

1. EINLEITUNG

1.1. *Der Morbus Hodgkin*

Im Jahre 1832 beschrieb Thomas Hodgkin an sieben Fällen das makroskopische Bild einer zum Tode führenden Erkrankung, die mit der Vergrößerung von Lymphknoten und Milz einherging (Hodgkin 1832). Diese Erkrankung, schon bald als Morbus Hodgkin bezeichnet, zählt heute mit einer Inzidenz von 3/100000 Einwohnern pro Jahr zu den häufigsten malignen Lymphomen in den westlichen Industrieländern. Charakteristisch ist der altersabhängige zweiphasige Verlauf mit einer Häufung von Hodgkinfällen zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr und einem zweiten Gipfel oberhalb des 50. Lebensjahres. Die Prognose des Morbus Hodgkin war bis zum Einzug der Polychemotherapie immer infaust. Heute können durch die Kombination von Radio- und Chemotherapie mehr als 85% der Patienten, in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung, geheilt werden (Freedman & Nadler 1998). Doch während in der Therapie immense Erfolge erzielt werden konnten, blieben diese bei der Erforschung der Ätiologie und Pathogenese des Morbus Hodgkin für lange Zeit weit gehend aus.

Auf der Suche nach kausal pathogenetischen Faktoren für den Morbus Hodgkin konnten jedoch Risikofaktoren identifiziert werden, die mit einer Hodgkin'schen Erkrankung gehäuft assoziiert sind. Dazu gehören:

- hormonelle oder gonosomal vererbte Faktoren, da von der jugendlichen Form bevorzugt Männer betroffen sind (Freedman & Nadler 1998),
- genetische Faktoren, da der Morbus Hodgkin bei Geschwistern betroffener Patienten vermehrt auftritt. Das bedeutet im Extremfall bei eineiigen Zwillingen ein, im Vergleich zur Normalbevölkerung, 99-fach erhöhtes Risiko für den gesunden Zwilling, ebenfalls am Morbus Hodgkin zu erkranken (Freedman & Nadler 1998),
- onkogene Viren, wie das Epstein-Barr-Virus (EBV), welches je nach histologischem Subtyp in ca. $\frac{2}{3}$ der Hodgkinfälle nachgewiesen werden kann (Hummel et al. 1993),
- Immundefekte, da der Morbus Hodgkin gehäuft bei AIDS Kranken oder Patienten auftritt, die eine Chemotherapie erhalten haben (Freedman & Nadler 1998).

Das Vorhandensein dieser Risikofaktoren ist jedoch keine notwendige Bedingung für die Entwicklung eines Morbus Hodgkin.

1.2. Ursprung der malignen Tumorzellen des Morbus Hodgkin

Die Frage nach der zellulären Herkunft der malignen Tumorzellen des Morbus Hodgkin war lange Zeit eines der großen Rätsel dieser Erkrankung. Dessen Lösung war eng mit dem Fortschritt und der Neuentwicklung wissenschaftlicher Methoden verknüpft.

1.2.1. Histologie

Erst 70 Jahre nach der Beschreibung der Makroskopie des Morbus Hodgkin 1832 konnte das mikroskopische Bild dieser Erkrankung von Dorothy Reed und Carl Sternberg charakterisiert werden (Reed 1902; Sternberg 1898). Als pathognomonisch für den Morbus Hodgkin identifizierten sie vereinzelt auftretende große einkernige Zellen und Riesenzellen. Die einkernigen Formen werden als Hodgkinzellen (H Zellen) und die mehrkernigen Formen, nach den Erstbeschreibern, als Reed–Sternberg Zellen (RS Zellen) bezeichnet. Die HRS Zellen, die nur 0,1 – 10% der Tumormasse ausmachen (Stein et al. 2001a), sind von einem reaktiven zellulären Hintergrund umgeben, der aus einer wechselnden Anzahl von Lymphozyten, Plasmazellen, Histiocyten, Fibroblasten, eosinophilen Granulozyten und anderen nicht malignen Zellen besteht.

Die Abhängigkeit des Krankheitsverlaufes vom jeweiligen zellulären Hintergrund führte 1944 zur ersten klinisch bedeutsamen Klassifikation des Morbus Hodgkin in drei Subtypen (Jackson & Parker 1944). Diese Klassifikation wurde 1966 durch Lukes & Butler auf sieben Subtypen erweitert (Lukes & Butler 1966), jedoch im gleichen Jahr durch die Rye Konferenz vereinfacht und auf die Subtypen *lymphozytenprädominant*, *nodulär sklerosierend*, *gemischt zellulär* und *lymphozytenarm* reduziert (Lukes et al. 1966). Diese Einteilung ist 1994 weitgehend von der R.E.A.L. Klassifikation (Revised European American Lymphoma Classification) (Harris et al. 1994) übernommen worden. Als Neuerung wurde in der R.E.A.L. Klassifikation der *lymphozytenreiche* Subtyp eingeführt sowie die Subtypen *nodulär sklerosierend*, *gemischt zellulär*, *lymphozytenreich* und *lymphozytenarm* wegen ähnlicher phänotypischer Merkmale der HRS Zellen und ähnlichem klinischen Verhalten als Varianten des klassischen Morbus Hodgkin zusammengefasst. Der lymphozytenprädominante Morbus Hodgkin wurde nun als eigene Krankheitsentität dem klassischen Morbus Hodgkin gegenübergestellt.

Der lymphozytenprädominante Morbus Hodgkin hat im Gegensatz zum klassischen Morbus Hodgkin auch unbehandelt eine deutlich bessere Prognose, die Patienten zeigen selten eine B-Symptomatik (wie z.B. Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust) (Regula et al. 1988) und die malignen Zellen (L&H- oder Popcorn Zellen genannt) weisen im Vergleich zu den HRS Zellen gelappte Zellkerne auf (Lukes & Butler 1966).

In der seit kurzem gültigen WHO Klassifikation des Morbus Hodgkin (Stein et al. 2001a), wurde die Einteilung der R.E.A.L. Klassifikation übernommen. Es werden nach der Häufigkeit unterschieden:

<i>klassischer Morbus Hodgkin</i> (95%)	}	nodulär sklerosierender Typ (ca. 70%), gemischt zellulärer Typ (20 – 25%), lymphozytenreicher Typ (< 5%), lymphozytenarmer Typ (1%)
<i>lymphozytenprädominanter Morbus Hodgkin</i> (5%)		

1.2.2. Immunhistologie

Nach der Identifizierung der malignen HRS Zellen war deren Ursprung Gegenstand intensiver Forschungen. Aufgrund der Morphologie und der Tatsache, dass sich der Morbus Hodgkin im lymphatischen System präsentiert, wurden neben Lymphozyten auch andere Zellen, wie z.B. Histiozyten oder Makrophagen, als Vorläufer der HRS Zellen diskutiert. Allein der Beweis konnte nicht geführt werden, da sich die HRS Zellen wegen ihres geringen Anteils am Tumorgewebe und ihrer großen Fragilität einer genaueren Analyse entzogen.

Einen Meilenstein in der Erforschung des Morbus Hodgkin markierte deshalb die Einführung der Immunhistologie, mit deren Hilfe das Antigenexpressionsmuster von Zellen im Gewebekontext dargestellt werden kann. In zahlreichen Untersuchungen von Gewebematerial des klassischen Morbus Hodgkin ließen sich nicht lymphatische Marker wie CD15 (Granulozyten und Monozyten) (Stein et al. 1981), Lysozym (Makrophagen) (Papadimitriou et al. 1978) oder Fascin (dendritische Zellen) (Pinkus et al. 1997) zur Darstellung bringen. Der Nachweis lymphatischer B- oder T-Zell Antigene wie Immunglobuline (Ig), CD20, CD3 oder T-Zellrezeptor (TCR) β gelang nur in einigen Fällen und dort nur an wenigen HRS Zellen (Poppema 1980; Pinkus & Said 1988; Falini et al. 1987; Dallenbach & Stein 1989). Aufgrund der inkonstanten Darstellung der lymphatischen Proteine in den HRS Zellen wurden diese

Ergebnisse von vielen Forschern als aberrantes Expressionsmuster gewertet. Erst mit dem konstanten Nachweis von Ki-1 (CD30), das im normalen lymphatischen Gewebe nur von wenigen aktivierten B- und T-Zellen exprimiert wird, konnte ein weitgehend akzeptierter Hinweis auf die lymphatische Natur der HRS Zellen gefunden werden (Schwab et al. 1982; Stein et al. 1982; zusammengefasst in: Stein & Hummel 1999).

1.2.3. Zelllinien

Mit der Entwicklung effizienter Zellkulturverfahren in den 60-er Jahren gelang nach vielen Fehlschlägen Ende der 70-er Jahre erstmalig die Anzüchtung von Zelllinien aus HRS Zellen (Schaadt et al. 1980). Die in diesen Zelllinien nachweisbaren genetischen und immunphänotypischen Merkmale von B- oder T-Zellen unterstützten die Theorie einer lymphatischen Natur der HRS Zellen (Diehl et al. 1981).

1.2.4. Polymerasekettenreaktion

Einen enormen Schub in der Forschung löste die 1985 etablierte und später durch den Einsatz thermostabiler Polymerasen verbesserte Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) aus (Saiki et al. 1988). Dabei lagern sich sogenannte Primer (Oligonukleotide), die den gesuchten Genabschnitt flankieren, komplementär an die DNA. Eine DNA-Polymerase synthetisiert dann die komplementäre Sequenz des gewünschten Genabschnittes an diese Primer. Die mehrfache Wiederholung dieses Syntheseschrittes ermöglicht eine millionenfache Amplifikation der Zielsequenz und damit sogar den Nachweis und die Analyse einzelner Genkopien.

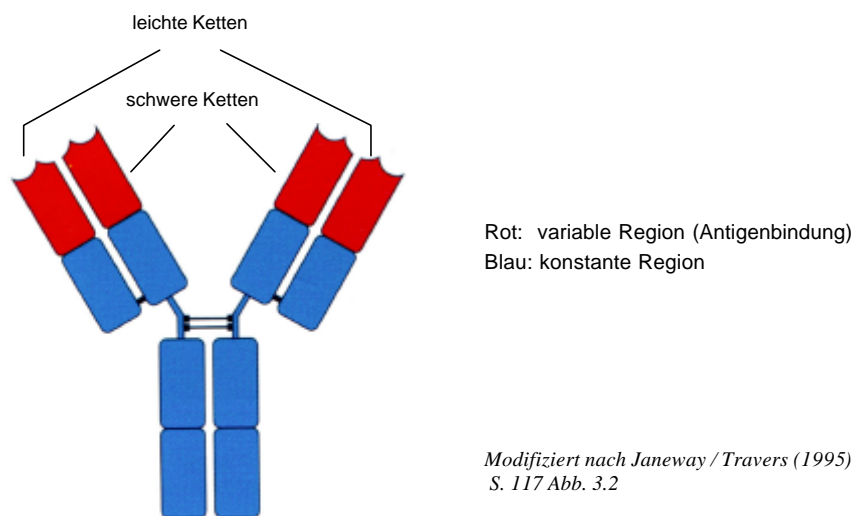
1.2.4.1 Das Immunglobulingen (Ig Gen)

Für den Nachweis einer möglichen lymphatischen Natur der HRS Zellen eignen sich das Ig Gen als B-Zellmarker und das T-Zellrezeptor (TCR) Gen als T-Zellmarker. Die Anordnung dieser Gene wird in B- und T-Zellen, im Gegensatz zu allen anderen Körperzellen, während der Zellentwicklung charakteristisch verändert. Dieser Prozess der Genumlagerung soll hier am Beispiel des Ig Gens dargestellt werden.

Zum Schutz eines Organismus vor eindringenden Antigenen benötigt ein funktionierendes Immunsystem ein großes Repertoire an Antikörpern (Immunglobuline; Ig). Diese, ausschließlich von B-Zellen produziert, bestehen aus vier Polypeptidketten: zwei leichten und zwei schweren Ketten (Abb. 1). Nach ihrer Funktion werden die Ig in zwei strukturelle

Bereiche unterteilt: die variable Region, die an das Antigen bindet und von Ig zu Ig sehr unterschiedlich ist und die konstante Region, deren Konfiguration fünf Hauptformen (Isotypen) zulässt und das Immunsystem aktiviert.

Abbildung 1 **Aufbau eines Antikörpers**



Um die notwendige Vielfalt (Diversität) der Immunglobuline zu garantieren, wird während der Entwicklung der B-Zellen der variable Bereich des Ig Gens durch Genumlagerung (Rekombination) und ungenaue Verknüpfung der Gensegmente (junktionale Vielfalt) charakteristisch verändert. Damit gelingt es dem Immunsystem ca. 10^{12} verschiedene Ig zu kodieren und damit nahezu jedes Antigen spezifisch zu erkennen (Lefranc & Lefranc 2001).

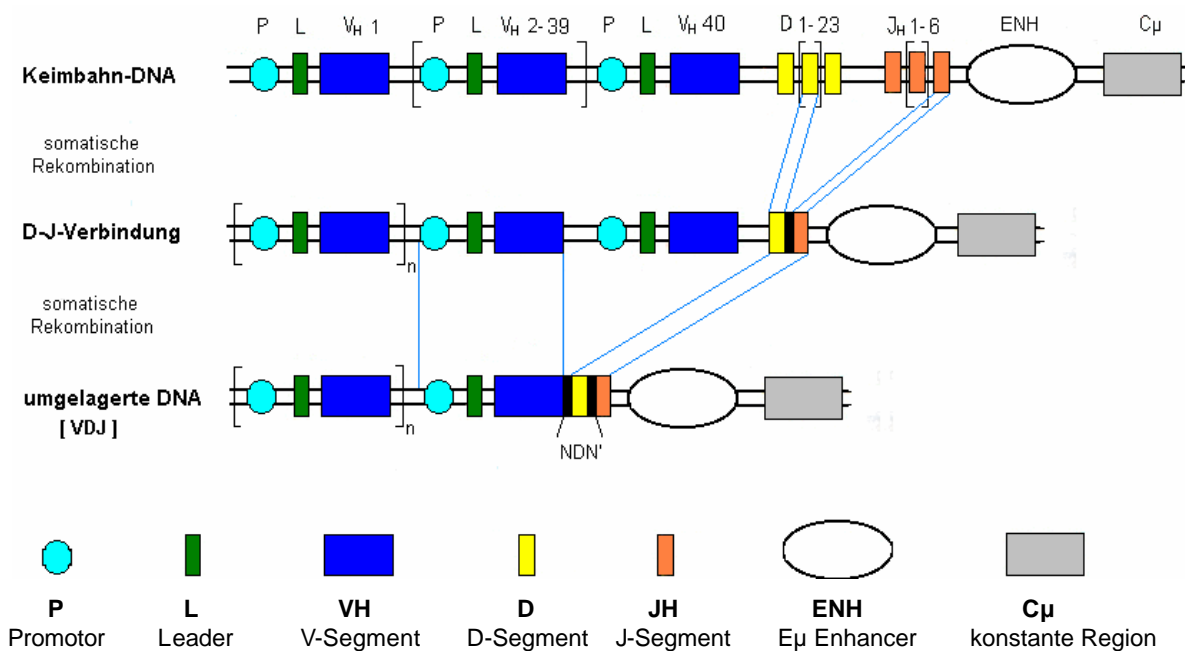
1. Rekombination von Gensegmenten (VDJ- und VJ-Umlagerung)

Die Knochenmarkstammzelle hat vor ihrer Differenzierung zur B-Zelle noch keine umgelagerten Ig Gene und besitzt damit Keimbahnkonfiguration (Abb. 2). In den nun folgenden Differenzierungsschritten werden verschiedene Abschnitte des Ig Gens nach dem Zufallsprinzip miteinander kombiniert. Dafür stehen im Schwerketten-Locus ca. 40 V – (variable), 23 D – („diversity“ für Vielfalt) und 6 J-Segmente („joining“ für verbindend) sowie im Leichtketten-Locus ca. 60 V – und 10 J-Segmente zur Verfügung (Matsuda et al. 1998; Lefranc & Lefranc 2001).

In der ersten Differenzierungsstufe, der frühen Pro-B-Zelle, kommt es im Bereich des Ig Schwerkettengens zur Verknüpfung eines D_H -Segmentes (H für heavy; schwer) mit

einem J_H -Segment. Anschließend erfolgt die Verknüpfung eines V_H -Segmentes mit dem D_HJ_H -Segment, womit die späte Pro-B-Zellphase abgeschlossen ist. In der so entstandenen Prä-B-Zelle ist damit nur das Ig Schwerkettengen umgelagert ($V_HD_HJ_H$ -Umlagerung), was erstmalig zur Expression einer H-Kette im Zytosol und der Zellmembran führt. Das Ig Leichtkettengen befindet sich zu diesem Zeitpunkt noch in Keimbahnkonfiguration. Im nächsten Schritt erfolgt die Verknüpfung des V_L -Segmentes (L für light; leicht) mit dem J_L -Segment (V_LJ_L -Umlagerung). Die Zelle, die nun als unreife B-Zelle bezeichnet wird, exprimiert L- und H-Ketten als Oberflächenmoleküle in Form des IgM-Isotypes (Janeway & Travers 1995).

Abbildung 2 Umlagerung der schweren Kette des Ig Gens



2. junktionale Vielfalt

Während der VDJ-Umlagerung der schweren Kette erfolgt die Verknüpfung der Gensegmente ungenau. Dabei werden flankierende Nukleotide der V-, D- und J-Segmente belassen (P-Nukleotide) und/oder zusätzlich Nukleotide an den Schnittstellen eingefügt (N-Nukleotide). Da sowohl Anzahl als auch Art der eingefügten Nukleotide dem Zufallsprinzip unterliegen, ist der daraus entstandene NDN'-Bereich (N für Nukleotid) einem genetischen Fingerabdruck vergleichbar, hoch spezifisch für jede B-Zelle. Die VJ-

Umlagerung der leichten Kette geht ebenfalls mit einer Ungenauigkeit der Position der Nahtstelle einher, so dass die Kodierung der jeweiligen Aminosäure variabel ist (Janeway & Travers 1995).

Erst nach Umlagerung der IgH und IgL-Gene verlassen die B-Zellen das Knochenmark. Diese Auswanderung geht einher mit der zusätzlichen Expression von IgD. Die IgM⁺IgD⁺ B-Zellen sind jetzt in der Lage mit einem Antigen zu reagieren und werden daher reife B-Zellen genannt.

B-Zellen sind somit anhand ihrer umgelagerten Ig Gene identifizierbar. Durch den Einsatz von Primern in verschiedenen Gensegmenten (V- und J-Segment) lässt sich mittels einer PCR zeigen, ob eine Ig Genumlagerung stattgefunden hat. Während der Umlagerung verringert sich der Abstand zwischen V- und J-Segment von mehr als dreißigtausend Basenpaaren (bp) auf ca. 10 – 70 bp. Finden sich also V-, (D-), und J-Segment in einem Sequenzabschnitt von 200 – 250 bp, gilt die B-Zellnatur der untersuchten Zelle als ausreichend belegt.

Der Vergleich der umgelagerten Ig Gensequenzabschnitte verschiedener B-Zellen lässt Rückschlüsse auf deren Verwandtschaftsgrad zu und wird mit den Begriffen Poly-, Oligo- und Monoklonalität beschrieben. Dafür eignet sich besonders die hoch spezifische NDN'-Region der schweren Kette, deren Analyse heute Standardmethode in der Diagnostik maligner Lymphome ist (Hummel & Stein 2000).

1.2.4.2. Ergebnisse aus Gesamtzellextrakten

Die ersten PCR Untersuchungen zum Nachweis von Ig Genumlagerungen beim klassischen Morbus Hodgkin erfolgten an Gesamtzellextrakten befallener Lymphknoten. Mit dieser Methode kamen in 28% der Fälle klonale Ig Genumlagerungen zur Darstellung (Tamaru et al. 1994). Die Interpretation dieser Daten erwies sich als schwierig, da die nachweisbaren Ig Genumlagerungen den HRS Zellen, wegen ihres zu geringen prozentualen Anteils am Tumorgewebe (0,1–10%), nicht sicher zugeordnet werden konnten. Des Weiteren war unklar, ob in den verbliebenen Fällen (ca. $\frac{3}{4}$) keine Ig Genumlagerungen vorhanden waren oder diese, wegen eines zu geringen Anteils monoklonaler Zellen, nur nicht nachgewiesen werden konnten.

1.2.4.3. Ergebnisse aus einzeln isolierten HRS Zellen

Die sichere Zuordnung einer Ig Genumlagerung zu einer Zelle kann nur durch die Analyse einzeln isolierter Zellen erfolgen. Aufgrund dieser Überlegung begannen vor ca. 10 Jahren mehrere Arbeitsgruppen mit der Isolierung einzelner HRS Zellen. Dabei kamen die folgenden Methoden zur Anwendung:

- I Herstellung einer Zellsuspension aus frischem Biopsatmaterial, Zentrifugation auf einen Objektträger und Immunfärbung gegen CD30, danach Isolierung der CD30⁺ Zellen mit einem Mikromanipulationsgerät (Trümper et al. 1993; Roth et al. 1994),
- II Herstellung einer Zellsuspension nach enzymatischem Aufschluss aus Paraffinmaterial, Immunfärbung gegen CD30, dann Pipettieren der CD30⁺ Zellen (Delabie et al. 1996),
- III CD30 Immunfärbung von Gefrierschnitten, Isolierung der CD30⁺ HRS Zellen mit Hilfe einer hydraulischen Mikromanipulationsanlage aus dem Gewebeverband (Küppers et al. 1994; Hummel et al. 1995; Kanzler et al. 1996).

Die Daten reichten, je nach Methode, von fehlenden Ig Genumlagerungen über polyklonale und/oder monoklonale Ig Genumlagerungen bis zu ausschließlich monoklonalen Ig Genumlagerungen. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse erfolgte eine intensive Analyse der Methoden und Daten. Diese offenbarte als mögliche Fehlerquellen: (1) die nicht eindeutige Trennung der HRS Zellen von den umgebenden Zellen und damit fälschliche Isolierung von reaktiven Zellen und HRS Zellen, (2) ein zu geringes Bindungsvermögen der Primer in stark mutierten Genabschnitten des Ig Gens, (3) die Isolierung reaktiver CD30⁺ B-Zellen, die polyklonal sind (Hummel et al. 1999, Stein & Hummel 1999). Nachfolgende Untersuchungen an einem größeren Kontingent von Hodgkinfällen mit einer optimierten Methode III zeigten, dass beim klassischen Morbus Hodgkin in 98% der Fälle monoklonale Ig Genumlagerungen (Marafioti et al. 2000) und in ca. 2% der Fälle monoklonale Umlagerungen des TCR-Gamma Gens (Seitz et al. 2000) nachweisbar sind.

Die Annahme einer B-Zellnatur der HRS Zellen erhielt durch den Nachweis gemeinsamer Vorläuferzellen von Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) und klassischem Morbus Hodgkin eine weitere Bestätigung (Bräuninger et al. 1999; Marafioti et al. 1999). Bräuninger et al. und Marafioti et al. zeigten anhand der Daten von drei Patienten, bei denen vor bzw. nach einer Hodgkin Erkrankung zusätzlich ein NHL (composite lymphoma) diagnostiziert wurde, dass

die Ig Sequenzen der NHL Zellen und der HRS Zellen nahezu identisch waren. Daraus folgerten die Autoren, dass die verschiedenen Krankheitsentitäten aus einer gemeinsamen transformierten B-Vorläuferzelle entstanden sind, deren Klone durch weitere nunmehr unterschiedliche Transformationsereignisse eine Entwicklung zu HRS- bzw. NHL Zellen vollzogen haben.

1.3. Stadium der B-Zellentwicklung von Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen

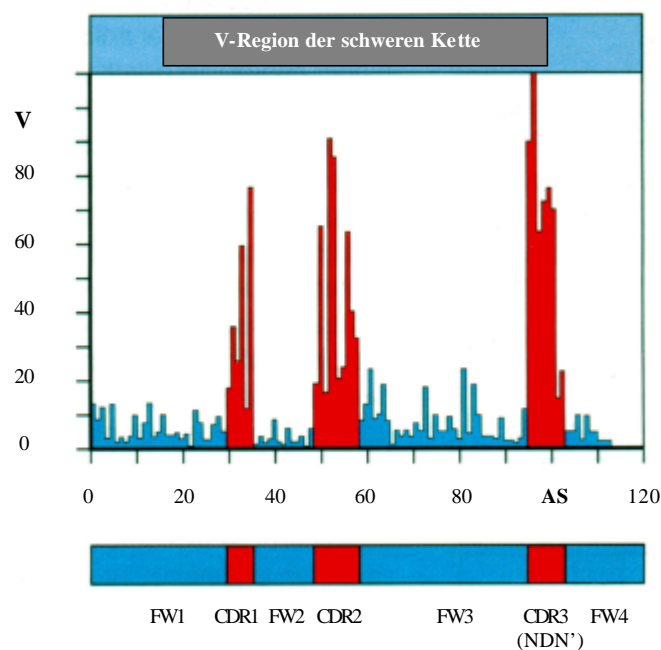
Mit dem Nachweis der B-Zellnatur der HRS Zellen entstand die Frage, warum diese Zellen keine weiteren Merkmale von B-Zellen besitzen. Zu den charakteristischen B-Zellmerkmalen zählt u.a. die Expression der Oberflächenantigene CD19, CD20, CD21, der J Kette und der Ig. Welche der genannten Oberflächenantigene exprimiert werden, ist vor allem von der Differenzierungsstufe der B-Zelle abhängig.

Mit der Differenzierung von Stammzellen zu B-Zellen beginnt ein ständiger Selektionsprozess. Nach erfolgter Ig Genumlagerung exprimieren die Prä- und die unreifen B-Zellen erstmals Ig an ihrer Oberfläche. Noch im Knochenmark erfahren nur die B-Zellen eine positive Selektion, deren exprimiertes Ig funktional und nicht gegen körpereigene Antigene gerichtet ist. Positiv selektierte Zellen verlassen als reife naive B-Zellen das Knochenmark und zirkulieren im Blut oder siedeln sich im lymphatischen Gewebe an. B-Zellen, deren Ig gegen körpereigene Antigene gerichtet oder nicht funktional sind, erhalten mit der VDJ- bzw. VJ-Umlagerung des anderen Chromosoms eine zweite Chance, ein funktional umgelagertes Ig Gen auszubilden. Führt die zweite Umlagerung nicht zum Erfolg, sterben diese B-Zellen in Folge der negativen Selektion den programmierten Zelltod (Apoptose) (Janeway & Travers 1995; Rajewsky 1996).

Außerhalb des Knochenmarkes werden die nun reifen naiven B-Zellen durch Kontakt mit einer antigenpräsentierenden Zelle oder Bindung eines Antigens aktiviert. Folge dieser Aktivierung ist die Wanderung der B-Zellen in die Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz oder Darmmukosa assoziierte lymphatische Gewebe) und eine starke Proliferation. In dieser Phase, Keimzentrumsreaktion genannt, erfolgt die Affinitätsreifung der B-Zellen durch das Einfügen von Mutationen (somatische Hypermutation) in den variablen Bereich des umgelagerten Ig Gens (Mutationsrate \approx 2-6%). Die Verteilung der Mutationen im Ig Gen der Keimzentrumszellen ist jedoch nicht einheitlich.

So finden sich gehäuft Mutationen in den hypervariablen komplementaritätsbestimmenden Regionen (complementarity determining region; CDR1-3), die die Antigenbindung vermitteln und deutlich weniger Mutationen in den Bereichen der Gerüstregion (frame work; FW1-4) (Janeway & Travers 1995; Rajewsky 1996) (Abb. 3).

Abbildung 3 Variabilität der Mutationsrate im V-Bereich



AS Aminosäuren V Variabilität

In Anlehnung an: Janeway / Travers (1995) Immunologie; S. 122, Abb.: 3.7

Mit der Aktivierung einer B-Zelle wird gleichzeitig ein Apoptosemechanismus angeschaltet, der nur bei zunehmender Affinität der B-Zelle zum Antigen inaktiviert werden kann. Die damit verbundene positive Selektion im Keimzentrum erlaubt eine weitere Differenzierung der Antigen-induzierten B-Zellen in Ig sezernierende Plasmazellen oder langlebige B-Gedächtniszellen. B-Zellen, die in Folge der Keimzentrumsreaktion eine verminderte Affinität zum Antigen, Autoreaktivität oder nicht funktionale Ig Proteine aufweisen, werden durch Apoptose eliminiert (Janeway & Travers 1995; Rajewsky 1996).

Im Vergleich zu normalen B-Zellpopulationen waren beim klassischen Morbus Hodgkin die umgelagerten Ig Gene der HRS Zellen deutlich stärker mutiert (\varnothing 10.7%) (Kanzler et al. 1996). Zusätzlich wiesen die Mutationen meist ein charakteristisches Verteilungsmuster in der

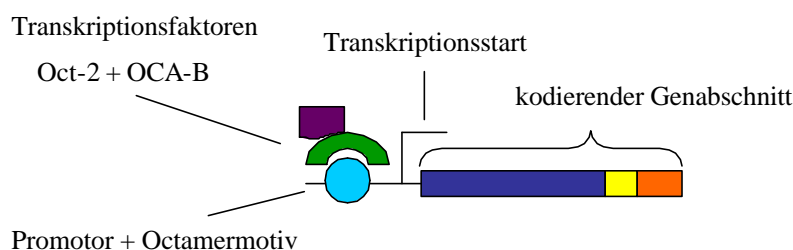
variablen Region auf: eine Häufung von Mutationen mit einem hohen Anteil von Austauschmutationen in den CDR und eine deutlich geringere Anzahl von Mutationen mit einem hohen Anteil an stillen Mutationen in den FW-Bereichen (Kanzler et al. 1996; Marafioti et al. 2000). Die Zusammenschau dieser Befunde führte zu der These, dass die HRS Zellen an der Keimzentrumsreaktion teilgenommen haben (Rajewsky 1996; Küppers et al. 1999; Marafioti et al. 2000).

1.4. Ursachen der fehlenden Ig Genexpression in HRS Zellen

Mit der Erkenntnis, dass HRS Zellen Abkömmlinge von B-Zellen sind, die an der Keimzentrumsreaktion teilgenommen haben, stellte sich immer dringender die Frage, warum in diesen Zellen sowohl keine Ig Proteine als auch keine oder nur sehr geringe Mengen von Ig m-RNA nachgewiesen werden konnten (Marafioti et al. 2000).

Die Expression eines Gens ist auf der Transkriptionsebene von verschiedenen Voraussetzungen abhängig (Abb. 4). Zum einen müssen der kodierende Bereich und zugehörige regulatorisch bedeutsame Strukturen des Gens (Promotor, Enhancer) intakt sein. Des Weiteren werden jene Transkriptionsfaktoren in ausreichender Menge benötigt, die an der Regulation des Gens beteiligt sind.

Abbildung 4 Voraussetzungen für die Transkription des funktionalen Ig Gens



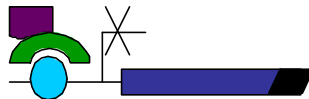
Für die fehlende Ig Genexpression beim Morbus Hodgkin gibt es verschiedene Theorien, die eine fehlerhafte Regulation der Ig Expression oder Mutationen im Ig Gen selbst favorisieren.

1.4.1. „Verkrüppelnde“ Mutationen im kodierenden Bereich des Ig Gens

- Mutationen, die den Verlust der Kodierfähigkeit eines Gens nach sich ziehen, werden als sogenannte „cripping mutations“ (verkrüppelnd, lähmend) bezeichnet. Dazu zählt man

Stopp-Kodons und Verschiebungen des Leserasters durch Insertionen oder Deletionen. In ersten Untersuchungen wurden in acht von neun Fällen des klassischen Morbus Hodgkin „cripling mutations“ im kodierenden Bereich der variablen Region der umgelagerten Ig Gene nachgewiesen (Kanzler et al. 1996) (Abb. 4a). Die Autoren folgerten: (1) dass aufgrund der fehlenden Funktionalität des Ig Gens und der hohen Anzahl von somatischen Mutationen (\varnothing 10,7%) die HRS Zellen die Fähigkeit zur Antigenselektion verloren haben, (2) dass die fehlende Antigenselektion zu einer „down“ Regulation der Ig Genexpression führt, (3) dass die in gesunden Zellen physiologisch einsetzende Apoptose durch eine Transformation der HRS Zellen verhindert wird.

Abbildung 4a Defekt im kodierenden Bereich des Ig Gens



Unsere Untersuchungen an einem größeren Kontingent von Hodgkin Fällen zeigten allerdings, dass „cripling mutations“ nicht die alleinige Ursache für die fehlende Ig Genexpression darstellen können, da wir nur in ca. 25% der Fälle Stopp-Kodons oder Leserasterverschiebungen feststellen konnten (Marafioti et al. 2000).

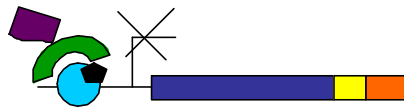
1.4.2. Mutationen in den konservierten Strukturen des Ig Schwerekettenpromotors

- Die Ig Genexpression wird durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an konservierte Strukturen im Promotor und den Enhancern des Ig Gens reguliert. Eine Reihe dieser funktionell bedeutsamen Sequenzmotive konnten in den letzten 20 Jahren identifiziert werden. Dazu gehören: im Ig Promotor die TATA-Box (Bergman et al. 1984), das konservierte Octamermotiv (ATGCAAAT) (Parslow et al. 1984), das Heptamermotiv (Eaton & Calame 1987) und die pyrimidinreiche Region (Dreyfus et al. 1987) sowie in den Enhancern (E μ Enhancer und 3' Enhancer) neben den Octamermotiven eine Vielzahl anderer konservierter Strukturen, wie z.B. die E-Box Motive (zusammengefasst in: Staudt 1991).

Eine besondere Bedeutung für die Ig Gentranskription kommt dem Octamermotiv ATGCAAAT im Ig Promotor zu, welches sich ca. 150 bp vor dem Leader befindet. In

verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Ig Transkriptionsaktivität bei einem Verlust des Octamermotivs im IgH Promotor um das 20-fache reduziert wird, wogegen dessen Verlust im E μ Enhancer oder in den 3'Enhancern deutlich geringere Effekte auf die Ig Genexpression hat (Jenuwein & Grosschedl 1991; zusammengefasst in: Matthias 1998) (Abb. 4b).

Abbildung 4b Defekt einer konservierten Struktur im Ig Promotor



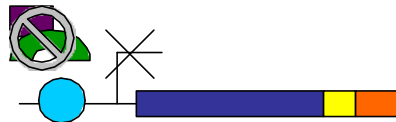
Eine Mutation im Octamermotiv des IgH Promotors war kürzlich für die Hodgkinzelllinie L1236 beschrieben worden (Jox et al. 1999). Da nicht nur der komplette Verlust, sondern auch einzelne Mutationen des Octamermotivs die Transkriptionsaktivität des IgH Promotors ebenso drastisch reduzieren können (Ballard & Bothwell 1986; Verrijzer et al. 1992; Botfield et al. 1994; Shah et al 1997), würde die in der L1236 beschriebene Mutation des Octamermotivs an Position 1 (A→T) ausreichen, die Ig Transkription auf ein kaum messbares Niveau zu senken (Jox et al. 1999).

1.4.3. Fehlregulation der Ig Genexpression durch Transkriptionsfaktoren

- Mit der wachsenden Erkenntnis der funktionellen Bedeutung des Octamermotivs wurde nach Proteinen gesucht, die über diese Struktur die Ig Genexpression regulieren. Der Nachweis des ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktors Oct-1 und des B-Zell-spezifischen Oct-2 führte zur Entdeckung einer neuen Familie von Transkriptionsfaktoren, den POU-Proteinen (Scheidereit et al. 1987; Sturm et al. 1988). Charakteristisch für die POU-Proteine ist die ca. 150 Aminosäuren große POU-Domäne, die aus einer POU-Homeodomäne (POU-HD) und einer POU-spezifischen Domäne (POU-SD) besteht. Die POU-SD bindet am Octamermotiv im Bereich ATGC, während die Bindung der POU-HD an die restlichen Basen AAAT erfolgt (Verrijzer et al. 1992). Oct-1 und Oct-2 können sich am Octamermotiv des Ig Promotors wechselseitig ersetzen, da der Verlust eines Faktors keinen Einfluss auf die Aktivität des Ig Promotors hat (Shah et al. 1997).

Oct-2 wird jedoch im Laufe der B-Zellentwicklung zunehmend stärker exprimiert, was zu der These führte, dass nach einem Antigenkontakt die Ig Gentranskription hauptsächlich von Oct-2 getragen wird (Shah et al. 1997; Schubart et al. 2001).

Abbildung 4c **Verlust oder Fehlfunktion von Transkriptionsfaktoren**



Verstärkt wird die Wirkung von Oct-1/Oct-2 durch den B-Zell-spezifischen Ko-Faktor OCA-B (OBF-1, Bob-1) (Luo et al. 1995; Strubin et al. 1995; Gstaiger et al. 1995). Dieser kann wie eine molekulare Klammer über je eine Bindungsstelle an der POU-HD, der POU-SD und der DNA (Octamermotiv Pos.5) eine stärkere und längere Bindung von Oct-1/Oct-2 am Octamermotiv vermitteln (Cepek et al. 1996; Sauter & Matthias 1998). Die Anwesenheit von OCA-B ist Voraussetzung für eine normale Ig Gentranskription, da dessen Verlust besonders in der späten B-Zellentwicklung zu einer Verminderung der Transkriptionsaktivität des Ig Promotors führt (Laumen et al. 2000; Schubart et al. 2001) (Abb. 4c).

Für den Morbus Hodgkin war die Expression dieser Transkriptionsfaktoren, mit Ausnahme von Oct-2 (Bargou et al. 1996), zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit noch nicht untersucht worden.