Universität Ulm
Abteilung Innere Medizin I
Leiter Prof. Dr. G. Adler

Expressionsprofilanalysen extranodaler Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ und diffus großzelliger B-Zell-Lymphome des Gastrointestinaltrakts

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Claudia Barth
aus Ulm an der Donau

Ulm 2005

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Gress
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Peter Dürre
Tag der Promotion:	27.01.2006

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungen III

1. Einleitung 1

1.1. Extranodale Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ und diffus großzellige B-Zell-Lymphome des Gastrointestinaltrakts 1

1.2. Die Anwendung der Microarray-Technologie in der Krebsforschung 6

1.3. Ziel der Arbeit 9

2. Material und Methoden 11

2.1. Gewebe, Organismen und Vektoren 11

2.2. Zellkultur 13

2.2.1. Kultivierung prokaryotischer Zellen 13

2.2.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen 14

2.3. Transformation 15

2.3.1. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA 15

2.4. Transfektion 15

2.4.1. Transiente Transfektion durch Lipofektion 15

2.4.2. Transiente Transfektion durch Elektroporation 16

2.5. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren 17

2.5.1. Behandlung von Geräten und Lösungen 17

2.5.2. Arbeiten mit DNA 17

2.5.3. Arbeiten mit RNA 23

2.6. Spezielle Techniken zur Durchführung von Expressionsprofilanalysen 25

2.6.1. Laser Mikrodissektion 25

2.6.2. Lineare Amplifikation und cDNA-Synthese 26

2.6.3. Radioaktive Markierung der amplifizierten RNA und Hybridisierung der Arrays 26

2.6.4. Herstellung von DNA-Microarrays (‚Spotten') 27

2.7. Methoden im Umgang mit Proteinen 28

2.7.1. Isolierung von Gesamt-Protein aus Zelllinien 28

2.7.2. Proteinkonzentrationsbestimmung 29
2.7.3. ‚Western Blots' 29
2.7.4. Immunhistologie 32
2.8. Durchflusszytometrie 33

3. Experimente und Ergebnisse 35
3.1. Durchführung von Expressionsprofilanalysen der SCL, LCL und SCL+LCL 35
3.1.1. Herstellung des Mikroarrays 35
3.1.2. Aufbereitung der Gewebe-Proben zur Hybridisierung 39
3.1.3. Radioaktive Markierung, Hybridisierung und Quantifizierung der Hybridisierungssignale 43
3.1.4. Auswertung der Hybridisierungsdaten 45
3.2. Funktionelle Charakterisierung von CUTL1 in diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen 54
3.2.1. Untersuchung von SCL+LCL und weiteren verschiedenen B-Zell-Lymphomen auf Expression von CUTL1 54
3.2.2. ‚Knock down' von CUTL1 in MedB-1 durch transiente Transfektion und dessen Auswirkung auf die Proliferation 57

4. Diskussion 59

5. Zusammenfassung 66

6. Literatur 68

7. Anhang 77

Abkürzungen

ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
aRNA	Antisense RNA
BSA	Bovine serum albumin
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CD	Cluster of differention
cDNA	copy DNA
C_T	Cycle threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxy nucleotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EC	Electron capture
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal calf serum
Ga^{67}	Gallium (mit EC-Zerfallsmodus)
GFP	Green fluorescent protein
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
H. pylori	*Helicobacter pylori*

ICD-O	International classification of diseases for oncology
IgH	Immunglobulin Heavy (Chain)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
Lsg.	Lösung
MALT	Mucosa-associated lymphoid-like tissue
Medb-1	Mediastinale B-Lymphom-Zelllinie
mRNA	Messenger RNA
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	potentia Hydrogenii
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	short interfering RNA
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
w/w	weight/weight
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1. Extranodale Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ und diffus großzellige B-Zell-Lymphome des Gastrointestinal-trakts

Allgemeines

Die extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ und die diffus großzelligen B-Zell-Lymphome des Gastrointestinaltrakts (GI-Trakt) gehören zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). In der Gruppe der NHL werden alle malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems außer den Hodgkin-Lymphomen zusammengefasst. Diese sehr heterogenen Erkrankungen können sich in ihrer feingeweblichen Struktur und ihrem Krankheitsverlauf stark unterscheiden. Man geht heute davon aus, dass sich die maligne Zellpopulation von korrespondierenden Zellen der normalen Lymphopoese ableiten, die alle zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Entwicklung ("Reifung") entarten können. Da die verschiedenen Entwicklungsstadien eng mit der Expression bestimmter Oberflächenproteine assoziiert sind, werden diese neben der Morphologie für die Einteilung der verschiedenen Lymphomtypen herangezogen. Dabei zeigen die verschiedenen Stufen der B-Zelltypen und die jeweils zugeordneten Lymphomtypen ein charakteristisches, sich teilweise überlappendes Profil von bestimmten Oberflächenantigenen (‚Cluster of Differentiation'). Klinisch werden die Lymphome in indolente (niedrigmaligne) und aggressive (hochmaligne) Formen unterteilt. In der indolenten (niedrigmalignen) Gruppe (ca. 70% aller NHL) wird das histologische Bild von kleinen, reifen Lymphozyten beherrscht, während bei den aggressiven (hochmalignen) Formen (ca. 30% aller NHL) große, unreife Zellen vorherrschen. Ferner teilt man die NHL in nodale (von Lymphknoten ausgehende) und extranodale (außerhalb von Lymphknoten entstehende) NHL ein. Etwa 20-35% aller NHL enstehen primär extranodal und von diesen wiederum ca. 30-40% im Gastrointestinaltrakt (d'Amore, Christensen, et al., 1991). Sie finden ihren Ursprung in lymphatischem Gewebe des Magen-Darm-Trakts.

Die extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ und die diffus großzelligen B-Zell-Lymphome des GI-Trakts stellen die weitaus größte und wichtigste Gruppe der extranodalen gastrointestinalen NHL. Diese B-Zell-Lymphome treten ganz überwiegend im Magen auf und gehen vom Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe aus (MALT = mucosa-associated lymphoid-like tissue). Lymphatisches Gewebe ist im Magen normalerweise nicht vorhanden. In Folge einer meist *Helicobacter pylori (H. pylori)* assoziierten chronischen Gastritis wandern Lymphozyten in den Magen ein und bilden dort

Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe aus, das mit seinen Primär- und reaktiven Sekundärfollikeln mit an das Epithel angrenzender Marginalzone im Aufbau den Peyerschen Plaques ähnelt (siehe Abb. 1).

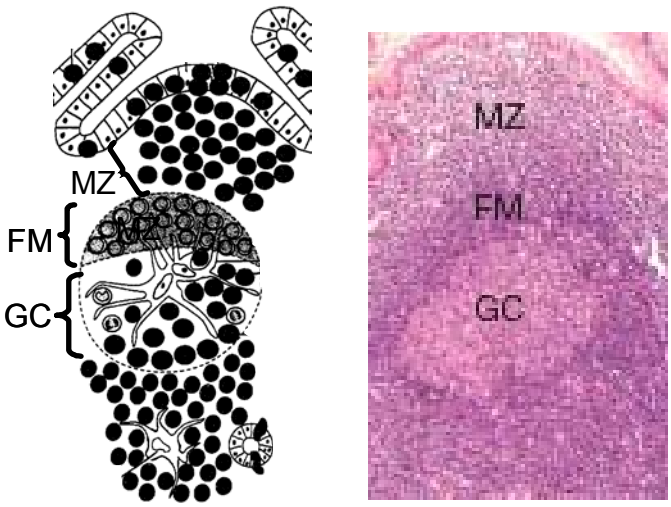


Abb. 1: Aufbau eines Sekundärfollikels in den Peyerschen Plaques

Gezeigt ist der Aufbau eines Sekundärfollikels mit dem Keimzentrum (GC = „Germinal center“), der Mantelzone (FM = „Follicle mantle“) und der ausgeprägten Marginalzone (MZ = „Marginal zone“).

In den Primärfollikeln finden sich ausschließlich B-Lymphozyten, die noch keinen Antigen-Kontakt hatten (reife, naive B-Zellen). Bei Kontakt mit Antigenen bilden sich Sekundärfollikel aus, die in einen peripheren dichteren Mantel mit nicht immunkompetenten B-Lymphozyten und einigen T-Lymphozyten und in ein weniger dichtes Keimzentrum differenziert sind. In den reaktiven Keimzentren findet die Vermehrung und Selektion von antigenspezifischen B-Lymphozyten und die Bildung von B-Gedächtniszellen statt. Reife Gedächtniszellen wandern aus dem Keimzentrum aus und siedeln sich in der angrenzenden Marginalzone an, wo sie nach entsprechendem Antigenkontakt zu Plasmazellen differenzieren können.

Bei einer *H. pylori*-assoziierten chronischen Gastritis ist das akquirierte MALT-Gewebe zu Beginn polyklonal, kann aber im Lauf der Zeit antigen-getrieben oligoklonal werden. Ensteht in dieser Phase in Folge fortlaufender IgH-Umlagerungen eine onkogene Mutation, z.B. eine

chromosomale Translokation, kann dies in einem noch Antigen-abhängigen, kleinzelligen, lokal langsam proliferierenden (niedrigmalignen) monoklonalen B-Zell-Lymphom resultieren. In vielen Fällen scheint nicht *H. pylori* selbst der antigene Stimulus, sondern die Interaktion mit durch *H. pylori* aktivierten T-Zellen der Grund für das anhaltende Wachstum der Magenlymphome zu sein (Wotherspoon, Ortiz-Hidalgo, et al., 1991; Hussell, Isaacson, et al., 1996). *In vitro* Experimente demonstrierten, dass die neoplastischen Zellen der extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ abhängig von spezifischen *H. pylori*-Stämmen proliferieren (Hussell, Isaacson, et al., 1993; Hussell, Isaacson, et al., 1996).
Eine bestehende Abhängigkeit der Lymphomzellen-Proliferation von dem Antigen-Stimulus durch *H. pylori* aktivierter T-Zellen zeigt sich auch durch die Tatsache, dass nach *H. pylori* Eradikation durch Antibiotika die Lymphome zurückgehen können (Isaacson 1999; Zucca, Roggero, et al., 1998), worauf sich die Eradikation als initiale Therapie durchsetzte. Fälle, in denen die Lymphome nicht in Folge einer Antibiotika-Therapie zurückgehen, weisen darauf hin, dass bestimmte genetische Aberrationen vermutlich eine autonome Proliferation der Lymphomzellen unabhängig von einem Antigen-Stimulus verursachen.

Histologie und Klassifikation

Die kleinen Zellen des extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphoms vom MALT-Typ (ICD-O (= international classification of diseases for oncology) code: 9699/3) ähneln morphologisch und immunphänotypisch (CD20+, CD21+, CD35+, IgM+, IgD-) den Marginalzonenzellen. Diese Ähnlichkeit lässt vermuten, dass das kleinzellige B-Zell-Lymphom des Gastrointestinaltrakts in den Marginalzonenzellen seinen Ursprung hat und war Grundlage für die Namensgebung dieser Lymphome in der WHO-Klassifikation (Harris, Jaffe, et al., 2000).
Das Zytoplasma ist mäßig ausgebildet und die Zellkerne sind klein und unregelmäßig geformt. Da es in vielen Fällen schwierig ist, die Lymphomzellen von der durch *H. pylori* hervorgerufenen follikulären Gastritis zu unterschieden, ist der Nachweis so genannter lympho-epithelialer Läsionen (definiert als mehr als 3 Lymphozyten pro Drüse), die durch die Infiltration neoplastischer Zellen in umliegendes Drüsengewebe entstehen, ein differenzialdiagnostisches Hauptcharakteristikum (Harris & Isaacson 1999; Kurtin 1999).
Innerhalb der extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ können eingestreut Areale aus transformierten Blasten auftreten, die immunphänotypisch großen, blastären B-Zellen ähneln (Abb. 2). Diese Morphologie entspricht nach WHO einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) (ICD-O code: 9680/3). In der Diagnose stellt das

häufige gleichzeitige Auftreten von klein- und großzelligen Arealen ein Problem dar. In der WHO-Klassifikation werden diese gemischtzelligen Lymphome als ‚sekundär' hochmaligne diffus großzellige B-Zell-Lymphome des GI-Trakts mit oder ohne koexistenter kleinzelliger Komponente des Marginalzonen/MALT-Typs bezeichnet (Harris, Jaffe, et al., 2000). Diese Fälle zeigen einen aggressiven klinischen Verlauf (Harris, Jaffe, et al., 2000; Taal, Boot, et al., 1996).

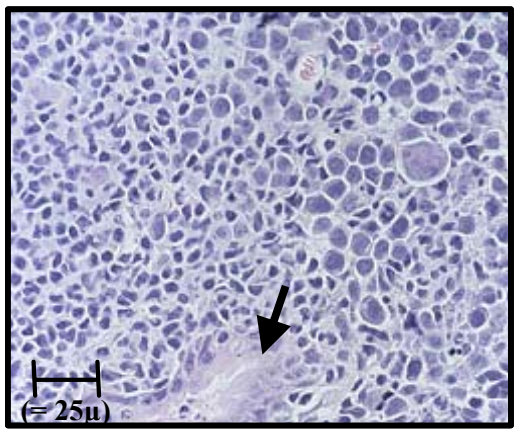


Abb. 2: Histologie (Giemsa-Färbung) eines diffus großzelliges B-Zell-Lymphoms des Gastrointestinaltrakts (DLBCL) mit kleinzelliger Komponente des Marginalzonen/MALT-Typs. Eine besiedelte Drüse (Pfeil) ist von dem Lymphom nahezu komplett zerstört.

In der vorgelegten Arbeit werden im folgenden die extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ als SCL (= ‚small cell lymphoma") und die diffus großzelligen B-Zell-Lymphome des GI-Trakts als LCL (= ‚large cell lymphoma") bezeichnet. Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom des GI-Trakts mit kleinzelliger Komponente des Marginalzonen/MALT-Typs wird mit SCL+LCL abgekürzt.

Das koexistente Auftreten klein- und großzelliger Komponenten in SCL+LCL und vor allem identische IgH-Umlagerungen innerhalb der klein- und großzelligen Population lassen eine klonale Progression vermuten. Andererseits weisen Einzelberichte von Zellklonen mit unterschiedlichen IgH-Umlagerungen innerhalb eines SCL+LCL darauf hin, dass neben der klonalen Transformation ebenso „*de novo*" Enstehungsmechanismen in der Pathogenese des LCL zu existieren scheinen (Cabras, Candidus, et al., 2001). Ob ein LCL ausschließlich aus einer Transformation einer niedrigmalignen Vorstufe entsteht, wird daher kontrovers

diskutiert. Ferner weisen chromosomale Aberrationen wie z.B. die t(11;18) Translokation, welche in circa 30 % aller SCL, niemals jedoch in LCL zu finden ist, auf unterschiedliche Entstehungswege in der Pathogenese hin (Starostik, Patzner, et al., 2002) und deuten eine genetische Heterogenität innerhalb der Gruppe der SCL an.

Genetische Aberrationen in SCL und LCL

Die häufigste chromosomale Aberration der SCL ist die reziproke Translokation zwischen Chromosom 11 und 18 (t(11;18)(q21;q21)). Sie tritt in bis zu einem Drittel aller Fälle auf (Auer, Gascoyne, et al., 1997; Ott, Katzenberger, et al., 1997). Interessanterweise konnten in den für diese Translokation positiven Fällen keine weiteren chromosomalen Abberationen nachgewiesen werden. Durch die Translokation entsteht ein Fusionsprotein aus dem Apoptose-Inhibitor-Gen API2 (Chromosom 11) und dem Gen MALT1 (Chromosom 18), welches in die Antigen-Rezeptor-vermittelte NFκB Aktivierung involviert ist. Es wird vermutet, dass dieses Fusionsprotein möglicherweise durch seine konstitutive Aktivierung von NFκB (McAllister-Lucas, Inohara, et al., 2001) wesentlich zu dem Überlebensvorteil dieser B-Zell-Klone beiträgt (Akagi, Tamura, et al., 1999; Dierlamm, Baens, et al., 1999; Stoffel, Rao, et al. 1999).

Eine weitere für SCL spezifische Translokation ist die t(1;14)(p22;q32), die oft zusammen mit einer Trisomie der Chromosomen 3, 12 und 18 auftritt. Die t(1;14)(p22;q32) tritt in 5 % aller Fälle auf und ist mit fortgeschrittenen Lymphomen assoziiert, die in der Regel nicht mehr auf eine *H. pylori* Eradikation ansprechen (Liu, Ye, et al., 2002). Durch die Translokation kommt das Gen für BCL10 unter die Kontrolle des Enhancers für den Schwerketten-Immunglobulin-Locus, wodurch es zu dessen Überexpression kommt. BCL10 ist sowohl an der Apoptose- als auch Proliferationsregulation der Zellen beteiligt (Zhang, Siebert, et al., 1999). Untersuchungen von transgenen Mäusen, in denen Bcl10 zusammen mit dem Ig-Enhancer vorliegt, zeigten eine spezifische Expansion der Marginalzonen-Zellen der Milz, so dass für BCL10 eine wichtige Rolle in der Regulation der Proliferation dieser Zellen vermutet wird (Hematology 2001. American Society of Hematology Education Program Book. Orlando, Florida, USA. December 7-11, 2001).

Interessanterweise sind durch die beiden Translokationen t(11;18)(q21;q21) und t(1;14)(p22;q32) mit MALT1 und Bcl10 zwei Gene betroffen, die normalerweise gemeinsam durch ihre Interaktion an der Aktivierung des NFκB Signalwegs in Lymphozyten beteiligt sind (Lucas, Yonezumi, et al., 2001).

Durch die Auswirkungen der Translokationen werden sowohl Bcl10, als auch MALT1 von ihrem jeweiligen Aktivator unabhängig und bewirken dadurch eine konstitutive Aktivierung von NFκB.

Weitere typische Anomalien sind Trisomien, insbesondere eine Trisomie des Chromosoms 3, die in ca. 60% aller SCL-Fälle (Wotherspoon, Finn, et al., 1995) vorkommt, aber auch häufig in anderen Lymphom-Subtypen zu finden ist (Zucca, Bertoni, et al., 2000). Die LCL zeigen einen komplexen Karyotyp mit charakteristischen chromosomalen Zugewinnen und Verlusten. Die häufigsten chromosomalen Zugewinne sind auf den Chromosomen 11 und 12 zu finden, auf welchen einige Protoonkogene liegen, für die eine mögliche pathogenetische Rolle in hämatologischen Tumoren vermutet werden (Barth, Dohner, et al., 1998).

Neben der Zytogenetik spielen Untersuchungen der Genexpression auf RNA-Ebene eine immer größere Rolle in der Diagnostik und bei der Aufklärung der Pathogenese von Lymphomen. Die Verwendung der Microarray-Technik erlaubt eine umfassende Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene und ermöglicht so insbesondere in der molekularen Onkologie Einblicke in das Krankheitsgeschehen, die bis vor wenigen Jahren noch unvorstellbar waren (siehe Abschnitt 1.2.). Neben der Identifizierung von zwischen benignem und malignem Gewebe differentiell exprimierten Genen stellt das Erkennen von Informationen in Form spezifischer Expressionsmuster neoplastischer Gewebe ein großes Potential in der Klassifikation und Diagnostik dar. Derzeit sind DNA-Arrays bis auf wenige Ausnahmen noch deutlich von der Anwendung in der klinischen Routine entfernt. Es ist jedoch zu erwarten, dass diese Technologie in der nahen Zukunft zum diagnostischen Standardrepertoire der Onkologie gehören wird.

1.2. Die Anwendung der Microarray-Technologie in der Krebsforschung

Die Entwicklung verbesserter Methoden zur Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen erfordert das Verständnis der molekularbiologischen Mechanismen im komplexen Prozess der Tumorgenese. Durch Genmutation veränderte Proteinfunktionen, aber auch Veränderungen in der Genexpression tragen entscheidend zur Entstehung von Krebs bei. Eine ideale Methode zur umfangreichen Untersuchung von Veränderungen der Genexpression stellt die Microarray-Technologie dar. In einem Microarray Experiment liegen die Nukleinsäuren der zu untersuchenden Gene immobilisiert auf einem festen Träger vor und werden zusammen

mit der zu untersuchenden, zuvor markierten RNA-Population hybridisiert. Bei den verwendeten Plattformen werden als Träger der Nukleinsäuren speziell beschichtete Glasobjektträger („Glas-Chips“) oder Nylonmembranen, seltener Kunststoffoberflächen verwendet. Die Genfragmente (z.B. cDNA-Fragmente) werden entweder von Präzisions-Robotern auf das Trägermaterial übertragen („Spotting“) oder in Form von kurzen Oligonukleotiden auf chemischem Wege direkt auf dem Träger synthetisiert. Das Ergebnis sind regelmäßige Anordnungen („Arrays“) von immobilisierten ungepaarten Genfragmenten, die im Falle von Glas-Chips eine Dichte von bis zu 10 000 Genen pro cm^2 erreichen können. Bei Verwendung von Nylonmembranen werden die zu hybridisierenden RNA-Populationen radioaktiv, bei Verwendung von Glasobjektträgern fluoreszent markiert. Während der Hybridisierungsreaktion binden die mRNA-Moleküle an ihre jeweilige auf den Trägern immobilisierte komplementäre Nukleotid-Sequenz. Die Häufigkeit einer spezifischen mRNA in einer Probe spiegelt sich dann an dieser Stelle in deren Signalintensität wider.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem herkömmlichen Northern Blot ist die Möglichkeit zur gleichzeitigen Untersuchung großer Mengen verschiedener Gene. Ein Problem bei der Auswertung der aus Geweben extrahierten Gesamt-RNA stellt jedoch die Heterogenität der Gewebe dar. Expressionswerte aus Gesamt-Gewebe lassen sich nicht ausschließlich auf die Krebszellen zurückführen, da diese zusammen mit einer Reihe anderer Zellen im Gewebe vorliegen. Die Methode der Mikrodissektion minimiert dieses Problem, da sie eine weitaus gezieltere, mikroskopisch kontrollierte Anreicherung bestimmter Zellpopulationen erlaubt. Die pro Hybridisierung benötigte Menge an RNA lässt sich bei den durch die Mikrodissektion präparierten relativ geringen Zellzahlen durch spezielle RNA-Amplifikationen erreichen. Eine der am häufigsten verwendeten Methode zur Amplifikation ist die *in vitro* Transkription unter Verwendung der T7 Polymerase (Van Gelder, von Zastrow, et al., 1990). Bei dieser linearen Amplifikations-Methode bleiben die relativen Verhältnisse der RNA-Moleküle erhalten, was entscheidend für die Vergleichbarkeit der Proben ist.

Da mittels Microarrays mit einer einzigen Untersuchung mehrere tausend Gene gleichzeitig analysiert werden können, erhält man Momentaufnahmen komplexer Expressionsmuster. Die Gewinnung relevanter Informationen aus den produzierten Daten und deren Interpretation stellt daher eine große Herausforderung dar. Ehe man zu relevanten Aussagen gelangt, ist eine intensive Vorverarbeitung der Rohdaten und eine statistische Analyse notwendig. Eine konzeptionell sehr nahe liegende Einsatzmöglichkeit für die Array-Technologie in der Onkologie besteht in der Suche nach einzelnen Genen, die überwiegend oder sogar ausschließlich in Tumorgeweben, nicht aber in Normalgeweben aktiviert sind. Dadurch

besteht die Hoffnung neue, möglicherweise an der Pathogenese einer speziellen Krebsart beteiligte Gene und für die Krankheit spezifische Markergene zu entdecken.

Eine unfassendere Analyse der Expressionsdaten wird häufig mit dem Stichwort ‚Data Mining' umschrieben. Unter ‚Data Mining' versteht man das systematische (in der Regel automatisierte oder halbautomatisierte) Entdecken und Extrahieren unbekannter Informationen und Beziehungen aus großen Datenmengen. Die Clusteranalyse ist eine der ersten statistischen Methoden, die zur Untersuchung von Expressionsmustern eingesetzt wurde (Eisen, Spellman, et al., 1998). Clusteranalysen können ‚überwacht' oder ‚unüberwacht' durchgeführt werden (Tefferi, Bolander, et al., 2002). In ‚überwachten' Clusteranalysen wird der statistische Algorithmus darauf trainiert, spezifische Genexpressionsmuster aus einer zuvor bekannten Klasse von Genen oder Experimenten zu erkennen, um neue, unbekannte Proben in diese prädefinierten Klassen einzuordnen. ‚Unüberwachte' Clusteranalysen hingegen beinhalten das Gruppieren von Genen allein auf der Basis ähnlicher Expressionsmuster. Das am häufigsten genutzte unüberwachte Clusterverfahren in Genexpressionsanalysen ist die hierarchische Clusteranalyse, die mit Hilfe verschiedener Abstandsmaße die Ähnlichkeitsverhältnisse zwischen den einzelnen untersuchten Proben errechnet und in Form von Binär-Bäumen (Dendrogrammen) darstellt.

Insgesamt hat die DNA-Chip/Mikroarray-Technologie ein enormes Potenzial für die Entwicklung neuer diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Verfahren in der Onkologie. Im Bereich hämatologischer Tumoren zeigte erstmals der Vergleich von Proben aus Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) oder akuter lymphatischer Leukämien (ALL) unter Verwendung von Oligonukleotid Mikroarrays das Potenzial dieser Technologie für die Klassifikation maligner Erkrankungen („class discovery"). (Golub, Slonim, et al., 1999). Jüngste Fortschritte in der Mikroarray-Technologie verhalfen zu einer Verfeinerung der Taxonomie hämatologischer Tumore wie den diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL). Die DLBCL stellen eine diagnostische Entität dar, die Lymphome mit unterschiedlichstem klinischen Verhalten und Therapie-Ansprechen umfassen. Eine Zuordnung der DLBCL in Unterklassen mit charakteristischen klinischen Verläufen ist mit Standardtechniken der Pathologie bisher nicht möglich. Alizadeh et al. konnten zeigen, dass sich mit Hilfe speziell zusammengestellter Microarrays zwei prinzipiell unterschiedliche Subtypen von DLBCL unterscheiden lassen: einer, der Ähnlichkeiten mit normalen Keimzentrumszellen zeigte und einer, der Ähnlichkeiten mit *in vitro* aktivierten peripheren Blut-B-Zellen zeigte. Von besonderer Bedeutung war die Beobachtung, dass diese Patientengruppen in der Klinik nach der Durchführung einer Standardtherapie signifikant

unterschiedliche klinische Verläufe zeigten (Alizadeh, Eisen, et al., 2000). Der prognostische Wert dieser Ergebnisse wurde durch zwei weitere unabhängige Datensätze bestätigt (Rosenwald, Wright, et al., 2002; Wright, Tan, et al., 2003).
Zusätzlich zu diesen Schlüsselstudien konnten mit Hilfe der Mikroarray-Technologie neue potentielle prognostische Marker für die chronische lymphatische Leukämie identifiziert (Stratowa, Loffler, et al., 2001) sowie ein typisches Genexpressionsprofil des Mantel-Zell-Lymphoms ermittelt werden, das eine Vorhersage der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten ermöglicht (Rosenwald, Wright, et al., 2003).
Für SCL und LCL existieren derzeit nur Genexpressionsdaten zu Proben verschiedener histopathologischer Stadien aus einem Maus-Modell (Mueller, O'Rourke, et al., 2003). Vergleichbare Studien an Biopsien aus humanen SCL und LCL wurden bisher noch nicht durchgeführt. Ursache dafür ist nicht zuletzt die Tatsache, dass diese Lymphome mittlerweile nur noch selten operativ behandelt werden, da heutzutage die konservative Therapie der SCL und LCL mit Chemo-und Radiotherapie im Vordergrund steht und somit das Aufkommen verwendbarer Gewebeproben deutlich zurückgegangen ist.

1.3. Ziel der Arbeit

Das extranodale Marginalzonen B-Zell-Lymphom vom MALT-Typ stellt aufgrund des häufig koexistenten diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms des GI-Trakts ein faszinierendes Modell der Lymphomentstehung und –progression dar.
Ziel dieser Arbeit war die Erstellung von Genexpressionsprofilen von extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphomen vom MALT-Typ (SCL), von diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen des GI-Trakts (LCL) und von koexistenten klein- und großzelligen Populationen des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms des GI-Trakts mit kleinzelliger Komponente des Marginalzonen/MALT-Typs (SCL+LCL). Zur Expressionsprofilanalyse sollte ein speziell für die Analyse von Lymphomen optimierter Array („Lymphochip“) konzipiert und hergestellt werden. Zur Analyse stand ein definiertes Kollektiv von Biopsien aus der Gewebebank des Instituts der Pathologie der Universität Ulm zur Verfügung.
Die Expressionsprofile sollten zum Einen dazu verwendet werden, Gene zu identifizieren, die zwischen niedrig- und hochmalignen Zellen differentiell exprimiert sind. Einige dieser differentiell exprimierten Gene sollten gegebenenfalls näher charakterisiert werden. Zum Anderen sollte anhand der komplexen Expressionsprofile untersucht werden, ob es

Expressionsmuster gibt, die für SCL, LCL und die klein- und großzelligen Populationen von SCL+LCL charakteristisch sind, und ob diese Expressionsdaten neue Erkenntisse zur Pathogenese (klonale Progression oder ‚*de novo*'- Transformation) von SCL und LCL gewinnen lassen.

2. Material und Methoden

2.1. Gewebe, Organismen und Vektoren

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Gewebe stammen aus der Gewebebank des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Ulm und sind zusammen mit ihren jeweiligen klinischen und molekularzytogenetischen Daten in Liste 2 im Anhang aufgeführt. Um bezüglich dem Gebrauch archivierter Gewebe für die klinische Forschung dem deutschen Gesetz zu entsprechen wurde das Material pseudonymisiert (Deutsches Ärzteblatt 2003; 100 A1632). Die Genehmigung dazu wurde von dem hiesigen Ethikkommitee erteilt.

Tabelle 1 führt die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme auf. Verwendete Zelllinien mit Bezugsquelle sind in Tabelle 2 aufgeführt, in Tabelle 3 verwendete Vektoren. Die zur Arrayherstellung zusätzlich benötigten cDNA-Abschnitte der Gene wurden beim RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin) bestellt und in *E. coli*-Bakterienstammkulturen (Tab. 2) in verschiedenen Vektoren (Tab. 3) geliefert.

Tab. 1 *E. coli*-Stämme

Stamm	Relevanter Geno- oder Phänotyp[1]	Herkunft/Referenz
DH5α	F-, endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, thi-1, -, recA1, gyrA96, relA1, _80dlacZM15	Life Technologies/Invitrogen, Karlsruhe
DH10β	lacX74 deoR recA1 araD139 (ara,leu)7697 galUgalK -rpsL end A1 nupG	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin

[1] Für die Genotyp-Abkürzungen siehe BACHMANN (1987)

Tab. 2: Verwendete Zellinien

Zellinie	Beschreibung	Herkunft/Referenz
MEDB-1	Parentaltumor ist ein primäres mediastinales B-Zell-Lymphom	Institut für Pathologie, Ulm (Moller, Bruderlein, et al. 2001)

Tab. 3 Vektoren

Vektor	Relevante Merkmale	Herkunft/Referenz
pBluescript SK-	Klonierungsvektor (Ap^r); vom RZPD in der cDNA-Bibliothek verwendet; Amplifikation der cDNA mittels der Primerpaare T3/T7	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin
LafmidBA	Klonierungsvektor (Ap^r); vom RZPD in der cDNA-Bibliothek verwendet; Amplifikation der cDNA mittels M13 Primern	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin
pT7T3D-PacI	Klonierungsvektor (Ap^r); vom RZPD in der cDNA-Bibliothek verwendet; Amplifikation der cDNA mittels der Primerpaare T3/T7	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin
pAMP10	Klonierungsvektor (Ap^r); vom RZPD in der cDNA-Bibliothek verwendet; Amplifikation der cDNA mittels M13 Primern	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin
pCMV-SPORT4	Klonierungsvektor (Ap^r); vom RZPD in der cDNA-Bibliothek verwendet; Amplifikation der cDNA mittels der Primerpaare sp6/T7	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin
Cat L	Cat L cDNA (Maus) inseriert in pCDNA3 (Ap^r)	Arbeitsgruppe Alain Nepveu, Royal Victoria Hospital, McGill University Health Montreal
Myc-CDP-HA	Volle Länge der CUTL1 cDNA mit MYC-Tag in pMX kloniert	Arbeitsgruppe Alain Nepveu, Royal Victoria Hospital, McGill University Health Montreal
pCDNA3	Klonierungsvektor (Ap^r)	InVitrogen

2.2. Zellkultur

2.2.1. Kultivierung prokaryotischer Zellen

2.2.1.1. Nährmedien und Medienzusätze

LB-(Luria-Bertani-)**Medium** (SAMBROOK et al., 1989)

Trypton		10	g
Hefeextrakt		5	g
NaCl		10	g
H_2O	ad	1000	ml

Das Medium wurde 15 min bei 121°C autoklaviert.
Zur Herstellung von festen Nährböden wurde den Medien vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben.
Medienzusätze sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Medienzusätze und ihre Konzentrationen

Medienzusatz	**Stammlösung**	**Arbeitskonzentration**
Ampicillin	100 mg/ml H_2O	50 – 100 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml H_2O	50 µg/ml

Alle Lösungen wurden nach Sterilfiltration in Aliquots bei –20°C gelagert.

2.2.1.2. Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*-Bakterien

Zur Kultivierung wurden mit den jeweiligen *E. coli*-Kulturen LB-Medien in flüssiger oder fester Form als Agarplatten angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.
Zur Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen wurden Übernachtkulturen mit 10% (v/v) DMSO oder Glycerin versetzt und bei –70°C gelagert.

2.2.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.2.2.1. Nährmedien und Medienzusätze

Die im Rahmen dieser Arbeit für die jeweiligen Zellinien verwendeten kommerziell erworbenen Nährmedien mit den Medienzusätzen wie tetracyclin-freiem fötalem Kälberserum („FCS“) und Antibiotikum (Angabe in der Endkonzentration) sind in Tabelle 5 aufgeführt. Für die Suspensionszellen wurde Glutamin-freies Medium verwendet und zusätzlich L-Glutamin (Angabe in der Endkonzentration) hinzugegeben.

Tab. 5: Nährmedien und Medienzusätze

Zellinie	Medium	Antibiotikum	Medienzusätze
MEDB-1	100 ml RPMI 1640 400 ml IMDM	Normocin™ 100 µg/µl	10% FCS L-Glutamin (2mM)

2.2.2.2. Kultivierung und Stammhaltung von eukaryontischen Zellen

Alle Arbeiten wurden mit sterilen Lösungen und unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO_2 in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen in den für die jeweilige Zellinie nötigem Medium (Tab. 5). Die Zellzahl der Zellinien wurde kontinuierlich überprüft und bei Erreichen zu hoher Zelldichten wurden die Zellen mit neuem Medium versorgt und in geringerer Zellzahl neu ausgesät. Die Suspensionszellen wurden abzentrifugiert, das alte Medium abgesaugt und in einer Zelldichte von 0.5-0.9 x 10^6 pro ml neu ausgesät. Die adhärenten Zellen der Zellinie NIH3T3 wurde

zuerst mit PBS gewaschen, um sie von der Oberfläche der Kulturschale zu lösen für 10 min mit 1-2 ml Trypsin behandelt, in 10 ml serumhaltigen Medium aufgenommen, abzentrifugiert und in frischem Medium in einer Zelldichte von $2x10^4$ Zellen pro cm^2 ausgesät.
Für die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurde ein Gefriermedium aus 70% Medium, 20% FCS und 10% DMSO verwendet.

2.3. Transformation

2.3.1. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Transformation wurden 100 ml frisches LB Medium mit 1 ml einer Übernachtkultur angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 angezogen, 10 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml einer 0,1 M $CaCl_2$-Lösung, die 20% Glycerin enthält gelöst und 20 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 1 ml $CaCl_2$-Glycerin-Lösung gelöst, in 100 µl Portionen aliquotiert und bei –80°C gelagert.
Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 sec wurde der Ansatz zunächst 1-2 min auf Eis abgekühlt, dann mit 900 µl vorgewärmten LB-Medium aufgefüllt und nach Inkubation bei 37°C (45-60 min ohne Schütteln) in Aliquots auf Selektiv-Nährböden ausplattiert.

2.4. Transfektion

2.4.1. Transiente Transfektion durch Lipofektion

Negativ geladene DNA-Moleküle binden durch elektrostatische Wechselwirkung an kationische Lipide. Es bildet sich ein DNA-Liposomen-Komplex, welcher mit der ähnlich aufgebauten Zellmembran fusioniert, die DNA gelangt so ins Zellinnere und schließlich in den Zellkern, wo sie exprimiert wird.

Für die transiente Transfektion von NIH3T3 Zellen wurde das ‚Lipofectamine™ Transfection Reagent' (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Dazu wurden am Vortag die Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion 50-80% konfluent waren.
Für die Transfektion wurden zwei Lösungen hergestellt: Zur Herstellung von Lösung A (für Transfektionen von Zellen in ‚24er wells') wurden 0.2-0.4 µg DNA in 25 µl serumfreien DMEM durch vorsichtiges Mischen gelöst. Zur Herstellung von Lösung B wurde 0.5-5 µl Lipofectamine™ in 25 µl serumfreien DMEM durch vorsichtiges Mischen gelöst. Lösung A und Lösung B wurden vermischt und für 15 – 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 0,2 ml serumfreiem Medium ersetzt. Zu dem Gemisch aus Lösung A und B wurden 0,15 ml serumfreies Medium hinzugefügt, vorsichtig vermischt und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach Zugabe der Transfektionslösungen bei 37°C in einem CO_2-Inkubator für 2-24 Stunden inkubiert. Danach wurde den Zellen 0,4 ml Medium mit doppeltem Serumgehalt als normal zugesetzt.

2.4.2. Transiente Transfektion durch Elektroporation

Bei der Elektroporation von eukaryontischen Zellen wird durch einen elektrischen Impuls die Zellmembran kurzfristig permeabel und DNA kann vom umgebenden Medium in die Zelle gelangen. Für die Transfektion von Lymphomzellen im Rahmen dieser Arbeit wurde die ‚Nucleofector' Technologie (AMAXA, Köln) verwendet. Diese Technologie ist eine hocheffiziente nicht-virale Transfektionsmethode die auf zwei Komponenten basiert: den speziellen vorprogrammierten elektrischen Parametern des Elektroporationsgerätes ‚Nucleofector' (AMAXA) und dem ‚Nucleofector Kit' (AMAXA), der Zelltyp-spezifische Lösungen für die Elektroporation enthält. Zur Vorbereitung für die Transfektion wurden die Zellen am Vortag so ausgesät, dass sie sich zum Zeitpunkt der Elektroporation in ihrer logarithmischen Wachstumsphase befanden. Zur Transfektion wurden 2-5 x 10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden bei 200 x g zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Transfektionspuffer aufgenommen, in die Elektroporationsküvetten überführt und einem elektrischen Puls ausgesetzt. Sofort nach Elektroporation wurde den Zellen 500 µl vorgewärmtes serumhaltiges Medium hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen samt Medium in mit 1,5 ml vorgewärmten serumhaltigen Medium gefüllte ‚12-well' Zellkulturschalen gegeben und bei 37°C im CO_2-Inkubator inkubiert. Für jede Zellinie

mussten, sofern die optimalen Bedingungen hinsichtlich Puffer und elektrische Parameter noch nicht bekannt waren, diese anhand des ‚Optimization protocols' ausgetestet werden. Dazu wurde der Kontrollvektor pmaxGFP, der für das aus Potellira sp. isolierte grün fluoreszierende Protein (GFP) codiert, transfiziert und die Effizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.5. Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1. Behandlung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden zur Inaktivierung von Nukleasen autoklaviert (20min, 121°C). Nicht hitzestabile Geräte wurden mit 70% (v/v) Alkohol abgewischt bzw. gespült und anschließend getrocknet; hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.5.2. Arbeiten mit DNA

2.5.2.1. Reinigung von DNA

2.5.2.1.1. Reinigung mittels ‚PCR_{96} Cleanup Plates'

Die zur Arrayherstellung amplifizierten cDNA-Abschnitte wurden mittels der ‚PCR_{96} Cleanup Plates' (MILLIPORE, Schwalbach) aufgereinigt. Mittels dieser Platten können PCR-Produkte mit einer Länge größer 300 bp aufgereinigt werden. Die PCR-Produkte wurden in spezielle 96-well-Filterplatten pipettiert, diese auf die zugehörige Vakuum-Station (MILLIPORE) platziert und der Flüssigkeits-Überstand durch die Filterplatten abgesaugt. Anschließend wurden die gereinigten PCR-Produkte durch auf- und abpipettieren mit 100 µl DNase-freiem H_2O wieder von den Platten-Membranen gelöst.

2.5.2.1.2. Reinigung mittels ‚Nucleotide Removal Kit'

Der ‚Nucleotide Removal Kit' (QIAGEN GmbH, Hilden) ist geeignet für die Aufreinigung von Oligonukleotiden und DNA bis zu 10kb. Die zu reinigende DNA wurde nach Anweisungen des Herstellers gereinigt. Dazu wurde sie mit 200 µl Puffer PN versetzt, auf die Säule gegeben und bei 6000 rpm 1 min lang zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule 2x mit 500 µl Puffer PE gewaschen (6000 rpm, 1 min) und in 50 µl Puffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8,5) eluiert.

2.5.2.2. Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration in Lösungen wurde photometrisch in einem Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Die Messung erfolgte in UV-durchlässigen Einmalküvetten (UV-Küvette mikro, Brand, Wertheim) bei 260 nm. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ µl.
Bei geringen DNA-Mengen wurde die Konzentration im Agarosegel anhand von Bandenintensitäten im Vergleich mit einem kommerziellen Marker (SmartLadder, Eurogentec, Köln) mit distinkten Banden bekannter Konzentration abgeschätzt.

2.5.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über eine horizontale Gelelektrophorese. Abhängig von den erwarteten Fragment-Größen variierte die Agarose-Konzentration zwischen 1-2% (w/v). Für das Gel wurde die Agarose durch Aufkochen in 1 x TAE-Puffer gelöst, zur Anfärbung der Nukleinsäuren Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5µg/ml zugegeben und in die Gel-Vorrichtungen gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen zur Beschwerung mit 1/5 Vol. Ladepuffer versetzt und nach Abkühlung des Gels in die Taschen dessen pipettiert. Als Größenmarker diente ein SmartLadder (Eurogentec, Köln). Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE- Puffer verwendet. Zur Größen-Auftrennung wurde eine konstante Spannung von 80-120V angelegt. Nukleinsäuren konnten anschließend durch interkaliertes Ethidiumbromid mittels UV-Licht

(302nm) sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte durch Fotografie des Gels bei UV-Licht mit einer Polaroidkamera (Bachhofer, Reutlingen).

50 x TAE-Puffer		
Na_2EDTA	50	mM
Tris	2	M
100% Acetat	5,7	% (v/v)

Ladepuffer		
50 x TAE-Puffer	4	% (v/v)
Gycerin	25	% (v/v)
SDS	5	% (v/v)

2.5.2.4. Plasmid -Präparation aus *E. coli*

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus 2 ml Übernachtkulturen von *E.coli* wurden Puffer und Plasmid-Mini-Säulen von QIAGEN (Plasmid Mini Kit, QIAGEN GmbH, Hilden), für die Isolierung aus 250 ml Übernachtkulturen wurde der Plasmid Maxi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.2.5. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

PCR-Reaktionen von 50-100µl wurden in 0,5µl Reaktionsgefäßen in einem Thermocyler (Biozym, Oldendorf) durchgeführt. Grundsätzlich enthielten PCR-Ansätze folgende Komponenten:

DNA	20-500	ng
‚Primer'	je 5-50	pmol
dNTP-Gemisch (je 1 mM)	1	µl
Taq-DNA-Polymerase (Roche)	1	U
10 x Reaktionspuffer (Roche)	5	µl
H_2O	ad 50	µl

Die Denaturierung der DNA und Aktivierung der durch Hitze aktivierbaren Taq-Polymerase erfolgte im ersten Zyklus bei 95°C für 8 min, danach jeweils bei 95°C für 30 sec. Die Anlagerungstemperatur wurde ausgehend von der errechneten Schmelztemperatur der ‚Primer' empirisch optimiert, im ‚Touchdown'-Programm erfolgte dann in jedem Zyklus eine Minimierung der Schmelztemperatur um 0,2°C. Die Kettenverlängerung erfolgte jeweils bei 72°C für 30 sec. Nach Abschluß von 30-35 Temperaturzyklen wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (s. 2.3.2.3.). Bei der Durchführung von PCRs zur Gewinnung der cDNA-Abschnitte zur Arrayherstellung wurden diese in 96 ‚well' Platten durchgeführt und als ‚Template' 1 µl Bakteriensuspension eingesetzt. Die in dieser Arbeit für die PCRs verwendeten ‚Primer' sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6 Verwendete Primer für PCR

Name	**Sequenz**
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGG-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'
M13for	5'-CCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
M13rev	5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'

2.5.2.6. Quantitative Real time PCR Analyse

Im Gegensatz zu der herkömmlichen PCR erlaubt die 'Real time PCR' eine quantitative Bestimmung von DNA-Sequenzen in einer Probe. Daher wird sie für den quantitativen Nachweis von mRNA-Produkten und somit zur Validierung der Expression einzelner Gene in verschiedenen Zellproben verwendet. Die mRNA musste dazu zunächst einer cDNA-Synthese unterzogen werden, um als Template für die Amplifikation dienen zu können.
Das Prinzip der Quantifizierung besteht darin, dass nicht die absolute Menge an PCR-Produkt am Endpunkt der PCR gemessen wird, sondern die Kinetik der PCR-Reaktion ausgewertet wird, indem die Zunahme der Produkte zu Beginn der exponentiellen Phase beobachtet und

verglichen wird. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte gibt es verschiedene Methoden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SYBR® Green-Methode unter Verwendung des SYBR® Green PCR Master Mix' (Applied Biosystems) eingesetzt. Da mit dieser Methode nur die relativen Mengen der DNA-Produkte verschiedener Proben verglichen werden konnten, wurden für die Normalisierung Primer für die „Haushaltsgene" XS13- (ribosomales Protein, große Untereinheit; Accession-Nr:BC001127) und CyclophilinA (Accession-Nr:BC018843) eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden mittels der Software ‚Primer Express 1.0' (Applied Biosystems, Foster City, USA) so ausgewählt, dass alle Amplicons eine ähnliche Länge besaßen. Die Detektion wurde mittels des ABI PRISM 7700 Detektions System (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Für alle Produkte wurde der Zeitpunkt bestimmt, bei dem der Eintritt in die logarithmische Phase der Produktbildung stattfand (‚C_T-Wert'). Für den Vergleich eines Gens in zwei Proben wurden die Differenzen der ‚C_T-Werte' zwischen den Haushaltsgen-‚Amplicons' und dem jeweiligen zu untersuchenden Gen des Interesses bestimmt. Der Differenzwert wurde in Potenz zur Basis 2 gesetzt, so dass der Kehrwert dieses Werts der relativen Expression der zu untersuchenden mRNA gegenüber dem Haushaltsgen in der Probe entsprach. Daher konnten die Kehrwerte verschiedener Proben direkt miteinander verglichen und die x-fache Expression eines Gens zwischen zwei Proben ermittelt werden. Da sich der Fluoreszenzfarbstoff auch in unspezifische ‚Primer-Dimere' einlagern kann, wurden zusätzlich zu den Proben jeweils Kontrollen ohne ‚Template' untersucht, um auszuschließen, dass ‚C_T-Werte' durch Hintergrundfluoreszenzen basierend auf ‚Primer'-Dimeren verfälscht wurden.

Für den Einsatz in der Real-time PCR wurde für ein jeweiliges ‚Primer'-Paar ein ‚Primer-Mix' mit einer Endkonzentration von 300 nM für jeden Primer vorbereitet.

Die Ansätze für die Real-time PCR unter Verwendung des ‚SYBR® Green PCR Master Mix' (Applied Biosystems) enthielt folgende Komponenten.

'Mastermix'	25	µl
‚Primer-Mix'	5	µl
cDNA	0,25	µl
H_2O	ad 50	µl

Für jedes 'Primer'-Paar wurden Doppelansätze pipettiert. Die Real-time PCR wurde in ‚Thermo-Fast 96 well detection' Platten (Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach) durchgeführt.

Die Durchführung der quantitativen PCR erfolgte im ABI PRISM 7700 Detektions System (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach folgendem Programm:

2 min	50°C	
10 min	95°C	
15 s	95°C	40 x
1 min	60°	

Tab. 7 Verwendete Primer für Real-time PCR

Name	**Sequenz**
XS13 for	5'-GTCGGAGGAGTCGGACGAG -3'
XS13 rev	5'-GCCTTTATTTCCTTGTTTTGCAAA -3'
Cyclo for	5'-CCCTCCACCCATTTGCT-3'
Cyclo rev	5'-CAATCCAGCTAGGCATGGGA-3'
COL3A1 for	5'-TTGCATTCAGAACATAAATGCACA-3'
COL3A1 rev	5'-AAAGCAGCCCCATAATTTGGTT-3'
SGK for	5'-TTTATGGACCAATGCCCCAG-3'
SGK rev	5'-ACAATGAAAAACACCAACGGCT-3'
CXCR4 for	5'-AAGCTAGAAATGATCCCCAGCTG-3'
CXCR4 rev	5'-GGGCTTTGGTTATAAGTGCCATC-3'
CTSL for	5'-GTGAGCTGGTGGACGGTGAT-3'
CTSL rev	5'-AGTGTGTATCCGACACAGCGG-3'
PLAU for	5'-CCCCACGTGACAGTGCCT-3'
PLAU rev	5'-AGGCTAAAAGGAAGGGATAACTGG-3'
FN1 for	5'-AGCCAACCAAGATGCAAATGTT-3'
FN1 rev	5'-CCTACAGTATTGCGGGCCAG-3'

CTSB for	5'-GGAGTTGTTTCTGACCCACTGATC-3'
CTSB rev	5'-TGTTAACTTGACAGGGTGAAGCTG-3'
CUTL1 for	5´-CCAAGCTGCGGGAGAATTC-3'
CUTL1 rev	5'-CAGCCTGGCCTTTGAGTTTTT-3'

2.5.3. Arbeiten mit RNA

2.5.3.1. RNA-Extraktion aus eukaryontischen Zellen

2.5.3.1.1. RNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform und anschließender Fällung

Die RNA-Extraktion mittels peqGOLD TriFast™ (PEQLAB, Erlangen) basiert auf einer Einschritt-Flüssigphasen-Separation. Zur Extraktion wurden 50-100mg Probe mit 1 ml peqGOLD TriFast™ versetzt und homogenisiert. Zur Phasentrennung wurde das Homogenisat mit 0.2 ml Chloroform versetzt, 15 sec lang mittels Vortexer durchmischt und bei RT 10 min lang stehengelassen. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert, die oberste Phase in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und 0.5 ml Isopropanol hinzugesetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurden die Proben für 10 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde durch wiederholte Zugabe von 1 ml 75%igem kaltem Ethanol und anschließender Zentrifugation von 10 min bei 12000 x g und 4°C gewaschen. Anschließend wurde das Pellet durch Anlegen eines leichten Vakuums getrocknet und in 10 µl mit DEPC versetztem H_2O gelöst.

2.5.3.1.2. RNA-Isolation über Silica-Gel Membranen

Zur RNA-Isolierung unter Verwendung RNA-bindender Silica-Gel Membranen wurde der Rneasy® Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

2.5.3.2. RT-PCR

Für die Qualitätskontrolle von RNA-Proben wurde im Rahmen dieser Arbeit der ‚OneStep RT-PCR Kit' (QIAGEN, Hilden) verwendet. Dieser ‚Kit' enthält optimierte Komponenten die sowohl eine reverse Transkription als auch eine PCR Amplifikation im gleichen Gefäß und ohne Zwischenschritt erlauben.
Der RT-PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

RNA	<= 2	µg
Q-Solution	10	µl
5x Puffer	10	µl
dNTP Mix	2	µl
'Primer'	je 30	pmol
RT-PCR Enzym Mix	2	µl
Rnasin (Promega, Mannheim)	1	µl
H_2O (RNase-frei)	ad 50	µl

Die Reaktion wurde bei folgendem Programm in der PCR-Maschine durchgeführt:

30 min	50°C	
15 min	94°C	
30 sec	94°C	23 x
1 min	56°C	
1 min	72°C	
10 min	72°C	

2.6. Spezielle Techniken zur Durchführung von Expressionsprofilanalysen

2.6.1. Laser Mikrodissektion

Die Verbindung von Laser-Mikrodissektion mit der Technologie des Laser-Katapults erlaubt es, kleinste Elemente aus einem Gewebeschnitt oder auch vollständige, lebende Zellen völlig berührungslos und damit kontaminationsfrei zu gewinnen. Die dabei eingesetzten Technologien erlauben den Transport des Zielmaterials nur mit Hilfe von Licht.

Das im Rahmen dieser Arbeit zur Mikrodissektion verwendete ‚PALM® MicroBeam System' (PALM Microlaser Technologies, Bernried, Germany) besteht aus einem Forschungsmikroskop mit eingekoppeltem Laser, angeschlossenem Computer und Kamera. Die Kamera überträgt die Bilder in Echtzeit an den Computer. Über die speziell für die Mikrodissektion entwickelte Systemsoftware ‚PALM® RoboSoftware' (PALM Microlaser Technologies, Bernried, Germany) werden die gewünschten Zellen oder Areale markiert und die Lasereinstellungen sowie die Bewegung des Motortisches gesteuert. Der Laserstrahl wird von unten durch die Mikroskopobjektive auf den Gewebeschnitt fokussiert und zum Schneiden und/oder Katapultieren der Zellen eingesetzt. Die Zellen werden durch einen gezielten Laserpuls kontaktlos in ein Auffanggefäß transportiert und können dann, nach Zugabe der für die nachfolgenden Analyseschritte benötigten Reagenzien, weiterbearbeitet werden.

Als Vorbereitung zur Mikrodissektion wurden die zu untersuchenden Gewebe als serielle 6µm dicke Schnitte von Gefrierblöcken auf Objektträger geschnitten. Die Schnitte wurden mit Haematoxilin/Eosin (H&E) gefärbt und die Areale mit hohen Prozentzahlen der gewünschten Zellen mittels Mikroskop ausgewählt. Alle durchgeführten Manipulationsschritte ließen sich mit der mitgelieferten Software einzeln dokumentieren. Das herauskatapultierte Material gelangte in den in einer speziellen Vorrichtung eingespannten Deckel eines 500 µl Eppendorfgefäßes. Der Deckel wurde zuvor mit Mineralöl beschichtet, damit die ausgeschnittenen Gewebeteile darin haften bleiben. Um die mikrodissektierten Gewebe aufzubewahren wurde der Deckel auf ein vorbereitetes Eppendorfgefäß gesteckt, das zuvor mit 100 µl RLT Puffer (Qiagen, Hilden, Germany) (zusätzlich 1/100 β-Mercaptoethanol) gefüllt worden war und das Gewebefragment durch Inversion des Gefäßes in Puffer aufgenommen.

2.6.2. Lineare Amplifikation und cDNA-Synthese

Die aus mikrodissektierten Gewebe geringen Mengen isolierter RNA wurden durch lineare Amplifikation vervielfältigt. Dazu wurde in einer Reversen Transkription mit ‚oligo(dT) Primern', die einen T7 Promoter tragen, zunächst der zur RNA komplementäre ‚copy DNA' (cDNA)-Strang synthetisiert. Anschließend wurde mit einer T7 RNA Polymerase durch in vitro' Transkription die jeweilige ‚antisense' RNA (aRNA) hergestellt. Am Ende der Reaktion entstanden aus jeder ursprünglichen mRNA einer Probe 100 bis 1000 Kopien. Durch diese Methode bleiben die Relationen der mRNA-Moleküle zueinander in einer Probe bestehen. Die lineare Amplifikation wurde mittels des MessageAmp^{TM} aRNA Kit (Ambion, Texas, USA) durchgeführt. Zur Herstellung von cDNA für die Real-Time-PCR-Analysen wurde mittels im Kit enthaltener ‚random Decamers' durch reverse Transkription zunächst einzelsträngige ‚sense' cDNA und darauf folgend unter Verwendung der ‚oligo(dT) Primer' doppelsträngige ‚sense' cDNA synthetisiert. An dieser Stelle wurde die zweite Runde beendet und die cDNA aufgereinigt.

2.6.3. Radioaktive Markierung der amplifizierten RNA und Hybridisierung der Arrays

Die radioaktive Markierung wurde unter Verwendung von [α-^{32}P]dATP mittels des Strip-EZ^{TM} RT Kit (Ambion, Texas, USA) durchgeführt, der modifizierte Nukleotide für die Reaktion verwendet, welche bei Bedarf durch spezielle Reagenzien gespalten und die Sonden-Spaltprodukte so einfacher wieder von den Membranen entfernt werden können. Für eine bessere Hybridisierung der Sonden wurde nach der radioaktiven Markierung durch Zugabe von 1 µl RnaseH für 30 min bei 37°C ein RNA-Verdau durchgeführt. Um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide zu entfernen, wurden die Proben anschließend mit dem QIAquick® Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Vor der Zugabe zu den Membranen wurden die markierten Proben mit einem „Kompetitionsmix" versehen, um repetitive Sequenzen auf den zu hybridisierenden cDNA-Molekülen zu maskieren und dadurch eine höhere Bindungsspezifität zu erreichen.

Komponenten des „Kompetitionsmix“:

20 x SSC	50	µl
10 mM Tris/HCl pH 8,0	70	µl
Human Cot I-DNA (1 mg/ml)	45	µl
1 % SDS	20	µl

20 x SSC:

NaCl	3	M
Natriumcitrat	300	mM
pH	7,0	

Die Proben wurden schließlich zu den im ‚ULTRArray’ Hybridisierungspuffer (Ambion, Texas, USA) 1-4 h vorhybridisierten Arrays gegeben und 14-16 h über Nacht bei 50 °C hybridisiert. Am folgenden Tag wurden die Arrays gewaschen und zur Erfassung der Signale ein Storage Phosphor Screen (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) für 5 Tage aufgelegt.

Waschen der Filter:

2 x 5 min bei RT in 2x SSC, 0,5% SDS

2 x 15 min bei 68°C in 0,5 x SSC, 0,5 % SDS

Das Entfernen der hybridisierten Sonden durch Degradation wurde mittels der Reagenzien und des Protokolls des Stip-EZTM RT Kits (Ambion, Texas, USA) durchgeführt.

2.6.4. Herstellung von DNA-Microarrays (‚Spotten’)

Jeweils 50-60 µl der PCR-Produkte wurden in 384-well Platten (NUNC, Wiesbaden) übertragen. Als inerten Träger der PCR-Produkte wurden Nylon-Membranen verwendet. Vor dem Auftragen durch einen Roboter (BioGridder, Biorobotics, UK) wurden die Nylon-Membranen zusammen mit jeweils drei in der Größe 7,2 X 11,2 cm zugeschnittenen Whatman-Papieren in Denaturierungspuffer befeuchtet. Die Membran wurde luftblasenfrei auf die Whatman-Papiere in die für das ‚Spotten’ benötigte Metallplatte gelegt. Das ‚Spotten’

erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Nach dem ‚Spotting'-Vorgang wurden die Membranen für 10 min auf mit Neutralisierungspuffer leicht angefeuchtete Whatman-Papiere gelegt. Dabei wurde beachtet, dass die Puffer nicht direkt auf die Oberfläche der Membranen gelangte. Anschließend wurden die Membranen über Nacht auf Whatman-Papieren getrocknet, für 2 h bei 80°C gebacken und bei 250 Joule/sec im UV-CrossLinker bestrahlt.

Dentaturierungspuffer:

NaCl (5 M)		300	ml
NaOH		20	g
H_2O	ad	5	l

Neutralisierungspuffer:

NaCl (5 M)		300	ml
Tris-HCL (2 M; pH 7,5)		250	ml
EDTA (0,5 M)		2	ml
H_2O	ad	5	l

2.7. Methoden im Umgang mit Proteinen

2.7.1. Isolierung von Gesamt-Protein aus Zell-Linien

Suspensionszellen wurden bei 200 x g für 5 min bei 4°C sedimentiert und das Pellet mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in einem entsprechendem Volumen 1 x RIPA lysiert. Die Zellen wurden 10 mal durch eine Kanüle (0,5 X 25 mm) gezogen und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 10000 x g wurden die Zelltrümmer entfernt.

1 x PBS:

NaCl	140	mM
KCl	3	mM
Na_2HPO_4	10	mM
KH_2PO_4	2	mM

=> pH 7,4 mit HCl

1 x RIPA:		
Tris/HCl pH 7,5	50	mM
NaCl	150	mM
$MgCl_2$	20	mM
Nonidet P-40 (NP-40) (v/v)	0,5	%

2.7.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Rohlysaten wurde unter Verwendung des ‚Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate' (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) durchgeführt. Zur Bestimmung einer Standardkurve wurde aus Rinderserum-Albumin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) eine Standardreihe mit den Proteinkonzentrationen von 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 µg/µl hergestellt. Sowohl die jeweilige Menge eingesetzten Proteins für die Standardreihe, als auch die zu messenden Proteinproben wurden mit H_2O auf 400 µl aufgefüllt, mit 100 µl ‚Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate' versetzt und 10 min inkubiert. Die Proteinkonzentrationen wurde photometrisch in dem ‚Eppendorf Biophotometer' (Eppendorf AG, Hamburg) bei 595 nm nach Messung der Standardreihe bestimmt.

2.7.3. ‚Western Blots'

2.7.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung denaturierter Proteine dienten diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele (Laemmli, 1970), die zu ca ¼ ihrer Länge aus einem 5 %igen Sammelgel und zu ¾ aus einem 7,5 %igen Trenngel bestanden.
Zunächst wurden die Komponenten des Trenngels (s. unten) gemischt, in die nach Herstelleranweisung vorbereitete Gelgießeinheit (Bio-Rad Laboratories, Hamburg) gegossen und zur Erzeugung einer geraden Abschlusskante mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, die frisch angesetzte Sammelgellösung zugegeben und der Kamm eingesetzt.

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben vor dem Auftragen mit 5 x Lämmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese in 1 x Laufpuffer erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel für 30-60 min; als Größenmarker diente der ‚Prestained Broad Range'-Standard von Bio-Rad (Hamburg).

Trenngel (7,5 %)

Acrylamid-Fertiglösung (Sigma, München)	1	ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3	ml
10 % SDS	50	µl
10 % APS	25	µl
TEMED	2,5	µl
H_2O	5	ml

Sammelgel (5 %)

Acrylamid-Fertiglösung (Sigma, München)	140	µl
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	325	µl
10 % SDS	12,5	µl
10 % APS	6,25	µl
TEMED	1,25	µl
H_2O ad	1,285	ml

5 x Lämmli-Puffer

Tris-HCl (pH 6,8)	225	mM
Glycerin (v/v)	50	%
SDS (w/v)	5	%
Bromphenolblau (w/v)	0,02	%
DTT	100	mM

1 x SDS-Laufpuffer

SDS (w/v)	0,1	%
Tris	25	mM
Glycin	200	mM

2.7.3.2. Protein-Transfer auf Nitrocellulose-Membranen

Die Proteine wurden mittels Nass-Transfer mit dem Tank-Blotter „Criterion“ (Bio-Rad Laboratories, Hamburg) von Polyacrylamid-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Dassel) transferiert. Dazu wurden Gel und Membran in „Towbins“-Puffer für 30 min äquilibriert, der anschließend auch für den Nass-Transfer benutzt wurde. Das Gel und die Membran wurden zwischen ebenfalls in „Towbins“-Puffer getränktes Whatman 3 MM Chromatographiepapier (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) geschichtet und bei 400 mA und 4°C über Nacht transferiert.

Towbins-Puffer			
5 x Salt		200	ml
Methanol		200	ml
20 % SDS (w/v)		500	µl
H_2O	ad	1	l

5 x Salt:			
Tris		250	mM
Glycin		2	M
H_2O	ad	1	l

2.7.3.3. Immunologische Detektion

Die Membranen wurden für 1h in Blockingpuffer bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h bei RT mit dem Antikörper gegen CUTL1 (antigen: GST-hCUTL1 nt 2551-3451, {Michl, Ramjaun, et al. 2005 70 /id}), verdünnt in Blockingpuffer (1:1000). Die Membranen wurden 3 x für 5 min mit 1 x TBST-Puffer gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit ‚Horse Radish Peroxidase’ (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper Anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences, Freiburg) in der Verdünnung 1:10000 (in Blockingpuffer) inkubiert. Die Membranen wurden anschließend wieder 3 mal mit 1 x TBST-Puffer für 5 min gewaschen und für 5 min in der Chemilumineszenz-Substrat-Lösung „Lumi-Light Western Blotting Substrate“ (Roche Diagnostics, Mannheim) inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion

und Entwicklung der Chemilumineszenz-Reaktion durch die Röntgenfilme „Cronex“ (AGFA, Köln).

Blockingpuffer:		
Milchpulver (w/v)	5	%
TBST-Puffer	1	x
1 x TBST-Puffer:		
TBS-Puffer	1	x
Tween® 20 (v/v)	0,1	%
10 x TBS-Puffer:		
NaCl	1,4	M
KCl	25	mM
Tris	250	mM
=> pH 7,4 mit HCl		

2.7.4. Immunhistologie

Die immunhistologischen Färbungen an Paraffinschnitten wurden mittels des Envision™ Detektions-Systems (DakoCytomation, Hamburg) durchgeführt.

Zunächst war eine Entparaffinisierung und Rehydrierung der Schnitte erforderlich, die mit drei Schritten für je fünf Minuten in Xylol, dann zweimaligen Spülen in 96%igem Ethanol durchgeführt wurde. Zur Verhinderung einer übermäßigen Hintergrundfärbung durch unspezifische Reaktionen mit dem Farbstoff wurden die Schnitte in mit 1% H_2O_2 versetztem Methanol 20 min inkubiert, um endogene Peroxidasen werden zu inaktivieren. Nach einmaligem Spülen mit PBS wurden zum Erhalt einer hydrophoben Barriere die zu bearbeitenden Areale mit PAP Pen (Abcam, Cambridge, UK) eingekreist.

Um durch die Fixierung entstandene Maskierungen von Antigenen rückgängig zu machen ist eine für jeden Antikörper spezifisch zu ermittelnde Vorbehandlung erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben mit Pronase (1mg/ml) für 5 min behandelt, wodurch durch Fixierung entstandene Aldehydvernetzungen der Antigene proteolytisch verdaut wurden. Danach folgte eine Spülung in PBS und für 30 min die Inkubation des Primärantikörpers, der

in PBS mit 1%igem Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA) verdünnt wurde. Nach der Inkubation folgte eine Spülung mit PBS. Die jeweiligen HRP-konjugierten Sekundärantikörper wurden 1:200 in PBS verdünnt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Spülen mit PBS erfolgte eine Inkubation von 35 min mit ‚3-amino-9-ethylcarbazole containing hydrogen peroxide' (AEC) (DakoCytomation, Hamburg). Die Reaktion wurde mit Leitungswasser abgestoppt und mit Hämalaun gegengefärbt. Es folgte ein Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min. Die Schnitte wurden schließlich mit Kaisers Glycerin Gelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckelt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

2.8. Durchflusszytometrie

Zur Vorbereitung wurden die Zellen 1 x in PBS gewaschen und 10 min bei 200 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit eiskaltem 80%igen EtOH unter Vortexen tröpfchenweise gelöst und auf Eis für mindestens 30 min fixiert. Nach dieser Zeit wurden die fixierten Zellen 10 min bei 200 x g und 4°C zentrifugiert, 1 x mit PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 250 µl Puffer B gelöst und 10 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Schluß wurden 350 µl Puffer C zugegeben, für 10 min bei RT inkubiert und für die Messung in 5 ml Polystyren-Röhrchen mit Rundboden überführt. Die durchflußzytometrischen Analysen wurden mit dem FACSCalibur-Gerät (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) und der Software CellQuest™ (Becton Dickinson GmbH) durchgeführt. Das Erstellen von Histogrammen und die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen WinMDI Version 2.8 (Joseph Trotter, http://scripps.edu/) und Cylchred Version 1.0.2 (http://www.cardiff.ac.uk).

Lösung B:

Trypsininhibitor		25	mg
RNase A		5	mg
H_2O	ad	50	ml
=> pH		7,6	

Lösung C:

Propidiumjodid		25	mg
Spermintetrahydrochlorid		70	mg
H_2O	ad	50	ml
=> pH		7,6	

3. Experimente und Ergebnisse

3.1. Durchführung von Expressionsprofilanalysen der SCL, LCL und SCL+LCL

Um zu untersuchen, in wie weit die histologischen Unterschiede und Gemeinsamkeiten der niedrigmalignen extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ (SCL), der hochmalignen diffus großzelligen B-Zell-Lymphome des GI-Trakts (LCL) und der klein- und großzelligen Komponenten der so genannten sekundär hochmalignen LCL mit koexistenter kleinzelliger Komponente des extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphom Typs (SCL+LCL) sich auch auf transkriptioneller Ebene widerspiegeln, wurden Expressionsprofilanalysen durchgeführt. Dazu wurde mit selbst hergestellten cDNA-Mikroarrays aus insgesamt 2182 Genen gearbeitet. Um den Mikroarray auf Fragestellungen im Bereich normaler und maligner Lymphozyten zu optimieren wurden 451 speziell in lymphoiden Zellen exprimierte Gene ausgewählt. Die für die Untersuchung eingesetzten Lymphom-Gewebe stellen sich histomorphologisch als heterogene Gewebe dar. Die zu untersuchenden Tumorzellen liegen im Zellverband umgeben von nicht tumorösen Stroma- und Entzündungszellen. Bei der Extraktion von RNA, DNA oder Protein aus ganzen Geweben erhält man somit Material aus vielen verschiedenen Zellen. Um Material aus reinen Zellpopulationen zu gewinnen, ist eine Mikrodissektion erforderlich. Vor allem die beabsichtigte Untersuchung der klein- und großzelligen Komponenten in SCL+LCL macht die Anwendung von Mikrodissektionstechniken, mit denen man gezielt die Zellen des Interesses isolieren kann, zur wesentlichen Voraussetzung.
Die entsprechenden Gewebe wurden mikrodisseziert, daraus mRNA isoliert, linear amplifiziert, radioaktiv markiert und für die Array-Hybridisierung eingesetzt. Die entstandenen radioaktiven Signale wurden erfasst, quantifiziert und mittels spezieller Software ausgewertet.

3.1.1. Herstellung des Mikroarrays

3.1.1.1. Auswahl und Bezug der Gene

Der Mikroarray wurde aus 2182 Genen zusammengesetzt. 1731 Gene gehörten zu funktionellen Gruppen wie Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Proteasen und Phosphatasen

sowie sonstiger Proteinfamilien mit bekannter oder vermuteter Beteiligung an der Onkogenese. Die restlichen 451 Gene wurden hinsichtlich Lymphozyten-relevanter Gene ausgewählt, wie z.B. Gene für Oberflächenmarker (Cluster of differention (CD)-Marker) und Gene für Proteine die in Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen (Zytokine, Immunglobuline etc). Dazu gehörten auch Gene, für die eine mögliche Beteiligung an der Entstehung von Lymphomen beschrieben worden sind (z.B. Rel, API-MLT) sowie eine Reihe von Apoptose-und Zellzyklus-assoziierten Genen.

Jedes Gen wurde durch mindestens einen Abschnitt seiner cDNA-Sequenz auf den Arrays repräsentiert. Die 451 „Lymphom-cDNA-Abschnitte“ wurden alle von dem Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) bezogen. Von weiteren 1100 der restlichen 1731 Gene wurden ebenso jeweils repräsentative cDNA-Abschnitte vom RZPD bezogen. Jedes dieser vom RZPD bezogenen Gene, mit ‚Image Clone ID’, ‚Gene ID’ und dem in der Nomenklatur-Datenbank der Human Genome Organisation (http://www.gene.ucl.ac.uk/hugo/) aufgeführten Namen wurde in einer Liste vermerkt.

Die cDNA-Abschnitte der restlichen 631 Gene stammten aus einer lokalen cDNA-Bibliothek der Arbeitsgruppe Prof. Gress (Innere Medizin I, Universität Ulm). Darunter fallen 426 Gene, die auf Grund ihrer differentiellen Regulation in Geweben aus Patienten mit Adenokarzinomen gegenüber Kontroll-Geweben aus einer lokalen cDNA-Klon-Bibliothek („XS-Klon-Bibliothek“) selektiert worden waren (Gress, Muller-Pillasch, et al., 1996). Vorliegende Homologien zu Genen aus DNA-Datenbanken sind in den Gen-Listen vermerkt. Die restlichen 205 cDNA-Abschnitte wurden durch PCR-Reaktionen unter Verwendung von RNA aus Pankreas-Geweben (Pankreaskarzinom, Pankreatitis und gesundes Pankreas) und degenerierten Primern gegen Homeobox- oder Zinkfingerdomänen gewonnen. Diese cDNA-Abschnitte repräsentieren putative Transkriptionsfaktoren, die für die Regulation in Pankreas-Geweben eine wichtige Rolle spielen. Vorliegende Homologien zu Genen aus DNA-Datenbanken sind in den Listen vermerkt.

3.1.1.1. Array-Herstellung

Die für die Array-Herstellung benötigten cDNA-Abschnitte waren bis auf die 451 Lymphozyten-relevanten Gene in der Arbeitsgruppe Gress vorhanden. Die vom RZPD bezogenen cDNA-Abschnitte dieser „Lymphom-Gene“ waren in *E. coli*- Klonen in verschiedenen kommerziellen Vektoren enthalten und wurden in 96-well ‚Stab’-Agar-

Kulturen geliefert. Von jeder Kultur wurden jeweils drei Platten Glycerin-Stammkulturen („Stocks“) hergestellt, mit denen weiter gearbeitet wurde. Aus diesen Stocks wurden wiederum 96 well-Agarplatten beimpft und zur Sequenzierung eingeschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mittels BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) auf ihre Übereinstimmung mit den bestellten Genen hin überprüft. Bei Fällen, in denen andere Gene als bestellt geliefert wurden, wurden diese in den Listen ersetzt. Bei misslungenen Sequenzierreaktionen wurden die jeweiligen Gene als „nicht sequenzverifiziert“ markiert. Um die cDNA-Abschnitte für die Herstellung des Arrays zu erhalten wurden mit den „Bakterienstock“-Platten unter Verwendung der jeweiligen Primer (siehe Tab. 3 in Material und Methoden) eine PCR durchgeführt. Als „Template“-Quelle für die PCR-Reaktion diente ein Aliquot der den entsprechenden Vektor enthaltenden Bakteriensuspension. Da die Vorbereitung für die PCR-Reaktion verhältnismäßig lange dauert, wurde für die Reaktion eine erst durch Hitze aktivierbare Taq-Polymerase verwendet. In einem ersten Durchlauf wurden alle Platten mit einem „Touchdown“-Programm amplifiziert, das sich zu Beginn der Reaktion bei hohen Anfangstemperaturen durch eine hohe Spezifität der Primer zum „Template“ auszeichnet und im Laufe der Reaktion und mit zunehmendem Produkt bei abnehmender Temperatur durch einen hohen Wirkungsgrad in der Vervielfältigung. Die PCR-Produkte wurden dann durch Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die Banden überprüft. Fehlende Amplifikate wurden wiederholt. Bei Fällen, in denen mehr als eine Bande entstanden, wurden die jeweiligen Proben mit einem ‚Touchdown-Programm’ mit höherer Ausgangstemperatur erneut amplifiziert, um die Anreicherung von Nebenprodukten zu verhindern. Um für ein Gen genügend cDNA-Material für die weitere Bearbeitung zu erhalten, wurden in jedem Fall drei PCR-Reaktionen durchgeführt. Alle drei Reaktionen wurden vereinigt, aufgereinigt und die gereinigten Produkte für die Weiterverarbeitung zum Aufbringen auf die Nylon-Membranen in Wasser gelöst. Die Ergebnisse wurden nochmals durch Gel-Elektrophorese überprüft und dokumentiert (Abb. 3).

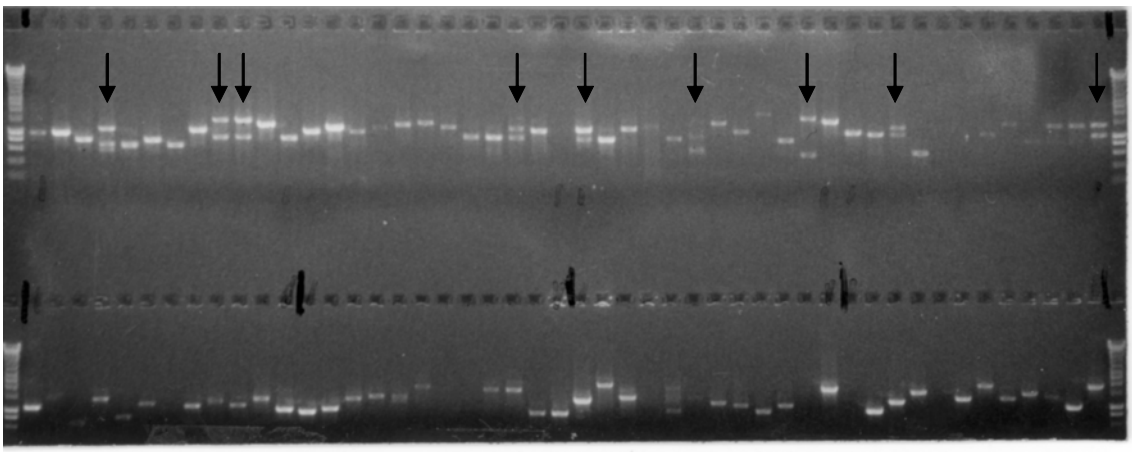


Abb. 3: (vorherige Seite)

Kontrollbild der durch „Colony"-PCR zur Array-Herstellung gewonnenen cDNA

Gezeigt ist als Beispiel eine Aufnahme von 96 elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkten. Bei den Proben mit einer oder mehreren Nebenbanden (mit Pfeilen markiert) wurde eine PCR mit höherer Ausgangstemperatur im Programm wiederholt.

Gene, deren Amplifikations-Reaktion trotz Wiederholung misslungen war, wurden nicht weiter zur Array-Herstellung verwendet und aus den Listen entfernt.

Die gereinigten PCR-Produkte wurden auf Nylon-Membranen aufgebracht („gespottet"), wobei die Gesamtzahl der 2182 Gene auf zwei Arrays (PanCanA und PanCanB) verteilt wurde. Jedes Gen wurde in Duplikaten gespottet. Das Spotting-Muster mit der Anordnung der Gene ist anhand eines Hybridisierungsergebnisses in Abbildung 4 gezeigt.

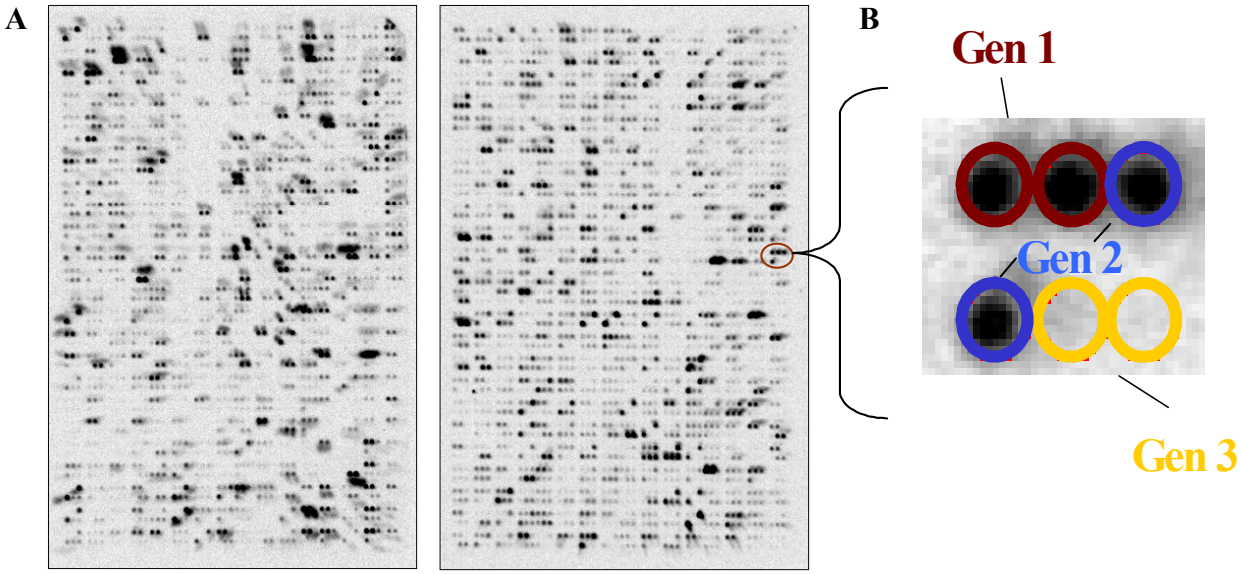


Abb. 4: Spotting-Muster der Gene auf den Arrays PanCanA und PanCanB

A) Gezeigt ist das Spotting-Muster der Gene auf den Filtern PanCanB (links) und PanCan A (rechts) anhand einer detektierten Hybridisierung. In B) ist einer der gespotteten Blöcke herausgestellt und zeigt die Anordnung der Gen-Duplikate innerhalb der Sechser-Blöcke.

3.1.2. Aufbereitung der Gewebe-Proben zur Hybridisierung

3.1.2.1. Laser Mikrodissektion und Optimierung der RNA-Ausbeute

Um eine hohe Anreicherung der zu untersuchenden Tumorzellen in den Proben zu gewährleisten, wurden diese durch Laser Mikrodissektion gewonnen. Der verwendete UV-Laser arbeitet nach dem Prinzip der Kaltablation, das heißt, die Zellen werden keinem thermischen Streß ausgesetzt, wenn sie aus einem Gewebeschnitt heraus in den Deckel eines Standard-Zentrifugenröhrchen katapultiert werden (P.A.L.M. „Laser Pressure Catapulting LPC“ – Technologie, Martinsried, Deutschland). Zum Herauskatapultieren der Gewebeteile bietet das PALM MicroBeam System zwei verschiedene Möglichkeiten: Das “Ausstanzen” der Gewebeareale von dem Objektträger herunter oder das Arbeiten mit einer zwischen Objektträger und Gewebe eingefügten inerten Folie, die es erlaubt, einen zuvor per Laser umrandeten Bereich in einem Stück herauszukatapultieren (Abb. 5).

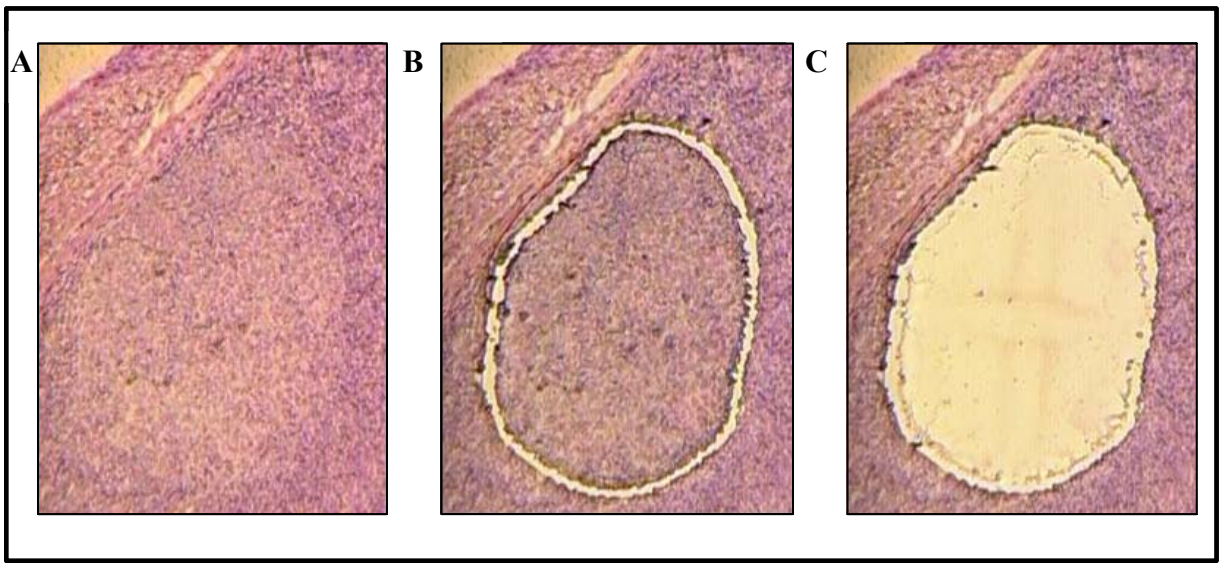


Abb. 5: Aufnahmen der verschiedenen Zwischenstufen einer Mikrodissektion unter Verwendung einer inerten Folie

Gezeigt ist die Mikrodissektion eines Keimzentrums A) aus einem Schnittpräparat einer Tonsillen-Biopsie. Das Keimzentrum wird per Laser umrandet B) und das Areal mittels eines Laserimpuls herauskatapultiert C).

Um die beste RNA-Qualität aus den zur Verfügung stehenden geringen Mengen an Gewebematerial zu gewinnen, wurde in Vorarbeiten die für das genetische Material der

Zellen schonenste Art der Mikrodissektionsmethode ausgetestet. Zusätzlich wurden zur Optimierung der Bedingungen verschiedene Puffer zum Aufbewahren der Proben nach der Mikrodissektion und die geeignete Methoden zur Isolation der Gesamt-RNA, wie die Fällung unter Verwendung von TriFast und die Aufreinigung mittels Silica-Gel-Membran-Säulen, miteinander verglichen. Es wurde unter verschiedenen Kombinationen der Bedingungen die Mikrodissektion durchgeführt. Dabei wurde die Mikrodissektion auf Glas und Folie bei anschließendem Aufbewahren in Trizol, RLT-Puffer und RNAlater-Puffer getestet. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde eine RT-PCR mit den Primern für das Haushaltsgen „RPLPO“ (ribosomales Protein, große Untereinheit; Accession-Nr:BC001127) durchgeführt. Die Produkte wurden anschließend durch Gel-Elektrophorese aufgetrennt und anhand der entstandenen cDNA-Menge die RNA-Qualität des Ausgangsmaterials abgeschätzt. Bei der Anwendung der Folien-Methode des PALM MicroBeam Systems unter Verwendung von RLT-Puffer zur Aufbewahrung und die Isolation über Silica-Gel-Membran-Säulen wurde die beste RNA-Qualität erreicht (Abb. 6).

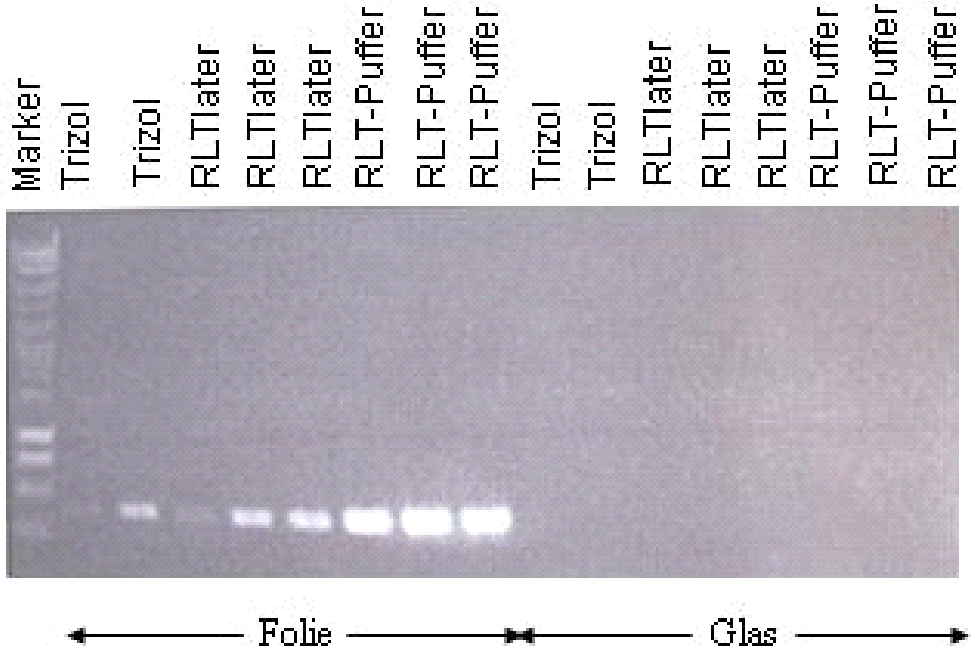


Abb. 6: Abschätzung der RNA-Qualität des Ausgangsmaterials nach Anwendung verschiedener Methoden und Puffer zur Isolation

Gezeigt ist die Aufnahme der gelelektrophoretisch aufgetrennten Produkte der RT-PCR. Mikrodissektion unter Anwendung der Folie und RLT-Puffer zur Aufbewahrung und Isolation über Silica-Gel-Membran-Säulen ergab die beste RNA-Qualität.

Für jede Probe wurden zwischen 10,000 und 30,000 Zellen mikrodisseziert. Insgesamt wurden Proben von 12 Patienten mit kleinzelligen SCL (SCL-1 bis 12), 25 Patienten mit großzelligen LCL (LCL-1 bis LCL-25) und 10 Patienten mit SCL+LCL untersucht. Aus den SCL+LCL wurden 10 Präparate großzelliger Komponenten ((SCL+LCL)-LC-1 bis –10) sowie 7 Präparate kleinzelliger Komponenten (SCL+LCL)-SC-1 bis 7) gewonnen. Für einen Großteil der Lymphom-Proben liegen sowohl Ergebnisse molekularzytogenetischer Untersuchungen als auch klinische Daten vor (Barth, Bentz, et al., 2001). In Liste 2 (Anhang) sind alle für die Auswertungen verwendeten mikrodissezierten Fälle zusammen mit allen (soweit vorhanden) zytogenetischen und klinischen Daten aufgeführt.

3.1.2.2. Lineare Amplifikation der mRNA

Für eine erfolgreiche Hybridisierung radioaktiv markierter mRNA werden erfahrungsgemäß mindestens 10 bis 20 µg Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial benötigt (M. Buchholz, persönliche Mitteilung). Die aus den mikrodissezierten Geweben (1-3x10^5 Zellen) zu erwartende Menge an isolierter Gesamt-RNA liegt dagegen lediglich zwischen 0,5 und 2 µg. Daher wurde vor der radioaktiven Markierung eine Amplifikation der isolierten mRNA durchgeführt. Da bei Expressionsprofilanalysen die Menge der in der Zelle vorkommenden verschiedenen mRNA-Spezies erfasst, verglichen und bewertet wird, ist es unbedingt erforderlich die relativen Häufigkeiten der verschiedenen mRNAs zu reproduzieren. Eine Amplifikation durch PCR kommt daher nicht in Frage, da hier die Effektivität und somit die enstehende Menge an Amplifikaten von Länge, Sequenz und Konzentration der Nukleinsäuren abhängt und die Relationen der ursprünglichen mRNA-Mengen zusätzlich durch Plateau-Effekte verzerrt werden. Daher wurde eine lineare RNA Amplifikation mittels eines kommerziellen Amplifikationskits basierend auf der Eberwine-Methode (Van Gelder, von Zastrow, et al., 1990) durchgeführt. Das Prinzip der linearen Amplifikation basiert auf einer Reversen Transkription mit ‚oligo(dT) Primern', die einen T7 Promoter tragen und einer daran anschließenden ‚*in vitro*' Transkription der resultierenden DNA mit einer T7 RNA Polymerase (Abb. 7).

Mit diesem Prinzip wurden von jeder mRNA routinemäßig 100 bis 1000 ‚antisense' RNA (aRNA) Kopien hergestellt. Die auf diese Weise vervielfältigte RNA konnte nun für eine radioaktive ‚random prime'-Markierung und Hybridisierung weiterverwendet werden.

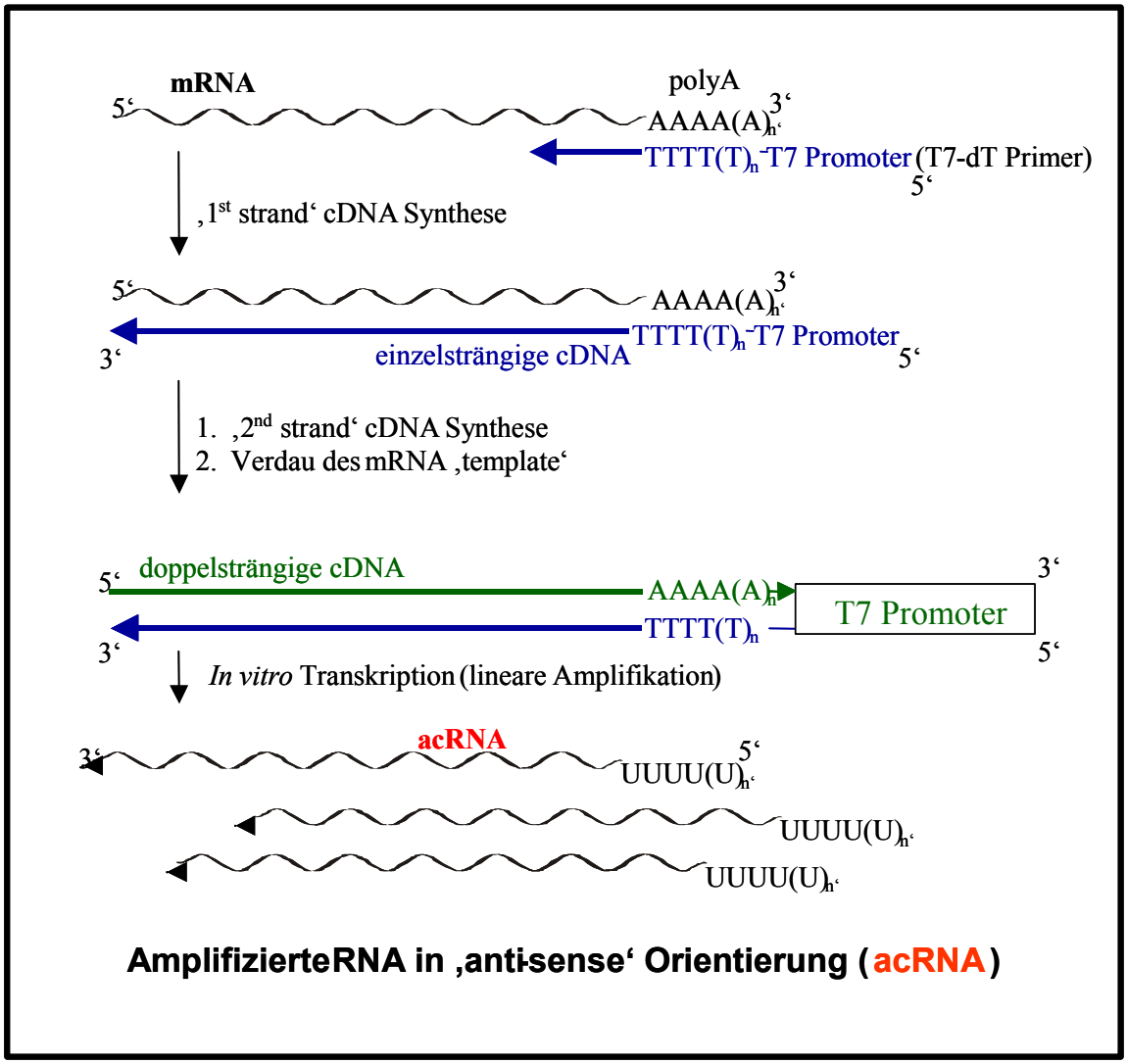


Abb. 7: Schema zur Darstellung des Prinzips der linearen Amplifikation nach der Eberwine-Methode

Gezeigt ist die erste Amplifikations-Runde. Mittels T7 Oligo(dt) ‚Primern' wurde aus Poly-A RNA durch Reverse Transkription eine einzelsträngige cDNA hergestellt. Der RNA-Strang wurde verdaut und der Zweitstrang synthetisiert. Die lineare Amplifikation fand durch eine ‚*in vitro*' Transkription statt, wodurch ‚antisense' RNA entstand.

3.1.3. Radioaktive Markierung, Hybridisierung und Quantifizierung der Hybridisierungssignale

Verlässliche Schlussfolgerungen aus Auswertungen von Expressionsprofilanalysen sind nur durch ausreichende Probenzahlen einer zu analysierenden Gruppe zu erreichen. Daher muß eine große Anzahl an Hybridisierungen der Arrays durchgeführt werden. Der hohe Aufwand und die Kosten der Arrayherstellung erforderten daher eine mehrfache Wiederverwendung der Arrays. Dazu muß die an den Array hybridisierte Probe nach der Auswertung der Signale wieder entfernt werden. Die bei herkömmlichen Methoden benutzten Lösungen zur Sondenentfernung greifen in der Regel auch die auf die Membran gespottete DNA an, was eine häufige Wiederverwendung der Arrays verhindert. Daher wurde für einen schonenderen Hybridisierungsvorgang und anschließenden Waschvorgang ein kommerziell erhältlicher Kit zur radioaktiven Markierung und Hybridisierung der amplifizierten RNA verwendet (siehe Material und Methoden). Die verwendeten Reagenzien ermöglichten die Synthese einer unter Hybridisierungs-und Waschbedingungen stabilen radioaktiven Sonde. Da beim Markieren der Sonde modifizierte Nukleotide verwendet wurden, die durch ein spezielles Reagenz im Kit gespalten wurden, konnten die kurzen und daher unstabilen Sondenfragmente spezifisch und unter milden Bedingungen nach Hybridisierung entfernt werden. Unter Verwendung des Kits wurde die amplifizierte RNA der zu untersuchenden Proben radioaktiv markiert und auf die Arrays hybridisiert. Die durch die Inkubation der radioaktiv markierten mRNA-Proben mit den DNA-Arrays erzeugten Hybridisierungssignale wurden zunächst mit Hilfe eines ‚Phosphorimager'-Systems aufgezeichnet und anschließend mit der ‚ArrayVision'-Software quantifiziert. Zur Erfassung der einzelnen Bildpunkte wurde eine Gitter-Maske (Grid) erstellt, die gleichzeitig der Erfassung der Hybridisierungssignale und der Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Genen diente. In Abbildung 8 ist ein Beispiel für die Auswertung eines Arrays mit einem „Grid" gezeigt. Die Software erfasst nur innerhalb der Kreise die Bildpunkte und quantifiziert die Signalintensität. Daher erfolgte im ersten Schritt die grobe Anpassung des idealen Musters durch manuelle Verzerrung an das reale Muster auf der Membran. Der nachfolgenden Feinanpassung des Rasters schloss sich eine visuelle Kontrolle und gegebenenfalls eine manuelle Korrektur der Position einzelner Kreise des Gitters an. Verunreinigte Spots wurden durch Wegnahme der Kreise von der Auswertung ausgeschlossen. Um den Vergleich mehrerer Experimente zu ermöglichen wurde in der Auswertung mit den normalisierten Intensitätswerten der Signale gearbeitet, die sich aus der Differenz der Signalintensität und des Hintergrunds dividiert durch den Mittelwert aller

Signale des Arrays ergab. Da zu jedem Gen zwei Werte (Doppelspots) vorlagen wurde deren Mittelwert ermittelt. Für die Auswertung wurden nur Hybridisierungen mit hohen Signalintensitäten verwendet.

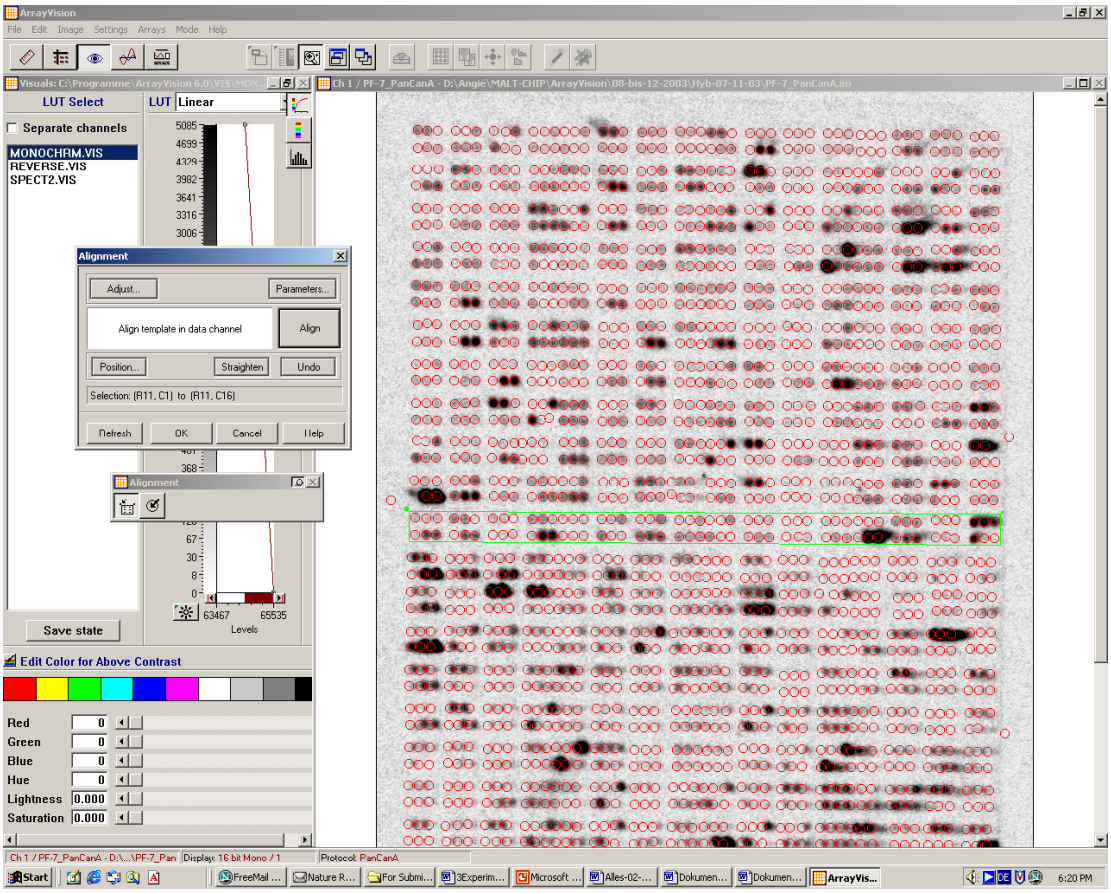


Abb. 8: Momentaufnahme des Auswerteverfahrens der radioaktiv hybridisierten Arrays mit der Software „ArrayVision“

Dargestellt ist die Momentaufnahme einer Auswertung der erfassten Hybridisierungs-signale eines Arrays. Der größte Teil des Arrays ist sichtbar. Über die einzelnen cDNA-Spots wurde eine Gitter-Maske (rot) gelegt. Die grün umrandete Reihe stellt die im Augenblick bearbeiteten Spots dar, an deren Positionen die Kreise der Maske angeglichen oder Gitter-Kreise bei Verschmutzungen aus der Auswertung herausge-nommen werden müssen.

3.1.4. Auswertung der Hybridisierungsdaten

3.1.4.1. Ermittlung differentiell exprimierter Gene durch T-Test und deren Verifizierung

Um zu untersuchen, welche genetischen Regulationsvorgänge den histologischen und/oder klinischen Unterschieden zwischen den einzelnen Lymphom-Subtypen zugrunde liegen, wurden differentiell exprimierte Gene zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen bestimmt. Zur Ermittlung von differentiell exprimierten Genen zwischen zwei Gruppen wurde ein zweiseitiger T-Test durchgeführt. Um einen ersten Überblick über die Homogenität der Expressionsstärke der Gene innerhalb einer Gruppe zu erlangen, wurde für jedes Gen die Standardabweichung vom jeweiligen Mittelwert ermittelt. In niedrigen Intensitätsbereichen sind technische Schwankungen von realen Expressionsschwankungen nicht eindeutig zu unterscheiden. Daher besteht die Gefahr, dass ein Gen falsch positiv zwischen zwei Gruppen als differentiell exprimiert selektiert wird. Um diese Gefahr zu minimieren wurde eine Auswahl der Gene getroffen, die mindestens in einer der beiden Gruppen mit einem normalisierten Mittelwert größer als 0,5 vertreten waren. Weitere Kriterien zur Festlegung eines Gens als differentiell exprimiert waren ein mindestens zweifacher Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten der Gene und ein p-Wert des T-Tests kleiner oder gleich 0,05. In dieser Arbeit wurden auf diese Weise zwischen den Gruppen SCL und LCL 86 Gene (Liste 3 im Anhang) als differentiell exprimiert identifiziert, zwischen den beiden Gruppen der groß- und kleinzelligen Komponenten aus SCL+LCL 67 Gene (Liste 4 im Anhang). 23 Gene waren sowohl zwischen SCL und LCL, als auch zwischen den groß- und kleinzelligen Komponenten aus SCL+LCL differentiell exprimiert (Abb. 9).

21 der Gene sind jeweils in den großzelligen Lymphomen hochreguliert, die restlichen 2 Gene sind herunterreguliert. Die Gene können in drei Gen-Gruppen eingeteilt werden: 1) Gene, die in der Modulation der extrazellulären Matrix eine Rolle spielen; 2) Gene, die in der Proliferationssteigerung eine Rolle spielen und 3) in Metabolismus involvierte Gene. Eine Liste der gemeinsam regulierten Gene ist in Tabelle 8 aufgeführt.

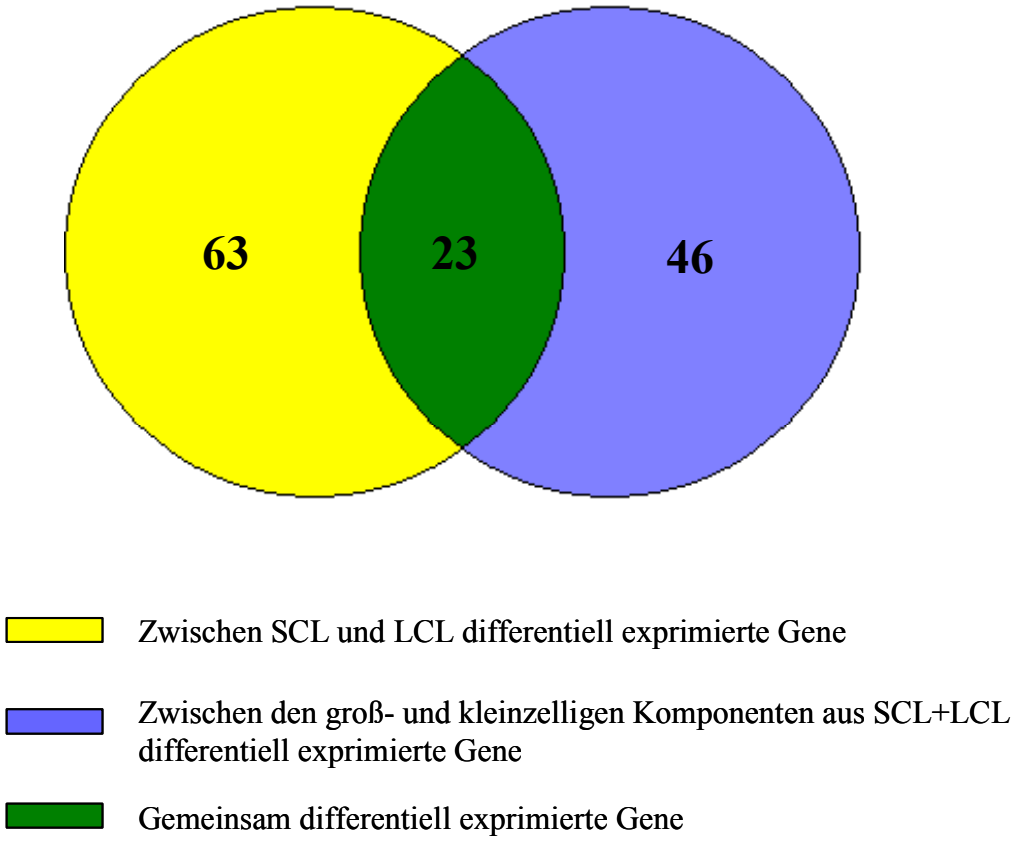


Abb. 9: Anzahl der differentiell exprimierten Gene zwischen SCL und LCL und zwischen der klein- und großzelligen Komponente von SCL+LCL

Um die Ergebnisse der unter den gewählten Kriterien als differentiell exprimiert selektierten Gene zu verifizieren wurde für einige Gene deren mRNA- und Proteinexpression untersucht. Die jeweilige mRNA-Expression wurden für die Gene Collagen, type III, alpha 1 (Col3A1), Serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK), Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), Cathepsin L (CTSL), Plasminogen activator, urokinase (PLAU), Fibronectin (FN1) und Cathepsin B (CTSB) mittels quantitativer ‚Real-Time-PCR'-Analysen unter Verwendung Gen-spezifischer Primerpaare verifiziert. Die eingesetzte cDNA wurde aus zuvor linear amplifizierter aRNA mittels des Amplifikationskits hergestellt (siehe Material und Methoden) und stammt von 6 Fällen der großzelligen Lymphome (LCL-2, LCL-4, LCL-5, LCL-6, LCL-10) und von 4 Fällen der kleinzelligen Lymphome (SCL-2, SCL-3, SCL-4, SCL-6). In allen großzelligen Lymphomen konnte die differentielle Expression der Gene gegenüber den kleinzelligen Lymphomen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der ‚Real-Time-PCR' für das Gen CXCR4 erfüllten zwar nicht die Kriterien einer differentiellen Expression

(mindestens zweifacher Unterschied), konnten aber die Tendenz einer differentiellen Expression bestätigen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

1) Gene, die in der Modulation der Extrazellulären Matrix eine Rolle spielen	Verhältnis LCL / SCL	Verhältnis groß-zu kleinzelliger Komponente (SCL+LCL)
fibronectin 1	8.3	3.8
cathepsin C	3.4	2.5
collagen, type III, alpha-1	9.5	4.9
cathepsin B	3.8	2.1
plasminogen activator, urinary	2.2	2.0
cathepsin L	2.9	2.0
2) Gene, die in der Proliferationssteigerung und „survival" eine Rolle spielen		
mitogen-activated protein kinase 12	7.2	3.9
cell division cycle 2	2.6	3.2
serum/glucocorticoid-regulated kinase	5.1	2.4
chemokine, CC motif, ligand 14	2.7	2.0
3) Gene die eine Rolle im Metabolismus spielen		
ribonucleotide reductase	2.1	2.6
dihydrofolate reductase	3.9	4.8
ubiquitin-conjugating enzyme	2.3	2.5
enolase 1	2.3	2.8
thioredoxin-interacting protein	0.2	0.3
topoisomerase, DNA, II, alpha	2.0	2.2
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2.7	2.0
phosphoglycerate kinase 1	2.5	2.4
pyruvate kinase 3	2.2	2.3
transferrin receptor	5.1	3.0
4) Sonstige		
high mobility group AT-hook 1	2.1	2.1
Fc fragment of IgE, high affinity I receptor, alpha subunit	3.6	2.2
chemokine, CXC motif, receptor 4	0.3	0.4

Tab. 8: Gemeinsam regulierte Gene sowohl zwischen SCL und LCL als auch klein- und großzelliger Komponente von SCL+LCL

Für die Verifizierung auf Proteinebene wurden mit Antikörpern gegen Transferrin receptor (CD71) (Mouse anti-Human Transferrin Receptor, Zymed laboratories Inc., San Francisco, USA), Cell division cycle 2 (CDC2) (Mouse Anti-Cdc2; Abcam, Cambridge, UK) und Cathepsin L (CTSL) (Mouse Anti-Cathepsin L, Abcam) immunhistochemische Färbungen der gemischtzelligen Lymphome ((SCL+LCL)-2, (SCL+LCL)-5 und (SCL+LCL)-10)) durchgeführt. Sowohl für CD71, als auch CDC2 konnte deren Überexpression in den

großzelligen Komponenten nachgewiesen werden. Für CTSL konnte nur eine starke Expression in Makrophagen nachgewiesen werden, die durch eine zusätzliche

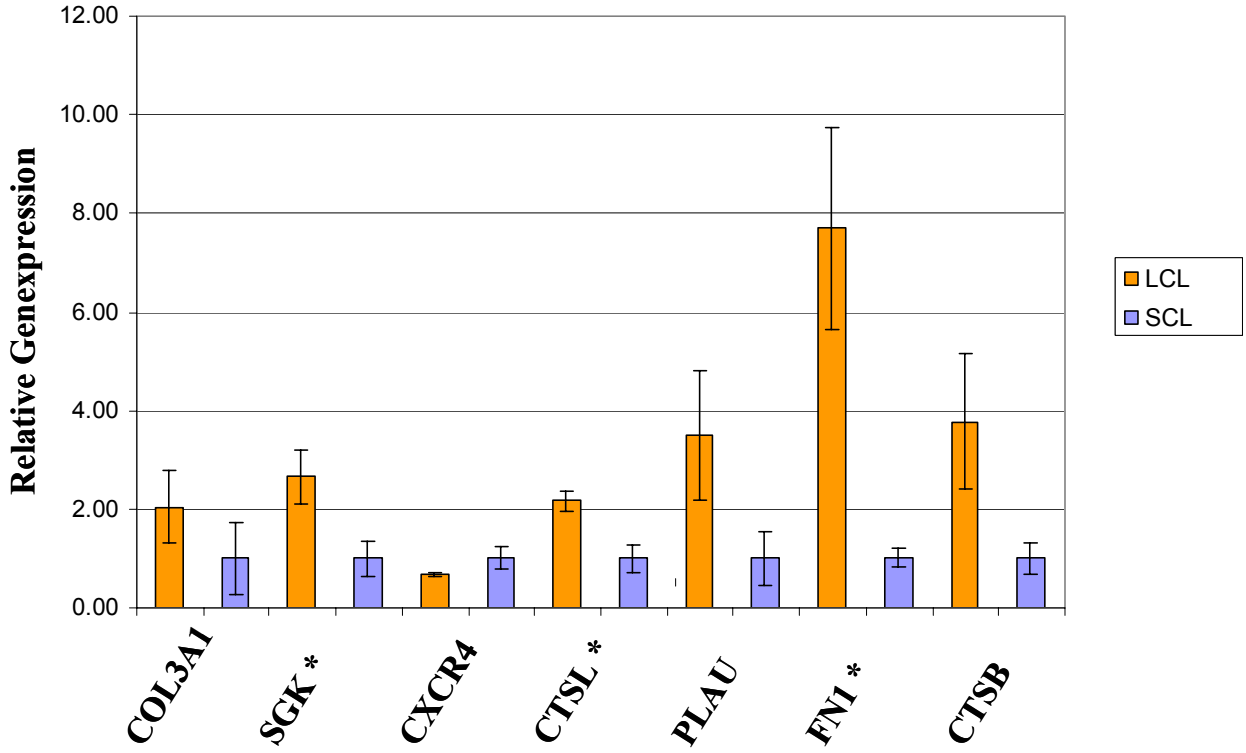


Abb.10: Quantitative ‚Real-Time-PCR'-Analysen verschiedener SCL und LCL

Dargestellt sind pro Gen die gemittelten relativen Expressionswerte aus den 4 kleinzelligen Lymphomfällen (SCL-2 bis -4, SCL-6) und 6 großzelligen Lymphomfällen (LCL-2, LCL-4 bis-6, LCL-10). Zur besseren Darstellung wurden die Mittelwerte der kleinzelligen SCL auf eins gesetzt.
* p-Wert < 0.05

immunhistochemische Färbung mit einem CD68- Antikörper bestätigt wurde. Deutlich sichtbar ist allerdings, dass die den Tumor infiltrierenden Makrophagen überwiegend im großzelligen Kompartiment vorzufinden sind, was den erhöhten Expressionswert von Cathepsin L in den Hybridisierungsdaten der großzelligen Lymphome erklärt. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen sind in Abbildung 11 gezeigt.

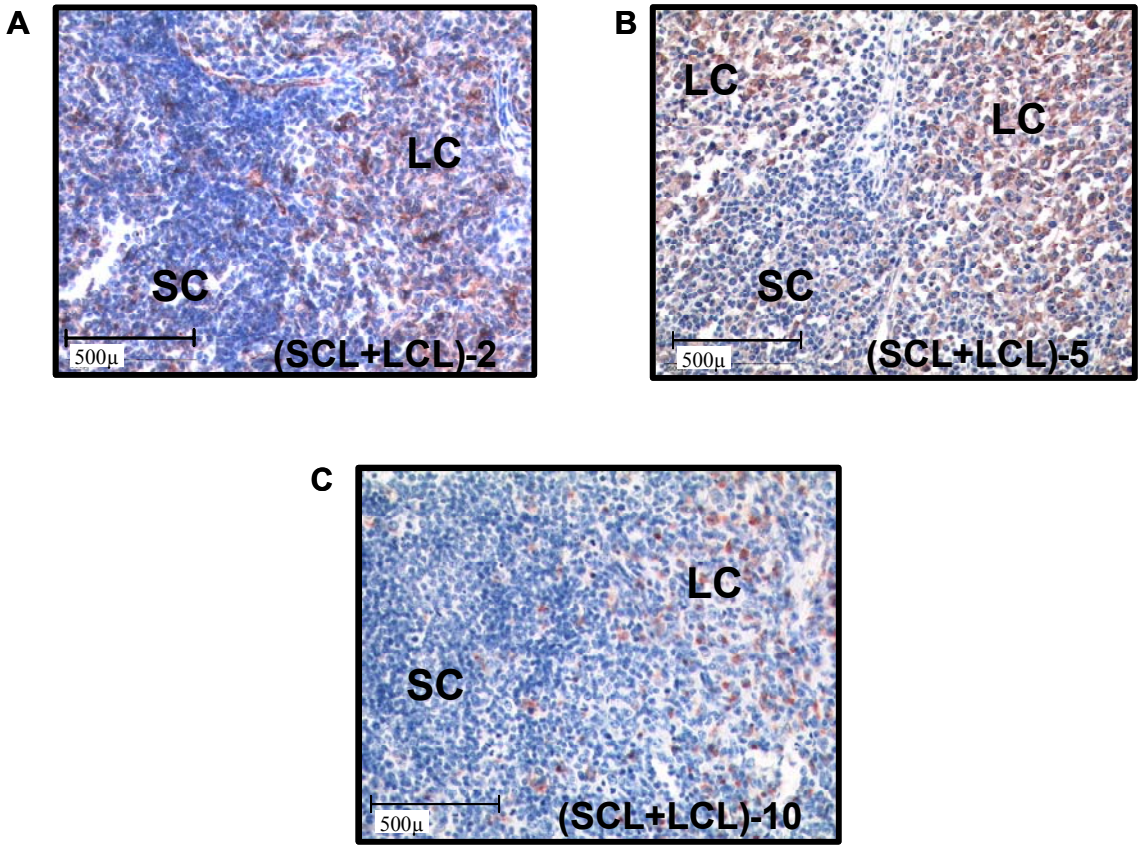


Abb.11: Immunhistochemie von SCL+LCL

Dargestellt sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen verschiedener Fälle von gemischtzelligen Lymphomen unter
A) der Verwendung eines Antikörpers gegen CDC2.
B) der Verwendung eines Antikörpers gegen CD71.
C) der Verwendung eines Antikörpers gegen CTSL.
D) In allen Färbungen erkennt man eine deutliche Überexpression der jeweiligen Proteine in der großzelligen Komponente
SC = Kleinzellige Komponente
LC = Großzellige Komponente

3.1.4.2. Ermittlung von Ähnlichkeitsverhältnissen der Expressionsprofile von SCL, LCL und SCL+LCL durch unüberwachte hierarchische Cluster-Analysen

Um zu untersuchen, ob sich die SCL und LCL durch jeweils ähnliche Expressionsmuster auszeichnen, wurden unüberwachte hierarchische Cluster-Analysen mittels des ‚Cluster'-Programms (Eisen, Spellman, et al., 1998) durchgeführt. Vor der Analyse wurden die Hybridisierungsdaten gefiltert. Bei Vergleich zweier Gruppen waren die Kriterien der Filterung ein Mindestexpressionswert der Gene von 0.5 in mindestens der Anzahl von Fällen,

die der Größe der kleinsten Gruppe entspricht. Durch die Wahl dieser Kriterien wird gewährleistet, dass Gene mit durchgängig über alle Fälle sehr niedrigen Expressionswerten, die ein die Auswertung beeinträchtigendes Rauschen verursachen, aus dem Datensatz entfernt werden. Gleichzeitig können aber die Gene erhalten bleiben, die in einer der beiden Gruppen zwar sehr niedrig, in der anderen Gruppe aber stärker exprimiert sind. Alle Werte wurden log-transformiert und die Ähnlichkeitsabstände mittels „Complete Linkage Clustering“ berechnet. Die Ergebnisse wurden mittels des Programms „TreeView“ {Eisen, Spellman, et al. 1998 42 /id} visualisiert. Abbildung 12 zeigt den Vergleich der beiden Gruppen SCL (SCL-2 bis -8,-9,-10) und LCL (LCl-2 bis -11,-13,-14,-16,-17,-25).

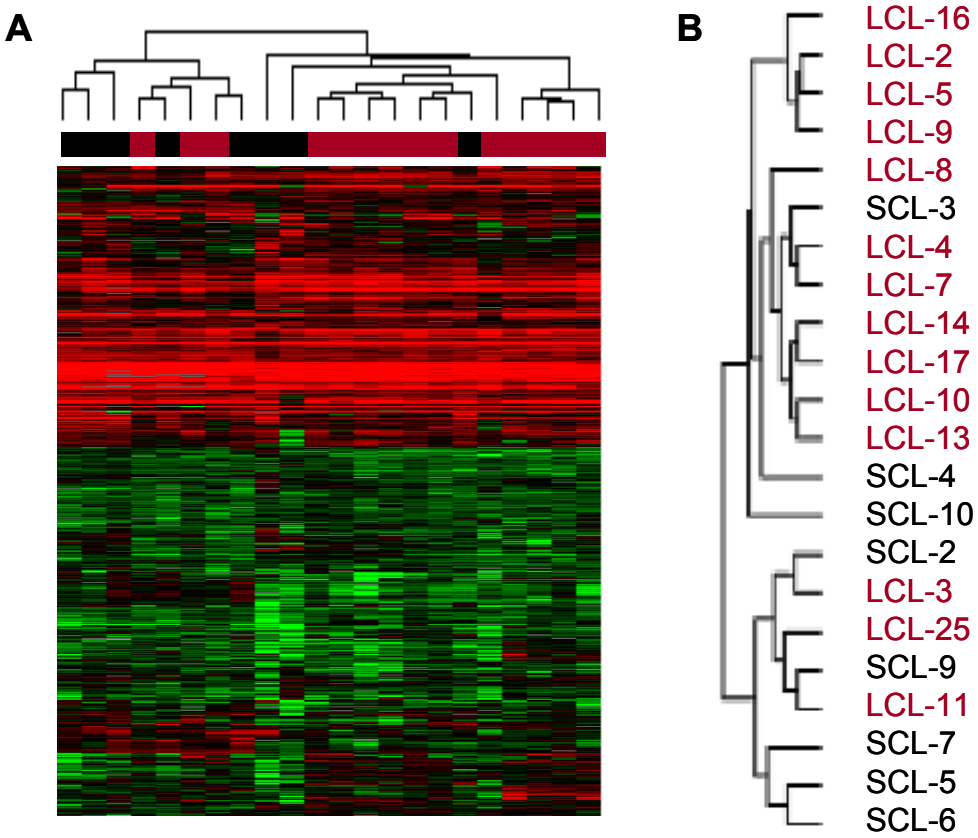


Abb.12: Darstellung des Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse von LCL und SCL

Abgebildet ist das durch „TreeView“ dargestellte Ergebnis der Clusteranalyse von LCL und SCL. A) In dem Diagramm sind sowohl die Gruppierung der Gene, als auch die der Proben dargestellt. Rot stellt hochregulierte, grün herunterregulierte Gene dar. B) Vergrößerte Ansicht des Clusterbaums. Diese sind in zwei Hauptgruppen eingeordnet. Innerhalb der einen sind 11 von 14 der LCL (rot) und 3 von 8 der SCL (schwarz) enthalten. Innerhalb des zweiten sind 5 von 8 der SCL- und 3 von 14 der LCL-Fälle enthalten.

Der “Cluster”-Baum ist in zwei Hauptzweige aufgeteilt, von welchen der eine die Mehrheit (11/14) der LCL (rot) aber nur einige (3/8) Fälle der SCL (schwarz) und der zweite die Mehrheit (5/8) der SCL-, aber nur wenige (3/14) LCL Fälle umfasst. Innerhalb der Gruppe der SCL zeigte der einzige Fall (SCL-6) mit einer vorliegenden t(11;18)(q21;q21) Translokation kein von den anderen abweichendes Transkriptionsprofil.

Mit demselben Verfahren wurden die groß-((SCL+LCL)-LC-1 bis 10) und kleinzelligen ((SCL+LCL)-SC-2, -4 bis -8 und -10) Komponenten der SCL+LCL verglichen. Der „Cluster“-Baum in TreeView zeigt ebenfalls zwei Hauptzweige (Abb. 13). Der eine Zweig enthielt 7/10 großzellige Komponenten und der zweite alle kleinzelligen Komponenten und die 3 restlichen großzelligen Komponenten. Sowohl für die beiden Gruppen SCL und LCL als auch für die verschiedenen Komponenten innerhalb der SCL+LCL wird der morphologische Unterschied zwischen den großen und kleinen Lymphomzellen durch unterschiedliche Expressionsprofile reflektiert.

23 Gene wurden sowohl zwischen SCL und LCL als auch zwischen den beiden Komponenten von SCL+LCL als differentiell exprimiert nachgewiesen. Dieser hohe gemeinsame Anteil lässt ein ähnliches Expressionsprofil der jeweils kleinen (aus SCL und SCL+LCL) als auch großen Zellen (aus LCL und SCL+LCL) untereinander vermuten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine unüberwachte hierarchische Clusteranalyse mit allen Lymphomproben (SCL, LCL und SCL+LCL) durchgeführt. Da angenommen wurde, dass jeweils die LCL mit den großzelligen Komponenten der SCL+LCL und die SCL mit den kleinzelligen Komponenten der SCL+LCL eine Gruppe bilden, erfolgte die Filterung nach dem Mindestexpressionswert von 0,5 in mindestens 15 Fällen, der Zahl der kleinsten Gruppe (SCL und SCL+LCL). Bis auf drei Fälle (SCL-4, SCL-7 und SCL-10) wurden unter diesen Bedingungen alle Fälle in zwei Hauptgruppen eingeteilt. In der einen Hauptgruppe befinden sich 18 von 24 großzelligen Lymphomproben aus den Gruppen LCL oder SCL+LCL aber nur 1 von 17 kleinzelligen Lymphomproben aus der Gruppe SCL+LCL. In die zweite Hauptgruppe sind 13 von 17 kleinzelligen Lymphomproben der Gruppen SCL oder SCL+LCL, aber nur 6 von 24 großzelligen Lymphomproben der Gruppen LCL oder SCL+LCL zugeordnet (Abb. 14). In diesem Ergebnis werden sowohl die morphologischen Unterschiede zwischen den großen und kleinen Zellen aus LCL, SCL und SCL+LCL, als auch die Ähnlichkeit innerhalb der großen Zellen aus LCL und SCL+LCL und der kleinen Zellen aus SCL und SCL+LCL reflektiert. Die Hinweise auf eine hohe Ähnlichkeit der Transkriptionsprofile werden zudem durch die Fälle bestärkt, in denen Fälle aus LCL

unmittelbar neben Fälle geordnet werden, die aus den großzelligen Komponenten aus SCL+LCL stammen (z.B. (SCL+LCL)-LC-7 und LCL-13).

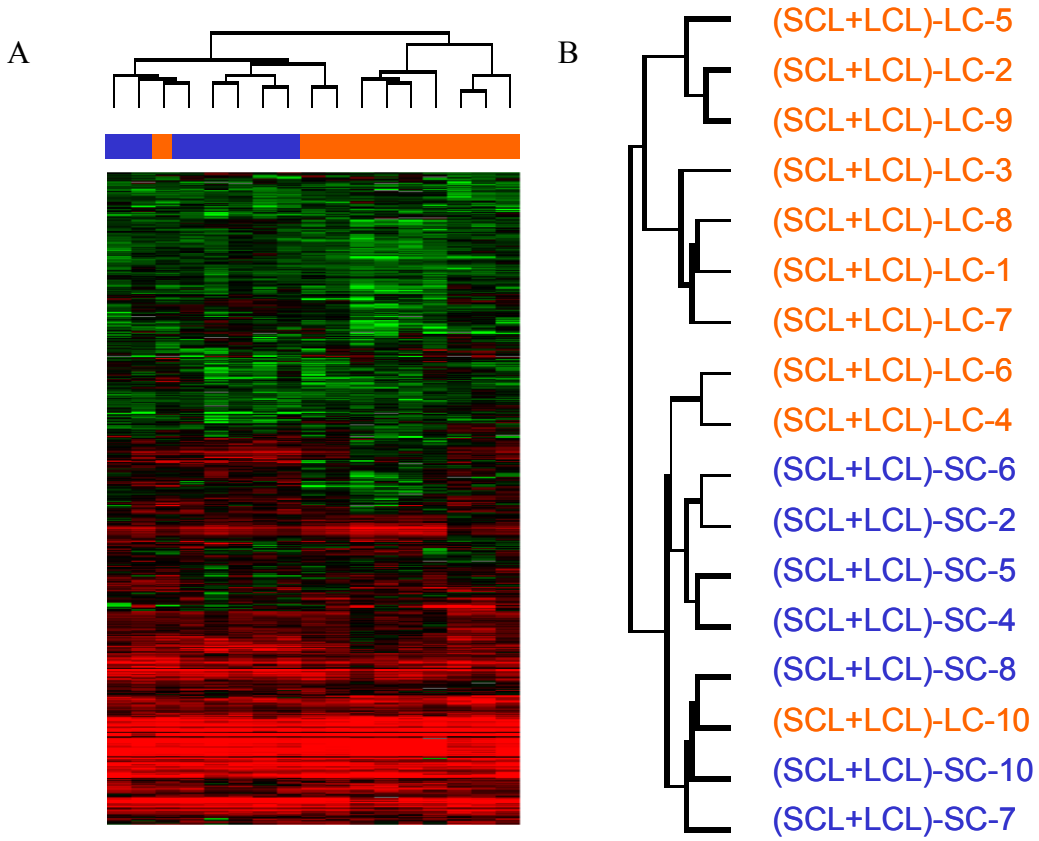


Abb.13: Darstellung des Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse der koexistenten groß – und kleinzelligen Komponenten von SCL+LCL

Abgebildet ist das durch „TreeView“ dargestellte Ergebnis der Clusteranalyse der klein (SC)- und großzelligen (LC) Komponenten von SCL+LCL. A) In dem Diagramm sind sowohl die Gruppierung der Gene, als auch die der Proben dargestellt. Rot stellt hochregulierte, grün herunterregulierte Gene dar. B) Vergrößerte Ansicht des Clusterbaums. Diese sind in zwei Hauptgruppen eingeordnet. Innerhalb der einen Gruppe sind ausschließlich großzellige Komponenten (orange) (7 von 10) enthalten. Innerhalb der zweiten Gruppe sind alle kleinzelligen Komponenten (blau) und die restlichen 3 großzelligen Komponenten enthalten.

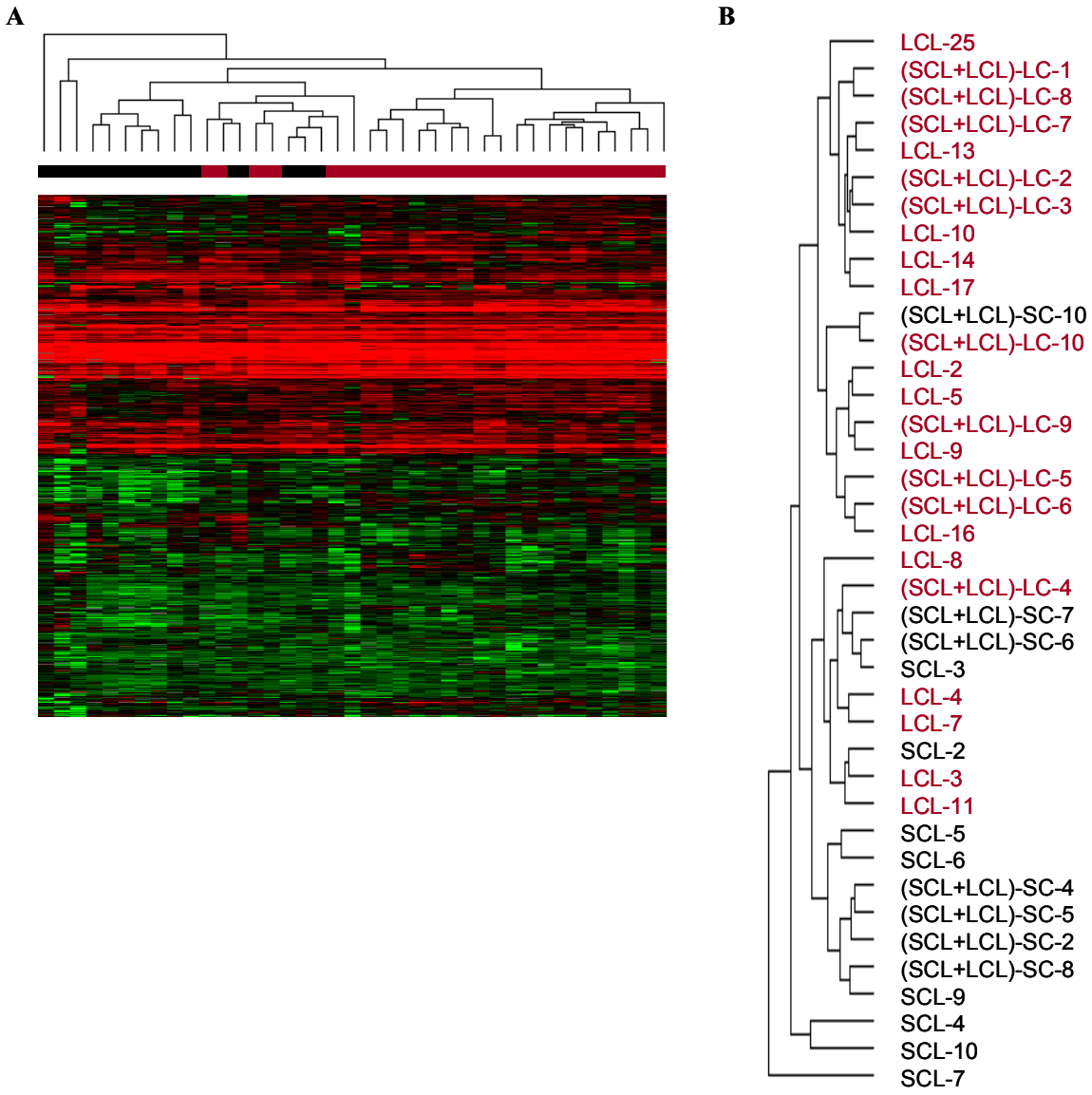


Abb.14: Darstellung des Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse aller mikrodissezierten SCL, LCL und groß- und kleinzelligen Komponenten von SCL+LCL

Abgebildet ist das mittels „TreeView“ dargestellte Ergebnis der hierarchischen Clusteranalyse aller mikrodissezierten SCL, LCL und groß-und kleinzelligen Komponenten von SCL+LCL. A) In dem Diagramm sind sowohl die Gruppierung der Gene, als auch die der Proben dargestellt. Rot stellt hochregulierte, grün herunterregulierte Gene dar. B) Für die Auswertung wurde nur die Gruppierung der Proben betrachtet. Bis auf 3 Proben (SCL-7, SCL-10 und SCL-4) wurden alle Proben in zwei Hauptgruppen geordnet. Diese sind in zwei Hauptgruppen eingeordnet. In der einen Hauptgruppe befinden sich 18 von 24 großzelligen (rot) Lymphomproben aus den Gruppen LCL oder SCL+LCL und 1 von 17 kleinzelligen Lymphomproben aus der Gruppe SCL+LCL. In der zweiten Hauptgruppe sind 13 von 17 kleinzelligen (schwarz) Lymphomproben der Gruppen SCL oder SCL+LCL, aber nur 6 von 24 großzelligen Lymphomproben der Gruppen LCL oder SCL+LCL zugeordnet.

3.2. Funktionelle Charakterisierung von CUTL1 in diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen

Eines der 23 gemeinsam zwischen SCL und LCL und zwischen den klein- und großzelligen Komponenten der SCL+LCL differentiell regulierten Genen war Cathepsin L, das jeweils in den großzelligen Komponenten überexprimiert war. Die immunhistochemische Analyse der SCL+LCL ergab, dass Cathepsin L hauptsächlich in den die großzelligen Bereiche infiltrierenden Makrophagen überexprimiert vorlag. Für Cathepsine im Allgemeinen und Cathepsin L im Speziellen ist seit kurzem bekannt, dass sie neben ihrer zentralen Aufgabe als Protease im lysosomalen Proteinabbau noch weitere wichtige Funktionen in Zellen ausüben. Unter anderem kann Cathepsin L den Transkriptionsfaktor CUTL1 durch Spaltung aktivieren, wodurch eine Proliferationssteigerung durch einen beschleunigten Übergang von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus bewirkt wird (siehe Einleitung). Dieser Zusammenhang ist Grund für die Untersuchung eines möglichen Beitrags von Cathepsin L zu der gesteigerten Proliferation in den diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen über die Aktivierung von CUTL1. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression des Transkriptionsfaktors CUTL1 und seine Rolle für die Proliferation in B-Zell-Lymphomen untersucht werden.

3.2.1. Untersuchung von SCL+LCL und weiteren verschiedenen B-Zell-Lymphomen auf Expression von CUTL1

Um einen ersten Hinweis zu bekommen, ob Cathepsin L zusammen mit der Expression von CUTL1 eine Rolle in einer Tumorprogression der LCL spielen könnte, wurde die Protein-Expression von CUTL1 in SCL+LCL untersucht. Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen CUTL1 zeigten eine Überexpression von CUTL1 in der großzelligen Komponente (Abb. 16).

Um weitere Hinweise auf eine Rolle von CUTL1 in der Proliferation von B-Zell-Lymphomen zu erhalten, wurden bei einer Reihe von B-Zell-Lymphomen immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CUTL1 und den Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt. Untersucht wurden 6 Fälle follikulärer Lymphome, 11 Fälle diffus großzelliger und 8 Fälle mediastinaler B-Zell-Lymphome. Für die niedrigmalignen follikulären und hochmalignen diffus großzelligen B-Zell-Lymphome zeigte sich, dass hohe Zahlen an proliferierenden

Zellen tendenziell mit einer erhöhten Expression von CUTL1 einhergehen. Für die aggressiven mediastinalen B-Zell-Lymphome ließ sich dieser Trend nicht bestätigen (Tab. 9)

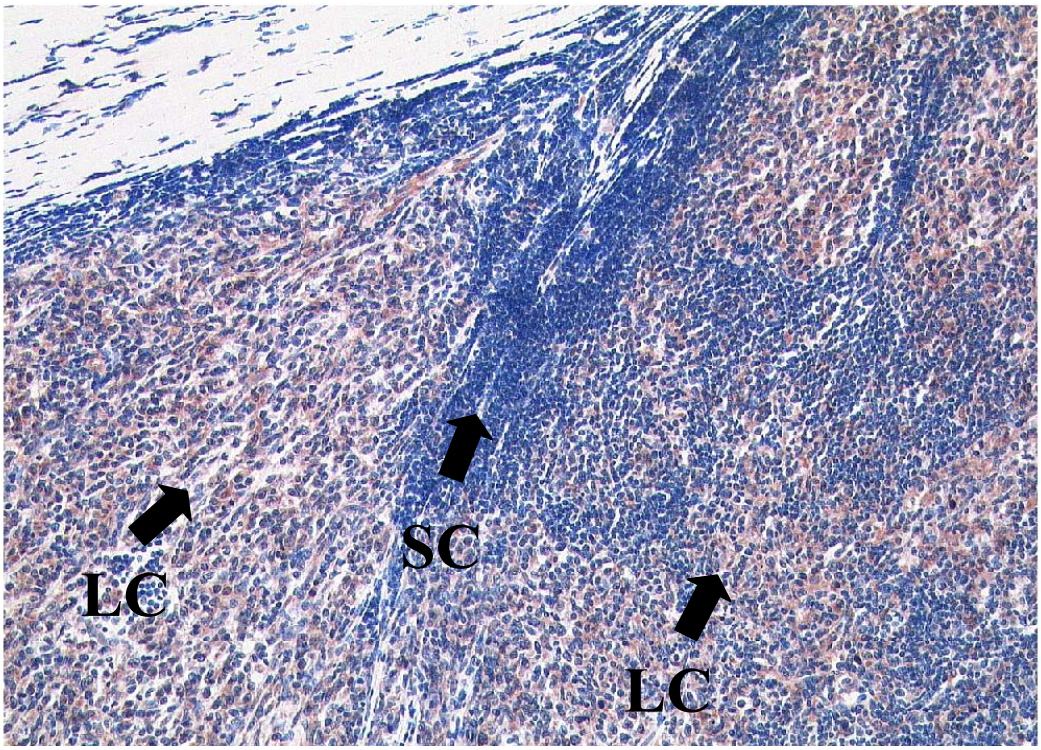


Abb.16: Immunhistochemische Färbung von SCL+LCL mit einem Antikörper gegen CUTL1

CUTL1 liegt gegenüber der kleinzelligen Komponente (SC) in der großzelligen Komponente (LC) von SCL+LCL überexprimiert vor. Die Pfeile zeigen auf die jeweiligen Areale.

	Ergebnis der CUTL-Färbung	Ergebnis der Ki67-Färbung
Foll. Lymphome:		
1	negativ	10-15% positiv
2	> 50 % negativ	20% positiv
3	positiv	20% positiv
4	negativ	<5% positiv
5	positiv	30% positiv
6	50% schwach positiv	30% positiv
DLBCL:		
1	schwach positiv	60-70% positiv
2	positiv	ca 100% positiv
3	schwach positiv	70% positiv
4	positiv	70% positiv
5	positiv	90% positiv
6	positiv	30% positiv
7	schwach positiv	50% positiv
8	positiv	30% positiv
9	schwach positiv	70% positiv
10	positiv	80% positiv
11	positiv	n.a.
Primäre mediastinale B-Zell Lymphome		
1	negativ	40% positiv
2	> 50% negativ	80% positiv
3	negativ	ca.75% positiv
4	negativ	80% positiv
5	negativ	95% positiv
6	schwach positiv	n.a.
7	negativ	n.a.
8	> 50% positiv	n.a.

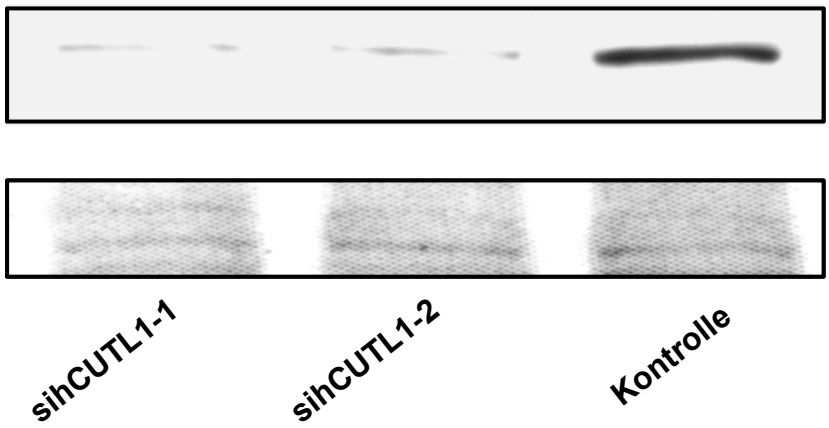
Tab. 9: Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen von Follikulären Lymphomen, diffus großzelligen B-Zell Lymphomen und primären mediastinalen B-Zell Lymphome mit Antikörpern gegen CUTL1 und Ki67

3.2.2. ‚Knock down' von CUTL1 in MedB-1 durch transiente Transfektion und dessen Auswirkung auf die Proliferation

Um zu untersuchen, ob CUTL1 in B-Zell Lymphomen an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist, wurden Durchflusszytometrie-Analysen mit MedB-1-Zellen (siehe Material und Methoden) durchgeführt, in denen zuvor ein ‚knock down' des Transkriptionsfaktors hergestellt worden war. Dazu wurde eine transiente Transfektion mit spezifisch gegen CUTL1 gerichteter siRNA durchgeführt. Diese sogenannten ‚small interfering' RNAs bewirken ein ‚gene silencing' auf posttranskriptioneller Ebene. Das Prinzip basiert auf dem natürlichen Abwehrmechanismus der Zelle gegenüber doppelsträngiger RNA (dsRNA). Gelangt dsRNA in die Zelle wird diese durch den Dicer-Enzymkomplex in 21-23 Nukleotid lange ‚small interfering' RNA zerlegt. Diese kleinen doppelsträngigen RNA-Moleküle bilden mit einem Proteinkomplex den sogenannten ‚RNA-induced Silencing Complex' (RISC). Innerhalb der aktivierten RISCs liegen die siRNAs einzelsträngig vor. Sobald in der Zelle mRNA-Moleküle mit zu der siRNA komplementären Sequenzen vorliegt, bindet der Komplex diese und schneidet sie in der Mitte des Hybrids.

48h nach Transfektion von MedB-1 mit siRNA gegen humanes und murines CUTL1, letzteres diente als Kontrolle, wurden die Zellen geerntet. Aus einem Teil der Zellen wurde Gesamt-Protein isoliert und durch Western Blot Analyse die verminderte CUTL1-Expression der transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle nachgewiesen (Abb. 17a). Der Rest der Zellen wurde fixiert und nach Färbung mit Propidiumjodid wurden Durchflusszytometrie-Analysen durchgeführt. Die Menge der Zellen in der G0/G1, S und G2/M Phase ist prozentual zur Gesamtzahl analysierter Zellen angegeben. Die Reduktion der CUTL1-Expression durch Transfektion der siRNA bewirkte im gezeigten Beispiel eine Reduktion der in der S-Phase befindlichen Zellen um 6 und 10 % (Abb. 17b). Die Reduktion der S-Phase konnte in wiederholten Experimenten bestätigt werden.

A



B

	G0/G1	S	G2/M
sihCUTL1-1	68,46 %	19,73 %	11,81 %
sihCUTL1-2	60,33 %	23,44 %	16,24 %
Kontrolle	55,17 %	29,86 %	14,96 %

Abb.17: Ergebnisse der Western Blot- und Durchflusszytometrie-Analyse der mit siRNA (sihCUTL1) transfizierten MedB-1 Zellen

A) Durch die Transfektion der siRNA wird die Proteinexpression von CUTL1 gegenüber der Kontrolle (mit siRNA gegen murines CUTL1 transfizierte Zellen) reduziert. Im oberen Teil des Schaubilds ist das Ergebnis nach Antikörper-Behandlung, im unteren Teil das Ergebnis der Ladekontrolle zu sehen.
B) Angegeben ist der prozentuale Anteil der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Ernte in den Phasen G0/G1, S und G2/M befanden.

4. Diskussion

Die niedrigmalignen extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ (SCL), die hochmalignen diffus großzelligen B-Zell-Lymphome des GI-Trakts (LCL) und die so genannten sekundär hochmalignen LCL mit koexistenter kleinzelliger Komponente des extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphom Typs (SCL+LCL) stellen laut WHO die weitaus größte und wichtigste Gruppe der extranodalen gastrointestinalen NHL (Harris, Jaffe, et al., 2000).

In dieser Arbeit wurden von Proben der drei Subtypen SCL, LCL und SCL+LCL Expressionsprofile unter Verwendung eigens zusammengestellter cDNA-Microarrays erstellt. Durch unüberwachte hierarchische Clusteranalysen der Profile verschiedener Proben aus SCL und LCL konnte gezeigt werden, dass sich die morphologischen Unterschiede zwischen den Subtypen auf transkriptioneller Ebene widerspiegeln. SCL und LCL lassen sich aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Profile nahezu fehlerlos unterscheiden. Dies weist auf ein für jede Entität typisches, diese bestimmendes Expressionsprofil hin.

Um zu untersuchen, ob sich die morphologischen Unterschiede der klein- und großzelligen Komponenten der SCL+LCL ebenfalls auf transkriptioneller Ebene widerspiegeln, wurden deren Expressionsprofile einer unüberwachten hierarchischen Clusteranalyse unterzogen. Die untersuchten klein-und großzelligen Komponenten der SCL+LCL stammten jeweils aus dem gleichen Patienten. Daher wäre es plausibel anzunehmen, dass aufgrund des gleichen genetischen Hintergrunds die groß-und kleinzelligen Komponenten aus einem Patienten sich jeweils sehr ähnlich sind und daher in der Cluster-Analyse eng assoziiert erscheinen. Jedoch wurden die klein- und großzelligen Komponenten der sekundär hochmalignen SCL+LCL sogar noch deutlicher voneinander getrennt, als dies bei den Untersuchungen der primär niedrigmalignen SCL und hochmalignen LCL der Fall war. Dies weist auf die Existenz eines stark ausgeprägten, für die groß- und kleinzelligen Komponenten des SCL+LCL typischen Transkriptionsprofils hin.

Zur Ermittlung der Gene, die zwischen SCL und LCL und zwischen klein- und großzelliger Komponente der SCL+LCL differentiell exprimiert waren, wurde ein T-Test durchgeführt. Der Vergleich beider Gruppen ergab eine Anzahl von 23 gemeinsam differentiell exprimierten Genen. Ein Großteil der Gene ist an der Modulation der extrazellulären Matrix und Proliferationssteigerung beteiligt und liegt in den diffus großzelligen Anteilen überexprimiert vor. Dies ist in Übereinstimmung mit dem allgemein gegenüber niedrigmalignen Lymphomen in hochmalignen Lymphomen zu beobachtenden hohen

Proliferationsindex (Arends, Bot, et al., 1999; Korkolopoulou, Oates, et al., 1994) (Krugmann, Dirnhofer, et al., 2001) und der erhöhten Synthese matrixmodulierender Proteine zu sehen (Hazar, Polat, et al., 2004; Sakata, Satoh, et al., 2004).

Für eine Auswahl an differentiell exprimierten Genen wurden die Array-Ergebnisse durch quantitative Real-Time PCR und Immunhistochemie bestätigt. Mit beiden Methoden wurde die hohe Expression von ‚cell division cycle 2' (CDC2), Transferrin Rezeptor (CD71) und Cathepsin L (CTSL) in den hochmalignen Lymphomzellen nachgewiesen.

CDC2 spielt im Zellzyklus im Komplex mit CyclinB1 eine wichtige Rolle für einen kontrollierten Übergang von der G2- in die M-Phase. Im so genannten ‚checkpoint', in dem der CDC2/CyclinB1-Komplex inaktiv vorliegt, hat die Zelle Zeit zu kontrollieren, ob die Chromosomen vollständig repliziert und ohne DNA-Schäden vorliegen. Erst dann erfolgt die Aktivierung des CDC2/CyclinB1 Komplexes und dadurch die Einleitung der M-Phase. Auf diese Weise gewährleistet die Zelle ihre genomische Integrität nach der Zellteilung. Die Mehrheit der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome zeigt einen hohen Grad an genomischer Instabilität (Nanjangud, Rao, et al., 2002; Barth, Dohner, et al., 1998). CDC2 scheint im Komplex mit CyclinB1 eng mit der Entstehung der SCL aus chronischer Gastritis assoziiert zu sein (Banerjee, Weston, et al., 2000). In malignen nodalen Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) wird für Cyclin B1 und CDC2 eine Beteiligung an der Entstehung und Transformation von malignen Lymphomen vermutet (Jin & Park, 2002). In SCL überexprimiertes CDC2 könnte daher durch Umgehung der G2-M Kontrollpunkte zu erhöhter genomischer Instabilität und daher zur Pathogenese der diffus großzelligen Lymphome des GI-Trakts beitragen.

Über den Transferrinrezeptor (CD71), der über einen Lipidanker in der Plasmamembran gebunden ist, wird das Eisen-bindende Protein Transferrin durch Endozytose aufgenommen und vesikulär zu den Endosomen transportiert (Aisen, 2004). In aktivierten Lymphozyten liegt vermehrt CD71 vor, was die große Bedeutung des Eisenmetabolismus für das zelluläre Wachstum widerspiegelt (Rittenhouse-Diakun, Van Leengoed, et al., 1995). In ruhenden Lymphozyten ist der Rezeptor praktisch nicht vorhanden.

Für verschiedene aggressive Non-Hodgkin-Lymphome wurde CD71 als Proliferationsmarker beschrieben (Glasova, Konikova, et al., 1998). Frühere Studien zeigten jedoch, dass eine hohe CD71-Expression nicht zwangsläufig mit einem hohen Proliferationsindex verbunden ist (Scott, Ramsden, et al., 1988) und daher CD71 eher einem Aktivierungsmarker als einem Proliferationsmarker entspricht. In einigen Studien wurde für die Expression von CD71 in NHL-Zellen eine Korrelation mit einer schlechten Prognose beschrieben (Habeshaw, Lister, et al., 1983), die durch eine Reihe von Studienergebnissen über die verstärkte Aufnahme von

Ga^{67}-Citrat (Gallium Scintigraphy) in malignen NHL untermauert wird. Gallium wird über einen hauptsächlich Transferrin-Rezeptor-äbhängigen Mechanismus in die neoplastischen Zellen aufgenommen (Weiner, 1990). Edwards und Hayes berichteten als erste über die hohe Ga^{67}-Aufnahme in Hodgkin's- und Non-Hodgkin's-Lymphomen (Edwards & Hayes, 1969). Heute wird diese Bildgebungstechnik dazu verwendet, das Ausmaß der Lymphom-Krankheit zu beschreiben, Rückfalle bzw. Progression zu detektieren und das Ansprechen auf Therapie und die Überlebensrate abzuschätzen (Kaplan, Jochelson, et al., 1990; Janicek, Kaplan, et al., 1997). Durch eine Reihe von Studien wurde die Korrelation zwischen CD71-Expression und Gallium-Avidität in sowohl niedrig- als auch hochmalignen NHL beschrieben (Feremans, Bujan, et al., 1991; {Gallamini, Biggi, et al., 1997), was auf eine potentielle Rolle von CD71 als prognostischer Marker hinweist. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten ist eine Verwendung von CD71 für die Detektion von großzelligen Arealen in SCL+LCL und deren Einstufung als zusätzliches diagnostisches Werkzeug denkbar.

Cathepsin L (CTSL) gehört zu der Familie der Papain Cysteine Proteasen (C1) welche bislang 11 humane Mitglieder umfasst (Rossi, Deveraux, et al., 2004). Neben ihrer Funktion im lysosomalen Proteinabbau spielen die Cysteine Proteasen eine wichtige Rolle für die epidermale Homöostase. Desweiteren haben sie wichtige Funktionen in der Prozessierung von Proteinen, beispielsweise in der Antigen-Präsentation. In vielen humanen Neoplasien, wie z.B. in Lungen-, Prostata-, Darm-, Brust- und Magen-Tumoren, ist die Hochregulation von Cathepsinen gezeigt worden (Kayser, Richter, et al., 2003; Lah, Kalman, et al., 2000; Talieri, Papadopoulou, et al., 2004). In dieser Arbeit ergaben die immunhistochemischen Analysen, dass Cathepsin L in den Tumor infiltrierenden Makrophagen und nicht in den Lymphomzellen überexprimiert vorliegt. Diese Tatsache demonstriert, dass auch nach Anreicherung der Lymphomzellen durch Laser-Mikrodissektion das Expressionsprofil eines Tumors durch infiltrierende Zellen beeinflusst werden kann. Die immunhistochemischen Daten zeigen, dass in der großzelligen Komponente des SCL+LCL deutlich mehr Makrophagen vorliegen, als in der kleinzelligen Komponente.

Das den Tumor formende komplexe Zell-Netzwerk besteht nur zum Teil aus neoplastischen Zellen. Zu den nicht-neoplastischen Komponenten eines Tumors gehören Fibroblasten, endotheliale Zellen und inflammatorische Zellen, die als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) bezeichnet werden. Es ist bekannt, dass TAMs durch die Sekretion von Cytokinen und lytischen Enzymen das Tumorwachstum fördern (al Sarireh & Eremin, 2000). Desweiteren korreliert die Anzahl und Verteilung der TAMs mit der Prognose verschiedener Malignome (Bingle, Brown, et al., 2002). Diese publizierten Daten sind in Übereinstimmung

mit der in dieser Arbeit beobachteten Infiltration von Makrophagen in die großzellige Komponente des SCL+LCL. Es ist daher zu vermuten, dass diese TAMs an der Pathophysiologie des LCL beteiligt sind. Welche Rolle überexprimiertes Cathepsin L in diesem Prozess spielt ist noch unklar. Da in der embryonalen Maus-Zellinie NIH3T3 für Cathepsin L eine bisher unerwartete Rolle in der Zellteilungskontrolle durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CUTL1 beschrieben worden ist (Goulet, Baruch, et al., 2004) bietet die Untersuchung dieses Zusammenhangs in B-Zell-Lymphomen einen interessanten Ansatzpunkt (siehe unten).

Die Pathogenese und klonale Evolution von LCL und deren Verwandtschaft zu den SCL wird kontrovers diskutiert. Für Untersuchungen zur Pathogenese eignet sich am Besten das gemischtzellige SCL+LCL, in dem sowohl eine klein- als auch großzellige Komponente vorhanden ist. Aufgrund der hohen morphologischen Ähnlichkeit der klein- bzw. großzelligen Komponenten des SCL+LCL mit den reinen kleinzelligen SCL bzw. großzelligen LCL wird eine gemeinsame Pathogenese vermutet. Diese Vermutung ist Grundlage für den Vorschlag der WHO-Klassifikation, die sekundär hochmalignen Lymphome als Marginalzonen B-Zell-Lymphom vom MALT-Typ *und* diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (SCL+LCL) zu bezeichnen, auch wenn sich diese klinisch-pathologisch wie primär hochmaligne Fälle zeigen (Cogliatti, Schmid, et al., 1991). In der vorgelegten Arbeit konnte durch die Durchführung einer unüberwachten hierarchischen Clusteranalyse aller Lymphom-Proben gezeigt werden, dass sich jeweils die klein- bzw. großzelligen Populationen aus SCL+LCL auf transkriptioneller Ebene nicht von den morphologisch entsprechenden Zellen des SCL bzw. LCL unterscheiden. Diese Ähnlichkeiten unterstützen die Hypothese einer gemeinsame Pathogenese der klein- bzw. großzelligen Komponenten der sekundär hochmalignen SCL+LCL und der jeweils entsprechenden Zellen aus primär niedrigmalignen SCL bzw. hochmalignen LCL. Für diese Vermutung spricht auch die in dieser Arbeit mittels T-Test detektierte hohe Anzahl von 23 gemeinsam differentiell exprimierten Genen zwischen SCL und LCL einerseits und den klein- und großzelligen Komponenten von SCL+LCL andererseits.

Auf Grund der Koexistenz von klein- und großzelligen Komponenten in SCL+LCL und deren durch identische IgH-Umlagerungen nachgewiesenen Klonalität (dies gilt auch für 5 im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SCL+LCL (Barth, Bentz, et al., 2001) und zwei weiteren SCL+LCL) geht man davon aus, dass die hochmalignen großzelligen Komponenten dieser Lymphome durch Progression aus den niedrigmalignen kleinzelligen Komponenten entstehen (Chan, Ng, et al., 1990; Peng, Du, et al., 1997). Es liegt daher nahe, auch für die primär

hochmalignen LCL eine Progression über eine niedrigmaligne Zwischenstufe zu vermuten. Wie oben beschrieben, werden die SCL bzw. LCL in der durchgeführten unüberwachten hierarchischen Clusteranalyse aller Lymphomproben fast vollständig zu den kleinzelligen bzw. großzelligen Komponenten der SCL+LCL zugeordnet. Dieses Ergebnis unterstützt daher die Hypothese eines allgemeinen Pathogeneseweges mit Progression über ein SCL-Stadium hin zum LCL.

Es ist jedoch zu beachten, dass einige Fälle gemischtzelliger Lymphome mit beschriebener Bi- und Oligoklonalität ihrer Komponenten (Cabras, Candidus, et al., 2001; Cabras, Weirich, et al., 2002) gegen eine Progression als einzigem Weg der Pathogenese der LCL sprechen. Auf verschiedene Pathogenesewege weisen auch einige Ergebnisse molekular-zytogenetischer Untersuchungen von SCL, LCL und SCL+LCL hin (Barth, Bentz, et al., 2001). In den untersuchten Subtypen waren eine Reihe von Aberrationen zu finden, deren teilweisen Überlappungen für eine klonale Progression sprechen. Jedoch gab es eine Vielzahl von Aberrationen, die entweder nur in den niedrig- oder nur in den hochmalignen Lymphomen vorhanden waren. Diese und andere Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass zwei unterschiedliche genetische Subtypen der LCL existieren, deren Pathogenese über zwei Wege verlaufen: a) über einen sukzessiven Entwicklungsweg durch Transformation des hochmalignen Lymphoms aus einer niedrig-malignen Vorstufe oder b) über einen „*de novo*“ Entwicklungsweg, in dem das hochmaligne Lymphom durch bestimmte genetische Veränderungen ohne über eine Vorstufe direkt aus Marginalzonenzellen entstehen können (Starostik, Patzner, et al., 2002). Die hier durchgeführten Expressionsprofilanalysen ergaben keine Hinweise auf distinkte transkriptionelle Phänotypen innerhalb der Gruppe der LCL. Dies weist darauf hin, dass entweder keine durch alternative Wege entstandenen Lymphome unter den untersuchten Proben waren, oder aber beide Pathogenesewege zu jeweils sehr ähnlichen transkriptionellen Veränderungen in den Lymphomzellen führen, die zu großen Übereinstimmungen in den Expressionsprofilen führen. Dass verschiedene genetische Aberrationen sich ähnlich auf die transkriptionelle Regulation auswirken können, lässt sich am Beispiel der bereits erwähnten, mit SCL eng assoziierten Translokationen t(11;18) und t(1;14) belegen. Beide Translokationen bewirken in den Lymphozyten letztendlich eine onkogene Überaktivierung des Transkriptionsfaktor NF-κB (Lucas, Yonezumi, et al., 2001; Willis, Jadayel, et al., 1999).

Bisher sind außer dem Transkriptionsfaktor FOXP1 (Streubel, Vinatzer, et al., 2005) keine weiteren an der Pathogenese von SCL und LCL beteiligte Transkriptionsfaktoren bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit ist der Homeodomän-Transkriptionsfaktor CUTL1 auf Expression in

SCL+LCL hin untersucht worden. Die Motivation für diese Untersuchung war eine Arbeit, in der Cathepsin L als Aktivator von CUTL1 beschrieben wurde, in dem es durch spezifische proteolytische Spaltung CUTL1 zu einer N-terminal verkürzten, 110 kDa schweren Isoform (p110) prozessiert (Goulet, Baruch, et al., 2004). Aktiviertes und dadurch verstärkt DNA-bindendes CUTL1 bewirkt durch Transkriptionsinitiation spezifischer Gene einen beschleunigten G1/S-Übergang innerhalb des Zellzyklus und dadurch eine erhöhte Proliferation. In dieser Arbeit wurde Cathepsin L mittels Expressionsprofilanalysen in den hochmalignen LCL überexprimiert detektiert. Immunhistochemische Färbungen ergaben, dass Cathepsin L hauptsächlich in den Tumor infiltrierenden Makrophagen exprimiert wird. Zum Aufschluß eines eventuellen Beitrags von Cathepsin L zu der gesteigerten Proliferationsrate von LCL über die Aktivierung von CUTL1 wurden zunächst Gewebeschnitte von SCL+LCL immunhistochemisch auf CUTL1-Expression hin untersucht. CUTL1 lag in den großzelligen Komponenten überexprimiert vor. Weitere immunhistochemische Färbungen von mediastinalen B-Zell-Lymphomen, follikulären Lymphomen und nodalen diffus großzelligen Lymphomen ergaben, dass außer bei den aggressiven mediastinalen B-Zell-Lymphomen eine erhöhte Expression von CUTL1 tendenziell mit erhöhten Proliferationsindices einherging.

Zur Untersuchung der Rolle von CUTL1 in der Proliferation von B-Zell-Lymphomen wurde die B-Lymphom-Zellinie MedB-1 verwendet, da in dieser CUTL1 in ausreichender Menge exprimiert vorlag. Es wurden eine transiente Transfektion von MedB-1 Zellen mit gegen CUTL1 gerichteter siRNA und anschließende Durchflusszytometrie-Analysen durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Herunterregulation von CUTL1 in MedB-1 zu einer Reduktion des Anteils der in der S-Phase befindlichen Zellen von bis zu 10 Prozent führte. Diese Daten, zusammen mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen, sprechen für eine Beteiligung von CUTL1 an der Proliferationsregulation von B-Zell-Lymphomen.

Aufgrund der Tatsache, dass sowohl Cathepsin L, als auch CUTL1 in den großzelligen Komponenten von SCL+LCL überexprimiert vorliegen, erscheint es lohnenswert, in zukünftigen Arbeiten die Lymphome auf ein zur Pathogenese von LCL beitragendes Zusammenwirken beider Proteine hin zu untersuchen. Weiterführende Studien müssen klären, ob durch Cathepsin L prozessiertes CUTL1 in Lymphomzellen den Übergang in die S-Phase beschleunigt. Für ein Zusammenwirken von in LCL exprimiertem CUTL1 und von Makrophagen sezerniertem Cathepsin L müsste eine Aufnahme von Cathepsin L in die Lymphomzellen, und der weitere Transport in den Zellkern, gewährleistet sein. In NIH3T3 Zellen wurde gezeigt, dass nur eine verkürzte Isoform von Cathepsin L ohne Signalpeptid in der Lage ist, in den Zellkern zu gelangen und CUTL1 zu aktivieren (Goulet, Baruch, et al.,

2004). Diese Isoform entsteht durch Translationsinitiation an weiter stromabwärts gelegenen Startcodons. Für ein Zusammenwirken von Cathepsin L und CUTL1 in LCL müsste also neben der Internalisierung von Cathepsin L vermutlich auch dessen Prozessierung in die richtige Isoform stattfinden. Für Myelomonozyten und alveolare Makrophagen ist bereits gezeigt worden, dass diese Cathepsin L als inaktives 43 kDa Proenzym aufnehmen und zum aktiven 25 kDa Enzym prozessieren (Reilly, Chen, et al., 1990). Eine Internalisierung und Prozessierung von Cathepsin L in B-Lymphomzellen ist also durchaus denkbar. Ein solches Zusammenspiel von CUTL1 und Cathepsin L in der Pathogenese von B-Zell-Lymphomen würde einen bisher völlig unvermuteten, neuen onkogenen Mechanismus in der Tumorgenese darstellen.

5. Zusammenfassung

Die niedrigmalignen extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ (SCL), die hochmalignen diffus großzelligen B-Zell-Lymphome des GI-Trakts (LCL) und die so genannten „sekundär“ hochmalignen LCL mit koexistenter kleinzelliger Komponente des extranodalen Marginalzonen B-Zell-Lymphom Typs (SCL+LCL) stellen laut WHO die weitaus größte und wichtigste Gruppe der extranodalen gastrointestinalen NHL (Harris, Jaffe, et al., 2000). Auf Grund der Koexistenz einer klein- und großzelligen Lymphompopulation und der häufigen Assoziation mit einer *Helicobacter pylori* induzierten Endzündung in den initialen Phasen des SCL gelten diese Lymphome als besonders attraktives Model in der Lymphomgenese und Lymphomprogression.

Das Ziel dieser Arbeit war die Erstellung von Genexpressionsprofilen aus SCL und LCL sowie aus den klein- und großzelligen Komponenten der SCL+LCL. Anhand der Daten sollten neue Einsichten über die Unterschiede der Subtypen auf transkriptioneller Ebene und hinsichtlich der derzeit noch kontrovers diskutierten Pathogenese der LCL gewonnen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die aus mikrodissezierten Proben der drei Subtypen isolierte RNA verwendet, um in einem speziellen Verfahren Expressionsprofile zu erstellen. Die Erstellung der Expressionsprofile erfolgte unter Verwendung eines speziell für die Analyse von Lymphomen optimierten Arrays („Lymphochip“). In unüberwachten hierarchischen Clusteranalysen ordneten sich aufgrund ähnlicher Expressionsprofile die SCL und die LCL jeweils in eine Gruppe. Ebenso bildeten die Proben aus den klein- und großzelligen Komponenten der SCL+LCL jeweils distinkte Cluster. Die Ergebnisse zeigen, dass für die groß- und kleinzelligen Komponenten der drei Subtypen jeweils ein typisches Transkriptionsprofil existiert, das die morphologischen Unterschiede auf transkriptioneller Ebene widerspiegelt. Des weiteren zeigten unüberwachte hierarchische Clusteranalysen der Expressionsdaten aller Lymphomproben eine hohe Ähnlichkeit zwischen den kleinen Zellen aus SCL und SCL+LCL einerseits, sowie den großen Zellen aus LCL und SCL+LCL andererseits. Diese Ähnlichkeiten spiegeln sich auch in der großen Übereinstimmung der mittels T-Test detektierten differentiell exprimierten Gene zwischen SCL und LCL bzw. den klein- und großzelligen Komponenten von SCL+LCL wider. Diese Ergebnisse sprechen hinsichtlich der Pathogenese von LCL für die bisher bevorzugte Hypothese einer kontinuierlichen Progression vom niedrigmalignen SCL zum hochmalignen LCL.

Die Validität des Ansatzes hinsichtlich der differentiell exprimierten Gene wurde in qRT-PCR- und immunhistochemischen Analysen exemplarisch bestätigt. Eines der gemeinsam in

LCL und großzelliger Komponente aus SCL+LCL überexprimierten Gene war Cathepsin L, das kürzlich als Aktivator des Transkriptionsfaktors CUTL1 beschrieben wurde. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CUTL1 in der großzelligen Komponente von SCL+LCL und einer Reihe weiterer diffus großzelliger B-Zell-Lymphome überexprimiert vorliegt. Funktionelle Untersuchungen unter Verwendung der siRNA Technik in der B-Lymphom-Zellinie MedB-1 ergaben für CUTL1 eine potentiell wichtige Rolle in der Wachstumsregulation von Lymphomzellen. Das mögliche Zusammenwirken von Cathepsin L und CUTL1 in der Pathogenese des B-Zell-Lymphoms des GI-Trakts muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

6. Literatur

Aisen,P. (2004). Transferrin receptor 1. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 2137-2143.

Akagi,T., Tamura,A., Motegi,M., Suzuki,R., Hosokawa,Y., Nakamura,S., Morishima,Y., Seto,M., and Taniwaki,M. (1999). Molecular cytogenetic delineation of the breakpoint at 18q21.1 in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. Genes Chromosomes. Cancer 24, 315-321.

al Sarireh,B. and Eremin,O. (2000). Tumour-associated macrophages (TAMS): disordered function, immune suppression and progressive tumour growth. J. R. Coll. Surg. Edinb. 45, 1-16.

Alizadeh,A.A., Eisen,M.B., Davis,R.E., Ma,C., Lossos,I.S., Rosenwald,A., Boldrick,J.C., Sabet,H., Tran,T., Yu,X., Powell,J.I., Yang,L., Marti,G.E., Moore,T., Hudson,J., Jr., Lu,L., Lewis,D.B., Tibshirani,R., Sherlock,G., Chan,W.C., Greiner,T.C., Weisenburger,D.D., Armitage,J.O., Warnke,R., Levy,R., Wilson,W., Grever,M.R., Byrd,J.C., Botstein,D., Brown,P.O., and Staudt,L.M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 403, 503-511.

Arends,J.E., Bot,F.J., Gisbertz,I.A., and Schouten,H.C. (1999). Expression of CD10, CD75 and CD43 in MALT lymphoma and their usefulness in discriminating MALT lymphoma from follicular lymphoma and chronic gastritis. Histopathology 35, 209-215.

Auer,I.A., Gascoyne,R.D., Connors,J.M., Cotter,F.E., Greiner,T.C., Sanger,W.G., and Horsman,D.E. (1997). t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. Ann. Oncol. 8, 979-985.

Banerjee,S.K., Weston,A.P., Zoubine,M.N., Campbell,D.R., and Cherian,R. (2000). Expression of cdc2 and cyclin B1 in Helicobacter pylori-associated gastric MALT and MALT lymphoma : relationship to cell death, proliferation, and transformation. Am. J. Pathol. 156, 217-225.

Barth,T.F., Bentz,M., Leithauser,F., Stilgenbauer,S., Siebert,R., Schlotter,M., Schlenk,R.F., Dohner,H., and Moller,P. (2001). Molecular-cytogenetic comparison of mucosa-associated marginal zone B-cell lymphoma and large B-cell lymphoma arising in the gastro-intestinal tract. Genes Chromosomes. Cancer 31, 316-325.

Barth,T.F., Dohner,H., Werner,C.A., Stilgenbauer,S., Schlotter,M., Pawlita,M., Lichter,P., Moller,P., and Bentz,M. (1998). Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. Blood 91, 4321-4330.

Bingle,L., Brown,N.J., and Lewis,C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. J. Pathol. 196, 254-265.

Cabras,A.D., Candidus,S., Fend,F., Kremer,M., Schulz,S., Bordi,C., Weirich,G., Hofler,H., and Werner,M. (2001). Biclonality of gastric lymphomas. Lab Invest 81, 961-967.

Cabras,A.D., Weirich,G., Fend,F., Nahrig,J., Bordi,C., Hofler,H., and Werner,M. (2002). Oligoclonality of a "composite" gastric diffuse large B-cell lymphoma with areas of marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type. Virchows Arch. 440, 209-214.

Chan,J.K., Ng,C.S., and Isaacson,P.G. (1990). Relationship between high-grade lymphoma and low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) of the stomach. Am. J. Pathol. 136, 1153-1164.

Cogliatti,S.B., Schmid,U., Schumacher,U., Eckert,F., Hansmann,M.L., Hedderich,J., Takahashi,H., and Lennert,K. (1991). Primary B-cell gastric lymphoma: a clinicopathological study of 145 patients. Gastroenterology 101, 1159-1170.

d'Amore,F., Christensen,B.E., Brincker,H., Pedersen,N.T., Thorling,K., Hastrup,J., Pedersen,M., Jensen,M.K., Johansen,P., Andersen,E., and . (1991). Clinicopathological features and prognostic factors in extranodal non-Hodgkin lymphomas. Danish LYFO Study Group. Eur. J. Cancer 27, 1201-1208.

Dierlamm,J., Baens,M., Wlodarska,I., Stefanova-Ouzounova,M., Hernandez,J.M., Hossfeld,D.K., Wolf-Peeters,C., Hagemeijer,A., Van den,B.H., and Marynen,P. (1999). The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21)p6ssociated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. Blood 93, 3601-3609.

Edwards,C.L. and Hayes,R.L. (1969). Tumor scanning with 67Ga citrate. J. Nucl. Med. 10, 103-105.

Eisen,M.B., Spellman,P.T., Brown,P.O., and Botstein,D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 14863-14868.

Feremans,W., Bujan,W., Neve,P., Delville,J.P., and Schandene,L. (1991). CD71 phenotype and the value of gallium imaging in lymphomas. Am. J. Hematol. 36, 215-216.

Gallamini,A., Biggi,A., Fruttero,A., Pugno,F., Cavallero,G., Pregno,P., Grasso,M., Farinelli,C., Leone,A., and Gallo,E. (1997). Revisiting the prognostic role of gallium scintigraphy in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. Eur. J. Nucl. Med. 24, 1499-1506.

Glasova,M., Konikova,E., Stasakova,J., and Babusikova,O. (1998). The relationship of HLA-DR, CD38 and CD71 markers to activation, proliferation and differentiation of some human leukemia and lymphoma cells. Neoplasma 45, 88-95.

Golub,T.R., Slonim,D.K., Tamayo,P., Huard,C., Gaasenbeek,M., Mesirov,J.P., Coller,H., Loh,M.L., Downing,J.R., Caligiuri,M.A., Bloomfield,C.D., and Lander,E.S. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 286, 531-537.

Goulet,B., Baruch,A., Moon,N.S., Poirier,M., Sansregret,L.L., Erickson,A., Bogyo,M., and Nepveu,A. (2004). A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. Mol. Cell 14, 207-219.

Gress,T.M., Muller-Pillasch,F., Geng,M., Zimmerhackl,F., Zehetner,G., Friess,H., Buchler,M., Adler,G., and Lehrach,H. (1996). A pancreatic cancer-specific expression profile. Oncogene 13, 1819-1830.

Habeshaw,J.A., Lister,T.A., Stansfeld,A.G., and Greaves,M.F. (1983). Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma. Lancet 1, 498-501.

Harris,N.L. and Isaacson,P.G. (1999). What are the criteria for distinguishing MALT from non-MALT lymphoma at extranodal sites? Am. J. Clin. Pathol. 111, S126-S132.

Harris,N.L., Jaffe,E.S., Diebold,J., Flandrin,G., Muller-Hermelink,H.K., Vardiman,J., Lister,T.A., and Bloomfield,C.D. (2000). The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting--Airlie House, Virginia, November, 1997. Hematol. J. 1, 53-66.

Hazar,B., Polat,G., Seyrek,E., Bagdatoglglu,O., Kanik,A., and Tiftik,N. (2004). Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. Int. J. Clin. Pract. 58, 139-143.

Hematology 2001. American Society of Hematology Education Program Book. Orlando, Florida, USA. December 7-11, 2001. Proceedings. Hematology. (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.) :1-552.

Hussell,T., Isaacson,P.G., Crabtree,J.E., and Spencer,J. (1993). The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to Helicobacter pylori. Lancet 342, 571-574.

Hussell,T., Isaacson,P.G., Crabtree,J.E., and Spencer,J. (1996). Helicobacter pylori-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. J. Pathol. 178, 122-127.

Isaacson,P.G. (1999). Gastric MALT lymphoma: from concept to cure. Ann. Oncol. 10, 637-645.

Janicek,M., Kaplan,W., Neuberg,D., Canellos,G.P., Shulman,L.N., and Shipp,M.A. (1997). Early restaging gallium scans predict outcome in poor-prognosis patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma treated with high-dose CHOP chemotherapy. J. Clin. Oncol. 15, 1631-1637.

Jin,Y.H. and Park,C.K. (2002). Expression of cyclin B1 and cdc2 in nodal non-Hodgkin's lymphoma and its prognostic implications. J. Korean Med. Sci. 17, 322-327.

Kaplan,W.D., Jochelson,M.S., Herman,T.S., Nadler,L.M., Stomper,P.C., Takvorian,T., Andersen,J.W., and Canellos,G.P. (1990). Gallium-67 imaging: a predictor of residual tumor viability and clinical outcome in patients with diffuse large-cell lymphoma. J. Clin. Oncol. 8, 1966-1970.

Kayser,K., Richter,N., Hufnagl,P., Kayser,G., Kos,J., and Werle,B. (2003). Expression, proliferation activity and clinical significance of cathepsin B and cathepsin L in operated lung cancer. Anticancer Res. 23, 2767-2772.

Korkolopoulou,P., Oates,J., Kittas,C., and Crocker,J. (1994). p53, c-myc p62 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-Hodgkin's lymphomas. J. Clin. Pathol. 47, 9-14.

Krugmann,J., Dirnhofer,S., Gschwendtner,A., Berresheim,U., Greil,R., Krugmann,K., and Fend,F. (2001). Primary gastrointestinal B-cell lymphoma. A clincopathological and immunohistochemical study of 61 cases with an evaluation of prognostic parameters. Pathol. Res. Pract. 197, 385-393.

Kurtin,P.J. (1999). How do you distinguish benign from malignant extranodal small B-cell proliferations? Am. J. Clin. Pathol. 111, S119-S125.

Lah,T.T., Kalman,E., Najjar,D., Gorodetsky,E., Brennan,P., Somers,R., and Daskal,I. (2000). Cells producing cathepsins D, B, and L in human breast carcinoma and their association with prognosis. Hum. Pathol. 31, 149-160.

Liu,H., Ye,H., Ruskone-Fourmestraux,A., de Jong,D., Pileri,S., Thiede,C., Lavergne,A., Boot,H., Caletti,G., Wundisch,T., Molina,T., Taal,B.G., Elena,S., Thomas,T., Zinzani,P.L., Neubauer,A., Stolte,M., Hamoudi,R.A., Dogan,A., Isaacson,P.G., and Du,M.Q. (2002). T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to H. pylori eradication. Gastroenterology 122, 1286-1294.

Lucas,P.C., Yonezumi,M., Inohara,N., McAllister-Lucas,L.M., Abazeed,M.E., Chen,F.F., Yamaoka,S., Seto,M., and Nunez,G. (2001). Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. J. Biol. Chem. 276, 19012-19019.

McAllister-Lucas,L.M., Inohara,N., Lucas,P.C., Ruland,J., Benito,A., Li,Q., Chen,S., Chen,F.F., Yamaoka,S., Verma,I.M., Mak,T.W., and Nunez,G. (2001). Bimp1, a MAGUK family member linking protein kinase C activation to Bcl10-mediated NF-kappaB induction. J. Biol. Chem. 276, 30589-30597.

Michl,P., Ramjaun,A.R., Pardo,O.E., Warne,P.H., Wagner,M., Poulsom,R., D'Arrigo,C., Ryder,K., Menke,A., Gress,T., and Downward,J. (2005). CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. Cancer Cell 7, 521-532.

Moller,P., Bruderlein,S., Strater,J., Leithauser,F., Hasel,C., Bataille,F., Moldenhauer,G., Pawlita,M., and Barth,T.F. (2001). MedB-1, a human tumor cell line derived from a primary mediastinal large B-cell lymphoma. Int. J. Cancer 92, 348-353.

Mueller,A., O'Rourke,J., Grimm,J., Guillemin,K., Dixon,M.F., Lee,A., and Falkow,S. (2003). Distinct gene expression profiles characterize the histopathological stages of disease in Helicobacter-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 100, 1292-1297.

Nanjangud,G., Rao,P.H., Hegde,A., Teruya-Feldstein,J., Donnelly,G., Qin,J., Jhanwar,S.C., Zelenetz,A.D., and Chaganti,R.S. (2002). Spectral karyotyping identifies new rearrangements, translocations, and clinical associations in diffuse large B-cell lymphoma. Blood 99, 2554-2561.

Ott,G., Katzenberger,T., Greiner,A., Kalla,J., Rosenwald,A., Heinrich,U., Ott,M.M., and Muller-Hermelink,H.K. (1997). The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. Cancer Res. 57, 3944-3948.

Peng,H., Du,M., Diss,T.C., Isaacson,P.G., and Pan,L. (1997). Genetic evidence for a clonal link between low and high-grade components in gastric MALT B-cell lymphoma. Histopathology 30, 425-429.

Reilly,J.J., Jr., Chen,P., Sailor,L.Z., Mason,R.W., and Chapman,H.A., Jr. (1990). Uptake of extracellular enzyme by a novel pathway is a major determinant of cathepsin L levels in human macrophages. J. Clin. Invest 86, 176-183.

Rittenhouse-Diakun,K., Van Leengoed,H., Morgan,J., Hryhorenko,E., Paszkiewicz,G., Whitaker,J.E., and Oseroff,A.R. (1995). The role of transferrin receptor (CD71) in photodynamic therapy of activated and malignant lymphocytes using the heme precursor delta-aminolevulinic acid (ALA). Photochem. Photobiol. 61, 523-528.

Rosenwald,A., Wright,G., Chan,W.C., Connors,J.M., Campo,E., Fisher,R.I., Gascoyne,R.D., Muller-Hermelink,H.K., Smeland,E.B., Giltnane,J.M., Hurt,E.M., Zhao,H., Averett,L., Yang,L., Wilson,W.H., Jaffe,E.S., Simon,R., Klausner,R.D., Powell,J., Duffey,P.L., Longo,D.L., Greiner,T.C., Weisenburger,D.D., Sanger,W.G., Dave,B.J., Lynch,J.C., Vose,J.,

Armitage,J.O., Montserrat,E., Lopez-Guillermo,A., Grogan,T.M., Miller,T.P., LeBlanc,M., Ott,G., Kvaloy,S., Delabie,J., Holte,H., Krajci,P., Stokke,T., and Staudt,L.M. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N. Engl. J. Med. 346, 1937-1947.

Rosenwald,A., Wright,G., Wiestner,A., Chan,W.C., Connors,J.M., Campo,E., Gascoyne,R.D., Grogan,T.M., Muller-Hermelink,H.K., Smeland,E.B., Chiorazzi,M., Giltnane,J.M., Hurt,E.M., Zhao,H., Averett,L., Henrickson,S., Yang,L., Powell,J., Wilson,W.H., Jaffe,E.S., Simon,R., Klausner,R.D., Montserrat,E., Bosch,F., Greiner,T.C., Weisenburger,D.D., Sanger,W.G., Dave,B.J., Lynch,J.C., Vose,J., Armitage,J.O., Fisher,R.I., Miller,T.P., LeBlanc,M., Ott,G., Kvaloy,S., Holte,H., Delabie,J., and Staudt,L.M. (2003). The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. Cancer Cell 3, 185-197.

Rossi,A., Deveraux,Q., Turk,B., and Sali,A. (2004). Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. Biol. Chem. 385, 363-372.

Sakata,K., Satoh,M., Someya,M., Asanuma,H., Nagakura,H., Oouchi,A., Nakata,K., Kogawa,K., Koito,K., Hareyama,M., and Himi,T. (2004). Expression of matrix metalloproteinase 9 is a prognostic factor in patients with non-Hodgkin lymphoma. Cancer 100, 356-365.

Scott,C.S., Ramsden,W., Limbert,H.J., Master,P.S., and Roberts,B.E. (1988). Membrane transferrin receptor (TfR) and nuclear proliferation-associated Ki-67 expression in hemopoietic malignancies. Leukemia 2, 438-442.

Starostik,P., Patzner,J., Greiner,A., Schwarz,S., Kalla,J., Ott,G., and Muller-Hermelink,H.K. (2002). Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. Blood 99, 3-9.

Stoffel,A., Rao,P.H., Louie,D.C., Krauter,K., Liebowitz,D.N., Koeppen,H., Le Beau,M.M., and Chaganti,R.S. (1999). Chromosome 18 breakpoint in t(11;18)(q21;q21) translocation associated with MALT lymphoma is proximal to BCL2 and distal to DCC. Genes Chromosomes. Cancer 24, 156-159.

Stratowa,C., Loffler,G., Lichter,P., Stilgenbauer,S., Haberl,P., Schweifer,N., Dohner,H., and Wilgenbus,K.K. (2001). CDNA microarray gene expression analysis of B-cell chronic

lymphocytic leukemia proposes potential new prognostic markers involved in lymphocyte trafficking. Int. J. Cancer 91, 474-480.

Streubel,B., Vinatzer,U., Lamprecht,A., Raderer,M., and Chott,A. (2005). T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. Leukemia 19, 652-658.

Taal,B.G., Boot,H., van Heerde,P., de Jong,D., Hart,A.A., and Burgers,J.M. (1996). Primary non-Hodgkin lymphoma of the stomach: endoscopic pattern and prognosis in low versus high grade malignancy in relation to the MALT concept. Gut 39, 556-561.

Talieri,M., Papadopoulou,S., Scorilas,A., Xynopoulos,D., Arnogianaki,N., Plataniotis,G., Yotis,J., and Agnanti,N. (2004). Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. Cancer Lett. 205, 97-106.

Tefferi,A., Bolander,M.E., Ansell,S.M., Wieben,E.D., and Spelsberg,T.C. (2002). Primer on medical genomics. Part III: Microarray experiments and data analysis. Mayo Clin. Proc. 77, 927-940.

Van Gelder,R.N., von Zastrow,M.E., Yool,A., Dement,W.C., Barchas,J.D., and Eberwine,J.H. (1990). Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 87, 1663-1667.

Weiner,R. (1990). The role of transferrin and other receptors in the mechanism of 67Ga localization. Int. J. Rad. Appl. Instrum. B 17, 141-149.

Willis,T.G., Jadayel,D.M., Du,M.Q., Peng,H., Perry,A.R., Abdul-Rauf,M., Price,H., Karran,L., Majekodunmi,O., Wlodarska,I., Pan,L., Crook,T., Hamoudi,R., Isaacson,P.G., and Dyer,M.J. (1999). Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. Cell 96, 35-45.

Wotherspoon,A.C., Finn,T.M., and Isaacson,P.G. (1995). Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. Blood 85, 2000-2004.

Wotherspoon,A.C., Ortiz-Hidalgo,C., Falzon,M.R., and Isaacson,P.G. (1991). Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet 338, 1175-1176.

Wright,G., Tan,B., Rosenwald,A., Hurt,E.H., Wiestner,A., and Staudt,L.M. (2003). A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 100, 9991-9996.

Zhang,Q., Siebert,R., Yan,M., Hinzmann,B., Cui,X., Xue,L., Rakestraw,K.M., Naeve,C.W., Beckmann,G., Weisenburger,D.D., Sanger,W.G., Nowotny,H., Vesely,M., Callet-Bauchu,E., Salles,G., Dixit,V.M., Rosenthal,A., Schlegelberger,B., and Morris,S.W. (1999). Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). Nat. Genet. 22, 63-68.

Zucca,E., Bertoni,F., Roggero,E., and Cavalli,F. (2000). The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. Blood 96, 410-419.

Zucca,E., Roggero,E., and Pileri,S. (1998). B-cell lymphoma of MALT type: a review with special emphasis on diagnostic and management problems of low-grade gastric tumours. Br. J. Haematol. 100, 3-14.

7. Anhang

Liste 2: Mikrodisserziertes Gewebe

Gruppe	Bezeichnung	Klinische Daten (bis 1998 verfolgt)	Überlebenszeit in Monaten	Beschriebene Abberationen	Herkunft
LCL	LCL-2	D	4	-	Magen
LCL	LCL-3	CR	62	-6q13q21	Magen
LCL	LCL-4	CR	69	+3q12q29	Dünndarm
LCL	LCL-5	CR	40	-	Magen
LCL	LCL-7	CR	39	+11q23q24, -13q14q31	Magen
LCL	LCL-8	CR	29	-	Magen
LCL	LCL-9	-	-	-	-
LCL	LCL-10	D	4	+12qter, +15	Magen
LCL	LCL-11	CR	86	-	Magen
LCL	LCL-13	CR	46	+9q22q34, +11q21q25	Magen
LCL	LCL-14	CR	1	+2p23p16, -6q12q24	Magen
LCL	LCL-16	D	13	+11q23q24,	Ileocoecal-Bereich
LCL	LCL-17	CR	47	+11q	Magen
LCL	LCL-25	-	-	-	Dünndarm

‚CR' = ‚complete remission' , -' = Verlust ‚Amp' = Amplifikation

‚D' = ‚death' ‚+' = Gewinn

Fortsetzung Liste 2: Mikrodisserziertes Gewebe

Gruppe	Bezeichnung	Klinische Daten (bis 1998 verfolgt)	Überlebenszeit in Monaten	Beschriebene Abberationen	Herkunft
SCL	SCL-2	_	_	+3, +18	Magen
SCL	SCL-3	_	_	_	Magen
SCL	SCL-4	_	_	_	Magen
SCL	SCL-5	_	_	2p14p15(Amp) +3, +18	Magen
SCL	SCL-6	_	_	t(11;18)	Magen
SCL	SCL-7	_	_	+3q25q29, -9q21.2q31, -13q14q22	Magen
SCL	SCL-9	_	_	_	Magen
SCL	SCL-10	_	_	+7, +12q13q21, +13q22q33, 17q23q24(Amp)	Lunge
SCL+LCL	(SCL+LCL)-LC-2	CR	15	+11q int	Magen
SCL+LCL	(SCL+LCL)-LC-3	D	3	+8qter	Magen
SCL+LCL	(SCL+LCL)-LC-4	_	_	_	_
SCL+LCL	(SCL+LCL)-LC-5	D	_	-2qint, +6q, -6qint, +8qter	Dünndarm
SCL+LCL	(SCL+LCL)-LC-6	_	_	_	_
SCL+LCL	(SCL+LCL)-LC-7	D	3	-6qter, +8qter, +11p, +11qint, 12p(Amp), +16q, +16p	Magen

‚CR' = ‚complete remission' ‚ -' = Verlust ‚Amp' = Amplifikation

‚D' = ‚death' ‚+' = Gewinn

Fortsetzung Liste 2: Mikrodisserziertes Gewebe

Gruppe	Bezeichnung	Klinische Daten (bis 1998 verfolgt)	Überlebenszeit in Monaten	Beschriebene Abberationen	Herkunft
SCL+LCL	(SCL+LCL)-LC-8	D	0.5	+1qint, 2pAmp, +2qter, -5qint, 2qint	Magen
SCL+LCL	(SCL+LCL)-LC-9	_	_	-x	Magen
SCL+LCL	(SCL+LCL)-LC-10	_	_	_	_
SCL+LCL	(SCL+LCL)-SC-2	CR	15	_	Magen
SCL+LCL	(SCL+LCL)-SC-4	_	_	-4, +8qter	_
SCL+LCL	(SCL+LCL)-SC-5	D	_	+8qter	Dünndarm
SCL+LCL	(SCL+LCL)-SC-6	_	_	_	_
SCL+LCL	(SCL+LCL)-SC-7	D	3	_	Magen
SCL+LCL	(SCL+LCL)-SC-8	D	0.5	_	Magen
SCL+LCL	(SCL+LCL)-SC-10	_	_	_	_

‚CR' = ‚complete remission' , -' = Verlust ‚Amp' = Amplifikation

‚D' = ‚death' ‚+' = Gewinn

Liste 3: Differentiell exprimierte Gene zwischen SCL und LCL

Gen	'IMAGE Clone ID'	'Gene ID' (RefSeq)	Mittelwert SCL	STABW SCL	Mittelwert LCL	STABW LCL	p-Wert des T-Tests	Verhältnis LCL/ SCL
EST XS284	local cDNA collection	n.a.	0.14	0.22	1.58	0.86	0.000	11.7
SDC1	local cDNA collection	n.a.	2.73	0.81	5.97	2.00	0.000	2.2
CTSC	1981245	NM_001814	1.52	0.65	5.09	2.37	0.000	3.4
EST XS114	local cDNA collection	n.a.	0.62	0.25	1.34	0.43	0.000	2.2
CSF3R (not sequence verified)	134369	NM_000760	0.31	0.15	0.88	0.39	0.000	2.9
EST 535/20	local cDNA collection	n.a.	3.72	1.67	10.08	4.66	0.000	2.7
GAPDH	local cDNA collection	H20929	3.49	1.52	7.39	2.59	0.000	2.1
GAPDH	local cDNA collection	R88968	1.32	0.95	3.56	1.38	0.000	2.7
SGK	248589	NM_005627	0.34	0.21	1.37	0.78	0.000	4.1
GAPDH	local cDNA collection	NM_002046	9.55	3.50	20.15	7.83	0.000	2.1
CDC2	898286	NM_001786	0.49	0.35	1.27	0.48	0.000	2.6
EST XS364	local cDNA collection	n.a.	0.26	0.13	0.65	0.30	0.000	2.5
TTG2 (not sequence verified)	712829	NM_005574	0.06	0.05	0.68	0.50	0.000	12.1
SGK	1840218	NM_005627	0.46	0.30	2.34	1.52	0.000	5.1
CD71 (not sequence verified)	588191	NM_003234	0.28	0.15	1.41	0.92	0.000	5.1
DHFR	1658970	NM_000791	0.19	0.28	0.75	0.30	0.001	3.9
GAPDH	local cDNA collection	X53778	4.18	1.85	9.35	4.06	0.001	2.2
CXCR6 (not sequence verified)	486696	NM_006564	0.33	0.23	1.10	0.63	0.001	3.3
GAPDH	local cDNA collection	R88955	3.04	1.92	6.91	2.55	0.001	2.3
GAPDH	local cDNA collection	R88955	1.43	0.76	3.04	1.13	0.001	2.1
EST XS004	local cDNA collection	n.a.	7.06	3.71	16.03	6.99	0.001	2.3
FIBRONECTIN	139009	NM_002026	0.32	0.17	2.68	2.05	0.001	8.3
PLAU	2404992	NM_002658	0.39	0.14	0.85	0.41	0.001	2.2
ILK	1353253	NM_004517	0.26	0.09	0.55	0.26	0.001	2.1
RRM2	local cDNA collection	NM_001034	0.51	0.30	1.05	0.35	0.001	2.1
COL3A1	local cDNA collection	NM_000090	0.26	0.11	2.46	2.10	0.002	9.5
FN1	local cDNA collection	NM_002026	0.77	0.38	5.59	4.61	0.002	7.2
ACP1	local cDNA collection	NM_004300	0.54	0.18	0.26	0.09	0.002	0.5
COL6A3	1678654	NM_004369	0.45	0.36	1.47	0.98	0.003	3.3
LGALS3	1707694	NM_002306	0.64	0.36	1.78	1.20	0.004	2.8
BCL2A1	814478	NM_004049	0.83	0.58	2.20	1.39	0.004	2.7
FES	1943890	NM_002005	1.12	0.30	5.05	4.27	0.004	4.5
PKM2	local cDNA collection	W21812	0.54	0.37	1.09	0.42	0.006	2.0
PSCD1	936576	NM_004762	1.15	0.54	0.40	0.17	0.006	0.3
HSPC150	428502	NM_014176	0.29	0.23	0.68	0.35	0.006	2.3
CTSB	261517	NM_001908	1.78	0.85	6.76	5.75	0.007	3.8
PKM2	local cDNA collection	Z36831	0.30	0.24	0.66	0.30	0.007	2.2
EST XS209	local cDNA collection	n.a.	5.64	3.18	1.43	0.74	0.007	0.3
MBTPS1	1402787	NM_003791	0.93	0.37	0.45	0.18	0.008	0.5
EST 603/4	local cDNA collection	n.a.	9.22	5.51	2.08	0.97	0.008	0.2
MMP2	155401	NM_004530	0.19	0.04	0.51	0.39	0.009	2.7
DUSP2	2316916	NM_004418	0.47	0.46	1.43	1.14	0.012	3.1
EST XS141	local cDNA collection	n.a.	0.58	0.28	0.25	0.11	0.013	0.4
EST XS185	local cDNA collection	n.a.	2.63	1.17	1.27	0.32	0.013	0.5
HSPB1	1913142	NM_001540	0.71	0.23	1.61	1.15	0.013	2.3
RPL10	512213	NM_006013	0.65	0.33	1.34	0.83	0.013	2.1
EST XS156	local cDNA collection	n.a.	1.17	0.58	0.51	0.24	0.014	0.4
EST XS181	local cDNA collection	n.a.	1.09	0.37	3.08	2.59	0.014	2.8
EST XS399	local cDNA collection	n.a.	0.68	0.45	1.41	0.84	0.014	2.1
GZMB	2176401	NM_004131	0.20	0.14	0.70	0.65	0.014	3.5
ABCA3	local cDNA collection	NM_001089	2.84	1.65	0.96	0.66	0.014	0.3
SYLD	local cDNA collection	NM_016250	1.65	1.09	0.43	0.28	0.015	0.3
CXCR4	local cDNA collection	NM_003467.1	15.35	9.29	5.00	1.68	0.016	0.3
TIMP3	754106	NM_000362	0.49	0.14	2.04	2.11	0.017	4.2
EIF4A2	local cDNA collection	D30655	5.49	2.73	2.50	0.90	0.017	0.5
CXCR4	2048274	NM_003467	5.24	3.24	1.73	0.73	0.018	0.3
TNC	local cDNA collection	NM_002160	0.23	0.17	0.62	0.52	0.019	2.7
VCAM-1	2221796	NM_001078	1.09	0.62	0.42	0.25	0.019	0.4
B-ATF	2108251	U15460	0.64	0.45	1.39	0.92	0.019	2.2
EST XS189	local cDNA collection	n.a.	6.69	4.18	2.23	1.15	0.019	0.3
EST XS400	local cDNA collection	n.a.	3.30	1.63	1.58	0.75	0.020	0.5
ITGB2	50503	NM_000211	3.04	1.25	6.20	4.29	0.021	2.0
FCERI	235155	NM_004106	0.70	0.17	2.54	2.62	0.021	3.6
IL11RA	811920	NM_004512	0.51	0.29	0.21	0.09	0.022	0.4
AIM	994958	NM_004833	0.46	0.27	0.99	0.73	0.025	2.2

Liste 3: Differentiell exprimierte Gene zwischen SCL und LCL

Gen	'IMAGE Clone ID'	'Gene ID' (RefSeq)	Mittelwert SCL	STABW SCL	Mittelwert LCL	STABW LCL	p-Wert des T-Tests	Verhältnis LCL/ SCL
EIF4A2	local cDNA collection	T53263	1.93	1.06	0.88	0.36	0.026	0.5
CCNL1	361274	AA016305	0.61	0.36	0.26	0.14	0.029	0.4
ITGA6	local cDNA collection	NM_000210	0.67	0.40	0.28	0.18	0.030	0.4
PPP1R10	2170520	NM_002714	0.58	0.30	0.27	0.30	0.033	0.5
EST XS387	local cDNA collection	n.a.	3.26	2.49	0.94	0.70	0.034	0.3
CTSL	1609274	NM_001912	1.30	0.51	3.83	4.01	0.036	2.9
EST XS194	local cDNA collection	n.a.	1.05	0.81	0.30	0.43	0.037	0.3
CD21	824695	NM_001877	1.33	1.12	0.31	0.49	0.038	0.2
CXCR4	1571630	NM_003467	8.72	5.14	4.07	1.76	0.038	0.5
SERPINA1	2294000	NM_000295	0.24	0.14	0.75	0.82	0.039	3.1
CCR7 (not sequence verified)	2345206	NM_001838	1.58	1.29	0.43	0.44	0.041	0.3
DP 23	local cDNA collection	n.a.	1.39	1.30	3.14	2.48	0.042	2.3
SCYA18	1160552	NM_002988	0.30	0.41	3.83	5.91	0.044	12.6
BTNL9	1305913	NM_152547	0.67	0.52	0.23	0.20	0.048	0.3
CNTN4	1543287	NM_175607	0.94	0.45	2.46	2.58	0.050	2.6
GAPDH	local cDNA collection	M33197	2.69	1.39	5.29	1.64	0.001	2.0
EST XS157	local cDNA collection	n.a.	0.47	0.30	0.93	0.39	0.006	2.0
TOP2A	248032	NM_001067	0.35	0.25	0.69	0.16	0.006	2.0
EST XS464	local cDNA collection	n.a.	0.56	0.37	1.11	0.46	0.007	2.0
PKM2	local cDNA collection	W21812	0.49	0.30	0.97	0.45	0.007	2.0
CASK	2343851	NM_003688	0.50	0.27	0.25	0.10	0.038	0.5

Liste 4: Differentiell exprimierte Gene zwischen klein (SC) - und großzelligen (LC) Komponenten aus SCL+LCL

Gen	'IMAGE Clone ID'	'Gene ID' (RefSeq)	Mittelwert (SCL+LCL)-SC	STABW (SCL+LCL)-SC	Mittelwert (SCL+LCL)-LC	STABW (SCL+LCL)-LC	p-Wert des T-Tests	Verhältnis (SCL+LCL)-LC/ (SCL+LCL)-SC
TUBA1	local cDNA collection	NM_006000	9.103	3.804	19.054	4.998	0.000	2.1
TUBA1	local cDNA collection	NM_006000	18.377	8.379	39.420	10.344	0.000	2.1
STK6	2237958	NM_003600	0.241	0.097	0.550	0.182	0.000	2.3
TUBA1	local cDNA collection	NM_006000	3.416	1.609	8.342	3.187	0.001	2.4
FN1	local cDNA collection	NM_002026	1.273	1.039	4.940	2.518	0.001	3.9
CYB561	376146	NM_001915	0.199	0.127	0.523	0.208	0.001	2.6
EST XS143	local cDNA collection	n.a.	0.326	0.151	0.660	0.197	0.001	2.0
EST XUD74	local cDNA collection	n.a.	7.466	3.010	15.327	5.294	0.002	2.1
FEN1	local cDNA collection	NM_004111	1.368	0.862	3.271	1.185	0.002	2.4
CDC2	898286	NM_001786	0.374	0.285	1.200	0.592	0.002	3.2
NQO2	local cDNA collection	J03934	0.809	0.292	0.277	0.155	0.002	0.3
NUSAP1	140677	R67964	0.456	0.190	0.947	0.364	0.003	2.1
CKS2	359119	NM_001827	1.067	0.542	2.303	0.882	0.003	2.2
RRM2	local cDNA collection	NM_001034	0.371	0.238	0.955	0.433	0.003	2.6
DHFR	1658970	NM_000791	0.260	0.270	1.237	0.770	0.003	4.8
FN1	139009	NM_002026	0.662	0.382	2.507	1.490	0.003	3.8
HSPC150	428502	NM_014176.1	0.224	0.170	0.568	0.241	0.004	2.5
CTSC	1981245	NM_001814	2.131	0.584	5.343	2.620	0.004	2.5
ENO1	local cDNA collection	n.a.	1.196	0.800	3.385	1.790	0.005	2.8
PRSS15	1959860	NM_004793	1.754	0.707	3.827	1.716	0.005	2.2
LHCGR	1620676	NM_000233	0.371	0.137	0.776	0.337	0.005	2.1
CCNB1	563130	NM_031966	0.377	0.214	0.805	0.320	0.005	2.1
SMN1	343317	NM_000344	2.828	1.446	6.171	2.699	0.005	2.2
CKS1B	1476198	X54941	2.414	2.086	7.685	4.457	0.006	3.2
ENX1	43456	U52965	0.535	0.364	1.168	0.451	0.006	2.2
ICAM2	1658707	NM_000873	0.522	0.210	0.220	0.114	0.008	0.4
EST XS320	local cDNA collection	n.a.	0.177	0.222	0.507	0.193	0.008	2.9
TXNIP	local cDNA collection	NM_006472	10.490	5.306	2.904	1.622	0.008	0.3
PSMB9	1989960	NM_002800	1.783	0.884	3.704	1.765	0.011	2.1
RIP	local cDNA collection	NM_032308	0.570	0.322	0.139	0.095	0.011	0.2
UBE2H	415621	NM_003344	0.391	0.272	0.822	0.346	0.012	2.1
VRK2	2125612	NM_018062	0.307	0.117	0.672	0.366	0.013	2.2
CXCR4	2048274	NM_003467	4.461	1.928	1.956	0.699	0.013	0.4
RB1	1308813	NM_000321	0.459	0.248	0.977	0.503	0.014	2.1
TOP2A	248032	NM_001067	0.262	0.190	0.575	0.282	0.015	2.2
FCERI	235155	NM_004106	1.039	0.363	2.327	1.383	0.017	2.2
CYBB	701100	NM_000397	2.387	1.813	5.759	3.372	0.018	2.4
HMG-Y	local cDNA collection	NM_145899	0.845	0.498	1.743	0.913	0.020	2.1
SGK	1840218	NM_005627	0.859	0.526	2.050	1.285	0.021	2.4
CTGF	local cDNA collection	NM_001901	0.820	0.267	3.261	2.768	0.021	4.0
TRADD	local cDNA collection	NM_003789	1.687	0.952	0.581	0.385	0.021	0.3
ADAM17	182177	NM_003183	5.412	2.266	2.654	1.815	0.021	0.5
COL3A1	local cDNA collection	NM_000090	0.459	0.242	2.255	2.050	0.022	4.9
CALM3	2345165	NM_005184	1.575	0.785	3.353	1.941	0.022	2.1
CDK2	2063791	NM_001798	0.366	0.315	0.747	0.256	0.023	2.0
CD71	588191	NM_003234	0.325	0.160	0.971	0.738	0.023	3.0
ENO1	local cDNA collection	NM_005945	0.423	0.316	1.158	0.812	0.023	2.7
HLA-E	1303315	NM_005516	4.722	2.380	2.068	1.063	0.025	0.4
CTSB	261517	NM_001908	2.514	1.235	5.382	3.266	0.026	2.1
HDGF	local cDNA collection	D16431	0.238	0.227	0.616	0.408	0.028	2.6
PK3	local cDNA collection	n.a.	2.088	1.690	4.457	2.361	0.029	2.1
SQLE	local cDNA collection	NM_003129	0.316	0.231	0.670	0.374	0.029	2.1
PKM2	local cDNA collection	Z36831	0.361	0.273	0.820	0.516	0.032	2.3
PLAU	local cDNA collection	NM_002658	0.259	0.122	0.647	0.477	0.032	2.5
CYCS	local cDNA collection	NM_018947	0.776	0.367	0.365	0.327	0.035	0.5
CIB1	2408155	NM_006384	1.011	0.506	0.489	0.270	0.036	0.5
SSBP	1951716	NM_003143	2.743	0.926	6.483	4.769	0.036	2.4
PSMB7	local cDNA collection	D56024	0.640	0.575	1.713	1.318	0.040	2.7
PGK1	local cDNA collection	NM_000291	0.301	0.090	0.724	0.571	0.045	2.4
SPHK1	1681960	NM_021972	0.197	0.049	0.525	0.447	0.046	2.7
CCL14	local cDNA collection	NM_004166	4.502	1.216	8.966	2.650	0.000	2.0
PLAU	2404992	NM_002658	0.587	0.176	1.155	0.495	0.006	2.0
GAPDH	local cDNA collection	R88968	1.495	0.900	2.966	1.185	0.011	2.0
BIRC5	local cDNA collection	NM_001168	0.809	0.320	0.409	0.111	0.015	0.5
CTSL	1609274	NM_001912	2.554	1.565	5.071	2.369	0.019	2.0
EEF1G	local cDNA collection	Z11531	6.905	3.221	3.470	1.217	0.030	0.5
ICAM1	293413	NM_000201	45.333	23.276	23.138	10.702	0.047	0.5

Danksagungen

Herrn Prof. Adler danke ich für die Möglichkeit der Erstellung einer Dissertationsarbeit in der Abteilung Innere 1.

Herrn Prof. Thomas Gress danke ich für die Überlassung des Themas und die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Dr. Thomas Barth und Marc Weniger bedanke ich mich für die erstklassige Zusammenarbeit bei der Durchführung unseres Kooperationsprojektes.

Dr. Patrick Michl und Dr. Malte Buchholz danke ich für die gute Betreuung, die anregenden Diskussionen und wertvollen Kritiken.

Mein Dank gilt Dr. Hans Kestler für die Betreuung der bioinformatischen Auswertungen dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Caroline Gschwendtner, Kerstin Jungert, Steffi Ripka, Hicran Schuler, Susanne Braun, Anita Buck und Claudia Ruhland, für das gute Arbeitsklima, den regen Gedankenaustausch, den Spaß an der Zusammenarbeit und das ein oder andere „Ohr“ in schweren Zeiten.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mir nicht nur in der Zeit meiner Promotion jede Unterstützung zukommen ließen.

.