

4. ERGEBNISSE

4.1. *Immunglobulin Gentranskripte in Hodgkinzelllinien*

Mit Hilfe der RT PCR untersuchten wir die Expression umgelagerter Ig Gene in den Hodgkinzelllinien L1236, L428, L591 und KM-H2 sowie in B- (Raji) und T-Kontrollzelllinien (Jurkat). Mit Ausnahme der L591 konnten in allen Hodgkinzelllinien und in der T-Zelllinie Jurkat durch einfache PCR (40 Zyklen) keine Ig spezifischen Produkte amplifiziert werden, während die B-Zelllinie Raji ein positives Signal zeigte. In der L591 war ein schwach positives Signal nachweisbar. Zum Nachweis sehr geringer RNA Mengen erfolgte zusätzlich eine Reamplifikation mit weiteren 40 Zyklen. Danach zeigte die B-Zelllinie Raji eine sehr kräftige und die Hodgkinzelllinie L591 eine mäßig starke Bande. Die Hodgkinzelllinien L1236, L428 und KM-H2 zeigten jetzt ein spezifisches Signal, welches im Vergleich zur Zelllinie Raji sehr schwach ausgeprägt war. In der T-Zelllinie Jurkat konnte auch nach der Reamplifikation kein spezifisches Produkt nachgewiesen werden.

4.2. *Untersuchung des umgelagerten IgH Gens in Hodgkinzelllinien*

4.2.1. *Etablierung einer PCR für den umgelagerten IgH Promotor*

Für die Untersuchung des umgelagerten IgH Promotors in den Zelllinien KM-H2, L428 und L591 etablierten wir eine „semi nested“ PCR, die 40 – 172 bp vor dem Octamermotiv beginnend den restlichen Promotor, den Leader, das komplette V- und D-Segment sowie Teile des J-Segmentes erfasste. Die Amplifikate der verschiedenen Zelllinien variierten in ihrer Größe zwischen 591 und 798 bp (Abb. 8). In der L1236 misslang dieser Ansatz, weshalb diese Zelllinie nach dem Schema der einzeln isolierten HRS Zellen (s.u.) amplifiziert wurde. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde zusätzlich zu den Negativkontrollen die PCR für jede Zelllinie wenigstens dreimal wiederholt. Dabei zeigten sich jeweils identische Sequenzen. Als weitere Kontrolle diente der Vergleich mit den bereits bekannten ca. 230 bp großen Sequenzabschnitten (FW2 – JH) (Abb. 8). Diese entsprachen den bekannten Ergebnissen.

4.2.2. *Mutationsanalyse des IgH Promotors*

Die Sequenzanalyse der IgH Promotoren zeigte in den Hodgkinzelllinien KM-H2, L428 und L591 keine Mutationen in den konservierten, für die Ig Genexpression bedeutsamen Regionen

(Octamermotiv, TATA-Box) (Tab. 4). In der L1236 konnten wir die bereits beschriebene Mutation im Octamermotiv (Position 1 A→T) bestätigen, die TATA-Box war hier, wie ebenfalls bereits bekannt, nicht mutiert (Jox 1999). Im verbleibenden Promotorbereich zeigten sich nur wenige Basenaustausche (\emptyset 1,5%) (Abb. 9, Tab. 5), die als Polymorphismen zu werten sind. Die pyrimidinreiche Region war in den Zelllinien L1236 und L591 nicht mutiert. Dieser Bereich konnte in den Zelllinien KM-H2 (nicht identifizierbar) und L428 (außerhalb des amplifizierten Bereiches) nicht analysiert werden (Tab. 4).

Tabelle 4 Sequenzanalyse der umgelagerten Immunglobulingenpromotoren und der E μ Enhancer in vier Hodgkinzelllinien

Zelllinie	Somatische Mutationen									Kodierfähigkeit	Familie*
	IgH Promotor				Leader	VH-Region		E μ Enhancer			
	Pyrimidin-region	Octamer-motiv	TATA Box	anderer Bereich	L1 + L2 und Intron	FW #	CDR ##	ATTGCGT 5' Octamer	ATTTTCAT 3' Octamer		
n	n	n	n	n	n	n	n	n	n		
L1236	0	1	0	2	4	33	18	0	0	+	VH-1
KM-H2	n.a.	0	0	0	18	30	13	0	0	+	VH-3
L591	0	0	0	0	0	9	6	0	0	— ^a	VH-3
L428	n.a.	0	0	3	6	29	10	0	0	+	VH-5

n Anzahl

n.a. nicht analysiert

+ funktional

– nicht funktional

Anzahl der Mutationen in FW1, FW2 und FW3

Anzahl der Mutationen in CDR1 und CDR2

***** nach VBASE (Tomlinson et al. 1992)

^a VH: Stopp-Kodon in FW3

4.2.3. Mutationsanalyse des Leaderbereiches

Die Verbindung zwischen dem Promotor und der VH-Region nimmt der Leader nicht nur topographisch und funktionell, sondern in den untersuchten Zelllinien auch in Bezug auf die Mutationshäufigkeit ein. Diese ist am niedrigsten mit

\emptyset 2,2% im ca. 50 bp großen Leader 1 (L1) (0 – 4,5%) und steigt über

\emptyset 5,2% im ca. 100 bp großen Intronbereich (0 – 15%) auf einen Wert von

\emptyset 10,8% im ca. 10 bp großen Leader 2 (L2) (0 – 17,6%) an (Abb. 9).

Nach dem Umschreiben der kodierenden Leadersequenz in die Aminosäuresequenz fanden wir keine „cripling mutations“. Zusätzlich zeigte sich, dass die Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen im Leader gleich ist (R/s Verhältnis in L1 →3 und in L2 →3) (im Detail in Tab. 5 dargestellt).

Tabelle 5 Analyse der Mutationsfrequenz und Antigenselektion im Promotor, Leader und kodierenden VH-Bereich der umgelagerten Immunglobulingene in vier Hodgkinzelllinien

Zelllinie	Somatische Mutationen															R/s FW	R/s CDR		
	Leader 1		Intron		Leader 2		FW 1		CDR 1		FW 2		CDR 2		FW 3			Summe (nur VH)	
	%	R/s	%	%	R/s	%	R/s	%	R/s	%	R/s	%	R/s	%	R/s			%	
L1236 *	0	-	3,5	17,6	1/0	15,5	7/7	20	1/2	9,5	2/2	29,4	13/2	15,6	7/8	17,3	0,9	3,5	
KM-H2	4,3	2/0	15	10	1/0	10	5/4	26,6	2/2	7,1	1/2	17,6	7/2	18,5	10/8	14,5	1,1	2,2	
L591	0	-	0	0	-	2,2	2/0	0	-	4,8	2/0	11,8	6/0	5,2	4/1	5,2	8	6	
L428	4,5	1/1	2,4	15,4	1/1	15,5	10/4	20	2/1	2,4	0/1	13,7	4/3	14,6	11/3	13,1	2,6	1,5	

* Sequenz publiziert unter „Accession Number“: X89595

4.2.4. Mutationsanalyse des VH-Bereiches

Im kodierenden Bereich des VH Segmentes (FW1 – FW3) der Hodgkinzelllinien L1236, L428, KM-H2 und L591 betrug die durchschnittliche Mutationsrate 12,5% (5,2 – 17,3%). Diese variierte jedoch innerhalb des VH-Segmentes sehr stark (Abb. 9; Tab. 5).

Die höchsten Mutationsraten ließen sich in den CDR feststellen:

Ø 16,6% für die ca. 15 bp große CDR1 (0 – 26,6%) und

Ø 18,1% für die ca. 51 bp große CDR2 (11,8 – 29,4%).

Eine geringere Anzahl somatischer Mutationen wiesen dagegen die FW-Regionen auf:

Ø 10,8% für die ca. 90 bp große FW1-Region (2,2 – 15,5%) sowie

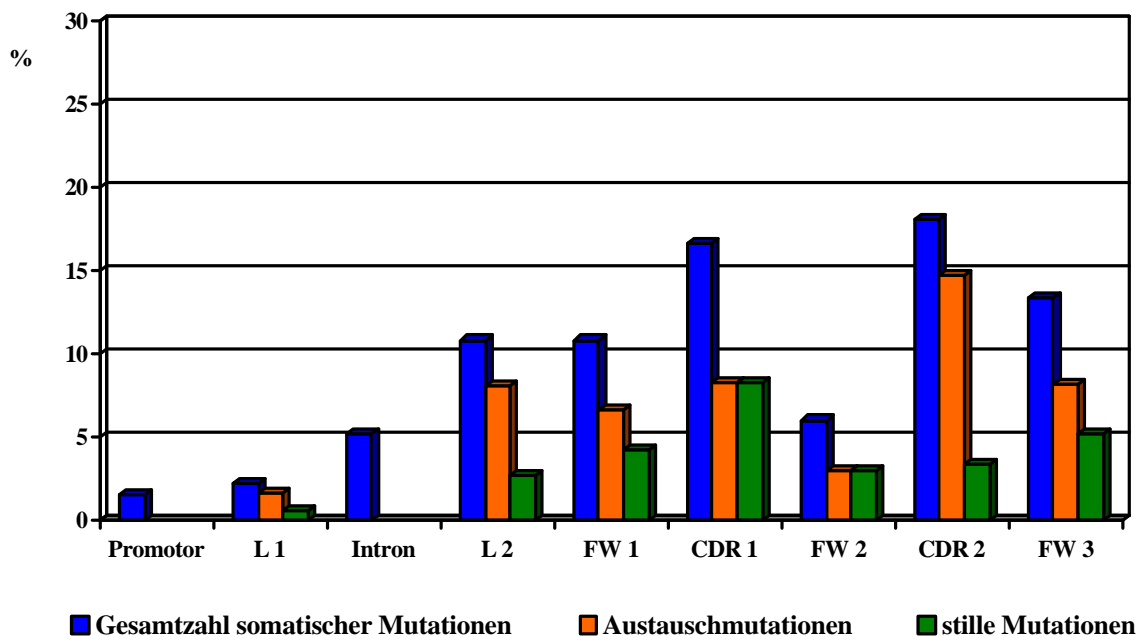
Ø 6% für die ca. 42 bp große FW2-Region (2,4 – 9,5%) und

Ø 13,4% für die ca. 96 bp große FW3-Region (5,2 – 18,5%).

Nach dem Umschreiben der VH-Sequenz in die Aminosäuresequenz fanden wir keine „crippling mutations“ mit Ausnahme eines Stopp-Kodons in FW3 der Zelllinie L591. Die Analyse der Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen zeigte im VH-Bereich deutliche Unterschiede zwischen den FW-Bereichen und den CDR. So ist das R/s Verhältnis in den CDR der Zelllinien L1236 und L591 sehr hoch und in den FW-Bereichen der Zelllinien L1236 und KM-H2 relativ niedrig (Tab. 5).

Die Analyse auf Zeichen einer Antigen Selektion zeigte, dass bei ausschließlicher Betrachtung der FW-Bereiche nach Methode II nur die L1236 und die KM-H2 als antigenselektiert gelten können. Bei Betrachtung der CDR und der FW-Bereiche nach Methode I trifft diese Aussage nur noch für die L1236 zu. Die L428 und die L591 weisen keine Zeichen der Antigen Selektion nach den oben beschriebenen Methoden auf (Tab. 5).

Abbildung 9 Frequenz somatischer Mutationen im Promotor, Leader und VH-Bereich der umgelagerten Ig Gene in vier Hodgkinzelllinien



4.2.5. Amplifikation und Mutationsanalyse des E_{μ} Enhancers

Für die Untersuchung der beiden beschriebenen Octamer motive [ATTTGCGT (90927 – 90934) und ATTTTCAT (91200 – 91206) (AccNo.X97051)] im E_{μ} Enhancer in den

Hodgkinzelllinien L1236, KM-H2, L428 und L591 etablierten wir eine „semi nested“ PCR. Das Produkt war 504 bp groß.

Die Octamer motive des E μ Enhancers erwiesen sich in den Hodgkinzelllinien als nicht mutiert (Tab. 4). Die wenigen, im untersuchten Abschnitt des E μ -Enhancers nachweisbaren Mutationen sind für jede Zelllinie unterschiedlich (KM-H2: Pos. 90853 t \rightarrow c, Pos. 90882 a \rightarrow t; L428: Pos. 91108 t \rightarrow a, Pos. 91199 t \rightarrow a), mit Ausnahme einer Insertion an Position 90863 in den Zelllinien KM-H2 und L591. Keine der Mutationen betraf uns derzeit bekannte Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren.

4.3. Untersuchung des umgelagerten IgH Gens in einzeln isolierten HRS Zellen des klassischen Morbus Hodgkin vom nodulär sklerosierenden Typ

4.3.1. Kriterien für die Auswahl der Fälle des klassischen Morbus Hodgkin

Zur Untersuchung kamen neun Fälle, die zuvor eindeutig als Fälle des klassischen Morbus Hodgkin identifiziert worden waren. Die Klassifikation stützt sich auf folgende Merkmale: die typische Zellmorphologie der Tumorzellen, den reaktiven gemischt zellulären Hintergrund (hier Zuordnung aller Fälle zum nodulär sklerosierenden Typ), die meist fehlende Expression von B- oder T-Zellantigenen, die Expression von CD30 und die fehlende Expression des ALK Proteins. Eine EBV Infektion der HRS Zellen wurde durch die Expression des Virusproteins LMP-1 in vier Fällen nachgewiesen (Tab. 1).

Zusätzlich waren alle Fälle zuvor von Marafioti et al. auf eine Ig Genumlagerung in den HRS Zellen untersucht worden (Marafioti et al. 2000). Hier zeigte sich in sechs Fällen ein funktional und in drei Fällen ein nicht funktional umgelagertes Ig Gen.

4.3.2. Ergebnisse der Einzelzellisolierung

Wir isolierten aus Gefrierschnitten befallener Gewebe von neun, nach den oben erwähnten Kriterien, ausgewählten Fällen des klassischen Morbus Hodgkin insgesamt 335 HRS Zellen (10 – 72 HRS Zellen/Fall) (Tab. 6). Die Auswahl der HRS Zellen für die Einzelzellisolierung erfolgte aufgrund ihrer Morphologie und der Expression von CD30. Zusätzlich entnahmen wir zur Überprüfung von Kontaminationen nach jeder zweiten isolierten Zelle eine Probe vom Überschichtungspuffer (Σ 157).

4.3.3. Amplifikation der umgelagerten IgH Promotoren in einzelnen HRS Zellen

Für die Untersuchung der umgelagerten IgH Promotoren in einzeln isolierten HRS Zellen etablierten wir eine „semi nested“ PCR, die 63 – 108 bp vor dem Octamermotiv beginnend den restlichen Promotor, den Leader und Teile des V-Segmentes (FW1 – CDR2) erfasste (Abb. 8). Die Amplifikate variierten je nach Fall in ihrer Größe zwischen 460 und 585 bp.

Mit diesem Ansatz gelang es aus 335 isolierten HRS Zellen 65-mal (2 – 16 Zellen/Fall) den Promotor des umgelagerten IgH Gens zu amplifizieren (Tab. 6). Als Kontrolle für die Spezifität der PCR konnten wir jeweils eine absolute Übereinstimmung zwischen unseren Sequenzen und den bereits bekannten Sequenzabschnitten [FW2 und (CDR2)] im überlappenden Sequenzbereich von 18 – 72 bp nachweisen (Abb. 8).

Für die weiteren Analysen bildeten wir aus der bereits bekannten Sequenz (FW2 – JH) und dem neuen Sequenzabschnitt (Promotor bis CDR2) eine Gesamtsequenz. Vor den Mutationsanalysen ermittelten wir für diese Gesamtsequenz die zu Grunde liegende Keimbahnsequenz. Zu unserer Überraschung stellten wir fest, dass in allen Fällen ein anderes VH-Segment der gleichen Familie umgelagert wurde als bisher angenommen. Dafür gibt es mehrere Ursachen:

- a) Durch den Vergleich eines deutlich längeren Sequenzabschnittes mit der Ig Gendatenbank ist die Wahrscheinlichkeit höher, die richtige Keimbahnsequenz zu ermitteln.
- b) Der von Marafioti et al. (Marafioti et al. 2000) benutzte Sequenzbereich (FW2 – FW3) weist eine deutlich höhere Mutationsrate auf als der neu hinzukommende Abschnitt (LI – FW2). Damit lassen sich bestimmte Muster der Keimbahnsequenz beim Datenbankvergleich leichter identifizieren.

In den weiteren Untersuchungen benutzten wir immer die von der kompletten umgelagerten IgH Sequenz abgeleitete Keimbahnsequenz als Berechnungsgrundlage für die Mutationen.

4.3.4. Mutationsanalyse des IgH Promotors

Die Analyse der umgelagerten IgH Promotoren in neun Fällen des klassischen Morbus Hodgkin zeigte für die konservierten, funktionell bedeutsamen Strukturen (Octamermotiv, TATA-Box) in der Mehrzahl der Fälle (8) keine Mutationen. Nur im Fall 7 konnten wir im Octamermotiv zwei Mutationen [Positionen 1 (A→G) und 8 (T→G)] nachweisen. Die TATA-Box war hier nicht mutiert. Im verbleibenden Promotorbereich zeigten sich in allen Fällen nur wenige Basenaustausche (Ø 1,4%), die wie bei den Zelllinien als Polymorphismen

zu werten sind. Dazu gehören: ein Basenaustausch (Fall 3) und die Deletion einer Base (Fall 6) in der pyrimidinreichen Region (Tab. 6; Tab. 7).

Tabelle 6 Somatische Mutationen in den Promotoren der umgelagerten IgH Gene in neun Fällen des klassischen Morbus Hodgkin

Fall	isolierte Zellen	spezifische Sequenzen	somatische Mutationen							Kodierfähigkeit	Familie *
			IgH Promotor				Leader	VH-Region			
			Pyrimidin-region	Octamer-motiv	TATA-Box	anderer Bereich	L1 + L2 und Intron	FW #	CDR ##		
n	n	n	n	n	n	n	n	n			
1	32	7	0	0	0	0	1	15	9	— ^a	VH-1
2	32	8	n.a.	0	0	0	1	26	8	+	VH-2
3	30	4	1	0	0	4	17	41	21	— ^b	VH-3
4	22	7	0	0	0	4	5	21	22	+ (-) ^c	VH-3
5	37	16	0	0	0	2	24	34	13	+	VH-3
6	44	7	1 [§]	0	0	2	0	5	7	+	VH-3
7	56	2	0	2	0	6	13	38	18	+	VH-3
8	10	8	n.a.	0	0	0	2	10	8	— ^d	VH-3
9	72	6	0	0	0	2	9	36	17	+	VH-4

n Anzahl

n.a. nicht analysiert

+ kodierend

– nicht kodierend

Anzahl der Mutationen in FW1, FW2 und FW3

Anzahl der Mutationen in CDR1 und CDR2

***** nach VBASE (Tomlinson et al. 1992)

§ Deletion eines Basenpaares

a VL: drei Basenpaare Insertion + Stopp-Kodon in FW3

b VH: drei Basenpaare Deletion in CDR2; VL: Stopp-Kodon und Leserasterverschiebung in CDR3

c VH: intraklonale Unterschiede – 22 Basenpaare Insertion in zwei HRS Zellen, mit Leserasterverschiebung und einem Stopp-Kodon

d VH: Deletion von zwei Basenpaaren in FW3 und zwei Stopp-Kodon in CDR2

4.3.5. Mutationsanalyse des Leaderbereiches

Ähnlich wie bei den Zelllinien stieg die Mutationshäufigkeit in den einzeln isolierten HRS Zellen vom Promotor zur VH-Region hin an. Die Häufigkeit somatischer Mutationen betrug:

∅ 2% im L1 (von 0 – 9%) und stieg auf

∅ 6,5% im Leader Intronbereich (0 – 18,4%) sowie

∅ 5,7% im L2 (0 – 23,1%) an.

Nach dem Umschreiben der Leadersequenz in Aminosäuren fanden wir in keinem Fall „crippling mutations“. Zusätzlich zeigte sich, dass das Verhältnis von Austauschmutationen und stillen Mutationen in L1 und L2 ähnlich ist (R/s in L1 \rightarrow 1,0 und in L2 \rightarrow 0,5) (Tab. 7).

Tabelle 7 Analyse der Mutationsfrequenz und Antigenselektion im Promotor, Leader und kodierenden VH-Bereich des umgelagerten Ig Gens in einzeln isolierten HRS Zellen aus neun Fällen des klassischen Morbus Hodgkin

Fall	Somatische Mutationen																R/s FW	R/s CDR	
	Leader 1		Intron		Leader 2		FW 1		CDR 1		FW 2 *		CDR 2 *		FW 3 *				Summe (nur VH) %
	%	R/s	%	%	R/s	%	R/s	%	R/s	%	R/s	%	R/s	%	R/s				
1	0	-	1,1	0	-	3,5	3/0	33,3	5/0	0	-	7,8	2/2	12,9	6/6	8,2	1,5	3,5	
2	0	-	1,2	0	-	8,8	3/5	23,8	4/1	4,8	1/1	6,3	2/1	16,5	8/8	9,7	0,8	3	
3	9	2/2	12,6	0	-	18,8	11/6	33,3	4/1	14,2	2/4	31,4	14/2	18,3	9/9	20,5	1,2	6	
4	2,3	0/1	4	0	-	4,4	1/3	33,3	3/2	7,1	2/1	33,3	13/4	14,2	10/4	14,5	1,6	2,7	
5	4,5	1/1	18,4	23,1	2/1	18,9	10/7	20	1/2	4,8	0/2	19,6	6/4	15,6	8/7	16	1,1	n.a.#	
6	0	-	0	0	-	0	-	20	2/1	0	-	8,3	4/0	5,4	2/3	4,2	0,6	6	
7	0	-	12	10	0/1	16,6	9/6	20	3/0	7,1	1/2	29,4	9/6	20,7	13/7	18,9	1,5	2	
8	2,1	1/0	1	0	-	0	-	26,6	4/0	2,4	1/0	7,8	4/0	9,2	7/2	6,4	4	8	
9	0	-	8,3	18,2	0/2	7,1	6/5	33,3	3/3	9,5	3/1	22,9	8/3	21,9	15/6	17,5	2	1,8	

n.a. nicht analysierbar

27 Basenpaare Insertion und davon 19 Basenpaare Duplikation in CDR 2

- nicht zu berechnen

* Sequenz aus Marafioti et al. 2000

4.3.6. Mutationsanalyse des VH-Bereiches

Der Vergleich des VH-Bereiches (FW1 – FW3) der HRS Zellen mit der zu Grunde liegenden Keimbahnsequenz zeigte durchschnittlich eine Mutationsrate von 12,9% (4,2 – 20,5%) (Tab. 7). Diese variierte innerhalb des VH-Bereiches wie bei den Zelllinien sehr stark (Abb. 10).

Die höchsten Mutationsraten ließen sich in den CDR feststellen:

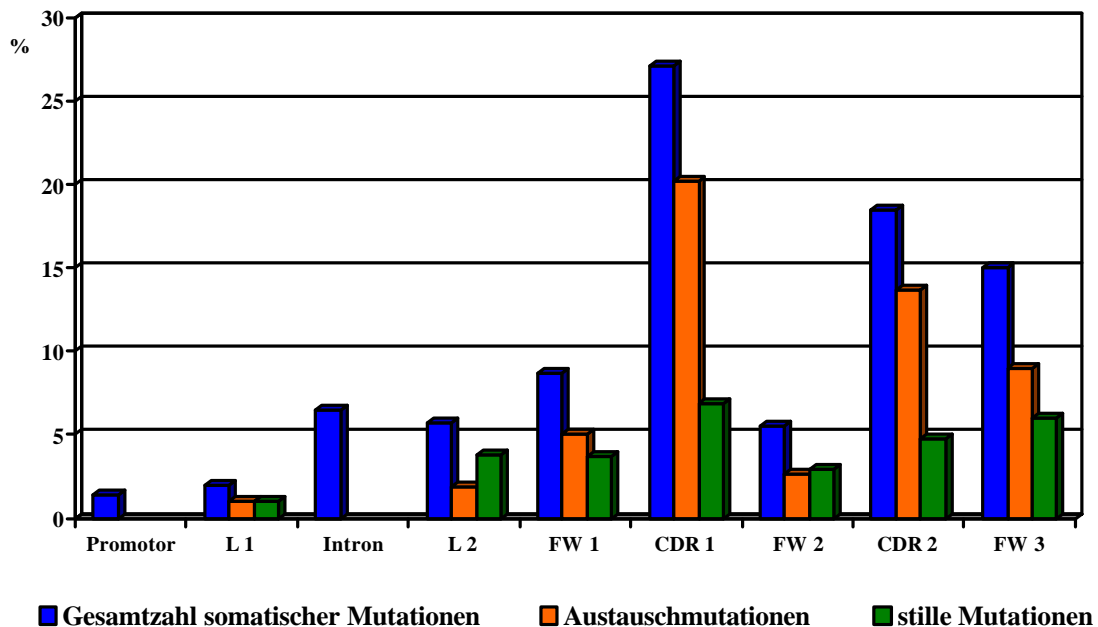
Ø 27,1% für die CDR1 (20,0 – 33,3%) und

Ø 18,5% für die CDR2 (6,2 – 33,3%).

Eine geringere Anzahl somatischer Mutationen wiesen dagegen die FW-Regionen auf:

- Ø 8,7% für die FW1-Region (0 – 18,9%) sowie
- Ø 5,5% für die FW2-Region (0 – 14,2%) und
- Ø 13,4% für die FW3-Region (3,1 – 20,8%).

Abbildung 10 Frequenz somatischer Mutationen im Promotor, Leader und VH-Bereich des umgelagerten Ig Gens in neun Fällen des klassischen Morbus Hodgkin



Nach dem Umschreiben der VH-Sequenz in die Aminosäuresequenz fanden wir in einem Fall (Fall 8) die bereits beschriebenen „cripling mutations“ (Marafioti et al. 2000). In allen anderen Fällen war die Funktionalität des VH-Elementes nicht beeinträchtigt (Tab. 6). Im Fall 4 war, mit Ausnahme von zwei Zellen mit einer Insertion und nachfolgenden „cripling mutations“, in 25 HRS Zellen ein kodierfähiger Klon amplifiziert worden, welchen wir für unsere Untersuchungen benutzten (Marafioti et al. 2000).

Die Analyse der Anzahl der Austauschmutationen und der stillen Mutationen zeigte deutliche Unterschiede zwischen den FW-Bereichen und den CDR. So variierte das R/s Verhältnis in den CDR von 1,8 bis 8,0 (Ø 4,1), während das R/s Verhältnis der FW-Bereiche Werte zwischen 0,6 bis 4,0 (Ø 1,6) aufwies. Für die CDR von Fall 5 konnte das R/s Verhältnis

aufgrund einer Insertion von 27 bp (mit einer Duplikation von 19 bp) nicht berechnet werden (Tab. 7).

Die Analyse auf Zeichen einer Antigenselektion zeigte, dass bei alleiniger Betrachtung der FW-Bereiche nach Methode II sieben Fälle (Fälle 1 – 7) die Kriterien der Antigenselektion erfüllen. Werden in die Bewertung nach Methode I zusätzlich die CDR Bereiche einbezogen, gelten nur noch vier Fälle als antigenselektiert (Fall 1, 2, 3 und 6). Der Fall 5 wurde in die Bewertung nach Methode I wegen einer Duplikation von 19 bp in der CDR2 nicht einbezogen (Tab. 7; Tab. 8).

Table 8 Analyse der Antigenselektion in neun Fällen des klassischen Morbus Hodgkin

Fall	Antigenselektion	
	(R/s für alle FW < 1,6)	(R/s für alle CDR > 2,9 und für alle FW < 1,5)
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	—
5	+	n.a.
6	+	+
7	+	—
8	—	—
9	—	—
Summe	7/9 (78%)	4/8 (50%)

+ antigenselektiert

– nicht antigenselektiert

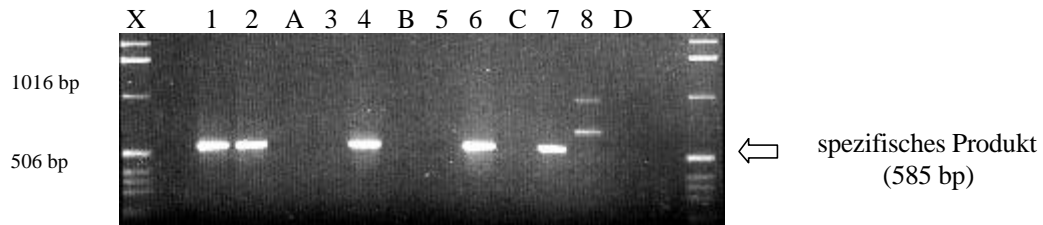
n.a. nicht analysiert

4.3.7. Kontrollen

Zur Überprüfung auf Kontaminationen während der Einzelzellisolierung amplifizierten wir 157 Proben des Überschichtungspuffers zu den gleichen Bedingungen wie die isolierten HRS Zellen. In der Mehrzahl der Fälle fanden sich in den Pufferproben keine Produkte. Jene die auftraten (z.B. Abb. 11; Fall 8, Pufferprobe E) wurden zum Teil sequenziert und zeigten ausnahmslos unspezifische Produkte (Abb. 11).

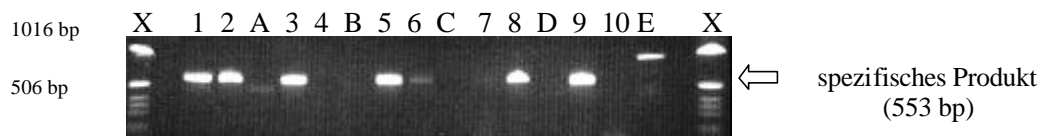
Abbildung 11 **IgH Promotor PCR von isolierten HRS Zellen**

Fall 5



1 – 8 *isolierte Zellen* A – D *Puffer* X *Standard*

Fall 8



1 – 10 *isolierte Zellen* A – E *Puffer* X *Standard*

4.4. Analyse der Expression der Transkriptionsfaktoren Oct-1, Oct-2 und des Ko-Faktors OCA-B in Hodgkinzelllinien

4.4.1. Nachweis von Oct-1, Oct-2 und OCA-B m-RNA

Wir untersuchten mit Hilfe der RT PCR die mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren Oct-1, Oct-2 und des Ko-Faktors OCA-B in den Hodgkinzelllinien L1236, KM-H2, L591 und L428 sowie in B- (Raji) und T-Kontrollzelllinien (Jurkat) (Tab. 9).

Oct-1 RNA war in allen untersuchten Zelllinien nachweisbar. Die Analyse der Sequenzen zeigte in jeder Zelllinie einzelne Mutationen, die in der Mehrzahl Austauschmutationen entsprachen. Alle Mutationen waren unterschiedlich lokalisiert, mit Ausnahme der Austauschmutation an Position 674 (A→T). Diese ließ sich sowohl in allen Hodgkinzelllinien als auch in den Kontrollzelllinien nachweisen. In der Zelllinie L428 entspricht der Verlust der Basenpaare 2201 bis 2203 dem Kodon der Aminosäure 734. Keine der Mutationen betraf die funktionell wichtige POU-Domäne von Oct-1.

Eine Expression von Oct-2 m-RNA konnten wir nur in den Zelllinien KM-H2, L591 und Raji nachweisen. In dem untersuchten Genabschnitt dieser Zelllinien zeigten sich keine Austauschmutationen. In den Zelllinien L1236, L428 und Jurkat ließ sich keine Oct-2 m-RNA amplifizieren.

Den Ko-Faktor OCA-B konnten wir auf mRNA Ebene in den Zelllinien L1236, L591, Raji und Jurkat nachweisen. Die Analyse dieser Sequenzen ergab in keiner dieser Zelllinien eine Austauschmutation, mit Ausnahme der Zelllinie Jurkat. Hier kam es durch eine Deletion von 28 bp zu einer Leserasterverschiebung, in deren Folge ein Stopp-Kodon in Pos. 187 – 189 (Acc No.: X13403) entstand. Die verbleibenden Zelllinien KM-H2 und L428 zeigten keine Expression von OCA-B m-RNA.

Tabelle 9 Expression von Oct-1, Oct-2 und OCA-B in Hodgkin- und Kontrollzelllinien

Zelllinie	Oct-1			Oct-2			OCA-B		
	m-RNA*		Protein [#]	m-RNA*		Protein [#]	m-RNA*		Protein [#]
	Expression	Mutation	Expression	Expression	Mutation	Expression	Expression	Mutation	Expression
L1236	+	0	+	¾	/	¾	+	0	¾
KM-H2	+	3	+	+	0	¾	¾	/	¾
L591	+	4	+	+	0	+ ~	+	0	+ ~
L428	+	4 &	+	¾	/	¾	¾	/	¾
Raji	+	0	+	+	0	+	+	n.a.	+
Jurkat	+	0	+	¾	/	¾	+	§	+

¾ keine Expression

* Nachweis durch RT PCR (40 Zyklen)

n.a. nicht analysiert

Nachweis durch Immunzytologie

Mutation: Anzahl der Austauschmutationen im kodierenden Bereich

§ Deletion von 28 Basenpaaren und Stopp-Kodon (Pos. 187-189)

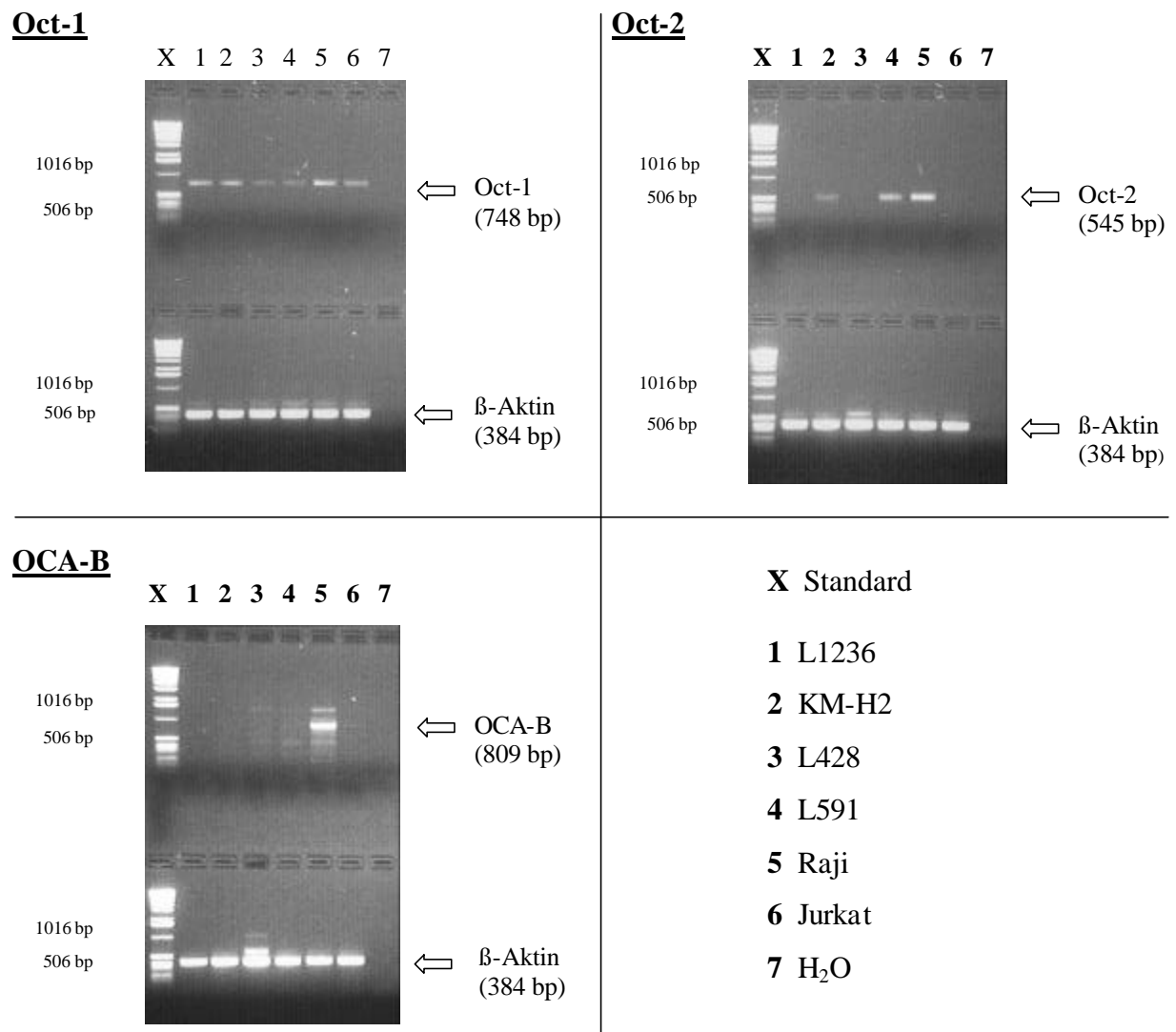
& davon Verlust eines kompletten Triplets

~ nur in einigen wenigen Zellen exprimiert

4.4.2. Quantifizierung der Oct-1, Oct-2 und OCA-B m-RNA

Zur Vermeidung von Fehlern in der Interpretation unserer Ergebnisse untersuchten wir die mRNA Expression von Oct-1, Oct-2 und OCA-B in den oben genannten Zelllinien mit nur 28 PCR Zyklen semiquantitativ. Dazu wurde in allen Zelllinien parallel zu den Transkriptionsfaktoren β -Aktin amplifiziert. Dieses „house keeping gene“ wurde bei den verschiedenen PCR Bedingungen in allen Zelllinien ähnlich stark exprimiert.

Abbildung 12 Semiquantitative RT PCR von Oct-1, Oct-2 und OCA-B



Im Vergleich zu β -Aktin wurde Oct-1 in allen Zelllinien, mit Ausnahme der L428, auf mäßigem Niveau exprimiert. In dieser Zelllinie war nur ein schwaches Signal nachweisbar.

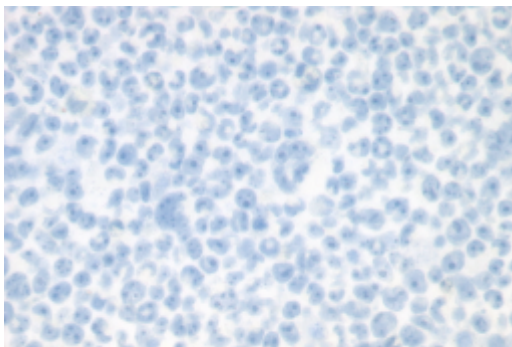
Oct-2 war mit zunehmender Intensität in den Zelllinien KM-H2 und L591 sowie sehr stark in der Zelllinie Raji exprimiert. In den Zelllinien L1236, L428 und Jurkat war keine Oct-2 Expression nachweisbar. OCA-B konnte in den Zelllinien L1236, L591 und Jurkat schwach, in der Zelllinie Raji auf starkem Niveau nachgewiesen werden. Die Gelelektrophorese zeigte keine spezifischen Banden für die Zelllinien KM-H2 und L428.

Die als Kontrolle jeweils mitgeführte Wasserprobe war in allen Untersuchungen negativ (Abb. 12).

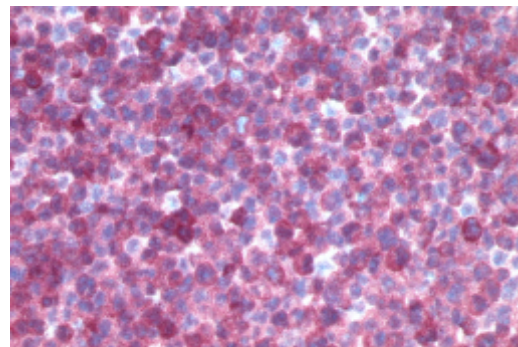
4.4.3. Nachweis von Oct-1, Oct-2 und OCA-B Proteinen

Mit Hilfe immunzytologischer Färbungen untersuchten wir an den Hodgkinzelllinien L1236, KM-H2, L428 und L591 und den Kontrollzelllinien Raji und Jurkat, ob die Expression von Oct-1, Oct-2 und OCA-B Proteinen mit der m-RNA Expression dieser Transkriptionsfaktoren übereinstimmt.

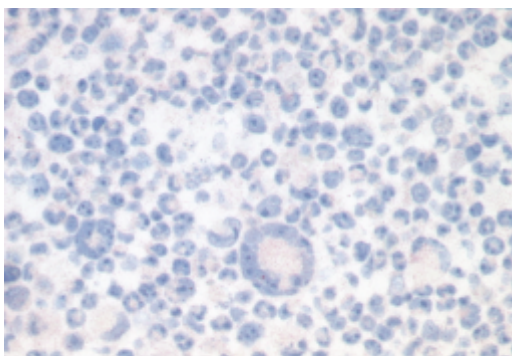
Abbildung 13 Immunzytologischer Nachweis von Oct-2 und OCA-B in Zelllinien



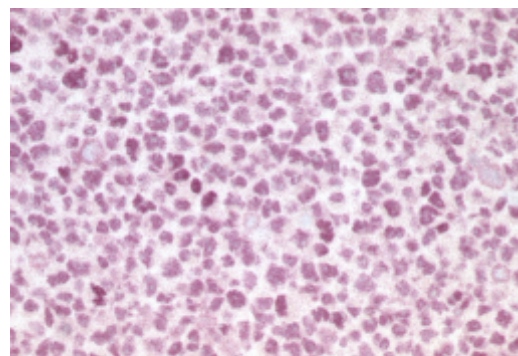
L428 OCA-B-Nachweis negativ (x 20)



Raji OCA-B-Nachweis positiv (x 20)



L428 Oct-2-Nachweis negativ (x 20)



Raji Oct-2-Nachweis positiv (x 20)

Das Oct-1 Protein war sowohl in allen Hodgkinzelllinien als auch in der B- und T-Kontrollzelllinie schwach nachweisbar (nicht gezeigt). Das Oct-2 Protein war in der B-Zelllinie Raji stark exprimiert. Im Vergleich dazu war Oct-2 in den Hodgkinzelllinien L1236, L424, KM-H2 und in der T-Zelllinie Jurkat nicht nachweisbar. In der Hodgkinzelllinie L591 fanden sich jeweils nur wenige positive Zellen für Oct-2 bzw. OCA-B. In den verbleibenden Hodgkinzelllinien und der T-Zelllinie Jurkat war OCA-B nicht exprimiert. Dagegen zeigte die OCA-B Färbung in der B-Zelllinie Raji eine starke Signalintensität (Abb. 13).