

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Onkologisches Zentrum
II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Identifikation von Epitop-Mimics für klonspezifische B-Zell- Rezeptoren von folliculären Non-Hodgkin-Lymphomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Stefanie Sievert
aus Gifhorn

Hamburg 2012

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.11.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Trepel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. U. Bacher

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. R. Schneppenheim

Wer das Ziel nicht kennt, wird den Weg nicht finden.
(Christian Morgenstern, 1871-1914)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Das folliculäre Lymphom	7
1.1.1 Übersicht	7
1.1.2 Eigenschaften und Therapieoptionen des folliculären Lymphoms	7
1.2 Die Rolle des B-Zell-Rezeptors bei malignen Lymphomen	9
1.2.1 Der Aufbau des B-Zell-Rezeptors und seine Entwicklung	9
1.2.2 Maligne Lymphome und ihr B-Zell-Rezeptor	11
1.3 Selektion von Epitop-Peptiden aus Phagen-Peptidbanken ...	14
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Materialien und Geräte	17
2.1.1 RNA- und Gewebeproben von folliculären Lymphomen	17
2.1.2 Zelllinie	17
2.1.3 Medien und Zusätze für Zellkultur	17
2.1.4 Bakterien	18
2.1.5 Medien und Zusätze für Bakterienkultur	18
2.1.6 Kits	18
2.1.7 Enzyme und Puffer	19
2.1.8 PCR und Sequenzierung	19
2.1.9 Primer	19
2.1.10 Chemikalien.....	20
2.1.11 Elektrophorese	21
2.1.12 Antikörper	21
2.1.13 Plastikwaren/Verbrauchsmaterial	21
2.1.14 Puffer und Stammlösungen	22
2.1.15 Geräte	23
2.1.16 Sonstiges.....	23
2.2 Methoden	23
2.2.1 Molekularbiologische/ Mikrobiologische Methoden.....	23
2.2.1.1 <i>Isolierung von Ribonukleinsäuren aus Gewebeproben</i>	23
2.2.1.2 <i>Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren am Spektrophotometer Nanodrop</i>	24
2.2.1.3 <i>Herstellung von cDNA mit Reverser Transkriptase</i>	24
2.2.1.4 <i>Alkohol-Fällung der cDNA</i>	24
2.2.1.5 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	25
2.2.1.6 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	28
2.2.1.7 <i>Aufreinigung von DNA mittels Gel-Extraktion-Kit</i>	29
2.2.1.8 <i>Klonierung in PJET-Vektor</i>	29
2.2.1.9 <i>Restriktionsverdau des pBUDopti human Vektor sowie der leichten und schweren Immunglobulinkettengene</i>	29
2.2.1.10 <i>Aufreinigung von DNA mittels PCR-Purifikation-Kit</i>	30
2.2.1.11 <i>Ligation des pBUDopti human Vektors mit leichter und schwerer Immunglobulinkette</i>	31

2.2.1.12	<i>Transformation in XL1-Blue-Bakterien</i>	31
2.2.1.13	<i>Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)</i>	31
2.2.1.14	<i>Restriktionsverdau der Plasmid-DNA und Colony-PCR</i>	32
2.2.1.15	<i>Sequenzierungs-PCR und alkoholische Fällung</i>	33
2.2.1.16	<i>Phagenselektion</i>	34
2.2.1.17	<i>Titration der Phagen</i>	36
2.2.1.18	<i>Einzelklonpräparation von Phagen</i>	36
2.2.1.19	<i>Phagen-Bindungs-ELISA</i>	36
2.2.2	<i>Zellkultur</i>	37
2.2.2.1	<i>Zellkultur</i>	37
2.2.2.2	<i>Zellzählung und Ausbringung von Zellen</i>	37
2.2.2.3	<i>Transfektion</i>	37
2.2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	38
2.2.3.1	<i>Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-Page)</i>	38
2.2.3.2	<i>Western Blot</i>	38
2.2.3.3	<i>Coomassie-Färbung</i>	39
2.2.3.4	<i>Aufreinigung der Antikörper über Protein-A-Säule</i>	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Sequenzierung der B-Zell-Rezeptoren in Lymphomgewebeproben	41
3.1.1	Übersicht	41
3.1.2	Amplifikation von Immunglobulin-DNA	41
3.1.3	Sequenzierungsergebnisse einzelner Lymphomproben	42
3.1.3.1	<i>Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 2</i>	43
3.1.3.2	<i>Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 4</i>	45
3.1.3.3	<i>Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 5</i>	47
3.1.3.4	<i>Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 7</i>	49
3.1.3.5	<i>Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 8</i>	50
3.1.3.6	<i>Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 11</i>	52
3.1.3.7	<i>Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # G3</i>	53
3.1.3.8	<i>Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # G5</i>	54
3.2	Quantifizierung der Immunglobuline-cDNA der Lymphomgewebeproben	56
3.2.1	Übersicht	56
3.2.2	Kopienanzahl-Bestimmung verschiedener Lymphomproben	56
3.3	Produktion von ausgewählten Antikörpern	58
3.3.1	Übersicht	58
3.3.2	Klonierung	58
3.3.3	Produktionskontrolle	59
3.4	Phagenpeptidbanken-Selektionen auf rekombinanten Lymphom-B-Zell-Rezeptoren	60
3.4.1	Übersicht	60
3.4.2	Selektionen mit der X ₁₈ - Phagenpeptidbank	60
3.4.3	Selektionen mit X ₁₂ - Phagenpeptidbank	64
3.4.4	Selektionen mit der X ₇ - Phagenpeptidbank	66
3.4.5	Bindungseigenschaften der selektierten Phagenklone	67

4 Diskussion.....	70
4.1 Übersicht	70
4.2 Interpretation der klonalen Diversität in den Lymphomproben 71	
4.2.1 Die Rolle der intraklonalen Variation der analysierten Klonsequenzen in den Lymphomproben.....	72
4.2.2 Mögliche Bedeutung der Heterogenität innerhalb der analysierten Klonsequenzen in den Lymphomproben	73
4.2.3 Vergleich der Homologien der analysierten Lymphomproben mit der Literatur	76
4.2.4 Identifikation der leichten Immunglobulinkette durch Verwendung der quantitativen Real-Time-PCR.....	78
4.2.5 Möglichkeit des Isotyp-Switchs der schweren Immunglobulinkette bei der Lymphomprobe # 11	79
4.3 Interpretation der Phagenselektions-Ergebnisse auf ausgewählten Lymphom-B-Zell-Rezeptoren.....	80
4.3.1 Potentieller Einfluss von Glykosilierungsmustern der Lymphomproben auf die Phagenpeptidbanken-Selektionen	81
4.4 Perspektiven.....	82
5 Zusammenfassung	85
6 Abkürzungsverzeichnis	87
7 Tabellenverzeichnis.....	90
8 Abbildungsverzeichnis	91
9 Literaturverzeichnis.....	92
10 Danksagung	102
11 Lebenslauf.....	103
12 Eidesstattliche Versicherung	104

1 Einleitung

1.1 Das folliculäre Lymphom

1.1.1 Übersicht

Laut Statistiken des Robert-Koch-Institutes erkrankten in den letzten Jahren jährlich etwa 6800 Männer und 6100 Frauen an einem Non-Hodgkin-Lymphom. Im Vergleich zum Jahr 1980 ist die Zahl der Neuerkrankungen mittlerweile fast dreimal so hoch. Dennoch hat sich die 5 Jahres-Überlebensrate für Erkrankte seit 1980 verbessert. Betrug sie vorher noch 50%, so ergaben sich für 2004 eine 5 Jahres-Überlebensrate von 62% für die Männer und 66% für Frauen (Bertz et al. 2010). Trotz der steigenden Zahlen der Neuerkrankungen konnte durch Verbesserungen der Therapieoptionen eine Verbesserung der Überlebensrate erreicht werden.

Risikofaktoren sind allerdings bislang nur bedingt für einige Unterformen der heterogenen Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome bekannt. So ist z.B. für die in Afrika vorkommende endemische Form des Burkitt-Lymphoms ein Zusammenhang mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) nachgewiesen. Ebenso zeigte sich eine gehäufte Infektion mit dem humanen T-Zell-Leukämie-Virus HTLV-1 bei T-Zell-Lymphomen (Bertz et al. 2010).

Für das folliculäre Lymphom, das ebenso zu den Non-Hodgkin-Lymphomen gehört, sind bislang noch keine Risikofaktoren bekannt. Umweltfaktoren und berufliche Exposition gegenüber Lösungsmitteln und anderen Chemikalien werden diskutiert (Vitolo et al. 2008).

1.1.2 Eigenschaften und Therapieoptionen des folliculären Lymphoms

Das folliculäre Lymphom ist eine maligne Erkrankung, die durch Entartung von B-Zellen entsteht und sich überwiegend in den Keimzentren der Lymphknoten manifestiert (Mann et al. 1979; Stein et al. 1982; Bahler und Levy 1992; Freedman et al. 1992).

In den westlichen Ländern beträgt der Anteil folliculärer Lymphome 22 – 45% aller Non-Hodgkin-Lymphome (Jones et al. 1973; The Non-Hodgkin's Lympho-

ma Pathologic Classification Project 1982; The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997; Harris et al. 1999; Noppe et al. 1999; Vitolo et al. 2008).

Mikroskopisch betrachtet, zeigt sich ein teilweise follikuläres oder noduläres Tumorwachstum in den betroffenen Lymphknoten, wie es auch im Keimzentrum von gesunden reaktiven Lymphknoten vorkommen kann (Stein et al. 1982 zitiert nach Bahler et al. 1992; Harris et al. 1994; Noppe et al. 1999; Aarts et al. 2000; Staudt und Dave 2005; Radcliffe et al. 2007; Klein und Dalla-Favera 2008). Aber auch Areale mit diffusem Wachstumsmuster können vorhanden sein. Die Zellen dieses Lymphoms lassen sich in zwei Formen der B-Zellen unterscheiden: Zentrozyten und Zentroblasten, wobei das Vorhandensein von Zentrozyten überwiegt (The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project 1982; Harris et al. 1994; Cong et al. 2002; Vitolo et al. 2008; Ghielmini 2010; Hayashi et al. 2010).

Klinisch zeigt sich eine Lymphadenopathie, mit oder ohne abdominelle oder mediastinale Lymphknotenbeteiligung sowie Hepatosplenomegalie und in 50% der Fälle Knochenmarkinfiltrationen (Harris et al. 1999; Adam et al. 2005; Vitolo et al. 2008; Tajeja et al. 2009). Das Vorhandensein von B-Symptomatik (Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß) ist möglich.

Häufig befindet sich das follikuläre Lymphom zum Diagnosezeitpunkt im hohen klinischen Stadium (nach der Ann Arbor Klassifikation Stadium III und IV) und ist dann in der Regel unheilbar. (Noppe et al. 1999; Ardeshtna et al. 2003; Adam et al. 2007; Ruminy et al. 2008; Vitolo et al. 2008; Soini et al. 2010).

Neben der Einteilung in die Stadien I – IV erfolgt auch eine von der Zentroblasten-Anzahl abhängige Einteilung in die Grade 1- 3. Diese Anzahl variiert von wenig (Grad 1) bis zum Vorhandensein von sehr vielen Zentroblasten (Grad 3) (Harris et al. 1994; Vitolo et al. 2008; Ghielmini 2010).

Die Therapiemöglichkeiten richten sich nach den klinischen Stadien. Tumore in klinischen Stadien I und II reagieren häufig auf Radiatio und/oder Chemotherapie und sind in 40-50% der Fälle kurativ behandelbar (Yahalom 1999; Jyrkkiö et al. 2007 zitiert nach Soini et al. 2010; Hayashi et al. 2010).

In höheren Stadien kommt vor allem die Chemotherapie zur Anwendung. In den letzten Jahren konnte eine Verbesserung der Therapie durch eine Immuntherapie mit dem monoklonalen anti-CD20-Antikörper Rituximab erzielt werden (Hidemann et al. 2005; Marcus et al. 2005; Friedberg 2008; Hayashi et al. 2010; Vidal et al. 2010).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Radioimmuntherapie für rezidivierende oder refraktäre folliculäre Lymphome mit radioaktiv markierten Anti-CD-20-Antikörpern (Matasar und Zelenetz 2008 zitiert nach Hayashi et al. 2010; Vitolo et al. 2008; Leonard und Martin 2010).

Prognostisch spielen für diese Erkrankung neben dem Alter des Patienten auch das Krankheitsstadium, die Serum-Laktatdehydrogenase (LDH) und die Knochenmarkbeteiligung eine entscheidende Rolle (Shipp et al. 1993; Vitolo et al. 2008).

1.2 Die Rolle des B-Zell-Rezeptors bei malignen Lymphomen

1.2.1 Der Aufbau des B-Zell-Rezeptors und seine Entwicklung

Nicht nur für die B-Zelle, sondern auch für andere, an der Immunantwort beteiligten Zellen ist der B-Zell-Immunglobulinrezeptor ein wichtiger Faktor. Neben der Antigenbindung ist der Rezeptor auch an der Antigenpräsentation für die T-Zelle beteiligt (Eynon und Parker 1992). Ebenso hängen Signale, die die B-Zelle über ihren B-Zell-Rezeptor empfängt, mit der Proliferation und dem Überleben der Zelle zusammen (Lam et al. 1997; Niironen und Clark 2002; Kraus et al. 2004).

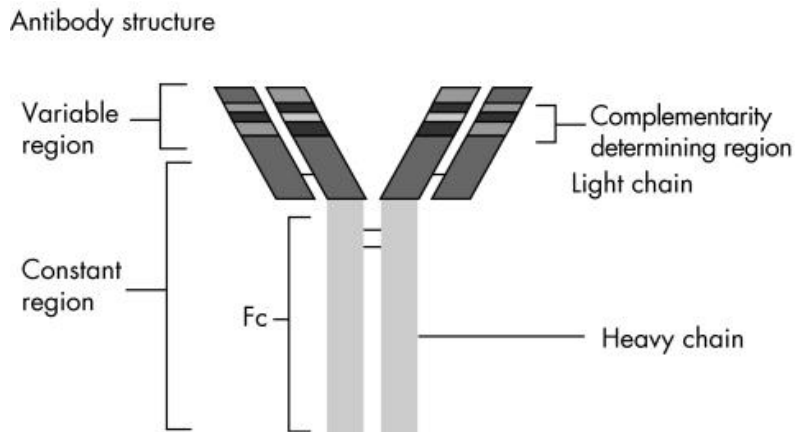


Abbildung 1: Der Aufbau des Immunglobulinrezeptors

Dargestellt ist der B-Zell-Rezeptor mit je zwei identischen schweren (heavy chain) und leichten (light chain) Immunglobulinketten mit je einem variablen und konstanten Bereich. Die Aminosäuren der complementarity determining region (CDR) sind für die Antigen-spezifität nötig. Der Fc-Teil besteht aus der konstanten Region der Immunglobulinkette (Johnston 2007).

Der B-Zell-Rezeptor (Abbildung 1) an sich besteht aus je zwei identischen schweren und leichten Immunglobulinketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die beiden sogenannten Fab-Fragmente, welche die variable Kettenregion darstellen, tragen an ihren Enden die Antigenbindungsstellen, die die Bindung von je einem Antigen ermöglichen (van Noesel und van Lier 1993). Die Aminosäuren der complementarity determining region (CDR) sind für die Antigen-spezifität nötig. Der Fc-Teil besteht aus der konstanten Region der Immunglobulinkette (Johnston 2007). Bei der schweren Immunglobulinkette handelt es sich überwiegend um das Immunglobulin mit dem konstanten Bereich μ , kurz IgM. Bei der leichten Kette wird zwischen der leichten Immunglobulinkette kappa und der leichten Immunglobulinkette lambda unterschieden.

Die Entwicklung des Immunglobulinrezeptors und die Reifung der B-Zelle verlaufen in mehreren Abschnitten, von denen nicht alle auf den Kontakt mit einem Antigen angewiesen sind. Im Knochenmark findet die sogenannte V(D)J-Rekombination statt (Tonegawa 1983; Schatz et al. 1992). Für die schwere Immunglobulinkette bedeutet das, dass hierbei ein Segment des variablen (V)-Gens, ein Segment des Diversitäts (D)-Gens und ein Segment des Joining (J) -Gens durch Genumlagerung kombiniert werden. Für die leichte Immunglobulin-

kette findet etwas später die Rekombination ohne ein D-Gen statt (Tonegawa 1983; Schatz et al. 1992).

Die B-Zelle mit ihrem neu entstandenen, noch nicht mutierten Immunglobulinrezeptor wird „naive“ B-Zelle genannt (Kosmas et al. 1998). Bei der Bildung dieser „naiven“ B-Zellen kann es zur Entstehung von potentiell schädlichen, mit Autoantigenen reagierenden B-Zellen kommen. Durch negative Selektion wird bei diesen Zellen allerdings die Apoptose eingeleitet, um spätere Schäden zu vermeiden (Nossal 1994; Niiro und Clark 2002).

Alle anderen B-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern in die Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe. Dort beginnt die zweite, antigenabhängige Entwicklung (Kosmas et al. 1998). Durch Antigenkontakt kommt es zur somatischen Hypermutation in der V-Region des Immunglobulins. Dadurch entsteht eine hohe Affinität des B-Zell-Rezeptors zum Antigen und die Zelle wird zur weiteren Proliferation angeregt (van Noesel und van Lier 1993; Nossal 1994; Rajewsky 1996).

Ist diese Affinität nicht vorhanden oder der Immunglobulinrezeptor nicht funktionsfähig, kommt es durch unzureichenden Stimulus durch das Antigen zur Apoptose der B-Zelle (McKean et al. 1984; Maizels 1995). Die Zelle kann dann nicht weiter Proliferieren und verliert die Möglichkeit sich später in eine Antikörper-produzierende Plasmazelle oder Gedächtniszelle zu differenzieren (Kocks und Rajewsky 1989; Liu und Arpin 1997; Rahman und Manser 2004).

Die entstehenden Mutationen der variablen Region der Immunglobulinkettensequenzen zeigen sich vor allem in den sogenannten complementarity determining regions (CDRs), die an der Bindungsstelle für Antigene beteiligt sind (Losos et al. 2000; Hershberg et al. 2008).

1.2.2 Maligne Lymphome und ihr B-Zell-Rezeptor

Hinsichtlich der Entwicklung einer normalen B-Zelle und ihrem Immunglobulinrezeptor gibt es viele Parallelen zu B-Zellen bei Lymphomen und lymphatischen Leukämien.

Die Zellen des folliculären Lymphoms zeigen sehr viele Ähnlichkeiten mit einer normalen, dem Antigenkontakt ausgesetzten B-Zelle. So finden sich bei diesem Lymphom Mutationen im Bereich der variablen Region der Immunglobulinketten

(v.a. der schweren Immunglobulinkette), wie sie auch bei antigenselektierten nicht malignen B-Zellen im Keimzentrum vorkommen (Stamatopoulos et al. 1997; Noppe et al. 1999; Aarts et al. 2000; Zhu et al. 2002; McCann et al. 2006). Obwohl noch kein klares genetisches Entstehungsmodell für die Pathogenese des folliculären Lymphoms gefunden wurde, scheinen die Analysen in einigen bislang veröffentlichten Arbeiten auf die Rolle der Antigenselektion sowie die Anwesenheit von T-Zellen und weiteren, im Lymphknoten vorhandenen Zellen bei der Entstehung des folliculären Lymphoms hinzuweisen (Cong et al. 2002; Dave et al. 2004; Farinha et al. 2005; Glas et al. 2007).

Des Weiteren zeigt sich bei 70 – 95% der analysierten folliculären Lymphome eine charakteristische Translokation t(14;18), die unter anderem das bcl-2-Gen betrifft. Dieses bcl-2-Protoonkogen gelangt von Chromosom 18 hinter den Genlokus der schweren Immunglobulinkette auf Chromosom 14. Durch die dadurch bedingte dauerhafte Expression des bcl-2-Proteins in der betroffenen B-Zelle kann es zur Unterdrückung der Apoptose kommen (Tsujimoto et al. 1984; Tsujimoto et al. 1985; Bakhshi et al. 1987; Seto et al. 1988; Korsmeyer 1999; Bende et al. 2007; Relander et al. 2010).

Die Translokation der beiden Genabschnitte findet in einem frühen Stadium der B-Zell Entwicklung während des Ig-Gen-Rearrangements statt, kann jedoch auch bei gesunden Individuen vorkommen (Limpens et al. 1991; Küppers et al. 1999; Summers et al. 2001; Vitolo et al. 2008).

Somit scheint dies nicht als alleinige Ursache auszureichen, um maligne B-Zellen entstehen zu lassen, ist aber doch wohl eine notwendige Voraussetzung zur Entstehung eines folliculären Lymphoms, weil nahezu alle folliculäre Lymphom-Fälle eine translokationsbedingte Überexpression zeigen. (Cleary und Sklar 1985; Albinger-Hegyí et al. 2002; McCann et al. 2006). Zudem scheint die spätere Antigenselektion entscheidender für die Entwicklung des folliculären Lymphoms zu sein.

Auch für das multiple Myelom, die chronisch lymphatische Leukämie der B-Zelle (B-CLL) und beim Marginal-Zonen-Lymphom der Milz ergaben Untersu-

chungen, dass der Prozess der Antigenselektion und die Antigenerkennung eine entscheidende Rolle in der Entwicklung dieser Malignome spielen und sie wie eine normale B-Zelle Immunglobulinrezeptor-Signale zum Überleben benötigen (Kosmas et al. 1998; Stamatopoulos et al. 2004; Belessi et al. 2005; Stamatopoulos et al. 2005).

Es zeigt sich beim Multiplen Myelom eine hohe Mutationsrate sowohl in der schweren, als auch in der leichten Immunglobulinkette (Wagner et al. 1994; Kosmas et al. 1996; Kosmas et al. 1997; Sahota et al. 1997). Im Gegensatz dazu weisen die bislang nur in Einzelfällen untersuchten leichten Immunglobulinketten des folliculären Lymphoms deutlich geringere Mutationsraten als die schweren Immunglobulinketten auf (Stamatopoulos et al. 1997).

Bei der chronisch lymphatischen Leukämie wird die Selektion des Lymphozyten durch spezifische Antigene, die unter anderem zur Entwicklung dieser Erkrankung führen, ebenfalls eine entscheidende Rolle beigemessen (Chiorazzi und Ferrarini 2003; Messmer et al. 2004; Stevenson und Caligaris-Cappio 2004; Stamatopoulos et al. 2007).

Neben den Non-Hodgkin-Lymphomen spielt eine Antigenselektion des B-Zell-Rezeptors auch beim Hodgkin-Lymphom eine entscheidende Rolle. So finden sich hier ebenfalls somatische Mutationen in den Genen der variablen Region der schweren Immunglobulinkette, die, wie auch beim folliculären Lymphom, hinweisend auf eine Antigenauseinandersetzung des Immunglobulinrezeptors sind (Kanzler et al. 2000).

Für viele B-Zell-Lymphome scheint die Antigenauseinandersetzung des B-Zell-Rezeptors eine wichtige Rolle in der Entwicklung und dem Verlauf der malignen B-Zelle zu spielen. Umso interessanter ist die Erkennung dieser spezifischen Antigene. Mit Hilfe von randomisierten Phagenpeptidbanken konnten für die chronisch lymphatische Leukämie Epitope identifiziert werden, die spezifisch an den B-Zell-Rezeptor dieser Zellen binden (Buhl et al. 2002; Binder et al. 2011). Reaktionen dieser Peptide mit den B-Zell-Rezeptoren anderer Proben chronisch lymphatischer Leukämien konnten ebenfalls gezeigt werden. (Buhl et al. 2002; Binder et al. 2011).

1.3 Selektion von Epitop-Peptiden aus Phagen-Peptidbanken

Die Peptid-Identifikation mittels Phagenpeptidbanken basiert auf der erstmals 1985 von George Smith beschriebenen Methode des Phage Displays.

Filamentösen Bakteriophagen wird in ein Oberflächenproteingen (meist pIII) eine fremde Gensequenz kloniert. Die entsprechend kodierte Aminosäuresequenz definierter Länge (z.B. für 7, 12 oder 18 Aminosäuren) fusioniert dabei genetisch mit der Aminosäuresequenz dieses Phagen-Kapsidproteins. Das entstandene Fusionsprotein wird anschließend in das Phagenkapsid integriert und als Oberflächenpeptid präsentiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Phagenpeptidbanken bestehen aus einer Ansammlung der oben beschriebenen Phagen, die jeweils ein Peptid mit randomisierter Aminosäuresequenz exprimieren und an ihrer Oberfläche präsentieren. Dadurch entsteht eine hohe Diversität von bis zu 10^{10} individuellen Phagenklonen.

Diese Phagen mit ihrem präsentierten Peptid können dann zur Selektion auf rekombinanten B-Zell-Immunglobulinrezeptoren verwendet werden, da sie auf Grund der hohen Diversität eine sehr hohe Anzahl an unterschiedlichen Epitopen für den Immunglobulinrezeptor imitieren. Der Phage, dessen Peptid die höchste Immunglobulinrezeptor-Affinität besitzt, kann durch Amplifikation in E.coli-Bakterien vermehrt und seine Phagen-DNA isoliert werden. Durch Sequenzierung lässt sich anschließend die Aminosäuresequenz des präsentierten Peptids identifizieren. Die Kenntnis über so ein Epitop-nachahmenden Peptidliganden könnte möglicherweise indirekt Informationen über das vom B-Zell-Rezeptor erkannte Antigen vermitteln. (Parmley und Smith 1989; Smith und Petrenko 1997; Braun und Paschke 2006).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Antigenselektion scheint ein entscheidender Faktor für die Entwicklung von bestimmten B-Zell-Lymphomen zu sein. Es ist denkbar, dass auch beim folliculären Lymphom dieser Antigenkontakt stattfindet, und die maligne Zelle zur weiteren Proliferation anregt (Bahler und Levy 1992). Auch die hohe Mutationsrate in den Genen der variablen Region der Immunglobulinketten wurde bislang in

vielen Veröffentlichungen als Ausdruck von Antigenselektion und Erhöhung der Affinität des Rezeptors zum Antigen gesehen.

Bei Betrachtung der bislang veröffentlichten Literatur für dieses Lymphom sowie den Ergebnissen der spezifischen an den B-Zell-Rezeptor bindenden Peptide für die chronisch lymphatische Leukämie drängt sich die Frage auf, welche Antigene der follikuläre Lymphom-Immunglobulinrezeptor erkennt. Möglicherweise wäre dies auch ein Hinweis zum weiteren Entstehungsmechanismus. Es scheint daher unerlässlich, die Antigen-bindende Region dieses Immunglobulinrezeptors genauer zu untersuchen. Von besonderem Interesse ist, welches Antigen von dem B-Zell-Rezeptor des follikulären Lymphoms erkannt wird. Möglicherweise wird nur ein einziges oder vielleicht eine kleine Anzahl verschiedener Antigene von diesen Immunglobulinrezeptoren erkannt.

Durch Eingabe der Aminosäuresequenzen der identifizierten Epitop-nachahmenden Peptidliganden in Datenbanken könnte eine Zuordnung zu einem oder mehreren Antigenen möglich sein. Ein Kenntnis über die möglicherweise beteiligten Antigene bei der Entstehung des follikulären Lymphoms könnte anschließende spezifischere Untersuchungen im Bereich dieser Antigene nach sich ziehen. Des Weiteren könnte neben den bislang verwendeten Therapiemöglichkeiten eine Verbesserung in der Lymphom-Therapie durch zielgerichtete, spezifisch für den B-Zell-Rezeptor hergestellte Peptid-Liganden erzielt werden, die auf den identifizierten Epitop-nachahmenden Peptidliganden basieren.

Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit Gewebeproben follikulärer Non-Hodgkin-Lymphome detailliert untersucht werden. Dazu sollen im ersten Abschnitt die zum B-Zell-Rezeptor des Lymphoms gehörenden Immunglobulinsequenzen der leichten und schweren Immunglobulinketten aus der DNA der jeweiligen Lymphom-Gewebeproben identifiziert und analysiert werden. Nach erfolgreicher Identifikation sowohl der leichten als auch schweren Lymphom-Immunglobulinkettensequenzen sollen diese in einen speziellen Vektor zur Expression rekombinanter Lymphom-B-Zell-Rezeptoren in 293T-Zellen kloniert werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte mittels Phagenpeptidbanken auf den isolierten rekombinanten Immunglobulinrezeptoren Epitop-nachahmende Peptidliganden isoliert werden, welche spezifisch an die B-Zell-Rezeptoren die-

1 Einleitung

ser Lymphome binden, um so indirekt Aufschlüsse über erkannte Antigene zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 RNA- und Gewebeproben von folliculären Lymphomen

Die verwendeten Ribonukleinsäuren (RNA) - bzw. Gewebeproben (Tabelle 1) wurden freundlicherweise von der Gewebebank der Arbeitsgruppe Dierlamm, II. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Ausgenommen von Probe # 4 und Probe # 7 (Translokation nicht bekannt) enthielten alle Proben die Translokation t14;18, die typisch für das folliculäre Lymphom ist. Überwiegend handelte es sich bei den verwendeten Proben um folliculäre Lymphome des Grades I, mit Ausnahme der Probe # 4 (Grad II) und der Probe # 11 (Grad III). Soweit Informationen vorhanden waren, werden die Lokalisation des entfernten Lymphknotens sowie das Alter des Patienten bei Diagnosestellung aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung von RNA- und Gewebeproben von Patienten mit folliculärem Lymphom

Probe	Material	Grad	Translokation	Gewebe *	Entnahme	Alter **
# 2	RNA	Grad I	t14;18	LK	axillär links	69 Jahre
# 4	RNA	Grad II	keine	LK	inguinal rechts	70 Jahre
# 5	RNA	Grad I	t14;18	LK	inguinal rechts	29 Jahre
# 7	RNA	Grad I	nicht bekannt	LK	keine Angabe	keine Angabe
# 8	RNA	Grad I	t14;18	LK	keine Angabe	keine Angabe
# 11	RNA	Grad III (Rezidiv)	t14;18	LK	cervikal rechts	75 Jahre
# G3	Gewebestück	Grad I	t14;18	LK	keine Angabe	keine Angabe
# G5	Gewebestück	Grad I	t14;18	LK	inguinal rechts	75 Jahre

* LK = Lymphknoten

** Alter bei Diagnosestellung bzw. Rezidivdiagnose

2.1.2 Zelllinie

293 T Zellen

humane fetale Nierenepithelzellen

Bezug: Dr. David Baltimore, Pasadena (USA)

2.1.3 Medien und Zusätze für Zellkultur

Material

Fetal Calf Serum (FCS)

Penicillin-Streptomycin (P/S)

Dulbecco's Modified Eagle

Medium (DMEM)

Tryptophanblau

Herkunft

PAA-Laboratories, Pasching (Österreich)

Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

Trypsin-EDTA (10x)

PAA-Laboratories, Pasching (Österreich)

2.1.4 Bakterien

Material

E.coli K91kan

Herkunft

Dr. George Smith, University of Missouri (USA)

E.coli K12

New England Biolabs, Frankfurt /Main

E.coli XL1-Blue

New England Biolabs, Frankfurt /Main

2.1.5 Medien und Zusätze für Bakterienkultur

Material

Bacto Yeastextrakt

Becton-Dickinson (BD), Heidelberg

Bacto Agar

Becton-Dickinson (BD), Heidelberg

Bacto Tryptone

Becton-Dickinson (BD), Heidelberg

Terrific Broth (TB)

Invitrogen, Karlsruhe

LB Broth Base (LB)

Invitrogen, Karlsruhe

Zeocin

InvivoGen, Toulouse (Frankreich)

Kanamycin

Roth, Karlsruhe

Tetrazyklin

Roth, Karlsruhe

IPTG

Fermentas, St. Leon-Rot

X-Gal

Fermentas, St. Leon-Rot

Ampicillin

Sigma, Taufkirchen

K₂HPO₄

Sigma, Taufkirchen

KH₂PO₄

Roth, Karlsruhe

2.1.6 Kits

Material

RNA-Extraktion-Kit

Qiagen, Hilden

Omniscript Reverse Transcription

Qiagen, Hilden

PCR-Purifikation-Kit

Qiagen, Hilden

Gel-Extraktion-Kit Qiaquick

Qiagen, Hilden

PolyFect Transfection Reagent

Qiagen, Hilden

CloneJET PCR Cloning Kit

Fermentas, St. Leon-Rot

peqGOLD-Plasmid-Mini-Kit

Peqlab, Erlangen

2.1.7 Enzyme und Puffer

Material	Hersteller
Sal I	New England Biolabs, Frankfurt /Main
Asc I	New England Biolabs, Frankfurt /Main
Swa I (Smi I)	New England Biolabs, Frankfurt /Main
Sbf I	New England Biolabs, Frankfurt /Main
Not I	New England Biolabs, Frankfurt /Main
Xho I	New England Biolabs, Frankfurt /Main
NEB Buffer 3 und 4 (10x)	New England Biolabs, Frankfurt /Main
BSA (100x)	New England Biolabs, Frankfurt /Main
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt /Main
T4 Ligase Buffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt /Main

2.1.8 PCR und Sequenzierung

Material	Hersteller
GoTaq DNA Polymerase	Promega, Madison (USA)
GoTaq Buffer (10x)	Promega, Madison (USA)
Pfu DNA Polymerase	Promega, Madison (USA)
Pfu Buffer (10x)	Promega, Madison (USA)
dNTP Mix (10mM)	Promega, Madison (USA)
Phusion DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt /Main
Phusion Buffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt /Main
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Taq-PCR Buffer (10x)	Qiagen, Hilden
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ (25mM))	Qiagen, Hilden
LightCycler FastStart	
DNA Master SYBR Green	Roche, Mannheim
BigDye Reagenz	UKE Sequenzierservice, Hamburg
BigDye Buffer	UKE Sequenzierservice, Hamburg

2.1.9 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion hergestellt. Die Primer-Sequenzen sind bei der Beschreibung der jeweiligen Methoden angegeben.

2.1.10 Chemikalien

Material	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat-Trihydrat	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol 8000 (PEG)	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Temed	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Methanol	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
2-Propanol	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Agarose	Serva, Heidelberg
EDTA Disodium	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blau G250	Serva, Heidelberg
30% Acrylamid	Bio-Rad, München
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Trizma base	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
ABTS	Roche, Mannheim
Intratect	Biotest, Dreieich
ECL	GE Healthcare, München
Protein A Sepharose CB4	GE Healthcare, München
Magermilchpulver	Spinnrad, Bad Segeberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA-Laboratories, Pasching (Österreich)

2.1.11 Elektrophorese

Material

10x Blue Juice Gel Loading Buffer
100bp DNA Ladder
GeneRuler 1kb DNA Ladder
Prestained Protein Ladder

Hersteller

Invitrogen, Karlsruhe
Invitrogen, Karlsruhe
Fermentas, St. Leon-Rot
Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.12 Antikörper

Material

AffiniPure Goat Anti-Human IgG
Rabbit Antigoat IgG HRP

Anti M13 HRP monoclonal

Hersteller

Jackson ImmunoResearch, Suffolk (UK)
Santa Cruz Biotechnology,
Santa Cruz (USA)
Fitzgerald, North Acton (USA)

2.1.13 Plastikwaren/Verbrauchsmaterial

Material

Zellkulturflaschen, steril
Agarschalen
UV-Küvetten
Einmalküvetten
PolyPrep Chromatographie Säulen
96-well Immulon Platten
96-well Platten, steril
Kunststoffröhrchen Falcon (15 ml)
Kunststoffröhrchen Falcon (50 ml)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2ml)
Pipetten
Pipettenspitzen mit Filter, steril
Glasperlen
Transfer Membran
Amersham Hybond-P
Amersham Hyperfilm ECL
Whatmanpapier

Hersteller

Greiner, Nürtingen
Greiner, Nürtingen
Brand, Wertheim
Brand, Wertheim
Bio-Rad, München
Thermo Scientific, Langenselbold
Becton-Dickinson (BD), Heidelberg
Becton-Dickinson (BD), Heidelberg
Sarstedt, Nürnberg
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Sarstedt, Nürnberg
Roth, Karlsruhe

GE Healthcare, München
GE Healthcare, München
GE Healthcare, München

2.1.14 Puffer und Stammlösungen

Bakterienkulturen

Luria Broth (LB) - Medium (1 L)	10 g Bacto Tryptone, 5 g Bacto Yeastextrakt, 10 g NaCl, pH 7,0
LB-lowsalt-Medium (0,5 L)	2,5 g Bacto Yeastextrakt, 2,5g NaCl, 5 g Bacto Tryptone
SOC-Medium	10 g Bacto Tryptone, 2,5 g Bacto Yeastextrakt, 250 mg NaCl, 1,25 ml 1M KCl, mit 20% NaOH pH 7,0 einstellen, 10 ml 1 M Glucose
Supplement	11,55 g KH_2PO_4 , 82,14 g K_2HPO_4
Terrific Broth (TB) -Medium	23,5 g Terrific Broth, 2 ml Glycerin 99,5%
PEG/NaCl (0,5 L)	100 g PEG, 116,9 g NaCl

Elektrophorese und Western Blot

Tris Acetat EDTA (TAE) (0,5 L)	121 g Tris, 50 ml 0,5M EDTA pH 8,0, 28,55 ml Eisessig
Natriumdodecylsulfat (SDS) (1L)	100 g Natriumdodecylsulfatkristalle, pH 7,2
5 x Laemmli Puffer (10 ml)	1650 μl 1 M Tris pH 6,8, 3438 μl 10% SDS, 2500 μl Glycin, 0,62 mg Bromphenolblau
Running Buffer	30 g Tris base, 144 g Glycin, 100 ml 10%SDS-Lösung
Transfer Buffer (10x)	24,2 g Tris base, 108,1 g Glycin
Tris Buffered Saline (TBS)	6,5 g Tris (50 mM), 8,76 g NaCl (150 mM), pH 7,5

Coomassie-Blau-Färbung

Coomassie-Blau-Lösung	2,5 g Coomassie Brilliant Blau, 450ml Methanol, 100ml Essigsäure, 450ml dH_2O
Coomassie-Blau-Entfärbelösung	450ml Methanol, 100ml Essigsäure, 450ml dH_2O

Antikörperaufreinigung

PBS (10xPBS)	80 g NaCl, 2 g KCl, 7,6 g Na_2HPO_4 , 2 g
--------------	---

KH_2PO_4 , pH 7,4

PBS high salt (1 L)

100 ml PBS (10x), 50,53 g NaCl

2.1.15 Geräte

Material	Hersteller
Eppendorf Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen
Elektrophoreseapparatur + Zubehör	Bio-Rad, München
Schüttler	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Brutschrank Kelvitron t	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank HERA cell 240	Thermo Scientific, Langenselbold
Zellkulturbank Hera safe	Thermo Scientific, Langenselbold
Photometer Ultrospec 2000	GE Healthcare, München
Elisa-Reader	Dynex-Technologies, Virginia(USA)
Light Cycler	Roche, Mannheim
Entwickler Crurix 60	AGFA, Köln

2.1.16 Sonstiges

Material	Hersteller
Phagenpeptidbank X ₁₂	New England Biolabs, Frankfurt /Main
Phagenpeptidbanken X ₁₈ und X ₇	Arbeitsgruppe Trepel, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
pBUDopti human Vektor	Arbeitsgruppe Spillner, Universität Ham- burg

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische/ Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren aus Gewebeproben

Die Extraktion der Ribonukleinsäuren (RNAs) aus Lymphknotengewebe erfolgte für die in Tabelle 1 aufgeführten Proben #G3 und #G5 unter Verwendung und nach Anleitung des RNA-Extraktion-Kits von Qiagen. Durch Zugabe von dem, im Kit enthaltenen RLT-Puffer, versetzt mit beta-Mercaptoethanol, wurden

RNAsen denaturiert und inaktiviert. Mit Hilfe von gestopften Pipetten und einer sterilen Nadel wurde das Gewebe homogenisiert und über Qia-Shredder-Tubes zentrifugiert. Durch Überführen der im Filtrat enthaltenen RNA in ein RNA easy spin tube und mehrmaliges Waschen wurde die RNA in 20 µl RNasefreiem Wasser eluiert.

2.2.1.2 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren am Spektrophotometer Nanodrop

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren ließen sich mit Hilfe der optischen Dichte (OD) bestimmen. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Bestimmung der RNA-Konzentration am Nanodrop (Einstellung „RNA-40“) diente zur Berechnung der benötigten Menge an RNA für die complementary DNA (cDNA) -Herstellung.

Die Konzentrationen von DNA wurden am Nanodrop-Gerät mit der Einstellung „DNA-50“ bei 260 nm gemessen.

2.2.1.3 Herstellung von cDNA mit Reverser Transkriptase

Für weitere Versuche bestand die Notwendigkeit, die einzelsträngige RNA der im Materialteil aufgeführten Patientenproben in cDNA zu transkribieren. Dazu wurde das Omniscript Kit (Qiagen) verwendet. Die enthaltenen Oligo-dT-Primer binden während der Reaktionszeit an den Poly-A+-Schwanz der RNA und synthetisieren zusammen mit dem Enzym Reverse Transkriptase den komplementären DNA-Strang zur RNA. Nach Anleitung des Herstellers wurden 2 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl umgeschrieben. Alle Komponenten wurden nach Protokoll zusammengeführt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.1.4 Alkohol-Fällung der cDNA

Diese Methode wurde zur Entfernung von Salzen aus der Nukleinsäure-Lösung und zur Konzentration der hergestellten cDNA angewendet. Durch die Zugabe von 60 µl 96%igem Ethanol, 2 µl 3M Natriumacetatlösung und Inkubation bei -80 °C für 30 Minuten fielen die Nukleinsäuren aus und ließen sich anschließend durch Zentrifugieren bei 4 °C (20 Minuten, 13000 rpm) zum Pellet binden. Um einen höheren Reinheitsgrad der Nukleinsäuren zu erhalten, wurde mit 150 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (4 °C, 5 Minuten, 13000

rpm). Nach Abnahme des Überstandes konnte das Pellet in 20 µl dH₂O resuspendiert werden.

2.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von doppelsträngiger Nukleinsäure wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt. Basierend auf drei Schritten ließ sich mit dieser Methode eine größere Menge des Amplifikats herstellen. Neben dem Template wurde eine thermostabile DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und Primer verwendet. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei einer Temperatur von 95 °C. Für das Annealing der Primer wurden verschiedene Temperaturen verwendet, die bei den einzelnen Varianten der PCR aufgeführt wurden. Das Temperaturoptimum für die Zweitstrangsynthese lag bei 72 °C. Die Zyklusanzahl variierte zwischen 34 und 40 Zyklen.

Im Rahmen dieser Arbeit fanden verschiedene Variationen der PCR ihre Verwendung, die im Folgenden näher erläutert werden:

PCR mit familienspezifischen Primern

Mit dieser Variante der PCR erfolgte die Amplifikation von Immunglobulin-codierenden Bereichen der hergestellten cDNA, um in weiteren Versuchen den Tumorbildenden Klon zu identifizieren und in einen geeigneten Vektor zu klonieren. Dafür wurden Primer verwendet, die spezifisch an der Leadersequenz einer bestimmten Familiengruppe der variablen Region binden. Ein antisense-Primer für die jeweilige Immunglobulinkette (kappa, lambda und schwere Kette µ) hatte seine Bindung im konstanten Bereich, der unabhängig von der Familie der variablen Region einer Immunglobulinkette war.

Der Reaktionsansatz war wie folgt:

GoTaq Puffer 10x	10 µl	
Primer sense	1 µl	10pMol
Primer antisense	1 µl	10pMol
dNTPs (10mM)	1 µl	
GoTaq Polymerase	0,25 µl	
dH ₂ O	35,75 µl	
cDNA (1:3 verdünnt)	1 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

2 Material und Methoden

Der Mastercycler wurde wie folgt programmiert:

95 °C	2 min	} 34 Zyklen
95 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	hold	

Im Rahmen dieser Methode wurden die in Tabelle 2 gelisteten Primer verwendet.

Tabelle 2: Primer für die PCR mit familienspezifischen Primern

Primer	Orientierung	Sequenz *	für Amplifikation von	Familie **
1	reverse	5`- CTC TCA GGA CTG ATG GGA AGC C	schwerer Kette IgM	c μ
2	reverse	5`- CAG AGG AGG GTG GGA ACA G	leichter Kette lambda	c lambda
3	reverse	5`- GCT CAT CAG ATG GCG GGA AG	leichter Kette kappa	c kappa
4	forward	5`- CAG TCT GTG yTG ACK CAG	leichter Kette lambda	VL 1
5	forward	5`- CAG TCT GCC CTG ACT CAG	leichter Kette lambda	VL 2
6	forward	5`- TCC TAT GwG CTG ACw CAG	leichter Kette lambda	VL 3
7	forward	5`- CwG CyT GTG CTG ACT CA	leichter Kette lambda	VL 4
8	forward	5`- CAG sCT GTG CTG ACT CAG	leichter Kette lambda	VL 5
9	forward	5`- AAT TTT ATG CTG ACT CAG	leichter Kette lambda	VL 6
10	forward	5`- CAG rCT GTG GTG ACy CAG	leichter Kette lambda	VL 7 + 8
11	forward	5`- CAG CCT GTG CTG ACT CAG	leichter Kette lambda	VL 9
12	forward	5`- CAG GCA GGG CTG ACT CAG	leichter Kette lambda	VL 10
13	forward	5`- GCT CAG CTC CTG GGr CT	leichter Kette kappa	VK 1
14	forward	5`- GGG CTG CTA ATG CTC TGG	leichter Kette kappa	VK 2
15	forward	5`- TC TTC CTC CTG CTA CTC TGG	leichter Kette kappa	VK 3
16	forward	5`- Ts Cty TGG ATC TCT G	leichter Kette kappa	VK 4 + 5
17	forward	5`- CTC TGG GTT CCA GCC TCC	leichter Kette kappa	VK 6
18	forward	5`- CAG GtK CAG CTG GTG CAG	schwerer Kette IgM	VH 1
19	forward	5`- CAG GtC CAG CTT GTG CAG	schwerer Kette IgM	VH 1
20	forward	5`- sAG GtC CAG CTG GTA CAG	schwerer Kette IgM	VH 1
21	forward	5`- CAr ATG CAG CTG GTG CAG	schwerer Kette IgM	VH 1
22	forward	5`- CAG ATC ACC TTG AAG GAG	schwerer Kette IgM	VH 2
23	forward	5`- CAG GtC ACC TTG ArG GAG	schwerer Kette IgM	VH 2
24	forward	5`- GAr GTG CAG CTG GTG GAG	schwerer Kette IgM	VH 3
25	forward	5`- CAG GTG CAG CTG GTG GAG	schwerer Kette IgM	VH 3
26	forward	5`- GAG GTG CAG CTG TTG GAG	schwerer Kette IgM	VH 3
27	forward	5`- GAG sTG CAG CTG CAG GAG	schwerer Kette IgM	VH 4
28	forward	5`- CAG GTG CAG CTA CAG CAG	schwerer Kette IgM	VH 4
29	forward	5`- GAr GTG CAG CTG GTG CAG	schwerer Kette IgM	VH 5
30	forward	5`- CAG GTA CAG CTG CAG CAG	schwerer Kette IgM	VH 6
31	forward	5`- CAG GtS CAG CTG GTG CAA	schwerer Kette IgM	VH 7

* Sequenzen im Tripletcode dargestellt. Mögliche Basen an degenerierten Positionen sind wie folgt: k=G,T; s=G,C; w=A,T; r=A,G; y=C,T

** VK = leichte Kette kappa, VL = leichte Kette lambda, VH = schwere Kette, c = konstanter Bereich

Einfügen von Restriktionsenzym-Schnittstellen zur Klonierung:

Die Vorbereitung für die Klonierung der variablen Region der leichten und schweren Kette eines Immunglobulins in den pBUDopti human Vektor erfolgte mittels der im Folgenden geschilderten PCR. Es bestand die Notwendigkeit,

Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme in die Immunglobulinsequenz vor und hinter der variablen Region einzufügen, um definierte Sequenzen bzw. Schnittstellen an beiden Enden zu erhalten. Dafür wurden für jede Kette Primer designed, die die benötigten Schnittstellen enthalten.

Als Polymerase diente die Pfu-Polymerase. Die Sequenzen der Proben #4 und #5 enthielten eine der benötigten Schnittstellen in einem anderen Bereich der Immunglobulinsequenz. Daher musste hier über die Verwendung entsprechender Primer eine zusätzliche Schnittstelle eingefügt und die Polymerase Phusion verwendet werden.

Es wurden die in Tabelle 3 gelisteten Primer benötigt.

Tabelle 3: Primer für die Einfügung von Schnittstellen

Primer	Orientierung	Sequenz *	Für Klonierung von
32	forward	5'-GAT CA TTT AAA TGT GTC CAG TGT CAG GTG CAG CTG GTG CAG	Probe #2 schwere Kette μ
33	reverse	5'-GAT CC T CGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC C	Probe #2 und #8 schwere Kette μ
34	forward	5'-GATGC CTG CA G GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACC CAG TC	Probe #2 leichte Kette kappa
35	reverse	5'-GAT CGG CGC GCC CAC AGT TCG TTT GAT CTC CAG	Probe #2 und #5 leichte Kette kappa
36	forward	5'-GAT CA TTT AAA TGT GTC CAG TGT CAG GTG CAG CTA CAG CAG TG	Probe #4 schwere Kette μ
37	reverse	5'-GAT CC T CGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC	Probe #4 schwere Kette μ
38	forward	5'-CTG GGG CTC CTG CTA CTC TGG CTA CCA GGT GCC AGA TGT GAT ATT GTG ATG ACT CAG TCT TC	Probe #4 leichte Kette kappa 1. PCR
39	reverse	5'-GAT CGG CGC GCC CAC AGT TCC TTT GAT TTC TAC	Probe #4 leichte Kette kappa
40	forward	5'-GAT CG TCG ACT ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTA CTC	Probe #4 leichte Kette kappa 2. PCR
41	forward	5'-GAT CA TTT AAA TGT GTC CAG TGT GAG GTG CAG CTG TTG GAG TC	Probe #5 schwere Kette μ
42	reverse	5'-GAT CC T CGA GAC GGT GAG CCG GGT TCC	Probe #5 schwere Kette μ
43	forward	5'-CTG GGG CTC CTG CTA CTC TGG CTA CCA GGT GCC AGA TGT GAT ATT GTC ATG ACT CAG TCC C	Probe #5 leichte Kette kappa 1. PCR
44	forward	5'-GAT CG TCG ACT ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTA CTC	Probe #5 leichte Kette kappa 2.PCR
45	forward	5'-GAT CA TTT AAA TGT GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG GTG GAG TC	Probe #8 schwere Kette μ
46	forward	5'-GAT CCT GCA GGT GCC AGA TGT GAT TAT GTG CTG ACT CAG TCA C	Probe #8 leichte Kette lambda
47	reverse	5'-GAT CGG CGC GCC CTT GGG CTG ACC TAG GAC G	Probe #8 leichte Kette lambda

* die Schnittstelle ist durch einen senkrechten Strich | gekennzeichnet

Quantitative Real-Time-PCR

Da durch die PCR mit familienzuspezifischen Primern keine Aussage über die Anzahl der cDNA-Kopien der jeweiligen leichten Kette lambda oder kappa getroffen werden kann, sollte diese Kopienanzahl mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt werden.

Als Standard diente die konstante Region des Vektors pBUD opti human lambda bzw. pBUDopti human kappa, für die spezielle Primer hergestellt wurden. Die eingesetzte Menge des Standards betrug in Zehnerschritten verdünnt 10^7 bis 10^5 Kopien. Die Mengen der zu untersuchenden cDNA-Probe betragen 0,2 ng, 2 ng und 20 ng. Es wurde je ein Reaktionsansatz für kappa bzw. lambda hergestellt. Die Reaktionsbedingungen waren für beide Ansätze identisch. Nach

Analyse durch den LightCycler konnte die Kopienanzahl durch Einbeziehungen der Verdünnungen für kappa und lambda je Probe ermittelt werden.

Der Master-Mix pro Probe bestand aus:

Primer sense	0,9 µl	10 pMol
Primer antisense	0,9 µl	10 pMol
MgCl ₂ (2mM)	0,8 µl	
SYBR Green I	2 µl	
cDNA	2 µl	
dH ₂ O	13,4 µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

Die Reaktionsbedingungen für den LightCycler waren wie folgt:

95 °C	10 min	} 40 Zyklen
95 °C	10 s	
60 °C	15 s	
72 °C	10 s	

Es wurden die in Tabelle 4 gelisteten Primer verwendet.

Tabelle 4: Primer für die quantitative Real-Time-PCR

Primer	Orientierung	Sequenz	Verwendung
48	reverse	5'- CTG ATG GGT GAC TTC GCA G	für konstanten Bereich leichte Kette kappa
49	forward	5'- GAG CAG GAC AGC AAG GAC A	für konstanten Bereich leichte Kette kappa
50	forward	5'- CTG AGG AGC TTC AAG CCA AC	für konstanten Bereich leichte Kette lambda
51	reverse	5'- CTT GAC GGG GCT GCT ATC T	für konstanten Bereich leichte Kette lambda

2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Detektion der entstandenen PCR-Produkte und Bestimmung ihrer Größe im Rahmen der PCR mit familienspezifischen Primern, der PCR zum Einfügen von Schnittstellen sowie der Klonierung in pBUD-Vektor, wurden diese in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3 g Agarose wurden mit 300 ml 1xTAE-Puffer gemischt, im Mikrowellenofen aufgeköcht und mit 3-5 µl Ethidiumbromid versetzt. Es wurden 5 µl 1kb DNA-Ladder (Fermentas) als Marker und die mit je 2-5 µl 10x Blue Juice versetzten Proben aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 90-100 V für 30 Minuten. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Tisch fotografiert und die gewünschten Banden ausgeschnitten.

2.2.1.7 Aufreinigung von DNA mittels Gel-Extraktion-Kit

Die Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel für weitere Versuche erfolgte mit dem Gel-Extraktion-Kit von Qiagen nach Protokoll des Herstellers mit anschließender Elution in 30 µl EB-Puffer. Des Weiteren wurde im Rahmen der Klonierung (Kapitel 2.2.1.9) der verdauten pBUDopti human Vektor nach Herstellerprotokoll aufgereinigt, allerdings in 30 µl dH₂O eluiert.

2.2.1.8 Klonierung in PJET-Vektor

Die mittels familienspezifischer Primer amplifizierte Immunglobulin-cDNA wurde im Folgenden für die Tumorklonidentifikation und Sequenzierung in den pJET-Vektor von Fermentas mit Hilfe des PCR cloning set CloneJet kloniert. Dabei wurden die beiden Enden des PCR-Produktes gerade geschnitten, als so genannte blunt-ends und mit Hilfe der T4 DNA Ligase in den Vektor eingefügt. Im Anschluss erfolgte die Transformation (s. 2.2.1.12).

2.2.1.9 Restriktionsverdau des pBUDopti human Vektor sowie der leichten und schweren Immunglobulinkettengene

Im Rahmen der PCR zum Einfügen von Schnittstellen entstandene PCR-Produkte sowie der benötigte Vektor pBUDopti human kappa bzw. lambda mussten mit Hilfe von Restriktionsenzymen vor der Klonierung geschnitten werden. Dazu wurden zuerst der Klon für die leichte Kette (in 30 µl Endvolumen) sowie 1 µg Vektor (in 20 µl Endvolumen) mit den Enzymen Asc I, Sbf I und dem Puffer NEB 4 vier Stunden bei 37 °C verdaut. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Vektors mittels 1%igem Agarosegel und Gel-Extraktion-Kit (s. 2.2.1.7) und die Aufreinigung der leichten Kette mittels PCR-Purifikation-Kit. (s. 2.2.1.10)

Im Folgenden ist ein Reaktionsansatz dargestellt:

	pBUDopti κ / λ	leichte Kette
DNA (~ 1µg)	3 µl	15 µl
NEB 4 Puffer (10x)	2 µl	3 µl
Sbf I	0,5 µl	0,75 µl
Asc I	0,5 µl	0,75 µl
dH ₂ O	14 µl	10,5 µl
Gesamtvolumen	20 µl	30 µl

Abweichend davon erfolgte der Verdau des Vektors und der leichten Kette für die Proben #4 und #5 auf Grund anderer Schnittstellen und daraus resultierender Inkompatibilität der Puffer für die benötigten Enzyme, wie folgt: Im ersten Verdauungsschritt wurde das Enzym Asc I mit Puffer NEB 4 verwendet und die Gemische vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die beschriebene Aufreinigung von Vektor und leichter Kette. Im zweiten Schritt erfolgte der Verdau mit Sal I, dem Puffer NEB 3 und BSA (10x) für vier Stunden bei 37 °C. Die Aufreinigungen waren wieder identisch zum Vorgehen bei den übrigen Proben.

Nach der unter Kapitel 2.2.1.11 beschriebenen Ligation der leichten Kette mit dem Vektor und Kontrolle des Inserts wurden 1 µg dieses Vektors sowie 15 µl des Klons für die schwere Kette mit den Restriktionsenzymen Swa I / Xho I, Puffer NEB 3 und BSA (10x) verdaut. Nach zwei Stunden Inkubation bei 25 °C wurde das zweite Enzym Xho I zugegeben und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung für Vektor und schwere Kette war identisch zu der obigen.

Beispielhaft wird hier ein Reaktionsansatz für die schwere Kette dargestellt:

	pBUDopti mit leichter Kette	schwere Kette	
DNA (~ 1µg)	3,3 µl	15 µl	
NEB 3 Puffer (10x)	2 µl	3 µl	
BSA 10x	2 µl	3 µl	
Swa I (Smi I)	0,5 µl	0,75 µl	
Wasser	11,7 µl	7,5 µl	
Xho I	0,5 µl	0,75 µl	nach 2Std.
Endvolumen	20 µl	30 µl	

2.2.1.10 Aufreinigung von DNA mittels PCR-Purifikation-Kit

Nach erfolgtem Verdau der leichten bzw. schweren Kette im Rahmen der Klonierung in den pBUDopti human Vektor wurden diese Produkte mit dem QIAquick-PCR-Purifikation-Kit von Qiagen nach Protokoll aufgereinigt und in 30 µl dH₂O eluiert. Dieser Schritt diente zu Entfernung von Puffern, Restriktionsenzymen und nicht benötigten verdauten Abschnitten des PCR-Produktes.

2.2.1.11 Ligation des pBUDopti human Vektors mit leichter und schwerer Immunglobulinkette

Mit dieser Methode wurde das aufgereinigte, geschnittene Insert (leichte bzw. schwere Kette) in den aufgereinigten, geschnittenen Vektor eingefügt und mit Hilfe einer Ligase verbunden. Zur Kontrolle erfolgte sowohl eine Ligationsreaktion mit, als auch ohne Insert. Verwendet wurde die T4 Ligase mit passendem T4 10x Puffer in einem Endvolumen von 10 µl. Es wurden je 1 µl Vektor und 5 µl Insert verwendet und das Gemisch für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.1.12 Transformation in XL1-Blue-Bakterien

Zur Vermehrung der entstandenen Plasmide im Rahmen der Klonierung in pJET-Vektor, als auch in den pBUDopti human Vektor, wurden diese in hitzeschockkompetente XL1-Blue-Bakterien transformiert und auf Agarplatten ausplattiert.

2,5 µl des ligierten Plasmides und 25 µl der Bakterien wurden vermischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Erwärmung für 45 sec. bei 42 °C im Wasserbad mit anschließender Abkühlung für 2 Minuten auf Eis. Für die Transformation mit dem pJET-Vektor wurden dann 150 µl SOC-Medium und für die Transformation mit dem pBUDopti human-Vektor 150 µl LB-lowsalt Medium hinzugefügt und eine Stunde bei 37 °C geschüttelt.

Die Ausplattierung erfolgte auf LB-Ampicillin-Agarplatten mit Zugabe von 100 µl IPTG (50 µg/ml) für den pJET-Vektor und auf LB-Zeocin Platten für den pBUDopti human Vektor. Die Kolonien konnten über Nacht im Brutschrank wachsen.

2.2.1.13 Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Für die Präparation von Plasmid-DNA (im pJET-Vektor) wurde über Nacht in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 mg/ml) je eine Kolonie angeimpft und bei 37 °C kultiviert. Für die Präparation von Plasmid-DNA im pBUDopti human Vektor erfolgte die Kultivierung je Kolonie in 3 ml LB-lowsalt mit Zeocin (1:2000) über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5 Min, 13000rpm) pelletiert und der Überstand verworfen. Beide Varianten wurden mit Hilfe des peqGOLD-Plasmid-Mini-Kit von Peqlab nach Anleitung der

Herstellers mit anschließender Elution in 30 µl EB-Puffer oder dH₂O weiter bearbeitet.

2.2.1.14 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA und Colony-PCR

Zur Kontrolle der Richtigkeit des Inserts in den Plasmiden mittels Sequenzierung wurden diese vorab durch Restriktionsverdau oder Colony-PCR auf enthaltene Inserts getestet. Im Rahmen der Verwendung des pBUDopti human Vektors erfolgte die Kontrolle mittels Colony-PCR. Diese PCR entsprach der unter 2.2.1.5 beschriebenen Methode. Es wurden die Taq-Polymerase und die in Tabelle 3 gelisteten Primer verwendet. Die Amplifikate wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Basenpaar-Länge geprüft.

Im Folgenden sind ein Reaktionsansatz für eine Reaktion und die Programmierung für den Mastercycler dargestellt:

Taq-Puffer 10x	2 µl	
Primer sense	0,4 µl	10pMol
Primer antisense	0,4 µl	10pMol
dNTPs (10mM)	0,8 µl	
Taq Polymerase	0,2 µl	
DNA	10 µl	
dH ₂ O	6,2 µl	
<hr/>		
Gesamtvolumen	20 µl	

95 °C	2 min	} 34 Zyklen
95 °C	1 min	
60 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	hold	

Im Rahmen der Verwendung des pJET-Vektors erfolgte anfänglich die Kontrolle eines enthaltenden Inserts mittels Restriktionsverdau. Hierzu wurden die beiden Restriktionsenzyme Not I und Xba I, der Puffer NEB 3, BSA (10x) und die DNA aus der Minipräparation verwendet und der Ansatz bei 37 °C 2 Stunden inkubiert. In einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese wurden die verdauten Produkte auf ihre Basenpaar-Länge untersucht.

Der Ansatz für den Verdau lautete wie folgt:

NEB 3 (10x)	2 µl
BSA (10x)	2 µl
Not I	1 µl
Xba I	1 µl
dH ₂ O	4 µl
DNA	10 µl
<u>Gesamtvolume</u>	<u>20 µl</u>

Da dieser Verdau nicht immer erfolgreich war, erfolgte für einige Proben die Kontrolle mittels Colony-PCR. Abweichend zu der oben beschriebenen Variante wurden hier die Primer pJET forward und reverse (enthalten im PCR Cloning Set Clone-Jet) sowie zusätzlich MgCl₂ verwendet.

2.2.1.15 Sequenzierungs-PCR und alkoholische Fällung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte beim Sequenzierservice des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) sowie bei der Firma Seqlab.

Für die Sequenzierung am UKE erfolgte vorab eine PCR mit je 2 µl BigDye Reagenz und Puffer und 1 µl Pjet-Primer Forward (oder Reverse) und ca. 200-500 ng DNA (Plasmid). Im Anschluss wurde die DNA mit 80 µl dH₂O, 10 µl 3M Natriumacetat und 300 µl Ethanol (96%ig) bei 4 °C (30 min, 13000 rpm) gefällt und mit 100 µl Ethanol (70%ig) gewaschen und erneut zentrifugiert (4 °C, 10 min, 13000 rpm). Das entstandene Pellet wurde bei 37 °C getrocknet.

Für den Sequenzierungsauftrag bei Seqlab wurden 600-700 ng Plasmid und 10 pMol Primer in einem Reaktionsvolumen von 7 µl verschickt.

Beispielhaft ist hier ein Reaktionsansatz für eine Reaktion dargestellt:

Big Dye Reagenz	2 µl	
Big Dye Puffer	2 µl	
Primer sense oder antisense	1 µl	10pMol
DNA	x µl	200-500ng
dH ₂ O	x µl	
<u>Gesamtvolumen</u>	<u>10 µl</u>	

Der Mastercycler wurde wie folgt programmiert:

96 °C	90 sec	} 29 Zyklen
96 °C	20 sec	
53 °C	15 sec	
60 °C	4 min	
4 °C	hold	

2.2.1.16 Phagenselektion

Die Selektionen wurden mit drei verschiedenen Phagenpeptidbanken (X_{18} , X_7 und X_{12}) durchgeführt, die sich durch die Anzahl (18, 7 oder 12) der randomisierten Aminosäuren (X) unterschieden. Diese Aminosäuren wurden von den Phagen an der Oberfläche präsentiert und dienten der Identifikation von Epitopen, die spezifisch an die hergestellten B-Zell-Rezeptoren binden.

Durchgeführt wurden die Selektionen auf 96-Well Platten.

Für die erste Selektionsrunde wurde ein Well mit 10 μg des zu untersuchenden Antikörpers und PBS in einem Endvolumen von 100 μl beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Folgenden wurde das Well für eine Stunde mit 3% BSA/PBS blockiert und im Anschluss einmal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit 2×10^9 „transduzierenden Einheiten“ (transducing units, TU) der Phagenpeptidbank in PBS auf dem Antikörper für zwei Stunden. Zur gleichen Zeit wurde eine K91-Bakterienlösung in TB-Medium mit 10% Supplement und Kanamycin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei 37 °C im Schüttler bis zu einer Dichte einer 1:10 Verdünnung von $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,16 – 0,21 inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde das Well viermal mit PBS/0,1% BSA/0,01% Tween 20, sowie einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 μl der Bakterienlösung ins Well gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterien wurden in diesem Schritt durch die nach den Waschschritten noch am Antikörper gebundenen Phagen infiziert. In einem Reaktionsgefäß wurden 10 ml LB-Medium mit Tetrazyklin (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bereit gestellt und das Bakteriophagengemisch aus dem Well hinzugegeben. 20 μl wurden in 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen ausplattiert. Die Anzahl der Kolonien am nächsten Tag ließ Rückschlüsse auf die Menge der an den Antikörper gebundenen Phagen ziehen und wurde als „Runden-Output“ bezeichnet. Das verbleibende Bakteriophagengemisch wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Am folgenden Tag konnten hieraus die Phagen präzipitiert werden. Dazu wurden diese bei 4 °C und 8000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 15% PEG/NaCl überführt. Die Fällung der Phagen erfolgte für mindestens eine Stunde auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C, 8000 rpm für 20 Minuten befanden sich die Phagen im entstandenen Pellet, sodass der Überstand entfernt werden konnte und durch

weitere Zentrifugation für 5 Minuten auch das restlichen PEG/NaCl entfernt wurde. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 200 µl TBS vorsichtig geschüttelt, bis sich dieses löste. Die Lösung wurde in ein Eppendorf Tube überführt, 10 Minuten bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand aufgehoben. Dieser diente für die nachfolgende Selektionsrunde als Phagenpeptidbank.

Für die anschließenden zwei bis drei Selektionsrunden ergaben sich folgende Änderungen: Die aus der ersten Runde entstandene Phagenpeptidbank wurde in zwei Wells auf einem humanen polyklonalen Immunglobulin G (IgG, Intratect) negativ vorselektiert. Dadurch ließen sich unspezifische Bindungen der verbleibenden Phagen außerhalb der Paratopregion des Antikörpers minimieren. Im Anschluss wurde die Phagenlösung auf ein Well mit dem Antikörper und ein Well mit dem humanen polyklonalen Immunglobulin G, welches als Negativkontrolle galt, gleichmäßig verteilt. Anhand der Kolonienzahl der Verdünnungsreihen am folgenden Tag konnte eine Aussage zur Bindungsstärke der jeweiligen Phagenpeptidbank im Verhältnis zur Kontrolle getroffen werden. Im Idealfall zeigte sich im Verlauf der einzelnen Runden eine Zunahme der Bindung am Antikörper im Vergleich zur Bindung an die Kontrolle.

Des Weiteren erfolgte in den weiteren Selektionsrunden eine Zunahme der Waschvorgänge, sodass in der zweiten Runde acht Mal, in der dritten und vierten Runde 12 Mal gewaschen wurde. Dadurch ergab sich eine zunehmende Stringenz von Runde zu Runde, sodass stärker bindende Phagen am Antikörper einen Selektionsvorteil gegenüber schwächer bindenden Phagen bekamen. Die Verwendung der Phagenpeptidbank X_{12} von NEB unterschied sich zu der vorangegangenen Beschreibung in wenigen Punkten. Anstelle der Inkubation mit 2×10^9 TU wurden 4×10^{10} TU verwendet. Des Weiteren wurden K12-Bakterien in LB-Medium, versetzt mit Tetrazyklin, verwendet. Die benötigte Dichte (OD_{600nm}) betrug hierbei unverdünnt 0,5. Nach den beschriebenen Waschschritten wurden die Phagen in 100 µl Glycin 0,2 M pH 2,2 eluiert und mit 15 µl Tris-HCL pH 9,1 neutralisiert. Anschließend wurden 200 µl Bakterien mit 1 µl dieses Eluates infiziert und in den oben beschriebenen Verdünnungen ausplattiert. Über Nacht wurde eine K12-Kultur wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde diese 1:100

verdünnt, mit den restlichen Phagen infiziert und bei 37 °C für vier Stunden geschüttelt. Die anschließende Fällung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.1.17 Titration der Phagen

Für eine erneute Selektionsrunde wurde der Phagengehalt einer Lösung bzw. der Titer der amplifizierten Phagen bestimmt, um die benötigte Menge der einzusetzenden Phagen berechnen zu können. Hierzu wurden aus der gefällten Phagenlösung eine Verdünnungsreihe mit 1 µl der Lösung hergestellt und die Verdünnungen 10^{-5} bis 10^{-9} mit den entsprechenden Bakterien versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Ausplattierung von 100 µl je Verdünnung auf den entsprechenden Agar-Platten und Wachstum der Kolonien über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

Das Auszählen der Kolonien je Platte und Verdünnung erfolgte am nächsten Tag mit anschließender Berechnung des Titers der Phagen in transduzierenden Einheiten.

2.2.1.18 Einzelklonpräparation von Phagen

Zur Identifikation der gebundenen Phagen nach erfolgreicher Selektion mussten diese in Form von Einzelklonen präpariert werden. Hierzu wurden von den Agarplatten aus der dritten oder vierten Selektionsrunde einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in je 10 ml LB-Medium mit Tetrazyklin und Kanamycin überführt. Die Kultivierung erfolgte über Nacht im Schüttler bei 37 °C. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Fällung und Titration wie oben beschrieben. Abweichend dazu wurden jedoch die Pellets nach dem ersten Zentrifugationsschritt bei -20 °C aufbewahrt. Nach positivem Phagen-Bindungs-ELISA konnte aus diesen Pellets die Phagen-DNA mittels Minipräparation extrahiert und sequenziert werden.

2.2.1.19 Phagen-Bindungs-ELISA

Im Rahmen eines ELISAs konnte die spezifische Bindung der einzelnen Phagen zu ihrem Antikörper im Vergleich zur Negativkontrolle IgG getestet werden. Nur spezifisch bindende Phagen sollten danach sequenziert werden.

Auf einer ELISA-Platte wurden je Einzelklon 2 µg Antikörper und 2 µg Negativkontrolle IgG (Intratect) in 100 µl über Nacht bei 4 °C gecoatet.

Jedes Well wurde mit PBS/ 3%BSA für eine Stunde geblockt und im Anschluss daran mit 1×10^8 TU des zu überprüfenden Phagen für eine Stunde inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS/0,5% BSA /0,01% Tween 20 wurde der HRP-gekoppelte Detektionsantikörper anti M13 hinzu gegeben und eine Stunde inkubiert. Nach erneutem vierfachen Waschen wurde die Entwicklungslösung ABTS dazugegeben und die 96-Well Platte für 5-15 Minuten im Dunkeln stehen gelassen. Nach erfolgtem Farbumschlag konnte dieser mittels Messung bei OD_{405nm} quantifiziert werden.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Zellkultur

293T-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Die Splittung 1:10 durch Ablösung mit 1x Trypsin erfolgte zweimal wöchentlich. Transfizierte 293T-Zellen wurden nach Durchführung des Selektionsdrucks (Kapitel 2.2.2.3) in DMEM-Medium mit 10% FCS, 1% P/S und Zeocin (1:1000) kultiviert und einmal wöchentlich 1:3 gesplittet.

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert.

2.2.2.2 Zellzählung und Ausbringung von Zellen

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Tryptophanblau 1:2 durchmischt. Wiederum 10 µl des Gemisches wurden auf die Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop alle vier Quadranten, bestehend aus je 16 Feldern, ausgezählt. Der Mittelwert, multipliziert mit 10^5 ergab die Zellzahl/ml. Für die nachfolgende Transfektionen wurden pro Well einer 6 Well-Platte 6×10^5 Zellen verwendet.

2.2.2.3 Transfektion

Die Transfektion von 293T-Zellen mit dem gewünschten Plasmid erfolgte mit dem Polyfect-Transfection-Reagenz von Qiagen. Pro Transfektion wurden 1,5 µg Plasmid-DNA, 100 µl zusatzfreies DMEM und 10 µl PolyFect gemischt 5-10 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Nach Zugabe von 600 µl DMEM/FCS/P/S wurde die Lösung auf den 293T Zellen vom Vortag (Kapitel 2.2.2.2), nach vorherigem Mediumwechsel tröpfchenweise verteilt.

Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit Zeocin-haltigem Medium (1:1000) unter Selektionsdruck gesetzt. Der Überstand des gewechselten Mediums wurde nach Zentrifugation (5 Minuten, 4000 rpm) bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Mittels dieser Methode lassen sich Proteine ihrer Größe nach auftrennen und in weiteren Schritten genauer untersuchen. Im Folgenden wurden immer 10%ige SDS-Gele verwendet. Für das Trenngel wurden dH₂O, 10% SDS, 30% Acrylamid, 1,5 M Tris pH 8,8, 10% APS und Temed gemischt und in die dafür vorgesehene Apparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, konnte das Isopropanol entfernt werden, das Sammelgel darüber gegossen und der Kamm eingesetzt werden. Abweichend zum Trenngel wurde beim Sammelgel anstelle des 1,5 M Tris pH 8,8 Puffer ein 1,5 M Tris pH 6,8 Puffer verwendet.

Die verwendeten Proben wurden mit reduzierendem 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Verwendeter Puffer in der Elektrophorese-Apparatur war der 1x Running Puffer und als Marker diente der Prestained Protein Ladder von Fermentas.

2.2.3.2 Western Blot

Zur Überprüfung der Antikörperproduktion in 293T Zellen wurde die Methode des Western Blots verwendet. Zunächst wurde eine SDS-Gelelektrophorese wie unter 2.2.3.1 beschrieben durchgeführt, um im Anschluss die aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu transferieren. Als Proben dienten die Überstände aus der Antikörperproduktion. Die Membran wurde zunächst kurz in Methanol eingelegt und dann zusammen mit dem Gel zwischen zwei Whatmannpapieren und Schwämmen in die dazugehörige Apparatur gelegt. Der Transfer (Blot) der Proteine von dem Gel auf die Membran erfolgte mit Transfer Puffer für ein bis zwei Stunden bei 100 V. Die Membran wurde im Anschluss mit TBS gewaschen und für eine Stunde mit 5%iger Milchlösung blockiert. Nach Zugabe des ersten Antikörpers Goat Anti-Human IgG in 1%iger Milchlösung in 1:50000 Verdünnung wurde die Membran über Nacht bei 4 °C kontinuierlich geschüttelt. Es

folgte ein 30 minütiges Waschen der Membran mit TBS-tween und Zugabe des zweiten HRP-konjugierten Anti goat IgG Antikörpers in 1%iger Milchlösung in einer 1:20000 Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit TBS-Tween konnten die Proteine durch die Detektion mit ECL-Lösung und anschließender Entwicklung in Form von Banden sichtbar gemacht werden.

2.2.3.3 Coomassie-Färbung

Mit Hilfe der Coomassie-Blau Färbung konnte die Aufreinigung der Antikörper (s. 2.2.3.4) überprüft und die Konzentration der Antikörper in den einzelnen Eluaten verglichen werden.

Wie unter 2.2.3.1 beschrieben, wurde ein SDS-Gel angefertigt und mit den Proben der Aufreinigung beladen. Nach erfolgreicher Elektrophorese wurde das Gel für 30 Minuten in Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und im Anschluss mit der entsprechenden Entfärbelösung bis zur gewünschten Sichtbarkeit der Banden wieder entfärbt.

2.2.3.4 Aufreinigung der Antikörper über Protein-A-Säule

Um die produzierten Antikörper aus 293T Zellen für weitere Versuche verwenden zu können, mussten diese mittels Säulenchromatographie aufgereinigt werden.

Hierzu wurde je Antikörper eine Chromatographiesäule mit 1000 µl Protein A Sepharose befüllt und mit dH₂O, PBS und PBS high salt gewaschen. Im Anschluss daran wurde der unter 2.2.2.3 beschriebene Überstand auf die Säule gegeben. Durch die Beschaffenheit der Protein A Sepharose wurde der Antikörper aus dem Überstand gebunden und nicht benötigte Bestandteile durchgelassen. Das dreimalige Waschen mit PBS und einmaliges Waschen mit PBS high salt diente zum Auswaschen weiterer möglicher Verunreinigungen, die sich noch im Säulenbett befanden. Die Messung der OD bei 280nm mit UV-Küvetten nach dem Waschvorgang sollte gleich Null betragen, um möglichst wenig Verunreinigungen im Säulenbett zurückzulassen. Der Antikörper wurde im Anschluss mit Glycin pH 4 eluiert und mit Tris HCl pH 9,1 neutralisiert.

Zur Kontrolle der erfolgten Aufreinigung mit SDS-Gel und Coomassie - Blau-Färbung wurden je 10 µl Proben aus dem Durchfluss, dem Säulenmaterial, während und nach dem Waschvorgang sowie von sieben Eluaten genommen.

Die Konzentration der Antikörper wurde im Anschluss am Spektrophotometer NanoDrop durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm und verwenden der, für Proteine gültigen Formel, bestimmt.

Protein (mg/ml) = $1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzierung der B-Zell-Rezeptoren in Lymphomgewebeproben

3.1.1 Übersicht

Zur Produktion von rekombinanten Antikörpern, die dem B-Zell-Rezeptor eines follikulären Lymphoms entsprechen, müssen die cDNA-Sequenzen der zugehörigen schweren und leichten Immunglobulinkette des Tumorklons vorhanden sein. Die hergestellte cDNA wurde mit Immunglobulinfamilien-spezifischen Primern, wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben, amplifiziert und anschließend in den pJET-Vektor kloniert. Je Kette wurden mehrere Einzelklone sequenziert. Die gewonnenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Datenbank „the international ImMu-noGeneTics information system“ (IMGT, <http://imgt.cines.fr>), bzw. mit IMGT/V-QUEST analysiert und der Tumorklon jeweils identifiziert.

3.1.2 Amplifikation von Immunglobulin-DNA

Die Amplifikation erfolgte in drei Reaktionsansätzen für die schwere Immunglobulinkette μ sowie für die beiden möglichen leichten Immunglobulinketten kappa und lambda. Nach anschließender Gelelektrophorese wurde die optisch am stärksten erscheinende Bande bei einer Länge von 400 bp ausgeschnitten und aufgereinigt. In Abbildung 2 ist exemplarisch das Ergebnis einer Amplifikation der leichten Immunglobulinkette dargestellt.

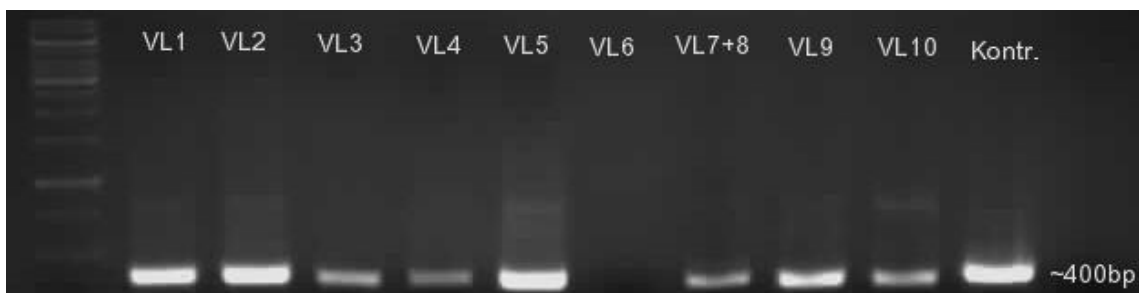


Abbildung 2: Amplifikate der familien-spezifischen PCR für die leichte Immunglobulinkette lambda der Lymphomprobe # 7 nach gelelektrophoretischer Auftrennung.

Die Produkte der durch die familien-spezifischen Primer amplifizierten Immunglobulinfamilien der leichten Immunglobulinkette lambda sind mit der Bezeichnung VL 1 – VL 10 beschriftet. Diese entsprechen der in Tabelle 2 bezeichneten Immunglobulinfamilien. Als Marker diente die 1kb DNA Ladder.

Bis auf Gruppe VL 6 zeigten sich für alle Immunglobulinfamilien positive Banden mit einer Größe von 400 bp. Die Vielfalt der Banden in den einzelnen Immunglobulin-Familien lässt sich durch Kreuzreaktionen der Primer erklären. Diese Primer sind an einigen Basenstellen degeneriert, um möglichst alle Untergruppen einer Familie abzudecken, wodurch eine Kreuzreaktion mit anderen Immunglobulinfamilien auftreten kann. Der Tumorklon sollte sich bei dieser Methode jedoch durch höhere Kopienzahl signifikant durchsetzen, so dass er anhand der Sequenzierungsergebnisse eindeutig zu identifizieren ist.

In diesem Beispiel wurde die Bande der Gruppe VL 5 für weitere Versuche ausgeschnitten und aufgereinigt, da sie die stärkste zu sein schien.

Für alle anderen Proben wurde analog vorgegangen.

3.1.3 Sequenzierungsergebnisse einzelner Lymphomproben

Um eine möglichst große Vielfalt von Immunglobulin-DNA beizubehalten, wurde die aufgereinigte DNA in den pJET-Vektor kloniert. Nach anschließender Sequenzierung mehrerer Klon-DNAs für die jeweilige Immunglobulinkette ergaben sich verschiedene Ergebnisse für die einzelnen amplifizierten Proben. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der oben erwähnten Datenbank mit den Keimbahnsequenzen für Immunglobuline verglichen. Je Klonsequenz wurden die Immunglobulin-Familien der variablen Region, die Abfolge der Aminosäuren im Bereich der CDRs (complementarity determining regions), die Homologie der Klonsequenzen zur Keimbahnsequenz sowie die Anzahl der Mutationen verglichen und tabellarisch erfasst.

Die einzelnen Immunglobulinfamilien wurden mit der Nomenklatur der Datenbank bezeichnet und können anhand der ersten zwei Buchstaben den jeweiligen Immunglobulinketten zugeordnet werden. Hierbei steht KV für den variablen Teil der kappa-Kette, LV für den variablen Teil der lambda-Kette und HV für den variablen Teil der schweren Kette μ . Des Weiteren gibt die erste Zahl nach der Kettenbezeichnung die Immunglobulinfamilie an. Für kappa gibt es sieben, für lambda elf und für die schwere Kette μ sieben Familien. Die mit „*“ verbundenen zwei Zahlen verweisen noch auf Untergruppen der jeweiligen Familie.

Die Aminosäuresequenzen der CDRs wurden mit dem allgemein gültigen Aminosäurecode aufgeführt. Punkte zwischen einzelnen Aminosäuren geben eine

100%ige Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz an und zeigen Bereiche, in denen äußerst selten Mutationen aufgetreten sind.

3.1.3.1 Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 2

Die Analyseergebnisse der amplifizierten Klone für die Probe # 2 sind im Bereich der Immunglobulinkette kappa (Tabelle 5) stark homogen. Von den acht sequenzierten Klonen konnte bei sieben (hellblau unterlegt) die Familie KV1 mit der Untergruppe 17*01 identifiziert werden. Auch in den Aminosäuresequenzen der CDRs 1 – 3 stimmten diese Klone vollkommen überein. Alle sieben Klone wiesen eine Homologie von 95,70 % zur Keimbahnsequenz auf und hatten im Vergleich zu dieser Sequenz jeweils 14 stattgefundene Mutationen im Bereich der variablen Region.

Der Vergleich der Sequenzen für die Klone der leichten Immunglobulinkette lambda (Tabelle 5) zeigte eine Zugehörigkeit der Klone zur Immunglobulin-Familie LV2, allerdings zu unterschiedlichen Untergruppen. Übereinstimmungen in der Immunglobulinfamilie zeigten sich für die Klone 2, 4 und 11 (lila unterlegt). Die Klone 2 und 11 wiesen des Weiteren noch eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der CDRs auf. Hierbei variierte die Homologie zur Keimbahnsequenz zwischen 95,14% und 97,22%. Ebenso zeigten sich unterschiedliche Mutationsanzahlen (14 bzw. 8) im Bereich der variablen Region. Die weiteren analysierten Klone der leichten Kette lambda ergaben keine weiteren Homologien, abgesehen von Übereinstimmungen in der Immunglobulinfamilie.

Tabelle 5: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # 2 ⁺⁾

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen	
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region			
Kappa	Klon1	IGKV1-17*01	QGI.....RND	AA.....S	CLQNNNSYPYSF	95,70%	14
	Klon2	IGKV1-17*01	QGI.....RND	AA.....S	CLQNNNSYPYSF	95,70%	14
	Klon3	IGKV1-17*01	QGI.....RND	AA.....S	CLQNNNSYPYSF	95,70%	14
	Klon 6	IGKV1-17*01	QGI.....RND	AA.....S	CLQNNNSYPYSF	95,70%	14
	Klon 7	IGKV1-17*01	QGI.....RND	AA.....S	CLQNNNSYPYSF	95,70%	14
	Klon 8	IGKV1-17*01	QGI.....RND	AA.....S	CLQNNNSYPYSF	95,70%	14
	Klon10	IGKV1-17*01	QGI.....RND	AA.....S	CLQNNNSYPYSF	95,70%	14
	Klon 9	IGKV2-30*02	QSLVHN.DGNTY	NV.....S	CIQATHWPPETF	94,56%	16
	n=8						
	Lambda	Klon 2	IGLV2-18*02	SSDVG...SYNR	DV.....N	CSSYIGSSTLVF	95,14%
Klon 11		IGLV2-18*02	SSDVG...SYNR	DV.....N	CSSYIGSSTLVF	97,22%	8
Klon 4		IGLV2-18*02	SSDVG...SYNR	EV.....S	CSSYTTSSTWVF	98,96%	3
Klon 7		IGLV2-14*01	SSDVG...GYKY	DV.....S	CSSYTSSTHFVF	98,26%	5
Klon 8		IGLV2-14*01	SSDVD...GYSY	DV.....S	LQLIYKQHPLVF	87,15%	37
Klon 9		IGLV2-14*01	SSDVG...AYNY	NV.....N	CSSYTSSNTLVIF	95,83%	12
Klon 12		IGLV2-14*01	SSDVG...GYNY	NV.....N	CSSYTSSNTLVIF	95,14%	14
Klon 10		IGLV2-14*01	SSDVG...GFSY	DA.....S	CSSYTTSSSLVVF	95,14%	14
Klon 3		IGLV2-8*01	SSDVG...GYNY	EV.....T	CSSYAGSNNFYVF	98,26%	5
Klon 1		IGLV2-11*01	SSDVG...GYNS	DV.....T	CCSYTGTYTWVF	97,22%	8
Klon 6		IGLV2-23*02	SSDVG...SYNL	EV.....N	CCSYAGGFVIF	96,53%	11
n= 11							

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette kappa sind hellblau unterlegt; Identische Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette lambda in Bezug auf die gleichen Immunglobulinfamilie und CDR 1-3 der sind lila unterlegt.

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, zeigte sich eine deutliche Homogenität im Bereich der leichten Immunglobulinkette kappa, sodass es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um Klonsequenzen des Lymphoms handelt.

Für die schwere Kette der Probe # 2 (Tabelle 6) zeigten sich beim Vergleich mit der Datenbank drei der neun Klone mit der Immunglobulinfamilie HV5 und identischer Untergruppe (hellblau unterlegt). Zwei von den Klonen hatten ebenfalls komplette Übereinstimmungen in den CDRs sowie einen identischen Mutationsstatus im Vergleich zur Keimbahnsequenz (98,96% Homologie und 3 Mutationen). Im arithmetischen Mittel betrug die Keimbahn-Homologie für diese drei Klone 98,84% und die Anzahl der Mutationen 3,33.

Bei diesen Sequenzen wurde von dem vom Tumor abstammenden Klon ausgegangen.

Tabelle 6: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 2 ⁺⁾

	Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen
			CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region		
schwere Kette	Klon1 206	IGHV5-51*01	GYSF...TSYW	IYPG..DSDT	CAAPRIAAPGSLGW	98,61%	4
	Klon2 206	IGHV5-51*01	GYSF...TSYW	IYPG..DSDT	CARLMPRDSSLVDW	98,96%	3
	Klon3 206	IGHV5-51*01	GYSF...TSYW	IYPG..DSDT	CARLMPRDSSLVDW	98,96%	3
	Klon 6	IGHV3-66*01, IGHV3-66*04	GFTV...SSSY	ISSG...GDT	CVRDLVGTIDYW	94,74%	15
	Klon 7	IGHV1-2*02	GYTF...TGYY	INPN..SGGT	CAREAYSGYDWSRGFDPW	99,31%	2
	Klon21 206	IGHV1-2*02	GYTF...TGYY	INPN..SGGT	CARDHGWSRFDPW	100,00%	0
	Klon9 206	IGHV1-8*01	GYTF...TSYD	MNPN..SGNT	CARGTTGRLLWFGELLSGFDYW	99,65%	1
	Klon6 206	IGHV1-18*01	GYTF...TSYG	ISAY..NGNT	CARVGGAYYDSSGYLPEYFQHW	99,31%	2
	Klon23 206	IGHV1-69*04, IGHV1-69*09	GGTF...SSYA	IIPL..LGIA	CARETIFGVVIRFDYW	99,65%	1
	n=9						

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der schweren Immunglobulinkette sind hellblau unterlegt.

3.1.3.2 Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 4

Ein anderes Bild zeigte sich für die leichten Immunglobulinketten der Probe # 4. Bei der Analyse von 16 Klonsequenzen für die leichte Immunglobulinkette kap-pa (Tabelle 7) überwog die Immunglobulinfamilie KV2, bzw. deren Untergruppe 28*01. Hier zeigte sich eine Übereinstimmung in allen CDRs für die Klone 6 und 20 (hellblau unterlegt). Die Keimbahn-Homologie sowie die Anzahl der Mutationen betragen 88,78% und 89,12% bzw. 33 und 32 Mutationen. Die anderen Klone dieser Immunglobulinfamilie zeigten Übereinstimmungen zur Keimbahnsequenz von 50,17% bis 97,96% (arithmetisches Mittel: 89,63%). Die Anzahl der Mutationen variierte von 8 bis 145 (arithmetisches Mittel: 30,33). Für den Klon 15 mit der niedrigsten Homologie und höchsten Mutationsanzahl konnte ein Teil der Sequenz nicht identifiziert werden. Eine weitere Übereinstimmung innerhalb der CDRs sowie im Mutationsstatus zeigte sich für die Klone 3 und 7 der Immunglobulinfamilie KV2-30*02 (lila unterlegt).

Die PCR der leichten Immunglobulinkette lambda für die Probe # 4 ergab zwar ein Amplifikat, allerdings zeigte die Sequenzierung der Klone keine Sequenzen eines Immunglobulins.

3 Ergebnisse

Tabelle 7: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 4 ⁺⁾

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region		
Klon 6	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSL LHT.SGYNH	LG.....S	CMQSLQTPLTF	88,78%	33
Klon 20	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSL LHT.SGYNH	LG.....S	CMQSLQTPLTF	89,12%	32
Klon 1	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSL LQS.NEYNF	LG.....S	CMQTLQTPTF	97,28%	8
Klon 8	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QTL LHT.DGYSY	LA.....S	CMRALQSPYTY	93,20%	20
Klon 11	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSL LHS.NGYNY	LG.....Y	CMQALQSPLAF	97,96%	6
Klon 15	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QXLHN..GGYHY	XX.....L	Sequenz nicht lesbar	50,17%	145
Klon 18	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSL LHG.NGHNY	LG.....S	CMQALQAPWTF	96,94%	9
Klon 19	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSL LHG.SGNNY	LG.....S	GVQGLQTPYTF	96,26%	11
Klon 2	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSL LHG.SGNNY	LG.....S	CVQGLQTPYTF	96,94%	9
Klon 3	IGKV2-30*02	ESLVHS.DGSTF	KV.....S	CMQGTWHPITF	95,92%	12
Klon 7	IGKV2-30*02	ESLVHS.DGSTF	KV.....S	CMQGTWHPITF	95,92%	12
Klon 5	IGKV2-30*02	QSLVHS.DGNTY	RV.....S	CMQGTWHPRTF	98,98%	3
Klon 14	IGKV2-30*02	EXLHX.XGSTF	KV.....X	Sequenz nicht lesbar	67,01%	97
Klon 10	IGKV2-24*01	QSLVHS.DGNTY	KI.....S	CMQTTQLPLTF	99,66%	1
Klon 13	IGKV2-29*02	QRLLQS.DGQTY	ET.....S	CMQALHLPLTF	92,18%	23
Klon 9	IGKV1-33*01, IGKV1D-33*01	QDI.....ANF	AA.....Y	CQYDTPYTF	96,06%	11
n = 16						

⁺⁾ Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette kappa einer Immunglobulinfamilien-Untergruppe und gleicher CDR 1-3 sind hellblau unterlegt;
Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette kappa einer anderen Immunglobulinfamilien-Untergruppe und gleicher CDR 1-3 sind lila unterlegt.

Die Klonsequenzenanalyse für die schwere Kette der Probe # 4 (Tabelle 8) zeigte ein homogenes Bild für die Immunglobulinfamilie HV4 mit Untergruppe 34*01. Fünf der sechs Klone stimmten in der CDR 2 und 3 überein und vier Klone zusätzlich noch in der CDR 1. Die Keimbahnsequenz-Homologie der sechs Klone variierte zwischen 84,02% und 97,54% (arithmetisches Mittel: 92,95 %) bzw. 7 bis 35 Mutationen (arithmetisches Mittel: 18). In der CDR1 von Klon 5 wurde ein Stoppcodon gefunden, sodass es sich bei dieser Sequenz um eine nicht produktive Immunglobulin-Sequenz gehandelt hat.

Insgesamt konnte nach dieser Sequenzenanalyse von Sequenzen des Tumors ausgegangen werden.

Tabelle 8: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 4 ⁺⁾

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region		
Klon 2	IGHV4-34*01	GGSF....SGYY	INHS...GST	CARGYSGSSHTLPEYYMDVW	96,84%	7
Klon 3	IGHV4-34*01	GGSF....SGYY	INHS...GSS	CARGYSGSSHTLPEYYMDVW	95,79%	12
Klon 4	IGHV4-34*01	GGSF....SGYY	INHS...GST	CARGYSGSSHTLPEYYMDVW	92,63%	21
Klon 5	IGHV4-34*01, IGHV4-34*02, IGHV4-34*08	Stoppcodon ⁺⁺⁾	INHS...GST	CARGYSGSSHTLPEYYMDVW	84,02%	35
Klon 6	IGHV4-34*01	GGSF....SGYY	INHS...GST	CARGYSGSSHTLPEYYMDVW	97,54%	7
Klon 1	IGHV4-34*01, IGHV4-34*02	GGSF....SGYY	INHS...GST	CARGYSGSSHTLPEYYMDVW	90,88%	26
n = 6						

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der schweren Immunglobulinkette sind hellblau unterlegt.
⁺⁺⁾ nicht produktive Immunglobulin-Sequenz durch Stoppcodon

3.1.3.3 Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 5

Der Sequenzenvergleich für die leichte Kette kappa für Probe # 5 (Tabelle 9) zeigte ein Überschuss der Immunglobulinfamilie KV2-28*01 bei sieben von zwölf analysierten Klonen (hellblau unterlegt). Übereinstimmungen in den CDR 2 und CDR 3 fanden sich für Klon 8 und Klon 9. Innerhalb der CDR 1 unterschieden sich diese beiden Klone in einer Aminosäure. Die Keimbahnsequenz-Homologie sowie die Anzahl der Mutationen ergaben ebenfalls Unterschiede zwischen diesen beiden Klonen. Insgesamt zeigten sich für die Klone dieser Immunglobulinfamilie im arithmetischen Mittel 96,89 % Keimbahn-Homologie (94,90% bis 99,66%) sowie 9,14 stattgefundene Mutationen (1 bis 15 Mutationen).

Im Vergleich dazu konnte sich bei den Sequenzen der leichten Immunglobulinkette lambda (Tabelle 9) keine Familienuntergruppe quantitativ eindeutig durchsetzen. Es gab Übereinstimmungen für die Klone 3, 5 und 9 dieser Kette in der Immunglobulinfamilie und der CDR 3 (lila unterlegt). Klon 5 und 9 waren darüber hinaus noch in den CDR 1 und 2 identisch. Die Keimbahn-Homologie variierte von 71,58% bis 72,63%. Im Bereich der variablen Region fanden 78 bis 81 Mutationen statt. Die Informationen der Datenbank ergaben jedoch für Klon 5 eine unproduktive Immunglobulin-Sequenz.

Tabelle 9: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # 5 ^{*)}

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen	
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region			
Kappa	Klon 3	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLLS.NGYNQ	LG.....S	CVQALQTPPTF	95,58%	13
	Klon 5	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLLS.NGFNY	LG.....S	CMQALQTLTYF	96,60%	10
	Klon 8	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLLS.NGYNY	LV.....S	CMQALQTPQYTF	96,26%	11
	Klon 9	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLLS.NGYNY	LV.....S	CMQALQTPQYTF	94,90%	15
	Klon 10	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLLS.NGYNY	LG.....S	CMQALQTPWTF	99,66%	1
	Klon 13	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLLS.NGYNY	LA.....S	CMQGLQVPLTF	97,96%	6
	Klon14	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLLS.DGYNY	LG.....S	CMQGLQTPCSF	97,28%	8
	Klon 1	IGKV2-24*01	QSLVHG.DGNTY	KI.....S	CMQATQFPQTF	97,96%	6
	Klon 7	IGKV2-30*01	QSLVYS.DGNTY	KV.....S	CMQGLQSRTF	97,28%	8
	Klon 15	IGKV2D-29*01	QSLLYS.DGKTY	EV.....F	CMQSVDLQPTF	90,14%	29
	Klon 2	IGKV1-5*03	QSI.....SSW	RA.....S	CQQYDSVPYTF	91,76%	23
	Klon 4	IGKV1-12*01, IGKV1-12*02	QAI.....SNN	GA.....S	CLQANSFPLMYTF	92,83%	20
n=12							
Lambda	Klon 3	IGLV1-47*02	ISCS....GGSS	NN.....N	CAAWDASLSAWVF	71,58%	81
	Klon 5	IGLV1-47*02	MSCS....GGTS	ND.....N	CAAWDASLSAWVF ^{**)}	72,63%	78
	Klon 9	IGLV1-47*02	MSCS....GGTS	ND.....N	CAAWDASLSAWVF	71,93%	80
	Klon 4	IGLV1-47*01	SSTI....GSNP	RN.....D	CTAWDNLGSLPLF	93,68%	18
	Klon 1	IGLV1-47*01	SSNI....GSNY	RN.....N	CAAWDDNLPLVVF	99,30%	2
	Klon 6	IGLV1-44*01	SSNI....GSNT	SN.....N	CAAWDDSLNGPVF	98,95%	3
	Klon 2	IGLV1-44*01	SSNI....GSNP	NN.....N	CAAWDDTLNGLYVF	97,19%	8
	Klon 8	IGLV1-40*01	SSNIG...SHND	RN.....T	CQSYDSSLAWVF	93,75%	18
	Klon 7	IGLV9-49*01	SDYS.....NYK	VG TG..SIVE	CAADHGSGGNFVYVF	94,95%	15
	Klon 10	IGLV9-49*01	SGYS.....NYK	VDTG..GIVG	CGADHSSGGNFVSWVF	95,29%	14
n = 10							

^{*)} Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette kappa einer Immunglobulinfamilien-Untergruppe und gleicher CDR 2-3 sind hellblau unterlegt;

3 Ergebnisse

Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette lambda einer Immunglobulinfamilien-Untergruppe und gleicher CDR 1-3 sind lila unterlegt.

++) nicht produktive Immunglobulin-Sequenz durch Leserasterverschiebung (Frameshift)

Nach erfolgter Analyse zeigte sich, dass sich die Immunglobulinfamilie KV2-28*01 der leichten Immunglobulinkette kappa tendenziell stärker durchsetzte (7 von 12 Klonen) und die Aminosäuresequenzen der CDRs untereinander starke Ähnlichkeiten aufwiesen. Des Weiteren ergaben sich für diese Kette keine unproduktiven Sequenzen. Für weitere Versuche wurden daher Sequenzen der leichten Immunglobulinkette kappa verwendet.

Im Gegensatz dazu zeigten die Klonsequenzen der schweren Immunglobulinkette (Tabelle 10) eine vollständige Übereinstimmung in der Immunglobulinfamilie sowie in der CDR 2. Neun der zehn Klone waren in der CDR 3 identisch und von diesen Klonen acht ebenfalls in der CDR 1 (hellblau unterlegt). Die Keimbahnsequenz-Homologie ergab für Klon 7, 8, 19 und 27 das gleiche Ergebnis von 96,53%. Ebenso war die Mutationenanzahl mit 10 stattgefundenen Mutationen für diese Klone identisch. Die Sequenzen der Klone 1 und 29 ergaben jedoch keine produktiven Immunglobulin-Sequenzen.

Bei Betrachtung aller Klone betrug die Homologie zur Keimbahn im arithmetischen Mittel 95,93% (94,10% - 96,53%) und die Mutationenanzahl 11,6 (10 – 17).

Insgesamt konnte nach dieser Sequenzenanalyse von Tumor-Sequenzen ausgegangen werden.

Tabelle 10: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 5 ⁺⁾

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region		
Klon 1	IGHV3-23*01	GFTF....SSYA	ISSN..GGST	CAQSNVAAAPRGWFDPW ⁺⁺⁾	94,10%	17
Klon 7	IGHV3-23*01	GFTF....SSYA	ISSN..GGST	CAQSNVAAAPRGWFDPW	96,53%	10
Klon 8	IGHV3-23*01	GFTF....SSYA	ISSN..GGST	CAQSNVAAAPRGWFDPW	96,53%	10
Klon 14	IGHV3-23*01	GFTF....SSYA	ISSN..GGST	CAQSNVAAAPRGWFDPW	95,49%	13
Klon 17	IGHV3-23*01	GYTF....SSYA	ISSN..GGST	CAQSNVAAAPRGWFDPW	96,18%	11
Klon 18	IGHV3-23*01	GFTF....SSYA	ISSN..GGST	CAQSNVAAAPRGWFDPW	96,18%	11
Klon 19	IGHV3-23*01	GFTF....SSYA	ISSN..GGST	CAQSNVAAAPRGWFDPW	96,53%	10
Klon 27	IGHV3-23*01	GFTF....SSYA	ISSN..GGST	CAQSNVAAAPRGWFDPW	96,53%	10
Klon 28	IGHV3-23*01	GFTF....SSYA	ISSN..GGST	CAQSNVAAAPRGWFDPW	96,18%	11
Klon 29	IGHV3-23*01	GFTF....SSYA	ISSN..GGST	CAQSNVAAAPRGWFDPW ⁺⁺⁾	95,14%	13
n= 10						

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der schweren Immunglobulinkette sind hellblau unterlegt.

⁺⁺⁾ nicht produktive Immunglobulin-Sequenz durch Stoppcodon bzw. Leserasterverschiebung (Frameshift)

3.1.3.4 Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 7

Der Klonsequenzenvergleich von den leichten Immunglobulinketten kappa und lambda von Probe # 7 (Tabelle 11) zeigte für beide möglichen Kettenvarianten kein eindeutiges Ergebnis. Von zwölf sequenzierten Klonen der leichten Immunglobulinkette kappa zeigten zwei eine Übereinstimmung in der Immunglobulin-Familie, sowie in den CDRs (hellblau unterlegt). Die Keimbahnsequenz-Abweichung war bei beiden unterhalb von 1% und die Mutationenanzahl betrug 1 bzw. 2.

Bei den elf sequenzierten Klonen der leichten Immunglobulinkette lambda stimmten zwei Klone in ihrer Familienzugehörigkeit sowie in den CDR 2 und CDR 3 überein (lila unterlegt). Die Sequenz der CDR 1 sowie die Keimbahnsequenz-Homologien variierten für diese beiden Klone. Bei beiden Ketten konnte daher kein Tumorklon mit einem überproportionalen Anteil identifiziert werden.

Tabelle 11: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # 7 ⁺⁾

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen	
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region			
Kappa	Klon 3	IGKV1-5*03	QSI.....SSW	KA.....S	CQQYNSYSRTF	99,64%	1
	Klon 17	IGKV1-5*03	QSI.....SSW	KA.....S	CQQYNSYSRTF	99,28%	2
	Klon 11	IGKV1-5*03	QSI.....NTW	KA.....S	CQHYNTYSFTF	95,70%	12
	Klon 9	IGKV1-5*03	QSI.....NDK	KA.....S	CQHFGTYSLTF	88,17%	33
	Klon 4	IGKV1-6*01	QGI.....RSD	AA.....S	CLQDNNYPPTF	94,27%	16
	Klon 2	IGKV1-27*01	QGT.....SNY	AA.....S	CQKYNVFLTF	97,85%	6
	Klon 13	IGKV1-33*01, IGKV1D-33*01	QDI.....SNY	DA.....S	CQLYNNVPLTF	96,77%	9
	Klon 15	IGKV1-39*01, IGKV1D-39*01	QSI.....SSY	TT.....S	CQQSYSTPYTF	97,13%	8
	Klon 12	IGKV2D-24*01	QSLVHS.DGNTY	KV.....S	CTQATQFPQTF	99,66%	1
	Klon 14	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLLSH.NGYNY	LG.....S	CMQALQTPYTF	99,66%	1
	Klon 5	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLLSH.NGYNY	LG.....S	CMQALQT ⁺⁺⁾	100,00%	0
	Klon 1	IGKV2D-29*01	QSLLSH.DGNTY	EV.....S	CMQFIELPPTF	95,58%	13
n=12							
Lambda	Klon 3	IGLV3-21*02	NIG.....SKS	DD.....N	CQVWVDF	95,34%	13
	Klon 9	IGLV3-21*02	DIG.....SKV	DD.....S	CHVWDNSGYHPMF	89,96%	28
	Klon 17	IGLV3-21*02	NIG.....SKV	DD.....S	CHVWDNSGYHPMF	92,83%	20
	Klon 18	IGLV3-21*02	KIG.....SKS	DD.....S	CQVWDSSSDHWVF	96,77%	9
	Klon 11	IGLV1-44*01	GSNI....GSHT	SN.....T	CAAWDDSLNGHLVF	91,93%	23
	Klon 12	IGLV1-44*01	SSNI....GSSI	SD.....D	CAAWDDSLKALVF	91,23%	25
	Klon 13	IGLV1-44*01	NSNI....GSNS	SN.....D	CAAWDDSLNGGVF	94,39%	16
	Klon 14	IGLV1-44*01	SSNI....GSNT	GH.....D	CAAWDDSLNGVVF	94,74%	15
	Klon 16	IGLV1-44*01	SSNI....GTNT	YN.....N	CAAWDDSLSGYVF	92,63%	21
	Klon 5	IGLV1-40*01	SSNIG...ANYD	SN.....A	CQSYDISLSAPYVF	94,10%	17
	Klon 15	IGLV5-45*02	SGINV...GTYR	YKSD...SDK	CMIWHSSAWVF	99,02%	3
n= 11							

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette kappa in Bezug auf Immunglobulinfamilien-Untergruppe und gleicher CDR 1-3 sind hellblau unterlegt;

Identische Klonsequenzen der Immunglobulinkette lambda sind lila unterlegt.

⁺⁺⁾ nicht produktive Immunglobulin-Sequenz durch Leserasterverschiebung (Frameshift)

Die Analyse der schweren Kette wies eine starke Heterogenität der sequenzierten Klone (Tabelle 12) auf. Es gab vereinzelt zwei Klone mit Übereinstimmung

gen in der Immunglobulinfamilie. In der CDR 3 gab es keine identischen oder sehr ähnlichen Aminosäuresequenzen und in der CDR 1 und CDR 2 waren vereinzelte Klone untereinander identisch.

Tabelle 12: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 7

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region		
Klon 9	IGHV3-48*03	GFTF....SSYE	ISSS..GSTI	CARQLVGATQEGAFDIW	99,31%	2
Klon 5	IGHV3-48*03	GFTF....SSYE	ISSS..GSTI	CATINYDFAADYFDYW	98,96%	3
Klon 8	IGHV3-23*04	GFTF....SSYA	ISGS..GGST	CAKDSFYGDYYYW	99,65%	1
Klon 15	IGHV3-23*04	GFTF....SSYA	ISGS..GGST	CAKEYRSVVVIATLLDYW	99,31%	2
Klon 11	IGHV3-30*03, IGHV3-30*18, IGHV3-30*19	GYSF....STYG	ISYD..GSNT	CARDNTYCTNRNCYSTYYAMDVW	90,97%	26
Klon 13	IGHV3-30*03, IGHV3-30*18	GFTF....SSYG	ISYD..GSNK	CAKDAGLVVYASDAFDIW	98,96%	3
Klon 3	IGHV3-9*01	GFTF....DDYA	ISWN..SGSI	CAKDIGWTGTTSDAFDIW	99,65%	1
Klon 4	IGHV3-11*03	GFTF....SDYY	ISSS..SSYT	CARKRIAVAAGAFDIW	98,96%	3
Klon 1	IGHV3-33*01	GFTF....SSYG	IWYD..GSNK	CARDRGSWGWLDDYW	99,65%	1
Klon 14	IGHV1-46*01, IGHV1-46*03	GYTF....TSYY	INPG..GNDR	CARGLSSSGYYAYW	93,75%	18
Klon 16	IGHV1-69*01	GGIF....NNYA	IVPI..FRTA	CASEVGDYVANAFHIW	94,10%	17
Klon 10	IGHV1-69*06	GGTF....SSYA	IIPL..FGTA	CAPGWGHYYGMDVW	98,96%	3
Klon 7	IGHV1-8*01	GYTL....TSFD	MNPN..SGNT	CVVNRATTSDW	92,01%	23
n= 13						

Da weder für die leichte noch für die schwere Immunglobulinkette dieser Probe ein vorhandener Tumor durch Sequenzierung eindeutig identifiziert werden konnte, wurde auf eine weitere Bearbeitung dieser Probe verzichtet.

3.1.3.5 Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 8

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Proben ergab sich für die Probe # 8 das folgende Ergebnis:

Die Klonsequenzen-Analyse der leichten Immunglobulinkette kappa (Tabelle 13) zeigte eine starke Heterogenität. Kein Klon zeigte mit einem der anderen aus dieser Gruppe sequenzierten Klone Übereinstimmungen. Nicht nur in den CDRs, sondern auch in den Immunglobulinfamilien zeigten sich gravierende Unterschiede. Die Klone 2 und 10 wiesen dazu noch eine nicht produktive Immunglobulin-Sequenz auf.

Anhand dieser Ergebnisse wurde deutlich, dass es sich bei der leichten Kette des Tumorklons nicht um die Immunglobulinkette kappa handeln konnte.

Für die leichte Immunglobulinkette lambda der Probe # 8 (Tabelle 13) ließen sich Klone identifizieren, die nicht nur in den CDRs identisch waren, sondern sich auch in ihrem Mutationsstatus nur geringfügig unterschieden (hellblau unterlegt). Es fanden sich arithmetisch gemittelte Werte von 94,21% Homologie zur Keimbahnsequenz (93,86% - 94,74%) und 16,5 Mutationen im Bereich der variablen Region (15 – 18 Mutationen).

Tabelle 13: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # 8 ⁺⁾

	Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen
			CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region		
Kappa	Klon1	IGKV1-39*01, IGKV1D-39*01	QSI.....STY	AA.....S	CQHSHTSSAITF	92,47%	21
	Klon 4	IGKV1-39*01, IGKV1D-39*01	QNI.....DTY	DA.....S	CHQTHHTPPETF	92,83%	20
	Klon 3	IGKV1-27*01	QDI.....HIY	AA.....S	CQKHNDAPLTF	92,83%	20
	Klon 5	IGKV3-20*01	QSVS.....SSY	GA.....S	CQYGRSPWTF	97,16%	8
	Klon2	IGKV3-20*01	QSVS.....SSN	SA.....S	CQYGSPPVTF	83,69%	47
	Klon 7	IGKV3-11*01	QGV.....SSS	DA.....S	CQQRSNWPLTF	95,34%	13
	Klon 8	IGKV3-15*01	QSV.....SSD	GA.....S	CHQYNDWPRTF	93,91%	17
	Klon 10	IGKV3-15*01	QFI.....NNK	FA.....S	CQYDXWPXYF ⁺⁺⁾	89,25%	30
	n = 8						
	Lambda	Klon 1	IGLV1-44*01	TSNI....GSKT	NN.....N	CAAWDDSLNGPVF	94,74%
Klon 3		IGLV1-44*01	TSNI....GSKT	NN.....N	CAAWDDSLNGPVF	94,04%	17
Klon 4		IGLV1-44*01	TSNI....GSKT	NN.....N	CAAWDDSLNGPVF	93,68%	18
Klon 6		IGLV1-44*01	TSNI....GSKT	NN.....N	CAAWDDSLNGPVF	94,39%	16
Klon 7		IGLV3-19*01	SLR.....SYY	AQ.....N	CNSRDSNGNPVLF	95,70%	12
Klon 8		IGLV3-1*01	KLG.....DKY	HX.....S	CQAWDSSTVVF	81,72%	51
Klon 9		IGLV3-21*02	KIG.....DFS	DD.....S	CQVWPSSSDHPVF	92,83%	20
n = 7							

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette lambda sind hellblau unterlegt.

⁺⁺⁾ nicht produktive Immunglobulin-Sequenz durch Leserasterverschiebung (Frameshift)

Die schwere Kette dieser Probe (Tabelle 14) zeigte bei acht von neun Klonen eine Übereinstimmung sowohl in der Immunglobulinfamilie (inklusive Untergruppe), als auch in der CDR 1 (hellblau unterlegt). Bei der Analyse der Aminosäuresequenzen der CDR 2 und CDR 3 ergab sich eine Differenz bei drei Klonen in jeweils einer Aminosäure im Vergleich zu den vorherigen Klonen dieser Immunglobulinkette (lila unterlegt). Die Keimbahnsequenz-Homologie variierte von 81,6% - 92,71% (arithmetisches Mittel: 91,16%) und 21 – 53 Mutationen (arithmetisches Mittel: 25,44). Bei der Sequenz von Klon 10 handelte es sich allerdings, bedingt durch ein Stoppcodon, um eine nicht produktive Immunglobulin-Sequenz.

Tabelle 14: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 8 ⁺⁾

	Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen
			CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region		
schwere Kette	Klon 1	IGHV3-11*03	GFTF....SDYN	INSG..SRNT	CVKSRYNGNYYFDYW	92,36%	22
	Klon 2	IGHV3-11*03	GFTF....SDYN	INSG..SRDT	CVKSRYNGNYYFDSW	92,36%	22
	Klon 3	IGHV3-11*03	GFTF....SDYN	INSG..SRNT	CVKSRYNGNYYFDYW	92,36%	22
	Klon 4	IGHV3-11*03	GFTF....SDYN	INSG..SRNT	CVKSRYNGNYYFDYW	92,36%	22
	Klon 6	IGHV3-11*03	GFTF....SDYN	INSG..SRDT	CVKSRYNGNYYFDSW	92,36%	22
	Klon 7	IGHV3-11*03	GFTF....SDYN	INSG..SRNT	CVKSRYNGNYYFDYW	92,71%	21
	Klon 8	IGHV3-11*03	GFTF....SDYN	INSG..SRDT	CVKSRYNGNYYFDSW	92,36%	22
	Klon 9	IGHV3-11*03	GFTF....SDYN	INSG..SRNT	CVKSRYNGNYYFDYW	92,01%	23
	Klon 10	IGHV3-11*03	GFAF....SDYN	INSG..SRDT	CVKSRYNGNXXFXSW ⁺⁺⁾	81,60%	53
	n = 9						

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der gleichen Immunglobulinfamilie und CDR 1-3 der schweren Immunglobulinkette sind hellblau unterlegt; Klonsequenzen gleicher Immunglobulinfamilie aber mit Unterschieden in CDR 2 und 3 sind lila unterlegt.

⁺⁺⁾ nicht produktive Immunglobulin-Sequenz durch Stoppcodon

3.1.3.6 Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # 11

Die Ergebnisse für die Probe # 11 ergaben, ebenso wie bei Probe # 7, keinen eindeutig identifizierbaren Tumorklon. Für die schwere Immunglobulinkette konnte mit familienzugehörigen Primern ein Amplifikat hergestellt werden. Dieses erwies sich jedoch im Rahmen der Klonsequenzen-Analyse nicht als Immunglobulin-cDNA. Auch nach mehrmaligen Versuchen war es nicht möglich, diese schwere Kette zu amplifizieren bzw. zu sequenzieren.

Der Vergleich der beiden möglichen leichten Immunglobulinketten lambda und kappa ergab für die leichte Kette lambda keine untereinander identischen Klone (Tabelle 15). Sie unterschieden sich alle in der CDR 3 und teilweise in der CDR 1 und CDR 2. Die Familienzugehörigkeit war für vier der neun sequenzierten Klone gleich.

Abgesehen von der Keimbahnsequenz-Homologie und der Mutationenanzahl zeigten sich in den Sequenzen der Klone für die leichte Kette kappa zwei identische Klone (lila unterlegt). Des Weiteren wiesen jedoch weitere Klone (hellblau unterlegt) Übereinstimmungen untereinander auf. Zwei von ihnen unterschieden sich hierbei ebenfalls lediglich in der Keimbahn-Homologie und der Mutationenanzahl.

Tabelle 15: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # 11 ⁺⁾

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region		
Klon 1	IGKV1-39*01, IGKV1D-39*01	QSI.....NNQ	AA.....S	CQQYNFPRTF	95,70%	12
Klon 2	IGKV1-39*01, IGKV1D-39*01	QSI.....SSY	AA.....S	CQQSYSTPFTF	99,28%	2
Klon 8	IGKV1-39*01, IGKV1D-39*01	QSI.....NNQ	AA.....S	CQQYNFPRTF	96,06%	11
Klon 6	IGKV1-39*02	ENI.....MTF	DA.....S	VNRVTVARSL	85,30%	41
Klon 7	IGKV3-20*01	QSVS.....SNY	GA.....S	CQHYDNSPSFTF	93,62%	18
Klon 12	IGKV3D-20*01	QSVT.....INS	DA.....S	CQQYGRSPITF	94,68%	15
Klon 3	IGKV3-15*01, IGKV3-20*01	QSV.....GSD	DA.....S	CQQYGGSPITF	89,61%	29
Klon 11	IGKV3-15*01	QPV.....SLD	GA.....S	CHQYNEWGTF	90,32%	27
Klon 13	IGKV3-15*01	HDI.....YTN	DT.....S	CQDYNDWPRTF	87,46%	35
Klon 10	IGKV3-11*01	QTG.....DLR	AA.....S	CQCRTNWPPEYTF	89,96%	28
Klon 14	IGKV3-11*01	QSV.....GSY	DA.....S	CQQRNWPPEVTF	97,13%	8
Klon 4	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLHT.NGYNY	LV.....S	CMQALQTPQYTF	94,90%	15
Klon 9	IGKV2-28*01, IGKV2D-28*01	QSLHT.NGYNY	LV.....S	CMQALQTPQYTF	94,56%	16
n = 13						
Klon 5	IGLV1-47*01	GSNI....GRNF	RN.....N	CAAWDDSLNVVVF	96,14%	11
Klon 2	IGLV1-47*01	TSNI....GSDY	RN.....N	CAAWDDSSNVLF	96,14%	11
Klon 3	IGLV1-47*01	SSNV....GSNY	RN.....N	CATWDDSLNSPVF	94,74%	15
Klon 7	IGLV1-47*01	SSNI....GRNY	RN.....N	CQAWDSGTDVVF	90,53%	27
Klon 4	IGLV1-44*01	XSNI....GSRT	KN.....D	CAAWDVSLSGVVF	88,53%	25
Klon 1	IGLV1-44*01	SSNI....GSNT	AN.....N	CAARDDSLNGVVF	95,44%	13
Klon 6	IGLV5-45*02	SGINF...PNSV	XKXD...SDT	CMTWYNNAWVF	83,01%	52
Klon 8	IGLV5-45*02	SGINV...GIXK	YKSD...SDK	CMIWHSAGVF	96,73%	10
Klon 9	IGLV3-21*03	NIG.....RNS	DS.....N	CQVWDDSSGDHPRMVF	91,04%	25
n = 9						

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette kappa einer Immunglobulinfamilien-Untergruppe und gleicher CDR 1-3 sind hellblau unterlegt; Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette kappa einer anderen Immunglobulinfamilien-Untergruppe und gleicher CDR 1-3 sind lila unterlegt.

3 Ergebnisse

Durch die fehlende Immunglobulinsequenz bei der schweren Kette dieser Probe konnte die komplette Tumor-Sequenz nicht identifiziert werden.

3.1.3.7 Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # G3

Bei der Klonsequenzenanalyse für die leichte Immunglobulinkette kappa dieser Probe zeigten sich keine komplett identischen Klone (Tabelle 16). Es gab neben Übereinstimmungen in der Immunglobulinfamilie auch Übereinstimmungen der CDR 1 bzw. CDR 2, jedoch fehlte die Keimbahnsequenz-Homologie in der entscheidenderen CDR 3. Für die leichte Immunglobulinkette lambda (Tabelle 16) zeigten zwei der acht Klonsequenzen die Übereinstimmung in der Immunglobulin-Familie, CDR 2 und CDR 3 (hellblau unterlegt). Die Keimbahn-Homologie variierte zwischen 95,79% und 97,19%, ebenso die Mutationenanzahl (8 -12).

Tabelle 16: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # G3 ⁺⁾

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen	
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region			
Klon 2	IGKV1-39*01, or IGKV1D-39*01	QTI.....STF	GA.....S	CQQSYSTPVTL	91,76%	23	
Klon 4	IGKV1-39*01, or IGKV1D-39*01	XDI.....GSS	AA.....S	CQQTYSTPITF	93,55%	18	
Klon 20	IGKV1-39*01, or IGKV1D-39*01	QSI.....SNY	AA.....S	CQQTYTTPHTF	94,98%	14	
Klon 22	IGKV1-39*01, or IGKV1D-39*01	QSI.....SNY	DA.....S	CQQSFNTPETF	94,98%	14	
Klon 30	IGKV1-39*01, or IGKV1D-39*01	QSI.....SDY	AA.....S	CQQTYTTPWTF	93,55%	18	
Klon 7	IGKV1-5*03	QSL.....DTW	KA.....S	CQQYAGLPTF	95,70%	12	
Klon 15	IGKV1-5*03	QSI.....RTW	EA.....S	CQHYNSDSGTF	93,91%	17	
Klon 17	IGKV1-5*03	QNV.....GSW	KA.....S	CQQYNSYPETF	96,42%	10	
Klon 26	IGKV1-5*03	QGI.....SNW	KA.....S	CQQYTDYYPTF ⁺⁺⁾	96,77%	9	
Klon 21	IGKV1-33*01, or IGKV1D-33*01	QDI.....GNY	DA.....S	CQQYDKLPLTF	89,25%	30	
Klon 18	IGKV1-33*01, or IGKV1D-33*01	QDI.....SNY	DA.....S	CQQYDDLPLTF	98,21%	5	
Klon 16	IGKV2-28*01, or IGKV2D-28*01	QSLH.I.NGYNF	LG.....S	CMQALQTPLTF	96,26%	11	
Klon 31	IGKV2-28*01, or IGKV2D-28*01	QSLH.S.NDYNY	LG.....S	CMQARQTPWTF	96,26%	11	
Klon 34	IGKV2-28*01, or IGKV2D-28*01	QSLH.S.NGYNY	LG.....S	CMQALQTPRTF	98,30%	5	
Klon 36	IGKV2-28*01, or IGKV2D-28*01	QSLY.S.NGYNY	LG.....S	CMEALQTPETF	98,98%	3	
Klon 19	IGKV2-30*01	QSLVY.T.DGNNH	KV.....S	CMQGSHPPTF	97,96%	6	
Klon 6	IGKV2-30*01	QSLVY.S.DGNTL	KV.....S	CMQGTHWPYTF	93,88%	18	
Klon 3	IGKV2D-29*01	QSLH.S.DEKTY	EV.....S	CMQSVQLPLTF	96,26%	11	
Klon 24	IGKV2-24*01	QSLVH.S.DGDTY	KI.....S	CMQGTQFPRTF	94,56%	16	
Klon 27	IGKV1-17*01	QGI.....RND	AA.....S	CLQHNTYPWTF	97,49%	7	
n = 20							
Lambda	Klon 3	I GLV1-47*01	NSNI....GSNY	MN.....N	CAAWDDSLSGPVF	88,56%	31
	Klon 6	I GLV1-47*01, or I GLV1-47*02	SSNI....GTYS	RN.....N	CAAWDDSLSGVVF	95,79%	12
	Klon 12	I GLV1-47*01	SSNI....GGYY	RN.....N	CAAWDDSLSGVVF	97,19%	8
	Klon 4	I GLV9-49*01	NGYS....NYK	VG TG..GIGE	CGADHGIGSEFVVF	96,97%	9
	Klon 11	I GLV9-49*01	SDYS....HYK	MGTG...GTVG	CGTDRGSGGDFVWVF	95,29%	14
	Klon 5	I GLV5-37*01	SDINV...GSYI	HYSD...SDK	CMIWPSNDYVVF	97,06%	9
	Klon 2	I GLV5-45*03	SDINV...GTYR	FKSD...SDK	CMIWHGSAWVF	98,37%	5
	Klon 9	I GLV7-46*01	TGAVT...SDHY	DT.....S	CLITYSGAWIF	96,53%	10
n = 8							

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der gleichen Immunglobulinfamilie und gleichen CDR 2-3 der leichten Immunglobulinkette lambda sind hellblau unterlegt.

⁺⁺⁾ nicht produktive Immunglobulin-Sequenz durch Stoppcodon

Das Analyse-Ergebnis der schweren Kette dieser Probe (Tabelle 17) zeigte eine starke Heterogenität und keine sich durchsetzende Tumorklonsequenz. In diesem Falle wurden nach gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate

3 Ergebnisse

Banden aus unterschiedlichen Immunglobulin-Familien aufgereinigt und jeweils in den pJET-Vektor kloniert.

Es fanden sich bei einem Drittel der sequenzierten Klone Gemeinsamkeiten in der Familienzugehörigkeit sowie in den CDRs 1 und - 2. Die CDR 3 unterschied sich jedoch innerhalb dieser Klonsequenzen und ebenso die Keimbahnsequenz-Homologie.

Die Klone 4, 16 und 20 enthielten des Weiteren Stoppcodone und hatten somit keine produktive Immunglobulin-Sequenz.

Tabelle 17: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # G3 ⁺⁾

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region		
Klon 21	IGHV3-30*03, IGHV3-30*18	GFTF....SSYG	ISYD..GSNK	CAKGGWELVQAEYFWHW	96,53%	10
Klon 2 212	IGHV3-30*03, IGHV3-30*18	GFTF....SSYG	ISYD..GSNK	CAKGGGFSPHRMDVW	99,65%	1
Klon1 214	IGHV3-30*03, IGHV3-30*18	GFTF....SSYG	ISYD..GSNK	CAKGSLSVYPFDYW	99,31%	2
Klon 2 214	IGHV3-30*03, IGHV3-30*18	GFIF....STYG	ISYD..GTNK	CAKDLWGSRDGYHYGADYW	96,88%	9
Klon 16	IGHV3-30-3*01, IGHV3-30-3*02	GFTF....XXYA	ISYD..GSNX	CARDHFSGSYFRGLDYW ⁺⁺⁾	85,76%	41
Klon 4	IGHV3-48*01	GFTF....SSYS	ISSS..SSTI	Stoppcodon ⁺⁺⁾	99,31%	2
Klon 20	IGHV3-48*01	GFTL....SHSS	ISSS..SSTI	CARDVAAPGRFGLW ⁺⁺⁾	95,49%	13
Klon 3 214	IGHV3-64*01	GFTF....SSYA	ISSN..GGST	CARDRYSGYDIYYYYGMDVW	99,31%	2
Klon 3 206	IGHV1-8*01	GYTF....TSYD	MNPN..SGNT	CASGGCSSTSCYWAGYYYYYGMVDVW	98,96%	3
n=9						

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der schweren Immunglobulinkette in Bezug auf Immunglobulinfamilie und CDR 1-2 sind hellblau unterlegt.

⁺⁺⁾ nicht produktive Immunglobulin-Sequenz durch Stoppcodon

Für diese Probe konnte daher anhand der Klonsequenzen nicht auf die zum Tumor gehörige Sequenz geschlossen werden.

3.1.3.8 Analyse der DNA-Sequenzen von Lymphomprobe # G5

Die Analyse der Probe # G5 in Bezug auf die leichte Immunglobulinkette kappa (Tabelle 18) ergab ein vermehrtes Vorkommen der Immunglobulin-Familie KV3 und darunter vor allem der Gruppe 20*01. Übereinstimmungen in den CDRs 1 bis 3, sowie im Mutationsstatus zeigten sich zum einen für die Klone 1 und 7 (92,91% Homologie) (hellblau unterlegt) und auch für die Klone 2 und 16 (96,10% Homologie) (gelb unterlegt) mit einer anderen Aminosäuresequenz. Daher fiel es schwer, einen eindeutigen Tumorklon für diese Kette zu identifizieren.

Für die leichte Immunglobulinkette lambda (Tabelle 18) ergab sich ebenso ein uneindeutiges Bild. Für die Klone 4, 7 und 9 zeigten sich Übereinstimmungen im Bereich der Familie und den CDRs 1 - 3 (hellblau unterlegt). Die Keimbahn-

3 Ergebnisse

sequenz-Homologie variierte jedoch von 79,54% bis 93,19% (arithmetisches Mittel: 87,21%) und die Mutationenanzahl von 19 bis 53 (arithmetisches Mittel: 34,33).

Auf Grund des uneindeutigen Ergebnisses wurden diese beiden Ketten mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR weiter untersucht (s.u.).

Tabelle 18: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # G5 ⁺⁾

Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen	
		CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region			
Klon 1	IGKV3-20*01	QIVS.....SSY	GA.....S	CHQQGDSPYTF	92,91%	20	
Klon 7	IGKV3-20*01	QIVS.....SSY	GA.....S	CHQQGDSPYTF	92,91%	20	
Klon 2	IGKV3-20*01	QSVT.....SKY	GA.....S	CQHYGRSPPTF	96,10%	11	
Klon 16	IGKV3-20*01	QSVT.....SKY	GA.....S	CQHYGRSPPTF	96,10%	11	
Klon 6	IGKV3-11*01	QNIL.....ANC	GA.....Y	CQQYSTTPLTF	91,13%	25	
Klon 12	IGKV3-20*01	QSVS.....NRY	GV.....S	CQQYAMTPLTF	93,62%	18	
Klon 13	IGKV3-20*01	QSVT.....NNY	GT.....S	CQHHGRSVTF	94,33%	16	
Klon 15	IGKV3-20*01	QSVS.....STY	GA.....S	CQQYGSPLTF	97,16%	8	
Klon 9	IGKV3-11*01	QSV.....SSY	DA.....S	CQQRANWPPLAF	97,49%	7	
Klon 8	IGKV3-15*01	QSF.....DSK	DA.....S	CQQYKQRPPTF	92,47%	21	
Klon 4	IGKV3-15*01, IGKV3D-15*01	QSV.....GTN	GA.....V	CQQYNSRPPYTF	87,81%	34	
Klon 11	IGKV1-39*01, IGKV1D-39*01	DYI.....DNH	AA.....T	CQQSYTSPITF	90,68%	26	
Klon 14	IGKV1-39*01, IGKV1D-39*01	QFI.....NNY	SA.....S	CQQSYNTLPYTF	92,47%	21	
n = 13							
Lambda	Klon 4	IGLV3-1*01	KLG.....DKY	QD.....N	CQAWDSSTVVF	79,54%	53
	Klon 7	IGLV3-1*01	KLG.....DKY	QD.....N	CQAWDSSTVVF	93,19%	19
	Klon 9	IGLV3-1*01	KLG.....DKY	QD.....N	CQAWDSSTVVF	88,89%	31
	Klon 2	IGLV1-47*01	SSNV.....GSNY	RN.....N	CATWDDSLNSPVF	94,74%	15
	Klon 3	IGLV1-47*01	SSNI.....GNNY	RN.....N	CATWDDSLSVYVF	97,89%	6
	Klon 5	IGLV1-47*01	SSNI.....GGNF	RD.....N	CAGWDASLNGPIF	91,23%	25
	Klon 6	IGLV1-40*01	SSNIG...AGYD	GN.....N	CQSYDSGLSGVVI	97,22%	8
n = 7							

⁺⁾ Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette kappa einer Immunglobulinfamilien-Untergruppe und gleicher CDR 1-3 sind hellblau unterlegt;
 Klonsequenzen der hellblau unterlegten Immunglobulinfamilie, aber anderer CDR 1-3 sind gelb unterlegt;
 Klonsequenzen der leichten Immunglobulinkette lambda einer Immunglobulinfamilie und gleicher CDR 1-3 sind lila unterlegt.

Die Sequenzen der Klone für die schwere Immunglobulinkette dieser Probe (Tabelle 19) ergaben im Gegensatz zu den Analysen der Probe # 7 und # G3 ein eindeutiges Ergebnis. Sieben der acht sequenzierten Klone (hellblau unterlegt) zeigten sich in der Familienzugehörigkeit und den CDRs 1 - 3 identisch. Von diesen hatten drei Klone zusätzlich noch eine Keimbahn-Homologie von 87,37% und je 36 Mutationen im Bereich der variablen Region.

Insgesamt zeigte sich für diese sieben Klone eine Keimbahn-Homologie arithmetisch gemittelt von 85,72 % (76,84% - 87,37%) und 40,71 Mutationen (36 – 66).

Auf Grund mehrerer Stoppcodone ergab sich für Klon 7 keine produktive Immunglobulin-Sequenz.

Tabelle 19: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # G5 ⁺⁾

	Klon Nr.	Immunglobulin-Familie	Aminosäuresequenzen			Homologie zur Keimbahn	Anzahl der Mutationen
			CDR 1 Region	CDR 2 Region	CDR 3 Region		
schwere Kette	Klon 2	IGHV3-53*01, IGHV3-53*02	GFSV....SNSN	IQSG...HDT	CARGRMGSNDSFDFW	76,84%	66
	Klon 3	IGHV3-53*01	GFSV....SNSN	IQSG...HDT	CARGRMGSNDSFDFW	87,37%	36
	Klon 6	IGHV3-53*01	GFSV....SNSN	IQSG...HDT	CARGRMGSNDSFDFW	87,37%	36
	Klon 10	IGHV3-53*01	GFSV....SNSN	IQSG...HDT	CARGRMGSNDSFDFW	87,37%	36
	Klon 11	IGHV3-53*01	GFSV....SNSN	IQSG...HDT	CARGRMGSNDSFDFW	87,37%	36
	Klon 4	IGHV3-53*01	GFSV....SNSN	IQSG...HDT	CARGRMGSNDSFDFW	87,02%	37
	Klon 1	IGHV3-53*01	GFSV....SNSN	IQSG...HDT	CARGRMGSNDSFDFW	86,67%	38
	Klon 7	IGHV3-22*02, IGHV3-71*01	GFSV....NNSN	Stoppcodon	Stoppcodon ⁺⁺⁾	51,23%	139
n = 8							

⁺⁾ Identische Klonsequenzen der schweren Immunglobulinkette sind hellblau unterlegt.

⁺⁺⁾ nicht produktive Immunglobulin-Sequenz durch Stoppcodon

Insgesamt konnte nach dieser Sequenzanalyse von Sequenzen der schweren Kette des Tumors ausgegangen werden.

3.2 Quantifizierung der Immunglobuline-cDNA der Lymphomgewebeproben

3.2.1 Übersicht

Wie in Kapitel 3.1 gezeigt, ergaben die Klonsequenz-Analysen der beiden leichten Immunglobulinketten-Varianten lambda und kappa bei einigen Gewebeproben kein eindeutiges Ergebnis. Es wurde angenommen, dass die Kopienzahl der cDNA, die für die leichte Lymphom-Immunglobulinkette kodiert, häufiger als die cDNA nicht-Lymphom-klonaler Immunglobuline vorhanden ist. Daher sollte diese Kopienzahl der cDNA für lambda und kappa ermittelt werden. Dazu wurde die Methode der quantitativen real-time PCR verwendet. Vorab wurden in mehreren PCR-Ansätzen die Bedingungen, wie z.B. die Annealingtemperatur, für die PCR optimiert und für die jeweilige Kette eine Standardkurve generiert. Anhand dieser Referenz-Standardkurven konnte im Verlauf die Kopienanzahl der Immunglobulin-cDNA für die Proben # 2, # 4 und # G5 bestimmt werden.

3.2.2 Kopienanzahl-Bestimmung verschiedener Lymphomproben

Die Kopienanzahl-Bestimmung der Leichtkettenimmunglobuline oben genannter Lymphomproben erfolgte gleichzeitig sowohl für kappa als auch für lambda in zwei unterschiedlichen Reaktionsansätzen. Hierdurch sollten eventuelle zeitlich bedingte Unterschiede auf Grund von aufeinanderfolgenden und nicht gleichzei-

tig durchgeführten Reaktionen möglichst gering gehalten werden. Je Probe wurden immer drei unterschiedliche Verdünnungen verwendet.

Nach Vergleich der Messungen mit den jeweiligen Standardkurven konnten daraus die Kopienanzahlen bestimmt werden. Im Folgenden werden die gemittelten Werte der jeweiligen Probe aufgeführt und in Abbildung 3 sind diese in schwarz für lambda und weiß für kappa dargestellt.

Für die Lymphomprobe # 2 ergab sich eine ca. 11-fach höhere Kopienanzahl für die leichte Kette kappa (kappa: $5,83 \times 10^3$ Kopien/ng; lambda: $4,85 \times 10^2$ Kopien/ng).

Die Kopienanzahl-Bestimmung für die Probe # 4 zeigte eine höhere Anzahl von Kopien der leichten Kette lambda (kappa: $6,72 \times 10^3$ Kopien/ng; lambda: $2,3 \times 10^4$ Kopien/ng). Der Unterschied zwischen diesen beiden Proben betrug allerdings weniger als eine Zehnerpotenz. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für die Probe # G5, bei der die lambda-Kette das etwa zwölffache der kappa-Kette an Kopien aufwies (kappa: $4,12 \times 10^3$ Kopien/ng; lambda: $5,09 \times 10^4$ Kopien/ng).

Als Positivkontrolle diente eine Probe, welche aus einer definierten Kopienanzahl des lambda-pBUDopti human-Vektors als auch des kappa-pBUDopti human-Vektors bestand und beiden Reaktionsansätzen zugefügt wurde. Das Mischungsverhältnis von lambda zu kappa betrug 10:1. Dieses Verhältnis sollte sich im Idealfall bei Bestimmung der Kopienanzahl bestätigen.

Nach erfolgreicher Reaktion, zeigte sich nach Berechnung des arithmetischen Mittelwertes der Kopienanzahl für die Positivkontrolle ein Verhältnis für lambda zu kappa von etwa 7:1 (kappa: $8,28 \times 10^4$ Kopien/ng; lambda: $5,42 \times 10^5$ Kopien/ng).

Die als Negativkontrolle angesetzte Probe ohne Template zeigte bei jedem Reaktionsansatz keinerlei relevante Reaktionskurven.

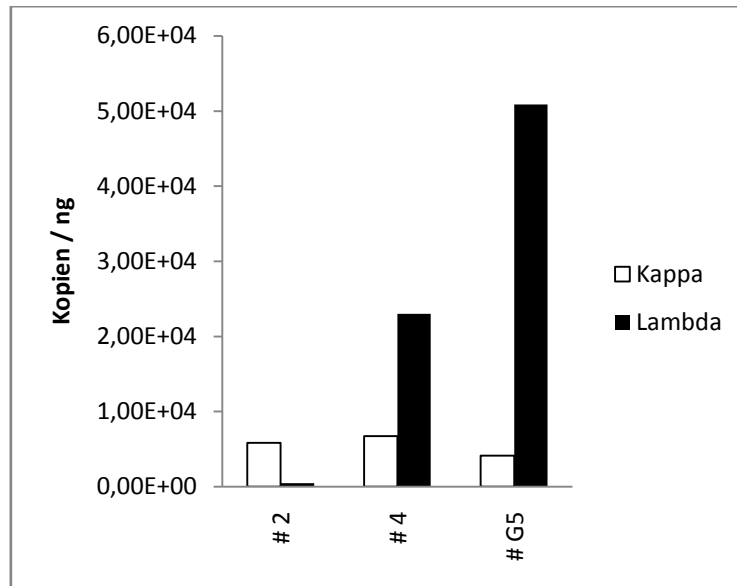


Abbildung 3: Kopienanzahl-Vergleich der leichten Immunglobulinketten von Lymphomprobe # 2, # 4 und # G5 nach quantitativer Real-Time-PCR. Die Kopienanzahl je ng ist für die leichte Immunglobulinkette kappa als weißer Balken und für die leichte Immunglobulinkette lambda als schwarzer Balken dargestellt.

3.3 Produktion von ausgewählten Antikörpern

3.3.1 Übersicht

Nach erfolgreicher Analyse der Klonsequenzen konnte für die Proben # 2, # 4 und # 5 die leichte und schwere Immunglobulinketten-cDNA des ausgewählten Klons in den dafür vorgesehenen Vektor pBUDopti human kappa kloniert werden. Die Klonierung für die leichte und schwere Immunglobulinketten-cDNA für Probe # 8 erfolgte in den Vektor pBUDopti human lambda.

Um das passgenaue Einfügen der cDNA an den richtigen Stellen im Vektor gewährleisten zu können, wurde die cDNA vor Klonierungsbeginn mit Schnittstellen versehen (Kapitel 2.2.1.5).

3.3.2 Klonierung

Die Klonierung der ausgewählten Klone in den Vektor erfolgte nach der oben genannten PCR-Variante mit anschließendem Restriktionsverdau, Ligation von Insert und Plasmid und Kontrolle der Insertsequenz.

Für die Klonierung der Lymphomprobe # 5 wurde Klon 19 der schweren Immunglobulinkette und Klon 9 der leichten Immunglobulinkette kappa verwendet.

Für Lymphomprobe #4 wurde die Sequenz von Klon 2 der schweren Immunglobulinkette und Klon 6 der leichten Immunglobulinkette kappa für die Produktion des Antikörpers benutzt. Für Lymphomprobe # 2 wurde Klon 2 206 für die schwere Immunglobulinkette und Klon 1 für die leichte Immunglobulinkette kappa verwendet. Bei der Lymphomprobe # 8 ergab sich die Verwendung von Klon 1 der leichten Immunglobulinkette lambda und Klon 1 der schweren Immunglobulinkette. Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Plasmide in 293 T Zellen transfiziert.

3.3.3 Produktionskontrolle

Um sicher zu gehen, dass nach Transfektion des Plasmids in 293T Zellen das gewünschte Plasmid exprimiert wird, wurde mit Proben aus den Zellkultur-Überständen ein Western Blot zur Färbung der Immunglobuline (Kapitel 2.2.3.2) durchgeführt.

Die Abbildung 4 zeigt das Ergebnis des Western Blots für die Antikörper der Proben # 2, # 4 und # 5. Zu sehen ist je eine Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 26 kDa für die leichte Immunglobulinkette und eine deutliche Bande bei etwa 55 kDa für die schwere Immunglobulinkette je Probe. Banden im Bereich dazwischen sind unspezifisch detektierte Produkte. Der Western Blot für den Antikörper der Lymphomprobe # 8 ist hier nicht dargestellt. Er verlief ebenso erfolgreich und zeigte ein positives Ergebnis.

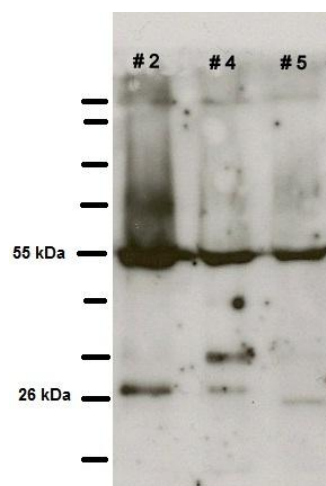


Abbildung 4: Westernblot - Detektion der rekombinanten leichten und schweren Immunglobulinkette der Proben # 2, # 4 und # 5.

Die schwere Immunglobulinkette je Probe hat ein Molekulargewicht von 55 kDa und die leichte Immunglobulinkette von etwa 26 kDa.

Die erfolgreiche Aufreinigung der Immunglobuline aus dem Zellüberstand mittels Protein A wurde mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung verifiziert (Daten nicht gezeigt).

3.4 Phagenpeptidbanken-Selektionen auf rekombinanten Lymphom-B-Zell-Rezeptoren

3.4.1 Übersicht

Zur Identifikation möglicher Peptide, die an die Epitope der hergestellten B-Zell-Rezeptoren binden, wurden drei verschiedene Phagenpeptidbanken verwendet. Diese unterschieden sich, wie in ihrem Namen kenntlich gemacht, anhand der Anzahl der randomisierten Aminosäuren, die sie an ihrer Oberfläche präsentieren. Die Phagen der X₇-Phagenpeptidbank präsentierten randomisierte Peptide, welche aus sieben Aminosäuren bestehen. Bei den Phagenpeptidbanken X₁₂ und X₁₈ waren diese Peptide 12 bzw. 18 Aminosäuren lang. Als Negativkontrolle für die rekombinanten Lymphom-Rezeptoren diente ein polyklonales Immunglobulin G (IgG).

Selektionen mit der X₁₈ und der X₁₂-Phagenpeptidbank wurden auf den Antikörpern der Proben # 2, # 4 und # 5 durchgeführt. Mit der Phagenpeptidbank X₇ wurde nur auf dem Antikörper der Probe # 5 selektiert. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.16 und 2.2.1.17 beschrieben. Zur Positivkontrolle des methodischen Vorgehens während der Selektion diente ein rekombinanter B-Zell-Rezeptor einer Burkitt-Lymphom-Zelllinie mit der Bezeichnung CA46, für den bereits im Vorfeld erfolgreich ein Epitop-nachahmendes Peptid isoliert werden konnte.

3.4.2 Selektionen mit der X₁₈- Phagenpeptidbank

Bei den Selektionen mit dieser Phagenpeptidbank wurden in jeder Runde eine Menge von 2×10^9 Phagen, angegeben in transduzierenden Einheiten (TU), eingesetzt.

Für den Lymphom-B-Zell-Rezeptor # 5 wurden abweichend zum Protokoll auf Grund geringer Anreicherung nach der dritten Runde fünf Selektionsrunden durchgeführt (Abbildung 5). Das Output der ersten Runde (1×10^6 Phagen) sank nach der zweiten Selektionsrunde (1×10^4 Phagen) für den rekombinanten B-

Zell-Rezeptor # 5 (schwarz dargestellt). Eine kontinuierliche Steigerung des Outputs fand in der Runde 3 (7×10^4 Phagen) und Runde 4 ($1,8 \times 10^6$ Phagen) statt. Das Output der Runde 5 (7×10^5 Phagen) war etwas geringer als in Runde 4. Für die Negativkontrolle (weiß dargestellt) zeigte sich keine Anreicherung in den Runden zwei und drei. In der Runde 4 ergab sich eine Anreicherung von 4×10^5 Phagen und in Runde fünf eine etwas geringere Anreicherung ($1,8 \times 10^5$ Phagen) für die Negativkontrolle.

Insgesamt zeigte sich nach den Runden zwei bis fünf eine etwa vierfach höhere Menge gebundener Phagen an das Immunglobulin der Lymphomprobe # 5 im Vergleich zur Negativkontrolle IgG.

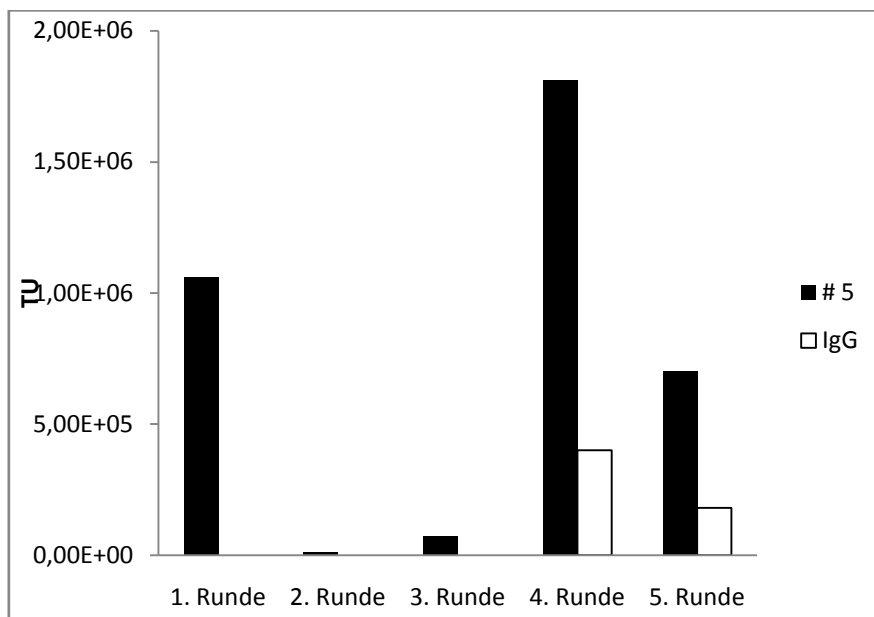


Abbildung 5: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 5 und der Negativkontrolle IgG mit der X₁₈ Phagenpeptidbank. Das Runden-Output ist in transduzierenden Einheiten der Phagen (TU) angegeben. Die schwarzen Balken stellen das Output für den B-Zell-Rezeptor # 5 und die weißen Balken das Output für die Negativkontrolle IgG dar.

Für die Selektion auf dem B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 4 (Abbildung 6, schwarz dargestellt) ergab sich nach der ersten Runde ein Runden-Output von $3,2 \times 10^5$ Phagen. In der folgenden Runde sank das Output auf $2,5 \times 10^5$ Phagen und in der dritten Runde konnte kein, an das rekombinante Immunglobulin bindender Phage nachgewiesen werden. Für die Negativkontrolle (weiß dargestellt) ergaben sich in jeder Runde keine bindenden Phagen. Wiederholungen dieser Selektion zeigten in der Tendenz die gleichen Ergebnisse, so-

dass für diesen Lymphom-B-Zell-Rezeptor mit der Phagenpeptidbank X_{18} keine bindenden Phagen isoliert werden konnten.

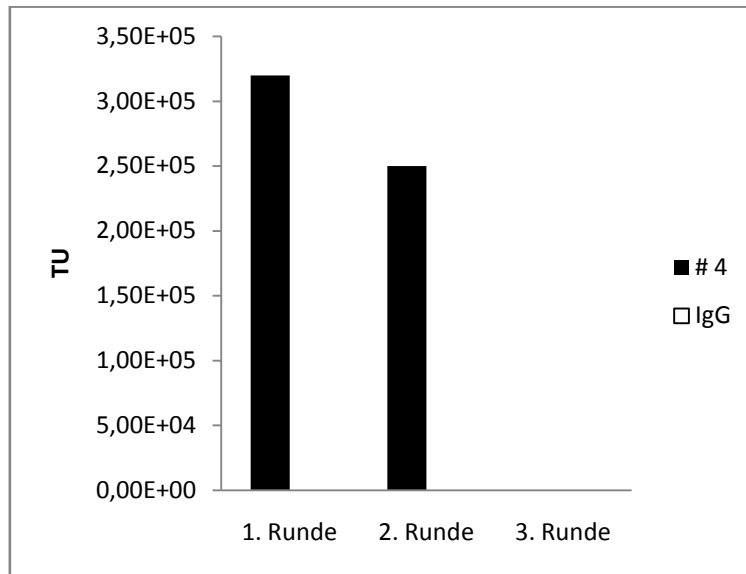


Abbildung 6: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 4 und der Negativkontrolle IgG mit der X_{18} Phagenpeptidbank. Das Runden-Output ist transduzierenden Einheiten der Phagen (TU) angegeben. Die schwarzen Balken stellen das Output für den B-Zell-Rezeptor # 4 und die weißen Balken das Output für die Negativkontrolle IgG dar.

Das Runden Output für die Selektion auf dem B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 2 (Abbildung 7, schwarz dargestellt) ergab $1,9 \times 10^5$ Phagen. Nach der zweiten Runde wurde jedoch eine höhere Menge an Phagen in der Negativkontrolle (5×10^4 Phagen, weiß dargestellt) im Vergleich zum B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 2 (3×10^4 Phagen) bestimmt. Die Selektion wurde nach dieser Runde abgebrochen und mehrmals von Neuem begonnen. Die Ergebnisse ähnelten jedoch stark den schon beschriebenen, sodass mit diesem rekombinanten Immunglobulin keine erfolgreiche Selektion über drei oder mehr Runden durchgeführt werden konnte.

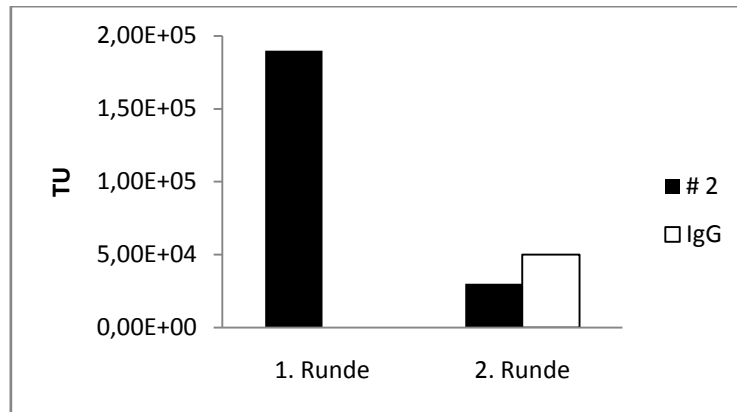


Abbildung 7: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 2 und der Negativkontrolle IgG mit der X₁₈ Phagenpeptidbank. Das Runden-Output ist in transduzierenden Einheiten der Phagen (TU) angegeben. Die schwarzen Balken stellen das Output für den B-Zell-Rezeptor # 2 und die weißen Balken das Output für die Negativkontrolle IgG dar.

Die Ergebnisse der Selektionen auf dem Kontroll-B-Zell-Rezeptor der Burkitt-Lymphom-Probe CA46 (Abbildung 8, schwarz dargestellt) ergaben erfolgreiche Anreicherungen mit der Phagenpeptidbank X₁₈. Beginnend mit einem Output von etwa 6×10^6 Phagen nach der ersten Runde, sank dieser in der folgenden Runde auf 5×10^4 Phagen und stieg nach der dritten Runde auf $2,5 \times 10^6$ Phagen an. Die Negativkontrolle (weiß dargestellt) zeigte hingegen ein Output von 4×10^4 Phagen nach der zweiten Runde und sank nach der dritten Runde auf 1×10^4 Phagen. Es zeigte sich in der zweiten Runde eine etwa 1,3-fach höhere Anreicherung für den rekombinanten B-Zell-Rezeptor der Burkitt-Lymphomprobe CA46 und in der dritten Runde eine 250-fach höhere Anreicherung im Vergleich zur Negativkontrolle.

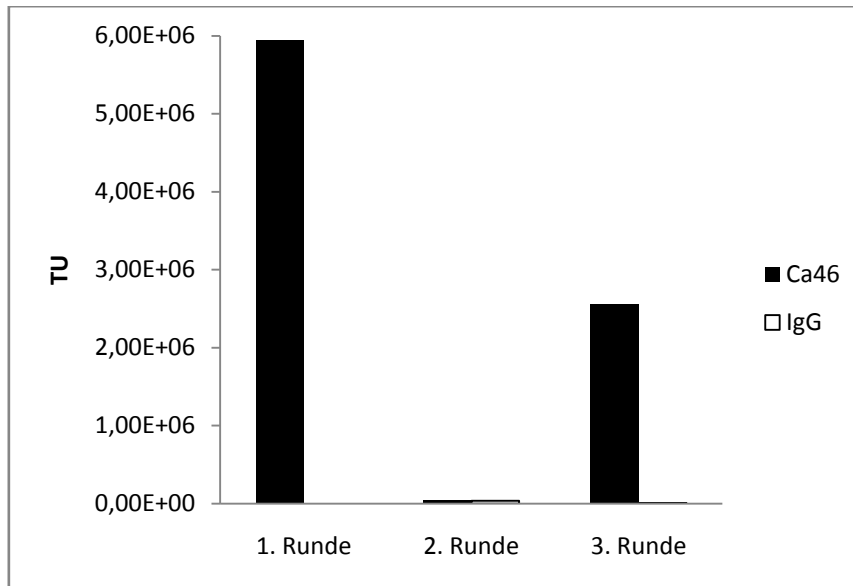


Abbildung 8: Kontrollselektion auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor der Burkitt-Lymphomprobe CA46 und der Negativkontrolle IgG mit der X₁₈ Phagenpeptidbank.

Das Runden-Output ist in transduzierenden Einheiten der Phagen (TU) angegeben. Die schwarzen Balken stellen das Output für den B-Zell-Rezeptor CA46 und die weißen Balken das Output für die Negativkontrolle IgG dar.

3.4.3 Selektionen mit X₁₂- Phagenpeptidbank

Die Selektionen mit der X₁₂- Phagenpeptidbank wurden mit dem Einsatz von 4×10^{10} Phagen je Runde durchgeführt.

Die Selektion auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 5 (Abbildung 9, schwarz dargestellt) ergab eine anfängliche Anreicherung von 9×10^5 Phagen in der ersten Runde. Dieser Output sank in der zweiten Runde auf 1×10^4 Phagen. Für die Negativkontrolle (weiß dargestellt) ergab sich kein bindender Phage in der zweiten Runde. In der dritten Runde stieg der Output des B-Zell-Rezeptors # 5 wieder auf $3,3 \times 10^6$ Phagen, allerdings stieg er ebenfalls bei der Negativkontrolle ($2,7 \times 10^6$ Phagen). Eine eindeutige höhere Anreicherung auf dem Lymphom-B-Zell-Rezeptor im Vergleich zur Negativkontrolle ergab sich nicht, sodass die dritte Runde erneut wiederholt wurde. Dieses Mal zeigte sich ein höherer Output bei der Selektion auf der Negativkontrolle ($1,2 \times 10^6$ Phagen) im Vergleich zum B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 5 ($6,9 \times 10^5$ Phagen). Erneute Selektionen mit dieser Phagenpeptidbank brachten unveränderte Ergebnisse.

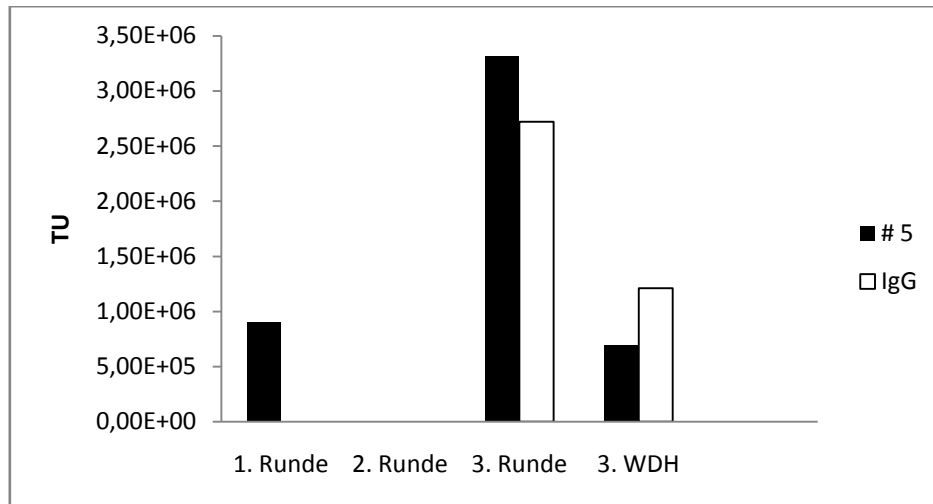


Abbildung 9: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 5 und der Negativkontrolle IgG mit der X₁₂ Phagenpeptidbank. Das Runden-Output ist in transduzierenden Einheiten der Phagen (TU) angegeben. Die schwarzen Balken stellen das Output für den B-Zell-Rezeptor # 5 und die weißen Balken das Output für die Negativkontrolle IgG dar.

Als Ergebnis der Selektion auf dem B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 4 (Abbildung 10, schwarz dargestellt) zeigte sich ein Output der erste Runde mit $5,2 \times 10^6$ Phagen. Das Output der Runde zwei ergab $5,8 \times 10^5$ Phagen und für die Negativkontrolle $3,8 \times 10^5$ Phagen (weiß dargestellt). Somit konnte keine eindeutige Anreicherung auf dem rekombinanten Immunglobulin im Vergleich zur Negativkontrolle nach der zweiten Runde gezeigt werden. Eine erneute Selektion auf diesem Lymphom-B-Zell-Rezeptor zeigte ähnliche Ergebnisse, die ebenfalls nicht über die zweite Selektionsrunde hinaus fortgeführt werden konnten.

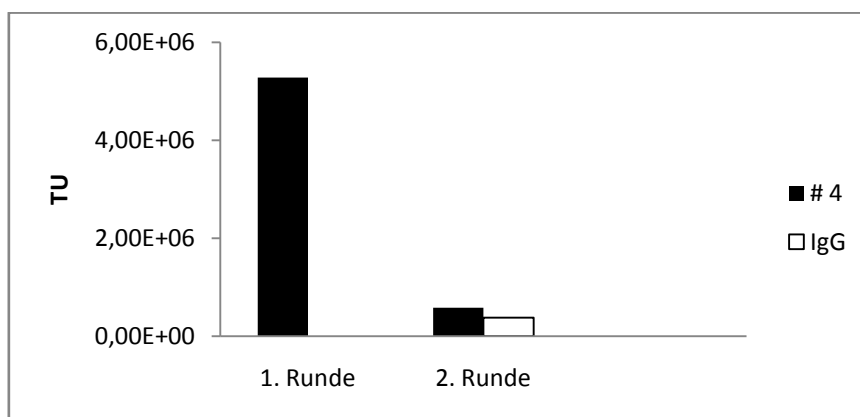


Abbildung 10: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 4 und der Negativkontrolle IgG mit der X₁₂ Phagenpeptidbank. Das Runden-Output ist in transduzierenden Einheiten der Phagen (TU) angegeben. Die schwarzen Balken stellen das Output für den B-Zell-Rezeptor # 4 und die weißen Balken das Output für die Negativkontrolle IgG dar.

Für die Selektion auf dem B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 2 (Abbildung 11, schwarz dargestellt) zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Selektion auf dem Lymphom-B-Zell-Rezeptor # 4. Nach einem Output der ersten Runde mit 4×10^6 Phagen, zeigte sich in der zweiten Runde keine deutliche Anreicherung. Das Output für den rekombinanten B-Zell-Rezeptor betrug $9,3 \times 10^5$ und nur etwas weniger für die Negativkontrolle ($8,3 \times 10^5$ Phagen, weiß dargestellt). Die Wiederholungen dieser Selektion zeigten ähnliche Ergebnisse.

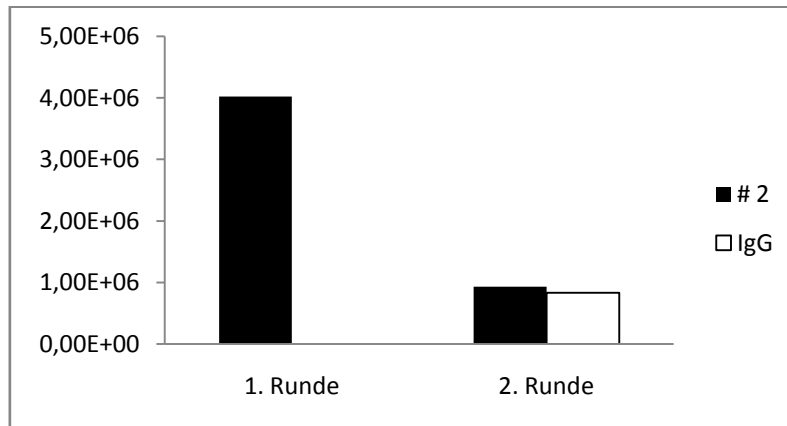


Abbildung 11: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 2 und der Negativkontrolle IgG mit der X₁₂ Phagenpeptidbank. Das Runden-Output ist in transduzierenden Einheiten der Phagen (TU) angegeben. Die schwarzen Balken stellen das Output für den B-Zell-Rezeptor # 2 und die weißen Balken das Output für die Negativkontrolle IgG dar.

3.4.4 Selektionen mit der X₇- Phagenpeptidbank

Identisch zur Selektion mit der X₁₈- Phagenpeptidbank wurden hier ebenfalls je Runde 2×10^9 Phagen eingesetzt.

Nach vier Selektionsrunden auf dem B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 5 (Abbildung 12, schwarz dargestellt) sowie der Negativkontrolle IgG (weiß dargestellt) ergab sich eine höhere Menge bindender Phagen für den B-Zell-Rezeptor als für die Negativkontrolle. Nach der zweiten Runde hatten $1,2 \times 10^5$ Phagen an das rekombinante Immunglobulin und 3×10^4 Phagen an die Negativkontrolle gebunden. In der folgenden Runde betrug das Output $2,1 \times 10^5$ Phagen für den Lymphom-B-Zell-Rezeptor und 9×10^4 Phagen für die Negativkontrolle. Die Anreicherung in der zweiten Runde betrug für den B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 5 etwa das Vierfache und in der dritten Runde nur noch das 2,5 fache im Vergleich zur Negativkontrolle, sodass die dritte Runde noch

einmal wiederholt wurde. Das Ergebnis zeigte daraufhin eine Anreicherung um das Vierfache (B-Zell-Rezeptor # 5: $1,6 \times 10^5$ Phagen und Negativkontrolle: 4×10^4 Phagen).

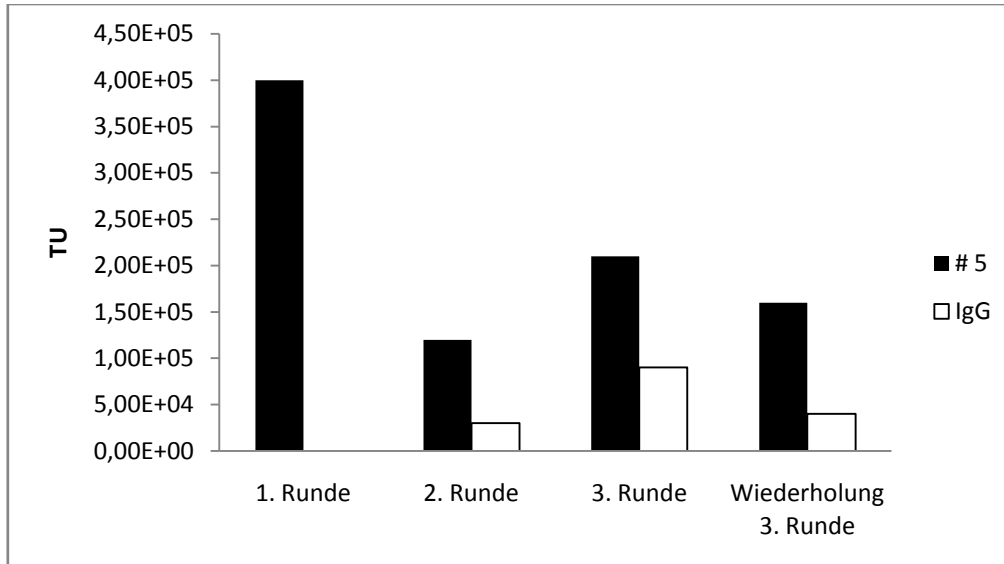


Abbildung 12: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 5 und der Negativkontrolle IgG mit der X₇ Phagenpeptidbank. Das Runden-Output ist in transduzierenden Einheiten der Phagen (TU) angegeben. Die schwarzen Balken stellen das Output für den B-Zell-Rezeptor # 5 und die weißen Balken das Output für die Negativkontrolle IgG dar.

3.4.5 Bindungseigenschaften der selektierten Phagenklone

Nach erfolgreicher Selektion galt es zu überprüfen, ob die selektierten Phagen auch spezifisch an den Lymphom-B-Zell-Rezeptor, auf dem sie selektiert wurden, binden. Hierzu wurden Einzelklone präpariert und diese dann in einem ELISA auf ihre Bindung zum B-Zell-Rezeptor im Vergleich zum polyklonalen Immunglobulin G (IgG) getestet (Abbildung 13).

Aus der dritten Selektionsrunde auf dem B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 5 mit der X₁₈- Phagenpeptidbank wurden 10 Einzelklone präpariert und auf ihre Bindung getestet. Der fd-Tet Phagenklon ohne Peptidinsert sollte hierbei als Phagennegativkontrolle nur sehr gering und unspezifisch an den B-Zell-Rezeptor, als auch an das IgG binden.

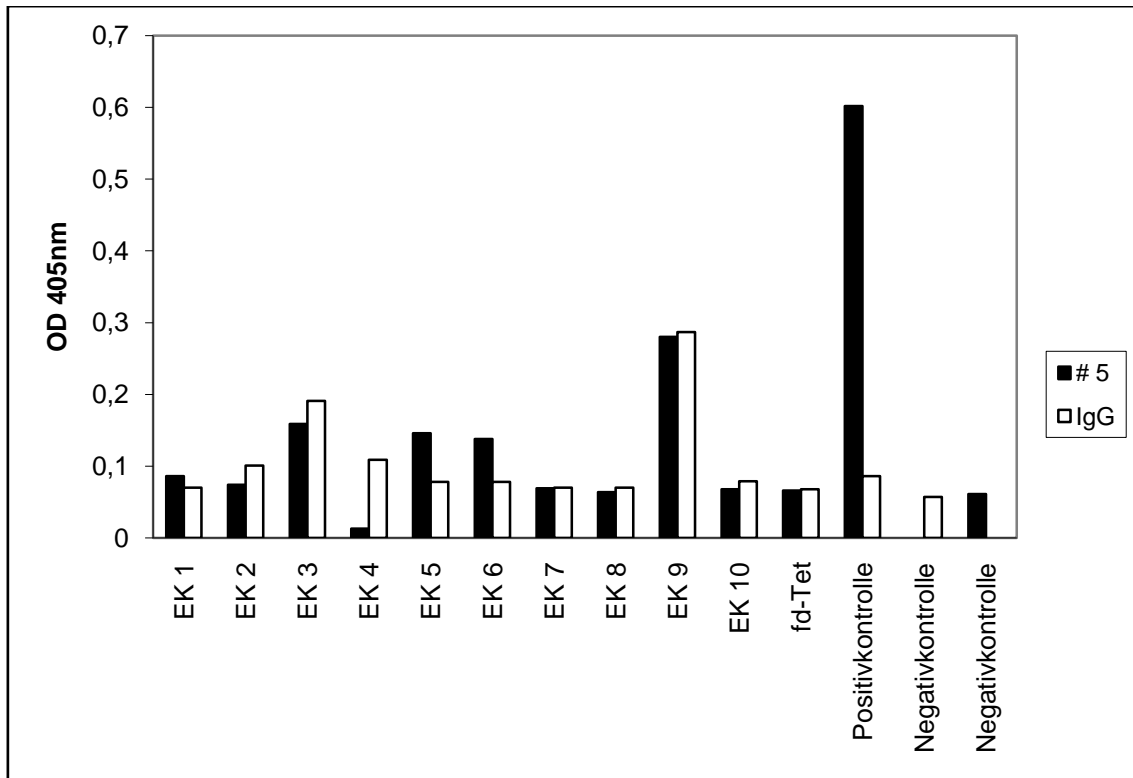


Abbildung 13: ELISA-Test zur Bindungseigenschaft von Einzelklonen auf Lymphom-B-Zell-Rezeptor # 5 und Negativkontrolle IgG.

Die Messung erfolgte anhand der optischen Dichte (Extinktion) bei 405nm; EK 1- 10 bezeichnet die Einzelklone 1 – 10, sowie eine Positivkontrolle (CA46 Einzelklon gemessen auf CA46-B-Zell-Rezeptor und Kontroll-IgG) und zwei Negativkontrollen (Einzelklon EK2 gemessen auf dem B-Zell-Rezeptor # 5 und Kontroll-IgG ohne Detektionsantikörper M13).

Es zeigten sich höhere Messwerte für die Einzelklone EK 1, EK 5 und EK 6 auf dem Lymphom-B-Zell-Rezeptor im Vergleich zum Kontroll-IgG. Diese Unterschiede waren jedoch geringfügig. Ebenso zeigten sich höhere Messwerte für das Kontroll-IgG für die Einzelklone EK 2, EK 3, EK 8, EK 9 und EK 10 im Vergleich zum B-Zell-Rezeptor # 5, die jedoch auch nur gering waren. Für den Einzelklon EK 4 zeigte sich allerdings eine deutlich höhere gemessene Bindung auf der Negativkontrolle IgG als für den Lymphom-B-Zell-Rezeptor. Der fd-Tet Phage zeigte sowohl für den B-Zell-Rezeptor, als auch für das Kontroll-IgG die gleiche optische Dichte an. Die Positivkontrolle, zur Überprüfung einer funktionierenden Messung, fiel positiv und die beiden Negativkontrollen ebenso negativ aus. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um einen vorab isolierten und spezifisch auf dem Burkitt-Lymphom-B-Zell-Rezeptor CA46 bindenden Phagenpeptidklon, der hier sowohl auf dem Kontroll-IgG als auch auf dem Burkitt-

3 Ergebnisse

Lymphom-B-Zell-Rezeptor CA46 getestet wurde. Als Negativkontrolle wurde der Einzelklon EK 2 auf dem B-Zell-Rezeptor # 5 und Kontroll-IgG je ohne Detektionsantikörper M13 getestet.

Insgesamt ergab diese Versuchsauswertung keinen spezifisch an den Antikörper bindenden Phagen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass auf den rekombinanten B-Zell-Rezeptoren der folliculären Lymphome keine spezifisch bindenden und somit das Epitop imitierenden Phagenpeptidklone isoliert worden waren.

4 Diskussion

4.1 Übersicht

Das folliculäre Lymphom ist mit einem Anteil von etwa 40% aller Non-Hodgkin-Lymphome eines der häufigsten Lymphome in Europa (Noppe et al. 1999). Dennoch sind trotz intensiver Forschung bislang weder eindeutige Risikofaktoren noch Auslöser für die Entstehung des folliculären Lymphoms entdeckt worden. Es wird davon ausgegangen, dass durch Antigenselektion B-Zellen stimuliert und zur Proliferation angeregt werden (Bahler und Levy 1992). Dies entspricht der natürlichen Entwicklung der B-Zelle im Keimzentrum. Weist diese B-Zelle zusätzlich die für das folliculäre Lymphom typische Translokation (t14;18) auf, ist der natürliche Apoptosemechanismus durch die dauerhafte Expression des bcl-2-Proteins außer Kraft gesetzt und die Zelle kann ohne Hindernisse weiter proliferieren.

Dieses Entstehungsmodell des folliculären Lymphoms wirft die Frage auf, ob bestimmte Antigene vorhanden sein müssen, um die maligne Entartung der B-Zelle zu bewirken oder zu begünstigen. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit der B-Zell-Rezeptor von folliculären Lymphomen verschiedener Patientenproben diesbezüglich untersucht werden. Hierzu musste die zum B-Zell-Rezeptor des Lymphoms gehörige DNA-Sequenz der leichten und schweren Immunglobulinkette identifiziert werden. Im Anschluss konnten rekombinante Lymphom-B-Zell-Rezeptoren in 293T-Zellen hergestellt und spezifisch bindende Peptidliganden aus randomisierten Phagenpeptidbanken isoliert werden. Hierdurch sollte ein von den Phagen an der Oberfläche präsentiertes Peptid isoliert werden, welches das Epitop des B-Zell Rezeptors von folliculären Lymphomen imitiert. Mit Hilfe solcher Peptide könnte das Verständnis, wie es zu der Entartung dieser Zellen kommen kann, verbessert und möglicherweise ein neuer Ansatzpunkt in der Therapie des folliculären Lymphoms gefunden werden.

Im Folgenden sollen unter Berücksichtigung der bislang veröffentlichten Literatur die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse betrachtet und diskutiert werden.

4.2 Interpretation der klonalen Diversität in den Lymphomproben

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die leichten und schweren Immunglobulinketten-Sequenzen des malignen Klons einzelner Lymphomproben identifiziert werden. Dabei erfolgte die RNA-Isolierung der verwendeten Lymphomproben aus Lymphknotengewebe. Das Entstehungsmodell des folliculären Lymphoms geht von einer monoklonalen Entwicklung aus. Es wäre denkbar, dass diese Entwicklung zur lymphatischen Neoplasie durch Antigenstimulation einer Zelle begünstigt wird. Diese Zelle bildet dann, möglicherweise stimuliert durch das Antigen, identische maligne Tochterzellen, bis letztendlich die Struktur des Lymphknotengewebes durch diese tumorbildenden Zellen dominiert wird. Da diese Tochterzellen klonal sind, also alle von ein und derselben Zelle abstammen, sollten auch ihre B-Zell-Rezeptoren und vor allem die CDR 3 identisch sein. Entsprechend wäre auch eine einheitliche Verwendung der leichten Immunglobulinkette kappa oder lambda innerhalb einer Lymphomprobe zu erwarten. Somit sollten sich nach der Klonsequenzenanalyse der jeweiligen verwendeten Gewebeprobe eine eindeutige Dominanz der leichten Immunglobulinkette (kappa oder lambda) sowie eine eindeutige Sequenz des malignen Klons der schweren Immunglobulin-Kette herausstellen.

Die Analysen der Klonsequenzen in dieser Arbeit ergaben mehrere unterschiedliche und überraschende Ergebnisse. So zeigten einige Lymphomproben eine Dominanz einer Klonsequenz und andere Lymphomproben ein heterogenes Geschehen mit ganz unterschiedlichen Klonsequenzen. Es ergaben sich aber auch vereinzelte nicht dominante Klonsequenzen anderer Immunglobulin-Familien innerhalb einer Lymphomgewebeprobe. Bei den letztgenannten Klonsequenzen handelt es sich vermutlich um Sequenzen vereinzelter nicht maligner B-Zellen, die sich in der Gewebeprobe befunden haben (Bahler et al. 1991). Die oben beschriebenen Ergebnisse sollen im Folgenden näher erläutert und diskutiert werden.

4.2.1 Die Rolle der intraklonalen Variation der analysierten Klonsequenzen in den Lymphomproben

Für einige der untersuchten Lymphomproben konnte eine eindeutige Dominanz einer Klonsequenz für die leichte und schwere Immunglobulinkette festgestellt werden. So ergab sich für die Lymphomprobe # 2 eine eindeutige Dominanz von Klonsequenzen im Bereich der leichten Immunglobulinkette kappa gegenüber der leichten Immunglobulinkette lambda. Die Klonsequenzen waren sowohl in ihren CDRs als auch in ihrem Mutationsstatus homolog. Dieses Ergebnis entspricht am ehesten dem unter 4.2 beschriebenen Entstehungsmodell eines folliculären Lymphoms und wäre für die weiteren untersuchten Lymphomproben ebenfalls zu erwarten gewesen. Für die Klonsequenzen der schweren Immunglobulinketten der Lymphomproben # 4, # 5, # 8 und # G5 ergaben sich Klonsequenzen, die die identische Immunglobulin-Familie inklusive Untergruppe besitzen und auch überwiegend in CDR 1 – 3 übereinstimmen, jedoch Unterschiede in ihrem Mutationsstatus aufweisen. Diese Klonsequenzen dürften letztlich vom selben Mutterklon abstammen.

Diese beschriebenen Abweichungen innerhalb des Mutationsstatus und auch in geringen Abweichungen in den CDR-Sequenzen werden als intraklonale Variation bezeichnet. Diese intraklonalen Variationen entstehen nach Noppe et al. (1999) durch fortlaufende Mutationen. Aufgrund dieser Möglichkeit der fortlaufenden Mutationen entsteht letztendlich eine heterogene Gruppe von Klonen, die sich in wenigen Basen unterscheiden. Aus dieser heterogenen Gruppe kann sich dann durch weitere Mutationen der dominante Klon entwickeln (Bahler und Levy 1992; Zhu et al. 1994). Es handelt sich um eine spezifische Eigenschaft von folliculären Lymphomen, fortlaufend zu mutieren und dadurch dieses Bild entstehen zu lassen (Levy et al. 1988).

Diese somatischen Mutationen finden vor allem in den Gensequenzen der variablen Regionen der Immunglobuline statt (Levy et al. 1988; Lebecque und Gearhart 1990). Dies betrifft vor allem die CDRs, die für die Antigenbindungsstruktur entscheidend sind und eine hohe Affinität des Immunglobulinrezeptors zum Antigen ermöglichen. Stamatopoulos et al. (1997) sowie Adam et al. (2007) beschreiben, dass vor allem Replacement-Mutationen (Austausch einer

Base bewirkt die Codierung einer anderen Aminosäure) in den CDRs und Silentmutationen (Austausch einer Base hat keine Auswirkung auf die Aminosäurecodierung) in den framework regions (FWRs) vorkommen.

4.2.2 Mögliche Bedeutung der Heterogenität innerhalb der analysierten Klonsequenzen in den Lymphomproben

Neben den oben beschriebenen Ergebnissen ergaben sich überraschenderweise auch Klonsequenzen, bei denen für eine Immunglobulinkette kein oder deutlich schwerer ein eindeutig dominanter Klon zugeordnet werden konnte.

So zeigte sich für die leichten Immunglobulinketten kappa der Lymphomgewebeproben # 4 und # 5, für die leichten Immunglobulinketten lambda der Lymphomgewebeproben # 8 und # G5 sowie für die schwere Immunglobulinkette μ der Lymphomgewebeprobe # 2 neben dem Bild der schon beschriebenen intraklonalen Variation innerhalb einer Immunglobulinkette auch ein großer Teil an Klonsequenzen komplett anderer Immunglobulinfamilien. Durch den Anteil der identischen bzw. durch die intraklonale Variation minimal variierten Klonsequenzen war zwar eine Identifikation der Tumorsequenzen möglich, dennoch deutlich schwerer als für die unter 4.2.1 beschriebenen Immunglobulinkettensequenzen.

Ein weiteres überraschendes Ergebnis zeigte sich für die Lymphomproben # 7, # 11 und # G3. Sowohl für die schwere als auch die leichten Immunglobulinketten zeigen sich ein sehr starkes heterogenes Bild mit sowohl unterschiedlichen Immunglobulinfamilien, also auch Untergruppen mit unterschiedlichen Klonsequenzen in den CDR 1 bis 3. Bei diesen Proben war eine Identifikation der Tumorsequenzen nicht möglich.

In der Annahme, dass es sich beim follikulären Lymphom um eine monoklonale Erkrankung handelt, sollte eigentlich eine eindeutige Dominanz eines Klons für eine der leichten Immunglobulinketten sowie für die schwere Immunglobulinkette zu identifizieren sein. Des Weiteren zeigt sich bei Lymphomen normalerweise ein kompletter Befall des Lymphknotens mit Tumorzellen. Daraus ergibt sich, dass nicht maligne B-Zellen nur vereinzelt noch vorhanden sein sollten und der überwiegende Teil des Gewebes aus malignen Tumorzellen besteht. Daher ist es überraschend, dass Klonsequenzen von verschiedenen Immunglobulinfami-

lien für eine Kette so zahlreich vertreten sind, wenn eigentlich eine monoklonale Neoplasie das gesamte Gewebe durchsetzt haben sollte und nur diese Klonsequenzen zu finden sein sollten.

Es stellt sich die Frage, ob das Wachstum von follikulären Lymphomen im gewissen Maße zwar verdrängend ist, jedoch auch die Möglichkeit zulässt, dass andere nicht maligne B-Zellen in diesem Lymphknoten überleben können. So wäre es denkbar, dass die nicht malignen B-Zellen möglicherweise eine Art „Symbiose“ mit dem malignen Tumor eingehen können und vielleicht selbst auch durch diese „Symbiose“ die Möglichkeit zur Proliferation erhalten. Dies würde zumindest erklären, warum unterschiedliche Immunglobulinsequenzen unterschiedlicher Familien in einer Lymphomgewebeprobe in größerer Menge vorhanden sind. Möglicherweise sind auch andere Zellen oder weitere Antigene an dieser Entwicklung beteiligt, die dieses Zusammenspiel zwischen malignen und nicht malignen Zellen unterstützen.

Des Weiteren ergibt sich die Frage, welche Komponenten vorhanden sein müssen, damit es entweder zu der Entwicklung eines Lymphoms mit einem eindeutigen dominanten Klon für die jeweilige Immunglobulinkette kommt oder sich eher ein heterogenes Geschehen ohne bzw. mit weniger eindeutiger Dominanz entwickelt. Denn bei den hier untersuchten Lymphomproben handelte es sich überwiegend um follikuläre Lymphome niedrigen Grades (Grad I). Es könnte daher angenommen werden, dass dem Lymphom mit niedrigem Grad gewisse Entwicklungsstufen zu einem dominanten Tumorklon fehlen und dass bei Grad II oder Grad III zunehmend deutlicher dominante Immunglobulinsequenzen gefunden werden können. Widersprüchlich dazu ist jedoch die Tatsache, dass es sich bei der Lymphomgewebeprobe # 11 um ein follikuläres Lymphom Grad III handelt und für dieses Probe die oben beschriebene Heterogenität ohne dominanten Klonsequenz sehr deutlich gezeigt hatte. Auch der Vergleich der untersuchten Lymphomproben niedrigen Grades zeigte als Beispiel für die Lymphomprobe # 4 klare Ergebnisse, hingegen für die Probe # G5 weniger eindeutige.

Des Weiteren scheint es überraschend, dass bei Betrachtung aller untersuchten Lymphomgewebeproben für die schwere Immunglobulinkette eher einen domi-

nanteren Tumorklon identifiziert werden konnte als für die leichten Immunglobulinketten.

In der veröffentlichten Literatur gibt es zu der entdeckten Heterogenität einzelner Lymphomproben bislang keine veröffentlichten Daten.

Im Falle der Lymphomgewebeproben # 7, # 11 und # G3 ist möglicherweise auch davon auszugehen, dass es sich bei dem verwendeten Gewebestück, aus dem die RNA isoliert wurde, um tumorfreies Gewebe handelte. Dadurch könnte erklärt werden, warum kein dominanter Klon, weder für die leichte noch für die schwere Immunglobulinkette gefunden werden konnte. Methodisch hätte es möglicherweise Vorteile gehabt, *sämtliche* Banden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung in den pJET-Vektor zu klonieren. Dadurch wäre unter Umständen möglich geworden, dass Sequenzen des Tumorklons in schwächeren Banden ebenfalls amplifiziert werden.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Annahme, dass sich bei der Entwicklung des follikulären Lymphoms die Tumorsequenzen der leichten und schweren Immunglobulinketten immer eindeutig zuordnen lassen, nur teilweise bestätigt werden konnte. Vielmehr fanden sich bei den meisten untersuchten Proben unterschiedliche Anzahlen von Mutationen, die im Sinne der intraklonalen Variation zu erklären sind. Diese intraklonale Variation scheint durch den erfolgten Antigenkontakt bedingt zu sein, der es follikulären Lymphomen ermöglicht auch nach diesem Kontakt weitere Mutationen zuzulassen. Dadurch kann der Immunglobulinrezeptor weiter verändert und angepasst werden. Die Antigenselektion scheint daher ein wichtiger Faktor in der Entstehung follikulärer Lymphome zu sein, auch wenn die genaue Rolle dieser Antigene noch weitestgehend unbekannt ist. Des Weiteren scheint bislang ungeklärt, warum einige Lymphomgewebeproben neben der intraklonalen Variation innerhalb der Immunglobulinketten auch einen großen Teil an Klonsequenzen anderer Immunglobulinfamilien aufweisen. Die Heterogenität in diesem Ausmaß vor allem für die leichten Immunglobulinketten ist bei einer monoklonalen Neoplasie, die den kompletten Lymphknoten durchsetzt hat, sehr überraschend und mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht hinreichend erklärbar. Weitere Forschungen in dieser Richtung würden möglicherweise mehr Aufschluss bringen.

4.2.3 Vergleich der Homologien der analysierten Lymphomproben mit der Literatur

Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, sind die fortlaufenden Mutationen und dementsprechend variierende Homologien zur Keimbahn eine spezielle Eigenschaft follikulärer Lymphome. Nach Zhu et al. (1994) sind sowohl die leichte als auch schwere Immunglobulinkette dem somatischen Mutationseigenschaften ausgesetzt. Es sind für das follikuläre Lymphom vor allem Mutationen in den CDRs der schweren Kette beschrieben. Bei der leichten Kette wurden deutlich weniger Mutationen entdeckt (Stamatopoulos et al. 2000).

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse aus dieser Arbeit und der Literatur für follikuläre Lymphome in Bezug auf die Anzahl der Mutationen und der prozentualen Übereinstimmung zur Keimbahnsequenz (Homologien zur Keimbahn) für die leichten und schweren Immunglobulinketten tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 20: Vergleich von Keimbahnhomologie und Mutationsstatus follikulärer Lymphome aus der Literatur mit eigenen Ergebnissen

Literaturquelle ^{+) und Lymphomprobe in dieser Arbeit}	Schwere Immunglobulinkette		Leichte Immunglobulinkette	
	Homologie (Mittelwert)	Anzahl der Mutationen (Mittelwert)	Homologie (Mittelwert)	Anzahl der Mutationen (Mittelwert)
Aarts et al.	92,20%	23	keine Angabe	keine Angabe
Adam et al .	89 - 99,1% *)	25	keine Angabe	keine Angabe
Bahler et al.	91,40%	25	keine Angabe	keine Angabe
Belessi et al.	89%	keine Angabe	96%	keine Angabe
Kosmas et al.	90,70%	27	95,30%	13
Noppe et al.	88%	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe
Radcliff et al.	85,6% - 90,5% *)	keine Angabe	88% - 97% *)	keine Angabe
Stamatopoulos et al.	90,70%	27	95,30%	13
Zelenetz et al.	90,70%	keine Angabe	96%	keine Angabe
Zhu et al.	87,70%	keine Angabe	97,20%	keine Angabe
Lymphomprobe # 2	98,84%	3,33	95,70%	14
Lymphomprobe # 4	92,95%	18	94,56%	16
Lymphomprobe # 5	95,93%	11,6	96,89%	9,14
Lymphomprobe # 8	91,16%	25,44	94,21%	16,5
Lymphomprobe #G5	85,72%	40,71	87,21%	34,33

^{+) (Bahler et al. 1991; Zelenetz et al. 1992; Zhu et al. 1994; Stamatopoulos et al. 1997; Kosmas et al. 1998; Noppe et al. 1999; Aarts et al. 2000; Belessi et al. 2002; Adam et al. 2007; Radcliffe et al. 2007)}

^{*) kein Mittelwert}

Bei Betrachtung der prozentualen Übereinstimmungen zur Keimbahn (Homologie) und dem Mutationsstatus (sofern angegeben) in der Literatur, ergeben sich für die schwere Immunglobulinkette unterschiedliche Ergebnisse. Die Homolo-

gien variieren im Mittelwert von 87,70% (Zhu et al. 1994) bis 99,10% (Adam et al. 2007) sowie von 23 (Aarts et al. 2000) bis 27 Mutationen (Stamatopoulos et al. 1997; Kosmas et al. 1998).

Die Homologien zur Keimbahn der schweren Immunglobulinkette im Rahmen dieser Arbeit ergeben ähnliche Werte. So variieren hier die Homologie-Werte von 85,72% und 40,71 Mutationen (Lymphomprobe # G5) bis 95,93% und 11,6 Mutationen (Lymphomprobe # 5). Die Homologie zur Keimbahn der Klonsequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 2 beträgt hingegen 98,84% und die Anzahl der Mutationen beläuft sich auf 3,33 Mutationen. Es ist in diesem Falle fraglich, ob diese stattgefundenen Mutationen ausreichen, um von einem mutierten Arrangement der variablen Region zu sprechen. Beschrieben ist bei Smilevska et al. (2008) eine Homologie von weniger als 98% zur Keimbahn, um von einer Mutation sprechen zu können.

Im Bezug auf die leichten Immunglobulinketten sind bislang wenige Daten verfügbar und nur für die leichte Immunglobulinkette kappa veröffentlicht. Es zeigt sich, dass Gen-Mutationen in den leichten Ketten geringere Anzeichen der Antigenselektion im Vergleich zu den schweren Ketten aufweisen (Stamatopoulos et al. 1997). Dennoch spielt die leichte Immunglobulinkette nach Ansicht von Smilevska et al. (2008) eine entscheidende Rolle in der Antigenerkennung.

Die Mittelwerte der Homologien zur Keimbahn variieren in der Literatur für die leichte Immunglobulinkette kappa von 95,3% und 13 Mutationen (Stamatopoulos et al. 1997; Kosmas et al. 1998) bis 97,2% (Zhu et al. 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Homologie-Werte für die Proben des folliculären Lymphoms in Bezug auf die leichte Immunglobulinkette kappa variieren von 94,6% und 16 Mutationen (Lymphomprobe # 4) bis 96,9% und 9 Mutationen (Lymphomprobe # 5). Die prozentualen Übereinstimmungen mit der Keimbahn liegen für die Lymphomproben in etwa bei den Werten aus der Literatur und zeigen auch deutlich die geringere Mutationsrate als bei den Immunglobulinsequenzen der schweren Kette. Die Homologie-Werte für die Lymphomproben # 8 und # G5, die die leichte Immunglobulinkette lambda verwenden, variieren von 87,21% bis 94,21% und 16,5 und 34,33 Mutationen. Auf Grund der Er-

gebnisse ist eine geringere Antigenauseinandersetzung der leichten Immunglobulinketten denkbar.

4.2.4 Identifikation der leichten Immunglobulinkette durch Verwendung der quantitativen Real-Time-PCR

Die Identifikation der vom Tumorklon verwendeten leichten Immunglobulinketten-Sequenz gestaltete sich bei einigen Lymphomproben schwierig. Sowohl für die leichte Immunglobulinkette lambda als auch kappa konnten teilweise mehrere identische Klonsequenzen gefunden werden. Für die Klonsequenzen von einer der beiden Immunglobulinketten zeigte sich jedoch keine starke Dominanz. Mit Hilfe der ermittelten Kopienanzahl der cDNA einer Lymphomprobe für die leichte Immunglobulinkette lambda sowie kappa sollte sich eine deutliche Dominanz einer der beiden Immunglobulinketten herausstellen.

Die Ergebnisse für die Lymphomprobe # 2 zeigen eine um etwa eine Zehnerpotenz höhere Kopienanzahl für die leichte Immunglobulinkette kappa als für lambda. Bei den Sequenzanalysen ergibt sich ebenfalls, wie unter 4.2 beschrieben, eine eindeutige Dominanz einer Klonsequenz für die leichte Immunglobulinkette kappa.

Bei der Kopienanzahl-Bestimmung für die Lymphomprobe # 4 zeigt sich eine höhere Kopienanzahl für die leichte Immunglobulinkette lambda. Mittels der PCR basierten Sequenzanalyse ist es für diese Probe nicht möglich, eine Sequenz für die leichte Immunglobulinkette lambda zu identifizieren. Es zeigt sich hingegen eher eine Dominanz eines Tumorklons für die leichte Immunglobulinkette kappa. In der gelelektrophoretischen Auftrennung der familienspezifischen PCR-Produkte für lambda zeigt sich jedoch immer eine Bande mit der erwarteten Größe. Nach erfolgreicher Sequenzierung konnte hier jedoch keine Immunglobulin-Sequenz festgestellt werden.

Daher ist davon auszugehen, dass die Primer der familienspezifischen PCR außer an den DNA-Sequenzen für die leichte Immunglobulinkette möglicherweise auch an anderen Nicht-Immunglobulin-Sequenzen binden und somit unspezifische Produkte entstehen. Gleiches könnte für die eigentlich spezifisch auf die konstante Region der leichten Immunglobulinkette lambda bzw. kappa hergestellten Primer der quantitativen Real-Time-PCR gelten. Dieses würde die

deutlich höhere Kopienanzahl der Lymphomprobe # 4 für die vermeintlich leichte Immunglobulinkette lambda erklären.

Die Sequenzanalysen für die leichte Immunglobulinkette der Lymphomprobe # G5 zeigt keine eindeutige Tendenz für eine der beiden leichten Ketten. Das Ergebnis der quantitativen Real-Time-PCR zeigt eine über eine Zehnerpotenz höhere Kopienzahl für die leichte Immunglobulinkette lambda als für kappa. Für die Antikörperproduktion wurde deshalb die Klonsequenz der leichten Immunglobulinkette lambda verwendet. Dennoch ist zu beachten, dass durch die Ergebnisse für die Lymphomprobe # 4 anscheinend keine hochspezifische Affinität der Primer zu den Sequenzen der konstanten Region der leichten Immunglobulinkette herrscht. Die Verwendung der quantitativen Real-Time-PCR als einzige Methode zur Identifikation der leichten Immunglobulinkettensequenz des Tumorklons scheint hier nicht ausreichend. Sie dient eher dazu, eine Tendenz zu einer der beiden Immunglobulinkettenvarianten aufzuzeigen.

4.2.5 Möglichkeit des Isotyp-Switchs der schweren Immunglobulinkette bei der Lymphomprobe # 11

Bei der Lymphomprobe # 11 handelt es sich, wie aus Tabelle 1 ersichtlich, um das Material eines follikulären Lymphom-Rezidivs. Die schwere Immunglobulinkette μ dieser Probe konnte jedoch nicht identifiziert werden. Da es sich bei dieser Probe um ein Lymphom des Grades III handelt, ist durch die verstärkte Ausbreitung des Tumors innerhalb des Lymphknotens die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, zum Tumor gehörige Immunglobulinsequenzen in der Gewebeprobe zu haben. Daher müsste es theoretisch möglich sein, die schwere Immunglobulinkette dieser Lymphomprobe amplifizieren zu können. Denkbar wäre es, dass es sich bei der konstanten Region dieser schweren Immunglobulinkette nicht um den angenommenen Isotyp μ (IgM), sondern um den Isotyp der schweren Immunglobulinkette γ (IgG) handelt. Diese Annahme beruht auf einer Arbeit von Aarts et al. (2000), die bei ihren Untersuchungen bei einem follikulären Lymphom-Rezidiv den Isotyp IgG anstelle von IgM wie beim Primarius gefunden haben. Dazu müsste während der Entwicklung des Rezidivs ein Isotyp-Switch stattgefunden haben. Weiterführend für die Lymphomprobe # 11 könnte dann durch die Verwendung eines reversen Primers, der in dem konstanten Bereich

der schweren Kette γ annealt, möglicherweise die Sequenz der schweren Immunglobulinkette dieses Rezidivs identifiziert werden. Fraglich wäre in diesem Falle jedoch, welche leichte Kettenform dieser Tumor verwendet. Auch hier ergeben die Analysen der Klonsequenzen leider kein eindeutiges Ergebnis. Somit scheint eine mangelhafte RNA oder ein Probenfehler als Ursache dieser negativen Befunde denkbar.

Die Rezidiventwicklung bleibt trotz der Erkenntnis des möglichen Isotyp-Switchs noch weitestgehend ungeklärt. So beobachteten Aarts et al. (2001) in ihrer Arbeit, dass der dominante Klon des Rezidivs schon bei Erstdiagnose des Lymphoms als Subklon vorhanden war. Auch Adam et al. (2007) untersuchten in Ihrer Arbeit die Immunglobulinsequenzen von Proben bei Erstdiagnose und Rezidiv. Sie stellten fest, dass die Rezidiv-Sequenzen eine höhere Keimbahn-Homologie aufwiesen (94,9% - 97,5%) als der Primärtumor (89,9% - 90,2%). Bei Betrachtung der einzelnen Mutationen zeigt sich, dass der dominante Klon des Rezidivs nicht vom dominanten Klon des Primärtumors abstammen kann und dass fortlaufende Mutationen eine größere Bedeutung für den Primärtumor als für das Rezidiv haben.

4.3 Interpretation der Phagenselektions-Ergebnisse auf ausgewählten Lymphom-B-Zell-Rezeptoren

Im Anschluss an die erfolgreiche Produktion und Aufreinigung der ausgewählten B-Zell-Rezeptoren wurde ein Versuch der Identifikation von Epitop-nachahmenden Peptiden unternommen. Hierzu wurden randomisierte Phagenpeptidbanken verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit drei verschiedenen Phagenpeptidbanken gearbeitet (X_7 , X_{12} und X_{18}).

Es zeigten sich für die B-Zell-Rezeptoren der Lymphomproben # 2, # 4 und # 5 mit den genannten Phagenpeptidbanken keine bzw. nicht ausreichende Anreicherungen in den Selektionsrunden.

Trotz fehlender Anreicherung in den meisten durchgeführten Selektionen zeigten sich für die Kontrolle mit dem Burkitt-Lymphom-B-Zell-Rezeptor CA46 (selektiert mit der X_{18} Phagenpeptidbank) eindeutige Anreicherungen, sodass eine methodische Fehlerquelle weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

Hieraus ergibt sich die Frage, warum auf den beiden B-Zell-Rezeptoren # 2 und # 4 nicht erfolgreich selektiert werden konnte und warum es für den B-Zell-Rezeptor # 5 mit der X_7 und X_{18} Phagenpeptidbank immerhin eine mäßige Anreicherung gegeben hat.

Trotz der Verwendung von randomisierten Phagenpeptidbanken besteht natürlich weiterhin die Möglichkeit, dass das Epitop, welches die B-Zell-Rezeptoren erkennen, nicht vom Phagen nachgeahmt wird. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass die Epitop-bindende Region des Rezeptors zu tief in einer Bindungstasche liegt und von dem randomisierten Phagenpeptid nicht erreicht werden kann. So wäre es möglich, dass längere Peptide, wie sie z.B. bei der X_{18} -Phagenpeptidbank vorkommen, besser gebunden werden. Dies würde erklären, warum für den B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 5 mit der X_{18} Phagenpeptidbank bessere Selektionsergebnisse vorhanden sind als mit der X_{12} Phagenpeptidbank.

4.3.1 Potentieller Einfluss von Glykosilierungsmustern der Lymphomproben auf die Phagenpeptidbanken-Selektionen

Eine weitere mögliche Erklärung der nicht erfolgreichen Selektionen mit den Phagenpeptidbanken auf den folliculären Lymphom-B-Zell-Rezeptoren sind Oligomannose-Glykosilierungen in den Antigen-Bindungsstellen der B-Zell-Rezeptoren. Diese so genannten N-Glykosilierungsstellen, die aus den Aminosäuren Asparagin (N), einer variablen Aminosäure (X) und dann Serin (S) oder Threonin (T) (N-X-S/T) bestehen, beeinflussen möglicherweise die Interaktion mit Antigenen und könnten typisch für folliculäre Lymphome sein (Zhu et al. 2002). Schon Noppe et al. (1999) beschreiben, dass Mutationen in den variablen Regionen eine mögliche Wirkung auf die Antikörperstabilität, die Antikörpersekretion und auch die Glykosilierung haben. Ein möglicher Interaktionspartner der Glykosilierung könnten Mannose-Rezeptoren von Stroma-Zellen im Keimzentrum sein (McCann et al. 2008). Zhu et al. (2002) zeigen, dass in 80% ihrer untersuchten schweren Immunglobulinketten und 59% der leichten Immunglobulinketten kappa von folliculären Lymphomen neue, durch Mutation entstandene Glykosilierungsstellen vorkommen und diese durch die somatischen Muta-

tionen entstehen. Bei Belessi et al. (2002) finden sich in 40% der Fälle diese neuen Glykosilierungssequenzen und bei Radcliffe et al. (2007) finden sich in 79% der Fälle Glykosilierungssequenzen für die schwere Immunglobulinkette.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für drei B-Zell-Rezeptoren ebenfalls diese, durch Mutation entstandenen Glykosilierungsstellen entdeckt werden. So zeigt sich für den B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 2 eine Glykosilierungssequenz (NNS) im Bereich der CDR 3 der leichten Kette kappa, die durch Mutation entstanden ist. Für den B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 4 ergeben sich sogar zwei Glykosilierungssequenzen: Zum einen eine durch Mutation entstandene Sequenz (NHS) im Bereich der CDR 2 der schweren Immunglobulinkette. Zum anderen eine, nicht durch Mutation entstandene Glykosilierungssequenz (NPS) im Bereich der „Framework-region“ FWR 3 der schweren Immunglobulinkette. Für den B-Zell-Rezeptor der Lymphomprobe # 8 zeigt sich ebenfalls eine durch Mutation erworbene Glykosilierungssequenz (NMT) im Bereich der CDR 1/ FWR 2 der schweren Immunglobulinkette.

Zusammenfassend scheinen die Glykosilierungsmuster mögliche Auswirkungen auf die Antikörperbindung zu haben. Durch fortlaufende Mutationen der folliculären Lymphome könnten sich neue Glykosilierungsstellen entwickelt haben, die die Bindungstasche soweit verändert haben, dass das ursprünglich erkannte Antigen nicht mehr erkannt bzw. binden kann. Denkbar wäre auch, dass die Expression der Lymphom-B-Zell-Rezeptoren in 293T-Zellen nicht mehr dem originären Milieu des Lymphoms entspricht und neu entstandene Glykosilierungsstellen in dem Fall nicht zur Interaktion mit dem Antigen sondern zur Blockade der Epitoptasche führen, wodurch eine Antigenbindung nicht möglich wäre. Zur weiteren Untersuchung der Auswirkung von Glykosilierungsstellen auf den B-Zell-Rezeptor wäre eine Expression der Lymphom-B-Zell-Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien denkbar.

4.4 Perspektiven

Die erzielten Ergebnisse im Vergleich zur Literatur konnten zeigen, dass die Antigenselektion beim folliculären Lymphom durchaus an der Entwicklung dieser Neoplasie beteiligt zu sein scheint. So ergaben sich Mutationen im Bereich der variablen Region der untersuchten Immunglobulinketten, die fortlaufend

entstehen können und ein Bild der intraklonalen Variation zeigen. Diese Mutationen scheinen Ergebnisse des Antigenkontaktes des B-Zell-Rezeptors mit einem oder mehreren unbekanntem Antigenen zu sein. Durch die Methode des Phage Displays konnte bislang noch kein spezifisch an den B-Zell-Rezeptor follikulärer Lymphome bindendes Peptid identifiziert werden.

Dennoch ist dies ein weiterhin interessanter und wichtiger Ansatzpunkt für neue Therapieoptionen sowie einem besseren Verständnis dieser Erkrankung.

So wäre neben weiteren und vielleicht auch optimierten Selektionsversuchen mit Phagenpeptidbanken auch die Untersuchung der Glykosilierungsstellen des Immunglobulinrezeptors denkbar. Diese Glykosilierungsstellen entstehen durch Mutationen und blockieren möglicherweise die Antigenbindungstasche des B-Zell-Rezeptors nach erfolgtem Antigenkontakt. Es wäre möglich mit deglykosilierenden Methoden diese Bindungen aufzuheben und erneute Selektionen mit Phagenpeptidbanken durchzuführen.

Als ein weiteres großes Ergebnis dieser Arbeit ergaben sich bei einigen Lymphomgewebeproben nicht nur die bekannten intraklonalen Variationen, sondern innerhalb der Immunglobulinkettensequenzen auch eine deutliche Heterogenität mit Klonsequenzen komplett anderer Immunglobulinfamilien, die so nicht zu erwarten waren. Hierbei handelte es sich überwiegend um die leichten Immunglobulinkettensequenzen, wodurch eine eindeutige Dominanz des Tumorklons der leichten Immunglobulinkette deutlich schwerer zu identifizieren war. Eine Erklärung dieses Phänomens ist bislang in der Literatur noch nicht zu finden. Denkbar wäre, dass nicht maligne-B-Zellen die Möglichkeit erhalten, neben den Tumorzellen weiterhin zu existieren und sogar zu proliferieren. Daher wäre es für weitere Ergebnisse interessant auch in diese Richtung weitere Untersuchungen anzuschließen. So könnten neben der Sequenzanalyse möglicherweise auch histologische Schnitte hilfreich sein, um eventuell das heterogene Bild zu bestätigen.

Des Weiteren könnten für die Methode der quantitativen Real-Time-PCR zur Bestimmung der Kopienanzahl für die leichte Immunglobulinkette kappa bzw. lambda versucht werden, spezifischere Primer zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse zu gestalten. Dadurch wären spezifischere Ergebnisse und mögli-

cherweise nicht nur Tendenzen für die Verwendung der einzelnen Immunglobulin-kette denkbar.

Lassen sich nach Berücksichtigung der oben genannten Punkte Peptide für einzelne B-Zell-Rezeptoren isolieren, so könnte die Sequenz dieser Peptide mit Hilfe von Datenbanken verglichen und ein mögliches Antigen identifiziert werden. Vielleicht würde dieses Antigen dann nicht lediglich von einem, sondern mehreren B-Zell-Rezeptoren follikulärer Lymphome erkannt werden. Die Kenntnis über das erkannte Antigen würde einen weiteren Therapieansatz für das follikuläre Lymphom ermöglichen und das Verständnis, wie es zu dieser malignen Neoplasie kommen kann, verbessern.

5 Zusammenfassung

Das folliculäre Lymphom gilt als das zweithäufigste Non-Hodgkin-Lymphom und ist in vielen Fällen bislang noch eine unheilbare Erkrankung. Vor allem die Rolle der Antigenselektion des B-Zell-Rezeptors scheint einen großen Einfluss auf die Entstehung und Proliferation maligner Lymphome zu haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie heterogen die B-Zell-Rezeptorklonalität im folliculären Lymphom ist und ob sich bestimmte Peptide mittels Phagenpeptidbanken isolieren lassen, die das Epitop des B-Zell-Rezeptors von folliculären Lymphomen imitieren. Basierend auf solchen Peptiden könnte ein neuer, spezifischerer und nebenwirkungsarmer Angriffspunkt in der Therapie dieser Erkrankung geschaffen werden.

Die Bearbeitung gliederte sich in zwei Abschnitte. Zu erst galt es aus Lymphknoten-Gewebeproben folliculärer Lymphome die Immunglobulinsequenz des B-Zell-Rezeptors dieses Tumors zu isolieren und zu identifizieren. Diese Tumorsequenzen wurden in einen geeigneten Vektor kloniert und in 293T-Zellen exprimiert. Um mögliche Epitop-nachahmende Peptide zu isolieren, wurde mit drei randomisierten Phagenpeptidbanken auf den hergestellten rekombinanten B-Zell-Rezeptoren selektiert.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse zeigten hohe Mutationsraten der identifizierten B-Zell-Rezeptor-Klone v.a. für die schwere Immunglobulinkette. Diese hohen Mutationsraten sind als Zeichen der Antigenauseinandersetzung zu werten und auch so in der Literatur beschrieben. Die leichte Immunglobulinkette des folliculären Lymphoms scheint hiervon geringer beeinflusst zu sein. Des Weiteren konnte eine hohe intraklonale Variation einzelner Immunglobulinketten nachgewiesen werden. Dies resultiert am ehesten aus der Möglichkeit der fortlaufenden Mutationen, die für das folliculäre Lymphom charakteristisch sind. Neben dieser intraklonalen Variation wiesen einige Lymphomproben überraschenderweise innerhalb einer Immunglobulinkette ein eher heterogenes Geschehen mit Klonsequenz anderer Immunglobulinfamilien auf. Auch in der Literatur sind keine Angaben oder Erklärungen dazu zu finden. Daher ist momentan noch fraglich, warum neben einer monoklonalen Neoplasie, die den gesamten Lymphknoten befällt, noch so eine große Menge andere nicht-maligner-B-Zellen

existieren können und dieses auch nicht auf alle untersuchten Lymphomgewebeproben zutrifft.

Die Selektionen mit den drei ausgewählten Phagenpeptidbanken erbrachten kein spezifisch an den B-Zell-Rezeptor bindendes Epitop-nachahmendes Peptid. Neben der Möglichkeit, dass das gesuchte Epitop nicht von den Peptiden der Phagen nachgeahmt wird, wäre das Vorhandensein von Glykosilierungsstellen, die möglicherweise eine Bindung durch Epitop-Mimics der Phagenpeptidbanken an die Antigen-Bindungstasche des B-Zell-Rezeptors verhindern, als Grund der negativen Selektionsergebnisse denkbar. In einigen Sequenzen der rekombinanten B-Zell-Rezeptoren lies sich das durch Mutation neu entstandene Motiv der N-Glykosilierung nachweisen.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf Grund des Mutationsstatus der untersuchten Immunglobulinkettensequenzen und der daraus resultierenden intraklonalen Variationen ein Antigenkontakt mit dem B-Zell-Rezeptor follikulärer Lymphome einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung dieser Neoplasie zu haben scheint. Neben dem Antigenkontakt scheinen aber auch noch weitere, bislang unklare Komponenten einen Einfluss auf die Entwicklung des follikulären Lymphoms zu haben. Dadurch scheint es möglich zu sein, dass neben malignen B-Zellen auch nicht-maligne B-Zellen in größerem Ausmaß existieren und auch proliferieren können. Dies wird durch das beschriebene heterogene Bild innerhalb der Immunglobulinkettensequenzen deutlich. Da dieses Ergebnis nicht erwartet wurde, waren die methodischen Vorgehensweisen auf weitere Untersuchungen in dieser Richtung nicht ausgelegt.

Weitere Versuche im Rahmen der Selektion mit Phagenpeptidbanken unter optimierten Bedingungen könnten durchaus noch Peptide, die an den B-Zell-Rezeptor des follikulären Lymphoms binden, isolieren und durch Datenbanken-Vergleich der isolierten Sequenzen ein erkrankungsauslösendes Antigen identifizieren. Die Kenntnis dieser Antigene wäre ein weiterer Schritt vorwärts und würde eine optimierte und zielgerichtete Therapie follikulärer Lymphome ermöglichen.

6 Abkürzungsverzeichnis

293T-Zellen	humane fetale Nierenepithelzellen
A	Adenin
Bcl-2-Protein	B-Zell-Lymphoma 2 Protein
bp	Basenpaare
C	Cytosin
c	konstanter Bereich des Immunglobulins
CA46	Burkitt-Lymphom-Zelllinie
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CDR	Complementarity determining region
CD-20	Cluster of differentiation (Differenzierungscluster) 20
CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie
D-Gen	Diversitäts-Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBV	Epstein-Barr-Virus
EK	Einzelklon
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fab	Antigenbindendes Antikörperfragment
FCL	Folikuläres Lymphom
Fd-Tet	Phagenklon ohne Peptidinsert
FWR	Framework-Region
G	Guanin
HRP	Horseradish Peroxidase
HTLV-1	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
HV	variablen Region der schweren Immunglobulinkette
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin mit konstantem Bereich γ
IgM	Immunglobulin mit konstantem Bereich μ
IMGT	the international ImMunoGeneTics information system
IMGT/V-Quest	Software des IMGT
J-Gen	Joining-Gen

K12	Escherichia coli Stamm
K91	Escherichia coli Stamm
Kappa	eine Variante der leichten Immunglobulinkette
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KV	variable Region der leichten Immunglobulinkette kappa
lambda	eine Variante der leichten Immunglobulinkette
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LK	Lymphknoten
LV	variable Region der leichten Immunglobulinkette lambda
M13	Detektionsantikörper
N	Asparagin
OD	Optische Dichte
pBUDopti human	Vektor zur Klonierung der Immunglobulinsequenz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pJET	Vektor zur Klonierung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT-PCR	Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion
S	Serin
SDS	Natrium-Dodocylsulfat
T	Thymin
TU	transduzierende Einheiten (transducing units)
UKE	Universitätsklinikum-Hamburg-Eppendorf
VH 1-7	Familien der variablen Region der schweren Immunglobulinkette
VK 1-6	Familien der variablen Region der leichten Immunglobulinkette kappa
VL 1-10	Familien der variablen Region der leichten Immunglobulinkette lambda
V-Gen	variables Gen
X	variable Aminosäure

6 Abkürzungsverzeichnis

X ₇ , X ₁₂ , X ₁₈	randomisierte Phagenpeptidbanken mit 7, 12 und 18 Aminosäuren
XL1-Blue	Escherichia coli Stamm
μ	konstanter Bereich des Immunglobulin IgM

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung von RNA- und Gewebeproben von Patienten mit follikulärem Lymphom	17
Tabelle 2: Primer für die PCR mit familien-spezifischen Primern	26
Tabelle 3: Primer für die Einfügung von Schnittstellen	27
Tabelle 4: Primer für die quantitative Real-Time-PCR.....	28
Tabelle 5: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # 2 ⁺⁾	44
Tabelle 6: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 2 ⁺⁾	45
Tabelle 7: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 4 ⁺⁾	46
Tabelle 8: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 4 ⁺⁾	46
Tabelle 9: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # 5 ⁺⁾	47
Tabelle 10: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 5 ⁺⁾	48
Tabelle 11: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # 7 ⁺⁾	49
Tabelle 12: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 7	50
Tabelle 13: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # 8 ⁺⁾	51
Tabelle 14: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # 8 ⁺⁾	51
Tabelle 15: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # 11 ⁺⁾	52
Tabelle 16: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # G3 ⁺⁾	53
Tabelle 17: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # G3 ⁺⁾	54
Tabelle 18: cDNA-Sequenzen der leichten Immunglobulinketten der Lymphomprobe # G5 ⁺⁾	55
Tabelle 19: cDNA-Sequenzen der schweren Immunglobulinkette der Lymphomprobe # G5 ⁺⁾	56
Tabelle 20: Vergleich von Keimbahn-homologie und Mutationsstatus follikulärer Lymphome aus der Literatur mit eigenen Ergebnissen	76

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Aufbau des Immunglobulinrezeptors	10
Abbildung 2: Amplifikate der familienspezifischen PCR für die leichte Immunglobulinkette lambda der Lymphomprobe # 7 nach gelelektrophoretischer Auftrennung.....	41
Abbildung 3: Kopienanzahl-Vergleich der leichten Immunglobulinketten von Lymphomprobe # 2, # 4 und # G5 nach quantitativer Real-Time-PCR.	58
Abbildung 4: Westernblot - Detektion der rekombinanten leichten und schweren Immunglobulinkette der Proben # 2, # 4 und # 5.....	59
Abbildung 5: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 5 und der Negativkontrolle IgG mit der X ₁₈ Phagenpeptidbank.....	61
Abbildung 6: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 4 und der Negativkontrolle IgG mit der X ₁₈ Phagenpeptidbank.....	62
Abbildung 7: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 2 und der Negativkontrolle IgG mit der X ₁₈ Phagenpeptidbank.....	63
Abbildung 8: Kontrollselektion auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor der Burkitt-Lymphomprobe CA46 und der Negativkontrolle IgG mit der X ₁₈ Phagenpeptidbank.....	64
Abbildung 9: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 5 und der Negativkontrolle IgG mit der X ₁₂ Phagenpeptidbank.....	65
Abbildung 10: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 4 und der Negativkontrolle IgG mit der X ₁₂ Phagenpeptidbank.....	65
Abbildung 11: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 2 und der Negativkontrolle IgG mit der X ₁₂ Phagenpeptidbank.....	66
Abbildung 12: Selektionsergebnisse auf dem rekombinanten B-Zell-Rezeptor # 5 und der Negativkontrolle IgG mit der X ₇ Phagenpeptidbank.....	67
Abbildung 13: ELISA-Test zur Bindungseigenschaft von Einzelklonen auf Lymphom-B-Zell-Rezeptor # 5 und Negativkontrolle IgG.....	68

9 Literaturverzeichnis

- Aarts, W. M., R. J. Bende, J. G. Bossenbroek, S. T. Palsund, C. J. van Noesel (2001). Variable heavy-chain gene analysis of follicular lymphomas: subclone selection rather than clonal evolution over time. *Blood* 98(1): 238-240.
- Aarts, W. M., R. J. Bende, E. J. Steenberg, P. M. Kluin, E. C. Ooms, S. T. Palsund, C. J. van Noesel (2000). Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. *Blood* 95(9): 2922-2929.
- Adam, P., T. Katzenberger, M. Eifert, M. M. Ott, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink, G. Ott (2005). Presence of preserved reactive germinal centers in follicular lymphoma is a strong histopathologic indicator of limited disease stage. *Am J Surg Pathol* 29(12): 1661-1664.
- Adam, P., J. Schoof, M. Hartmann, S. Schwarz, B. Puppe, M. Ott, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink (2007). Cell migration patterns and ongoing somatic mutations in the progression of follicular lymphoma. *Cytogenet Genome Res* 118(2-4): 328-336.
- Albinger-Hegy, A., B. Hochreutener, M. T. Abdou, I. Hegyi, M. T. Dours-Zimmermann, M. O. Kurrer, P. U. Heitz, D. R. Zimmermann (2002). High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas: improved polymerase chain reaction protocols for their detection. *Am J Pathol* 160(3): 823-832.
- Ardeshna, K. M., P. Smith, A. Norton, B. W. Hancock, P. J. Hoskin, K. A. MacLennan, R. E. Marcus, A. Jelliffe, G. Vaughan, Hudson, D. C. Linch (2003). Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 362(9383): 516-522.
- Bahler, D. W., M. J. Campbell, S. Hart, R. A. Miller, S. Levy, R. Levy (1991). Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. *Blood* 78(6): 1561-1568.
- Bahler, D. W., R. Levy (1992). Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15): 6770-6774.
- Bahler, D. W., A. D. Zelenetz, T. T. Chen, R. Levy (1992). Antigen selection in human lymphomagenesis. *Cancer Res* 52(19 Suppl): 5547s-5551s.
- Bakhshi, A., J. J. Wright, W. Graninger, M. Seto, J. Owens, J. Cossman, J. P. Jensen, P. Goldman, S. J. Korsmeyer (1987). 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(8): 2396-2400.

- Belessi, C.,K. Stamatopolous und C. Kosmas (2002). Glycosylation of V region genes in follicular lymphoma as a result of the somatic hypermutation mechanism. *Blood* 100(6): 2269-2270; author reply 2270-2271.
- Belessi, C.,K. Stamatopoulos, A. Hadzidimitriou, K. Hatzi, T. Smilevska, N. Stavroyianni, F. Marantidou, G. Paterakis, A. Fassas, A. Anagnostopoulos und N. Laoutaris (2005). Analysis of expressed and non-expressed IGK locus rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Med* 11(1-12): 52-58.
- Bende, R. J., L. A. Smit und C. J. van Noesel (2007). Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 21(1): 18-29.
- Bertz, J., S. Dahm, J. Haberland, K. Kraywinkel, B. Kurth und U. Wolf (2010). Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI. Berlin, Robert Koch-Institut (Hrg.): 140-147.
- Binder, M., F. Müller, A. Jackst, B. Lechenne, M. Pantic, U. Bacher, C. Zu Eulenburg, H. Veelken, R. Mertelsmann, R. Pasqualini, W. Arap und M. Trepel (2011). B-cell receptor epitope recognition correlates with the clinical course of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 117(9): 1891-1900.
- Braun, B. und M. Paschke (2006). Protein-Selektion. Phagen-Display auf neuen Wegen. *BIOspektrum*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag. 04: 381-383.
- Buhl, L., P. B. Szecsi, G. G. Gissel und C. Schafer-Nielsen (2002). Surface immunoglobulin on B lymphocytes as a potential target for specific peptide ligands in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 116(3): 549-554.
- Chiorazzi, N. und M. Ferrarini (2003). B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 21: 841-894.
- Cleary, M. L. und J. Sklar (1985). 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(21): 7439-7443.
- Cong, P., M. Raffeld, J. Teruya-Feldstein, L. Sorbara, S. Pittaluga und E. S. Jaffe (2002). In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood* 99(9): 3376-3382.

- Dave, S. S., G. Wright, B. Tan, A. Rosenwald, R. D. Gascoyne, W. C. Chan, R. I. Fisher, R. M. Braziel, L. M. Rimsza, T. M. Grogan, T. P. Miller, M. LeBlanc, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. C. Lynch, J. Vose, J. O. Armitage, E. B. Smeland, S. Kvaloy, H. Holte, J. Delabie, J. M. Connors, P. M. Lansdorp, Q. Ouyang, T. A. Lister, A. J. Davies, A. J. Norton, H. K. Muller-Hermelink, G. Ott, E. Campo, E. Montserrat, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, R. Simon, L. Yang, J. Powell, H. Zhao, N. Goldschmidt, M. Chiorazzi und L. M. Staudt (2004). Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 351(21): 2159-2169.
- Eynon, E. E. und D. C. Parker (1992). Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J Exp Med* 175(1): 131-138.
- Farinha, P., H. Masoudi, B. F. Skinnider, K. Shumansky, J. J. Spinelli, K. Gill, R. Klasa, N. Voss, J. M. Connors und R. D. Gascoyne (2005). Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* 106(6): 2169-2174.
- Freedman, A. S., J. M. Munro, C. Morimoto, B. W. McIntyre, K. Rhyhart, N. Lee und L. M. Nadler (1992). Follicular non-Hodgkin's lymphoma cell adhesion to normal germinal centers and neoplastic follicles involves very late antigen-4 and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood* 79(1): 206-212.
- Friedberg, J. W. (2008). Treatment of follicular non-Hodgkin's lymphoma: the old and the new. *Semin Hematol* 45(3 Suppl 2): S2-6.
- Ghielmini, M. (2010). Follicular lymphoma. *Ann Oncol* 21 Suppl 7: vii151-vii153.
- Glas, A. M., L. Knoops, L. Delahaye, M. J. Kersten, R. E. Kibbelaar, L. A. Wessels, R. van Laar, J. H. van Krieken, J. W. Baars, J. Raemaekers, P. M. Kluin, L. J. van't Veer und D. de Jong (2007). Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 25(4): 390-398.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, J. Diebold, G. Flandrin, H. K. Muller-Hermelink, J. Vardiman, T. A. Lister und C. D. Bloomfield (1999). 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(12): 3835-3849.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, H. Stein, P. M. Banks, J. K. Chan, M. L. Cleary, G. Del-sol, C. De Wolf-Peeters, B. Falini, K. C. Gatter und et al. (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84(5): 1361-1392.

- Hayashi, D., J. C. Lee, B. Devenney-Cakir, S. Zaim, S. Ounadjela, P. Solal-Celigny, M. Juweid und A. Guermazi (2010). Follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Radiol* 65(5): 408-420.
- Hershberg, U., M. Uduman, M. J. Shlomchik und S. H. Kleinstein (2008). Improved methods for detecting selection by mutation analysis of Ig V region sequences. *Int Immunol* 20(5): 683-694.
- Hiddemann, W., M. Kneba, M. Dreyling, N. Schmitz, E. Lengfelder, R. Schmits, M. Reiser, B. Metzner, H. Harder, S. Hegewisch-Becker, T. Fischer, M. Kropff, H. E. Reis, M. Freund, B. Wormann, R. Fuchs, M. Planker, J. Schimke, H. Eimermacher, L. Trumper, A. Aldaoud, R. Parwaresch und M. Unterhalt (2005). Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 106(12): 3725-3732.
- Johnston, S. L. (2007). Biologic therapies: what and when? *J Clin Pathol* 60(1): 8-17.
- Jones, S. E., Z. Fuks, M. Bull, M. E. Kadin, R. F. Dorfman, H. S. Kaplan, S. A. Rosenberg und H. Kim (1973). Non-Hodgkin's lymphomas. IV. Clinicopathologic correlation in 405 cases. *Cancer* 31(4): 806-823.
- Jyrkkiö, S., E. Jantunen und L. Keskinen (2007). Follikulärisen lymfooman hoito. *Finnish Med J* 17: 1729-1733.
- Kanzler, H., R. Kuppers, S. Helmes, H. H. Wacker, A. Chott, M. L. Hansmann und K. Rajewsky (2000). Hodgkin and Reed-Sternberg-like cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia represent the outgrowth of single germinal-center B-cell-derived clones: potential precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Blood* 95(3): 1023-1031.
- Klein, U. und R. Dalla-Favera (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8(1): 22-33.
- Kocks, C. und K. Rajewsky (1989). Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. *Annu Rev Immunol* 7: 537-559.
- Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 59(7 Suppl): 1693s-1700s.

- Kosmas, C.,K. Stamatopoulos und D. Loukopoulos (1997). Antigen selection of multiple myeloma clonogenic B cells as evidenced by V(H) and V(L) gene mutations. *Blood* 90(3): 1334-1335.
- Kosmas, C.,K. Stamatopoulos,T. Papadaki,C. Belessi,X. Yataganas,D. Anagnostou und D. Loukopoulos (1998). Somatic hypermutation of immunoglobulin variable region genes: focus on follicular lymphoma and multiple myeloma. *Immunol Rev* 162: 281-292.
- Kosmas, C.,N. A. Viniou,K. Stamatopoulos,N. S. Courtenay-Luck,T. Papadaki,P. Kollia,G. Paterakis,D. Anagnostou,X. Yataganas und D. Loukopoulos (1996). Analysis of the kappa light chain variable region in multiple myeloma. *Br J Haematol* 94(2): 306-317.
- Kraus, M.,M. B. Alimzhanov,N. Rajewsky und K. Rajewsky (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 117(6): 787-800.
- Küppers, R.,U. Klein,M. L. Hansmann und K. Rajewsky (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341(20): 1520-1529.
- Lam, K. P.,R. Kuhn und K. Rajewsky (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90(6): 1073-1083.
- Lebecque, S. G. und P. J. Gearhart (1990). Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med* 172(6): 1717-1727.
- Leonard, J. P. und P. Martin (2010). Novel agents for follicular lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010: 259-264.
- Levy, S.,E. Mendel,S. Kon,Z. Avnur und R. Levy (1988). Mutational hot spots in Ig V region genes of human follicular lymphomas. *J Exp Med* 168(2): 475-489.
- Limpens, J.,D. de Jong,J. H. van Krieken,C. G. Price,B. D. Young,G. J. van Ommen und P. M. Kluin (1991). Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 6(12): 2271-2276.
- Liu, Y. J. und C. Arpin (1997). Germinal center development. *Immunol Rev* 156: 111-126.
- Lossos, I. S.,R. Tibshirani,B. Narasimhan und R. Levy (2000). The inference of antigen selection on Ig genes. *J Immunol* 165(9): 5122-5126.

- Maizels, N. (1995). Somatic hypermutation: how many mechanisms diversify V region sequences? *Cell* 83(1): 9-12.
- Mann, R. B., E. S. Jaffe und C. W. Berard (1979). Malignant lymphomas--a conceptual understanding of morphologic diversity. A review. *Am J Pathol* 94(1): 105-192.
- Marcus, R., K. Imrie, A. Belch, D. Cunningham, E. Flores, J. Catalano, P. Solal-Celigny, F. Offner, J. Walewski, J. Raposo, A. Jack und P. Smith (2005). CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 105(4): 1417-1423.
- Matasar, M. J. und A. D. Zelenetz (2008). Overview of lymphoma diagnosis and management. *Radiol Clin North Am* 46(2): 175-198, vii.
- McCann, K. J., P. W. Johnson, F. K. Stevenson und C. H. Ottensmeier (2006). Universal N-glycosylation sites introduced into the B-cell receptor of follicular lymphoma by somatic mutation: a second tumorigenic event? *Leukemia* 20(3): 530-534.
- McCann, K. J., C. H. Ottensmeier, A. Callard, C. M. Radcliffe, D. J. Harvey, R. A. Dwek, P. M. Rudd, B. J. Sutton, P. Hobby und F. K. Stevenson (2008). Remarkable selective glycosylation of the immunoglobulin variable region in follicular lymphoma. *Mol Immunol* 45(6): 1567-1572.
- McKean, D., K. Huppi, M. Bell, L. Staudt, W. Gerhard und M. Weigert (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(10): 3180-3184.
- Messmer, B. T., E. Albesiano, D. G. Efremov, F. Ghiotto, S. L. Allen, J. Kolitz, R. Foa, R. N. Damle, F. Fais, D. Messmer, K. R. Rai, M. Ferrarini und N. Chiorazzi (2004). Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 200(4): 519-525.
- Niirö, H. und E. A. Clark (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2(12): 945-956.
- Noppe, S. M., C. Heirman, M. H. Bakkus, J. Brissinck, R. Schots und K. Thielemans (1999). The genetic variability of the VH genes in follicular lymphoma: the impact of the hypermutation mechanism. *Br J Haematol* 107(3): 625-640.
- Nossal, G. J. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76(2): 229-239.

- Parmley, S. F. und G. P. Smith (1989). Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv Exp Med Biol* 251: 215-218.
- Radcliffe, C. M., J. N. Arnold, D. M. Suter, M. R. Wormald, D. J. Harvey, L. Royle, Y. Mimura, Y. Kimura, R. B. Sim, S. Inoges, M. Rodriguez-Calvillo, N. Zabalegui, A. L. de Cerio, K. N. Potter, C. I. Mockridge, R. A. Dwek, M. Bendandi, P. M. Rudd und F. K. Stevenson (2007). Human follicular lymphoma cells contain oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B-cell receptor. *J Biol Chem* 282(10): 7405-7415.
- Rahman, Z. S. und T. Manser (2004). B cells expressing Bcl-2 and a signaling-impaired BAFF-specific receptor fail to mature and are deficient in the formation of lymphoid follicles and germinal centers. *J Immunol* 173(10): 6179-6188.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381(6585): 751-758.
- Relander, T., N. A. Johnson, P. Farinha, J. M. Connors, L. H. Sehn und R. D. Gascoyne (2010). Prognostic factors in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 28(17): 2902-2913.
- Ruminy, P., F. Jardin, J. M. Picquenot, F. Parmentier, N. Contentin, G. Buchonnet, S. Tison, V. Rainville, H. Tilly und C. Bastard (2008). S(mu) mutation patterns suggest different progression pathways in follicular lymphoma: early direct or late from FL progenitor cells. *Blood* 112(5): 1951-1959.
- Sahota, S. S., R. Leo, T. J. Hamblin und F. K. Stevenson (1997). Myeloma VL and VH gene sequences reveal a complementary imprint of antigen selection in tumor cells. *Blood* 89(1): 219-226.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger und M. S. Schlissel (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* 10: 359-383.
- Seto, M., U. Jaeger, R. D. Hockett, W. Graninger, S. Bennett, P. Goldman und S. J. Korsmeyer (1988). Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO J* 7(1): 123-131.
- Shipp, M., D. Harrington, J. Anderson und et al (1993). A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 329(14): 987-994.
- Smilevska, T., E. Tsakou, A. Hadzidimitriou, V. Bikos, N. Stavroyianni, N. Laoutaris, A. Fassas, A. Alphanagnostopoulos, T. Papadaki, C. Belessi und K. Stama-

- topoulos (2008). Immunoglobulin kappa gene repertoire and somatic hypermutation patterns in follicular lymphoma. *Blood Cells Mol Dis* 41(2): 215-218.
- Smith, G. P. und V. A. Petrenko (1997). Phage Display. *Chem Rev* 97(2): 391-410.
- Soini, E. J., J. A. Martikainen und T. Nousiainen (2010). Treatment of follicular non-Hodgkin's lymphoma with or without rituximab: cost-effectiveness and value of information based on a 5-year follow-up. *Ann Oncol* 22(5): 1189-1197.
- Stamatopoulos, K., C. Belessi, A. Hadzidimitriou, T. Smilevska, E. Kalagiakou, K. Hatzi, N. Stavroyianni, A. Athanasiadou, A. Tsompanakou, T. Papadaki, G. Kokkini, G. Paterakis, R. Saloum, N. Laoutaris, A. Anagnostopoulos und A. Fassas (2005). Immunoglobulin light chain repertoire in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106(10): 3575-3583.
- Stamatopoulos, K., C. Belessi, C. Moreno, M. Boudjograh, G. Guida, T. Smilevska, L. Belhoul, S. Stella, N. Stavroyianni, M. Crespo, A. Hadzidimitriou, L. Sutton, F. Bosch, N. Laoutaris, A. Anagnostopoulos, E. Montserrat, A. Fassas, G. Dighiero, F. Caligaris-Cappio, H. Merle-Beral, P. Ghia und F. Davi (2007). Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 109(1): 259-270.
- Stamatopoulos, K., C. Belessi, T. Papadaki, E. Kalagiakou, N. Stavroyianni, V. Douka, S. Afendaki, R. Saloum, A. Parasi, D. Anagnostou, N. Laoutaris, A. Fassas und A. Anagnostopoulos (2004). Immunoglobulin heavy- and light-chain repertoire in splenic marginal zone lymphoma. *Mol Med* 10(7-12): 89-95.
- Stamatopoulos, K., C. Kosmas, C. Belessi, N. Stavroyianni, P. Kyriazopoulou und T. Papadaki (2000). Molecular insights into the immunopathogenesis of follicular lymphoma. *Immunol Today* 21(6): 298-305.
- Stamatopoulos, K., C. Kosmas, T. Papadaki, E. Pouliou, C. Belessi, S. Afendaki, D. Anagnostou und D. Loukopoulos (1997). Follicular lymphoma immunoglobulin kappa light chains are affected by the antigen selection process, but to a lesser degree than their partner heavy chains. *Br J Haematol* 96(1): 132-146.
- Staudt, L. M. und S. Dave (2005). The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* 87: 163-208.

Stein, H., J. Gerdes und D. Y. Mason (1982). The normal and malignant germinal centre. *Clin Haematol* 11(3): 531-559.

Stevenson, F. K. und F. Caligaris-Cappio (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 103(12): 4389-4395.

Summers, K. E., L. K. Goff, A. G. Wilson, R. K. Gupta, T. A. Lister und J. Fitzgibbon (2001). 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(2): 420-424.

Tageja, N., S. Padheye, P. Dandawate, A. Al-Katib und R. M. Mohammad (2009). New targets for the treatment of follicular lymphoma. *J Hematol Oncol* 2: 50-64.

The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997). A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma *Blood* 89(11): 3909-3918.

The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project (1982). National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 49(10): 2112-2135.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302(5909): 575-581.

Tsujimoto, Y., J. Cossman, E. Jaffe und C. M. Croce (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228(4706): 1440-1443.

Tsujimoto, Y., L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell und C. M. Croce (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226(4678): 1097-1099.

van Noesel, C. J. und R. A. van Lier (1993). Architecture of the human B-cell antigen receptors. *Blood* 82(2): 363-373.

Vidal, L., A. Gafter-Gvili und O. Shpilberg (2010). Immunotherapy for patients with follicular lymphoma: the contribution of systematic reviews. *Acta Haematol* 125(1-2): 23-31.

Vitolo, U., A. J. Ferreri und S. Montoto (2008). Follicular lymphomas. *Crit Rev Oncol Hematol* 66(3): 248-261.

Wagner, S. D., V. Martinelli und L. Luzzatto (1994). Similar patterns of V kappa gene usage but different degrees of somatic mutation in hairy cell leukemia,

prolymphocytic leukemia, Waldenstrom's macroglobulinemia, and myeloma. *Blood* 83(12): 3647-3653.

Yahalom, J. (1999). Radiation therapy in the treatment of lymphoma. *Curr Opin Oncol* 11(5): 370-374.

Zelenetz, A. D., T. T. Chen und R. Levy (1992). Clonal expansion in follicular lymphoma occurs subsequent to antigenic selection. *J Exp Med* 176(4): 1137-1148.

Zhu, D., R. E. Hawkins, T. J. Hamblin und F. K. Stevenson (1994). Clonal history of a human follicular lymphoma as revealed in the immunoglobulin variable region genes. *Br J Haematol* 86(3): 505-512.

Zhu, D., H. McCarthy, C. H. Ottensmeier, P. Johnson, T. J. Hamblin und F. K. Stevenson (2002). Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood* 99(7): 2562-2568.

10 Danksagung

Zu Beginn möchte ich Herrn Prof. Martin Trepel nicht nur für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit danken, sondern auch für seine Unterstützung, eine wunderbare Betreuung und sein stets offenes Ohr für Fragen und Probleme.

Ein großer Dank gilt aber auch der gesamten Arbeitsgruppe Trepel, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Vor allem aber auch Dr. Tanja Schneider-Merck für ihre Betreuung während der experimentellen Phase, ihre Diskussionsbereitschaft und Motivation, sowie Agnes Hunger, Barbara Götsch und Stephan Michelfelder für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und ihre Unterstützung.

Zuletzt, aber dafür nicht umso weniger, möchte ich besonders meinen Eltern Wolfgang und Christine Sievert danken, die mir nicht nur dieses Studium sorgenfrei ermöglicht haben, sondern auch in jedem Lebensabschnitt immer für mich da waren und mich unterstützt haben. Ebenso gilt auch ein besonderer Dank meiner Schwester Daniela Sievert-Meister für ihr offenes Ohr und ihre Motivation.

11 Lebenslauf

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: