

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Gewebematerial und Zelllinien

Für die Untersuchungen an primären HRS Zellen wurde Gefriermaterial von neun, zuvor auf Ig Genumlagerung untersuchten Fällen des klassischen Morbus Hodgkin vom nodulär sklerosierenden Typ aus den Beständen des Institutes für Pathologie der Freien Universität Berlin ausgewählt (Marafioti et al. 2000) (Tab. 1).

Tabelle 1 Charakterisierung von neun untersuchten Fällen des klassischen Morbus Hodgkin vom nodulär sklerosierenden Typ #

Patient	Alter/ Geschlecht	Lokalisation	IgH Umlagerung	CD30	CD15	CD20	CD3	ALK	EBV (LMP-1)
1	27/W	LN	+	+	+	—	—	—	+
2	22/W	CV LN	+	+	+	—	—	—	+
3	23/W	SC LN	+	+	+	—	—	—	—
4	33/M	SC LN	+	+	+	—	—	—	—
5	58/M	LN	+	+	+	—	—	—	—
6	38/M	LN	+	+	+	—	—	—	—
7	40/M	SC LN	+	+	+	—	—	—	—
8	30/M	MD	+	+	+	—	—	—	+
9	26/W	MD	+	+	—	—	—	—	+

LN Lymphknoten

SC Supraklavikulär

CV Zervikal

MD Mediastinum

nach Marafioti et al. 2000

+ nachweisbar

¾ nicht nachweisbar

Die von HRS Zellen abstammenden Zelllinien L1236, L428, L591 und KM-H2 sowie die Kontrollzelllinien Raji (B-Zelle) und Jurkat (T-Zelle) wurden bei 37°C unter Zusatz von 5% CO₂ in RPMI 1640 und Glutamax I Medium (GIBCO, Deutschland) in Kultur gehalten, welches mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Rinderserum (FCS) (GIBCO, Deutschland) und 10 µg/ml Ciprofloxacin (Bayer, Deutschland) versetzt war (Tab. 2).

Tabelle 2 Immunphänotyp und Genotyp der Hodgkinzelllinien L1236, KM-H2, L591 und L428 sowie der Kontrollzelllinien Raji (B-Zelle) und Jurkat (T-Zelle)

Zelllinie	Umlagerung		Ig [§]	CD30 [§]	CD15 [§]	CD20 [§]	CD2 [§]	ALK [§]	EBV [§] (LMP-1)
	Ig*	TCR*							
L1236 ^{&}	+	—	—	+	+	—	—	—	—
KM-H2 [#]	+	—	—	+	+	—	—	—	—
L591 [#]	+	—	+ IgA λ	+	+	+	+	—	+
L428 [#]	+	—	—	+	+	—	—	—	—
Raji ^{&}	+	—	+	—	n.a.	+	—	—	+
Jurkat ^{&}	—	+	—	n.a.	n.a.	—	+	—	—

* Nachweis durch PCR

+ exprimiert

§ immunzytologische Untersuchung

~~§~~ nicht exprimiert

Canellos et al 1998

n.a. nicht analysiert

& nicht publizierte Daten

3.2. Immunhistologie

Wir untersuchten mit Hilfe der Immunhistologie die oben genannten Zelllinien auf die Expression der Transkriptionsfaktoren Oct-1, Oct-2 und des Ko-Faktors OCA-B. Dafür wurden Cytospins der Zelllinien nach einer Acetonfixierung mit Antikörpern gegen Oct-1, Oct-2 oder OCA-B für 45 min. inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde mit der APAAP Technik nachgewiesen (Cordell et al. 1984). Nach der Farbentwicklung mit Naphthol-AS-Biphosphat und Neufuchsin erfolgte zur Darstellung der Kerne eine Gegenfärbung mit Hämalaun. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Präparate gründlich mit TBS Puffer gewaschen. Materialien:

Antikörper: Anti-Oct-1 (sc-8024) (Santa Cruz, USA), monoklonal, Verdünnung 1:50;

Anti-Oct-2 (sc-233) (Santa Cruz, USA), polyklonal, Verdünnung 1:1000;

Anti-OCA-B (sc-955) (Santa Cruz, USA), polyklonal, Verdünnung 1:1000;

TBS Puffer: in 5 l H₂O wurden

34,25 g TRIS HCl,

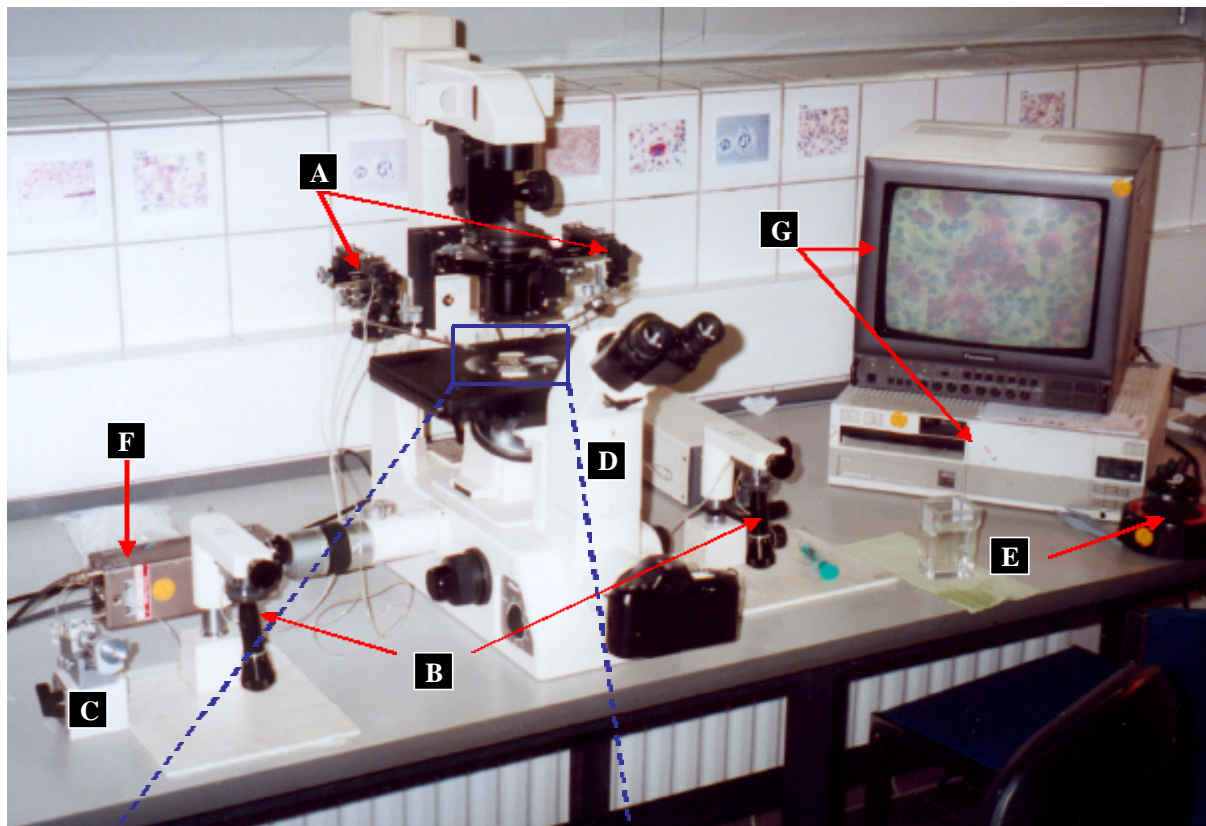
4,5 g TRIS Base und

43,9 g NaCl gelöst (pH-Wert von 7,4 – 7,6).

3.3. Einzelzellisolierung

Für die technische Umsetzung der Einzelzellisolierung stand uns eine hydraulische Mikromanipulationsanlage (MO-188, Nikon-Narishige, Tokio, Japan) zur Verfügung, welche an ein inverses Lichtmikroskop (Diaphot 300 Nikon, Tokio, Japan) montiert war (Abb. 5).

Abbildung 5 Versuchsaufbau für die Einzelzellisolierung



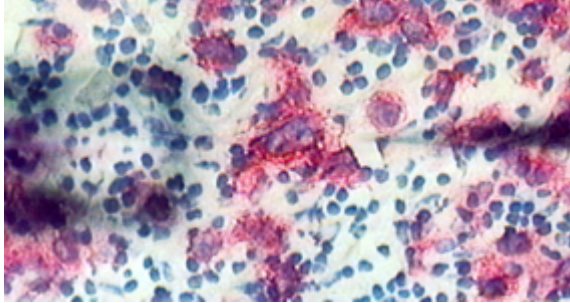
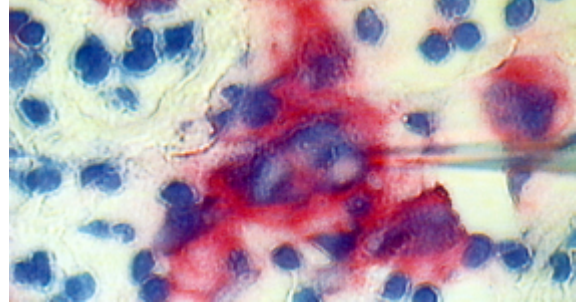
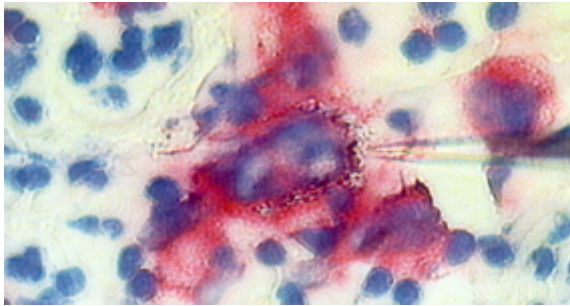
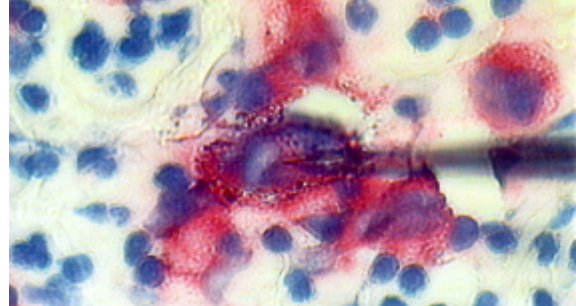
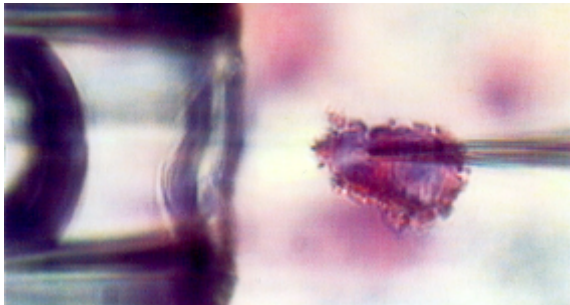
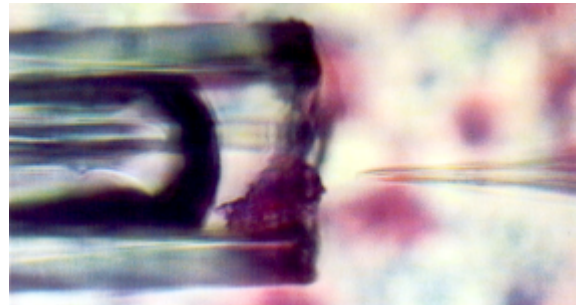
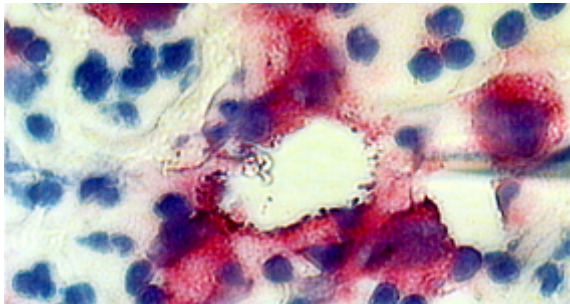
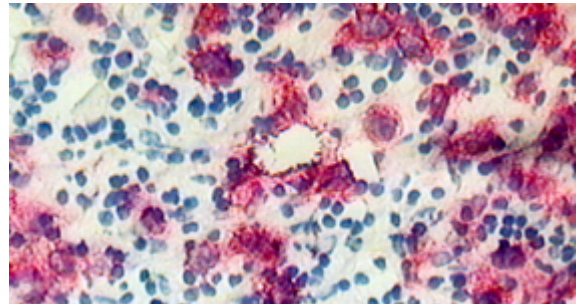
- A Mikromanipulationsanlage mit offener Kapillare (links) und geschlossener Kapillare (rechts)
- B Joysticks für die Steuerung der jeweiligen Kapillare
- C Luftreservoir zum Druckausgleich in der offenen Kapillare
- D inverses Mikroskop
- E Minizentrifuge
- F Videokamera
- G Monitor und Videoprinter

Die Einzelzellisolierung erfolgte an 8–9 µm dicken Schnitten aus Gefriergewebe. Zur eindeutigen Identifizierung der HRS Zellen wurde eine Färbung mit dem CD30 spezifischen Antikörper Ber-H2 (eigene Herstellung des Institutes für Pathologie) durchgeführt. Dessen Bindung wurde nach 45 min. Inkubation mit Hilfe der APAAP Technik nachgewiesen. Für die Farbentwicklung wurden Naphthol-AS-Biphosphat und Neufuchsin benutzt. Um einen Abbau der Zell-DNA zu verhindern, war der TBS Puffer, mit dem zwischen allen Inkubationsschritten gründlich gewaschen wurde, mit Heringssperma DNA (1 mg/ml) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1 mM) versetzt. Die Schnitte wurden nach der Färbung in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert und zum Schutz vor Luftfeuchtigkeit zusammen mit kristallinem CaCl_2 bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren. Kurz vor der Einzelzellisolierung wurde der zu untersuchende Gefrierschnitt langsam aufgetaut, danach in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert und anschließend mit PBS Puffer (PBS Dulbecco's ohne Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ und HCO_3^-) (Life Technologies, Raisley, Großbritannien) überschichtet.

Die aufgrund der roten Färbung (CD30) und ihrer Morphologie identifizierbaren HRS Zellen (Abb. 6a+b) wurden mit Hilfe einer spitzen Kapillare aus dem Gewebeverband freipräpariert und anschließend vom Objektträger gelöst (Abb. 6c+d). Mit der Spitze der Kapillare wurde die Zelle aufgespießt und in einer offenen, mit geringen Mengen des Überschichtungspuffers (ca. 0,1 µl) gefüllte Kapillare abgelegt (Abb. 6e+f). Die nun in der offenen Kapillare befindliche Zelle wurde für die PCR in ein Reaktionsgefäß, das mit 10 µl Proteinase K (0,1 mg/ml) (Qiagen, Hilden, Deutschland) gefüllt war, durch das Abbrechen der Pipettenspitze überführt. Zur Gewährleistung einer gründlichen Vermischung von Proteinase K und dem Inhalt der offenen Pipettenspitze (Zelle + Puffer) wurden die PCR Reaktionsgefäße anschließend in einer Minizentrifuge (DW 41, Qualitron, Korea) kurz anzentrifugiert. Zur Freisetzung der DNA wurden die Zellen in diesem Gemisch eine Stunde bei 50°C verdaut.

Die Areale mit den zu isolierenden HRS Zellen wurden vor und nach der Zellisolierung mit einer Video-Dokumentationsanlage (CP 100 E, Mitsubishi, Tokio, Japan) dokumentiert (Abb. 6a, b, g, h). Als Negativkontrolle entnahmen wir nach jeder zweiten isolierten Zelle dem Überschichtungspuffer 0,2 µl und führten diese Flüssigkeit ebenfalls der Einzelzell-PCR zu.

Abbildung 6 Darstellung der Einzelzellisolierung einer HRS Zelle

A**B****C****D****E****F****G****H**

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde festgelegt:

- den Überschichtungspuffer nach jeder zweiten Negativkontrolle auszuwechseln
- die spitze Manipulationspipette (so sie nicht vorher beschädigt wurde) nach jeder zweiten Negativkontrolle auszuwechseln
- die offene Pipette nach jeder Zellisolierung und jeder Pufferprobe auszuwechseln
- während der Zellisolierung Handschuhe zu tragen.

Die Pipetten fertigten wir mit Hilfe eines Micro-Pipette-Pullers (PB-7, Narishige, Tokio, Japan) aus Kapillaren der Größe GD-1 1x90 mm (Narishige, Tokio, Japan) an. Diese wurden in speziell angefertigten Behältern zwei Stunden bei 200°C in einem Heißluftschrank (UT-12, Heraeus-Instruments, Hanau, Deutschland) sterilisiert.

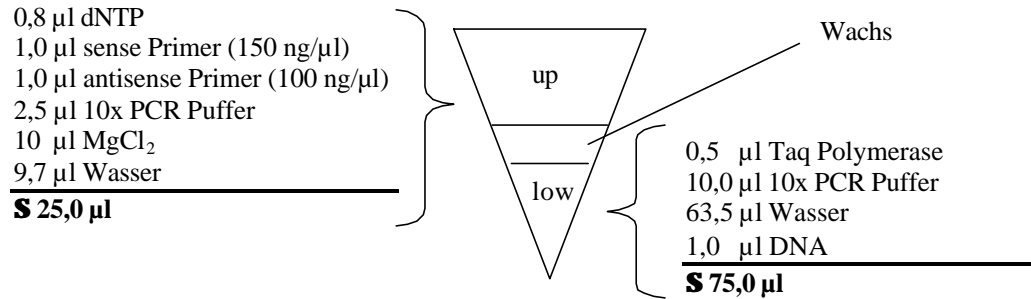
3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der PCR erfolgten in sogenannten „clean benches“ (Steril-Bank), welche das Risiko von DNA Kontaminationen reduzieren. Dieser Effekt wird während der Benutzungszeit über ein Umluftsystem und außerhalb der Benutzungszeit durch UV-Bestrahlung (260 nm) erreicht. Dem gleichen Ziel diene eine weitere Einteilung dieser „clean benches“ in „buffer bench“ (nur zum Pipettieren von Puffer, dNTPs, DNA Polymerase, Primern und MgCl₂) und „DNA bench“ (nur zum Pipettieren der DNA). Für die PCR benutzten wir folgende Materialien:

AmpliTaq® DNA Polymerase (4 U/μl) (Perkin Elmer, USA),
 Primer (Konzentrationen im jeweiligen Abschnitt) (Metabion, München, Deutschland),
 dATP, dGTP, dTTP, dCTP (200 mM) (Boehringer Mannheim, Deutschland),
 MgCl₂ (25 mM) (Perkin Elmer, USA),
 10 x PCR Puffer (Perkin Elmer, USA) und
 steriles, entmineralisiertes Wasser.

Für die Untersuchungen des Promotors der umgelagerten VH-Elemente im Ig Gen und des Eμ Enhancers benutzten wir die „Hot Start PCR“. Hierbei kann durch die räumliche Trennung der Primer und dNTPs von der DNA vor der ersten „Annealing“-phase der PCR deren Sensitivität und Spezifität erhöht werden. Dafür wurde im PCR Gefäß nach dem Pipettieren der DNA-haltigen „low“ Phase eine Wachskugel für 5 min. bei 80°C geschmolzen (Abb.7). Nach dem Erkalten der Wachsschicht wurde die „up“ Phase dazugegeben.

Abbildung 7. Aufteilung der Reagenzien bei der „Hot-Start PCR“



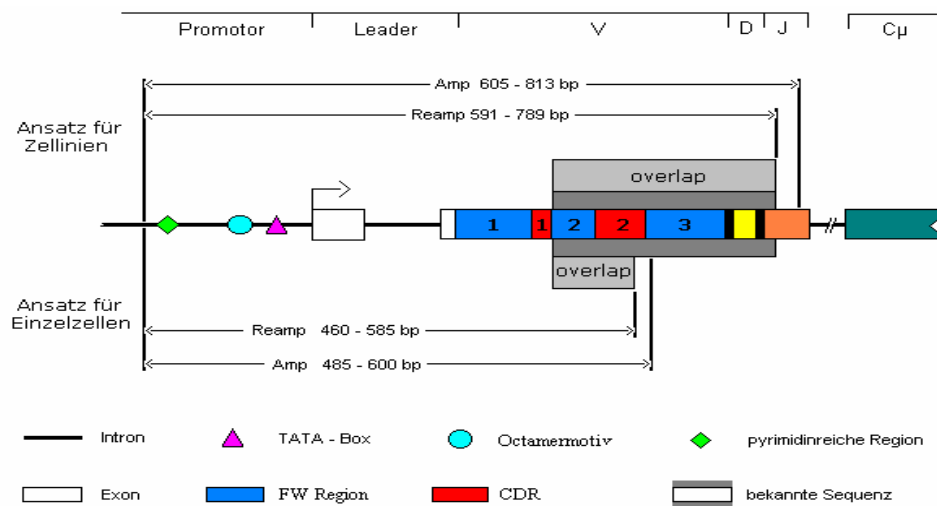
Zur Erhöhung der Sensitivität etablierten wir zusätzlich eine sogenannte „semi-nested“ (halb geschachtelt) PCR. Bei diesem Ansatz wird nach der Primäramplifikation der DNA mit einem „sense“ (Sinn-) und einem „antisense“ (Gegensinn-) Primer, 1 µl des Amplifikates mit dem gleichen „sense“ Primer und einem neuen, auf dem amplifizierten DNA Abschnitt weiter innen liegenden „antisense“ Primer reamplifiziert. Für die Reamplifikation wurde auf die „Hot Start Technik“ verzichtet, so dass sich die Reagenzien der „up“ und „low“ Phase einfach addieren. Die Amplifikationen erfolgten in Thermoblockcyclern PE9600 oder PE9700 (PE Applied Biosystems, USA).

3.4.1. *IgH Promotor PCR*

Aufgrund des komplexen Aufbaus des Ig Gens war es unmöglich, die verschiedenen umgelagerten VH-Promotoren mit ein und demselben Primersset zu amplifizieren. Da die ca. 40 verschiedenen VH-Elemente des IgH Genlokus jeweils einen eigenen Promotor besitzen (Abb. 2), waren wir gezwungen spezifische „sense“ Primer zu suchen. Dazu ermittelten wir für jeden Fall aus der Sequenz des umgelagerten Ig Gens der HRS Zellen (nicht publizierte Daten; Marafioti et al. 2000; Jox et al. 1999) die entsprechende Keimbahnsequenz (79). In den Promotor dieser Keimbahnsequenz plazierten wir den „sense“ Primer, ca. 100 bis 200 bp vor das Octamermotiv.

Um sicherzustellen den Promotor des umgelagerten Ig Gens zu amplifizieren, benutzten wir als „antisense“ Primer einen bereits etablierten, für das J-Segment spezifischen Konsensusprimer (LJH) (Marafioti et al. 2000). Zur Erhöhung der Sensitivität führten wir mit einem weiteren ebenfalls für das J-Element spezifischen Konsensusprimer (VLJH) (Marafioti et al. 2000) eine „semi nested“ PCR durch. In den Hodgkinzelllinien entstanden mit diesem Ansatz 591 – 789 bp (Basenpaare) große Produkte (Abb. 8).

Abbildung 8 Darstellung des Primerdesigns für die IgH Promotor PCR



Der Versuch, dieses Konzept auf das Gewebematerial der Hodgkin Fälle zu übertragen, misslang, da wegen der geringen DNA Menge einzeln isolierter HRS Zellen bisher nur gute Ergebnisse bei PCR Produkten bis 500 bp zu erzielen waren. Deshalb modifizierten wir den o.g. Ansatz für das Gewebematerial der Hodgkin Fälle. Den „sense“ Primer platzierten wir im IgH Promotor wie oben beschrieben. Für die „antisense“ Primer benutzten wir hochmutierte Regionen (CDR2/FW3) der fallspezifischen IgH Sequenz (Marafioti et al. 2000). Die so gewonnenen Produkte variierten je nach Fall in ihrer Größe zwischen 460 und 585 Basenpaaren (Abb. 8). Zur Erhöhung der Spezifität der „sense“ und „antisense“ Primer führten wir umfangreiche Recherchen in allen bekannten Datenbanken (79) durch. Nur die Primer mit den geringsten Homologien zu anderen VH-Segmenten und damit höchsten Spezifität zu der gesuchten Sequenz wurden in der nachfolgenden PCR verwandt. Eine Kontrolle unseres Ansatzes erfolgte nach Auswertung der Sequenzen durch die Überlappung von mindestens 18 bp des untersuchten Bereiches mit der uns bekannten Sequenz (Marafioti et al. 2000). Dieser Überlappungsbereich enthielt mindestens zwei fallspezifische Mutationen. Für die Untersuchung des Promotors des umgelagerten IgH Gens der Hodgkinzelllinie L1236 etablierten wir die PCR nach dem Schema der Fälle.

In Tabelle 3 sind für jeden Fall bzw. jede Zelllinie die Sequenzen der Primer sowie die spezifischen „Annealing“-Temperaturen und MgCl₂-Konzentrationen für Amplifikation und Reamplifikation dargestellt. Die PCR erfolgte nach dem Programm:

- 1 x 2 min. Denaturierung 96°C;
- 5 x je 15 sec. Denaturierung 96°C, 150 sec. Annealing, 40 sec. Extension 72°C;
- 35 x je 15 sec. Denaturierung 96°C, 60 sec. Annealing, 40 sec. Extension 72°C;
- 1 x 10 min. Extension 72°C, dann Kühlung auf 5°C.

3.4.2. Eμ Enhancer PCR:

Für die Untersuchung der Octamer motive [ATTTGCGT (Pos.: 90927 – 90934) und ATTTTCAT (Pos.: 91200 – 91206) Accession No.: X97051] im Eμ Enhancer wurde eine „semi nested“ PCR mit folgenden Primern etabliert:

	Sequenz (5'-3')	Position (AccNo.: X97051)	Produktgröße
sense (100 ng/μl)	ACA GCA GGT GGC AGG AAG	90775 - 90792	527 bp
antisense (150 ng/μl)	AAA ATG AAG GCC ACT CTA TCA G	91301 - 91280	
sense (100 ng/μl) (Reamplifikation)	CAC CGC GAG AGT CTA TTT TAG G	90798 - 90819	504 bp

MgCl₂ wurde in beiden Runden in einer Konzentration von 2,5 mM eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit dem Programm:

- 1 x 2 min. Denaturierung 96°C;
- 5 x je 15 sec. Denaturierung 96°C, 120 sec. Annealing 60°C, 60 sec. Extension 72°C ;
- 35 x je 15 sec. Denaturierung 96°C, 60 sec. Annealing 56°C, 60 sec. Extension 72°C;
- 1 x 10 min. Extension 72°C, dann Kühlung auf 5°C.

Die Reamplifikation erfolgte bis auf die Annealingtemperaturen (je 60°C) mit dem gleichen Programm.

Tabelle 3. Bedingungen und Primer der IgH Promotor Polymerasekettenreaktion

Fall/ Zelllinie	Annealing °C		MgCl ₂ mM	sense Primer (5' – 3') (150 ng/μl)	antisense Primer (5' – 3') (100 ng/μl)
1	62	58	2	GTA CAG CTG ATG TGG CAT CTG	CGT GGA TTC GTC CGC TAC
	62	62	2	GTA CAG CTG ATG TGG CAT CTG	TGT GCG TAG TTT GAT GTA CCG
2	63	59	2,5	CTG CTC CTC ACC ACA GAT GC	AGT GTG AGG ACC ACC CGG
	64	63,5	2	CTG CTC CTC ACC ACA GAT GC	TGT GTC CTT GGT TAT GGT GAG G
3	61	57,5	2,5	TTA TTA CCA ATC TCC CCC AGG	GAT GGG CTG TCT TCT TGG TG
	61	61	2,5	TTA TTA CCA ATC TCC CCC AGG	GTC TCT GGA GAT GGT GAG GC
4	61,5	57,5	2,5	TTA TTA CCA ATC TCC CCC AGG	TGG ATT TGT CTC AGA TGC
	61,5	61,5	2,5	TTA TTA CCA ATC TCC CCC AGG	TGC ATA TGT GAC GAC ACT TCC
5	65	58	1,5	TAT CAC AGA TCT CCC CGA GG	CAG AGT CTG CGT AGT ATG TGG C
	65	65	1,5	TAT CAC AGA TCT CCC CGA GG	GTG GCG AGA CTA CTT CCA CTC
6	64	58	2,5	GGA GAC TTT CAT CTG CAC TGG	AGT AGT ATG TGG TAC CAC CGC C
	61	61	2,5	GGA GAC TTT CAT CTG CAC TGG	GAC CCA GGT CAT GTT ATT GC
7	61,5	57,5	2,5	TTA TTA CCA ATC TCC CCC AGG	CTG GTG ACG GTG AAT CGA C
	61	61	2	TTA TTA CCA ATC TCC CCC AGG	AAT CGA CCC ACG ACA GAG TC
8	60	56	2,5	ACT TCA TCT GCC CTG AGC C	TTG CAA ACA GCG TCT TCT TG
	60	60	2,5	ACT TCA TCT GCC CTG AGC C	TCT GCA GAT GGT GAA TCG G
9	61	57	2,5	CCT CCT TCC AGG GAG AGC	TTC ACA GAC ACA AGT TGC AGG
	61	61	2,5	CCT CCT TCC AGG GAG AGC	TGT AGT CGG TGG TGC TAG TCC
L1236	63	57	2,5	TGG CAG ATG GGA CAT CTA TC	GAA CTT CTC TGC GCA CAT TG
	63	63	2,5	TGG CAG ATG GGA CAT CTA TC	CAA GGC CTT GTC CAC GAG
KM-H2	63	57	2,5	ACT TCA TCT GCC CTG AGC C	TGA GGA GAC GGT GAC C
	63	63	2	ACT TCA TCT GCC CTG AGC C	GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG
L428	63,5	56	2,5	CTG TAG ACT CCT CCC TTC AGG	TGA GGA GAC GGT GAC C
	64	64	2,5	CTG TAG ACT CCT CCC TTC AGG	GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG
L591	62	56	2	GCC TCT CCA TGC TTG GGG GTT TAC C	TGA GGA GAC GGT GAC C
	63	63	2	GCC TCT CCA TGC TTG GGG GTT TAC C	GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG
	5 x	35 x			

Normal: Primäramplifikation

Fett: Reamplifikation

3.5. Sequenzanalysen

Alle PCR Produkte wurden in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit einem Gel-Extraktionskit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Amplifikate der IgH Promotor PCR und der E μ Enhancer PCR wurden im Anschluss daran mit den Primern der Reamplifikation direkt sequenziert. Alle RT PCR Produkte und die Amplifikate der IgH Promotor PCR, deren direkte Sequenzierung keine eindeutige Sequenz zur Folge hatte, wurden mit Hilfe eines Plasmid Miniprep Kits (BIO-RAD, Hercules, USA) kloniert und anschließend sequenziert.

Die Sequenzreaktion von beiden Seiten erfolgte mit Hilfe eines DNA Sequenzierungskits (Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit, Applied Biosystems, Deutschland) nach dem Kettenabbruchverfahren. Die Sequenzreaktionsprodukte wurden in einem 8%-igen Sequenzpolyacrylamidgel aufgetrennt und von einem Sequenzautomaten (ABI 377 Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) analysiert.

Die so entstandenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Sequence Navigator[®] Programmes (Perkin Elmer, Germany) ausgewertet. Anschließend verglichen wir zum Ausschluss von Kontaminationen, zum Nachweis der Klonalität und zur Unterscheidung von stillen Mutationen, Austauschmutationen und sogenannten „cripling Mutations“ (Stopp-Kodons und Leserasterverschiebungen) unsere Sequenzen mit allen publizierten sowie unseren eigenen DNA Sequenzdaten (79).

3.6. Antigenselektion

Das IgH Gen der Hodgkinzelllinien L1236, KM-H2, L428 und L591 und der neun Fälle des klassischen Morbus Hodgkin untersuchten wir auf Zeichen einer Antigenselektion. Der kodierende VH-Bereich (FW1 – FW3) der Hodgkinzelllinien und –fälle wurde mit der entsprechenden Keimbahnsequenz verglichen. Das daraus entstandene Verhältnis der Häufigkeit von Austauschmutationen (R) zu stillen Mutationen (s) bewerteten wir mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden.

In Methode I wird das R/s Verhältnis der CDR und der FW-Region in Beziehung gesetzt. Eine Sequenz gilt als antigenselektiert, wenn das R/s Verhältnis der CDR $> 2,9$ und das R/s Verhältnis der FW-Regionen < 1.5 beträgt (Tamaru et al. 1995). In Methode II liegt der Aussage ausschließlich das R/s Verhältnis in den FW-Regionen zugrunde. Nach diesem Schema ist die Antigenselektion bei einem R/s Verhältnis < 1.6 erfüllt (Klein et al. 1998).

3.7. Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT PCR)

Aus den oben genannten Hodgkinzelllinien wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) Gesamt RNA nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. 1 µg der Gesamt RNA Extrakte wurde auf das Vorhandensein von Ig m-RNA und m-RNA der Transkriptionsfaktoren Oct-1, Oct-2 und des Ko-Faktors OCA-B untersucht. Die RT PCR wurde mit dem RNA PCR Core Kit (Perkin Elmer) nach dem Schema des Herstellers durchgeführt. Der RT Schritt erfolgte in allen Untersuchungen mit einem identischen 20 µl Ansatz. In diesem verwendeten wir:

- 1 µl Reverse Transkriptase (U/µl) (Perkin Elmer, USA),
- 1 µl RNase Inhibitor (U/µl) (Perkin Elmer, USA),
- 1 µl Random Hexamer Primer (U/µl) (Perkin Elmer, USA),
- je 2 µl dATP, dGTP, dTTP, dCTP (200 mM) (Perkin Elmer, USA),
- 4 µl MgCl₂ (25 mM) (Perkin Elmer, USA),
- 2 µl 10 x Puffer (Perkin Elmer, USA),
- 2 µl DEPC Wasser und
- 1 µl Gesamt RNA (1 µg/µl).

Im nachfolgenden RT-Schritt:

- 1 x 10 min. inkubieren bei 25°C;
- 1 x 30 min. Reverse Transkription bei 42°C;
- 1 x 5 min. Denaturierung bei 99°C und 5 min. Kühlung bei 5°C,

wurde die RNA in copy-DNA umgeschrieben und die Enzyme anschließend denaturiert.

Wir benutzten die Thermocycler PE9600 oder PE9700 (PE Applied Biosystems, USA).

3.7.1. Immunglobulin Gentranskripte

Für den Nachweis der m-RNA umgelagerter Ig Gene wurde eine bereits etablierte „nested“ (geschachtelt) PCR benutzt (Marafioti et al. 2000). Die Primäramplifikation erfolgte mit sechs familienspezifischen „sense“ Primern im FW1 Bereich (FR1FS) und einem JH spezifischen Konsensus „antisense“ Primer (LJH). 6 µl des Primäramplikates wurden zum Nachweis spezifischer Ig Produkte in 6% Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Reamplifikation erfolgte mit sechs weiteren familienspezifischen „sense“ Primern im FW2 Bereich (FR2FS) und einem anderen JH Konsensus „antisense“ Primer (VLJH).

Für den Ansatz benutzten wir je PCR Gefäß:

0,5 µl (4 U/µl) AmpliTaq[®] DNA Polymerase (Perkin Elmer, USA),
 je 1,0 µl Primer (Konzentration s.u.) (Metabion, Deutschland),
 4,0 µl MgCl₂ (25 mM) (Perkin Elmer, USA),
 8,0 µl 10 x PCR Puffer (Perkin Elmer, USA) und
 65,5 µl DEPC Wasser.

Primer:

Primäramplifikation	Reamplifikation
Sequenz 5' – 3'	Sequenz 5' – 3'
<i>sense</i>	<i>sense</i>
FR1FS (300 ng/µl)	FR2FS (200 ng/µl)
VH1 CCT CAG TGA AGG T(CT)T CCT GCA AGG	FR2.1 TGG GTG CGA CAG GCC CCT GG
VH2 GTC CTG CGC TGG TGA AA(GC) CCA CAC A	FR2.2 TGG ATC CGT CAG CCC CCA GG
VH3 GGG GTC CCT CAG ACT CTC CTG TGC AG	FR2.3 TGG GTC CGC CAG GCT CCA GG
VH4 GAC CCT GTC CCT CAC CTG C(AG)C TGT C	FR2.4 TGG RTC CGS CAG CCC CCA GG
VH5 AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG A(AG)GA	FR2.5 TGG GTG CGC CAG ATG CCC GG
VH6 ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G	FR2.6 TGG ATC AGG CAG TCC CCA TCG
<i>antisense</i>	<i>antisense</i>
LJH (100 ng/µl)	VLJH (200 ng/µl)
TGA GGA GAC GGT GAC C	GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG

Die Primäramplifikation erfolgte mit dem Programm:

1 x 2 min. Denaturierung 96°C;
 5 x je 15 sec. Denaturierung 96°C, 30 sec. Annealing 63°C, 30 sec. Extension 72°C ;
 35 x je 15 sec. Denaturierung 96°C, 30 sec. Annealing 57°C, 30 sec. Extension 72°C;
 1 x 10 min. Extension bei 72°C, dann Kühlung auf 4°C.

Für die Reamplifikation wurde das gleiche Programm mit Ausnahme der Annealingtemperaturen (je 63°C) benutzt.

3.7.2. Oct-1 RT PCR

Für die Analyse der gesamten 2229 bp langen Oct-1 m-RNA wurde die Sequenz in drei Teilabschnitte untergliedert: I (5'-Bereich); II (Mittelbereich); III (3'-Bereich). Diese

überlappten jeweils soweit, dass die gesamte Sequenz sicher dargestellt werden konnte.

Für den Ansatz benutzten wir je PCR Gefäß:

0,5 µl (2U) AmpliTaq[®] DNA Polymerase (Perkin Elmer, USA),
 je 1,0 µl Primer (100ng/µl) (Metabion, München, Deutschland),
 4,0 µl MgCl₂ (25 mM) (Perkin Elmer, USA),
 8,0 µl 10 x PCR Puffer (Perkin Elmer, USA) und
 65,5 µl DEPC Wasser;

mit den Primern:

		Sequenz (5'–3')	Position (Acc.No.: X13403)	Produktgröße
I	<i>sense</i>	CAG CAG CAG CAG ACT CAA G	40 – 58	901 bp
	<i>antisense</i>	GTC TTG GCA AAC TGC TCA AG	940 – 921	
II	<i>sense</i>	GCC CAG TGA CCT TGA GGA G	902 – 920	719 bp
	<i>antisense</i>	ACG TGA CTG CTG AGG AAG	1620 – 1602	
III	<i>sense</i>	CAC AGC AAC CGT GAT TTC C	1571 – 1589	748 bp
	<i>antisense</i>	GCT TCT GGC AGC CCA GC	2318 – 2302	

zu folgenden Bedingungen:

1 x 2 min. Denaturierung 95°C;
 40 x je 40 sec. Denaturierung 95°C, 40 sec. Annealing 60°C, 45 sec. Extension 72°C;
 1 x 10 min. Extension 72°C; dann Kühlung auf 4°C.

3.7.3. Oct-2 RT PCR

Für die Analyse der 1434 bp großen Oct-2 m-RNA amplifizierten wir ein Segment von 534 bp. Dieses erfasste die komplette POU-Domäne und ermöglichte zusätzlich eine Unterscheidung der verschiedenen „Splice“-Produkte.

Als Ansatz je PCR Gefäß benutzten wir:

0,5 µl (2U) AmpliTaq[®] DNA Polymerase (Perkin Elmer, USA),
 je 1,0 µl Primer (100ng/µl) (Tib Mol Biol, Berlin, Deutschland),
 4,0 µl MgCl₂ (25 mM) (Perkin Elmer, USA),
 8,0 µl 10 x PCR Puffer (Perkin Elmer, USA) und
 65,5 µl DEPC Wasser;

mit den Primern:

	Sequenz (5' – 3')	Position (Acc.No.: X53468)	Produktgröße
<i>sense</i>	CCT GCT CAG TTC CTG CTA CC	433 – 452	545 bp
<i>antisense</i>	GAT GCT GGT CCT CTT CTT GC	978 – 959	

zu folgenden Bedingungen:

1 x 2 min. Denaturierung 95°C;

40 x je 40 sec. Denaturierung 95°C, 40 sec. Annealing 63°C, 40 sec. Extension 72°C;

1 x 10 min. Extension 72°C; dann Kühlung auf 4°C.

3.7.4. OCA-B RT PCR

Für die Analyse der 768 bp großen OCA-B mRNA amplifizierten wir ein Segment von 809 bp. Als Ansatz benutzten wir je PCR Gefäß:

0,5 µl (2U) AmpliTaq® DNA Polymerase (Perkin Elmer, USA),
 je 1,0 µl Primer (100 ng/µl) (Metabion, München, Deutschland),
 4,0 µl MgCl₂ (25 mM) (Perkin Elmer, USA),
 8,0 µl 10 x PCR Puffer (Perkin Elmer, USA) und
 65,5 µl DEPC Wasser;

mit den Primern:

	Sequenz (5' – 3')	Position (AccNo.: Z47500.emhum2)	Produktgröße
<i>sense</i>	CAT CCT GTC ACA GGC CAT G	81 – 99	809 bp
<i>antisense</i>	AGG ACT CAG GTG GGA GCC AC	871 – 889	

zu folgenden Bedingungen:

1 x 2 min. Denaturierung 95°C;

40 x je 40 sec. Denaturierung 95°C, 60 sec. Annealing 56°C, 40 sec. Extension 72°C;

1 x 10 min. Extension 72°C; dann Kühlung auf 4°C.

3.7.5. Semiquantitative RT PCR

Die Menge der vorhandenen mRNA von Oct-1, Oct-2 und OCA-B wurde in den Zelllinien L1236, KM-H2, L428, L591, Raji und Jurkat mit einer semiquantitativen RT PCR untersucht. Bei diesem Ansatz geht man davon aus, dass zu Beginn der PCR die Menge der Amplifikate exponentiell zunimmt und somit direkt von der Ausgangsmenge der untersuchten RNA abhängig ist. Nach 25 – 30 Amplifikationszyklen schließt sich dieser exponentiellen Phase eine Plateauphase an, in der die Produktmenge weniger von der ursprünglichen Anzahl der RNA Kopien vor der PCR als vielmehr von den PCR Bedingungen abhängig ist. Deshalb wurde nach dem RT Schritt jeder Transkriptionsfaktor mit den in 3.7.2. – 3.7.4. beschriebenen Ansätzen und Bedingungen, allerdings mit nur 28 Zyklen amplifiziert (Oct-1 nur 3'-Segment). Als Vergleichsmaßstab der Expressionsstärke amplifizierten wir für jeden Transkriptionsfaktor in den oben genannten Zelllinien parallel das Haushaltsgen (house-keeping gene) β -Aktin.

Die Quantifizierung stützt sich auf die Annahme, dass β -Aktin in den Hodgkinzelllinien gleich stark exprimiert ist. Deshalb wurde in der Gelelektrophorese die Stärke der Banden der Transkriptionsfaktoren durch visuellen Vergleich ins Verhältnis zu den Banden von β -Aktin gesetzt.

Primer:

	Sequenz (5' – 3')	Position (AccNo.: XM 004814.1)	Produktgröße
<i>sense</i> (100 ng/ μ l)	CAC GGC ATC GTC ACC AAC TG	290 – 309	384 bp
<i>antisense</i> (100 ng/ μ l)	TGA AGC TGT AGC CGC GCT C	674 – 656	