

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Müller-Hermelink

Molekulare Analyse der humoralen Immunität beim Magenkarzinom

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stefan Reiß
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2007

Referent: Prof. Dr. Dr. H.-P. Vollmers

Korreferent: Prof. Dr. H. Girschick

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2008

Der Promovend ist Arzt

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Synthese, Aufbau und Funktion von Antikörpern	2
1.2.1 Entstehung und Funktion von Plasmazellen	2
1.2.1.1 Entstehung von Plasmazellen	2
1.2.1.2 Funktion von Plasmazellen	3
1.2.2 Aufbau spezifischer Antikörper	4
1.2.3 Mechanismen der Synthese von Antikörpern	5
1.2.4 Affinitätsreifung von Antikörpern	7
1.2.5 Funktion von Antikörpern	7
1.3 Das Magenkarzinom	8
1.3.1 Der Magen	8
1.3.2 Inzidenz und Risikofaktoren des Magenkarzinoms	8
1.3.3 Klassifikation des Magenkarzinoms	10
1.3.4 Therapie des Magenkarzinoms	11
1.4 Immunität und Tumorentstehung	12
1.5 Ziel der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Enzyme und Chemikalien	16
2.1.1.1 Enzyme	16
2.1.1.2 Chemikalien	16
2.1.1.3 Kits	16
2.1.1.4 Größenstandards	16
2.1.2 Lösungen, Puffer, Medien	16
2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide	18
2.1.4 Bakterienstämme	19
2.1.5 Ursprungsgewebe	19

2.1.6 Arbeitsmaterial und Hilfsmittel	19
2.1.7 Geräte	20
2.1.8 Hard- und Software	21
2.2 Methoden	21
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1.1 DNA-Isolierung aus gefrorenem Gewebe	21
2.2.1.2 V _H -Familien-PCR aus genomischer DNA	22
2.2.1.3 Prinzip der Optimierung einer PCR	23
2.2.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über ein Agarosegel	23
2.2.1.5 „Bluntenden“ von PCR-Fragmenten	23
2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.2.1.7 Herstellung kompetenter E. coli	24
2.2.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli	25
2.2.1.9 Flüssigkultur von Bakterienstämmen	25
2.2.1.10 Minipräparation von Plasmid-DNA aus E. coli	25
2.2.1.11 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	26
2.2.1.12 Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Gelelektrophorese .	26
2.2.1.13 Cyclesequencing von DNA	26
2.2.2 Färbemethoden	27
2.2.3 Auswertung der Daten	27
2.2.3.1 Sequenz- und Mutationsanalysen der V _H -Regionen	27
2.2.3.2 Methoden der Statistik	28
3 Ergebnisse	30
3.1 Charakterisierung des Ursprungsgewebes	30
3.2 Identifizierung der IgV _H -Klassen	30
3.3 Charakterisierung der IgV _H -Keimbahngene	32
3.4 Mutationsanalyse im Vergleich Antrum vs. Tumor	36
3.5 Mutationsanfälligkeit der ermittelten IgV _H -Keimbahngene	37
3.6 Nachweis von Antigenkontakt	39

3.7 Vergleich von Sequenzen desselben Keimbahngens aus unterschiedlichen Patienten	42
3.8 Einzelfallbetrachtungen einiger spezieller Sequenzen	45
3.8.1 Sequenzen ohne Auftreten von Austauschmutationen	45
3.8.2 Mutationen, die zu einer Abbruchsequenz führen	45
3.8.3 Deletionen	45
3.8.4 Insertionen.....	46
4 Diskussion	48
5 Zusammenfassung	55
6 Literaturverzeichnis	57

Abkürzungsverzeichnis

3'	downstream end
5'	upstream end
a	Jahr (lat.: annus)
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bidest	zweifach destilliert
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
C _H	konstante Region der schweren Immunglobulinkette
C _L	konstante Region der leichten Immunglobulinkette
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CDR	kodierende Region (engl.: coding region)
D	diversity segment
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonuclein acid)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphat
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
FR	Rahmenregion (engl.: framework region)
g	Gramm
G	Guanin
GET	Glukose-EDTA-Tris-Puffer
h	Stunde (lat.: hora)
H	schwere Kette eines Immunglobulins (engl.: heavy chain)
H. pylori / H. p.	Helicobacter pylori

Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure (Hydrogenchlorid)
HE	Hämatoxylin-Eosin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMGT	ImMuno Gene Tics
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
J	Verknüpfungssegment (engl.: joining segment)
J _H	J-Region der schweren Immunglobulinkette
k	Kilo (x 10 ³)
KCl	Kaliumchlorid
Kpn	Klebsiella pneumoniae
l	Liter
L	leichte Kette eines Immunglobulins (engl.: light chain)
L	Führungssegment (engl.: leader segment)
lat.	lateinisch
LB	Luria-Bertani
m	männlich
m	Milli (x 10 ⁻³)
m	Meter
M	Molar
ME	Mercaptoethanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure (engl.: ribonuclein acid)
Mut.	Mutation
μ	Mikro (x 10 ⁻⁶)
n	Nano (x 10 ⁻⁹)
N	Normal
NaOH	Natriumhydroxid

NCBI	National Center of Biotechnology Information
p	Wahrscheinlichkeit (engl.: probability)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
Pfu	Pyrococcus furiosus
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (lat.: potentia hydrogenii)
R	Austauschmutation (engl.: replacement mutation)
rATP	Riboadenosintriphosphat
RbCl	Rubidiumchlorid
Rf	immanente Mutationsanfälligkeit (engl.: replacement frequency)
RF	Reaktionsflüssigkeit
RG	Reaktionsgefäß
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonuclein acid)
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	stille Mutation (engl.: silent mutation)
Sac	Streptomyces achromogenes
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecylsulfate)
Seq.	Sequenz
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus
TdT	terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T ₃	3'-Ende der DNA (engl.: downstream end)
T ₅	5'-Ende der DNA (engl.: upstream end)
U	Einheit enzymatischer Aktivität (engl.: unit)
ü. N.	über Nacht

UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	variables Segment
V _H	variable Region der schweren Immunglobulinkette
V _L	variable Region der leichten Immunglobulinkette
vs.	gegenüber (lat.: versus)
w	weiblich
w/v	Gewicht pro Volumen (Gewichtsprozent; engl.: weight per volume)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: world health organisation)
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galctopyranosid

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes System, das sich in eine spezifische und eine unspezifische Abwehr unterteilen lässt [GOLDSBY et al., 2000]. Es ist in der Lage, in den Organismus eingedrungene Fremdkörper viraler, bakterieller oder anderer Herkunft ebenso wie entartetes körpereigenes Gewebe zu erkennen und zu eliminieren. Darüber hinaus verfügt es über ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis, das es ermöglicht, bei wiederholtem Kontakt mit einem bestimmten Fremdkörper bedeutend schneller und effektiver reagieren zu können. [SCHMIDT, THEWS, 1993]

Die erworbene, also nicht angeborene Abwehrleistung des menschlichen Organismus beruht im Wesentlichen auf den Funktionen der Zellen des lymphatischen Systems, der Lymphozyten. Sie entwickeln sich ab der Fetalzeit als unreife Lymphozytenvorläuferzellen aus pluripotenten Stammzellen in Leber und Knochenmark. Später wandern sie in die primären lymphatischen Organe Knochenmark und Thymus aus, wo sie sich vermehren, weiter entwickeln und ihre arttypischen Eigenschaften ausbilden. Diesen Prozess bezeichnet man als Lymphozytenprägung. Die so entstandenen Zellen wandern auf dem Blutweg zu den sekundären lymphatischen Organen, den Lymphknoten und der Milz, wo sie nach einem ersten Antigenkontakt weiter proliferieren und sich zu den eigentlichen Effektorzellen differenzieren [GOLDSBY et al., 2000].

Je nach Prägungsort der Lymphozyten unterscheidet man B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Nullzellen.

Die B-Zellen werden im Knochenmark (engl.: bone marrow) geprägt, machen ca. 15% der Lymphozyten aus und sind besonders für die humorale Immunantwort verantwortlich. Ihre Effektorzellen sind die Antikörper produzierenden Plasmazellen und die B-Gedächtnis-Zellen [SCHMIDT, THEWS, 1993]. Die Rolle der B-Lymphozyten bei der Immunabwehr sowie die Antikörperproduktion der B-Effektorzellen (Plasmazellen) sind von entscheidender Bedeutung für das Verständnis dieser Arbeit und sollen daher in Kapitel 1.2 ausführlicher behandelt werden.

Die T-Lymphozyten werden im Thymus geprägt, machen 70-80% der Lymphozyten aus und sind für die zelluläre Immunabwehr zuständig. Ihre Effektorzellen sind die T-Helferzellen, T-Suppressorzellen, T-Killerzellen und T-Gedächtniszellen.

Die Gruppe der Nullzellen umfasst ca. 10% der Lymphozyten, die sich aufgrund ihrer Oberflächenstruktur weder in die Reihe der B- noch der T-Lymphozyten einordnen lassen. Dazu zählen in die Blutbahn verirrte hämatopoetische Stammzellen sowie K-(Killer)-Zellen, welche antigenabhängig, jedoch antigenunspezifisch mit IgG beladene Zellen zerstören [SCHMIDT, THEWS, 1993].

Bei der unspezifischen Abwehr unterscheidet man ähnlich wie bei der spezifischen eine humorale von einer zellulären Abwehr. Das unspezifische humorale System umfasst dabei im Wesentlichen das Komplementsystem. Daneben spielen Lysozym, C-reaktives Protein für die Aktivierung des Komplementsystems und Interferone als antivirale Glykoproteine eine Rolle.

Die unspezifische zelluläre Abwehr umfasst die Fähigkeit einiger Leukozyten zur Phagozytose. Sie ist besonders ausgeprägt bei Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Diese Zellen sind in der Lage, mit Hilfe lysozymaler Enzyme phagozytiertes Material abzubauen. Sie sind jedoch auch an der spezifischen zellulären Abwehr als Antigen präsentierende Zellen beteiligt [GOLDSBY et al., 2000].

Es ist also offensichtlich, dass spezifische und unspezifische Abwehr funktionell nicht voneinander zu trennen sind, sondern sich gegenseitig beeinflussen und ergänzen [SCHMIDT, THEWS, 1993].

1.2 Synthese, Aufbau und Funktion von Antikörpern

1.2.1 Entstehung und Funktion von Plasmazellen

1.2.1.1 Entstehung von Plasmazellen

Die Entwicklung von Plasmazellen lässt sich in drei Stadien einteilen: Die Entstehung reifer B-Zellen, ihre Aktivierung durch Antigenkontakt sowie die anschließende Differenzierung zu den eigentlichen Effektorzellen.

Die Entstehung der B-Zellen aus ihren Vorläuferzellen ist einer der am besten untersuchten Vorgänge im menschlichen Organismus überhaupt [GOLDSBY et al., 2000]. Die B-Lymphozyten entwickeln sich aus Stammzellen über verschiedene Zwischenformen: frühe Pro-B-Zelle, späte Pro-B-Zelle, Prael-B-Zelle, unreife B-Zelle bis hin zur reifen B-Zelle. Die gesamte Differenzierung der unreifen B-Zelle spielt sich im Knochenmark ab. Im Rahmen dieser Differenzierung bildet jede B-Zelle ein spezifisches äußerst variables Oberflächen-Immunglobulin aus, das später die antigenspezifische Abwehrleistung möglich macht. Die Mechanismen der Immunglobulinsynthese werden in Kapitel 1.2.3 näher erläutert. Erst die Weiterentwicklung zur reifen B-Zelle sowie die Aktivierung und Enddifferenzierung des Lymphozyten gehen außerhalb des Knochenmarks antigenabhängig vor sich [JANEWAY et al., 2005]. Während der Reifung der B-Lymphozyten findet eine negative Selektion solcher Zellen statt, deren Oberflächenstrukturen in der Lage sind, an körpereigene Strukturen zu binden. Durch diesen Prozess wird im gesunden Organismus die Ausbildung von Autoimmunreaktionen weitestgehend verhindert [GOLDSBY et al., 2000].

Die reifen B-Zellen wandern auf dem Blutweg zu den peripheren lymphatischen Organen. Dort entwickeln sie sich nach Antigenkontakt über Lymphoblasten zu den Effektorzellen, B-Gedächtnis-Zellen und Plasmazellen, weiter [JANEWAY et al., 2005]. Während dieser Nachreifungsphase tragen verschiedene Mechanismen zu einer Verbesserung der Affinität zum präsentierten Antigen bei. Darauf wird in Kapitel 1.2.4 genauer eingegangen.

1.2.1.2 Funktion von Plasmazellen

Plasmazellen sind die Effektorzellen der B-Lymphozyten. Sie sind in der Lage, hochaffine spezifische Immunglobuline gegen antigene Determinanten zu produzieren und zu sezernieren. Die von Plasmazellen als Reaktion auf ein Antigen gebildeten und ausgeschiedenen Immunglobuline bezeichnet man auch als Antikörper [GOLDSBY et al., 2000].

1.2.2 Aufbau spezifischer Antikörper

Der gemeinsame Bauplan von Antikörpern umfasst vier Aminosäureketten, die durch Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind. Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen leichten (L-) Ketten mit einem Molekulargewicht von ca. 25 000 Dalton und zwei schweren (H-) Ketten mit einem Molekulargewicht von ca. 50 000 Dalton, wobei man sich das (H-L)₂-Dimer in der Form eines Y vorstellen kann.

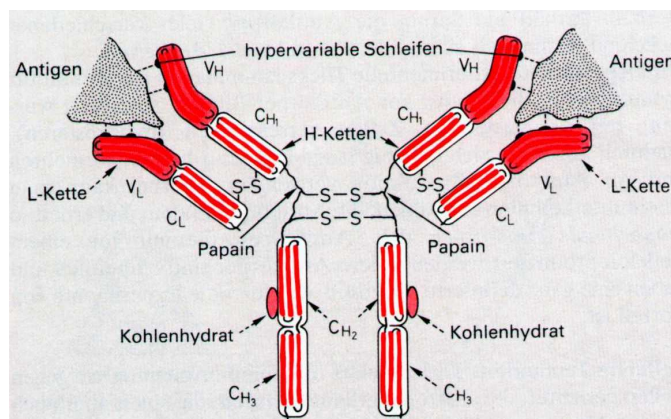


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Antikörpers; KARLSON et al., 1994

Die endständigen etwa 110 Aminosäuren jeder Kette variieren von Antikörper zu Antikörper deutlich. Man bezeichnet diese Abschnitte als variable Region (V_L in den Leichtketten und V_H in den schweren Ketten). An sie schließen sich sogenannte konstante Regionen (C_H und C_L) an. Innerhalb der variablen Regionen finden sich besonders inkonstante Abschnitte, sogenannte hypervariable Schleifen, die die Antigenbindungsstelle bilden und als Bindungsregionen, CDR1 bis 3 (engl.: complementarity determining region) bezeichnet werden. Die dazwischenliegenden Abschnitte innerhalb der variablen Region nennt man Rahmenregion, FR (engl.: framework region) [GOLDSBY et al., 2000].

VH						N	D	N	JH
L	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3			
						CDR3	FR4		

Abb. 2: Aufbau der variablen Region einer schweren Immunglobulinkette auf genomischer Ebene nach erfolgreichem VDJ-Rearrangement [nach KNÖRR, 2000];
L: leader region, **V_H**: variable region, **D**: diversity region, **J_H**: joining region,
N bezeichnet neu hinzugefügte Nukleotide, vgl. Kap. 1.2.3

Man unterscheidet fünf verschiedene Klassen von Antikörpern. Die Zugehörigkeit zu den Klassen M, G, D, A und E wird durch den Aufbau des konstanten Teils der leichten und schweren Immunglobulinkette bestimmt. Man unterscheidet zwei verschiedene C_L-Domänen und fünf C_H-Domänen. Dabei kann jede konstante Region mit jeder variablen Region kombiniert werden [SCHMIDT, THEWS, 1993].

Je nach Klassenzugehörigkeit haben die Antikörper unterschiedliche Eigenschaften und erfüllen verschiedene Funktionen in der Abwehr von Krankheitserregern [GOLDSBY et al., 2000]. Bei der primären Immunantwort spielen IgM-Antikörper die Hauptrolle [BOES, 2000].

1.2.3 Mechanismen der Synthese von Antikörpern

Die enorme Vielfalt des Antikörper-Reservoirs im menschlichen Organismus lässt sich durch eine größere Anzahl von Genabschnitten für die variablen und konstanten Regionen der Immunglobuline auf Chromosom 14 erklären [STEWART, SCHWARTZ, 1994]. Die Gene sind über einen großen Bereich der Keimbahn verteilt und werden kombinatorisch unterschiedlich zusammengesetzt. Diesen Vorgang bezeichnet man im englischen Sprachraum als rearrangement [COOK, TOMLINSON, 1995]. Das rearrangement ist eine Voraussetzung für die Expression von Immunglobulinen, das heißt, alle exprimierten Immunglobuline sind rearrangiert während dieselben Gene in nicht exprimierendem Gewebe in der Keimbahnkonfiguration vorliegen [JANEWAY et al., 2005].

Für die in dieser Arbeit untersuchten schweren Immunglobulinketten soll dieses rearrangement im folgenden erläutert werden.

Man unterscheidet im menschlichen Genom 51 V-Regionen (engl.: variable segments), 27 D-Regionen (engl.: diversity segments) und sechs J-Regionen (engl.: joining segments), von denen je eine zufällig zu einem VDJ-Komplex kombiniert werden [GOLDSBY et al., 2000]. Diskutiert wird sogar eine noch größere Anzahl von über 100 verschiedenen V-Regionen [STEWART, SCHWARTZ, 1994]. Das rearrangement verläuft in mehreren Schritten, die in Abb. 3 dargestellt sind.

Zuerst werden D- und J-Region zu einem DJ-Segment verknüpft. Anschließend folgt die Rekombination eines VDJ-Abschnittes. Die L-Region (engl.: leader segment) und die konstante Region der schweren Kette sind auf anderen Exons lokalisiert und werden während des Spleißens, also dem Entfernen der Introns, mit der variablen VDJ-Region zu einem gemeinsamen RNA-Transkript verbunden. Die Translation dieser RNA führt nach Entfernen der L-Region zur Bildung der fertigen schweren Immunglobulinkette [JANEWAY et al., 2005].

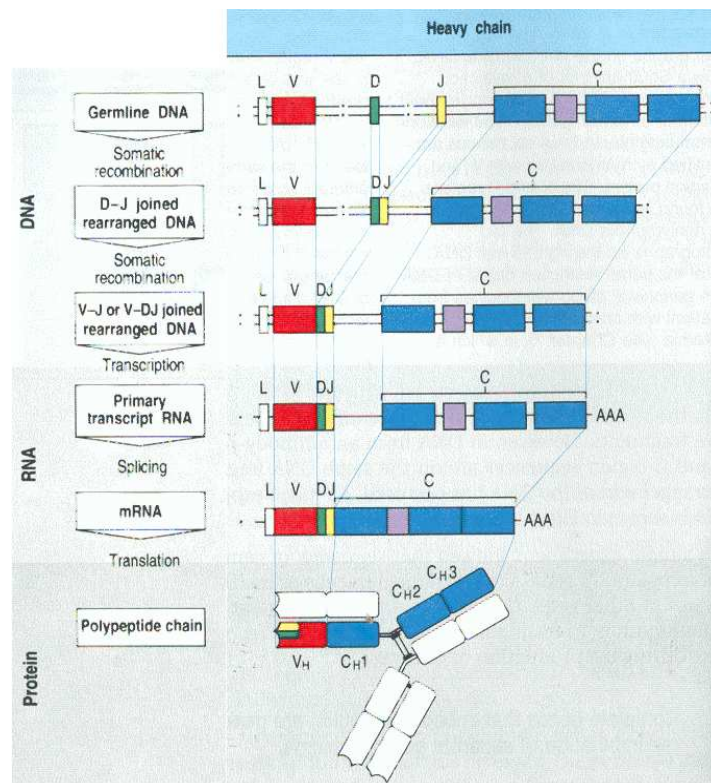


Abb. 3: Konstruktion der schweren Kette eines Immunglobulins;
germline DNA: DNA in Keimbahnkonfiguration
heavy chain: schwere Immunglobulinkette
 [aus JANEWAY et al., 2005]

Unter Berücksichtigung der fünf schweren Ketten ergibt sich eine kombinatorische Anzahl von $51 \cdot 27 \cdot 6 \cdot 5 = 41310$ Möglichkeiten für die Bildung eines Immunglobulins [GOLDSBY et al., 2000]. Die Variabilität der VDJ-Region wird jedoch noch durch weitere Faktoren erweitert. Zum einen ist die Verknüpfung der einzelnen Genloci unpräzise. Dies bezeichnet man als funktionale Flexibilität. Des Weiteren spielen P-Addition und N-Addition eine Rolle. Bei der P-Addition findet eine asymmetrische Haarnadelrestriktion durch

eine Endonuklease statt, was wiederum zu einer unscharfen Kombination führt [JANEWAY et al., 2005]. Bei der N-Addition werden durch das Enzym TdT noch einmal völlig variable Sequenzen zwischen die V-, D- und J-Regionen interponiert (vgl. Abb. 2) [BENEDICT et al., 2000]. Die N-Addition findet man ausschließlich in den schweren, nicht aber in den leichten Immunglobulinketten [JANEWAY et al., 2005].

Die Verknüpfungsstelle von V- und J-Segment befindet sich im Bereich der CDR3 der Immunglobulinkette (vgl. Abb. 2). Diese Region ist aufgrund der funktionalen Flexibilität sowie der N-Addition besonders variabel aufgebaut [TOMLINSON et al., 1992]. Sie ist jedoch für die Affinität eines Antikörpers von untergeordneter Bedeutung [CLEMENS et al., 1998].

1.2.4 Affinitätsreifung von Antikörpern

Nachdem die Antikörper erstmals mit Antigen in Kontakt getreten sind, findet eine sogenannte Nachreifungsphase statt, in der die Affinität der Antikörper optimiert wird. Man bezeichnet diesen Vorgang als somatische Hypermutation [WAGNER, NEUBERGER, 1996]. Während dieser Phase finden vor allem Punktmutationen innerhalb der gesamten variablen Regionen statt, also innerhalb der Regionen CDR1 und CDR2 sowie der angrenzenden Rahmenregionen, nicht aber im Bereich der konstanten Regionen [JANEWAY et al., 2005]. Die genauen Mechanismen, wie Mutationen in die exprimierten Immunglobulinketten eingeführt werden, sind unbekannt [JACOBS, BROSS, 2001]. Die Verteilung der auftretenden Mutationen ist bei diesem Prozess allerdings nicht zufällig, sondern bevorzugt spezielle Nukleotide und Mutationsmuster [WAGNER et al., 1995; JOLLY et al., 1996; DÖRNER et al., 1997]. Die somatische Hypermutation ist der Hauptfaktor für die enorme Vielfalt des menschlichen Antikörperrepertoires [JANEWAY et al., 2005].

1.2.5 Funktion von Antikörpern

Antikörper spielen als humorale Faktoren der spezifischen Immunität eine tragende Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern und anderer Antigene [SCHMIDT, THEWS, 1993].

1.3 Das Magenkarzinom

1.3.1 Der Magen

Der Magen lässt sich von proximal nach distal in Fundus, Korpus und Antrum unterteilen. Der Eingangsbereich wird als Kardja, der Ausgangsbereich als Pylorus bezeichnet (vgl. Abb. 4). Als Hauptfunktionen des Magens sind Aufnahme, Speicherung, Durchmischung, Verdauung und portionsweise Entleerung des Chymus zu nennen. Zur Aufrechterhaltung dieser Aufgaben dienen eine ausgeprägte Peristaltik sowie die Sekretion von Salzsäure und Pepsin in Fundus und Korpus und die Schleimproduktion in der Kardja- und Pylorusregion [BERCHTOLD et al., 1999]. Die Magenschleimhaut wird somit bereits durch das physiologische Magenmilieu, darüber hinaus aber auch durch Nahrungsbestandteile, aufgenommene Mikroorganismen und Toxine besonders beansprucht, was zu zahlreichen Erkrankungen bis hin zum Magenkarzinom führen kann.

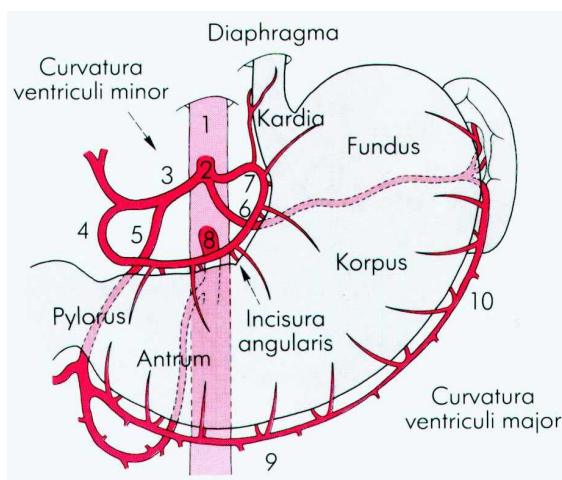


Abb. 4: Anatomie des Magens. Die Ziffern 1-10 bezeichnen die versorgenden Gefäße [BERCHTOLD et al., 1999].

1.3.2 Inzidenz und Risikofaktoren des Magenkarzinoms

Die Inzidenz des Magenkarzinoms hat in den letzten Jahrzehnten weltweit abgenommen. Die Gründe dafür sind weitgehend unbekannt, zumal ein Rückgang schon vor der Entdeckung von *H. pylori* als ätiologischem Faktor zu

beobachten war. Allerdings ist festzustellen, dass Tumoren vom diffusen Typ nach Laurén (vgl. Kap. 1.3.3) eine deutliche Zunahme zu verzeichnen haben. Ebenso ist eine Veränderung der bevorzugten anatomischen Lokalisation zugunsten des Kardiakarzinoms zu verzeichnen. Diese proximal gelegenen Tumoren stehen nicht in Zusammenhang mit schwerer Gastritis, Schleimhautatrophie oder intestinaler Metaplasie, verlaufen aber aggressiver als distal entstandene Magenkarzinome [CHAN et al., 2001].

Die Inzidenz des Magenkarzinoms variiert zwischen verschiedenen geographischen Regionen. Besonders hohe Raten findet man in Japan, Korea und China, in Teilen Europas, wie z. B. Irland sowie in Chile und Kolumbien. Außerdem lässt sich eine steigende Inzidenzrate mit zunehmendem Längengrad sowohl auf der Nord- als auch der Südhalbkugel erkennen [CHAN et al., 2001]. Ein ähnliches geographisches Verteilungsmuster zeigt sich auch bei der chronisch-atrophischen Gastritis, die als Präkanzerose gilt [WECK, BRENNER, 2006].

Das Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken, ist neben dem sozioökonomischen Status [CHAN et al., 2001] auch vom Geschlecht - Männer erkranken häufiger als Frauen - abhängig. Benigne Magenpolypen gehen mit einer erhöhten Inzidenz von Magenkarzinomen einher [GALLO, CHA, 2006].

Die chronische Gastritis infolge einer Infektion mit *H. pylori* steht als definitive Präkanzerose fest, eine Ausnahme stellen die Kardialkarzinome dar [MACHIDA-MONTANI et al., 2004; MURAKAMI et al., 2006]. Die chronische Gastritis stellt jedoch auch ohne *H. pylori* einen unabhängigen Risikofaktor dar [POTTER, ULRICH, 2006]. Zudem scheint einer EBV-Infektion eine prokarzinogene Bedeutung zuzukommen [TAKADA, 2000; LO et al., 2001].

Zusammenhänge zwischen Ernährungsgewohnheiten und Karzinominzidenz sind nachgewiesen. So fassen BARTSCH et al. 1989 die Bedeutung von N-Nitroso-Verbindungen für die Entstehung von Magenkarzinomen zusammen. Als bewiesen gilt auch der Zusammenhang von Magenkarzinom und Konsum von Rind- und Lammfleisch [CHEN et al., 2002] sowie Salz und gepökelten Speisen [RIBOLI, NORAT, 2001]. Darüber hinaus wurden als Tumor begünstigende Faktoren tierische Eiweiße, Cholesterin und Vitamin B12, als

protektive Faktoren Ballaststoffe, Betakarotin, Folsäure und Vitamin C nachgewiesen [MAYNE et al., 2001].

Erwiesene Tumor begünstigende Faktoren sind auch chemische Karzinogene wie Alkohol und Zigarettenrauch [GALLO, CHA, 2006].

Trotz stetig abnehmender Inzidenzrate steht das Magenkarzinom noch immer auf Rang zwei der Tumor bedingten Sterblichkeit [CHAN et al., 2001]. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt gemittelt über alle Tumorstadien bei 15-35% [LIM et al., 2005].

In ca. 10% der Fälle ist die Entstehung eines Magenkarzinoms multizentrisch.

1.3.3 Klassifikation des Magenkarzinoms

Beim Magenkarzinom handelt es sich um ein epitheliales Malignom, das von der WHO nach histologischen Kriterien in Adenokarzinom, adenomuzinöses Karzinom, Plattenepithelkarzinom, undifferenziertes und nichtklassifizierbares Karzinom eingeteilt wird [CLASSEN et al., 1998]. Für die klinische Stadieneinteilung ist das TNM-System von herausragender Bedeutung.

Tab. 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms [nach CLASSEN et al., 1998]

T	Primärtumor
T1	Tumor auf Mukosa bzw. Submukosa beschränkt
T2	Tumor bis Serosa reichend
T3	Tumor durchbricht Serosa, Nachbarorgane frei
T4	Tumorbefall auch der Nachbarorgane
N	Regionale Lymphknoten
N0	regionale Lymphknoten frei
N1	regionaler Lymphknotenbefall; weniger als 3 cm vom Tumorrand entfernt
N2	regionaler Lymphknotenbefall; mehr als 3 cm vom Tumorrand entfernt
N3	disseminierter intraabdominaler Lymphknotenbefall
M	Fernmetastasen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen gesichert
Mx	Fernmetastasen möglich, aber nicht gesichert

Von prognostischer Bedeutung ist die histologische Einteilung des Magenkarzinoms nach Laurén in intestinalen und diffusen Typ. Tabelle 2 zeigt die modifizierte Laurén-Klassifikation.

Tab. 2: modifizierte Laurén-Klassifikation des Magenkarzinoms [nach CLASSEN et al., 1998]

Typ	Kennzeichen	bevorzugte Lokalisation
intestinal	höher differenzierte Karzinomzellen, kohärent, bilden Tubuli (tubulärer Typ)	Antrum- und Kardiabereich
diffus	gering differenzierte Karzinomzellen, diffus verstreut	Korpus
siegelringzellig	intrazelluläre Muzinvakuolen (muzinöser Typ)	
anaplastisch	schmale Zytoplasmasäume ohne Differenzierung	
Mischtyp	heterogenes Bild	-

Von geringerer Bedeutung sind die an das TNM-System angelehnte Stadieneinteilung nach UICC, die morphologische Einteilung nach Borrmann Typ I-IV, die Klassifikation nach dem Wachstumsverhalten nach Ming sowie die histogenetische Differenzierung [CLASSEN et al., 1998].

Darüber hinaus wird bei einer histopathologischen Untersuchung eine Tumorgraduierung durchgeführt. Wichtige Kriterien für die Einteilung sind Kernatypien, Mitosen und Differenzierungsgrad des Tumors, also Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe [BÖCKER et al., 1997]. Die Graduierung reicht von G1 (gut differenziert) bis G3 (undifferenziert).

1.3.4 Therapie des Magenkarzinoms

Die kurative Therapie des Magenkarzinoms ist nur durch operative Maßnahmen wie Magenresektion oder Gastrektomie unter Mitnahme der regionalen Lymphknoten und umliegenden Gewebes zu erreichen. Je nach Tumortyp und Ausdehnung wird bei der Resektion ein Sicherheitsabstand von 3,5 bis 7 cm eingehalten. Beim diffusen Typ nach Laurén besteht immer die Indikation zur Gastrektomie, wenn der Allgemeinzustand des Patienten dies zulässt. Durch operative Therapie kann die Fünfjahresüberlebensrate je nach Tumorstadium auf bis zu 100% beim Frühkarzinom und auf immerhin 10-15% beim fortgeschrittenen Karzinom gesteigert werden [BERCHTOLD et al., 1999].

Mit fortgeschrittenem Tumorstadium spielt jedoch die Mikrometastasierung eine zunehmende Rolle, welche eine kurative Resektion nicht mehr ermöglicht. Durch adjuvante Therapieverfahren der Radio- und Chemotherapie konnte in Therapiestudien eine Prognosebesserung erreicht werden [LIM et al., 2005].

1.4 Immunität und Tumorentstehung

Bereits vor fast 100 Jahren, 1909, als das menschliche Immunsystem noch kaum erforscht war, postulierte Paul Ehrlich die körpereigene Erkennung und Eliminierung von Tumoren [EHRlich, 1909]. Über 60 Jahre später erhielt diese Hypothese im englischen Sprachraum den Namen „cancer immunosurveillance“, also eine Wachfunktion des Immunsystems gegen das Auftreten von Krebs [BURNET, 1970]. Es gilt inzwischen als gesichert, dass neben nicht-immunologischen Mechanismen zur Verhinderung von Tumoren [JAKÓBISIÁK et al., 2003] eine solche Funktion des Immunsystems existiert [SOLOSKI, 2001; NAGORSEN et al., 2003], und dass Frühstadien von Tumoren Strategien entwickeln, sich dem Angriff des Immunsystems zu entziehen, also vor der Immunantwort zu „flüchten“ (engl.: tumor-escape) [KHONG, RESTIFO, 2002; PIEMONTE et al., 2003; MAPARA, SYKES, 2004]. Neben physikalischen Tumoreigenschaften wie Fibrosierung oder Schleimbildung [JANEWAY et al., 2005] existieren zahlreiche immunologische Escape-Mechanismen [ADAM et al., 2003]. Es existieren auch Studien, die verschiedene solcher Mechanismen speziell für Magenkarzinome beschreiben [KOYAMA et al., 1998; SAITO et al., 1999; ZHENG et al., 2003; NAKAMURA et al., 2004; MAJIMA et al., 2005].

Als Resultat weitreichender Interaktionen zwischen diesen beiden Prozessen - Immunabwehr und Tumor-Escape - kommt es im Frühstadium der Tumorentstehung schließlich entweder zur Elimination durch das Immunsystem, einem Gleichgewicht von Tumorwachstum und Abwehrmechanismen (Equilibrium) oder einem manifesten Tumorprozess (Tumor-Escape), der resistent gegen die Wirkung des Immunsystems fortschreitet [DUNN et al., 2004a]. Dabei beeinflusst das Immunsystem den Tumor in seinem Wachstumsverhalten, was man englisch als immunoediting (auf deutsch etwa Immunprägung) bezeichnet [DUNN et al., 2002 und 2004b; SMYTH et al., 2006].

Diese Beeinflussung des Tumors kann sich unter Umständen sogar begünstigend auf dessen Wachstumsverhalten auswirken [PAWELEC, 2004]. Im Gegensatz zum zellulären Arm der „cancer immunosurveillance“ ist der humorale Teil bisher nur von wenigen Arbeitsgruppen untersucht worden. Dennoch gibt es aussagekräftige Daten über primäre humorale Aktivität gegen die Entstehung von Tumoren [KODA et al., 1998; BOHN, 1999; VOLLMERS, BRÄNDLEIN, 2002, 2005 und 2006; BRÄNDLEIN et al., 2003a; TOUBI, SHOENFELD, 2007]. Grundlegender Mechanismus dieser angeborenen Immunabwehr ist das Erkennen von veränderten Epitopen, also veränderten phänotypischen Eigenschaften einer Zelle, beispielsweise im Glykolysierungsmuster bestimmter Oberflächenproteine [GIRARDIN, PHILPOTT, 2004]. Auch maligne Transformationen einer Zelle haben neben veränderten Wachstums- und Regulationseigenschaften typischerweise eine Veränderung des Epitopmusters durch Expression neuer, tumorspezifischer Oberflächenstrukturen zur Folge [TURNER, 1992; EGEA et al., 1993; HANISCH et al., 1996; LIAKATOS, KUNZ, 2007]. Diese für das angeborene Immunsystem unbekannt, sich von körpereigenen Strukturen unterscheidenden Epitope dienen als Zielstruktur des in der Einleitung dargestellten komplexen Abwehrsystems aus zellulären und humoralen Mechanismen. Eine entscheidende Bedeutung kommt dabei den zeitlebens von jedem Individuum produzierten körpereigenen Antikörpern zu. Die Analyse der Spezifität dieser Antikörper bezüglich eines bestimmten Antigens, beispielsweise bestimmter Epitope auf der Oberfläche von Tumorzellen, ist durch die humane Hybridom Technologie möglich geworden [SINKOVICS, DREESMAN, 1983; WINTER, MILSTEIN, 1991]. Dabei werden durch Verschmelzen (Hybridisierung) eines B-Lymphozyten und einer immortalisierten Heteromyelomzelle Zellklone geschaffen, welche sich wie Myelomzellen rasch vermehren und dabei monoklonale humane Antikörper produzieren [SEVIER et al, 1981]. Mit Hilfe dieser Technologie konnte in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Antikörpern mit tumorspezifischer Aktivität [BRÄNDLEIN, VOLLMERS, 2004a] und Aktivität gegen Tumorstufen [BRÄNDLEIN et al., 2003b; BRÄNDLEIN et al., 2004b] isoliert und charakterisiert werden. Interessanterweise gelang deren Nachweis jedoch nicht nur bei Patienten mit manifesten

Tumorerkrankungen, sondern auch bei gesunden Individuen als Bestandteil der angeborenen Immunität [BOHN, 1999; BRÄNDLEIN et al., 2003a]. Diesen Antikörpern sind entscheidende Merkmale gemeinsam. Es handelt sich um Antikörper vom IgM-Isotyp, die in der Regel keimbahnkodiert oder nur gering mutiert vorliegen und bestimmten IgV_H-Genfamilien angehören. Sie binden an posttranskriptionell modifizierte Carbohydrate, die ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert werden, also tumorspezifisch sind, und induzieren eine direkte Apoptose der jeweiligen Tumorzelle [TOUBI, SHOENFELD, 2007].

Der am besten untersuchte derartige tumorspezifische Antikörper SC-1 wurde 1989 aus Milzlymphozyten eines an Magenkarzinom erkrankten Patienten durch Fusion mit dem Heteromyelom SPM4-0 etabliert [VOLLMERS, O'CONNOR, 1989]. Seine Bindungsstelle liegt an einem Zuckerrest im oberen Bereich von CD55, einem tumorspezifischem Epitop, welches nicht nur auf Zellen des Primärtumors, sondern auch auf Metastasen und disseminierten Tumorzellen exprimiert wird. In vitro und in vivo löst SC-1 eine Apoptose von Tumorzellen und eine Reduktion disseminierter Tumorzellen aus [VOLLMERS et al., 1998a und 1998b; HENSEL et al., 1999a und 2001, ILLERT et al., 2005]. Seine potentielle therapeutische Wirksamkeit wurde in einem ersten klinischen Heilversuch nachgewiesen [VOLLMERS et al., 2000].

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit werden die variablen Schwereketten Gene von Immunglobulinsequenzen (IgV_H) aus Tumorgewebe infiltrierenden B-Lymphozyten von acht Patienten mit manifestem Magenkarzinom analysiert und mit solchen aus tumorfreiem Antrumgewebe derselben Patienten als Referenzgewebe verglichen. Der Focus dieser Arbeit liegt somit auf der Analyse der immunologischen Situation vor Ort (in situ), also innerhalb des gesunden sowie des maligne erkrankten Organgewebes, in diesem Fall der Magenschleimhaut. Aus Magenresektaten von karzinomerkrankten Patienten können mittels DNA-Isolierung Immunglobuline gewebeständiger Plasmazellen gewonnen und deren variable Schwerekettenfragmente mittels PCR amplifiziert werden. Dabei ist nicht nur eine Zuordnung zu den bekannten, in Datenbanken verfügbaren

Keimbahngenen möglich, sondern darüber hinaus eine exakte Analyse der Mutationen in den entsprechenden in situ nachgewiesenen Immunglobulinen. In Kenntnis einer im Organismus vorhandenen humoralen Aktivität gegen die Entstehung von Tumoren (vgl. 1.4) sind diesbezüglich Unterschiede im Vergleich von Tumorgewebe und tumorfreiem Referenzgewebe möglich, deren Auswertung zum Verständnis der Interaktionen von humoraler Aktivität des Immunsystems und Tumorentstehung beitragen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme und Chemikalien

2.1.1.1 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Eppendorf (Hamburg), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Stratagene (Amsterdam) bezogen.

2.1.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen geliefert: Applied BioSystems (Weiterstadt), Boehringer (Mannheim), GIBCO BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth GmbH (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen).

2.1.1.3 Kits

Folgende Fertigkits wurden verwendet:

DNeasy™ Tissue Kit der Firma Quiagen (Hilden)

Jetsorb Gel Extraction Kit der Firma Genomed (Bad Oeynhausen)

PCR-Script™ Amp Cloning Kit der Firma Stratagene (Amsterdam)

2.1.1.4 Größenstandards

Als Größenstandards für DNA-Agarosegele wurden eine 100 bp Leiter sowie eine 1 kbp Leiter Gene Ruler™ der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

2.1.2 Lösungen, Puffer, Medien

TAE-Laufpuffer	10 ml 50x TAE
	70 µl Ethidiumbromid
	ad 500 ml H ₂ O bidest

50x TAE	121 g Trisbase 28,55 ml Eisessig 50 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 500 ml H ₂ O bidest
TE	1 ml 1 M Tris/HCl pH 7,5 200 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 100 ml H ₂ O bidest pH 7,5 bzw. 8,0
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,5
LB-Agar	LB-Medium 1,2% Agar
LB _{Amp} -Medium	LB-Medium 100 µg/ml Ampizillin
SOB-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 10 ml/l 250 mM KCl ad 1 l H ₂ O bidest pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen; autoklavieren 5 ml steriles 2 M MgCl ₂
SOB-Agar	SOB-Medium 1,2% Agar
SOC-Medium	100 ml SOB-Medium 1 ml sterile 20% Glukose 1 ml sterile 20% Maltose
IPTG	2 g IPTG in 8 ml H ₂ O bidest
X-gal	1 mg X-gal in 50 µg Dimethylformamid
Ethidiumbromid	40 mg/ml in H ₂ O bidest
Ampizillin	50 mg/ml in H ₂ O bidest

Lösungen zur Herstellung kompetenter E. coli

RF1	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ x 4 H ₂ O 30 mM K-Azetat 10 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O 15% (w/v) Glycerol pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen; sterilfiltrieren
RF2	10 mM RbCl 10 mM MOPS 10 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O 15% (w/v) Glycerol pH 6,8 mit 0,2 M NaOH einstellen; sterilfiltrieren

Lösungen für Miniplasmidisolierung

GET	50 mM Glukose 10 mM EDTA pH 8,0 25 mM Tris pH 8,0
Lysispuffer	0,2 M NaOH 10% SDS
	3 M K-Azetat pH 4,8

2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide

Für die Klonierung wurde der Vektor pPCR-Script Amp SK(+) von Stratagene (Amsterdam) verwendet. Der Vektor trägt eine Ampizillin-Resistenz und hat eine Größe von 2961 bp.

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt und bezogen. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide [aus KÜPPERS et al., 1993]

	Sequenz
V _H 1a	5' – CCA TGG ACT GGA CCT GGA – 3'
V _H 2a	5' – ATG GAC ATA CTT TGT TCC AC – 3'
V _H 3a	5' – CCA TGG AGT TTG GGC TGA GC – 3'
V _H 4a	5' – ATG AAA CAC CTG TGG TTC TT – 3'
V _H 5a	5' – ATG GGG TCA ACC GCC ATC CT – 3'
V _H 6a	5' – ATG TCT GTC TCC TTC CTG AT – 3'
V _H 1b	5' – CCT CAG TGA AGT TTC CTG CAA GGC – 3'
V _H 2b	5' – GTC CTG CGC TGG TGA AAA CCA CAC – 3'
V _H 3b	5' – GGG GTC CCT GAG CTC CTG TGC AG – 3'
V _H 4b	5' – GAC CCT GTC CCT CAC CTG CCC TGT – 3'
V _H 5b	5' – AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AGG A – 3'
V _H 6b	5' – ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G – 3'
J _H a	5' – GGT GAC CAG GGT CCC TTG GCC CCA G – 3'
J _H b	5' – GGT GAC CGT GGT CCC TTG CCC CCA G – 3'

2.1.4 Bakterienstämme

Für die Herstellung kompetenter E. coli wurde eine Glycerinkultur des E. coli-Stammes DH5α verwendet.

2.1.5 Ursprungsgewebe

Als Ursprungsgewebe dienten paraffin-gebettete Gewebelöcke von tumorfreiem Magengewebe des Antrums (im folgenden kurz Antrumgewebe) und Tumorgewebe der in Tabelle 4 genannten Patienten. Alter und Geschlecht der Patienten sowie das Tumorstadium stellten keine Auswahlkriterien dar.

2.1.6 Arbeitsmaterial und Hilfsmittel

Die Pipetten wurden von der Firma Eppendorf (Hamburg) geliefert.

Alle verwendeten Plastikmaterialien wurden über die Firmen Hartenstein (Würzburg) und Greiner Labortechnik (Frickhausen) bezogen.

Tab. 4: Patientengut für Ursprungsgewebe

SR: Siegelringzelliges (muzinöses) Karzinom

H.p.: -: Infektion ausgeschlossen, 0: kein H.p.-Nachweis, +: H.p. nachgewiesen

Gastritis: 0: nicht beschrieben, +: beschrieben

Fall	interne Fall-Nr.	Sex	Alter (a)	H.p.	Gas tritis	Tumor-Typ	Tumor-Lokalisation	Stadium (TNM)	Grad
#1	15055/97	w	73	0	+	diffus-SR	Kardia	T2N2M1	G3
#2	17698/98	w	87	-	+	diffus-SR	Antrum	T3N2Mx	G3
#3	22452/96	m	60	+	+	diffus-SR	Antrum	T4N2M1	G3
#4	23051/96	m	75	+	+	diffus	Kardia	T2N2Mx	G3
#5	23592/96	m	88	0	0	intestinal	Korpus	T3N0M1	G2
#6	27253/98	w	78	-	+	diffus-SR	Antrum	T2N0M0	G3
#7	9531/97	m	69	0	0	diffus-SR	Korpus-Antrum	T3N2M1	G3
#8	Mais/96	m	76	0	+	intestinal	Kardia	T2N2Mx	G3

2.1.7 Geräte

Für die Arbeit wurden die Geräte der folgenden Firmen verwendet:

Aquabidest-Anlage Milli-Q Plus PF	Millipore (Eschborn)
Brutschränke	Heraeus Thermotech (Hanau)
Sterilbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus (Hanau)
Kryostat 2800 Frigocut N	Reichert-Jung (jetzt Leica, Wetzlar)
Minizentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckmann (München)
Wasserbad Minitherm 2	Dinkelberg Labortechnik (Neu-Ulm)
Vortex Mixer	NeoLab (Heidelberg)
Gelelektrophoreseapparatur	Biometra (Göttingen)
Power Supply GPS	Pharmacia (Freiburg)
Videoauswerteeinheit	MWG Biotech (Ebersberg)
UV-Schirm UVT 20 M/W	Herolab (Wiesloch)
PCR-Maschine Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
DNA-Sequencer	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Spektrometer	Kontron
Mikroskop DMIB	Leica (Wetzlar)

2.1.8 Hard- und Software

Die Auswertung der Daten erfolgte an einem Bildschirmarbeitsplatz der Firma Compaq Presario.

Zur Analyse von DNA- und Aminossequenzen wurde das Programm DNAMAN 4.1 von Lynnon Biosoft verwendet. Homologievergleiche wurden mittels der Internetdatenbanken NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) und IMGT-Database (http://www.dnplot.de/input/human_v.html) durchgeführt. Die V_H-Keimbahn-Sequenzen wurden von IMGT-Database (http://imgt.cnusc.fr:8104/textes/IMGTrepertoire/1/tabgenes/human/IGH/IGHC/Hu_IGHC.html) verwendet.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Tabellenkalkulation MS Excel 7.0, die Textverarbeitung mit MS Word 9.0.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Isolierung aus gefrorenem Gewebe

Am Kryostaten wurden jeweils 10 bis 15 Schnitte zu je 8 µm von vorhandenen Paraffin-Gewebeblöcken in ein auf -20° C gekühltes 1,5 ml-RG überführt und verdaut. Der Gewebeverdau erfolgte mit dem Quiagen DNeasy™ Tissue Kit. Das Gewebe wurde in 180 µl ATL Puffer mit 20 µl Proteinase K ü. N. bei 55° C verdaut. Nach gründlicher Durchmischung wurden 200 µl AL Puffer hinzugegeben und für 10 min bei 70° C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl 96% Ethanol und gründliche Durchmischung. Die Lösung wurde auf eine DNeasy-Minisäule gegeben und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Minisäule wurde nun auf ein neues 2 ml-RG gesetzt, mit 500 µl AW1 Puffer geladen und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Umsetzen der Minisäule auf ein neues 2 ml-RG wurden 500 µl AW2 Puffer hinzugegeben und für 3 min bei 11000 rpm zentrifugiert, um die DNeasy-Membran zu trocknen. Die Minisäule wurde nun auf ein steriles 1,5 ml-RG gesetzt, mit 100 µl AE Puffer geladen und für 1 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte für 1 min die Zentrifugation bei 8000 rpm. Das Eluat wurde zuletzt noch einmal auf die

Minisäule gegeben, erneut für 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und bei 4° C eingelagert.

2.2.1.2 V_H -Familien-PCR aus genomischer DNA

Zur Amplifikation der V_H -Gene der schweren Immunglobulinketten wurde eine Nested PCR mit V_H -spezifischen Primern [MARKS et al, 1991] durchgeführt:

I. Runde:

8 µl	genomische DNA
5 µl	10x PCR Reaktionspuffer
3 µl	25 mM MgCl ₂
8 µl	dNTP je 200 µM
0,2 µl	Taq Polymerase (5 U/µl)
0,8 µl	1,5 µM J _H a Primer
0,8 µl	$V_H(1-6)a$ Primer-Mix
24,2 µl	H ₂ O bidest

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

94° C 1 min
(94° C 40 s; 65° C 40 s; 72° C 110 s) 5x
(94° C 40 s; 60° C 40 s; 72° C 110 s) 5x
(94° C 40 s; 55° C 40 s; 72° C 110 s) 25x
72° C 10 min
4° C ∞

II. Runde:

Abweichend von Runde I wurden 0,8 µl J_Hb Primer sowie 0,8 µl $V_H(1-6)b$ Primer-Mix verwendet. Statt 8 µl genomischer DNA dienten 8 µl Produkt der I. Runde als Ausgangsmaterial. Die PCR wurde nach demselben Programm durchgeführt wie in Runde I.

Das PCR-Produkt wurde in einem 2%-Agarosegel mit einem Größenstandard verglichen.

2.2.1.3 Prinzip der Optimierung einer PCR

Da die Konzentration der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte in der genomischen DNA sehr gering war, mussten die Reaktionsbedingungen intensiv optimiert werden. Der Reaktionsansatz wurde, wie in 2.2.1.2 beschrieben, zusammenpipettiert und die MgCl₂-Konzentration von 0,5 mM bis 2,5 mM in 0,5-er Schritten ausgetestet. Die Annealingtemperatur wurde in einer PCR-Maschine mit Temperaturgradient in 1° C-Schritten so variiert, dass ein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht wurde.

2.2.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über ein Agarosegel

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem 2%-Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-RG überführt. Mittels des Jetsorb Kits der Firma Genomed (Bad Oeynhausen) wurde die DNA aus dem Gel extrahiert. Zu dem Gelstück wurden 1 ml A1 Puffer und 33 µl Jetsorb Suspension gegeben und bis zur vollständigen Auflösung des Gels unter regelmäßigem Vortexen bei 50° C inkubiert. Anschließend wurde 1 min bei 11000 rpm pelletiert, das Pellet in 300 µl A1 Puffer gelöst und erneut für 1 min bei 11000 rpm pelletiert. Das erhaltene Pellet wurde nun zweimal in 300 µl A2 Puffer gelöst und jeweils für 1 min bei 11000 rpm pelletiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde in sterilem Milieu bei RT gut getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 100 µl TE pH 8,0 gelöst und 5 min bei 50° C inkubiert. Danach wurde die DNA mit 10 µl 3 M Na-Azetat pH 4,8 und 300 µl 96% Ethanol 30 min auf Eis gefällt und für 15 min bei 11000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde nun mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, 5 min bei 11000 rpm zentrifugiert und in sterilem Milieu bei RT getrocknet. Zuletzt wurde das gereinigte DNA-Fragment in 12 µl H₂O bidest aufgenommen und bei 4° C eingelagert.

2.2.1.5 „Bluntenden“ von PCR-Fragmenten

Da die verwendete Taq-Polymerase Überhänge an den Enden von PCR-Fragmenten produziert, mussten alle Fragmente, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten, vor der Ligation „gebluntended“ werden. Dies erfolgte mit dem

PCR-Script™ Amp Cloning Kit von Stratagene (Amsterdam) nach folgendem Schema:

10 µl	aufgereinigtes PCR-Fragment in H ₂ O gelöst
1,3 µl	10x polishing Puffer
1 µl	10 mM dNTP mix (je 2,5 mM)
1 µl	cloned <i>Pfu</i> DNA Polymerase (0,5 U)

Die bluntended-Reaktion wurde unter Mineralöl 30 min bei 72° C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei 4° C gelagert.

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

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

1 µl	pPCR-Script Amp SK(+) Klonierungsvektor (10 ng/µl)
1 µl	PCR-Script 10x Reaktionspuffer
0,5 µl	10 mM rATP
4 µl	bluntend-PCR-Fragment
1 µl	<i>Srf</i> I Restriktionsenzym (5 U/µl)
1 µl	T4 DNA-Ligase (4 U/µl)
1,5 µl	H ₂ O bidest

Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert und anschließend für 10 min auf 65° C erhitzt, um die eingesetzten Enzyme zu inaktivieren.

2.2.1.7 Herstellung kompetenter *E. coli*

Eine SOB-Agarplatte wurde aus einer *E. coli*-Glycerinkultur beimpft und ü. N. bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden nun von der Platte abgenommen und in 500 ml SOB-Medium überführt. Nach Hinzugabe von 5 ml 2 M MgCl₂-Lösung wurde bei 37° C und 200 rpm inkubiert bis im Spektrometer bei 550 nm eine optische Dichte von 0,5 bis 0,55 nachzuweisen war. Die Zellen wurden nun in sterile 250 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 30 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde 15 min bei 2500 rpm und 4° C abzentrifugiert, das Pellet in 20 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend

wurde 9 min bei 2500 rpm und 4° C zentrifugiert, das Pellet in 7 ml RF2-Lösung resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden schließlich zu 225 µl in einem Trockeneis/Ethanol-Bad aliquotiert und bei -70° C eingelagert.

2.2.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli

Die zu transformierenden E. coli wurden auf Eis aufgetaut und 40 µl in ein vorgekühltes 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Zu den kompetenten Bakterien wurden 0,7 µl β-ME pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Lösung wurde daraufhin 10 min auf Eis inkubiert und nach 2, 4, 6, 8 und 10 min erneut vorsichtig gemischt. Danach wurden 10 µl Ligationsansatz zupipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend für 45 s in ein 42° C-Wasserbad und danach wieder auf Eis gestellt. Nach 2 min wurden 450 µl 42° C warmes SOG-Medium hinzugegeben und die Bakteriensuspension 2 h bei 37° C und 250 rpm geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde in vier Teilen zu 10 µl, 100 µl, 200 µl und Restvolumen auf LB_{Amp}-Agar-Platten ausplattiert, die zuvor zur Blau-Weiß-Selektion mit je 50 µl IPTG und 25 µl X-Gal versetzt worden waren.

2.2.1.9 Flüssigkultur von Bakterienstämmen

Für ü. N.-Kulturen einer Minipräparation von Plasmid-DNA wurde eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze in 5 ml LB_{Amp}-Medium überimpft.

2.2.1.10 Minipräparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Zur Minipräparation von Plasmid-DNA wurden ca. 1,5 ml aus einer 5 ml-ü. N.-Kultur entnommen und für 5 min bei 11000 rpm pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl GET aufgenommen und resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 200 µl Lysispuffer, die erhaltene Lösung wurde 3x invertiert und für 5 min auf Eis gestellt. Nach Beendigung der Inkubation wurden 150 µl 3 M K-Azetat hinzugegeben, die Lösung vorsichtig gemischt und wiederum 5 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte eine 5minütige Zentrifugation bei 11000 rpm und 4° C. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-RG überführt, mit

400 µl Phenol-Chloroform nachgereinigt, erneut 5 min bei 11000 rpm und 4° C abzentrifugiert und in ein neues 1,5 ml-RG überführt. Durch Zugabe von 1 ml eiskalten 96% Ethanol und 5 min Zentrifugation bei 11000 rpm wurde die Plasmid-DNA bei RT gefällt. Das DNA-Pellet wurde schließlich mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und in sterilem Milieu bei RT getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in je 40 µl TE pH 7,5 mit 20 µg/ml RNase gelöst.

2.2.1.11 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurden 4 µl eines 40 µl-Volumens aus einer Minipräparation verwendet. Folgender Standardansatz pro Restriktionsverdau wurde pipettiert:

4 µl	Plasmid-DNA
1 µl	10x Puffer (Y+/Tango™)
0,5 µl	Sac I Restriktionsenzym
0,5 µl	Kpn I Restriktionsenzym
4 µl	H ₂ O bidest

Der Restriktionsverdau erfolgte 2 h bei 37° C im Inkubator.

2.2.1.12 Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden standardmäßig über ein 2%iges Agarosegel aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE mit Ethidiumbromid verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 220 V und wurde anschließend über eine Videoauswerteeinheit dokumentiert.

2.2.1.13 Cyclesequencing von DNA

Für die Sequenzierreaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

5 µl	Plasmid-DNA aus Minipräparation
10 µl	Sequenzier-Mastermix
1 µl	T ₃ -Primer bzw. T ₅ -Primer
4 µl	H ₂ O bidest

Der Reaktionsansatz durchlief folgende PCR-Zyklen:

(95° C 30 s; 52° C 15 s ; 60° C 4 min) 30x

4° C ∞

Das PCR-Produkt wurde anschließend über eine Sephadex G50 Säule in einer gelben Eppendorfspitze aufgereinigt und aus dem Eluat die amplifizierte DNA mit 2 μ l 3 M Na-Azetat pH 4,8 und 50 μ l 96% Ethanol 15 min bei -20° C gefällt. Die DNA wurde 15 min bei 11000 rpm pelletiert, mit 200 μ l 70% Ethanol gewaschen und zuletzt in sterilem Milieu bei RT gut getrocknet.

Die automatische Sequenzierung wurde von Herrn Sergej Tchuvpilo mittels eines DNA-Sequencers der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

2.2.2 Färbemethoden

Vor der Verwendung des tiefgefrorenen Gewebes wurde dieses mikroskopisch untersucht, um Tumorgewebe bzw. in gesundem Antrumgewebe die Abwesenheit von Tumorgewebe festzustellen. Dazu wurden am Kryostaten von jedem Gewebestück 4 μ m-Schnitte auf Objektträger angefertigt und diese HE-gefärbt.

2.2.3 Auswertung der Daten

2.2.3.1 Sequenz- und Mutationsanalysen der V_H-Regionen

Zur statistischen Auswertung der amplifizierten Sequenzen wurden von jedem Fall #1 - #8 je fünf Antrum- und fünf Tumor-Sequenzen herangezogen.

Die 80 Sequenzen wurden jeweils mit dreistelligen Zahlen nummeriert. Die erste Ziffer gibt dabei die Patientenummer entsprechend Tab. 2-2 an. Die zweite Ziffer steht für die Gewebeart, 1 für Antrum und 2 für Tumor. Die dritte Ziffer gibt die Nummer der Sequenz (eins bis fünf) innerhalb dieser Klassifizierung an.

Über die Internetdatenbanken NCBI-BLAST und IMGT-Database wurde jede Sequenz mit allen bekannten Keimbahngenen verglichen, jeweils dasjenige mit der größten Homologie ermittelt und für die Mutationsanalyse verwendet. Im Programm DNAMAN wurden amplifizierte Sequenz und mutmaßliches

Keimbahngen gegenübergestellt und die Anzahl der Mutationen getrennt nach CDR und FR sowie nach stillen Mutationen und Austauschmutationen erfasst. Die Ermittlung der immanenten Mutationsanfälligkeit R_f der Keimbahngene erfolgte nach CHANG, 1994. Sie beschreibt die Anfälligkeit einer Sequenz für Austauschmutationen als Quotient der Summe aller möglichen Replacement-Mutationen und der Summe aller durch Punktmutationen erreichbaren Mutationen.

Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass somatische Mutationen in den analysierten V_H -Sequenzen nicht durch Antigenselektion, sondern rein zufällig entstanden sind, wurde ebenfalls nach CHANG, 1994 nach folgender Formel berechnet:

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

Dabei ist n die Gesamtzahl aller beobachteten Mutationen, k die Anzahl der beobachteten Replacement-Mutationen in den CDRs oder FRs und q die Wahrscheinlichkeit dafür, dass eine Replacement-Mutation in den CDRs oder FRs auftritt:

$$q = CDR_{rel} \cdot Rf_{CDR} \quad \text{bzw.} \quad q = FR_{rel} \cdot Rf_{FR}$$

Dabei stehen CDR_{rel} und FR_{rel} für die relative Länge der CDR bzw. FR bezogen auf die Gesamtlänge des untersuchten Keimbahngens. Rf_{CDR} und Rf_{FR} stehen für die immanente Mutationsanfälligkeit der CDR- bzw. FR-Region [CHANG, CASALI, 1994].

2.2.3.2 Methoden der Statistik

Zur Berechnung des Mittelwertes μ wurde die allgemein übliche Formel

$$\mu = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

verwendet. Dabei steht x für die Einzelwerte und n für die Anzahl der Einzelwerte.

Die Standardabweichung σ beschreibt die mittlere Streuung der einzelnen Werte um den Mittelwert. Sie berechnet sich als:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}$$

Zum Test der Signifikanz von Differenzen wurde der zweiseitige Student-t-Test angewandt. Dabei wird ein Widerspruchsbeweis geführt, d. h. es wird eine sogenannte Nullhypothese aufgestellt und diese auf einem vorher festzulegenden Signifikanzniveau abgelehnt. Kann man z. B. die Nullhypothese: „Die Werte der Kategorie A sind im Mittel genauso groß wie die Werte der Kategorie B.“ auf einem Signifikanzniveau von 0,95 ablehnen, so kann man mit 95%iger Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass die Differenz der Mittelwerte A und B nicht zufällig, also signifikant, ist. Die Irrtumswahrscheinlichkeit entspricht in diesem Fall dann 0,05. Von hochsignifikanten Ergebnissen spricht man, wenn die Nullhypothese auf dem Signifikanzniveau 0,99, also mit der Irrtumswahrscheinlichkeit 0,01 abgelehnt werden kann.

Die Vorteile des Student-t-Testes sind unter anderem seine Robustheit gegenüber Abweichungen der Messwerte von der idealen Gauß'schen Normalverteilung sowie die Unabhängigkeit von der Standardabweichung ab einer genügend großen Stichprobenanzahl [BASLER, 1994]. Die Stichprobenzahl war bei allen in dieser Arbeit errechneten Wahrscheinlichkeiten ausreichend groß.

Den dabei errechneten t-Wert erhält man als

$$t = \frac{(\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2 \cdot (n_1 - 1) + \sigma_2^2 \cdot (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

Die dazugehörige Sicherheitswahrscheinlichkeit erhält man schließlich aus der Verteilungsfunktion Φ der normierten Normalverteilung:

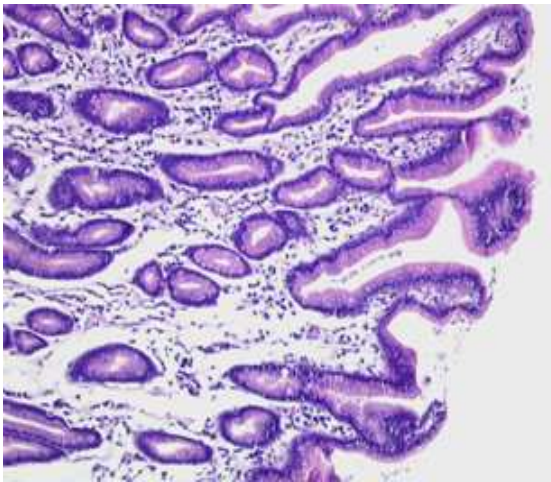
$$\Phi(x) = \int_{-\infty}^x \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{y^2}{2}} dy$$

Zur Veranschaulichung: Um die Nullhypothese auf dem Signifikanzniveau 0,99 ablehnen zu können, muss der t-Wert größer als 2,326 sein.

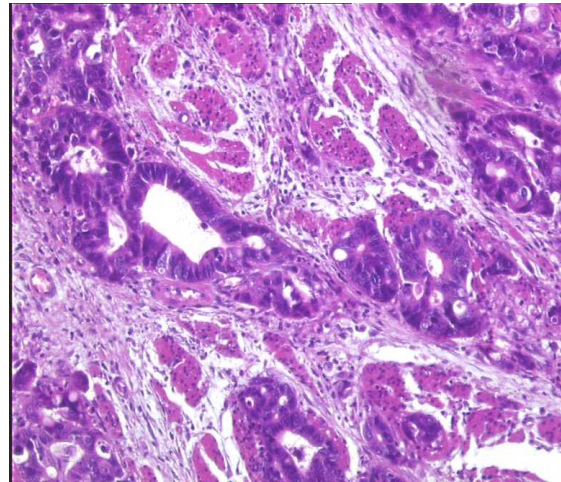
3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Ursprungsgewebes

Zur sicheren Charakterisierung des Ursprungsgewebes wurden von allen verwendeten Gewebeproben histologische Schnitte angefertigt, gefärbt und mikroskopisch untersucht. Bei allen acht Patienten stellt sich im Antrum-Gewebeblock tumorfreies Magenschleimhautgewebe dar, während im Tumorb-Block bei allen acht Patienten zumindest ein Großteil der gesamten Schnittfläche von tumortypischem Gewebe eingenommen wird. Abb. 5 zeigt stellvertretend je einen Ausschnitt aus Antrum- und Tumorgewebe.



Antrumgewebe



Tumorgewebe

Abb. 5: histologischer Ausschnitt aus untersuchtem Ursprungsgewebe

3.2 Identifizierung der IgV_H-Klassen

Aus den verwendeten Magengewebeproben konnten mit Hilfe der in Kap. 2 beschriebenen Methoden Immunglobuline extrahiert und deren Sequenzen amplifiziert und analysiert werden. Zur Identifizierung der im Antrum- bzw. Tumorgewebe vorkommenden Immunglobuline wurden diese, wie in Kap. 2.2.3.1 beschrieben, mit den bekannten Keimbahngenen der IMGT-Datenbank verglichen und jeweils dem mit der größten Übereinstimmung zugeordnet.

Es zeigt sich in Antrumgewebe ein Überwiegen von Keimbahngenen der Familien V_{H3} (18 von 40 Sequenzen) und V_{H1} (9 von 40 Sequenzen), demgegenüber jedoch in Tumorgewebe eine Häufung der Familien V_{H4} und V_{H1} (je 11 von 40 Sequenzen) sowie V_{H5} (8 von 40 Sequenzen). Eine Übersicht über die Familienzugehörigkeit aller amplifizierten Immunglobuline gibt Tabelle 5.

Tab. 5: Absolute Häufigkeit der Zugehörigkeit zu den Immunglobulin- V_H -Unterfamilien

Gewebetyp	Immunglobulin- V_H -Unterfamilie						
	V_{H1}	V_{H2}	V_{H3}	V_{H4}	V_{H5}	V_{H6}	V_{H7}
Antrum	9	4	18	3	5	1	0
Tumor	11	4	4	11	8	1	1

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die einzelnen IgV_H -Familien unterschiedlich viele Keimbahngene beinhalten, kann man Erwartungswerte für die prozentualen Anteile der einzelnen Familien an der Gesamtzahl der amplifizierten Gene errechnen [BREZINSCHKE et al, 1997]. Abb. 6 zeigt die Abweichung der ermittelten Häufigkeitsverteilung von den Erwartungswerten.

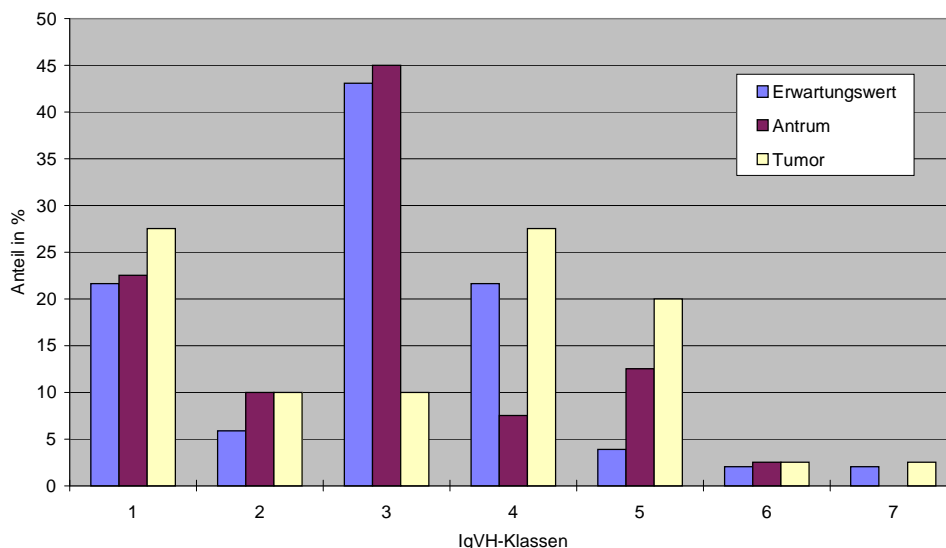


Abb. 6: Abweichung der Zugehörigkeit zu den IgV_H -Unterfamilien vom Erwartungswert

Es zeigt sich für die Familien V_H1 , 2, 6 und 7 sowohl in Antrum- also auch in Tumorgewebe eine Häufigkeit, die dem errechneten Erwartungswert annähernd entspricht. Klasse V_H3 ist in Tumorgewebe deutlich unterrepräsentiert. Klasse V_H4 dagegen zeigt ein übererwartungsgemäß hohes Auftreten in Tumorgewebe, in Antrumgewebe sind Immunglobuline der Klasse V_H4 demgegenüber deutlich seltener nachweisbar, als erwartet. Klasse V_H5 zeigt in Antrum- und Tumorgewebe signifikant gegenüber dem Erwartungswert häufigeres Vorkommen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass in Tumorgewebe deutlich seltener als erwartet, und als dies in Antrumgewebe der Fall ist, Immunglobuline der Familie V_H3 , dafür deutlich häufiger Immunglobuline der Familie V_H4 nachgewiesen werden konnten.

3.3 Charakterisierung der IgV_H -Keimbahngene

Zur weiteren Charakterisierung der amplifizierten V_H -Regionen wurden die Sequenzen wie beschrieben auf ihre Keimbahngenzugehörigkeit untersucht. Tab. 6 zeigt getrennt nach Antrum- und Tumorgewebe die Häufigkeit, mit der die jeweiligen Keimbahngene nachgewiesen werden konnten.

Es zeigen sich sowohl in Antrum- als auch in Tumorgewebe in allen IgV_H -Familien unterschiedliche Keimbahngenzugehörigkeiten, was einer großen Vielfalt der gebildeten Immunglobuline in beiden Gewebetypen entspricht. Eine Ausnahme stellt die Familie V_H2 dar. Hier gehören sieben von acht Sequenzen dem Keimbahngen 2/70*01 an.

Eine deutliche Differenz zwischen Antrum- und Tumorgewebe erkennt man in Unterfamilie V_H4 . In Antrumgewebe gehören alle Sequenzen demselben Keimbahngen an, im Tumorgewebe zeigt sich eine deutliche Variabilität, wobei das in Antrumgewebe vertretene V_H -Gen 4/30-4*01 in Tumorgewebe nicht nachweisbar ist.

Besonders häufig zeigen sich in tumorfreiem Magengewebe die Gene 2/70*01, 3/23*01, 3/11*01, 3/30-3.30-5*01, 4/30.4*01 und 5/51*01. Letzteres tritt neben den Genen 4/61*01, 2/70*01 und 1/69*02 auch gehäuft in Tumorgewebe auf.

Tab. 6: Absolute Häufigkeit n der einzelnen Keimbahngene in Antrum- und Tumorgewebe

Antrum		
Familie	Keimbahngen	n
IgV _{H1}	3*01	2
	8*01	1
	18*01	2
	69*01	2
	e*02	2
IgV_{H2}	70*01	4
IgV _{H3}	11*01	3
	15*02	1
	23*01	4
	30-3.30-5*01	3
	43*01	2
	48*01	2
	48*02	1
	53*02	1
	66*01	1
IgV _{H4}	30-4*01	3
IgV _{H5}	51*01	3
	a*01	2
IgV _{H6}	1*02	1
IgV _{H7}		0

Tumor		
Familie	Keimbahngen	n
IgV _{H1}	3*01	1
	8*01	1
	18*01	2
	69*01	2
	69*02	3
	e*01	1
	e*02	1
IgV _{H2}	70*01	3
	70*02	1
IgV _{H3}	11*01	1
	23*01	1
	33*01	1
	74*03	1
IgV _{H4}	4*01	1
	4*03	1
	30-1-4.31*01	2
	34*01	1
	39*03	1
	59*02	1
	61*01	4
IgV _{H5}	51*01	6
	51*03	1
	a*01	1
IgV _{H6}	1*02	1
IgV _{H7}	4-1*02	1

Tab. 7: Mutationsanalyse der gewonnenen V_H-Sequenzen (Antrumgewebe)

Fall	Seq.	Keimbahngen	Mut. FR S / R	Mut. CDR S / R	Mut. ges. S / R; Σ	mut. AS FR	mut. AS CDR	mut. AS gesamt	Homologie in %
#1	111	1-18*01	0 / 4	2 / 4	2 / 8; 10	3	3	6	95,6
	112	2-70*01	2 / 1	0 / 0	2 / 1; 3	1	0	1	98,9
	113	1-18*01	0 / 1	0 / 0	0 / 1; 1	1	0	1	99,6
	114	1-8*01	5 / 5	1 / 2	6 / 7; 13	4	2	6	94,8
	115	3-43*01	1 / 2	1 / 4	2 / 6; 8	2	3	5	96,7
#2	211	3-30...-5*01	2 / 4	0 / 3	2 / 7; 9	4	3	7	96,4
	212	3-11*01	0 / 2	0 / 0	0 / 2; 2	2	0	2	99,2
	213	3-11*01	1 / 0	0 / 0	1 / 0; 1	0	0	0	99,6
	214	5-51*01	0 / 2	0 / 1	0 / 3; 3	2	1	3	98,9
	215	3-23*01	1 / 3	2 / 2	3 / 5; 8	2	2	4	96,8
#3	311	1/69*01	0 / 0	1 / 0	1 / 0; 1	0	0	0	99,6
	312	3-30...-5*01	0 / 0	3 / 2	3 / 2; 5	1	0	1	98,0
	313	1-69*01	8 / 5	0 / 8	8 / 13; 21	5	7	12	91,6
	314	5-51*01	1 / 2	0 / 1	1 / 3; 4	2	1	3	98,5
	315	2-70*01	1 / 3	0 / 2	1 / 5; 6	2	2	4	97,6
#4	411	4-30-4*01	8 / 5	3 / 4	11 / 9; 20	5	4	9	92,2
	412	3-48*01	3 / 2	1 / 3	4 / 5; 9	2	2	4	96,4
	413	3-11*01	0 / 0	0 / 0	0 / 0; 0	0	0	0	100,0
	414	3-48*01	1 / 8	3 / 6	4 / 14; 18	5	3	8	92,6
	415	1-3*01	1 / 0	0 / 0	1 / 0; 1	0	0	0	99,6
#5	511	2-70*01	2 / 10	1 / 3	3 / 13; 16	8	3	11	94,0
	512	1-3*01	3 / 7	1 / 4	4 / 11; 15	6	3	9	94,0
	513	3-23*01	2 / 2	0 / 3	2 / 5; 7	2	2	4	97,2
	514	3-23*01	2 / 5	2 / 6	4 / 11; 15	5	4	9	94,0
	515	3-23*01	3 / 6	2 / 4	5 / 10; 15	5	3	8	93,9
#6	611	3-15*02	1 / 4	1 / 4	2 / 8; 10	4	3	7	95,9
	612	3-30...-5*01	1 / 5	0 / 3	1 / 8; 9	5	3	8	96,4
	613	3-53*02	4 / 7	1 / 7	5 / 14; 19	6	7	13	92,3
	614	5-a*01	3 / 2	0 / 2	3 / 4; 7	2	2	4	97,2
	615	3-66*01	2 / 11	1 / 2	3 / 13; 16	8	1	9	93,4
#7	711	5-a*01	3 / 3	0 / 1	3 / 4; 7	3	1	4	97,3
	712	4-30-4*01	4 / 0	0 / 0	4 / 0; 4	0	0	0	98,4
	713	1-e*02	2 / 1	0 / 0	2 / 1; 3	1	0	1	98,6
	714	3-48*02	2 / 3	2 / 2	4 / 5; 9	3	2	5	96,4
	715	1-e*02	1 / 1	0 / 0	1 / 1; 2	1	0	1	99,1
#8	811	6-1*02	3 / 5	0 / 5	3 / 10; 13	4	4	8	94,7
	812	5-51*01	1 / 1	0 / 4	1 / 5; 6	1	3	4	97,7
	813	4-30-4*01	3 / 0	0 / 0	3 / 0; 3	0	0	0	98,8
	814	2-70*01	7 / 7	1 / 9	8 / 16; 24	6	7	13	91,3
	815	3-43*01	0 / 2	1 / 3	1 / 5; 6	2	2	4	97,6

Tab. 8: Mutationsanalyse der gewonnenen V_H-Sequenzen (Tumorgewebe)

Fall	Seq.	Keimbahngen	Mut. FR S / R	Mut. CDR S / R	Mut. ges. S / R; Σ	mut. AS FR	mut. AS CDR	mut. AS	Homologie in %
#1	121	2-70*01	4 / 9	1 / 1	5 / 10; 15	7	1	8	94,5
	122	3-33*01	6 / 21	4 / 4	10/25; 35	18	3	21	85,9
	123	4-61*01	3 / 1	0 / 3	3 / 4; 7	1	3	4	97,3
	124	4-61*01	6 / 4	0 / 1	6 / 5; 11	3	1	4	95,6
	125	5-51*01	0 / 8	2 / 5	2 / 13; 15	7	4	11	94,3
#2	221	4-4*01	1 / 13	1 / 9	2 / 22; 24	10	6	16	85,3
	222	1-3*01	3 / 10	1 / 5	4 / 15; 19	8	5	13	89,8
	223	4-30...-31*01	1 / 8	0 / 4	1 / 12; 13	8	3	11	94,9
	224	2-70*01	8 / 26	1 / 11	9 / 37; 46	18	10	28	82,6
	225	7-4-1*02	6 / 8	0 / 6	6 / 14; 20	8	6	14	92,0
#3	321	1-69*02	13 / 19	3 / 14	16/33; 49	12	8	20	80,1
	322	3-23*01	6 / 12	2 / 7	8 / 19; 27	10	5	15	89,1
	323	5-51*01	4 / 30	1 / 11	5 / 41; 46	23	7	30	82,3
	324	1-e*02	12 / 17	3 / 14	15/31; 46	11	9	20	79,3
	325	4-61*01	5 / 16	1 / 15	6 / 31; 37	13	12	25	85,6
#4	421	3-74*03	4 / 15	1 / 9	5 / 24; 29	12	6	18	88,3
	422	2-70*01	10 / 10	2 / 3	12/13; 25	9	3	12	90,1
	423	1-e*01	13 / 20	3 / 14	16/34; 50	13	9	22	79,9
	424	5-51*01	4 / 30	1 / 11	5 / 41; 46	23	7	30	82,5
	425	1-18*01	8 / 10	0 / 4	8 / 14; 22	9	2	11	91,1
#5	521	1-69*02	9 / 20	0 / 11	9 / 31; 40	15	10	25	83,9
	522	5-51*03	6 / 22	0 / 15	6 / 37; 43	19	11	30	83,7
	523	6-1*02	4 / 15	2 / 3	6 / 18; 24	13	3	26	90,2
	524	5-51*01	4 / 15	1 / 12	5 / 27; 32	13	8	21	87,6
	525	5-51*01	2 / 14	1 / 11	3 / 25; 28	12	8	20	88,9
#6	621	5-a*01	3 / 6	1 / 3	4 / 9; 13	5	3	8	94,8
	622	1-69*01	3 / 3	1 / 3	4 / 6; 10	3	3	6	96,0
	623	2-70*02	6 / 25	0 / 4	6 / 29; 35	18	3	21	86,5
	624	1-69*01	5 / 14	1 / 6	6 / 20; 26	11	5	16	89,5
	625	4-30...31*01	5 / 7	1 / 4	6 / 11; 17	7	3	10	93,0
#7	721	4-39*03	9 / 29	2 / 18	11/47; 58	19	11	30	76,6
	722	4-61*01	5 / 16	3 / 6	8 / 22; 30	11	4	15	88,0
	723	4-59*02	5 / 18	2 / 6	7 / 24; 31	13	5	18	87,5
	724	1-18*01	5 / 8	2 / 3	7 / 11; 18	6	2	8	92,8
	725	1-8*01	6 / 12	0 / 4	6 / 16; 22	11	4	15	91,2
#8	821	4-4*03	4 / 6	0 / 2	4 / 8; 12	5	2	7	95,2
	822	3-11*01	3 / 5	2 / 4	5 / 9; 14	4	3	7	94,4
	823	4-34*01	6 / 7	1 / 4	7 / 11; 18	7	3	10	92,8
	824	1-69*02	13 / 19	3 / 14	16/33; 49	12	8	20	80,2
	825	5-51*01	2 / 11	0 / 8	2 / 19; 21	8	5	13	92,0

3.4 Mutationsanalyse im Vergleich Antrum vs. Tumor

Eine genaue Sequenz- und Mutationsanalyse der gewonnenen V_H -Sequenzen ist in den Tabellen 7 (Antrumgewebe) und 8 (Tumorgewebe) dargestellt. Die Spalten vier bis sechs zeigen jeweils die Anzahl der Punktmutationen, d. h. der veränderten Basen, in kodierender Region, Rahmenregion und Gesamtsequenz. Dabei steht R für Austausch- (engl.: replacement) und S für stille (engl.: silent) Mutationen. Die Spalten sieben bis neun zeigen die Anzahl der dadurch ausgetauschten Aminosäuren. Die unterschiedlichen Zahlenwerte sind darauf zurückzuführen, dass stille Mutationen keinen und mehrere Austauschmutationen innerhalb eines Basentriplets nur einen Aminosäureaustausch nach sich ziehen.

Es zeigen sich in allen Bereichen signifikant höhere Mutationsraten für Tumorgewebe als für Antrumgewebe. Dazu wurde für beide Vergleichsgruppen jeweils der Mittelwert aller 40 Sequenzen für die Punktmutationen sowie die mutierten Basentriplets in CDR, FR und Gesamtsequenz berechnet. Anschließend wurde jeweils der Wert aus Antrumgewebe mit dem aus Tumorgewebe verglichen. Für alle gegenübergestellten Werte liegt die Mutationshäufigkeit in Tumorgewebe hochsignifikant höher als in tumorfreiem Antrumgewebe. Die Signifikanz wurde mit dem Student-t-Test nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigt zusammenfassend Tabelle 9.

Tab. 9: Signifikanz der Mutationsergebnisse

Signifikanztest (Student-t)		Anzahl Mutationen in			Anzahl mutierter AS in		
		CDRs	FRs	gesamt	CDRs	FRs	gesamt
Antrum	μ	5,575	3,175	8,750	2,875	2,075	4,950
	σ	3,866	2,897	6,316	2,193	1,929	3,801
Tumor	μ	19,525	8,550	28,075	10,875	5,350	16,225
	σ	9,168	4,944	13,29	5,211	2,963	7,418
t-Test	t	8,867	5,932	8,305	8,949	5,859	8,555
	p	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005

Auch in der Qualität der ermittelten Mutationen zeigen sich Unterschiede zwischen beiden Gewebegruppen. So liegt die R:S-ratio, also das Verhältnis von Austausch- zu stillen Mutationen in Antrumgewebe im Mittel bei 2,10, in Tumorgewebe dagegen hochsignifikant höher bei 3,89 ($p < 0,001$, $t = 3,395$). Die höhere Gesamtzahl an Mutationen in Tumorgewebe führt somit auch zu einem höheren Anteil an Austauschmutationen.

Entsprechend der höheren Mutationsrate liegt die Homologie, also die prozentuale Übereinstimmung von amplifizierter Sequenz mit der ursprünglichen Keimbahnsequenz, in Tumorgewebe deutlich niedriger als in Antrumgewebe. Es zeigt sich eine Homologie zwischen 76,6% und 97,3% für Tumorgewebe, dagegen zwischen 91,3% und 100% in Antrumgewebe. Im Mittel liegt die Homologie bei 88,63% (Tumor) vs. 96,52% (Antrum). Auch dieser Unterschied ist hochsignifikant ($p < 0,0005$, $t = 8,466$).

In Antrumgewebe liegt eine Sequenz (Nr. 413) in der Keimbahnkonfiguration vor, weitere fünf Sequenzen (Nr. 213, 311, 415, 712, 813) weisen nur stille Mutationen auf. Ohne Austauschmutation in den CDR-Regionen sind 11 von 40 Sequenzen (27,5%). Ebensoviele Sequenzen weisen lediglich eine Austauschmutation in der Gesamtsequenz auf. Fast ein Drittel, nämlich 13 von 40 Sequenzen (32,5%), weisen eine Homologie von über 98% auf und zeigen maximal vier Mutationen in der Gesamtsequenz, davon maximal drei Austauschmutationen.

In Tumorgewebe dagegen liegt keine ermittelte IgV_H-Region in der Keimbahnkonfiguration vor, alle amplifizierten Sequenzen weisen zwischen vier und 47 Austauschmutationen auf, die geringste Mutationshäufigkeit liegt bei sieben, davon vier Austauschmutationen (Nr. 123), entsprechend einer Homologie von 97,3%.

3.5 Mutationsanfälligkeit der ermittelten IgV_H-Keimbahngene

Als Maß für die Mutationsanfälligkeit der Sequenz wurden für die ermittelten Keimbahngene die Replacement-Frequenz R_f sowie die R:S-ratio, also das Verhältnis von erwarteten Replacement-Mutationen zu erwarteten stillen Mutationen, errechnet [CHANG, CASALI, 1994]. Als Replacement-Mutationen

werden solche Mutationen bezeichnet, die zu einem Aminosäure-Austausch führen.

Tab. 10: Rf- und R:S-Werte der ermittelten Keimbahngene
Werte gerundet.

Keimbahngene	Rf CDR	Rf FR	Rf gesamt	R:S CDR	R:S FR	R:S gesamt
1/3*01	0,73611	0,72821	0,72977	3,21212	3,40800	3,36709
1/8*01	0,77778	0,72308	0,73388	4,14815	3,27907	3,42949
1/18*01	0,74306	0,71795	0,72291	3,45161	3,15789	3,21341
1/69*01	0,73611	0,72137	0,72428	3,02857	3,19697	3,16168
1/69*02	0,72917	0,72308	0,72428	2,91667	3,22901	3,16168
1/e*01	0,73611	0,72137	0,72428	3,02857	3,19697	3,16168
1/e*02	0,73611	0,72515	0,72755	3,02857	3,23478	3,18667
2/70*01	0,78431	0,72308	0,73577	4,61538	3,00000	3,25150
2/70*02	0,78431	0,72310	0,73611	4,61538	2,99270	3,25153
3/11*01	0,78472	0,71282	0,72702	4,34615	3,06618	3,27160
3/15*02	0,78571	0,71453	0,72714	4,50000	2,92308	3,13333
3/23*01	0,76389	0,71111	0,72154	3,54839	2,99281	3,09412
3/30.3-30.5*01	0,75000	0,71624	0,72291	4,00000	3,01439	3,17470
3/33*01	0,77778	0,71624	0,72840	4,66667	3,01439	3,25767
3/43*01	0,77083	0,71966	0,72977	3,96429	3,07299	3,22424
3/48*01	0,81250	0,70940	0,72977	4,87500	3,02920	3,30435
3/48*02	0,81250	0,71282	0,73251	4,87500	3,08889	3,35849
3/53*02	0,76296	0,71453	0,72361	3,67857	3,02899	3,13855
3/66*01	0,75556	0,71795	0,72500	3,64286	3,08824	3,18293
3/74*03	0,79861	0,71111	0,72840	4,79167	2,90909	3,17964
4/4*01	0,74074	0,70270	0,71368	3,44828	2,78571	2,95575
4/4*03	0,72917	0,71111	0,71468	4,03846	2,86897	3,04678
4/30.1-4.31*01	0,73203	0,70769	0,71274	3,39394	2,87500	2,97175
4/30-4*01	0,74510	0,70427	0,71274	3,67742	2,82197	2,97175
4/34*01	0,75556	0,70769	0,71667	3,64286	2,87500	3,00000
4/39*03	0,75817	0,70769	0,71816	4,00000	2,83562	3,02857
4/59*02	0,73333	0,70427	0,70972	3,53571	2,80272	2,92000
4/61*01	0,73856	0,70427	0,71138	3,53125	2,80272	2,93296
5/51*01	0,74306	0,72821	0,73114	3,82143	3,30233	3,39490
5/51*03	0,74306	0,72821	0,73114	3,82143	3,30233	3,39490
5/a*01	0,75694	0,73333	0,73800	4,19231	3,37795	3,51634
6/1*02	0,75439	0,71949	0,72778	3,90909	3,06202	3,23457
7/4-1*02	0,73611	0,71624	0,72016	3,21212	3,12687	3,14371
Mittelwert	0,75771	0,71630	0,72463	3,85327	3,05342	3,18231
Standard- abweichung	0,02361	0,00789	0,00748	0,56336	0,17220	0,14904

Es ergibt sich ein Mittelwert von $R_f = 0,72463$ und $R:S = 3,18231$. Diese Werte stimmen mit hinreichender Genauigkeit mit den von T. H. Jukes ermittelten Werten für Keimbahngene überein [JUKES, KING, 1979]. Dabei ist jedoch eine ungleiche Verteilung der Mutationsanfälligkeit über die einzelnen Regionen der Keimbahngene augenscheinlich. Es zeigt sich in den CDR-Regionen im Durchschnitt eine signifikant höhere ($R_f = 0,75771$, $R:S = 3,85327$), in den FR eine signifikant niedrigere Mutationsanfälligkeit ($R_f = 0,71630$, $R:S = 3,05342$), als in der Gesamtsequenz. Die kodierenden Regionen sind somit anfälliger für Mutationen als die nicht-kodierenden. [CHANG, CASALI, 1994]

Diese Zahlen veranschaulicht Tab. 11.

Tab. 11: R_f - und $R:S$ -Werte in CDR und FR im Vergleich zur Gesamtsequenz
 p gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass der Wert vom Wert der Gesamtsequenz signifikant abweicht, t -Wert aus dem Student- t -Test.

	R_f	P	R:S	p
Gesamtsequenz	0,72463		3,18231	
CDR-Regionen	0,75771	< 0,0005 ($t=7,67$)	3,85327	< 0,0005 ($t=6,61$)
FR-Regionen	0,71630	< 0,0005 ($t=4,40$)	3,05342	0,0006 ($t=3,25$)

3.6 Nachweis von Antigenkontakt

Ausgehend von den berechneten R_f -Werten der Keimbahngene (vgl. Kapitel 3.5) kann man für die amplifizierte Sequenzen die Wahrscheinlichkeit dafür berechnen, dass die Austauschmutationen in den CDR- bzw. FR-Regionen zufällig und nicht durch Antigenkontakt zustande gekommen sind. Die dafür benötigte Formel [CHANG, CASALI, 1994] wurde in Kap. 2.2.3.1 vorgestellt. Tab. 12 zeigt für alle 80 Sequenzen diese Wahrscheinlichkeitswerte.

Alle Tumorsequenzen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Antigenkontakt zustande gekommen. Die Wahrscheinlichkeit, dass kein Antigenkontakt stattgefunden hat, liegt bei allen Sequenzen unter 50%, bei einem Viertel der Sequenzen (10/40) sogar unter 1% in den kodierenden Regionen.

Tab. 12: Wahrscheinlichkeiten p dafür, dass die Austauschmutationen in CDR bzw. FR rein zufällig (ohne Antigenkontakt) entstanden sind. Werte gerundet.

Fall	Seq.	Keimbahngen	p CDR	p FR
#1	111	1-18*01	0,03760	0,13418
	112	2-70*01	0,58721	0,31327
	113	1-18*01	0,85322	0,57613
	114	1-8*01	0,29391	0,08758
	115	3-43*01	0,01943	0,05311
#2	211	3-30...-5*01	0,10436	0,19120
	212	3-11*01	0,71402	0,32720
	213	3-11*01	0,84499	0,42798
	214	5-51*01	0,32056	0,42580
	215	3-23*01	0,23893	0,15183
#3	311	1-69*01	0,85460	0,42112
	312	3-30...-5*01	0,13567	0,01390
	313	1-69*01	0,00527	0,00129
	314	5-51*01	0,36467	0,35395
	315	2-70*01	0,19502	0,29285
#4	411	4-30-4*01	0,18826	0,00400
	412	3-48*01	0,14579	0,01728
	413	3-11*01	1,00000	1,00000
	414	3-48*01	0,03888	0,10608
	415	1-3*01	0,85460	0,41563
#5	511	2-70*01	0,23971	0,18531
	512	1-3*01	0,10834	0,13336
	513	3-23*01	0,06250	0,09978
	514	3-23*01	0,01355	0,03869
	515	3-23*01	0,11705	0,08569
#6	611	3-15*02	0,03211	0,12287
	612	3-30...-5*01	0,10436	0,25843
	613	3-53*02	0,00969	0,03321
	614	5-a*01	0,20890	0,08583
	615	3-66*01	0,28373	0,14599
#7	711	5-a*01	0,39608	0,20457
	712	4-30-4*01	0,51110	0,03808
	713	1-e*02	0,58987	0,31964
	714	3-48*02	0,27251	0,09662
	715	1-e*02	0,70335	0,49123
#8	811	6-1*02	0,04897	0,11023
	812	5-51*01	0,00507	0,04349
	813	4-30-4*01	0,60448	0,00862
	814	2-70*01	0,00725	0,00364
	815	3-43*01	0,04301	0,15940
Mittelwert Antrum			0,30397	0,20127
Standardabweichung			0,29563	0,19792

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tab. 12

Fall	Seq.	Keimbahngen	p CDR	p FR
#1	121	2-70*01	0,20336	0,20206
	122	3-33*01	0,16567	0,13049
	123	4-61*01	0,06463	0,02904
	124	4-61*01	0,31963	0,10520
	125	5-51*01	0,04183	0,18750
#2	221	4-4*01	0,03298	0,14878
	222	1-3*01	0,08376	0,15879
	223	4-30...-31*01	0,08623	0,20586
	224	2-70*01	0,05626	0,11730
	225	7-4-1*02	0,04060	0,05245
#3	321	1-69*02	0,00483	0,00298
	322	3-23*01	0,06003	0,06439
	323	5-51*01	0,03512	0,07874
	324	1-e*02	0,00697	0,00335
	325	4-61*01	0,00014	0,04052
#4	421	3-74*03	0,01955	0,12432
	422	2-70*01	0,19934	0,03557
	423	1-e*01	0,00619	0,00454
	424	5-51*01	0,03512	0,07874
	425	1-18*01	0,19497	0,08763
#5	521	1-69*02	0,01407	0,07439
	522	5-51*03	0,00056	0,07621
	523	6-1*02	0,18422	0,12484
	524	5-51*01	0,00094	0,05901
	525	5-51*01	0,00098	0,09974
#6	621	5-a*01	0,18928	0,14244
	622	1-69*01	0,12281	0,05468
	623	2-70*02	0,14183	0,03093
	624	1-69*01	0,09394	0,14256
	625	4-30...31*01	0,14858	0,09045
#7	721	4-39*03	0,00165	0,06756
	722	4-61*01	0,14175	0,13943
	723	4-59*02	0,12326	0,14335
	724	1-18*01	0,23856	0,09943
	725	1-8*01	0,20240	0,15994
#8	821	4-4*03	0,28909	0,19988
	822	3-11*01	0,10724	0,05907
	823	4-34*01	0,14520	0,05404
	824	1-69*02	0,00483	0,00298
	825	5-51*01	0,00557	0,14725
Mittelwert Tumor			0,09535	0,09566
Standardabweichung			0,08708	0,05677
Mittelwert insgesamt			0,19966	0,14846
Standardabweichung			0,24160	0,15487

In den Antrumsequenzen zeigt sich ein etwas anderes Bild: zwar ist ein Teil der Sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Antigenkontakt mutiert. Allerdings findet man hier zahlreiche Fälle wenig mutierter Sequenzen, bei denen ein Antigenkontakt unwahrscheinlich ist. Eine Sequenz (Nr. 413) liegt in der Keimbahnkonfiguration vor, die Wahrscheinlichkeit für einen nicht stattgehabten Antigenkontakt liegt somit auch bei 1,0 (100%). Andere Sequenzen, die nur geringfügig von der Keimbahnkonfiguration abweichen, erreichen Wahrscheinlichkeitswerte bis über 85% für nicht stattgehabten Antigenkontakt. Insgesamt hat bei einem Viertel der Antrumsequenzen (10/40) mit hoher Wahrscheinlichkeit (>50% in den kodierenden Regionen) kein Antigenkontakt stattgefunden. Dies sind die Sequenzen Nr. 112, 113, 213, 311, 413, 415, 712, 713, 715 und 813.

Zusammenfassend ergeben sich hiermit innerhalb des Antrungewebes Hinweise auf Vorliegen natürlicher Immunität aber auch durch Antigenkontakt gereifter Immunität. In Tumorgewebe dagegen finden sich ausschließlich Sequenzen, die mit hinreichender Wahrscheinlichkeit auf Antigenkontakt zurückzuführen sind.

3.7 Vergleich von Sequenzen desselben Keimbahngens aus unterschiedlichen Patienten

Die amplifizierten Sequenzen aus Antrum- und Tumorgewebe wurden einander gegenübergestellt, um mögliche Regionen mit identischen Mutationsmustern, sog. hotspots, nachzuweisen. Verglichen wurden jeweils die Sequenzen der Keimbahngene V_H1-69 (DP-10; 2 Antrumsequenzen/5 Tumorsequenzen), $2-70^*01$ (DP-27; 4/3), $3-23^*01$ (DP-47; 4/1), $4-61^*01$ (DP-66; 0/4) und $5-51^*01$ (DP-73; 3/6). Andere Keimbahngene traten in zu geringer Häufigkeit auf, um auf hotspots schließen zu können.

Exemplarisch ist dies für DP-27 (vier Antrumsequenzen) und DP-66 (vier Tumorsequenzen) in Abb. 7 dargestellt.

Ergebnisse

		16										
ighv2-70-01	ACC	CTC	ACA	CTG	ACC	TGC	ACC	TTC	TCT	GGG	TTC	
112	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
315	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
511	---	---	---	---	---	---	<u>T</u>	<u>G</u>	---	---	---	---
814	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---
ighv4-61-01	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGT	GGC	
123	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
124	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
325	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	<u>A</u>	---
722	---	---	---	---	---	---	-C	---	---	---	---	---
ighv2-70-01	TCA	CTC	AGC	ACT	AGT	GGA	ATG	TGT	GTG	AGC	TGG	
112	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
315	---	---	---	---	-G	---	---	---	---	---	---	---
511	---	---	<u>T</u>	-G	---	<u>C</u>	-C	---	<u>A</u>	---	---	---
814	---	---	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	---	-C	---	<u>AT</u>	---	---	---
ighv4-61-01	TCC	GTC	AGC	AGT	GGT	AGT	TAC	TAC	TGG	AGC	TGG	
123	---	<u>A</u>	---	---	---	<u>G</u>	---	---	---	-T	---	---
124	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---	---
325	---	---	<u>AT</u>	<u>CC</u>	<u>A</u>	-C	-T	-T	---	---	<u>A</u>	---
722	---	---	---	<u>GA</u>	---	TC	---	---	---	---	---	---
ighv2-70-01	ATC	CGT	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GCC	CTG	GAG	TGG	
112	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
315	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
511	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
814	-T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
ighv4-61-01	ATC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG	GAG	TGG	
123	---	-C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
124	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
325	---	---	---	<u>T</u>	---	---	---	---	---	-A	<u>A</u>	---
722	---	---	---	<u>T</u>	---	---	<u>CG</u>	---	---	---	---	---
												59
ighv2-70-01	CTT	GCA	CTC	ATT	GAT	TGG	GAT	GAT	GAT	AAA	TAC	
112	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-T	---
315	---	---	---	---	---	---	---	<u>A</u>	---	---	---	---
511	---	---	<u>A</u>	---	---	---	---	---	---	---	---	---
814	---	---	-G	---	<u>AC</u>	---	-G	-C	<u>AG</u>	---	---	---
ighv4-61-01	ATT	GGG	TAT	ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC	AAC	
123	---	---	---	<u>T</u>	---	---	---	---	---	---	<u>T</u>	---
124	<u>G</u>	---	---	<u>T</u>	---	---	---	---	---	---	---	---
325	<u>T</u>	<u>CAA</u>	-G	-A	<u>A</u>	-CT	<u>G</u>	---	-G	<u>G</u>	---	---
722	---	---	---	-T	<u>AC</u>	-C	-C	---	---	---	---	---

Fortsetzung nächste Seite

60											
ighv2-70-01	TAC	AGC	ACA	TCT	CTG	AAG	ACC	AGG	CTC	ACC	ATC
112	----	<u>-A-</u>	----	----	----	----	----	----	----	----	----
315	----	----	<u>-TG</u>	----	----	----	----	----	----	----	----
511	----	----	<u>C-</u>	----	----	----	----	----	----	----	----
814	----	<u>-A</u>	<u>--G</u>	----	----	----	<u>-G-</u>	----	----	<u>T-</u>	----
ighv4-61-01	TAC	AAC	CCC	TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA
123	----	----	----	----	<u>-G</u>	----	----	----	----	----	----
124	----	----	----	----	<u>-G</u>	----	----	<u>-G</u>	----	----	----
325	----	<u>-T</u>	<u>T-</u>	----	----	----	----	----	----	----	----
722	----	<u>-T</u>	----	<u>C-</u>	----	----	----	----	----	<u>G-</u>	<u>--G</u>
ighv2-70-01	TCC	AAG	GAC	ACC	TCC	AAA	AAC	CAG	GTG	GTC	CTT
112	----	----	----	----	----	----	----	----	<u>-A</u>	----	----
315	----	----	----	<u>C-</u>	----	----	----	----	<u>-A</u>	----	----
511	----	----	----	----	----	----	----	----	----	<u>C-</u>	----
814	----	----	----	----	----	----	----	<u>-A</u>	----	----	<u>-G</u>
ighv4-61-01	TCA	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG
123	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
124	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
325	----	<u>TA-</u>	----	----	----	----	----	----	----	----	----
722	<u>--G</u>	<u>A-T</u>	----	----	----	<u>T-</u>	----	----	<u>--T</u>	----	----
ighv2-70-01	ACA	ATG	ACC	AAC	ATG	GAC	CCT	GTG	GAC	ACA	GCC
112	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
315	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
511	----	----	----	----	----	----	<u>GTA</u>	<u>-C-</u>	----	----	----
814	----	<u>C-</u>	----	----	----	----	----	----	----	<u>-C</u>	----
ighv4-61-01	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	ACG	GCC
123	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
124	<u>-GA</u>	----	<u>G-</u>	----	----	<u>-T</u>	<u>-C</u>	<u>--A</u>	----	----	----
325	----	<u>T-</u>	<u>-C-</u>	----	<u>A-</u>	----	----	<u>-A</u>	----	----	----
722	<u>-GC</u>	<u>G-C</u>	<u>-A-</u>	----	----	----	----	----	----	----	----
97											
ighv2-70-01	ACG	TAT	TAC	TGT	GCA	...					
112	----	----	----	----	----	----					
315	----	----	----	----	----	----					
511	<u>--A</u>	<u>--C</u>	----	----	----	----					
814	<u>--C</u>	----	----	----	----	----					
ighv4-61-01	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	...					
123	----	----	----	----	----	----					
124	----	----	----	----	----	----					
325	----	<u>--G</u>	<u>--G</u>	----	<u>-G-</u>	----					
722	<u>A-A</u>	<u>--C</u>	----	----	----	----					

Abb. 7: exemplarische Gegenüberstellung von Sequenzen zur hotspot-Suche (unvollständig); Austauschmutationen unterstrichen, stille Mutationen nicht; Fettdruck: CDR-Regionen.

Es zeigt sich zum einen eine Häufung der Mutationen innerhalb der CDR-Regionen sowie der direkt anschließenden Abschnitte der FR-Regionen. Eine besondere Anfälligkeit gegenüber Mutationen beobachtet man bei einzelnen Basentriplets bzw. Aminosäuren. Dies sind im Keimbahngen V_H1-69 die Aminosäuren Ser31, Ala34, und Ser36, die beiden erstgenannten liegen in CDR1, die dritte im direkt folgenden Abschnitt der FR2-Region. Ein ähnliches Bild zeigt sich in V_H2-70*01 bei Ser31 (CDR1) und Ser61 (FR3) in 3-23*01 bei Ser32 (CDR1), Ala51 (FR2) und Ser58 (CDR2) sowie in 5-51*01 bei Ser29, Thr30, Ser31 (alle CDR1), Met49 (FR2), Tyr53 (CDR2), Gln66, Ser78 und Ser85 (alle FR3). In Sequenzen des Keimbahngens 4-61*01 können keine hotspots nachgewiesen werden, allerdings wurde hier auch die kleinste Anzahl an Sequenzen verglichen.

3.8 Einzelfallbetrachtungen einiger spezieller Sequenzen

Einige Sonderfälle in den Mutationen der verschiedenen Sequenzen sollen im Folgenden gesondert dargestellt werden.

3.8.1 Sequenzen ohne Auftreten von Austauschmutationen

Sechs der insgesamt 80 amplifizierten Sequenzen (Nr. 213, 311, 413, 415, 712 und 813) liegen in der Keimbahnkonfiguration vor oder weisen lediglich stumme Mutationen auf. Alle sechs Sequenzen stammen aus Antrumgewebe.

3.8.2 Mutationen, die zu einer Abbruchsequenz führen

In drei Sequenzen wurde jeweils ein Basenaustausch registriert, der zu einer Abbruchsequenz führt. Alle drei Sequenzen stammen aus Tumor-Gewebe (Nr. 222, 522 und 825). Das Abbruchkodon entstand einmal in FR2, einmal in CDR1 sowie einmal in FR3. Diese Mutationen wurden für die statistische Auswertung als Replacement-Mutationen gezählt.

3.8.3 Deletionen

In zwei Sequenzen konnte eine Deletion im Sinne eines Verlustes mehrerer Triplets nachgewiesen werden. Es handelt sich um den Verlust von drei Triplets

in der CDR2-Region einer Antrumsequenz sowie um den Verlust von zwei Triplets in der FR2-Region einer Tumorsequenz. Beide Sequenzen stammen aus Gewebe desselben Patienten (Fall #6, Nr. 611 und 623). Sie sind in Abb. 8 dargestellt.

3.8.4 Insertionen

Insertionen, also Einfügungen von Basentriplets, wurden in den amplifizierten Sequenzen nicht nachgewiesen.

Ergebnisse

ighv3-15-02 611	TCC CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC --- -- G --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
ighv3-15-02 611	ACT TTC AGT AAC GCC TGG ATG AGC TGG GTC CGC -- C --- --- -- GT --- --- --- --- --- --- --- ---
ighv3-15-02 611	CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT GGC --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -- C -
ighv3-15-02 611	CGT ATT AAA AGC AAA ACT GAT GGT GGG ACA ACA --- G -- --- GAA --- --- G -- ---
ighv3-15-02 611	GAC TAC GCT GCA CCC GTG AAA GGC AGA TTC ACC --- --- --- --- --- --- -- G - --- --- --- ---
ighv3-15-02 611	ATC TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG CTG TAT --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
ighv3-15-02 611	CTG CAA ATG AAC AGC CTG AAA ACC GAG GAC ... --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

ighv2-70-02 623	ACC CTC ACA CTG ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTC --- --- -- T - --- --- --- -- T -- C - --- --- ---
ighv2-70-02 623	TCA CTC AGC ACT AGT GGA ATG TGT GTG AGC TGG --- --- -- C - --- --- -- TG --- --- A -- -- C - GTC
ighv2-70-02 623	ATC CGT CAG CCC CCA GGG AAG GCC CTG GAG TGG -- G - -- CC --- -- T --- --- -- C --- ---
ighv2-70-02 623	CTT GCA CTC ATT GAT TGG GAT GAT GAT AAA TAC --- -- T --- --- A -- --- --- --- --- --- --- A - T
ighv2-70-02 623	TAC AGC ACA TCT CTG AAG ACC AGG CTC ACC ATC --- -- C - --- --- --- -- G - --- --- --- -- G -- ---
ighv2-70-02 623	TCC AAG GAC ACC TCC AAA AAC CAG GTG GTC CTT --- --- --- -- G --- --- --- --- --- --- ---
ighv2-70-02 623	ACA ATG ACC AAC ATG GAC CCT GTG GAC ACG ... -- A - --- --- --- --- -- A-T -- G --- -- G - -- A

**Abb. 8: Sequenzen, in denen eine Deletion nachgewiesen werden konnte;
Austauschmutationen unterstrichen, stille Mutationen nicht;
Fettdruck: CDR-Regionen; farbig: Deletionen.**

4 Diskussion

Maligne Tumoren sind das Ergebnis einer intensiven Wechselwirkung von spontan auftretenden Mutationen primär gesunder körpereigener Zellen und dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Die Entstehung eines Tumors ist dabei das Resultat zumindest teilweise erfolgreicher Tumor-Escape-Mechanismen, mit denen es dem malignen Prozess ausnahmsweise gelingt, sich der körpereigenen Immunabwehr zu entziehen (vgl. Kap. 1.4).

Unter diesem Aspekt wurden in der vorliegenden Arbeit die variablen Schwereketten Gene von gewebeständigen B-Lymphozyten aus Tumorgewebe und tumorfreiem Referenzgewebe von Patienten mit Magenkarzinom verglichen. Vergleichbare in-situ-Untersuchungen tumorinfiltrierender B-Lymphozyten sind bisher nur in geringer Anzahl veröffentlicht. Im Folgenden soll diskutiert werden, welche Bedeutung den im Ergebnisteil (Kap. 3) erläuterten nachweisbaren Unterschieden zukommt.

Entscheidende Unterschiede zwischen beiden Gewebetypen zeigen sich zum einen in der Häufigkeitsverteilung der vorkommenden Keimbahngene (Kap. 3.2 und 3.3). Darüber hinaus zeigen sich in Tumorgewebe gegenüber Antrum eine Häufung von Mutationen in allen IgV_H-Abschnitten mit entsprechend niedrigerer Homologie zum Keimbahngen, eine überproportionale Häufung von Austauschmutationen gegenüber stillen Mutationen, welche sich in einer höheren R:S-ratio ausdrückt, sowie ein Fehlen von IgV_H-Genen, die in der Keimbahnkonfiguration vorliegen oder zumindest eine starke Homologie aufweisen (Kap. 3.4).

Anhand der in Kap. 3.5 berechneten Mutationsanfälligkeit der IgV_H-Keimbahngene konnte in Kap. 3.6 gezeigt werden, dass alle aus Tumorgewebe extrahierten IgV_H-Sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit das Ergebnis von Antigenkontakt sind. Demgegenüber liegen in Antrumgewebe Sequenzen ohne Hinweis auf Affinitätsreifung vor, insbesondere eine Sequenz in der Keimbahnkonfiguration.

Durch den Vergleich von verschiedenen Sequenzen, die sich vom selben Keimbahngen ableiten (Kap. 3.7) konnten zwar gewisse identische Mutationsmuster nachgewiesen werden, allerdings wird deren Relevanz

bezüglich möglicherweise zugrundeliegenden Einflusses tumorspezifischer Antigene auf die Affinitätsreifung im Folgenden noch relativiert werden.

In Kap. 3.8 wurden einige Sonderfälle unter den amplifizierten Sequenzen vorgestellt.

Im Bereich der veränderten Häufigkeitsverteilung der nachgewiesenen Keimbahngene stellt sich als auffälligste Tatsache dar, dass Immunglobuline der Klasse V_{H3} in Tumorgewebe deutlich seltener nachweisbar sind, als erwartet, und als dies in Antrumgewebe der Fall ist. Bemerkenswert ist dies insbesondere aufgrund der Tatsache, dass nahezu alle in der Vergangenheit nachgewiesenen natürlichen IgM-Antikörper mit Anti-Tumor-Aktivität V_H -Gene aus der V_{H3} -Familie beinhalten [BRÄNDLEIN et al., 2003a]. Auch die weitere Charakterisierung der amplifizierten Sequenzen hinsichtlich ihrer Keimbahngenzugehörigkeit in Kap. 3.3 ist diesbezüglich auffällig. Die häufigsten bei natürlichen Anti-Tumor-IgM-Antikörpern nachgewiesenen Gene sind 3/23*01 (DP-47) und 3/30-3.30-5*01 (DP-49) [BRÄNDLEIN et al., 2003a; VOLLMERS, BRÄNDLEIN, 2006]. Insbesondere findet DP-49 Verwendung bei dem spezifisch gegen Magenkarzinomzellen gerichteten Antikörper SC-1 [VOLLMERS et al., 1998b]. V_H3 -Gene wie DP-49 waren bereits in der Vergangenheit gehäuft in Immunglobulinen aus Magenschleimhaut-assoziierten Lymphozyten von Patienten mit Gastritis und Magenkarzinomen beschrieben worden [HENSEL et al., 1999b], so dass deren Nachweis in Antrumgewebe von Magenkarzinompatienten im Rahmen dieser Arbeit nicht verwundert, wohl aber deren äußerst sporadisches Auftreten innerhalb des jetzt untersuchten Tumorgewebes. Unerwartet seltenes Auftreten von 3/23*01 (DP-47) in IgV_H Tumorgewebe infiltrierender Lymphozyten wurde auch schon bei invasiv-duktalem Mammakarzinomen beobachtet [SIMSA et al., 2005].

Das gehäufte Auftreten von IgV_{H5}, insbesondere 5/51*01, sowohl in Antrum- als auch Tumorgewebe ist möglicherweise auf eine höhere Affinität des V_{H5} -Primers während der nested-PCR zurückzuführen und auch in anderen Versuchsreihen, in denen mit denselben Primern gearbeitet wurde, beobachtet worden [GERHARD et al., 2002]. Eine Häufung von IgV_H der Klasse 5 wurde allerdings ebenfalls schon bei Immunglobulinen Tumor infiltrierender B-

Lymphozyten in invasiv-duktalem Mammakarzinomen beschrieben [NZULA et al., 2003; SIMSA et al., 2005].

Eine Häufung von IgV_{H4} in Tumorgewebe bei gleichzeitig breiter Diversität könnte einer Immunantwort auf tumorspezifische Oberflächenantigene entsprechen. So findet man in der Literatur IgV_{H4} bei Immunglobulinen mit Anti-Tumor-Aktivität, z. B. bei Mammakarzinomen [CORONELLA et al., 2002] und Melanomen [THOMAS et al., 1999].

Die deutlich erhöhte Rate an Punktmutationen, insbesondere Austauschmutationen, in den Sequenzen aus Tumorgewebe, welche eine deutlich niedrigere Homologie mit den Keimbahngenen mit sich bringt, als dies in Antrumgewebe der Fall ist, spricht in hohem Maße für eine abgelaufene Affinitätsreifung der nachgewiesenen IgV_H-Sequenzen [BEREK et al., 1991]. Die Fehlerrate der verwendeten taq-Polymerase von ca. 0,6-0,7/1000 bp ist bei der Länge der amplifizierten Sequenzen von unter 250 bp vernachlässigbar [CORONELLA et al., 2002].

Bei der Affinitätsreifung treten wie in Kap. 1.2.4 beschrieben in allen Abschnitten der variablen Schwereketten erhöhte Raten an Punktmutationen auf [JANEWAY et al., 2005]. Dementsprechend zeigt sich im Durchschnitt auch eine deutlich höhere R:S-ratio von 3,89 in Tumorgewebe, Werte von über 2,9 gelten als klarer Hinweis auf Affinitätsreifung [CHANG, CASALI, 1994].

Dies bestätigt sich durch die in Kap. 2.2.3.1 vorgestellte Berechnung der Wahrscheinlichkeit für das Zustandekommen der Mutationen ohne bzw. durch Antigenkontakt, also Affinitätsreifung. Die entsprechenden Ergebnisse wurden in Kap. 3.6 vorgestellt. Dass in Antrum und Tumor hoch affinitätsgereifte Immunglobuline exprimiert werden, verwundert insofern nicht, da in der Schleimhautbarriere des Magens eine intensive Auseinandersetzung des Immunsystems mit peroral aufgenommenen Mikroorganismen stattfindet (vgl. Kap. 1.3.1) [BERCHTOLD et al., 1999]. Zudem können chronische Entzündungsprozesse im Bereich der Magenschleimhaut eine Rolle spielen. Bei sechs der acht Patienten beschreibt der histo-pathologische Befund explizit eine chronische Gastritis. Bei zwei Patienten ist der Nachweis von *H. pylori*

beschrieben, bei weiteren vier kann eine *H. pylori*-Besiedlung anhand der histopathologischen Beurteilung nicht ausgeschlossen werden (vgl. Tab. 4).

Bekanntermaßen besitzen auch Magenkarzinomzellen an ihrer Oberfläche bestimmte Glykoproteine, die als antigene Determinante für die humorale Immunantwort dienen können [OKUYAMA et al., 1998; HENSEL et al., 1999a; BRÄNDLEIN et al., 2003b]. Allerdings kann hier lediglich eine primäre, IgM-vermittelte Immunantwort stattfinden, da posttranskriptionell modifizierte glykopeptidische Antigene, also oligosaccharidische Epitope, im Gegensatz zu reinen Peptiden nicht über T-Lymphozyten präsentiert werden können und somit nicht zu einer sekundären Immunantwort, also zur Hypermutation und Antikörperreifung führen [JANEWAY, 2001; BRÄNDLEIN, VOLLMERS, 2004a]. Die hochaffinen, hypermutierten Immunglobuline in Tumorgewebe können somit nicht gegen diese Glykoproteine, sondern allenfalls gegen andere tumorspezifische Antigene gerichtet sein. Solchermaßen affinitätsgereifte tumorspezifische Immunglobuline, in der Regel IgG, und ihre möglichen Zielantigene auf der Tumoroberfläche werden in der Literatur häufig diskutiert, u. a. für Malignome des Colons [MOSOLITS et al., 2002], des Pankreas [MAACKE et al., 2002; HONG et al., 2004], der Lunge [YASUDA et al., 2002, ICHIKI et al., 2004], der Mamma [HANSEN et al., 2001], der Cervix [O'BRIEN et al., 2001], sowie des Ovars [LUBORSKY et al., 2005]. Von ihnen leiten sich auch neue experimentelle adjuvante immunologische Therapieansätze ab [JÄGER, JÄGER, 2001; CARTER et al., 2004; LIN et al., 2005; VAISITTI et al., 2005]. Der Nachweis einer vielfältigen Anzahl hypermutierter Immunglobuline innerhalb eines im vorliegenden Fall klinisch manifesten, fortgeschrittenen Tumorprozesses legt allerdings nahe, dass es sich hierbei entweder um eine völlig tumor-unabhängige sekundäre Immunantwort oder gar eine autoimmunologische Aktivität oder um frustrane, unwirksame Abwehrversuche seitens des Immunsystems gegen rasch wechselnde Oberflächenstrukturen bei überwiegend resistentem Wachstumsverhalten des Tumors handelt [CHIOU et al., 2005]. Diese affinitätsgereiften Antikörper dürften im 3E-Modell von Dunn dann Residuen aus der als „Equilibrium“ bezeichneten Gleichgewichtsphase

der Immunantwort (vgl. Kap. 1.4) [DUNN, 2004a] entsprechen, der sich jedoch in diesem Fall der Tumor durch erfolgreiche Escape-Mechanismen entzogen hat. Umso bedeutsamer könnten demzufolge jedoch die Unterschiede zwischen Antrum und Tumor bezüglich nicht-affinitätsgereifter, also naiver Immunglobuline sein. Solche sind in gesundem Antrumgewebe von Magenkarzinompatienten eindeutig nachweisbar, innerhalb des manifesten Tumors dagegen nicht (vgl. Kap. 3.6). Wie in der Einleitung beschrieben ist für bestimmte keimbahnkodierte Immunglobuline eine Aktivität gegen tumorspezifische Antigene nachgewiesen. Dabei handelt es sich um posttranskriptionell modifizierte Carbohydrate auf der Oberfläche der Tumorzellen (vgl. Kap. 1.4), eine sekundäre Immunantwort ist aus den oben erläuterten Gründen allerdings nicht möglich. Möglicherweise sind die in Antrumgewebe nachgewiesenen keimbahnkodierten oder nur gering mutierten Immunglobuline also der entscheidende Bestandteil des Immunsystems, der mit wenigen Ausnahmen in der Regel effektiv die Entstehung eines Tumorprozesses verhindern kann. Dazu passt das gehäufte Auftreten von IgV_H3 in Antrumgewebe, dieser Genfamilie gehören bekanntlich die meisten naiven tumorspezifischen Antikörper an [BRÄNDLEIN et al., 2003a]. Die interessante Beobachtung in dieser Arbeit ist somit nicht das Fehlen von keimbahnkodierten Immunglobulinen innerhalb des Tumorprozesses, sondern die Tatsache, dass überall dort, wo kein Tumor vorliegt, eine solche immunologische Situation vorliegt, oder umgekehrt, nur dort, wo keine primäre Immunantwort in Form nicht-mutierter Immunglobuline nachweisbar ist, findet sich ein manifester Tumorprozess. Dabei kann man über die Mechanismen, mit denen sich der Tumor der primären humoralen Wachfunktion des Organismus (immunosurveillance) entzogen hat, nur spekulieren. Mögliche Escape-Mechanismen wurden in Kap. 1.4 bereits vorgestellt.

Im Hinblick auf die affinitätsgereiften Immunglobuline sollen jetzt noch die in Kap. 3.7 dargestellten Mutationsmuster diskutiert werden. Innerhalb der Sequenzen zeigen sich bestimmte Regionen bzw. Nukleotide, die besonders bevorzugt mutieren. Diese bezeichnet man in der englischsprachigen Literatur als „hotspots“ [WAGNER, NEUBERGER, 1996]. Allerdings handelt es sich in der

Mehrzahl der nachgewiesenen Fälle um sogenannte intrinsische hotspots, also Nukleotide, die unabhängig vom präsentierten Antigen, das die somatische Hypermutation bedingt, bevorzugt mutieren, wobei die Ursache im molekularen Prozess der Affinitätsreifung zu suchen ist [JOLLY et al., 1996, JACOBS, BROSS, 2001]. Schon in Kap. 1.2.4 war beschrieben worden, dass die Verteilung der Mutationen über die Immunglobulinsequenzen nicht nur die kodierenden Regionen der Immunglobuline [CHANG, CASALI, 1994], sondern darüber hinaus spezielle Nukleotide und Mutationsmuster bevorzugt [WAGNER, NEUBERGER, 1996; DÖRNER et al., 1997; DUNN-WALTERS et al., 1998a]. Hiervon zu unterscheiden sind Mutationsmuster, die von intrinsischen hotspots abgrenzbar auftreten und vermutlich durch den Einfluss von Antigenen bedingt sind [BETZ et al., 1993]. Die in Kap. 3.7 beschriebenen Nukleotide liegen allerdings praktisch alle im Bereich intrinsischer hotspots. Insbesondere die Häufung von Mutationen in Nukleotiden innerhalb der CDR-Regionen, die für die Aminosäure Serin kodieren, ist für Immunglobuline bereits bekannt [WAGNER et al., 1995; JOLLY et al., 1996].

Lediglich einige der in dieser Arbeit auffälligen Mutationsmuster in Sequenzen der IgV_H5/51*01 könnten antigenbedingt sein, allerdings ist die Unterscheidung von intrinsischen und antigenbedingten hotspots generell sehr schwierig [DUNN-WALTERS, SPENCER, 1998b]. Gerade von den nachgewiesenen IgV_H5/51*01 stammt ein Großteil der Sequenzen gerade aus Antrumgewebe, so dass der Einfluss von tumorspezifischen Antigenen hier äußerst unwahrscheinlich ist.

Innerhalb dreier Sequenzen aus Tumorgewebe traten infolge von Mutationen Abbruchkodons auf. Dies belegt, dass zumindest ein Teil der hier exprimierten hypermutierten Immunglobuline gar nicht funktionsfähig ist [SCHIFF et al., 1985]. Bekanntlich können während der Affinitätsreifung auch Insertionen oder Deletionen im Sinne von Einfügungen oder Verlustes ganzer Basentriplets auftreten [WILSON et al., 1998]. Sie bereichern das menschliche Antikörperreservoir durch erweiterte Diversität der gebildeten Immunglobuline [DE WILDT et al., 1999] und sind in naiven, nicht-affinitätsgereiften B-Lymphozyten nicht nachweisbar [GOOSSENS et al., 1998]. In den hier untersuchten Sequenzen traten keine Insertionen auf, allerdings konnten zwei

Deletionen nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.8.3), interessanterweise bei Sequenzen, die zwar demselben Patienten zuzuordnen sind, allerdings je eine aus Antrum- und Tumorgewebe, so dass auch hier der direkte Einfluss eines tumorspezifischen Antigens auf die Affinitätsreifung unwahrscheinlich ist.

Zusammengefasst ergeben sich also in der Tat in situ auf molekularer Ebene signifikante Unterschiede zwischen IgV_H aus Tumorgewebe und tumorfreiem Gewebe. Insbesondere der Nachweis von nicht-affinitätsgereiften naiven Immunglobulinen der primären Immunantwort in Antrumgewebe und deren Fehlen in Tumorgewebe, sowie die bei antitumoralen naiven humanen Antikörpern häufig nachgewiesene, hier innerhalb des Tumors deutlich unterrepräsentierte IgV_H3-Familie legen nahe, dass B-lymphozytäre naive Immunglobuline als Bestandteil der Immunüberwachung (immunosurveillance) Tumoren effektiv verhindern. Lediglich in Ausnahmefällen kann trotz funktionierender primärer humoraler Immunantwort durch nicht näher bekannte (Escape-) Mechanismen eine maligne entartete Zelle ausnahmsweise zu einem Tumorprozess heranwachsen. Zwar lässt der Nachweis stark affinitätsgereifter IgV_H innerhalb des Tumorgewebes Rückschlüsse auf eine intensive Auseinandersetzung des erworbenen Abwehrsystems im Sinne einer sekundären Immunantwort mit einer Vielzahl von antigenen Determinanten zu, seien diese tumorspezifisch oder nicht. Ihr Nachweis innerhalb eines manifesten Tumorprozesses legt aber nahe, dass sich das Karzinom in seinem Wachstumsverhalten, insbesondere aber seiner Immunogenität, dem Zugriff von zellulärer und humoraler Immunabwehr in diesem Stadium bereits entzogen hat.

Selbstverständlich bedürfen diese Hinweise der Untermauerung durch weitere Studien, insbesondere in Bezug auf die Mechanismen, mit denen sich der Tumorprozess der regulären Immunantwort entzieht. Entsprechende Ergebnisse könnten im Hinblick auf neue adjuvante immunologische Therapieverfahren von Bedeutung sein.

5 Zusammenfassung

Vor fast 100 Jahren postulierte Paul Ehrlich ein körpereigenes System, das in der Lage ist, Tumorentstehung zu erkennen und zu eliminieren. Die Weiterentwicklung dieser Hypothese führte in den Folgejahren zum Modell der „immunosurveillance“, einer angeborenen Wachfunktion des Immunsystems, welche im Regelfall die Entstehung von manifesten Tumoren verhindern kann. Neben zellulären Bestandteilen wie Makrophagen und natürlichen Killerzellen kommt dabei eine entscheidende Bedeutung den B-Lymphozyten mit ihrer Fähigkeit zur Produktion eines variablen Antikörperrepertoires zu. Diese angeborene, IgM-vermittelte, humorale Abwehrfunktion richtet sich insbesondere auch gegen glykopeptidische Oberflächenantigene maligner körpereigener Zellen.

Allerdings scheint sich in seltenen Einzelfällen ein Tumorprozess durch Fluchtmechanismen dem Zugriff der Immunabwehr entziehen zu können. Die intensiven Wechselwirkungen von Immunsystem und Tumorwachstum sind Ziel weitreichender Forschung geworden, angetrieben von der Hoffnung, in naher Zukunft neue immunologische Therapieverfahren gegen maligne Tumoren anbieten zu können. Bisher wenig untersucht ist allerdings die lokale Situation der humoralen Immunität innerhalb von Tumorgewebe.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Sequenzanalyse des exprimierten Immunglobulin-Repertoires in situ, also aus gewebeständigen tumorinfiltrierenden B-Lymphozyten und solchen aus tumorfreiem Gewebe vorgenommen. Als Ausgangsmaterial diente Gewebe aus Magenkarzinomen und tumorfreier Magenschleimhaut des Magenansatzes von acht Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung. Adenokarzinome des Magens stellen eine multifaktoriell bedingte, weltweit häufig auftretende Tumorentität mit besonders schlechter Prognose dar.

In der Tat zeigen sich in den vorliegenden Ergebnissen signifikante Unterschiede zwischen Tumor und Antrum in den variablen Schwerekettenregionen der gewebeständigen B-Lymphozyten. Diese betreffen sowohl die IgV_H-

Familienzugehörigkeit als auch die Mutationsraten und Mutationsmuster der einzelnen Sequenzen.

Die entscheidenden Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit sind der in situ-Nachweis von naiven, nicht immunitätsgereiften Immunglobulinen der primären Immunantwort, insbesondere der mit Antitumoraktivität in Verbindung gebrachten IgV_H3-Familie innerhalb des untersuchten Antrumgewebes sowie deren Fehlen innerhalb des Tumorprozesses. Der Nachweis affinitätsgereifter Immunglobuline innerhalb des Tumorprozesses legt eine zwar intensive, aber letztendlich ineffektive Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem sich offenbar in diesem Stadium nicht mehr als ausreichend immunogenen erweisenden Tumorprozess nahe.

Diese Ergebnisse heben die entscheidende Bedeutung der naiven Immunität für die Verhinderung von Tumoren (Immunüberwachung) hervor. Unklar sind allerdings nach wie vor die Escape-Mechanismen, die es einem Tumor erlauben, sich dieser primären Immunantwort zu entziehen.

Weitere Forschungsarbeit im Bereich naiver Immunglobuline mit Antitumoraktivität, wie beispielsweise dem selektiv an Magenkarzinomzellen bindenden und Apoptose auslösenden Antikörper SC-1, könnte dazu beitragen, zukünftig völlig neue adjuvante immunologische Therapieverfahren in der Tumorthherapie zu etablieren.

6 Literaturverzeichnis

Adam, J. K., Odhav, B., Bhoola, K. D.: Immune responses in cancer. *Pharmacol Ther*, 2003 Jul; **99(1)**:113-32

Bartsch, H., Ohshima, H., Pignatelli, B., Calmels, S.: Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. *Cancer Surv.*, 1989; **8(2)**:335-62

Basler, H.: Grundbegriffe der Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistischen Methodenlehre. 11. Auflage. Physica-Verlag, Heidelberg, 1994

Benedict, C. L., Gilfillan, S., Thai, T.-H., Kearney, J. F.: Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunol Rev*, 2000 Jun; **175**:150-7

Berchtold R., Hamelmann, H., Peiper H.-J., Trentz, O.: Chirurgie. 3. Auflage, Urban & Fischer, München, 1999

Berek, C., Berger, A., Apel, M.: Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, 1991 Dec 20; **67(6)**:1121-9

Betz, A. G., Neuberger, M. S., Milstein, C.: Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes. *Immunol Today*, 1993 Aug; **14(8)**:405-11

Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U.: Pathologie. Urban & Schwarzenberg, München, 1997

Boes, M.: Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol*, 2000 Dec; **37(18)**:1141-9

Bohn, J.: Are natural antibodies involved in tumour defence? *Immunol Lett*, 1999 Sep 1; **69(3)**:317-20

Brändlein, S., Pohle, T., Ruoff, N., Wozniak, E., Müller-Hermelink, H. K., Vollmers, H.-P.: Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res*, 2003a Nov 15; **63(22)**:7995-8005

Brändlein, S., Beyer, I., Eck, M., Bernhardt, W., Hensel, F., Müller-Hermelink, H. K., Vollmers, H.-P.: Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1. *Cancer Res*, 2003b May 1; **63(9)**:2052-61

Brändlein, S., Vollmers, H.-P.: Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity. *Histol Histopathol*, 2004a Jul; **19(3)**:897-905

Brändlein, S., Eck, M., Strobel, P., Wozniak, E., Müller-Hermelink, H. K., Hensel, F., Vollmers, H.-P.: PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors. *Hum Antibodies*, 2004b; **13(4)**:97-104

Brezinschek, H. P., Foster, S. J., Brezinschek, R. I., Dorner, T., Domiati-Saad, R., Lipsky, P. E.: Analysis of the human V_H gene repertoire. *J Clin Invest*, 1997 May 15; **99(10)**:2488-501

Burnet, F. M.: The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Exp*, 1970; **13**:1-27

Carter, P., Smith, L., Ryan, M.: Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocr Relat Cancer*, 2004 Dec; **11(4)**:659-87

Chan, A. O., Wong, B. C., Lam, S. K.: Gastric cancer: Past, present and future. *Can J Gastroenterol*, 2001 Jul.; **15(7)**: 469-74

Chang, B., Casali, P: The CDR1 sequences of a major proportion of human germline IgV_H genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunology Today*, 1994 Aug.; **15(8)**:367-73

Chen, H., Ward, M. J., Graubard, B. I., Heinemann, E. F., Markia, R. M., Potischman, N. A., Russell, R. M., Weisenburger, D. D., Tucker, K. L.: Dietary pattern and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Am J Clin Nutr*, 2002 Jan.; **75(1)**:137-44

Chiou, S. H., Sheu, B. C., Chang, W. C., Huang, S. C., Hong-Nerng, H.: Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies. *J Reprod Immunol*, 2005 Oct; **67(1-2)**:35-50

Classen, M., Diehl, V., Kocksieck, K.: Innere Medizin. 4. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, 1998

Clemens, A., Rademaekers, A., Spect, C., Kolsch, E.: The J558 V_H CDR3 region contributes little to antibody avidity. *Int Immunol*, 1998 Dec.; **10(12)**:1931-42

Cook, G. P., Tomlinson, I. M.: The human immunoglobulin V_H repertoire. *Immunology Today*, 1995 May; **16(5)**:237-42

Coronella, J. A., Spier, C., Welch, M., Trevor, K. T., Stopeck, A. T., Villar, H., Hersh, E. M.: Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Immunol*, 2002 Aug 15; **169(4)**:1829-36

Dörner, T., Brezinschek, H. P., Brezinschek, R. I., Foster, S. J., Domiati-Saad, R., Lipsky, P. E.: Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations within nonproductively rearranged human variable heavy chain genes. *J Immunol*, 1997 Mar 15; **158(6)**:2779-89

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., Schreiber, R. D.: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 2002 Nov; **3(11)**:991-8

Dunn, G. P., Old, L. J., Schreiber, R. D.: The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, 2004a; **22**:329-60

Dunn, G. P., Old, L. J., Schreiber, R. D.: The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 2004b Aug; **21(2)**:137-48

Dunn-Walters, D. K., Dogan, A., Boursier, L., MacDonald, C. M., Spencer, J.: Base-specific sequences that bias somatic hypermutation deduced by analysis of out-of-frame human IgV_H genes. *The Journal of Immunology*, 1998a; **160**:2360-4

Dunn-Walters, D. K., Spencer, J.: Strong intrinsic biases towards mutation and conservation of bases in human IgV_H genes during somatic hypermutation prevent statistical analysis of antigen selection. *Immunology*, 1998b Nov; **95(3)**:339-45

Egea, G., Francí, C., Gambús, G., Lesuffleur, T., Zweibaum, A., Real, F. X.: cis-Golgi resident proteins and O-glycans are abnormally compartmentalized in the RER of colon cancer cells. *J Cell Sci*, 1993 Jul; **105 (Pt. 3)**:819-30

Ehrlich, P.: Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk*, 1909; **5(1)**:273-90

Gallo, A, Cha, C.: Updates on esophageal and gastric cancers. *World J Gastroenterol*, 2006 May 28; **12(20)**:3237-42

Gerhard, N., Krenn, V., Magalhaes, R., Morawietz, L., Brändlein, S., König, A.: IgV_H genes analysis from psoriatic arthritis shows involvement of antigen-activated synovial B-lymphocytes. *Z Rheumatol*, 2002 Dec; **61(6)**:718-27

Girardin, S. E., Philpott, D. J.: Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur J Immunol*, 2004 Jul; **34(7)**:1777-82

Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A.: Immunology. 4th edition, Freeman, New York, 2000

Goossens, T., Klein, U., Küppers, R.: Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998 Mar 3; **95(5)**:2463-8

Hanisch, F. G., Stadie, T. R., Deutzmann, F., Peter-Katalinic, J.: MUC-1 glycoforms in breast cancer - cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur J Biochem*, 1996 Feb 15; **236(1)**:318-27

Hansen, M. H., Nielsen, H., Ditzel, H. J.: The tumor infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001 Oct 23; **98(22)**:12659-64

Hensel, F., Hermann, R., Schubert, C., Abe, N., Schmidt, K., Franke, A., Shevchenko, A., Mann, M., Müller-Hermelink, H. K., Vollmers, H.-P.: Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-

accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res*, 1999a Oct 15; **59(20)**:5299-306

Hensel, F., Knörr, C., Hermann, R., Krenn, V., Müller-Hermelink, H. K., Vollmers, H.-P.: Mitogenic autoantibodies in Helicobacter pylori-associated stomach cancerogenesis. *Int J Cancer*, 1999b; **81**:229-35

Hensel, F., Hermann, R., Brändlein, S., Krenn, V., Schmausser, B., Geis, S., Müller-Hermelink, H. K., Vollmers, H.-P.: Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis. *Lab Invest*, 2001 Nov; **81(11)**:1553-63

Hong, S.-H., Misek, D. E., Wang, H., Puravs, E., Giordano, T. J., Greenson, J. K., Brenner, D. E., Simeone, D. M., Logsdon, C. D., Hanash, S. M.: An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer. *Cancer Res*, 2004 Aug 1; **64(15)**:5504-10

Ichiki, Y., Takenoyama, M., Mizukami, M., So, T., Sugaya, M., Yasuda, M., So, T., Hanagiri, T., Sugio, K., Yasumoto, K.: Simultaneous cellular and humoral immune response against p53 in a patient with lung cancer. *J Immunol*, 2004 Apr 15; **172(8)**:4844-50

Illert, B., Otto, C., Vollmers, H.-P., Hensel, F., Thiede, A., Timmermann, W.: Human antibody SC-1 reduces disseminated tumor cells in nude mice with human gastric carcinoma. *Oncol Rep*, 2005 Apr; **13(4)**:765-70

Jacobs, H., Bross, L.: Towards an understanding of somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol*, 2001 Apr; **13(2)**:208-18

Jäger, D., Jäger, E., Knuth, A.: Immune responses to tumour antigens: implications for antigen-specific immunotherapy of cancer. *J Clin Pathol*, 2001 Sep; **54(9)**:669-74

Jakóbiśiak, M., Lasek, W., Gołęb, J.: Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett*, 2003 Dec 15; **90(2-3)**:103-22

Janeway, C. A. jr.: How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001 Jun 19; **98(13)**:7461-8

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomichik, M. J.: Immunobiology. The immune system in health and disease. 6th edition, Garland Science, New York, 2005

Jolly, C. J., Wagner, S. D., Rada, C., Klix, N., Milstein, C., Neuberger, M. S.: The targeting of somatic mutation. *Semin Immunol*, 1996 Jun; **8(3)**:159-68

Jukes, T. H., King, J. L.: Evolutionary nucleotide replacements in DNA. *Nature*, 1979 Oct.; **281(5732)**:605-6

Karlson, P., Doenecke D., Koolman J.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Auflage, Thieme, Stuttgart, 1994

Khong, H. T., Restifo, N. P.: Natural selection of tumor variants in the generation of „tumor escape“ phenotypes. *Nat Immunol*, 2002 Nov; **3(11)**:999-1005

Knörr, C. H.: Untersuchungen zu den Mechanismen in der Entwicklung maligner B-Zell-Lymphome vom mukosaassoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) - Typ. Naturwissenschaftliche Dissertationsarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2000

Koda, K., Nakajima, N., Saito, N., Yasutomi, J., McKnight, M. E., Glassy, M. C.: A human natural antibody to adenocarcinoma that inhibits tumour cell migration. *Br J Cancer*, 1998 Nov; **78(10)**:1313-22

Koyama, S., Maruyama, T., Adachi, S., Nozue, M.: Expression of costimulatory molecules, B7-1 and B7-2 on human gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1998; **124**: 383-8

Küppers, R., Zhao, M., Rajewski, K., Hansmann, M. L.: Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 1993 Jul; **143(1)**:230-9

Liakatos, A., Kunz, H.: Synthetic glycopeptides for the development of cancer vaccines. *Curr Opin Mol Ther*, 2007 Feb; **9(1)**:35-44

Lim, L., Michael, M., Mann, G. B., Leong, T.: Adjuvant therapy in gastric cancer. *J Clin Oncol*, 2005; **23**:6220-32

Lin, M. Z., Teittel, M. A., Schiller, G. J.: The evolution of antibodies into versatile tumor-targeting agents. *Clin Cancer Res*, 2005 Jan 1; **11(1)**:129-38

Lo, Y. M., Chan, W. Y., Ng, E. K., Chan, L. Y., Lai, P. B., Tam, J. S., Chung, S. C.: Circulating Epstein-Barr virus DNA in the serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2001 Jul; **7(7)**:1856-9

Luborsky, J. L., Barua, A., Shatavi, S. V., Kebede, T., Abramowicz, J., Rotmensch, J.: Anti-tumor antibodies in ovarian cancer. *Am J Reprod Immunol*, 2005 Aug; **54(2)**:55-62

Maacke, H., Hundertmark, C., Miska, S., Voss, M., Kalthoff, H., Sturzbecher, H. W.: Autoantibodies in sera of pancreatic cancer patients identify recombinant factor Rad51 as a tumour-associated antigen. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002 Apr; **128(4)**:219-22

Machida-Montani, A., Sasazuki, S., Inoue, M., Natsukawa, S., Shaura, K., Koizumi, Y., Kasuga, Y., Hanaoka, T., Tsugane, S.: Association of Helicobacter

pylori infection and environmental factors in non-cardia gastric cancer in Japan. *Gastric Cancer*, 2004; **7(1)**:46-53

Majima, T., Ichikura, T., Chochi, K., Kawabata, T., Tsujimoto, H., Sugasawa, H., Kuranaga, N., Takayama, E., Kinoshita, M., Hiraide, H., Seki, S., Mochizuki, H.: Exploitation of interleukin-18 by gastric cancers for their growth and evasion of host immunity. *Int J Cancer*, 2006 Jan 15; **118(2)**:388-95

Mapara, M. Y., Sykes, M.: Tolerance and cancer: Mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol*, 2004 Mar 15; **22(6)**:1136-51

Marks, J. D., Tristem, M., Karpas, A., Winter, G.: Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur J Immunol*, 1991 Apr; **21(4)**:985-91

Mayne, S. T., Risch, H. A., Dubrow, R., Chow, W. H., Jammon, M. D., Vaughan, T. L., Farrow, D. C., Schoenberg, J. B., Stanford, J. L., Ahsan, H., West, A. B., Rotterdam, H., Blot, W. J.: Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001 Oct.; **10(10)**:1055-62

Mosolits, S., Steinitz, M., Harmenberg, U., Ruden, U., Eriksson, E., Mellstedt, H., Fagerberg, J.: Immunogenic regions of the GA733-2 tumour-associated antigen recognized by autoantibodies of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2002 Jun; **51(4)**:209-18

Murakami, K., Kodama, M., Fujioka T.: Latest insights into the effect of Helicobacter pylori infection on gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 2006 May 7; **12(17)**:2713-20

Nagorsen, D., Scheibenbogen, C., Marincola F. M., Letsch, A., Keilholz, U.: Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res*, 2003 Oct 1; **9(12)**:4296-303

Nakamura, Y., Yamazaki, K., Oizumi, S., Nakashima, M., Watanabe, T., Dosaka-Akita, H., Nishimura, M.: Expression of RCAS1 in human gastric carcinoma: A potential mechanism of immune escape. *Cancer Sci*, 2004 Mar; **95(3)**:260-5

Nzula, S., Going, J. J., Stott, D. I.: Antigen-driven clonal proliferation, somatic hypermutation, and selection of B lymphocytes infiltrating human ductal breast carcinomas. *Cancer Res*, 2003 Jun 15; **63(12)**:3275-80

O'Brien, P. M., Tsimonaki, E., Coomber, D. W., Millan, D. W., Davis, J. A., Campo, M. S.: Immunoglobulin genes expressed by B-lymphocytes infiltrating cervical carcinomas show evidence of antigen-driven selection. *Cancer Immunol Immunother*, 2001 Dec; **50(10)**:523-32

Okuyama, T., Maehara, Y., Kakeji, Y., Tsujitani, S., Korenaga, D., Sugimachi, K.: Interrelation between tumor-associated cell surface glycoprotein and host immune response in gastric carcinoma patients. *Cancer*, 1998 Apr 15; **82(8)**:1468-75

Pawelec, G.: Tumor escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol Immunother*, 2004 Mar; **53(3)**:262-74

Piemonti, L., Zerbi, A., Di Carlo, V.: Strategies for tumor immune escape. *Drugs Today (Barc)*, 2003 Sep; **39(9)**:701-24

Potter, J. D., Ulrich, C. M.: COX-2 and gastric cancer: More on inflammation and neoplasia. *Gastroenterology*, 2006 Jun; **130(7)**:2198-200

Riboli, E., Norat, T.: Cancer prevention and diet: opportunities in Europe. *Public Health Nutr*, 2001 Apr.; **4(2B)**:475-84

Saito, H., Tsujitani, S., Oka, S., Kondo, A., Ikeguchi, M., Maeta, M., Kaibara, N.: The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer*, 1999 Oct 15; **86(8)**:1455-62

Schiff, C., Milili, M., Fougereau, M.: Functional and pseudogenes are similarly organized and may equally contribute to the extensive diversity of the IgV_{HIII} family. *EMBO J*, 1985 May; **4(5)**:1125-30

Schmidt, R. F., Thews, G. (Hrsg.): Physiologie des Menschen. 25. Auflage, Springer, Berlin, 1993

Sevier, E. D., David, G. S., Martinis, J., Desmond, D. J., Bartholomew, R. M., Wang, R.: Monoclonal antibodies in clinical immunology. *Clin Chem*, 1981 Nov; **27(11)**:1797-806

Simsa, P., Teillaud, J.-L., Stott, T. I., Tóth, J., Kotlan, B.: Tumor-infiltrating B cell immunoglobulin variable region gene usage in invasive ductal breast carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 2005; **11(2)**:92-7

Sinkovics, J. G., Dreesman, G. R.: Monoclonal antibodies of hybridomas. *Rev Infect Dis*, 1983 Jan-Feb; **5(1)**:9-34

Smyth, M. J., Dunn, G. P., Schreiber, R. D.: Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*, 2006; **90**:1-50

Soloski, M. J.: Recognition of tumor cells by the innate immune system. *Curr Opin Immunol*, 2001 Apr; **13(2)**:154-62

Stewart, A. K., Schwartz, R. S.: Immunglobulin V regions and the B cell. *Blood*, 1994; **83(7)**:1717-30

Takada, K.: Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2000; **53**:255-61

Thomas M. D., Clough, K., Melamed, M. D., Stevenson, F. K., Chapman, C. J., Spellerberg, M. B., Potter, K. N., Newton-Bishop, J. A., Gregson, N., Dawson, K.: A human monoclonal antibody encoded by the V4-34 gene segment recognises melanoma-associated ganglioside via CDR3 and FWR1. *Hum Antibodies*, 1999; **9(12)**:95-106

Tomlinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B., Winter, G.: The repertoire of human germline V_H sequences reveals about fifty groups of V_H segments with different hypervariable loops. *J Mol Biol*, 1992 Oct. 5; **227(3)**:776-98

Toubi, E., Shoenfeld, Y.: Protective autoimmunity in cancer. *Oncol Rep*, 2007 Jan; **17(1)**:245-51

Turner, G. A.: N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clin Chim Acta*, 1992 Jun 30; **208(3)**:149-71

Vaisitti, T., Deaglio, S., Malavasi, F.: Cationization of monoclonal antibodies: another step towards the „magic bullet“? *J Biol Regul Homeost Agents*, 2005 Jul-Dec; **19(3-4)**:105-12

Vollmers, H.-P., O'Connor, R., Müller, J., Kirchner, T., Müller-Hermelink, H. K.: SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells. *Cancer Res*, 1989 May 1; **49(9)**:2471-6

Vollmers, H.-P., Hensel, F., Hermann, R., Dämmrich, J., Wozniak, E., Gessner, P., Herrmann, B., Zimmermann, U., Müller-Hermelink, H. K.: Tumor-specific apoptosis induced by the human monoclonal antibody SC-1: A new therapeutical approach for stomach cancer. *Oncology Reports*, 1998a Jan.-Feb.; **5(1)**:35-40

Vollmers, H.-P., Zimmermann, U., Krenn, V., Timmermann, W., Illert, B., Hensel, F., Herrmann, R., Thiede, A., Wilhelm, M., Rückle-Lanz, H., Reindl, L., Müller-Hermelink, H. K.: Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: first clinical and histopathological results. *Oncology Reports*, 1998b May-Jun; **5(3)**:549-52

Vollmers, H.-P., Timmermann, W., Hensel, F., Illert, B., Thiede, A., Müller-Hermelink, H. K.: Adjuvant immunotherapy of stomach carcinoma with antibody-induced apoptosis. *Zentralbl Chir*, 2000; **125 Suppl 1**:37-40

Vollmers, H.-P., Brändlein, S.: Nature's best weapons to fight cancer. Revival of human monoclonal IgM antibodies. *Hum Antibodies*, 2002; **11(4)**:131-42

Vollmers, H.-P., Brändlein, S.: The „early birds“: natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histol Histopathol*, 2005 Jul; **20(3)**:927-37

Vollmers, H.-P., Brändlein, S.: Natural IgM antibodies: The orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006 Aug 7; **58(5-6)**:755-65

Wagner, S. D., Milstein, C., Neuberger, M. S.: Codon bias targets mutation. *Nature*, 1995 Aug 31; **376(6543)**:732

Wagner, S. D., Neuberger, M. S.: Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol*, 1996; **14**:441-57

Weck, M. N., Brenner, H.: Prevalence of chronic atrophic gastritis in different parts of the world. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006 Jun; **15(6)**:1083-94

de Wildt, R. M., van Venrooij, W. J., Winter, G., Hoet, R. M., Tomlinson, I. M.: Somatic insertions and deletions shape the human antibody repertoire. *J Mol Biol*, 1999 Dec 3; **294(3)**:701-10

Wilson, P. C., de Bouteiller, O., Liu, Y.-J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J. D., Pascual, V.: Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med*, 1998 Jan 5; **187(1)**:59-70

Winter, G., Milstein, C.: Man-made antibodies. *Nature*, 1991 Jan 24; **349(6307)**:293-9

Yasuda, M., Takenoyama, M., Obata, Y., Sugaya, M., So, T., Hanagiri, T., Sugio, K., Yasumoto, K.: Tumor-infiltrating B lymphocytes as a potential source of identifying tumor antigen in human lung cancer. *Cancer Res*, 2002 Mar 15; **62(6)**:1751-6

Zheng, H.-C., Sun, J.-M., Wei, Z.-L., Yang, X.-F., Zhang, Y.-C., Xin, Y.: Expression of Fas ligand and Caspase-3 contributes to formation of immune escape in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2003; **9(7)**:1415-20

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Vollmers für die Überlassung des Themas und die freundliche und faire Behandlung.

Herrn Prof. Dr. H. K. Müller-Hermelink danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Frank Hensel, unter dessen Betreuung die Laborarbeit durchgeführt wurde, danke ich für die zahlreichen Anregungen und Tipps sowie für die stete Bereitschaft zu lehrreichen Diskussionen.

Frau Dr. Stephanie Brändlein danke ich für die aufopferungsvolle Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit, für ihr Engagement und ihre Fähigkeit, in jeder Situation einen guten Rat zur Verfügung zu haben. Durch ihre Unterstützung hat sie wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau Tina Pohle, Frau Nele Ruoff und Frau Ewa Wozniak möchte ich mich ganz herzlich für die Einweisung in die verschiedenen Techniken der Laborarbeit und den Umgang mit dem Kryostaten sowie für ihre grenzenlose Geduld und Unterstützung bedanken.

Herrn Dr. Carsten Schmitt gilt mein Dank für seine Versuchsprotokolle.

Herrn Dr. Mathias Eck danke ich für die Bestätigung der histologischen Befunde.

Herrn Dr. Sergej Tchuvpilo sei für die Durchführung der automatischen Sequenzierung gedankt.

Bei Teresa Haase möchte ich mich für ihre Motivationsschübe, ihre Geduld und das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich noch bei allen bedanken, die bislang nicht genannt wurden, aber direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit „Molekulare Analyse der humoralen Immunität beim Magenkarzinom“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Würzburg, den 01.10.2007

Lebenslauf

Name: Stefan Reiß
Geburtsdatum: 30.05.1976
Geburtsort: Bad Neustadt a. d. Saale
Eltern: Dr. Wolfgang Reiß, Allgemeinarzt
Anneliese Reiß, Gymnasiallehrerin
Geschwister: 2 jüngere Schwestern, 2 jüngere Brüder

Schulbildung:

09/1982-08/1986 Grund- und Verbandschule Salz
09/1986-06/1995 Rhön-Gymnasium Bad Neustadt a. d. Saale
06/1995 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienst:

07/1995 bis 04/1996 im Sanitätsdienst der Bundeswehr

Studium:

04/1996 bis 11/2002 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
04/1998 Ärztliche Vorprüfung
04/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07/1999-06/2001 wissenschaftliche Mitarbeit im Rahmen der Dissertation
bei Prof. Dr. Dr. H.-P. Vollmers, Institut für Pathologie
09/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2001-09/2002 Ausbildung im Praktischen Jahr an der Uniklinik Würzburg
10/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang:

01/2003-06/2004 Arzt im Praktikum in der Main-Klinik Ochsenfurt
01.07.2004 Approbation
07/2004-12/2005 Assistenzarzt in der Main-Klinik Ochsenfurt
seit 01/2006 Weiterbildungsassistent bei Dr. W. Herkert, Würzburg