

Aus dem
Institut für Pathologie der Universität Köln
und dem
Institut für Geflügelkrankheiten des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Analyse von Hodgkin-Zellen in B-Zell chronischer lymphatischer
Leukämie mittels Einzelzell-PCR und Untersuchungen zur
Etablierung der Einzelzell-PCR von Zellen aus Formalin-
fixierten, in Paraffin eingebetteten Biopsaten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sabine Helmes
Tierärztin aus Porz am Rhein
Berlin, 1997

Journal-Nr. 2062

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Universitätsprofessor Dr. K. Hartung

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. G. Monreal

2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. M.-L. Hansmann

Tag der Promotion: 20.06.1997

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	Einleitung	1
1.1.	Molekularbiologische Untersuchung von Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen	1
1.2.	Immunglobulin-Genumlagerungen	4
1.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	7
1.4.	PCR-Amplifikation der Ig-Genumlagerungen	10
1.5.	Ziele der Arbeit	11
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Untersuchungsmaterial zur Etablierung der FR2 und FR3 V _H -Primer	12
2.1.1.	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	12
2.1.2.	Von Zytospins mittels Mikromanipulation isolierte Einzelzellen	12
2.1.3.	Untersuchungsmaterial	13
2.1.4.	Isolierung von DNS aus Lymphknotenpräparaten	13
2.1.4.1.	Entparaffinierung	13
2.1.4.2.	Proteinase K-Verdau	14
2.1.4.3.	DNS-Extraktion mit Phenol/Chloroform	14
2.1.4.4.	Bestimmung der Qualität und Quantität der aufgereinigten DNS	15
2.1.5.	Immunfärbungen	15
2.1.6.	B-Zell-Positivkontrollen	17
2.1.7.	Isolierung einzelner Zellen von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Morbus Hodgkin-Fällen	18
2.1.8.	Isolierung von Zellgruppen und Einzelzellen von einem Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten B-NHL	18
2.2.	Einzelzelluntersuchung eines NHL mit Hodgkinzellen	19
2.2.1.	Untersuchungsmaterial	19
2.3.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	20
2.3.1.	Verwendete Primer	20
2.3.2.	DNS-Amplifizierung	23
2.3.2.1.	Erste Runde-PCR mit FR1 Primern	24
2.3.2.2.	Zweite Runde- sowie Ganzschnitt-PCR mit FR1 Primern	25
2.3.2.3.	PCR mit FR2 V _H -Primern	26
2.3.2.4.	PCR mit FR3 V _H -Primern	26
2.3.2.5.	PCR mit β -Aktin-Primern	28

2.3.3.	Analyse der PCR-Produkte	28
2.4.	Sequenzierung	28
2.4.1.	Aufreinigung der PCR-Produkte	28
2.4.2.	Sequenzreaktion	29
2.4.3.	DNS-Sequenzierung	30
2.4.4.	Sequenzanalyse	30
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Untersuchung von mikromanipulierten Einzelzellen aus einem B-NHL mit HRS-Zellen auf Ig-Genumlagerungen	31
3.2.	Etablierung der FR2 VH- und FR3 VH-Primer zur Amplifikation von Ig-Genumlagerungen einzelner Zellen	37
3.3.	Untersuchung von aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben mikromanipulierten einzelnen HRS- und NHL-Zellen auf Ig-Genumlagerungen	40
3.3.1.	Untersuchung von aus immungefärbten Präparaten von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben mikromanipulierten HRS-Zellen auf Ig-Genumlagerungen	40
3.3.2.	Untersuchung des Einflusses der Immunfärbung auf die Amplifizierbarkeit der DNS	41
3.3.3.	Untersuchung mikromanipulierter HRS-Zellen aus Hämalaun gefärbten sowie aus immungefärbten und mit Hämalaun gegengefärbten Präparaten von Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe auf Ig-Genumlagerungen	43
3.3.4.	Untersuchung von mikromanipulierten Tumor-Zellgruppen und einzelnen NHL-B-Zellen auf Ig-Genumlagerungen	45
4.	Diskussion	48
4.1.	Molekularbiologische Untersuchung eines B-NHL mit Hodgkin-Zellen	48
4.2.	Etablierung der Einzelzell-PCR mikromanipulierter Zellen aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe	55
5.	Zusammenfassung/Summary	64
6.	Literaturverzeichnis	66
7.	Abkürzungen	76
8.	Anhang	77

1. EINLEITUNG

1.1. Molekularbiologische Untersuchung von Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen

Bei den malignen Lymphomen des Menschen werden einerseits der Morbus Hodgkin (MH) und andererseits die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterschieden. Während die NHL aus relativ homogenen Populationen klonaler Tumorzellen bestehen, ist der MH durch einkernige Hodgkin- und mehrkernige Reed/Sternberg- (HRS-) Zellen charakterisiert, die von lymphoiden und histiozytären Zellen umgeben werden. Die lymphoiden und histiozytären Zellen im MH gelten als reaktiv und polyklonal, während die HRS-Zellen, die weniger als 1% des befallenen lymphatischen Gewebes ausmachen, als Tumorzellen gelten. Nach der Rye-Klassifikation (Rye, 1965) werden nach rein morphologischen Kriterien vier Typen des MH unterschieden:

1. Lymphozytenreiche Form (LP, lymphocyte predominant)
2. Nodulär-sklerosierende Form (NS, nodular sclerosis)
3. Gemischtzellige Form (MC, mixed cellularity)
4. Lymphozytenarme Form (LD, lymphocyte depleted).

Im Gegensatz zum MH ist die Unterteilung der NHL wesentlich komplexer. Ein insbesondere in Europa weit verbreitetes Klassifikationsprinzip (Kiel-Klassifikation) geht davon aus, daß jeder lymphatische Tumor eine Ausgangszelle besitzt, die ihr Gegenstück im reaktiven lymphatischen Gewebe hat. So gibt es Lymphome, die sich von besonderen Keimzentrumzellen herleiten und nach der Ursprungszelle benannt sind. Ein weiteres Prinzip liegt in der Unterscheidung zwischen hoch- und niedrigmaligne.

In jüngster Zeit wurde eine neue Klassifikation, die sogenannte REAL-Klassifikation (revised european american lymphoma classification) ins Leben gerufen. Diese übernimmt weitgehend die Inhalte der Kiel-Klassifikation und ergänzt sie in einzelnen Details.

Obgleich morphologische Prinzipien zur Einteilung der malignen Lymphome wegweisend sind, werden heutzutage immunhistochemische Reaktionen nahezu routinemäßig ergänzend durchgeführt. Sie eröffnen die Möglichkeit, mit geeigneten monoklonalen Antikörpern zwischen B- und T-Zellen zu differenzieren und auch B-Zell-Immunglobuline (Ig) darzustellen. Letztere dienen zum Nachweis bestimmter Leicht- oder Schwereketten, die für Klonalität eines Prozesses sprechen.

Weiterhin werden vermehrt molekularbiologische Methoden zur Klassifikation und Klonalitätsbestimmung von Lymphomen herangezogen. So wurde zunächst die "Southern Blot Hybridisierung" (SBH) eingesetzt (Wu et al. 1990, Chen et al. 1991, Cossmann et al. 1991). Die Nachweisgrenze dieser Methodik liegt bei ca. 5% Tumorzellen im infiltrierten Gewebe. Seit einigen Jahren bietet sich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) in der Lymphomdiagnostik zum Nachweis von Ig- oder T-Zell-Rezeptor-Genumlagerungen an. Im Gegensatz zur SBH ist die PCR auch für Untersuchungen an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Zellen geeignet. Sie hat sich insbesondere zum Nachweis von klonalen Tumorzell-Proliferaten bewährt (Algara et al. 1993, Deane et al. 1991, Diss et al. 1993, Inghirami et al. 1993, Küppers et al. 1993a, McCarthy et al. 1990, Pan et al. 1994, Ramsamy et al. 1992, Reed et al. 1993, Segal et al. 1994, Wan et al. 1990, Yamada et al. 1989). Die Nachweisgrenze der PCR für klonale Proliferate ist vergleichbar der der SBH (Knowles 1993).

Ein entscheidender Nachteil der Anwendung der PCR zum Nachweis von Genumlagerungen in Zellpopulationen liegt darin, daß man die gefundenen Amplifikate keinen eindeutigen Zellformen zurechnen kann. Erst die Einführung von Einzelzellanalysen mit dem Nachweis einzelner umgelagerter Gene eröffnete die Möglichkeit, definierten Zellen Genamplifikate zuzuordnen (Küppers et al. 1993b). Mittels Mikromanipulation wurden einzelne Zellen aus immunhistochemisch gefärbten Präparaten isoliert. Diese Zellen wurden dann der Einzelzell-PCR zugeführt und Ig-Genumlagerungen nachgewiesen (Küppers et al. 1993b). Durch anschließende Sequenzanalyse war es möglich, die Basensequenz der Ig-Genumlagerungen der einzelnen Zellen zu ermitteln. Mit Hilfe dieser Technik gelang die nähere Analyse der Keimzentrumszellreaktion im normalen Immunsystem und der Nachweis von somatischen Hypermutation in bestimmten Keimzentrumszellen, sowie die Beurteilung

verwandtschaftlicher Beziehungen der Keimzentrumszellen untereinander (Küppers et al. 1993b). Diese Untersuchungen bilden die Basis zum Verständnis des komplexen Systems maligner Keimzentrumszell-Lymphome.

Die Einzelzell-PCR bot sich ebenfalls zur Untersuchung des MH an. Hierzu wurden HRS-Zellen aus Gefrierschnitten mit Hilfe der Mikromanipulation isoliert und auf Ig-Genumlagerungen untersucht. Es war so möglich, HRS-Zellen als B-Zellen und klonale Proliferate zu identifizieren (Küppers et al. 1994, Kanzler et al. 1996a, b). Durch den Nachweis von somatischen Mutationen wurde der Rückschluß auf die Keimzentrumsnatur der HRS-Zellen gezogen.

Die Methodik der Einzelzell-PCR hat eine Vielzahl weiterer Anwendungsbereiche. So ist das Thema der vorliegenden Arbeit die Untersuchung von HRS-Zellen, die in seltenen Fällen von NHL auftreten. In niedrigmalignen NHL wie der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) auftretende HRS-Zellen stellen eine Schlüsselkonstellation bei dem Verständnis des Verhältnisses zwischen MH und NHL dar. Bislang gibt es nur immunhistochemische Untersuchungen derartiger Fälle (Colby et al. 1981, Hansmann et al. 1989, Jaffe et al. 1994, Momose et al. 1992, Shin et al. 1993, Tsang et al. 1993, Williams et al. 1991). Es bietet sich daher an, die Einzelzell-PCR einzusetzen, um durch Sequenzvergleich umgelagerter Ig-Gene mögliche verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den HRS-Zellen und den Zellen des NHL zu analysieren.

1.2. Immunglobulin-Genumlagerungen

Das Immunsystem vollbringt die erstaunliche Leistung, Antikörper gegen fast alle vom Körper als fremd erkannten Antigene produzieren zu können. Eine genetisch festgelegte Kodierung dieser Antikörpervielfalt ist aufgrund der begrenzten Genzahl nicht möglich. Dreyer und Bennett (1965) stellten eine Hypothese auf, nach der die verschiedenen Regionen der Antikörper auf unterschiedlichen Genabschnitten liegen und beliebig miteinander verknüpft werden können. 1976 gelang Hozumi und Tonegawa der experimentelle Beweis des Vorkommens von somatischen Rekombinationen der Ig-Genabschnitte im Rahmen der B-Zell-Entwicklung.

Ein Antikörper besteht aus zwei schweren Ketten (H-Ketten, engl.: heavy = schwer) und zwei leichten Ketten (L-Kette, engl.: light = leicht). Es gibt zwei unterschiedliche Formen von Leichtketten, welche sich funktionell nicht unterscheiden (Kappa = κ und Lambda = λ). Eine Leichtkette besteht aus einem V-Segment (V, engl.: variable), einem J-Segment (J, engl.: junction = Verbindung) und einem C-Segment (C, engl.: constant), welche in der Keimbahnkonfiguration viele tausend Basenpaare (bp) voneinander getrennt sind und erst im Rahmen der B-Zell-Entwicklung miteinander verknüpft werden. Die Gensegmente für die Kappa-Leichtkette liegen auf Chromosom 2, es existieren 51 potentiell funktionelle V_{κ} -Gene (Schäble und Zachau, 1993) und fünf J_{κ} -Gene (Hieter et al. 1982). Von den auf Chromosom 22 liegenden Lambda-Gensegmenten sind mindestens 24 funktionelle V_{λ} -Gene bekannt (Williams und Winter 1993) sowie vier funktionelle J_{λ} -Gene (Vasicek und Leder 1990, Dariavach et al. 1987).

Die Antikörper werden nach der Struktur der konstanten Region ihrer Schwereketten in Klassen unterteilt, nämlich IgG, IgA, IgM, IgD und IgE, welche jeweils unterschiedliche Funktionen haben. So ist IgA der vorherrschende Antikörper auf Schleimhäuten, IgM ist der Antikörper der primären Immunantwort.

Die Schwereketten enthalten neben V-, J- und C-Segment noch zusätzlich ein D-Segment (D, engl.: diversity = Vielfalt) (Tonegawa 1983). Die Gensegmente liegen auf Chromosom 14, es gibt etwa 50 funktionelle V_H -Gene (Matsuda et al. 1993, Cook et al. 1994), etwa 30 D_H -Gene (Ichihara et al. 1988) sowie sechs J_H -Gene (Ravetch et al. 1981). Bei der Ig-Genumlagerung der schweren Kette (siehe Abb.1) wird zuerst ein D- mit einem J-Segment verknüpft, an diese erfolgt anschließend die Anlagerung

eines V-Segmentes (Waldmann 1987). Die Antikörperdiversität wird durch Hinzufügen (N-Nukleotide) oder Entfernen von Nukleotiden in den Verknüpfungsstellen der Gensegmente erhöht (Tonegawa 1983). Nach erfolgreicher Schwerekettenumlagerung wird eine V-J-Genumlagerung der Kappa-Leichtkette durchgeführt (Korsmeyer et al. 1981, Reth et al. 1985, Kubagawa et al. 1989). Ist die κ -Genumlagerung nicht funktionell, wird eine Genumlagerung auf dem korrespondierenden Allel versucht. Wenn keine funktionelle κ -Genumlagerung erreicht werden kann, erfolgt eine Genumlagerung im λ -Lokus (Korsmeyer et al. 1981).

Die Antigenbindung erfolgt in der variablen Region des Antikörpers. Diese kann in vier konservierte Gerüstregionen (FR, engl.: framework regions) und in drei gering konservierte, hypervariable oder Komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR, engl.: complementarity determining region) unterteilt werden (siehe Abb.1). Aufgrund ihrer Einzigartigkeit kann die Sequenz der CDR3 als "molekularer Marker" für einen B-Zell-Klon betrachtet werden. Daher kann die PCR-Analyse der Ig-Genumlagerungen einer B-Zell-Population (z.B. eines potentiell malignen Lymphoms) Aufschluß über die Klonalität geben.

Die V_H -, J_H -, V_K -, J_K -, V_λ - und J_λ -Genabschnitte werden in Familien eingeteilt, wobei die Basensequenz der Mitglieder einer Familie eine Homologie von mindestens 75% aufweisen muß. Es existieren sieben V_H -, sechs J_H -, sechs V_K -, fünf J_K -, zwölf V_λ - und fünf J_λ -Genfamilien.

Durch den Mechanismus der somatischen Hypermutation, welcher in den Keimzentren in den Lymphknoten abläuft, werden Punktmutationen (selten Insertionen und Deletionen) in umgelagerte V(D)J-Segmente mit einer geschätzten Mutationsrate von 10^{-3} Mutationen pro Basenpaar und Zellteilung eingeführt (McKean et al. 1984, Kocks und Rajewsky 1989). Die Spontanmutationsrate von Genen liegt dagegen bei 10^{-8} - 10^{-9} . Die Vielzahl der Antikörper wird so zusätzlich zu der durch die Genumlagerungen entstehende Diversität auf schätzungsweise 10^{14} Möglichkeiten erhöht (Sanz 1991).

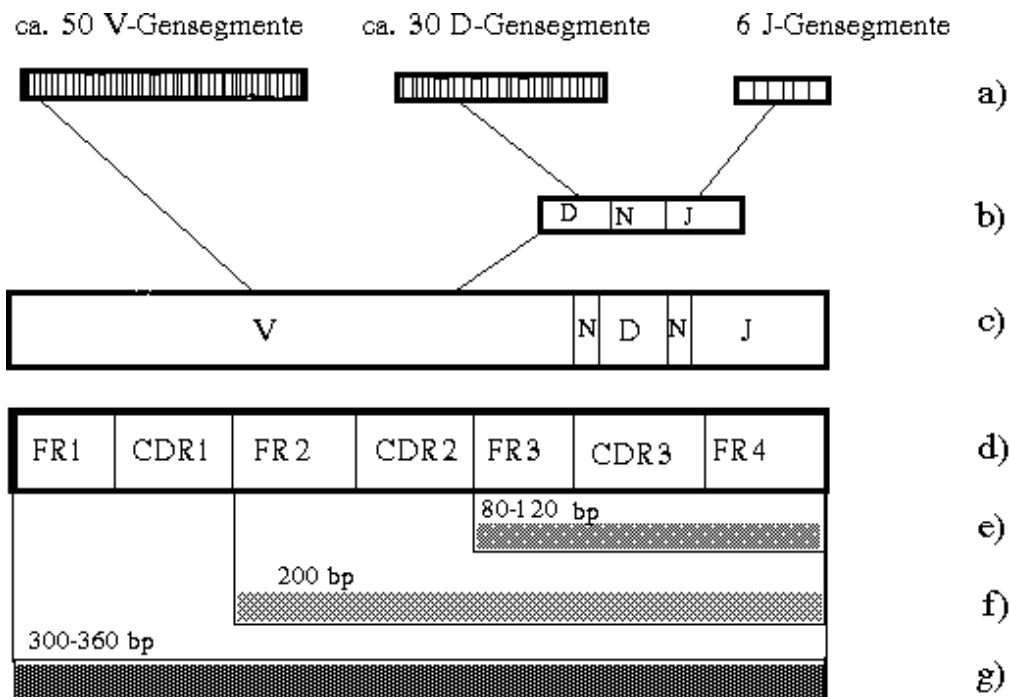


Abbildung 1: Genumlagerung der variablen Region der Ig-Schwerketten

- a) in der Keimbahnkonfiguration liegen die Gensegmente weit voneinander entfernt
- b) zuerst erfolgt die Verknüpfung eines D- mit einem J-Segment
- c) an das DJ-Segment wird ein V-Segment angelagert
- d) die variable Region der Ig-Schwerkettengene wird in vier Gerüstregionen (FR1-4) und drei hypervariable Regionen (CDR1-3) eingeteilt
- e) bei Verwendung von FR3 V_H -Primern hat das PCR-Produkt eine Länge von 80-120 bp
- f) bei Verwendung von FR2 V_H -Primern liegt die Länge des PCR-Produktes bei ca. 200 bp
- g) werden FR1 V_H -Primer eingesetzt, so hat das PCR-Produkt eine Länge von 300-360 bp.

1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik, für deren Entwicklung K.B. Mullis 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde (Erlich et al. 1988, Mullis und Falcoona 1987, Saiki et al. 1988), eröffnete der Molekularbiologie neue Wege. Es war nun möglich, schnell, zuverlässig und relativ kostengünstig gezielte Vervielfältigungen von Desoxyribonukleinsäure-Segmenten (DNS-Segmenten) vorzunehmen. Die neue Technik wird u.a. zur Pränataldiagnostik von Erbkrankheiten eingesetzt (Coutelle et al. 1989, Handyside et al. 1989, Wong et al. 1987)), in der Gerichtsmedizin (Higuchi et al. 1988, Li et al. 1988), zur Untersuchung von Onkogenen (Bos et al. 1987, Farr et al. 1988), in der Mikrobiologie zum Nachweis von bakterieller oder viraler DNS (Kwok et al. 1987, Ou et al. 1988, Brisson-Noel et al. 1989) sowie bei der Überwachung von Krebstherapien (Roth et al. 1989).

Der Mechanismus der DNS-Replikation, der bei der Zellteilung vorkommt, wird mit der PCR in vitro nachgeahmt. Die PCR läuft in drei sich wiederholenden Schritten ab (siehe Abb.2):

1. Denaturierung
2. Primer-Bindung (engl. = Annealing)
3. DNS-Synthese.

Bei der Denaturierung, welche in der Regel bei 95°C erfolgt, werden die DNS-Doppelstränge in als Matrizen dienende Einzelstränge aufgetrennt. In der nun folgenden Annealing-Phase lagern sich kurze Oligonukleotide (Primer, engl.: prime = vorbereiten) an die komplementäre Stelle des Ausgangsstranges an. Das zu amplifizierende DNS-Stück muß also von kurzen Segmenten mit bekannter Basensequenz zum Primer-Annealing flankiert sein. Die Temperatur dieses Schrittes ist von der Nukleotid-Zusammensetzung der Primer abhängig und muß experimentell für jeden Primer ermittelt werden. Das kurze Stück doppelsträngige DNS ist nötig, damit das Enzym DNS-Polymerase im nächsten Schritt den komplementären Strang an der DNS-Matrize entlang mit dem Primer als Ausgangspunkt synthetisieren kann. Die Synthese erfolgt stets in 5'-3'-Richtung. Der entstandene DNS-Doppelstrang wird in der folgenden Denaturierungsphase wieder getrennt und die doppelte Anzahl Matrizen steht bereit. Die Vervielfältigung erfolgt theoretisch annähernd exponentiell.

Wird eine sehr kleine DNS-Menge in einer PCR analysiert, so ist es nicht möglich, die für eine Gelelektrophorese notwendige Menge an PCR-Produkten in einer einfachen PCR-Analyse zu erhalten. Bei einer Erhöhung der Zyklenzahl über 55 fällt die PCR-Produktmenge deutlich ab. Dieses liegt an verschiedenen Faktoren, so u.a. am Verbrauch der Primer und dNTPs, am Aktivitätsverlust der DNS-Polymerase und der Degradation der DNS sowie an der Entstehung von Primer-Dimeren. Um diese Hindernisse zu umgehen, wird eine zweiphasige PCR durchgeführt. Die in den ersten Vermehrungszyklen erhaltenen PCR-Produkte werden zur weiteren Vermehrung in der zweiten Runde der Amplifizierung eingesetzt. Zusätzlich wird eine verschachtelte (engl. nested) PCR durchgeführt, die die Wahrscheinlichkeit, ungewollte Sequenzen zu vermehren, deutlich reduziert. Die in der zweiten Runde der Amplifizierung eingesetzten Primer liegen bei einer nested-PCR-Analyse innerhalb des ersten Primerpaares. Die erhaltenen PCR-Produkte sind damit kürzer als die der ersten Runde. Wird in der zweiten Runde der Amplifizierung nur ein Primer des Primerpaares gegen einen innerhalb des ersten liegenden Primer ausgetauscht, so bezeichnet man dieses als semi-nested-PCR (halbverschachtelte PCR) (Küppers et al. 1993b).

Das Klenow-Fragment der DNS-Polymerase aus dem Bakterium *Escherichia coli*, welches in den Originalprotokollen verwendet wurde (Saiki et al. 1985, Mullis et al. 1986, Mullis und Faloona 1987), hat sein Temperaturoptimum bei 37°C und ist nicht hitzebeständig. Aus diesem Grunde mußte es nach jedem Denaturierungsschritt neu in den Reaktionsansatz gegeben werden. Dieses Problem konnte durch die Einführung des Enzymes Taq DNS-Polymerase, welches aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wurde (Chien et al. 1976), gelöst werden (Saiki et al. 1988). Diese DNS-Polymerase hat ihr Temperaturoptimum bei 72°C, was die Stringenz der Reaktion deutlich erhöht, zusätzlich ist das Enzym hitzestabil bei 95°C.

Für die Spezifität der Reaktion sind neben der Annealing-Temperatur auch die MgCl₂- und dNTP-Konzentration, die Zeit der drei Grundschrte sowie die Zyklenzahl ausschlaggebend. Diese Parameter müssen für jeder PCR-Anwendung individuell ermittelt werden (Innis et al. 1990).

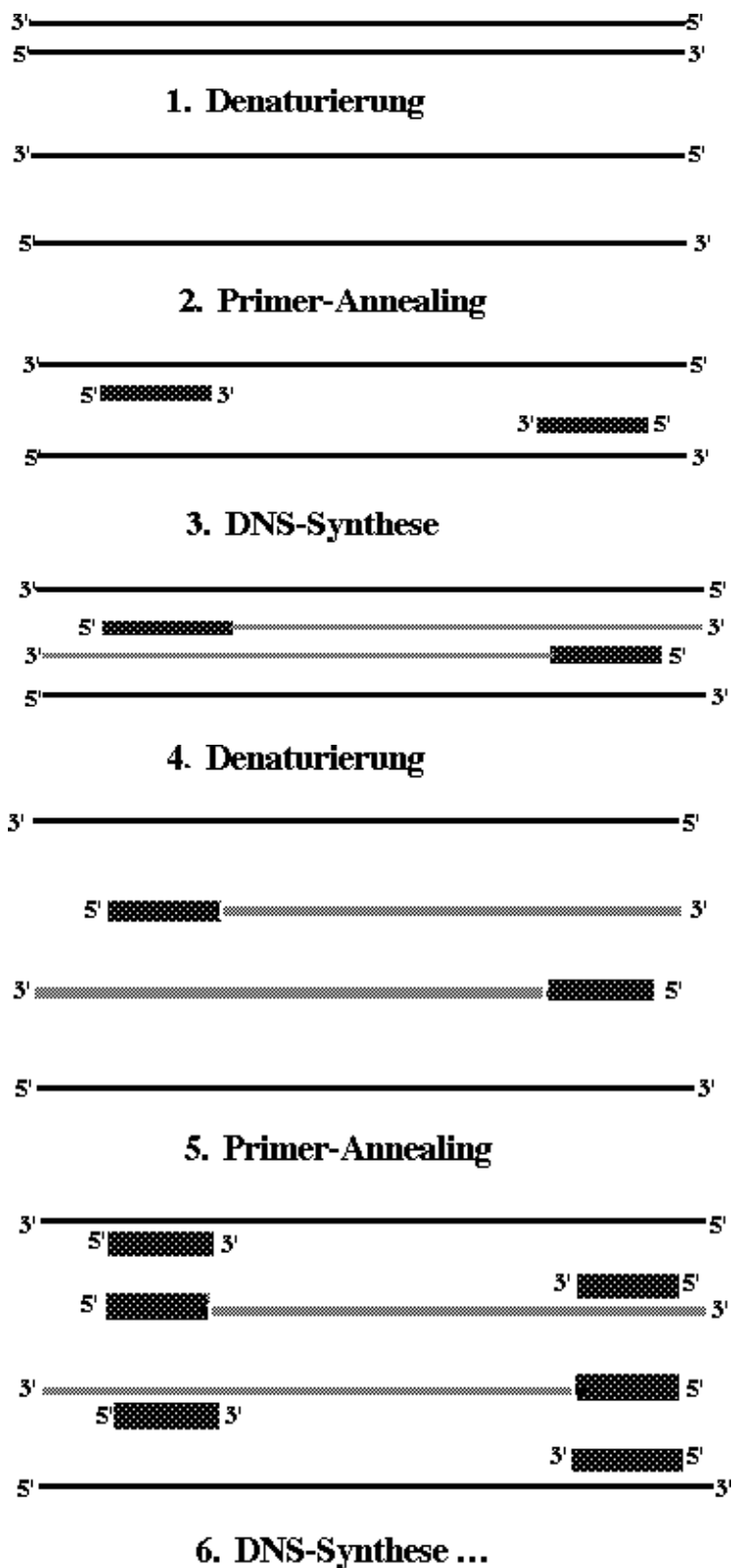


Abbildung 2: Schematische Darstellung der PCR

1.4. PCR-Amplifikation der Ig-Genumlagerungen

Bei den Ig-Genumlagerungen, die im Rahmen der B-Zell-Entwicklung durchgeführt werden, kommt es zu einer Verknüpfung von Gensegmenten, die in der Keimbahnkonfiguration viele tausend Basen voneinander getrennt sind (siehe Abb.1). Diesen Mechanismus macht man sich bei PCR-Analysen von Ig-Gensegmenten zunutze. Für diese PCR-Analysen werden Primer ausgewählt, die komplementär zu Genabschnitten der relativ hoch konservierten FR der Ig-Gene sind. Die von den Primern eingeschlossene Region ist bei nicht umgelagerten Ig-Genen mehrere Kilobasenpaare lang, so daß eine effiziente Amplifizierung nicht möglich ist. Erst bei erfolgter Ig-Genumlagerung entsteht ein Gensegment mit einer Länge von ca. 350 bp, das amplifiziert werden kann (siehe 1.2. Abbildung 1).

Viele Autoren wählen für die Amplifizierung der umgelagerten Ig-Schwerketten-Gensegmente einen Konsensus-Primer der V_H FR3 mit korrespondierenden Primern der FR4 (J_H) aus. Die von diesen Primern eingeschlossene CDR3-Region ist hoch variabel und stellt somit einen guten Marker für einen B-Zell-Klon dar (Yamada et al. 1989, Wan et al. 1990, Ramasamy et al. 1992, Reed et al. 1993, Diss et al. 1993, Delabie et al. 1994, Pan et al. 1994). In der Gelelektrophorese-Analyse der PCR-Produkte stellt sich ein B-Zell-Klon, da alle Zellen die gleiche Genumlagerung tragen, in einer scharfen Bande dar. Die PCR-Produkte eines reaktiven Prozesses sind dagegen verschieden lang und zeigen in der Gelelektrophorese ein unterschiedliches Laufverhalten.

Küppers et al. (1993a, 1993b, 1995) verwendeten familienspezifische Primer, welche in der FR1 liegen, zusammen mit den korrespondierenden FR4- (J -) Primern in nach V_H -, V_K - bzw. V_λ -Familien getrennten Reaktionsansätzen. Durch anschließende Sequenzanalyse der PCR-Produkte können klonale Verwandtschaften der untersuchten Population festgestellt werden. Außerdem erlaubt eine Analyse der somatischen Mutationen der umgelagerten V-Gene Rückschlüsse über die Ursprungszelle des gefundenen Klons.

1.5. Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand eines untersuchten Falles mögliche verwandtschaftliche Beziehungen zwischen dem Morbus Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphomen aufzuzeigen. Analysiert wurde ein Fall eines niedrigmalignen NHL der B-Zellreihe (CLL, chronische lymphatische Leukämie) mit Hodgkin-Zellen. Zum Einsatz kam die Technik der Einzelzell-PCR mit Nachweis von Ig-Genumlagerungen sowohl in den Hodgkin-Zellen als auch in den Lymphozyten des NHL. Durch anschließende Sequenzanalyse sollten die Ig-Genumlagerungen analysiert und die erhaltenen Basensequenzen hinsichtlich einer Verwandtschaft verglichen werden.

Fälle von NHL, in denen Hodgkin-Zellen oder klassische HRS-Zellen auftreten, sind äußerst selten. Nur ein Teil dieser Fälle liegt in frischem Zustand vor, so daß auch große Konsiliarzentren für Lymphomdiagnostik lediglich einen derartigen Fall innerhalb von zehn Untersuchungsjahren aufweisen können. Geringgradig häufiger sind derartige Lymphomfälle in Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Zustand. Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Einzelzell-PCR zum Nachweis von Ig-Genen nicht nur an Frischgewebe durchzuführen, sondern auf Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe zu übertragen. Ein wesentliches Problem dieses Vorhabens liegt jedoch darin, daß die Formalinfixierung eine Degradation der DNS verursacht, die eine Amplifikation von Genabschnitten erschwert oder sogar unmöglich macht. Aus diesem Grund sollten Primer zum Nachweis von V_H -Familien so ausgewählt werden, daß sie auch relativ kleine Amplifikate zugänglich machten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchungsmaterial zur Etablierung der FR2 und FR3 V_H-Primer

2.1.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut von fünf Fällen chronischer, lymphatischer Leukämie (CLL) wurden mittels FICOLL Dichtegradienten-Zentrifugation angereichert. Von diesen Zellen wurde hochmolekulare DNS isoliert (siehe 2.1.2.2. und 2.1.2.3.). Küppers et al. (1993a und 1995a) verwendeten diese CLL bereits zur Etablierung der FR1 V_H⁻, FR1 V_K⁻, und FR1 V_λ⁻ Primer mit korrespondierenden J_H⁻, J_K⁻ und J_λ⁻ Primern. Aufgrund der früheren Untersuchungen waren die Sequenzen der umgelagerten Ig-Genabschnitte der CLL und ihre Zuordnung zu den V_H-Familien bekannt. Sie eigneten sich daher zur Austestung der Familienspezifität der zu etablierenden FR2 und FR3 V_H-Primer.

2.1.2. Von Zytospins mittels Mikromanipulation isolierte Einzelzellen

Von zwei der CLL (1. CLL: Ig-Genumlagerungen der V_H-Familien 3 und 5, 2. CLL: Ig-Genumlagerungen der V_H-Familien 2 und 3) wurden Zytospin-Präparate angefertigt. Dazu wurden 5x10⁴ Zellen mittels einer Zytocentrifuge bei 900 UpM für fünf Minuten auf Objektträger aufgebracht. Mittels Mikromanipulation (Küppers et al. 1993b und 1994) wurden Einzelzellen von den Zytospin-Präparaten isoliert. Die Mikromanipulation erfolgte mit Hilfe eines Inversmikroskopes (Olympus, Hamburg) bei 600-facher Vergrößerung. Unter Verwendung eines hydraulischen Mikromanipulators (Narishige, Japan) wurden einzelne Zellen mit einer Kapillare mobilisiert und aufgesaugt. Die Lagerung der Einzelzellen erfolgte in mit 20 µl 1x PCR-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, GIBCO BRL, Überlingen, Deutschland) sowie mit 1ng/µl 5S rRNS gefüllten PCR-Reagiergefäßen bei -80°C.

2.1.3. Untersuchungsmaterial

Elf Non-Hodgkin-Lymphom- (NHL-) Fälle aus dem Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Köln wurden ausgewählt. Bei dem Material handelte es sich um Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Lymphknotenpräparate. Die Fälle waren in einer vorherigen Ganzschnitt-PCR-Analyse (siehe 2.3.2.2.) mit FR1 V_H - und V_K -Primern analysiert und die PCR-Produkte sequenziert worden. Die Sequenzen der Ig-Genabschnitte der Lymphome und die Zuordnung zu den V_H -Familien waren somit bekannt. Bei der Auswahl der Fälle konnten daher Lymphome mit Ig-Genumlagerungen der V_H -Familien 1, 2, 3, 4 und 5 berücksichtigt werden. Es waren somit bis auf die sehr seltene V_H6 -Familie alle V_H -Familien repräsentiert.

Die untersuchten NHL-Fälle sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Zusammenstellung der untersuchten NHL-Fälle

Fall	V_H -Familie	Diagnose
G3	V_H2/V_H4	T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom, NHL
G8	V_H2	hochmalignes B-Zell-NHL, centroblastisch
G31	V_H5	mediastinales, sklerosierendes B-Zell-Lymphom
G48	V_H4/V_H5	hochmalignes NHL
G59	V_H2/V_H4	niedrigmalignes B-Zell-NHL, centrocytisch
G61	V_H1	niedrigmalignes B-Zell-NHL, centrocytisch
G72	V_H3	hochmalignes B-Zell-NHL, Hodgkin-Sarkom
G75	V_H4	hochmalignes B-Zell-NHL, centroblastisch
G76	V_H3	hochmalignes B-Zell-NHL, centroblastisch
G77	V_H3	hochmalignes B-Zell-NHL, centroblastisch
G90	V_H1	malignes B-Zell-NHL, centrocytisch

2.1.4. Isolierung von DNS aus Lymphknotenpräparaten

2.1.4.1. Entparaffinierung

Mit einem Schlittenmikrotom (Model HN 40, Leica, Nussloch, Deutschland) wurden von jedem Lymphknoten-Präparat 10 μm dicke Schnitte angefertigt und in ein steriles Eppendorf-Hütchen überführt. In Abhängigkeit von der Menge des Tumorgewebes in dem Präparat wurden

ein oder mehrere Schnitte angefertigt, die Tumorzellmenge war somit bei den einzelnen Proben etwa gleich groß. Um eine Kontamination der Schnitte durch vorher bearbeitetes Material zu vermeiden, wurde nach dem Schneiden jeder Probe das Mikrotom-Einmalmessers gewechselt und der Messerhalters sowie die Präpariernadel mit Xylol gereinigt.

Die Entparaffinierung des Gewebes erfolgte durch die Zugabe von 1 ml Xylol und einstündiges Schütteln (Schüttelapparat, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde die Suspension für 5 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert (Zentrifuge 5402, Eppendorf, Deutschland). Nach Verwerfen von 800 μ l Überstand wurde mit 800 μ l Xylol erneut extrahiert. Dieser organischen Extraktion folgte nach erneutem Verwerfen von 800 μ l Überstand ein dreimaliges Waschen mit 100%igem Ethanol, wobei jeweils für 15 Minuten geschüttelt wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde so viel Ethanol wie möglich abpipettiert und der restliche Alkohol in einer Vakuumzentrifuge (Vacuum concentrator BA-VC 300H, Bachofer, Reutlingen, Deutschland) verdampft.

2.1.4.2. Proteinase K-Verdau

Die entparaffinierte Probe wurde in 98 μ l 1x PCR-Puffer resuspendiert, 2 μ l Proteinase K (20 mg/ml) (Böhringer, Deutschland) wurden hinzugefügt und die Probe über Nacht im Wasserbad bei 56°C inkubiert. Das Enzym konnte anschließend durch zehnminütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert werden.

2.1.4.3. DNS-Extraktion mit Phenol/Chloroform

Mit Hilfe der Phenol/Chloroform-Extraktion erfolgte nach dem Proteinase K-Verdau die Trennung der DNS von Proteinen (Maniatis et al. 1989).

100 μ l Phenol/Chloroform (Vol.1:1) wurden zu der Probe gegeben, kurz geschüttelt und für 3 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert. Es folgte die Überführung der oberen, wässrigen Phase in ein neues, steriles Eppendorf-Hütchen und eine Wiederholung der Extraktion. Um Phenolrückstände zu entfernen, wurde anschließend mit 100 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Eine Fällung der DNS mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,6 und 2,5 Volumen 100%igem Ethanol wurde bei -20°C für 30 Minuten durchgeführt und anschließend 20 Minuten bei 14000

Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die überschüssigen Salze konnten durch Waschen mit 1000 μ l 70%igem Ethanol, dreiminütigem Zentrifugieren bei 14000 Upm und erneutem Verwerfen des Überstandes entfernt werden. Das DNS-Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 μ l sterilem Wasser (Aqua ad injektabilia Ph. Eur., Delta-Pharma, Pfullingen, Deutschland) resuspendiert.

2.1.4.4. Bestimmung der Qualität und Quantität der aufgereinigten DNS

Zur Abschätzung der Länge der extrahierten DNS-Segmente erfolgte die Auftrennung eines 8 μ l DNS-Aliquots in einer Gelelektrophorese. Als Bezugsgröße diente ein Molekulargewichtsstandard (1 Kilobasenmarker, GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland). Das mit Ethidiumbromid gefärbte 1%ige Agarosegel (Agarose Type 1: Low EEO, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde unter UV-Licht (300 nm, LKB 2011 Marco Vue Transilluminator, LKB-Produkte AB, Schweden) mit einer Polaroid-Kamera (Direct screen instant camera DS 34, Genetic Research Instrumentation Ltd, Dimnow, Essex, GB) zur Dokumentation fotografiert. Photometrisch konnte bei 260 nm Wellenlänge die Konzentration der DNS und bei 280 nm die Verunreinigung der Probe mit Proteinen bestimmt werden (U-2000 Spectrophotometer, Hitachi Ltd, Tokyo, Japan). Der Quotient der beiden Messungen ist ein Maß für die Reinheit der Probe. Als Kontrolle der Amplifizierbarkeit der extrahierten DNS erfolgte eine PCR-Analyse jeder Probe mit 250 ng und 500 ng DNS mit Primern für das β -Aktin-Gen (Nakajima-Iilima et al. 1985). Primersequenz und PCR-Bedingungen siehe 2.3.1.5. und 2.3.2.5..

2.1.5. Immunfärbungen

Bei der Mikromanipulation von Einzelzellen ist zur sicheren Identifikation der Zelle eine Immunfärbung unerlässlich. Die im Rahmen dieser Arbeit bei Immunfärbungen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antigen	Antikörper	Hersteller
CD3	*OKT3	Dako, Hamburg, Deutschland
	*CD3 (polyklonal)	Dako, Hamburg, Deutschland
CD20	L26	Dako, Hamburg, Deutschland
CD30	BerH2	Dako, Hamburg, Deutschland

Die Bezeichnung des Antigens bezieht sich auf die CD-Nomenklatur, einem internationalem System für die Benennung von Differenzierungsantigenen auf der Zelloberfläche von Leukozyten und Zellen, deren Zellmembran-Antigene mit denen von Immunzellen identisch sind. (CD, engl. cluster of differentiation). * Der monoklonale OKT3-Antikörper wurde bei Frischgewebe eingesetzt, CD3 (polyklonal) bei Formalin-fixiertem Gewebe.

Um den Einfluß der Immunfärbung auf die Länge der DNS-Stränge zu prüfen, wurden von zwei Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten NHL (G48 und G61, siehe 2.1.3.) jeweils ein 10 µm dicker Gewebe-Schnitt angefertigt und die DNS extrahiert (siehe 2.1.4.). Weiterhin wurden je NHL-Fall fünf jeweils 2µm dicke histologische Schnitte mit einem anti-CD20-Antikörper (L26, Dako, Hamburg, Deutschland) nach Angabe des Herstellers immungefärbt und zur Zellkernfärbung mit Hämalaun gegengefärbt. Es wurden fünf Schnitte verwendet um bei der folgenden DNS-Extraktion eine ausreichend große DNS-Menge zu erhalten. Die DNS-Extraktion erfolgte wie in 2.1.4. beschrieben nach dem Abkratzen der Schnitt-Präparate mit sterilen Skalpell von den Objektträgern und der Überführung des Gewebes von jeweils fünf Präparaten in ein steriles Eppendorf-Reagiergefäß. Nach der Gelelektrophorese wurde von dem 1%igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel ein Polaroid-Foto angefertigt (siehe Abb.6). Zusätzlich erfolgte eine photometrische Bestimmung der DNS-Menge.

Eine gleichartige Analyse wurde mit Präparaten von zwei Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Tonsillen durchgeführt. Von jeder Tonsille wurde ein 10 µm dicker Gewebeschnitt angefertigt, wie in 2.1.4. beschrieben entparaffiniert und die DNS extrahiert. Weiterhin wurden von jedem Fall 15 Schnittpräparate angefertigt. Je Fall wurden fünf der Präparate durch eine Inkubation für 15 Minuten bei 80°C im Wärmeschrank entparaffiniert. Weitere fünf Präparate jeden Falles wurden im Wärmeschrank entparaffiniert und mit einem anti-CD20-Antikörper gefärbt. Die restlichen fünf Präparate jeden Falles wurden durch ein 24

stündiges Xylol-Bad entparaffiniert und ebenfalls mit einem anti-CD20-Antikörper gefärbt. Die DNS-Extraktion der Schnittpräparate und die Analyse der DNS erfolgte wie oben beschrieben. Zum Vergleich wurde DNS aus Frischgewebe eines MH immungefärbt sowie nicht-immungefärbt extrahiert und analysiert.

2.1.6. B-Zell-Positivkontrollen

Zur Positivkontrolle der Einzelzell-PCR wurden mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zell-Sortierer (FACS, fluorescence-activated cell sorter) sortierte, einzelne B-Zellen verwendet. Bei der Etablierung der FR2 V_H- und FR3 V_H-Primer wurden FACS-sortierte B-Zellen verwendet, die IgM auf der Zelloberfläche exprimierten (FACS-sortierte IgM⁺ B-Zellen; Klein et al. 1994). Zur Kontrolle der Einzelzell-PCR-Analysen wurden einzelne B-Zellen verwendet, die IgD exprimierten (FACS-sortierte IgD⁺ B-Zellen; Kanzler et al. 1996).

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mittels FICOLL-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. B-Zellen wurden durch magnetische Zell-Sortierung mit dem MACS-System and anti-CD19 Magnetkörpern (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) aufgereinigt. Die CD19⁺ Fraktion wurde anschließend mit einer Kombination von anti-CD20-Phycoerythrin (anti-CD20-PE) (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA U.S.A.) und anti-IgD-Fluoresceinisothiocyanat (anti-IgD-FITC) (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL U.S.A.) oder anti-IgM-FITC (Becton Dickinson & Co.) oder anti-Ig lambda-PE (Becton Dickinson & Co.) und anti Ig kappa-FITC (Becton Dickinson & Co.) Antikörpern gefärbt. Einzelne IgM⁺ oder Ig lambda⁺ oder IgD⁺CD20⁺ Zellen wurden durch Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung mit einem FACS 440 (Becton Dickinson & Co.) isoliert. Tote Zellen wurden durch eine Färbung mit Propidiumiodid ausgeschlossen. Die Einzelzellen wurden in 0,5 ml Reagiergefäßen mit 20 µl 1x PCR-Puffer mit 1 ng/µl 5S rRNS sortiert und bei -80°C gelagert.

2.1.7. Isolierung einzelner Zellen von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Morbus Hodgkin-Fällen

Einzelne HRS-Zellen konnten mittels Mikromanipulation (siehe 2.1.2.) aus 2-3 μm dicken, immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparaten isoliert werden. Dazu wurden zwei Fälle von MH, deren HRS-Zellen in vorherigen Untersuchungen auf Ig-Genumlagerungen analysiert worden waren (Küppers et al. 1994), aus dem Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Köln ausgewählt. Die Immunfärbung erfolgte bei dem lymphozytenreichen Subtyp (LP) mit monoklonalen anti-CD20-Antikörper und bei dem gemischtzelligen Subtyp (MC) mit anti-CD30-Antikörper nach Anweisung des Herstellers (siehe Tab.2). Von einem weiteren Fall eines MH (Subtyp lymphozytenreich) wurden HRS-Zellen aus einem mit anti-CD20-Antikörper gefärbten sowie aus einem nur mit Hämalaun gefärbten Schnitt isoliert. Als Negativkontrollen der PCR des letzten Falles dienten isolierte T-Zellen. Angrenzende Schnitte wurden mit anti-CD3-Antikörper gefärbt (siehe 2.1.5. Tabelle 2) und die CD3⁺ T-Zellen wurden isoliert.

2.1.8. Isolierung von Zellgruppen und Einzelzellen von einem Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten B-NHL

Von dem NHL G62 (siehe 2.1.3. Tabelle 1) wurden histologische Schnittpräparate angefertigt. Ein Teil der Präparate wurde mit anti-CD20-Antikörper gefärbt und mit Hämalaun gegengefärbt, ein anderer Teil wurde nur mit Hämalaun gefärbt. Mittels Mikromanipulation erfolgte die Isolierung von Zellgruppen zu 200, 100, 50, 10 und 5 Zellen, sowie von Einzelzellen. Die Isolierung von T-Zellen erfolgte wie in 2.1.7. beschrieben.

Nach Mikromanipulation konnte die DNS aus den Schnitten isoliert und zur Abschätzung ihrer Qualität mittels Gelelektrophorese analysiert werden (siehe 2.1.4.2.-2.1.4.4.)

2.2. Einzelzelluntersuchung eines NHL mit Hodgkinzellen

2.2.1. Untersuchungsmaterial

Untersucht wurde ein Fall eines NHL (B-Zell chronische, lymphatische Leukämie (B-CLL)) mit Hodgkin-Zellen aus dem Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Köln. Es lag Lymphknotengewebe sowohl in frischer, bei -80°C gelagerter, als auch in Formalin-fixierter, in Paraffin eingebetteter Form vor.

Bei der diagnostisch-immunohistochemischen Untersuchung reagierten die kleinen lymphoiden Zellen des B-Zell Lymphoms (NHL-B-Zellen) positiv für den B-Zell-Marker CD20, während die großen Hodgkin-Zellen positiv für CD15 und CD30 reagierten. Weder mit einem anti-kappa-Leichtketten-Antikörper noch mit einem anti-lambda-Leichtketten-Antikörper war eine monoklonale Ig-Expression der Ig-Leichtketten der NHL-B-Zellen oder der Hodgkin-Zellen eindeutig nachzuweisen.

Mittels Mikromanipulation (siehe 2.1.2.) wurden aus den immungefärbten Schnittpräparaten des frischen Gewebes in zwei Experimenten Einzelzellen isoliert. Die Isolierung der NHL-B-Zellen erfolgte im ersten Experiment von Schnittpräparaten, die mit einem anti-CD3-Antikörper (siehe Tab.2) gefärbt waren. Es wurden CD3⁻ Zellen isoliert. Im zweiten Experiment wurden die NHL-B-Zellen von Schnittpräparaten isoliert, die mit einem anti-CD20-Antikörper gefärbt waren. Die Hodgkin-Zellen wurden in beiden Experimenten als immunohistochemisch CD30⁺ Zellen identifiziert. Einzelne CD3⁺ T-Zellen wurden aus anti-CD3-gefärbten, angrenzenden Schnittpräparaten isoliert. Zur Identifikation der Zellkerne wurden alle Präparate zusätzlich mit Hämalaun gefärbt. Die Lagerung der Einzelzellen erfolgte bei -80°C.

Die Ig-Genumlagerungen der isolierten Zellen wurden mit dem FR1-Primer-Set (siehe 2.3.1.1. und 2.3.1.4.) mit der in 2.3.2.1. und 2.3.2.2. beschriebenen PCR-Analyse amplifiziert. Als Positivkontrolle der PCR dienten 25 pg CLL-DNS (siehe 2.1.1.), diese DNS-Menge entspricht fünf Kernäquivalenten, sowie einzelne FACS-sortierte IgD⁺-B-Zellen (siehe 2.1.6.). Als Negativkontrollen dienten die oben beschriebenen mikromanipulierten T-Zellen sowie zahlreiche Reaktionsansätze ohne Zugabe von DNS oder Zellen (Wasserkontrollen). Die erhaltenen PCR-

Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert (siehe 2.3.3.), aufgereinigt (siehe 2.4.1.) und sequenziert (siehe 2.4.2.-2.4.4.).

Von frischem, bei -80°C gelagertem Gewebe des untersuchten Lymphoms wurde DNS wie in 2.1.4.1.-2.1.4.4. beschrieben extrahiert und analysiert.

2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.1. Verwendete Primer

FR1-Primer

Die Amplifizierung von V_H- und V_K-Gensegmenten erfolgte unter Verwendung der von Küppers et al. (1993a,b und 1994) etablierten familienspezifischen FR1 V-Primern und korrespondierenden J-Primern. Die Oligonukleotide (Eurogentec, Seraing, Belgien) hatten folgende Sequenzen:

FR1 V _H 1	: 5'CCTCAGTGAAGGT(C/T)TCCTGCAAGGC 3'
FR1 V _H 2	: 5'GTCCTGCGCTGGTGAAACCCACACA 3'
FR1 V _H 3	: 5'GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG 3'
FR1 V _H 4	: 5'GACCCTGTCCCTCACCTGC(A/G)CTGTC 3'
FR1 V _H 5	: 5'AAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGA(A/G)GA 3'
FR1 V _H 6	: 5'ACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGT 3'
FR1 V _K 1	: 5'GACATCC(A/G)G(T/A)TGACCCAGTCTCC(A/T)TC 3'
FR1 V _K 2	: 5'CAG(T/A)CTCCACTCTCCCTG(C/T)CCGTCA 3'
FR1 V _K 3	: 5'TTGTG(A/T)TGAC(A/G)CAGTCTCCAG(G/C)CACC 3'
FR1 V _K 4	: 5'AGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC 3'
FR1 V _K 5	: 5'CAGTCTCCAGCATTTCATGTCAGCGA 3'
FR1 V _K 6	: 5'TTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAA 3'

Bei der Synthese der Primer werden an den mit () gekennzeichneten Stellen beide Basen zugegeben, so daß ein "wobble" (engl.: schwanken, wackeln) entsteht und der Primer damit familienspezifische Sequenzunterschiede erfaßt. Bei einigen Zellen wurden V_{λ} -Genumlagerungen analysiert (Küppers et al. 1995a und modifizierte Primer nach Küppers et al., nicht veröffentlichte Daten).

FR2 V_H -Primer

Entsprechend zu den FR1 V_H -Primern wurden für die menschlichen Ig-Gene familienspezifische FR2 V_H -Primer ausgewählt. Die Auswahl der Primer erfolgte so, daß möglichst alle Mitglieder der entsprechenden V_H -Familie erfaßt, idealerweise aber keine andere V_H -Familie erkannt wird. Mit den ausgewählten FR2 V_H -Primern wurden alle Mitglieder der V_H -Familien 2, 4, 5 und 6, ca. 95% der Mitglieder der V_H1 -Familie sowie ca. 90% der Mitglieder der V_H3 -Familie erfaßt. Zusätzlich wurde mit Hilfe der Genbank nach komplementären Genbereichen in anderen Abschnitten des menschlichen Genoms gesucht, um eine unspezifische Bindung der Primer zu vermeiden.

Die Sequenzen der Oligonukleotide lauten:

FR2 V_H1	: 5'GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA 3'
FR2 V_H2	: 5'GAAGGCCCTGGAGTGGCTTGC 3'
FR2 V_H3	: 5'CAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT 3'
FR2 V_H4	: 5'GAAGGG(A/G)CTGGAGTGGATTGGG 3'
FR2 V_H5	: 5'CGCCAGATGCCCGGGAAAGGC 3'
FR2 V_H6	: 5'GGATCAGGCAGTCCCCATCGAG 3'

Kreuzreaktivitäten des FR2 V_H4 -Primers mit der V_H5 -Familie sowie des FR2 V_H1 -Primers mit der V_H6 -Familie sind möglich.

FR3 V_H -Primer

Der erste FR3 V_H -Consensus-Primer wurde von Yamada et al. (1989) zur Amplifizierung der CDR3 entwickelt und vielfach in späteren Untersuchungen in z.T. leicht modifizierter Form verwendet (Wan et al.

1990, Ramasamy et al. 1992, Reed et al. 1993, Diss et al. 1993, Delabie et al. 1994, Pan et al. 1994).

Da die FR3 bei allen V_H-Familien sehr ähnliche Basensequenzen aufweist, war die Verwendung von familienspezifischen Primern nicht immer möglich. Daher wurde für die Amplifizierung der Mitglieder der V_H1-, V_H3-, V_H4- und V_H6-Familie ein gemeinsamer Primer ausgewählt:

FR3 V_H1,3,4,6 : 5'G(A/C)GGACACGGC(C/T)GTGTATTACTGT 3'

FR3 V_H2 : 5'ATGGACCCTGTGGACACAGCTAC 3'

FR3 V_H5 : 5'CAGCCTGAAGGCCTCGGACACC 3'

Die Oligonukleotide wurden als A-Primer (FR3 V_H1,3,4,6), B-Primer (FR3 V_H2) und C-Primer (FR3 V_H5) bezeichnet. Eine Kreuzreaktivität kann zwischen dem A-Primer und Genen der V_H5-Familie bestehen.

J_H- (FR4-) Primer

Bei Durchführung der Einzelzell-PCR als semi-nested-PCR mit zwei Runden (siehe 1.3.) sind neben den J-Primern für die erste Runde der Amplifizierung in der zweiten Runde weiter 5'-gelegene J-Primer nötig. Die Primer der ersten Runde der PCR wurden als 3'J-Primer, die für die zweite Runde als 5'J-Primer bezeichnet. Bis auf modifizierte J_H-Primer wurden die von Küppers et al. 1993a,b etablierten Primer verwendet.

5'J_H1,4,5 : 5'GACGGTGACCAGGGT(G/T)CCCTGGCC 3'

5'J_H2 : 5'GACAGTGACCAGGGTGCCACGGCC 3'

5'J_H3 : 5'GACGGTGACCATTGTCCCTTGGCC 3'

5'J_H6 : 5'GACGGTGACCGTGGTCCCTT(G/T)GCC 3'

3'J_H1,2,4,5 : 5'ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT 3'

3'J_H3 : 5'TACCTGAAGAGACGGTGACCATTGT 3'

3'J_H6 : 5'ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT 3'

5'J_K1,2 : 5'TTGAT(C/T)TCCA(G/C)CTTGGTCCC(C/T)TGGC 3'

5'J_K3 : 5'TTGATATCCACTTTGGTCCCAGGGC 3'

5'_K4 : 5'TTGACTTCCACCTTGGTCCCTCCGC 3'
5'_K5 : 5'TTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTGGC 3'

3'_K1,2,4 : 5'ACTCACGTTTGAT(T/C)TCCA(G/C)CTTGGTCC 3'
3'_K3 : 5'GTA CTTACGTTTGATATCCACTTTGGTCC 3'
3'_K5 : 5'GCTTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCC 3'

β-Aktin-Primer

Bei der ersten Runde der PCR wurden zur Amplifikation des β-Aktin-Genabschnittes in einer semi-nested PCR der β-Aktin Ex4a-Primer mit dem korrespondierenden β-Aktin Ex5-Primer eingesetzt, in der zweiten Runde der β-Aktin Ex4b-Primer mit korrespondierendem β-Aktin Ex5-Primer. Die Sequenzen der Oligonukleotide lauten:

β-Aktin Ex4a: 5'CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAA 3'

β-Aktin Ex4b: 5'AAGAGATGGCCACGGCTGCTTCCAG 3'

β-Aktin Ex5 : 5'GAAGGTAGTTTCGTGGATGCCACAG 3'

2.3.2. DNS-Amplifizierung

Die Durchführung der PCR erfolgte mit Hilfe des DNS Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Cetus, Überlingen, Deutschland) und eines Trio-Thermoblockes (Biometra, Göttingen, Deutschland).

Um die Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte einzuschränken, wurde eine Heißstart-PCR durchgeführt. Hierzu wurden 1,25 Einheiten des Enzyms Taq DNS-Polymerase (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland) nach der ersten 95°C-Denaturierungsphase in der folgenden, verlängerten Anlagerungsphase in den PCR-Ansatz pipettiert. Durch Überschichten jedes Reaktionsansatzes mit zwei Tropfen Mineralöl (Paraffin dünnflüssig, Merck, Darmstadt, Deutschland) konnte ein Verdampfen der Probe während der Erhitzungsvorgänge vermieden werden.

Die stets beim Ansetzen der PCR getragenen Einmalhandschuhe wurden wiederholt gewechselt, um eine Kontamination der PCR-Ansätze zu vermeiden. Für die in einem speziellen Raum angesetzten ersten Runden der Einzelzell-PCR, sowie generell beim Pipettieren von DNS, wurden zur Vermeidung von Kontaminationen der Reaktionsansätze immer gestopfte Pipettenspitzen verwendet (Küppers 1997).

Um Kontaminationen der Reaktionsansätze mit DNS oder PCR-Produkten sowie Fehler bei der Durchführung der PCR aufzuzeigen, wurden bei allen PCR-Ansätzen Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Die Negativkontrollen bestanden aus dem gleichen Reaktionsansatz wie die restlichen Proben des Ansatzes mit Ausnahme von DNS. CLL-DNS mit bekannten Ig-Genumlagerungen (siehe 2.1.1.) oder FACS-sortierte B-Zellen (siehe 2.1.6.) dienten als Positivkontrollen.

2.3.2.1. Erste Runde-PCR mit FR1 Primern

Um Ig-Genumlagerungen in einzelnen Zellen nachzuweisen, wurde eine zweiphasige PCR durchgeführt (Küppers et al. 1993b, 1997). In der ersten Runde wurde ein Primergemisch aus allen familienspezifischen V_H - und V_K -Primern sowie den 3' J_H - und den 3' J_K -Primern (bzw. zur Amplifizierung von Lambda-Leichtkettengenumlagerungen ein Gemisch der V_λ - und der 3' J_λ -Primer) eingesetzt. Die DNS der Einzelzellen wurde durch Inkubation in 20 μ l 1xPCR-Puffer mit 0,25 mg/ml Proteinase K für 60 Minuten bei 50°C freigesetzt. Es folgte eine Inaktivierung der Proteinase K durch einen Erhitzungsschritt von 95°C für zehn Minuten. Im gleichen Reagiergefäß wurde in einem Volumen von 50 μ l die erste Runde der Amplifizierung durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 2,5 mM $MgCl_2$, 100 μ M je dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Ultrapure dNTP Set, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) sowie 2,8 nM je V_H -, V_K -, 3' J_H - und 3' J_K -Primer (bzw. je V_λ - und 3' J_λ -Primer). Die Zugabe von 1,25 Einheiten Taq DNS-Polymerase erfolgte nach der Heißstart-Methode nach dem ersten Denaturierungsschritt.

Der erste Zyklus des PCR-Programms bestand aus 95°C für 2 Minuten, 65°C für 5 Minuten zur Zugabe der Taq DNS-Polymerase und 72°C für 60 Sekunden. Es folgten 34 Zyklen von 95°C für 60 Minuten, 59°C (bzw. 61°C für die Amplifizierung von V_λ) für 30 Sekunden und 72°C für 60 Sekunden. Anschließend folgte eine fünfminütige Inkubation bei 72°C.

Alle Pipettierschritte wurden mit gestopften Pipettenspitzen durchgeführt und die Einmalhandschuhe wurden häufig gewechselt.

2.3.2.2. Zweite Runde- sowie Ganzschnitt-PCR mit FR1 Primern

In der zweiten Runde der Einzelzell-PCR wurden 1,5 μ l aus dem Reaktionsansatz der ersten Runde zur weiteren Amplifizierung eingesetzt (Küppers et al. 1993b, 1997). Die Amplifizierung der V_H -, V_K - und V_λ -Genfamilien erfolgte in der zweiten Runde in getrennten 50 μ l-Reaktionsansätzen, es wurde jeweils ein familienspezifischer V-Primer mit einer Kombination von 5'J-Primern eingesetzt. Ein Reaktionsansatz bestand aus 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,4, 1,5 mM $MgCl_2$ (V_K : 2,5 mM $MgCl_2$), je 100 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,125 μ M V_H - bzw. V_K - bzw. V_λ -Primer und 5'J $_H$ - bzw. 5'J $_K$ - bzw. 5'J $_\lambda$ -Mischung. Der erste Zyklus bestand aus einer Denaturierungsphase für fünf Minuten bei 95°C, einer Pause bei 68°C zur Zugabe der Taq DNS-Polymerase sowie einer Synthesephase von 60 Sekunden. Es folgten 45 Zyklen, bestehend aus 95°C für 1 Minute, 61°C (V_{H1} , V_{H2} , V_{H5} , V_{H6} , V_K , V_λ) bzw. 65°C (V_{H3} , V_{H4}) für 30 Sekunden und 72°C für 60 Sekunden. Das Programm endete mit einer Inkubation von 5 Minuten bei 72°C (Küppers et al. 1993b)

Wird in der PCR-Analyse DNS eingesetzt, die aus Gewebeschnitten isoliert wurde (siehe 2.1.4.), so bezeichnet man dieses als "Ganzschnitt-PCR-Analyse". Die in der PCR eingesetzte DNS-Menge lag bei der Ganzschnitt-PCR-Analyse für Frischgewebe bei 50 ng pro PCR-Ansatz und für Paraffingewebe bei 500 ng pro PCR-Ansatz.

Die Ganzschnitt-PCR wurde nach dem gleichen Schema wie die zweite Runde der Einzelzell-PCR in nach V_H - und V_K - bzw. V_λ -Familien getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt (Küppers et al. 1993a und 1995a). Bei der Amplifizierung von DNS aus Frischgewebe wurden 35 PCR-Zyklen und bei DNS aus Paraffingewebe 45 PCR-Zyklen durchgeführt.

2.3.2.3. PCR mit FR2 V_H-Primern

Die Etablierung der FR2 V_H-Primer erfolgte an den in 2.1.1. beschriebenen Fällen von CLL. Es wurden 50 ng DNS pro PCR-Ansatz eingesetzt, die Zyklenzahl betrug 34. Durch Änderung der Annealing-Temperatur (im Bereich von 59-67°C) sowie der MgCl₂-Konzentration im Ansatz (1,5 mM, 2,0 mM oder 2,5 mM) konnten die optimalen Bedingungen ermittelt werden. Sie lagen bei einer Annealingtemperatur von 63°C und einer MgCl₂-Konzentration von 2,0 mM.

Durch Senkung der Annealing-Temperatur auf 61°C, Erhöhung der Zyklenzahl auf 44 und den Einsatz von 500 ng DNS konnten die Bedingungen an die Amplifizierung von aus Paraffingewebe extrahierter DNS (siehe 2.1.2.) angepaßt werden.

Die Etablierung der Einzelzell-PCR erfolgte mit 25 pg CLL-DNS (siehe 2.1.1.) pro PCR-Ansatz sowie mit FACS-sortierten IgM⁺-B-Zellen (siehe 2.1.6.). Das eingesetzte Primergemisch bestand aus 3,125 nM je FR2 V_H- und 3'J_H-Primern. Die PCR wurde wie die erste Runde mit FR1 V_H-Primern in einem Volumen von 50 µl mit den gleichen Konzentrationen an KCl, Tris-HCl und dNTP durchgeführt. Durch Austestung im Bereich von 59-63°C Annealing-Temperatur sowie 1,5-2,5 mM MgCl₂ konnten die optimale Bedingungen für die 1.Runde der PCR ermittelt werden. Die optimale Annealing-Temperatur betrug 61°C, die MgCl₂-Konzentration betrug 2,5 mM, die 1. Runde der PCR umfaßte 34 Zyklen (siehe Tab.3).

Bei der zweiten Runde der Amplifizierung wurden 1,5 µl aus dem Ansatz der ersten Runde eingesetzt. Die PCR wurde in nach V_H-Familien getrennten Reaktionsansätzen mit der 5'J_H-Primermischung durchgeführt. Die Annealing-Temperatur lag bei 63°C, es wurden 2,5 mM MgCl₂ eingesetzt. Die PCR umfaßte 44 Zyklen (siehe Tabelle 3).

2.3.2.4. PCR mit FR3 V_H-Primern

Die Etablierung der FR3 V_H-Primer erfolgte entsprechend zu der der FR2 V_H-Primer. Für die Etablierung der Einzelzell-PCR wurden zusätzlich von Zytospin-Präparaten isolierte Einzelzellen verwendet (siehe 2.1.2.).

Als optimal erwies sich für die erste Runde der Einzelzell-Amplifizierung eine Annealing-Temperatur von 61°C und eine MgCl₂-Konzentration von 2,5 mM. Das Primergemisch bestand aus den A-, B-, C- und den 3'J_H-Primern (siehe 2.3.1.3. und 2.3.1.4.) mit einer Primerendkonzentration von 6,25 nM je Primer im Reaktionsansatz.

Die Annealing-Temperatur der zweiten Runde der PCR betrug 63°C bei 2,0 mM MgCl₂. A-, B- und C-Primer wurden in der zweiten Runde in getrennten Reaktionsansätzen mit der 5' J_H-Primer-Mischung eingesetzt. Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation von Ig-Genumlagerungen mit FR3 V_H-Primern sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3: PCR-Protokol für FR2 V_H-Primer

1. Runde der Amplifizierung: 2,5 mM MgCl ₂					
1. Zyklus:	95°C	2 Minuten	34 Zyklen:	95°C	60 Sekunden
	65°C	5 Minuten		61°C	30 Sekunden
	72°C	60 Sekunden		72°C	60 Sekunden
			Ende:	72°C	5 Minuten
2. Runde der Amplifizierung: 2,0 mM MgCl ₂					
1. Zyklus:	95°C	2 Minuten	44 Zyklen:	95°C	60 Sekunden
	68°C	5 Minuten		63°C	60 Sekunden
	72°C	60 Sekunden		72°C	60 Sekunden
			Ende:	72°C	5 Minuten

Tabelle 4: PCR-Protokol für FR3 V_H-Primer

1. Runde der Amplifizierung: 2,5 mM MgCl ₂					
1. Zyklus	95°C	2 Minuten	34 Zyklen	95°C	60 Sekunden
	65°C	5 Minuten		61°C	30 Sekunden
	72°C	60 Sekunden		72°C	60 Sekunden
			Ende:	72°C	5 Minuten
2. Runde der Amplifizierung: 2,0 mM MgCl ₂					
1. Zyklus	95°C	5 Minuten	44 Zyklen	95°C	60 Sekunden
	68°C	5 Minuten		63°C	30 Sekunden
	72°C	60 Sekunden		72°C	60 Sekunden
			Ende:	72°C	5 Minuten

2.3.2.5. PCR mit β -Aktin-Primern

Für die Amplifizierung von β -Aktin galten die gleichen PCR-Bedingungen wie für die FR1 V_H -Primer.

2.3.3. Analyse der PCR-Produkte

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurden 8 μ l-Aliquots der PCR-Produkte zusammen mit 2 μ l Ladepuffer (0,25% Bromphenol blau, 0,25% Xylene Cyanol, 30% Glycerol in Wasser) in die Ladeschlitze von zweiprozentigen, mit Ethidiumbromid (GIBCO BRL) gefärbten Agarosegelen (Agarose Typ 1: Low EEO, Sigma) pipettiert. Bei FR3 V_H -PCR-Produkten wurden 2,5-prozentige Agarosegele verwendet. Die Herstellung der Gele und die Beschickung der Gelkammern erfolgte mit 1xTAE Puffer (0,04 M Tris-Base, 5,71% Eisessig, 1 mM EDTA pH 8,0). Als Standard zur Abschätzung der Länge der PCR-Produkte diente 1 μ l eines 100 Basenmarkers (100 bp ladder, GIBCO BRL), welcher zusammen mit 2 μ l Ladepuffer aufgetragen wurde.

Nach Beschicken der Gele wurde eine Spannung von 6 V/cm für etwa eine Stunde angelegt. Unter UV-Licht (300 nm) angefertigte Polaroidfotos der Agarosegele dienten der Dokumentation.

Die Länge der erwarteten PCR-Produkte betrug bei Verwendung der FR1-Primer 300-350 bp, bei FR2-Primern ca. 200-250 bp und bei FR3-Primern ca. 80-130 bp.

2.4. Sequenzierung

2.4.1. Aufreinigung der PCR-Produkte

Um eine ausreichend große Menge PCR-Produkt zur Verfügung zu haben, wurden jeweils zwei 50 μ l-PCR-Ansätze angesetzt. Beide Ansätze wurden nach der Amplifikation unter Vermeidung der Überführung von Öl zusammengegeben und das restliche Öl durch zweimaliges Waschen mit 180 μ l Diethylether entfernt. Nach Verwerfen des Ether-Überstandes konnte der restliche Ether unter einem Abzug verdampft werden. Die Fällung der Proben erfolgte durch Zugabe von 2,5 Volumen 100%igem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,6 nach kurzem

Schütteln über Nacht bei -20°C . Anschließend wurde 20 Minuten bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Probe mit $500\ \mu\text{l}$ 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes konnte das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet werden. Die Resuspension der Probe erfolgte in $20\ \mu\text{l}$ sterilem Wasser.

Zur Aufreinigung des PCR-Produktes wurde die Probe zusammen mit $3\ \mu\text{l}$ Ladepuffer in ein mit großen Ladeschlitz versehenes, mit Ethidiumbromid gefärbtes 2,5%iges Agarosegel (NuSieve GTG Agarose, Low melting, FMC Bio Products, Rockland, USA) pipettiert. Als Standard diente ein 100 Basenmarker. Nach einer Laufzeit von ca. 90 Minuten bei $6\ \text{V/cm}$ konnten die Banden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ($312\ \text{nm}$) aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorf-Reagiergefäß überführt werden. Das Skalpell wurde nach jeder Probe gewechselt. Anschließend wurde nach Protokoll des Herstellers eine QIAEX 2 Agarose Gel Extraktion (QIAEX 2, QIAGEN AG, Hilden, Deutschland) durchgeführt und so die PCR-Produkte gereinigt.

Nach Analyse eines $2\ \mu\text{l}$ -Aliquots der aufgereinigten DNS in einer Gelelektrophorese in einem 2%igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel mit $1\ \mu\text{l}$ DNS Mass Ladder (GIBCO, BRL) als Standard konnte unter UV-Licht ein Polaroidfoto angefertigt werden. Die DNS-Konzentration der Proben wurde anhand des quantifizierten Standards geschätzt.

2.4.2. Sequenzreaktion

Die Sequenzierung erfolgte nach einem modifizierten Prinzip nach Sanger (Sanger et al. 1977). Mit dem "Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (ABI, Applied Biosystems Inc., Weiterstadt, Deutschland) wurde nach Hersteller-Protokoll sequenziert. Bei der Sequenzreaktion wurde nur ein Primer verwendet. Als Matritze dienten die aufgereinigten PCR-Produkte. Wurde bei der DNS-Synthese ein Farbstoff-gekoppeltes didesoxy-NTP eingebaut, so führte dieses zum Abbruch der DNS-Synthese. Es entstanden so DNS-Stränge unterschiedlichster Länge, abhängig vom Zeitpunkt des Einbaues eines Farbstoff-gekoppelten didesoxy-NTPs. Da zur Sequenzierung nur ein Primer verwendet wurde,

waren DNS-Stücke gleicher Länge immer durch das gleiche Nukleotid, das zum Abbruch der Synthese führte, gekennzeichnet. Bei der Auftrennung der neusynthetisierten Einzelstränge in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) konnte anhand der Farbstoff-markierten Basen die Basensequenz abgelesen werden.

Eine weitere Aufbereitung der Proben war vor der PAGE-Analyse zum Entfernen überschüssiger didesoxy-NTP und desoxy-NTP nötig. Dazu wurde 80 μ l bidest. H₂O zugegeben, gemischt und die Probe unter Vermeidung der Überführung von Öl in ein steriles Eppendorf-Hütchen überführt. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion, eine Ethanolpräzipitation und Waschen mit 70%igem Ethanol (siehe 2.1.4.3.), das Pellet konnte in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20°C gelagert werden.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgten sowohl von der V- als auch von der J-Seite, um Fehler der Taq-Polymerase bei der Sequenzreaktion zu vermeiden.

2.4.3. DNS-Sequenzierung

Die automatische Analyse der Sequenzansätze erfolgte mit dem Sequenziersystem Modell 373A (Applied Biosystems) im Institut für Genetik der Universität Köln.

2.4.4. Sequenzanalyse

Mit Hilfe eines Sequenzanalyse-Programms (HIBIO DNASIS, Hitachi America Ltd., Brisbane, CA, USA) wurden die DNS-Sequenzen analysiert und mit den bekannten Keimbahngenen aus der Genbank (CD018-1 HIBIO, Gene/Protein Sequenz Database 1, GenBank R79,0, Hitachi Software Engineering America Ltd, San Bruno, CA, USA) verglichen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchung von mikromanipulierten Einzelzellen aus einem NHL mit Hodgkin-Zellen auf Ig-Genumlagerungen

Von einem Fall einer CLL mit Hodgkin-Zellen (siehe 2.2.1.) erfolgte die Untersuchung der NHL B-Zellen und der Hodgkin-Zellen auf Ig-Genumlagerungen. In zwei Experimenten wurden mittels Mikromanipulation aus frischem Lymphknotengewebe des Falles CD3⁻NHL B-Zellen (erstes Experiment) bzw. mit anti-CD20-Antikörper gefärbte NHL B-Zellen (zweites Experiment) sowie aus weiteren Schnittpräparaten mit anti-CD30-Antikörper gefärbte Hodgkin-Zellen (in beiden Experimente) isoliert (siehe Abbildung 3). Als Negativkontrollen wurden aus zusätzlichen benachbarten Schnittpräparaten mit anti-CD3-Antikörper gefärbte T-Zellen isoliert. Die Analyse der Zellen erfolgte in einer semi-nested PCR nach dem in 2.3.2.ff beschriebenen Protokoll mit FR1 V_H- und V_K-Primern. Die isolierten Zellen wurden kodiert, so daß die Identität der Zellen während des Experimentes nicht bekannt war. Als Positivkontrolle der PCR dienten 25 pg DNS der in 2.1.1. beschriebenen Fälle von CLL sowie einzelne FACS-sortierte IgD⁺ B-Zellen. (siehe 2.1.6.).

Im ersten Experiment wurde aus sechs von zehn Hodgkin-Zellen sowie aus drei von zehn NHL B-Zellen eine Ig-Genumlagerung der V_H4-Familie amplifiziert (siehe 3.1. Abbildung 4 und Tabelle 5). Eine Kontroll-T-Zelle zeigte ebenfalls eine Ig-Genumlagerung der V_H4-Familie. Von allen vier der untersuchten FACS-sortierten IgD⁺ B-Zellen konnten PCR-Produkte erhalten werden (siehe Tabelle 5). Die CLL-Positivkontrollen zeigten die erwarteten Banden von ca. 300-350 bp Länge in der Gelelektrophorese.

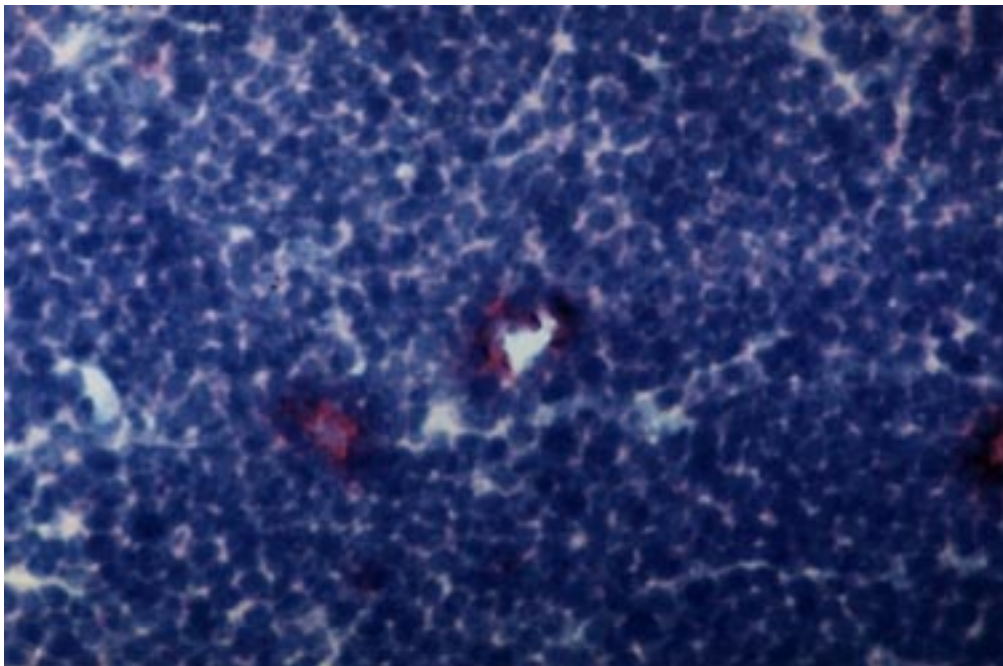
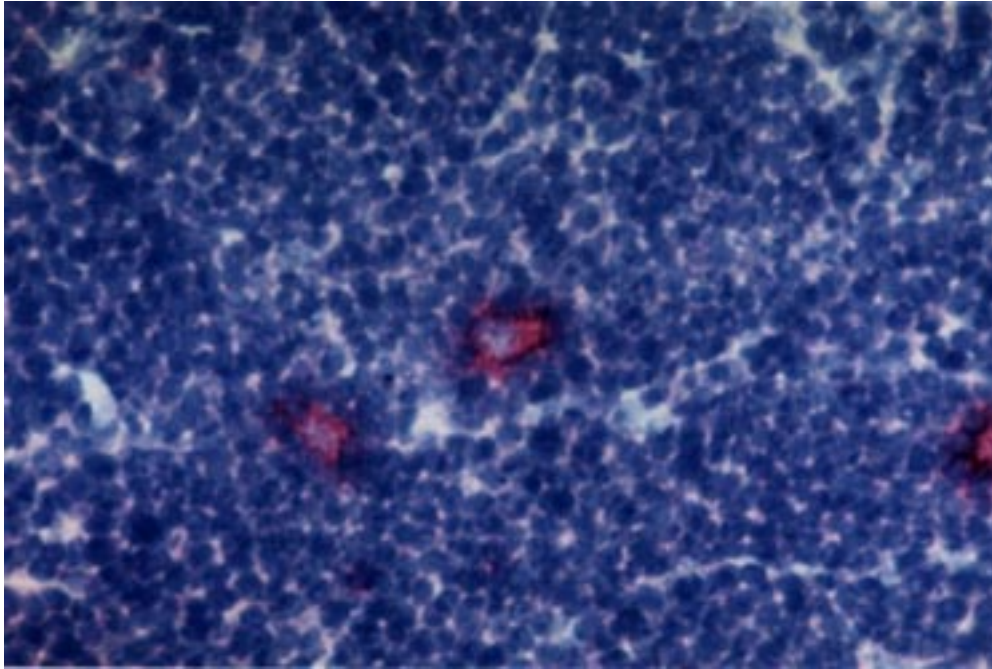


Abbildung 3: Mikromanipulation einer einzelnen Hodgkin-Zelle

Lymphknotenpräparat der untersuchten CLL mit Hodgkin-Zellen mit einer CD30-positiven Hodgkin-Zelle in der Mitte des Bildes vor (oberes Bild) und nach (unteres Bild) Isolierung. Die umliegenden Zellen wurden durch die Mikromanipulation nicht berührt. Gefrierschnitt, anti-CD30-Antikörper Färbung, Hämalaun Gegenfärbung, 600-fache Vergrößerung.

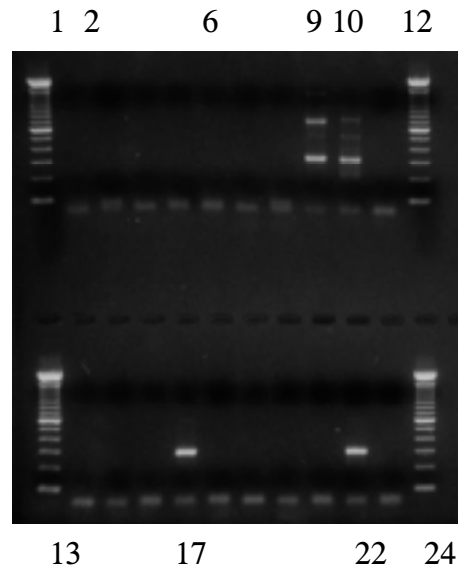


Abbildung 4: Polaroidfoto eines 2%igen Agarosegels. Gelelektrophoretische Darstellung des Nachweises von Ig-Genumlagerungen einer Hodgkin-Zelle und einer NHL B-Zelle der untersuchten CLL mit Hodgkin-Zellen.

Die Gelspuren 1, 12, 13 und 24 zeigen den Längenstandard (100 bp-Marker) .

Die Spuren 2-6 zeigen Negativkontrollen.

Die Spuren 7-11 zeigen die Amplifikationsprodukte einer FACS-sortierten IgD⁺ B-Zelle (Positivkontrolle), die Spuren 14-18 zeigen das Amplifizierungsprodukt einer Hodgkin-Zelle und die Spuren 19-23 das einer NHL B-Zelle mit familienspezifischen Primern der V_H-Familien 1, 2, 3, 4 und 5/6.

Die Hodgkin-Zelle und die NHL B-Zelle zeigen Genumlagerungen der V_H4-Familie (Spur 17 und 22), die IgD⁺ B-Zelle der V_H3- und V_H4-Familie (Spur 9 und 10).

Im zweiten Experiment wurde aus fünf von zwölf Hodgkin-Zellen und aus sechs von zwölf NHL B-Zellen erneut eine V_H4-Umlagerung nachgewiesen (siehe Tabelle 5). Eine NHL B-Zelle wies neben einer V_H4- auch eine V_H3-Umlagerung auf, welche jedoch nicht reproduziert werden konnte. Aus keiner der acht Kontroll-T-Zellen wurde eine Ig-Genumlagerung amplifiziert. Von fünf der sechs untersuchten FACS-sortierten IgD⁺ B-Zellen wurden PCR-Produkte in der erwarteten Länge von 300-350 bp erhalten (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammenfassung der Einzelzell-PCR-Analyse der CLL mit HRS-ähnlichen Zellen

Zelltyp	Experiment	positive/ analysierte Zellen	PCR-Produkte		Umlagerungen	
			erhalten	sequenziert	wiederholt	einmalig
NHL-B-Z.	1	3/10	3	3	3 V _H 4	
	2	6/12	7	6	6 V _H 4	(1 V _H 3)
Hodg.-Z.	1	6/10	6	6	6 V _H 4	
	2	5/12	5	5	5 V _H 4	
Kontrollen						
FACS-s.IgD ⁺ B-Z.	1+2	9/10	21	17	multiple	
T-Zellen	1+2	1/14	1	1	1 V _H 4	

Zur Analyse der Hodgkin-Zellen und der NHL B-Zellen wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Zellen waren kodiert und T-Zellen (am selben Tag wie die Hodgkin-Zellen und die NHL B-Zellen von angrenzenden, mit OKT3-Antikörper gefärbten Schnitten mikromanipuliert) sowie FACS-sortierte IgD⁺ B-Zellen wurden als Kontrollen verwendet. Die Anzahl der erhaltenen und sequenzierten PCR-Produkte ist angegeben. "Wiederholte Umlagerungen" sind klonal verwandte Umlagerungen. "Einmalige Umlagerungen" sind Umlagerungen, die nur einmal erhalten wurden und die nicht verwandt zu einer anderen Sequenz waren. Für die Hodgkin-Zellen und die NHL B-Zellen wurden in beiden Experimenten dieselben "wiederholten Umlagerungen" gefunden (siehe Text). "Multiple" bedeutet, daß nicht verwandte V_H- und V_K-Genumlagerungen von verschiedenen V-Genfamilien amplifiziert wurden. Von FACS-sortierten IgD⁺ B-Zellen wurden Mitglieder von allen V_H- und V_K-Genfamilien mit Ausnahme der V_K5/6-Familie amplifiziert. Keine von 17 sequenzierten Ig-Genumlagerungen der FACS-sortierten IgD⁺ B-Zellen war klonal verwandt zu einer wiederholten Umlagerung der Hodgkin-Zellen oder der NHL B-Zellen. Vier PCR-Produkte wurden nicht sequenziert. Eine aus einer T-Zelle in Experiment 1 amplifizierte Ig-Genumlagerung hatte die gleiche Sequenz wie die klonale V_H4-Genumlagerung der NHL B-Zellen (siehe Text).

Da weder die NHL B-Zellen noch die Hodgkin-Zellen eine V_K-Genumlagerung aufwiesen, folgte für jeweils fünf Zellen beider Zelltypen eine Analyse mit V_λ-Primern. Es war keine Umlagerung für V_λ nachweisbar.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert (siehe 2.4.). Die Sequenzierung erfolgte mit dem entsprechenden V_H - bzw. V_K -Primer und J_H - bzw. J_K -Primer der zweiten Runde der PCR.

Die Sequenzen der Ig-Genumlagerungen aus den NHL B-Zellen waren identisch, also klonal verwandt. Auch die Sequenzen der Ig-Genumlagerungen der Hodgkin-Zellen waren klonal. Ein Vergleich der Sequenzen aus NHL B-Zellen und Hodgkin-Zellen zeigte, daß diese beiden Zellpopulationen bis auf eine Base identische Ig-Genumlagerungen hatten (siehe Abb.5). Die Sequenz der Ig-Genumlagerung der NHL B-Zellen und der Hodgkin-Zellen zeigte die höchste Homologie zum V_H4-21 Keimbahngen (Sanz et al. 1989). Die V_H4 Gensequenzen der NHL B-Zellen zeigten 15 Nukleotide Differenz (6,8% Mutation) zum V_H4-21 Gen, die Ig-Genumlagerungen der Hodgkin-Zellen 14 Unterschiede (6,4% Mutation).

Abbildung 5 (siehe folgende Seite):

Vergleich der Sequenzen der klonalen Ig-Genumlagerungen der Hodgkin-Zellen und der NHL B-Zellen miteinander und mit dem am höchsten homologen Keimbahngen V_H4-21 . Die gezeigte Sequenz der Hodgkin-Zellen und der NHL B Zellen stellt die Konsensussequenz der ermittelten Sequenzen der einzelnen Hodgkin-Zellen bzw. NHL B-Zellen dar. Somatische Mutation der Hodgkin- bzw. NHL B-Zellen sind als Unterschiede zum V_H4-21 Keimbahngen gekennzeichnet. Homologien zum D-Gen DIR2 und zum J_H6 -Gen sind angegeben.

_____CDR I_____

V_H4-21 TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG ATC CGC CAG CCC
Hodg.-Z. --- --- --- --- --- --- -A- --- --- --- -C- --- --- --- --- ---
NHL B-Z. --- --- --- --- --- --- -A- --- --- --- -C- --- --- --- --- ---

V_H4-21 CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT GGA AGC
Hodg.-Z. --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -C-
NHL B-Z. --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- --T --- --- --- --- -C-

_____CDR II_____

V_H4-21 ACC AAC ACA AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC
Hodg.-Z. --- --T --- --- --- --- --- --- --- --- --- --T --G --G ---
NHL B-Z. --- --T --- --- --- --- --- --- --- --- --- --T --G --G ---

V_H4-21 ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG
Hodg.-Z. --- --- --- --T --- --- --- --- -G- T-- --A --- A-- --- --- ---
NHL B-Z. --- --- --- --T --- --- --- --- -G- T-- --A --- A-- --- --- ---

_____CDR III_____

V_H4-21 GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA
Hodg.-Z. --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- AGT GTT GGG GTG ACT ACC GGT
NHL B-Z. --- --- --- --A --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

- --- --- - - --- ---
DIR2 JH6

V_H4-21
Hodg.-Z. GTG GAC TTC TGG
NHL B-Z. --- --- --- ---
A-- --- G-- ---
 JH6

Abbildung 5: Sequenzabbildung

Die Basensequenz der von einer Kontroll-T-Zelle nachgewiesenen V_{H4} -Umlagerung war mit der der NHL B-Zellen identisch. Auf diese, als zelluläre Kontamination oder als falsche Identifikation der mikromanipulierten Zelle zu wertende Sequenzübereinstimmung wird in der Diskussion eingegangen.

Keine der 17 sequenzierten Ig-Genumlagerungen (einschließlich der vier V_{H4} -Genumlagerungen) der FACS-sortierten IgD^+ B-Zellen war mit der klonalen V_{H4} -Genumlagerung der NHL B-Zellen und der Hodgkin-Zellen verwandt. Auch die Wasserkontrollen waren stets negativ, so daß (bis auf die Ig-Genumlagerung, die aus einer T-Zelle (s.o.) amplifiziert wurde) keine Kontamination in den Experimenten nachzuweisen war.

Zusätzlich zu der Einzelzell-PCR-Analyse erfolgte eine Ganzschnitt-PCR-Analyse des Falles. Hierzu wurde aus frischem Lymphknotengewebe DNS wie unter 2.1.4.ff beschrieben isoliert und wie unter 2.3.2.2. beschrieben analysiert. Es wurde eine Umlagerung der V_{H4} -Familie ermittelt. Die erhaltene Sequenz war identisch zu der Sequenz aus den einzelnen NHL B-Zellen.

3.2. Etablierung der FR2 V_H - und FR3 V_H -Primer zur Amplifikation von Ig-Genumlagerungen einzelner Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Primer für die FR2 und FR3 der V_H -Gene etabliert. In Korrespondenz zu den J_H -Primern (Küppers et al. 1993a, b) können mit den FR2-Primern ca. 200 bp lange Fragmente von Ig-Genumlagerungen nachgewiesen werden, bei Verwendung der FR3-Primer wiesen die PCR-Produkte eine Länge von ca. 100 bp auf. Hintergrund der Etablierung der FR2- und FR3-Primer war die Übertragung der Einzelzell-PCR-Analyse von Frischgewebe auf Formalin-fixiertes Gewebe. Die Formalin-Fixierung führt zu einer Fragmentierung der DNS, wodurch eine Amplifizierung von Genabschnitten erschwert wird. Durch die Etablierung der FR2- und der FR3-Primer sollte eine Amplifizierung von ca. 100 bzw. ca. 200 bp kürzeren Genabschnitten als bei Verwendung der FR1-Primer ermöglicht werden.

Die Etablierung der Primer erfolgte an den von Küppers et al. (1993a und 1995a) zur Etablierung der FR1 V_H -, V_K - und V_λ -Primern verwendeten Fälle von CLL (siehe 2.1.1.). Durch Austestung konnten die optimale Annealingtemperatur und die optimale $MgCl_2$ -Konzentration bestimmt werden (siehe 2.3.2.3. und 2.3.2.4. Tabelle 3 und 4). Es wurden in der Ganzschnitt-PCR bei aus Frischgewebe extrahierter DNS 50 ng DNS pro Ansatz eingesetzt, die Zyklenzahl betrug 34. Die Amplifizierung erfolgte sowohl in Kombination mit dem 5' J_H - als auch mit dem 3' J_H -Primer-Mix. Zur Übertragung der Bedingungen der Ganzschnitt-PCR mit FR2- und FR3-Primern auf DNS, die aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe isoliert wurde, wurden die in 2.1.3. beschriebenen NHL-Fälle verwendet. Mit 500 ng DNS als Target konnten die Ig-Genumlagerungen von neun der zehn NHL-Fälle mit den FR3 V_H -Primern amplifiziert werden. Mit den FR2 V_H -Primern gelang dieses bei fünf Fällen. Die Amplifizierung der auf 50 ng verdünnten DNS gelang bei zwei von drei untersuchten Fällen mit den FR3 V_H -Primern.

Bei der Etablierung der zweiphasigen PCR wurden 25 pg DNS der in 2.1.1. beschriebenen Fälle von CLL für die erste Runde eingesetzt. 25 pg entsprechen etwa der DNS-Menge aus fünf Zellen. Die PCR wurde zuerst mit dem 3' J_H -Primer-Mix in nach FR2 V_H - bzw. FR3 V_H -Primern getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt. Die PCR-Bedingungen für die erste Runde konnten durch Variation der Annealingtemperatur und der $MgCl_2$ -Konzentration optimiert werden. Anschließend wurden die FR2 V_H -Primer und die FR3 V_H -Primer jeweils mit der 3' J_H -Primer-Mischung als Mix in der ersten Runde eingesetzt. Als optimale Primerkonzentrationen im Reaktionsansatz erwiesen sich für die FR2 V_H /3' J_H -Primer-Mischung 3,125 nM und für die FR3 V_H /3' J_H -Primer-Mischung 6,25 nM für jeden Primer. Die V_H -Primer wurden in der zweiten Runde der PCR in getrennten Reaktionsansätzen eingesetzt.

Einzelne, von Zytospin-Präparaten zweier CLL-Fällen isolierte NHL B-Zellen (siehe 2.1.2.), wurden mit der FR3-Primer-Mischung in der oben beschriebenen semi-nested PCR analysiert. Die Zellen des ersten CLL-Falles wiesen Ig-Genumlagerungen der V_H -Familien 3 und 5, die des zweiten CLL-Falles der V_H -Familien 2 und 3 auf (Küppers et al. 1993a). Es wurden elf Einzelzellen des ersten CLL-Falles analysiert, von vier Zellen wurden PCR-Produkte mit dem A- und dem C-Primer erhalten. Von den fünf untersuchten Zellen des zweiten CLL-Falles wurden von zwei Zellen PCR-Produkte mit dem A- und dem B-Primer erhalten. Die

Effizienz, d.h. der Anteil der Zellen, aus denen mindestens eine Ig-Genumlagerung amplifiziert wurde, lag somit bei ca. 37%.

Bei der Analyse 16 FACS-sortierter einzelner μ^+ B-Zellen (siehe 2.1.6.) konnten von zwölf Zellen PCR-Produkte mit den FR3 V_H -Primern erhalten werden, die Effizienz der Amplifizierung betrug somit 75%. Von elf Zellen wurden mit dem A-Primer und von einer Zelle mit dem A- und dem C-Primer PCR-Produkte erhalten. Die Ergebnisse der Etablierung der Einzelzell-PCR-Analyse mit den FR3 V_H -Primern sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Untersuchung der Ig-Genumlagerungen von Einzelzellen mit dem FR3 V_H -Primer-Mix

Zelltyp	positive/analyierte Zellen
Zellen des ersten CLL-Falles	4/11
Zellen des zweiten CLL-Falles	2/5
FACS-sortierte μ^+ B-Zellen	12/16

Es zeigte sich somit, daß die Amplifizierung von Ig-Genumlagerungen einzelner Zellen unter Verwendung der FR2- bzw. der FR3-Primer möglich ist.

3.3. Untersuchung von aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben mikromanipulierten einzelnen HRS- und NHL-Zellen auf Ig-Genumlagerungen

3.3.1. Untersuchung von aus immungefärbten Präparaten von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben mikromanipulierten HRS-Zellen auf Ig-Genumlagerungen

Einzelne HRS-Zellen wurden mittels Mikromanipulation aus immungefärbten Schnitten Formalin-fixierter Biopsate eines lymphozytenreichen (LP) und eines gemischtzelligen Subtyps (MC) von Morbus Hodgkin isoliert (siehe 2.1.7.). Die Basensequenzen der Ig-Genumlagerungen der HRS-Zellen waren aus der Untersuchung von Küppers et al. (1994) bekannt. Bei Amplifizierung mit den FR3 V_H-Primern betrug die Länge der zu erwartenden PCR-Produkte bei dem LP MH 90 bp und bei dem MC MH 106 bp.

Die Durchführung der semi-nested PCR mit FR3 V_H-Primern erfolgte nach dem in 2.3.2.ff beschriebenen Protokoll. Als Positivkontrolle der PCR dienten 25 pg CLL-DNS (siehe 2.1.1.) sowie einzelne FACS-sortierte IgD⁺ B-Zellen (siehe 2.1.6.).

Es wurden von jedem Fall 20 HRS-Zellen untersucht. Aus keiner der Zellen konnte eine Ig-Genumlagerung amplifiziert werden (siehe Tabelle 7). Eine Verlängerung des Proteinase K-Verdau von einer auf drei Stunden bei jeweils 10 der 20 analysierten Zellen jeden Falles führte zu keiner Verbesserung der Amplifikation.

Drei der vier CLL-Positivkontrollen zeigten in der Gelelektrophorese Banden in der erwarteten Höhe. Ebenso waren PCR-Produkte im erwarteten Längenbereich (80-130 bp) bei neun von zehn FACS-sortierten IgD⁺ B-Zellen nachzuweisen (siehe Tabelle 7). Von acht der Zellen wurden PCR-Produkte mit dem A-Primer und von einer Zelle mit dem A- und dem C-Primer erhalten. Aufgrund der hohen Effizienz der Amplifizierung der IgD⁺ B-Zell-Positivkontrollen konnte von einer korrekten Durchführung der PCR ausgegangen werden. Die Gelspuren der Negativkontrollen zeigten keine PCR-Produkte.

Tabelle 7: PCR-Analyse mikromanipulierter HRS-Zellen von immungefärbten und Hämalaun gegengefärbten Schnitten Formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebes.

Zelltyp	Fall	positive/analyzierte Zellen
HRS-Zellen	LP MH	0/20
	MC MH	0/20
Kontrollen		
FACS-sortierte IgD ⁺ B-Zellen		9/10

3.3.2. Untersuchung des Einflusses der Immunfärbung auf die Amplifizierbarkeit der DNS

Bei der Durchführung einer Immunfärbung werden Schnitt-Präparate einer aufwendigen Behandlung unterzogen. Es sollte daher der Einfluß der Immunfärbung auf die durch Formalinfixierung gegenüber unfixiertem Gewebe bereits verschlechterte DNS-Güte untersucht werden.

DNS von zwei Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten NHL-Fällen mit bekannten Ig-Genumlagerungen wurde extrahiert (siehe 2.1.4.). Dazu wurde von jedem Fall ein 10 µm Schnitt angefertigt. Zusätzlich wurden jeweils fünf histologische Schnitte mit einer Dicke von 2 µm mit anti-CD20-Antikörper gefärbt, von den Objektträgern abgekratzt und in sterile Eppendorf-Hütchen überführt. Nach der Extraktion erfolgte die Analyse der DNS in der Gelelektrophorese. In der Gelelektrophorese waren deutliche Unterschiede zwischen den DNS-Präparationen der immungefärbten und nicht immungefärbten Präparate zu erkennen (siehe Abbildung 6). Die aus den nicht immungefärbten Schnitten isolierte DNS stellte sich in Fragmenten dar, die gleichmäßig vom Gelslot bis auf die Höhe der kleinsten Länge des Standard-Basenmarkers auf dem Gel verteilt waren. Demgegenüber konnte die nach Immunfärbung extrahierte DNS in Fragmenten bis zu einer DNS-Stranglänge von maximal 300 bp auf dem Gel nachgewiesen werden.

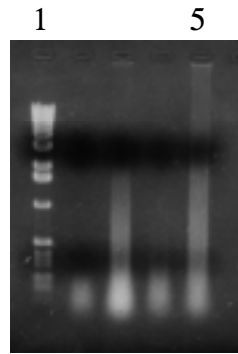


Abbildung 6: Polaroidfoto eines 1%igen Agarosegels. Gelelektrophoretische Darstellung des Einflusses der Immunfärbung auf die Länge der DNS-Fragmente bei Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe

Spur 1 zeigt als Längenstandard eine kilo-bp-Leiter, Spur 2 und 3 zeigen die extrahierte DNS des NHL G48, Spur 4 und 5 die des NHL G61. Die DNS aus Spur 2 und 4 wurde aus den Schnittpräparaten nach der Immunfärbung, die DNS aus Spur 3 und 5 aus den ungefärbten Präparaten isoliert.

Bei der anschließend durchgeführten Ganzschnitt-PCR mit den FR1, FR2 und FR3 V_H -Primern mit korrespondierenden J_H -Primern war bei einer eingesetzten DNS-Menge von 250 ng bei der aus den Paraffinschnitten isolierten DNS eine Amplifikation der Ig-Genumlagerung möglich. Es zeigten sich nach der Gelelektrophorese auf dem Agarosegel prominente Banden. Mit der nach Immunfärbung extrahierten DNS war bei Amplifikation mit den FR1 V_H -Primern nach der Gelelektrophorese auf dem Agarosegel nur eine sehr schwache Bande zu erkennen. Auch die Intensität der Bande des mit FR2 V_H -Primern amplifizierten Produktes war bei der DNS aus immungefärbten Präparaten schwächer, wohingegen die Bande des mit dem FR3 V_H -Primer amplifizierten Produktes prominent war. Die schlechtere Amplifikation der längeren Produkte mit den FR1- und den FR2-Primern deutet auf eine geringere Qualität der aus immungefärbten Präparaten extrahierten DNS im Gegensatz zu der aus nicht-immungefärbten hin.

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der Immunfärbung auf die DNS erfolgte die Analyse zweier Formalin-fixierter, in Paraffin eingebetteter Tonsillen (siehe 2.1.4.). Dazu wurden von jeder Tonsille vier verschiedene Fraktionen erstellt und die DNS wie in 2.1.4.1.-2.1.4.4. beschrieben extrahiert:

1. je Tonsille ein 10 μm Schnitt zur DNS-Extraktion,
2. je Tonsille fünf 2 μm dicke Schnitte, welche wie für die Immunfärbung im Wärmeschrank entparaffiniert, aber nicht gefärbt wurden,
3. je Tonsille fünf mit anti-CD20-Antikörper gefärbte, 2 μm dicke Schnitte,
4. je Tonsille fünf 2 μm dicke Schnitte, welche nach einer Entparaffinierung für 24 Stunden im Xylol-Bad mit anti-CD20-Antikörper gefärbt wurden.

Wieder konnten nach der Gelelektrophorese deutliche Unterschiede in der Länge der DNS-Fragmente der einzelnen Fraktionen erkannt werden. Fraktion 1 und 2 zeigten eine gleichmäßige Größenverteilung der DNS-Fragmente. Die DNS-Fragmente stellten sich bei der ersten Fraktion von der Höhe der kleinsten Länge des Standard-Basenmarkers bis in den Gelslot hinein dar. Bei Fraktion 2 reichten sie annähernd so weit bis auf eine Höhe von etwa 1200 bp Länge. Fraktion 3 und 4 wichen davon stark ab. Die DNS-Fragmente zeigten eine Länge von maximal 300 bp.

Zum Vergleich wurde die DNS eines unfixierten Falles eines MH untersucht. Die Analyse der extrahierten DNS im Gegensatz zu der mit anti-CD20-Antikörper gefärbten und extrahierten DNS erbrachte in der Gelelektrophorese keinen deutlichen Unterschied der DNS-Stranglänge. Bei beiden Fraktionen waren die DNS-Fragmente gleichmäßig über die ganze Gel-Länge zu erkennen. Der oben beschriebene Einfluß der Immunfärbung auf die Länge der extrahierten DNS-Fragmente konnte bei der aus unfixiertem Material extrahierten DNS also nicht beobachtet werden.

3.3.3. Untersuchung mikromanipulierter HRS-Zellen aus Hämalaun-gefärbten sowie aus immungefärbten und mit Hämalaun gegengefärbten Präparaten von Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe auf Ig-Genumlagerungen

Aus histologischen Schnittpräparaten eines LP MH wurden mittels Mikromanipulation HRS- und T-Zellen isoliert (siehe 2.1.6.). Da ein Einfluß der Immunfärbung auf die DNS-Güte vermutet wurde, (s.o.), erfolgte die Isolierung der HRS-Zellen in zwei Fraktionen. Die Mikromanipulation wurde zum einen an nur mit Hämalaun gefärbten und zum anderen an mit anti-CD20-Antikörper gefärbten und mit Hämalaun gegengefärbten Schnitten durchgeführt.

Als Negativkontrollen dienten T-Zellen, die am gleichen Tag aus benachbarten, mit anti-CD3-Antikörper gefärbten Schnitten isoliert wurden. Positivkontrollen der PCR waren einzelne FACS-sortierte IgD⁺ B-Zellen. Die Basensequenz der Ig-Genumlagerung der V_H3-Familie der HRS-Zellen war aufgrund von vorhergehenden Untersuchungen bekannt. Die Länge des zu erwartenden PCR-Produktes betrug bei Amplifizierung mit dem FR3 V_H-Primer 102 bp.

Die Durchführung der semi-nested PCR mit FR3 V_H-Primern erfolgte nach dem in 2.3.2.ff beschriebenen Protokoll. Es wurden 15 aus Hämalaun-gefärbten und 15 aus mit anti-CD20-Antikörper gefärbten Schnitten isolierte HRS-Zellen analysiert. Von keiner HRS-Zelle konnte ein PCR-Produkt erhalten werden, ebenso von keiner der acht analysierten T-Zellen (siehe Tabelle 8). Bei sieben der acht FACS-sortierten IgD⁺ B-Zellen waren in der Gelelektrophorese Banden in der erwarteten Höhe (80-130 bp) nachweisbar. Von sechs Zellen wurden Produkte mit dem A-Primer erhalten und von einer Zelle mit dem C-Primer.

Tabelle 8: PCR-Analyse mikromanipulierter HRS-Zellen von immungefärbten sowie Hämalaun-gefärbten Schnitten aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe

Zelltyp Zellen	Färbung	positive/analysierte
HRS-Zellen	anti-CD20-AK + Hämalaun	0/15
	Hämalaun	0/15
Kontrollen		
FACS-sortierte IgD ⁺ B-Zellen		7/8
T-Zellen	anti-CD3-AK + Hämalaun	0/8

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es bei der Analyse von drei Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Fällen von MH nicht möglich war, Ig-Genumlagerungen in den mittels Mikromanipulation isolierten HRS-Zellen zu amplifizieren (3.3.1.-3.3.3.). Mit Ganzschnitt-PCR-Analysen von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten B-NHL sind jedoch erfolgreich Ig-Genumlagerungen nachgewiesen worden (Küppers et al. 1993). Auch bei der Analyse von Zellgruppen bestehend aus

neoplastischen Follikeln oder einigen hundert Tumorzellen (Pan et al. 1994) war dieses möglich.

Es stellte sich die Frage nach einer "Auflösegrenze" der Amplifizierbarkeit von aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material extrahierter DNS. Da bei MH die maligne HRS-Zell-Tumorpopulation ca. 1% der Gesamtzellmenge darstellt, wurde ein B-NHL für die Analyse von Tumorzellgruppen verwendet (2.1.7.).

3.3.4. Untersuchung von mikromanipulierten Tumor-Zellgruppen und einzelnen NHL B-Zellen eines B-NHL auf Ig-Genumlagerungen

Mittels Mikromanipulation wurden aus histologischen Schnittpräparaten eines B-NHL (G62) Tumorzellgruppen und einzelne Tumorzellen sowie T-Zellen isoliert (siehe 2.1.8.). Die Isolierung der Tumorzellen erfolgte in zwei Fraktionen zum einen aus mit Hämalaun und zum anderen aus mit anti-CD20-Antikörper gefärbten und mit Hämalaun gegengefärbten Schnitten. Die T-Zellen wurden aus mit anti-CD3-Antikörper gefärbten Schnitten isoliert. Sie dienten als Negativkontrollen der PCR.

Die semi-nested PCR wurde mit FR3 V_H-Primern nach dem in 2.3.2.ff beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Basensequenz der Ig-Genumlagerung der V_H3-Familie der NHL B-Zellen war bekannt. Die Länge des erwarteten PCR-Produktes betrug bei Amplifizierung mit den FR3 V_H-Primern 99 bp. Als Positivkontrolle der PCR dienten einzelne FACS-sortierte IgD⁺ B-Zellen (siehe 2.1.6.). Die Ergebnisse der PCR-Analyse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Die Amplifizierung von Zellgruppen mit 50 bis zu 200 Zellen war möglich. Die PCR-Produkte aus den Tumorzellen stellten sich als scharfe Banden in erwarteter Höhe auf dem Agarosegel dar. Es war kein Unterschied in der Effizienz der Amplifizierbarkeit der Ig-Genumlagerung zwischen den aus Hämalaun-gefärbten und den aus immungefärbten und Hämalaun gegengefärbten Schnitten isolierten Zellen festzustellen.

Die Effizienz der Amplifizierung lag bei Gruppen von fünf bzw. drei Zellen bei ca 70%, sie fiel drastisch bei der Analyse von Einzelzellen auf 10% ab. Insgesamt wurden 31 Einzelzellen untersucht. Alle drei Zellen, die ein PCR-Produkt erbrachten, waren aus nur Hämalaun-gefärbt Schnitten isoliert worden.

Aus keiner der mikromanipulierten T-Zellen wurde eine Ig-Genumlagerung amplifiziert, wohingegen bei acht von 15 untersuchten FACS-sortierten IgD⁺-B-Zellen Banden von 80-130 bp nachzuweisen waren.

Tabelle 9: Analyse des NHL (G62) mit FR3 V_H-Primer-Mix

Anzahl d. Zellen pro Gruppe	Färbung	positive/analyisierte Zellgruppen bzw. Zellen	Gesamtzahl positiver/analyisierter Zellgruppen bzw. Zellen
200	anti-CD20-AK + Häkalaun	2/2	
	Häkalaun	2/2	4/4
100	anti-CD20-AK + Häkalaun	2/2	
	Häkalaun	2/2	4/4
50	anti-CD20-AK + Häkalaun	2/2	
	Häkalaun	2/2	4/4
20	Häkalaun	1/1	1/1
10	anti-CD20-AK + Häkalaun	4/5	
	Häkalaun	5/7	9/12
5	anti-CD20-AK + Häkalaun	6/10	
	Häkalaun	5/6	11/16
3	Häkalaun	2/2	2/2
2	Häkalaun	1/3	1/3
1	anti-CD20-AK + Häkalaun	0/16	
	Häkalaun	3/15	3/31
Kontrollen			
FACS-sort. IgD ⁺ B-Zellen			8/15
T-Zellen	anti-CD3-AK + Häkalaun		0/10

Bei einigen Zellgruppen erfolgte eine Analyse mit der FR2 V_H-Primer-Mischung in einer semi-nested PCR nach dem in 2.3.2ff beschriebenen Protokoll. Die Effizienz der Amplifizierung lag deutlich unter der mit FR3 V_H-Primern, weshalb auf eine Untersuchung von Einzelzellen verzichtet wurde (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Analyse des NHL (G62) mit FR2 VH-Primer-Mix

Anzahl d. Zellen pro Gruppe	Färbung	positive/analyisierte Zellgruppen	Gesamtzahl positiver/analyisierter Zellgruppen
200	anti-CD20-AK + Häkalaun	0/3	
	Häkalaun	2/3	2/6
150	anti-CD20-AK + Häkalaun	1/1	1/1
100	anti-CD20-AK + Häkalaun	0/3	
	Häkalaun	2/3	2/6
50	anti-CD20-AK + Häkalaun	1/3	
	Häkalaun	1/3	2/5
Kontrollen			
	FACS-sort. IgD ⁺ B-Zellen		1/3
	T-Zellen anti-CD3-AK + Häkalaun		0/2

4. DISKUSSION

4.1. Molekularbiologische Untersuchung eines B-NHL mit Hodgkin-Zellen

Die großen, mit einem blasigen Zellkern und prominenten Nucleoli ausgestatteten Hodgkin-Zellen und die mehrkernigen Reed/Sternberg-Zellen sind die typischen neoplastischen Zellen des Morbus Hodgkin (MH). Das Vorhandensein dieser zusammengefaßt auch als Hodgkin-Reed/Sternberg-(HRS-) Zellen bezeichneten Tumorzellen reicht jedoch für die Diagnose eines MH nicht aus. Ein typisches Zellinfiltrat aus Makrophagen, Histiozyten, Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, Retikulumzellen und evtl. Epitheloidzellen gehört ebenfalls zum histologischen Bild dieses malignen Lymphoms. Dieses Kriterium ist sehr wichtig, da das Vorkommen von HRS-Zellen auch bei anderen Erkrankungen beschrieben ist, so bei der Epstein-Barr-Virusinfektion "Infektiöse Mononukleose" (Tindle et al. 1972) oder beim Burkitt-Lymphom (Schnitzer et al. 1970). Strum et al. (1970) fanden HRS-Zellen in 13 Fällen unterschiedlicher Erkrankungen, so in einem anaplastischen Karzinom der Brust, einem wenig differenzierten Adenokarzinom der Lunge, einem malignen Melanom sowie in Fällen von malignen Lymphomen. Schwierig ist die Einordnung der HRS-Zellen in Fällen von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Ein Kombinationslymphom aus NHL und MH zeichnet sich durch das Vorhandensein des typischen Zellinfiltrates um die HRS-Zellen sowie einem abgegrenzten NHL aus (Jaffe et al. 1994). Ist dieses nicht gegeben und liegen die HRS-Zellen diffus zwischen den NHL-Zellen verteilt, so werden diese HRS-Zellen von verschiedenen Autoren als HRS-ähnlichen Zellen (engl.: Reed/Sternberg-like cells) bezeichnet (Hansmann et al. 1989, Momose et al. 1992, Schnitzer 1970, Shin et al. 1993, Tindle et al. 1972, Tsang et al. 1993, siehe Tabelle 8). Aufgrund der uneinheitlichen Nomenklatur werden die beschriebenen Zellen unabhängig von dem Vorhandensein eines MH-typischen Zellinfiltrates als HRS-Zellen bzw. als einkernige Hodgkin-Zellen bezeichnet.

Schnitzer (1970) beschreibt einen Fall von chronischer, lymphatischer Leukämie (CLL) mit Reed/Sternberg-Zellen. Er interpretiert die HRS-Zellen als aufgrund der CLL-Chemotherapie veränderte, histiocytische Zellen. Dick et al. (1978) beschreiben ein histologisches Lymphknotenbild von Grad-III

CLL mit von HRS-Zellen nicht zu unterscheidende Zellen. Sie interpretieren diese Zellen als transformierte CLL-Zellen. Auch Colby et al. (1981) beschreiben einen derartigen Fall. Mittels Immunfluoreszenz konnte hier eine Leichtketten-Restriktion (κ) der NHL B-Zellen und der HRS-Zellen nachgewiesen werden. Dieser Fall wurde als CLL angesprochen.

Eine Erleichterung bei der Einordnung der HRS-Zellen bietet die Immunhistochemie. HRS-Zellen zeichnen sich beim gemischtzelligen (MC) und beim nodulär-sklerosierenden (NS) Subtyp des MH in der Regel durch die Expression der Oberflächenmarker CD30 (in ca. 90% der Fälle) und CD15 (in ca. 80% der Fälle) aus. HRS-Zellen des lymphozytenreichen (LP) Subtypes des MH fehlen in ca. 70% der Fälle die Oberflächenmarker CD30 und CD15, sie exprimieren aber im Gegensatz zu den HRS-Zellen der klassischen Subtypen MC und NS in ca. 80% der Fälle CD20 (Knowles 1993).

Die Angaben über die von HRS-Zellen in NHL exprimierten Oberflächenmarker weichen in der Literatur sehr voneinander ab. Die HRS-Zellen in NHL exprimierten laut Norton und Isaacson (1985) kein CD15, Kornstein et al. (1986) und Sheibani et al. (1986) konnten jedoch die Expression dieser Antigene nachweisen. Hansmann et al. (1989) beschrieben vier Fälle von CLL mit HRS-Zellen. In drei dieser Fälle exprimierten die HRS-Zellen CD15, in zwei der Fälle zusätzlich CD30. Im vierten Fall exprimierten die HRS-Zellen kein CD15, jedoch CD30. In einem von Shin et al. (1993) beschriebenen Fall von CLL mit HRS-Zellen exprimierten die HRS-Zellen CD20, nicht jedoch CD15 und CD30.

Diese Übersicht macht deutlich, daß die immunhistochemischen Untersuchungen die Diagnosestellung bei der Unterscheidung zwischen MH, NHL mit HRS-Zellen oder Kombinationslymphom unterstützen können, jedoch immer im Kontext von Histologie und Klinik gesehen werden müssen.

Tsang et al. (1993) teilten zur besseren Übersicht die Fälle von CLL mit HRS-Zellen in drei Gruppen ein: Gruppe A beinhaltet danach Fälle von CLL mit gleichzeitigem MH, d.h. das typische Zellinfiltrat um die HRS-Zellen ist vorhanden. In Gruppe B werden Fälle von CLL mit HRS-Zellen, um die das MH-typische Zellinfiltrat fehlt, zusammengefaßt. Die HRS-Zellen verhalten sich immunphänotypisch wie die der klassischen Subtypen MC und NS des MH, d.h. sie exprimieren CD30 und meist CD15. Gruppe C unterscheidet sich nur durch die Oberflächenmarker von Gruppe B, die HRS-Zellen exprimieren B-Zellmarker (u.a. CD20) und kein CD15. Von den 13 von Mimose et al. (1992) beschriebenen Fälle von CLL mit HRS-Zellen lassen sich sechs in Gruppe B und fünf in Gruppe C einordnen, zwei weitere Fälle

lassen sich mit dieser Einteilung nicht erfassen, die HRS-Zellen exprimieren CD15, CD20 und CD30.

In der Literatur beschriebene Fälle von CLL mit HRS-Zellen sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: Literaturübersicht: CLL mit HRS-Zellen

	Anzahl d. Fälle	CLL-Z. einzelner Fälle	HRS-Z. einzelner Fälle	CD15	CD20	CD30	Sonstiges
1. Strum et al. 1970	2						Keine Immunhisto- chemie
2. Schnitzer et al. 1970	1						Keine Immunhisto- chemie
3. Dick et al. 1978	1						Keine Immunhisto- chemie
4. Colby et al. 1981	1	kappa (+)	kappa (+)				Immunfluoreszenz- Untersuchung der Ig-Leichtkette
5. Hansmann et al. 1989	4		1. 2. 3. 4.	+ + + -		+ / - + +	
6. Williams et al. 1991	2	x	x	+	+	+	Fall 1 zeigt 1 Jahr nach CLL-Chemo- therapie in neuer Biopsie nur MH
7. Momose et al. 1992	13	13	1x 5x 2x 3x 2x	+ + - - +	+ - + + +	- + - +	In situ Hybridisierung: EBV-RNS(+) in 12 der Fälle
8. Shin et al. 1993	1		1x	-	+	-	
9. Tsang et al. 1993	1	x kappa IgM u. Ig D	x (kappa)	- -	+ +	- +	
10. Jaffe et al. 1994	8	x	x	+	+	+	

Ein vielversprechender Ansatz zur Untersuchung von CLL mit HRS-Zellen ist die Anwendung molekularbiologischer Verfahren. Seit der Etablierung der Einzelzell-PCR-Analyse mikromanipulierter Zellen (Küppers et al 1993b) ist die Amplifizierung der Ig-Genumlagerungen einer einzelnen Zelle möglich (siehe 1.1.). Die Basensequenz der CDR3 der Antikörper ist mit Hilfe dieser PCR und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte zu ermitteln. Die CDR3 stellt durch ihre Einzigartigkeit einen idealen Klonalitätsmarker für B-Zell-Tumoren dar (siehe 1.2. und 1.4.). Anhand dieses Verfahrens ist es möglich, eine klonale Verwandtschaft von Zellen zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einzelzell-PCR-Untersuchung bei einem Fall einer CLL mit Hodgkin-Zellen angewendet, um eine mögliche klonale Verwandtschaft der phänotypisch und immunhistochemisch unterschiedlichen NHL-B-Zellen und Hodgkin-Zellen aufzuzeigen.

Das zur molekularbiologischen Untersuchung ausgewählte Lymphom ist bei der Begutachtung im Institut für Pathologie der Universität Köln als CLL mit Hodgkin-Zellen eingestuft worden. Die Hodgkin-Zellen (typische Reed-Sternberg-Zellen kamen nicht zur Ausbildung) lagen im histologischen Bild diffus zwischen den kleinen, lymphoiden Zellen des NHL vom Typ einer chronischen, lymphatischen Leukämie (CLL) verstreut. Ein für den MH typisches Zellinfiltrat in der Umgebung der Hodgkin-Zellen war nicht vorhanden.

Immunhistochemisch reagierten die Hodgkin-Zellen mit anti-CD30- und anti-CD15-Antikörpern positiv, wohingegen die kleinen lymphoiden Zellen der CLL (NHL B-Zellen) positiv für den B-Zell-Marker CD20 waren. Nach Tsang et al. (1993) wäre dieser Fall in Gruppe B einzuordnen. Weder für die NHL B-Zellen noch für die Hodgkin-Zellen war immunhistochemisch eine eindeutige klonale Ig-Expression nachweisbar.

Das unterschiedliche Immunfärbeverhalten der Hodgkin-Zellen und der NHL-B-Zellen scheint auf einen unterschiedlichen Ursprung dieser Tumorzellpopulationen hinzudeuten. Eine eindeutige Aussage über eine eventuelle klonale Verwandtschaft ist jedoch anhand der angewendeten diagnostischen Möglichkeiten nicht möglich. Die Untersuchung der Ig-Genumlagerungen der Tumorzellen mittels einer Einzelzell-PCR-Analyse stellt demgegenüber eine sichere Möglichkeit des Klonalitätsnachweises dar.

Die Basensequenzen der Ig-Genumlagerungen mikromanipulierter Hodgkin-Zellen und NHL B-Zellen wurden ermittelt (siehe 3.1.). Sowohl Hodgkin-Zellen als auch NHL B-Zellen wiesen eine $V_H D_H J_H$ -Genumlagerung eines Gens der $V_H 4$ -Familie auf (siehe Tabelle 5). Die Sequenzen der Ig-Genumlagerungen individueller Hodgkin-Zellen waren identisch, ebenso die Sequenzen der Ig-Genumlagerungen einzelner NHL B-Zellen (siehe Abbildung 5). Es handelt sich bei beiden Zellpopulationen damit um einen Zellklon. Die Sequenzen der Ig-Genumlagerungen der Hodgkin-Zellen und der NHL B-Zellen waren bis auf einen Basenunterschied miteinander identisch (siehe Abbildung 5). Die beiden Populationen der Hodgkin-Zellen und der NHL B-Zellen sind somit klonal verwandte Zellpopulationen.

Zu dem am nächsten homologen Keimbahngen $V_H 4-21$ (Sanz et al. 1989) wiesen die Hodgkin-Zellen 14 Basen, die NHL B-Zellen 15 Basen Differenz auf. Die überwiegende Mehrheit dieser Nukleotidsubstitutionen kann verlässlicherweise somatischen Mutationen zugeordnet werden, da die meisten humanen V_H -Gene bekannt sind (Matsuda et al. 1993, Cook et al. 1994). Weitere Evidenz für die weitgehende Bekanntheit der V_H -Keimbahngene konnte in einer Sequenzanalyse von V_H -Genen, die von nativen IgD⁺ B-Zellen (diese Zellen tragen bekannterweise unmutierte, umgelagerte V-Gene) amplifiziert wurden, gewonnen werden. Unter 55 V_H -Genen die von B-Zellen von zwei Spendern amplifiziert wurden, waren 48 zu 100% homolog zu publizierten Keimbahngenen. Sieben Sequenzen hatten zwischen einem und acht Nukleotidunterschiede (im Durchschnitt vier Unterschiede) zu den am höchsten homologen Keimbahngenen (H. Kanzler, R. Küppers, persönliche Mitteilung).

Küppers et al. 1994 und Kanzler et al. 1996b beschrieben das Auftreten von klonalen Ig-Genumlagerungen in HRS-Zellen des MH. Sie konnten zeigen, daß die HRS-Zellen im MH einen dominanten, von B-Zellen abgeleiteten Tumorklon darstellen. In den klonalen Ig-Genumlagerungen wurde ein hohes Maß an somatischer Mutation festgestellt. Es wird angenommen, daß der Prozeß der somatischen Hypermutation von der Mikroumgebung des Keimzentrums abhängig ist. Aufgrund des Auffindens von mutierten, umgelagerten V-Genen in den HRS-Zellen kann daher angenommen werden, daß sich die HRS-Zellen von Keimzentrums-B-Zellen oder deren Nachkommen ableiten. In einigen Fällen wurden Mutationen gefunden, die die Schlußfolgerung zulassen, daß die Vorläuferzellen der HRS-Zellen aus einem Keimzentrum stammen müssen (Kanzler et al. 1996b).

In dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Fall einer CLL mit Hodgkin-Zellen stellte sich ebenfalls heraus, daß die Hodgkin-Zellen identische Ig-Genumlagerungen tragen und somit eine klonale Population mit Herleitung von der B-Zell-Linie darstellen. Wie in den bereits untersuchten HRS-Zellen des MH tragen auch die Hodgkin-Zellen der untersuchten CLL somatisch mutierte, umgelagerte V-Gene (s.o.). Das Auftreten von somatischen Mutationen in V_H -Genumlagerungen in Zellen der B-CLL ist in ca. 25% der untersuchten Fälle von B-CLL beschrieben worden (zur Übersicht siehe Schroeder und Dighiero, 1994). Zusammenfassend kann in dem untersuchten Fall von einer Herleitung der klonal verwandten Populationen von Hodgkin-Zellen und NHL-B-Zellen von einer Keimzentrums-B-Zelle oder deren Nachkommen ausgegangen werden.

In dem untersuchten Fall von CLL mit Hodgkin-Zellen konnte weder für die Hodgkin-Zellen noch für die NHL-B-Zellen eine V-J-Umlagerung für κ - oder für λ -Leichtkettengene nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5). Es ist denkbar, daß somatische Mutationen im Bereich der Bindungsstellen der Primer für die Einzelzell-PCR eine effiziente Bindung der Primer verhindert haben und so mögliche vorliegende Leichtketten-Genumlagerungen nicht amplifiziert werden konnten.

Die NHL B-Zellen des ersten Experiments wurden als $CD3^-$ Zellen mikromanipuliert, die des zweiten Experimentes als $CD20^+$ Zellen. Die ermittelten Basensequenzen der Ig-Genumlagerungen der NHL B-Zellen beider Experimente waren identisch, die Identifikation der NHL B-Zellen als $CD3^-$ Zellen war somit sehr gut möglich. Bei einer von 14 untersuchten Kontroll-T-Zellen wurde bei der PCR-Analyse eine V_H4 -Umlagerung nachgewiesen, deren Basensequenz identisch zu der der NHL B-Zellen war. In T-Zellen sind bisher nur D-J-Umlagerungen der Schwereketten nachgewiesen worden (Waldmann, 1987). Eine zelluläre Kontamination während der Mikromanipulation, d.h. eine unbeabsichtigte Isolierung von Zellkern-Fragmenten benachbarter Zellen oder eine unspezifische Immunfärbung einer NHL-B-Zelle ist wahrscheinlich die Ursache der Kontamination.

Die Übereinstimmung der Sequenzen der V_H -Genumlagerungen der Hodgkin-Zellen und der NHL B-Zellen des untersuchten Falles macht die klonale Verwandtschaft der beiden Zellpopulationen deutlich. Die Hodgkin-Zellen dieses Falles haben somit den gleichen Ursprung wie die CLL-Zellen (s.o.). Nach Choi et al. (1981) und Rausing (1976) sind in der terminalen Phase der CLL bei 10-20% der Fälle HRS-Zellen zu finden. Über eine mögliche

Entstehung eines MH wäre nur mit Verlaufsuntersuchungen eine Aussage zu machen. Williams et al. (1991) beschreiben einen derartigen Fall. Ein Jahr nach Diagnose einer CLL mit HRS-Zellen und Chemotherapie wurde in einer erneuten Biopsie MH ohne Anzeichen einer CLL nachgewiesen.

Interessant ist die Frage, ob bei ähnlichen Fällen ebenfalls eine Übereinstimmung der Ig-Genumlagerungen, also eine klonale Verwandtschaft der NHL B-Zellen und der HRS-Zellen besteht. Aufgrund der Seltenheit von CLL mit HRS-Zellen ist Frischgewebe selten verfügbar. Das archivierte Material liegt stattdessen in Formalin-fixierter, in Paraffin eingebetteter Form vor. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, die Technik der Einzelzell-PCR von unfixiertem, gefrierkonserviertem Gewebe auf Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes Material zu übertragen.

4.2. Etablierung der Einzelzell-PCR mikromanipulierter Zellen aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe

Ganzschnitt-PCR-Analysen von DNS, welche aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe isoliert wurde, sind häufig zur Klonalitätsbestimmung von B-Zell-Neoplasien angewandt worden (Inghirami et al. 1993, Küppers et al. 1993a, Pan et al. 1994, Reed et al. 1993, Wan et al. 1990). Pan et al. (1994) führten semi-nested PCR-Analysen mit einem FR3 V_H-Konsensus-Primer durch. Sie isolierten aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe neoplastische Follikel oder einige hundert Tumorzellen, welche sie nach Proteinase K-Verdau als Target einsetzten. Bei der PCR-Analyse von mikromanipulierten Einzelzellen aus immungefärbten Schnitt-Präparaten frischen Gewebes liegt die Effizienz der Amplifikation (Anzahl der Zellen, aus denen mindestens eine Ig-Genumlagerung amplifiziert werden kann) bei ca. 45% (Küppers et al. 1993b, 1994, Kanzler et al. 1996b). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Übertragbarkeit der Einzelzell-PCR-Analyse auf mikromanipulierte Zellen aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material überprüft werden.

Durch die Fixierung von Gewebe mit Formalin, einer wässrigen Formaldehyd-Lösung, werden zwischen dem Formaldehyd und den NH-Gruppen der Amino-Gruppen der Nukleotide, sowie der Peptid-Bindungen und anderer Gruppen von Proteinen, Brücken ausgebildet (Schiff'sche Basen). Diese führen zu einer Vernetzung der Proteine mit der DNS. Es entsteht eine irreversible Denaturierung (Beyermann 1987, Wu et al. 1990), das DNS-Molekül wird starrer als im unfixierten Zustand und deshalb anfälliger für Strangbrüche (Mies 1992). Die DNS-Extraktion führt somit auch bei mit großer Vorsicht durchgeführter Behandlung zu Brüchen des DNS-Stranges.

Da das Problem der Fragmentierung der DNS nicht zu umgehen ist, wurden zur Amplifikation von Ig-Genumlagerungen Primer ausgewählt, die komplementär zu der FR2 bzw. FR3 der Ig-Schwerketten sind. In Korrespondenz mit den J_H-Primern entstehen so um ca. 100 bzw. 200 bp kürzere PCR-Produkte als bei Verwendung der FR1 V_H-Primer, die für die Einzelzell-PCR aus Frischgewebe verwendet werden (siehe 1.2. Abbildung 1). Die Wahrscheinlichkeit, ein PCR-Produkt zu erhalten, welches bei Verwendung der FR3 V_H-Primer nur 80-130 bp, bei Verwendung der FR2 V_H-Primer ca. 200 bp lang ist, ist aufgrund der zu erwartenden Strangbrüche der DNS höher als die, ein 300-350 bp langes Produkt wie bei Verwendung der FR1-Primer zu erhalten.

Die Etablierung der FR2 und FR3 V_H-Primer erfolgte an Fällen von CLL, die bereits von Küppers et al. (1993a und 1995) bei der Etablierung der FR1 V_H⁻, V_κ⁻ und V_λ⁻-Primer verwendet worden sind (siehe 2.1.1. und 3.2.). 25 pg DNS wurden als Target in der ersten Runde der PCR eingesetzt, diese Menge entspricht etwa der DNS-Menge von fünf Zellen. Als nächsten Schritt wurden Einzelzellen verwendet (einzelnen CLL-Zellen von Zytospins sowie einzelne FACS-sortierte IgM⁺ B-Zellen, siehe 2.1.2. und 2.1.6.). Die Effizienz der Amplifizierung war mit 37,5% (für die CLL-Zellen) und 75% (für die FACS-sortierten IgM⁺ B-Zellen) vergleichbar mit der Amplifizierung mit FR1 V_H⁻-Primern (siehe 3.2. Tabelle 6).

Aus HRS-Zellen, die aus immungefärbten Schnitt-Präparaten von zwei Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Lymphknoten von MH (MC- und LP-Subtyp) isoliert worden waren, konnten mittels zwei Runden semi-nested PCR mit FR3 V_H-Primern keine PCR-Produkte erhalten werden (siehe 3.3.1. Tabelle 7). Aus Frischgewebe der gleichen Fälle war bei Verwendung der FR1 V_H-Primer bei der Einzelzell-PCR eine Effizienz von 25% (LP MH) bzw. 60% (MC MH) erreicht worden (Küppers et al. 1994). Neun der zehn als Positivkontrolle amplifizierten FACS-sortierten IgD⁺ B-Zellen erbrachten

mit FR3 V_H-Primern PCR-Produkte in der erwarteten Länge von 80-130 bp, so daß Fehler in der Durchführung der PCR ausgeschlossen werden können. Es stellte sich die Frage, ob ausschließlich die durch Formalin-Fixierung entstandene DNS-Denaturierung für dieses Ergebnis verantwortlich ist, oder ob andere Faktoren eine Rolle spielten.

Histologische Präparate werden bei der zur eindeutigen Identifizierung der mikromanipulierten Zellen notwendigen Immunfärbung einer aufwendigen Prozedur unterworfen. Es besteht die Möglichkeit, daß hierdurch die DNS-Güte für die Amplifikation verschlechtert werden könnte. Um dieses zu untersuchen wurde DNS aus mit anti-CD20-Antikörper gefärbten und mit Hämalaun gegengefärbten sowie aus ungefärbten Präparaten Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebes zweier NHL isoliert und in einer Gelelektrophorese analysiert. Die Länge der nach Immunfärbung extrahierten DNS-Fragmente lag bei maximal 300 bp. Die Fragmente der ungefärbt-extrahierten DNS stellten sich gleichmäßige über die Gellänge verteilt dar (siehe 3.3.2. Abbildung 6). Es scheint, daß die Immunfärbung in diesen Fällen zu einer deutlichen Verkürzung der Länge der DNS-Fragmente geführt hat. Bei der mit der extrahierten DNS anschließend durchgeführten Ganzschnitt-PCR mit den FR1, FR2 und FR3 V_H-Primern konnten mit 250 ng DNA als Target PCR-Produkte sowohl von der nach Immunfärbung extrahierten als auch von der aus ungefärbten Präparaten extrahierten DNS erhalten werden. Die Intensität der Banden, welche aus der nach Immunfärbung extrahierten DNS erhalten wurden, zeigte sich auf dem Agarosegel jedoch deutlich schwächer als die Banden, die aus der von unfixierten Präparaten extrahierten DNS erhalten wurden. Am ausgeprägtesten war dieser Unterschied bei den mit FR1 V_H-Primern erhaltenen Produkten von 300-350 bp. Die aus immungefärbten Präparaten extrahierte DNS scheint für die Amplifikation von schlechterer Qualität zu sein als die aus unfixierten Präparaten extrahierte DNS.

Die deutlichen Unterschiede der Güte der extrahierten DNS, definiert durch die in einer Gelelektrophorese dargestellte Länge der extrahierten DNS-Fragmente, konnten anhand zweier ähnlich behandelte Formalin-fixierter, in Paraffin eingebetteter Tonsillen reproduziert werden (siehe 3.3.2.). Im Gegensatz dazu zeigte die nach Immunfärbung extrahierte DNS eines unfixierten Falles eines MH auf dem Elektrophoresegel keine Unterschiede in der Länge der DNS-Fragmente zu der aus ungefärbten Präparaten extrahierten DNS (siehe 3.3.2.). Es scheint somit durch die erforderliche Immunfärbung eine Verschlechterung der DNS-Güte bei aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe isolierter DNS hervorgerufen zu werden.

Es wäre allerdings auch möglich, daß die kurzen DNS-Fragmente durch die Formalin-Fixierung des Gewebes entstehen. Durch die Denaturierung könnte es zu einer bei der DNS-Extraktion nicht zu lösenden Verbindung der DNS-Fragmente kommen. Bei einer gelelektrophoretischen Analyse der DNS würde die Fragmente länger erscheinen, als sie sind. Durch die Immunfärbung könnten diese Verbindungen der DNS-Fragmente aufgelöst werden und die DNS sich in der Gelelektrophorese in ihrer realen Länge darstellen. Gegen diese Möglichkeit spricht die unterschiedliche Intensität der PCR-Banden des oben erläuterten Experimentes der PCR-Analyse der extrahierten DNS.

Der Vergleich der Amplifizierbarkeit von HRS-Zellen, welche aus immungefärbten Präparaten im Gegensatz zu aus nur mit Hämalaun gefärbten Präparaten Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebes isoliert wurden, lag nahe. Es konnte jedoch weder aus den immungefärbten noch aus den mit Hämalaun gefärbten HRS-Zellen eines LP MH ein PCR-Produkt erhalten werden (siehe 3.3.3. Tabelle 8). Die als Positivkontrolle der PCR dienenden FACS-sortierten IgD⁺ B-Zellen erbrachten in sieben von acht Fällen PCR-Produkte in dem erwarteten Längenbereich von 80-130 bp, was auf eine korrekte Durchführung der PCR schließen ließ. Demgegenüber konnte von HRS-Zellen, die aus unfixiertem Gewebe des gleichen Falles isoliert wurden, bei PCR-Analysen mit den FR1 V_H-Primern eine Umlagerung der V_H3-Familie nachgewiesen werden.

Zusammenfassend war in drei Fällen von MH die Amplifizierung von Ig-Genumlagerungen mikromanipulierter Einzelzellen aus immungefärbten Schnitt-Präparaten von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben nicht möglich. Da die Amplifikation größere Zellmengen erfolgreich durchgeführt wurde (Algara et al. 1992, Deane et al. 1991, Diss et al. 1993, Inghirami et al. 1993, Küppers et al. 1993a, McCarthy et al. 1990, Pan et al. 1994, Ramsamy et al. 1992, Reed et al. 1993, Segal et al. 1994, Wan et al. 1990, Yamada et al. 1989), sollte eine "Auflösegrenze" der PCR-Analyse ermittelt werden. Hierzu wurde ein NHL verwendet, da die Tumorzellmenge bei MH < 1% liegt (siehe 3.3.4.).

Interessanterweise konnten aus Zellgruppen von 200 bis zu 50 Zellen pro PCR-Reaktionsansatz bei Verwendung der FR3 V_H-Primern Ig-Genumlagerungen in allen Fällen amplifiziert werden (siehe 3.3.4. Tabelle 9). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Zellgruppen aus immungefärbten und Hämalaun gegengefärbten oder Hämalaun-gefärbten Präparaten. Bei drei bis fünf Zellen pro PCR-Reaktionsansatz konnte noch eine Effizienz von ca. 70% erreicht werden. Die Amplifizierung von Ig-Genumlagerungen einzelner Zellen war in ca. 10% der Fälle möglich (drei von 31 Zellen), wobei interessanterweise alle positiven Zellen nur mit Hämalaun gefärbt waren (siehe 3.3.4. Tabelle 9).

Bei Verwendung der FR2 V_H-Primer, welche ein um etwa 100 bp längeres PCR-Produkt erbringen als die FR3 V_H-Primer, zeigte sich eine deutlich schlechtere Effizienz der Amplifizierbarkeit schon bei Zellgruppen von 200-50 Zellen pro Reaktionsansatz (siehe 3.3.4. Tabelle 10). Die Effizienz der Amplifizierung war bei Zellgruppen aus immungefärbten und Hämalaun gegengefärbten Präparaten deutlich schlechter als bei Zellgruppen aus Hämalaun-gefärbten Präparaten. Somit konnten erneut Hinweise für einen negativen Einfluß der Immunfärbung auf die Amplifikation der Ig-Genumlagerungen gefunden werden.

In zwei Experimenten wurde DNS jeweils aus immungefärbten und Hämalaun-gefärbten Präparaten des NHL extrahiert. Es konnte bei der ersten Extraktion kein Unterschied in der DNS-Stranglänge der aus immungefärbten und aus mit Hämalaun gefärbten Präparaten extrahierten DNS nach einer Gelelektrophorese auf dem Agarosegel beobachtet werden. Bei der zweiten Extraktion zeigte sich demgegenüber, daß die aus immungefärbten Präparate extrahierte DNS deutlich kürzere Fragmente aufwies. Da die DNS-Extraktionen von zwei verschiedenen Archiv-Blöckchen des NHL-Falles durchgeführt wurden, liegt hier evtl. der Grund für das unterschiedliche Verhalten.

Es zeigt sich somit, daß Einzellzell-PCR-Analysen von Zellen, welche aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe mittels Mikromanipulation isoliert wurden, grundsätzlich möglich sind. Die Effizienz bleibt jedoch deutlich unter der von Einzelzell-PCR-Analysen von aus unfixiertem Gewebe isolierten Zellen. Bei drei Fällen von MH war es nicht möglich, mit FR3 V_H-Primern Ig-Genumlagerungen der HRS-Zellen zu amplifizieren, obwohl dieses bei HRS-Zellen, die aus unfixiertem Gewebe der Fälle isoliert wurden, mit FR1 V_H-Primern möglich war. Bei einem NHL-Fall konnten demgegenüber Ig-Genumlagerungen von aus fixiertem Gewebe

isolierten NHL B-Zellen mit den FR3 V_H-Primern mit einer Effizienz von 10% amplifiziert werden (siehe Tabelle 9). Die schlechte Effizienz der Amplifizierung im Vergleich zur Amplifizierung von Ig-Genumlagerungen von Zellen, die aus Frischgewebe isoliert wurden kann mehrere Ursachen haben. Ein wichtiger Grund ist die Fixierung der Gewebe. Routinemäßig wird in Deutschland zur Fixierung von Gewebe für histologische Untersuchungen Formalin verwendet. Greer et al. (1990) untersuchten den Einfluß verschiedener Fixative und der Fixationszeit auf die Verwendungsmöglichkeit der extrahierten DNS in der Ganzschnitt-PCR. In 10%igem, gepuffertem Formalin sowie in Aceton fixiertes Gewebe wies ihren Untersuchungen zufolge die beste DNS-Qualität im Gegensatz zu den mit anderen Fixativen behandelten Geweben auf. Für Formalin-fixiertes Gewebe fanden Greer et al. keinen Einfluß der Fixationszeit, wobei nur drei Fixationszeiten, nämlich Zeiten von einer, vier und 24 Stunden untersucht wurden.

Die Fixation der Gewebe erfolgt im Institut für Pathologie der Universität Köln mit 5%igem (Schwankungsbreite bis zu 10%igem) ungepuffertem Formalin für ca. 12-48 Stunden. Präparate von auswärtigen Ärzten oder Krankenhäusern sollen ebenfalls in 5%igem Formalin eingeschickt werden, dieses ist jedoch nicht zu überprüfen. Die Einsendung erfolgt in der Regel auf dem Postweg, die Fixationszeit schwankt somit unter Umständen beträchtlich. Rogers et al. (1990) fanden bei Formalin-fixiertem Gewebe bei Verwendung von 10%igem, gepuffertem Formalin einen negativen Einfluß der Fixationsdauer auf die DNS-Qualität, definiert durch die Intensität von PCR-Signalen auf dem Gel. Eine Fixationszeit von sechs bis zu 48 Stunden zeigte keine Unterschiede, bei 72 Stunden bis zu einer Woche war eine schwache Verschlechterung und bei einer Fixationszeit von einer bis zu vier Wochen war eine deutliche Verschlechterung der PCR-Banden-Intensität festzustellen.

Der Zeitpunkt der Fixation nach Entnahme der Biopsate ist nicht zu beeinflussen. Idealerweise sollte die Fixation umgehend erfolgen. Aus technischen Gründen kann es aber vorkommen, daß das Gewebe erst nach einiger Zeit in das Fixativ gegeben wird. Es kann somit in dem Präparat schon Autolyse aufgetreten sein, welche die DNS-Qualität negativ beeinflussen kann. Ein weiterer nicht zu beeinflussender Punkt ist die Einbettung der Formalin-fixierten Präparate in Paraffin. Vor einer Durchtränkung mit dem flüssigen, auf 60°C erhitzten Paraffin ist eine Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe erforderlich. Da Paraffin in Alkohol nicht löslich ist, folgt ein Bad in einem alkoholentziehenden, paraffinlösenden Intermedium, meistens Xylol. Negative Einflüsse auf die DNS-Güte sind durch diese Behandlung möglich.

Auch das Alter der archivierten Blöcke hat einen Einfluß auf die Länge der extrahierten DNS (Goelz et al. 1985). Je länger die Archivierungsdauer beträgt, desto kürzer sind häufig die nach DNS-Extraktion in der Gelelektrophorese nachzuweisenden DNS-Fragmente.

Zu den Parametern, die im Rahmen der Untersuchungen archivierter Präparate zu beeinflussen sind, gehören die Behandlung der Paraffin-Blöcke, d.h. die Schnittdicke der Präparate sowie die Färbung und Immunhistochemie der Paraffinschnitte. Ebenso sind die Mikromanipulation der Zellen, der Proteinase K-Verdau sowie die Durchführung der Einzelzell-PCR inklusive Primerauswahl beeinflussbar.

Optimalerweise sollte die Schnittdicke der Präparate zur Mikromanipulation die Dicke ca. einer Lage von Zellen betragen. Die Mikromanipulation der HRS-Zellen, die einen Durchmesser von ca. 10 μm aufweisen, erfolgt somit bei unfixiertem Gewebe von 6-10 μm dicken Schnitt-Präparaten. Werden Paraffin-Schnitte in der gleichen Dicke angefertigt, so schwimmen sie bei der nötigen Entparaffinierung und Färbung von den Objektträgern ab. Aus diesem Grund beträgt die Schnittdicke hier ca. 3 μm . Obwohl das Gewebe durch die Formalin-Fixierung geschrumpft ist, ist es möglich, daß durch die geringere Schnittdicke nur sehr wenig Material der HRS-Zelle auf dem Schnitt verbleibt. Es können so Bereiche des Zellkerns, die die Ig-Genumlagerungen enthalten, fehlen. Dieser Punkt könnte dazu beigetragen haben, daß die Amplifizierung der HRS-Zellen aus Formalin-fixiertem Gewebe nicht möglich war. Die NHL B-Zellen sind wesentlich kleiner als die HRS-Zellen, so daß die Wahrscheinlichkeit, den ganzen Zellkern bei der Mikromanipulation aufzunehmen, deutlich größer ist. Delabie et al. (1994) umgingen dieses Problem durch die Anfertigung von Zellsuspensionen aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe. Sie isolierten daraus mit einer Mikropipette die für EMA (engl.: epithelial membrane antigen) gefärbten HRS-Zellen (L&H-Zellen des LP-Subtyps). Ihren Angaben nach erreichten sie bei der Einzelzell-PCR mit einem FR3 V_H -Konsensus-Primer eine Effizienz von 48%. Von zwei HRS-Zellen wiesen sie jedoch jeweils drei V_H -Umlagerungen nach, die nicht aus einer einzelnen Zelle stammen können. Es liegt die Vermutung nahe, daß anhaftende B-Zellen sowohl für die drei Schwerekettenumlagerungen aus einem Reaktionsansatz als auch für die hohe Effizienz der Amplifikation verantwortlich sein könnten. Die Technik von Delabie et al. (1993) scheint zur verlässlichen Isolierung einer einzigen Zelle nicht geeignet zu sein.

Einen sehr wichtigen Punkt stellt die zur eindeutigen Identifizierung der Zellen nötige Immunfärbung dar. Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf einen negativen Einfluß der Immunfärbung, besonders bei Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe hin. Definiert wird der Einfluß der Immunfärbung anhand der Länge der DNS-Fragmente in der Gelelektrophorese. Eine systematische Arbeit über den Einfluß verschiedener Immunfärbetechniken wäre zur Lösung dieses Problemes erforderlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war eine ausführlichere Bearbeitung jedoch nicht möglich.

Auch bei der Isolierung der Einzelzellen mittels Mikromanipulation aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe ergeben sich Schwierigkeiten, die bei der Isolierung aus unfixiertem Gewebe nicht auftreten. So ist das Loslösen der Einzelzelle aus dem Zellverband wegen der fixationsbedingten Proteinvernetzung schwieriger. Dadurch erhöht sich die Gefahr, nicht den ganzen Zellkern aufzunehmen, so daß die gewünschten Gensegmente auf dem Schnitt-Präparat verbleiben könnten. Der gegenteilige Fall, die als "zelluläre Kontamination" bezeichnete unerwünschte Isolierung der DNS von mehr als einer Zelle, kommt bei der verwendeten Technik selten vor. Zur Abschätzung der Häufigkeit der zellulären Kontamination werden in jeder Mikromanipulations-Sitzung T-Zellen isoliert und ebenfalls auf Ig-Genumlagerungen hin analysiert (siehe 2.1.8.). Keine der aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe isolierten T-Zellen erbrachten in der PCR-Analyse ein PCR-Produkt.

Weiterhin denkbar ist, daß der Proteinase K-Verdau aufgrund der fixationsbedingten Denaturierung unvollständig erfolgt, die DNS somit nicht oder nur teilweise zur Amplifikation zur Verfügung steht. Eine entsprechend große Enzymmenge sowie eine lange Verdauungszeit von einer Stunde sollten hierbei jedoch ausreichen. Die Verlängerung der Verdauungszeit auf drei Stunden erbrachte keine höhere Effizienz der Amplifizierung (siehe 3.3.1.).

Der neben der Fixierung der Gewebe sicherlich wichtigste Punkt ist die Auswahl geeigneter Primer. Da die DNS durch die Fixation stark denaturiert ist, ist die Wahrscheinlichkeit, ein kurzes PCR-Produkt erhalten zu können deutlich größer, als bei einem längeren Produkt. Diesem Umstand wurde durch die Verwendung der FR3 V_H -Primer Rechnung getragen (siehe 1.2. Abbildung 1). Die Amplifizierung von verschiedenen großen Zellgruppen mikromanipulierter NHL B-Zellen aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebettetem Gewebe mit FR2 V_H -Primern bestätigte durch die deutlich schlechtere Effizienz im Gegensatz zu der Effizienz bei Verwendung der FR3 V_H -Primer diese Hypothese (siehe 3.3.4. Tabelle 9 und 10). Bei Verwendung

der FR3 V_H-Primer konnte eine zuverlässigere Amplifizierung erreicht werden.

Ein Vorschlag zur Auswahl der für die Einzelzell-PCR-Analyse geeigneten Formalin-fixierten Präparate besteht in einer Voranalyse von Gruppen zu jeweils fünf zu amplifizierenden Zellen des jeweiligen Falles gemeinsam in einem PCR-Reaktionsansatz. Sind hierbei keine PCR-Produkte zu erzielen, so ist dieser Fall wahrscheinlich zur Einzelzell-PCR-Analyse nicht geeignet. Im Falle eines positiven Ergebnisses lohnt sich die Durchführung der Einzelzell-PCR. Ein derart aufwendiges Verfahren ist bei seltenen Fällen wie NHL mit HRS-Zellen oder von Kombinationslymphomen zur Identifizierung der Tumorsprungszelle und zur Klonalitätsanalyse gerechtfertigt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Amplifizierung von Ig-Genumlagerungen mittels PCR aus Einzelzellen, welche aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben isoliert wurden, grundsätzlich möglich ist. Weitere Untersuchungen betreffend der Einflüsse verschiedener Fixierungsmethoden auf die Amplifizierbarkeit der DNS in der Einzelzell-PCR-Analyse und bezüglich des Einflusses der Immunfärbung auf die Güte der DNS sind nötig, um diese Technik effizienter zu gestalten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Auftreten von HRS-Zellen in Fällen von CLL des Menschen ist ein seltenes Phänomen. Bisherige Untersuchungen zur Herkunft dieser HRS-Zellen beschränkten sich auf morphologische Beschreibungen sowie auf immunhistochemische Analysen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmalig eine molekularbiologische Analyse der Ig-Genumlagerungen eines Falles von B-CLL mit HRS-Zellen auf Einzelzell-Ebene mit Hilfe der PCR. Die Analyse dient dem näheren Verständnis des möglichen Zusammenhangs zwischen MH und NHL.

Die Basensequenzen der Ig-Genumlagerungen der NHL B-Zellen waren identisch als Hinweis auf deren Klonalität. Ein ebenfalls identisches Muster zeigten die HRS-Zellen. Im Vergleich der Basensequenzen zwischen HRS-Zellen und B-Zellen des NHL ergab sich ein Unterschied von einer Base. Es kann somit ein verwandtschaftlicher Zusammenhang zwischen beiden Zellformen angenommen werden.

Da Schlüsselfälle wie der hier in Frischgewebe untersuchte nur sehr selten vorkommen, sind derartige Analysen nur begrenzt durchführbar. Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete, vergleichbare Fälle sind jedoch in etwas größerer Zahl in verschiedenen hämatopathologisch-orientierten Instituten archiviert. Aus diesem Grund sollte die Technik der Einzelzell-PCR am Frischgewebe auch auf die Analyse von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Zellformen erweitert werden. Da die DNS durch Formalin degradiert wird, war eines der Bestreben, Primer einzusetzen, die in der FR2 und FR3 des V-Gensegments binden und somit kürzere Produkte ermöglichen als Primer im Bereich der FR1 der Schwerketten des Ig-Genlocus.

Die Untersuchung konnte zeigen, daß der Nachweis von Genumlagerungen in Einzelzellen aus Paraffingewebe grundsätzlich möglich ist. Die Effizienz im Vergleich zu Frischgewebe war jedoch mit 10% niedrig.

Summary

Analysis of Hodgkin cells in B cell chronic lymphatic leukemia by single cell PCR and experiments on the establishment of the single cell PCR on cells isolated from formalin-fixed paraffin-embedded biopsies

The occurrence of HRS cells in cases of human CLL is a rare phenomenon. Until recently, investigations on the origin of these HRS cells were restricted on morphological description and immunohistochemical analysis. In this thesis, the first molecular analysis of Ig gene rearrangements of a case of B-CLL with HRS cells on the level of individual cells by single cell PCR is presented. The analysis aimed at a more detailed understanding of the possible relationship between Hodgkin's disease and NHL.

The sequences of the Ig gene rearrangements of the NHL B cells were identical, indicating clonality of these cells. An identical pattern was obtained for the HRS cells. Comparing the sequences from the HRS cells and the B cells of the NHL, a difference of one base was observed. Thus, the assumption that the two cell populations are closely related is valid.

Due to the sparseness of important cases as studied in this thesis as a fresh tissue biopsy, such single cell investigations are limited. A higher number of comparable cases are conserved as formalin-fixed and paraffin-embedded samples in different institutes interested in hematology. For that reason, we wanted to transfer the single cell PCR technique established on fresh tissue to the analysis of formalin-fixed and paraffin-embedded cells. Since DNA is degraded by formalin, primers were established that bind to sequences in the FR2 and FR3 of the V genes in order to generate PCR products shorter than those obtained with primers binding to sequences in the FR1 of the genes in the Ig heavy chain locus.

We could show that generally the detection of gene rearrangements in single cells isolated from paraffin tissue is possible. However, compared to the efficiency obtained using fresh tissue, the observed efficiency of 10% was low.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Algara P, Martinez P, Sanchez L, Villuendas R, Benitez J, Rivas C, Piris MA: The detection of B-cell monoclonal populations by polymerase chain reaction: Accuracy of approach and application in gastric endoscopic biopsy specimen. *Hum Pathol* 1993, 24:1184-1188
2. BartonRogers B, Alpert LC, Hine EAS, Buffone GJ: Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1990, 136:541-548
3. Beyermann K: *Chemie für Mediziner*. Thieme Verlag Stuttgart, 6. Auflage 1987
4. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B: Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987, 327:293-297
5. Brisson-Noel A, Lecossier D, Nassif X, Gicquel B, Levy-Frebault V, Hance AJ: Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of myobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989, ii:637-640
6. Chen YT, Godwin TA, Mouradian JA: Immunohistochemistry and gene rearrangement studies in the diagnosis of malignant lymphomas. *Hum Pathol* 1991, 22:1249-1257
7. Chien A, Edgar DB, Trela JM: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976, 127:1550-1557
8. Choi H, Kelle RH: Coexistence of chronic lymphocytic leukemia and Hodgkin's disease. *Cancer* 1981, 48:48-57
9. Colby TV, Warnke RA, Burke JS, Dorfman RF: Differentiation of chronic lymphocytic leukemia from Hodgkin's disease using immunologic marker studies. *Am J Surg Pathol* 1981, 5:707-710

10. Cook GP, Tomlinson IM, Walter G, Rithman H, Carter NP, Buluwela L, Winter G, Rabbitts TH: A map of the human immunoglobulin V_H locus completed by analysis of the telomeric region of chromosom 14q. *Nature Genet* 1994, 7:162-168
11. Cossmann J, Zehnbauer B, Garratt CT, Smith LJ, Williams M, Jaffe ES, Hanson LO, Love J: Gene rearrangement in the diagnosis of lymphoma/leukemia - Guidelines for use based on a multiinstitutional study. *Am J Clin Pathol* 1991, 95:347-354
12. Coutelle C, Williams C, Handyside A, Hardy K, Winston R, Williamson R: Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *Brit Med J* 1989, 299:22-24
13. Dariavach M, Lefrance G, Lefrance MP: Human immunoglobulin CVlambda 6 gene encodes the Kern+Oz lambda chain and CVlambda 4 and CVlambda 5 are pseudogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84:9074-9078
14. Deane M, Norton JD: Detection of immunoglobulin gene rearrangement in B cell neoplasias by polymerase chain reaction gene amplifikation. *Leukemia and Lymphoma* 1992, 5:9-22
15. Delabie J, Tierens A, Wu G, Weisenburger DD, Chan WC: Lymphocyte predominance Hodgkin's disease: Lineage and clonality determination using a single-cell assay. *Blood* 1994, 10:3291-3298
16. Dick FR, Maga RD: The lymph node in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1978, 41:283-292
17. Diss TC, Peng H, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Pan L: Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the polymerase chain reaction is dependent on primer selection and lymphoma type. *J Pathol* 1993, 169:291-295
18. Dreyer WJ, Bennett JC: The molecular basis of antibody formation: A paradox. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965, 54:864-869

19. Erlich HA, Gerfand DH, Saiki RK: Specific DNA amplification. *Nature* 1988, 331:461-462
20. Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, McCormick F, Marshall CJ: Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci* 1988, 85:1629-1633
21. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B: Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985, 130:118-126
22. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM: PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 1991, 95:117-124
23. Handyside AH, Pattison JK, Penketh RJA, Delhanty JDA, Winston RML, Tuddenham EGD: Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989, i:347-349
24. Hansmann ML, Fellbaum CH, Hui PK, Lennert K: Morphological and immunohistochemical investigation of non-Hodgkin's lymphoma combined with Hodgkin's disease. *Histopathology* 1989, 15:35-48
25. Hieter PA, Maizel JV, Leder P: Evolution of human immunoglobulin κ J region genes. *J Biol Chem* 1982, 257:1516-1522
26. Higuchi N, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA: DNA typing from single hairs. *Nature* 1988, 332:543-546
27. Hozumi N, Tonegawa S: Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin gene coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976, 73:3628-3632
28. Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa Y: Organization of human immunoglobulin heavy diversity gene loci. *EMBO J* 1988, 7:4141-4150
29. Inghirami G, Szabolcs MJ, Yee HT, Corradini P, Cesarman E, Knowles DM: Detection of immunoglobulin gene rearrangement of B cell Non-Hodgkin's lymphomas and leukemias in fresh, unfixed and formalin-

fixed, paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1993, 68:746-757

30. Innis MA, Gelfand DH: Optimization of PCRs. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (ed.), Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, San Diego, California, Academic Press 1990, pp:3-12

31. Jaffe ES, Zarate-Osorno A, Kingma DW, Raffeld M, Medeiros LJ: The interrelationship between Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol* 1994, 5:7-11

32. Kanzler H, Hansmann ML, Kapp U, Wolf J, Diehl V, Rajewsky K, Küppers R: Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood* 1996a, 87:3429-3436

33. Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K: Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 1996b, 184:1495-1505

34. Klein U, Küppers R, Rajewsky K: Variable region gene analysis of B cell subsets derived from a 4-year-old child: Somatic mutations in memory B cells accumulate in the peripheral blood already at young age. *J Exp Med* 1994, 180:1383-1393

35. Knowles DM: Immunophenotypic and immunogenotypic approaches useful in distinguishing benign and malignant lymphoid proliferations. *Seminars in Oncology* 1993, 20:583-610

36. Kocks C, Rajewsky K: Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. *Annu Rev Immunol* 1989, 7:537-559

37. Kornstein MJ, Bonner H, Gee B, Cohen R, Brooks JJ: LeuM1 and S-100 in Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 1986, 85:433-437

38. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch JV, Poplack DG, Waldmann TA, Leder P: Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78:7096-7100
39. Kubagawa H, Cooper MD, Carrol AJ, Burrows PD: Light-chain gene expression before heavy-chain gene rearrangement in pre-B cells transformed by Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:2356-2360
40. Küppers R, Zhao M, Rajewsky K, Hansmann ML: Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1993a, 143:230-239
41. Küppers R, Zaho M, Hansmann ML, Rajewsky K: Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 1993b, 12:4955-4967
42. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML: Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:10962-10966
43. Küppers R, Willenbrock K, Rajewsky K, Hansmann ML: Detection of clonal lambda light chain gene rearrangements in frozen and paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaktion. *Am J Pathol* 1995a, 147:806-814
44. Küppers R, Kanzler H, Hansmann ML, Rajewsky K: Single cell analysis of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Ann Oncol* 1995b, 27-30
45. Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K: Mikromanipulation and PCR analysis of single cells from tissue sections. *Handbook of Exp. Immunol.* (5th edition) 1997 im Druck
46. Kwok S, Mack DH, Mullis KB, Poiesz B, Erlich G, Blair D, Friedman-Kien A, Sninsky JJ: Identification of human immunodeficiency

virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J Virol* 1987, 61:1690-1694

47. Li H, Gyllensten UB, Cui X, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N: Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 1988, 335:414-417

48. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch E: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

49. Matsuda F, Shin EK, Nagaoka H, Matsumura R, Fukita Y, Taka-ishi S, Imai T, Riley JH, Anand R, Soeda E, Honjo T: Structure and physical map of 64 variable segments in the 3' 0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature Genet* 1993, 3:88-94

50. McCarthy KP, Sloane JP, Wiedemann LM: Rapid method for distinguishing clonal from polyclonal B cell populations in surgical biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1990, 43:429-432

51. McKean D, Hüppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M: Generation of antibody diversity in the human response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:3180-3184

52. Mies C: Molecular pathology of paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* 1992, 1:206-211

□

□

53. Momose H, Jaffe ES, Shin SS, Chen YY, Weiss LM: Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with Reed-Sternberg-like cells and possible transformation to Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol* 1992, 16:859-867

54. Mullis K, Falcoona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987, 155:335-350

55. Norton AJ, Isaacson PG: Granulocyte and HLA-D region specific monoclonal antibodies in the diagnosis of Hodgkin's disease. *J Clin Pathol* 1985, 38:1241-1246
56. Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T: Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: Interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82:6133-6137
57. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, Feorino P, Warfield D, Schochetman G: DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988, 239:295-297
58. Pan LX, Diss TC, Peng HZ, Isaacson PG: Clonality analysis of defined B-cell populations in archival tissue sections using microdissection and the polymerase chain reaction. *Histopathology* 1994, 24:323-327
59. Ramasamy I, Brisco M, Morley A: Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J Clin Pathol* 1992, 45:770-775
60. Rausing A: Lymphocytic leukemia and lymphoma in the adult. *Acta Med Scand [Suppl]* 1976, 595:1-270
61. Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P: Structure of the human immunoglobulin μ locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 1981, 27:583-591
62. Reed TJ, Reid A, Wallberg K, O'Leary TJ, Frizzera G: Determination of B-cell clonality in paraffin-embedded lymph nodes using the polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1993, 2:42-49
63. Reth MG, Ammirati P, Jackson S, Alt FW: Regulated progression of a cultured pre-B-cell line to the B-cell stage. *Nature* 1985, 317:353-355
64. Roth MS, Antin JH, Bingham EL, Gisburg D: Detection of Philadelphia chromosome-positive cells by polymerase chain reaction following bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemic. *Blood* 1989, 74:882-885

65. Saiki RK, Scharf S, Falcoona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230:1350-1354
66. Saiki RK, Gelfand DH, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 239:487-491
67. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 75:5463-5467
68. Sanz I, Kelly P, Williams C, Scholl S, Tucker P, Capra JD: The smaller human V_H gene families display remarkably little polymorphism. *EMBO J* 1989, 8:3741-3748
69. Sanz I: Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol* 1991, 147:1720-1729
70. Schäble KF, Zachau HG: The variable genes of the human immunoglobulin κ locus. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1993, 374:1001-1022
71. Schnitzer B: Reed-Sternberg-like cells in lymphocytic lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 1970, 1:1399-1400
-
-
72. Schroeder HW, Dighiero G: The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. 1994, *Immunol Today* 15:288-294
73. Segal GH, Jorgensen T, Masih AS, Braylan RC: Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: 1. Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type. *Hum Pathol* 1994, 25:1269-1275

74. Segal GH, Jorgensen T, Scott M, Braylan RC: Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction Analysis: 2. Follicular lymphomas. *Hum Pathol* 1994, 25:1276-1282
75. Sheibani K, Battifora H, Burke JS, Rappaport H: LeuM1 antigen in human neoplasms. An immunohistologic study of 400 cases. *Am J Surg Pathol* 1986, 10:227-236
76. Shin SS, Ben-Ezra J, Burke JS, Sheibani K, Rappaport H: Reed-Sternberg-like cells in low-grade lymphomas are transformed neoplastic cells of B-cell lineage. *Am J Clin Pathol* 1993, 99:658-662
77. Strum SB, Park JK, Rappaport H: Observation of cells resembling Sternberg-Reed cells in conditions other than Hodgkin's disease. *Cancer* 1970, 26:176-190
78. Tindle BH, Parker JW, Lukes RJ: "Reed-Sternberg cells" in infectious mononucleosis? *Am J Clin Pathol* 1972, 58:607-617
79. Tonegawa S: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983, 302:575-581
80. Tsang WYW, Chan JKC, Ng CS: The nature of Reed-Sternberg-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1993, 99:317-323
81. Vasicek TJ, Leder P: Structure and expression of the human immunoglobulin lambda genes. *J Exp Med* 1990, 172:609-620
82. Waldmann TA: The arrangement of immunoglobulin and T cell receptor genes in human lymphoproliferative disorders. *Adv Immunol* 1987, 40:247-321
83. Wan JH, Trainor KJ, Brisco MJ, Morley AA: Monoclonality in B cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1990, 43:888-890
84. Williams J, Schned A, Cotelingam JD, Jaffe ES: Chronic lymphocytic leukemia with coexistent Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol* 1991, 15:33-42

85. Williams SC, Winter G: Cloning and sequencing of human immunoglobulin V_{1am} gene segments. *Eur J Immunol* 1993, 23:1456-1461
86. Wong C, Dowling CE, Saiki RK, Higuchi RG, Erlich HA, Kazazian HH: Characterization of β -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 1987, 330:384-386
87. Wu AM, Ben-Ezra J, Winberg C, Colombero AM, Rappaport H: Analysis of antigen receptor gene rearrangements in ethanol and formaldehyde-fixed, paraffin-embedded specimens. *Lab Invest* 1990, 63:107-114
88. Wu AM, Winberg CD, Sheibani K, Colombero AM, Wallace RB, Rappaport H: Genotype and phenotype: A practical approach to the immunogenetic analysis of lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol* 1990, 21:1132-1141
89. Yamada M, Hudson S, Tournay O, Bittenbender S, Shane SS, Lange B, Tsujimoto Y, Caton AJ, Rovera G: Detection of minimal disease in hematopoietic malignancies of the B-cell lineage by using third-complementarity-determining region (CDR-3)-specific probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:5123-5127

7. ABKÜRZUNGEN

B-CLL	B-Zell chronische lymphatische Leukämie
bp	Basenpaar
C	Konstante (engl.: constant) Region der Immunglobulingene
CDR	Hypervariable Region (engl: complementarity determining region) der Antikörper
D	Diversitäts-Gensegment der Immunglobulin-Schwerkette
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dTTP	Desoxytyrosintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FR	Gerüstregion (engl: framework region) der Antikörper V-Region
H	Schwerkette (engl: heavy) der Immunglobuline
HRS	Hodgkin- und Reed/Sternberg
Ig	Immunglobulin
J	Verbindungs- (engl: joining) Gensegment der V-Region
L	Leichtkette (engl: light) der Immunglobuline
LP	Lymphozytenreicher (engl: lymphocyte predominant) Subtyp des Morbus Hodgkin
M	Mol
MC	Gemischtzelliger (engl: mixed cellularity) Subtyp des Morbus Hodgkin
MH	Morbus Hodgkin
NHL	Non Hodgkin Lymphom
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl: polymerase chain reaction)
RNS	Ribonukleinsäure
SBH	Southern Blot Hybridisierung
TAE	Tris-Base/Eisessig/EDTA
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	V-Gensegment (engl: variable) der Immunglobulingene

8. ANHANG

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. M.-L. Hansmann für die Überlassung des Themas sowie für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit im Institut für Pathologie der Universität Köln.

Herrn Prof. Dr. G. Monreal danke ich für die Ermöglichung dieser externen Doktorarbeit.

Herrn Dipl.-Biol. H. Kanzler und Herrn Dr. rer. nat. R. Küppers möchte ich für die hervorragende Betreuung danken.

Für die technische Hilfe danke ich Frau A. Klöckner, Frau A. Faßbender und Frau G. Stellbrink.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Name	Sabine Helmes
Geburtsdatum	23. September 1968
Geburtsort	Porz jetzt Köln
Schulbildung	1975 bis 1979 Don-Bosco-Grundschule, Köln-Porz 1979 bis 1988 Städtisches Gymnasium Köln-Porz
Studium der Veterinärmedizin	1988-1994 an der Freien Universität Berlin Vorphysikum: 1989 Physikum: 1991 Erster Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung: 1992 Zweiter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung: 1993 Dritter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung: 1994 Approbation erteilt am 27. September 1994