

**Frühe Entwicklungsschritte in der Pathogenese
der B-Zell-Lymphome vom mukosa-assoziierten
lymphatischen Gewebe (MALT) - Typ**

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

**vorgelegt von
Harald Bruno Gustav Seeberger
aus Marktredwitz**

Würzburg, 2000

Eingereicht am: 4. 10. 2000

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Goebel

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

Gutachter: PD Dr. Gert Pflugfelder

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

I. EINLEITUNG	1
1. DIE B- UND T-ZELLEN DES IMMUNSYSTEMS	2
1.1 Die Aufgaben der B- und T-Zellen.....	2
1.2 Die Antigenerkennung über B-Zell-Rezeptor (BCR) bzw. T-Zell-Rezeptor (TCR).....	3
2. DIE NORMALE ENTWICKLUNG VON B-ZELLEN	4
2.1 Die Kontrollmechanismen der B-Zell-Entwicklung.....	4
2.2 Das Instrument der T-Zell-Kontrolle: Fas (CD95, APO-1)-vermittelte Apoptose	10
3. DIE MALT-TYP LYMPHOME UND DLBL	13
3.1 Die Entstehungsvoraussetzung: Anlage von sekundärem lymphatischem Gewebe (MALT).....	13
3.2 Die Tumorzellen und ihre Progression	13
3.3 Die Pathologie	14
3.4 Der Einfluss von Antigen- und T-Zell-Stimulation auf die malignen B-Zellen	14
3.5 Das Paradoxon der MALT-Typ Lymphomgenese	16
4. DIE AUFGABENSTELLUNG.....	16
II. MATERIAL UND METHODEN.....	18
1. MATERIAL	18
1.1 Untersuchte Lymphome.....	18
1.2 Die wichtigsten Puffer und Lösungen.....	20
1.3 Oligonukleotide	23
1.4 Größenstandards	24
1.5 Arbeitsgeräte.....	25
2. METHODEN.....	26
2.1 Methoden zur Untersuchung tumor-infiltrierender T-Zellen.....	26
2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus tiefgefrorenem Tumorgewebe	26
2.1.2 cDNA-Synthese	26
2.1.3 GAPDH-PCR.....	27
2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.1.5 T-Zell-Rezeptor (TCR) V β -familienspezifische RT- PCR	28
2.1.6 TCR-Analysen	30
2.1.7 Klonierung und Sequenzierung der CDR3-Region des TCR.....	32
2.1.8 Einstellen der cDNA für eine semiquantitative RT-PCR.....	36

2.1.9 Semiquantitative FasL-spezifische RT- PCR an tumor-infiltrierenden T-Zellen.....	36
2.2 Methoden zur Untersuchung maligner und normaler B-Zellen.....	38
2.2.1 Immunomagnetische Isolierung maligner B-Zellen.....	38
2.2.2 Immunomagnetische Isolierung normaler T- und B-Zellen aus Tonsillen.....	38
2.2.3 Zellkultur	39
2.2.3.1 Zellzahlbestimmung nach Neubauer.....	39
2.2.3.2 Aktivierung von normalen T-Zellen über anti-CD3-Stimulation.....	39
2.2.3.3 T/B-Zell-Kokultur	40
2.2.4 FACS-Analyse	41
2.2.4.1 Reinheitskontrolle isolierter Zellen	42
2.2.4.2 Messung von Fas-Expression und Apoptoserate (7-AAD-Versuch) maligner B-Zellen	44
2.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus B-Zellen nach der T/B-Zell-Kokultur und daran anschließende cDNA-Synthese	45
2.2.6 Untersuchung der Expression apoptose-relevanter Gene mittels Multiplex RT-PCR.....	46
2.2.7 Densitometrische Auswertung der Multiplex RT-PCR.....	47
2.2.8 Fas-spezifische RT-PCR.....	47
2.2.9 Klonierung und Sequenzierung von Fas cDNA maligner B-Zellen	49
2.2.10 Isolierung von Gesamtprotein aus B-Zellen nach T/B-Zell-Kokultur	49
2.2.11 Polyacrylamid - Gelelektrophorese (PAGE)	49
2.2.12 Semi-dry Transfer (blotting) der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran.....	51
2.2.13 Immunoblotting	51
2.2.14 Immunopräzipitation von löslichem Fas (sFas).....	53
III. ERGEBNISSE.....	54
1. DAS T-ZELL-REPERTOIRE VON PATIENTEN MIT MALT-TYP LYMPHOM ZEIGT ANTIGEN-INDUZIERT KLONALE T-ZELL-EXPANSIONEN.....	54
2. DIE TUMOR-INFILTRIERENDEN T-ZELLEN ZWEIER PATIENTEN MIT MALT-TYP LYMPHOM BESITZEN ÄHNLICHE ANTIGENERKENNUNGSSTELLEN.....	57
3. FASL MRNA WIRD IN MALT-TYP LYMPHOMEN IN VIVO VON T-ZELLEN EXPRIMIERT	60
4. DER T-ZELL-EINFLUSS STEIGERT DIE FAS-EXPRESSION NORMALER GEDÄCHTNIS-B-ZELLEN UND MALIGNER B-ZELLEN AUS MALT-TYP LYMPHOMEN	62

5. EINIGE MALT-TYP LYMPHOME UND FAST ALLE UNTERSUCHTEN DLBL ZEIGEN VERMINDERTE SENSITIVITÄT GEGENÜBER T-ZELL INDUZIERTER, FAS/FASL-VERMITTELTER APOPTOSE	65
6. DER T-ZELL-EINFLUSS VERHINDERT DIE SPALTUNG VON PARP IN MALIGNEN B-ZELLEN ...	70
7. DIE EXPRESSION APOPTOSE-RELEVANTER GENE IN NORMALEN UND MALIGNEN B-ZELLEN ZEIGT KEIN CHARAKTERISTISCHES MUSTER IN APOPTOSE-RESISTENTEN B-ZELLEN	72
8. EINIGE MALIGNEN B-ZELLEN EXPRIMIEREN MRNA FÜR LÖSLICHES FAS (SOLUBLE FAS, sFAS), JEDOCH KEIN PROTEIN	74
9. MALT-TYP LYMPHOME WEISEN MUTATIONEN IN FAS-TRANSKRIPTEN MALIGNER B-ZELLEN AUF	77
10. ZUSAMMENFASSENDE ERGEBNISTABELLE	83
IV. DISKUSSION.....	84
1. TUMOR-INFILTRIERENDE T-ZELLEN SIND WICHTIGE BESTANDTEILE DER MALT-TYP LYMPHOME	84
2. DIE RESISTENZ GEGENÜBER FAS-VERMITTELTER APOPTOSE KÖNNTE AUF MUTATIONEN IN DEN FAS-TRANSKRIPTEN MALIGNER B-ZELLEN ZURÜCKZUFÜHREN SEIN	87
3. FAS-MUTATIONEN UND APOPTOSE-RESISTENZ SIND CHARAKTERISTIKA DER FRÜHEN MALT- TYP LYMPHOMGENESE	95
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	98
VI. SUMMARY	100
VII. LITERATURVERZEICHNIS.....	101
VIII. ANHANG.....	113
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	113
LEBENS LAUF	117
PUBLIKATIONEN	118

I. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigte sich mit B-Zell-Lymphomen vom mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT)-Typ. Diese Tumoren aus Zellen des menschlichen Immunsystems können an verschiedenen Stellen des Körpers aus einer chronisch entzündlichen Vorläufererkrankung heraus entstehen. Das Charakteristikum der MALT-Typ Lymphome ist ihr langsames, wenig aggressives Wachstum und ihre offensichtliche Abhängigkeit von einer T-Zell-vermittelten Immunstimulation. Die Ursache der eigentlichen Tumorentstehung ist bislang unbekannt. Das Ziel meiner Arbeit war es daher, mit Hilfe von molekular- und zellbiologischen Methoden einen Beitrag zum Verständnis der MALT-Typ Lymphomgenese zu leisten.

Die hier vorgestellte Untersuchung ist in zweifacher Hinsicht eine immunologische Studie: zum einen wird die Frage der Tumorimmunität, also der Reaktion des Immunsystems auf den Tumor bearbeitet, zum anderen die Frage einer tumorbedingten Veränderung der normalen immunologischen B/T-Zell-Interaktion.

Um den immunologischen Hintergrund dieser Arbeit zu verstehen, werden in der Einleitung zunächst Aufbau und normale Funktion des menschlichen Immunsystems dargestellt. Die Beschreibungen konzentrieren sich auf die hier relevanten B- und T-Zellen und deren Interaktion. Darauf folgt die Darstellung des Entwicklungsweges von B-Zellen sowie der verschiedenen Selektionsmechanismen, welche das Schicksal heranreifender B-Zellen entscheidend beeinflussen. Am Ende der Einleitung werden dann die Besonderheiten maligner B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen beschrieben.

1. Die B- und T-Zellen des Immunsystems

Das hochentwickelte menschliche Immunsystem dient zum Schutz vor eindringenden Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten und kann darüber hinaus unter bestimmten Umständen Krebszellen des eigenen Organismus spezifisch abtöten. Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl spezialisierter Zellen, die im Blut und den lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz und Rachenmandeln patrouillieren. Die wichtigsten zellulären Komponenten werden als B- und T-Zellen bezeichnet. Dies sind morphologisch kaum unterscheidbare Leukozyten. Sie besitzen jedoch unterschiedliche Entwicklungswege und Aufgaben und exprimieren jeweils charakteristische Zelloberflächenmarker (cluster of differentiation, CD), die eine immunhistologische Unterscheidung erlauben.

- B-Zellen haben ihre Bezeichnung von der *Bursa fabricii*, einem speziellen Organ der B-Zell-Erzeugung bei Vögeln erhalten. Beim Menschen entstehen die B-Zellen im Knochenmark. Dort durchlaufen sie ihre ersten Entwicklungsschritte, bevor sie in den peripheren Blutkreislauf entlassen werden. B-Zellen exprimieren den Zelloberflächenmarker CD19.
- T-Zellen werden ebenfalls im Knochenmark gebildet und wandern in einem frühen Entwicklungsstadium in den Thymus, von dem sie auch ihre Bezeichnung erhalten haben. Dort reifen sie aus und gelangen schließlich ebenfalls in den peripheren Blutkreislauf. T-Zellen sind durch die Expression des Zelloberflächenmarkers CD3 charakterisiert.

1.1 Die Aufgaben der B- und T-Zellen

B-Zellen (CD19⁺) sind für die humorale Immunität verantwortlich: sie produzieren als Plasmazellen vor allem lösliche und in geringerem Maße auch membranständige Antikörper. Die Antikörper binden hochspezifisch an definierte Antigene (Proteinstrukturen) eindringender Krankheitserreger. Dadurch werden die Erreger entweder gebunden und neutralisiert oder für ihre Aufnahme durch Makrophagen, die Fresszellen

des Immunsystems, markiert. T-Zellen dagegen vermitteln eine zellgebundene Immunität. Man unterscheidet cytotoxische T-Zellen ($CD3^+$, $CD8^+$) und T-Helferzellen ($CD3^+$, $CD4^+$). Die cytotoxischen T-Zellen eliminieren die mit Krankheitserregern befallenen Körperzellen und unter Umständen auch Tumorzellen, indem sie diese mit Cytotoxinen (Perforin, Granzym) gezielt abtöten. Bei den T-Helferzellen unterscheidet man T_H1 -Zellen, die auf die Aktivierung von Makrophagen, und T_H2 -Zellen, die auf die Aktivierung von B-Zellen spezialisiert sind. T_H2 -Zellen, welche die B-Zellen in ihren Aufgaben unterstützen und kontrollieren, spielen sowohl in der normalen Entwicklung von B-Zellen als auch im Zusammenhang mit der Entstehung eines B-Zell-Lymphoms vom MALT-Typ eine wichtige Rolle.

1.2 Die Antigenerkennung über B-Zell-Rezeptor (BCR) bzw. T-Zell-Rezeptor (TCR)

Die Grundlage für eine erfolgreiche Arbeit von sowohl B- als auch T-Zellen ist ihre Fähigkeit, die enorme Antigenvielfalt verschiedenster Krankheitserreger zu erkennen. Darüberhinaus müssen diese Antigene von den nicht minder vielfältigen körpereigenen Antigenen unterschieden werden, um Immunreaktionen gegen das eigene Körpergewebe (Autoimmunität) zu vermeiden. Die Antigenerkennung erfolgt bei B- und T-Zellen in sehr ähnlicher Weise über den B-Zell-Rezeptor (BCR) bzw. T-Zell-Rezeptor (TCR). Dies sind Transmembranproteine mit einem extrazellulären Anteil für die Antigenbindung und einem intrazellulären Anteil zur Weiterleitung eines durch Antigenbindung induzierten Signals ins Zellinnere. Um die sehr große Zahl aller denkbaren Antigene zu erkennen und zu binden, benötigen BCR und TCR eine äußerst hohe Variabilität in ihrer Antigenerkennungsstelle (complementary determining region, CDR). Diese Variabilität wird zunächst in jeder heranreifenden B- oder T-Zelle durch eine kombinatorische Zusammenstellung verschiedener Gensegmente realisiert. Ein Prozess, der als somatische Rekombination bezeichnet wird.

Der Antigenrezeptor von T-Zellen, die den Thymus verlassen haben, ist durch die somatische Rekombination fertig gestellt und wird nicht mehr verändert. Der Antigenrezeptor von im Blut zirkulierenden B-Zellen wird dagegen unter Antigenkontakt in den Follikeln des Lymphgewebes immer weiter optimiert. Diese so genannte Affinitäts-

reifung der B-Zellen ist ein Darwinscher Selektionsprozess, bei dem B-Zellen auf ihre erfolgreiche Antigenbindung hin selektiert werden. Es entstehen so B-Zellen mit immer besserer und schließlich maximaler Bindungsaffinität zu den Antigenen des jeweils eindringenden Krankheitserregers. Diese selektierten B-Zellen differenzieren sich mit der Hilfe von T-Zellen entweder zu langlebigen Gedächtnis-B-Zellen oder zu antikörperproduzierenden Plasmazellen (Janeway und Travers 1997).

2. Die normale Entwicklung von B-Zellen

B-Zellen beginnen ihren langen Entwicklungsweg im Knochenmark und beenden ihn in den Follikeln der peripheren lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten. Die B-Zellen entstehen aus einer Knochenmarkstammzelle, die sich zu einer unreifen B-Zelle entwickelt, aus der dann unter Antigenkontakt eine reife B-Zelle entsteht. Alle Stufen der B-Zell-Entwicklung sind über das Immunprofil der Zellen charakterisierbar (vgl. Abbildung 1). Die B-Zelle ist auf ihrem Weg vom Knochenmark zur Peripherie je nach Entwicklungsstadium verschiedenen positiven und negativen Selektions- oder Kontrollmechanismen unterworfen. Insgesamt gesehen überwiegt dabei der Einfluss negativer Selektionsmechanismen, so dass nur ein kleiner Bruchteil aller neu entstehenden B-Zellen überlebt und den Entwicklungsweg bis zum Ende durchläuft. Mit dieser rigorosen negativen Selektion stellt der Organismus sicher, dass nur die am besten geeigneten B-Zellen überleben und entweder als Plasmazellen Antikörper produzieren oder als Gedächtnis-B-Zellen das immunologische Gedächtnis bilden (vgl. Abbildung 1).

2.1 Die Kontrollmechanismen der B-Zell-Entwicklung

In der frühen B-Zell-Entwicklung entscheiden zellinterne Faktoren über Leben oder Tod der B-Zelle. Es geht darum, ob die Zelle in der Lage ist, einen Antigenrezeptor zu exprimieren. Dazu sind zunächst zwei aufeinanderfolgende genetische Rearrangements der Immunglobulin-Gene nötig (Burrows und Cooper 1997; Papavasiliou et al. 1997; von Boehmer und Rajewsky 1997). Wenn das erste Rearrangement im Immunglobulinlocus der

schweren (heavy) Kette (IgH-Locus) erfolgreich abläuft, präsentiert die Zelle einen prä-B-Zell-Rezeptor (pBCR) auf ihrer Oberfläche. Dies ist die Voraussetzung für ein zweites Rearrangement, das jetzt im Immunglobulinlocus der leichten (light) Kette (IgL-Locus) stattfindet und zur Produktion des fertigen BCR führt, der in Form von Immunglobulin M (IgM) auf der Zelloberfläche erscheint. Die Zelle wird jetzt als unreife B-Zelle bezeichnet und gelangt in die Peripherie. Beim Verlassen des Knochenmarks exprimiert die B-Zelle neben IgM auch IgD. Sie wird jetzt als naive B-Zelle bezeichnet, weil sie noch nicht auf körperfremdes Antigen getroffen ist.

Für die nun folgende B-Zell-Entwicklung in der Peripherie (vgl. Abbildung 1) sind zwei Einflüsse aus der Umgebung der B-Zellen von großer Bedeutung: Antigen und T-Zellen. Um überleben zu können, benötigen die B-Zellen neben Antigenstimulation an ihrem BCR auch T-Zellen gleicher Antigenspezifität, die ein Überlebenssignal (CD40 Ligand, CD40L) für sie bereitstellen (Clark und Ledbetter 1994; Janeway und Travers 1997). Dies ist ein Sicherungsmechanismus gegen autoreaktive B-Zellen, die irrtümlicherweise auf körpereigenes Antigen ansprechen. Ist dies nicht der Fall, so werden die B-Zellen im Verlauf einer Immunantwort von den T-Zellen des lymphatischen Gewebes weiter aktiviert. Einige B-Zellen differenzieren sich dabei direkt zu Plasmazellen, die die frühe Versorgung mit zirkulierenden Antikörpern sicherstellen. Andere wandern in die primären Lymphfollikel des lymphatischen Gewebes, wo sie die Keimzentren (vgl. Abbildung 2 A) bilden (Camacho et al. 1998; Lindhout et al. 1997). Zunächst proliferieren die jetzt als Centroblasten bezeichneten B-Zellen in der dunklen Zone des Keimzentrums. In diesem Stadium findet die somatische Hypermutation ihrer Immunglobulingene statt: mit hoher Mutationsrate entstehen Punktmutationen in den Bereichen der Immunglobulingene, die die Antigenerkennungsstelle des BCR codieren. Bei den Nachkommen der ursprünglich aktivierten B-Zelle wird dadurch die Variabilität des BCR sehr stark erhöht. Die so erzeugten B-Zellen proliferieren nicht mehr und werden als Centrocyten bezeichnet. Sie wandern in die helle Zone des Keimzentrums, wo ihnen von follikulären dendritischen Zellen (FDC) Antigen eingedrungener Krankheitserreger präsentiert wird. B-Zellen, deren Rezeptor dieses Antigen nicht oder nicht fest genug bindet, sterben ab (vgl. Abbildung 2 B). Wenn sie jedoch vorher irrtümlicherweise T-Zell-Hilfe über CD40-Ligation erhalten haben, werden sie von T-Zellen über Fas-Ligation in den programmierten Zelltod (Apoptose) getrieben (vgl. Abbildung 2 C). Dieser Mechanismus verhindert das Überleben von „bystander“ B-Zellen.

B-Zellen, deren Rezeptor das von den FDC präsentierte Antigen bindet, benötigen für ihr Überleben ebenfalls die über CD40-Ligation vermittelte Hilfe der T-Zellen (vgl. Abbildung 2 D). Mit diesen grundlegenden Mechanismen, nämlich CD40-Ligation als Überlebenssignal und Fas-Ligation als Todessignal, selektieren die T-Zellen diejenigen B-Zellen mit den besten Antigenrezeptoren und töten autoreaktive oder erfolglose B-Zellen (Janeway und Travers 1997; Rajewsky 1996).

Abbildung 1:

Entwicklungsstadien der B-Zellreifung. Die Darstellung von Immunprofil und Selektionsmechanismen erfolgte nach Choe et al. (1996) bzw. Nossal et al. (1994). sIg: Immunglobulin auf der Zelloberfläche (surface Ig). cIg: Immunglobulin im Cytoplasma.

<u>Lokalisation</u>	zentral Knochenmark		peripher Blut und Lymphgewebe		
<u>Reifegrad</u>	unreif	naiv	reif		
<u>Zuordnung</u>	Knochenmark	präfollik.	follikulär	postfollikulär	
<u>Zelltyp</u>	unreife B-Zelle	Mantelzonenzelle	Centroblast/ Centrocyt	Gedächtnis-B-Zelle	Plasmazelle
<u>Immun-Profil</u>	sIg ⁻ IgD ⁻ CD38 ⁺	sIg ⁺ IgD ⁺ CD38 ⁻ CD44 ⁺ CD77 ⁻ Fas ⁽⁺⁾	sIgM ⁽⁺⁾ IgD ⁻ CD38 ⁺ CD44 ⁻ CD77 ⁻ Fas ⁺	sIgM ⁺ IgD ⁻ CD38 ⁻ CD44 ⁺ CD77 ^{+/-} Fas ⁽⁺⁾	sIg ⁻ cIg ⁺ CD38 ⁺ CD44 ⁻ CD77 ⁻ Fas ⁻
<u>positive Selektion</u>	erfolgreiche Ig Gen-Rearrangements	B C R – v e r m i t t e l t e s S i g n a l			
<u>negative Selektion</u>	missglückte Ig Gen-Rearrangements	Fas/FasL fehlende T-Zell-Hilfe	Fas/FasL fehlende Antigen-Bindung	Fas/FasL fehlende T-Zell-Hilfe	begrenzte Lebensdauer (unbek. Ursache)

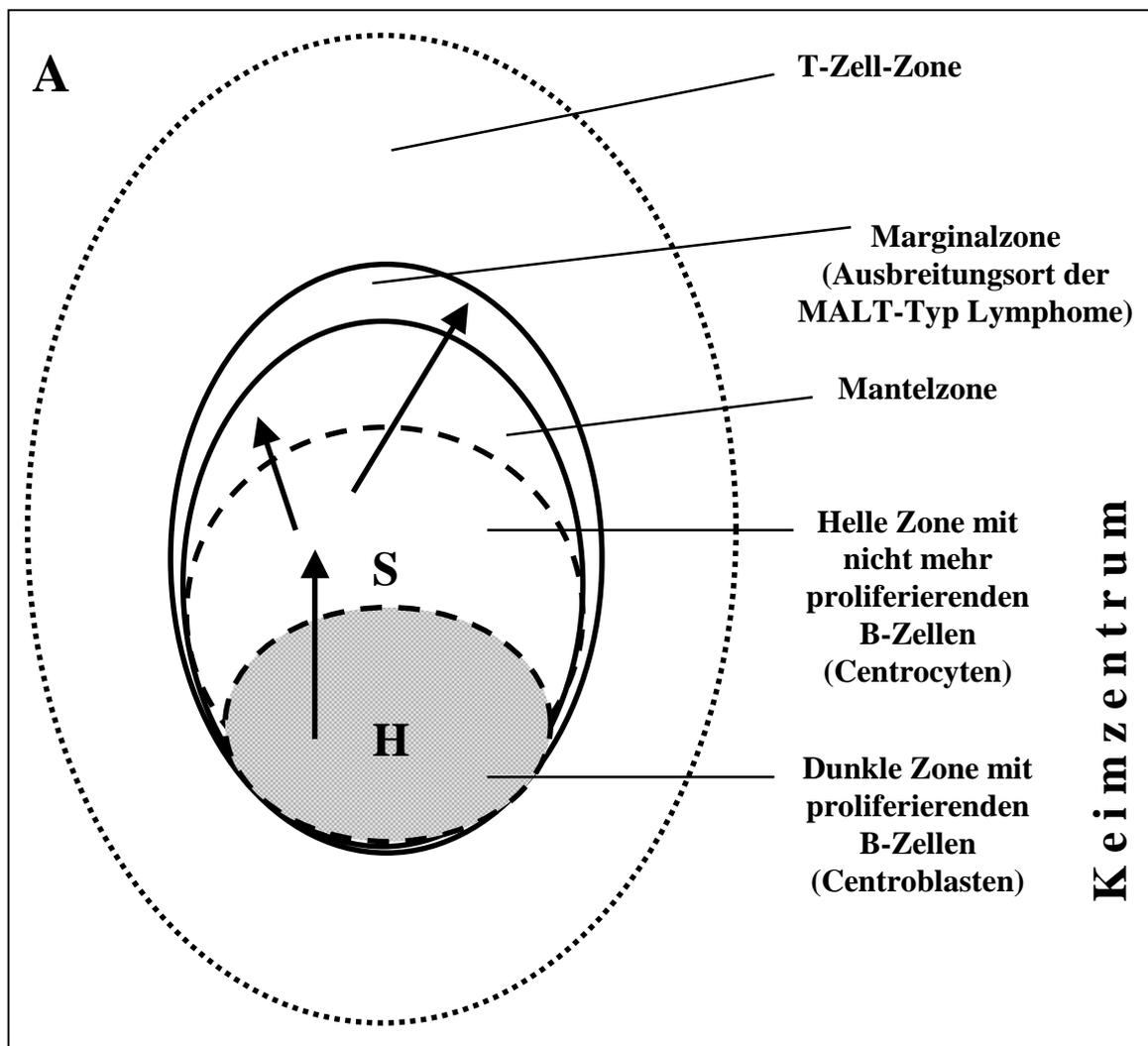
Abbildung 2:**Das Keimzentrum und die Mechanismen der Selektion von B-Zellen im Keimzentrum (Liu et al. 1997).**

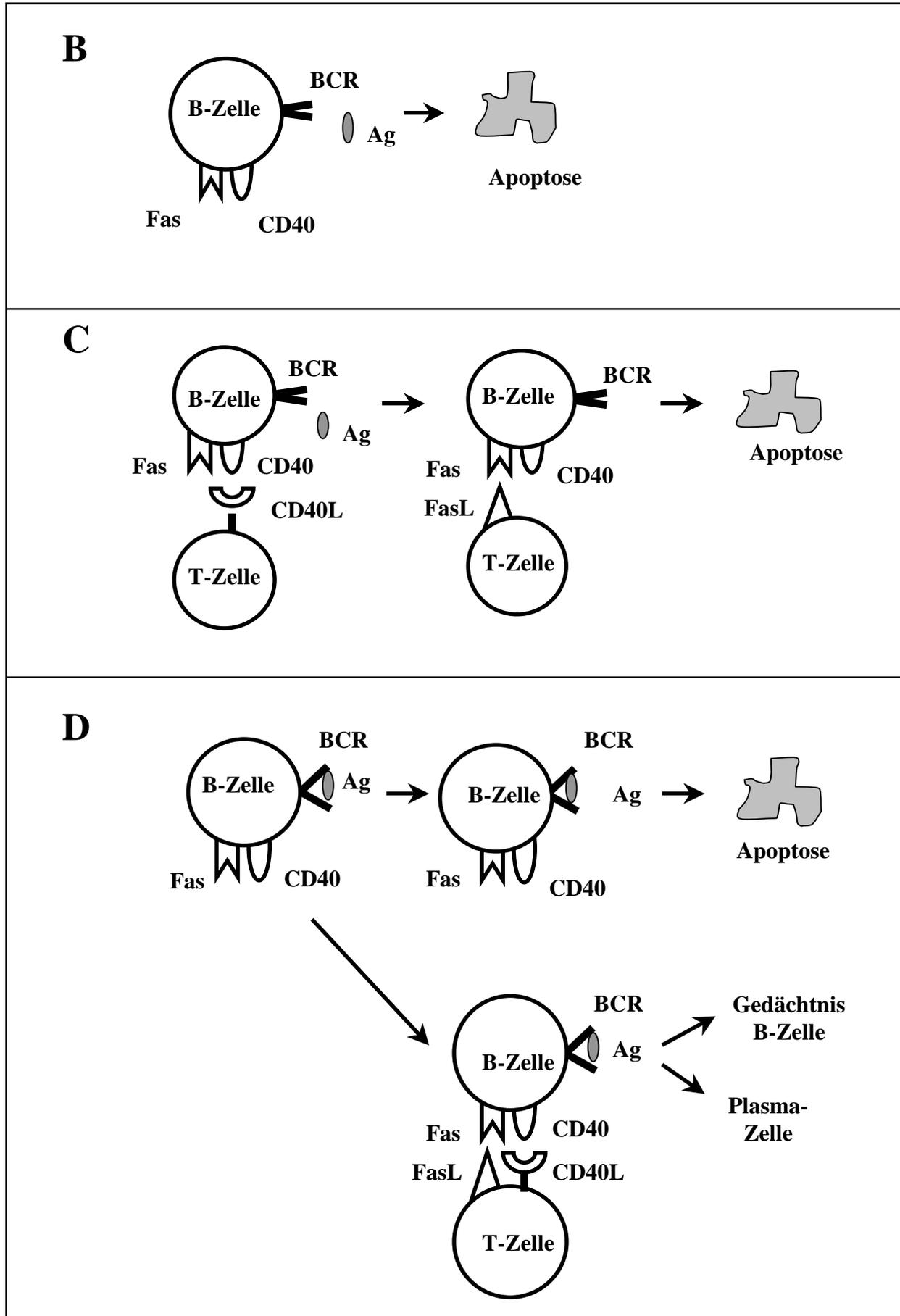
(A): Schematischer Aufbau eines Lymphfollikels mit Keimzentrum und umgebender T-Zell-Zone (Janeway und Travers 1997). Die Pfeile zeigen den Weg der B-Zellen. Das Keimzentrum ermöglicht zwei wichtige immunologische Prozesse, die in der dunklen bzw. hellen Zone des Keimzentrums stattfinden: die somatische Hypermutation (H) zur Erhöhung der Variabilität der Antigen-Rezeptoren von B-Zellen, und die daran anschließende positive Selektion (S) derjenigen B-Zellen mit den besten Rezeptoren.

(B): Eine B-Zelle, die wegen eines niedrig-affinen BCR kein Antigen binden kann, geht in Apoptose.

(C): Eine B-Zelle mit niedrig-affinen BCR kann aber auch über CD40 Ligation versehentliche, so genannte „bystander“-Hilfe von T-Zellen bekommen. Sie überlebt daher zunächst und wird später über Fas Ligation eliminiert.

(D): Eine B-Zelle mit hoch-affinen BCR und gebundenem Antigen überlebt zunächst ohne jede Hilfe. Für längeres Überleben benötigt jedoch auch sie CD40 Ligation (die dann auch gleichzeitig zusammen mit Fas Ligation stattfinden kann, ohne dass Apoptose induziert wird).





2.2 Das Instrument der T-Zell-Kontrolle: Fas (CD95, APO-1)-vermittelte Apoptose

Die Fas-vermittelte Apoptose ist der wichtigste Kontrollmechanismus der T-Helfer-Zellen zur Eliminierung von nicht mehr benötigten, erfolglosen oder autoreaktiven B-Zellen (Boise und Thompson 1996). Die große Bedeutung der Fas-vermittelten Apoptose für die Homöostase im Immunsystem konnte an Patienten mit Defekten im Fas-Gen gezeigt werden. Initial kommt es dabei zu einer massiven Anhäufung von Lymphozyten in der Peripherie sowie zur Ausbildung von autoimmunen Erkrankungen (Nagata 1997).

Fas gehört zu den Todesrezeptoren der Zelle und ist ein Transmembranprotein mit einer cysteinreichen extrazellulären Domäne (Smith et al. 1994) und einer speziellen intrazellulären Todesdomäne (Nagata 1997). Das Todessignal wird durch die Bindung eines Liganden (hier: FasL, CD95L) an Fas ausgelöst und über eine Kaskade von Caspasen vermittelt und verstärkt (vgl. Abbildung 3). Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Proteine hinter bestimmten Aspartat-Resten schneiden (Cystein-Aspasen).

Die Bindung von FasL-Trimeren an ebenfalls schon in trimerer Form vorliegende Fas-Moleküle führt zu einer Vernetzung (clustering) von Fas, die auf noch unbekannte Weise das eigentliche Todessignal initiiert (Chan et al. 2000; Siegel et al. 2000). Auf der cytoplasmatischen Seite von Fas lagert sich jetzt das Adaptorprotein FADD (Fas-associated protein with death domain) an die vernetzten Fas-Moleküle (Chinnaiyan et al. 1995). FADD wiederum bindet mehrere Moleküle der inaktiven Form von Caspase-8, die sich durch gegenseitige Spaltung aktivieren (Muzio et al. 1998). Dann erfolgt die kaskadenartige Aktivierung weiterer so genannter Effektor-Caspasen, die ihrerseits schließlich eine Vielzahl von Substraten zerstören, die für die Aufrechterhaltung der zellulären Lebensfähigkeit wichtig sind. Darunter sind beispielsweise Bestandteile des Cytoskeletts (Takahashi et al. 1996), negative Regulatoren der Apoptose wie Bcl-2 (Cheng et al. 1997; Xue und Horvitz 1997) und auch DNA-Reparaturenzyme wie Poly-ADP Ribose Polymerase (PARP).

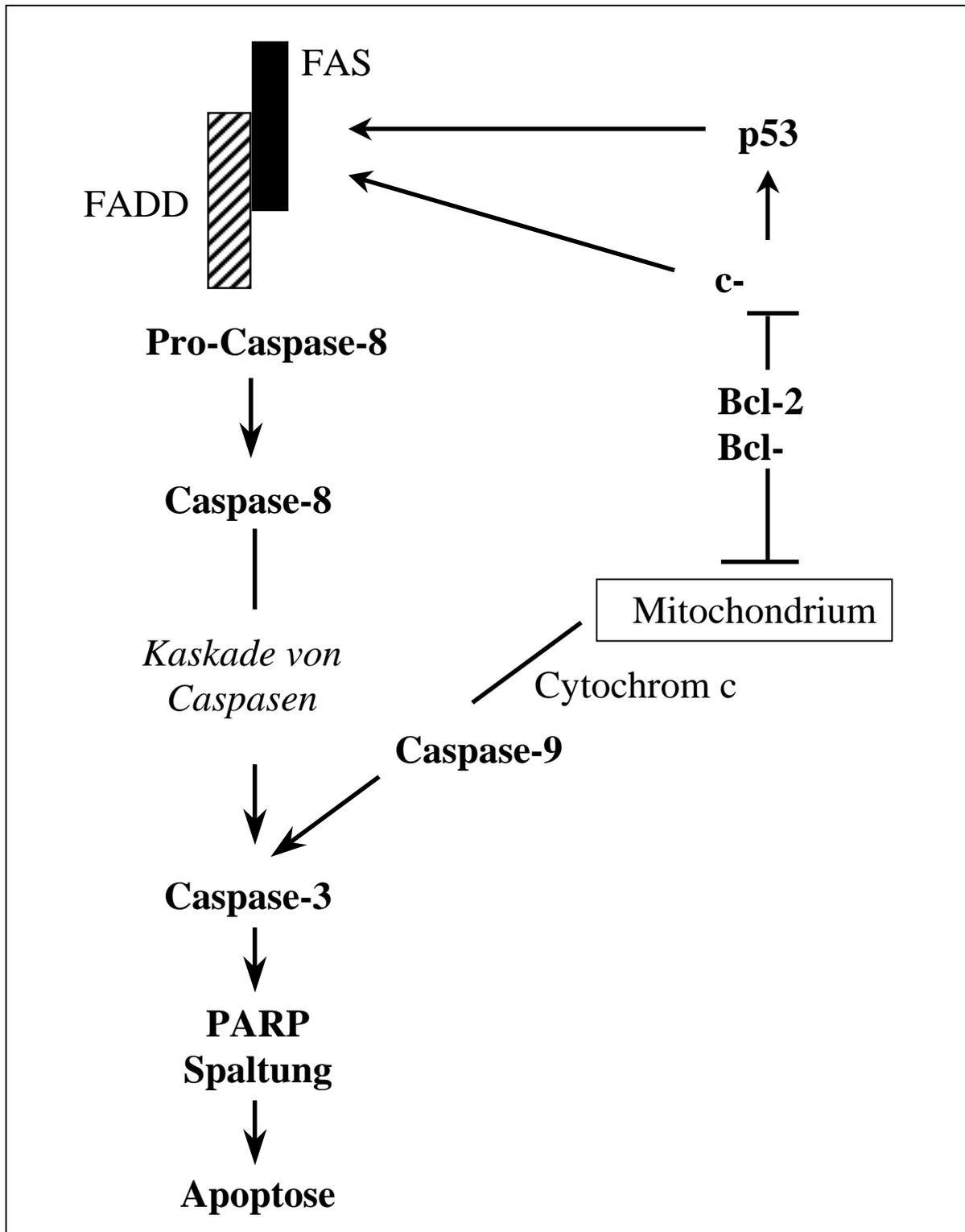
Komplex wird das beschriebene System durch zusätzliche Regelungsmechanismen oder einmündende alternative Apoptosewege, die etwa unter Beteiligung der Mitochondrien ablaufen und zur Freisetzung von Cytochrom c führen. Dadurch werden Pro-Caspase-9 und unmittelbar danach Pro-Caspase-3 aktiviert (Li et al. 1997). Die als Regelglieder

fungierenden anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie wie Bcl-2 und Bcl-xL verhindern zum einen die Freisetzung von Cytochrom c (Adams und Cory 1998; Kluck et al. 1997), zum anderen binden sie an Caspasen und verhindern so deren Aktivierung (Reed 1997). Weiterhin wurde für Bcl-2 gezeigt, dass es auch die von dem Proto-Oncogen c-myc vermittelte Apoptose verhindert (Bissonnette et al. 1992), die beim Entzug zellulärer Wachstumsfaktoren abläuft und in engem Zusammenhang mit der Expression von Fas steht (Hueber et al. 1997). Das Proto-Oncogen c-myc ist daneben auch ein Transkriptionsfaktor des Tumorsuppressors p53 (Roy et al. 1994). Das Protein p53 kann nach massiven Schädigungen der zellulären DNA die Fas-vermittelte Apoptose unterstützen, indem es Fas-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert (Bennett et al. 1998) und die Zelle somit empfänglich für Fas-vermittelte Todessignale macht.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Störungen der Apoptose für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und malignen Tumoren von der gleichen Bedeutung sind wie Störungen der Zellproliferation. In beiden Fällen kommt es zu einer unbeabsichtigten Akkumulation von Zellen (Thompson 1995).

Abbildung 3:

Die Fas-Signalkaskade in vereinfachter Darstellung. Fas leitet das Signal über ein Adaptorprotein (FADD) weiter an Pro-Caspase-8, die gespalten und damit aktiviert wird und ihrerseits weitere Effektor-Caspasen aktiviert. Caspase-3 schließlich spaltet das Substrat Poly-ADP Ribose Polymerase (PARP).



3. Die MALT-Typ Lymphome und DLBL

3.1 Die Entstehungsvoraussetzung: Anlage von sekundärem lymphatischem Gewebe (MALT)

Die Bezeichnung MALT-Typ Lymphom weist auf eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung dieser Tumoren hin: die Anlage von sekundärem mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT). Sekundäres MALT entsteht erst im Rahmen einer chronischen Entzündung in endodermalen Organen, die von sich aus kein lymphatisches Gewebe aufweisen (Müller-Hermelink et al. 1995). Die Auslöser der zugrunde liegenden Entzündungsreaktion sind sehr vielfältig. Dies können sowohl autoimmune Erkrankungen sein, wie das Sjögren-Syndrom der Speicheldrüse oder die Hashimoto-Thyreoiditis, als auch Infektionen wie eine *Helicobacter pylori*-induzierte Gastritis (Isaacson 1993). Dabei kann es während einer oftmals Jahre andauernden, chronischen Entzündung zu einer malignen Entartung von B-Zellen des sekundären lymphatischen Gewebes kommen.

3.2 Die Tumorzellen und ihre Progression

Die malignen B-Zellen der MALT-Typ Lymphome entsprechen morphologisch und immunologisch den Gedächtnis-B-Zellen (Harris et al. 1994). Die Tumoren breiten sich in der Marginalzone eines Lymphfollikels aus (vgl. Abbildung 2 A) und entwickeln sich in der Regel als MALT-Typ Lymphome, die im Rahmen einer Tumorprogression auch in primär großzellige B-Zell-Lymphome (diffuse large B cell lymphoma, DLBL) transformiert werden können (Chan et al. 1990). Diese Tumoren wurden früher als hochmaligne MALT-Typ Lymphome bezeichnet. Es ist aber auch möglich, dass ein DLBL ohne vorhergehendes MALT-Typ Lymphom durch eine *de-novo*-Transformation von B-Zellen entsteht.

3.3 Die Pathologie

MALT-Typ Lymphome wachsen zunächst flächenhaft in der betroffenen Schleimhaut, dabei bilden sie einen breiten Saum um die reaktiven Lymphfollikel mit den Keimzentren. Ein wichtiger Hinweis auf Malignität ist das invasive und destruktive Wachstum der Lymphomzellen: es kommt zu lymphoepithelialen Läsionen, die durch eine Infiltration und Zerstörung des Drüsenkörpers charakterisiert sind. Im Verlauf der Lymphomprogression dringt der Tumor auch in die Lymphfollikel mit den Keimzentren ein und es kommt zur follikulären Kolonisierung (Isaacson et al. 1991). Das MALT-Typ Lymphom ist in charakteristischer Weise mit reaktiven Lymphfollikeln vergesellschaftet, sowohl bei seiner Ausbreitung in der Schleimhaut, als auch bei seinem Eindringen in tiefere Wandschichten. Eine charakteristische genetische Aberration der MALT-Typ Lymphome ist die chromosomale Translokation $t(11;18)(q21;q21)$, die in etwa 50 % der Fälle auftritt (Ott et al. 1997).

DLBL dagegen sind oft schon makroskopisch als knotige, umgrenzte und zentral ulzerierte Tumoren sichtbar, die selten lymphoepitheliale Läsionen aufweisen. Sie werden auch nicht von reaktiven Lymphfollikeln, sondern von einem Infiltrat aus Makrophagen, T-Zellen und anderen Entzündungszellen begleitet.

3.4 Der Einfluss von Antigen- und T-Zell-Stimulation auf die malignen B-Zellen

Die MALT-Typ Lymphome des Magens stellen die häufigste und bislang am besten untersuchte Gruppe der MALT-Typ Lymphome dar. An ihnen lassen sich die beiden Phänomene Antigen- und T-Zell-Einfluss, die mit großer Wahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit der Lymphomgenese stehen, besonders gut studieren. Die bei MALT-Typ Lymphomen stets vorhandenen reaktiven Lymphfollikel waren ein erster Hinweis darauf, dass Antigen für die Proliferation der malignen B-Zellen von Bedeutung sein könnte. Frühere Studien untersuchten daher die Spezifität der Antigenrezeptoren der Lymphomzellen im Hinblick auf bakterielle Antigene (wie etwa von *Helicobacter pylori*). Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die malignen B-Zellen gastraler MALT-Typ

Lymphome nicht auf Antigene von *Helicobacter pylori* reagierten. Vielmehr zeigten sie eine Spezifität für sehr verschiedene Autoantigene (Greiner et al. 1998). In funktionellen Experimenten wurde mit Hilfe eines antiidiotypischen Antikörpers eine Antigenbindung an malignen B-Zellen eines gastralen MALT-Typ Lymphoms *in vitro* simuliert; dabei reagierten die Lymphomzellen mit einer deutlichen Wachstumssteigerung (Greiner et al. 1994a; Hussell et al. 1993). Somit konnte der positive Einfluss einer Antigenbindung für die Entwicklung von MALT-Typ Lymphomen belegt werden. Der Einfluss von Antigen hat sich darüber hinaus auch in dem genetischen Mutationsmuster der Immunglobulingene von Tumorzellen niedergeschlagen: es konnte gezeigt werden, dass die malignen B-Zellen oder ihre Vorläufer im Rahmen einer somatischen Hypermutation durch Antigen selektiert wurden (Qin et al. 1995) und dass dieser Prozess sogar im Tumor noch andauert (Qin et al. 1997).

Mit Hilfe eines antiidiotypischen Antikörpers wurde auch nach Vorläuferläsionen des Lymphoms gesucht. Interessanterweise fanden sich Lymphozyten, die mit diesem Antikörper reagierten, ausschließlich in der Magenschleimhaut von Patienten mit *Helicobacter pylori*-assoziierter Gastritis, nicht aber in der gesunden oder entzündeten Schleimhaut des Magens von Patienten, die frei von *Helicobacter pylori* waren (Greiner et al. 1994a). Dies bedeutet, dass eine Infektion mit *Helicobacter pylori* nicht nur die Entstehungsvoraussetzung für gastrale MALT-Typ Lymphome ist, sondern darüber hinaus für eine kontinuierliche Wachstumsstimulation der malignen B-Zellen sorgt. Antigene von *Helicobacter pylori* werden von den malignen B-Zellen nicht erkannt, wohl aber von den reaktiven tumor-infiltrierenden T-Zellen. Es wurde gezeigt, dass *Helicobacter pylori*-spezifische T-Zellen eine Art Überlebenshilfe für die Lymphomzellen leisten (Hussell et al. 1996). Dies geht offensichtlich so weit, dass ein durch die Eradikation von *Helicobacter pylori* bewirktes Verschwinden dieser T-Zellen sogar zur Regression von gastralen MALT-Typ Lymphomen führt (Bayerdörffer et al. 1995; Fischbach et al. 1997; Wother-spoon et al. 1993). Neuere Arbeiten haben die für den Tumor lebenswichtige Bedeutung der T-Zellen noch deutlicher gemacht. Es wurde gezeigt, dass die malignen B-Zellen für ihr Überleben *in vitro* mehrere wichtige T-Zell-vermittelte Signale wie CD40-Ligation und bestimmte Cytokine vom Th2-Typ benötigen (Greiner et al. 1997) und dass genau diese Signale auch *in vivo* von tumor-infiltrierenden T-Zellen bereitgestellt werden (Knörr et al. 1999).

3.5 Das Paradoxon der MALT-Typ Lymphomgenese

Zusammenfassend ergibt sich also bei MALT-Typ Lymphomen das komplexe Bild einer Wechselwirkung von tumor-infiltrierenden T-Zellen mit meist autoreaktiven malignen B-Zellen, die überraschenderweise in Tumorförderung resultiert. Es ist unklar, warum die autoreaktiven Vorläufer der MALT-Typ Lymphomzellen den negativen Selektionsmechanismen der T-Zellen entkommen konnten.

4. Die Aufgabenstellung

Diese Arbeit sollte sowohl tumor-infiltrierende T-Zellen als auch maligne B-Zellen der MALT-Typ Lymphome näher charakterisieren. Der gedankliche Hintergrund des experimentellen Ansatzes kann mit den folgenden Fragen umschrieben werden:

- Sind die tumor-infiltrierenden T-Zellen durch Antigen aktiviert und erkennen sie tumor-assoziierte Antigene?

Zunächst wurde im gesamten Repertoire tumor-infiltrierender T-Zellen verschiedener Patienten mit MALT-Typ Lymphomen nach klonalen Expansionen gesucht, um Hinweise auf eine mögliche Antigenstimulation dieser T-Zellen zu erhalten. Bei tumor-infiltrierenden T-Zellen aus zwei MALT-Typ Lymphomen unterschiedlicher Lokalisation und Vorläufererkrankung wurde der antigenbindende Bereich des T-Zell-Rezeptors kloniert und sequenziert, um Rückschlüsse auf die Art der stimulierenden Antigene ziehen zu können. Mit dieser Untersuchung sollte auch geklärt werden, ob die T-Zellen tumor-assoziierte Antigene erkennen können, was die Voraussetzung für eine mögliche Tumorabwehr wäre.

- Wie verhalten sich maligne B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen gegenüber aktivierten T-Zellen? Sind sie sowohl für T-Zell-Hilfe als auch für T-Zell-Kontrolle empfänglich, oder entziehen sie sich durch Apoptose-Resistenz der T-Zell-Kontrolle?

Hier wurde ein *in vitro* T/B-Zell-Kokultur-Ansatz entwickelt, der erstmals eine funktionelle Untersuchung des Einflusses von aktivierten T-Zellen auf maligne bzw. normale B-Zellen ermöglichte. Im Einzelnen wurde dabei der Einfluss auf das Überleben, die Fas-Expression, sowie die Expression einzelner apoptose-relevanter Gene bei malignen und normalen B-Zellen bestimmt. Nachdem maligne B-Zellen aus einigen MALT-Typ Lymphomen Resistenz gegenüber der T-Zell-induzierten, Fas-vermittelten Apoptose zeigten, wurde nach den Ursachen dieses Phänomens gesucht. Dabei stand die Frage nach der Funktionsfähigkeit des Fas-Moleküls und seiner Signalkaskade in den apoptose-resistenten malignen B-Zellen im Vordergrund.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Untersuchte Lymphome

In dieser Arbeit wurden 17 Patienten im Alter von 31 bis 74 Jahren untersucht (vgl. Tabelle 1). Bei zehn Patienten lag ein MALT-Typ Lymphom unterschiedlicher Lokalisation vor, bei sieben Patienten ein primär großzelliges B-Zell-Lymphom des Magens (diffuse large B cell lymphoma, DLBL). Die Diagnose erfolgte im Pathologischen Institut der Universität Würzburg anhand konventioneller Morphologie und Immunhistologie an Gefrier- und Paraffinschnitten gemäß der REAL-Klassifikation (Harris et al. 1994) bzw. der WHO-Klassifikation (Harris et al. 2000).

Ein Teil des nativen Tumorgewebes wurde nach der operativen Entfernung zugeschnitten und blockweise in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Diese Gefrierblöcke waren das Ausgangsmaterial für die Untersuchung tumor-infiltrierender T-Zellen.

Aus dem anderen Teil des nativen Tumorgewebes wurden Lymphozyten isoliert. Zunächst wurden kleingeschnittene Stücke des Gewebes durch sterile Gazenetze (Maschenweite 100 μm) in eine Petrischale mit Zellkulturmedium RPMI1640 (Linaris, Bettingen/Main) gedrückt. Aus dieser Zellsuspension wurde die Lymphozytenfraktion durch eine Ficoll-Gradientenzentrifugation isoliert, in PBS gewaschen und ebenfalls in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Aus den Lymphozyten wurden später die malignen B-Zellen spezifisch isoliert.

Tabelle 1:

Untersuchte Patienten

Nr	Patient	Diagnose / Stadium ¹	Lokalisation des Tumors	Geschlecht	Alter
1	4579/94	MALT-Lymphom / --	Speicheldrüse	W	66
2	10623/95	MALT-Lymphom / --	Speicheldrüse	W	61
3	H 3302/88	MALT-Lymphom / --	Lunge	-- ²	--
4	H 4145/91	MALT-Lymphom / --	Lunge	--	--
5	H 705/93	MALT-Lymphom / E I 1	Magen	M	66
6	H 4364/94	MALT-Lymphom / E I 2	Magen	M	59
7	H 1851/95	MALT-Lymphom / --	Schilddrüse	M	70
8	H 4236/95	MALT-Lymphom / E I 1	Magen	M	74
9	H 5690/95	MALT-Lymphom / E I 1	Magen	M	53
10	H 6006/95	MALT-Lymphom / --	Magen	W	69
11	22903/96	DLBL / E II 1	Magen	W	46
12	H 4365/94	DLBL / E I 2	Magen	M	31
13	H 5030/94	DLBL / E I 1	Magen	W	55
14	H 1479/95	DLBL / E II 1	Magen	M	74
15	H 4590/96	DLBL / E III	Magen	M	64
16	H 5503/96	DLBL / E II 1	Magen	M	32
17	H 4487/97	DLBL / --	Magen	M	--

¹ Stadium nach Musshoff, modifiziert von Radaszkiewicz et al. (1992)² keine Daten vorhanden

1.2 Die wichtigsten Puffer und Lösungen

Speziellere Puffer, Lösungen, sowie Antikörper und alle übrigen hier nicht aufgeführten Reagenzien und ggf. deren Bezugsquellen sind bei der Beschreibung der jeweiligen Experimente im Text angegeben.

Ampicillin:

- 50 mg/ml in Wasser

Ethidiumbromid:

- 40 mg/ml in Wasser (davon 40 µl für 2000 ml Laufpuffer 0,5 x TBE)

FACS-Puffer:

- PBS
- 0,01 % Natriumazid
- 10 % fetales Kälberserum (wurde unmittelbar vor Gebrauch zugegeben)

GET:

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

Ladepuffer (nativ) für Agarose-Gelelektrophorese (in TE):

- 0,05 % Bromphenolblau
- 0,05 % Xylencyanol
- 10 % Glycerin

Laemmli-Probenpuffer (Laemmli 1970):

- 60 mM Tris, pH 6,8
- 2 % SDS
- 100 mM DTT oder Mercaptoethanol
- 10 % Glycerin
- 0,01 % Bromphenolblau (wurde erst kurz vor dem Auftragen der Probe auf das Polyacrylamidgel zugegeben)

Laufpuffer (0,5 x TBE) für Agarose-Gelelektrophorese:

- 50 mM Tris
- 1 mM EDTA,
- 25 mM Borat

Laufpuffer (5x) für PAGE:

- 15,1 g Tris base
- 94,0 g Glycin
- 50 ml SDS (10 %)
- ad 1000 ml mit Wasser

LB-Agar mit Ampicillin

- 10 g NaCl
- 10 g Trypton
- 5 g Hefe-Extrakt
- 20 g Agar
- ad 1000 ml mit Wasser
- Einstellen auf pH 7,0 mit 5 N NaOH
- Nach dem Autoklavieren auf 55 °C abkühlen lassen, dann 5 ml sterilfiltriertes Ampicillin (10 mg/ml) zugeben.

LB-Medium mit Ampicillin:

- entspricht LB-Agar unter Weglassung des Agars.

Lysis-Puffer für die Plasmidisolierung (Minipräp):

- 0,2 M NaOH
- 1 % SDS

Low TE:

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 0,1 mM EDTA

NZY-Medium:

- 10 g NZ-Amin (Casein-Hydrolysat)
- 5 g Hefe-Extrakt
- 5 g NaCl
- ad 1000 ml mit Wasser
- Nach dem Autoklavieren Zugabe von 12,5 ml MgCl_2 (1,0 M) und 12,5 ml MgSO_4 (1,0 M) und 20 ml einer 20%-igen Glucoselösung, anschließend sterilfiltrieren.

PBS (phosphate buffered saline, pH 7,5):

- 1,15 g Na_2HPO_4
- 0,2 g KH_2PO_4
- 0,2 g KCl
- 8 g NaCl
- ad 1000 ml mit Wasser

TE:

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 1 mM EDTA

Transferpuffer für semi-dry Transfer:

- 48 mM Tris base
- 39 mM Glycin
- 0,037 % SDS
- 20 % Methanol

Trypanblau:

- 5 g/l Trypanblau
- 9 g/l NaCl in Wasser

X-Gal:

- 1 mg X-Gal in 50 µl Dimethylformamid

1.3 Oligonukleotide

Tabelle 2:

Verwendete Primer für die RT-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _m (°C)
GAPDH-For	GTGGAAGGACTCATGACCACAGTC	70
GAPD-Rev	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC	78
Cβ ¹	GGTGTGGGAGAATTCTGCTTCTGA	72
Vβ1 ¹	CCGCACAACAGTTCCTGACTTGC	76
Vβ2 ¹	GGCCACATACGAGCAAGGCGTCGA	78
Vβ3 ¹	CGCTTCTCCCGGATTCTGGAGTCC	78
Vβ4 ¹	TTCCCATCAGCCGCCCAAACCTAA	74
Vβ5 ¹	AGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCC	74
Vβ6 ¹	TCTCAGGTGTGATCCAAATTCGGG	72
Vβ7 ¹	CCTGAATGCCCAACAGCTCTCTC	76
Vβ8 ¹	CCATGATGCGGGGACTGGAGTTGC	78
Vβ9 ¹	TTCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGC	76
Vβ10 ¹	CCACGGAGTCAGGGGACACAGCAC	80
Vβ12 ¹	TGTCACCAGACTGGGAACCACCAC	76
Vβ13 ¹	CACTGCGGTGTACCCAGGATATGA	74
Vβ14 ¹	GGGCTCGGCTTAAGGCAGACCTAC	78
Vβ15 ¹	CAGGCACAGGCTAAATTCTCCCTG	74

V β 16 ¹	GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGG	74
V β 17 ¹	CTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCC	78
V β 18 ¹	TGCCCCAGAATCTCTCAGCCTCCA	76
V β 19 ¹	TCCTCTCACTGTGACATCGGCCCA	76
V β 20 ¹	TCTCAATGCCCAAGAACGCACCC	76
V β 21 ¹	TCCAACCTGCAAGGCTTGACGACT	74
V β 22 ¹	AAGTGATCTTGCGCTGTGTCCCA	74
V β 23 ¹	GCAGGGTCCAGGTCAGGACCCCA	82
V β 24 ¹	CCCAGTTTGAAAGCCAGTGACCC	76
FasL-For	GTAGTGTTCCCTCTGTGTCCGG	66
FasL-Rev	CCAGTTAGAACGTTGTTGGAC	62
CD95-I-For ²	ATGCTGGGCATCTGGACCCT	64
CD95-III-Rev ²	TCTAGACCAAGCTTTGGATTTC	62
CD95-GR19-For ³	AACATGCAGAAAGCACAGAAA	58
CD95-GR46-Rev ³	CATTGACACCATTCTTTCGAA	58

¹ (Genevee et al. 1992)

² (Fiucci und Ruberti 1994)

³ (Cascino et al. 1996)

1.4 Größenstandards

Als DNA-Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 123-bp-Marker verwendet (GIBCO, Eggenstein).

Der Protein-Größenstandard für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese war der „rainbow marker“ (Amersham, Freiburg). Die farbigen Banden hatten folgende Größen:

250 kD: blau

160 kD: rot

105 kD: grün

75 kD: gelb

50 kD: violett

35 kD: blau

30 kD: orange

25 kD: grün

15 kD: blau

10 kD: rot

1.5 Arbeitsgeräte

- Elektrophoresekammern GNA100 und GNA 200 (Amersham, Freiburg)
- Netzgerät EPS200 und GPS200/400 (Amersham, Freiburg)
- Blotapparatur für „semi-dry“ Transfer (Amersham, Freiburg)
- PCR-Maschine GeneAmp 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- Zentrifugen Eppendorf (Hamburg) und Heraeus (Hanau)
- FACScan mit Software LYSIS II (Beckton Dickinson, Heidelberg)
- Videodokumentation für Agarose-Gelelektrophorese (MWG, Ebersberg)
- Mikroskop (Zeiss, Jena)

2. Methoden

2.1 Methoden zur Untersuchung tumor-infiltrierender T-Zellen

2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus tiefgefrorenem Tumorgewebe

Gesamt-RNA wurde aus 30 etwa 10 µm dicken Schnitten tiefgefrorenen Tumorgewebes isoliert. Das Schneiden des gefrorenen Gewebes erfolgte im Kryostaten bei -20 °C und die Schnitte wurden in einem vorgekühlten Reaktionsgefäß aufgenommen. Bei Raumtemperatur wurden dann 800 µl TRIZOL (GIBCO, Eggenstein) zugegeben. Um den Zellverband auch mechanisch aufzubrechen und die genomische DNA zu scheren, wurde das Gewebe durch drei Injektionsspritzen mit zunehmend kleineren Kanülen und zuletzt durch eine Insulinspritze gezogen. Nach Zugabe von 0,5 µl Glykogen (20 mg/ml) erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden 160 µl Chloroform zugegeben, 15 Sekunden gevortext und schließlich 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde bei $10000 \times g$ und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und die obere, wässrige, RNA-haltige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Gesamt-RNA erfolgte nach Zugabe von 400 µl Isopropanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Schließlich wurde bei $10000 \times g$ und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, der RNA-Niederschlag mit 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Wasser aufgenommen, das mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt worden war, um eventuell vorhandene RNAsen zu inaktivieren. Die RNA wurde für 10 Minuten bei 65 °C gelöst und dann bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 5 µl (ca. 1 µg) der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Nach Zugabe von 2 µl oligo dT₁₅ - Primer (1 µg/µl) wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt.

Dann wurden folgende Komponenten zugegeben:

- 5,2 µl DEPC-behandeltes Wasser

- 5,0 µl 5 x „first strand buffer“ (Amersham, Freiburg) mit 250 mM TrisHCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂
- 2,5 µl DTT (0,1 M)
- 2,5 µl dNTP (10 mM)
- 0,8 µl RNAsin (40 U/µl)
- 1,0 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl, Amersham, Freiburg)

Der Ansatz wurde zunächst für 70 Minuten bei 37 °C, dann für 4 Minuten bei 98 °C inkubiert, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, und schließlich auf Eis abgekühlt. Die cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.3 GAPDH-PCR

Um zu kontrollieren, ob die cDNA-Synthese erfolgreich verlaufen ist, wurde zunächst eine Test-PCR durchgeführt. Dabei wurde die cDNA des Gens für Glycerinaldehyd-3phosphat-dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert. Dieses Gen wird normalerweise in allen Zellen stark exprimiert.

Es wurde folgender Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl pipettiert:

- 19,9 µl Wasser
- 1,0 µl cDNA (vgl. Punkt 2.1.2)
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (Amersham, Freiburg) mit 15 mM MgCl₂
- 0,5 µl dNTP (10 mM)
- 0,5 µl Primer GAPDH-For (10 pmol, vgl. Tabelle 2)
- 0,5 µl Primer GAPDH-Rev (10 pmol, vgl. Tabelle 2)
- 0,1 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Amersham, Freiburg)

Für die Reaktion wurde das GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt) mit folgendem Programm verwendet:

- Denaturierung: 94 °C, 60 Sekunden
- 25 Zyklen mit
- Denaturierung: 94 °C, 30 Sekunden
 - Primer-annealing: 60 °C, 30 Sekunden

- Polymerisation: 72 °C, 45 Sekunden
- Abschließende Polymerisation: 72 °C, 7 Minuten

2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Vom PCR-Ansatz wurden 10 µl mit 1 µl Gelladepuffer vermischt und auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100-130 V in 0,5 x TBE, das mit 15 µl Ethidiumbromid (40 mg/ml) pro 1000 ml versetzt worden war. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.1.5 T-Zell-Rezeptor (TCR) Vβ-familienspezifische RT-PCR

Zur Charakterisierung der tumor-infiltrierenden T-Zellen wurde die Expression der β-Kette des TCR untersucht. In 23 parallelen PCR-Reaktionen wurde jeweils der Primer für die konstante Region der β-Kette (Cβ-Region, vgl. Abbildung 4) mit einem Primer für eine von 23 Familien von variablen Regionen kombiniert (Vβ1-10 bzw. Vβ12-14) (Genevee et al. 1992). Der Primer Vβ11 lieferte in keinem der bisher in der Arbeitsgruppe untersuchten Fälle ein Resultat (W. Haedicke, pers. Mitteil.) und wurde daher nicht verwendet. Um eine automatische Genescan-Längenanalyse der PCR-Produkte zu ermöglichen, war der Primer Cβ mit den Fluoreszenzfarbstoffen ABI-FAM bzw. ABI-HEX (Applied Biosystems, Weiterstadt) markiert.

Es wurde folgender Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl pipettiert:

- 19,9 µl Wasser
- 1,0 µl cDNA (vgl. Punkt 2.1.2)
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (Amersham, Freiburg) mit 15 mM MgCl₂
- 0,5 µl dNTP (10 mM)
- 0,5 µl Primer Cβ (1 pmol, vgl. Tabelle 2)
- 0,5 µl Primer Vβx (1 pmol, vgl. Tabelle 2)
- 0,1 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Amersham, Freiburg)

Für die Reaktion wurde das GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt) mit folgendem Programm verwendet:

- Denaturierung: 94 °C, 60 Sekunden
- 35 Zyklen mit
- Denaturierung: 94 °C, 45 Sekunden
 - Primer-annealing: 60 °C, 45 Sekunden
 - Polymerisation: 72 °C, 90 Sekunden
 - Abschließende Polymerisation: 72 °C, 10 Minuten

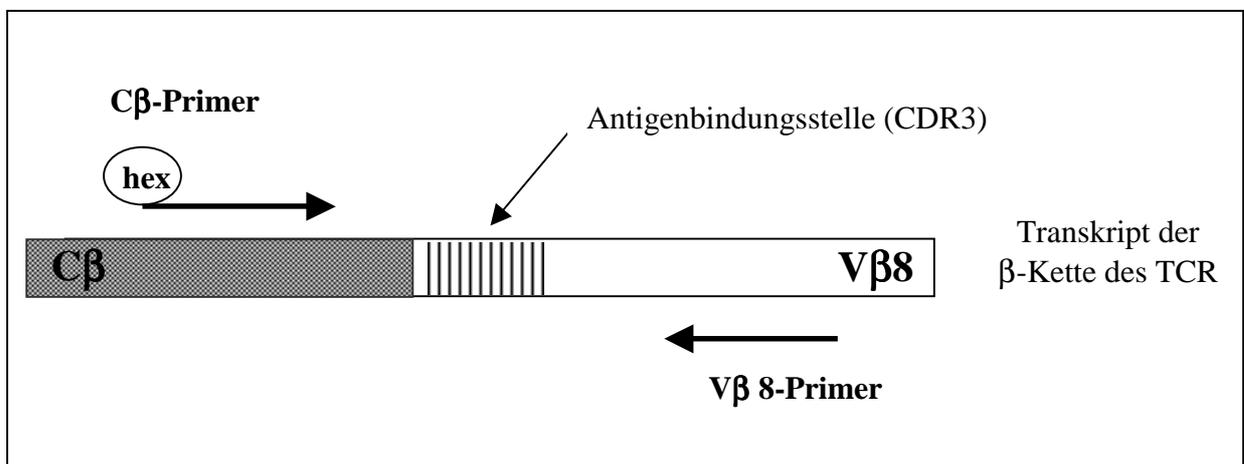


Abbildung 4:

Beispiel für eine T-Zell-Rezeptor Vβ-familien-spezifische RT-PCR. Dargestellt ist die Kombination des fluoreszenzmarkierten (hex) Cβ-Primers mit dem Vβ8-familien-spezifischen Primer.

2.1.6 TCR-Analysen

Jede T-Zelle exprimiert nur eine V β -Kette in ihrem Antigenrezeptor. Aufgrund dieser Spezifität ist es möglich, die Expression der verschiedenen V β -Ketten (V β -Diversität) in einem Patienten zu untersuchen und damit dessen gesamtes T-Zell-Repertoire zu charakterisieren. Daneben gibt es in jeder einzelnen V β -Kette Längenvariationen, die aus genetischen Rearrangements in der Antigenbindungsstelle (CDR3) resultieren. Die Untersuchung dieser Längenvariationen erlaubt Rückschlüsse auf die klonale Zusammensetzung der T-Zellen. Im normalen, unstimulierten T-Zell-Repertoire einer gesunden Person gab es für jede V β -Familie 6 bis 8 Längenvarianten, die eine annähernde Gauß'sche-Normalverteilung bildeten, d. h. V β -Transkripte, deren CDR3 eine mittlere Länge besaß, wurden am häufigsten exprimiert (vgl. Abbildung 5). Die Längenvarianten unterschieden sich stets um ein Vielfaches von 3 Nukleotiden, da das genetische Rearrangement im Leseraster der Proteinbiosynthese erfolgt (in-frame rearrangement). Abweichungen von der Gauß'schen-Verteilung, wie etwa eine starke Überrepräsentation einer einzelnen Längenvariante wurde gemäß der Literatur als antigen-induzierte Expansion eines einzigen T-Zell-Klons (Monoklonalität) oder weniger T-Zell-Klone (Oligoklonalität) interpretiert (Pannetier et al. 1993).

Zur Bestimmung der Längenvariabilität der Transkripte der V β -Ketten wurden die PCR-Produkte zusammen mit einem fluoreszenzmarkierten Größenstandard (ABI Rox-2500, Applied Biosystems, Weiterstadt) auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und im Sequenzierautomaten ABI 373A (Applied Biosystems, Weiterstadt) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Längenvariabilität und relative Expressionsintensität innerhalb der einzelnen V β -Familien wurde mit Hilfe der Genescan Software Version 1.2.2 (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewertet. Dabei wurde jede Längenvariante als distinkter Peak dargestellt, der umso höher war, je mehr PCR-Produkte dieser Länge vorhanden waren.

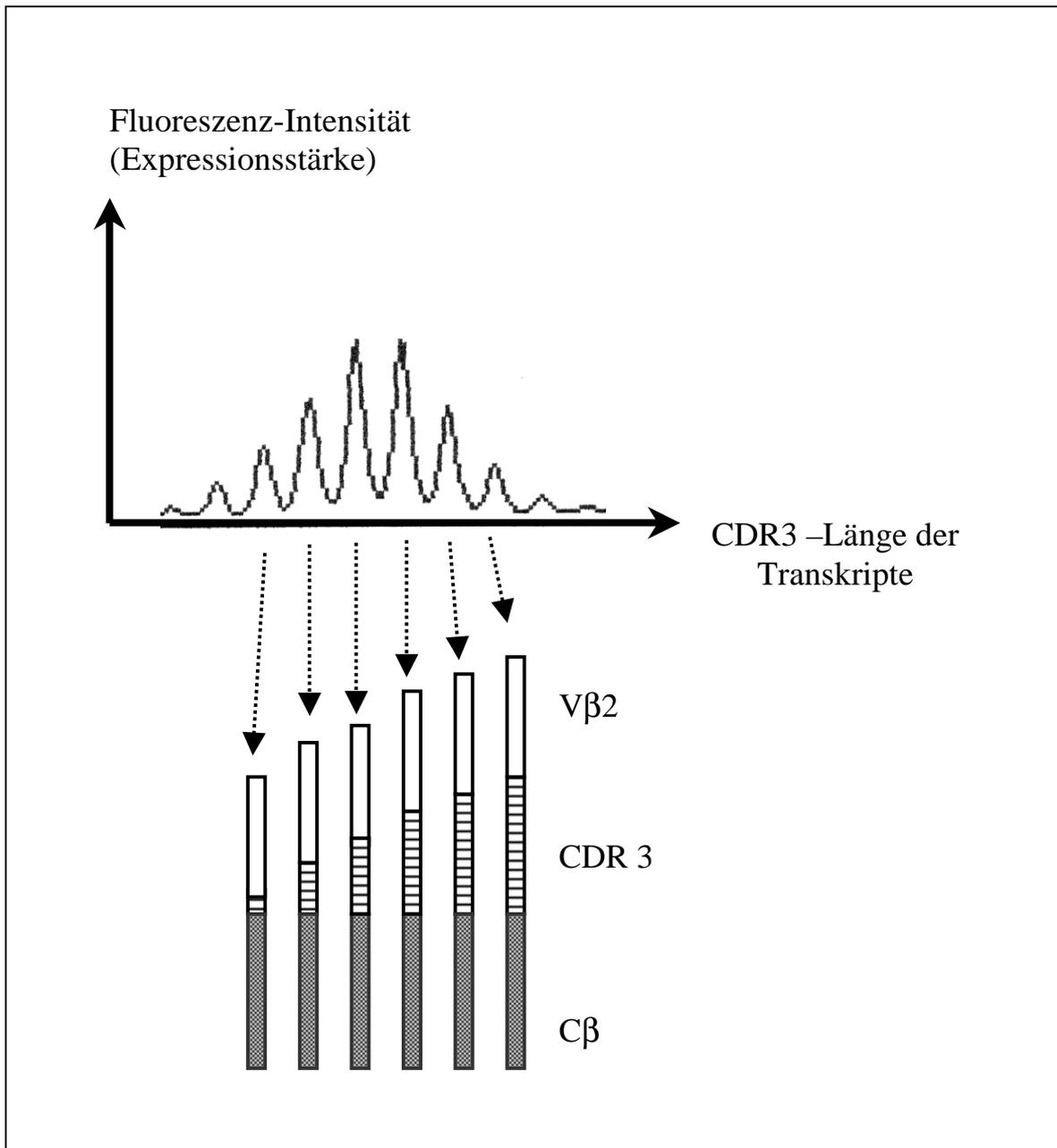


Abbildung 5:

Die CDR3-Längenverteilung von V β -Transkripten des TCR von T-Zellen einer gesunden Kontrollperson ist eine annähernde Gauß'sche Normalverteilung. Die Transkripte mit mittlerer CDR3-Länge werden am häufigsten exprimiert. Im hier dargestellten Elektrophoreseprofil fluoreszenzmarkierter V β 2-Transkripte haben alle Transkripte einen Peak der gleichen Länge. Von links nach rechts nimmt die Länge der Transkripte ausschließlich in der CDR3 zu; die variable (V β) und konstante Region (C β) des TCR bleiben unverändert.

2.1.7 Klonierung und Sequenzierung der CDR3-Region des TCR

In den Fällen H1851/95 und H6006/95 erfolgte die Klonierung von PCR-Produkten der V β 2-Familie des TCR unter Verwendung des „PCR-Script Amp Cloning Kit“ (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Zunächst wurden vier parallele PCR-Reaktionen durchgeführt, um genügend Ausgangsmaterial zu erhalten.

Aufreinigung des PCR-Produkts:

Die Schar der PCR-Produkte wurde auf einem Agarosegel (1 %) aufgetrennt und unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe von „GenElute minus EtBr spin columns“ (Supelco, Bellefonte, USA) aus dem Gel eluiert und von Ethidiumbromid befreit. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelstückchen bei 12000 x g für 10 Minuten durch die Säule zentrifugiert. Aus diesem Eluat wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol (100 %) für 10 Minuten bei -20 °C gefällt und schließlich in 10 μ l Low TE aufgenommen.

Vorbereitung des PCR-Produkts für die Ligation mit dem Vektor:

Da eine Bluntend-Klonierung durchgeführt wurde, mussten überstehende Einzelstrangenden des PCR-Produkts vor der Ligation mit dem Klonierungsvektor abgebaut werden (polishing). Dazu wurde folgende Reaktion pipettiert:

- 10,0 μ l aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1,0 μ l dNTP (10 mM)
- 1,3 μ l 10 x Polishing Puffer (Stratagene, Amsterdam)
- 1,0 μ l Pfu DNA Polymerase (0,5 U)

Dann erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 72 °C in der PCR-Maschine

Ligation mit dem Klonierungsvektor:

Um die Re-Ligation des leeren Vektors mit sich selbst weitgehend auszuschalten, erfolgte die Zugabe des Restriktionsenzym Srf I zum Ligationsansatz.

Die Ligations-Reaktion wurde in dieser Reihenfolge pipettiert:

- 1,0 μ l Klonierungsvektor pPCR-Script Amp SK(+) (10 ng/ μ l, Stratagene, Amsterdam)

- 1,0 µl 10 x PCR-Script Reaktions-Puffer (Stratagene, Amsterdam)
- 0,5 µl ATP (10 mM)
- 5,5 µl PCR-Produkt aus der Polishing-Reaktion
- 1,0 µl Srf I (5 U/µl)
- 1,0 µl T4 DNA-Ligase (4 U/µl)

Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur, dann noch für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert und auf Eis gestellt.

Transformation:

Der Klonierungsvektor wurde mit Hilfe der Hitzepuls-Methode in kompetente Zellen von *Escherichia coli* eingebracht. Die kompetenten Zellen „XL 10-Gold Kan ultracompetent cells“ (Stratagene, Amsterdam) wurden auf Eis aufgetaut. Für jede Reaktion wurden 40 µl Zellsuspension mit 1,6 µl „XL 10-Gold β-Mercaptoethanol“ (Stratagene, Amsterdam) gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert, wobei der Ansatz alle 2 Minuten vorsichtig geschüttelt wurde. Dann wurde die gesamte Ligations-Reaktion zugegeben, vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Jetzt wurden die Reaktionsgefäße für genau 30 Sekunden in ein Wasserbad mit 42 °C getaucht (Hitzepuls) und anschließend sofort mit 450 µl vorgewärmtem NZY-Medium vermischt und für 1 Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Danach wurden von jedem Ansatz 50 µl, 100 µl, 150 µl und 200 µl auf LB-Agarplatten aufgebracht, die Ampicillin und 100 µl X-Gal (2 %) enthielten, und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ampicillin sorgte dafür, dass nur Bakterien wuchsen, die den Klonierungsvektor aufgenommen hatten und X-Gal ermöglichte die blau-weiß Selektion. Hierbei bildeten die Bakterien, die einen Klonierungsvektor mit ligiertem PCR-Produkt enthielten, keine β-Galactosidase, konnten somit das Substrat X-Gal enzymatisch nicht umsetzen und blieben dadurch weiß, während Bakterien mit einem leeren Klonierungsvektor die β-Galactosidase weiter produzierten und X-Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzten. Auf die Induktion des β-Galactosidase-Promotors mit Isopropylthiogalactosid (IPTG) wurde verzichtet, da der Promotor eine ausreichende konstitutive Aktivität aufwies.

Isolierung des klonierten PCR-Produkts (Minipräp):

Weißer Bakterienkolonien waren der Ausgangspunkt für Flüssigkulturen, zur Isolierung des Klonierungsvektors und zum Ausschneiden des ligierten PCR-Produkts. Damit konnte die relativ grobe blau-weiß Selektion verifiziert werden, die in diesem Fall ca. 40-60 % falsch-positive Ergebnisse (weiße Bakterienkolonien ohne kloniertes PCR-Produkt) lieferte. Die weißen Bakterienkolonien wurden mit Hilfe steriler Zahnstocher in ein Reagenzglas mit 3 ml LB-Flüssigmedium und Ampicillin übertragen. Die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml dieser Flüssigkultur in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 5 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag in 100 µl GET resuspendiert und kräftig gemischt. Es wurden dann 200 µl frisch angesetzter Lysis-Puffer zugegeben, gut gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Fällung und Abtrennung der hochmolekularen Bakterien-DNA wurden 150 µl eiskaltes 3 M Kalium-Acetat (pH 4,8) zugegeben, gemischt und wieder für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 15800 x g an. Das Plasmid befand sich im Überstand, der in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem zweifachen Volumen an Ethanol (100 %) versetzt wurde. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die ausgefällte Plasmid-DNA durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 15800 x g ausgefällt. Der Niederschlag wurde getrocknet und in 40 µl Low TE gelöst.

Im anschließenden Kontrollverdau wurde das klonierte Fragment mit Hilfe zweier Restriktionsenzyme aus dem Plasmidvektor ausgeschnitten. Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 3,0 µl DNA (aus 40 µl der Plasmidisolierung)
- 0,1 µl Not I (10 U/µl)
- 0,1 µl Pst I (10 U/µl)
- 1,0 µl 10 x Puffer H (Boehringer, Mannheim)
- 5,8 µl Wasser

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, dann auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für die nachfolgende Sequenzierungsreaktion wurden die Ansätze ausgewählt, die das klonierte Fragment enthielten.

Sequenzierungsreaktion:

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem „ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al. 1977). Der Kit enthielt fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide, dNTP und die AmpliTaq DNA Polymerase FS.

Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 6,0 µl Terminator Premix
- 2,5 µl DNA aus der Plasmidisolierung (mindestens 500 ng)
- 1,0 µl Sequenzier-Primer (3,2 pmol/µl) T3 bzw. M13 Universal
- ad 20,0 µl mit Wasser

Die eigentliche Sequenzierungsreaktion (cycle sequencing) erfolgte in der PCR-Maschine. Es wurde das GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt) mit folgendem Programm verwendet:

25 Zyklen mit:

- Denaturierung: 96 °C, 10 Sekunden
- Primer-annealing: 52 °C, 5 Sekunden (Sequenzier-Primer T3)
bzw. 49 °C, 5 Sekunden (Sequenzier-Primer M13 Universal)
- Polymerisation: 60 °C, 4 Minuten

Der Ansatz wurde für 3 Minuten bei 900 x g durch eine Pipettenspitze mit Filter, die mit Sephadex G50 (Pharmacia, Freiburg) gefüllt war, zentrifugiert. Dabei blieben unerwünschte Bestandteile wie Primer und dNTP im Sephadex zurück. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µl Kaliumacetat (3 M) und 300 µl Ethanol (96 %) ausgefällt. Es wurde sofort für 20 Minuten bei 15800 x g zentrifugiert, der Niederschlag mit Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt.

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

2.1.8 Einstellen der cDNA für eine semiquantitative RT-PCR

An den cDNAs verschiedener Patientenproben wurde zunächst eine GAPDH-PCR durchgeführt. Nach 20, 22 und 24 Zyklen wurden jeweils 7 µl des PCR-Ansatzes entnommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Intensitäten der Banden wurden visuell miteinander verglichen. Dann wurde die GAPDH-PCR mit variierten Mengen an cDNA solange wiederholt, bis die Banden aller Proben die gleiche Intensität aufwiesen. Diese empirisch bestimmte Menge an cDNA wurde dann auch für die anschließende semiquantitative RT-PCR eingesetzt.

2.1.9 Semiquantitative FasL-spezifische RT-PCR an tumor-infiltrierenden T-Zellen

Im Fall H4365/94 wurden maligne B-Zellen und tumor-infiltrierende T-Zellen immunomagnetisch voneinander getrennt (vgl. Punkt 2.2.1). Aus beiden Zellfraktionen wurde RNA isoliert, cDNA gewonnen und anschließend eine semiquantitative FasL-spezifische RT-PCR durchgeführt.

Es wurde folgender PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl pipettiert:

- 19,9 µl Wasser
- 1,0 µl cDNA
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (Amersham, Freiburg) mit 15 mM MgCl₂
- 0,5 µl dNTP (10 mM)
- 0,5 µl Primer FasL-For (10 pmol, vgl. Tabelle 2)
- 0,5 µl Primer FasL-Rev (10 pmol, vgl. Tabelle 2)
- 0,1 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Amersham, Freiburg)

Für die Reaktion wurde das GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt) mit folgendem Programm verwendet:

- Denaturierung: 94 °C, 60 Sekunden
- 35 Zyklen mit
- Denaturierung: 94 °C, 45 Sekunden

- Primer-annealing: 60 °C, 45 Sekunden
- Polymerisation: 72 °C, 60 Sekunden
- Abschließende Polymerisation: 72 °C, 10 Minuten

2.2 Methoden zur Untersuchung maligner und normaler B-Zellen

2.2.1 Immunomagnetische Isolierung maligner B-Zellen

Aus einer Lymphozytensuspension des jeweiligen Patienten wurden die B-Zellen negativ immunomagnetisch isoliert, indem T-Zellen mit anti-CD3-Antikörpern und Makrophagen mit anti-CD14-Antikörpern entfernt wurden. Die Antikörper waren jeweils an magnetische Beads (Dynal, Hamburg) gekoppelt. Diese Antikörper-Beads wurden in ca. fünffachem Überschuss eingesetzt und vor ihrem Einsatz dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen, dem 1 % fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt war. Die Inkubation der Antikörper-Beads mit der primären Zellsuspension erfolgte für 1 Stunde in einem Volumen von 2 bis 3 ml in einem Falcon-Röhrchen unter Schütteln auf Eis. Dann wurde das Volumen mit Zellkulturmedium auf 5 ml ergänzt und das Röhrchen für 2 Minuten in einen Magnetständer (Dynal, Hamburg) gestellt. Die T-Zellen und Makrophagen wurden über die gebundenen Antikörper-Beads an den Magneten gezogen, während die B-Zellen in der Zellsuspension verblieben. Die malignen B-Zellen wurden dann weiter aufgereinigt, indem nichtmaligne „bystander“ B-Zellen immunomagnetisch mit Antikörpern gegen diejenige leichte Immunglobulinkette (kappa oder lambda), die die malignen Zellen nicht exprimierten, entfernt wurden. Anschließend erfolgte durch FACS-Analyse eine Reinheitskontrolle der isolierten malignen B-Zellen (vgl. Punkt 2.2.4.1).

2.2.2 Immunomagnetische Isolierung normaler T- und B-Zellen aus Tonsillen

Für Kontrollexperimente wurden normale B-Zellen und für die T/B-Zell-Kokultur normale T-Zellen benötigt, die beide aus Gewebe von Tonsillektomien gewonnen wurden. Das Gewebe der Tonsillen wurde wie beschrieben mechanisch aufgearbeitet. Die T-Zellen wurden positiv immunomagnetisch mit anti-CD3 Antikörper-Beads isoliert, die danach mit Hilfe von „detach-a-beads“ (Dynal, Hamburg) wieder von den T-Zellen entfernt wurden. Aus der Zellsuspension wurden anschließend Makrophagen entfernt (vgl. Punkt 2.2.1), so dass nur noch B-Zellen in der Suspension zurückblieben. Gedächtnis-B-Zellen (CD19⁺,

IgM⁺, IgD⁻, CD38⁻) als normale Gegenstücke der malignen B-Zellen von MALT-Typ Lymphomen wurden dann weiter aufgereinigt, indem Keimzentrums-B-Zellen (CD38⁺) und Mantelzonen-B-Zellen (IgD⁺) mit Hilfe der an magnetische Beads gekoppelten Antikörper anti-CD38 (Klon ACT 13.5, Serotec, Wiesbaden) und anti-IgD (Klon HJ9, Sigma, Deisenhofen) entfernt wurden (Arpin et al. 1995). Schließlich wurden die Zellen mit einer FACS-Analyse (vgl. Punkt 2.2.4.1) auf ihre Reinheit kontrolliert.

2.2.3 Zellkultur

Generell wurden alle Zellen bei 37 °C und 7 % CO₂ in Flachbodenplatten (24 well) oder Rundbodenplatten (96 well) kultiviert. Das Zellkulturmedium RPMI 1640 (Linaris, Bettingen/Main) wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 0,1 mg/ml Gentamycin versetzt.

2.2.3.1 Zellzahlbestimmung nach Neubauer

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen pro ml wurden 20 µl Zellsuspension mit 180 µl Trypanblau gemischt und in die Zählkammer pipettiert, dann wurden in einem Großquadrat der Zählkammer die ungefärbten (lebenden) Zellen gezählt. Zur Berechnung der Zellzahl pro ml Suspension wurde dieser Wert mit dem Faktor 10⁴ (Umrechnung des Volumens der Zählkammer 0,1 µl auf 1 ml) und mit dem Verdünnungsfaktor 10¹ multipliziert.

2.2.3.2 Aktivierung von normalen T-Zellen über anti-CD3-Stimulation

Die T-Zellen wurden vor ihrem Einsatz in der T/B-Zell-Kokultur durch Stimulation mit einem anti-CD3-Antikörper aktiviert. Eine maximale Stimulation wurde erreicht, wenn der Antikörper von murinen Fibroblasten präsentiert wurde, die mit humanem FcγRII transfiziert waren (Banchereau und Rousset 1991). Die murinen Fibroblasten waren mit einer Energiedosis von 6000 rd bestrahlt worden, um ihre Proliferation vollständig zu unterbinden. Sie wurden zunächst über Nacht in einer Flachbodenplatte zu 1 x 10⁵ Zellen/Well kultiviert. Am folgenden Morgen waren die Zellen adhärent am Boden der Platte festgewachsen. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und durch 1 ml neues Medium

ersetzt, dem 1 μg anti-CD3-Antikörper (Klon 4B5, Boehringer, Mannheim) zugesetzt waren. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C, in der sich der Antikörper an den humanen Fc γ RII der Fibroblasten anlagerte. Dann erfolgte in jedem Well die Zugabe von 1×10^6 T-Zellen in 1 ml Zellkulturmedium und eine Inkubation bei 37 °C für 6 Stunden. In Vorversuchen wurde durch eine FasL-spezifische RT-PCR (vgl. Punkt 2.1.9) festgestellt, dass nach 6 Stunden Stimulation mit dem anti-CD3-Antikörper die Produktion von mRNA für FasL in den T-Zellen ein Maximum erreicht hatte. Dies war das Kriterium für eine erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen. Nach der sechsständigen Aktivierung wurden die T-Zellen abpipettiert und in der jeweils benötigten Menge in der T/B-Zell-Kokultur eingesetzt.

2.2.3.3 T/B-Zell-Kokultur

In der T/B-Zell-Kokultur wurden normale bzw. maligne B-Zellen für 24 Stunden zusammen mit den aktivierten T-Zellen aus Punkt 2.2.3.2 kultiviert. In einem Vorversuch mit einer Verdünnungsreihe wurde festgestellt, dass das Verhältnis 1 : 5 (B-Zellen : T-Zellen) für 24 Stunden zu einer maximalen Apoptose-Induktion in normalen B-Zellen führte. Jedes Experiment der T/B-Zell-Kokultur war Ausgangspunkt von drei verschiedenen Untersuchungen. Dazu wurden folgende Ansätze pipettiert:

- Für die RNA-Isolierung aus malignen bzw. normalen B-Zellen:
 1×10^6 B-Zellen + 5×10^6 aktivierte T-Zellen
- Für die Protein-Isolierung aus malignen bzw. normalen B-Zellen:
 $1,4 \times 10^6$ B-Zellen + 5×10^6 aktivierte T-Zellen
- Für die FACS-Analyse maligner bzw. normaler B-Zellen:
 4×10^4 B-Zellen + 2×10^5 aktivierte T-Zellen

Für jeden dieser drei Ansätze gab es einen Parallelansatz mit malignen bzw. normalen B-Zellen ohne T-Zellen. Der Vergleich mit diesem Ansatz ermöglichte die Bestimmung des Einflusses von T-Zellen. Nach der T/B-Zell-Kokultur mussten für die RNA- und Proteinisolierung die malignen bzw. normalen B-Zellen wieder von den T-Zellen getrennt

werden. Dies erfolgte durch eine immunomagnetische Zellisolierung (vgl. Punkt 2.2.1), an die sich eine Reinheitskontrolle der Zellen im FACS anschloss (vgl. Punkt 2.2.4.1).

2.2.4 FACS-Analyse

Die Expression ausgewählter Oberflächenproteine der B-Zellen wie Fas und CD19 wurde durch eine FACS (fluorescence-activated cell sorting)-Analyse untersucht und quantifiziert. Der Nachweis der Oberflächenproteine („Färbung“) erfolgte mit Antikörpern, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren. Je mehr Oberflächenproteine eine Zelle besitzt, umso mehr Antikörper binden sich daran und umso stärker fluoresziert die Zelle. Die Messungen wurden an einem FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) mit einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm durchgeführt. Die Datenaufnahme und Datenauswertung erfolgte mit der Software LYSIS II (Becton Dickinson, Heidelberg). Das Gerät wurde über die Verstärkung der 3 Fluoreszenzkanäle so eingestellt, dass ungefärbte Lymphozyten (B- oder T-Zellen) mit ihrer Eigenfluoreszenz im Vorwärts/Seitwärts-Scatter den Bereich zwischen den Fluoreszenzintensitäten 10^0 und 10^1 ausfüllten. Für jede Messung wurden standardmäßig 20000 Zellen aufgezeichnet, bei Messungen zur Apoptoserate (7-AAD-Versuch) waren es 40000 Zellen. In einer Messung konnten bis zu drei verschiedene Oberflächenproteine über ihre Antikörperbindung nachgewiesen werden: an den Farbstoff Fluorisothiocyanat (FITC) gekoppelte Antikörper wurden in Kanal 1, an Phycoerythrin (PE) gekoppelte Antikörper wurden in Kanal 2, und an Tricolor (TRI) gekoppelte Antikörper wurden in Kanal 3 des FACScan aufgenommen. Der für die Messung der Apoptoserate verwendete Farbstoff 7-AAD wurde ebenfalls in Kanal 3 aufgenommen.

Jede Messung bestand aus zwei Parallelansätzen, der eigentlichen Färbung und der Isotypkontrolle. Für die Färbung wurden 2×10^5 Zellen mit den farbstoffmarkierten Antikörpern inkubiert. Für die zugehörige Isotypkontrolle wurde die gleiche Zellzahl mit ebenfalls farbstoffmarkierten, aber irrelevanten, unspezifischen Antikörpern gleicher Herkunft und gleichen Isotyps inkubiert. Die Isotypkontrolle diente damit zur Abschätzung der unspezifischen Antikörperbindung. Die Zellen wurden zunächst bei $500 \times g$ und $4^\circ C$ für 5 Minuten zentrifugiert und in $100 \mu l$ FACS-Puffer aufgenommen. Dann wurden die direkt konjugierten Antikörper in einer vorher empirisch ermittelten Optimal-Verdünnung

zugegeben. Die Inkubation der Antikörper erfolgte für 10 Minuten auf Eis und im Dunkeln, um das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu minimieren. Anschließend wurden zum Waschen 1000 µl FACS-Puffer zugegeben und zentrifugiert. Unmittelbar vor der Messung wurden die gefärbten Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen, gevortext und dann im FACScan eingelesen.

2.2.4.1 Reinheitskontrolle isolierter Zellen

Die aus dem Tumorgewebe isolierten malignen B-Zellen wurden in der FACS-Analyse auf Kontamination mit T-Zellen und Makrophagen untersucht. Dabei wurden die Antikörper anti-CD3-FITC (F-0522, Sigma, Deisenhofen) mit der Isotypkontrolle „Maus IgG1-FITC“ (F-6397, Sigma) und anti-CD14-TRI (MHCD-1406, Medac, Wedel) mit der Isotypkontrolle „Maus IgG2a-TRI“ (MG2a06TC, Medac) verwendet. Es wurden nur Zellisolierungen maligner B-Zellen mit einer Reinheit von mindestens 98 % für die nachfolgenden Versuche eingesetzt. Für die FACS-Analyse isolierter normaler B- und T-Zellen aus Tonsillen wurden die Antikörper anti-CD3-FITC (wie oben) und anti-CD19-PE (MHCD-1904, Medac) mit der Isotypkontrolle „Maus IgG1-PE“ (P-4685, Sigma) verwendet. Es wurden nur B-Zellen (CD19⁺) mit einer Reinheit von mindestens 95 % und T-Zellen (CD3⁺) mit einer Reinheit von mindestens 90 % für die nachfolgenden Versuche verwendet (vgl. Abbildung 6). Die aufgereinigten Gedächtnis-B-Zellen (IgD⁻, CD38⁻) wurden mit Hilfe der Antikörper anti-IgD-FITC (F-5027, Sigma) mit der Isotypkontrolle „Maus IgG1-FITC“ (wie oben) und anti-CD38-PE (MHCD-3804, Medac) mit der Isotypkontrolle „Maus IgG1-PE“ (wie oben) auf Kontaminationen untersucht.

B-Zellen, die unmittelbar nach der B/T-Zell-Kokultur wieder von den T-Zellen abgetrennt wurden, sind mit Hilfe des Antikörpers anti-CD3-FITC (wie oben) mit der Isotypkontrolle „Maus IgG1-FITC“ (wie oben) auf Verunreinigungen mit T-Zellen untersucht worden. Gegebenenfalls wurden die immunomagnetischen Isolierungsschritte solange wiederholt, bis die T-Zell-Kontamination unter 5 % gesunken war.

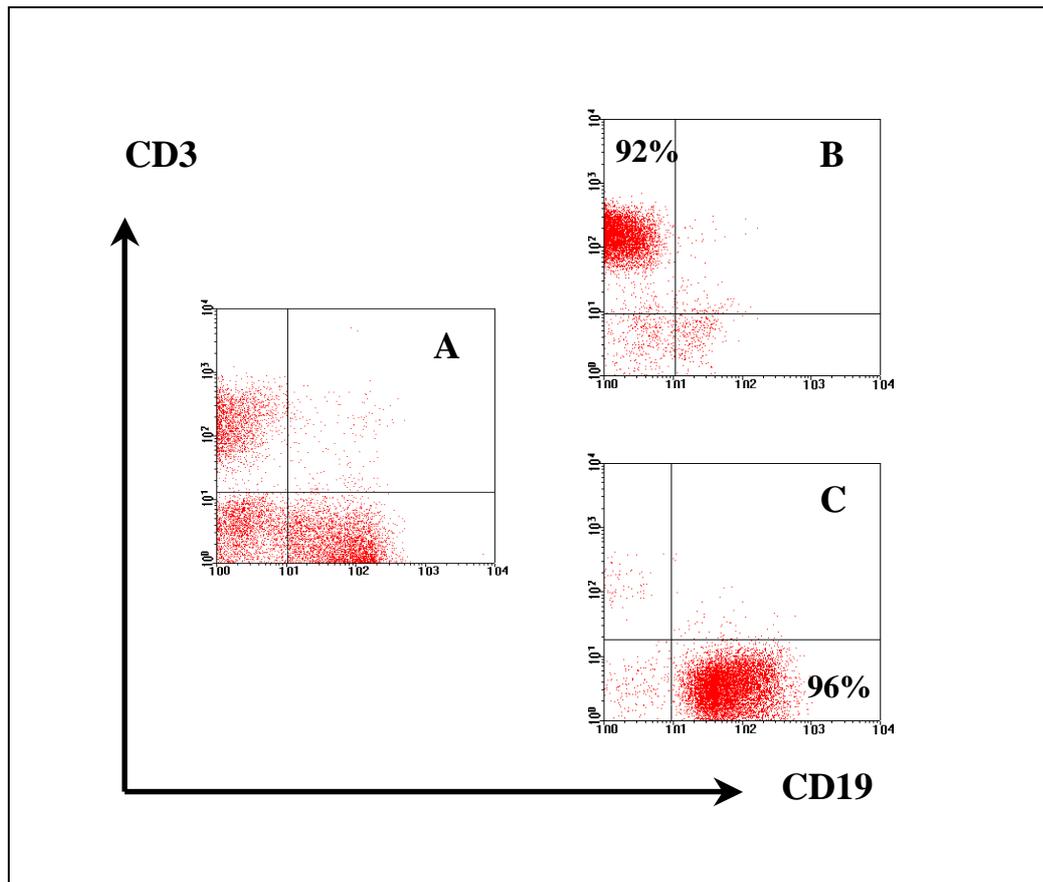


Abbildung 6:

FACS-Analyse zur Reinheitskontrolle von immunomagnetisch getrennten B-Zellen (CD19⁺) und T-Zellen (CD3⁺) einer Tonsille.

(A): Zellgemisch vor der Trennung

(B): Abgetrennte T-Zellen

(C): Abgetrennte B-Zellen

2.2.4.2 Messung von Fas-Expression und Apoptoserate (7-AAD-Versuch) maligner B-Zellen

Unmittelbar nach Ablauf der 24-stündigen T/B-Zell-Kokultur wurde der gesamte Zell-Kokultur-Ansatz mit $2,4 \times 10^5$ Zellen abzentrifugiert, in 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen und gefärbt.

Zuerst wurde der unkonjugierte Primärantikörper „anti-Apo-1“ (freundliche Überlassung von P. Krammer, Heidelberg) zugegeben, nach Inkubation und Waschen (gemäß Punkt 2.2.4) erfolgte die Zugabe eines irrelevanten Antikörpers zur Blockierung unspezifischer Bindungskapazitäten. Nach Inkubation und Waschen wurde der PE-konjugierte Sekundärantikörper „Esel-anti-Maus-PE“ (715-116-150, Dianova, Hamburg) zugegeben, der an den Primärantikörper „anti-Apo-1“ bindet. Gleichzeitig wurde auch der direkt konjugierte Antikörper anti-CD19-FITC (F-768, Dako, Glostrup, Dänemark) dazugegeben. Parallel wurden in die Isotypkontrolle die Antikörper „Maus-IgG1-PE“ (P-4685, Sigma, Deisenhofen) und „Maus-IgG1-FITC“ (F-6397, Sigma) pipettiert. Nach Inkubation und Waschen wurden in die Färbung 0,1 μ g 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) pipettiert. Nach der letzten Inkubation wurde hier der Waschschrift weggelassen und die Proben wurden sofort zum Messen in das FACScan eingesetzt. Nachdem in den Ansätzen ein B/T-Zellgemisch vorlag, aber nur die Fas-Expression und Apoptose der B-Zellen gemessen werden sollte, wurden für die Auswertung nur B-Zellen (CD19⁺) herangezogen (CD19⁺-gating). Die Quantifizierung lebender, apoptotischer und toter B-Zellen mit Hilfe des DNA-bindenden Farbstoffes 7-AAD erfolgte wie beschrieben (Philpott et al. 1996). Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf einer selektiven Aufnahme dieses Stoffes durch die Zellen: tote Zellen färben sich stark, apoptotische schwach und lebende Zellen überhaupt nicht (vgl. Abbildung 7).

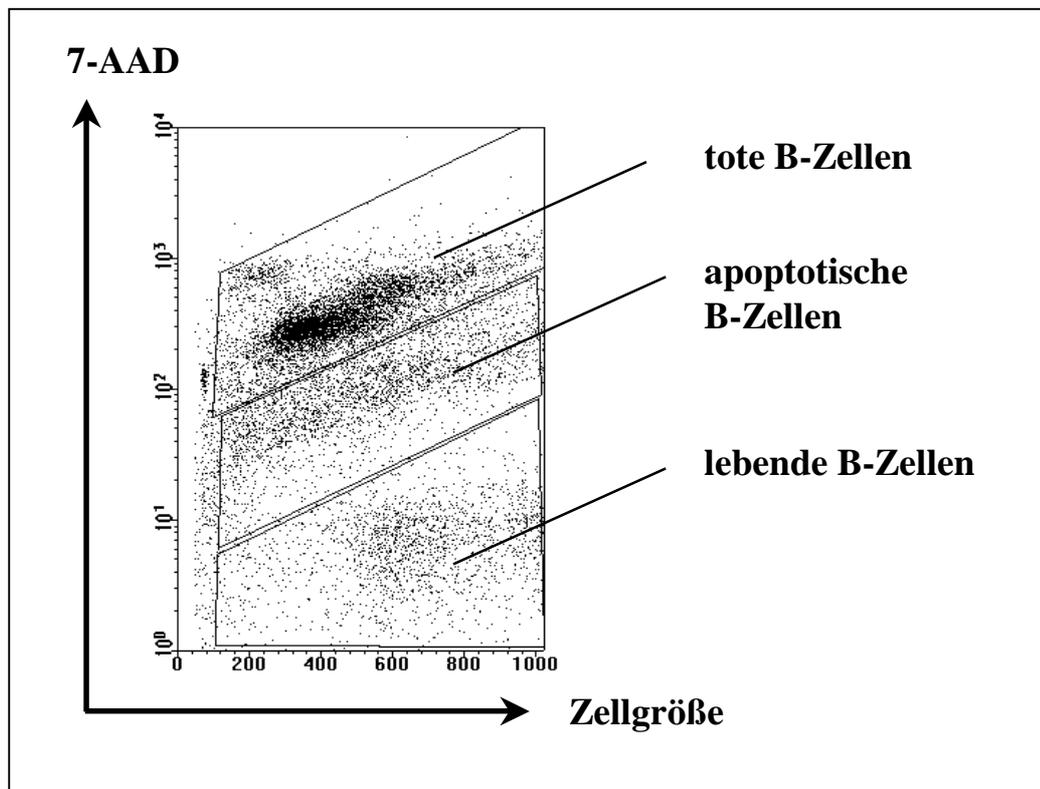


Abbildung 7:

FACS-Analyse zur Unterscheidung von lebenden, apoptotischen und toten Zellen (7-AAD-Versuch). Dargestellt sind normale Gedächtnis-B-Zellen einer Tonsille, die für 24 Stunden mit aktivierten T-Zellen kokultiviert worden waren.

2.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus B-Zellen nach der T/B-Zell-Kokultur und daran anschließende cDNA-Synthese

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte aus 5×10^5 malignen bzw. normalen B-Zellen, die bei $500 \times g$ und $4^\circ C$ für 5 Minuten abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und zum Niederschlag wurden $800 \mu l$ TRIZOL (GIBCO, Eggenstein) gegeben, anschließend wurde die Suspension mehrmals durch eine Insulinspritze gezogen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter den Punkten 2.1.1 und 2.1.2 beschrieben.

2.2.6 Untersuchung der Expression apoptose-relevanter Gene mittels Multiplex RT-PCR

Zur Untersuchung der Expression einiger ausgewählter Gene, deren Produkte eine Rolle in der Fas-Signalkaskade spielen oder eine pro- bzw. anti-apoptotische Wirkung haben, wurden zwei Multiplex RT-PCR-Kits verwendet (Maxim Biotech, San Francisco, USA; vgl. Tabelle 3).

Es wurde folgender PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl pipettiert:

- 30,5 µl Wasser
- 5,0 µl cDNA (bzw. Positivkontrolle aus dem Kit)
- 5,0 µl 10 x hAPO-1 (bzw. APO-2) PCR-Puffer (Maxim Biotech, San Francisco)
- 4,0 µl dNTP (Maxim Biotech, San Francisco)
- 5,0 µl 10 x hAPO-1 (bzw. APO-2) Primer-Gemisch (Maxim Biotech, San Francisco)
- 0,5 µl AmpliTaq DNA Polymerase (5 U/µl, Applied Biosystems, Weiterstadt)

Für die Reaktion wurde das GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt) mit folgendem Programm verwendet:

2 Zyklen mit:

- 96 °C, 1 Minute
- 57 °C, 4 Minuten

33 Zyklen mit:

- 94 °C, 1 Minute
- 57 °C, 2,5 Minuten
- Abschließende Polymerisation: 70 °C, 10 Minuten

Tabelle 3 :

Verwendete Multiplex RT-PCR-Kits (Maxim Biotech, San Francisco, USA) zur gleichzeitigen Untersuchung der Expression ausgewählter apoptose-relevanter Gene.

Kit „hAPO-1“	Größe des PCR-Produkts (bp)
caspase-1	658
c-myc	371
bcl-2	233
p53	204
Kit „hAPO-2“	
bcl-xL	371
caspase-3	318
bcl-2	235
bcl-xS	181
bax	140

2.2.7 Densitometrische Auswertung der Multiplex RT-PCR

Eine semiquantitative Bestimmung der Expressionsstärke der untersuchten Gene erfolgte densitometrisch. Dabei wurde die optische Dichte (OD) der im Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte bestimmt. Je mehr PCR-Produkt vorhanden war, desto höher war die optische Dichte. Die Werte wurden folgendermaßen standardisiert: Für jeden untersuchten Fall wurde in einer zusätzlichen PCR die OD der GAPDH-Expression bestimmt, wobei hierfür die gleiche Menge an cDNA verwendet worden ist wie in der Multiplex RT-PCR. Die gemessene OD der Multiplex RT-PCR wurde dann auf die jeweilige GAPDH-Expression bezogen.

2.2.8 Fas-spezifische RT-PCR

Die gesamte codierende Sequenz der Fas cDNA (1008 bp) wurde in zwei PCR-Reaktionen amplifiziert (vgl. Abbildung 8). Die Verwendung der Primer CD95-I-For und CD95-GR46-Rev ergab ein PCR-Produkt mit 765 bp, die Verwendung der Primer CD95-GR19-For und CD95-III-Rev eines mit 417 bp. Die PCR-Produkte überschneiden sich um 174 bp.

Es wurde folgender Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl pipettiert:

- 39,8 µl Wasser
- 2,0 µl cDNA (aus Punkt 2.2.5)
- 5,0 µl 10 x PCR-Puffer (Amersham, Freiburg) mit 15 mM MgCl₂
- 1,0 µl dNTP (10 mM)
- 1,0 µl Primer „CD95-I-For“ bzw. „CD95-GR19-For“ (10 pmol, vgl.Tabelle 2)
- 1,0 µl Primer „CD95-GR46-Rev“ bzw. „CD95-III-Rev“ (10 pmol, vgl.Tabelle 2)
- 0,2 µl Taq DNA Polymerase (Amersham, Freiburg)

Für die Reaktion wurde das GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt) mit folgendem Programm verwendet:

- Denaturierung: 94 °C, 60 Sekunden
- 33 Zyklen mit
- Denaturierung: 94 °C, 30 Sekunden
 - Primer-annealing: 61 °C, 30 Sekunden
 - Polymerisation: 72 °C, 60 Sekunden
 - Abschließende Polymerisation: 72 °C, 7 Minuten

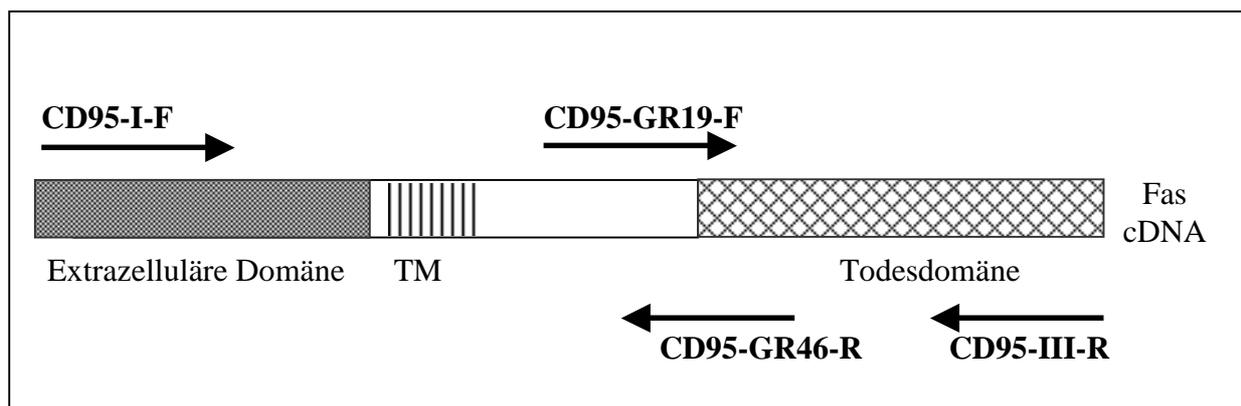


Abbildung 8:

Relative Lage der Primer für die Fas-spezifische RT-PCR.
(TM: Transmembrandomäne).

2.2.9 Klonierung und Sequenzierung von Fas cDNA maligner B-Zellen

Vor der Klonierung wurde die gesamte PCR-Reaktion (vgl. Punkt 2.2.8) durch eine Reinigungssäule (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) zentrifugiert. Störende Bestandteile der ursprünglichen PCR-Reaktion blieben in der Säule zurück, während die PCR-Produkte mit 50 µl Low TE wieder aus der Säule eluiert wurden. Vom Eluat wurden 5 µl auf ein Agarosegel (1,5 %) aufgetragen, um die Menge und Qualität des PCR-Produkts zu kontrollieren. Die anschließende Klonierung erfolgte wie unter Punkt 2.1.7 beschrieben.

2.2.10 Isolierung von Gesamtprotein aus B-Zellen nach T/B-Zell-Kokultur

Die Isolierung von Gesamtprotein erfolgte aus 1×10^6 normalen bzw. malignen B-Zellen, die nach der T/B-Zell-Kokultur (vgl. Punkt 2.2.3.3) von den T-Zellen wieder abgetrennt worden waren. Die Zellen wurden bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 100 µl Laemmli-Probenpuffer (Laemmli 1970) aufgenommen und bei 98 °C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die zähflüssige Lösung durch eine Insulinspritze geschert und bei 10000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde abgenommen und der Niederschlag verworfen.

2.2.11 Polyacrylamid - Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese im Tris-Glycin-SDS-System. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und bestand aus Sammelgel (5 % Polyacrylamid) und Trenngel (12 % Polyacrylamid).

Für 10 ml Trenngel wurden verwendet:

- 3,3 ml Wasser
- 4,0 ml Acrylamidlösung (30 %) mit 0,8 % Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
- 2,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8
- 100 µl SDS (10 %)
- 100 µl Ammoniumpersulfat, APS (10 %)

- 4 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Die Flüssigkeit wurde ca. 6,5 cm hoch zwischen zwei zusammengeklammerte Glasplatten gegossen und mit 1000 µl Butanol überschichtet. Das Auspolymerisieren des Acrylamids benötigte mindestens 30 Minuten. Dann wurde das Butanol abgegossen und gründlich mit Wasser nachgespült.

In der Zwischenzeit wurde das Sammelgel (4 ml) vorbereitet:

- 2,7 ml Wasser
- 670 µl Acrylamidlösung (30 %) mit 0,8 % Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
- 500 µl 1,0 M Tris, pH 6,8
- 40 µl SDS (10 %)
- 40 µl Ammoniumpersulfat, APS (10 %)
- 4 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Mit dem Sammelgel wurden die verbliebenen 2 cm am oberen Rand der Glasplatten ausgegossen. Dann wurde von oben ein Kamm eingesteckt, der die Taschen für das Probenmaterial formte. Nach weiteren 30 Minuten zum Auspolymerisieren des Sammelgels konnten die Glasplatten in die Gelkammer eingespannt werden. Die Gelkammer wurde im oberen und unteren Pufferreservoir mit Laufpuffer (1 x) gefüllt, der Kamm aus dem Gel herausgezogen und die Taschen sorgfältig mit einer Spritze gespült. Von den Proteinproben wurden jeweils 20 µl aufgetragen und vom Protein-Größenstandard (rainbow-marker, Amersham, Freiburg) 10 µl.

Der Gellauf erfolgte bei 80 – 100 V für ca. 2 Stunden bis die Lauffront des Bromphenolblaus den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

2.2.12 Semi-dry Transfer (blotting) der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran

Die der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden nach der Elektrophorese aus dem Polyacrylamidgel durch einen „semi-dry“ Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA 85, Porengröße: 0,45 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) überführt.

Auf die untere Graphitplatte (Anode) der Blottingapparatur (Amersham, Freiburg) wurden 3 Blottingpapiere gelegt (GB 002, Schleicher & Schuell, Dassel), die auf die Größe des Gels zugeschnitten und mit Transferpuffer vollgesogen waren. Darauf wurde die Nitrocellulosemembran, die in Wasser getaucht worden war, gelegt. Dann wurde das Gel aufgelegt und darauf schließlich noch einmal 3 Blottingpapiere mit Transferpuffer. Mit leichtem Druck wurden Luftblasen aus dem Stapel entfernt und die obere Graphitplatte (Kathode) des Apparates aufgelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 50 mA für 1,5 Stunden unter Kühlung mit Eis.

2.2.13 Immunoblotting

Die Detektion spezifischer Proteine auf der Nitrocellulosemembran erfolgte immunologisch mit Hilfe von Antikörpern und unter Verwendung des „ECL western blotting analysis system“ (Amersham, Freiburg).

Ein Primärantikörper (vgl. Tabelle 4) erkannte das nachzuweisende Protein und wurde seinerseits von einem Sekundärantikörper erkannt, der mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt war. Das Enzym oxidiert dann in Gegenwart eines phenolischen Verstärkers das zugegebene Substrat Luminol zu einem chemolumineszierenden Produkt, das mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert wird. Alle Bereiche der Nitrocellulosemembran, an die Primärantikörper und damit auch Sekundärantikörper gebunden haben, lumineszieren und schwärzen dadurch den Röntgenfilm. Als Inkubationslösung wurde für alle Schritte PBS verwendet, das mit 0,05 % Tween-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, Sigma, Deisenhofen) versetzt wurde. Tween-20 verhinderte unspezifische Antikörper-Antigen-Bindungen und erhöhte somit die Spezifität der Detektion. Alle Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler statt. Zunächst wurde die Nitrocellulosemembran für

1 Stunde in einer Magermilchlösung (5 %) inkubiert, um die proteinfreien Bereiche der Membran mit irrelevanten Proteinen zu besetzen (blocking). Dann folgten drei Waschschrte mit jeweils frischer Inkubationslösung in einem möglichst großen Volumen (30 - 50 ml): 1 x 15 Minuten und 2 x 5 Minuten. Dann wurde der Primärantikörper in einem möglichst kleinen Volumen (8 ml) Inkubationslösung verdünnt. Die optimale Konzentration für alle hier verwendeten Antikörper lag bei 1 µg/ml. Die Nitrocellulosemembran wurde für 1 bis 2 Stunden in der Primärantikörperlösung bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Wiederum folgten die drei Waschschrte, dann eine Inkubation in einer 1:3000-Verdünnung des Sekundärantikörpers für 30 bis 45 Minuten. Es wurden -je nach Herkunft des Primärantikörpers (Maus oder Kaninchen)- folgende Sekundärantikörper verwendet: „anti-Maus-Ig“ aus dem Schaf oder „anti-Kaninchen-Ig“ aus dem Esel (Pharmingen, Hamburg). Danach schlossen sich vier Waschschrte an: 1 x 15 Minuten und 4 x 5 Minuten. Schließlich wurden je 1 ml vom „detection reagent 1“ und „detection reagent 2“ (Amersham, Freiburg) gemischt, auf die Membran pipettiert, für 1 Minute dort belassen und wieder abgekippt. In der Dunkelkammer wurde die Membran in Frischhaltefolie eingepackt und unverzüglich ein Röntgenfilm (Biomax MR-1, Kodak, New York, USA) aufgelegt. Die optimale Expositionszeit musste in jedem Einzelfall empirisch festgestellt werden und reichte von 30 Sekunden bis zu 20 Minuten. Der Film wurde entsprechend den Herstellerangaben entwickelt und fixiert.

Tabelle 4:

Verwendete Primärantikörper (Santa Cruz, Heidelberg):

Spezifität	Bezeichnung (Klon)
Caspase-1	C-15
Caspase-3	N-19
Caspase-8	T-16
Bax	I-19
Bcl-xS/L	L-19
c-myc	A-14
PARP	H-250

2.2.14 Immunopräzipitation von löslichem Fas (sFas)

Hierbei wurde versucht, aus dem Zellkulturüberstand maligner B-Zellen mit Hilfe eines Antikörpers lösliches Fas (soluble Fas, sFas) auszufällen und durch Western Blotting mit dem gleichen Antikörper nachzuweisen. Der jeweilige Überstand (600 - 800 μ l) wurde zunächst für 1 Stunde bei 4 °C und unter Rotation mit 1 μ g des Antikörpers gegen sFas inkubiert (G 254-274, Pharmingen, Hamburg). Danach erfolgte die Zugabe von 20 μ l Protein A/G-Agarose (Santa Cruz, Heidelberg), die die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe untereinander vernetzte und damit ausfällte. Nach einer weiteren Stunde Inkubation unter den gleichen Bedingungen erfolgte eine Zentrifugation bei 720 x g und 4 °C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag viermal mit PBS ohne Tween (vgl. Punkt 2.2.13) gewaschen und schließlich in 25 μ l Proben-Puffer (vgl. 2.2.10) aufgenommen; hier allerdings ohne β -Mercaptoethanol und somit unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Es folgten SDS-PAGE und Immunoblotting wie unter den Punkten 2.2.11 bis 2.2.13 beschrieben. Als Positivkontrolle wurden 100 ng rekombinantes sFas (Pharmingen, Hamburg) in 1 ml Wasser bzw. Zellkulturmedium gelöst und wie oben beschrieben ausgefällt.

III. Ergebnisse

1. Das T-Zell-Repertoire von Patienten mit MALT-Typ Lymphom zeigt antigen-induzierte klonale T-Zell-Expansionen

Das T-Zell-Repertoire ist die Gesamtheit aller antigenspezifischen, reifen T-Zellen eines Menschen. Die T-Zellen sind über ihren Antigenrezeptor (TCR) gut charakterisierbar, indem die für jede T-Zelle individuelle Expression der V β -Kette („V β -Familie“) des TCR bestimmt wird. Mit Hilfe einer V β -familienspezifischen RT-PCR wurden in dieser Arbeit tumor-infiltrierende T-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen mit peripheren T-Zellen aus dem Blut des gleichen Patienten in Hinblick auf ihre klonale Zusammensetzung untersucht. Dabei wurde bei jedem Patienten die Expression aller untersuchten 23 V β -Familien sowohl im Tumor als auch in der Peripherie gefunden. Es lag also kein eingeschränktes T-Zell-Repertoire vor.

Die weitere Analyse konzentrierte sich auf die Längenverteilung der Transkripte der einzelnen V β -Familien. Aufgrund der variierenden Länge des antigenerkennenden Abschnitts der V β -Kette (CDR3) gibt es in jeder V β -Familie 6 - 8 Größenklassen, die in annähernder Gauß'scher Normalverteilung vorliegen (vgl. Abbildung 5). Jedes Heraus-treten eines oder mehrerer Peaks aus der Normalverteilung ist eine antigen-induzierte klonale Expansion einzelner T-Zellen mit einer bestimmten CDR3-Länge. Derartige Expansionen fanden sich in allen untersuchten MALT-Typ Lymphomen (vgl. Tabelle 5). Eine bestimmte Verteilung dieser Expansionen auf die verschiedenen V β -Familien war nicht erkennbar. Es trat beim Patienten H1851/95 beispielsweise eine Expansion in der Familie V β 2 auf, während beim Patienten H6006/95 die Längenverteilung von V β 2 weitgehend normal war (vgl. Abbildung 9). Die meisten klonalen T-Zell-Expansionen waren gleichzeitig im Tumor und in der Peripherie zu finden. Abbildung 10 zeigt dies exemplarisch für V β 4 des Patienten H6006/95. Beim Patienten H5690/95 hatte sich interessanterweise eine derartige gemeinsame klonale T-Zell-Expansion 15 Monate nach der operativen Entfernung des Tumors auch in der Peripherie zurückgebildet (vgl. Abbildung 11).

Von großer Bedeutung für die Untersuchung der Vorgänge im Tumor sind vor allem diejenigen klonalen T-Zell-Expansionen, die nur im Tumor und nicht im peripheren Blut auftraten. In den drei untersuchten MALT-Typ Lymphomen gab es jeweils 2 bis 4 derartige tumor-spezifische Expansionen (vgl. Tabelle 5 und Abbildung 12).

Tabelle 5:

Klonale Expansionen tumor-infiltrierender T-Zellen und peripherer T-Zellen von MALT-Typ Lymphomen. Angegeben ist jeweils die V β -Familie der TCR-Transkripte, in welcher die klonale Expansion auftritt.

Patient	Expansion nur in tumor-infiltrierenden T-Zellen	Expansion nur in peripheren T-Zellen	gemeinsame Expansion in tumor-infiltrierenden und peripheren T-Zellen
H6006/95	9, 16, 17	6, 8, 13, 21, 22	1, 3, 4, 5, 7, 14, 15, 18, 23
H4364/94	14, 19	1, 15	2, 4, 5, 6, 10, 12, 13, 16, 21
H5690/95	1, 5, 9, 21	2, 3, 7, 22, 23	4, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 24
H1851/95	1, 2, 5, 7, 8, 15, 16, 19, 20, 23	keine peripheren T-Zellen verfügbar	---

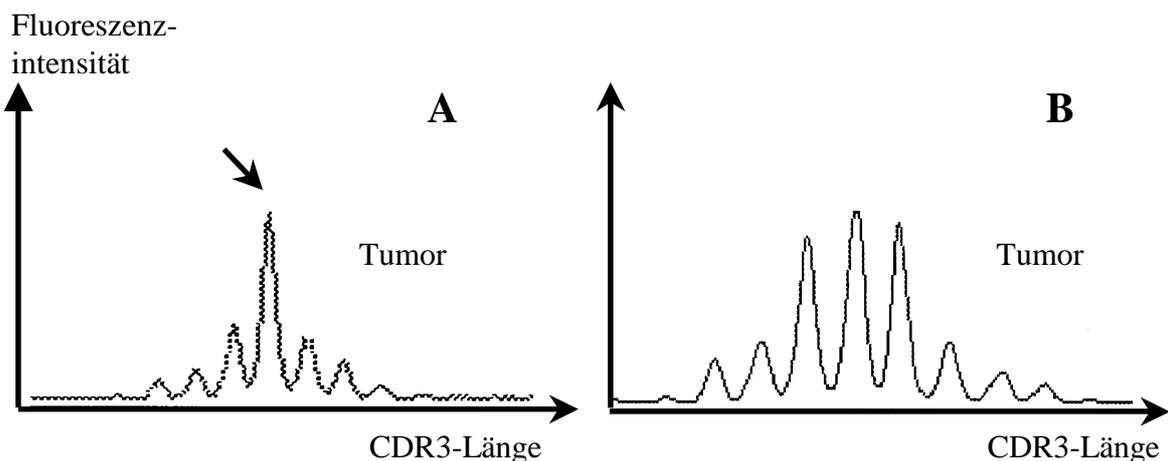


Abbildung 9:

CDR3-Längenverteilung von V β 2-Transkripten des TCR von tumor-infiltrierenden T-Zellen. Eine klonale T-Zell-Expansion ist nur bei Patient H1851/95 (A, Pfeil) zu finden, nicht aber beim Patienten H6006/95 (B).

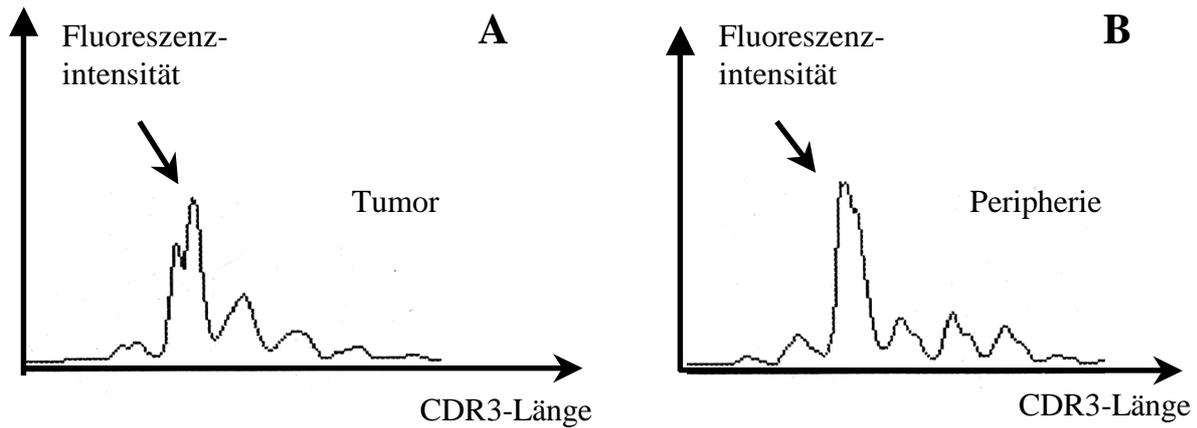


Abbildung 10:

Beispiel für eine gemeinsame klonale T-Zell-Expansion (Pfeil) in Tumor (A) und Peripherie (B) eines Patienten. Dargestellt ist die CDR3-Längenverteilung der V β 4-Transkripte des TCR von tumor-infiltrierenden T-Zellen und peripheren T-Zellen des Patienten H6006/95.

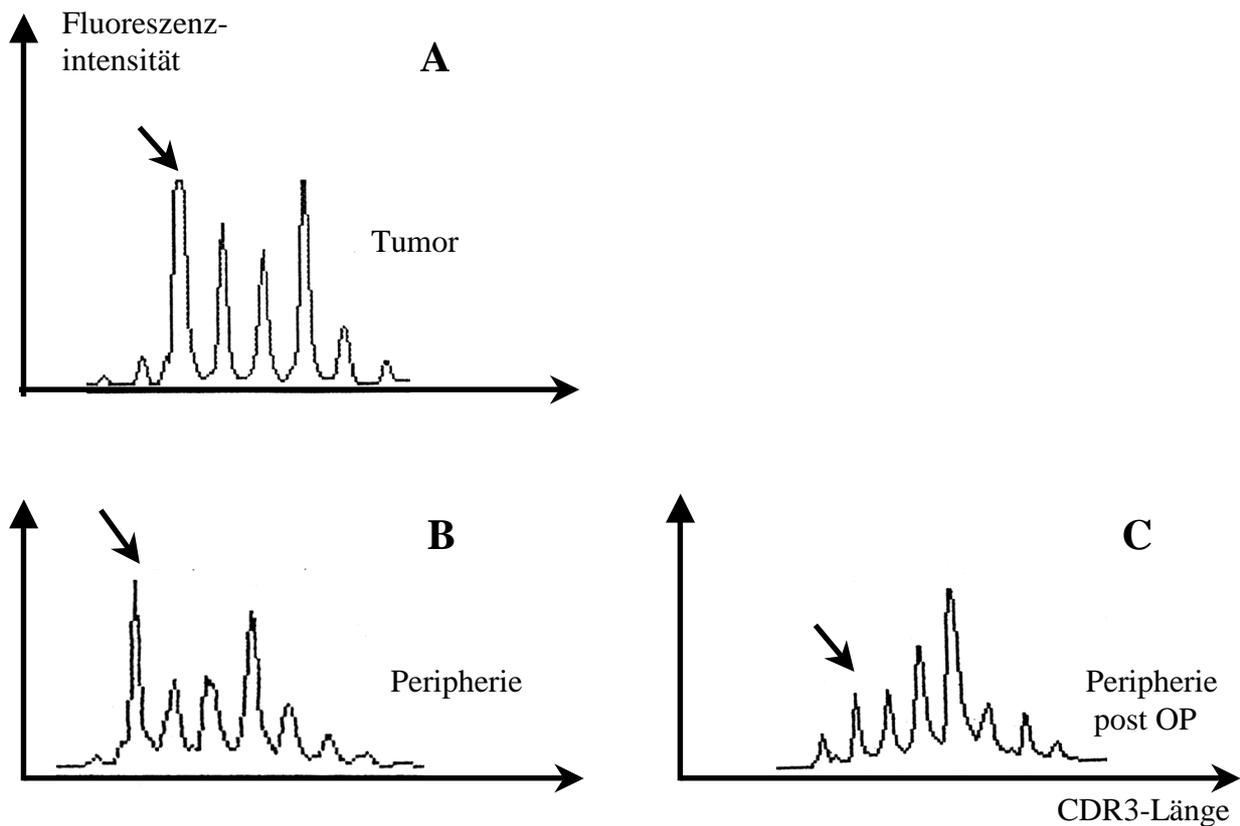


Abbildung 11:

Eine gemeinsame klonale T-Zell-Expansion (Pfeil) in Tumor (A) und Peripherie (B) hat sich 15 Monate nach operativer Entfernung des Tumors (post OP) auch in der Peripherie zurückgebildet (C). Dargestellt ist die CDR3-Längenverteilung der V β 16-Transkripte des TCR von tumor-infiltrierenden T-Zellen und peripheren T-Zellen des Patienten H5690/95.

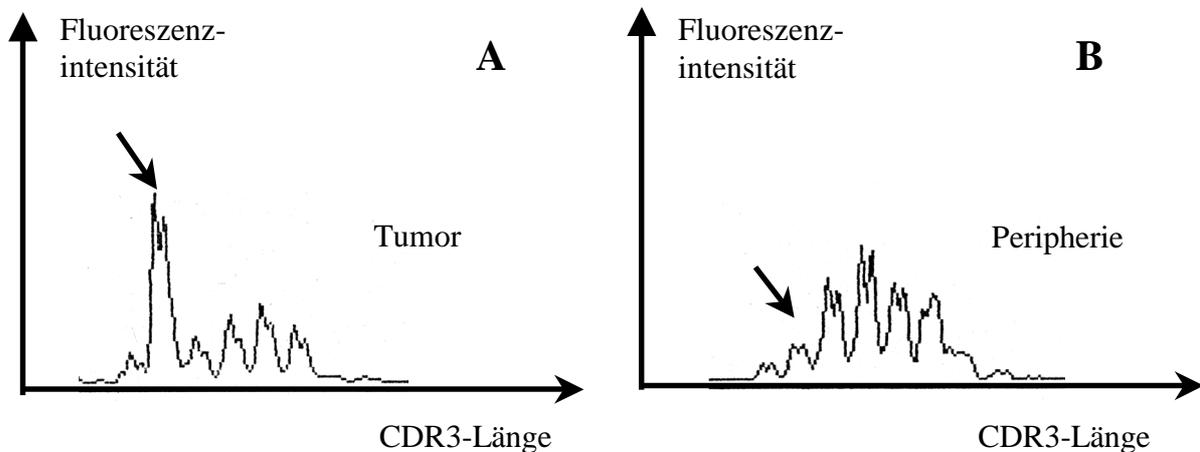


Abbildung 12:

Beispiel für eine nur im Tumor (A), aber nicht in der Peripherie (B) eines Patienten vorkommende klonale T-Zell-Expansion (Pfeil). Dargestellt ist die CDR3-Längenverteilung der $V\beta 17$ -Transkripte des TCR von tumor-infiltrierenden T-Zellen und peripheren T-Zellen des Patienten H6006/95.

2. Die tumor-infiltrierenden T-Zellen zweier Patienten mit MALT-Typ Lymphom besitzen ähnliche Antigen-erkennungsstellen

Bei zwei Patienten (H6006/95 und H1851/95), deren MALT-Typ Lymphome eine unterschiedliche Lokalisation und Vorgeschichte hatten, wurden die $V\beta 2$ -Transkripte des TCR von tumor-infiltrierenden T-Zellen kloniert und sequenziert. Der Patient H1851/95 besaß im Gegensatz zum Patienten H6006/95 eine klonale Expansion von T-Zellen mit $V\beta 2$ -Transkripten (vgl. Abbildung 9). Von besonderem Interesse für die Sequenzierung war der antigenerkennende Bereich (CDR3) der Transkripte. Die CDR3 erhält ihre hohe Variabilität durch die genetische Verknüpfung eines $V\beta$ -Gens mit einem $J\beta$ - (joining) Gensegment und durch das zufällige Einfügen beliebiger Nukleotide im Rahmen von somatischen Mutationen. Aufgrund dieser Mechanismen besitzt jede T-Zelle bzw. jeder auf diese Zelle zurückgehender monoklonale T-Zell-Klon eine individuelle CDR3.

Vom Patienten H6006/95 wurden sieben, vom Patienten H1851/95 acht unabhängige Klone der V β 2-Transkripte sequenziert und die Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) anhand der Nukleotidsequenz abgeleitet (vgl. Abbildung 13). Der Patient H6006/95, der keine klonale T-Zell-Expansion aufwies, besaß V β 2-Transkripte mit einer CDR3-Länge von 16 AS (43 % aller Transkripte), 20 AS (14 %) und 21 AS (43 %). Demgegenüber besaß Patient H1851/95 eine Präferenz für V β 2-Transkripte mit einer CDR3-Länge von 20 AS (62,5 %), was die klonale T-Zell-Expansion widerspiegelt. Die übrigen V β 2-Transkripte dieses Patienten hatten eine CDR3-Länge von 19 AS (12,5 %) und 21 AS (25 %). Der AS-Sequenzvergleich zeigte eine große Sequenzähnlichkeit. So wiesen die tumor-infiltrierenden T-Zellen beider Patienten identische J β -Segmente in ihrer CDR3 auf. Die Transkripte beider Patienten mit einer CDR3-Länge von 20 AS besaßen jeweils J β 1.5-Segmente und die Sequenzhomologie der gesamten CDR3 betrug 75 %. Transkripte mit einer CDR3-Länge von 21 AS besaßen jeweils J β 2.1-Segmente und eine Sequenzhomologie von noch 67 % (vgl. Abbildung 13, Pfeile).

Darüber hinaus fanden sich in beiden Patienten identische J β -Segmente in Transkripten mit jeweils verschiedener CDR3-Länge: J β 2.3-Segmente wurden in Transkripten mit einer CDR3-Länge von 16 AS (Patient H6006/95), 19 AS (Patient H1851/95) und 21 AS (Patient H1851/95) verwendet. J β 1.2-Segmente fanden sich in Transkripten mit einer CDR3-Länge von 20 AS (Patient H1851/95) und 21 AS (Patient H6006/95, vgl. Abbildung 13, Symbole).

Beim Patienten H1851/95 besaßen fünf Transkripte die dominante CDR3-Länge von 20 AS der klonal expandierten T-Zellen. Von diesen fünf Transkripten enthielten eines das J β 1.5-Segment und vier das J β 1.2-Segment. Von diesen vier Transkripten hatten drei eine identische AS-Sequenz in der gesamten CDR3, während das verbleibende Transkript zwei abweichende AS aufwies (vgl. Abbildung 13).

H6006/95 Vβ 2		CDR3			
Klon 19:	CSA	L D L E <u>Q Y F G P G</u> T R L T V T	*	Jβ 2.3	
Klon 20:	CSA	R S G <u>E L F F G E G</u> S S L T V L		Jβ 2.2	
Klon 22:	CSA	R S G <u>E L F F G E G</u> S S L T V L		Jβ 2.2	
Klon 17:	CSA	K P G Y S <u>N Q P Q H F G D G</u> T R L S I L	←	Jβ 1.5	
Klon 18:	CSA	R D G R G S Y <u>N E Q F F G P G</u> T R L T V L	←.....	Jβ 2.1	
Klon 24:	CSA	R D G R G S Y <u>N E Q F F G P G</u> T R L T V L	←.....	Jβ 2.1	
Klon 23:	CSA	R D P S D L N Y G Y T <u>F G S G</u> T R L T V V	○	Jβ 1.2	
H1851/95 Vβ 2		CDR3			
Klon 8:	CSA	R N P S D E T <u>Q Y F G P G</u> T R L L V L	*	Jβ 2.3	
Klon 10:	CSA	E L A R G <u>N Q P Q H F G D G</u> T R L S I L	←	Jβ 1.5	
Klon 1:	CSA	S M Q G S N E K L F <u>F G S G T</u> Q L S V L	○	Jβ 1.2	
Klon 4:	CSA	S M Q G S N E K L F <u>F G S G T</u> Q L S V L	○	Jβ 1.2	
Klon 5:	CSA	G M G G S N E K L F <u>F G S G T</u> Q L S V L	○	Jβ 1.2	
Klon 9:	CSA	S M Q G S N E K L F <u>F G S G T</u> Q L S V L	○	Jβ 1.2	
Klon 2:	CSA	R A G T G A G E T <u>Q Y F G P G</u> T R L L V L	*	Jβ 2.3	
Klon 3:	CSA	C P D D K A G <u>N E Q F F G P G</u> T R L T V L	←.....	Jβ 2.1	

Abbildung 13:

Abgeleitete Aminosäuresequenz des antigenerkennenden Abschnitts (CDR3) des TCR von tumor-infiltrierenden T-Zellen aus zwei verschiedenen MALT-Typ Lymphomen. Die Jβ-Segmente der CDR3 sind unterstrichen und am Zeilenende bezeichnet. Die Pfeile verweisen auf in beiden Patienten gleiche Jβ-Segmente bei gleichen CDR3-Längen; die Symbole („Φ“ und „o“) bezeichnen in beiden Patienten gleiche Jβ-Segmente bei verschiedenen CDR3-Längen.

3. FasL mRNA wird in MALT-Typ Lymphomen *in vivo* von T-Zellen exprimiert

Um die tumor-infiltrierenden T-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen auch im Hinblick auf ihre funktionelle Kompetenz näher zu charakterisieren, wurde die Expression von FasL untersucht. FasL-Expression ist die Voraussetzung, damit T-Zellen gegenüber B-Zellen ihre Kontrollfunktion ausüben können. In einem ersten Screening wurde aus tiefgefrorenem Tumorgewebe RNA isoliert und eine semiquantitative RT-PCR mit FasL-spezifischen Primern durchgeführt. Dabei konnten in fünf von sechs untersuchten MALT-Typ Lymphomen und allen untersuchten DLBL FasL-Transkripte nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 14).

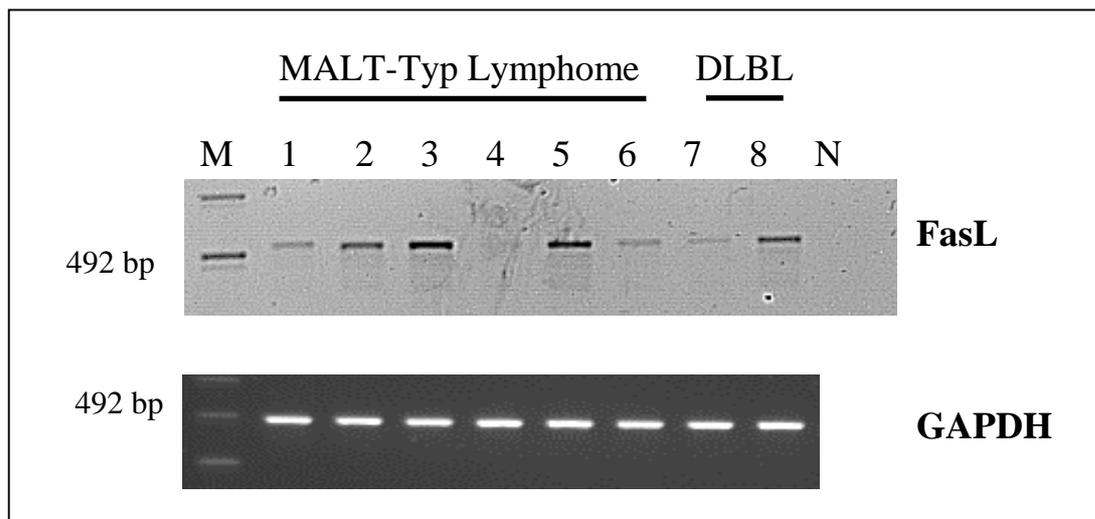


Abbildung 14:

Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis von FasL-Transkripten in Tumorgewebe von MALT-Typ Lymphomen und DLBL. Als Mengenstandard dienten amplifizierte GAPDH-Transkripte.

N: Negativkontrolle, M: Größenstandard.

1: H705/93, 2: H6006/95, 3: H4236/95, 4: H1851/95, 5: H4364/94, 6: H5690/95, 7: H4365/94, 8: H5030/94.

Bei diesem ersten Nachweis der FasL-Expression *in vivo* wurde das gesamte Tumorgewebe und damit ein Gemisch verschiedener Zellen untersucht, daher blieb noch offen, ob

die FasL-Transkripte tatsächlich von den T-Zellen stammen. In einem zweiten Schritt wurden daher maligne B-Zellen und tumor-infiltrierende T-Zellen aus dem Tumorgewebe des Patienten H4365/94 voneinander getrennt und entweder sofort untersucht oder unter nicht-stimulierenden bzw. stimulierenden Bedingungen kultiviert. Aus den B- und T-Zellen wurden RNA und cDNA gewonnen und die semiquantitative RT-PCR mit den FasL-spezifischen Primern wiederholt. Als Kontrolle dienten normale B- und T-Zellen einer Tonsille, die identisch behandelt worden waren. Es zeigte sich, daß weder die malignen B-Zellen des untersuchten MALT-Typ Lymphoms noch die normalen B-Zellen der Tonsille mRNA für FasL exprimierten (vgl. Abbildung 15). Dagegen exprimierten sowohl frisch isolierte tumor-infiltrierende T-Zellen des MALT-Typ Lymphoms als auch T-Zellen der Tonsille mRNA für FasL. Interessanterweise verschwand diese Expression, wenn die T-Zellen beider Fraktionen für 6 Stunden in Kultur genommen wurden. Wenn dagegen die Zellkultur unter Ionomycin-Stimulation durchgeführt wurde, blieb die Expression von mRNA für FasL in abgeschwächter Form bestehen.

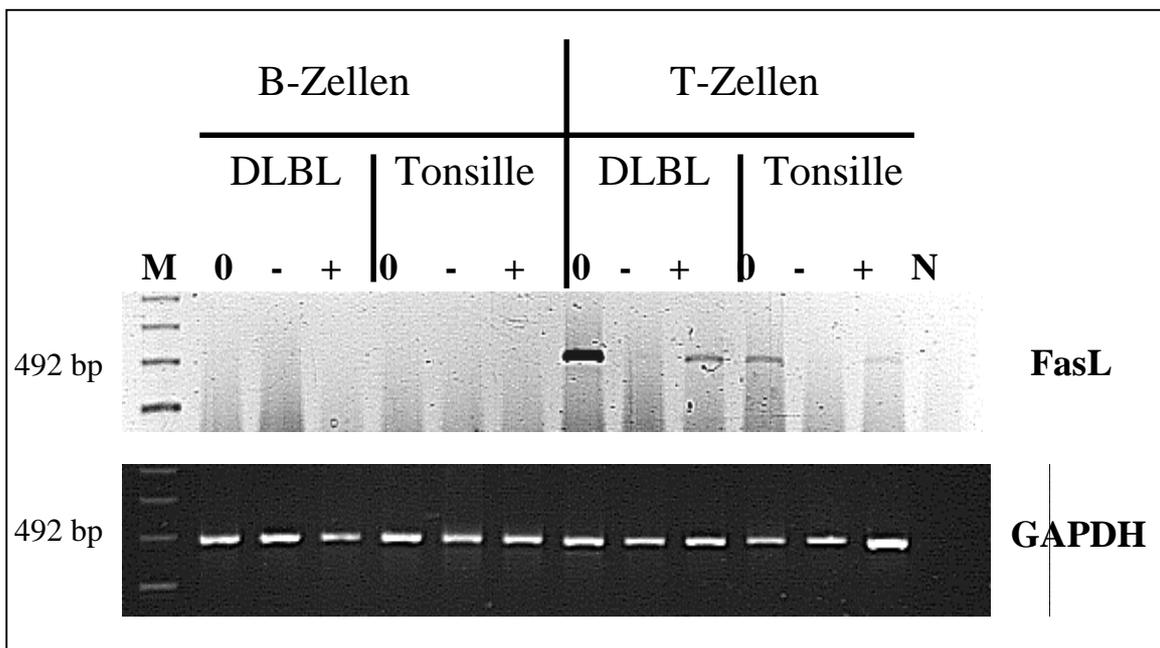


Abbildung 15:

Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis von FasL-Transkripten in getrennten B- und T-Zellen des Patienten H4365/94 und einer Tonsille als Kontrolle. Als Mengensstandard dienten amplifizierte GAPDH-Transkripte. Die Zellen wurden entweder sofort nach der Trennung untersucht („0“) oder für 6 Stunden ohne („-“) bzw. mit („+“) dem unspezifisch stimulierenden Agens Ionomycin (400 ng/ml) kultiviert.

M: Größenstandard, N: Negativkontrolle.

4. Der T-Zell-Einfluss steigert die Fas-Expression normaler Gedächtnis-B-Zellen und maligner B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen

Der Schwerpunkt der Untersuchungen wurde jetzt auf die malignen B-Zellen der MALT-Typ Lymphome verlagert, die *in vitro* zusammen mit aktivierten T-Zellen einer Tonsille kultiviert wurden. Die erste Frage war dabei, ob die malignen B-Zellen Fas, das Kooperationsmolekül für den FasL der tumor-infiltrierenden T-Zellen, exprimieren. Die Fas-Expression der B-Zellen wurde in der FACS-Analyse nachgewiesen. Die Messungen wurden an normalen Gedächtnis-B-Zellen und malignen B-Zellen durchgeführt, die 24 Stunden ohne bzw. mit aktivierten T-Zellen kultiviert wurden. Für die Auswertung wurden nur B-Zellen (CD19⁺) berücksichtigt und die Expressionsstärke von Fas wurde durch die Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI) dargestellt. Von der gemessenen MFI wurde jeweils der MFI der Isotypkontrolle subtrahiert. Dabei handelte es sich um identische B-Zellen, die in einem Parallelansatz mit einem irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps inkubiert worden waren.

Normale Gedächtnis-B-Zellen (CD19⁺, IgM⁺, CD38⁻, IgD⁻) einer Tonsille verdoppelten durch den Einfluß von T-Zellen ihre konstitutive Fas-Expression von 19,7 (MFI) auf 44,5 (MFI) (vgl. Abbildung 16).

Die konstitutive und T-Zell-induzierte Fas-Expression maligner B-Zellen aller untersuchten MALT-Typ Lymphome ist in Abbildung 17 A dargestellt. In allen Fällen war die konstitutive Fas-Expression maligner B-Zellen im Vergleich zu normalen B-Zellen um mindestens 50 % vermindert. T-Zell-Einfluss führte auch bei malignen B-Zellen zu einer deutlichen Steigerung der Fas-Expression, die jedoch in ihrem Absolutwert stets unter dem normaler B-Zellen blieb. Die sieben untersuchten Tumoren ließen sich bezüglich der Fas-Expression in zwei Untergruppen einteilen. Die Fälle H6006/95, H1851/95 und H3302/88 wiesen eine durchschnittlich doppelt so hohe konstitutive und induzierbare Fas-Expression auf wie die übrigen vier Fälle. Bei den malignen B-Zellen der sechs untersuchten DLBL dagegen zeigte sich ein heterogenes Bild (vgl. Abbildung 17 B). In den Fällen 22903/96 und H4487/97 war die konstitutive Fas-Expression höher als bei normalen B-Zellen und konnte durch T-Zell-Einfluss nicht mehr gesteigert werden. In den Fällen H1479/95 und

H4590/96 war die konstitutive Fas-Expression ebenfalls höher als bei normalen B-Zellen und wurde durch T-Zell-Einfluss noch gesteigert. Die konstitutive Fas-Expression der beiden verbleibenden Fälle H4365/94 und H5503/96 dagegen entsprach etwa der von normalen Gedächtnis-B-Zellen.

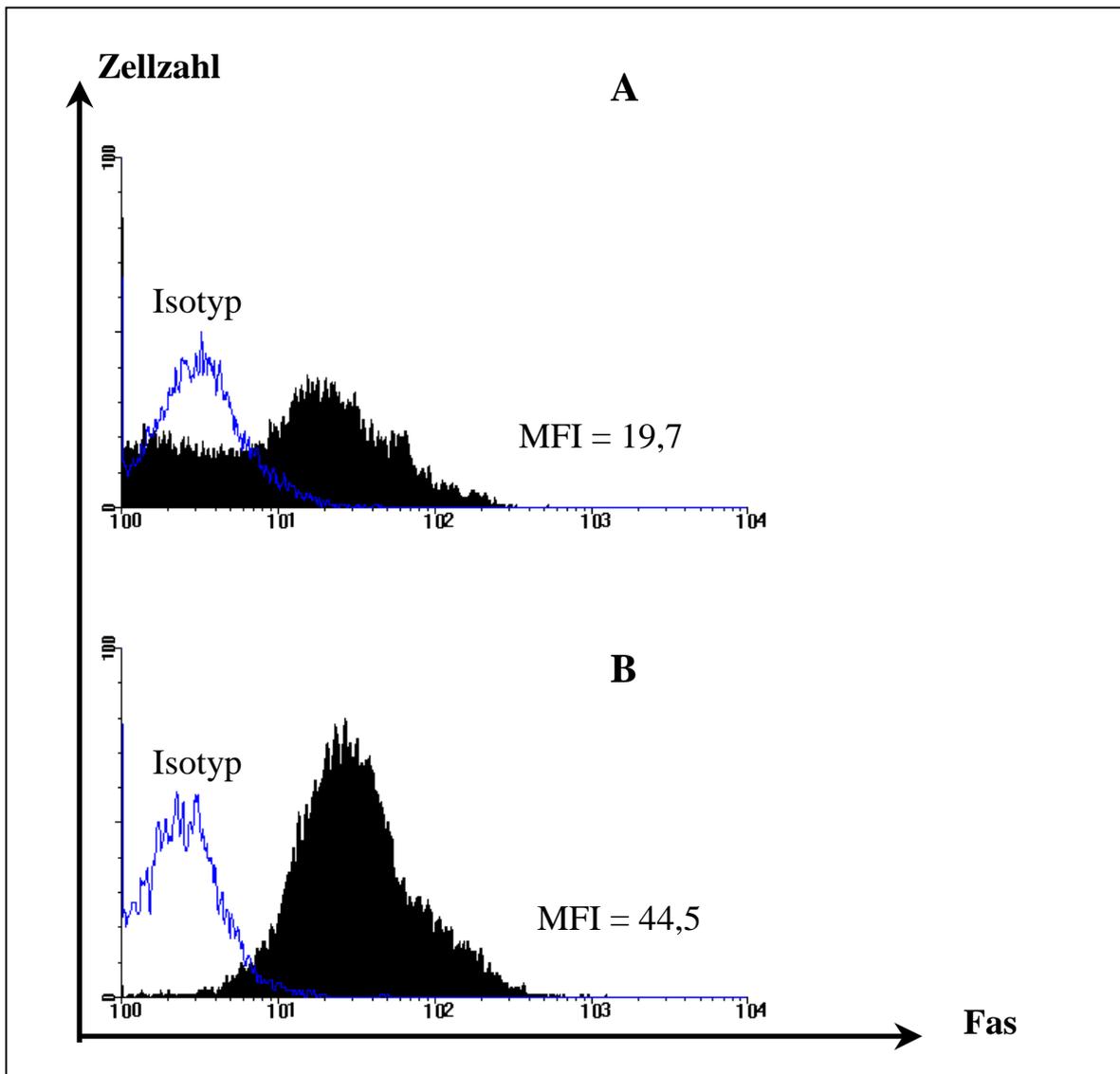


Abbildung 16:

FACS-Analyse (Histogramm) der Fas-Expression normaler Gedächtnis-B-Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden ohne (A) bzw. mit T-Zellen (B) kultiviert. Der T-Zell-Einfluss steigerte die Fas-Expression der B-Zellen. Als Maß der Fas-Expressionsstärke sind die MFI-Werte (mean fluorescence intensity) angegeben.

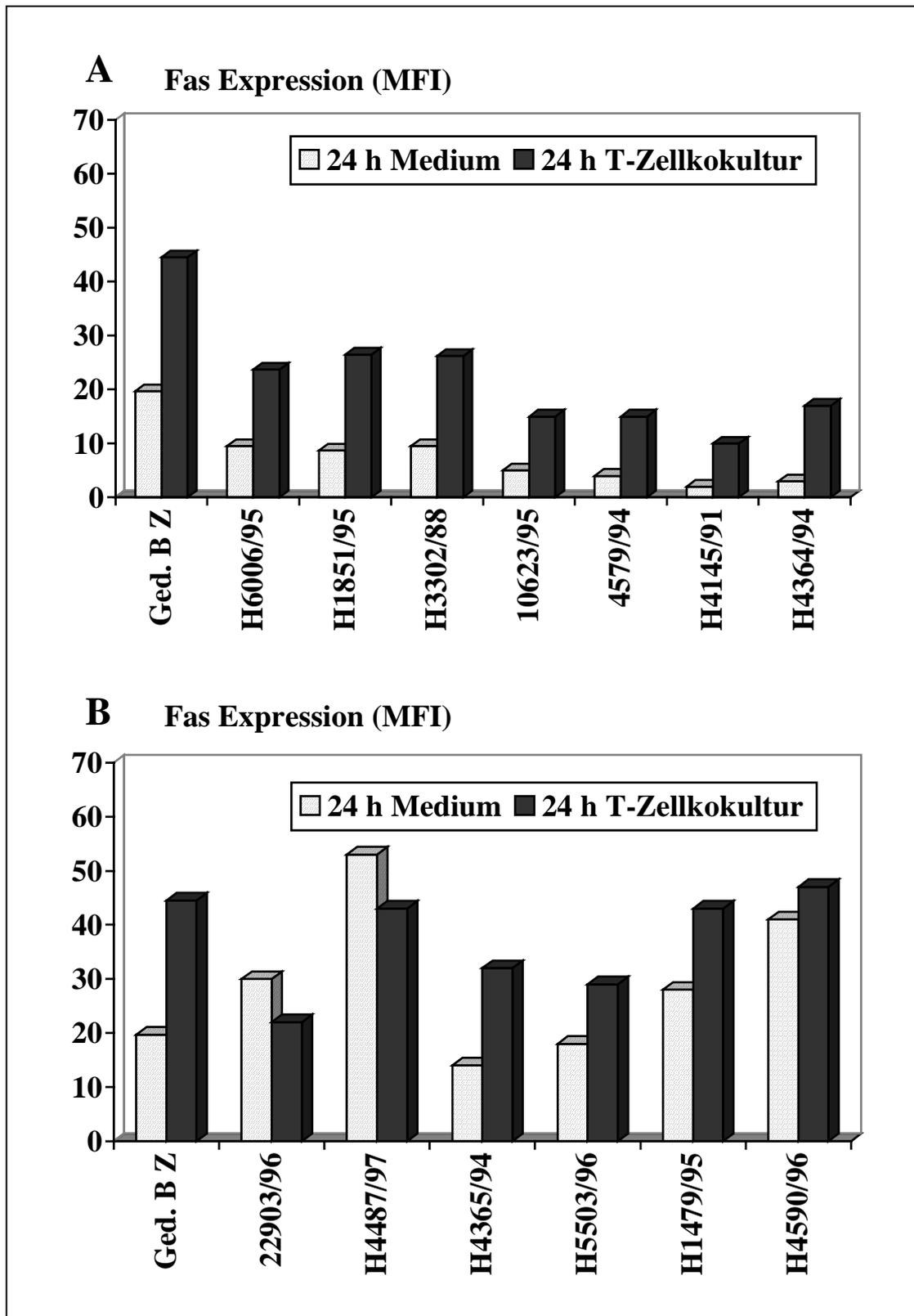


Abbildung 17:

Einfluss aktivierter T-Zellen auf die Fas-Expression normaler Gedächtnis-B-Zellen (Ged.BZ) und maligner B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen (A) und DLBL (B).

5. Einige MALT-Typ Lymphome und fast alle untersuchten DLBL zeigen verminderte Sensitivität gegenüber T-Zell induzierter, Fas/FasL-vermittelter Apoptose

Um zunächst zu prüfen, ob die in unserer B/T-Zell-Kokultur *in vitro* untersuchte Apoptose von B-Zellen tatsächlich von den T-Zellen induziert wurde und via Fas/FasL Wechselwirkung erfolgte, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Dabei wurde das Fas-Molekül der B-Zellen durch die Zugabe eines nicht-induzierenden Antikörpers (ZB4, Immunotech, Heidelberg) blockiert. Somit war die Bindungsstelle für FasL nicht mehr zugänglich und die B-Zellen waren vor Apoptose geschützt. Abbildung 18 zeigt dies exemplarisch für apoptose-sensitive maligne B-Zellen des Patienten H4364/94. Die Anwesenheit des blockierenden Antikörpers in der T-Zell-Kokultur reduzierte die Anzahl der toten B-Zellen von 63 % auf 38 %.

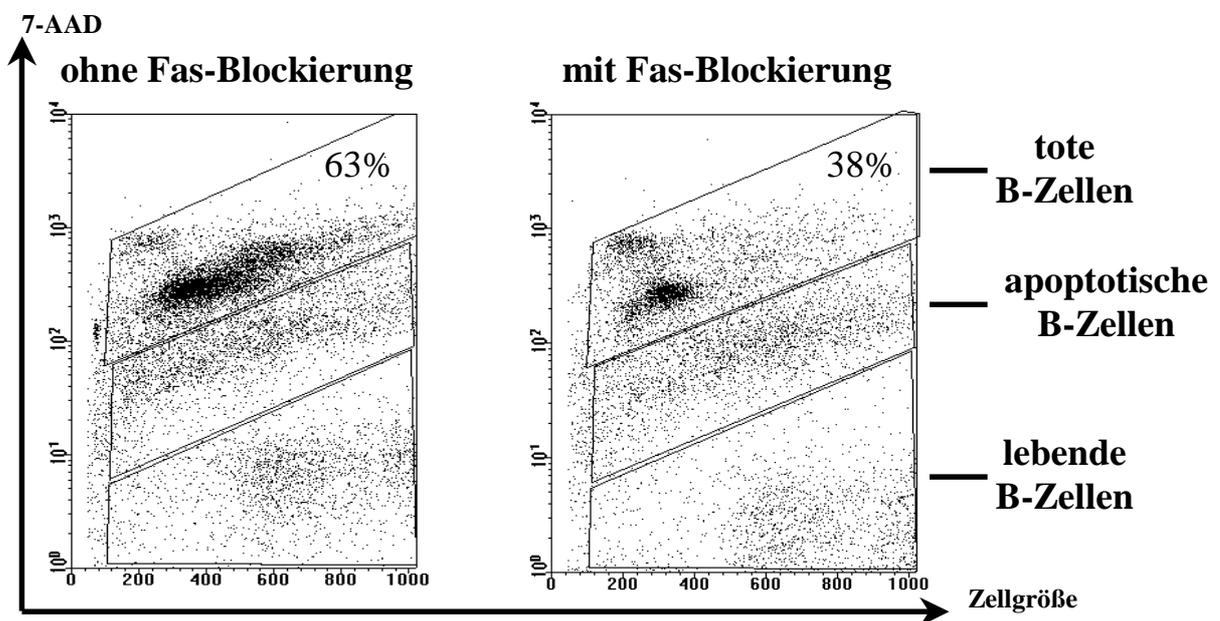


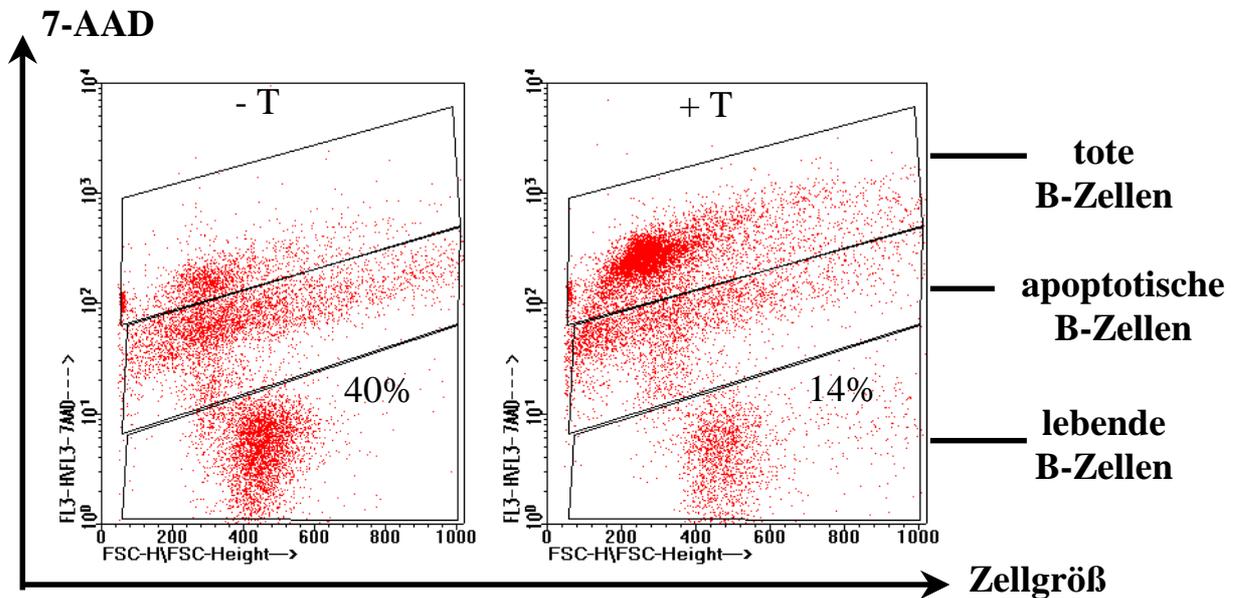
Abbildung 18:

Kontrollversuch zur Fas-vermittelten Apoptose. Dargestellt ist die FACS-Auswertung eines 7-AAD-Versuchs zur Bestimmung des Anteils toter Zellen. Maligne B-Zellen wurden für 24 h in zwei Parallelansätzen ohne bzw. mit dem blockierenden anti-Fas-Antikörper ZB4 zusammen mit aktivierten T-Zellen kokultiviert.

Wurden normale Gedächtnis-B-Zellen mit aktivierten T-Zellen kokultiviert, so verminderte sich der Anteil überlebender B-Zellen auf 14 %, während in einem Kontrollansatz ohne T-Zellen 40 % der B-Zellen überlebten. Das heißt, die T-Zellen induzierten unter den gegebenen Versuchsbedingungen Apoptose in den B-Zellen (vgl. Abbildung 19 A und Abbildung 20).

Bei malignen B-Zellen von MALT-Typ Lymphomen ergab sich dagegen ein differenziertes Bild. In drei von sieben untersuchten Fällen kam es zu keiner Apoptose-Induktion; die Zahl der überlebenden B-Zellen in der T-Zell-Kokultur war im Vergleich zum Kontrollansatz entweder konstant geblieben (H1851/95, vgl. Abbildung 19B und Abbildung 20) oder sogar etwas gestiegen (H6006/95, H3302/88). Die restlichen vier Fälle dagegen zeigten eine den normalen B-Zellen vergleichbare Sensitivität gegenüber T-Zell-induzierter, Fas-vermittelter Apoptose. In drei Fällen (10623/95, 4579/94, H4145/91) überlebten allerdings im Kontrollansatz mehr B-Zellen, in einem Fall (H4364/94) weniger als bei den normalen Gedächtnis-B-Zellen. Maligne B-Zellen aus DLBL zeigten dagegen schon in den jeweiligen Kontrollansätzen eine generell geringere Überlebensrate (vgl. Abbildung 20 B). In einem Fall (H5503/96) waren überhaupt keine lebenden B-Zellen mehr nachweisbar. In zwei Tumoren (22903/96, H4365/94) führte der T-Zell-Einfluss jedoch zu einer gesteigerten Überlebensrate der malignen B-Zellen und in weiteren zwei Tumoren (H4487/97, H1479/95) zu einem gleichbleibenden Überleben der malignen B-Zellen auf niedrigem Niveau. Insgesamt gesehen, zeigten die hier untersuchten DLBL Apoptose-Resistenz vor dem Hintergrund einer niedrigen Überlebensrate. Eine Ausnahme stellt allerdings Patient H4590/96 dar, dessen maligne B-Zellen eine ähnliche Überlebensrate und Apoptose-Sensitivität zeigten wie normale Gedächtnis-B-Zellen.

A



B

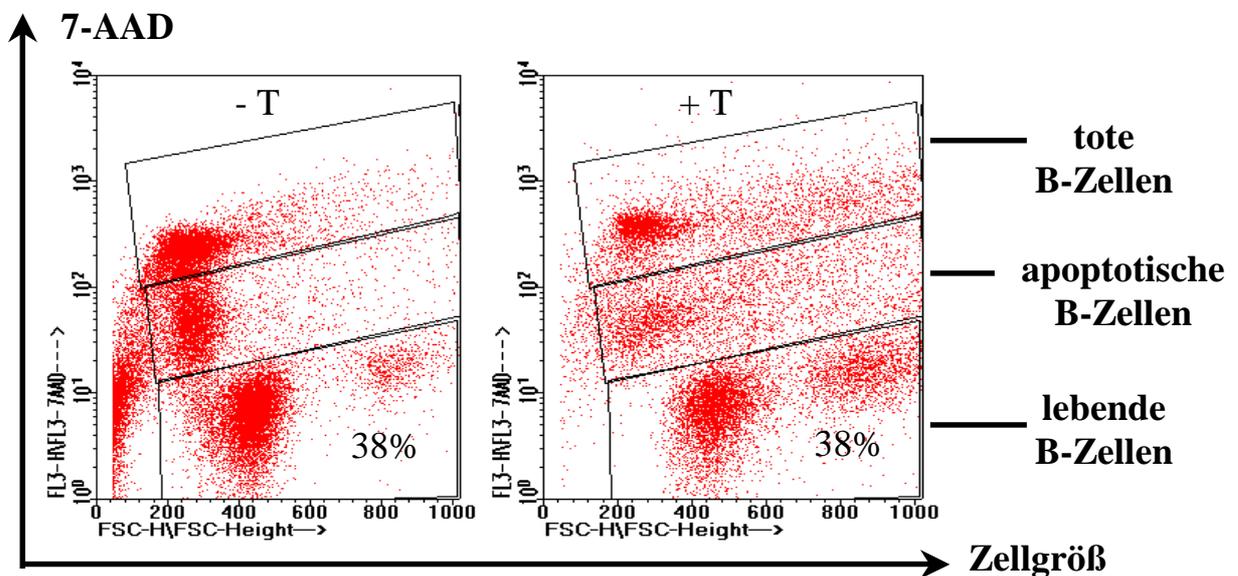


Abbildung 19:

FACS-Auswertung eines 7-AAD-Versuchs zur Unterscheidung lebender, apoptotischer und toter B-Zellen.

A: Bei normalen Gedächtnis-B-Zellen sank die Rate überlebender B-Zellen von 40 % in einem Kontrollansatz (-T) auf 14 % in der T-Zell-Kokultur (+T).

B: Bei malignen B-Zellen des MALT-Typ Lymphoms H1851/95 dagegen blieb die Rate überlebender B-Zellen auch in der T-Zell-Kokultur konstant bei 38 %.

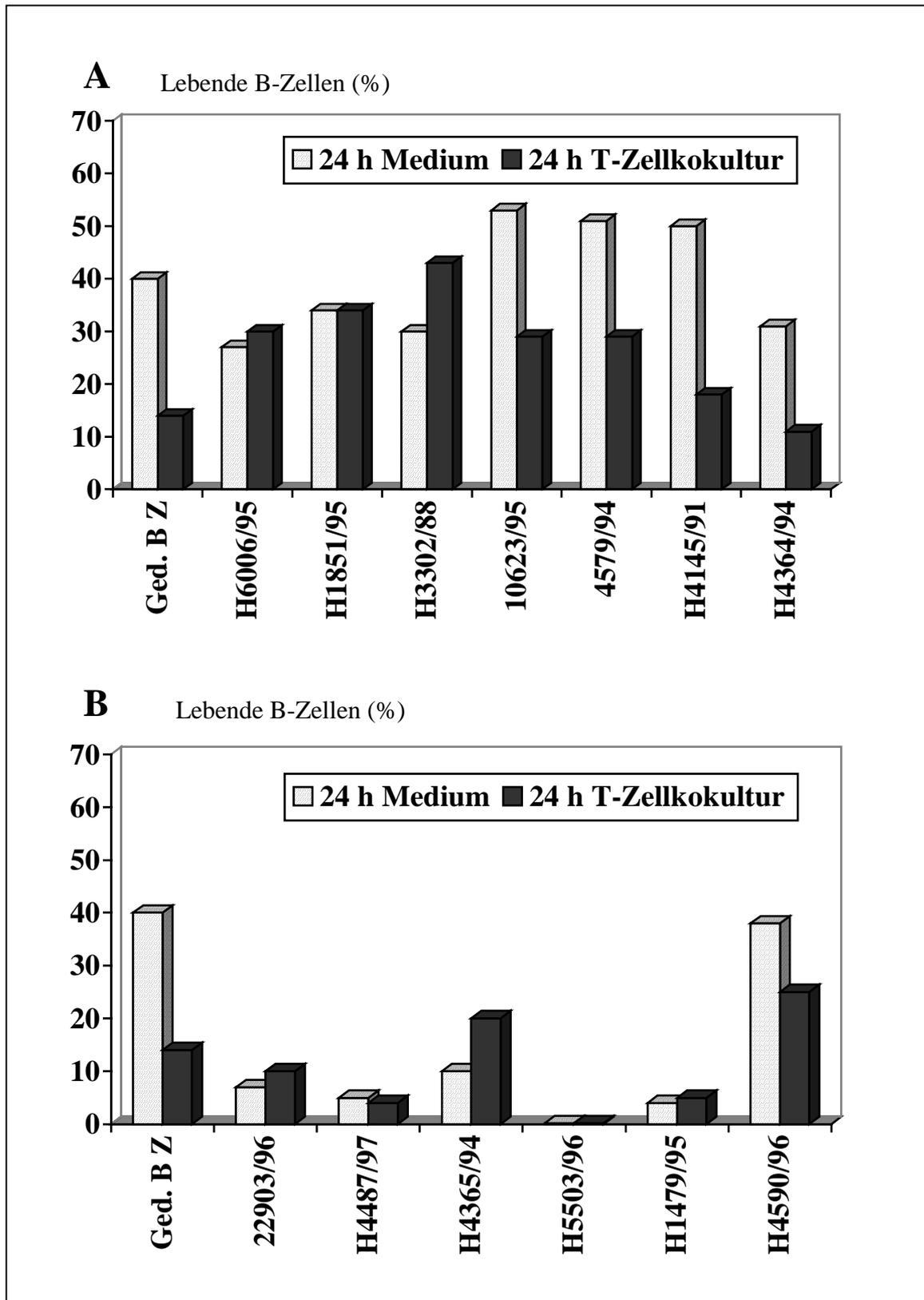


Abbildung 20:

Überlebensrate maligner B-Zellen von MALT-Typ Lymphomen (A) und DLBL (B) in einem Kontrollansatz (24h Medium) bzw. in der T-Zell-Kokultur. Zum Vergleich ist jeweils die Überlebensrate normaler Gedächtnis-B-Zellen (Ged BZ) dargestellt.

Zusammenfassend sind die Überlebensraten normaler und maligner B-Zellen mit und ohne T-Zell-Kokultur in Abbildung 21 dargestellt. Hier wurde der Quotient aus dem Prozentsatz überlebender B-Zellen mit T-Zell-Kokultur und überlebender B-Zellen ohne T-Zell-Kokultur gebildet. Ein Wert unter 1 bedeutet Apoptose-Induktion. Der kleinste Wert von 0,35 war bei normalen Gedächtnis-B-Zellen zu finden. Diese Zellen waren somit am sensitivsten für die T-Zell-induzierte Apoptose. Bei malignen B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen waren vier Fälle apoptose-sensitiv und erreichten einen durchschnittlichen Wert von 0,45. Anders dagegen die drei apoptose-resistenten Fälle, die einen durchschnittlichen Wert von 1,18 aufwiesen. In der gleichen Größenordnung, nämlich 1,22 lag auch der durchschnittliche Wert aller untersuchten DLBL. Es war also eine mit dem Malignitätsgrad der B-Zellen zunehmende Resistenz gegenüber T-Zell-induzierter Apoptose festzustellen.

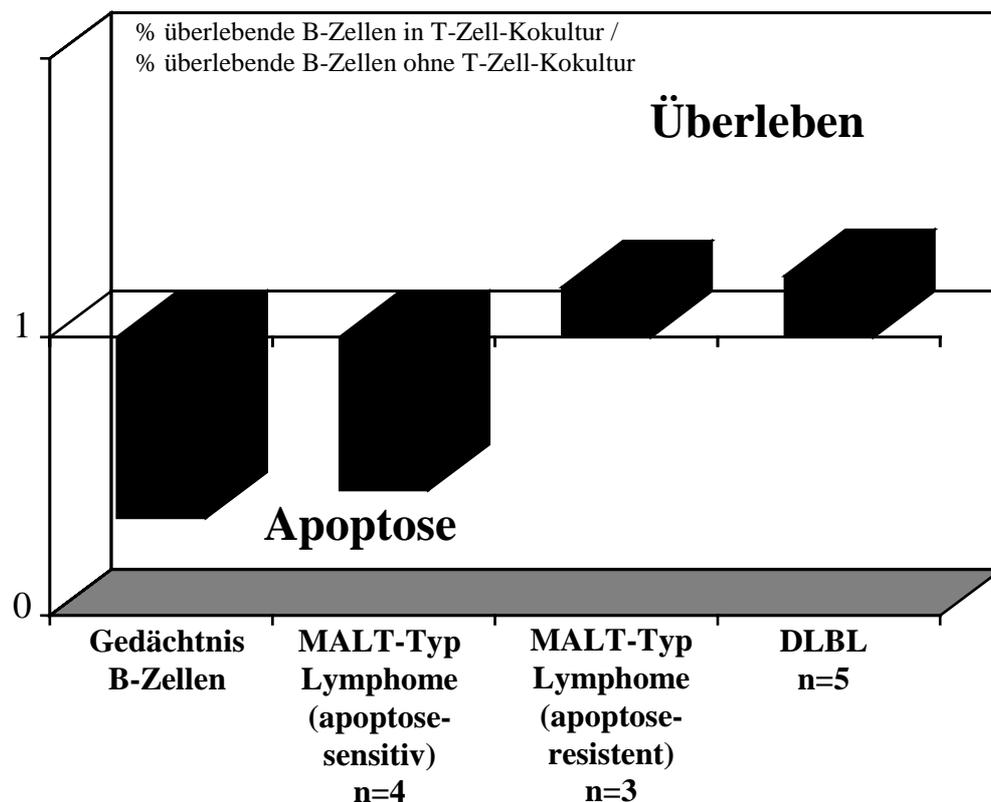


Abbildung 21:

Apoptose-Resistenz maligner B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen und DLBL. Dargestellt ist der Quotient der Prozentzahlen überlebender B-Zellen mit T-Zell-Kokultur / überlebende B-Zellen ohne T-Zell Kokultur.

6. Der T-Zell-Einfluss verhindert die Spaltung von PARP in malignen B-Zellen

Die Spaltung von Poly-ADP Ribose-Polymerase (PARP) durch aktivierte Caspase-3 ist ein starker Hinweis auf eine stattfindende Fas-vermittelte Apoptose. Im Western Blot kann dann neben intaktem PARP (115 kD) auch das Spaltprodukt von 85 kD nachgewiesen werden. In einem Vorversuch wurde eine T-Zell-Leukämie Zelllinie (Jurkat) mit dem apoptose-induzierenden anti-Fas-Antikörper CH11 (500 ng/ml, Boehringer, Mannheim) für die angegebenen Zeiträume kultiviert. Ab 120 Minuten Inkubation setzte eine deutliche PARP-Spaltung ein und nach 24 Stunden war nur noch das Spaltprodukt, aber kein intaktes PARP mehr nachweisbar (vgl. Abbildung 22). Der Nachweis einer PARP-Spaltung wurde an malignen B-Zellen der Fälle H3302/88 und H1851/95 mit und ohne 24-stündiger T-Zell-Kokultur durchgeführt. Es zeigte sich, dass der T-Zell-Einfluss die PARP-Spaltung in malignen B-Zellen verhinderte oder zumindest verzögerte (vgl. Abbildung 23).

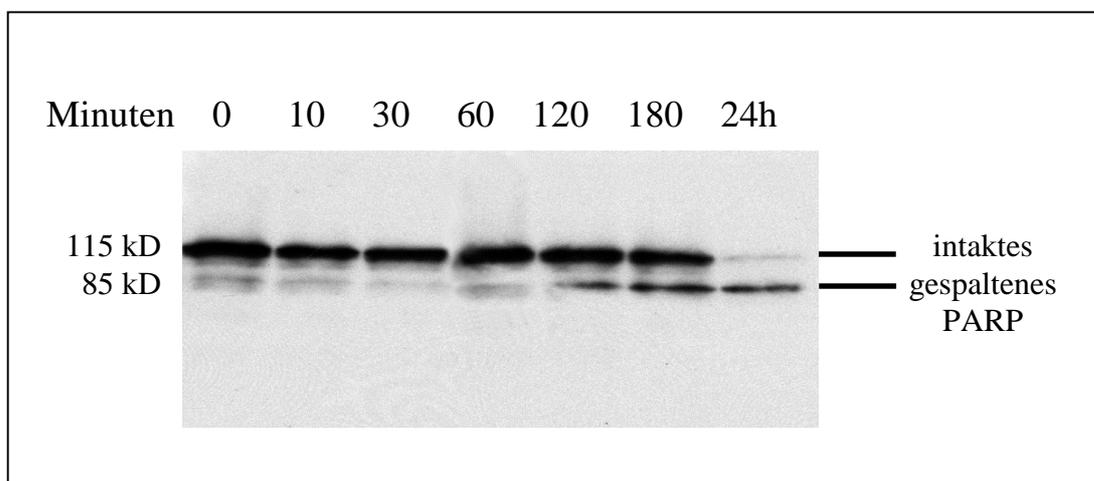


Abbildung 22:

Western Blot zum Nachweis von intaktem (115 kD) und gespaltenem PARP (85 kD). Jurkat-Zellen wurden für die angegebenen Zeitintervalle mit 500 ng/ml des apoptose-induzierenden anti-Fas Antikörpers CH11 (Boehringer, Mannheim) inkubiert.

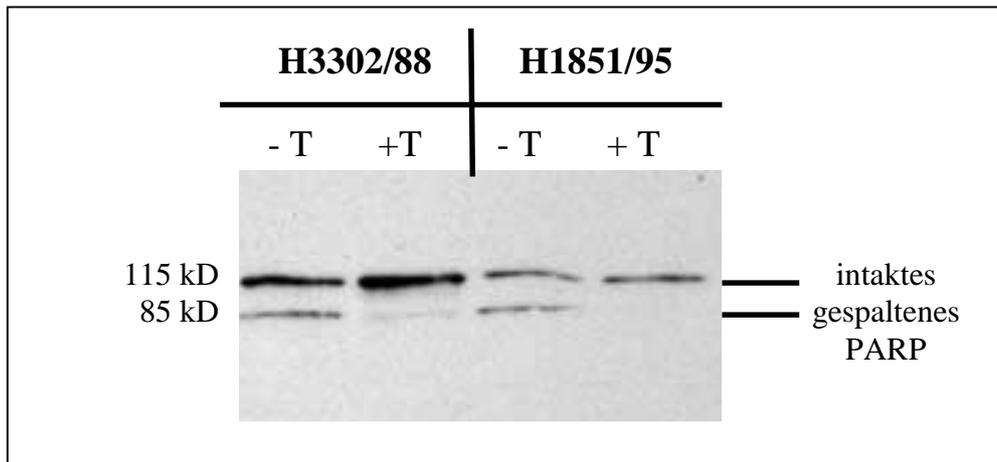


Abbildung 23:

Western Blot zum Nachweis der PARP-Spaltung. Maligne B-Zellen aus zwei MALT-Typ Lymphomen wurden für 24 Stunden ohne (-T) oder zusammen mit T-Zellen kultiviert (+T).

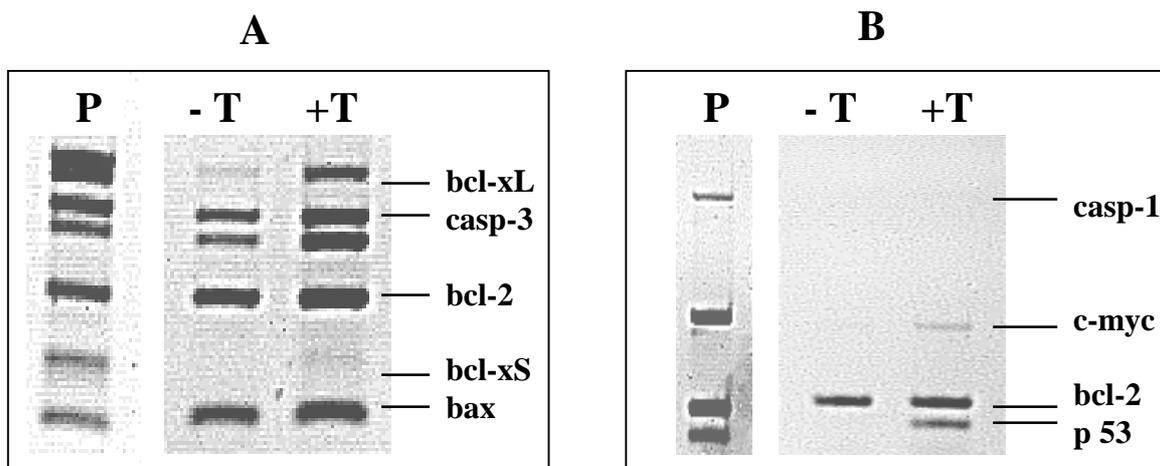


Abbildung 24:

Multiplex RT-PCR zur Untersuchung der Expression apoptose-relevanter Gene. Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der verwendeten Ansätze hAPO-2 (A) und hAPO-1 (B) von Maxim Biotech (San Francisco, USA). Eingesetzt wurde cDNA normaler Gedächtnis-B-Zellen, die 24 Stunden ohne (-T) bzw. 24 Stunden zusammen mit T-Zellen (+T) kultiviert wurden. P: Positivkontrolle.

7. Die Expression apoptose-relevanter Gene in normalen und malignen B-Zellen zeigt kein charakteristisches Muster in apoptose-resistenten B-Zellen

Um die Ursachen der beobachteten Apoptose-Resistenz von malignen B-Zellen bei MALT-Typ Lymphomen näher zu charakterisieren, wurde zunächst die Expression einiger ausgewählter apoptose-relevanter Gene auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu gehörten Gene, deren Produkte entweder an der Fas-Signalkaskade beteiligt sind (caspase-1, caspase-3) oder eine anti-apoptotische Wirkung (bcl-2, bcl-x_L) bzw. pro-apoptotische Wirkung zeigen (bcl-x_S, bax, p53, c-myc). Dazu wurden zwei verschiedene Multiplex RT-PCR Ansätze verwendet. So konnte jeweils gleichzeitig die Gen-Expression von bcl-x_L, caspase-3, bcl-2, bcl-x_S, bax (Ansatz 1) und caspase-1, c-myc, bcl-2, p53 (Ansatz 2) untersucht werden. In normalen Gedächtnis-B-Zellen konnte mRNA der Gene für caspase-3, bcl-x_L, bcl-2, bax, c-myc und p53 nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 24). Die Expression dieser Gene wurde durch T-Zell-Einfluss verstärkt oder wie bei c-myc und p53 erst induziert. Um eine Quantifizierung dieses Effekts vorzunehmen, wurden die Gelbilder densitometrisch ausgewertet (vgl. Abbildung 25).

Bei der entsprechenden Untersuchung von malignen B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen zeigten dagegen nur 2 Fälle (H4145/91, H3302/88) eine vergleichbare Expressionssteigerung unter T-Zell-Einfluss. In den Fällen 4579/94 und H1851/95 war nur noch eine teilweise Expressionssteigerung der Gene caspase-3, c-myc und p53 zu finden, während bei H4364/94 und 22903/96 keinerlei T-Zell-Einfluss mehr nachweisbar war. Insgesamt gesehen ergab sich jedoch bei den hier untersuchten Genen kein Expressionsmuster, das etwa die apoptose-resistenten malignen B-Zellen charakterisieren würde.

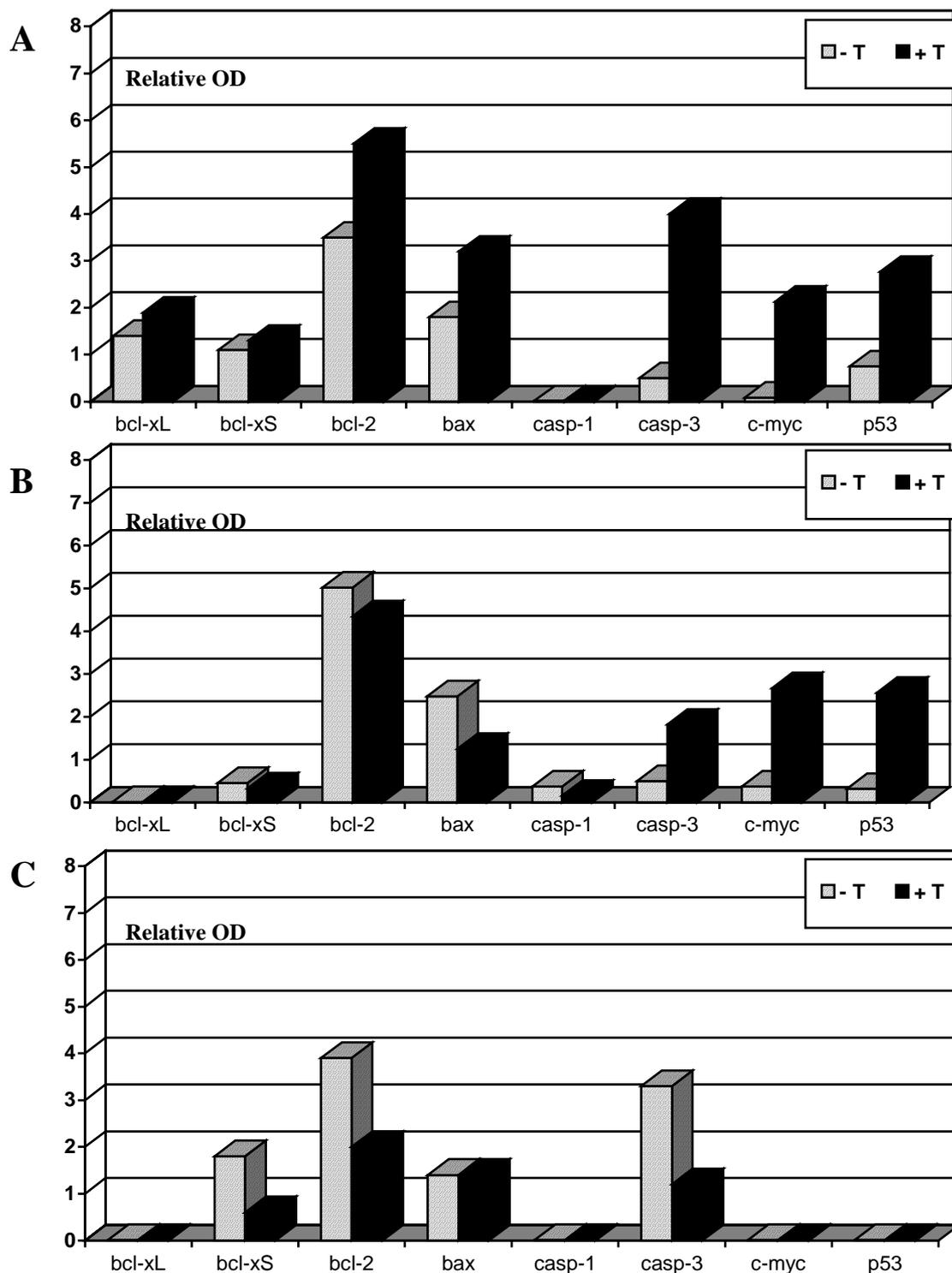


Abbildung 25:

Densitometrische Auswertung der Genexpression maligner B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen, die 24 Stunden ohne (-T) oder zusammen mit T-Zellen (+T) kultiviert wurden. Der T-Zell-Einfluss führte entweder zur Expressionssteigerung aller untersuchten Gene (A, Patient H4145/91) oder zur Expressionssteigerung nur eines Teils der untersuchten Gene (B, Patient H1851/95) oder aber es war bei keinem der untersuchten Gene eine Expressionssteigerung festzustellen (C, Patient H4364/94).

8. Einige maligne B-Zellen exprimieren mRNA für lösliches Fas (soluble Fas, sFas), jedoch kein Protein

Die weiteren Untersuchungen zu den Ursachen der Apoptose-Resistenz maligner B-Zellen konzentrierten sich auf das Fas-Molekül dieser Zellen. Beim Nachweis der mRNA für Fas wurde in einigen Fällen neben dem erwarteten PCR-Produkt von 1003 bp noch ein zusätzliches Transkript gefunden (Fas-63, vgl. Abbildung 26). Dieses war um 63 bp kleiner und trat bei zwei von vier untersuchten MALT-Typ Lymphomen auf, sowie bei den beiden untersuchten DLBL. In normalen Gedächtnis-B-Zellen dagegen war es nicht nachzuweisen. Die direkte Sequenzierung des kleineren Transkripts zeigte, dass der Bereich zwischen Exon 5 und 6 fehlte, der normalerweise die Transmembrandomäne von Fas codiert (vgl. Abbildung 27). Dieses Fas-Transkript wurde in der Literatur als Spleißvariante von Fas beschrieben und codiert lösliches Fas (soluble Fas, sFas), das anti-apoptotisch wirken kann (Cascino et al. 1995).

Wenn nun die gefundene Spleißvariante der Fas mRNA in das entsprechende Protein sFas umgesetzt wird, müsste auch sFas im Zellkulturüberstand der entsprechenden malignen B-Zellen zu finden sein. Es wurde daher mittels Immunopräzipitation versucht, das etwa 40 kD große sFas aus dem Kulturüberstand der Zellen auszufällen und im Western Blot nachzuweisen. Für beide Schritte wurde ein für sFas spezifischer Antikörper verwendet, der in einem Vorversuch rekombinantes humanes sFas bis zu einem Minimum von 100 ng detektierte (vgl. Abbildung 28). In den verschiedenen Zellkulturüberständen konnte dagegen kein sFas nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 29). Die Detektion einer Proteinbande bei ca. 35 kD trat auch in der Negativkontrolle auf und ist daher möglicherweise auf eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit Proteinen des fetalen Kälberserums, die im Zellkulturmedium enthalten waren, zurückzuführen.

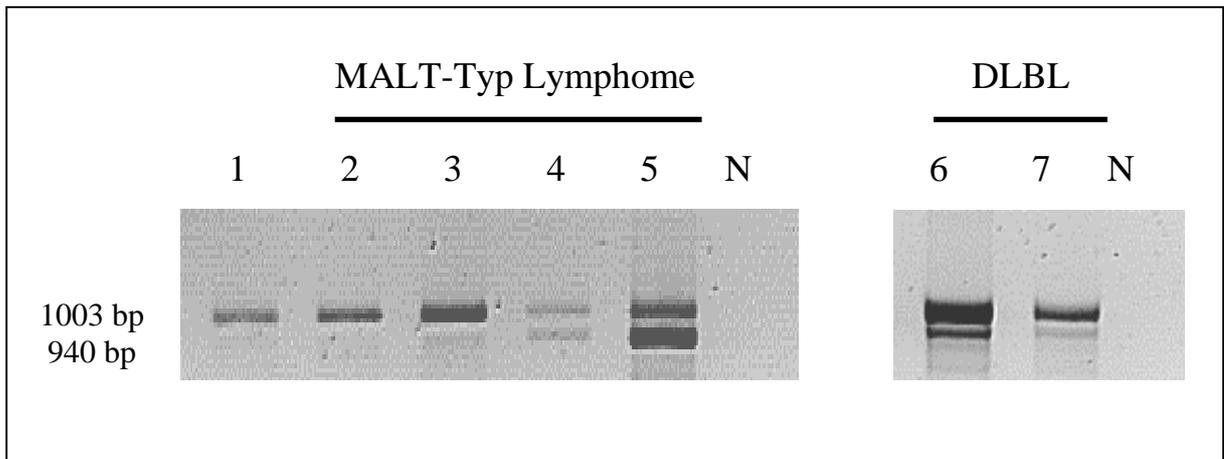


Abbildung 26:

RT-PCR zur Untersuchung der Fas-Expression in normalen und malignen B-Zellen.

In den Spuren 4, 5, 6 und 7 tritt ein um 63 bp kleineres Fas-Transkript auf.

1: Gedächtnis-B-Zellen.

2: H4145/91, 3: 4579/94, 4:H1851/95, 5:H3302/88.

6: H4365/94, 7: H4590/96.

N: Negativkontrolle.

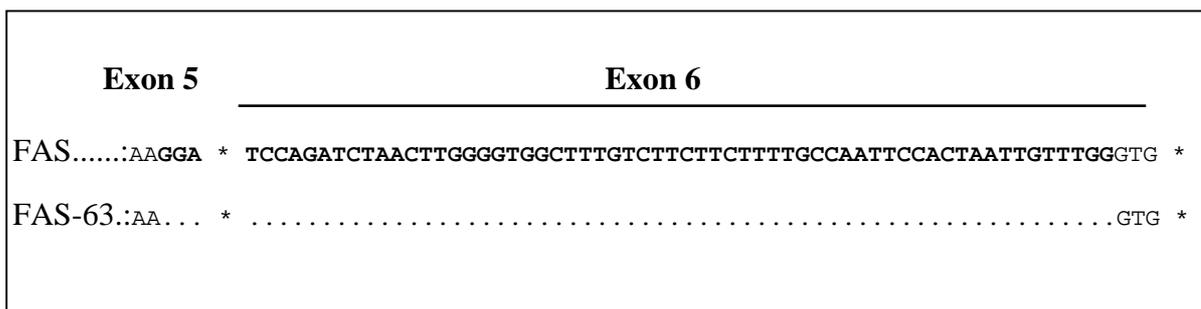


Abbildung 27:

Ausschnitt aus der cDNA-Sequenz von Fas. Dem kürzeren Fas-Transkript (Fas-63) fehlen das letzte Codon von Exon 5 und alle Codons bis auf das letzte von Exon 6. Bei diesem Bereich handelt es sich um die Transmembrandomäne von Fas.

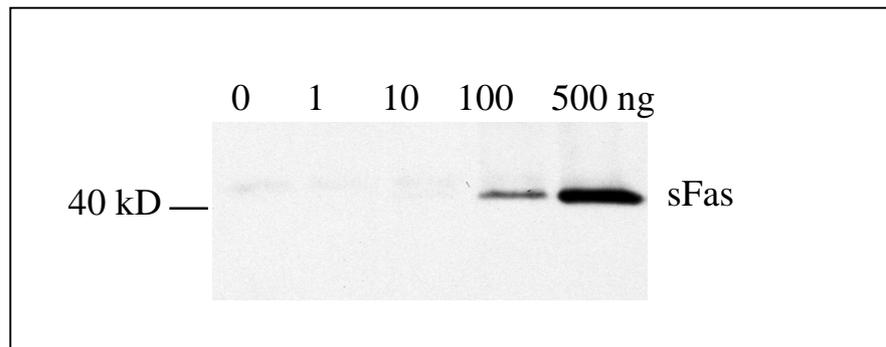


Abbildung 28:

Western Blot zur Sensitivität der Immunopräzipitation von sFas. Die angegebenen Mengen an rekombinantem humanem sFas (Pharmingen, Hamburg) wurden mit Hilfe eines für sFas spezifischen Antikörpers (G254-274, Pharmingen, Hamburg) aus 1 ml Wasser ausgefällt.

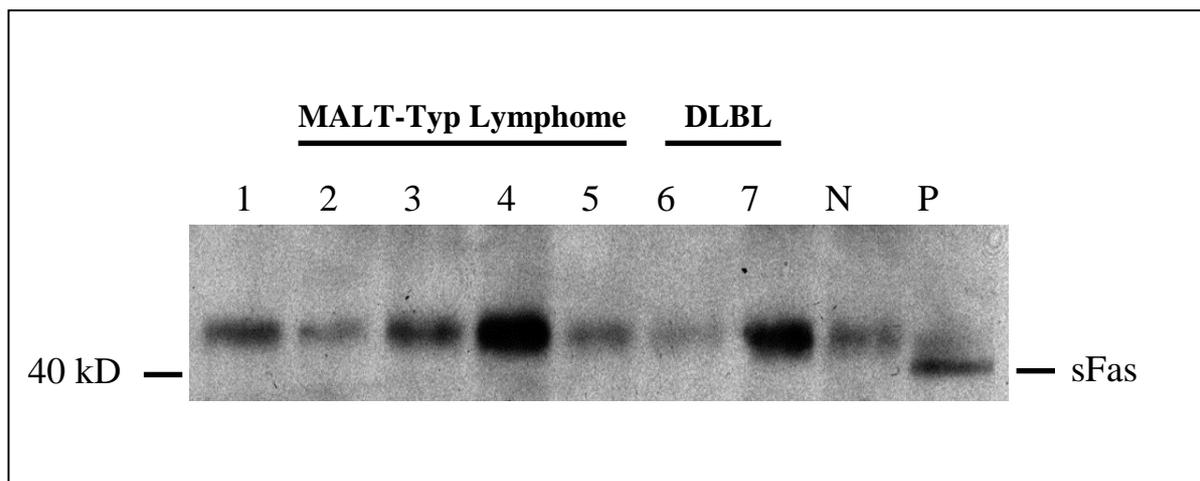


Abbildung 29:

Immunopräzipitation von sFas aus dem Zellkulturüberstand normaler Gedächtnis-B-Zellen und maligner B-Zellen. Die gesuchte Proteinbande tritt nur in der Positivkontrolle (P) auf; hier wurden 100 ng rekombinantes humanes sFas aus 1 ml Zellkulturmedium ausgefällt. Die in den Spuren 1 – 7 auftretende Bande knapp oberhalb von 40 kD ist auch in der Negativkontrolle (N) zu finden und repräsentiert möglicherweise eine unspezifische Reaktion des verwendeten Antikörpers mit Proteinen des Zellkulturmediums.

1: Gedächtnis-B-Zellen

2: H4145/91, 3: 4579/94, 4: H1851/95, 5: H3302/88

6: H4365/94, 7: H4590/96.

9. MALT-Typ Lymphome weisen Mutationen in Fas-Transkripten maligner B-Zellen auf

Bei fünf MALT-Typ Lymphomen und fünf DLBL wurden Fas-Transkripte maligner B-Zellen kloniert und sequenziert (vgl. Tabelle 6). Dabei lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung des intrazellulären Anteils von Fas mit der signaltransduzierenden Todesdomäne. Die für die PCR-Reaktion verwendete Taq-Polymerase hatte in unserem experimentellen System eine empirisch ermittelte Fehlerrate von 0,17 % (C. Knörr, pers. Mitteilung). Um PCR-Artefakte auszuschließen, wurden für die Sequenzauswertung nur solche Mutationen berücksichtigt, die in mindestens zwei der untersuchten cDNA-Klone eines Patienten oder aber in cDNA-Klonen verschiedener Patienten auftraten: Abbildung 30 zeigt, dass das Codon 23 in den Patienten H3302/88 und H6006/95 in mehreren Klonen von der gleichen Mutation betroffen ist, während die Codons 43 bzw. 57 nur in jeweils einem Patienten und auch nur in einem cDNA-Klon mutiert sind. Die Mutationen in den Codons 43 und 57 wurden daher nicht berücksichtigt.

Jeder der untersuchten Patienten besaß zwischen einer und sieben Mutationen in den Fas-Transkripten maligner B-Zellen (vgl. Tabelle 6). In den beiden untersuchten MALT-Typ Lymphomen mit apoptose-sensitiven malignen B-Zellen (H4145/91, 4579/94) wurden eine bzw. drei Mutationen gefunden. In den drei MALT-Typ Lymphomen mit apoptose-resistenten malignen B-Zellen (H6006/95, H1851/95, H3302/88) waren es dagegen drei bis sieben Mutationen. Bei den DLBL traten zwischen einer und fünf Mutationen auf.

Insgesamt waren es 20 verschiedene Punktmutationen, davon wurden acht jeweils nur in einem Patienten gefunden, während zehn jeweils gleiche Mutationen in zwei Patienten und die restlichen zwei Mutationen jeweils in drei Patienten auftraten (vgl. Tabelle 7).

Von den 20 verschiedenen Punktmutationen führen zwölf zu einem Aminosäureaustausch bei der Translation, während sechs Mutationen die dritte Position eines Codons betrafen und damit ohne funktionelle Konsequenz bleiben (silent mutations). Eine Mutation ersetzt das Codon 152 durch ein Stop-Codon, was bei der Translation zu einem trunkierten Protein führt. Die Insertion eines zusätzlichen Nukleotids (A) nach Codon 284 führt zu einer Verschiebung des Leserasters, zum Einbau von 19 anderen Aminosäuren und daran anschließend zu vorzeitiger Termination der Translation.

Ein beschriebener Fas-Polymorphismus bei Codon 198 (Fiucci und Ruberti 1994) wurde in sechs der zehn untersuchten Patienten gefunden und ist hier nicht als Mutation aufgeführt.

Tabelle 6:

Sequenzierte Klone von Fas-Transkripten und gefundene Mutationen

Patient	Sequenzierte Klone extrazelluläre/intrazelluläre Domäne	gefundene Mutationen (n)		
		gesamt	AS- Austausch	silent
MALT-Typ Lymphome				
H6006/95	22 / 34	6	6	0
H1851/95	17 / 15	3	1	2
H3302/88	12 / 35	7	4	3
4579/94	6 / 18	3	3	0
H4145/91	0 / 10	1	0	1
DLBL				
22903/96	4 / 30	5	4	1
H4487/97	0 / 12	2	2	0
H4365/94	4 / 4	4	3	1
H5503/96	0 / 4	2	1	1
H4590/96	8 / 13	1	1	0

Codon	23			43			57						
Fas	...	AGG	AAG	ACT	...	TTC	TGC	CAT	...	GAC	TGC	ACA	...
H3302/88													
032	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
094	...	---	---	---	...	---	C--	---	...	---	---	---	...
096	...	---	-G-	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
098	...	---	-G-	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
135	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
137	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
142	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
144	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
148	...	---	-G-	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
151	...	---	-G-	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
H6006/95													
048	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
050	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
187	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	C--	---	...
189	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
191	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
458	...	---	-G-	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
460	...	---	-G-	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
462	...	---	-G-	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
470	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...
472	...	---	---	---	...	---	---	---	...	---	---	---	...

Abbildung 30:

Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz klonierter Fas-Transkripte maligner B-Zellen der Patienten H3302/88 und H6006/95. Codon 23 ist bei beiden Patienten in jeweils mehreren Klonen von der gleichen Mutation betroffen. Die Codons 43 bzw. 57 zeigen dagegen eine so genannte randomisierte Mutation, die bei den Patienten jeweils nur in einem Klon auftritt und daher möglicherweise einen PCR-Artefakt darstellt. Die Nummerierung der Codons erfolgte nach Itoh et al. (1991).

Tabelle 7:

Zusammenfassung aller gefundenen Fas-Mutationen in den untersuchten MALT-Typ Lymphomen bzw. DLBL. Die Nummerierung der Codons erfolgte nach Itoh et al. (1991). Mutationen wurden als „silent“ bezeichnet, wenn die dritte Position eines Codons betroffen war und es zu keinem Aminosäureaustausch kommt. Gleiche Mutationen, die in verschiedenen Patienten und in mehreren cDNA-Klonen auftraten sind fett hervorgehoben. Bei den Codons 225, 233, 255 und 248, die in anderen Tumoren bzw. autoimmunen Syndromen Mutationen aufwiesen, ist der Hinweis auf die entsprechende Literatur angegeben.

A. Mutationen, die in nur einem Patienten auftraten:

Codon	Nukleotidaustausch Aminosäureaustausch	Sequenz- Nr.	mutierte Klone / sequenzierte Klone	Patient	Apoptose- Resistenz
27	A → G silent	64.1 504	2 / 17	H1851/95	ja
50	G → A Gly → Ser	504 176	2 / 17	H1851/95	ja
152	G → T Glu → STOP	036 038	2 / 4	H4365/94	ja
172	T → C Val → Ala	145/146 039	2 / 14	H3302/88	ja
193	T → C Ser → Pro	259/260 265/266	2 / 4	H5503/96	--
229	T → C Val → Ala	035 037	2 / 4	H4365/94	ja
255	A → T silent Ala → Glu (Lee et al. 1999b)	035 037	2 / 4	H4365/94	ja
291	A → G silent	155/156 550 556	3 / 21	H3302/88	ja

B. Mutationen, die in zwei bis drei Patienten auftraten:

Codon	Nukleotidaustausch Aminosäureaustausch	Sequenz Nr.	mutierte Klone / sequenzierte Klone	Patient	Apoptose- Resistenz
23	A → G Lys → Arg	096	4 / 12	H3302/88	ja
		098 158 151			
136	G → A Gly → Arg	458	3 / 22	H6006/95	ja
		460 462			
142	C → T Thr → Ile	149/150	1 / 12	H3302/88	ja
		237/238	1 / 22	H6006/95	ja
225	A → G Thr → Ala	105/106	1 / 4	22903/96	ja
		201/202	1 / 8	H4590/96	nein
232	T → C silent	40	1 / 4	H4365/94	ja
		252/253	1 / 12	H4487/97	ja
233	Thr → Pro (Fisher et al. 1995; Martin et al. 1999)	580	2 / 30	22903/96	ja
		610			
237	T → C silent	091/092	1 / 15	H1851/95	ja
		554	1 / 35	H3302/88	ja
233	T → C Val → Ala	606	1 / 30	22903/96	ja
		257/258	1 / 12	H4487/97	ja
237	T → C silent	157/158	2 / 35	H3302/88	ja
		554			
		267/268	1 / 10	H4145/91	nein

Codon	Nukleotidaustausch Aminosäureaustausch	Sequenz Nr.	mutierte Klone / sequenzierte Klone	Patient	Apoptose- Resistenz
243	A → G Ile → Val	426 291/292	1 / 34 1 / 18	H6006/95 4579/94	ja nein
248	A → G Asn → Asp Asn → Lys (Gronbaek et al. 1998)	417 301/302	1 / 34 1 / 18	H6006/95 4579/94	ja nein
252	A → G silent	262 119/120	1 / 4 1 / 30	H5503/96 22903/96	-- ja
284	1-bp Insertion (A)	291/292 299/300 303/304 430/431 446/447	3 / 18 2 / 34	4579/94 H6006/95	nein ja
320	A → C STOP → Ser	430/431 438 439 584 610 564	3 / 34 2 / 30 1 / 35	H6006/95 22903/96 H3302/88	ja ja ja

10. Zusammenfassende Ergebnistabelle

Tabelle 8:

Apoptose-Resistenz und Gesamtzahl der gefundenen Fas-Mutationen im Zusammenhang mit der jeweiligen Tumordiagnose des Patienten und einer beschriebenen chromosomalen Translokation t(11;18)(q21;q21)

Nr	Patient	Diagnose/Stadium	Apoptose-Resistenz	Fas-Mutationen (n, gesamt)	t(11;18) ¹
1	4579/94	MALT-Lymphom / -- ²	nein	3	nein
2	10623/95	MALT-Lymphom / --	nein	--	nein
3	H 3302/88	MALT-Lymphom / --	ja	7	ja
4	H 4145/91	MALT-Lymphom / --	nein	1	ja
5	H 705/93	MALT-Lymphom / E I 1	--	--	--
6	H 4364/94	MALT-Lymphom / E I 2	nein	--	ja
7	H 1851/95	MALT-Lymphom / --	ja	3	ja
8	H 4236/95	MALT-Lymphom / E I 1	--	--	--
9	H 5690/95	MALT-Lymphom / E I 1	--	--	--
10	H 6006/95	MALT-Lymphom / --	ja	6	nein
11	22903/96	DLBL / E II 1	ja	5	nein
12	H 4365/94	DLBL / E I 2	ja	4	nein
13	H 5030/94	DLBL / E I 1	--	--	--
14	H 1479/95	DLBL / E II 1	ja	--	nein
15	H 4590/96	DLBL / E III	nein	1	nein
16	H 5503/96	DLBL / E II 1	nein	2	nein
17	H 4487/97	DLBL / --	ja	2	nein

¹ (Ott et al. 1997)

² keine Daten

IV. Diskussion

1. Tumor-infiltrierende T-Zellen sind wichtige Bestandteile der MALT-Typ Lymphome

Ein Charakteristikum von MALT-Typ Lymphomen ist der hohe Anteil von tumor-infiltrierenden T-Zellen, die überwiegend den Phänotyp von T-Helfer-Zellen ($CD3^+$, $CD4^+$) besitzen (Knörr et al. 1999; Koulis et al. 1997). Dies ist insofern überraschend, als bei den meisten soliden Tumoren und auch bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen tumor-infiltrierende T-Zellen mit cytotoxischem oder Suppressor-Phänotyp ($CD3^+$, $CD8^+$) nachgewiesen wurden (Guidoboni et al. 1999; Wang und Rosenberg 1999). Was sind die Gründe für diesen Unterschied? Um dieser Frage nachzugehen, wurde in vorliegender Arbeit der Antigen-Rezeptor (TCR) der tumor-infiltrierenden T-Zellen von MALT-Typ Lymphomen untersucht. Dadurch war es möglich, das T-Zell-Repertoire im Tumordinfiltrat verschiedener Patienten zu charakterisieren und den Einfluss von Antigen auf die Ausbildung des T-Zell-Repertoires zu untersuchen. Die zunächst durchgeführte Expressionsanalyse der $V\beta$ -Ketten des TCR zeigte, dass stets alle 23 untersuchten Familien von $V\beta$ -Ketten exprimiert wurden. Es gab somit keine Deletionen bestimmter $V\beta$ -Ketten, wie sie etwa bei einer Stimulation mit Superantigenen auftreten würden (Choi et al. 1989). Damit kann ein bakterielles Superantigen (wie etwa Toxine von *Staphylococcus aureus*) als stimulierendes Agens der T-Zellen ausgeschlossen werden. In der anschließenden Analyse der antigenbindenden Region (CDR3) der $V\beta$ -Ketten wurden deren Länge und relative Expressionshäufigkeit bestimmt. Wenn T-Zellen auf das Antigen treffen, welches sie spezifisch erkennen, proliferieren sie sehr stark. Es kommt zur klonalen Expansion dieser T-Zellen und die spezifische CDR3-Längenvariante dieses T-Zell-Klons tritt dominant in Erscheinung (Puisieux et al. 1994). Die tumor-infiltrierenden T-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen aller untersuchten Patienten zeigten eine Vielzahl von klonalen Expansionen, die je nach Patient in verschiedenen $V\beta$ -Familien auftraten. Diese Diversität weist auf ein breit gefächertes Spektrum verschiedener Antigene hin, welche die tumor-infiltrierenden T-Zellen der MALT-Typ Lymphome stimulieren könnten (Sensi und Parmiani 1995). Bei den CDR3-Analysen ist der Vergleich von tumor-infiltrierenden T-

Zellen mit T-Zellen aus der Peripherie des gleichen Patienten sehr wichtig. Damit kann festgestellt werden, ob die Expansion von T-Zellen im Tumordinfiltrat spezifisch nur dort auftritt, oder eine systemische Expansion von T-Zellen der Peripherie widerspiegelt (Pannetier et al. 1995). So fiel beim Patienten H5690/95 folgende Beobachtung auf: eine in Tumor und Peripherie gleiche klonale Expansion hatte sich 15 Monate nach operativer Entfernung des Tumors auch in der Peripherie zurückgebildet. Dabei konnte nicht unterschieden werden, ob eine systemische Expansion vorlag, die bis in das Tumordinfiltrat reichte, oder genau umgekehrt eine tumorspezifische Expansion, die bis in die Peripherie vordrang. Für die Auswertung wurden daher nur klonale Expansionen berücksichtigt, die ausschließlich in den tumor-infiltrierenden T-Zellen auftraten. Um zu untersuchen, ob sich unter dem offenbar sehr breiten Antigenpektrum auch eine gerichtete Antigenstimulation verbirgt, war es nötig, die CDR3 der tumor-infiltrierenden T-Zellen molekular zu charakterisieren. Es gelang, Transkripte der V β 2-Kette des TCR zu klonieren, sequenzieren und die Aminosäuresequenz der antigenbindenden Region CDR3 zu bestimmen. Dabei wurden tumor-infiltrierende T-Zellen der MALT-Typ Lymphome H6006/95 und H1851/95 mit unterschiedlicher Lokalisation (Magen bzw. Schilddrüse) und Vorläuferläsion (*Helicobacter pylori*-assoziierte Gastritis bzw. Hashimoto-Thyreoiditis) untersucht. Die Genescan-Analyse der V β 2-Ketten zeigte nur im Patienten H1851/95 eine klonale T-Zell-Expansion. Die Klonierung der CDR3-Region der V β 2-Ketten brachte im Vergleich zur Genescan-Analyse einen zusätzlichen Informationsgewinn. In tumor-infiltrierenden T-Zellen aus beiden Tumoren wurden gleiche V β 2-J β 1.5 und V β 2-J β 2.1-Rearrangements in der CDR3 gefunden. Diese Rearrangements wiesen auch jeweils die gleiche Gesamtlänge auf, jedoch war die Aminosäuresequenz nicht über die gesamte Länge identisch. Es gab jeweils fünf bzw. sieben unterschiedliche Aminosäuren im Verbindungsbereich zwischen V β - und J β -Segment. Allerdings wurde gezeigt, dass bereits die CDR3-Länge allein ein wichtiger Faktor für die Antigenpezifität von T-Zellen ist (McHeyzer-Williams und Davis 1995). Die tumor-infiltrierenden T-Zellen aus den beiden unterschiedlichen MALT-Typ Lymphomen besitzen daher Antigenbindungsstellen, die einander sehr ähnlich sind. Vergleichbare Befunde wurden unter anderem auch bei chronischen Darmerkrankungen beschrieben (Chott et al. 1996) und deuten darauf hin, dass die jeweiligen T-Zellen ein gemeinsames Antigen erkennen (Oksenberg et al. 1993).

Wie könnte ein solches gemeinsames Antigen aussehen? Es könnte zunächst ein von dem jeweiligen MALT-Typ Lymphom unabhängiges Antigen sein, beispielsweise ein Auto-

antigen. Diese Möglichkeit ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, da nur einer der beiden untersuchten Patienten eine autoimmune Störung aufwies. Weiterhin könnte es ein weit verbreitetes bakterielles Antigen sein, das in beiden Patienten zu finden ist, etwa ein Hitzeschockprotein von *Helicobacter pylori* (Kawahara et al. 1999; Kobayashi et al. 1998). Es wurde in einem Einzelfall gezeigt, dass sich ein MALT-Typ Lymphom der Speicheldrüse, das sich auf dem Boden eines Sjögren-Syndroms entwickelt hatte, nach einer *Helicobacter pylori*-Eradikation zurückbildete (Alkan et al. 1996). Das könnte bedeuten, dass *Helicobacter pylori*-Antigene T-Zellen aktivieren, welche dann in verschiedenen Organen ein Mikromilieu etablieren, das ein Lymphomwachstum ermöglicht. Jedoch müssten derart spezifische Antigene Auswirkungen auf die Antigenrezeptoren der malignen B-Zellen zeigen und etwa eine Restriktion der verwendeten VH-Gene bewirken, wie es bisher für MALT-Typ Lymphome der Speicheldrüse (Miklos et al. 2000), nicht aber für gastrale MALT-Typ Lymphome nachgewiesen werden konnte (Hallas et al. 1998, C. Knörr, pers. Mitteilung; Qin et al. 1997). Stattdessen wurde gezeigt, dass die Tumorzellen gastraler MALT-Typ Lymphome überhaupt keine Antigene von *Helicobacter pylori* erkennen, jedoch eine Reihe unterschiedlichster Autoantigene (Greiner et al. 1994a).

Eine wahrscheinlichere Erklärung für die ähnlichen Antigenrezeptoren der tumor-infiltrierenden T-Zellen ist daher die Erkennung der Tumorzellen an sich. Dies spricht für das Vorhandensein eines tumor-assoziierten Antigens auf malignen B-Zellen der MALT-Typ Lymphome und für eine potenzielle Antitumor-Aktivität der tumor-infiltrierenden T-Zellen. Jedoch erlauben die hier durchgeführten molekularen Untersuchungen keine Aussage darüber, wie die Antitumor-Aktivität hier realisiert werden könnte. Es gibt dazu zwei Möglichkeiten: die cytotoxischen T-Zellen (CD3⁺, CD8⁺) lysieren ihre Zielzellen mit Hilfe von Perforinen und Granzymen (Kagi et al. 1994) und T-Helfer-Zellen (CD3⁺, CD4⁺) induzieren FasL/Fas-vermittelte Apoptose (Williams 1991). Die cytotoxischen T-Zellen spielen bei MALT-Typ Lymphomen eine untergeordnete Rolle, da sie gegenüber den T-Helfer-Zellen in der Minderzahl vorliegen und auch nicht aktiviert sind (Knörr et al. 1999). Daher kommen nur die T-Helfer-Zellen für die Antitumor-Aktivität in Frage. Wir haben daher die tumor-infiltrierenden T-Zellen der MALT-Typ Lymphome im Hinblick auf ihre Expression von mRNA für FasL untersucht. Dabei konnte sowohl konstitutive FasL-Expression *in vivo* als auch durch Ionomycin induzierbare FasL-Expression *in vitro* nachgewiesen werden.

Nach den Ergebnissen unserer Untersuchungen gibt es also bei den tumor-infiltrierenden T-Zellen der MALT-Typ Lymphome keinerlei Hinweise auf eine funktionelle Störung im Zusammenhang mit der Antigenerkennung (Kudoh et al. 1995; Wang et al. 1995) oder der cytotoxischen Funktion (D'Elios et al. 1999). Vielmehr besitzen die T-Zellen antigen-induzierte klonale Expansionen und die mutmaßliche Fähigkeit, tumorassoziiertes Antigen zu erkennen. Von anderen Autoren wurde darüber hinaus gezeigt, dass sie *in vivo* aktiviert vorliegen und Immunkompetenzmarker exprimieren (Haedicke et al. 1999). Offenbar werden die T-Zellen durch Antigen stimuliert und schaffen durch die Expression von CD40L und anderer kostimulierender Moleküle (Knörr et al. 1999) ein Milieu, das die Proliferation von malignen B-Zellen fördert. Sind die T-Zellen dadurch für die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums verantwortlich? Nachdem sie jedoch auch FasL exprimieren, wären sie in der Lage über den Fas-Rezeptor Apoptose in den malignen B-Zellen zu induzieren. Tatsächlich jedoch findet Apoptose in MALT-Typ Lymphomen *in vivo* nur in sehr geringem Ausmaß statt (Du et al. 1996). Diese Befunde veranlassten uns, die malignen B-Zellen im Hinblick auf die Funktionalität ihrer Fas-Rezeptoren näher zu untersuchen.

2. Die Resistenz gegenüber Fas-vermittelter Apoptose könnte auf Mutationen in den Fas-Transkripten maligner B-Zellen zurückzuführen sein

Schon seit längerem wird der Zusammenhang von Autoimmunität mit dem Auftreten bestimmter maligner Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) beschrieben (Greiner et al. 1994a; Greiner et al. 1994b; Greiner et al. 1996; Müller-Hermelink und Greiner 1992). Neben allgemeinen Veränderungen weisen gerade MALT-Typ Lymphome der Schilddrüse und Speicheldrüse eine enge Verbindung zu Hashimoto-Thyreoiditis bzw. dem Sjögren-Syndrom auf, welche der Lymphomgenese oft viele Jahre voraus gehen (Greiner und Müller-Hermelink 1996). Parallel zu diesen Beobachtungen fand man, dass bestimmte autoimmune Syndrome wie das Canale-Smith Syndrom (Vaishnaw et al. 1999) und das autoimmune lymphoproliferative Syndrom ALPS (Sneller et al. 1997) mit Lymphoproliferation schon in jungen Jahren der Patienten einher gehen und auf angeborene

Defekte der Fas-vermittelten Apoptose zurückzuführen sind. Insbesondere wurden Mutationen im Fas-Gen der Lymphozyten identifiziert, die offensichtlich zu einer funktionellen Inaktivierung des Fas-Rezeptors führen (Fisher et al. 1995; Rieux Laucat et al. 1995). Es wurde dann in späteren Arbeiten gezeigt, dass die zu Aminosäureaustauschen führenden Punktmutationen in der extrazellulären Domäne des Fas-Rezeptors die Bindung von FasL und in der intrazellulären Domäne die Bindung des Adaptorproteins FADD stören (Bettinardi et al. 1997; Sneller et al. 1997; Vaishnaw et al. 1999). Damit wird ein Todessignal nicht mehr in die Zelle weitergeleitet und die Zelle überlebt. Fas-Mutationen sind jedoch nicht auf autoimmune lymphoproliferative Syndrome beschränkt. Sie wurden auch in den malignen Zellen einer Vielzahl verschiedener Tumoren gefunden, wie etwa der adulten T-Zell-Leukämie (Maeda et al. 1999) und dem multiplen Myelom (Landowski et al. 1997), sowie in soliden Tumoren, wo der Anteil von Fällen mit Fas-Mutationen von 6,8 % bei Melanomen (Shin et al. 1999), über 7,7 % in Lungenkarzinomen (Lee et al. 1999b) bis hin zu 28 % in Blasenkarzinomen (Lee et al. 1999a) reichte. Eine erste Studie in einem großen Kollektiv verschiedener NHL dokumentierte Fas-Mutationen in den Tumorzellen in 16 von 150 Fällen (Gronbaek et al. 1998). Auffällig war der hohe Anteil von Fas-Mutationen in MALT-Typ Lymphomen, wobei allerdings nur eine geringe Anzahl von Fällen (n = 3) untersucht wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich zehn MALT-Typ Lymphome bzw. extranodale gastrale DLBL auf Fas-Mutationen untersucht. Dabei wurden in allen Fällen insgesamt 20 verschiedene Punktmutationen in den Fas-Transkripten maligner B-Zellen gefunden. Ein Vergleich mit bisher publizierten Fas-Mutationen zeigt, dass vier dieser 20 Mutationen in Codons auftreten, die auch in autoimmunen Störungen bzw. Tumoren betroffen waren. Im Einzelnen waren dies bei autoimmunen Syndromen das Codon 225 (Fisher et al. 1995; Martin et al. 1999) und in anderen Tumoren die Codons 233 (Landowski et al. 1997), 248 (Gronbaek et al. 1998) und 255 (Lee et al. 1999b) (vgl. Tabelle 7). Die Mutationen selbst waren aber stets andere als die in vorliegender Arbeit gefundenen; dies könnte ein Hinweis auf eine sehr große Variationsbreite in den Fas-Mutationen sein. In unserer Studie zeigten evolutionär hochkonservierte Bereiche der Todesdomäne wie das Codon 256, das in einem folliculärem Lymphom und die Codons 262 und 283, die in zwei DLBL mutiert waren (Gronbaek et al. 1998), keine Veränderungen. Ein Vergleich mit den bisher bei MALT-Typ Lymphomen beschriebenen Mutationen zeigt sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten. Es wurden bisher zwei Fälle mit einer Deletion des Exons 8, und ein

Fall mit dem Aminosäureaustausch Asn → Lys am Codon 248 beschrieben (Gronbaek et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte zwar in keinem Fall eine Deletion von Exon 8 nachgewiesen werden, jedoch in zwei MALT-Typ Lymphomen der Aminosäureaustausch Asn → Asp am Codon 248. Dieses Codon könnte also einen Mutations-Schwerpunkt (hotspot) innerhalb der MALT-Typ Lymphome darstellen. Es liegt in der Todesdomäne von Fas in unmittelbarer Nähe des Codons 244, das als die Bindungsstelle von FADD identifiziert wurde (Huang et al. 1996). Codon 244 selbst war dagegen in keinem der hier untersuchten MALT-Typ Lymphome bzw. DLBL mit einer Mutation betroffen. Die Codons 23, 225, 284 und 320, die in mehreren der hier untersuchten Patienten mutiert waren, könnten ebenfalls derartige Hotspots darstellen.

Haben die gefundenen Fas-Mutationen eine funktionelle Konsequenz für die malignen B-Zellen? Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine *in vitro* T/B-Zell-Kokultur etabliert, die eine funktionelle Untersuchung der Fas-Induktion durch FasL erlaubte. Normale Gedächtnis-B-Zellen bzw. maligne B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen und DLBL wurden für 24 Stunden mit aktivierten, FasL-exprimierenden T-Zellen kokultiviert, dann wurde die Fas-Expression und der Prozentsatz überlebender B-Zellen gemessen. Das System wurde am Verhalten der normalen Gedächtnis-B-Zellen geeicht. Diese Zellen zeigten in der T-Zell-Kokultur erwartungsgemäß gesteigerte Fas-Expression und erhöhte Apoptoserate gegenüber den B-Zellen des parallelen Kontrollansatzes ohne T-Zellen (Schattner et al. 1995): der Anteil überlebender B-Zellen verringerte sich deutlich von 40 % auf 14 %. Obwohl die malignen B-Zellen in allen Fällen in der T-Zell-Kokultur ebenfalls eine erhöhte Fas-Expression zeigten, erwiesen sich nur vier von sieben MALT-Typ Lymphomen und eines von sechs DLBL als ähnlich apoptose-sensitiv wie die normalen Gedächtnis-B-Zellen. Die restlichen drei MALT-Typ Lymphome und fünf DLBL zeigten keine erhöhte Apoptoserate und wurden daher als apoptose-resistent bezeichnet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Untersuchungen an malignen B-Zellen verschiedener NHL, darunter auch vier DLBL, die sich alle als resistent gegen die Fas-vermittelte Apoptose erwiesen (Plumas et al. 1998). In einigen Fällen der in meiner Arbeit untersuchten apoptose-resistenten malignen B-Zellen (H6006/95, H3302/88, 22903/96 und H4365/94) scheinen die T-Zellen sogar einen positiven Einfluss auf deren Überleben zu haben, da in der T-Zell-Kokultur prozentual mehr Zellen überlebten als im Kontrollansatz ohne T-Zellen. Auffällig ist allerdings, dass bei den DLBL (mit Ausnahme des einzigen apoptose-sensitiven Falles H4590/96) schon im Kontrollansatz weitaus weniger maligne B-

Zellen als bei den MALT-Typ Lymphomen überlebten, diese wenigen Zellen aber durchweg apoptose-resistent waren. Da Apoptose-Resistenz vor allem bei DLBL auftritt, könnte sie ein Charakteristikum fortgeschrittener Malignität sein. Die Grenze zwischen normaler Apoptose-Sensitivität und aberranter Apoptose-Resistenz verläuft mitten durch die MALT-Typ Lymphome; die drei apoptose-resistenten Fälle (H6006/95, H1851/95, H3302/88) könnten sich schon auf dem Weg hin zu höherer Malignität befinden.

Vierzehn der gefundenen 20 Fas-Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch und könnten damit eine funktionelle Bedeutung besitzen. Die Mehrzahl dieser Mutationen (10 von 14) in den Codons 23, 50, 136, 152, 172, 193, 225, 229, 233 und 320 tritt tatsächlich nur in den apoptose-resistenten malignen B-Zellen auf. Diese Mutationen sind über die gesamte codierende Sequenz der Fas-Transkripte verteilt und könnten damit sowohl die extra- als auch die intrazelluläre Domäne von Fas in ihrer Funktion einschränken. Obwohl jede dieser Mutationen nur in der Minderzahl der klonierten Fas-Transkripte auftritt, ist eine funktionelle Störung des Fas-Rezeptors möglich, da mutierte Fas-Moleküle in dominant-negativer Weise wirken (Siegel et al. 2000).

Die Mutationen in den Codons 142, 243, 248 und 284 treten dagegen sowohl in apoptose-sensitiven als auch apoptose-resistenten B-Zellen auf und sind damit offensichtlich nicht für Apoptose-Resistenz verantwortlich. Zusammenfassend bleibt also festzuhalten, daß Fas-Mutationen ein Charakteristikum maligner B-Zellen sowohl der MALT-Typ Lymphome als auch der DLBL sind. Obwohl nicht jede Mutation notwendigerweise zu Apoptose-Resistenz maligner B-Zellen führt, spricht das gehäufte Auftreten von Mutationen in den apoptose-resistenten Fällen für eine funktionelle Bedeutung.

Fas-Mutationen, die zu einem Funktionsverlust von Fas und damit zur Apoptose-Resistenz von B-Zellen führen, würden dem Fas-Gen die Eigenschaft eines Tumorsuppressors zuschreiben (Peng et al. 1996), da Apoptose-Resistenz als Eigenschaft maligner Zellen identifiziert wurde (Hanahan und Weinberg 2000). Ein Tumorsuppressor ist ein Gen, dessen Inaktivierung zur Entstehung von Tumoren führt. In den Tumoren liegt oft nur noch das inaktivierte Allel des Gens vor, während das Wildtyp-Allel deletiert ist: es kommt zu einem Verlust des normalen heterozygoten Zustands (loss of heterozygosity, LOH). In soliden Tumoren wie Melanomen (Shin et al. 1999), Lungenkarzinomen (Lee et al. 1999b) und Blasenkarzinomen (Lee et al. 1999a) hat man bereits LOH im Bereich des Fas-Gens gefunden. Eine entsprechende Untersuchung von sieben MALT-Typ Lymphomen bzw. DLBL dagegen ergab keinen LOH (Petr Starostik und Stephan Schwarz, pers. Mitteilung),

das heißt beide Allele des Fas-Gens sind vorhanden. Wie unsere Klonierungen der Fas-Transkripte zeigten, sind stets Klone mit unmutierter Sequenz vorhanden, was ebenfalls dafür spricht, dass nur ein Allel mutiert ist und dominant negativ wirkt (Gronbaek et al. 1998).

Interessanterweise treten die Fas-Mutationen in den MALT-Typ Lymphomen und DLBL in B-Zellen auf, die das Keimzentrum durchlaufen haben und damit ihre Immunglobulin-Gene einer somatischen Hypermutation unterzogen haben. Vor kurzem wurde gezeigt, dass dieser Hypermutationsprozeß auch andere Gene betreffen kann, wie etwa *bcl-6* (Peng et al. 1999; Shen et al. 1998). *Bcl-6* ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Expression für die Ausbildung von Keimzentren wichtig ist und als Marker für folliculäre und postfolliculäre B-Zellen dient (Ye et al. 1997). Die funktionelle Konsequenz der *bcl-6* Mutationen ist noch unbekannt, könnte aber in der Inaktivierung eines in reifen B-Zellen nicht mehr benötigten Gens liegen. Mutationen im *bcl-6*-Gen wurden in MALT-Typ Lymphomen und DLBL gefunden (Capello et al. 2000). Möglicherweise stehen auch die Fas-Mutationen der MALT-Typ Lymphome und DLBL in einem Zusammenhang mit der somatischen Hypermutation in den Vorläufern der malignen B-Zellen. Die Fas-Mutationen könnten dann, in Abhängigkeit davon welches Codon sie betreffen, zu einer Funktionsstörung des Fas-Rezeptors führen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die in den funktionellen Analysen beobachtete Apoptose-Resistenz maligner B-Zellen.

Aber es gibt noch eine Reihe weiterer denkbarer Mechanismen der Apoptose-Resistenz. Gerade bei B-Zellen kann allein Antigenstimulation am BCR zu Resistenz gegen Fas-vermittelte Apoptose führen (Lagresle et al. 1996; Rothstein et al. 1995). Dieser Mechanismus wirkt über das Protein c-FLIP (FLICE-(Caspase-8)-inhibitory protein), dessen Expression durch BCR-Stimulation induziert wird und das die Aktivierung von Caspase-8 verhindert (Wang et al. 2000). Bei unseren *in vitro*-Untersuchungen fand jedoch keine Kostimulation am BCR statt. Theoretisch bestünde noch die Möglichkeit einer veränderten Signaltransduktion in den apoptose-resistenten malignen B-Zellen, die eine Antigenstimulation am BCR vorspiegeln würde. Bisher ist aber noch zu wenig über die intrazelluläre Signalkette des BCR bekannt, um die Plausibilität dieser theoretischen Überlegung abschätzen zu können (Plumas et al. 1998).

Ein weiterer Mechanismus der Apoptose-Resistenz ist die aberrante Expression bestimmter zellulärer Interaktionsmoleküle in den malignen Zellen. Es wurde gezeigt, dass maligne B-Zellen aus chronisch lymphatischen Leukämien (CLL) CD40L exprimieren und dadurch

eine T-Zell-Stimulation simulieren, die sie vor Apoptose schützt (Schattner et al. 1998; Younes et al. 1998). Bei MALT-Typ Lymphomen konnte dagegen klar gezeigt werden, dass die malignen B-Zellen selbst nicht in der Lage sind CD40L zu exprimieren, dieses Kooperationsmolekül jedoch von den tumor-infiltrierenden T-Zellen bereitgestellt wird (Knörr et al. 1999). Ein weiterer, hypothetischer Mechanismus ist die aberrante Expression von FasL in malignen Zellen. So sollten etwa Melanome (Hahne et al. 1996) und Leberzellkarzinome (Strand et al. 1996) FasL exprimieren und angreifende T-Zellen ihrerseits in die Apoptose schicken. Dies sollte zu einer immunprivilegierten Umgebung des Tumors führen. In diesen Arbeiten wurde die FasL-Expression jedoch nur immunhistochemisch nachgewiesen und heute werden an diesen Ergebnissen Zweifel geäußert, da die seinerzeit verwendeten Antikörper wohl nicht FasL-spezifisch waren, was zu falsch-positiven Ergebnissen geführt haben könnte (Restifo 2000). Vor diesem Hintergrund erscheinen Arbeiten, die eine FasL-Proteinexpression in normalen B-Zellen (Truman et al. 1997) oder malignen B-Zellen (Xerri et al. 1997) nachgewiesen haben, zweifelhaft. In einer Untersuchung zum Nachweis von mRNA für FasL mit Hilfe einer RT-PCR wurde bisher allenfalls eine sehr schwache FasL-Expression in normalen B-Zellen und malignen B-Zellen eines Burkitt-Lymphoms gefunden (Daniel et al. 1997). Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen dagegen keine Expression von FasL mRNA in malignen B-Zellen. Vielmehr wurde deutlich, dass die im Tumorgewebe von MALT-Typ Lymphomen *in vivo* gefundene mRNA für FasL ausschließlich von den tumor-infiltrierenden T-Zellen stammt.

Ein anderer, einfacher und regulierbarer Mechanismus der Resistenz gegenüber Fas-vermittelter Apoptose ist die reduzierte oder fehlende Expression von Fas auf der Oberfläche maligner Zellen. So wurde in einer Studie gezeigt, dass sieben von acht B-Zell-Lymphomen keine konstitutive Fas-Expression *in vivo* aufweisen (Owen-Schaub et al. 1993). *In vitro*-Experimente mit Jurkat-Zellen zeigten, dass fortgesetzte Stimulation von Fas mit Hilfe eines induzierenden Antikörpers zu verminderter und schließlich vollständig fehlender Fas-Expression und gänzlicher Apoptose-Resistenz führen kann (Martinez-Lorenzo et al. 1998). Die hier untersuchten MALT-Typ Lymphome bzw. DLBL wiesen dagegen nicht nur konstitutive, sondern meist auch durch T-Zell-Einfluss induzierbare Fas-Expression auf. Nachdem die Fas-Expression gerade in den apoptose-resistenten DLBL maximal und in den apoptose-resistenten MALT-Typ Lymphomen deutlich höher als in den apoptose-sensitiven war, spielt die Fas-Expression für die Apoptose-Resistenz hier offensichtlich keine Rolle.

Ein weiterer Mechanismus, um der Fas-vermittelten Apoptose zu entkommen, besteht in der Produktion von löslichem Fas (soluble Fas, sFas). Soluble Fas wird von der (malignen) Zelle sezerniert und wirkt dosisabhängig anti-apoptotisch, indem es FasL Moleküle abfängt (Cheng et al. 1994). Die mRNA für sFas wird durch alternatives Spleißen der normalen Fas-mRNA erzeugt. Man kennt bisher drei funktionelle Isoformen von sFas. Die häufigste Isoform besitzt eine Deletion von Exon 6, so dass die letzten 5 AS der extrazellulären Domäne und 16 von 17 AS der Transmembrandomäne des Fas Moleküls fehlen (Cascino et al. 1995). Diese Isoform wurde im Überstand von normalen aktivierten Lymphozyten (Cascino et al. 1995), aber auch verstärkt im Überstand verschiedener Zelllinien aus soliden Tumoren (Midis et al. 1996) und aus B- und T-Zell-Leukämien (Knipping et al. 1995) nachgewiesen. Eine jüngere Untersuchung beschrieb sFas nur in T-Zell-Lymphomen, nicht aber in B-Zell-Lymphomen (Yufu et al. 1998). Die Expression von sFas scheint bei MALT-Typ Lymphomen nicht für die Apoptose-Resistenz in Frage zu kommen, da zwar mRNA für sFas durch eine hochempfindliche RT-PCR detektiert werden konnte, der Proteinnachweis mittels Immunopräzipitation jedoch negativ blieb.

Letztlich könnte eine Resistenz gegen Fas-vermittelte Apoptose auch durch eine Störung in der Fas-Signalkaskade bzw. dem komplexen Netzwerk der Apoptose-Regulation entstehen. Nach einem apoptotischen Signal, das etwa durch die Aufnahme cytotoxischer Stoffe oder über die Stimulierung des Fas-Rezeptors erfolgen kann, entscheidet erst eine komplexe Interaktion verschiedener pro- und anti-apoptotischer Proteine, ob die Zelle tatsächlich in Apoptose geht. Der Sinn des komplexen Regelmechanismus besteht für die Zelle darin, in ihrem jeweiligen physiologischen Kontext verschiedene Stimuli miteinander zu verarbeiten. Der Nachteil dieses Regelmechanismus liegt in der Gefahr, dass im Rahmen eines malignen Prozesses einzelne Regelglieder außer Kontrolle geraten und beispielsweise die anti-apoptotischen Proteine bcl-2 und bcl-x_L im Vergleich zum pro-apoptotischen Protein bax überexprimiert werden, was dann zur Apoptose-Resistenz der Zelle führt. Dies wurde bisher für maligne Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie (McConkey et al. 1996) und des folliculären Lymphoms (Ghia et al. 1998) gezeigt. Unsere Untersuchungen zur Expression dieser Proteine in malignen B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen ergaben jedoch kein Expressionsmuster, das spezifisch die apoptose-resistenten malignen B-Zellen charakterisieren würde. Weitere Mechanismen setzen an der wichtigen Effektor-Caspase-3 an. In einem Experiment zur Selektion apoptose-resistenter Jurkat-Zellen zeigte sich, dass diese ihre Expression von Caspase-3 einstellen können (Martinez-Lorenzo et al. 1998). In

malignen B-Zellen von MALT-Typ Lymphomen dagegen war Caspase-3 auf mRNA- und Protein-Ebene stets vorhanden, darüber hinaus wurde ihre Expression in vier von sechs Fällen durch aktivierte T-Zellen gesteigert. Die Ergebnisse vorliegender Arbeit geben also keinen Hinweis auf einen Defekt in den hier untersuchten Bestandteilen der Fas-Signalkasade in apoptose-resistenten malignen B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen. Am Ende der Fas-Signalkaskade steht das Substrat Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), dessen Spaltung in zwei Fragmente ein direkter Hinweis für eine stattfindende Apoptose und damit für das Funktionieren der Signal-kaskade ist. Auch in apoptose-resistenten malignen B-Zellen aus zwei MALT-Typ Lymphomen wurde PARP-Spaltung gefunden, nachdem die Zellen für 24 Stunden in Kultur genommen worden waren. Offensichtlich findet eine spontane Apoptose statt. In der Kokultur mit aktivierten T-Zellen dagegen wurde die PARP-Spaltung der gleichen Zellen verhindert oder zumindest verzögert, was auf die CD40-Ligation zurückzuführen ist (An und Knox 1996). Diese Ergebnisse weisen daher auf eine zumindest unterhalb von Fas funktionierende Signalkaskade hin, die ein apoptotisches Signal anderer, einmündender Apoptose-Wege bis hinunter zum PARP weiterleiten kann.

3. Fas-Mutationen und Apoptose-Resistenz sind Charakteristika der frühen MALT-Typ Lymphomgenese

Da in der vorliegenden Arbeit Mutationen in den Fas-Transkripten maligner B-Zellen aller untersuchten MALT-Typ Lymphome und DLBL gefunden wurden, könnten die Fas-Mutationen einen frühen Schritt der Lymphompathogenese darstellen. Einige dieser Mutationen könnten zu einer funktionellen Inaktivierung des Fas-Rezeptors führen und damit zu der in drei von sieben MALT-Typ Lymphomen und vier von fünf DLBL beobachteten Apoptose-Resistenz maligner B-Zellen beitragen. Aufgrund der Apoptose-Resistenz kommt es zu einem verlängerten Überleben der B-Zellen und damit im weiteren Verlauf der Lymphomgenese zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Erwerbs zusätzlicher genetischer Aberrationen. Als Beispiele kennt man in seltenen Fällen bei MALT-Typ Lymphomen bzw. DLBL die chromosomale Translokation $t(1;14)(p22;q32)$ (Wotherspoon et al. 1992). Wesentlich häufiger ist dagegen die für MALT-Typ Lymphome spezifische und in etwa 50 % aller Fälle auftretende $t(11;18)(q21;q21)$ (Ott et al. 1997). In vorliegender Arbeit konnte kein Fall mit einer $t(1;14)(p22;q32)$ untersucht werden, dagegen aber vier MALT-Typ Lymphome mit einer $t(11;18)(q21;q21)$. Interessanterweise wurde in jüngster Zeit bei dieser Translokation die Beteiligung des Gens für den Apoptose-Inhibitor HIAP-1 nachgewiesen, dessen Produkt genau wie Fas eine Rolle in der Apoptose-Regulation der Zelle spielt. Daneben ist in diese Translokation noch ein Gen unbekannter Funktion involviert, das als MLT bezeichnet wurde. Durch die $t(11;18)(q21;q21)$ entsteht ein HIAP-1/MLT-Fusionsprotein (Dierlamm et al. 1999; Morgan et al. 1999), dessen funktionelle Auswirkungen noch nicht bekannt sind. Denkbar wäre jedoch, dass die Zellen mit einer $t(11;18)(q21;q21)$ Apoptose-Resistenz besitzen. Bei den von mir untersuchten vier MALT-Typ Lymphomen, die diese Translokation besaßen, erwiesen sich allerdings nur 2 Fälle (H3302/88 und H1851/95) als apoptose-resistent, während die anderen beiden Fälle (H4145/91 und H4364/94) apoptose-sensitiv waren. HIAP-1 soll anti-apoptotisch wirken, indem es die Spaltung und damit Aktivierung von Caspasen verhindert (Roy et al. 1997). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit war die Spaltung der untersuchten Caspasen-8, -3 und -1 jedoch unabhängig vom Vorhandensein der $t(11;18)(q21;q21)$.

Unsere Ergebnisse schließen allerdings nicht aus, dass ein HIAP-1/MLT-Fusionsprotein in andere, von Fas unabhängige Apoptosewege der Zellen eingreift.

Auch bei der selteneren t(1;14)(p22;q32) ist mit bcl-10 ein Gen involviert, das eine Rolle in der Apoptose-Regulation spielt und durch die Translokation möglicherweise seine normale pro-apoptotische Funktion verliert. Unabhängig von der Translokation wurden in jüngster Zeit auch verschiedene Mutationen im bcl-10 Gen maligner B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen und DLBL nachgewiesen (Du et al. 2000), die ebenfalls zu einer Inaktivierung von Bcl-10 führen könnten. Interessanterweise wurden die Mutationen vor allem in besonders aggressiven MALT-Typ Lymphomen des Magens gefunden, die nicht auf eine *Helicobacter pylori*-Eradikation ansprechen (Du et al. 2000). Offensichtlich treffen in MALT-Typ Lymphomen verschiedene Ereignisse mit ähnlichen Konsequenzen, wie Fas-Mutationen, chromosomale Translokationen und auch Mutationen im bcl-10-Gen, zusammen oder interferieren miteinander. Letztlich verweisen sie aber alle auf eine gestörte Apoptose in malignen B-Zellen als Prinzip der MALT-Typ Lymphomgenese.

Aus den bisherigen Befunden und den Ergebnissen der hier vorgestellten Untersuchungen von malignen B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen bzw. DLBL und den entsprechenden tumor-infiltrierenden T-Zellen läßt sich folgendes Modell der frühen MALT-Typ Lymphomgenese ableiten. Die aktivierten, tumor-infiltrierenden T-Zellen treten den malignen B-Zellen der MALT-Typ Lymphome grundsätzlich janusköpfig gegenüber. Sie können die B-Zellen einerseits durch CD40-Ligation zum Wachstum anregen und andererseits durch Fas-Ligation in die Apoptose treiben. Oftmals jedoch bleibt diese Kontrollfunktion erfolglos, weil sich die malignen B-Zellen oder auch schon deren Vorläufer durch Apoptose-Resistenz der Fas-vermittelten Apoptose entziehen. Dadurch können die B-Zellen ihr Überleben verlängern und darüber hinaus in vermutlich parakriner Weise von der T-Zell-Hilfe profitieren und es kommt zur Persistenz des Tumors. Bisher wurde dieses Phänomen so interpretiert, als leisteten die T-Zellen eine gewissermaßen irrtümliche Überlebenshilfe für die malignen B-Zellen (Hussell et al. 1996). Das verlängerte Überleben der B-Zellen kann möglicherweise auch zur Generierung autoreaktiver B-Zellen führen, die nicht mehr eliminiert werden können und vergrößert die Wahrscheinlichkeit des Erwerbs weiterer maligner Eigenschaften der B-Zellen.

Das Phänomen der Apoptose-Resistenz könnte weiterhin auch zur Erklärung bisher unverstandener klinischer Beobachtungen im Zusammenhang mit der Eradikation von *Helicobacter pylori* bei gastralen MALT-Typ Lymphomen beitragen, so etwa der

Persistenz von einzelnen Tumorklonen noch Jahre nach erfolgreicher Eradikation (Thiede et al. 1998). Auch das Versagen der Therapie mit der Folge einer Tumorprogression trotz erfolgreicher Eradikation von *Helicobacter pylori* in etwa 20 % der Fälle könnte bedeuten, dass der Wegfall einer T-Zell-vermittelten Wachstumsstimulation für die Tumorregression dann nicht mehr ausreichend ist, wenn die B-Zellen schon Apoptose-Resistenz erworben haben.

V. Zusammenfassung

B-Zell-Lymphome vom mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT)-Typ sind die größte Gruppe der extranodalen Lymphome. Sie entstehen vor dem Hintergrund einer chronischen Entzündung, wie etwa einer *Helicobacter pylori*-assoziierten Gastritis im Magen. Die Mechanismen der Lymphomgenese sind weitgehend unverstanden. Der Befund, dass die malignen B-Zellen der MALT-Typ Lymphome autoreaktiv sind und durch Antigen oder T-Zell-vermittelte Signale stimuliert werden, weist auf ein mögliches Versagen der T-Zell-Kontrolle hin. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl tumor-infiltrierende T-Zellen als auch maligne B-Zellen aus MALT-Typ Lymphomen untersucht. Mit Hilfe von Expressionsanalysen der V β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR) wurden antigen-induzierte klonale Expansionen in den tumor-infiltrierenden T-Zellen nachgewiesen. Weiterhin wurden ähnliche antigen-erkennende Regionen (CDR3) des TCR in tumor-infiltrierenden T-Zellen aus zwei verschiedenen MALT-Typ Lymphomen gefunden. Diese Ergebnisse charakterisieren die T-Zellen als funktionell und auch als potenziell tumor-reaktiv. Um mögliche Defekte bei malignen B-Zellen zu untersuchen, wurde eine *in vitro* T/B-Zell-Kokultur entwickelt. Damit war es möglich, die Interaktion des apoptose-induzierenden Oberflächenmoleküls FasL auf aktivierten T-Zellen mit dem entsprechenden Todesrezeptor Fas auf malignen B-Zellen zu untersuchen. Drei von sieben MALT-Typ Lymphomen und vier von fünf DLBL erwiesen sich als resistent gegen FasL-vermittelte Apoptose. Meine Untersuchungen deuten darauf hin, dass hierfür eine mutationsbedingte funktionelle Inaktivierung des Fas-Rezeptors verantwortlich ist. In Fas-Transkripten aller untersuchten malignen B-Zellen wurden insgesamt 14 verschiedene Punktmutationen gefunden, die zu Aminosäureaustauschen bei der Translation führen. Zehn dieser Mutationen waren mit der Apoptose-Resistenz maligner B-Zellen assoziiert. Durch ergänzende Untersuchungen konnten alternative Mechanismen der Apoptose-Resistenz wie etwa reduzierte Fas-Expression, Produktion von löslichem Fas (sFas) oder Störungen in der Fas-Signalkaskade weitgehend ausgeschlossen werden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgender Schluss ziehen: Resistenz gegen FasL/Fas-vermittelte Apoptose ist ein Mechanismus der frühen MALT-Typ Lymphomgenese und

möglicherweise auf bestimmte Fas-Mutationen zurückzuführen. Durch Apoptose-Resistenz entkommen die malignen B-Zellen der MALT-Typ Lymphome der vorhandenen T-Zell-Kontrolle. Gleichzeitig nehmen sie die parakrin angebotene T-Zell-Hilfe solange in Anspruch, bis sie völlige Autonomie erreicht haben. Durch das abnorm verlängerte Überleben der B-Zellen steigt dann die Wahrscheinlichkeit, weitere Aberrationen wie etwa die in 50 % aller Fälle auftretende Chromosomentranslokation $t(11;18)(q21;q21)$ zu erwerben.

VI. Summary

The largest group of extranodal lymphomas are B cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type. They arise on the background of chronic inflammation, e.g. the *Helicobacter pylori*-associated gastritis in the stomach. The mechanism of MALT-type lymphomagenesis is still enigmatic. The finding of autoreactive malignant B cells which proliferate in response to antigen and T cell-mediated signals may suggest a failure of T cell control. For testing this hypothesis we examined both tumor-infiltrating T cells and malignant B cells of various MALT-type lymphomas. By expression analysis of the T cell receptor (TCR) V β chain we showed clonal expansions of T cells due to antigenic stimulation. Furthermore we found similar antigen-binding regions (CDR3) in the TCR of tumor-infiltrating T cells in two different MALT-type lymphomas, that indicate potential antitumor-reactivity of the tumor-infiltrating T cells. Furthermore we established an *in vitro* T/B cell coculture assay for investigating the B cells and focused on the interaction of the pro-apoptotic molecule FasL on activated T cells with its corresponding death receptor Fas on malignant B cells. The malignant B cells from three out of seven MALT-type lymphomas and four out of five DLBL were resistant to FasL/Fas-mediated apoptosis. My results indicate that this is probably due to mutational inactivation of the Fas receptor. In Fas transcripts of malignant B cells from all cases investigated, 14 different point mutations leading to amino acid changes were found. Ten of these mutations were associated with resistance to apoptosis of malignant B cells. Additional investigations showed, that alternative mechanisms of resistance to apoptosis such as decreased expression of Fas, production of soluble Fas (sFas) or an impaired signalling cascade downstream of Fas were not operative. From the results we conclude the following: Resistance to FasL/Fas-mediated apoptosis is a mechanism of early MALT-type lymphomagenesis that could be due to certain Fas mutations. By this mechanism the B cells are able to escape T cell control while still receiving T cell help until they reach autonomous growth. The prolonged survival of the B cells might increase the risk of acquiring additional aberrations, such as the chromosomal translocation t(11;18)(q21;21) which is found in 50 % of all MALT-type lymphomas.

VII. Literaturverzeichnis

- Adams, J. M., und Cory, S. (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science*, 281(5381), 1322-6.
- Alkan, S., Karcher, D. S., Newman, M. A., und Cohen, P. (1996). "Regression of salivary gland MALT lymphoma after treatment for *Helicobacter pylori* [letter]." *Lancet*, 348(9022), 268-269.
- An, S., und Knox, K. A. (1996). "Ligation of CD40 rescues Ramos-Burkitt lymphoma B cells from calcium ionophore- and antigen receptor-triggered apoptosis by inhibiting activation of the cysteine protease CPP32/Yama and cleavage of its substrate PARP." *FEBS Lett*, 386(2-3), 115-22.
- Arpin, C., Dechanet, J., van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J., und Liu, Y. J. (1995). "Generation of memory B cells and plasma cells in vitro." *Science*, 268(5211), 720-722.
- Banchereau, J., und Rousset, F. (1991). "Growing human B lymphocytes in the CD40 system." *Nature*, 353(6345), 678-679.
- Bayerdörffer, E., Neubauer, A., Rudolph, B., Thiede, C., Lehn, N., Eidt, S., und Stolte, M. (1995). "Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group." *Lancet*, 345(8965), 1591-1594.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R., und Weissberg, P. (1998). "Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis [see comments]." *Science*, 282(5387), 290-3.
- Bettinardi, A., Brugnani, D., Quiros-Roldan, E., Malagoli, A., La Grutta, S., Correr, A., und Notarangelo, L. D. (1997). "Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis." *Blood*, 89(3), 902-9.
- Bissonnette, R. P., Echeverri, F., Mahboubi, A., und Green, D. R. (1992). "Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2." *Nature*, 359(6395), 552-4.
- Boise, L. H., und Thompson, C. B. (1996). "Hierarchical control of lymphocyte survival." *Science*, 274(5284), 67-8.
- Burrows, P. D., und Cooper, M. D. (1997). "B cell development and differentiation." *Curr Opin Immunol*, 9(2), 239-44.

- Camacho, S. A., Kosco-Vilbois, M. H., und Berek, C. (1998). "The dynamic structure of the germinal center." *Immunol Today*, 19(11), 511-4.
- Capello, D., Vitolo, U., Pasqualucci, L., Quattrone, S., Migliaretti, G., Fassone, L., Ariatti, C., Vivenza, D., Gloghini, A., Pastore, C., Lanza, C., Nomdedeu, J., Botto, B., Freilone, R., Buonaiuto, D., Zagonel, V., Gallo, E., Palestro, G., Saglio, G., Dalla-Favera, R., Carbone, A., und Gaidano, G. (2000). "Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia [In Process Citation]." *Blood*, 95(2), 651-9.
- Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G., und Ruberti, G. (1995). "Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing." *J Immunol*, 154(6), 2706-13.
- Cascino, I., Papoff, G., De Maria, R., Testi, R., und Ruberti, G. (1996). "Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis." *J Immunol*, 156(1), 13-17.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., und Lenardo, M. J. (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling [see comments]." *Science*, 288(5475), 2351-4.
- Chan, J. K., Ng, C. S., und Isaacson, P. G. (1990). "Relationship between high-grade lymphoma and low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) of the stomach." *Am J Pathol*, 136(5), 1153-1164.
- Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K., und Hardwick, J. M. (1997). "Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases." *Science*, 278(5345), 1966-8.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., und Mountz, J. D. (1994). "Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule." *Science*, 263(5154), 1759-62.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., und Dixit, V. M. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." *Cell*, 81(4), 505-12.
- Choe, J., Kim, H. S., Zhang, X., Armitage, R. J., und Choi, Y. S. (1996). "Cellular and molecular factors that regulate the differentiation and apoptosis of germinal center B cells. Anti-Ig down-regulates Fas expression of CD40 ligand-stimulated germinal center B cells and inhibits Fas-mediated apoptosis." *J Immunol*, 157(3), 1006-16.
- Choi, Y. W., Kotzin, B., Herron, L., Callahan, J., Marrack, P., und Kappler, J. (1989). "Interaction of Staphylococcus aureus toxin "superantigens" with human T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(22), 8941-5.

- Chott, A., Probert, C. S., Gross, G. G., Blumberg, R. S., und Balk, S. P. (1996). "A common TCR beta-chain expressed by CD8+ intestinal mucosa T cells in ulcerative colitis." *J Immunol*, 156(8), 3024-3035.
- Clark, E. A., und Ledbetter, J. A. (1994). "How B and T cells talk to each other." *Nature*, 367(6462), 425-8.
- Daniel, P. T., Oettinger, U., Mapara, M. Y., Bommert, K., Bargou, R., und Dorken, B. (1997). "Activation and activation-induced death of human tonsillar B cells and Burkitt lymphoma cells: lack of CD95 (Fas/APO-1) ligand expression and function." *Eur J Immunol*, 27(4), 1029-1034.
- D'Elios, M. M., Amedei, A., Manghetti, M., Costa, F., Baldari, C. T., Quazi, A. S., Telford, J. L., Romagnani, S., und Del Prete, G. (1999). "Impaired T-cell regulation of B-cell growth in Helicobacter pylori--related gastric low-grade MALT lymphoma." *Gastroenterology*, 117(5), 1105-12.
- Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J. M., Hossfeld, D. K., De Wolf-Peeters, C., Hagemeijer, A., Van den Berghe, H., und Marynen, P. (1999). "The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas [In Process Citation]." *Blood*, 93(11), 3601-9.
- Du, M., Singh, N., Husseuin, A., Isaacson, P. G., und Pan, L. (1996). "Positive correlation between apoptotic and proliferative indices in gastrointestinal lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)." *J Pathol*, 178(4), 379-384.
- Du, M. Q., Peng, H., Liu, H., Hamoudi, R. A., Diss, T. C., Willis, T. G., Ye, H., Dogan, A., Wotherspoon, A. C., Dyer, M. J., und Isaacson, P. G. (2000). "BCL10 gene mutation in lymphoma [In Process Citation]." *Blood*, 95(12), 3885-90.
- Fischbach, W., Tacke, W., Greiner, A., und Müller-Hermelink, H. K. (1997). "Regression of immunoproliferative small intestinal disease after eradication of helicobacter pylori." *Lancet*, 349(9044), 31-32.
- Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J., und Puck, J. M. (1995). "Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome." *Cell*, 81(6), 935-946.
- Fiucci, G., und Ruberti, G. (1994). "Detection of polymorphisms within the Fas cDNA gene sequence by GC- clamp denaturing gradient gel electrophoresis." *Immunogenetics*, 39(6), 437-9.
- Genevee, C., Diu, A., Nierat, J., Caignard, A., Dietrich, P. Y., Ferradini, L., Roman-Roman, S., Triebel, F., und Hercend, T. (1992). "An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V alpha 1-w29/V beta 1-w24) for

- the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction." *Eur J Immunol*, 22(5), 1261-9.
- Ghia, P., Boussiotis, V. A., Schultze, J. L., Cardoso, A. A., Dorfman, D. M., Gribben, J. G., Freedman, A. S., und Nadler, L. M. (1998). "Unbalanced expression of bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling in promoting survival." *Blood*, 91(1), 244-51.
- Greiner, A., Knörr, C., Qin, Y., Schultz, A., Marx, A., Kroczeck, R. A., und Müller-Hermelink, H. K. (1998). "CD40 ligand and autoantigen are involved in the pathogenesis of low- grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue [In Process Citation]." *Dev Immunol*, 6(3-4), 187-95.
- Greiner, A., Knörr, C., Qin, Y., Sebald, W., Schimpl, A., Banchereau, J., und Müller-Hermelink, H. K. (1997). "Low-grade B cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-type) require CD40-mediated signaling and Th2-type cytokines for in vitro growth and differentiation." *Am J Pathol*, 150(5), 1583-1593.
- Greiner, A., Marx, A., Heesemann, J., Leebmann, J., Schmausser, B., und Müller-Hermelink, H. K. (1994a). "Idiotypic identity in a MALT-type lymphoma and B cells in Helicobacter pylori associated chronic gastritis." *Lab Invest*, 70(4), 572-578.
- Greiner, A., Marx, A., Schmausser, B., und Müller-Hermelink, H. K. (1994b). "The pivotal role of the immunoglobulin receptor of tumor cells from B cell lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue (MALT)." *Adv Exp Med Biol*, 355, 189-193.
- Greiner, A., und Müller-Hermelink, H. K. (1996). "Recent advances in gastric extranodal B-cell lymphoma." *Curr Diagn Pathol*, 3, 91-98.
- Greiner, A., Qin, Y., Knörr, C., Haedicke, W., Kaup, A., und Müller-Hermelink, H. K. (1996). "Autoantigen receptors in extranodal non-Hodgkin B-cell lymphomas." *Verh Dtsch Ges Pathol*, 80, 160-168.
- Gronbaek, K., Straten, P. T., Ralfkiaer, E., Ahrenkiel, V., Andersen, M. K., Hansen, N. E., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K., und Guldborg, P. (1998). "Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity." *Blood*, 92(9), 3018-24.
- Guidoboni, M., Doglioni, C., Laurino, L., Boiocchi, M., und Dolcetti, R. (1999). "Activation of infiltrating cytotoxic T lymphocytes and lymphoma cell apoptotic rates in gastric MALT lymphomas. Differences between high- grade and low-grade cases." *Am J Pathol*, 155(3), 823-9.
- Haedicke, W., Greiner, A., Seeberger, H., und Müller-Hermelink, H. K. (1999). "Oligoclonal expansions of T-cell repertoire in gastric mucosa associated lymphoid tissue type B-cell lymphoma and adjacent gastritis [In Process Citation]." *Diagn Mol Pathol*, 8(3), 138-44.

- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., und Tschopp, J. (1996). "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape [see comments]." *Science*, 274(5291), 1363-6.
- Hallas, C., Greiner, A., Peters, K., und Müller-Hermelink, H. K. (1998). "Immunoglobulin VH genes of high-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas show a high load of somatic mutations and evidence of antigen-dependent affinity maturation." *Lab Invest*, 78(3), 277-287.
- Hanahan, D., und Weinberg, R. A. (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell*, 100(1), 57-70.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., und Bloomfield, C. D. (2000). "The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997." *Histopathology*, 36(1), 69-86.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Stein, H., Banks, P. M., Chan, J. K., Cleary, M. L., Delsol, G., De Wolf Peeters, C., Falini, B., Gatter, K. C., Müller-Hermelink, H. K., und al, e. (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group [see comments]." *Blood*, 84(5), 1361-1392.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., und Fesik, S. W. (1996). "NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain." *Nature*, 384(6610), 638-41.
- Hueber, A. O., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., und Evan, G. I. (1997). "Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis [see comments]." *Science*, 278(5341), 1305-9.
- Hussell, T., Isaacson, P. G., Crabtree, J. E., und Spencer, J. (1993). "The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori* [see comments]." *Lancet*, 342(8871), 571-574.
- Hussell, T., Isaacson, P. G., Crabtree, J. E., und Spencer, J. (1996). "Helicobacter pylori-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue [see comments]." *J Pathol*, 178(2), 122-127.
- Isaacson, P. G. (1993). "Pathogenesis and early lesions in extranodal lymphoma." *Toxicol Lett*, 67(1-3), 237-247.
- Isaacson, P. G., Wotherspoon, A. C., Diss, T., und Pan, L. X. (1991). "Follicular colonization in B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue." *Am J Surg Pathol*, 15(9), 819-828.

- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., und Nagata, S. (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." *Cell*, 66(2), 233-43.
- Janeway, C. A., und Travers, P. (1997). *Immunobiology*, Churchill Livingstone, Edinburgh, London.
- Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H., und Golstein, P. (1994). "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity." *Science*, 265(5171), 528-30.
- Kawahara, Y., Yokota, K., Mizuno, M., Yunoki, N., Uesu, T., Okada, H., Kobayashi, K., Hirai, Y., Oguma, K., und Tsuji, T. (1999). "Antibodies to human gastric epithelial cells and heat shock protein 60 in Helicobacter pylori positive mucosa associated lymphoid tissue lymphoma." *Gut*, 45(1), 20-3.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R., und Newmeyer, D. D. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [see comments]." *Science*, 275(5303), 1132-6.
- Knipping, E., Debatin, K. M., Stricker, K., Heilig, B., Eder, A., und Krammer, P. H. (1995). "Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B- and T-cell lines and increased serum levels in B- and T-cell leukemias." *Blood*, 85(6), 1562-1569.
- Knörr, C., Amrehn, C., Seeberger, H., Rosenwald, A., Stilgenbauer, S., Ott, G., HK, M.-H., und Greiner, A. (1999). "Expression of Costimulatory Molecules in Low-Grade Mucosa-Associated Lymphoid Tissue-Type Lymphomas in Vivo." *Am J Pathol*, 155(6), 2019-2027.
- Kobayashi, K., Yokota, K., Yoshino, T., Kawahara, Y., Dey, A., Hirai, Y., Oguma, K., und Akagi, T. (1998). "Detection of Helicobacter pylori associated antigen and heat shock protein 60 on follicular dendritic cells in the germinal centres of low grade B cell lymphoma of gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT)." *J Clin Pathol*, 51(5), 396-8.
- Koulis, A., Diss, T., Isaacson, P. G., und Dogan, A. (1997). "Characterization of tumor-infiltrating T lymphocytes in B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue." *Am J Pathol*, 151(5), 1353-1360.
- Kudoh, S., Wang, Q., Hidalgo, O. F., Rayman, P., Tubbs, R. R., Edinger, M. G., Kolenko, V., Panuto, J., Bukowski, R., und Finke, J. H. (1995). "Responses to T cell receptor/CD3 and interleukin-2 receptor stimulation are altered in T cells from B cell non-Hodgkin's lymphomas." *Cancer Immunol Immunother*, 41(3), 175-84.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, 227(259), 680-5.

- Lagresle, C., Mondiere, P., Bella, C., Krammer, P. H., und Defrance, T. (1996). "Concurrent engagement of CD40 and the antigen receptor protects naive and memory human B cells from APO-1/Fas-mediated apoptosis." *J Exp Med*, 183(4), 1377-88.
- Landowski, T. H., Qu, N., Buyuksal, I., Painter, J. S., und Dalton, W. S. (1997). "Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma." *Blood*, 90(11), 4266-70.
- Lee, S. H., Shin, M. S., Park, W. S., Kim, S. Y., Dong, S. M., Pi, J. H., Lee, H. K., Kim, H. S., Jang, J. J., Kim, C. S., Kim, S. H., Lee, J. Y., und Yoo, N. J. (1999a). "Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder." *Cancer Res*, 59(13), 3068-72.
- Lee, S. H., Shin, M. S., Park, W. S., Kim, S. Y., Kim, H. S., Han, J. Y., Park, G. S., Dong, S. M., Pi, J. H., Kim, C. S., Kim, S. H., Lee, J. Y., und Yoo, N. J. (1999b). "Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in non-small cell lung cancer." *Oncogene*, 18(25), 3754-60.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., und Wang, X. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell*, 91(4), 479-89.
- Lindhout, E., Koopman, G., Pals, S. T., und de Groot, C. (1997). "Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions." *Immunol Today*, 18(12), 573-7.
- Liu, J.-Y., de Bouteiller, O., und Fugier-Vivier, I. (1997). "Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers." *Current Opinion in Immunology*, 9, 256-262.
- Maeda, T., Yamada, Y., Moriuchi, R., Sugahara, K., Tsuruda, K., Joh, T., Atogami, S., Tsukasaki, K., Tomonaga, M., und Kamihira, S. (1999). "Fas gene mutation in the progression of adult T cell leukemia." *J Exp Med*, 189(7), 1063-71.
- Martin, D. A., Zheng, L., Siegel, R. M., Huang, B., Fisher, G. H., Wang, J., Jackson, C. E., Puck, J. M., Dale, J., Straus, S. E., Peter, M. E., Krammer, P. H., Fesik, S., und Lenardo, M. J. (1999). "Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(8), 4552-7.
- Martinez-Lorenzo, M. J., Gamen, S., Etxeberria, J., Lasierra, P., Larrad, L., Pineiro, A., Anel, A., Naval, J., und Alava, M. A. (1998). "Resistance to apoptosis correlates with a highly proliferative phenotype and loss of Fas and CPP32 (caspase-3) expression in human leukemia cells." *Int J Cancer*, 75(3), 473-81.
- McConkey, D. J., Chandra, J., Wright, S., Plunkett, W., McDonnell, T. J., Reed, J. C., und Keating, M. (1996). "Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of BCL-2 and BAX." *J Immunol*, 156(7), 2624-2630.

- McHeyzer-Williams, M. G., und Davis, M. M. (1995). "Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo." *Science*, 268(5207), 106-11.
- Midis, G. P., Shen, Y., und Owen-Schaub, L. B. (1996). "Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy." *Cancer Res*, 56(17), 3870-4.
- Miklos, J. A., Swerdlow, S. H., und Bahler, D. W. (2000). "Salivary gland mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma immunoglobulin V(H) genes show frequent use of V1-69 with distinctive CDR3 features [In Process Citation]." *Blood*, 95(12), 3878-84.
- Morgan, J. A., Yin, Y., Borowsky, A. D., Kuo, F., Nourmand, N., Koontz, J. I., Reynolds, C., Soreng, L., Griffin, C. A., Graeme-Cook, F., Harris, N. L., Weisenburger, D., Pinkus, G. S., Fletcher, J. A., und Sklar, J. (1999). "Breakpoints of the t(11;18)(q21;q21) in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma lie within or near the previously undescribed gene MALT1 in chromosome 18." *Cancer Res*, 59(24), 6205-13.
- Müller-Hermelink, H. K., und Greiner, A. (1992). "[Autoimmune diseases and malignant lymphoma]." *Verh Dtsch Ges Pathol*, 76, 96-109.
- Müller-Hermelink, H. K., Ott, G., Ott, M., und Greiner, A. (1995). "[Pathology and pathogenesis of extranodal lymphomas in the gastrointestinal tract]." *Schweiz Rundsch Med Prax*, 84(48), 1416-1422.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., und Dixit, V. M. (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." *J Biol Chem*, 273(5), 2926-30.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." *Cell*, 88(3), 355-65.
- Nossal, G. J. (1994). "Negative selection of lymphocytes." *Cell*, 76(2), 229-239.
- Oksenberg, J. R., Panzara, M. A., Begovich, A. B., Mitchell, D., Erlich, H. A., Murray, R. S., Shimonkevitz, R., Sherritt, M., Rothbard, J., Bernard, C. C., und et al. (1993). "Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis." *Nature*, 362(6415), 68-70.
- Ott, G., Katzenberger, T., Greiner, A., Kalla, J., Rosenwald, A., Heinrich, U., Ott, M. M., und Müller-Hermelink, H. K. (1997). "The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type." *Cancer Res*, 57(18), 3944-3948.
- Owen-Schaub, L. B., Meterissian, S., und Ford, R. J. (1993). "Fas/APO-1 expression and function on malignant cells of hematologic and nonhematologic origin." *J Immunother*, 14(3), 234-41.

- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zoller, M., und Kourilsky, P. (1993). "The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(9), 4319-23.
- Pannetier, C., Even, J., und Kourilsky, P. (1995). "T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples." *Immunol Today*, 16(4), 176-81.
- Papavasiliou, F., Jankovic, M., Gong, S., und Nussenzweig, M. C. (1997). "Control of immunoglobulin gene rearrangements in developing B cells." *Curr Opin Immunol*, 9(2), 233-8.
- Peng, H. Z., Du, M. Q., Koullis, A., Aiello, A., Dogan, A., Pan, L. X., und Isaacson, P. G. (1999). "Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells." *Blood*, 93(7), 2167-72.
- Peng, S. L., Robert, M. E., Hayday, A. C., und Craft, J. (1996). "A tumor-suppressor function for Fas (CD95) revealed in T cell-deficient mice." *J Exp Med*, 184(3), 1149-54.
- Philpott, N. J., Turner, A. J., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J. C., Gordon-Smith, E. C., Dalglish, A. G., und Gibson, F. M. (1996). "The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques." *Blood*, 87(6), 2244-51.
- Plumas, J., Jacob, M. C., Chaperot, L., Molens, J. P., Sotto, J. J., und Bensa, J. C. (1998). "Tumor B cells from non-Hodgkin's lymphoma are resistant to CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis." *Blood*, 91(8), 2875-85.
- Puisieux, I., Even, J., Pannetier, C., Jotereau, F., Favrot, M., und Kourilsky, P. (1994). "Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas." *J Immunol*, 153(6), 2807-18.
- Qin, Y., Greiner, A., Hallas, C., Haedicke, W., und Müller-Hermelink, H. K. (1997). "Intraclonal offspring expansion of gastric low-grade MALT-type lymphoma: evidence for the role of antigen-driven high-affinity mutation in lymphomagenesis." *Lab Invest*, 76(4), 477-485.
- Qin, Y., Greiner, A., Trunk, M. J., Schmausser, B., Ott, M. M., und Müller-Hermelink, H. K. (1995). "Somatic hypermutation in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type B-cell lymphoma." *Blood*, 86(9), 3528-3534.
- Radaszkiewicz, T., Dragosics, B., und Bauer, P. (1992). "Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis." *Gastroenterology*, 102(5), 1628-1638.
- Rajewsky, K. (1996). "Clonal selection and learning in the antibody system." *Nature*, 381(6585), 751-758.

- Reed, J. C. (1997). "Double identity for proteins of the Bcl-2 family." *Nature*, 387(6635), 773-6.
- Restifo, N. P. (2000). "Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape." *Nat Med*, 6(5), 493-5.
- Rieux Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A., and de Villartay, J. P. (1995). "Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity." *Science*, 268(5215), 1347-1349.
- Rothstein, T. L., Wang, J. K., Panka, D. J., Foote, L. C., Wang, Z., Stanger, B., Cui, H., Ju, S. T., and Marshak Rothstein, A. (1995). "Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells." *Nature*, 374(6518), 163-165.
- Roy, B., Beamon, J., Balint, E., and Reisman, D. (1994). "Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53 expression in some tumors." *Mol Cell Biol*, 14(12), 7805-15.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." *Embo J*, 16(23), 6914-25.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-7.
- Schattner, E. J., Elkon, K. B., Yoo, D. H., Tumang, J., Krammer, P. H., Crow, M. K., and Friedman, S. M. (1995). "CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway." *J Exp Med*, 182(5), 1557-1565.
- Schattner, E. J., Mascarenhas, J., Reyfman, I., Koshy, M., Woo, C., Friedman, S. M., and Crow, M. K. (1998). "Chronic lymphocytic leukemia B cells can express CD40 ligand and demonstrate T-cell type costimulatory capacity." *Blood*, 91(8), 2689-97.
- Sensi, M., and Parmiani, G. (1995). "Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor-specific immune responses." *Immunol Today*, 16(12), 588-95.
- Shen, H. M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X., and Storb, U. (1998). "Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes." *Science*, 280(5370), 1750-1752.
- Shin, M. S., Park, W. S., Kim, S. Y., Kim, H. S., Kang, S. J., Song, K. Y., Park, J. Y., Dong, S. M., Pi, J. H., Oh, R. R., Lee, J. Y., Yoo, N. J., and Lee, S. H. (1999). "Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma." *Am J Pathol*, 154(6), 1785-91.
- Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000). "Fas preassociation required for apoptosis

- signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations [see comments].” *Science*, 288(5475), 2354-7.
- Smith, C. A., Farrah, T., und Goodwin, R. G. (1994). “The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death.” *Cell*, 76(6), 959-62.
- Sneller, M. C., Wang, J., Dale, J. K., Strober, W., Middelton, L. A., Choi, Y., Fleisher, T. A., Lim, M. S., Jaffe, E. S., Puck, J. M., Lenardo, M. J., und Straus, S. E. (1997). “Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis.” *Blood*, 89(4), 1341-8.
- Strand, S., Hofmann, W. J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S. M., Stremmel, W., Krammer, P. H., und Galle, P. R. (1996). “Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? [see comments].” *Nat Med*, 2(12), 1361-6.
- Takahashi, A., Alnemri, E. S., Lazebnik, Y. A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. G., Kaufmann, S. H., und Earnshaw, W. C. (1996). “Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(16), 8395-400.
- Thiede, C., Alpen, B., Morgner, A., Schmidt, M., Ritter, M., Ehninger, G., Stolte, M., Bayerdorffer, E., und Neubauer, A. (1998). “Ongoing somatic mutations and clonal expansions after cure of Helicobacter pylori infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue B-cell lymphoma [published erratum appears in J Clin Oncol 1999 Mar;17(3):1092].” *J Clin Oncol*, 16(12), 3822-31.
- Thompson, C. B. (1995). “Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.” *Science*, 267(5203), 1456-62.
- Truman, J. P., Choqueux, C., Tschopp, J., Vedrenne, J., Le Deist, F., Charron, D., und Mooney, N. (1997). “HLA class II-mediated death is induced via Fas/Fas ligand interactions in human splenic B lymphocytes.” *Blood*, 89(6), 1996-2007.
- Vaishnav, A. K., Orlinick, J. R., Chu, J. L., Krammer, P. H., Chao, M. V., und Elkon, K. B. (1999). “The molecular basis for apoptotic defects in patients with CD95 (Fas/Apo-1) mutations [published erratum appears in J Clin Invest 1999 Apr;103(7):1099].” *J Clin Invest*, 103(3), 355-63.
- von Boehmer, H., und Rajewsky, K. (1997). “Lymphocyte development essential features [editorial].” *Curr Opin Immunol*, 9(2), 213-5.
- Wang, J., Lobito, A. A., Shen, F., Hornung, F., Winoto, A., und Lenardo, M. J. (2000). “Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP.” *Eur J Immunol*, 30(1), 155-63.

- Wang, Q., Stanley, J., Kudoh, S., Myles, J., Kolenko, V., Yi, T., Tubbs, R., Bukowski, R., und Finke, J. (1995). "T cells infiltrating non-Hodgkin's B cell lymphomas show altered tyrosine phosphorylation pattern even though T cell receptor/CD3-associated kinases are present." *J Immunol*, 155(3), 1382-92.
- Wang, R. F., und Rosenberg, S. A. (1999). "Human tumor antigens for cancer vaccine development." *Immunol Rev*, 170, 85-100.
- Williams, G. T. (1991). "Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis." *Cell*, 65(7), 1097-8.
- Wotherspoon, A. C., Doglioni, C., Diss, T. C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M., und Isaacson, P. G. (1993). "Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori* [see comments]." *Lancet*, 342(8871), 575-577.
- Wotherspoon, A. C., Pan, L. X., Diss, T. C., und Isaacson, P. G. (1992). "Cytogenetic study of B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue." *Cancer Genet Cytogenet*, 58(1), 35-38.
- Xerri, L., Devilard, E., Hassoun, J., Haddad, P., und Birg, F. (1997). "Malignant and reactive cells from human lymphomas frequently express Fas ligand but display a different sensitivity to Fas-mediated apoptosis." *Leukemia*, 11(11), 1868-1877.
- Xue, D., und Horvitz, H. R. (1997). "Caenorhabditis elegans CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor." *Nature*, 390(6657), 305-8.
- Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S., Rothman, P., Stall, A. M., Pandolfi, P. P., und Dalla Favera, R. (1997). "The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation." *Nat Genet*, 16(2), 161-170.
- Younes, A., Snell, V., Consoli, U., Clodi, K., Zhao, S., Palmer, J. L., Thomas, E. K., Armitage, R. J., und Andreeff, M. (1998). "Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia." *Br J Haematol*, 100(1), 135-41.
- Yufu, Y., Choi, I., Hirase, N., Tokoro, A., Noguchi, Y., Goto, T., Uike, N., und Kozuru, M. (1998). "Soluble Fas in the serum of patients with non-Hodgkin's lymphoma: higher concentrations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma." *Am J Hematol*, 58(4), 334-6.

VIII. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

3`:	downstream (Orientierung am DNA-Strang)
5`:	upstream (Orientierung am DNA-Strang)
7-AAD:	7-Amino-Actinomycin D
A:	Adenin
APS:	Ammoniumpersulfat
AS:	Aminosäure
ATP:	Adenosintri-phosphat
BCR:	B cell receptor
bp:	base pairs
°C:	Grad Celsius
C:	Cytosin
CD:	cluster of differentiation
cDNA:	copy DNA
CDR3:	complementary determining region 3
CTP:	Cytidintri-phosphat
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
DLBL:	diffuse large B cell lymphoma
dNTP:	desoxy-Nukleosidtri-phosphate
DTT :	Dithiotreitol
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EtBr:	Ethidiumbromid

FACS:	fluorescence activated cell sorting
FADD:	Fas-associated protein with death domain
Fas:	CD95, APO-1
FasL:	CD95L,
FCS:	fetales Kälberserum
FITC:	Fluorisothiocyanat
For:	forward (Orientierung eines PCR-Primers)
g:	Erdbeschleunigung ($g=9,81 \text{ m/s}^2$) oder Gramm
G:	Guanin
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3phosphat-dehydrogenase
GTP:	Guanosintriphosphat
IgD, IgM:	Immunglobulin D bzw. M
kD:	Kilodalton
MALT:	mucosa-associated lymphoid tissue
MFI:	mean fluorescence intensity
M-MLV:	murine Moloney leukemia virus
mRNA:	messenger RNA
NHL:	Non-Hodgkin-Lymphom
PAGE:	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
PARP:	Poly-ADP-Ribose Polymerase
PBS:	phospho-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PE:	Phycoerythrin
Rev:	reverse (Orientierung eines PCR-Primers)
RT-PCR:	reverse transcriptase polymerase chain reaction

SDS:	sodium dodecyl sulfate
sFas:	soluble Fas
T:	Thymin
Taq:	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE:	Tris-Borat-EDTA
TE:	Tris-EDTA
TEMED:	N,N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TCR:	T cell receptor
Tris:	Trishydroxyaminomethan
TTP:	Thymidintriphosphat
U:	unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV:	ultraviolett
X-Gal:	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Abkürzungen für Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin

N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Genetischer Code:

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

Lebenslauf

HARALD BRUNO GUSTAV SEEBERGER

21. August 1969 geboren in Marktredwitz
- 1976 - 1980 Grundschule Marktredwitz
- 1980 - 1989 Otto-Hahn-Gymnasium Marktredwitz
Abitur in den Fächern Biologie, Englisch, Erdkunde und
Deutsch
- 1989 - 1990 Grundwehrdienst in Nürnberg und Roding
- November 1990 Beginn des Studiums der Biologie (Universität Bayreuth)
- Oktober 1992 Diplomvorprüfung (Universität Bayreuth)
- Dezember 1994 Diplomhauptprüfung (Universität Bayreuth)
in den Fächern Botanik, Genetik und Biochemie
- Februar - Oktober 1995 Diplomarbeit am Lehrstuhl Pflanzensystematik der Uni-
versität Bayreuth. Thema: „Phylogenetische Strukturen
innerhalb der Flechtenalgen-Gattung *Trebouxia*: Sequenz-
analysen der ITS-Regionen und group-I Introns der kern-
codierten ribosomalen DNA“.
- September 1996 -
September 2000 Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Uni-
versität Würzburg. Bearbeitung des Themas „Frühe Ent-
wicklungsschritte in der Pathogenese der B-Zell-Lymphome
vom MALT-Typ“ am Pathologischen Institut der Universität
unter der Betreuung von Prof. Müller-Hermelink und Prof.
Buchner.

Würzburg, im Oktober 2000

Harald Seeberger

Publikationen

Haedicke W., Greiner A., **Seeberger H.**, Eck M., Müller-Hermelink H. K.: Selektive Expansion der T-Lymphozyten innerhalb niedrig-maligner B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 81, 349 (1997).

Greiner A., **Seeberger H.**, Knörr C., Starostik P., Müller-Hermelink H. K.: MALT-type B-cell lymphomas escape the censoring Fas-mediated apoptosis. *Blood* 92, 484a (abstr, suppl 1, 1998).

Knörr C., Amrehn C., **Seeberger H.**, Rosenwald A., Stilgenbauer S., Ott G., Müller-Hermelink H. K., Greiner A.: Expression of costimulatory molecules in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas in vivo. *Am. J. Pathol.* 155(6), 2019 (1999).

Greiner A., **Seeberger H.**, Knörr C., Müller-Hermelink H. K.: MALT-Typ B-Zell-Lymphome entkommen der Fas-vermittelten Apoptosekontrolle. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 83, 247 (1999).

Haedicke W., Greiner A., **Seeberger H.**, Müller-Hermelink H. K.: Oligoclonal expansions of T-cell repertoire in gastric mucosa-associated lymphoid tissue type B-cell lymphoma and adjacent gastritis. *Diagn. Mol. Pathol.* 8(3), 138 (1999).

Seeberger H., Knörr C., Müller-Hermelink H. K., Greiner A.: Impaired apoptosis in low-grade B cell lymphomas of MALT-type. *Dev. Immunol.* Accepted (1999).

Greiner A., Knörr C., **Seeberger H.**, Schultz A., Müller-Hermelink H. K.: Tumor biology of mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Recent Results Cancer Res.* 156, 19 (2000).

Seeberger H., Knörr C., Müller-Hermelink H. K., Greiner A.: Tumour-infiltrating T cells with similar antigen binding sites in different MALT-type B cell lymphomas. *Immunology.* In preparation (2000).

Seeberger H., Starostik P., Schwarz S., Knörr C., Kalla J., Ott G., Müller-Hermelink H. K., Greiner A.: Loss of Fas (CD95/APO-1) regulatory function is an important step in early MALT-type lymphoma development. *Lab. Invest.* Submitted (2000).

Seeberger H., Knörr C., Müller-Hermelink H. K., Greiner A.: Eine gestörte Fas (CD95, APO-1)-vermittelte Apoptose ist ein Progressionsfaktor in der frühen MALT-Typ Lymphomgenese. *Med. Klinik.* Submitted (2000).

POSTER

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

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

Seeberger H., Knörr C., Müller-Hermelink H. K., Greiner A.: Impaired Fas-mediated apoptosis in MALT-type B cell lymphoma. *13th International Conference on Lymphoid Tissues in Immune Reactions*, Geneva, August 1st-6th 1999.

Seeberger H., Knörr C., Müller-Hermelink H. K., Greiner A.: Gestörte Fas-vermittelte Apoptose ist ein Progressionsfaktor der frühen MALT-Typ Lymphomgenese. *Med. Klinik* 95, Abstract-Band I, 123 (2000).

ERKLÄRUNGEN

(gem. § 4, Abs. 3, S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung)

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass

1. die vorliegende Dissertation von mir selbstständig angefertigt wurde und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.
2. diese Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
3. ich bisher den akademischen Grad „Diplom-Biologe“ (Universität Bayreuth) besitze, ansonsten aber keinen weiteren akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg,

.....

Harald Seeberger

Ein herzliches Dankeschön.....

...an Herrn Prof. Müller-Hermelink, der meine Arbeit stets wohlwollend und mit Interesse begleitet hat, und der mit seiner Großzügigkeit das Pathologische Institut Würzburg als ein offenes und internationales Haus führt.

...an Herrn Prof. Buchner für seine Bereitschaft, das Koreferat für diese Arbeit zu übernehmen und an Herrn PD Dr. Pflugfelder, der gegen Ende meiner Arbeit Prof. Buchner vertreten hat.

...an Axel Greiner, der mich mit den MALT-Typ Lymphomen vertraut machte; der mit vielen guten Ideen und hilfreichen Diskussionen diese Arbeit begleitet und sich immer Zeit für meine Fragen genommen hat.

... an das Labor: Constanze Knörr (für ihre große Unterstützung in der täglichen Laborarbeit), Maria Reichert, Christa Amrehn, Simone Schindelmann, Cornelia Heitzig und Andrea Homburger.

... an alle Biologinnen für deren stete Hilfsbereitschaft: Annette Wilisch-Neumann, Anja Schultz, Viola Hoffacker, Steffi Gutsche und Nicole Schmut.

... an die Mitglieder der medizinischen Fakultät, zu denen immer ein gutes Einvernehmen bestand: Petr Starostik, Stefan Schwarz, Monika Weikert, Susanne Steindl, Andreas Zettl, Andreas Rosenwald, Henning Feist, Wolfgang Haedicke, Andreas Thalheimer, Phillip Ströbel, Mathias Eck, Eva Geißinger, Steffen Bergelt, Arne Twelmeier, Bernd Schmauß und Jin-Man Kim.

...an die hilfsbereiten Mitarbeiter aus dem Umfeld der Molekularen Pathologie: Prof. Serfling, Manfred Neumann, Frank Hensel, Ralph Hermann, Ralf Marienfeld, Andris Avots, Serge Tchouvpilo und Hossein Monir.

...an unseren Fotografen, Herrn Schmitt für seine bewundernswerte Gelassenheit.