

Aus der Medizinischen Universitätsklinik

Abteilung für Innere Medizin C

(Direktor Uni.-Prof. Dr. Dölken)

der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Prävalenz und Frequenz zirkulierender t(14;18)-positiver Zellen in gesunden Menschen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Naturwissenschaften in der Medizin

(Dr. rer. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2008

vorgelegt von: Tobias Berg

geb. am: 31.01.1980

in: Berlin

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Dölken (Hämatologie/Onkologie, Greifswald)

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Th. Schweder (Pharmazeutische Biotechnologie, Greifswald)

3. Gutachter: Prof. Dr. L. Uharek (Hämatologie/Onkologie, Berlin)

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Klinik für Innere Medizin C

Tag der Disputation: 13. Mai 2009

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil in folgender Publikation angenommen

Schüler, F.; Dölken, L.; Hirt, C.; Kiefer, T.; **Berg, T.**; Fusch, G.; Hoffmann, W.; Fusch, C.; Janz, S.; Rabkin, Ch. C.; Dölken, G. Prevalence and Frequency of Circulating t(14;18)-MBR Translocations Carrying Cells in Healthy Individuals. International Journal of Cancer

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Entwicklung einer normalen B-Zelle | 1 |
| 1.1.1 | Schwerketten-Genumlagerung | 2 |
| 1.1.2 | Somatische Hypermutationen | 3 |
| 1.2 | Epidemiologie und Klinik des folliculären Lymphoms | 5 |
| 1.3 | Pathogenese und Molekularbiologie des folliculären Lymphoms | 6 |
| 1.4 | Funktion des Bcl-2-Proteins | 8 |
| 1.5 | Bedeutung von Bcl-2 in der Pathogenese von folliculären Lymphomen | 11 |
| 1.6 | Mögliche Translokationsmechanismen | 12 |
| 1.7 | Zirkulierende t(14;18)-positive Zellen bei gesunden Individuen | 15 |
| 1.7.1 | Mögliche Risikofaktoren | 16 |
| 1.8 | Ziel der Arbeit | 19 |
| 2 | MATERIALIEN | 21 |
| 2.1 | Geräte | 21 |
| 2.2 | Reagenzien und Chemikalien | 22 |
| 2.3 | Lösungen | 22 |
| 2.4 | Enzyme | 23 |
| 2.5 | Zelllinien | 23 |
| 2.5.1 | DOGKIT, DOGUM und GUMBUS | 23 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.5.2 | Karpas 422 | 24 |
| 2.6 | Computersoftware | 24 |
| 3 | METHODEN | 26 |
| 3.1 | Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMNC) | 26 |
| 3.2 | DNS-Präparation nach Gentra | 26 |
| 3.2.1 | Quantifizierung der DNS | 27 |
| 3.3 | Oligonukleotide | 28 |
| 3.3.1 | Primer der t(14;18)-PCR | 28 |
| 3.3.2 | Primer der K-ras Wild-Typ PCR | 28 |
| 3.3.3 | Sonden für die quantitative real-time PCR | 28 |
| 3.4 | TaqMan Polymerase-Kettenreaction (PCR) | 29 |
| 3.4.1 | Einführung in die Grundlagen der PCR | 29 |
| 3.4.2 | Quantifizierung von PCR Ergebnissen | 31 |
| 3.5 | PCR Methode zum Nachweis von t(14;18)-Translokationen | 32 |
| 3.5.1 | Quantitative real-time PCR | 32 |
| 3.5.2 | Temperatur-Zeit-Protokoll | 33 |
| 3.6 | Agarose-Gelelektrophorese | 34 |
| 3.6.1 | Probenvorbereitung | 34 |
| 3.6.2 | Durchführung der Elektrophorese | 34 |
| 3.7 | Herstellung von Plasmid-DNA Standards für die quantitative real-time PCR | 35 |
| 3.7.1 | Transformation und Selektion rekombinierter Bakterienklone | 35 |
| 3.7.2 | Durchführung der Klonierung | 36 |
| 3.8 | Sequenzanalysen | 39 |
| 3.8.1 | Theoretische Grundlagen | 39 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3.8.2 | Sequenzierung von t(14;18)-positiven PCR-Produkten | 40 |
| 3.9 | Sterilisierung von Lösungen und Nährmedien | 42 |
| 3.10 | Konzentrationsbestimmung von Proteinen | 42 |
| 3.11 | Diskontinuierliche SDS-PAGE | 42 |
| 3.11.1 | Western Blot | 43 |
| 3.12 | Allgemeine Methoden der Zellkultur | 45 |
| 3.13 | Elektroporation | 45 |
| 4 | ERGEBNISSE | 47 |
| 4.1 | Die Prävalenz von zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen bei gesunden Probanden | 47 |
| 4.2 | Die Frequenz von zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen bei gesunden Probanden | 49 |
| 4.3 | Verweildauer von t(14;18)-positiven Klonen | 51 |
| 4.4 | Auftreten der t(14;18)-positiven Zellen | 53 |
| 4.5 | Verteilung der BCL2/IgH-Bruchpunkte | 55 |
| 4.6 | Transfektion von B-Zelllinien | 58 |
| 4.6.1 | Transfektionsoptimierung | 58 |
| 4.6.2 | Selektion von transfizierten Zellen | 60 |
| 5 | DISKUSSION | 62 |
| 5.1 | t(14;18)-positive Zellen in gesunden Menschen | 62 |
| 5.2 | Prävalenz von zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen | 62 |
| 5.2.1 | Bcl-2-Genrearrangements bei Kindern | 63 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.3 | Die Frequenzen zirkulierender t(14;18)-positiver Zellen in gesunden Menschen | 65 |
| 5.4 | Persistenz von t(14;18)-positiven Zellklonen | 66 |
| 5.5 | Transfektion von B-Zelllinien | 68 |
| 5.6 | Ausblick | 70 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 72 |
| 7 | APPENDIX | 74 |
| 7.1 | Eidesstattliche Erklärung | 74 |
| 7.2 | Lebenslauf | 75 |
| 7.3 | Danksagung | 76 |
| 7.4 | Literaturverzeichnis | 77 |

1 Einleitung

Viele hämatologische Neoplasien sind durch typische chromosomale Aberrationen charakterisiert. Als Beispiele seien hier die t(9;22)-Translokation bei der chronisch myeloischen Leukämie, die t(11;14)-Translokation beim Mantelzelllymphom und die t(14;18)-Translokation beim folliculären Lymphom genannt.¹ Doch sind nicht alle Zellen, die eine chromosomale Translokation tragen, immer bösartig. Dies konnte bereits in Studien gezeigt werden, die mit Hilfe von PCR-basierten Techniken auch bei gesunden Individuen die Präsenz chromosomaler Translokationen nachgewiesen haben.^{2;3}

1.1 Entwicklung einer normalen B-Zelle

Zum besseren Verständnis der Lymphomgenese soll zunächst die Entwicklung einer normalen B-Zelle nachvollzogen werden. Die B-Zellen sind Träger der humoralen Immunantwort und bilden mit den T-Zellen zusammen den entscheidenden Bestandteil des lymphatischen Systems. Wenn ihr spezifischer Antikörper als Hauptbestandteil des B-Zell-Rezeptors mit einem Antigen Kontakt hatte, differenzieren sie zu Antikörper produzierenden Plasmazellen oder zu langlebigen Gedächtniszellen. Die Entwicklung der B- und T-Zellen findet in den primären lymphatischen Organen (Knochenmark bzw. Thymus) statt. Im Knochenmark entwickelt sich aus einer Pro-B-Zelle eine Prä-B-Zelle, die dann zu einer unreifen B-Zelle differenziert. Diese unreife B-Zelle verlässt das Knochenmark und gelangt in das periphere lymphatische System (Lymphknoten, Tonsillen, Milz), wo sie sich zu einer reifen B-Zelle entwickelt.

In den Lymphknoten entsteht nun eine aktivierte B-Zelle, die sich in das Keimzentrum begibt und zur Plasmazelle oder Gedächtniszelle ausdifferenziert. Die Schwerketten-

Genrearrangements, somatische Hypermutationen und Affinitätsreifung spielen in diesen Entwicklungsstufen eine bedeutende Rolle.

1.1.1 Schwerketten-Genumlagerung

Immunglobuline bestehen aus zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten, die sich aus variablen und konstanten Regionen zusammensetzen.

Beim Menschen ist das Schwerkettengen des Immunglobulins auf Chromosom 14 lokalisiert.⁴ Im menschlichen Genom existieren ca. 88 VH-Segmente, davon können 51 Segmente funktional umgelagert werden, während die restlichen Segmente ohne jede Funktion sind. Des Weiteren kommen noch 30 D-Segmente und 6 JH-Segmente hinzu.⁵ Die VH-Segmente lassen sich in 7 verschiedene Familien einteilen, innerhalb dieser betragen die Homologien der Nukleotidsequenzen mehr als 80 %.

Als ersten Schritt der Umlagerung des Schwerkettengens findet in der Phase der Pro-B-Zelle die irreversible Umlagerung eines der D-Segmente mit einem der JH-Segmente statt. In der späten Prä-B-Zelle lagert sich als nächstes eines der VH-Segmente um und beschließt den ersten Reifungsmechanismus der VDJ-Umlagerung. Während dieser Phase findet auch die Umlagerung der Leichtkettengene Kappa oder Lambda statt, bei denen eine variable VL-Region mit einem JL-Segment nach gleichem Muster verknüpft werden.⁶ Die Anlagerung der verschiedenen Segmente erfolgt nicht exakt. Zusätzliche Nukleotide können in den sogenannten N-Regionen eingefügt werden.⁷ Die Diversität beziehungsweise die Unterschiedlichkeit des jeweiligen Immunglobulins wird durch diesen Vorgang zusätzlich erhöht.

Die VH-Genregion besteht aus drei „Frame Work Regions“ (FR) und zwei „Complementary Determining Regions“ (CDR), wobei die zumeist konstante Region der JH-Segmente als FR4 bezeichnet wird. Dagegen bildet die sehr variable DH-Region mit den anliegenden N-

Regionen die so genannte CDR3-Region. Das D-Segment wird bei der Genumlagerung an beiden Enden verkürzt. Zur Diversität des Immunglobulinpools tragen die Ungenauigkeiten der Genumlagerung und der Einbau von N-Nukleotiden entscheidend bei.

Es kann davon ausgegangen werden, dass für einen bestimmten B-Zell-Klon die CDR3 spezifisch ist und diesen dadurch eindeutig identifiziert.^{8;9} Die Frame Work Regions sind aufgrund ihrer weitgehenden Homologien für die Auswahl von consensus PCR-Primern geeignet. Außerdem gibt es im Bereich der Frame Work Regions weniger Mutationen, da dieser Bereich für die Struktur und damit für die Funktion des Immunglobulin-Moleküls wichtig ist. Mutationen in diesem Bereich führen zu einem nicht funktionsfähigen Immunglobulin und die B-Zellen mit diesen nicht funktionsfähigen Immunglobulinen durchlaufen die Apoptose.

Verantwortlich für die Optimierung der Bindungsaffinität der Antikörper sind die hypervariablen CD-Regionen, weil sie weniger homolog sind.¹⁰

Bei den initialen Genumlagerungsprozessen der IgH-Regionen entstehen durch das zufällige Einfügen oder Entfernen von Basen häufig Verschiebungen des Leserasters oder sogar Stopp-Codons. Wird die Produktion eines Immunglobulins aus solch einem Grund verhindert, kommt es zur Umlagerung des zweiten Allels. Führt eine Umlagerung des zweiten Allels des Immunglobulin-Schwerkettengens zu keiner kodierenden Sequenz für einen funktionalen Antikörper, so wird in dieser B-Zelle die Apoptose ausgeführt.

1.1.2 Somatische Hypermutationen

Ein Teil der B-Zellen differenziert sich bei der primären Immunantwort unter Antigenstimulation mit Hilfe von T-Zellen zu kurzlebigen Plasmazellen, welche Antikörper mit einer relativ geringen Antigenpezifität produzieren. Durch somatische Hypermutationen erfolgt die weite-

re Diversifizierung, die in den Immunglobulinen der sich schneller teilenden Zentroblasten des Keimzentrums eines Lymphfollikels stattfinden. Diese Mutationen dienen der sogenannten Affinitätsreifung, die die Herstellung von Antikörpern mit höherer Affinität zum Ziel hat.

Die CDR sind sehr viel häufiger hypermutiert als die FR, da die CDR fast immer die antigenbindende Struktur darstellen. Man unterteilt die CDR nach ihrer Diversität in CDR1, 2 und 3. In der CDR1 sind vor allem somatische Hypermutationen für die Diversität der Basensequenzen verantwortlich. Die CDR2 ist unter den verschiedenen VH-Familien recht variabel und durch die ungenauen Umlagerungsprozesse in den N-Regionen erhält die CDR3 ihre Diversität.¹¹

Das Einbringen von somatischen Mutationen in das rearrangierte Immunglobulin erfolgt nicht zufällig. Es werden „hot spots“ bevorzugt, in denen Mutationen mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einer Änderung der Bindungsaffinität führen, als dies in anderen Regionen, den sogenannten „cold spots“, der Fall ist. B-Zellen mit Mutationen, die ungünstige Auswirkungen auf die Antikörperaffinität haben, erhalten keine Wachstumssignale von den Keimzentrums-T-Zellen und durchlaufen die Apoptose. Zentrozyten mit hoher Antikörperaffinität, die das durch follikuläre dendritische Zellen dargebotene Antigen binden können, werden vor der Apoptose durch die Interaktion mit T-Zellen, die CD40 L, IL-4 und IL-10 sezernieren, geschützt. Dies führt zur Proliferation der selektierten B-Zellen und die Zentrozyten entwickeln sich zu langlebigen Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen.¹²

Somatisch hypermutierte Zellen können als B-Gedächtniszellen im Blut zirkulieren oder sich nach einem Isotypenwechsel im Knochenmark als Plasmazelle niederlassen. Bei erneutem Antigenkontakt können sie außerdem wieder ins Keimzentrum eintreten, um zur Bildung von Antikörper mit höherer Affinität erneut somatisch mutiert zu werden.¹³⁻¹⁵

Außerhalb der Keimzentren können diese speziellen B-Zellen auch eine rasche Immunantwort aufbauen.¹⁶ Im Keimzentrum entstehen in der Regel mehrere Subklone hypermutierter B-Zellen, die eine ähnliche, aber nicht identische DNA-Sequenz des Immunglobulins besitzen. Diese B-Zellklone, die unter fortlaufender Diversifizierung durch Zellteilung im Keimzentrum entstanden sind, unterscheiden sich sowohl untereinander als auch gegenüber der Keimbahnsequenz.

Durch den weiteren Einbau somatischer Mutationen kommen diese fortgesetzten Mutationen während der Keimzentrumsreaktion zustande und sind für die intraklonale Diversität verantwortlich.¹⁷

1.2 Epidemiologie und Klinik des folliculären Lymphoms

Follikuläre Lymphome gehören zu den häufigsten Lymphomen in der westlichen Welt und machen etwa 30 % der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) aus. In Deutschland beträgt die Inzidenz jährlich sieben bis zehn Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und ist in den letzten drei Jahrzehnten stark angestiegen. In den vergangenen 20 Jahren wurde in den USA eine nahezu dreifache Steigerung der Erkrankungsrate festgestellt. Die im mittleren bis höheren Lebensalter (> 60 Jahre) bei Männern und Frauen gleich häufig festgestellten folliculären Lymphome sind durch ein langsames, disseminiertes Wachstum gekennzeichnet.

Das folliculäre Lymphom gehört in die Kategorie niedrige Malignität, die in der amerikanischen Literatur auch als indolent bezeichnet wird. Erst 1999 erfolgte eine einheitliche Einteilung in Form der international anerkannten neuen WHO (World Health Organization)-Klassifikation, die auf der REAL (Revised European American Lymphoma)-Klassifikation aufbaut und Unklarheiten beseitigt, die aufgrund der nicht kompatiblen und somit konkurrie-

renden Klassifikationsversuche zuvor aufgetreten waren.^{18;19} Dieser Einteilung liegen morphologische, immunologische, zytogenetische, molekularbiologische und klinische Befunde zugrunde. Sie teilt die folliculären Lymphome anhand des Prozentsatzes blastärer Zellen im Tumor in Grad I, II, IIIa und IIIb ein. Die folliculären Lymphome Grad I und II entsprechen dem zentroblastisch-zentrozytischen Lymphom, während das folliculäre Lymphom Grad III in der Kiel-Klassifikation als zentroblastisches Lymphom bezeichnet wurde.

Das klinische Bild wird hauptsächlich von drei Symptomenkomplexen bestimmt. Vergrößerung von Lymphknoten, Leber oder Milz; Knochenmarkinfiltration mit Verdrängung der normalen Hämatopoese sowie B-Symptome (Fieber über 38 °C, Nachtschweiß, Gewichtsverlust von mehr als 10 % des Körpergewichts in sechs Monaten). In den frühen Stadien werden charakteristischerweise am häufigsten zervikale, axilläre und inguinale Lymphknoten befallen, mediastinaler Lymphknotenbefall und leukämische Ausschwemmung sind dagegen selten. Typisch für den klinischen Verlauf der folliculären Lymphome ist eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes über Jahre bis Jahrzehnte.

1.3 Pathogenese und Molekularbiologie des folliculären Lymphoms

Die folliculären Non-Hodgkin-Lymphome sind eine Neoplasie einer Keimzentrumszelle, die von einer einzelnen, klonal expandierenden Zelle des lymphatischen Systems ausgeht. Die knotenförmigen Ausbreitungen der Tumorzellen folgen einem folliculären Wachstumsmuster und verdrängen die normale Lymphknotenstruktur.

Die t(14;18)-Translokation ist wahrscheinlich die primäre genetische Veränderung, die zusammen mit weiteren bisher nicht identifizierten genetischen Aberrationen zur Entstehung dieser Neoplasie führen.²⁰

Bei etwa 80 % der Patienten ist eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomensegmenten 14q32 und 18q21 nachweisbar.²¹ Bei der t(14;18)-Translokation ist das BCL2 Gen auf dem Chromosom 18q21 involviert, das in den Immunglobulin Schwerketten (IgH) Locus auf dem Chromosom 14q32 transloziert wurde.

Nahezu 60 % der Bruchpunkte im Bcl-2-Gen sind in einer 150bp Sequenz konzentriert vorzufinden, der sogenannten MBR (major breakpoint region), die in der 3'-untranslatierten Region des zweiten Exons des BCL2 Gens auf dem Chromosom 18q21 gefunden wurde.²² Weitere 8-15 % der Bruchpunkte konzentrieren sich in einer Region mit einer Größe von 500bp, mcr (minor cluster region) genannt, die sich 25kb abwärts von der MBR befindet.²³ Die Bruchpunkte auf dem Chromosom 14q32 wurden überwiegend in den Verbindungselementen (JH) des IgH Locus gefunden. Die Position der Bruchpunkte lässt auf einen irrtümlichen Rekombinationsprozess während eines frühen Stadiums der Pre-B-Zelldifferenzierung schließen, bei der die D und J Genelemente des IgH Locus umgeordnet werden.²⁴ Durch diese Translokation kommt das anti-apoptische BCL2 Gen unter die Kontrolle des IgH Enhancers, was eine konstitutive Expression eines strukturell intakten und funktionellen BCL2 Proteins zur Folge hat.²⁵ Solche Zellen haben einen Vorteil beim Überleben und eine erhöhte Chance, über einen längeren Zeitraum klonal zu expandieren.

In der Tat konnten McDonnell et al. an BCL2/IgH transgenen Mäusen nachweisen, dass B-Zellen anhaltend überlebten und ein Teil von den Mäusen (10 %) nach einer Latenzperiode maligne Lymphome entwickelten.²⁶ Dies deutet darauf hin, dass zur malignen Transformation neben der t(14;18)-Translokation weitere genetische Veränderungen notwendig sind. Der

Prozess der malignen Transformation scheint ein mehrstufiger Prozess im Lymphom zu sein. Daher kann die ausgeprägte chromosomale Aberration wie die t(14;18)-Translokation nur als einen ersten Schritt in der Transformation von einer normalen B-Zelle zu einer malignen Zelle angesehen werden. Dies unterstützt die Hypothese einer lange Latenzperiode zwischen dem ersten Auftreten der t(14;18)-Translokation und der Entwicklung eines folliculären Lymphoms in einem nur sehr kleinen Teil von Individuen, in der die t(14;18)-positiven B-Zellen multiple genetische Aberrationen akquirieren können.

1.4 Funktion des Bcl-2-Proteins

Das Bcl-2-Gen wurde als Onkogen 1985 durch genetische Analysen der chromosomalen Translokation, die charakteristisch für humane folliculäre Lymphome ist, entdeckt und ein Jahr später kloniert.²⁷ Das Besondere an diesem Onkogen ist, dass seine Fehlregulation nicht zu einem gesteigerten Zellwachstum führt, sondern den Zelltod unterdrückt und somit das Überleben der Zelle fördert.²⁸

Innerhalb der Zelle ist Bcl-2 an der zytosolischen Seite der äußeren mitochondrialen Membran, am endoplasmatischen Retikulum und an der Kernmembran lokalisiert. Wahrscheinlich ist es für die Membranintegrität durch Modulation des Ein- und Austritts von kleinen Molekülen und Proteinen verantwortlich. In Folge weiterführender Untersuchungen wurden später viele Gene beziehungsweise Proteine gefunden, die große Ähnlichkeiten zu Bcl-2 zeigen. Man fasste sie als Bcl-2-Familie zusammen (siehe Tab. 1, Seite 9).

Tab. 1: **Bcl-2-Proteinfamilie**

| pro-apoptotisch | anti-apoptotisch |
|------------------------|-------------------------|
| Bax | Bcl-2 |
| Bak | Bcl-X _L |
| Bad | Bcl-w |
| Bcl-X _S | Mcl-1 |
| Bid | A1 |
| Bik | |
| Harakiri | |

Die einzelnen Mitglieder, die man bisher in Säugetieren identifiziert hat, sind in Tab. 1 aufgelistet.²⁹ Die strukturelle Gemeinsamkeit besteht darin, dass alle Mitglieder mindestens eine der vier konservierten Motive, die unter dem Namen Bcl-2 Homologie-Domäne (BH1, BH2, BH3 und BH4) bekannt sind, besitzen.

Im Zusammenhang mit der Apoptose werden die Proteine in zwei Untergruppen eingeteilt. Eine Gruppe fördert die Apoptose, die andere wirkt dieser entgegen. Allgemein kann man sagen, dass die anti-apoptotisch wirkenden Proteine mindestens die BH1 und BH2 Domäne besitzen. Die BH3 Domäne ist unerlässlich für die Funktion der pro-apoptotischen Proteine.

Die Proteine der Bcl-2-Familie gehen bevorzugt Dimere ein, deren Bildung über die Domänen BH1-BH3 abläuft.³⁰ Es können sowohl Homo- als auch Heterodimere untereinander gebildet werden, wobei die Gewichtung auf den Heterodimeren liegt und die Art der Dimerbildung über ihre letztendliche Funktion entscheidet.

Ein favorisiertes Modell, das die Funktion der Heterodimere voraussagt, ist das Gleichgewichts-(Rheostat)-Modell. Hierbei ist das Verhältnis von Apoptose-Promotoren und -Inhibitoren in einer Zelllinie entscheidend für die Art der Umsetzung des an die Zelle kommenden Signals. Liegen in der gegebenen Zelle zum Beispiel mehr Bcl-2-Proteine (anti-apoptotisch) als Bax-Proteine (pro-apoptotisch, siehe Tab. 1) vor, so werden Heterodimere

zwischen Bcl-2 und Bax gebildet und der Zelltod wird unterdrückt. Umgekehrt, wenn mehr Bax vorhanden ist, werden Bax Homodimere gebildet, die die Zelle für apoptotische Stimuli empfänglich machen.³¹

Ein weiteres Modell besagt, dass Bcl-2/Bcl-x_L Heterodimere Apoptose inhibieren, weil sie die Assoziation von Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) mit Procaspase-9 oder Procaspase-3, Cytochrom C und ATP verhindern und so die Aktivierung der jeweiligen Procaspase blockieren.³²

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in Gegenwart von Bcl-2 kein Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird.^{33;34} Dieses Modell entstand, nachdem die dreidimensionale Struktur von Bcl-x_L aufgeklärt wurde.³⁵ Die Struktur vom Bcl-x_L besitzt große Ähnlichkeit zu bakteriellen Toxinen wie Diphterietoxin und Colicin, die bekanntermaßen Poren in Membranen formen können. Es gibt viele Hinweise, dass es während der Apoptose zum Abfall der mitochondrialen Membranspannung kommt und dass dadurch die äußere Mitochondrienmembran porös und durchlässig für Proteine wird.^{36;37} Daraus folgernd kann man sagen, dass Bcl-2 wahrscheinlich als eine Art Kanal/Pore den Ein- und Ausstrom von Ionen oder kleinen Molekülen so reguliert, dass die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran erhalten bleibt und Cytochrom C nicht austreten kann. Ein weiterer Regulationsmechanismus für die Proteine der Bcl-2-Familie ist die posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierung, die für Bcl-2 und Bad bekannt ist, aber nur für Bad gut beschrieben ist. Bcl-2 kann die Zelle vor dem Zelltod schützen, der durch unterschiedliche Stimuli wie UV-Strahlung, Hitzeschock, p53, c-myc, Calcium und Chemotherapeutika induziert wird.

1.5 Bedeutung von Bcl-2 in der Pathogenese von folliculären Lymphomen

Als einer der ersten setzten sich Vaux et al.³⁸ mit den biologischen Auswirkungen auseinander, die eine konstitutive, erhöhte Expression von Bcl-2 in Zellsystemen zeigten. Er konnte nachweisen, dass mit Bcl-2 transfizierte Knochenmarkszellen aus Mäusen erst autonom proliferieren und Merkmale malignen Wachstums zeigen, wenn diese Knochenmarkszellen zusätzlich mit einem die Zellproliferation fördernden Onkogen, in diesem Fall c-myc, transfiziert wurden. In Übereinstimmung damit zeigten wachstumsfaktorabhängige myeloische und lymphatische Zelllinien, die mit Bcl-2 allein transfiziert wurden, zwar ein gegenüber den nicht transfizierten Zellen längeres Überleben nach Entzug des Wachstumsfaktors, doch fand sich auch hier keine autonome, von Wachstumsfaktoren unabhängige Proliferation. Die Zellen verharrten ruhend im G₀-Stadium und traten erst nach erneuter Zugabe von Wachstumsfaktoren wieder in den Zellzyklus ein.

McDonnellet et al.²⁶ waren es schließlich, die ein Bcl-2-IgH-Fusionsminigen, wie es auch bei der t(14;18)-Translokation entsteht, in Mäusekeimzellen einbrachten, um anhand dieser Experimente das onkogene Potential der t(14;18)-Translokation abschätzen zu können. Die Mäuse wiesen anfänglich eine polyklonale folliculäre Lymphoproliferation auf, die sich im weiteren Verlauf histologisch als indolente folliculäre Hyperplasie präsentierte. Genauere Analysen zeigten, dass sich ruhende, IgM/IgD exprimierende B-Zellen spezifisch anreicherten, die zu 97 % in der G₀/G₁-Phase verharrten. So führte also nicht eine erhöhte Proliferation, sondern eine erhöhte Lebensdauer der einzelnen Zellen zur Lymphozytenakkumulation. Im weiteren Verlauf traten in den transgenen Tieren monoklonale Lymphome auf, vornehmlich vom diffusen, großzellig-immunoblastischen Typ. Allerdings deutete die lange Latenz, die Progression der ursprünglich polyklonalen Expansion zur monoklonalen Erkrankung und die histologische

Konversion auf sekundäre Veränderungen hin, die in den durch Bcl-2 vor der Apoptose geschützten Zellen letztlich zur Entstehung eines malignen Lymphom-Zellklones führten. Da ein synergistischer Effekt von Bcl-2 und c-myc beschrieben war, untersuchte man das Tumorgewebe auf c-myc-Rearrangements, die man tatsächlich bei ca. 50 % der diffusen immuno-blastischen Lymphome nachweisen konnte.

1.6 Mögliche Translokationsmechanismen

Bei der wechselseitigen t(14;18)-Translokation entsteht eine Verknüpfung des Bcl-2-Gens im Bereich des untranslatierten 3'-Anteils des dritten Exons mit einem J_H-Gen und konsekutiv ein chimäres Bcl-2/IgH Transkript. Durch die weiter 3' gelegenen E_μ-Enhancer des Immunglobulingenlokus wird dieses konstitutiv exprimiert. Andererseits wird der terminale Bereich von Chromosom 14 mit seiner V- und D-Region mit der 3'-Region des Bcl-2-Gens auf Chromosom 18 ligiert. Diese Befunde deuten trotz des zumeist reif erscheinenden Phänotyps der folliculären Lymphome darauf hin, dass die t(14;18)-Translokation im Prä-B-Stadium während des D-J-Rearrangements im Knochenmark im Verlauf der Differenzierung der B-Zellen stattfindet.^{39;40} Dass die Bruchpunkte innerhalb des Bcl-2-Gens in einer 150 bp langen „hot spot region“ innerhalb des MBR gebündelt vorliegen, lässt vermuten, dass es sich bei der t(14;18)-Translokation um einen nicht zufälligen Prozess handelt.^{22;25;27}

Dass das für die VDJ-Rekombination verantwortliche Enzymsystem in den Translokationsmechanismus verwickelt sein muss, schlossen Tsujimoto et al. aus der Tatsache, dass alle Bruchpunkte auf Chromosom 14 mit ihrem 5'-Ende innerhalb eines J_H-Segments liegen, dort wo die D-Segmente während der B-Zell-Reifung mit den J_H-Segmenten rekombiniert werden. In Übereinstimmung mit dem Mechanismus der VDJ-Rearrangierung, zeigen Sequenzanaly-

sen der Bcl-2/J_H-Fusionsregion (Chromosom 14) und der reziproken D_H/Bcl-2-Fusionsregion (Chromosom 18) die vermuteten Bruchstellen exakt an der Grenze zwischen den kodierenden Abschnitten und der Rekombination-Signalsequenzen (RSS).^{24;41-43} Diese Theorie wird für die Entstehung der Bruchpunkte innerhalb der Immunglobulinschwerkettengene allgemein akzeptiert.

Aber für die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen im Bereich des Bcl-2-Gens auf Chromosom 18 scheinen andere Mechanismen entscheidend zu sein. Die meisten Brüche in der MBR treten auf Chromosom 18, einer weit 3' gelegenen, untranslatierten Region des dritten Exons des Bcl-2 Gens, auf.

Von Wyatt et al. wurden innerhalb der MBR drei Cluster von jeweils 15 bis 20 bp Länge gefunden, in denen zwischen 80 % und 90 % der Bruchpunkte liegen. Trotz dieser auffälligen Clusterbildung der Bruchpunkte im Bcl-2 Gen war es nicht möglich RSS-Signalsequenzen, Erkennungssequenzen der VDJ-Rekombinase oder vergleichbare Sequenzen mit ähnlicher Struktur im Bereich der Bcl-2 Bruchpunktregionen zu finden. Dies lässt den Schluss zu, dass neben der VDJ-Rekombinase noch andere Mechanismen beteiligt sein müssen.^{44;45}

Da noch viele potentielle RSS-ähnlichen Sequenzen innerhalb der MBR unentdeckt sind, ist eine Beteiligung der VDJ-Rekombinase am Translokationsprozess der MBR-Translokationen weiter diskussionswürdig.⁴⁶

Ein G-reiches Oktamer am 5'-Ende der Bcl-2 MBR wird mit dem Translokationsmechanismus in Zusammenhang gebracht, das Homologien zu dem Aktivator prokaryotischer Rekombination (Chi-Element) und auch zu dem eukaryotischen „minisatellite-core“ zeigt.^{47;48} Dieses „Chi-like“ Element wurde innerhalb der MBR und MCR und in den D_H und J_H-Regionen ge-

funden.⁴⁹ Es wird vermutet, dass diese „Chi-like“ Elemente eine eigene Klasse von Signalsequenzen darstellen, die von dem VDJ-Rekombinase-Komplex erkannt werden.

Das von Jaeger et al. identifizierte 45 kD Protein (bp45) bindet an die „G“-reichen „chi-like“-Elemente am 5'-Ende der MBR und MCR. In weniger als 250 Nukleotiden Abstand von verschiedenen lymphomspezifischen Bruchpunkten lässt sich die minimale Bindungssequenz „GGGAGG“ finden. Das bp45 bindet an die Chi-Elemente aller vier an der t(14;18)-Translokation beteiligten Partner und wird im frühen B-Zell-Stadium exprimiert. Dies weist darauf hin, dass eine Protein-DNA-Interaktion direkt oder indirekt in den Translokationsprozess verwickelt sein könnte.

Für eine Zelle geht das Einführen neuer und fehlerhafter DNA-Sequenzen in das genomische Material mit einem hohen potentiellen Risiko einher. Wenige Mechanismen in Säugetierzellen verwenden dieses Prinzip. Ein sehr wichtiges Prinzip, bei dem eine fehlerhafte DNA-Synthese in Zellen stattfindet, ist der Mechanismus der somatischen Hypermutation.⁵⁰ Bei diesem Mechanismus sind nicht nur Einführungen von Punktmutationen und Deletionen beteiligt, sondern auch Duplikationen und Insertionen von Nukleotiden, deren Ursprung unbekannt ist.⁵¹⁻⁵³ Die t(14;18)-Translokation entsteht dabei in einem sekundären D_H/J_H-Rearrangement im Knochenmark. Dies wird mit der Beobachtung begründet, dass in t(14;18)-positiven Lymphomzellen im Gegensatz zu normalen B-Zellen normalerweise die am weitesten 5' gelegenen D_H- und die am weitesten 3' gelegenen J_H-Segmente in den Bruchpunktregionen nachweisbar sind.⁵⁴

Erkenntnisse über die Entstehung von t(11;14)-Translokation bei Mantelzelllymphomen bestätigen die Beobachtungen. Diese zeigen eine prozentuale Verteilung der in den Bruchpunktregionen nachzuweisenden D_H- und J_H-Gene auf, die mit denen von normalen B-Zellen vergleichbar sind. Sie weisen in der Regel auch keine somatischen Hypermutationen in den

Immunglobulinen auf, die in die t(11;14)-Translokation involviert sind. Dies ist ein Hinweis darauf, dass zu einem frühen Zeitpunkt der B-Zell-Entwicklung die t(11;14)-Translokation während der primären D-J-Rearrangierung außerhalb des follikulären Keimzentrums stattfindet.

Die Theorie des prägerminalen Ursprungs von Mantelzelllymphomen und des germinalen Ursprungs der follikulären Lymphome sind dadurch gut miteinander vereinbar. Zusätzlich gibt es den Hinweis, dass t(14;18)-Translokation im Knochenmark entstehen und die Prozesse VDJ-Rekombination sowie die somatische Hypermutation darin verwickelt sind.

1.7 Zirkulierende t(14;18)-positive Zellen bei gesunden Individuen

Die Gruppe um Limpens⁵⁵ konnte 1991 erstmals schlüssig demonstrieren, dass t(14;18)-positive Zellen mit Hilfe einer sensiblen nested PCR Technik auch in gesunden Individuen nachweisbar sind. Die Struktur der Translokationsfragmente waren identisch zu Translokationen bei follikulären Lymphomen bezüglich der Bruchpunkte in der Bcl-2-MBR und im D_H/J_H-Bereich des Immunglobulinschwerkettenlokus auf Chromosom 14q32.

Von mehreren Arbeitsgruppen wurden dann mit hoch sensitiven PCR-Methoden, die eine Nachweisgrenze von einer t(14;18)-positiven Zelle in 10⁵ beziehungsweise 10⁶ normalen Zellen hatten, bei 50-60 % der untersuchten gesunden Kontrollpersonen zirkulierende t(14;18)-positive Zellen nachgewiesen.⁵⁶⁻⁵⁸ Die Entdeckung, dass sich diese Translokation in den peripheren B-Zellen im Blut nachweisen lässt, war für Erkenntnisse über das Vorkommen von t(14;18)-positiven Zellen bei gesunden Personen von besonderer Bedeutung. Limpens et al. gelang es, in 6 von 9 Blutproben von gesunden Personen zwei bis fünf verschiedene klon-

spezifische t(14;18)-Fragmente zu amplifizieren und konnte zeigen, dass bei diesen mehrere verschiedene Klone zur gleichen Zeit bestehen können.⁵⁹

Eine Parallelstudie mit 26 t(14;18)-positiven Normalpersonen bestätigte diese Ergebnisse.⁶⁰ Bei einem Spender mit vier verschiedenen, spezifischen Translokationssequenzen konnten alle vier Klone kontinuierlich über einen Zeitraum von 6 Jahren zurückverfolgt werden. Diese Daten zeigten, dass multiple, verschiedene Klone über eine Periode bestehen können und dies nicht zwingend zur Entwicklung eines Lymphoms führte.

1.7.1 Mögliche Risikofaktoren

1.7.1.1 Assoziation mit dem Alter

Follikuläre Lymphome treten vor allem bei Personen über 60 Jahren auf und die Inzidenz bei Individuen unter 40 Jahren ist sehr gering. Daher wurden die Prävalenz und die Frequenz der t(14;18)-Translokation in gesunden Individuen unter Berücksichtigung des Alters in verschiedenen Studien untersucht.

Eine Studie von Liu et al. stellte eine statistisch signifikante Erhöhung in der Frequenz t(14;18)-positiver Zellen im peripheren Blut von Individuen gleich oder älter als 60 Jahre fest im Vergleich zu solchen, die 20 Jahre alt waren oder jünger.³ Von einer der t(14;18)-positiven Personen wurde fünf Monate später eine zweite Probe untersucht, die eine identische DNA Sequenz der Bruchpunktregionen im Vergleich zur vorherigen aufwies. Zum ersten Mal wurde die Persistenz eines t(14;18)-positiven Klons bei gesunden Normalpersonen über einen Zeitraum von 5 Monaten gezeigt.

Ji et al. konnte ebenfalls einen linearen Anstieg in der Proportion von Translokationen t(14;18)-positiver Personen als auch der Frequenz t(14;18)-positiven Zellen pro Individuum mit steigendem Alter nachweisen.²

In anderen großen Studien wurde kein Zusammenhang zwischen der Prävalenz der Bcl-2 Um-lagerung und dem Alter gefunden.^{57;60-63}

1.7.1.2 Geographische Verteilung

In den USA und Europa ist das folliculäre Lymphom nach dem diffus großzelligen B-Zelllymphom (DLBCL) der zweithäufigste Typ des Non-Hodgkin-Lymphoms, aber in Japan ist die Inzidenz relativ gering (<10 % aller NHL). Daher wurde die Prävalenz der t(14;18)-Translokation in einer epidemiologischen Studie bei 241 gesunden Japanern und 75 gesunden deutschen Probanden analysiert.⁶⁴ In 16 % der japanischen Proben und in 52 % der deutschen Proben ($p < 0.0001$) konnten t(14;18)- positive Zellen nachgewiesen werden. Die relative niedrige Inzidenz des folliculären Lymphoms in der japanischen Bevölkerung scheint mit der geringeren Prävalenz peripher zirkulierender t(14;18)-positiver Zellen zu korrelieren. Die t(14;18)-Translokation als einen molekularen Indikator für die Exposition gegenüber die DNA schädigende Stoffe zu verwenden, wurde von anderen Arbeitsgruppen untersucht.

1.7.1.3 Radioaktive Strahlung

Chromosomale Translokationen können durch radioaktive Strahlung induziert werden, wie man bereits bei der t(8;21)- und t(9;22)-Translokation in vivo bei menschlichen Zellen zeigen konnte.⁶⁵ Die Prävalenz der t(14;18)-Translokation lag bei 60,3 % in gesunden Arbeitern eines

Kernkraftwerkes, wo sie unterschiedlicher Dosen radioaktiver Strahlung ausgesetzt waren. Die höchste Strahlendosis lag bei 400 mSv. Statistisch gesehen ergab dies keinen Unterschied zu der Prävalenz von 55 % in einer Gruppe mit gleichaltrigen gesunden Probanden.⁵⁸ Darüber hinaus hatte die geringe radioaktive Strahlenaufnahme keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl zirkulierender t(14;18)-positiver Zellen als auch auf die Prävalenz multipler Translokationen.

1.7.1.4 Nikotinabusus

Die Resultate von den vorhergehenden epidemiologischen Studien, welche die Rolle des Zigarettenrauchens in der Ätiologie des Non-Hodgkin-Lymphoms untersuchten, sind widersprüchlich. Einige Studien berichteten von einer Assoziation zwischen Zigarettenrauchen und Non-Hodgkin-Erkrankung⁶⁶ und Mortalität,⁶⁷ andere wiederum sahen keine Zusammenhänge zwischen Rauchen und Non-Hodgkin-Lymphomen.⁶⁸

Eine Metaanalyse weiterer epidemiologischer Studien der Gruppe um Besson et al. zeigt signifikant, dass Zigarettenrauchen ein Risikofaktor für die Entwicklung eines follikulären Lymphoms sein könnte. In den einzelnen Studien, die sich mit der Frage befassten, ob die Assoziationen zwischen den Non-Hodgkin-Lymphomen und Rauchen bei den Subtypen dieser Erkrankungen variiert, konnte dies nicht hinreichend beantwortet werden.⁶⁹ Zwischen den Zeiträumen von 1978-1983 und 1990-1995 nahm die Inzidenz des follikulären Lymphoms um ca. 22 % unter Kaukasiern in den Vereinigten Staaten zu.⁷⁰ In einem ähnlichen Zeitraum stieg die Inzidenz des Non-Hodgkin-Lymphoms um 50 % auf der ganzen Welt.⁷¹ Im Gegensatz dazu nahm die Verbreitung des Zigarettenrauchens in den Industriestaaten in den letzten Jahren nicht zu und in einigen Staaten ging die Verbreitung sogar zurück.⁷²

Es scheint eher unwahrscheinlich, dass Zigarettenrauchen substantiell zur langfristigen Zunahme des Non-Hodgkin-Lymphoms beigetragen hat. Aber die Assoziation speziell zum follikulären Lymphom unterstützt die Möglichkeit, dass es Heterogenität in der Ätiologie unter den Non-Hodgkin-Lymphomen Subtypen gibt.⁷³

Hierzu ist auch die Arbeit von Bell et al. zu nennen. In dieser Studie war die Frequenz der t(14;18)-positiven Zellen bei starken Rauchern 3,6-fach höher als bei Nichtrauchern. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Nikotingenuss und der t(14;18) Frequenz festgestellt.⁵⁷

Rauzy et al. fanden ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen der Prävalenz t(14;18)-positiver Zellen in 39 Knochenmarksproben und zunehmendem Nikotingenuss. Jedoch fanden sie auch in einer zweiten Gruppe bei 44 % der Individuen zirkulierende t(14;18)-positive Zellen, die nicht mit den Rauchgewohnheiten korrelierten.⁶²

1.8 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, in welchem Alter ein signifikanter Anstieg der Prävalenz peripher zirkulierender t(14;18)-positiver Zellen festgestellt werden kann, ob das Alter einen Einfluss auf die Frequenz t(14;18)-positiver Zellen hat und wann die t(14;18)-Translokation in den lymphatischen Organen und die Phase der ersten klonalen Expansion auftritt.

Weiterhin ist zu klären, ob noch weitere Gene durch Genexpressionsanalysen vor und nach einem Bcl-2-Knockdown identifiziert werden können, die neben dem Bcl-2-Gen eine wesentliche Rolle bei der malignen Transformation zum follikulären Lymphom und der Progression

zum hochmalignen Lymphom spielen. Dafür muss eine Transfektionsmethode etabliert werden, die es ermöglicht, si-RNA in drei ausgewählte B-Zelllinien einzuschleusen.

2 Materialien

2.1 Geräte

Elektrophoreseeinheit:

- Elektrophoresekammer E-Gel Base (Invitrogen)
- Gleichspannungsgerät (Pharmacia Biotech Europe GmbH)

Heizblock und Wasserbad:

- elektronischer Heizblock (Gebrüder Liebisch GmbH)
- Schüttelwasserbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH)

Pipetten:

- Mikropipetten mit variablen Volumina 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l (Gilson Medical Electronics)
- Mikropipetten mit variablen Volumina 2 μ l, 10 μ l (Eppendorf)

Photoeinheiten:

- GelDoc 200 System (Biorad)

Sequenzanalyse:

- ABI PRISM Sequence Analyser 310 (PE Biosystems)

Thermocycler für PCR-Analysen:

- Thermocycler 480, 2400, 9700 (PE Biosystems)
- Sequence Detection System SDS 7700 (PE Biosystems)

Zentrifugen:

- Tischkühlzentrifuge (Eppendorf)
- Zentrifugen mit variabler Temperatureinstellung: Varifuge 1.0, Varifuge 3.0 RS (Haerereus Instruments)

2.2 Reagenzien und Chemikalien

Sequenzierreagenzien:

- Big Dye Terminator Kit (PE Biosystems)
- TaqMan PCR Core Kit mit AmpliTaq Gold (PE Biosystems)

Kulturmedien:

- Bacto-Agar (Difco-Laboratories)
- Bacto-Trypton (Difco-Laboratories)
- Yeast-Extrakt (Difco-Laboratories)
- Ampicillin Sodium Salt (Sigma – Aldrich Chemie GmbH)
- X-Gal [5-Brom-4-chlor-3-indolyl-3-D-galacopyranosid] (Boehringer)

Wenn nicht weiter im Text vermerkt, wurden alle weiteren Chemikalien von Sigma – Aldrich GmbH verwendet.

2.3 Lösungen

| | | |
|------------|----------------------------|---------------|
| TB-Medium: | 12 g | Bacto-Trypton |
| | 24 g | Yeast-Extrakt |
| | 4 ml | Glycerol |
| | ad 900 ml H ₂ O | |

| | | |
|----------|-------------------------|---------------|
| LB-Agar: | 10 g | Bacto-Trypton |
| | 10 g | Yeast-Extrakt |
| | 5 g | NaCl |
| | 15 g | Bacto-Agar |
| | ad 1 l H ₂ O | |

| | | |
|---------------------|------------|----------------------------------|
| Bakteriennährboden: | 35ml | LB-Agar |
| | 35 μ l | Ampicillin (50 μ g/ μ l) |

2.4 Enzyme

Alle Enzyme wurden nach Protokoll der Hersteller verwendet.

- Ampli-Taq Gold DNA Polymerase (PE Biosystems)
- Proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH)
- Restriktionsenzym Eco I (Boehringer Mannheim GmbH)
- Restriktionsenzym Hind III (Boehringer Mannheim GmbH)

2.5 Zelllinien

2.5.1 DOGKIT, DOGUM und GUMBUS

Die DOGKIT-, DOGUM- und GUMBUS-Zelllinien⁷⁴ wurden von drei verschiedenen Patienten mit hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen isoliert, die in der Klinik für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums in Greifswald behandelt wurden. Detaillierte Eigenschaften der verschiedenen Zelllinien sind in der Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: **3 Non-Hodgkin-Lymphomzelllinien**
im Labor von Prof. Dölken etabliert

| Zelllinie | Erkrankung | Patient (Alter, Geschlecht) | Material | Genetische Analyse ^{A,B} | Durchschnittliche Zellgröße, Verdopp- lungsrate |
|-----------|--|--------------------------------|--------------------|--|---|
| GUMBUS | Europäisches Burkitt-Lymphom | 28 Jahre, männlich | Liquor | $t(8;14)(q24;q31)^C$ add(3)(p11) del(6)(q14;q24) keine $t(14;18)$ Translokation | 9,7 μm , 24 h |
| DOGKIT | Burkitt-Lymphom (transformiertes follikuläres Lymphom) | 57 Jahre, männlich | Peripheres Blut | $t(14;18)(q32;q21)^E$ $t(8;22)(q24;q11)^D$ $t(3;10)(q21;q25)$ dup1(q12;q41) +der(18) $t(14;18)(q32;q21)$ add(20)(q13) +13; +17; +20; +20 | 10,1 μm , 38 h |
| DOGUM | Zentroblastisches Non-Hodgkin- Lymphoms (transfor- miertes follikuläres Lymphom) | 49 Jahre, weiblich | Peripheres Blut | $t(14;18)^E$ Bruchpunkt im c-myc Lokus, das nicht mit der FISH Analyse identifiziert werden konnte | 9,5 μm , 41 h |

A Konventionelle Analyse (R-Färbung von 20 Metaphasen bei jeder Zelllinie) und FISH [mindestens 100 Interphasen bei jeder Zelllinie and Genlokus (2p12; 22q11; 3q27; 8q24; 14q32; 18q21)]

B keine Metaphase bei DOGUM gefunden, daher war keine konventionelle Analyse der Chromosomen möglich

C MYC-IGH Fusion

D MYC-IGL Fusion

E Bei der $t(14;18)$ Translokation (BCL2-IGH Fusion) ist die 5'- MBR Region involviert und wurde auch mit der PCR detektiert.⁷⁵

2.5.2 Karpas 422

Von Dr. A. Karpas (Universität of Cambridge, UK) wurde die $t(14;18)$ -positive Zelllinie Karpas 422 zur Verfügung gestellt,⁷⁶ die als Positivkontrolle in der $t(14;18)$ -PCR eingesetzt wurde.

2.6 Computersoftware

Für die quantitative PCR Auswertung stand „GraphPad Prism 3.0“ (GraphPad Software Inc.) zur Verfügung. Die mit „Geldoc 2000“ (Biorad) unter UV-Licht eingescannten Elektrophoresegele wurden mit der Analysesoftware „Quantity One“ (Biorad) weiter bearbeitet und die Sequenzen der spezifischen $t(14;18)$ -positiven Zellklone mit „Vector NTI Advance 10“ (Invitrogen, USA) ausgewertet. Die Berechnungen der Proteinkonzentrationen erfolgte mit „Magellan V3.12 - Readersoftware“.

Für die gesamte Dokumentation im Rahmen dieser Dissertation fand „Microsoft Office Word 2003“, „Reference Manager Version 11“ (Apache Software Foundation) und „Adobe Photoshop 7.0“ Anwendung.

3 Methoden

3.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMNC)

Die Isolierung der PBMNC erfolgte durch Dichtegradienten-Zentrifugation. Dabei wurde Blut im Verhältnis 1:2 (v/v) mit PBS-Dulbecco-Puffer (PBS) gemischt und auf gleichem Volumen Ficoll-Paque vorsichtig überschichtet. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1000 g wurde die Interphase mit den mononukleären Zellen vorsichtig abpipettiert und zweimal mit PBS gewaschen. Nach Resuspension in 1 ml PBS folgte die Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer und schließlich die Portionierung zu je $1-2 \times 10^7$ Zellen und Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 DNS-Präparation nach Gentra

Bei einer Zellzahl kleiner 7×10^6 wurde das Zellpellet mit 300 μl Cell-Lyse behandelt, bei einer Zellzahl größer 7×10^6 das zehnfache (3 ml Cell-Lyse) Volumen verwendet. Die Arbeitsschritte sahen wie folgt aus:

1. enthielt das Pellet Erythrozyten, dann wurden 100 μl PBS-Puffer zugegeben und das Pellet gelöst, danach 30 (300) μl RBC-Solution und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 10 min bei 2000 x g zentrifugiert, Überstand wurde verworfen
2. Zugabe von 300 μl (3 ml) Cell-Lysis und Inkubation über Nacht in ein 15 ml Tube bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad
3. Ergänzung von 1,5 (15) μl RNase und Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15-60 min
4. Zugabe von 100 μl (1 ml) Protein-Precipitation-Solution, 20 s mixen, 10 min Zentrifugation bei 4000 x g. Wenn der Überstand nicht klar war, Überführung in ein neues 15ml Tube, ca. 5-10 min vortexen, auf Eis stellen, im Anschluss noch einmal für 10 min bei 4000 x g zentrifugieren

-
5. Überstand (mit DNS) in ein neues 15 ml Tube geben und mit 3 ml (300 μ l) 100 % 2-Propanol auffüllen, gut mischen bis ein weißes Pellet zu sehen ist (an dieser Stelle muss das Volumen vom einfach TE-Puffer festgelegt werden, in dem die DNS nach dem Punkt 7. gelöst wird), dann 5 min für 10 min bei 4000 x g zentrifugieren, Überstand vorsichtig vom Pellet abnehmen und werfen
 6. Pellet mit 3 ml (300 μ l) 70 % Ethanol waschen, 5 min bei 4000 x g zentrifugieren, Überstand werfen und Pellet ca. 10-15 min an der Luft trocknen
 7. die bei Punkt 5. bestimmte 1xTE-Puffer Menge zugeben und 60 min bei 65 °C inkubieren, in ein 1,5 ml Tube umfüllen und bei -20° C oder -80 °C einfrieren

3.2.1 Quantifizierung der DNS

DNS absorbiert UV-Licht bei einer Wellenlänge zwischen 260 und 280 nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Mit Hilfe eines Photometers kann die optische Dichte (OD) einer DNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden. Es wird davon ausgegangen, dass eine OD₂₆₀ von 1,0 50 μ g doppelsträngige DNS beziehungsweise 33 μ g einzelsträngige DNS entsprechen. Der Quotient OD₂₆₀ / OD₂₈₀ spiegelt die Reinheit der DNS-Lösung wider und sollte in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte, die unterhalb von 1,8 liegen, zeigen eine Verunreinigung der Lösung mit Proteinen oder Ethanol an. Diese Verunreinigungen machen eine genaue photometrische Konzentrationsbestimmung unmöglich und können die PCR-Amplifikation hemmen. In dieser Arbeit wurde zur Konzentrationsbestimmung 500 μ l einer 50-fach beziehungsweise 100-fach verdünnten DNS-Lösung gemessen.

3.3 Oligonukleotide

3.3.1 Primer der t(14;18)-PCR

P2-18QS: Sense-Primer der t(14;18)-PCR, 21 bp lang, liegt bei 2978-2998 der Bcl-2 Sequenz²⁷, T_D = 60/C
5' - TGGTGGTTTG ACCTTTAGAG A - 3'

P1-JHIGA: Antisense-Primer, 18 bp lang, komplementär zu allen sechs J_H-Genen auf Chromosom 14⁷⁷, T_D = 60/C

5' - ACCTGAGGAG ACGGTGAC - 3'

3.3.2 Primer der K-ras Wild-Typ PCR

K-ras WT 5': Senseprimer für die K-ras Wild-Typ PCR, 18 bp lang,

5' - CTTGTGGTAG TTGGAGCT - 3'

K-ras WT 3': Antisenseprimer für die K-ras Wild-Typ PCR, 18 bp lang,

5' - ATCAAAGAAT GGTCCTGC - 3'

3.3.3 Sonden für die quantitative real-time PCR

Die beiden Oligonukleotidsonden wurden von der Firma PE Biosystems synthetisiert und mit zwei Fluoreszenzmolekülen (FAM, TAMRA) markiert.

t(14;18)-Sonde: Sonde für die t(14;18)-PCR, 25 bp lang

FAM - 5' - CTCTGGGTGG GTCTGTGTTG AAACA - 3' – TAMRA

K-ras WT-Sonde: Sonde für die K-ras Wild-Typ PCR, 22 bp lang

FAM - 5' - AAGAGTGCCT TGACGATACA GC - 3' – TAMRA

3.4 TaqMan Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.4.1 Einführung in die Grundlagen der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion hat seit ihrer Entwicklung durch Mullis⁷⁸ im Jahr 1985 die Forschung und auch die medizinische Diagnostik insbesondere im Bereich der Hämatologie und Onkologie stark beeinflusst. Die PCR ist eine Methode zur in vitro Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, die im Wesentlichen auf die gleichen Vorgänge zurückgreift, die in jeder sich teilenden Zelle ereignen. Bei der enzymatischen in vitro Synthese von DNA mit Hilfe spezifischer Primer wird durch zyklisch wiederholende Temperaturwechsel eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz bewirkt.

In der deutlich höheren Sensitivität und der Möglichkeit an geringsten Probenmengen Untersuchungen durchführen zu können, liegen die Vorteile der PCR gegenüber zytogenetischen Untersuchungen in der Tumordiagnostik und den vorwiegend verwendeten molekularbiologischen Standardmethoden (zum Beispiel Southern- und Northern-Blot).

Mit den erheblichen Erleichterungen in der alltäglichen Laborarbeit, die dieses relativ leicht zu automatisierende Verfahren mit sich gebracht hat, bedeutet der sensitive, reproduzierbare und spezifische Nachweis der PCR Produkte mit Elektrophoreseanalysen und Southern-Blot Hybridisierungen immer noch einen hohen Zeit-, Arbeits- und Materialaufwand.

Ein zusätzlich hohes Kontaminationsrisiko bringt die Analyse der PCR Produkte mit sich. Um dies zu minimieren und die PCR-Analysen möglichst kontaminationsfrei und automatisiert durchführen zu können, arbeitete man an der Entwicklung sogenannter homogener Testsysteme. Bei diesen Systemen sollten die Amplifikation und der Nachweis der PCR-Produkte simultan in einem Reaktionsgefäß geschehen, ohne dieses zu öffnen.

Holland et al.⁷⁹ beschrieben im Jahr 1991 erstmalig ein PCR-Testsystem, in dem sie die 5',3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase zum direkten Nachweis einer sequenzspezifischen Amplifikation verwendeten. Die Taq-DNA-Polymerase spaltet während der DNA-Synthese durch ihre 5',3'-Exonukleaseaktivität jede auf dem Matrizenstrang komplementär gebundene Oligonukleotide in ihre Bausteine. Holland et al. arbeiteten mit spezifischen Oligonukleotiden, die mit radioaktiven Phosphor (P32) markiert waren und setzten sie dem PCR-Ansatz zum Beginn bei. Bei einem positiven Ergebnis konnten nach Abschluss der PCR radioaktive Sondenfragmente von intakten DNA-Sonden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie unterschieden werden. Dadurch wurden die bis zu diesem Zeitpunkt notwendigen, aber zeitaufwendigen Hybridisierungsschritte als Nachweis einer sequenzspezifischen Amplifikation überflüssig.

1993 entwickelten Lee et al.⁸⁰ bei Applied Biosystems Oligonukleotidsonden, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Dies ermöglichte es dann, den Abbau der DNA-Sonden ohne aufwendige Analyseverfahren und sogar während der PCR-Amplifikation (real-time) quantitativ zu erfassen. Diese Sonden bestehen aus einem sequenzspezifischen Oligonukleotid, bei dem das 5'-Ende mit einem "Reporter"-Fluoreszenzmolekül, zum Beispiel "FAM", und das 3'-Ende mit einem sogenannten "Quencher", einem Rhodaminderivat, wie zum Beispiel "TAMRA", markiert wurde. Damit die Sonde der DNA-Polymerase nicht als Primer dienen kann, ist das 3'-Ende der Sonde zusätzlich mit einem Phosphatrest verestert. In dem Fall, dass die intakte Sonde durch einen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488nm zur Fluoreszenz angeregt wird, unterdrückt der Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) die spezifische Fluoreszenz des Reporter-Moleküls, bedingt durch die räumliche Nähe. Die Sonde hybridisiert während der PCR spezifisch in einem Sequenzbereich, der zwischen den beiden Primern liegt. In der Extensionsphase stößt die Taq-DNA Po-

lymerase auf die gebundene Sonde und spaltet die Sonden mit ihrer 5',3'-Exonukleaseaktivität mit fortschreitender DNA-Synthese so lange, bis schließlich die Bindungskräfte zwischen Sonde und Matrize so gering werden, dass sich die Sonde vom Matrizenstrang löst. Es werden aber keine freien und nicht hybridisierten Sondenmoleküle von der Taq-DNA Polymerase gespalten. Diese hydrolytische Spaltung der Sonden bewirkt eine räumliche Trennung des Reporter-moleküls von dem Quencher-molekül und der Fluoreszenzenergietransfer (FET) wird unterbrochen. Die Reporter-moleküle können nun Licht im Bereich ihres charakteristischen Fluoreszenzspektrums aussenden. Für jede synthetisierte DNA-Kopie wird ein Reporter-molekül freigesetzt. Mit zunehmender Anhäufung des PCR Produkts steigt dadurch die Fluoreszenzintensität des Reporter-Moleküls stöchiometrisch bei jedem weiteren PCR-Zyklus exponentiell an. In jedem Zyklus wird die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Farbstoffe mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) in verschlossenen, jedoch lichtdurchlässigen Reaktionsgefäßen gemessen. Dieses System realisiert über eine Computeranalyse die unmittelbare und quantitative Bestimmung der vorhandenen Kopienzahl des gesuchten Gens, die sich in der untersuchten Probe befindet.

3.4.2 Quantifizierung von PCR Ergebnissen

Die Möglichkeiten, in einer Probe die vorhandene Kopienzahl einer spezifischen DNA-Sequenz quantitativ zu bestimmen, waren bis zur Entwicklung der TaqMan-PCR sehr beschränkt. Mit der Verwendung und Messung von Verdünnungsreihen bis unter die Nachweisgrenze ließen sich nur semi-quantitative Ergebnisse erzielen.

Eine weitere Methode, die kompetitive PCR, erlaubte immerhin verhältnismäßig genaue quantitative Daten zu erheben. Jedoch war diese Methode mit hohem zeitlichem Aufwand

verbunden, sowie mit einem signifikant höheren Risiko, Kontaminationen in die Proben einzubringen.

Durch die „real-time“-Datenaufnahme durch das ABI Prism 7700 Sequence Detection Systems und die damit verbundene automatische quantitative Bestimmung der Produkte in der exponentiellen Phase der Amplifikation war es nun möglich, im Vergleich mit externen Standards eine sehr genaue und sehr gut reproduzierbare Quantifizierung zu erzielen. Der wichtigste Messpunkt in diesem System ist der Zyklus beziehungsweise der Zeitpunkt, an dem zum ersten Mal eine signifikante Erhöhung der Reporteraktivität gegenüber einem zwischen dem 3. und 15. Zyklus ermittelten Fluoreszenz-Background nachweisbar ist. Dieser Zeitpunkt wird als „threshold cycle“ (C_T), bezeichnet. Zwischen dem „threshold cycle“ und der anfänglich eingesetzten Kopienzahl (A_0) des Zielgens besteht eine enge Korrelation, da die Anzahl der freien Reportermoleküle der Zahl der synthetisierten Kopien entspricht. Diese Kopienzahl ist proportional zur anfänglich in der Probe vorhandenen Kopienzahl (A_0). Bei einer Halbierung der anfänglichen Kopienzahl erhöht sich der C_T -Wert um etwa einen Zyklus. Für jede Verdünnungsreihe kann dieser Zusammenhang rechnerisch ermittelt und als Standardkurve dargestellt werden. Mit dieser mathematisch ermittelten Standardkurve kann die anfängliche Kopienzahl einer unbekannt Probe bestimmt werden.

3.5 PCR Methode zum Nachweis von t(14;18)- Translokationen

3.5.1 Quantitative real-time PCR

Im Folgenden sind der PCR Ansatz sowie die Reaktionsbedingungen für die quantitative real-time PCR zum Nachweis der t(14,18)-MBR Translokation aufgeführt. Vorab musste eine Optimierung der PCR für Temperaturprofil, Magnesiumchlorid- und Primerkonzentrationen

festgelegt werden. Als Primer standen der innere Sense-Primer P2-18QS und der Anti-Sense Primer P1-JHIGA zur Verfügung. Die PCR wurde in einer 96-well Reaktionsplatte mit jeweils 50 µl pro Ansatz durchgeführt, davon waren 10 bis 20 µl DNA-Template. Verschlossen wurden die PCR-Reaktionsgefäße (MicroAmp „optical plates“) mit einer Deckfolie (MicroAmp „optical adhesive film“). Die PCR-Amplifikation und Analyse erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detection System.

3.5.2 Temperatur-Zeit-Protokoll

Nach einer einmaligen 2-minütigen Inkubation bei 50 °C, die der zugesetzten Uracil-N-Glycosylase (UNG) die Spaltung von Uracil-enthaltenden früheren Amplifikaten ermöglichte, erfolgte die Aktivierung der hitzeaktivierbaren AmpliTaq GoldTM DNA-Polymerase für 10 Minuten bei 95 °C. Die eigentliche PCR Amplifikation lief über 50 Zyklen, jeder Zyklus bestand aus:

I.) Denaturierung der doppelsträngigen DNA, 15 Sekunden bei 95 °C

II.) Primer- und Sonden-Anlagerung und DNA-Synthese, 1 Minute bei 61 °C mit anschließender Sondenspaltung.

Am Schluss des Protokolls wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt, die amplifizierten Proben nach der quantitativen real-time PCR entweder über Nacht bei 4 °C gehalten oder umgehend bei -20 °C tiefgefroren und gelagert. Bei den t(14;18)-positiven Proben erfolgte eine Kontrolle der Amplifikationsfragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese.

3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren liegen im alkalischen und schwach sauren pH-Bereich als Polyanionen vor. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes können sie daher nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist auf Grund des konstanten Ladung-Masse-Verhältnisses proportional zu ihrem Molekulargewicht. Der Proportionalitätsbereich kann durch die Wahl der Porengröße des Gels, bestimmt durch dessen Agarosekonzentration, beeinflusst werden. Durch die Färbung des Gels mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert, können die Banden durch Anregung im UV-Licht dargestellt werden.

3.6.1 Probenvorbereitung

Jeweils 10 µl der PCR-Produkte und 10 µl H₂O wurden mit 4 µl 6x F-Stopp-Mix versetzt. Durch den Zusatz von Bromphenolblau konnte die Lauffront sichtbar gemacht werden.

| | | |
|---|----------------|--------|
| <u>Probenpuffer (6-fach F-Stopp Mix):</u> | EDTA (pH 8,0) | 0,05 M |
| | SDS | 1 % |
| | Ficoll 400 | 14 % |
| | Bromphenolblau | 0,4 % |

3.6.2 Durchführung der Elektrophorese

Für die epidemiologische Studie standen geschlossene, mit Ethidiumbromid versehene Fertigele (Invitrogen) – Halterung (E-Gel Base) von Invitrogen und Stromquelle (Pharmacia LKB-GPS 200/400) - zur Verfügung. Deren kurze Elektrophoresedauer von nur 25 Minuten

und scharfe Bandendarstellung erleichterte die Analyse der Amplifikationsprodukte sehr und machte sie zu einer effektiven Methode. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert (Polaroid-Photoeinrichtung) oder mit „GelDoc 2000“ in den Computer eingescannt und mit der Analysesoftware „Quantity One“ ausgewertet.

3.7 Herstellung von Plasmid-DNA Standards für die quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR bietet gegenüber früheren PCR-Methoden die Möglichkeit, direkt, exakt und reproduzierbar eine Quantifizierung des zu untersuchenden Gens vorzunehmen. Voraussetzung hierfür sind stabile Standardproben mit definierten Kopienzahlen. Neben genomischer DNA der t(14;18)-positiven Zelllinie „Karpas 422“ wurde hierzu die in Bakterien klonierte DNA-Bruchpunktsequenz dieser Zelllinie verwendet. Für die Etablierung der Standardkurve für K-ras Wild-Typ kamen ebenfalls genomische DNA und die zugehörigen klonierten Standards zum Einsatz.

3.7.1 Transformation und Selektion rekombinierter Bakterienklone

Der von uns verwendete Vektor, das Plasmid pCR[®] 2.1 (Invitrogen, Leek, Niederlande) trägt ein Resistenzgen für Ampicillin, so dass bei Zugabe dieses Antibiotikums nicht nur Fremdkeime, sondern auch Bakterien, die das Plasmid nicht aufgenommen haben, abgetötet werden. Der Bakterienstamm Oneshot[™] (Invitrogen) trägt ein F-Episom, das unter anderem für das ω -Fragment der β -Galaktosidase (enzymatisch inaktiv) kodiert. Wird eines dieser Bakterien mit dem Plasmid pCR[®] 2.1 transformiert, das für die α -Untereinheit der β -Galactosidase (en-

zymatisch inaktiv) kodiert, so wird durch sogenannte α -Komplementation ein enzymatisch aktives Protein aus den beiden, enzymatisch inaktiven Untereinheiten gebildet.

Nach Induktion der beiden Gene der β -Galactosidase mittels IPTG und Zugabe des Farbstoffes X-Gal können entsprechende Klone auf Agarplatten durch ihre blaue Farbreaktion nachgewiesen werden. Die Insertionsstelle für das zu klonierende Genfragment liegt auf dem Plasmid pCR[®] 2.1 innerhalb des für die α -Untereinheit der β -Galactosidase kodierenden Genabschnitts. Dies führt bei erfolgtem Einbau des zu klonierenden Gens zu einer inaktiven α -Untereinheit und nach α -Komplementation zu einem inaktiven Enzym.

Nach Induktion der beiden Gene der β -Galactosidase mittels IPTG und Zugabe des Farbstoffes X-Gal bleibt die Farbreaktion aus. Die weißen, rekombinante Plasmide tragenden Kolonien können gezielt ausgesucht, weiter kloniert und analysiert werden.

3.7.2 Durchführung der Klonierung

3.7.2.1 Ligation

Die mittels PCR-Amplifikation erhaltenen DNA-Fragmente von Karpas 422 (t(14;18)), β -Actin oder K-ras Wild-Typ) und ein linearisierter Vektor DNA (pCR[®] 2.1) wurden zusammengegeben, für 5 Minuten bei 45 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 1 μ l 10x Ligase-Puffer (660 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 10 mM DTE; 10 mM ATP) und 4 „Weiss“ Units T4 DNA Ligase versetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14 °C. Die mit der PCR amplifizierten ds-DNA-Fragmente weisen aufgrund der Eigenschaft der Taq-Gold DNA Polymerase, am Ende der Extension einen Adenosinrest anzuhängen, auf beiden Seiten am 3'-Ende einen sogenannten „A“-Überhang auf. Diesem „A“-Überhang steht ein „T“-Überhang des Vektors (pCR[®] 2.1) an beiden 5'-Enden gegenüber. Dies verhindert einerseits eine

Selbstligation des Vektors ohne Einbau des gewünschten DNA-Fragments, andererseits erleichtern die sich zwischen dem jeweiligen A und T ausbildenden Wasserstoffbrückenbindungen die Ligation durch die zugesetzte T4 DNA Ligase.

3.7.2.2 Transformation und Klonselektion

6 µl des Ligationsansatzes wurden zu den kompetenten Bakterienzellen (Oneshot™, Invitrogen) hinzugegeben und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation bei 42 °C im Wasserbad für 90 Sekunden, anschließend eine Inkubation für 2 Minuten auf Eis, nach Zugabe von 800 µl LB-Medium eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln. In der Zwischenzeit wurden Agarplatten vorbereitet, unter Verwendung von LB-Medium, dass im Mikrowellenofen gekocht, auf etwa 55 °C abgekühlt und nach Zugabe von 1 µl Ampicillin (50 µg/µl) je ml LB in Petrischalen - je 20 ml – ausgegossen. Je Platte wurden 35 µl X-Gal (2 %) und 20 µl IPTG (100 mM) ausgestrichen, anschließend 200 µl des Transformationsansatzes auf den Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit rekombinantem Vektor transformierte Bakterien bildeten weiße Klone. Einzelne weiße Klone wurden mittels PCR auf das gewünschte DNA Fragment untersucht und im Falle eines positiven PCR-Ergebnisses zur weiteren Klonierung ausgewählt.

3.7.2.3 Züchtung der rekombinanten Klone

Zur Züchtung der positiven Klone wurde eine Kultur mit 35 ml LB-Medium und 35 µl Ampicillin (50 µg/µl) in einem 50 ml Röhrchen angesetzt und das Nährmedium unter Verwendung eines sterilen Zahnstochers mit einer positiven Kolonie der Agarplatte beimpft. Die Deckel der Röhrchen wurden mit Löchern versehen, die Röhrchen 16 h in einem Schüttler bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 180/min inkubiert.

3.7.2.4 Präparation und Linearisierung der Plasmid DNA

Die Plasmidpräparation erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers. Das präparierte Plasmid wurde durch enzymatischen Verdau mit Hind III linearisiert [86 µl Plasmid-DNA ($\approx 30 \mu\text{g}$) + 10 µl B-Puffer (Boehringer, Mannheim, Deutschland) + 4 µl Hind III (10 U/µl) für 1h bei 37 °C] und anschließend elektrophoretisch kontrolliert.

3.7.2.5 Plasmid-Minipräparation

Die zu untersuchenden Klone wurden mit Zahnstochern (steril) in je 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert (maximal 18 Stunden). Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit einem Kit von Qiagen, der die vorgefertigten Puffer P₁, P₂ und P₃ enthält. Je 1 ml Übernachtskultur (in einem Eppendorfgefäß) wurden bei 13000 rpm 1 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 150 µl P₁ resuspendiert, anschließend 150 µl P₂ dazugegeben, invertiert (nicht gevortext) und 4 min bei Raumtemperatur (24-25 °C) inkubiert. Mit 150 µl P₃ wurde neutralisiert: 4 min bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Invertierten. Danach wurde 10 min bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 5 min wie oben zentrifugiert, nach Zugabe von 1 ml 99,98 % Ethanol (-20 °C) 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol zweimal gewaschen, 3-5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet, in 20 µl TE aufgenommen und davon 1 µl (0,1-0,2 µg) für den Kontroll-Restriktionsverdau eingesetzt.

3.7.2.6 Plasmid-Midipräparation

Bakterienklone, angesetzt in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, wurden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Die Aufnahme der Bakterien-Pellets erfolgte in jeweils 4 ml Puffer P₁ und inkubierten für 2 min bei Raumtemperatur, dann 4 min mit Puffer P₂ ebenfalls bei Raumtemperatur und nach Zusatz von P₃ 30 min auf Eis. Diese Ansätze wurden mit 6500 rpm bei 4 °C 40 min zentrifugiert, der Überstand auf eine vorher mit QBT-Puffer äquilibrierte Säule gegeben und nach Waschen mit Puffer QC mit QF-Puffer die Plasmid-DNA eluiert. Das Eluat wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol mit 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, dann zweimal mit 2 ml kaltem 70 % Ethanol gewaschen und in 200 µl TE aufgenommen.

3.8 Sequenzanalysen

3.8.1 Theoretische Grundlagen

1977 beschrieben Sanger et al.⁸¹ eine Methode, bei der die Basenabfolge eines DNA-Fragments mit Hilfe der Erzeugung von multiplen Kettenabbrüchen bestimmt wurden. Diese Kettenabbrüche wurden durch Inhibitoren verursacht. Als Inhibitoren der DNA-Synthese kamen Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) in Anwesenheit von DNA-Polymerase I zum Einsatz. Normalerweise wird das nächste Nukleotid an die Hydroxylgruppe angehängt. Da die ddNTPs an der 3'-Position der Ribose keine Hydroxylgruppe aufweisen, verursachen sie jedoch Kettenabbrüche. Das Verhältnis der verwendeten ddNTPs zu dNTPs liegt bei zirka 100:1. In einem Reaktionsansatz entstehen durch den Einsatz dieser Inhibitoren DNA-Fragmente von unterschiedlicher Größe. Das 5'-Ende wird durch den Primer definiert, ein Abbruch am 3'-Ende findet nur dann statt, wenn anstelle des normalen Nukleotids ein Didesoxynukleotid eingefügt wird.

Bei den aktuelleren Verfahren wird jedes der vier verwendeten ddNTPs, das heißt ddATP, ddUTP, ddCTP, ddGTP, mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Während der Sequenzierreaktion entstehen alle nur möglichen Fragmente, die jeweils mit einer fragment-spezifischen, fluoreszenzmarkierten ddNTP-Base enden und so nach Größentrennung mittels Chromatographie und Fluoreszenzbestimmung die automatische Erfassung der jeweils letzten, veränderten Base (ddNTP) anhand ihrer Fluoreszenz ermöglichen. So lässt sich Base für Base die jeweilige Sequenz ermitteln.

3.8.2 Sequenzierung von t(14;18)-positiven PCR-Produkten

Die Sequenzierung der Bruchpunktregion von t(14;18)-MBR-Translokationen erfolgte nach einer Reihe von Probenaufarbeitungsschritten mit dem ABI PRISM Sequence Analyser 310. Die zu sequenzierenden t(14;18)-DNA Fragmente wurden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten.

Für die Gelextraktion des spezifischen DNA-Fragments wurden die Ultrafree[®] Millipore Säulen (Amicon[®] Bioseparations) nach der Präparationsvorschrift des Herstellers verwendet. Wenn sich nach Zentrifugation kein Eluat ergab, wurden 20 µl Aqua dest. auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Die aus dem Agarose-Gel extrahierte DNA wurde als Template erneut in eine PCR eingesetzt und reamplifiziert, um eine größere Menge DNA zu erhalten, die als Matrize in die Sequenzreaktion eingesetzt werden sollte.

Als Primer wurden hier, wie auch in der Sequenzierreaktion, die Schnittstellenprimer P2-18 BAM2 und P1-JH HIND verwendet, um ein optimales Annealing zu erreichen. Die Reamplifikations-PCR wurde anhand des im Abschnitt 3.5.2 angegebenen PCR-Temperatur-Zeit-

Protokolls mit den Primern P1-JH HIND und P2-18 BAM2 ohne UNG in einem Reaktionsvolumen von 100 µl über 40 Zyklen durchgeführt.

Von der extrahierten DNA wurden je 5 µl als Template eingesetzt. Um zu überprüfen, ob die Reamplifikation ein Produkt der gewünschten Größe ergab, wurde wiederum eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Nur wenn im Gel eine distinkte, klare Bande zu sehen war, wurde das PCR-Produkt über eine YM-100 Säule (Millipore, Amicon[®] Bioseparations) weiter gereinigt, um überschüssige Nukleotide zu entfernen. Diese DNA wurde in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Hierzu wurde der BigDye Terminator Sequenzierungskit (PE Applied Biosystems) verwendet. Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler 2400 (PE Applied Biosystems).

Sequenzierungsschema:

| | | | | |
|-------------------------|------|-----|-------|-------------|
| Denaturierung | 15 s | bei | 95 °C | } 30 Zyklen |
| Annealing und Extension | 90 s | bei | 61 °C | |

Um die überschüssigen fluoreszenzmarkierten ddNTPs zu entfernen, erfolgte eine Reinigung des Sequenzierprodukts mittels „Centrisep“-Säulen (Princeton Separations). Nach anschließender 5-minütiger Trocknung des Eluats in der Vakuumzentrifuge (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) wurde das entstandene Sediment in 20 µl TSR (Template Suppression Agent) aufgenommen und im ABI PRISM Sequence Analyser 310 mehrfach analysiert.

Die Auswertung der computergesteuerten Sequenzanalyse erfolgte mittels einer online Genbank. Aus mehrfach (3 – 5x) analysierten Sequenzen der beiden Primeransätze wurde eine zusammenhängende Sequenz generiert und mittels Homologievergleichen die Anteile von Bcl-2⁸² und IgH-Sequenzen⁸³ und die jeweilige N-Region bestimmt.

3.9 Sterilisierung von Lösungen und Nährmedien

Alle Puffer und Lösungen wurden in doppelt destilliertem Wasser angesetzt und, wenn nötig, durch Autoklavieren 3 Stunden bei 2,7 bar oder durch Filtrieren sterilisiert (Sterilfilter 0,2 µm). Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte zwischen 23 °C und 25 °C.

3.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen kann durch eine Farbreaktion in Lösung photometrisch bestimmt werden. Wir arbeiteten mit dem BCA-Protein-Assay-Reagent der Firma Pierce. Zur Dreifachbestimmung wurden je 10 µl Lysat beziehungsweise Lysepuffer (zur Kontrolle 3x) in einer Mikrotiterplatte mit Flachboden vorgelegt. Als Eichlösungen dienten verschiedene BSA-Konzentrationen im gleichen Puffer. Je Probe wurden 196 µl Reagenz A und 4 µl Reagenz B gemischt und dazugegeben, die Platte 2 h bei 37 °C inkubiert und bei 550 nm im TECAN-GENios-Reader gemessen. Mit Hilfe der bekannten Konzentrationen an BSA konnten die Proteinmengen der Lysate errechnet werden.

3.11 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Lämmli, 1970). Dabei wandern die denaturierten, durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zum Pluspol, zunächst in einem Sammelgel zur Fokussierung der Banden und anschließend in einem Trenngel.

Durch Molekulargewichtsstandards kann die Größe der Proteine bestimmt werden. Die SDS-Gele wurden mit dem Elektrophoresesystem für Minigele der Firma BioRad hergestellt.

TEMED und 10 % Ammoniumsulfat wurden erst kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben. Zuerst wurde das Trenngel bis ca. 1 cm unterhalb des später eingesetzten Kamms gegossen und mit Bidest überschichtet, nach dem Polymerisieren das Wasser abgegossen, mit Filterpapier die restlichen Wassertropfen entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Ein Kamm mit 10 Taschen wurde sogleich in das Sammelgel gesteckt.

Die Zellysate beziehungsweise Standards wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Währenddessen wurden die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, mit Lämmli-Puffer bedeckt und die Kämmen entfernt. Die Taschen wurden mit Puffer gespült, die Gelen von Luftblasen befreit und die Proben mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 200 Volt solange durchgeführt, bis die blaue Front am Ende der Gele durchgelaufen war.

3.11.1 Western Blot

Beim Western Blot werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert, auf der sie indirekt detektiert werden können. Hier werden über die Bindung spezifischer primärer Antikörper alkalisch Phosphatase-konjugierte sekundäre Antikörper gebunden. Durch die Zugabe von NBT/BCIP kommt es zu einer bläulichen Einfärbung der spezifischen Proteinbanden. Dabei spaltet die alkalische Phosphatase die Phosphatgruppe vom BCIP und unter oxidativen Bedingungen dimerisiert das entstandene Molekül zu einer bläulichen Ablagerung. Während dieser Reaktion wird das gelbliche NBT zu seiner bläulichen Form abgebaut. Der Blot wurde in einer Wet-Blot-Kammer (BioRad) wie folgt aufgebaut:

-weiße Seite (Pluspol)

- Schwamm

-
- 2 Lagen Gel-Blotting-Papier
 - Nitrocellulose-Membran
 - Gel
 - 2 Lagen Gel-Blotting-Papier
 - Schwarze Seite (Minuspol)

Dazu wurden die Membran und die Filterpapiere vorher auf die Gelgröße zurechtgeschnitten. Zur Vermeidung von Verunreinigungen waren das Tragen und das regelmäßige Wechseln von Handschuhen unerlässlich. Alle Blot-Komponenten wurden kurz im Blotpuffer angefeuchtet, luftblasenfrei aufeinander gelegt und die Kammer auf Eis gestellt, um die entstehende Hitze abzufangen. Geblottet wurde 60 min bei 100 mA (10 mA pro cm²) mit dem passenden Biometra-Spannungsgerät.

Der vorgefärbte Marker (BioRad) diente zum Nachweis des Transfers. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S angefärbt, um den erfolgreichen Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran zu überprüfen. Nach dem Waschen mit dest. H₂O wurde der Blot entfärbt und die Nitrozellulosemembran in einer Schale über Nacht bei 4 °C oder 60 min bei Raumtemperatur mit 5 % Trockenmilch in TBS-Tween inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Am folgenden Tag wurde die Membran zweimal kurz und einmal 5 min mit TBS-Tween gewaschen und eine Stunde mit einer geeigneten Verdünnung des ersten Antikörpers in TBS-Tween bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend musste der primäre Antikörper mit PBS-Puffer abgewaschen und für den sekundären Antikörper präpariert werden. Zum Blot wurde eine 1:1500 Verdünnung des zweiten alkalisch Phosphatase-konjugierten Antikörpers in TBS-Tween gegeben, beides eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend dreimal 5 min mit TBS-Tween gewaschen. Die Inkubationen erfolgten unter Schütteln auf dem Phero-Shaker. Die BCIP-NBP-Tablette (Enhanced Luminol

Reagent, Amersham) wurde in 10 ml dest. H₂O aufgelöst und die Membranen sofort 5 bis 10 min darin inkubiert. Um ein unspezifisches Verfärben der Membran zu verhindern, kamen die Membrane in dest. H₂O. Somit wurden sie von der BCIP-NBT-Lösung gereinigt. Nach kurzem Abtropfen wurden sie zwischen zwei sauberen Filterpapieren luftblasenfrei getrocknet und später digital eingescannt.

3.12 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Die B-Lymphomzellen wurden in RPMI-1640-Medium mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Dies geschah in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 % CO₂ enthielt. Die verwendeten Zelllinien wuchsen in Suspension als einzelne Zellen oder als Agglomerate in den Kulturflaschen. Das Zellmedium wurde jeden zweiten bis dritten Tag erneuert, je nach Zelllinie, um sowohl tote Zellen als auch saure Stoffwechselprodukte zu entfernen und die Zellen 5 min bei 300 x g pelletiert und in Medium resuspendiert. Danach wurden sie je nach Proliferationsrate mit entsprechender Zellzahl für die Versuche ausgesät oder weiter kultiviert.

3.13 Elektroporation

Elektroporation ist eine Methode, Zellmembranen permeabel zu machen, um so DNA in Zellen einzuschleusen (Transformation). Durch ein elektrisches Feld, das in der Regel durch einen sich schnell entladenden Kondensator erzeugt wird, werden in der behandelten Zellmembran mikroskopisch kleine Löcher erzeugt, die sich innerhalb von Millisekunden wieder schließen. Dieser Effekt der Elektroporation wurde von Zimmermann⁸⁴ sowie Neumann⁸⁵ beschrieben.

Die Poreninduktion bedingt einen Verlust der Semipermeabilität der Zellmembran und die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile. Fügt man dem Umgebungsmedium vorher nun freie

RNA, DNA oder gar Vektoren hinzu, können diese von den Zellen aufgenommen und in den Zellkern transportiert werden.

Elektroporation ist theoretisch mit allen Zelltypen möglich. Zur Elektroporation benutzt man einen Elektroporator, der das elektrische Feld erzeugt. Der Elektroporator hat einen Platz für eine Küvette, in die man die Zellsuspension pipettiert.

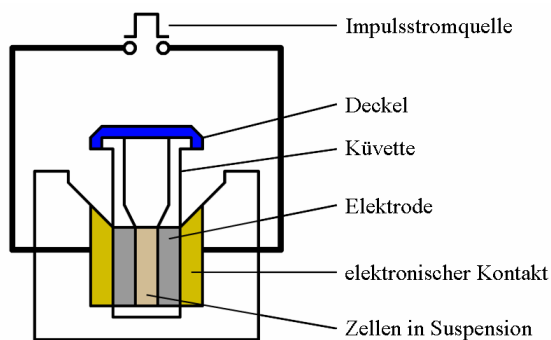


Abb. 1: **Schematischer Aufbau einer Elektroporationseinheit**

Bei den Versuchen kamen Küvetten mit Elektroden aus Aluminium zum Einsatz (siehe Abb. 1). Im Allgemeinen benötigt man 100 μl von Zellsuspension. Vor der Elektroporation wurden zusätzlich maximal 10 μl der Plasmidlösung mit den Zellen gemischt, die entsprechende Spannung am Elektroporator eingestellt, die Küvette in die Halterung gestellt und die Elektroporation durchgeführt. Der Vorgang dauerte einige Sekunden. Die Erfolgsrate der Elektroporation hing stark von der Reinheit der Plasmidlösung ab, insbesondere muss die Lösung von Salzen frei sein, was durch Ausfällung erreicht werden konnte.

4 Ergebnisse

4.1 Die Prävalenz von zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen bei gesunden Probanden

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, in welchem Alter ein signifikanter Anstieg der Prävalenz peripher zirkulierender t(14;18)-positiver Zellen festgestellt werden kann. Zur Beantwortung dieser Frage wurde peripheres Blut von 715 gesunden Probanden mit Hilfe der quantitativen real-time PCR auf die Prävalenz und Frequenz t(14;18)-positiver zirkulierender B-Zellen untersucht. Die mediane Prävalenz zirkulierender t(14;18)-positiver Zellen im peripheren Blut aller gesunder Personen betrug 46 % (327 von 715).

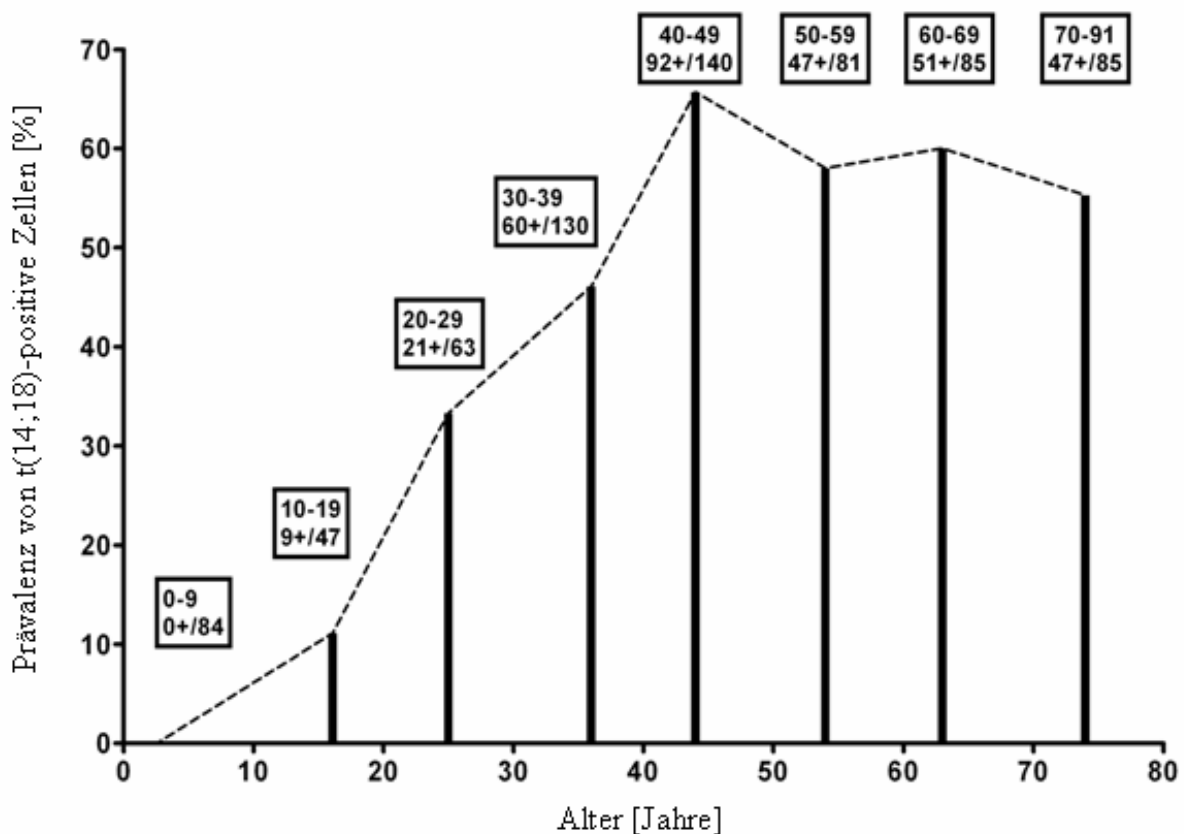


Abb. 2: Prävalenz bei gesunden Probanden

Tab. 3: Prävalenz von t(14;18)-positiven Zellen bei gesunden Menschen

| Altersgruppe | n | medianes Alter | t(14;18)-positiv | t(14;18)-negativ | Prävalenz [%] | mediane Anzahl der getesteten Zellen |
|------------------------|-----|----------------|------------------|------------------|---------------|--------------------------------------|
| 0 (Nabelschnurblut) | 36 | 0,0 | 0 | 36 | 0,0 | 993.247 |
| 0-9 | 48 | 2,6 | 0 | 48 | 0,0 | 493.109 |
| 10-19 | 47 | 16,1 | 9 | 38 | 19,1 | 430.386 |
| 20-29 | 63 | 25,0 | 21 | 42 | 33,3 | 567.002 |
| 30-39 | 130 | 36,0 | 60 | 70 | 46,2 | 684.500 |
| 40-49 | 140 | 44,0 | 92 | 48 | 65,7 | 704.000 |
| 50-59 | 81 | 54,0 | 47 | 34 | 58,0 | 691.026 |
| 60-69 | 85 | 63,0 | 51 | 34 | 60,0 | 563.277 |
| 70-91 | 85 | 74,0 | 47 | 38 | 55,3 | 612.072 |

In Abb. 2 wird die Prävalenz von t(14;18)-Translokationen in Relation zum zunehmenden Alter gezeigt, wobei die Individuen in Altersgruppen zusammengefasst sind. Folgende Ergebnisse sind hervorzuheben. In keiner der 36 Nabelschnurblutproben und 48 Blutproben von Kindern bis neun Jahre ließen sich zirkulierende t(14;18)-positive Zellen nachweisen. Dies umfasst die Altersgruppe 0 – 9 Jahre (n=84) mit einem medianen Alter von 2,6 Jahren. Zwischen dem 10. und 40. Lebensjahr steigt die Prävalenz der zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen bis zu 65 % signifikant an (siehe Tab. 3). In den älteren Altersgruppen bleibt sie annähernd bei 60 % beständig. Ermittelt wurde die Signifikanz der Prävalenz zwischen den Altersgruppen mit dem Exakten Fisher-Test, ohne Berücksichtigung der Altersgruppe 0 – 9 Jahre (Tab. 4).

Tab. 4: **Exakter Fisher-Test**

Vergleich der Prävalenz zwischen den Altersgruppen,
signifikanter Unterschied bei $p < 0,005$

| p-Wert | 20-29 Jahre | 30-39 Jahre | 40-49 Jahre | 50-59 Jahre | 60-69 Jahre | 70-91 Jahre |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 10-19 Jahre | 0,1303 | 0,0015 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| 20-29 Jahre | | 0,1196 | < 0,0001 | 0,0042 | 0,0016 | 0,0121 |
| 30-39 Jahre | | | 0,0014 | 0,1192 | 0,0517 | 0,2108 |

Ein lineares Regressionsmodell konnte erfolgreich an den Anstieg der Prävalenz im Alter angewandt werden ($r^2 = 0,97$). Der Anstieg betrug zwischen dem 5. und 44. Lebensjahr 1,6 % pro Jahr.

4.2 Die Frequenz von zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen bei gesunden Probanden

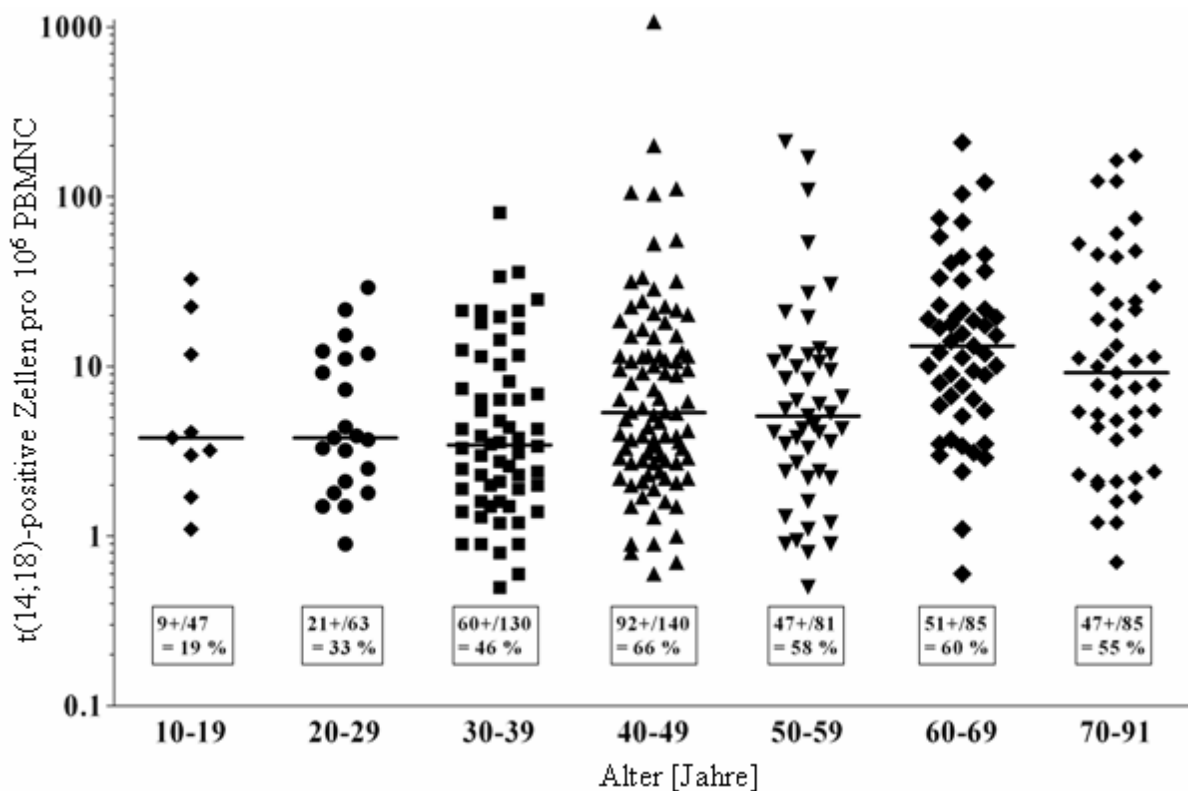


Abb. 3: Frequenz von t(14;18)-positiven Zellen bei verschiedenen Altersgruppen

Neben der Prävalenz von t(14;18)-positiven Zellen in gesunden Individuen wurde auch die Frequenz der zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen untersucht und nur die medianen Frequenzen der t(14;18)-positiven Individuen berechnet und angegeben. In Abb. 3 wird die Frequenz von t(14;18)-positiven Zellen pro 1 Million Zellen des peripheren Blutes in Abhängigkeit der unterschiedlichen Altersgruppen gezeigt. Die Zunahme der medianen Frequenzen von t(14;18)-positiven Zellen zeigen eine deutliche Assoziation im Bezug auf das Alter der Probanden (siehe Tab. 5). Die mediane Frequenz t(14;18)-positiver Zellen war in den beiden Altersgruppen 60 -69 Jahre (13,29 / 10^6 PBMNC) und 70 – 91 Jahre (9,2 / 10^6 PBMNC) signifikant höher als in den jüngeren Altersgruppen ($< 5,4 / 10^6$ PBMNC). Die Person mit der höchsten t(14;18)-Frequenz (1079 / 10^6 PBMNC) war jedoch 44 Jahre alt. 4 % der positiven Individuen wiesen mehr als eine t(14;18)-positive Zelle pro 25.000 PBMNC auf und waren alle älter als 40 Jahre. Zur Gegenüberstellung der Frequenzen in den verschiedenen Altersgruppen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

Tab. 5: t(14;18)-Frequenzen in den Altersgruppen

| Altersgruppe | n | medianes Alter | mediane Frequenz [x / 10^6 PBMNC] | Bereich der Frequenz Min. – Max. [x / 10^6 PBMNC] | mediane Sensitivität |
|--------------|-----|----------------|-------------------------------------|---|----------------------|
| 10-19 | 47 | 16,1 | 3,80 | 1,1 – 32,8 | 430.386 |
| 20-29 | 63 | 25 | 3,80 | 0,9 – 29,2 | 567.002 |
| 30-39 | 130 | 36 | 3,45 | 0,5 – 81,0 | 684.500 |
| 40-49 | 140 | 44 | 5,35 | 0,6 – 1078,9 | 704.000 |
| 50-59 | 81 | 54 | 5,10 | 0,5 – 211,0 | 691.026 |
| 60-69 | 85 | 63 | 13,29 | 0,6 – 209,0 | 563.277 |
| 70-91 | 85 | 74 | 9,20 | 0,7 – 174,1 | 612.072 |

Die Altersgruppen 10 – 19 Jahre und 20 – 29 Jahre weisen gegenüber allen anderen Altersgruppen eine signifikant geringere t(14;18)-Frequenz auf (siehe Tab. 6). Bei der Gegenüber-

stellung der älteren Altersgruppen sind mit dem Mann-Whitney-Test keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass nicht nur die Prävalenz zwischen dem 10. und 40. Lebensjahr signifikant zunimmt, sondern auch die Frequenz der t(14;18)-positiven Zellen eine deutliche Steigerung in den älteren Altersgruppen im Vergleich zu den jüngeren Altersgruppen aufweist.

Tab. 6: **Mann-Whitney-Test**

Vergleich der Frequenz zwischen den Altersgruppen,
signifikanter Unterschied bei $p < 0,005$

| p-Wert | 20-29 Jahre | 30-39 Jahre | 40-49 Jahre | 50-59 Jahre | 60-69 Jahre | 70-91 Jahre |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 10-19 Jahre | 0,1126 | 0,0028 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| 20-29 Jahre | | 0,1507 | < 0,0001 | 0,0035 | < 0,0001 | 0,0015 |
| 30-39 Jahre | | | 0,0001 | 0,0393 | 0,0002 | 0,0133 |
| 40-49 Jahre | | | | 0,2211 | 0,3166 | 0,6163 |
| 50-59 Jahre | | | | | 0,0763 | 0,5931 |

4.3 Verweildauer von t(14;18)-positiven Klonen

In einigen gesunden Menschen konnten t(14;18)-positive Klone über einen längeren Zeitraum detektiert werden. In Abb. 4 ist ein solcher Verlauf beispielhaft dargestellt. In diesem Fall konnte ein t(14;18)-positiver Klon über einen Zeitraum von fünf Jahre nachgewiesen werden. Die mediane Frequenz der zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen lag bei $80 \text{ pro } 10^6$ PBMNC.

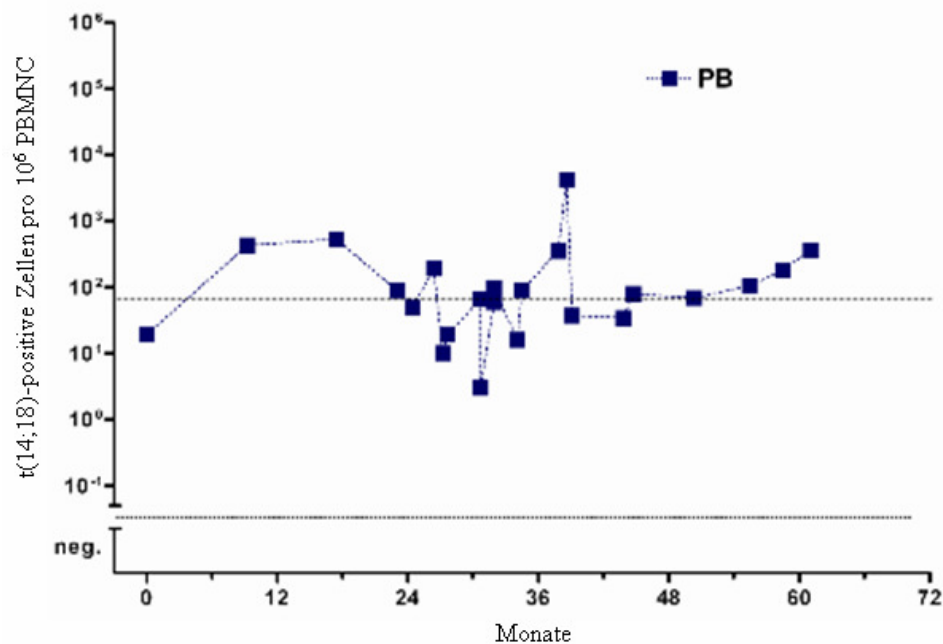


Abb. 4: **Quantitative Analyse spezifischer t(14;18)-positiver Zellklone** in einem gesunden Probanden über den Zeitraum von 5 Jahren

In Abb. 5 sind die Ergebnisse einer weiteren Untersuchung dargestellt. Geprüft wurden die Sequenz der t(14;18)-positiver Zellen im peripheren Blut eines Patienten nach einer allogenen Blutstammzelltransplantation und die Sequenz der t(14;18)-positiven Zellen im periphere Blut seines Spenders. Exakt die gleiche t(14;18)-Sequenz wurde in den Stammzellen des Spenders vor der Transplantation gefunden, als auch im Spender und dem Empfänger sieben Jahre nach der Transplantation.

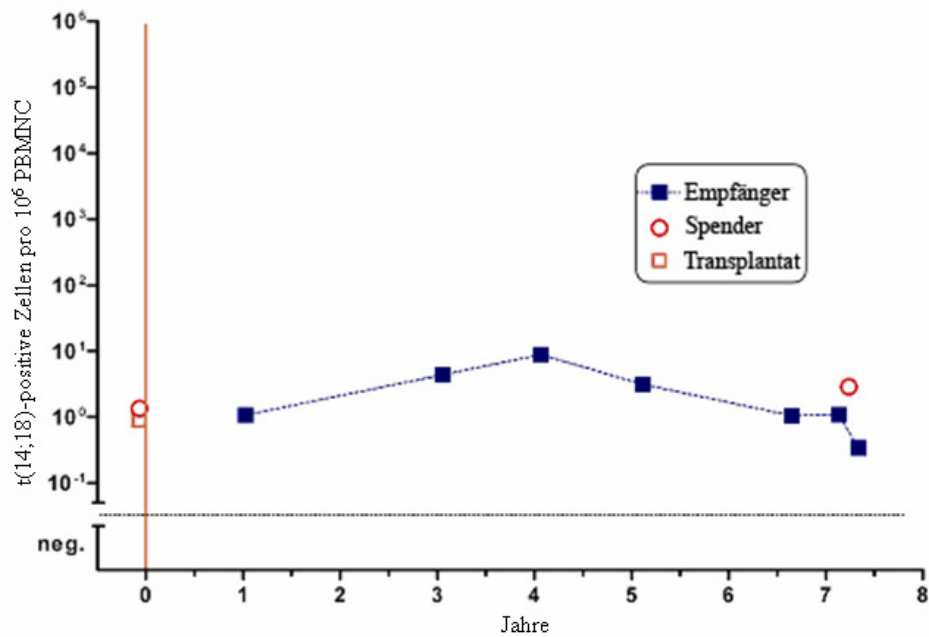


Abb. 5: Nachweis eines t(14;18)-positiven Zellklons beim Empfänger und Spender, sowie in dem Blutstammzellentransplantat

4.4 Auftreten der t(14;18)-positiven Zellen

Das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Greifswald stellte von 10 Kindern jünger als 1 Jahr Tonsillenproben zur Verfügung, die auf t(14;18)-positive Zellen hin untersucht wurden. In keinen der untersuchten Tonsillenproben waren t(14;18)-positive Zellen nachweisbar (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Lymphatisches Gewebe von Neugeborenen und Kleinkindern

| Alter | peripheres Blut | Knochenmark | Tonsille | Lymphknoten | Milz |
|--------------------|-----------------|-------------|------------|-------------|---------|
| 1 Monat (n=1) | negativ | negativ | negativ | negativ | negativ |
| 10 Monate (n=1) | negativ | negativ | negativ | negativ | negativ |
| Neugeborene (n=10) | | | 10 negativ | | |
| Summe | 0/2 | 0/2 | 0/12 | 0/2 | 0/2 |

Zusätzlich erhielten wir aus dem Institut für Rechtsmedizin Lymphknoten, Tonsillen, Milzen, Knochenmarkproben und peripheres Blut von 11 Individuen zwischen 17 und 32 Jahren, die nicht am folliculären Lymphom erkrankten.

In den Milzen und den Tonsillen wurden t(14;18)-positive Zellen mit der höchsten medianen Frequenz detektiert, während nur 2 von 11 Knochenmarkproben t(14;18)-positive Zellen enthielten (siehe Tab. 8). Bei sechs Individuen fanden wir mehr als ein Klon in den verschiedenen Gewebeproben. Außerdem waren bei einem Individuum im peripheren Blut und der Milz t(14;18)-positive Zellen mit identischer Sequenz vorhanden. Es konnte gezeigt werden, dass in den verschiedenen lymphoiden Organen gesunder Personen t(14;18)-positive Zellen detektierbar sind und diese in dem einen Fall zwischen den Organen zirkulieren.

Tab. 8: Untersuchung von lymphatischen Geweben auf t(14;18)-Translokationen

| Alter | Peripheres Blut | Knochenmark | Tonsille | Lymphknoten | Milz |
|--------------|-----------------|-------------|----------|-------------|---------|
| 17 Jahre (a) | positiv | negativ | negativ | negativ | negativ |
| 17 Jahre (b) | negativ | negativ | positiv | negativ | negativ |
| 18 Jahre (a) | negativ | negativ | positiv | negativ | positiv |
| 18 Jahre (b) | positiv | positiv | positiv | negativ | positiv |
| 20 Jahre | negativ | negativ | negativ | negativ | negativ |
| 21 Jahre | negativ | negativ | negativ | negativ | negativ |
| 22 Jahre | negativ | negativ | negativ | negativ | positiv |
| 26 Jahre | positiv | negativ | positiv | positiv | negativ |
| 27 Jahre | positiv | negativ | negativ | negativ | positiv |
| 31 Jahre | negativ | negativ | positiv | positiv | positiv |
| 32 Jahre | positiv | positiv | negativ | positiv | positiv |
| Ergebnis | 5+/11 | 2+/11 | 5+/11 | 3+/11 | 6+/11 |

4.5 Verteilung der BCL2/IgH-Bruchpunkte

Um die Gefahr einer Kontamination der Proben zu verhindern, wird besondere Sorgfalt bei der Aufarbeitung der Materialien verlangt. Zum Ausschluss von Kontaminationen und zur Bestimmung der Verteilung der Bruchpunkte wurden 33 amplifizierte DNA-Fragmente von t(14;18)-positiven Proben sequenziert, die in der Gelelektrophorese ähnliche Fragmentgrößen gezeigt hatten. Die Basennummern der Bruchpunktregionen für das Bcl-2-Gen (M14745) stammen aus Cleary et al.²⁷, die der jeweils beteiligten J_H Region (J00256) aus Ravetch et al.⁷⁷. Die ermittelten Sequenzen sind in Tab. 9 zu sehen.

Die individuellen N-Regionen sind in Bezug auf die Bruchpunkte von Chromosom 18q21 und 14q32 dargestellt. Bei allen gefundenen Sequenzen handelt es sich ausnahmslos um typische Bcl-2-MBR/J_H Translokationen, bestehend aus einem 5'-Bcl-2-Anteil, einem 3'-J_H-Segment und einer dazwischen liegenden N-Region. Es konnte festgestellt werden, dass sie sich nicht von den bei folliculären Lymphomen gefundenen t(14;18)-Translokationen unterscheiden.

Ebenso verteilen sich die Bruchpunkte innerhalb der MBR auf drei eng begrenzte Regionen (auch Cluster genannt) entsprechend den Beobachtungen bei folliculären Lymphomen, wie sie bei Wyatt et al.⁴³ und Cotter et al.³⁹ bereits beschrieben wurden. (Abb. 6 auf Seite 57)

Verglichen wurden die sequenzierten Proben der gesunden Individuen untereinander, sowie mit allen bisher im Labor untersuchten Proben von Patienten mit folliculären Lymphomen. In keinem Fall waren identische Sequenzen nachweisbar. Somit können „carry over“ von Bcl-2/J_H-DNA-Fragmenten und damit falsch positive Ergebnisse durch Kontamination ausgeschlossen werden.

Tab. 9: Bruchpunkte bei Normalpersonen

| Sequenz-Nr. | BCL2-Bruchpunkt | N-Segment | J-Segment | Länge (bp) |
|-------------|-----------------|------------------------------------|-----------|------------|
| 1 | 3115 | GGGCCGCCAGAACCTCAAAGGCG GTCCACT | J5 | 175 |
| 2 | 3050 | CAACCCGTCGCGG | J5 | 113 |
| 3 | 3082 | CCCCTCCGG | J6 | 171 |
| 4 | 3043 | GCTCAA | J6 | 117 |
| 5 | 3113 | CGTTCGTTACCCCTCCCGGG | J6 | 147 |
| 6 | 3141 | GCT | J5 | 187 |
| 7 | 3163 | TATCAGGTTTCGACCC | J1 | 205 |
| 8 | 3051 | GAAAGCGTCGGGAAAA | J6 | 88 |
| 9 | 3114 | TAGGGAGGCCCT | J6 | 145 |
| 10 | 3118 | GTCTAATGGGCTACTACTACTAC | J6 | 208 |
| 11 | 3057 | CCTCGTCGC | J6 | 119 |
| 12 | 3109 | TA | J6 | 194 |
| 13 | 3160 | TTCCGTACAACCTGGTTCGACCC | J1 | 224 |
| 14 | 3112 | GA | J1 | 147 |
| 15 | 3058 | GAATCCCCTA | J4 | 111 |
| 16 | 3054 | | J6 | 104 |
| 17 | 3045 | CTGTCCCTCCCAAC | J4 | 90 |
| 18 | 3059 | CCGACTTCAGGACCCA | J6 | 160 |
| 19 | 3050 | GCCCCAAC | J4 | 125 |
| 20 | 3082 | CCTCTCATTGGGCCATG | J6 | 152 |
| 21 | 3113 | TTGCCGTCA | J6 | 109 |
| 22 | 3113 | GAGCACCCGAATA | J1 | 179 |
| 23 | 3054 | CCGGGACCTGAACTGGTTCGACCC | J4 | 138 |
| 24 | 3059 | | J1 | 75 |
| 25 | 3163 | GTATCAGG | J1 | 237 |
| 26 | 3151 | GGGGCAGGG | J6 | 211 |
| 27 | 3118 | TCTTCTTCG | J6 | 209 |
| 28 | 3056 | TGAGTCTGG | J6 | 147 |
| 29 | 3056 | GGTCGGAGTCCCCCGTCGT | J6 | 157 |
| 30 | 3163 | TATCAGGTTTCGACCC | J1 | 237 |
| 31 | 3163 | TATCAGGTTTCGACCC | J1 | 239 |
| 32 | 3060 | TTATAACTGGTTCGACCC | J4 | 137 |
| 33 | 3060 | TTATAACTGGTTCGACCC | J4 | 137 |

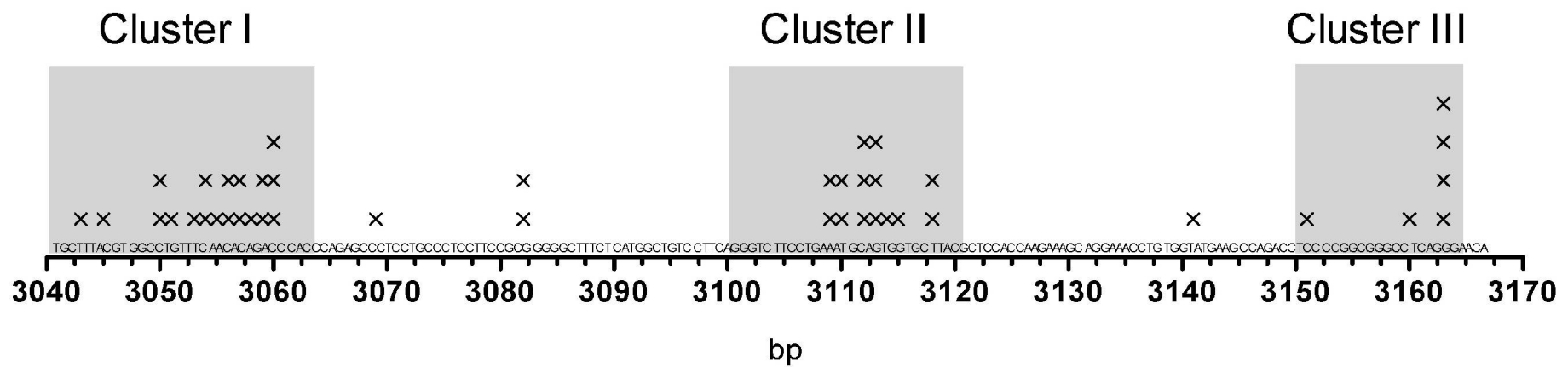


Abb. 6: **Lokalisation der Bruchpunkte von t(14;18)-Translokationen bei gesunden Personen,**
 die von Wyatt et al. und Cotter et al. beschriebenen Cluster (I – III) sind durch graue Boxen markiert

4.6 Transfektion von B-Zelllinien

Die t(14;18)-Translokation und die damit verbundenen kontinuierliche Bcl-2-Expression stellt nur das initiale Ereignis in der Lymphomagenese des follikulären Lymphoms dar. Die Rolle weiterer Gene bezüglich einer malignen Transformation zum follikulären Lymphom und der Progression zum hochmalignen Lymphom ist noch unklar.

Für diese Untersuchungen standen drei Zelllinien (DOGKIT, DOGUM und GUMBUS) von Lymphompatienten, die in dem Labor von Prof. Dölken etabliert wurden, zur Verfügung. Über si-RNA Inhibition sollten durch Genexpressionsanalysen die Gene identifiziert werden, die von einer hohen Bcl-2-Expression beziehungsweise von einer konstitutiven c-myc-Expression abhängig sind.

Im Vergleich zu der bereits etablierten B-Zelllinie RAJI, die als Kontrolle für der Transfektionstechnik diente, lassen sich diese drei Zelllinien mit der gewählten Elektroporationsmethode deutlich schwieriger transfizieren. Nur die B-Zelllinie GUMBUS konnte reproduzierbar mit einer Effizienz von 60 % mit Bcl-2-siRNA transfiziert werden.

4.6.1 Transfektionsoptimierung

Im weiteren Verlauf der Arbeiten sollte eine Optimierung der Transfektionseffizienz und Vitalität nach der Transfektion erreicht werden. Für die Transfektion mit dem Elektroporationsverfahren von Amaxa standen die Parameter Stromstärke, Prozessdauer und Probenpuffer, die optimiert werden konnten, zur Verfügung. Durch Optimierungsexperimente sollte ein geeignetes Behandlungsprotokoll erstellt und etabliert werden.

Die Zelllinien wurden mit fluoreszierenden Oligonukleotiden transfiziert und mit verschiedenen Stromstärken und Prozesszeiten, ausgehend von geringen Stromstärken und Zeiten hin zu hohen Stromstärken und langen Verweilzeiten behandelt. Die sechs unterschiedlichen Programme (A-20, X-01, X-05, L-29, D-23, G-10) waren der Ausgangspunkt für die Optimierung der Transfektion von DOGKIT-Zellen.

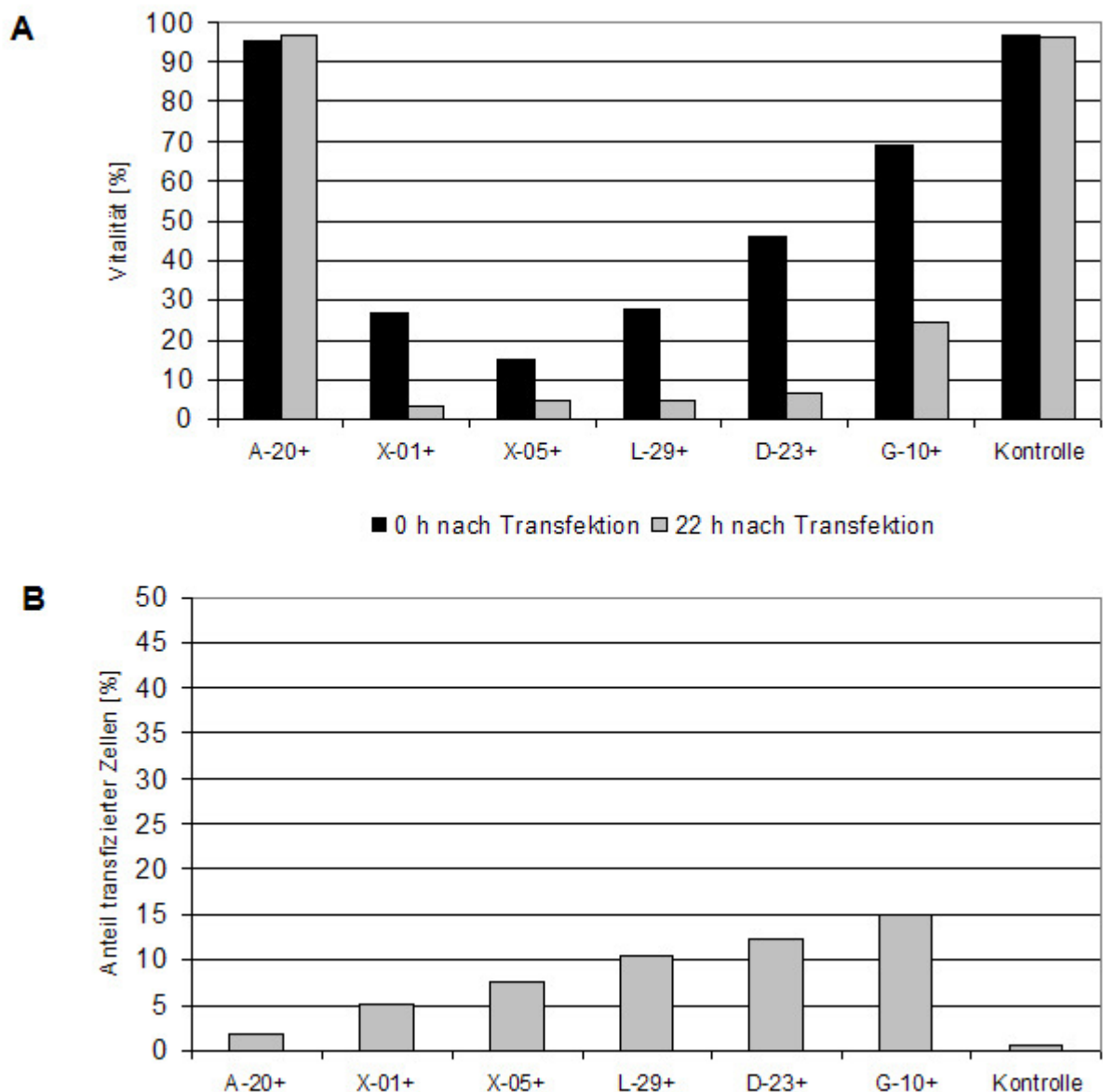


Abb. 7: Transfektion der DOGKIT-Zelllinie

A) Die Vitalität der Zellen wurde direkt nach der Transfektion und nach 22 h mittels Trypanblaufärbung ermittelt. B) Bestimmung der Transfektionseffizienz durch Messung der Fluoreszenz 22 h nach der Transfektion

Die Ergebnisse der Optimierungsexperimente wiesen zwei Extreme auf. Mit dem Programm A-20 lag die Vitalität der DOGKIT-Zellen direkt nach der Transfektion über 90 % (siehe Abb. 7). Obwohl die Zellen einmal mit und einmal ohne fluoreszierenden Oligonukleotiden transfiziert wurden, konnten keine Unterschiede in der Fluoreszenz festgestellt werden. Um die fluoreszierenden Oligonukleotide in die Zellen zu transfizieren, war das Programm A-20 offensichtlich nicht effektiv genug. Zum anderen zeigte sich, dass die Programme X-01, X-05, L-29 und D-23 auf die DOGKIT-Zellen letal wirkten. Lediglich bei Programm G-10 wurden 22 Stunden nach der Transfektion noch 24 % vitale und 15 % fluoreszierende DOGKIT-Zellen detektiert. Von den vitalen DOGKIT-Zellen hatten 24 % die fluoreszierenden Oligonukleotide aufgenommen. Das Programm G-10 wurde folglich für die nächsten Transfektionsexperimente verwendet.

Neben diesen beschriebenen Verfahren der Elektroporation testeten wir noch andere Transfektionsmethoden und Reagenzien, wie zum Beispiel das Lipofectamin 2000 (Invitrogen) und FuGene (Roche), sogenannte Lipofektionsmethoden. Jedoch brachten diese Methoden im Vergleich zur Elektroporation keine Effizienzsteigerung in unseren Experimenten, sowie gar keinen Erfolg bei der Einschleusung von fluoreszierenden Oligonukleotiden in die DOGKIT-Zellen.

4.6.2 Selektion von transfizierten Zellen

Als nächstes galt es ein Verfahren für die Anreicherung der wenigen transfizierten DOGKIT-Zellen zu entwickeln. Das sollte mit der Kotransfektion von pMACS 4.1 Vektoren der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) realisiert werden. Durch diese Methode

konnten die transfizierten DOGKIT-Zellen angereichert werden und machten nach der Selektion 60 % aller Zellen aus.

Mit Hilfe dieses nun optimierten Verfahrens wurde die Transfektion mit der ausgewählten DOGKIT-Zelllinie wiederholt und an Stelle der fluoreszierenden Oligonukleotiden wurden si-RNA gegen Bcl-2 eingesetzt. Über den Western Blot konnte jedoch keine signifikante Veränderung in der Bcl-2-Konzentration der transfizierten DOGKIT-Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 8). Auch auf m-RNA Ebene waren mit der quantitativen real-time PCR keine Unterschiede in der Bcl-2-Expression auszumachen.

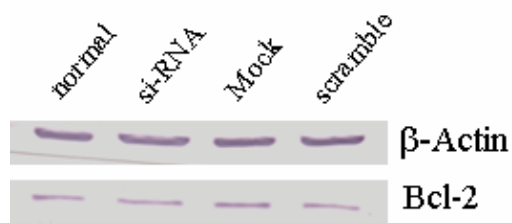


Abb. 8: Western Blot DOGKIT-Zelllinie

5 Diskussion

5.1 t(14;18)-positive Zellen in gesunden Menschen

Die t(14;18)-Translokation, die zu einer kontinuierlichen Bcl-2-Expression in B-Zellen führt, wird als initialer Schritt bei der Entstehung maligner Lymphome gesehen.^{26;86;87} Die t(14;18)(q32;q21)-Translokationen sind jedoch nicht nur in malignen Lymphomzellen zu finden, sondern können auch bei mehr als 50 % gesunder Personen nachgewiesen werden.^{60;88;89} Sie sind auf eine fehlerhafte VDJ-Rekombination in einer frühen Entwicklungsstufe der B-Zellreifung im Knochenmark mit sich anschließender klonaler Expansion zurückzuführen.⁹⁰ Neuere Studien unterstützen diese Hypothese, in denen klontypische Sequenzen der t(14;18)-Translokation in verschiedenen B-Zellsubpopulationen ermittelt und auf einem geringen Level in naiven (CD27-) B-Lymphozyten gefunden wurden.⁹¹ Diese Translokationen entstehen wahrscheinlich im Knochenmark während der Kindheit und dem frühen Erwachsenenalter, wenn das Immunsystem besonders aktiv ist.

Es ist anzumerken, dass bereits einige Studien bei gesunden Personen eine steigende Prävalenz der Bcl-2/J_H-Rearrangements mit dem Alter aufzeigten^{2;3;92}, aber wiederum andere Studien keine Altersabhängigkeit feststellen konnten.^{57;60-63}

5.2 Prävalenz von zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen

In dieser Studie, in der eine standardisierte, hoch sensitive real-time PCR Technik zur Anwendung kam, wurde die Prävalenz des Bcl-2/J_H-Rearrangements in über 700 DNA-Proben gesunder Individuen untersucht. Die mediane Prävalenz der zirkulierenden t(14;18)-positiven

Zellen im peripheren Blut aller gesunden Individuen lag bei 46 % (327 von 715) und es konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz der zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen eine deutliche Assoziation mit dem Alter aufweist. Mit zunehmendem Alter (vom 10. bis 40. Lebensjahr) erhöht sich die Prävalenz signifikant, nimmt aber ab dem 60. Lebensjahr nicht weiter zu und zeigt zwischen den älteren Altersgruppen keine wesentlichen Differenzen auf.

Vorteilhaft für das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung war offensichtlich eine ausgewogene Verteilung der Individuen in allen Altersgruppen. In den Studien von Rauzy et al.⁶² und Summers et al.⁶³ beispielsweise konnte ein Zusammenhang zwischen Prävalenz und dem Alter nicht aufgezeigt werden. Die Ursache kann in der Altersverteilung zu sehen sein. Das mediane Alter in der Studie von Rauzy et al. lag bei 70 Jahren, in der Studie von Summers et al. waren die Altersgruppen von 0 bis 20 Jahre nicht vertreten. Für das Ergebnis dieser Arbeit gaben genau diese letztgenannten Altersgruppen einen großen Aufschluss über den Anstieg der Prävalenz der zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen im peripheren Blut.

5.2.1 Bcl-2-Genrearrangements bei Kindern

Die in der Arbeit erhobenen Daten deuten an, dass zirkulierende t(14;18)-positive Zellen nicht vor dem 9. Lebensjahr auftreten. Unter den getesteten Tonsillenproben neugeborener Kinder gab es keinen Fall, in dem t(14;18)-positive Zellen nachgewiesen werden konnte. Es wurden 84 periphere Blutproben gesunder Kinder getestet, unter denen sich auch 36 Nabelschnurblutproben befanden, dennoch war kein Fall mit dieser genetischen Aberration nachweisbar. Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen aus drei früheren Studien, die in nur 11,5 % (4/35) der gesunden Kindern zwischen 0 und 19 Jahren t(14;18)-positive Zellen fanden.^{2;3;62} In einer weiteren Studie von Yasukawa et al.⁶⁴ fand man nur in 2 % (1/49) der japanischen Kinder

zirkulierende t(14;18)-positive Zellen, wobei der Durchschnitt unter den Erwachsenen bei über 20 % lag. Dies steht im Einklang mit der geringeren Inzidenz von folliculären Lymphomen in der japanischen im Vergleich zur kaukasischen Population.

Diesem Ergebnis stehen folliculäre Lymphome bei Kindern gegenüber, die annähernd 1 % bis 2 % aller pädiatrischen Lymphome ausmachen.⁹³⁻⁹⁵ Lorschach et al.⁹⁶ fanden nur in 2 von 16 Patienten mit folliculären Lymphomen mittels PCR Bcl-2-Genrearrangements. Diese 2 Patienten wiederum hatten ein folliculäres Lymphom Grad III, während die anderen Patienten mit Bcl-2 negativen Tumoren Grad I oder Grad II hatten. Darüber hinaus waren die pädiatrischen Patienten, deren Tumore in der Immunhistochemie Bcl-2-negativ getestet wurden, bei der Erstdiagnose unter 12 Jahre alt.

Ebenso konnten Finn et al.⁹⁷ bei den pädiatrischen Patienten mit primären folliculären Lymphomen keine Bcl-2-Genarrangements oder Überexpression des Bcl-2-Proteins feststellen. Dies scheint eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese des pädiatrischen folliculären Lymphoms zu spielen.

Der fehlende Nachweis von t(14;18)-positiven Zellen bei Kindern im Alter von 0 bis 9 Jahren passt zu der extrem niedrigen Inzidenz von folliculären Lymphomen in diesem Alter und zu der Beobachtung, dass folliculäre Lymphome von Kindern in diesem Alter offensichtlich in der Regel keine t(14;18)-Translokationen aufweisen.

Zirkulierende t(14;18)-positive Zellen wurden frühestens in Kindern beziehungsweise Jugendlichen zwischen 10 und 19 Jahren, wo das Immunsystem besonders aktiv ist, mit einer durchschnittlichen Prävalenz von 19 % detektiert. Dieses Ergebnis stützt die Vorstellung, dass die t(14;18)-positiven Zellen primär im lymphatischen Gewebe auftreten, wo die Mikroumge-

bung wahrscheinlich die Proliferation, die Persistenz und klonale Expansion einiger t(14;18)-positiver B-Zellen fördert.⁹⁸

5.3 Die Frequenzen zirkulierender t(14;18)-positiver Zellen in gesunden Menschen

Das Auffinden von t(14;18)-positiven B-Zellklonen in gesunden Menschen ist ein Hinweis darauf, dass diese Translokation ein primäres Ereignis für die anschließende Entwicklung eines follikulären Lymphoms darstellen könnte. Generell ist die Frequenz der zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen in gesunden Menschen mit einigen wenigen Ausnahmen niedrig, können aber durch hoch sensitive PCR-Untersuchungen in fast 50 % aller Individuen detektiert werden. Bisher ist es unklar, ob eine erhöhte Anzahl von zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen mit einem höheren Risiko für die Entwicklung eines follikulären Lymphoms assoziiert ist.

In dieser Studie fanden wir signifikant höhere mediane Frequenzen t(14;18)-positiver Zellen in gesunden Menschen, die über 60 Jahre alt waren im Vergleich zu Personen unter 60 Jahren. Die medianen Frequenzen t(14;18)-positiver Zellen bei den Altersgruppen 10 – 19, 20 – 29 und 30 – 39 Jahre unterschieden sich kaum. Erst im Vergleich mit den älteren Altersgruppen über 40 Jahre waren die Frequenzunterschiede statistisch signifikant. Wiederum zeigten sich zwischen den Altersgruppen 40 – 49, 50 – 59, 60 – 69 und 70 – 91 Jahre keine signifikanten Frequenzunterschiede. Bis auf eine Ausnahme wurden nur in gesunden Menschen, die älter als 40 Jahre waren, hohe Frequenzen (mehr als 1 in 25000 PBMNC) von t(14;18)-positiver Zellen detektiert. Dass es keine Proben mit mehr als einer t(14;18)-positiven Zelle pro 1000 PBMNC bei gesunden Menschen über 60 Jahre gab und die Präsenz dieser positiven Zellen in gesun-

den Individuen über 50 Jahre nahezu konstante blieb, lässt auf regulatorische Mechanismen im Wachstum der Zelle oder dem Immunsystem schließen.

Bis heute gibt es keinen endgültigen Beweis für die Sequenz einer t(14;18)-positive B-Zelle, die in einem gesunden Menschen nachgewiesen wurde und sich später in ein malignes follikuläres Lymphom weiter entwickelte. Diese Hypothese kann nur durch eine groß angelegte prospektive Langzeitstudie nachgeprüft werden. Außerdem ist es im Ablauf solcher Studien vielleicht möglich, zusätzliche molekulare Veränderungen zu entdecken, die eventuell zu einer Transformation einer langlebigen t(14;18)-positive B-Zelle in eine maligne Lymphomzelle führen.

Die Identifizierung dieser zusätzlichen molekularen Ereignisse würde einen tieferen Einblick in die molekulare Pathogenese des follikulären Lymphoms geben und könnte dabei helfen, neue molekulare Angriffspunkte für therapeutische Strategien gegen follikuläre Lymphome zu definieren, die bei den meisten Patienten noch immer unheilbar sind.

5.4 Persistenz von t(14;18)-positiven Zellklonen

Liu et al.³ beschrieben in ihrer Studie zwei Fälle, in denen bei gesunden Individuen über einen Zeitraum von 5 Monaten identische t(14;18)-positive Zellklone nachweisbar waren.

Ebenso konnte die Gruppe um Roulland et al.⁹⁸ zeigen, dass auch Zellen mit einer t(14;18)-Translokation weitere Reifungsprozesse durchlaufen können und imstande sind, auf die Anregung exogener Antigene zu antworten. Sie konnten ebenfalls nachweisen, dass 58 % der untersuchten Individuen nach einer dreijährigen Verlaufsstudie deutlich mehr t(14;18)-positive Zellen aufwiesen als zum Beginn.⁸⁸ Es bleibt jedoch unklar, ob die Anzahl dieser Zellen eigentlich beibehalten wurde oder durch antigene Stimulation und der letztlich daraus ergebe-

nen dynamischen Ansammlung von t(14;18)-positiven Zellen bis zu einem Niveau anwuchs, das bei der Erstdiagnose von Patienten mit folliculären Lymphomen detektiert wird.

Es wurden für diese Arbeit auch gesunde Personen, bei denen man t(14;18)-positive Zellen fand, regelmäßig über einen längeren Zeitraum auf t(14;18)-Translokationen untersucht.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass im Vergleich zur oben zitierten Studie von Liu et al. bei einigen gesunden Individuen spezifische t(14;18)-positive Zellklone über einen noch längeren Zeitraum nachweisbar waren. Im peripheren Blut dieser gesunden Personen zirkulierten die identischen Klone sogar mehr als 5 Jahre nach dem erstmaligen Erfassen der t(14;18)-positiven Zellklone.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass t(14;18)-positive Zellklone eines Spenders durch eine allogene Blutstammzelltransfusion auf den Empfänger übertragen wurde und dort noch nach über sieben Jahren mittels der quantitativen real-time PCR detektierbar sind.

Die Persistenz der t(14;18)-positiven Zellklone über die Jahre könnte darin begründet sein, dass die t(14;18)-Translokation solchen B-Zellen einen Überlebensvorteil und eine größere Chance für eine klonale Expansion verschafft.

So lassen sich bei einigen gesunden Individuen t(14;18)-positive Zellen in verschiedenen lymphatischen Organen detektieren. Dabei sind die Frequenzen der t(14;18)-positiven Zellen bei Tonsillen und Milz besonders hoch. Dort findet die Antigen-Stimulation und vermutlich auch die Selektion von t(14;18)-positiven Zellen mit hoher Affinität des Immunglobulins für das entsprechende Antigen statt.^{91;99;100}

Ob nun Individuen mit einer hohen Anzahl von t(14;18)-positiver Zellen oder solche mit multiplen t(14;18)-positiven Klonen ein höheres Risiko haben ein malignes Lymphom zu bekommen, kann indes nicht beantwortet werden.

5.5 Transfektion von B-Zelllinien

Über si-RNA Inhibition und Genexpressionsanalysen sollten Gene identifiziert werden, die von einer Überexpression des Bcl-2-Proteins beziehungsweise von einer konstitutiven C-MYC-Expression beeinflusst werden und eine wichtige Rolle in der Pathogenese des folliculären Lymphoms spielen könnten.

Im Gegensatz zu den bereits etablierten Zelllinien, die die häufige Kombination von t(8;14)(q24;q32) und t(14;18)(q32;q21) haben und wo beide IgH Allele in die Translokation involviert sind, trägt die transformierte folliculäre Lymphomzelllinie DOGKIT nur ein transloziertes IgH Allel und ein c-myc-Rearrangement t(8;22).¹⁰¹ Mit der Etablierung dieser Zelllinie ist es erstmals möglich, die Interaktion von Bcl-2 und c-myc systematisch zu untersuchen. Zum Vergleich waren die Zelllinien DOGUM und GUMBUS vorgesehen (siehe Tab. 2).

Die Transfektion von fluoreszierenden Oligonukleotiden, si-RNA und Kotransfektionsvektoren, konnte mit den gewählten Transfektionsmethoden nicht zufriedenstellend realisiert werden.

Die niedrige Vitalität der relativ neu etablierten B-Zelllinien nach der Elektroporation sowie die geringe Transfektionseffizienz bei den Lipofektionsmethoden erschwerten die Arbeit mit den verwendeten B-Zelllinien. Insbesondere die DOGKIT-Zelllinie erwies sich gegenüber der Elektroporationsmethode als sehr empfindlich und ein Großteil der angewandten Transfektionsprogramme wirkte auf die DOGKIT-Zellen letal.

Zusätzliche Optimierungsversuche, wie die Selektion der transfizierten Zellen von den nicht transfizierten Zellen und das Trennen der toten Zellen von den vitalen Zellen, brachten nur minimal bessere Transfektionsergebnisse. Erklären lässt sich dieser Umstand durch eine un-

spezifische Bindung der MACSelect MicroBeads an tote Zellen und Zellbruchstücke, die nach der aggressiven Transfektion den größten Anteil der Zellsuspension ausmachten.

Erschwerend bei der Selektionsmethode über die CD4-Oberflächenmoleküle war die Inkubationszeit von 22 Stunden bis zur maximalen CD4-Expression in den transfizierten DOGKIT-Zellen. Ein Einfluss der verwendeten si-RNA auf die Bcl-2-Expression konnte erst nach der Selektion und Anreicherung der CD4-positiven Zellen untersucht werden. Zu erklären wäre die nicht messbare Inhibition der Bcl-2-Expression mit der Annahme, dass bereits vor den 22 Stunden das Maximum der Inhibition beziehungsweise der Herunterregulierung des Bcl-2-Proteins erreicht wurde und später nicht mehr auf Protein- und m-RNA-Ebene messbar war.

5.6 Ausblick

Nach heutigem Erkenntnisstand stellt die t(14;18)-MBR-Translokation eine der frühesten genetischen Veränderungen dar, die schließlich nach Anhäufung einer Reihe von weiteren genetischen Veränderungen zum Auftreten eines follikulären Lymphoms führen könnte. Über diese zusätzlichen genetischen Veränderungen ist bisher nur sehr wenig bekannt. Die Etablierung von Zelllinien t(14;18)-positiver Zellen von gesunden Personen ist bisher nicht gelungen und wäre ein wesentlicher Schritt für weitere Forschungen zum Verständnis der Genese dieses bösartigen Lymphoms. Des Weiteren ist es bisher ebenfalls nicht gelungen, die klonspezifische Translokation eines Lymphoms über Jahre bis zu einem Zeitpunkt zurückzuverfolgen, zu dem das Lymphom noch nicht vorlag.

Es ist anzunehmen, dass zum Beispiel die weitere Erhöhung der Probandenzahl und die zusätzliche Einbeziehung von gesunden weiblichen Probanden Aufschluss geben, welche Umwelteinflüsse und Lebensweisen, wie zum Beispiel der Nikotin- und Alkoholabusus oder Pestizide, die Prävalenz und Frequenz dieser t(14;18)-positiven Zellen begünstigen. Durch Untersuchungen in populationsbezogenen Studien, wie der SHIP-Studie (Study of Health in Pomerania), könnten diese Fragen beantwortet werden.

Ein möglicher Ansatz ist die Etablierung stabiler si-RNA Vektoren tragender Subklone der drei B-Zelllinien. Hierbei werden die Zelllinien mit einem si-RNA tragenden Vektor retroviral transfiziert und erst durch eine spätere Induktion wird die Expression von si-RNA in den transfizierten und stabilen Zellen initiiert.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit entwickelten wir die folgende Hypothese, die durch anschließende Studien überprüft werden muss:

Bei gesunden Individuen mit einer hohen Frequenz von t(14;18)-positiven Zellen sowie einer langen Verweildauer der t(14;18)-positiven Zellklone besteht ein erhöhtes Risiko für die Bildung eines follikulären Lymphoms.

6 Zusammenfassung

Die t(14;18)-Translokation ist eine zufällig und spontan auftretende Aberration, die bei Verwendung hoch sensitiver PCR-Methoden in über 60 % aller gesunden Menschen detektiert werden kann. Diese Translokation wird darüber hinaus als initiales Ereignis in der Pathogenese des folliculären Lymphoms angesehen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Assoziation zwischen dem Alter und der Prävalenz und Frequenz zirkulierender t(14;18)-positiver Zellen bei gesunden Personen besteht. Dazu wurden über 700 gesunde Menschen mit Hilfe der quantitativen real-time PCR auf die Prävalenz und Frequenz t(14;18)-positiver B-Zellen untersucht.

Im peripheren Blut von Kindern bis 9 Jahren konnten keine zirkulierenden t(14;18)-positive Zellen nachgewiesen werden. Ab dem zehnten Lebensjahr steigt die Prävalenz bis zum vierzigsten Lebensjahr signifikant auf 65 % an und weist eine starke Korrelation mit dem Alter auf. Die mediane Prävalenz der zirkulierenden t(14;18)-positiven Zellen aller getesteter gesunder Personen betrug 46 % (327 von 715). Nur 4,3 % (31 von 715) der untersuchten Personen hatten mehr als eine t(14;18)-positive Zelle pro 25000 PBMNC ($> 40 / 10^6$) und waren bis auf eine Ausnahme über 40 Jahre alt. Untersucht wurden außerdem Tonsillen, Knochenmark, Lymphknoten und Milz von gesunden Probanden im Alter zwischen 0 bis 32 Jahren. In allen untersuchten lymphatischen Gewebeproben von Neugeborenen konnten keine t(14;18)-positive Zellen detektiert werden. Bei gesunden Personen im Alter zwischen 17 und 32 Jahren wurden t(14;18)-positive Zellen mit den höchsten Frequenzen in den Tonsillen und der Milz nachgewiesen und nur zwei Knochenmarksproben enthielten t(14;18)-positive Zellen.

Diese Ergebnisse werden das Verständnis über die Relevanz von t(14;18)-positiven Zellen in gesunden Menschen als ein Risiko-Marker im Bezug auf die Entwicklung zu einer Vorstufe zum Lymphom weiter verbessern.

Mit dem Versuch, Bcl-2 si-RNA in drei etablierte B-Zelllinien zu transfizieren und dadurch eine Inhibition des Bcl-2-Proteins zu bewirken, sollten mit anschließenden Genexpressionsanalysen die Gene identifiziert werden, die von einer hohen Bcl-2-Expression abhängig sind. Im Vergleich zu anderen B-Zelllinien ließen sich diese drei Zelllinien deutlich schwieriger transfizieren und die gewählte Transfektionsmethode erbrachte nicht die nötige Transfektionseffizienz. Die Etablierung stabil, retroviral transfizierter Subklone aller drei ausgewählten B-Zelllinien, die eine induzierbare Expression von si-RNA ermöglichen, stellt eine Alternative dar.

7 Appendix

7.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum:

Unterschrift:

7.2 Lebenslauf

Name: Tobias Berg
Geburtstag: 31.01.1980
Geburtsort: Berlin-Pankow
Anschrift: Makarenkostraße 52B, 17491 Greifswald
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

1986 – 1992 Grundschule, Berlin – Lichtenberg
1992 – 1999 Gymnasium, Berlin – Lichtenberg
1999 Abitur

Wehrdienst:

1999 – 2000 6. Sanitätsregiment in Breitenburg

Studium:

2000 – 2004 Fachhochschule Flensburg
Studiengang: Verfahrenstechnik – Biotechnologie
2004 Diplomierung
seit 2005 Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Studiengang: Medizin (Promotionsstudium)
2005 – 2008 Alfried-Krupp-Graduiertenkolleg „Tumorbiologie“,
gefördert mit Mitteln der Alfried Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung
(Essen)

Greifswald, 18. August 2008

Tobias Berg

7.3 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei den Medizinisch Technischen Assistentinnen der Klinik für Innere Medizin C, Abteilung Hämatologie und Onkologie, der Ernst-Moritz-Arndt Universität, für ihren großen persönlichen Einsatz und ihre freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Schüler sowie Herrn Prof. Dölken für die Förderung, die menschliche und fachliche Betreuung, sowie das Überlassen des Dissertationsthemas.

Der Alfred Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

7.4 Literaturverzeichnis

1. Levine, E.G., Arthur, D.C., Frizzera, G., Peterson, B.A., Hurd, D.D., Bloomfield, C.D. There are differences in cytogenetic abnormalities among histologic subtypes of the non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 66, 1985: 1414-1422.
2. Ji, W., Qu, G.Z., Ye, P., Zhang, X.Y., Halabi, S., Ehrlich, M. Frequent detection of Bcl-2/JH translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay. *Cancer Res.* 55, 1995: 2876-2882.
3. Liu, Y., Hernandez, A.M., Shibata, D., Cortopassi, G.A. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 1994: 8910-8914.
4. Stevenson, F., Sahota, S., Zhu, D., Ottensmeier, C., Chapman, C., Oscier, D., Hamblin, T. Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol.Rev.* 162, 1998: 247-259.
5. Tomlinson, I.M., Walter, G., Jones, P.T., Dear, P.H., Sonnhammer, E.L., Winter, G. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J.Mol.Biol.* 256, 1996: 813-817.
6. Steinmetz, M., Altenburger, W., Zachau, H.G. A rearranged DNA sequence possibly related to the translocation of immunoglobulin gene segments. *Nucleic Acids Res.* 8, 1980: 1709-1720.
7. Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 1996: 751-758.

-
8. Deane, M., Norton, J.D. Detection of immunoglobulin gene rearrangement in B lymphoid malignancies by polymerase chain reaction gene amplification. *Br.J.Haematol.* 74, 1990: 251-256.
 9. Trainor, K.J., Brisco, M.J., Wan, J.H., Neoh, S., Grist, S., Morley, A.A. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 78, 1991: 192-196.
 10. Neuberger, M.S., Milstein, C. Somatic hypermutation. *Curr.Opin.Immunol.* 7, 1995: 248-254.
 11. MacLennan, I.C., Gray, D. Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. *Immunol.Rev.* 91, 1986: 61-85.
 12. Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 1996: 751-758.
 13. Huang, C., Stewart, A.K., Schwartz, R.S., Stollar, B.D. Immunoglobulin heavy chain gene expression in peripheral blood B lymphocytes. *J.Clin.Invest* 89, 1992: 1331-1343.
 14. Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* 89, 1997: 1288-1298.
 15. van Es, J.H., Meyling, F.H., Logtenberg, T. High frequency of somatically mutated IgM molecules in the human adult blood B cell repertoire. *Eur.J.Immunol.* 22, 1992: 2761-2764.

-
16. Oprea, M., Perelson, A.S. Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. *J.Immunol.* 158, 1997: 5155-5162.
 17. Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L., Rajewsky, K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N.Engl.J.Med.* 341, 1999: 1520-1529.
 18. Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C., . A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1994: 1361-1392.
 19. Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G, Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., Bloomfield, C.D. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J.Clin.Oncol.* 17, 1999: 3835-3849.
 20. Yunis, J.J., Frizzera, G, Oken, M.M., McKenna, J., Theologides, A., Arnesen, M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N.Engl.J.Med.* 316, 1987: 79-84.
 21. Cleary, M.L., Sklar, J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 1985: 7439-7443.

-
22. Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 229, 1985: 1390-1393.
 23. Ngan, B.Y., Nourse, J., Cleary, M.L. Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of Bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas. *Blood* 73, 1989: 1759-1762.
 24. Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., Korsmeyer, S.J. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 1985: 899-906.
 25. Tsujimoto, Y., Croce, C.M. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 1986: 5214-5218.
 26. McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., Korsmeyer, S.J. Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57, 1989: 79-88.
 27. Cleary, M.L., Smith, S.D., Sklar, J. Cloning and structural analysis of cDNAs for Bcl-2 and a hybrid Bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47, 1986: 19-28.

-
28. Yang, E., Korsmeyer, S.J. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88, 1996: 386-401.
 29. Newton, K., Strasser, A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8, 1998: 68-75.
 30. Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S.A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol.Today* 18, 1997: 44-51.
 31. Gajewski, T.F., Thompson, C.B. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell* 87, 1996: 589-592.
 32. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 1997: 405-413.
 33. Kluck, R.M., Bossy-Wetzler, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1997: 1132-1136.
 34. Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1997: 1129-1132.
 35. Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., Thompson, C.B. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 1997: 353-357.

-
36. Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M., Thompson, C.B. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385, 1997: 353-357.
 37. Petit, P.X., Susin, S.A., Zamzami, N., Mignotte, B., Kroemer, G. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett.* 396, 1996: 7-13.
 38. Vaux, D.L., Cory, S., Adams, J.M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 1988: 440-442.
 39. Cotter, F.E., Price, C., Meerabux, J., Zucca, E., Young, B.D. Direct sequence analysis of 14q+ and 18q- chromosome junctions at the MBR and MCR revealing clustering within the MBR in follicular lymphoma. *Ann.Oncol.* 2 Suppl 2, 1991: 93-97.
 40. McKeithan, T.W. Molecular biology of non-Hodgkin's lymphomas. *Semin.Oncol.* 17, 1990: 30-42.
 41. Bakhshi, A., Wright, J.J., Graninger, W., Seto, M., Owens, J., Cossman, J., Jensen, J.P., Goldman, P., Korsmeyer, S.J. Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 1987: 2396-2400.
 42. Tsujimoto, Y., Louie, E., Bashir, M.M., Croce, C.M. The reciprocal partners of both the t(14; 18) and the t(11; 14) translocations involved in B-cell neoplasms are rearranged by the same mechanism. *Oncogene* 2, 1988: 347-351.

-
43. Wyatt, R.T., Rudders, R.A., Zelenetz, A., Delellis, R.A., Krontiris, T.G. BCL2 oncogene translocation is mediated by a chi-like consensus. *J.Exp.Med.* 175, 1992: 1575-1588.
 44. Haluska, F.G., Finver, S., Tsujimoto, Y., Croce, C.M. The t(8; 14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-J joining. *Nature* 324, 1986: 158-161.
 45. Jaeger, U., Karth, G.D., Knapp, S., Friedl, J., Laczika, K., Kusec, R. Molecular mechanism of the t(14;18)--a model for lymphoid-specific chromosomal translocations. *Leuk.Lymphoma* 14, 1994: 197-202.
 46. Lewis, S.M., Agard, E., Suh, S., Czyzyk, L. Cryptic signals and the fidelity of V(D)J joining. *Mol.Cell Biol.* 17, 1997: 3125-3136.
 47. Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314, 1985: 67-73.
 48. Wahls, W.P., Wallace, L.J., Moore, P.D. Hypervariable minisatellite DNA is a hotspot for homologous recombination in human cells. *Cell* 60, 1990: 95-103.
 49. Jaeger, U., Purtscher, B., Karth, G.D., Knapp, S., Mannhalter, C., Lechner, K. Mechanism of the chromosomal translocation t(14;18) in lymphoma: detection of a 45-Kd breakpoint binding protein. *Blood* 81, 1993: 1833-1840.
 50. Storb, U. Progress in understanding the mechanism and consequences of somatic hypermutation. *Immunol.Rev.* 162, 1998: 5-11.

-
51. Goossens, T., Klein, U., Kuppers, R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 1998: 2463-2468.
 52. Sale, J.E., Neuberger, M.S. TdT-accessible breaks are scattered over the immunoglobulin V domain in a constitutively hypermutating B cell line. *Immunity*. 9, 1998: 859-869.
 53. Wilson, P.C., de, B.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.* 187, 1998: 59-70.
 54. Welzel, N., Le, T., Marculescu, R., Mitterbauer, G., Chott, A., Pott, C., Kneba, M., Du, M.Q., Kusec, R., Drach, J., Raderer, M., Mannhalter, C., Lechner, K., Nadel, B., Jaeger, U. Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 61, 2001: 1629-1636.
 55. Limpens, J., de, J.D., van Krieken, J.H., Price, C.G., Young, B.D., van Ommen, G.J., Kluin, P.M. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 6, 1991: 2271-2276.
 56. Aster, J.C., Kobayashi, Y., Shiota, M., Mori, S., Sklar, J. Detection of the t(14;18) at similar frequencies in hyperplastic lymphoid tissues from American and Japanese patients. *Am.J.Pathol.* 141, 1992: 291-299.

-
57. Bell, D.A., Liu, Y., Cortopassi, G.A. Occurrence of Bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers. *J.Natl.Cancer Inst.* 87, 1995: 223-224.
 58. Dolken, L., Schuler, F., Dolken, G. Frequency of BCL-2/J(H) translocation in healthy males exposed to low-level radiation in comparison to age-matched health controls. *Blood* 100, 2002: 1513-1514.
 59. Limpens, J., Stad, R., Vos, C., de, V.C., de, J.D., van Ommen, G.J., Schuurin, E., Kluin, P.M. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 85, 1995: 2528-2536.
 60. Dolken, G., Illerhaus, G., Hirt, C., Mertelsmann, R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J.Clin.Oncol.* 14, 1996: 1333-1344.
 61. Fuscoe, J.C., Setzer, R.W., Collard, D.D., Moore, M.M. Quantification of t(14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposures to carcinogens. *Carcinogenesis* 17, 1996: 1013-1020.
 62. Rauzy, O., Galoin, S., Chale, J.J., Adoue, D., Albarede, J.L., Delsol, G., al, S.T. Detection of t(14;18) carrying cells in bone marrow and peripheral blood from patients affected by non-lymphoid diseases. *Mol.Pathol.* 51, 1998: 333-338.
 63. Summers, K.E., Goff, L.K., Wilson, A.G., Gupta, R.K., Lister, T.A., Fitzgibbon, J. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the

-
- monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 19, 2001: 420-424.
64. Yasukawa, M., Bando, S., Dolken, G., Sada, E., Yakushijin, Y., Fujita, S., Makino, H. Low frequency of BCL-2/J(H) translocation in peripheral blood lymphocytes of healthy Japanese individuals. *Blood* 98, 2001: 486-488.
65. Deininger, M.W., Bose, S., Gora-Tybor, J., Yan, X.H., Goldman, J.M., Melo, J.V. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res.* 58, 1998: 421-425.
66. Stagnaro, E., Ramazzotti, V., Crosignani, P., Fontana, A., Masala, G., Miligi, L., Nanni, O., Neri, M., Rodella, S., Costantini, A.S., Tumino, R., Vigano, C., Vindigni, C., Vineis, P. Smoking and hematolymphopoietic malignancies. *Cancer Causes Control* 12, 2001: 325-334.
67. Linet, M.S., McLaughlin, J.K., Hsing, A.W., Wacholder, S., Co Chien, H.T., Schuman, L.M., Bjelke, E., Blot, W.J. Is cigarette smoking a risk factor for non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma? Results from the Lutheran Brotherhood Cohort Study. *Leuk.Res.* 16, 1992: 621-624.
68. Schroeder, J.C., Olshan, A.F., Baric, R., Dent, G.A., Weinberg, C.R., Yount, B., Cerhan, J.R., Lynch, C.F., Schuman, L.M., Tolbert, P.E., Rothman, N., Cantor, K.P., Blair, A. A case-control study of tobacco use and other non-occupational risk factors for t(14;18) subtypes of non-Hodgkin's lymphoma (United States). *Cancer Causes Control* 13, 2002: 159-168.

-
69. Besson, H., Renaudier, P., Merrill, R.M., Coiffier, B., Sebban, C., Fabry, J., Trepo, C., Sasco, A.J. Smoking and non-Hodgkin's lymphoma: a case-control study in the Rhone-Alpes region of France. *Cancer Causes Control* 14, 2003: 381-389.
70. Groves, F.D., Linet, M.S., Travis, L.B., Devesa, S.S. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *J.Natl.Cancer Inst.* 92, 2000: 1240-1251.
71. Hartge, P., Devesa, S.S., Fraumeni, J.F., Jr. Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Surv.* 19-20, 1994: 423-453.
72. State-specific prevalence of cigarette smoking among adults and quitting among persons aged 18-35 years--United States, 2006. 56(38), 993-996. 28-9-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*
Ref Type: Generic
73. Morton, L.M., Hartge, P., Holford, T.R., Holly, E.A., Chiu, B.C., Vineis, P., Stagnaro, E., Willett, E.V., Franceschi, S., La, V.C., Hughes, A.M., Cozen, W., Davis, S., Severson, R.K., Bernstein, L., Mayne, S.T., Dee, F.R., Cerhan, J.R., Zheng, T. Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (interlymph). *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 14, 2005: 925-933.
74. Bracht, K., Kiefer, T., Dolken, G., Bednarski, P.J. Characterization of three B-cell lymphoma cell lines from chemotherapy resistant patients with respect to in vitro sensitivity to 21 antitumor agents, ABC-transporter expression and cellular redox status. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 133, 2007: 957-967.

-
75. Dolken, L., Schuler, F., Dolken, G. Quantitative detection of t(14;18)-positive cells by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. *Biotechniques* 25, 1998: 1058-1064.
 76. Dyer, M.J., Fischer, P., Nacheva, E., Labastide, W., Karpas, A. A new human B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 422) exhibiting both t (14;18) and t(4;11) chromosomal translocations. *Blood* 75, 1990: 709-714.
 77. Ravetch, J.V., Siebenlist, U., Korsmeyer, S., Waldmann, T., Leder, P. Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 27, 1981: 583-591.
 78. Mullis, K.B., Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 1987: 335-350.
 79. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 1991: 7276-7280.
 80. Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21, 1993: 3761-3766.
 81. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 1977: 5463-5467.

-
82. Cleary, M.L., Sklar, J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 1985: 7439-7443.

 83. Dolken, G., Illerhaus, G., Hirt, C., Mertelsmann, R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J.Clin.Oncol.* 14, 1996: 1333-1344.

 84. Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F. [Reversible dielectric breakdown of cell membranes by electrostatic fields (author's transl)]. *Z.Naturforsch.[C.]* 29, 1974: 304-305.

 85. Neumann, E., Rosenheck, K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J.Membr.Biol.* 10, 1972: 279-290.

 86. Bende, R.J., Smit, L.A., van Noesel, C.J. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 21, 2007: 18-29.

 87. Egle, A., Harris, A.W., Bath, M.L., O'Reilly, L., Cory, S. VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood* 103, 2004: 2276-2283.

 88. Roulland, S., Lebailly, P., Lecluse, Y., Heutte, N., Nadel, B., Gauduchon, P. Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia* 20, 2006: 158-162.

-
89. Schuler, F., Hirt, C., Dolken, G. Chromosomal translocation t(14;18) in healthy individuals. *Semin.Cancer Biol.* 13, 2003: 203-209.
 90. Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1984: 1097-1099.
 91. Hirt, C., Dolken, G., Janz, S., Rabkin, C.S. Distribution of t(14;18)-positive, putative lymphoma precursor cells among B-cell subsets in healthy individuals. *Br.J.Haematol.* 138, 2007: 349-353.
 92. Dolken, G., Dolken, L., Hirt, C., Fusch, C., Rabkin, C.S., Schuler, F. Age-dependent prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals. *J.Natl.Cancer Inst.Monogr*, 2008: 44-47.
 93. Frizzera, G., Murphy, S.B. Follicular (nodular) lymphoma in childhood: a rare clinical-pathological entity. Report of eight cases from four cancer centers. *Cancer* 44, 1979: 2218-2235.
 94. Ribeiro, R.C., Pui, C.H., Murphy, S.B., Shuster, J.J., Hvizdala, E.V., Falletta, J., Link, M.P., Sullivan, M.P., Pick, T.E., Sandlund, J.T., . Childhood malignant non-Hodgkin lymphomas of uncommon histology. *Leukemia* 6, 1992: 761-765.
 95. Winberg, C.D., Nathwani, B.N., Bearman, R.M., Rappaport, H. Follicular (nodular) lymphoma during the first two decades of life: a clinicopathologic study of 12 patients. *Cancer* 48, 1981: 2223-2235.

-
96. Lorsbach, R.B., Shay-Seymore, D., Moore, J., Banks, P.M., Hasserjian, R.P., Sandlund, J.T., Behm, F.G. Clinicopathologic analysis of follicular lymphoma occurring in children. *Blood* 99, 2002: 1959-1964.
 97. Finn, L.S., Viswanatha, D.S., Belasco, J.B., Snyder, H., Huebner, D., Sorbara, L., Raffeld, M., Jaffe, E.S., Salhany, K.E. Primary follicular lymphoma of the testis in childhood. *Cancer* 85, 1999: 1626-1635.
 98. Roulland, S., Navarro, J.M., Grenot, P., Milili, M., Agopian, J., Montpellier, B., Gauduchon, P., Lebailly, P., Schiff, C., Nadel, B. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J.Exp.Med.* 203, 2006: 2425-2431.
 99. Kuppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat.Rev.Cancer* 5, 2005: 251-262.
 100. Zelenetz, A.D., Chen, T.T., Levy, R. Clonal expansion in follicular lymphoma occurs subsequent to antigenic selection. *J.Exp.Med.* 176, 1992: 1137-1148.
 101. Kiefer, T., Schuler, F., Knopp, A., Wimmer, M., Hirt, C., Schaefer, H.E., Dolken, G. A human Burkitt's lymphoma cell line carrying t(8;22) and t(14;18) translocations. *Ann.Hematol.* 86, 2007: 821-830.