

5. DISKUSSION

Lange Zeit konnte das Rätsel um die Herkunft der malignen Tumorzellen beim Morbus Hodgkin aufgrund der fehlenden Expression zelltypischer Oberflächenproteine sowie des sehr geringen Anteils der HRS Zellen am Tumorgewebe nicht gelöst werden. Erst mit der Entwicklung der Einzelzellisolierung und extrem sensitiver PCR-Techniken gelang in den letzten Jahren die Analyse des Genotyps einzelner HRS Zellen (Küppers et al. 1998; Stein & Hummel 1999). Seither steht fest: Der klassische Morbus Hodgkin ist in fast allen Fällen ein B-Zell Lymphom (Küppers et al. 1994; Hummel et al. 1995; Kanzler et al. 1996; Marafioti et al. 2000). Der Nachweis von Ig Genumlagerungen bewies nicht nur die Abstammung der HRS Zellen von B-Zellen, sondern ermöglichte gleichzeitig deren B-Zelldifferenzierungsstufe zu bestimmen. Die Anzahl der somatischen Mutationen im Ig Gen, aber vor allem das Verhältnis von stillen Mutationen und Austauschmutationen zueinander, legten den Verdacht nahe, dass HRS Zellen Antigenkontakt hatten und an der Keimzentrumsreaktion teilgenommen haben (Kanzler et al. 1996; Marafioti et al. 1999; Bräuninger et al. 1999; Marafioti et al. 2000). Unklarheit besteht jedoch bis heute darüber, warum die HRS Zellen, obwohl genotypisch B-Zellen, phänotypisch selten B-Zellmarker aufweisen und keine Immunglobuline exprimieren. Als Erklärungsansatz für die fehlende Ig Genexpression dienen derzeit verschiedene Theorien:

- 1) sogenannte „crippling mutations“ im codierenden Bereich der variablen Region des Ig Gens (Kanzler et al. 1996),
- 2) Mutationen in für die Regulation der Ig Genexpression wichtigen Abschnitten außerhalb des codierenden Bereiches des Ig Gens (z.B. im IgH Promotor) (Jox et al. 1999),
- 3) ausbleibende Ig Gentranskription durch Defekte regulatorisch bedeutsamer Transkriptionsfaktoren (Marafioti et al. 2000).

Marafioti et al. zeigten, dass „crippling mutations“ im umgelagerten Ig Gen nur in ca. 25% der Fälle vorkommen und damit nur zum Teil für die fehlende Ig Genexpression beim klassischen Morbus Hodgkin verantwortlich sein können (Marafioti et al. 2000). Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit zu klären, ob Mutationen in funktionell bedeutsamen Bereichen außerhalb des kodierenden Abschnittes des Ig Gens (Promotor und Enhancer) eine mögliche Ursache für die fehlende Ig Genexpression beim klassischen Morbus Hodgkin darstellen könnten.

Zu Beginn der Arbeit untersuchten wir das konservierte Octamermotiv (ATGCAAAT) in Hodgkinzelllinien mit B-Zellgenotyp auf Mutationen. Hierfür amplifizierten wir mit Hilfe der PCR den Promotorbereich einschließlich TATA Box und Octamermotiv des umgelagerten IgH Gens der vier Hodgkinzelllinien L1236, KM-H2, L591 und L428. Bis auf die bereits beschriebene Mutation im Octamermotiv der L1236 (Jox et al. 1999) konnten wir keine weiteren Mutationen der TATA Box und des Octamermotivs in diesen Zelllinien nachweisen. Die zusätzlich untersuchten Octamer motive im E_μ Enhancer der o.g. Zelllinien zeigten ebenfalls keine Mutationen, weshalb wir Octamer mutationen als eher seltene Ursache für die fehlende Ig Genexpression in Hodgkinzelllinien erachten.

Das Octamermotiv im IgH Promotor, welches sich ca. 70 – 100 bp vor der Leaderregion befindet, ist eine gut charakterisierte, für die Ig Gentranskription bedeutende Bindungsstelle (Eaton & Calame 1987; Staudt 1991). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass nicht nur der komplette Verlust, sondern auch schon einzelne Basenaustausche im Octamermotiv zu einer drastischen Reduktion der Ig Gentranskription führen (Jenuwein & Grosschedl 1991; Shah et al. 1997; Matthias 1998).

In einer kürzlich publizierten Arbeit war für einen Fall des klassischen Morbus Hodgkin in primären und kultivierten HRS Zellen (L1236) eine Mutation an Position 1 des Octamermotivs des IgH Promotors gefunden worden (Jox et al. 1999). Da der kodierende Bereich des umgelagerten Ig Gens der L1236 keine „crippling mutations“ enthält, folgerten die Autoren, dass Mutationen im Octamermotiv des IgH Promotors in den Fällen des klassischen Morbus Hodgkin, die keine „crippling mutations“ im umgelagerten Ig Gen aufweisen, eine mögliche Ursache für die fehlende Ig Genexpression darstellen könnten (Jox et al. 1999).

Um die Bedeutung von Octamer mutationen für die Ig Expression der HRS Zellen in vivo zu klären, dehnten wir die Analysen auf Gewebematerial des klassischen Morbus Hodgkin aus. Wir isolierten mit einer Mikromanipulationsanlage aus Gewebeschnitten von neun Fällen des klassischen Morbus Hodgkin vom nodulär sklerosierenden Typ 335 einzelne HRS Zellen. Es gelang in 19,4% (Σ 65) dieser Zellen den IgH Promotor, den Leader und Teile des kodierenden VH-Bereiches (FW1 – CDR2) mit promotorspezifischen „sense“ Primern und

fallspezifischen CDR2 „antisense“ Primern zu amplifizieren. Konservierte, funktionell bedeutsame Strukturen der IgH Promotoren wie TATA Box und Octamermotiv wiesen bis auf eine Ausnahme keine Mutationen auf. In diesem einen Fall (Fall 7) war das Octamermotiv durch zwei Basenaustausche verändert.

Damit zeigen unsere Ergebnisse, dass Mutationen im IgH Promotor in der überwiegenden Zahl der Hodgkin Fälle nicht für die fehlende Expression der Ig Gene in den HRS Zellen verantwortlich sein können.

In den Fällen, die keine Mutationen im Octamermotiv sowie ein funktionales Ig Gen aufwiesen, bestand weiterhin die Frage nach möglichen Ursachen für die fehlende Ig Genexpression. Da von Marafioti et al. nur ein Teilbereich (FW2 – JH) der variablen Region auf „crippling mutations“ untersucht worden war (Marafioti et al. 2000), analysierten wir zusätzlich die bislang nicht untersuchten kodierenden Abschnitte FW1 und CDR1. Trotz der im gesamten VH-Bereich hohen Mutationsrate von $\bar{\varnothing}$ 12,9% konnten wir keine weiteren als die bisher beschriebenen „crippling mutations“ nachweisen, so dass weiterhin lediglich drei der neun Fälle als nicht funktional gelten können. Innerhalb des VH-Bereiches variierte die Verteilung der Mutationen zum Teil erheblich. Besonders häufig waren die CDR ($\bar{\varnothing}$ 20,7%) mutiert, während die FW-Regionen mit $\bar{\varnothing}$ 9,0% deutlich geringere Mutationsraten aufwiesen. Die Verteilung der Mutationshäufigkeit sowie das Verhältnis der Austauschmutationen zu den stillen Mutationen (R/s Verhältnis) zeigten, dass die Vorläufer der HRS Zellen vermutlich Antigenkontakt hatten und an der Keimzentrumsreaktion teilgenommen haben.

Normale B-Zellen zeigen in Abhängigkeit vom Stadium ihrer Entwicklung unterschiedliche Mutationsraten im Ig Gen. Unreife und naive B-Zellen weisen in den V-Regionen des Ig Gens keine Mutationen auf. Nach einem Antigenkontakt kommt es während der Keimzentrumsreaktion zu Mutationen in den variablen Ig Genabschnitten der B-Zellen. Deren Ziel ist es, über eine Veränderung der Tertiärstruktur des Antikörpers, eine höhere Affinität zum Antigen zu erreichen (Janeway & Travers 1995). Die aus der Keimzentrumsreaktion entstandenen hochaffinen B-Gedächtniszellen und Plasmazellen weisen Mutationsraten von 2 – 6% in den V-Regionen des Ig Gens auf (Klein et al. 1998). B-Zellen, die während der Keimzentrumsreaktion keine höhere Affinität zum Antigen erlangt haben, gegen körpereigene Antigene gerichtet sind oder ihre Funktionalität durch „crippling mutations“ wie Stopp-Kodons oder

Leserasterverschiebungen verloren haben, werden normalerweise durch Apoptose eliminiert. Jene B-Zellen, die diesen Selektionsprozess überstehen, weisen als Zeichen der Antigenselektion unterschiedlich stark mutierte CDR und FW-Regionen auf. Eine eher niedrige Mutationsrate und wenige Austauschmutationen gelten als Voraussetzung für die Bewahrung der Grundstruktur der Antikörper und sind damit Zeichen der FW-Regionen, während eine höhere Mutationsrate mit einem größeren Anteil von Austauschmutationen häufiger die CDR als hochaffine Antigenbindungsstellen charakterisieren (Janeway & Travers 1995; Rajewsky 1996).

Mit der vorliegenden Arbeit bestätigen wir die bereits zuvor beschriebene (Küppers et al. 1994; Kanzler et al. 1996), im Vergleich zu normalen B-Zellen (Klein et al. 1998) deutlich erhöhte Mutationsrate der HRS Zellen im VH-Bereich. Zusätzlich konnten Kanzler et al. in ihrer Arbeit an einzeln isolierten HRS Zellen in acht von neun Fällen Stopp-Kodons bzw. Leserasterverschiebungen nachweisen. Diese „cripling mutations“ sahen die Autoren als wesentliche Ursache für die fehlende Ig Genexpression beim klassischen Morbus Hodgkin an (Kanzler et al. 1996). Da auch nach Analyse des gesamten VH-Bereiches (FW1 – JH) nur in drei von neun Fällen keine Kodierfähigkeit nachweisbar war (eigene Daten und Marafioti et al. 2000), schließen wir, dass in der Mehrzahl der Hodgkinfälle Mutationen im Ig Gen nicht Ursache für die fehlende Ig Expression sind.

Sowohl „cripling mutations“ im kodierenden Bereich als auch Mutationen in regulativ bedeutsamen Sequenzen des Ig Gens konnten somit nur zum Teil die fehlende Ig Genexpression in den HRS Zellen erklären. Deshalb überprüften wir, ob ein Defekt in der Regulation der Transkription für die fehlende Ig Genexpression verantwortlich ist. Dafür untersuchten wir die Expression der Transkriptionsfaktoren Oct-1, Oct-2 und OCA-B, die über die Bindung an das Octamer-motiv im Ig Promotor einen großen Einfluss auf die Ig Genexpression haben (Shah et al. 1997; Matthias 1998), in den Hodgkinzelllinien L1236, KM-H2, L428, L591 und in Kontrollzelllinien. Während in allen untersuchten Zelllinien sowohl Oct-1 m-RNA als auch Oct-1 Protein nachweisbar waren, zeigte sich in den Hodgkinzelllinien eine fehlende oder stark verminderte m-RNA Expression von Oct-2 und OCA-B (RT-PCR). Eine Expression von Oct-2 und OCA-B Proteinen in den Hodgkinzelllinien (Immunzytologie) konnten wir nicht nachweisen. Dagegen waren in der Ig

produzierenden B-Kontrollzelllinie Raji sowohl m-RNA als auch Proteine von Oct-2 und OCA-B stark exprimiert.

Die Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Oct-2 gehören zur Familie der POU-Proteine, die über die Bindung der beiden Untereinheiten ihrer POU-Domäne an das Octamermotiv im Ig Promotor die Ig Gentranskription aktivieren (zusammengefasst in: Ryan & Rosenfeld 1997). Das ubiquitär exprimierte Oct-1 und das hauptsächlich in B-Zellen vorkommende Oct-2 besitzen in der frühen B-Zellentwicklung am Ig Promotor ein ähnlich hohes Aktivierungspotential. In der weiteren Entwicklung wird Oct-2 zunehmend stärker exprimiert, so dass die Ig Genexpression in der terminalen Differenzierung zu Plasmazellen vermutlich fast ausschließlich von Oct-2 getragen wird (Feldhaus et al. 1993; Shah et al. 1997; Tang & Sharp 1999). Diese These wurde jedoch in einer kürzlich publizierten Arbeit in Frage gestellt. Die Autoren konnten an IgM^+ $\text{Oct-2}^{-/-}$ $\text{OCA-B}^{-/-}$ B-Zellen eine annähernd normale Ig Transkription zeigen (Schubart et al. 2001), weshalb eine größere Bedeutung von Oct-1, in Verbindung mit einem bislang unbekanntem Ko-Faktor, postuliert wurde. Inwieweit die Ergebnisse unreifer B-Zellen auf reife bzw. sich terminal differenzierende B-Zellen übertragbar sind müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Der Ko-Faktor OCA-B wird fast ausschließlich in B-Zellen exprimiert und hat zusammen mit Oct-1/Oct-2 einen großen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität im Ig Gen (Luo et al. 1995; Gstaiger et al. 1995; Strubin et al. 1995). OCA-B verstärkt die Bindung von Oct-1/Oct-2 an das Octamermotiv im Ig Promotor durch gleichzeitige Bindung an beide Untereinheiten der Oct-1/Oct-2 POU-Domäne und das Octamermotiv (Pos. 5) (Cepek et al. 1996). Daraus entsteht eine molekulare Klammer, die die Protein-DNA Interaktion von Oct-1/Oct-2 und Octamermotiv verlängert. Diese Interaktion von OCA-B, Oct-1/Oct-2 und Octamermotiv ist für eine vollständige Aktivität des Ig Promotors notwendig (Sauter & Matthias 1998).

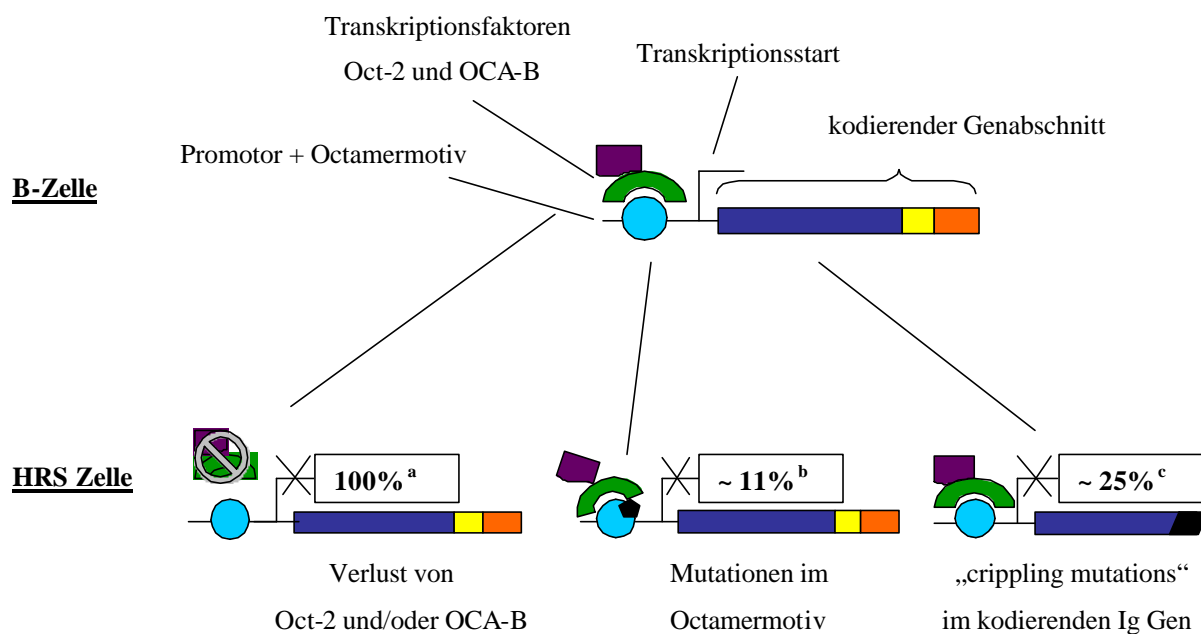
Experimente an „knock-out“ Mäusen zeigten, dass der Verlust von OCA-B zu einer deutlich reduzierten Ig Expression und einer fehlenden Ausbildung von Keimzentren führt (Kim et al. 1996). Die besondere Rolle von OCA-B für die späte, Antigen-abhängige B-Zellentwicklung zeigte eine kürzlich publizierte Arbeit. Dort hatte der Verlust von OCA-B in der frühen B-Zellentwicklung nur eine gering verminderte Ig Expression zur Folge, während die Ig

Produktion reifer B-Zellen besonders nach Antigenkontakt deutlich reduziert war (Laumen et al. 2000).

In der Zusammenschau der Daten favorisieren wir die Hypothese, dass die fehlende Ig Gentranskription beim klassischen Morbus Hodgkin hauptsächlich durch den Verlust der Transkriptionsfaktoren Oct-2 und/oder OCA-B verursacht wird. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse aus Hodgkinzelllinien inzwischen an Gewebematerial des klassischen Morbus Hodgkin reproduzieren (Stein et al. 2001; Re et al. 2001a). Damit sind frühere Arbeiten, die eine starke Expression von Oct-2 beim klassischen Morbus Hodgkin beschrieben hatten (Bargou et al. 1996), eindeutig widerlegt.

Neben der fehlerhaften Regulation der Ig Transkription können zusätzlich sowohl Mutationen im Octamermotiv des umgelagerten Ig Promotors als auch „cripling mutations“ im codierenden Bereich des Ig Gens beim klassischen Morbus Hodgkin auftreten, die potentiell eine Ig Gentranskription verhindern (Re et al. 2001b), jedoch von uns als Epiphänomen gewertet werden.

Abbildung 14 Ursachen für den Verlust der Expression von Ig in HRS Zellen



a) von 32 Hodgkinfällen (Stein 2001)

b) von 9 Hodgkinfällen (Theil 2001)

c) von 25 Hodgkinfällen (Marafioti 2000)

Die Möglichkeit einer fehlerhaften Regulation der Ig Gentranskription beim klassischen Morbus Hodgkin war erstmals von Kanzler et al. 1996 diskutiert und in einer kürzlich publizierten Arbeit experimentell bestätigt worden (Marafioti et al. 2000). Marafioti et al. konnten in dieser Arbeit zeigen, dass transfizierte synthetische Ig Promotorkonstrukte in Hodgkinzelllinien keine Aktivität aufweisen. B-Kontrollzelllinien zeigten dagegen eine normale Aktivität der Ig Promotorkonstrukte, weshalb die Autoren für den Morbus Hodgkin einen Defekt auf der Ebene der Regulation der Ig Gentranskription vermuteten (Marafioti et al. 2000). Unsere weiterführenden Versuche durch transiente Ko-Transfektion von Oct-2 und/oder OCA-B in Hodgkinzelllinien bestätigten diese Hypothese, da die Aktivität der Ig Promotorkonstrukte in Anwesenheit von OCA-B deutlich erhöht war (Stein et al. 2001; Theil et al. 2001). Damit unterstützen die vorliegenden Ergebnisse die Annahme, wonach Oct-2 und besonders OCA-B in der Phase der späten B-Zelldifferenzierung nach Antigenkontakt die größte Bedeutung für die Ig Genexpression besitzen (Laumen et al. 2000; Stein et al. 2001).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der Verlust der Ig Genexpression beim klassischen Morbus Hodgkin unabhängig von „crippling mutations“ im kodierenden Bereich des Ig Gens oder im Ig Promotor ist. Stattdessen legen die Daten nahe, dass die fehlende Aktivität des Ig Promotors in den HRS Zellen auf den Verlust von Oct-2 und/oder OCA-B und damit auf einen Defekt der Transkriptionsmaschinerie zurückzuführen ist.