

# **Untersuchung des Einflusses von Antigenen auf die Entstehung von MALT-Lymphomen**

**Inaugural-Dissertation**  
**zur Erlangung der Doktorwürde**  
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Dido Lenze**  
aus Arnsberg

Berlin 2004

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Stein am Institut für Pathologie,  
Campus Benjamin Franklin der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Stein  
Institut für Pathologie  
Campus Benjamin Franklin  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. V. A. Erdmann  
Institut für Chemie-Biochemie  
Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 23.2.2004

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst angefertigt wurde und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Dido Lenze

Berlin, den

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Die Funktion von B-Zellen im Immunsystem.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Der Aufbau der Immunglobuline .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Die normale Entwicklung von B-Zellen .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Pathogenese von MALT-Lymphomen .....</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Einfluss von Antigen-Stimulation auf die Entstehung der MALT-Lymphome .....</b>	<b>7</b>
<b>1.6 Aufgabenstellung.....</b>	<b>8</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Patientenmaterial.....	9
2.1.2 Vektoren.....	9
2.1.3 Zelllinien .....	10
2.1.4 PCR Primer .....	10
2.1.5 Lösungen.....	12
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Isolierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	19
2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA.....	19
2.2.1.2 Isolierung von Plasmid DNA .....	19
2.2.1.3 Isolierung von RNA .....	19
2.2.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	20
2.2.2 Isolierung von Tumorzellverbänden aus Gefrierschnitten (Mikrodissektion).....	20
2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	21
2.2.3.1 Multiplex PCR zur Identifizierung der tumorspezifischen Immunglobulingenumlagerungen.....	21
2.2.3.1.1 Immunglobulinschwerketten (IgH) PCR .....	21
2.2.3.1.2 Immunglobulin-Kappa (Igκ) PCR.....	22
2.2.3.1.3 Immunglobulin-Lambda (Igλ) PCR.....	22
2.2.3.2 PCR zur Amplifikation bekannter Immunglobulingenumlagerungen.....	23
2.2.3.2.1 Amplifikation der Immunglobulingenumlagerung des BerH2 Hybridoms .	23
2.2.3.2.2 Amplifikation der Immunglobulingenumlagerungen der MALT-Lymphome .....	23
.....	23
2.2.3.3 Kolonie PCR .....	24

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.4	<i>In-Vitro</i> Mutagenese.....	25
2.2.5	Sequenzierung.....	26
2.2.6	Sequenzauswertung.....	26
2.2.7	GeneScan Analyse.....	27
2.2.8	Isolierung von PCR Fragmenten und Produkten aus Restriktionsanalysen.....	27
2.2.9	Restriktionsanalyse.....	27
2.2.10	Gelelektrophorese zur Auftrennung von Makromolekülen .....	28
2.2.10.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.2.10.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
2.2.10.2.1	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA .....	28
2.2.10.2.2	Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen.....	29
2.2.11	Anfärbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Makromolekülen .....	29
2.2.11.1	Anfärbung von DNA.....	29
2.2.11.2	Anfärbung von Proteinen .....	30
2.2.11.2.1	Coomassie Färbung.....	30
2.2.11.2.2	Silberfärbung.....	30
2.2.12	Ligation .....	31
2.2.12.1	Topo TA Ligation.....	31
2.2.12.2	Ligation mit T4-Ligase.....	31
2.2.13	Einschleusung von DNA in Zellen.....	31
2.2.13.1	Transformation .....	31
2.2.13.1.1	Hitzeschock .....	31
2.2.13.1.2	Elektroporation.....	32
2.2.13.2	Transfektion .....	32
2.2.14	Kultur von Bakterienzellen .....	33
2.2.15	Kultur von humanen Zelllinien .....	33
2.2.16	Kultur von Insektenzellen .....	34
2.2.17	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) .....	35
2.2.18	Herstellung von <i>Helicobacter pylori</i> Lysaten .....	35
2.2.19	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	36
2.2.19.1	Bradford Assay.....	36
2.2.19.2	Bioanalyser.....	36
2.2.20	Biotinylierung.....	37
2.2.21	Herstellung von Peptidarrays .....	37

2.2.21.1	Generierung der Peptidbibliothek .....	37
2.2.21.2	Programmierung des Spot-Roboters .....	38
2.2.21.3	Herstellung der CAPE Membran .....	38
2.2.21.4	Kopplung der Membran mit $\beta$ -Alanin.....	39
2.2.21.5	Acetylierung .....	39
2.2.21.6	Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.....	40
2.2.21.7	Kopplung von Aminosäuren an die Membran .....	40
2.2.21.8	Abspaltung der Seitenschutzgruppen.....	41
2.2.22	Immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten .....	41
2.2.23	Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) Messung.....	42
2.2.24	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	43
2.2.25	Immunoblot .....	43
2.2.26	Detektion von Bindungsdomänen auf Proteinfiltren.....	44
2.2.27	Detektion von Bindungsdomänen im Peptidarray .....	45
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung des BerH2-Kontroll-scFv .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Herstellung der scFvs aus MALT-Lymphom Tumorzellen .....</b>	<b>52</b>
3.2.1	Amplifikation der Immunglobulingenumlagerungen der MALT-Lymphome .....	52
3.2.2	Analyse der Immunglobulingensequenzen der MALT-Lymphome .....	56
3.2.2.1	Analyse der dominanten Immunglobulingenumlagerungen .....	56
3.2.2.2	Rezeptor-Revision.....	66
3.2.3	Expression der Tumormmuglobulingene als scFv-Antikörper.....	72
<b>3.3</b>	<b>Immunhistologie.....</b>	<b>74</b>
3.3.1	Etablierung des Verstärkersystems .....	74
3.3.2	Färbung von Normalgeweben .....	78
3.3.2.1	Paraffinmaterial.....	78
3.3.2.2	Gefriermaterial .....	81
3.3.3	Färbung von MALT-Lymphom Gewebe .....	82
3.3.3.1	Paraffinmaterial.....	82
3.3.3.2	Gefriermaterial .....	83
<b>3.4</b>	<b>Reaktivität der Tumor-scFvs gegenüber Helicobacter pylori.....</b>	<b>84</b>
3.4.1	Western Blot.....	84
3.4.2	Immunhistologie.....	86

<b>3.5</b>	<b>Reaktivität der Tumor-scFvs gegenüber einer exprimierten cDNA Bibliothek aus humanem fötalem Gehirngewebe (Proteinfilter) .....</b>	<b>87</b>
<b>3.6</b>	<b>Reaktivität der Tumor-scFvs gegenüber einer Peptidbibliothek (Peptidarray) ..</b>	<b>89</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>92</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>104</b>
<b>6.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>107</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>109</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>109</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>117</b>
<b>10.</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>118</b>