

Aus der Klinik für Innere Medizin
Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie/Immunologie
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Neubauer
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit
dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

B-Zell stimulatorische Faktoren der TNF-Familie bei MALT-Lymphomen des Magens

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Visvakanth Sivanathan
aus
Mundel (Sri Lanka)

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
04. März 2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: PD Dr. med. T. Wündisch

Korreferent: Prof. Dr. med. Barth

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	5
1.1	Zielsetzung	5
1.2	MALT-Lymphom des Magens	5
1.2.1	Genetische Veränderungen	6
1.3	B-Zell stimulatorische Faktoren der TNF-Familie	7
1.3.1	Vorkommen & Struktur.....	8
1.3.2	Signalwege der Rezeptoren.....	9
1.3.3	BAFF und B-Zellen Homöostase	10
1.3.4	Mit dem BAFF-System assoziierte Krankheitsmodelle.....	11
1.4	Fragestellung.....	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Versuchsablauf.....	13
2.2	Patientenkollektiv.....	13
2.2.1	Magenbiopsien (Tumor, Antrum & Corpus, Gastritiden)	13
2.3	Probenaufbereitung.....	14
2.3.1	Etablierung der RNA-Extraktion	14
2.3.1.1	RNA Extraktion mittels RNAzol	14
2.3.1.2	RNA Extraktion mit Qiagen Kit	15
2.4	Messung der DNA & RNA-Konzentrationen	17
2.4.1	Spektralphotometrische RNA-Konzentrationsmessung	17
2.4.2	RNA-Quantifikation am Tagman	18
2.5	Reverse Transkription	19
2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.6.1	Qualitative PCR (β -Actin PCR)	21
2.6.1.1	Vorgehen bei der β -Actin RT-PCR	22
2.6.2	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	23
2.6.2.1	Schmelzkurve	25
2.6.2.2	Optimierung der RT-PCR Amplifikation	25
2.6.2.3	Etablierung der Annealingtemperatur	26
2.6.2.4	Etablierung der $\delta\delta$ -CT-Methode – Validierungsexperimet.....	28

2.7	Gelelektrophorese	28
2.7.1	Elektrophorese mit Agarosegel.....	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Etablierung der RNA Extraktion	30
3.2	Optimierung der Annealingtemperatur	30
3.3	Etablierung der $\delta\delta$ -CT-Methode.....	31
3.4	RT-PCR der einzelnen Patienten.....	32
3.4.1	Relative Expression von BAFF, APRIL, BAFF-R und TACI	34
3.4.2	Zusammenfassung der Relativen Expressionen	36
3.5	Statistische Auswertung	39
3.6	Zusammenfassung der statistischen Auswertung	46
4	Diskussion	48
4.1	Allgemeine Diskussion	48
4.2	Ergebnisorientierte Diskussion.....	53
5	Zusammenfassung	57
5.1	Englische Zusammenfassung	58
6	Anhang	60
6.1	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	60
6.2	Abbildungsverzeichnis & Abbildungen	61
6.3	Abkürzungsverzeichnis	68
6.4	Statistische Auswertung	71
6.5	Tabellenverzeichnis.....	76
6.6	Quellen	77
6.7	Publikation	84
6.8	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	84
6.9	Danksagung	85

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung

MALT-Lymphome des Magens entstehen auf dem Boden einer chronischen Entzündung der Magenschleimhaut, die durch eine Infektion mit *Helicobacter pylori* (HP) hervorgerufen wird. Die Eradikation von HP kann in frühen Stadien zu einer kompletten Remission des Lymphoms führen. Dies und die Tatsache, dass die Proliferation von Lymphomzellen in vitro auf die Anwesenheit von T-Zellen angewiesen ist, legt nahe, dass zur Ausbildung der malignen Transformation stimulatorische Signale notwendig sind.

Mit BAFF ist ein stark B-Zell stimulatorischer Faktor identifiziert worden, der wie APRIL, ein weiteres Mitglied der Tumor Nekrose Faktor Familie (TNF), an dieselben Rezeptoren - BCMA, TACI und BAFF-R - bindet, so dass hier eine interessante Verbindung zwischen B-Zell-Stimulation und Tumorgenese vorliegen könnte.

In der vorliegenden Arbeit soll daher die Expression von BAFF, APRIL sowie ihrer Rezeptoren BAFF-R und TACI in MALT-Lymphomgewebe untersucht werden, um Hinweise für eine mögliche Rolle in der Lymphomgenese zu erhalten.

Dazu wurde die relative Expression der Liganden und ihrer Rezeptoren mittels quantitativer Real-Time PCR gemessen. Für die Untersuchung standen Magenbiopsien von MALT-Lymphom Patienten und Biopsien mit Lymphfollikelbildung von Patienten mit einer HP-positiven Gastritis (Gastritiden) zur Verfügung. Von den Proben der MALT-Lymphom Patienten waren Biopsien vom Lymphomgewebe (Tumor) und Biopsien vom organisierten lymphatischen Gewebe ohne histologischen Lymphomnachweis (Antrum und Corpus) vorhanden.

1.2 MALT-Lymphom des Magens

Das MALT Lymphom wurde zum ersten Mal von Isaacson und Wright beschrieben (Isaacson and Wright 1983). Es wird auch als extranodales Marginalzonen B-Zell-Lymphom vom MALT Typ bezeichnet. Es ist am häufigsten im Magen lokalisiert und macht etwa 50% aller Magenlymphome aus (Freedman 2004).

Nachdem das MALT-Konzept 1983 von Isaacson und Wright entwickelt worden war, wurde 1988 zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen erworbenen MALT des Magens und HP-Infektionen vermutet (Übersicht in: Stolte, Bayerdorffer et al. 2002). E. Zucca und Kollegen wiesen 2000 in Biopsien von chronischen HP-Gastritiden B-Zell Klone nach, aus denen sich später ein MALT-Lymphom entwickelt hat (Zucca, Bertoni et al. 2000). Auch konnte gezeigt werden, dass die neoplastischen B-Zellen einer klonalen Evolution unterliegen und eine genetische Alteration fortschreitet (Thiede, Alpen et al. 1998). In-vitro Untersuchungen mit in Kultur genommenen MALT-Lymphomzellen demonstrierten, dass die neoplastischen Zellen in einer stammspezifischen Antwort auf HP proliferieren. Diese Antwort ist abhängig von der durch das Bakterium induzierten T-Zell-Aktivierung (Hussell, Isaacson et al. 1993; Hussell, Isaacson et al. 1996).

1.2.1 Genetische Veränderungen

Bekannte genetische Veränderungen bei gastralen MALT Lymphomen sind die Translokation t(11;18) (q21;q21) und t(1,14) (p22;q32) (Alpen, Neubauer et al. 2000; Liu, Xu et al. 2002; Isaacson and Du 2004). Auch die Trisomien 3, 12, 18, die Mutationen der Gene p53/LOH, p15 und die p16 Promoter-Methylierungen, sowie die Mutationen im FAS-Gen finden sich in MALT Lymphomen (Alpen, Neubauer et al. 2000; Liu, Xu et al. 2002; Isaacson and Du 2004; Nakagawa, Seto et al. 2006).

Die Translokation t(11;18), die 1999 zum ersten Mal beschrieben wurde, ist mit 25% bis 40% die am häufigsten gefundene Translokation in MALT Lymphomen (Übersicht in: Cavalli, Isaacson et al. 2001; Freedman 2004). Sie wird oft als einzige Translokation detektiert, ist assoziiert mit einem Nichtansprechen auf die HP-Eradikationstherapie, hat eine höhere Prävalenz in HP-negativen als in HP-positiven MALT-Lymphomen, wird häufiger in fortgeschrittenen Fällen mit einem lokalen Lymphknotenbefall nachgewiesen (Alpen, Neubauer et al. 2000; Liu, Xu et al. 2002; Nakamura, Matsumoto et al. 2003) und findet sich signifikant häufiger in MALT-Lymphomen, bei dem CagA-positive-HP-Stämme nachzuweisen sind (Ye, Liu et al. 2003). Sie führt zu einem Fusionsprotein, bestehend aus dem für den Apoptoseinhibitor cIAP2 (engl.: „inhibitor of apoptosis“) kodierenden Gen (API2) auf Chromosom 11 und dem MALT1-Protein (engl.: „mucosa-associated

lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1) (Dierlamm, Baens et al. 1999). API2 gehört zur Familie der IAPs (inhibitor of apoptosis), die Apoptose inhibieren, indem sie die biologische Aktivität von Kaspasen hemmen. Kaspasen sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose. Das MALT1/MLT ist eine Parakaspase, eine Kaspase ähnliche Protease, die unter physiologischen Bedingungen mit ihren Immunglobulin ähnlichen Domänen an BCL10 bindet und die nukleäre NF-kappaB Aktivität erhöht.

Morphologisch sind keine Unterschiede zwischen Translokation t(11;18) oder t(1;14) positiven und MALT-Lymphomen ohne Nachweis dieser Translokationen festzustellen (Hu, Du et al. 2006). Bei der Translokation t(11;18) und der Translokation t(1;14) sind jeweils eine schwache zytoplasmatische MALT1-Expression und eine starke nukleäre BCL10-Expression nachzuweisen (Willis, Jadayel et al. 1999; Zhang, Siebert et al. 1999). Beide Translokationen beeinflussen denselben Signalweg, der in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB resultiert.

Ein wichtiger Effekt nach B- und T-Zellrezeptorstimulation ist eine NF-kappaB-Aktivierung (Lucas, Yonezumi et al. 2001; Lucas, McAllister-Lucas et al. 2004; Zhou, Du et al. 2005). NF-kappaB gehört zur Familie der Transkriptionsfaktoren, die eine essentielle Rolle bei inflammatorischen und angeborenen Immunantworten spielen (Li and Verma 2002).

In Malt-Lymphomen mit der t(11,18) führt dessen Fusionsprotein cIAP2-MALT zu einer stärkeren Aktivierung von NF-kappaB als Wildtyp MALT1 (Zucca, Bertoni et al. 2000).

1.3 B-Zell stimulatorische Faktoren der TNF-Familie

BAFF (engl.: B cell activation factor of the TNF family, TALL1, THANK, BLyS, zTNF4, TNFSF 13b) und APRIL (engl.: A proliferation-inducing ligand, TRDL1, TALL-2 TNFSF 13a) sind zwei Liganden, die zur TNF (Tumornekrosefaktor) Familie gehören (Schneider, MacKay et al. 1999). Beide können an BCMA (engl.: B cell maturation antigen, TNFRSF 17) und TACI (engl.: Transmembrane activator und Calcium modulator and Cylophilin Ligand interactor, TNFRSF 13b) binden (von Bulow and Bram 1997; Gross, Johnston et al. 2000; Marsters, Yan et al. 2000; Rennert, Schneider et al. 2000; Thompson, Schneider et al. 2000; Wu, Bressette et al. 2000; Yu, Boone et al. 2000; Xu and Lam 2001).

BAFF-R (TNFRSF 13c, BR3) ist ein weiterer Rezeptor, der nur spezifisch BAFF bindet (Thompson, Bixler et al. 2001; Yan, Brady et al. 2001). Auch die Rezeptoren gehören zur TNF-Familie. Die für die Proteine kodierende DNA ist jeweils an folgenden Chromosomen lokalisiert: BAFF – Chromosomen 13 (13q34) (Moore, Belvedere et al. 1999; Schneider, MacKay et al. 1999; Jiang, Ohtsuji et al. 2001), APRIL – an Chromosomen 17 (17p13.1) (Kelly, Manos et al. 2000), BAFF-R – an Chromosomen 22 (22q13.2) (Mackay, Schneider et al. 2003), TACI – an Chromosomen 17 (17p11.2) (Mackay, Schneider et al. 2003), BCMA – an Chromosomen 16 (16p13.1) (Mackay, Schneider et al. 2003).

1.3.1 Vorkommen & Struktur

Proteine der TNF-Liganden-Familie haben eine trimäre Struktur und sind an der Oberfläche von Zellen lokalisiert. (Mackay, Schneider et al. 2003). BAFF hat 20 – 30% Ähnlichkeiten mit 16 anderen Liganden der gleichen Familie und ca. 50% Ähnlichkeiten mit APRIL (Mackay, Schneider et al. 2003).

BAFF wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, vorwiegend von peripheren Leukozyten im Blut, Stromazellen der Milz und der Lymphknoten (Dejardin, Droin et al. 2002; Mackay, Schneider et al. 2003; Lesley, Xu et al. 2004). BAFF kommt sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form vor. Membrangebundenes BAFF kommt auf humanen Monozyten und auf dendritischen Zellen von Mäusen vor (Moore, Belvedere et al. 1999; Nardelli, Belvedere et al. 2001). Auch auf Zellen, die die Speicheldrüsen von Sjögren's Syndrom Patienten infiltrieren, findet sich BAFF (Groom, Kalled et al. 2002). Normale B-Zellen exprimieren weder BAFF noch APRIL (Dillon, Gross et al. 2006).

APRIL wird von Monozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen, T-Zellen, Osteoklasten und von einigen Tumorzellen exprimiert (Mackay, Schneider et al. 2003; Dillon, Gross et al. 2006). Seine Synthese wird durch ähnliche Faktoren wie auch BAFF stimuliert. Dazu gehören unter anderem IFN- α (Interferon), IFN- γ , CD40L, PAMPs (engl.: Pathogen-associated molecular patterns) (Dillon, Gross et al. 2006). Es wird nur in löslicher Form produziert und wirkt sowohl als kostimulatorischer Faktor bei der Proliferation von B- und T-Zellen, als auch von nicht lymphoiden Tumorzellen (Dillon, Gross et al. 2006; Woodland, Schmidt et al. 2006).

Die Rezeptoren werden primär auf B-Zellen exprimiert. Ihr Expressionsmuster ändert sich während der Entwicklung der verschiedenen B-Zellen. Auf unreifen frühen B-Zellen des Knochenmarks ist ihre Expression minimal. BAFF-R findet sich auf allen reifen B-Zellen der Milz, Lymphknoten und im peripheren Blut. TACI hingegen wird vorwiegend auf T2 B-Zellen, Marginalzonen B-Zellen und B1 B-Zellen exprimiert, wohingegen es in follikulären und B-Zellen im Keimzentrum herunterreguliert ist. Die Expression von BCMA findet sich weitestgehend auf Keimzentrums-B-Zellen (engl.: germinal center B cell) und Plasmazellen des Knochenmarks (Sutherland, Mackay et al. 2006). Aber auch auf T-Zellen wurden BAFF-R und TACI nachgewiesen (Sutherland, Mackay et al. 2006). Alle drei Rezeptoren und auch BAFF konnten auf der Zelloberfläche von Plasmazytomzellen nachgewiesen werden (Novak, Darce et al. 2004). Es wird vermutet, dass ein dritter noch unbekannter Rezeptor APRIL binden kann. (Schneider, Mackay et al. 1999; Rennert, Schneider et al. 2000).

1.3.2 Signalwege der Rezeptoren

In Abbildung 2 wird die Interaktion und Expression der Liganden und der Rezeptoren dargestellt.

Die Signaltransduktionswege der drei Rezeptoren sind nur zum Teil bekannt und verstanden. TNF-Rezeptoren triggern Apoptose oder das Überleben von Zellen mit Hilfe von Death domain containing proteins, TNF receptor associated factors (TRAFs) und einigen rezeptorspezifischen Proteinen. Death domain motifs fehlen allerdings bei allen genannten Rezeptoren (Mackay, Schneider et al. 2003). TRAF-Proteine können NF- κ B und MAPK Signalwege aktivieren. Die antiapoptotische Funktion von NF- κ B könnte im Einklang mit den überlebenfördernden Funktionen von BAFF und APRIL stehen (Karin and Ben-Neriah 2000; Baud and Karin 2001; Mackay, Schneider et al. 2003).

Die intrazelluläre Domäne von BCMA enthält drei TRAF-Bindungsseiten (TRAF1, 2 & 3), wobei wahrscheinlich nur eine aktiv ist (Mackay and Browning 2002; Mackay and Mackay 2002; Plas, Rathmell et al. 2002; Mackay, Schneider et al. 2003; Cancro 2008). TRAF aktiviert seinerseits folgenden Proteine: NF- κ B, p38, MAPK, JNK (Hatzoglou, Roussel et al. 2000).

TACI, das auch Bindungseinheiten für TRAF2, 5 und 6 enthält, aktiviert NF- κ B

(von Bulow and Bram 1997) und AP-1, dass weiter NF-AT aktiviert (Cancro 2008). Zusätzlich interagiert es mit CAML (Calcium modulator and Cylophilin Ligand), das seinerseits die Kalzium abhängige Phosphatase Calcineurin reguliert (von Bulow and Bram 1997; Xia, Treanor et al. 2000). Calcineurin desphosphoryliert NF-AT (ein Transkriptionsfaktor), das vom Zytoplasma in den Nukleus dissoziieren kann.

Der Zytoplasmatische Anteil von BAFF-R enthält ebenfalls eine TRAF-Bindungsseite (TRAF3), die den NF-kappa B Signaltransduktionsweg aktivieren kann (Lucas, McAllister-Lucas et al. 2004; Ely, Kodandapani et al. 2007; Cancro 2008). Es wird spekuliert, dass BAFF-R durch Antiapoptose fördernde oder Apoptose verringernde Wege, wie z.B. durch die Aktivität der Bcl-Familie, das Überleben von Zellen unterstützt (Mackay, Schneider et al. 2003). Denn transgene Bcl-2 und Bim (Bcl-2 Antagonist) defiziente Mäuse, wie auch transgene BAFF-Mäuse zeigen B-Zellhyperplasie und Autoimmunität (Strasser, Whittingham et al. 1991; Bouillet, Metcalf et al. 1999; Mackay, Woodcock et al. 1999; Khare, Sarosi et al. 2000). Transgene BAFF-Mäuse zeigten bei FACS Analysen auch erhöhte Bcl-2 Werte (Mackay, Woodcock et al. 1999). Des weiteren zeigen transitionale B-zellen von A/WySJ Mäusestämmen, deren BAFF-R Gen dysreguliert ist, eine erhöhte Expression des proapoptotischen Gens „engl.: Bike-like killer gene (Blk)“ (Amanna, Clise-Dwyer et al. 2001).

1.3.3 BAFF und B-Zellen Homöostase

Für das BAFF-System konnte eine Beeinflussung der B-Zellen Entwicklung nachgewiesen werden. Dass BAFF, ein das Überleben fördernder Faktor von B-Zellen ist, zeigt sich in ausgedehnten Kompartimenten von B-Zellen, wo es überexprimiert ist. Dieser stimulierende Effekt auf B-Zellen wurde auch in in vitro Versuchen nachgewiesen. BAFF spielt aber nicht für alle B-Zellen während ihrer Entwicklung eine gleich große Rolle. Für die unreifen B-Zellen im Knochenmark und für das Überleben von unreifen B-Zellen oder T1 B-Zellen der Milz, ist BAFF nicht entscheidend. Auch für die Entwicklung der B1-Zellen scheint sowohl BAFF, als auch ARPIL nicht bedeutend zu sein. Die Funktion von BAFF für die Bildung und das Überleben von Memory B-Zellen ist nicht bekannt. Aber die Entwicklung der T2 B-Zellen, reifen B-Zellen und der Marginalzonen B-Zellen sind BAFF abhängig. Dabei scheint BAFF nicht die Zellproliferation, sondern vielmehr das

Überleben von reifen B-Zellen zu beeinflussen (Mackay, Schneider et al. 2003).

Die Expansion von antigenspezifischen Plasmazellen benötigen ebenfalls BAFF und auch APRIL kann über BCMA das Überleben von Plasmazellen verbessern (Mackay, Schneider et al. 2003; Dillon, Gross et al. 2006).

Bei der Reifung von B-Zellen scheinen TACI und BCMA keine Rolle zu spielen. Denn Mäuse, denen es an TACI, BCMA oder sowohl an TACI als auch BCMA fehlte, zeigten eine normale Reifung der B-Zellen. Hingegen ähnelten Mäuse (A/WySnJ) mit einer Mutation des BAFF-R Gens solchen, die BAFF (-/-) defizient sind (Mackay, Schneider et al. 2003). Jedoch scheint TACI die B-Zellen Homöostase negativ zu regulieren. Ein Mangel an TACI zeigt sich durch einen Anstieg von reifen B-Zellen.

1.3.4 Mit dem BAFF-System assoziierte Krankheitsmodelle

Ein pathologisches Expressionsmuster des BAFF-Systems ist assoziiert mit autoimmunen Erkrankungen (Systemischer Lupus erythematoses (SLE), Rheumatoide Arthritis (RA), Multipler Sklerose (MS) oder Sjögren's Syndrom (SjS), HIV) und hämatologischen Tumorerkrankungen (Non Hodgkin Lymphom (NHL), B-CLL, Multiplem Myelom (MM), Morbus Waldenström (MW)) (Mackay, Schneider et al. 2003; Dillon, Gross et al. 2006).

1.4 Fragestellung

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, beeinflussen BAFF und APRIL mit ihren Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA die B-Zellen Homöostase. Eine Über- und Unterexpression dieser Liganden oder ihrer Rezeptoren führen zu verschiedenen Störungen während der Entwicklung und Proliferation von B-Zellen. Eine erhöhte Expression von BAFF und APRIL geht mit autoimmunen Erkrankungen (Sjögren's Krankheit, Rheumatische Arthritis, Systemischer Lupus Erythematoses), Immundefizienz und B-Zellen Lymphomen einher (Tangye, Bryant et al. 2006). Eine hohe Expression von BAFF und APRIL findet sich insbesondere in B-Zell Lymphomen, die von reifen B-Zellen ausgehen (Tangye, Bryant et al. 2006), wie Chronische lymphatische Leukämie, Multiples Myelom oder Morbus Waldenström. Sie scheinen eine Rolle bei der Entstehung, der Entartung und beim Überleben dieser Zellen zu spielen, indem sie

Apoptoseproteine (Bak, Blk, Bim (Tangye, Bryant et al. 2006)) inhibieren und Anitapoptoseproteine (Al, bcl-2, bcl-XL, Mcl-1 (Tangye, Bryant et al. 2006)) stimulieren (He, Chadburn et al. 2004).

BAFF und APRIL könnten auch die Pathogenese des Marginalzonen B-Zellen-Lymphom vom MALT Typ des Magens beeinflussen. Deshalb haben wir die Expression dieser Liganden und Rezeptoren im MALT-Lymphomgewebe im Vergleich zu MALT-Gewebe desselben Patienten sowie mit MALT-Gewebe von Patienten mit HP positiver Gastritis mit Lymphfollikellbildung verglichen. Unsere Hypothese ist, dass BAFF und April im Lymphomgewebe höher exprimiert ist.

Bisherige Studien zeigen, dass reife B-Zellen sowie die Zellen einer Chronischen lymphatischen Leukämie TACI und BAFF-R exprimieren. Plasmazytomzellen dagegen exprimieren alle drei Rezeptoren. BAFF-R und BCMA haben einen stimulatorischen Effekt auf die B-Zellen und wirken durch Regulierung verschiedener Proteine antiapoptotisch (Tangye, Bryant et al. 2006). Deshalb vermuten wir, dass auch BAFF-R und BCMA im Lymphomgewebe hochreguliert sind.

TACI hingegen hat als ein inhibitorischer Rezeptor von BAFF und APRIL einen negativen Effekt auf die B-Zellen Homöostase (Tangye, Bryant et al. 2006). Auf normalen B-Zellen fördert es die Apoptose, aber es wird auch vermutet, dass es bei NHL Zellen antiapoptotisch wirkt. Einige Autoren sehen TACI im Zusammenspiel mit BAFF-R und BCMA. Dabei ist die Expression von BAFF-R und BCMA in Tumorzellen hochreguliert und die von TACI runterreguliert (Tangye, Bryant et al. 2006). Demzufolge erwarten wir eine niedrigere Expression von TACI im Tumorgewebe, als im Gastritisgewebe oder im lymphomfernen MALT-Gewebe.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsablauf

Die Untersuchungen wurden an Magenbiopsien von Patienten mit MALT Lymphom und Patienten mit einer HP-Gastritis (28 Proben) durchgeführt. Von den MALT Lymphom Patienten wurde Biopsiematerial sowohl aus dem Lymphom (24 Proben) als auch von zwei tumorfernen Biopsien (23 Corpus und 20 Antrum Proben), die histologisch organisiertes lymphatisches Gewebe ohne ein Anhalt für ein MALT-Lymphom zeigten, untersucht.

Zunächst wurde die RNA aus den Biopsien extrahiert und daraus cDNA synthetisiert. Letztere wurde dann als Ausgangsmaterial für die PCR benutzt. Es wurden geeignete Primerpaare entworfen und die optimalen PCR Bedingungen ausgetestet. Anschließend wurde, nach Etablierung der Methoden (z.B. $\Delta\Delta$ CT Methode), die relative Expression der vier zu untersuchenden Gene unter Anwendung der quantitativen Echtzeit PCR gemessen. Da nach Extraktion der RNA nur ausreichend Material für die Analyse von vier Genen zur Verfügung stand, wurde auf die Untersuchung von BCMA verzichtet.

2.2 Patientenkollektiv

2.2.1 Magenbiopsien (Tumor, Antrum & Corpus, Gastritiden)

Die Biopsien rekrutierten sich aus 2 prospektiven multizentrischen Studien, in deren Rahmen Gefriermaterial asserviert wurde (Fischbach, Goebeler-Kolve et al. 2004; Wundisch, Thiede et al. 2005). In diesen Studien wurden Patienten mit HP positiven MALT-Lymphomen des Magens im Stadium IE der Ann Arbor Klassifikation modifiziert nach Musshoff behandelt. Es standen Proben aus dem makroskopisch infiltriertem Areal, sowie dem tumorfernen Antrum und dem Corpus zur Verfügung. Die Biopsien sind direkt nach der Gewinnung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° gelagert worden. Die Untersuchungen wurden an diesen Proben retrospektiv durchgeführt. Als weiteres Kollektiv wurden Biopsien von Patienten mit einer HP-Gastritis und dem histologischen Nachweis von organisiertem lymphatischem Gewebe untersucht.

Insgesamt wurden Proben von 24 MALT-Lymphompatienten und 28 Proben von Patienten mit einer Gastritis mit Lymphfollikelbildung untersucht. Zur Etablierung der verwendeten Protokolle wurden Milzbiopsien und die Zellreihe BV 173 verwendet, die

bereits in der Literatur charakterisiert sind (Drexler HG 2000). Die cDNA der Zellen BV 173 wurden für die Etablierung der $\delta\delta$ -CT-Methode verwendet.

2.3 Probenaufbereitung

2.3.1 Etablierung der RNA-Extraktion

Es wurde ein Vergleich zwischen der Extraktion mit RNAzol und der Extraktion mit einem kommerziell erwerbaren KIT (Mini_Kit_Handbook 2001) durchgeführt.

2.3.1.1 RNA Extraktion mittels RNAzol

Die RNA-Extraktion mittels RNAzol besteht aus den fünf Schritten Homogenisierung, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, Waschen und Lösen der RNA. Die so gewonnene RNA wird bei -80°C gelagert. Die Methode wurde nach dem Standardprotokoll des molekularbiologischen Labors der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Philipps Universität Marburg (SOP RNA – Extraktion mittels RNAzol) angewandt.

Ausgangsmaterial: Magenbiopsien

Reagenzien RNAzol (BIOTECH Laboratories Inc., Houston, Tx, USA):

Ablauf:

Homogenisierung

Die bei -80°C eingefrorenen Magenbiopsien (50 – 100mg) werden jeweils mit 900 μl RNAzol in einem Reagenzglas auf Eis (ca. 4°C) gemörsert und homogenisiert.

Phasentrennung

Die Proben werden für 5min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Je eingesetztem ml RNAzol werden 0,2ml Chloroform zugegeben und die Proben für 0,5-1 min gevortext. Danach werden die Lösungen 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min bei $12000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Dies führt zur Trennung der einzelnen Proben in drei Phasen: Eine untere blaue Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine Interphase. Die RNA ist ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich die DNA und die Proteine in der Interphase und der Phenolphase

befinden. Die wässrige Phase nimmt dabei ca. 60% des Probevolumens ein.

RNA-Präzipitation

Die wässrige Phase wird ganz vorsichtig (hier in 100µl Schritten) in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt. Zur Ausfällung der RNA wird jedem ml der wässrigen Phase 0,5ml Isopropanol hinzugeben und über Nacht bei -20°C gelagert.

Danach wird für 20min bei 12000*g und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat sollte von gelartiger Konsistenz sein und an der unteren Seite des Röhrchens liegen.

Waschen der RNA

Den Isopropanolüberstand wird vorsichtig abgezogen. Das Pellet wird 2x mit 1ml 75%igem Ethanol durch Vortexen mit anschließender Zentrifugation (20min bei 12000*g und 4°C) gewaschen. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet für 5-20min auf Eis getrocknet.

Lösen der RNA

Das getrocknete RNA-Pellet wird in 30µl RNase-freiem Wasser gelöst und kann so bei -80°C gelagert werden.

2.3.1.2 RNA Extraktion mit Qiagen Kit

Eine andere Methode ist die Extraktion mit dem RNeasy® Mini Kit. Dabei können bis zu 100 µg RNA aus maximal 30mg tierischem Gewebe gewonnen werden. Es können Nukleinsäuren mit einer Länge von mehr als 200 Basen an eine Silicagelmembran eines Säulchens gebunden werden (Mini_Kit_Handbook 2001).

Grundlage der Methode

Die Magenbiopsien werden zuerst lysiert und dann homogenisiert. Dafür dient ein stark denaturierender Guanidin-Isothiocyanat enthaltender Puffer, der zusätzlich RNasen inaktiviert. Mittels Ethanol werden die Bindungsbedingungen verbessert und die Proben in die RNeasy Mini Säulen gegeben, wo die RNA an die Membran bindet und durch Waschschrte unter Zentrifugieren von Begleitstoffen befreit wird. Anschließend wird mit Wasser eluiert.

Reagenzien des (RNeasy® Mini Kits Catalog No. 74903 74904):

RNeasy mini spin columns (rosa Säule), QIAshredder homogenizer (lila

Säule), Collection tubes (1.5 ml) (Auffanggefäß), Collection tubes (2 ml) (Auffanggefäß), Buffer RLT (enthält Guanidin-Isothiocyanat), 70% Ethanol (ist nicht im Kit enthalten), Buffer RW1, Buffer RPE , RNase-free water
1,5ml Eppendorf Gefäß, Reagenzglas

Geräte: Eppendorf Centrifuge 5417 R

Ablauf:

Lysierung & Homogenisierung

Die bei -80°C eingefroren Biopsien (maximal 30mg) werden jeweils mit 600µl Buffer RLT in einem Reagenzglas bei Raumtemperatur gemörstert und homogenisiert. Davon werden 600µl in den QIAshredder homogenizer (lila Säule) überführt. Dieser wird in ein Collection tube gesteckt und nun bei max. Geschwindigkeit 2min lang zentrifugiert. Der QIAshredder homogenizer (lila Säule) kann danach entsorgt werden, weil sich die lysierten und homogenisierten Proben nun im Collection tube befinden.

Optimierung der Bindungsbedingungen

In dieses Collection tube werden 600µl 70%igen Ethanol zupipettiert und gut resuspendiert.

Adsorption der RNA

Von dieser Lösung werden maximal 700µl Lysat in die RNeasy mini spin columns (rosa Säule) pipettiert. Nach Zusammenstecken mit einem Collection tube wird bei 12000rpm 15sec lang zentrifugiert. Anschließend wird das Auffanggefäß gewechselt. Das restliche Lysat wird auf die gleiche Säule geladen und zentrifugiert.

Waschschritte

Die RNeasy mini spin column (rosa Säule) wird mit 700µl Buffer RW1 geladen und bei 12000 rpm für 15sec zentrifugiert. Nach Wechseln des Auffanggefäßes wird die Säule mit 500µl Buffer RPE bei maximaler Geschwindigkeit zum Trocknen zentrifugiert.

Eluierung

Die Säule wird nun auf ein 1,5ml Eppendorf Gefäß gestellt und mit 30µl RNase freiem Wasser bei 12000rpm für 1min zentrifugiert. Die so gewonnene RNA befindet sich jetzt im Eppendorf Gefäß.

2.4 Messung der DNA & RNA-Konzentrationen

Für die verschiedenen Untersuchungen (z.B. cDNA Synthese) mussten die Konzentrationen der Ausgangsmaterialien cDNA oder RNA bekannt sein. Die Bestimmung erfolgte mittels Photometer oder am ABI PRISM 7700. Die Methode wurde nach dem Standardprotokoll des molekularbiologischen Labors der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Philipps Universität Marburg (SOP Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren) angewandt.

2.4.1 Spektralphotometrische RNA-Konzentrationsmessung

Grundlage der Methode

Mittels eines Photometers lässt sich sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der RNA messen. Da Nukleinsäuren bei 260nm und Proteine bei 280nm ultraviolette Strahlung absorbieren, wird die optische Dichte der Proben (1:20 mit ddH₂O verdünnt) bei diesen Wellenlängen gegen ddH₂O gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration ermittelt sich aus der optischen Dichte bei 260 nm, der RNA-Verdünnung und dem für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor von 40. Als Grundlage zur Berechnung diene das Lambert-Beer'sches Gesetz:

$$c(\text{Probe}) = OD \times 20 \times 40$$

c = Konzentration; OD = Extinktion, optische Dichte; RNA-Verdünnung ist 1:20 ± Verdünnungsfaktor von 20;

Eine Aussage über die Verunreinigung der Nukleinsäure durch Proteine erhält man aus dem Verhältnis der OD bei 260nm und der OD bei 280nm. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Liegt der Wert unter 1,8 besteht eine Verunreinigung durch Proteine und bei einem Wert über 2,0 wurde zu viel RNA isoliert.

Ausgangsmaterial:	Nukleinsäure-Lösung (RNA)
Materialien:	ddH ₂ O (für RNA: 0.1% DEPC-H ₂ O), 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße, 200µl, 20µl Filtertips Pipettenspitzen, Eisgefäß (z.B. Styropor-Box) für RNA-Lösungen Photometer/Küvette (Genequant II von Pharmacia)
Geräte:	Photometer der Firma Pharmacia® (Genequant II)

Ablauf:

Um die RNA 1:20 zu verdünnen nimmt man 4µl RNA und versetzt sie mit 76µl ddH₂O. Am Anfang und am Ende der Messung wird eine Kontrollprobe mit 80µl ddH₂O als Referenzprobe und Kontrollprobe (sollte eine Probenkonzentration von 0 ergeben) gemessen.

2.4.2 RNA-Quantifikation am Tagman**Grundlage der Methode**

Bei dieser Methode erlaubt eine spezifische Bindung von RiboGreen® RNA Reagenz an Nukleinsäuren die Konzentrationsbestimmungen (Probes 2001). Das Reagenz ist ein interkalierender Farbstoff, der bei Bindung an Nukleinsäuren sein Fluoreszenzverhalten ändert. Die Partikel werden bei ungefähr 500nm angeregt und die Emission wird bei ca. 525nm gemessen.

Ausgangsmaterial: Nukleinsäure-Lösung (RNA)

Materialien: RiboGreen RNA Quantitation Kit (R-11490):
RiboGreen RNA quantitation reagent (Component A), 1 mL
solution in DMSO, 20X TE (Component B), 25 mL of 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5 (20X TE) in DEPC-treated water, Ribosomal RNA standard (16S and 23S rRNA from, E. coli; Component C), five vials, each containing 200 µL of a 100 µg/mL solution in TE, Optical Tubes

Geräte: ABI PRISM 7700, Mac&Tosch Rechner, Software: Sequenz detection software 1.9

Ablauf:

Von der Standard-Nukleinsäure-Lösung mit vorgegebener Konzentration wird eine Eichreihe aus fünf verschiedenen Konzentrationen erstellt. Um die erwünschte RNA-Konzentration zu erreichen, müssen folgenden Volumina an Standard-RNA, TE-Puffer und RiboGreen-Lösung vermischt werden. Tabelle 1 zeigte die Eichreihe der Konzentration.

Tabelle 1 Eichreihe der Konzentrationen

	RNA Konzentration	Standard-RNA (200ng/ μ L)	1* TE Puffer	RiboGreen (1 : 200)
1	0 ng/ μ L	0 μ L	25,00 μ L	25,00 μ L
2	5 ng/ μ L	1,25 μ L	23,75 μ L	25,00 μ L
3	25 ng/ μ L	6,25 μ L	18,75 μ L	25,00 μ L
4	50 ng/ μ L	12,5 μ L	12,50 μ L	25,00 μ L
5	100 ng/ μ L	25,0 μ L	0 μ L	25,00 μ L

Für die Messung werden sowohl die erstellte Eichreihe, als auch die Versuchsproben mit TE-Puffer und Ribogreen-Lösung vermischt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

- Proben RNA (1:10) = 1,25 μ L
- 1 * TE = 24,00 μ L
- RiboGreen (1 : 200) = 25,00 μ L

Diese Lösungen werden auf eine optische Platte aufgetragen. Ihre Extinktionen werden im Tagman bestimmt. Der ABI PRISM 7700 wird dafür folgendermaßen programmiert:

Stage I: 24°C / 15 sec

Nach linearer Regression der Eichgeraden können die Konzentrationen der Versuchsproben bestimmt werden.

2.5 Reverse Transkription

Grundlage der Methode

Um die RNA in PCR-Reaktionen einsetzen zu können (sog. RT-PCR), muss die RNA (genauer: die mRNA aus der Gesamt-RNA) in cDNA (Copy DNA) umgeschrieben werden. Diese Reaktion wird durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) katalysiert. Als Startmoleküle verwendet die RT random Hexamer-Primer (6bp DNA-Fragmente mit zufälliger Basenverteilung). Die so hergestellte cDNA ist relativ stabil (Lagerung bei -20°C) und wird dann in die verschiedenen PCR-Reaktionen eingesetzt. Die Methode wurde nach dem Standardprotokoll des molekularbiologischen Labors der Klinik für

Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Philipps Universität Marburg (SOP cDNA Synthese aus RNA mittels Reverser Transcriptase (RT) angewandt.

Ausgangsmaterial: 1µg Gesamt-RNA (maximal 8µl RNA-Lösung)

Materialien: Superscript-RT (MMLV, 200u, Gibco BRL), RNase-Inhibitor (z.B. RNasin von Promega), 10mM dNTPs (je 2.5mM; z.B. 1:10 Verdünnung eines Mixes, aus je 100µl 100mM dCTP, dTTP, dATP und dGTP), random hexamer Primer (100µM, pd(N)6, Pharmacia Biotech), 0.1M DTT (Dithiothreitol, Gibco BRL), 10x PCR Puffer (PE, da später AmpliTaq® Polymerase von PE für die PCR verwendet wird), 0.1% DEPC-H₂O (1ml 10% Diethyl-Pyrocbonat in Ethanol, auf 100ml mit ddH₂O, steril filtrieren, 2x autoklavieren), 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße, 1000µl, 200µl, 20µl Filtertips Pipettenspitzen, Eisgefäß (Styropor-Box), Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417 R)

Geräte: Eisgefäß (Styropor-Box), Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417 R), Beheizbares Wasserbad, Heizblock, Kurzzeitwecker, Siehe auch SOP

Ablauf:

Jede Probe enthält 8 µl RNA-Lösung (mit einer Stoffmenge von 1000ng RNA) und folgende Reagenzien:

- 1 µl random hex primer (100 µM)
- 5 µl dNTP (2.5 mM)
- 2µl 10x PCR-Puffer
- 2 µl 0.1 M DTT (Dithiothreitol, stabilisiert Enzymreaktion)

Die cDNA Synthese wird mit einer Positiv- und Negativkontrolle überprüft. Anstatt der zu synthetisierenden RNA benutzt man für die Positivkontrolle eine K562-RNA-Lösung mit einer RNA Stoffmenge von 1000ng und für die Negativkontrolle 0.1% DEPC-H₂O.

Alle Proben werden dann für 10 min bei 70°C zur Denaturierung der Sekundärstrukturen im Thermocycler inkubiert. Anschließend fügt man jeder Probe eine Reverse Transkriptase Mischung aus 1 µl RNase Inhibitor (inhibiert andere RNasen) und 0.5 µl Superskript-RT hinzu.

Anschließend werden die Proben im Thermocycler bei verschiedenen Temperaturen

erhitzt und können nach Ablauf des Programms bei -20°C gelagert werden.

Programmierung des Thermocyclers:

- 10 min bei RT inkubieren
- 40 min bei 42°C im Wasserbad inkubieren
- 5 min bei ca.90°C im Heizblock zur Inaktivierung der RT inkubieren.

2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.6.1 Qualitative PCR (β-Actin PCR)

Die Methode wurde nach dem Standardprotokoll des molekularbiologischen Labors der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Philipps Universität Marburg (SOP Vorgehen bei der β-Actin RT-PCR) angewandt.

Grundlage der Methode

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert aus einer vorgegebenen Menge an cDNA bzw. DNA einen bestimmten Abschnitt davon, so dass dieser mittels Gelelektrophorese detektiert werden kann.

Primer (DNA-Oligonukleotide) binden an die spezifische Stelle der DNA und dienen so als Startsequenz für eine DNA-Polymerase. Die PCR läuft zyklisch ab. Jeder Zyklus besteht aus drei Phasen. In der ersten Phase wird die cDNA bzw. die DNA durch Erhitzen auf 94°C denaturiert, wobei die Wasserstoffbrücken zwischen den Einzelsträngen gelöst werden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in der Annealingphase (Anlagerungsphase = 2.Phase) auf 55°C gekühlt. Hier bindet sich das Primerpaar mit seinen komplementären Sequenzen an der Matrizen-DNA. Nach Erhitzung auf 72°C beginnt in der Transkriptionsphase (3.Phase) die AmpliTaq Polymerase am 3'-Ende der Primer mit der Synthese der neuen Einzelstränge (neuer Komplementärstrang). Bei der für die Polymerase optimalen Temperatur von ca. 72°C arbeitet sie fortlaufend. Nach Beendigung der Polymerisation beginnt der Zyklus von vorn. Bei jedem Zyklus wird die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt. Die PCR kann so lange ablaufen, bis die in der Lösung vorhandenen Taq-Polymerasen nicht mehr ausreichen, um alle Primer zu belegen.

Mit dieser Methode kann man auch sehr geringe Mengen an Nukleinsäuren nachweisen. Um sicherzustellen, dass die untersuchte Probe überhaupt intakte Nukleinsäuren aufweist, wird ein Referenzgen amplifiziert, das ubiquitär vorhanden ist.

Neben dem Gen GAPDH ist das β -Actin Gen ein übliches Referenzgen.

Ausgangsmaterial:	1 μ l cDNA (ca. 50ng cDNA)
Materialien:	10x PCR Puffer (PE) AmpliTaq® Polymerase (PE) 10mM dNTPs (je 2.5mM) ddH ₂ O β Actin1 Primer (10 μ M, 5'-CCTTCCTgggCATggAgTCCT-3') β Actin3 Primer (10 μ M, 5'-AATCTCATCTTgTTTTCTgCg-3') 0,2ml ReaktionsgefäÙe (z.B. Biozym) 1,5ml EppendorfgefäÙe 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l Filtertips Pipettenspitzen
Geräte:	Siehe auch SOP, ThermalCycler (Perkin Elmer 9600), Zentrifuge, Eisbad

2.6.1.1 Vorgehen bei der β -Actin RT-PCR

Für jede erstellte cDNA wird ein Reaktionsansatz mit 25 μ l wie folgt hergestellt:

- 16.875 μ l ddH₂O
- 1.25 μ l β -Actin1 (10 μ M)
- 1.25 μ l β -Actin3 (10 μ M)
- 2.0 μ l dNTPs (10mM)
- 2.5 μ l 10x PCR-Puffer
- 0.125 μ l AmpliTaq Polymerase (5u/ μ l, sorgfältig mischen)

Die Reaktionsansätze werden in den Thermozykler überführt und nach folgendem Programm erhitzt:

- 94 °C / 2min30sec Hold
- 94 °C / 30sec }
- 55 °C / 30sec } 21 Zyklen
- 72 °C / 30sec }
- 94 °C / 30sec } 1 Zyklus
- 60 °C / 5min }
- 20 °C/ ∞ Hold

2.6.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Grundlage der Methode

Mithilfe der quantitativen Echtzeit PCR werden spezifische Nukleinsäuresequenzen von z. B. Zytokinen, die oft auf niedriger Stufe exprimiert werden und deshalb schwer von etablierten Methoden wie ELISA zu messen sind, amplifiziert und quantifiziert. Die Amplifikationsschritte ähneln denen einer qualitativen PCR (Giulietti, Overbergh et al. 2001). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass ein fluoreszierender Farbstoff sich an die doppelsträngige DNA Moleküle bindet und ein fluoreszierendes Signal bei definierter Wellenlänge emittiert. In der Transkriptionsphase eines jeden Zyklus der PCR wird die Emission gemessen. Da sich im optimalen Fall die Menge des Amplifikats von Zyklus zu Zyklus verdoppelt, nimmt damit auch die Emission zu.

Der fluoreszierende Farbstoff (SYBR Green I), dessen Anregungs- und Emissionsmaxima bei 494nm und 521nm liegen, bindet unspezifisch an jede doppelsträngige DNA. So können auch nicht spezifische PCR Produkte sowie Primer Dimer fluoreszierende Signale verursachen und dadurch das Ergebnis verfälschen. Deshalb muss bei dieser Methode eine hohe Spezifität der PCR gewährleistet sein. (Qiagen 2004)

Ausgangsmaterial: 1µL cDNA (< Stoffmenge 500ng)

Materialien: QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix bestehend aus:

- HotStarTaq®DNA Polymerase
- QuantiTect SYBR Green PCR Buffer
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP & dUTP
- SYBR Green I
- ROX (passive reference dye)
- 5 mM MgCl₂
- RNase-free water

Uracil N-glycosylase (Applied Biosystems, AMPErase[®]

Uracil N-glycosylase)

Geräte:

ABI PRISM 7700, Mac&Tosch Rechner, Software: Sequenz detection software 1.9, 96-Well Optical Reaction Plate (Applied Biosystems, Part Number 430 667 37), Optical Caps (Applied Biosystems, Part Number 432 303 2)

Ablauf:

Für jedes Primerpaar wird eine Zusammensetzung des Reaktionsgemisch wie folgt hergestellt (Qiagen 2003):

• QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µl
• Primer A	0,75 µl
• Primer B	0,75 µl
• Uracil-N-Glycosylase (UNG)	0,5 µl
• <u>RNase freies Wasser</u>	<u>9,5 µl</u>
• <u>Gesamtvolumen :</u>	<u>24 µl</u>

Drei aufeinanderfolgende Tubes einer Platte stellen eine Probe dar. Sie enthalten neben dem MasterMix noch 1µl cDNA. Für die Negativkontrolle wird anstatt cDNA 1µl RNase freies Wasser verwendet. Für jedes benutzte Primerpaar muss eine Negativkontrolle hergestellt werden.

Zum Schluß wird die Platte mit Optical Caps verschlossen und in den Zykler überführt (Qiagen 2003). Die Software des Zyklers wird wie folgt programmiert:

STAGE I 2 Min Inkubation bei 50°C

STAGE II 95°C / 15 Min (Aktivierung der HotStarTaq®DANN Polymerase)

STAGE III (Dieser Reaktionszyklus wird 40 mal durchlaufen)

15 Sek Denaturierung bei 94°C

30 Sek Hybridisierung bei 58°C

30 Sek Polymerisation bei 72°C

Die Zyklenzahl, die Zeiten und die Temperaturen beim Hybridisierungs- und Polymerisationsschritt wurden je nach Primerpaar und Fragmentgröße der zu amplifizierenden DNA optimiert.

STAGE IV (Schmelzkurve)

15 sek Denaturierung der PCR-Produkte bei 95°C

15 sek Kühlung der Reaktion unter der Annealing Temperatur bei 60°C

Ramping Time 19:59 Min (langsames heizen von 60°C auf 95°C)

5 sek bei 95°C

In der ersten Inkubationsstufe wird die Uracil-N-Glycosylase (UNG) aktiviert. Die UNG

kann PCR-Produkte aus vorherigen Läufen, welche die neuen Proben kontaminieren können, inaktivieren. Zwischen cDNA (bzw. DNA) und PCR-Produkten kann anhand des Desoxymononuklotids dUTP unterschieden werden. Denn für die PCR wird nicht nur dCTP, dTTP, dATP und dGTP, die in cDNA und DNA enthalten sind, sondern auch dUTP benutzt.

Während des Inkubationsschritts entfernt UNG Uracil von dUMP, so dass Restmoleküle entstehen. Während der Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase wird die UNG inaktiviert und die Restmoleküle werden zerstört. Während des Zyklus werden dadurch nur die entsprechenden Zielsequenzen amplifiziert und nicht eventuell kontaminierende Nukleotide (Qiagen 2003).

2.6.2.1 Schmelzkurve

Nicht nur die spezifischen PCR-Produkte werden mittels Fluoreszenz markiert, sondern auch Primer Dimer und unspezifische PCR-Produkte. Deshalb muss die Spezifität eines Laufs mit der Schmelzkurve bestimmt werden. Das Prinzip beruht darauf, dass die PCR-Produkte unterschiedliche Schmelztemperaturen besitzen und bei langsamem Erhitzen unterschiedlich denaturieren. Dabei spaltet sich der DNA Doppelstrang und der SYBR Green Farbstoff löst sich, womit die Fluoreszenz abnimmt. Die Schmelztemperatur hängt von der Ratio der Basenpaare GC/AT (Guanin Cytosin zu Adenin Thymin), der Länge und Sequenz der Produkte ab. Der Differentialquotient der Abnahme der Fluoreszenz in Bezug zur Temperatur ($-dF/dT$) ergibt eine Kurve mit einem typischen Maximum für die entsprechende Schmelztemperatur. Kurvenverläufe mit zusätzlichen Maxima im Bereich unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur oder Plateaus deuten auf Primer-Dimer und unspezifische PCR-Produkte hin (Qiagen 2003).

2.6.2.2 Optimierung der RT-PCR Amplifikation

Die Effektivität und die Spezifität der PCR hängt unter anderem auch von dem verwendeten Primer ab. Dabei spielen ihre Sequenz, Länge, GC-Gehalt (G= Guanin, C=Cytosin) und die Schmelztemperatur (T_m) eine Rolle (Giulietti, Overbergh et al. 2001). Beim Entwerfen eines Primers sollte man auf folgende Faktoren achten:

Sequenz:

- Maximale Länge der PCR-Produkte: 150 Basenpaare,
- Komplementäre Basenpaare innerhalb eines Primers und zwischen Proben vermeiden, um Haarnadelbildung zu verhindern,
- 3' und 5' Primer dürfen zueinander keine komplementären Sequenzabschnitte aufweisen,
- Fehlanpassung vermeiden,
- Thymin am 3'-Ende vermeiden, weil diese Base Fehlanpassungen besser toleriert.

Länge:

- 18–30 Nukleotide

GC Bestandteil:

- 40–60%

T_m:

- T_m (vereinfacht) = $2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{C}+\text{G})$
(Wallace Regel)

2.6.2.3 Etablierung der Annealingtemperatur

Grundlage der Methode

Die Effizienz der PCR kann durch die Optimierung der Annealingtemperatur gesteigert werden. Bei zu niedrigen Temperaturen können die Primer unspezifisch und bei zu hohen Temperaturen gegebenenfalls gar nicht an die Zielsequenz binden und so die Spezifität beeinflussen. Mit einem Gradientenzykler kann mit einem Versuch die optimale Temperatur herausgefunden werden. Dazu durchlaufen identische Proben die normalen Schritte einer PCR. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass die Proben einer unterschiedlichen Hybridisierungstemperatur ausgesetzt werden (Rohrer 2000).

Rein rechnerisch liegt die Annealingtemperatur 2 – 5 °C unter der Schmelztemperatur der Primer, so dass der tatsächliche Wert in diesem Bereich abgeschätzt werden kann.

Ausgangsmaterial: 1µl cDNA (ca. 50ng cDNA)

Materialien: 10x PCR Puffer (PE), AmpliTaq® Polymerase (PE), 10mM dNTPs (je 2.5mM), ddH₂O, Primer A (10µM ; 5' Primer)
Primer B (10µM ; 3' Primer), 0,2ml Reaktionsgefäße (z.B. Biozym), 1,5ml Eppendorfgefäße, 1000µl, 200µl, 20µl, 10µl

Filtertips Pipettenspitzen

Geräte: Mastercycler® ep (Eppendorf, Seriennummer: 5345),
Zentrifuge, Eisbad

Ablauf:

Alle vorbereitenden Schritte sind denen der oben erwähnten qualitativen PCR ähnlich. Die Annealingtemperaturen für die vier untersuchten Gene sind zwischen 53,4°C und 62,4°C eingestellt worden. Dafür muss die mittlere Temperatur des Zyklers auf 58°C und die Gradiententemperatur auf 10°C programmiert werden. Die PCR ist nach folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt und mittels Gelelektrophorese ausgewertet worden:

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

- 16.875µl ddH₂O
- 1.25µl Primer A (10µM)
- 1.25µl Primer B (10µM)
- 2.0µl dNTPs (10mM)
- 2.5µl 10x PCR-Puffer
- 0.125µl AmpliTaq Polymerase (5u/µl, sorgfältig mischen)

Zyklerbedingungen

- 94°C / 2min30sec Hold
- 94°C / 30sec }
- 53,4 – 62,4°C / 30sec } 30 Zyklen
- 72°C / 30sec }
- 4°C/∞ Hold

Tabelle 2 zeigt die Anordnung der Proben für die untersuchten Gene und dazugehöriger Annealingtemperatur.

Tabelle 2 Probenverteilung zur Bestimmung der Annealingtemperatur

T1 = 53,4°C	T2 = 55,2°C	T3 = 57°C	T4 = 58,8°C	T5 = 60,6°C	T6 = 62,4°C
BAFF	BAFF	BAFF	BAFF	BAFF	BAFF
APRIL	APRIL	APRIL	APRIL	APRIL	APRIL
BAFF-R	BAFF-R	BAFF-R	BAFF-R	BAFF-R	BAFF-R
BCMA	BCMA	BCMA	BCMA	BCMA	BCMA
TACI	TACI	TACI	TACI	TACI	TACI

2.6.2.4 Etablierung der $\delta\delta$ -CT-Methode – Validierungsexperiment

Zur Auswertung der qRT-PCR müssen die Expressionsdaten der untersuchten Gene gegen definierte Haushaltsgene (hier GAPDH) normalisiert werden (Biosystems 2001; Wiedermann C. 2004). Dazu wurde die $\delta\delta$ -CT-Methode verwendet. Voraussetzung dafür ist ein Validierungsexperiment, mit dem gezeigt wird, dass die Effizienz der Expression des benutzten Referenzgens (GAPDH) und des zu untersuchenden Gens ungefähr gleich ist. Dazu wird eine Verdünnungsreihe mit cDNA aus Lymphozyten von Knochenmarkproben oder mit cDNA der Zellreihe BV 173cDNA hergestellt und die jeweilige Effizienz der Expression zwischen dem Haushaltsgen und dem Gen von Interesse verglichen. Diese lassen sich als eine Gerade zwischen dem Log der Konzentration und dem Schwellenwert Zyklus (CT-Wert) darstellen. Bewiesen ist eine annähernde Effizienz bei einer Differenz der Steigung der Geraden kleiner 0,1.

2.7 Gelelektrophorese

Die Produkte der β -Actin PCR sowie der quantitativen RT-PCR wurden mit der Gelelektrophorese überprüft. Auch die Reinheit der extrahierten RNA wurde mit ihrer Hilfe bestimmt.

Die Gelelektrophorese ist ein Elektrophorese-Verfahren, bei dem ein Gel als Trägermedium benutzt wird. Am häufigsten werden durch Gelelektrophorese Gemische von Proteinen, DNA oder RNA aufgetrennt. Wichtige Trägermedien sind Agarosegel und Polyacrylamidgel.

2.7.1 Elektrophorese mit Agarosegel

Die Methode wurde nach dem Standardprotokoll des molekularbiologischen Labors

der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Philipps Universität Marburg (SOP Gelelektrophorese) angewandt.

Grundlage der Methode

Agarosegel verwendet man zur Auftrennung von DNA und RNA. Die Trennung wird durch die im Gel vorhandenen Poren erreicht, die wie ein Sieb wirken und deren Größe die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren bestimmen. Die Porengröße des Gels wird durch die Agarosekonzentration festgelegt.

Da die DNA negativ geladen ist, wandert sie stets zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist von der Länge und der Konformation der DNA abhängig. Kurze DNA-Fragmente wandern schneller als lange und ringförmige DNA schneller als lineare. Die kürzesten Stränge wandern im Gel am weitesten in Richtung Anode. Als Referenz lässt man einen Marker aus DNA-Molekülen mitlaufen, deren Länge bekannt ist.

DNA/RNA Fragmente sind nativ nicht sichtbar und werden deshalb mit Ethidiumbromid oder Megafluor angefärbt. Die Färbung erzeugt typische sichtbare "Banden" im Trägermedium.

Materialien: DNA aus PCR oder RNA, 5% Agarose-Gel (2,5% für RNA), 1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, der Ansatz des TAE setzt sich aus 121g Tris, 28,55ml Eisessig und 50ml 0,5M EDTA (pH=8) zusammen), 10x Loading-Dye Gibco, 100bp-Leiter Gene Ruler® Fermentas

Geräte: Kammer für Gelelektrophorese, Spannungsgeber, UV-Transilluminator (HEROLAB UVT 2035), MP 4 LAND Photokamera der Firma POLAROID

Ablauf:

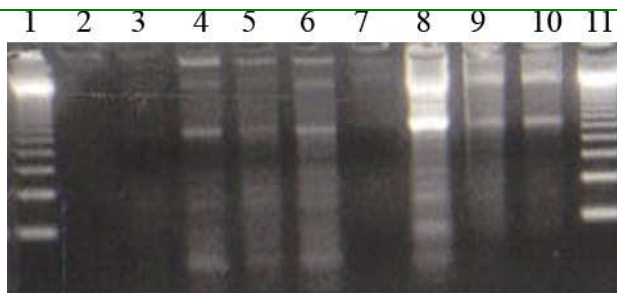
Die Elektrophoresekammer wird mit 1xTAE-Puffer soweit gefüllt, dass das Flüssigkeitsniveau etwa 1mm über dem Gel ist. 10µl DNA bzw. RNA werden mit 1µl 10x LoadingDye gefärbt und auf das Gel getragen. Parallel lässt man eine 100bp Leiter (Marker) mitlaufen. Die Elektrophorese dauert bei 100V ca. 30 min. Die Banden können im UV-Transilluminator bei 254nm und abfotografiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der RNA Extraktion

Die Qualität der RNA Extraktion wurde mit der Ausbeute der RNA-Konzentration und der Banden der Gelelektrophorese ermittelt. Dabei war die Gewinnung der RNA mit dem Qiagen Kit der RNazol Methode überlegen, beispielhaft in Abbildung 4 dargestellt.

Abbildung 4 Vergleich der Extraktionsmethoden mittels Gelelektrophorese



Bande 1 & 11	100bp DNA Leiter
Bande 2	leer
Banden 3 – 6	Magenbiopsieproben die mit RNazol extrahiert wurden
Banden 7 – 10	Magenbiopsieproben die mit Qiagen extrahiert wurden

Aus diesem Grund wurden die zu untersuchenden Patientenproben mit dem Qiagen Kit bearbeitet.

3.2 Optimierung der Annealingtemperatur

In der Gelelektrophorese sieht man anhand der Banden die optimale Annealingtemperatur für alle vier benutzten Primerpaare bei ca. 58°C. Die Abbildungen 5, 6 sowie die Tabelle 3 zeigen die Gelelektrophoresen und die Anordnung der Primerpaare zur eingestellten Annealingtemperatur.

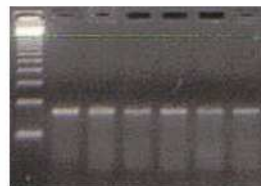
Abbildung 5 Optimierung der Annealingtemperatur **Abbildung 6 Optimierung der Annealingtemperatur**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



BAFF-R, Banden 2 – 7 Abb. 5
 APRIL, Banden 8 – 13 Abb. 5

1 2 3 4 5 6 7



BAFF, Banden 14 – 19 Abb. 5
 TACI, Banden 2 – 7 Abb. 6

Tabelle 3 Annealingtemperatur

Annealingtemperatur °C	53,4	55,2	57	58,8	60,6	62,4	Gen
Abbildung 5, Banden	7	6	5	4	3	2	BAFF-R
	13	12	11	10	9	8	APRIL
	19	18	17	16	15	14	BAFF
Abbildung 6, Banden	7	6	5	4	3	2	TACI
Banden 1 & 20	100bp DNA Leiter						

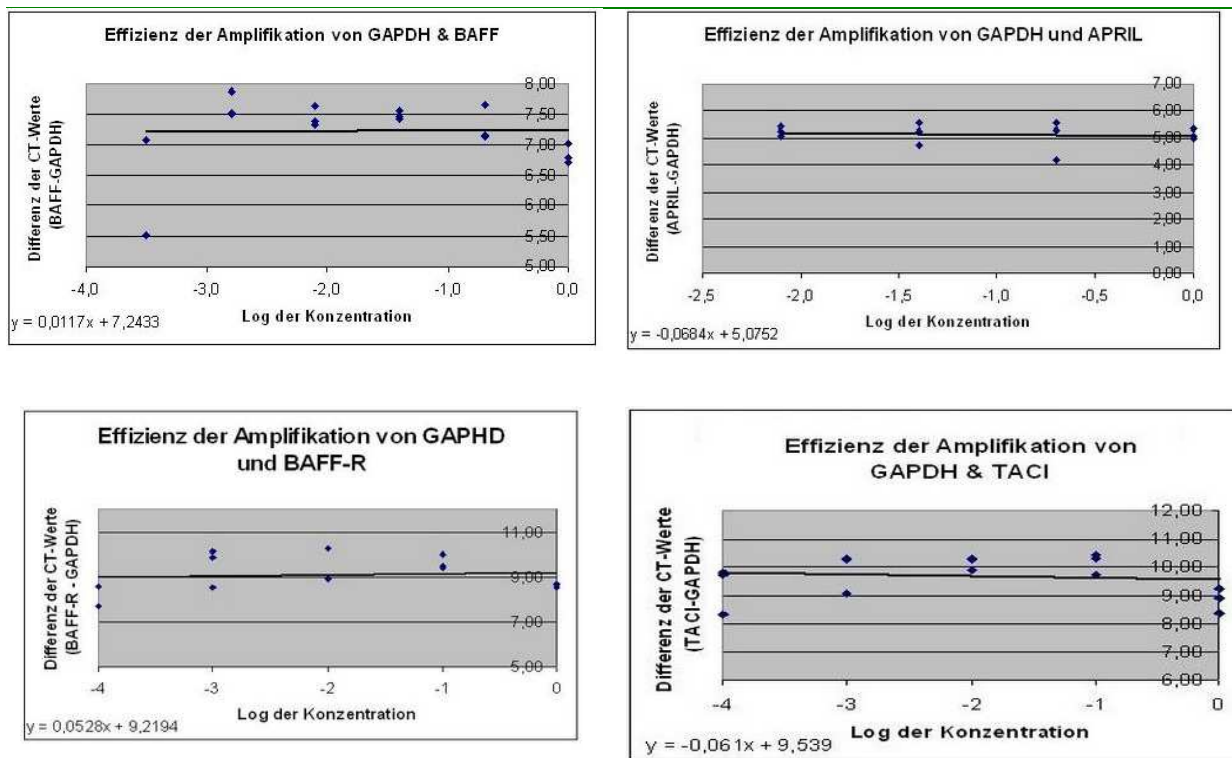
3.3 Etablierung der $\delta\delta$ -CT-Methode

Für die benutzten Gene und das Referenzgen GAPDH konnte eine ähnliche Effizienz der PCR bewiesen werden. Die Voraussetzung, dass die Steigung der Geraden aus den Differenzen der einzelnen CT-Werte von Zielgenen und Referenzgenen bei unterschiedlichen Verdünnungen kleiner 0,1 liegen soll, war gegeben (Biosystems 2001). Tabelle 4 und Abbildung 7 stellen die einzelnen Werte der Steigung und die Steigung der Geraden dar.

Tabelle 4 Effizienz der Amplifikation zwischen Referenzgenen und Zielgenen

GEN	Steigung
BAFF	0,0117
APRIL	0,0684
BAFF-R	0,0528
TACI	0,061

Abbildung 7 Effizienzen der Amplifikationen



3.4 RT-PCR der einzelnen Patienten

Die relative Expression der untersuchten Gene wurde nach Anleitung von ABI PRISM berechnet (Biosystems 2001). Die theoretische Grundlage der Berechnung findet sich dort. Die relative Menge der Zielgene kann, nach Normalisierung mit einem endogenen Referenzgen (GAPDH), und relativ zu einem Kalibrator durch folgende Formel $2^{-\delta\delta CT}$ ermittelt werden. Dazu muss zuerst der Mittelwert der einzelnen CT-Werte jedes Gens berechnet werden, da pro Gen drei identische Proben eines Primerpaars (BAFF, APRIL, TACI, BAFF-R und GAPDH) pro Probematerial (Kalibrator, Tumor, Antrum, Corpus bzw. Gastritiden) gemessen werden. Anschließend wird die Differenz aus diesem CT Wert eines Gens und CT Wert von GAPDH gebildet. Von dem so berechneten ΔCT wird der CT Wert des Kalibrators abgezogen, woraus sich $\Delta\Delta CT$ ergibt. Die relative Expression eines Gens ist die negative $\Delta\Delta CT$ Potenz von zwei ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Tabelle 5 zeigt die Berechnung am Beispiel eines Patienten mit den Proben 92303 (Tumor), 92403 (Antrum) und 92503 (Corpus). In Abbildung 8 wird die relative Expression mittels eines Säulendiagramms dargestellt.

Tabelle 5 Berechnung der relativen Expression

Mittelwerte der CT-Werte (CT GEN)

Gen	Kalibrator	Tumor	Antrum	Corpus
BAFF	18,59	25,76	27,33	26,05
April	23,13	23,71	24,12	24,35
BAFF-R	22,90	21,52	28,17	22,85
Taci	23,91	24,52	29,37	25,48
GAPDH	15,06	16,49	18,96	18,25

$\Delta CT = CT Gen - CT GAPDH$

Gen	Kalibrator	Tumor	Antrum	Corpus
BAFF	3,53	9,27	8,37	7,80
April	8,08	7,22	5,15	6,10
BAFF-R	7,84	5,03	9,21	4,61
Taci	8,85	8,03	10,41	7,24

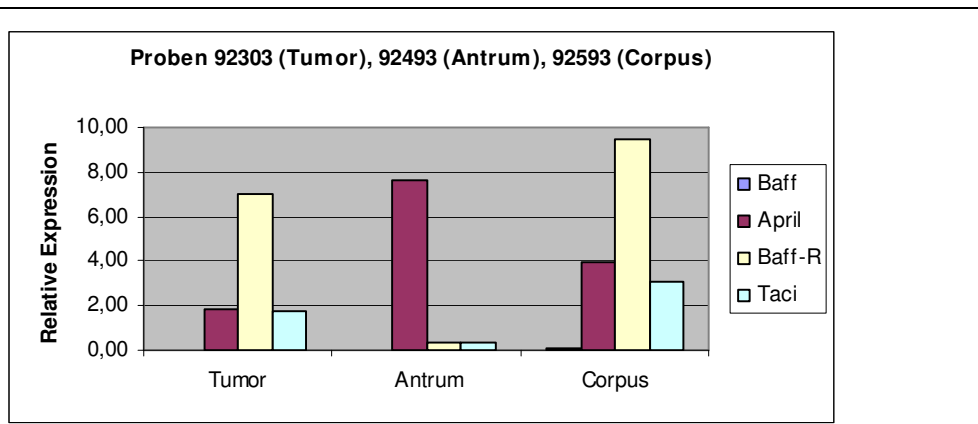
$\Delta\Delta CT = \Delta CT Gen - \Delta CT Kalibrator$

Gen	Kalibrator	Tumor	Antrum	Corpus
BAFF	0,00	5,73	4,84	4,27
April	0,00	-0,86	-2,92	-1,97
BAFF-R	0,00	-2,81	1,37	-3,24
Taci	0,00	-0,82	1,56	-1,61

Relative Expression der Gene ($2^{-\Delta\Delta CT}$)

Gen	Tumor	Antrum	Corpus
BAFF	0,02	0,03	0,05
April	1,82	7,59	3,93
BAFF-R	7,02	0,39	9,43
Taci	1,76	0,34	3,06

Abbildung 8 Relative Expression am Beispiel eines Patienten



3.4.1 Relative Expression von BAFF, APRIL, BAFF-R und TAC1

Insgesamt wurde die relative Expression von 24 Tumor-, 20 Antrum-, 23 Corpus- und 28 Gastritidenproben untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse sind in den Tabellen 6, 7 und 8 zu finden.

Tabelle 6 Relative Expression der MALT Lymphom Patienten

Probennummer	BAFF			APRIL		
	Tumor 24 Proben	Antrum 20 Proben	Corpus 23 Proben	Tumor 24 Proben	Antrum 20 Proben	Corpus 23 Proben
18502&18702	0,08		0,08	11,66		20,88
91103-91303	0,06	0,04	0,04	11,71	15,89	11,71
91403-91603	0,01	0,03	0,01	7,00	11,01	8,92
91703-91903	0,06	0,12	0,07	3,49	42,62	9,80
92003-92203	0,39	0,09	0,36	24,48	10,24	4,21
92303-92503	0,02	0,03	0,05	1,82	7,59	3,93
92903&143901	0,09	0,04		8,17	2,20	
125801&138201&138301	0,04	0,04	0,02	10,63	20,03	6,34
92603-92803	0,06	0,01	0,02	4,87	41,26	14,49
93003&149701&149801	0,06	0,04	0,01	1,12	7,02	3,40
94303-94403	0,03	1,77	0,05	7,78	41,55	10,85
120701&143701&143801	0,59	0,61	0,26	16,61	29,19	16,19
97503-97703	0,06	0,07	0,01	27,23	16,55	73,21
121601&98803	0,27		0,19	5,18		4,18
95803 – 96003	0,08	0,13	0,21	18,22	8,48	44,45
94903-95103	0,03	0,03	0,01	21,57	19,08	14,59
96403&149301&149401	0,10	0,34	0,20	2,19	27,74	6,55
97803-98003	0,08	0,10	0,02	8,82	10,48	7,01
95203-95403	0,53	0,05	0,14	9,71	6,68	4,07
93303&93403&28602	0,24	0,08	0,12	6,21	19,71	3,40
98903-99003	0,21		0,04	13,09		12,91
96103-96303	0,07	0,01	0,01	7,18	5,37	5,71
105503-105703	0,02	0,05	0,03	10,25	29,80	11,29
95503-95603	0,01		0,00	10,88		5,87
Mittelwert	0,13	0,18	0,09	10,41	18,62	13,22
Median	0,07	0,05	0,04	9,26	16,22	8,92

Tabelle 7 Relative Expression der MALT Lymphom Patienten

Probennummer	<u>BAFF-R</u>			<u>TACI</u>		
	Tumor	Antrum	Corpus	Tumor	Antrum	Corpus
	24 <i>Proben</i>	20 <i>Proben</i>	23 <i>Proben</i>	24 <i>Proben</i>	20 <i>Proben</i>	23 <i>Proben</i>
18502&18702	0,65		0,82	0,36		0,45
91103-91303	1,09	0,21	1,40	0,97	0,19	0,97
91403-91603	0,68	2,34	1,02	0,21	2,34	1,02
91703-91903	19,25	4,49	10,70	5,36	3,29	7,80
92003-92203	30,55	1,49	37,44	11,55	2,29	6,23
92303-92503	7,02	0,39	9,43	1,76	0,34	3,06
92903&143901	13,69	13,31		4,11	0,31	
125801&138201&138301	4,07	1,51	0,55	4,57	1,31	0,36
92603-92803	15,85	1,86	6,25	12,30	0,68	3,94
93003&149701&149801	4,82	1,50	0,65	10,19	0,90	0,32
94303-94403	0,52	138,78	2,10	0,47	58,62	2,11
120701&143701&143801	34,97	50,26	105,52	19,91	10,09	106,79
97503-97703	9,21	4,19	5,60	18,93	10,43	74,82
121601&98803	15,69		7,37	28,09		20,75
95803 – 96003	4,37	9,26	4,58	5,32	13,13	21,04
94903-95103	0,30	0,16	0,33	0,37	0,27	0,22
96403&149301&149401	8,54	1553,53	1,68	12,46	27,13	1,54
97803-98003	10,13	1,01	5,10	8,46	0,92	3,25
95203-95403	10,81	1,25	9,11	27,07	2,01	19,54
93303&93403&28602	19,45	3,21	21,68	6,67	1,05	3,28
98903-99003	5,66		0,99	0,24		4,38
96103-96303	4,97	0,16	0,56	12,92	0,31	0,85
105503-105703	0,20	0,27	1,13	0,31	1,73	2,73
95503-95603	0,19		0,13	0,38		0,07
Mittelwert	9,28	89,46	10,18	8,04	6,87	12,41
Median	6,34	1,69	2,10	5,34	1,52	3,06

Tabelle 8 Relative Expression der HP positiven Gastritiden mit Lymphfollikelbildung

Probennummer (28 Proben)	<u>BAFF</u>	<u>APRIL</u>	<u>BAFF-R</u>	<u>TACI</u>
42801	0,11	39,99	4,41	115,49
42901	0,05	15,40	0,63	2,99
43001	0,04	29,34	0,48	15269,16
43301	0,76	65,57	3,06	18,40
43401	0,10	76,64	5,98	24,08
43501	0,02	23,81	0,16	0,77
43601	0,03	41,55	0,78	1,68
43701	0,10	22,68	1,85	13,83
43901	0,04	25,69	1,38	13,56
60202	0,04	32,07	45,68	175,26
70502	0,00	5,13	0,26	6,71
70602	0,00	1,99	0,81	8,73
70702	0,01	5,34	0,47	17,00
73102	0,00	0,72	1,15	51,03
73202	0,01	1,51	1,49	12,20
73302	0,03	17,03	10,29	19,20
73402	0,02	9,36	20,63	99,73
73502	0,01	8,15	4,41	26,23
73602	0,03	15,35	9,62	81,20
73702	0,02	8,63	2,74	16,64
73802	0,03	6,50	4,54	0,00
5701	0,02	64,30	0,66	7,76
6001	0,02	42,62	4,35	129,49
6101	0,01	29,24	1,35	13,96
6201	0,28	14,83	0,95	5,06
43801	0,01	21,01	0,10	1,15
186100	0,88	19,63	2304,12	28824,34
101601	0,00	28,12	3,07	27,22
Mittelwert	0,10	24,01	86,98	1606,53
Median	0,03	20,32	1,67	16,82

3.4.2 Zusammenfassung der Relativen Expressionen

In den Abbildungen 9-12 sind die relativen Expression von Tumor, Antrum, Corpus und Gastritiden dargestellt.

Abbildung 9 Relative Expression der MALT-Lymphome (inklusive tumorfreies Gewebe) und Gastritiden für BAFF

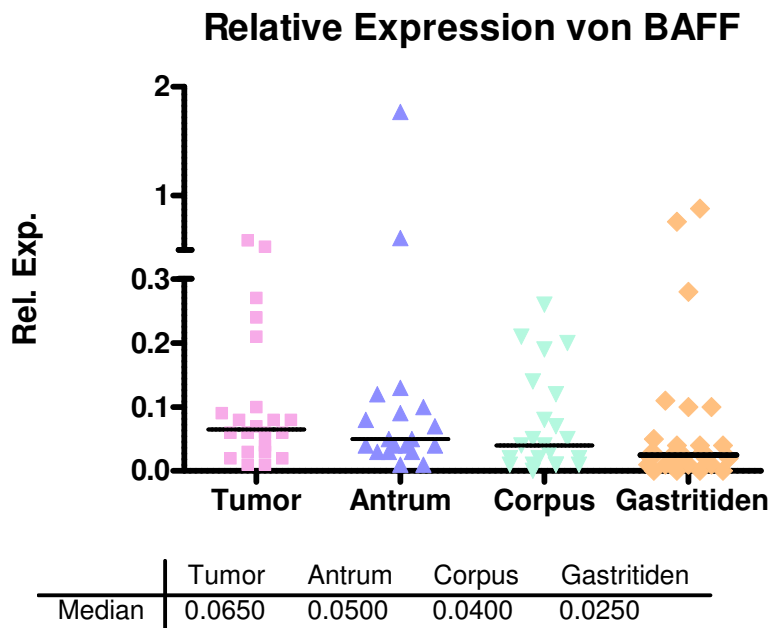


Abbildung 10 Relative Expression der MALT-Lymphome (inklusive tumorfreies Gewebe) und Gastritiden für APRIL

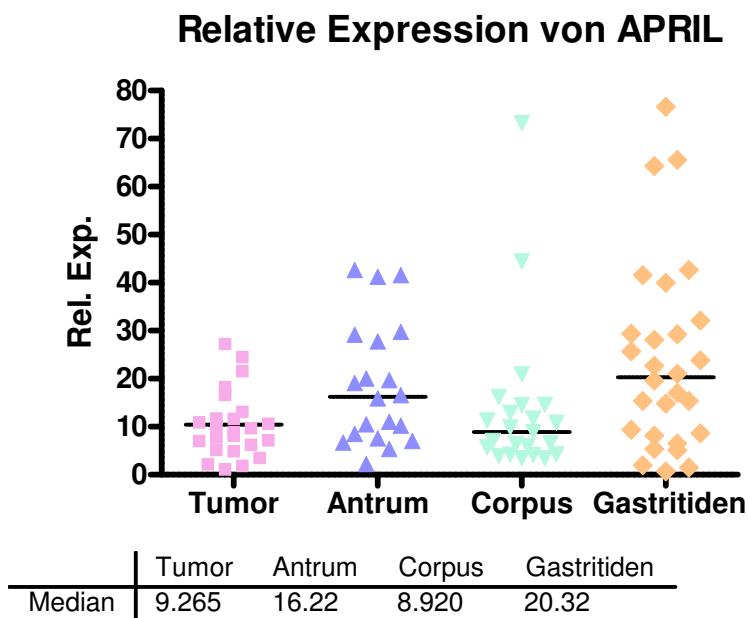


Abbildung 11 Relative Expression der MALT-Lymphome (inklusive tumorfreies Gewebe) und Gastritiden für BAFF-R

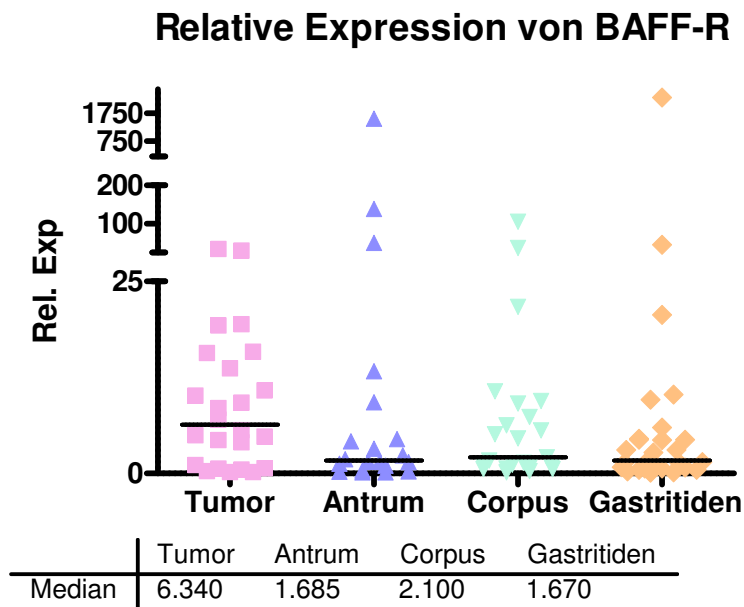
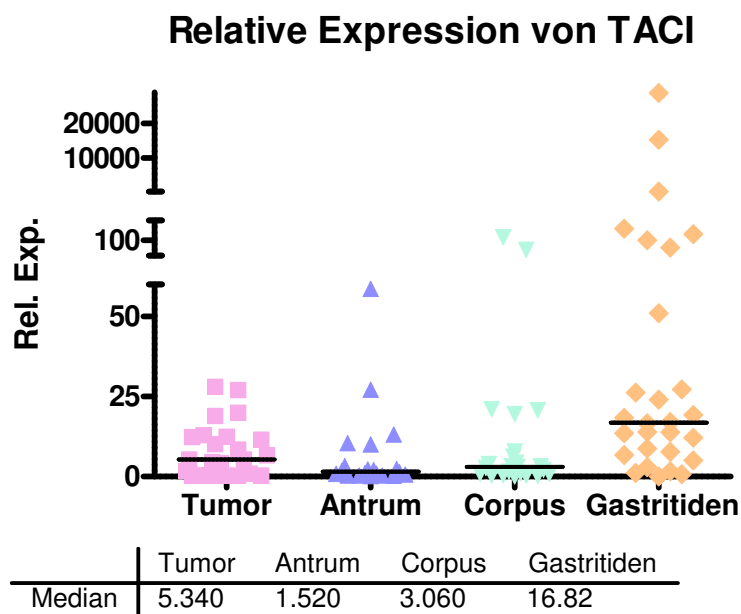


Abbildung 12 Relative Expression der MALT-Lymphome (inklusive tumorfreies Gewebe) und Gastritiden für TAC1



3.5 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit den Computerprogrammen Excel XP, SPSS Version 13.0 und GraphPad Prism 4.00 für Windows XP ausgewertet.

Es wurde die relative Expression zwischen MALT-Lymphomen und Gastritiden verglichen. Dabei sind wir von unterschiedlichem Expressionsverhalten der Gene der beiden Gewebeproben ausgegangen.

Mittels statistischer Tests wurden die festgestellten Unterschiede auf Ihre Signifikanz hin untersucht. Dazu wurden zuerst beide Stichproben mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung hin überprüft. Als Nullhypothese ist eine Normalverteilung und als Alternativhypothese keine Normalverteilung definiert. Wenn der p-Wert kleiner 0,05 ist, wird die Nullhypothese verworfen. Wie in Tabelle 9 beschrieben, zeigt sich eine Normalverteilung sowohl für die Proben der Gastritiden, als auch die der Tumoren nur für APRIL.

Tabelle 9

Kolmogorov-Smirnov Test für Gastritiden			Kolmogorov-Smirnov Test für Tumor		
Gen	p-Wert	Ergebnis	Gen	p-Wert	Ergebnis
BAFF	0.01	nicht normalverteilt	BAFF	0,01	nicht normalverteilt
APRIL	0,06	normalverteilt	APRIL	0,45	normalverteilt
BAFF-R	0,00	nicht normalverteilt	BAFF-R	0,50	normalverteilt
TACI	0,00	nicht normalverteilt	TACI	0,43	normalverteilt

Normalverteilte Stichproben können mittels parametrischen Tests (z.B. T-Test) und nicht normalverteilte Stichproben mittels nicht-parametrischen Tests (z.B. Mann-Whitney) auf die Signifikanz ihrer Unterschiede hin überprüft werden.

Deshalb untersuchten wir die Gültigkeit unserer Hypothese von APRIL mittels des statistischen T-Test. Die beiden Stichproben waren unabhängig voneinander (keine direkte Beziehung zueinander). Daher konnte der ungepaarte T-Test angewandt werden. Die Hypothesen der restlichen Gene wurden aufgrund der nicht Normalverteilung der beiden Stichproben mittels des Mann-Whitney Tests überprüft.

Als Nullhypothese wurde kein Unterschied und als Alternativhypothese ein Unterschied der relativen Expression festgelegt. Dabei wurde als Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau α), wie in statistischen Tests üblich, 0,05 festgelegt. Für jede Probe wurden die Unterschiede von vier Genen untersucht und deshalb wurden mehrere Null- bzw. Alternativhypothesen aufgestellt. Hierdurch ergibt sich ein multiples Testproblem (Forst 1999). Mit zunehmender Zahl der Hypothesentests nimmt auch die Häufigkeit für falsch positive Resultate zu. Um dies zu korrigieren, wird das Signifikanzniveau des Einzeltests mit der Anzahl der Hypothesen, in unserem Fall vier, multipliziert. Bei einem p-Wert kleiner 0.05 wurde die Nullhypothese verworfen und damit war der festgestellte Unterschied statistisch signifikant. Wie in Tbl. 10 und 11 dargestellt, zeigte sich ein signifikanter Unterschied für BAFF, APRIL und TACI. Ausführliche Beschreibung siehe Tbl. 10.1 und 11.1.

Tabelle 10 Ungepaarter T Test: Gastritiden vs Tumor

APRIL	Proben	Mittelwert	Standardabweichung
Gastritiden	28	24,01	19,94
Tumor	24	10,41	6,93

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 0,007. **Statistisch signifikanter Unterschied.**

Tabelle 11 Mann Whitney Test: Gastritiden vs Tumor

BAFF	Proben	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gastritiden	28	21,23	594,5
Tumor	24	32,65	783,5

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 0,03. **Statistisch signifikanter Unterschied.**

BAFF	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Gastritiden	0,1	0,03	0,21
Tumor	0,13	0,07	0,16

BAFF-R	Proben	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gastritiden	28	23,04	645
Tumor	24	30,54	733

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 0,3. **Kein Statistisch signifikanter Unterschied.**

BAFF-R	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Gastritiden	86,98	1,67	434,61

Tumor	9,278	6,34	9,483
-------	-------	------	-------

Tabelle 11 Mann Whitney Test: Gastritiden vs Tumor

TAC1	Proben	Mittlerer Rang	Rangsumme
Gastritiden	28	32,46	909
Tumor	24	19,54	469

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 0,01. **Statistisch signifikanter Unterschied.**

TAC1	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Gastritiden	1606,53	16,82	6060,83
Tumor	8,04	5,34	8,47

Des Weiteren wurde die relative Expression der Gene einerseits zwischen Tumorgewebe und Antrum und andererseits zwischen Tumorgewebe und Corpus beim gleichen Patienten verglichen. In Antrum und Corpus fand sich kein Anhalt für ein MALT-Lymphom und histologisch zeigte sich organisiertes lymphatisches Gewebe. Damit sollte ein möglicher Unterschied zwischen einer lokalen und generalisierten Expression festgestellt werden. Da bei einigen Patienten, von denen eine Tumorprobe vorhanden war, jedoch die dazugehörige Antrum- bzw. Corpusprobe fehlte, haben wir die jeweilige Tumorprobe nicht mit in die Analyse einbezogen. Es fehlten vier Antrum- und drei Corpusproben. Deshalb wurden insgesamt 20 Proben Tumor vs Antrum und 23 Proben Tumor vs Corpus miteinander verglichen.

Die Strichproben waren systemisch miteinander verbunden; da jeweils ein Paar Tumor und Antrum bzw. Corpus von einem Patienten stammte. Deshalb musste zum Nachweis eines signifikanten Unterschiedes der Expression ein gepaarter Test verwendet werden. Die Berechnung wurde bei Normalverteilung beider Proben mittels eines parametrischen Tests (gepaarter T-Test) und bei nicht Normalverteilung mittels eines nicht parametrischen Tests (Wilcoxon-Rangsummen Test) durchgeführt. Eine Normalverteilung konnte nur für APRIL sowohl im Tumor als auch im Antrumgewebe nachgewiesen werden.

Tabelle 12

Kolmogorov-Smirnov Test für Antrum			Kolmogorov-Smirnov Test für Tumor (abzüglich der 4 Tumorproben, von denen korrespondierende Antrumproben fehlten)		
GEN	P-WERT	Ergebnis	GEN	P-WERT	Ergebnis
BAFF	0,00	nicht normalverteilt	BAFF	0,01	nicht normalverteilt
APRIL	0,57	normalverteilt	APRIL	0,46	normalverteilt
BAFF-R	0,00	nicht normalverteilt	BAFF-R	0,62	normalverteilt
TACI	0,01	nicht normalverteilt	TACI	0,78	normalverteilt

Tabelle 13

Kolmogorov-Smirnov Test für Corpus			Kolmogorov-Smirnov Test für Tumor (abzüglich einer Tumorprobe, von dem die korrespondierende Corpusprobe fehlte)		
GEN	P-WERT	Ergebnis	GEN	P-WERT	Ergebnis
BAFF	0,12	normalverteilt	BAFF	0,01	nicht normalverteilt
APRIL	0,04	nicht normalverteilt	APRIL	0,51	normalverteilt
BAFF-R	0,01	nicht normalverteilt	BAFF-R	0,46	normalverteilt
TACI	0,01	nicht normalverteilt	TACI	0,47	normalverteilt

Unsere Hypothesen wurden daher für APRIL mittels des gepaarten T-Testes und für die anderen Gene mittels des Wilcoxon-Rangsummen Testes untersucht. Auch hierbei wurden die Null- und die Alternativhypothese sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit wie beim Vergleich zwischen Gastritiden mit Tumor definiert. Ein statistisch signifikanter Unterschied wie in Tabellen 14, 15 und 16 dargestellt, wurde für keine der Untersuchten Gene festgestellt. Die Tabellen 14.1, 15.1 und 16.1. zeigen die ausführliche Auswertung.

Tabelle 14 Gepaarter T Test: Antrum vs Tumor (abzüglich der 4 Tumorproben, von denen korrespondierende Antrumproben fehlten)

APRIL	Proben	Mittelwert	Standardabweichung
Antrum	20	18,62	12,75
Tumor	20	10,45	7,50

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 0,13. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

Tabelle 15 Wilcoxon Test: Antrum vs Tumor (abzüglich der 4 Tumorproben, von denen korrespondierende Corpusproben fehlten)

Ränge (negative Ränge: Corpus < Tumor; positive Ränge: Corpus > Tumor; Bindung: Corpus = Tumor)

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BAFF_Antrum -	Negative Ränge	8	11,19	89,50
BAFF_Tumor	Positive Ränge	10	8,15	81,50
	Bindungen	2		
	Gesamt	20		

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 3,44. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

BAFF	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Antrum	0,18	0,05	0,40
Tumor	0,13	0,06	0,17

BAFF-R_Antrum	Negative Ränge	14	10,00	140,00
-BAFF-R_Tumor	Positive Ränge	6	11,67	70,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	20		

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 0,77. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

BAFF-R	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Antrum	89,46	1,69	346,07
Tumor	10,02	7,78	9,86

TACI_Antrum	- Negative	15	10,10	151,50
TACI_Tumor	Ränge			
	Positive	5	11,70	58,50
	Ränge			
	Bindungen	0		
	Gesamt	20		

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 0,33. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

TACI	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Antrum	6,87	1,52	13,85
Tumor	8,20	6,02	7,51

Tabelle 16 Wilcoxon Test: Corpus vs Tumor (abzüglich einer Tumorprobe, von dem die korrespondierende Corpusprobe fehlte)

Ränge (negative Ränge: Corpus < Tumor; positive Ränge: Corpus > Tumor; Bindung: Corpus = Tumor)

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BAFF_Corpus	- Negative Ränge	15	11,93	179,00
	Positive Ränge	6	8,67	52,00
BAFF_Tumor	Bindungen	2		
Gesamt		23		

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 0,11. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

BAFF	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Corpus	0,08	0,04	0,10
Tumor	0,13	0,06	0,16

APRIL_Corpus	- Negative Ränge	11	9,55	105,00
	Positive Ränge	11	13,45	148,00
APRIL_Tumor	Bindungen	1		
Gesamt		23		

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 1,94. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

APRIL	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Corpus	13,22	8,92	15,74
Tumor	10,51	9,71	7,07

BAFF-R_Corpus	- Negative	12	14,92	179,00
BAFF-R_Tumor	Ränge			
	Positive	11	8,82	97,00
	Ränge			
	Bindungen	0		
	Gesamt	23		

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 0,85. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

BAFF-R	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Corpus	10,18	2,10	22,46
Tumor	9,09	5,66	9,65

TACI_Corpus		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
TACI_Tumor	Positive	10	10,4	104
	Ränge			
	Bindungen	1		
	Gesamt	23		

p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen = 1,86. Kein statistisch signifikanter Unterschied.

TACI	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Corpus	12,41	3,06	26,02
Tumor	8,21	5,36	8,62

3.6 Zusammenfassung der statistischen Auswertung

Wie in Tabelle 17 zusammenfassend dargestellt und im Abschnitt 3.5 ausführlich beschrieben, wurden die gemessenen Unterschiede der relativen Expression mittels unterschiedlicher Tests, abhängig von der Normalverteilung und Verbundenheit der verglichenen Proben ausgewertet. Hier zeigen sich signifikante Unterschiede der Expression zwischen Gastritiden und Tumor für APRIL, BAFF und TACI. Wobei die Expression von APRIL und TACI in den Gastritiden höher als im Tumorgewebe ist. BAFF hingegen ist im Tumorgewebe höher exprimiert. Die festgestellten unterschiedlichen Expressionen zwischen Antrum und Tumor sowie Corpus und Tumor waren nicht signifikant.

Tabelle 17 Zusammenfassung der statischen Auswertung**Tabelle 17.1**

Gen	Gastritiden, 28 Proben, Mittelwerte (Median)	vs Tumor, 24 Proben, Mittelwerte (Median)	P-Wert	Statistischer Test	Statistischer Unterschied
APRIL	24,01 (20,32)	10,41 (9,26)	0,007	Ungepaarter T Test	<u>signifikant</u>
BAFF	0,1 (0,03)	0,13 (0,07)	0,03	Mann Whitney Test	<u>signifikant</u>
BAFF-R	86,98 (1,67)	9,28 (6,34)	0,3	Mann Whitney Test	nicht signifikant
TACI	1606,53 (16,82)	8,04 (5,34)	0,01	Mann Whitney Test	<u>signifikant</u>

Tabelle 17.2

Gen	Antrum, 20 Proben, Mittelwerte (Median)	vs Tumor, 20 Proben, Mittelwerte (Median)	P-Wert	Statistischer Test	Statistischer Unterschied
APRIL	18,62 (16,22)	10,45 (8,50)	0,13	Gepaarter T Test	nicht signifikant
BAFF	0,18 (0,05)	0,13 (0,06)	3,44	Wilcoxon Test	nicht signifikant
BAFF-R	89,46 (1,69)	10,02 (7,78)	0,77	Wilcoxon Test	nicht signifikant
TACI	6,87 (1,52)	8,2 (6,02)	0,33	Wilcoxon Test	nicht signifikant

Tabelle 17.3

Gen	Corpus, 23 Proben, Mittelwerte (Median)	vs Tumor, 23 Proben, Mittelwerte (Median)	P-Wert	Statistischer Test	Statistischer Unterschied
APRIL	13,22 (8,92)	10,51 (9,71)	1,94	Wilcoxon Test	nicht signifikant
BAFF	0,08 (0,04)	0,13 (0,06)	0,11	Wilcoxon Test	nicht signifikant
BAFF-R	10,18 (2,1)	9,09 (5,66)	0,85	Wilcoxon Test	nicht signifikant
TACI	12,41 (3,06)	8,21 (5,36)	1,86	Wilcoxon Test	nicht signifikant

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Diskussion

Durch eine HP-Infektion im Magen kommt es zu einem chronisch inflammatorischen Zustand und dadurch zum Erwerb vom MALT-Gewebe. Dies stellt eine Vorbedingung bei der Entwicklung zum MALT-Lymphom dar (Stolte, Bayerdorffer et al. 2002).

Die Magenschleimhaut enthält unter physiologischen Bedingungen kein lymphatisches Gewebe (Han 2004). HP induziert die Aggregation von CD4+ Lymphozyten (T-Helfer-Zellen) und B-Zellen in die Lamina Propria des Magens. Dies führt zur Antigenpräsentation, T-Zellaktivierung und B-Zell Proliferation mit einer konsekutiven Formation von Lymphfollikeln. Das Magen MALT-Gewebe bildet sich aus (Han 2004). Entwickelt sich im MALT des Magens ein MALT Lymphom, breiten sich die MALT Lymphom Zellen von der Marginalzone des Lymphfollikels auch in die interfollikuläre Region aus. Wenn sie Epithelgewebe infiltrieren, verursachen sie damit die sogenannten „lymphoepithelialen Läsionen“. Diese wird von manchen Autoren auch als „lymphoepitheliale Destruktion“ bezeichnet und ist das charaktersistische histologische Merkmal von gastralen MALT-Lymphomen.

Die Proliferation von B-Zellen in einer HP induzierten Gastritis ist abhängig von HP-Stamm spezifischen T-Zellen. Es ist noch unklar, ob die B-Zell-Aktivierung von einer kontinuierlichen Präsenz von HP als Antigen oder von einem indirektem Autoimmunprozess abhängig ist (Zucca, Bertoni et al. 2000).

Welche Faktoren zur Transformation der B-Zellen und zur Bildung des MALT-Lymphoms führen, ist noch weitgehend unbekannt. Wir untersuchten das BAFF System als eine der möglichen Faktoren, die dabei von Bedeutung sein könnten.

Von der Entzündung im Magen bis zur Entwicklung des Tumors könnte das BAFF-System die T- und B-Zellen beeinflussen und bei der Pathogenese eine wichtige Rolle spielen. Bereits bei anderen Krankheitsmodellen konnte dies gezeigt werden. Eine übermäßige BAFF und APRIL Expression ist assoziiert mit verschiedenen autoimmunen und inflammatorischen Erkrankungen. Aktuell geht man davon aus, dass BAFF und APRIL in die Pathogenese autoimmunener Erkrankungen involviert sind (Mackay, Schneider et al. 2003; Dillon, Gross et al. 2006).

Bei transgenen BAFF Mäusen scheint die Regulation der Immuntoleranz über das Überleben von autoantigenen B-Zellen gestört zu sein und sie entwickeln

Immunglobulin basierte, autoimmune Störungen. Sie zeigen folgende Veränderungen auf (Mackay, Schneider et al. 2003): B-Zellen Hyperplasie und Hyperglobulinämie; IgG, -M, -E und -A Erhöhung; Vergrößerte Milz, Payersche Plaques und Lymphknoten; Zunahme von zirkulierenden Immunkomplexen, Rheumafaktoren, Antids&ssDNA, Anti-Histone, antinukleäre Antikörper und Nierenveränderungen (erhöhte Proteine im Urin, Leukozyteninfiltration, Zeichen der Vaskulitis, vergrößerte und abnormale Glomeruli).

Erhöhte BAFF und APRIL Werte finden sich im Serum von Patienten, die schwere B-Zellen Funktionsstörung aufweisen: Systemischer Lupus erythematodes (SLE), Rheumatoide Arthritis, Multipler Sklerose oder Sjögren's Syndrom (SjS) (Mackay, Schneider et al. 2003; Dillon, Gross et al. 2006). Auch bei HIV Patienten finden sich erhöhte BAFF Werte.

Durch Blockierung von BAFF in (NZB–NRW) F1 Mäusen konnte eine Reduktion der SLE Symptome nachgewiesen werden oder die Entwicklung Kollagen induzierter Arthritis wurde dadurch inhibiert. Auch bei Mäusen mit rheumatoider Arthritis, war die Knochen- und Knorpelschädigungen nach einer TACI-Ig Behandlung herabgesetzt (Mackay, Schneider et al. 2003).

Eine erhöhte Expression von BAFF und APRIL finden sich auch in einigen hämatologischen Tumoren und in Autoimmunerkrankungen, die wie das SjS, zu maligner Entartung (z.B. NHL) neigen (Tangye, Bryant et al. 2006).

Neoplastische B-Zellen werden vermutlich durch immunologische Mechanismen eliminiert. Übermäßige BAFF und APRIL Stimulierung mag diesen Prozess vermindern oder die Entwicklung zum Lymphomen erleichtern (Mackay, Schneider et al. 2003), (Dillon, Gross et al. 2006).

BAFF (und APRIL) sind mit folgenden malignen B-Zellen Tumoren assoziiert: B-CLL, Multiplem Myelom (MM) und Morbus Waldenström (MW). Dabei werden sie von den malignen Zellen selbst oder von Zellen der Umgebung synthetisiert und stimulieren diese auto- und parakrin. Die Sekretion von BAFF erfolgt zum Beispiel durch NLC (engl.: Nurse-Like-Cells), die in der Umgebung von B-CLL zu finden sind (Mackay and Ambrose 2003; Tangye, Bryant et al. 2006).

Auch ein Zusammenhang zwischen APRIL und hämatologischen Tumoren ist gezeigt worden. Maligne B-Zellen von Patienten mit B-CLL oder Multiples Myelom sprechen auf exogenes APRIL an und exprimieren APRIL mRNA. (Dillon, Gross et al. 2006). Rennert und Kollegen haben gezeigt, dass APRIL Tumorwachstum fördern kann

(Mackay, Schneider et al. 2003). APRIL reguliert Zellwachstum zum Teil durch antiapoptotische Proteine. So führt die exogene Zufuhr von APRIL und BAFF auf NHL Zellen in vitro zur Hochregulierung von antiapoptotischen Proteinen Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1 und zur Runterregulierung von proapoptotischen Proteinen Bax und Bim (Dillon, Gross et al. 2006; Tangye, Bryant et al. 2006).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine anormale oder erhöhte Synthese von BAFF, APRIL und seiner Rezeptoren durch die malignen Zellen selbst oder durch Zellen der Tumorumgebung, den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil oder Überlebensvorteil bieten könnten (Tangye, Bryant et al. 2006).

HP ist in der Lage intrazelluläre Signaltransduktionswege in humanen Zellen zu induzieren, die ihrerseits Transkriptionsfaktoren aktivieren (Yanai, Hirata et al. 2003). Auch proinflammatorische Zytokine werden durch HP induziert (Yanai, Hirata et al. 2003). Die Infektion wirkt pro- und antiapoptotisch auf die Zellen und ein Ungleichgewicht dieses Systems könnte zur malignen Entartung führen (Yanai, Hirata et al. 2003). Dabei scheinen Eigenschaften des Wirts und Faktoren des Erregers eine Rolle zu spielen, da nicht jede HP Infektion und erworbenes MALT-Gewebe zur Bildung eines MALT-Lymphoms führt (Stolte, Bayerdorffer et al. 2002).

Eine HP-Infektion führt zu einer inflammatorischen Umgebung mit Infiltration von Entzündungszellen (Farinha and Gascoyne 2005). Es kommt zur Bildung von sekundärem lymphatischem Gewebe mit Keimzentrum (von Lymphknoten) ähnlichen Strukturen, die schnell teilende B-Zellen enthalten. Durch Antigene und Zytokine werden antigenspezifische T-Zellen aktiviert und im Keimzentrum differenzieren sich reife B-Zellen zu Gedächtnis B-Zellen und zu Plasmazellen, die durch somatische Hypermutation hochaffine AK produzieren (Dillon, Gross et al. 2006; Tangye, Bryant et al. 2006).

In diesem Milieu könnten durch Zytokine von infiltrierten Entzündungszellen BAFF und APRIL vermehrt synthetisiert werden. BAFF und APRIL sind dann in der Lage T-Zellen und B-Zellen zu aktivieren und die Formation von Keimzentrum ähnlichen Strukturen zu induzieren (Tangye, Bryant et al. 2006).

Die Differenzierung der reifen B-Zellen zu Effektorzellen wird strikt reguliert, um hinreichend spezifische humorale Immunität zu sichern und Autoantikörper zu

vermeiden. Liganden-Rezeptoren Paare des TNF-Systems kontrollieren die humorale Immunantwort von aktivierten B-Zellen, wozu auch das BAFF-System gehört (Tangye, Bryant et al. 2006). Interessanterweise sezernieren die malignen B-Zellen des MALT-Lymphoms vom Magen Antikörper, die gegen körpereigene Antigene und nicht gegen HP gerichtet sind (Wundisch, Kim et al. 2003). Dies könnte wieder mit einer abweichenden Expression von BAFF und APRIL zusammenhängen, welches die Apoptose beeinflusst, so dass die autoreaktiven B-Zellen nicht elimiert werden.

Eine Langzeitstimulation von B-Zellen führt zu einem Wachstumsvorteil eines B-Zell Klons, der eine hohe Affinität zu dem stimulierten Antigen besitzt. Die antigene Selektion führt zur Expansion dieses B-Zell Klons. Durch die vermehrte Proliferation kann dieser anfälliger für genetische Veränderungen werden, die zur neoplastischen Transformation der Zellen und zu dessen Tumorprogression führen können (Zucca, Bertoni et al. 2004).

Die entarteten B-Zellen des MALT-Lymphoms stammen von hypermutierten „engl.: postgerminal center lymphocytes“ ab. Ihr Wachstum wird durch Antigene stimuliert und sie durchlaufen eine antigene Selektion (Wundisch, Kim et al. 2003). Die Abhängigkeit der MALT-Lymphome, von der Stimulation durch Antigene oder durch Faktoren lokaler Immunreaktion, könnte die Tendenz des MALT- Lymphoms, nicht zu streuen erklären (Zucca, Bertoni et al. 2000). Denn die HP Eradikationstherapie im frühen Stadium des MALT-Lymphoms spricht dafür, dass die malignen Zellen eine Antigenstimulation bzw. die chronisch inflammatorische Umgebung zum Überleben benötigen. In höheren Stadien der Tumorerkrankung bleibt die Eradikationstherapie erfolglos. Die genetischen Alterationen sind in diesen Stadien vielleicht so weit fortgeschritten, dass die malignen Zellen zum Überleben keiner äußerlichen Stimulation mehr bedürfen (Zucca, Bertoni et al. 2000; Stolte, Bayerdorffer et al. 2002). So sprechen MALT-Lymphome mit einer t(11,18) nicht auf eine Eradikationstherapie an (Nakagawa, Seto et al. 2006). Das Überleben dieser malignen B-Zellen könnte dann auch unabhängig von einer möglichen Stimulation durch BAFF&Co sein.

Das BAFF-System, durch chronische Inflammation in seinem Expressionsverhalten pathologisch verändert oder genetisch prädispositioniert und durch Inflammation zur pathologischen Expression getriggert, könnte dabei die Homöostase der B-Zellen so

verändern, dass die „postgerminal center lymphocytes“ entarten oder entartete Zellen überleben. BAFF könnte aber, wie bei anderen B-Zellen Lymphomen auch, von den Tumorzellen von Beginn an oder im Verlauf selbst produziert werden (Tangye, Bryant et al. 2006).

Bei der Pathogenese des MALT-Lymphoms des Magens scheint NF- κ B eine Schlüsselrolle zu spielen.

Denn die Aktivität des Signalweges von NF- κ B kann sowohl durch eine HP-Infektion als auch durch die Translokationen t(11;18), t(1;14) und t(14,18) erhöht werden (Wundisch, Kim et al. 2003; Nakagawa, Seto et al. 2006). Auch die Signaltransduktionswege der Rezeptoren von APRIL und BAFF können zu einer Veränderung von NF- κ B führen und stehen so im Einklang mit den bisher bekannten Pathomechanismen des MALT-Lymphoms. NF- κ B aktiviert einen klassischen und einen alternativen Signaltransduktionsweg, die ihrerseits zur Expression unterschiedlicher Zielgene führen und antiapoptotisch wirken können. Durch BAFF und APRIL können ebenfalls beide Signaltransduktionswege aktiviert werden. Zum Beispiel wird in B-CLL Zellen bevorzugt der alternative Signaltransduktionsweg aktiviert. Trotzdem scheint die antiapoptotische Funktion von BAFF und APRIL, das in B-CLL Zellen wahrscheinlich parakrin und autokrin sezerniert werden, am ehesten durch den klassischen NF- κ B Signaltransduktionsweg vermittelt zu sein (Endo, Nishio et al. 2007).

In Abbildung 13 sind die Signaltransduktionswege von NF- κ B bedingt durch Aktivierung des BAFF Systems dargestellt.

Die t(11,18) ist signifikant verknüpft mit der Infektion von CagA-positiven HP-Stämmen (Nakagawa, Seto et al. 2006). CagA-positive HP Stämme stehen im Zusammenhang mit einer verstärkten inflammatorischen Antwort, Sezernierung von potenten Chemokinen (z.B. IL-8), die ihrerseits neutrophile Granulozyten aktivieren. Aktivierte Neutrophile produzieren genotoxische Agenzien wie z.B. Sauerstoffradikale, die Doppelstrangbrüche verursachen können, die z.B. auch bei der t(11;18) gefunden worden sind (Farinha and Gascoyne 2005). Dies könnte z.B. ein Erregerfaktor sein, der zur Entartung führen kann.

4.2 Ergebnisorientierte Diskussion

Der Vergleich der relativen Expression zwischen dem MALT-Lymphom (Tumor) und der Kontrollgruppe der Gastritiden (MALT-Gewebe von Patienten mit HP positiver Gastritis mit Lymphfollikellbildung) lässt auf einen Unterschied der Expression für APRIL, BAFF und TACI schließen. Für BAFF-R ist das Signifikanzniveau größer 0,05 und deshalb wird angenommen, dass ein statistischer Unterschied der Expression unwahrscheinlich ist. Damit kann jedoch nicht der Schluss gezogen werden, dass kein Unterschied besteht, weil ein Fehler 2. Art vorliegen kann. Dabei handelt es sich um ein falsch negatives Ergebnis, dass durch eine höhere Probandenzahl korrigiert werden kann.

Im zweiten durchgeführten Test zeigte sich für keines der untersuchten Gene ein statistisch signifikanter Unterschied der relativen Expression zwischen MALT-Lymphomgewebe (Tumor) und MALT-Gewebe desselben Patienten (Antrum & Corpus). Ein Grund dafür könnte sein, dass das MALT-Lymphom den Magen multifokal infiltrierte. Denn auch in histologisch tumorfreiem Magengewebe konnte mit Hilfe von klonspezifischen Primern eine Ausbreitung des Tumors gezeigt werden (Wotherspoon, Doglioni et al. 1992; Du, Diss et al. 2000). Aber bei dieser Untersuchung könnte ebenfalls ein Fehler 2. Art die Ursache für den nicht festgestellten Unterschied sein.

Der in diesem Stichprobenumfang festgestellte nicht signifikante Unterschied, könnte der Grundgesamtheit entsprechen. Es könnte auch durch technische Ursachen bedingt sein. Von der Probengewinnung, über ihre Aufbewahrung bis hin zur ihrer Aufbereitung, könnten die Magenbiopsien unterschiedlich geschädigt worden sein. Dadurch hätten z.B. schon von Beginn an unterschiedliche Konzentrationen mRNA vorgelegen haben können, die aber nicht der tatsächlichen Expression entsprechen haben. Fehler dieser Art könnten durch einen größeren Probenumfang minimiert werden.

BAFF (Median: Gastritiden 0,03 [Standardabweichung = 0,21] < Tumor 0,07 [Standardabweichung = 0,16], Statistischer Test: Mann Whitney Test, $p=0,03$) war wie erwartet im Tumorgewebe höher exprimiert als in den Gastritiden. Das steht im Einklang mit der zuvor beschriebenen erhöhten Expression bei Autoimmunerkrankungen und anderen B-Zell-Lymphomen. Unsere Annahme, dass

BAFF auch in den tumorfreien Arealen eines Patienten niedriger exprimiert wird, kann wegen der geringen Signifikanz nicht bewiesen werden.

Unerwarteterweise ist die Expression von APRIL in den Gastritiden höher als im Tumorgewebe (Mittelwert: Gastritiden 24,01 [Standardabweichung = 19,94] > Tumor 10,41 [Standardabweichung = 6,93], Statistischer Test: Ungepaarter T Test, $p=0,007$). Trotz der hohen Ähnlichkeiten von APRIL und BAFF, scheint APRIL für die Homöostase der naiven peripheren B-Zellen eine geringere Rolle als BAFF zu spielen (Woodland, Schmidt et al. 2006). Für die vollkommene Funktion von antigenstimulierten B-Zellen wird es jedoch benötigt. So beeinflusst es die Immunglobulin-Klassenwechsel von IgA und das Überleben von langlebigen Plasmazellen (Woodland, Schmidt et al. 2006).

Wenn man annimmt, dass der gemessene Unterschied, also die relative Menge der mRNA auch die Menge der funktionierenden Proteine widerspiegelt, könnte man argumentieren, dass die Expression von APRIL in den Gastritiden durch den chronisch infektiös-inflammatorischem Zustand erhöht ist. Dadurch werden vermehrt Immunglobuline, vor allem IgA produziert, um die Abwehr gegen HP zu unterstützen (Tangye, Bryant et al. 2006). Während der malignen Transformation der B-Zellen wird es eventuell runterreguliert, weil andere B-Zellen stimulierende Faktoren wie z.B. BAFF überwiegen. BAFF könnte dabei sowohl von Zellen der Tumorumgebung, als auch von den Tumorzellen selbst exprimiert werden wie z.B. bei der B-CLL (Mackay and Ambrose 2003; Tangye, Bryant et al. 2006).

Der Vergleich der Expression von APRIL zwischen MALT-Lymphomgewebe (Tumor) und MALT-Gewebe desselben Patienten (Antrum & Corpus) lässt wegen der niedrigen Signifikanz nur eine Tendenz interpretieren. APRIL ist im Antrum höher (Mittelwert: Antrum 18,62 [Standardabweichung = 12,75] > Tumor 10,45 [Standardabweichung = 7,50], Statistischer Test: Gepaarter T-Test, $p=0,13$) und im Corpus niedriger (Median: Corpus 8,92 [Standardabweichung = 15,74] < Tumor 9,71 [Standardabweichung = 7,07], Statistischer Test: Wilcoxon Test, $p=1,94$) exprimiert. Diese Abweichung zwischen den beiden MALT-Lymphom freien Arealen könnte am multifokalen Vorkommen der Lymphomzellen liegen, die histologisch jedoch tumorfrei waren (Wotherspoon, Doglioni et al. 1992; Du, Diss et al. 2000).

Es wäre interessant zu erfahren, wie die Expression von APRIL im normalen Magengewebe ist und von welchen Zellen die einzelnen Liganden bzw. ihre

Rezeptoren exprimiert werden. Nach den vorherigen Überlegungen sollte die Synthese von APRIL in physiologischem Magengewebe niedriger als in den Gastritiden und im Tumorgewebe sein.

TACI ist wie erwartet in den Gastritiden im Vergleich zum Tumor höher exprimiert (Median: Gastritiden 16,82 [Standardabweichung = 6060,83] > Tumor 5,34 [Standardabweichung = 8,47], Statistischer Test: Mann Whitney Test, $p=0,01$).

Durch eine höhere Expression von TACI könnten in inflammatorischem Gewebe die stimulatorischen Effekte auf B-Zellen, die proliferationsfördernd und stimulierend wirken, im Gleichgewicht gehalten werden. Denn TACI defiziente Mäuse entwickeln Autoimmunität und eine fatale Lymphoproliferation. Als ein inhibitorischer Rezeptor von BAFF und APRIL hat es einen negativen Effekt auf die B-Zellen Homöostase (Tangye, Bryant et al. 2006). Einige Autoren sehen TACI im Zusammenspiel mit BAFF-R und BCMA. Dabei ist die Expression von BAFF-R und BCMA in Tumorzellen hochreguliert und die von TACI wie in unserer Untersuchung runterreguliert (Tangye, Bryant et al. 2006). Das Gleichgewicht der Rezeptoren mag zugunsten stimulierender Faktoren (z.B. BAFF-R und BCMA) verschoben worden sein, die zur Entartung geführt haben könnten oder das Überleben der malignen B-Zellen begünstigen.

Zusätzlich interagiert TACI mit APRIL. Dies hat positive Effekte auf die humorale Immunität, indem es zum Beispiel die T-Zellen unabhängige Antigenantwort fördert und die Serum IgA Werte erhöht (Tangye, Bryant et al. 2006). Die vermehrte Expression von TACI und APRIL mag daher in den Gastritiden zur besseren Eliminierung des Erregers (HP) führen.

Im Tumorgebewebe ist TACI im Vergleich zum lymphomfernen MALT-Gewebe (Antrum und Corpus) höher exprimiert (Median: Corpus 3,06 [Standardabweichung = 26,02] < Tumor 5,36 [Standardabweichung = 8,62], Statistischer Test: Wilcoxon Test, $p=1,86$ / Antrum 1,52 [Standardabweichung = 13,85] < Tumor 6,02 [Standardabweichung = 7,51], Statistischer Test: Wilcoxon Test, $p=0,33$). Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant und geht auch nicht mit den bisher beschriebenen geringeren Expression in Tumoren einher (Tangye, Bryant et al. 2006).

Ebenfalls für BAFF-R bestand kein signifikanter Unterschied ($p=0,3$ Gastritiden vs Tumor, $p=0,77$ Antrum vs Tumor, $p=1,86$ Corpus vs Tumor) zwischen den Proben. Jedoch zeigt sich ein Trend, der unsere Vermutung bestätigt das BAFF-R im Tumor

höher als in den lymphomfreien Gewebe (Gastritiden, Antrum & Corpus) exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte von den vier untersuchten Genen für BAFF, APRIL und TACI ein wahrscheinlicher Unterschied der Expression zwischen Tumor und Gastritiden festgestellt werden. Um auch für BAFF-R einen signifikanten Unterschied zeigen zu können und um einen Fehler 2. Art zu vermeiden, sollten die Versuche mit einem größeren Probenumfang wiederholt werden. Zusätzlich sollten die histologisch tumorfreien Proben der MALT-Lymphom-Patienten, durch klonspezifische Primer exakt charakterisiert werden. Damit könnten mögliche Unterschiede zwischen diesen Geweben festgestellt werden.

Des Weiteren wäre es wichtig, die gewonnenen Erkenntnisse, die auf der Synthese von mRNA beruhen, auch auf der Proteinebene zu bestätigen. Damit könnte ein Einfluss des BAFF-Systems auf das MALT-Lymphom genauer beschrieben werden, weil von der Transkription bis zur Proteinsynthese und –sekretion, diese noch essentiell verändert werden können.

Es wäre interessant zu erfahren, welche biologischen Umstände (wie z.B. H.P. spezifische T-Zellen) zu einer Veränderung des Expressionsmusters des BAFF-Systems im Tumor im Vergleich zu normalem Magen und zu den Gastritiden geführt haben. Diese Fragen könnten in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ des Magens sind zu ca. 90% mit einer HP-induzierten chronischen Gastritis assoziiert. Die Eradikation von HP kann in frühen Stadien zu einer Remission des Lymphoms führen. Dies und die Tatsache, dass die Proliferation von Lymphomzellen *in vitro* auf die Anwesenheit von T-Zellen angewiesen ist, legt nahe, dass zur Ausbildung der malignen Transformation stimulatorische Signale notwendig sind.

Mit BAFF und APRIL sind starke B-Zell stimulatorische Faktoren der Tumor Nekrose Faktor Familie identifiziert worden, die an die Rezeptoren BCMA, TACI und BAFF-R binden können. Eine Dysregulation ihrer Expression führt zu verschiedenen Störungen während der Entwicklung und Proliferation von B-Zellen. Eine erhöhte Expression von BAFF und APRIL geht mit autoimmunen Erkrankungen, Immundefizienz und B-Zellen Lymphomen einher. Eine hohe Expression von BAFF und APRIL findet sich insbesondere in B-Zell Lymphomen, die von reifen B-Zellen ausgehen. Zu nennen sind hier die chronisch lymphatische Leukämie, das Multiples Myelom oder der Morbus Waldenström. Die Liganden wirken auf diese Tumoren proliferationsfördernd, so dass hier eine Verbindung zwischen B-Zell-Stimulation und Tumorgenese vorliegen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir die relative Expression von BAFF, APRIL und seinen Rezeptoren TACI und BAFF-R in gastralen MALT und gastralen MALT-Lymphomen. Unsere Hypothese war, dass eine Dysregulierung des BAFF-Systems bei der Lymphomentstehung und -erhaltung eine Rolle spielt.

Deshalb haben wir diese Faktoren im MALT-Lymphomgewebe (Tumor) im Vergleich zum MALT-Gewebe desselben Patienten (Antrum & Corpus) sowie zum MALT-Gewebe von Patienten mit HP positiver Gastritis mit Lymphfollikellbildung (Gastritiden) verglichen.

Ein signifikanter Unterschied der Expression ist zwischen Gastritiden und MALT-Lymphomen für BAFF, APRIL und TACI festgestellt worden. BAFF ist in unserer Untersuchung wie auch in anderen B-Zell Lymphomen und autoimmunen Erkrankungen höher exprimiert.

Die Expression von APRIL ist in den Gastritiden jedoch höher als im Tumorgewebe. Dies steht im Gegensatz zu den bei anderen B-Zell Lymphomen erhobenen Befunden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß hochreguliertes APRIL in den Gastritiden ein Ausdruck für Erregereliminierung durch Aktivierung einer intakten Immunantwort darstellt. Während der malignen Transformation der B-Zellen wird es eventuell

runterreguliert, weil andere B-Zellen stimulierende Faktoren wie z.B. BAFF überwiegen. BAFF könnte dabei sowohl von Zellen der Tumorumgebung als auch von den Tumorzellen selbst exprimiert werden, wie es bei der B-CLL beschrieben wurde.

TACI ist in den Gastritiden im Vergleich zum Tumor höher exprimiert. Als ein inhibitorischer Rezeptor von BAFF und APRIL hat es einen negativen Effekt auf die B-Zell Proliferation. Durch eine höhere Expression von TACI könnten in inflammatorischem Gewebe die stimulatorischen Effekte auf B-Zellen, die proliferationsfördernd und stimulierend wirken, im Gleichgewicht gehalten werden. Die Expression von BAFF-R und BCMA ist in der Literatur bei Tumoren als hochreguliert und die Expression von TACI wie in unserer Untersuchung als runterreguliert beschrieben. Das Gleichgewicht der Rezeptoren ist zugunsten stimulierender Faktoren (z.B. BAFF-R und BCMA) verschoben. In unseren Untersuchungen war jedoch für BAFF-R kein signifikanter Unterschied festzustellen, es zeigte sich jedoch ein Trend, der unsere Vermutung bestätigt, dass BAFF-R im Tumor höher als im lymphomfreien Gewebe exprimiert wird.

Im zweiten durchgeführten Test zeigte sich für keines der untersuchten Gene ein statistisch signifikanter Unterschied der relativen Expression zwischen MALT-Lymphomgewebe (Tumor) und MALT-Gewebe desselben Patienten (Antrum & Corpus). Ein Grund dafür könnte sein, dass das MALT-Lymphom den Magen multifokal infiltriert. Auch in histologisch tumorfreiem Magengewebe konnte mit Hilfe von klonspezifischen Primern eine Dissemination des Tumors gezeigt werden. Eine weitere Ursache könnte die zu geringe Anzahl untersuchter Proben sein.

5.1 Englische Zusammenfassung

Early gastric MALT (mucosa associated lymphoid tissue) lymphoma is still dependent on antigen presentation as indicated by the remission after *Helicobacter pylori* (H.p.) eradication. Autocrine and paracrine secretion of B-cell stimulatory factors by inflammatory bystander cells may sustain lymphoma growth and survival. The TNF (tumor necrosis factor) family members BAFF (B cell- activating factor of the TNF family) and APRIL (A Proliferation Inducing-ligand) have previously been shown to be expressed in B-cell lymphomas.

We assessed the expression levels of BAFF and APRIL, as well as their receptors BAFF-R (BAFF receptor) and TACI (Transmembrane Activator and CAML Interactor) in 24 patients with early gastric MALT lymphomas by real-time quantitative PCR of

snap-frozen biopsy samples. Distant biopsies with gastric MALT, but without evidence for lymphoma, from the same patients were used for intra-individual comparison. A second independent cohort of 28 patients with H.p.-associated chronic gastritis was used for inter-individual comparison.

BAFF was significantly up-regulated in lymphoma tissue when compared with chronic gastritis in the inter-individual group (chronic gastritis 0,03 [standard deviation (SD)=0,21] < lymphoma tissue 0,07 [SD=0,16], Mann Whitney test (MWT) $p=0,03$). APRIL (chronic gastritis 24,01 [SD=19,94]) > lymphoma tissue 10,41 [SD= 6,93], unpaired t-test $p=0,007$) as well as TACI (chronic gastritis 16,82 [SD=6060,83] > lymphoma tissue 5,34 [SD=8,47], MWT $p=0,01$) were down-regulated in lymphoma tissue in comparison to the chronic gastritis tissue. No differences could be shown for the same genes in the intra-individual comparison group. No differences were found for BAFF-R between all groups.

The higher expression of BAFF in both, lymphoma and non-neoplastic gastritis, in gastric MALT lymphoma as compared to lymphoid tissue of chronic gastritis cases suggests an involvement of BAFF in the development of gastric MALT lymphoma. In addition, the lower expression of TACI as a negative regulator of B-cell development may further support the importance of B-cell stimulatory factors and their receptors. However, the absence of significant differences within a given patient with gastric MALT lymphoma indicates the necessity of additional events for full transformation.

6 Anhang

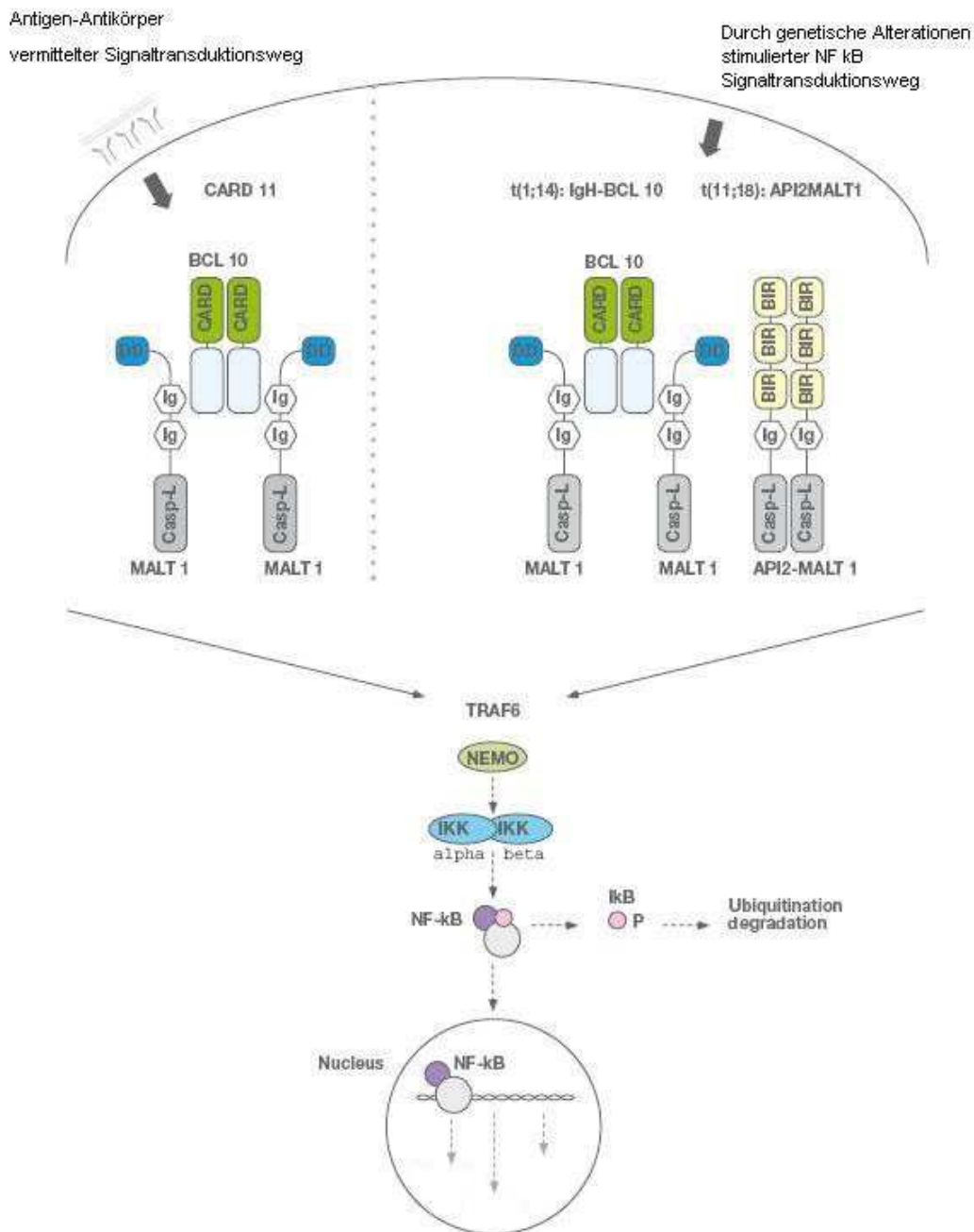
6.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

GAPDH 5´	CTC CTC CAC CTT TGA CGC TG
GAPDH 3´	ACC AC C CTG TTG CTG TAG CC
BAFF-3´	TCA GAA CAG CAG AAA TAA CGG TG
BAFF-5´	ACC GCG GGA CTG AAA ATC T
APRIL-3´	ACT CTG TCC TGC ACC TGG TTC C
APRIL-5´	CCT GGA AGC CTG GGA GAA TG
BAFF-R-3´	CTT TGA CAG CCC TTG AAG GTG
BAFF-R-5´	CCC CAT GGA GTT TGG TGT G
TACI-3´	TCA GAC AAC TCG GGA AGG TAC CAA
TACI-5´	GCA AGG AGC AAG GCA AGT TCT ATG

6.2 Abbildungsverzeichnis & Abbildungen

- Abbildung 1 Aktivierung von NF- κ B, verändert nach (Cavalli, Isaacson et al. 2001; Isaacson and Du 2004; Du 2007)
- Abbildung 2.1 & 2.2 Interaktion und Expression der Liganden und der Rezeptoren. Verändert nach: (Mackay, Schneider et al. 2003; Mackay, Silveira et al. 2007)
- Abbildung 3 BAFF, APRIL, BCMA, TACI & BAFF-R Expressionprofil auf B-Zellen (Tangye, Bryant et al. 2006)
- Abbildung 4 Vergleich der Extraktionsmethoden mittels Gelelektrophorese
- Abbildung 5 Optimierung der Annealingtemperatur
- Abbildung 6 Optimierung der Annealingtemperatur
- Abbildung 7 Effizienzen der Amplifikationen
- Abbildung 8 Relative Expression am Beispiel eines Patienten
- Abbildung 9 Relative Expression der MALT-Lymphome (inklusive tumorfreies Gewebe) und Gastritiden für BAFF
- Abbildung 10 Relative Expression der MALT-Lymphome (inklusive tumorfreies Gewebe) und Gastritiden für APRIL
- Abbildung 11 Relative Expression der MALT-Lymphome (inklusive tumorfreies Gewebe) und Gastritiden für BAFF-R
- Abbildung 12 Relative Expression der MALT-Lymphome (inklusive tumorfreies Gewebe) und Gastritiden für TACI
- Abbildung 13 NF- κ B Aktivierung durch das BAFF System (Endo, Nishio et al. 2007)

Abbildung 1 Aktivierung von NF-κB, verändert nach (Cavalli, Isaacson et al. 2001; Isaacson and Du 2004; Du 2007)



Antigen-Antikörper Stimulierung

Durch Bindung eines Antigens (z.B. HP) an einem Antikörper wird intrazellulär CARD11 (=CARMA1 = Bimp1) aktiviert. Dadurch wird Bcl10 rekrutiert und dessen Oligomerisation induziert. Dies führt wiederum, nach Bindung von MALT1 an Bcl10 zu dessen Oligomerisation und so aktiviertes MALT1 bindet TRAF6, das seinerseits wieder oligomerisiert und den IKK-Komplex aktiviert.

Aktivierung von NF-κB durch genetische Alterationen

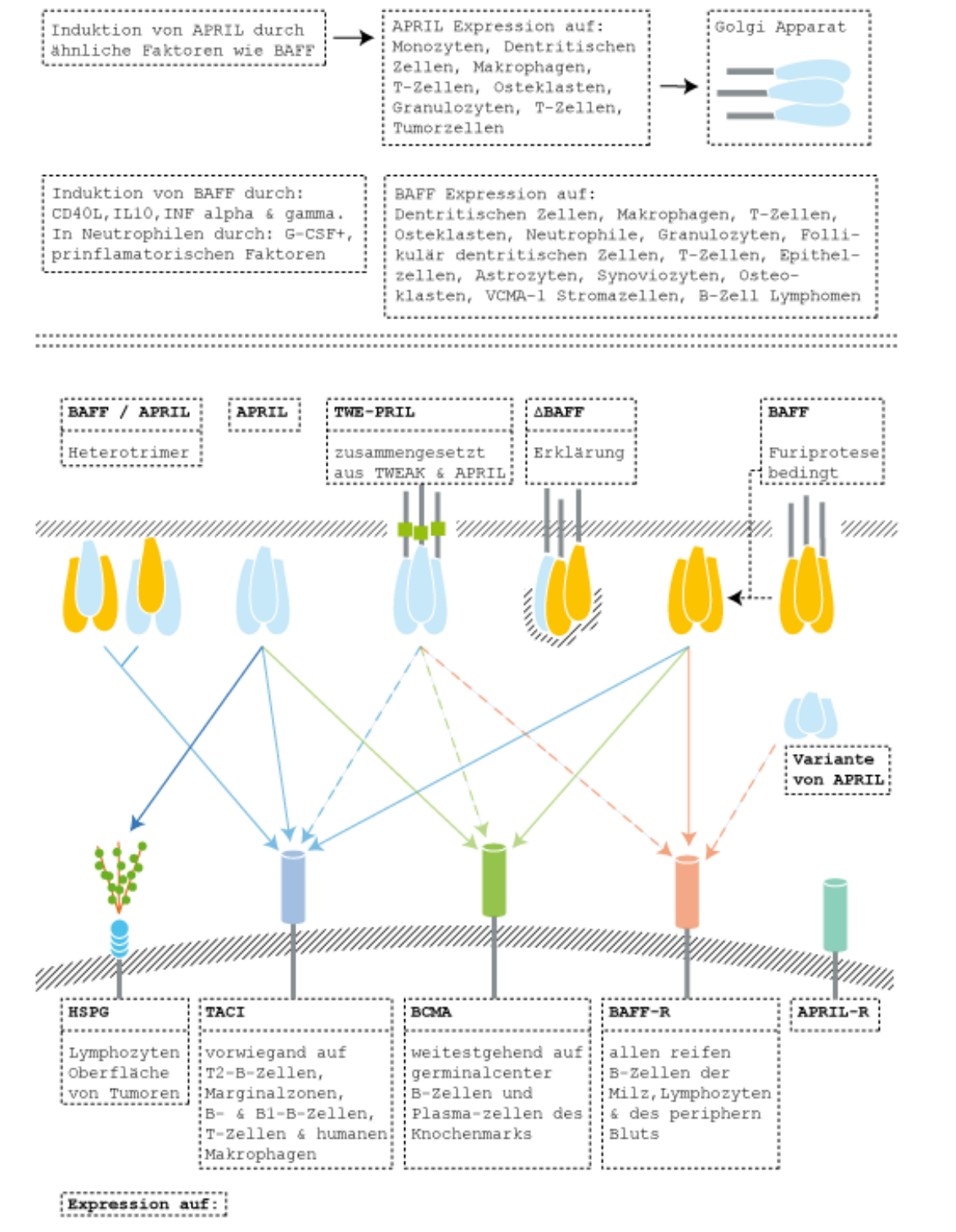
In MALT Lymphomen mit der Translokation t(1;14) wird das gesamte Bcl10 Gen

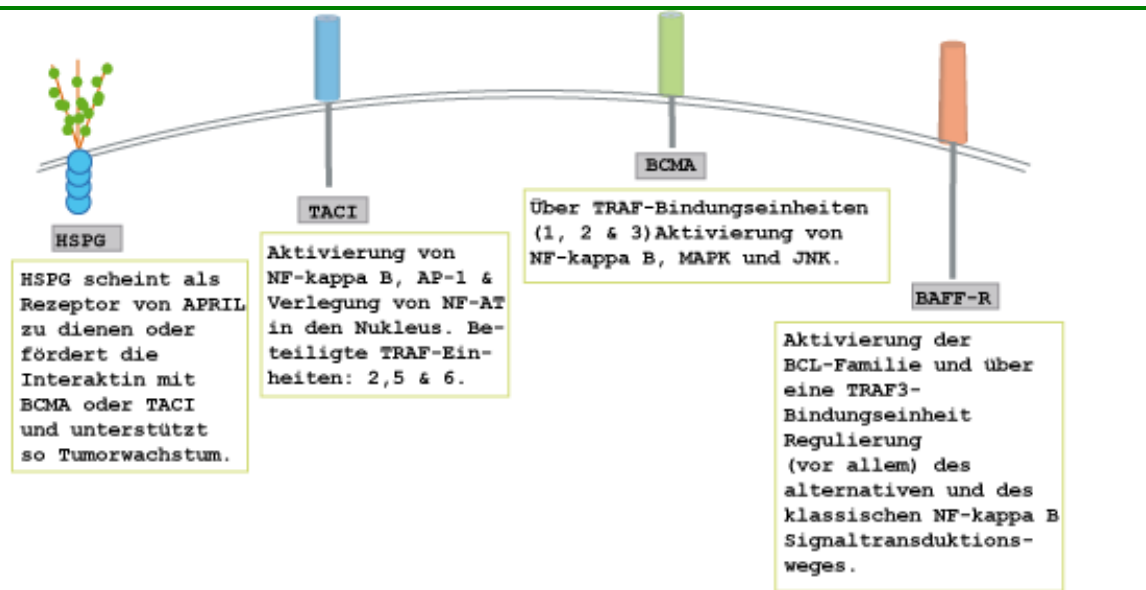
unter die Kontrolle des Immunglobulin (Ig) Locus (Enhancer-Region) des Chromosom 14 gebracht, dass zur dysregulierten Expression von Bcl10 führt. Über dessen CARD-Dömenen oligomerisiert es und führt zu einer konstitutiven Aktivierung von NF- κ B. Die Translokation t(11;18) bestehend aus dem Fusionsprotein API2-MALT1 führt zur Stabilisierung des Proteins Bcl10 und über selbst - Oligomerisation zu einer dauerhaften NF- κ B Aktivierung. Beide Translokationen führen über den IKK-Komplex zur einer Translokation von NF- κ B in den Nukleus.

Aktivierung des IKK-Komplexes

Der IKK-Komplex umfasst 2 katalytisch aktive Kinasen (IKK-alpha und IKK-beta) und eine regulatorische Komponente (IKK-gamma, auch als NEMO bezeichnet). Dessen Aktivierung führt zu einer IKK-beta-Kinase-Aktivierung und nachfolgend zu einer I-kappa-B-Phosphorylierung und -Degradation. Dies führt zu einer Freisetzung von NF- κ B in den Nukleus

Abbildung 2.1 & 2.2 Interaktion und Expression der Liganden und der Rezeptoren. Verändert nach: (Mackay, Schneider et al. 2003; Mackay, Silveira et al. 2007)





Zu Abbildung 2.1:

Im oberen Teil der Graphik sind von links nach rechts die folgenden Liganden dargestellt: BAFF/APRIL Heterotrimer, ein Heterotrimer mit Delta BAFF (, das nicht sezerniert werden kann und das wahrscheinlich biologisch inaktiv ist.), APRIL das im Golgi Apparat gespalten und in löslicher Form sezerniert wird, TWE-PRIL (das wahrscheinlich die membrangebundene Form von APRIL ist), BAFF und eine alternative Variante von APRIL. Im unteren Teil finden sich wieder von links nach rechts die Rezeptoren: HSPG, TACI, BCMA und BAFF-R. Durchgezogene schwarze Pfeile zeigen strenge und gestrichelte Pfeile schwache und nicht direkt nachgewiesene Interaktion an.

Zu Abbildung 2.2:

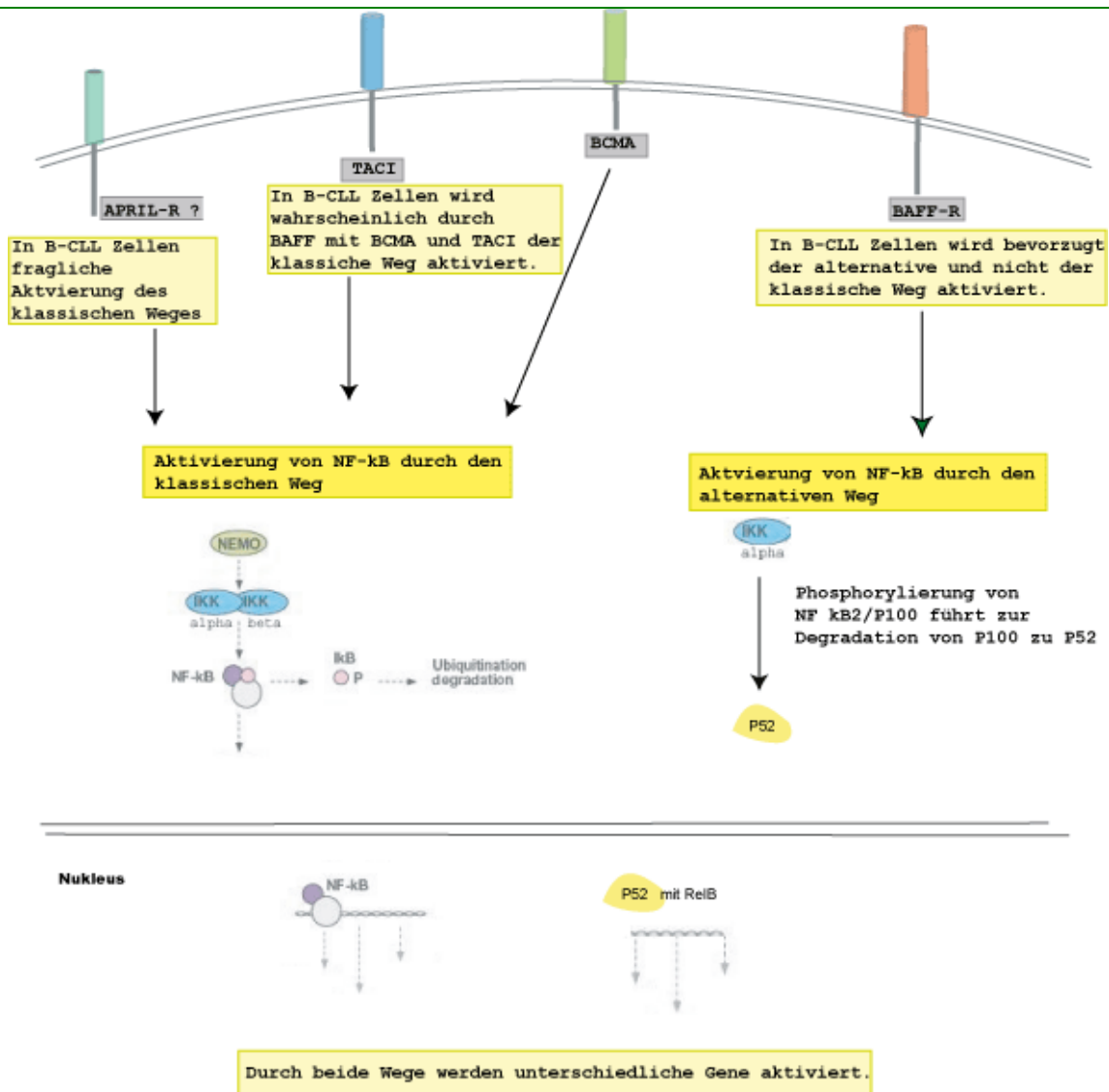
Von links nach rechts sind die Rezeptoren mit den nachgeschalteten Mediatoren dargestellt und beschrieben.

Abbildung 3 BAFF, APRIL, BCMA, TACI & BAFF-R Expressionprofil auf B-Zellen (Tangye, Bryant et al. 2006)

Ort der Entwicklung	Knochenmark (KM)				Lymphatisches Gewebe		Knochenmark, Milz, Tonsillen, Mergen-Darm-Trakt
	Untreife B-Zelle	KM, Blut, Milz	Naive -> Germinal-center	Transitionale B-Zelle	Gedächtniszelle	Plasmazelle	
B-Zelle							
BAFF-R	+	+	++	++	++	±	-
BCMA	-(+m)	-	-	+	-	++	-(+m)
TACI	-	-(+m)	-	±	+	+	-
Reaktion auf BAF							
Maus	-	+++	++	+	+	++	++
Mensch	?	-	±	?	±	++	-

Unterschiedliche Expression der BAFF-Rezeptoren während der humanen B-Zell Entwicklung und Differenzierung. (Von der unreifen zur transitionalen zur naiven Germinalcenter und zur Plasmazelle/Gedächtniss B-Zelle). Dargestellt ist auch die Fähigkeit der jeweiligen humanen und menschlichen Zellen auf BAFF Stimulierung zu antworten.

Abbildung 13 NF-κB Aktivierung durch das BAFF System (Endo, Nishio et al. 2007)



BAFF und APRIL können in normalen B-Zellen NF-κB aktivieren. Sowohl der klassische als auch der alternative NF-κB Signaltransduktionsweg kann von BAFF aktiviert werden. Dabei wird von BAFF-R bevorzugt der alternative Weg und der klassische Weg wahrscheinlich durch BCMA und TACI stimuliert. APRIL kann wahrscheinlich in B-CLL Zellen durch einen noch nicht identifizierten APRIL Rezeptor den klassischen Weg aktivieren.

6.3 Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen Presenting Cells
APRIL	A proliferation-inducing ligand
BAFF	B cell activation factor of the TNF family
BAFF-R	BAFF Rezeptor
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCMA	B cell maturation antigen
BCR	B-Zell-Rezeptor
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
Blk	Bike-like killer gene
CAML	Calcium modulator and Cylophilin Ligand
CARMA	CARD and MAGUK domain-containing protein
cDNA	Complementary DANN
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisone
clAPs	inhibitor of apoptosis
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CRD	Cystein Rich Domain
CSR	Class switch Recombination
CT	Grenzwertzyklus
FACS	Fluorescence activated cell sorting
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin Lymphome
HP	Helicobacter Pylori
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycans
IARC	International Agency for Research on Cancer
IFN-	Interferon Gamma
Ig	Immunglobulin
IKK	IkappaB kinase
IL-	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminal kinase

JÜR	Jahres Überlebensrate
KM	Knochenmark
LDH	Lactat Dehydrogenase
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MLT	MALT lymphoma-associated translocation
MM	Multiplern Myelom
MW	Morburs Waldenström
MZ B-Zellen	Marginalzonen B-Zellen
MZL	Marginalzonen B-Zell Lymphom
NEMO	Nuclear factor kappaB essential modulator
NHL	Non Hodgkin Lymphome
NIK	(NF-kappa B inducing Kinase)
NLC	Nurse-Like-Cells
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerase Chain Reaction
RA	Rheumatoide Arthritis
REAL	Revised European American Classification
RNA	Ribonukleinsäure
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results of the National Cancer Institute
SjS	Sjögren's Syndrom
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SOP	Standard operating procedure
TA Immunglobulinantwort	T-Zellen abhängige Immunglobulinantwort
TAC1	Transmembrane activator und Calcium modulator and Cylophilin Ligand interacter
TCR	T-Zell-Rezeptor
THD	TNF homology domain
TMNB-Paris Staging Systems	Tumor Node Metastasis B-Sytmoms Paris Staging System
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	TNF receptor associated factors

TU	T-Zellen unabhängige Immunglobulinantwort
TWE-PRIL	aus Hybrid mRNA von APRIL und TWEAK
WHO	World Health Organisation
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

6.4 Statistische Auswertung

Tabelle 6.1 Deskriptive Statistiken: Tumor

		BAFF	APRIL	BAFF-R	TACI
N	Gültig	24,00	24,00	24,00	24,00
	Fehlend	0,00	0,00	0,00	0,00
Mittelwert		0,13	10,41	9,28	8,04
Standardfehler	des Mittelwertes	0,03	1,41	1,94	1,73
Median		0,07	9,27	6,34	5,34
Standardabweichung		0,16	6,93	9,48	8,47
Varianz		0,03	47,99	89,93	71,80
Minimum		0,01	1,12	0,19	0,21
Maximum		0,59	27,23	34,97	28,09
Deskriptive Statistiken: Gastritiden					
		BAFF	APRIL	BAFFR	TACI
N	Gültig	28,00	28,00	28,00	28,00
	Fehlend	0,00	0,00	0,00	0,00
Mittelwert		0,10	24,01	86,98	1606,53
Standardfehler	des Mittelwertes	0,04	3,77	82,13	1145,39
Median		0,03	20,32	1,67	16,82
Standardabweichung		0,21	19,94	434,61	6060,83
Varianz		0,05	397,42	188889,01	36733616,00
Minimum		0,00	0,72	0,10	0,00
Maximum		0,88	76,64	2304,12	28824,34

Tabelle 10.1 Ungepaarter T Test: Gastritiden vs Tumor

	Gruppe	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
APRIL	Gastritiden	28,00	24,01	19,94	3,77
	Tumor	24,00	10,41	6,93	1,41
ungepaarter T-Test					
	T	df	p-Wert	95% Konfidenzintervall Differenz	der
	3,379	34,34	0,00	5,42 Untere Grenze	21,77 Obere Grenze
p-Wert nach Korrektur des multiplen Testproblems 0,007					

Tabelle 11.1 Mann Whitney Test: Gastritiden vs Tumor

Ränge	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BAFF	1,00	28	21,23	594,50
	2,00	24	32,65	783,50
	Gesamt	52		
BAFF-R	1,00	28	23,04	645,00
	2,00	24	30,54	733,00
	Gesamt	52		
TACI	1,00	28	32,46	909,00
	2,00	24	19,54	469,00
	Gesamt	52		
Statistik für Test				
	BAFF	BAFF-R	TACI	
Mann-Whitney-U	188,500	239,000	169,000	
Wilcoxon-W	594,500	645,000	469,000	
Z	-2,719	-1,781	-3,065	
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,007	0,075	0,002	
p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen	0,03	0,30	0,01	

Tabelle 14.1 Gepaarter T Test: Antrum vs Tumor (abzüglich der 4 Tumorproben, von denen korrespondierende Antrumproben fehlten)

	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
APRIL	Antrum	20	18,62	12,75	2,85
	Tumor	20	10,45	7,50	1,68

Test bei gepaarten Stichproben

		Gepaarte Differenzen		95% Konfidenzintervall der Differenz		
		Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Untere	Obere
Paar	Antrum - Tumor	8,17	15,72	3,51	0,81	15,53
		T	df	Sig. (2-seitig)		
		2,32	19,00	0,03		

p-Wert nach Korrektur des multiplen Testproblems 0,13

Tabelle 15.1 Wilcoxon Testes: Antrum vs Tumor (abzüglich der 4 Tumorproben, von denen korrespondierende Antrumproben fehlten)

Ränge (negative Ränge: Antrum < Tumor; positive Ränge: Antrum > Tumor; Bindung: Antrum = Tumor)

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BAFF_Antrum	Negative Ränge	8	11,19	89,50
-				
BAFF_Tumor	Positive Ränge	10	8,15	81,50
	Bindungen	2		
	Gesamt	20		
BAFF-R_Antrum	Negative Ränge	14	10,00	140,00
-				
BAFF-R_Tumor	Positive Ränge	6	11,67	70,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	20		
TACI_Antrum	Negative Ränge	15	10,10	151,50
-				
TACI_Tumor	Positive Ränge	5	11,70	58,50
	Bindungen	0		
	Gesamt	20		
Statistik für Test				
	BAFF_Antrum	BAFFR_Antrum	TACI_Antrum	
	-	-	-	
	BAFF_Tumor	BAFFR_Tumor	TACI_Tumor	
Z	-,175	-1,307	-1,736	
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,861	0,191	0,083	
p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen	3,445	0,765	0,330	

Tabelle 16.1 Wilcoxon Test: Corpus vs Tumor (abzüglich einer Tumorprobe, von dem die korrespondierende Corpusprobe fehlte)

Ränge (negative Ränge: Corpus < Tumor; positive Ränge: Corpus > Tumor; Bindung: Corpus = Tumor)

		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
BAFF_Corpus - BAFF_Tumor	Negative Ränge	15	11,93	179,00
	Positive Ränge	6	8,67	52,00
	Bindungen	2		
	Gesamt	23		
APRIL_Corpus - APRIL_Tumor	Negative Ränge	11	9,55	105,00
	Positive Ränge	11	13,45	148,00
	Bindungen	1		
	Gesamt	23		
BAFF-R_Corpus - BAFF-R_Tumor	Negative Ränge	12	14,92	179,00
	Positive Ränge	11	8,82	97,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	23		
TACI_Corpus - TACI_Tumor	Negative Ränge	12	12,42	149,00
	Positive Ränge	10	10,40	104,00
	Bindungen	1		
	Gesamt	23		
Statistik für Test				
Z	BAFF_Corpus - BAFF_Tumor	APRIL_Corpus - APRIL_Tumor	BAFF-R_Corpus - BAFF-R_Tumor	TACI_Corpus - TACI_Tumor
	-2,210(a)	-,698(b)	-1,247(a)	-,730(a)

Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	0,027	0,485	0,212	0,465
p-Wert nach Korrektur bei multiplen Testen	0,108	1,941	0,850	1,860

a. Basiert auf positiven Rängen.
b. Basiert auf negativen Rängen.
c. Wilcoxon-Test

6.5 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1 Eichreihe der Konzentrationen
- Tabelle 2 Probenverteilung zur Bestimmung der Annealingtemperatur
- Tabelle 3 Annealingtemperatur
- Tabelle 4 Effizienz der Amplifikation zwischen Referenzgenen und Zielgenen
- Tabelle 5 Berechnung der relativen Expression
- Tabelle 6 Relative Expression der MALT Lymphom Patienten
- Tabelle 7 Relative Expression der MALT Lymphom Patienten
- Tabelle 8 Relative Expression der HP positiven Gastritiden mit Lymphfollikelbildung
- Tabelle 9 Kolmogorov-Smirnov Test für Gastritiden und Tumor
- Tabelle 10 Ungepaarter T Test: Gastritiden vs Tumor
- Tabelle 11 Mann Whitney Test: Gastritiden vs Tumor
- Tabelle 12 Kolmogorov-Smirnov Test für Antrum und Tumor
- Tabelle 13 Kolmogorov-Smirnov Test für Corpus und Tumor
- Tabelle 14 Gepaarter T Test: Antrum vs Tumor
- Tabelle 15 Wilcoxon Test: Antrum vs Corpus
- Tabelle 16 Wilcoxon Test: Corpus vs Tumor
- Tabelle 17 Zusammenfassung der statistischen Auswertung

6.6 Quellen

- Alpen, B., A. Neubauer, et al. (2000). "Translocation t(11;18) absent in early gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type responding to eradication of *Helicobacter pylori* infection." Blood 95(12): 4014-5.
- Amanna, I. J., K. Clise-Dwyer, et al. (2001). "Cutting edge: A/WySnJ transitional B cells overexpress the chromosome 15 proapoptotic *Blk* gene and succumb to premature apoptosis." J Immunol 167(11): 6069-72.
- Baud, V. and M. Karin (2001). "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." Trends Cell Biol 11(9): 372-7.
- Biosystems, A. (2001). Unser Bulletin #2, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Page 14.
- Bouillet, P., D. Metcalf, et al. (1999). "Proapoptotic *Bcl-2* relative *Bim* required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." Science 286(5445): 1735-8.
- Cancro, M. P. (2008). "Living in context with the survival factor BAFF." Immunity 28(3): 300-1.
- Cavalli, F., P. G. Isaacson, et al. (2001). "MALT Lymphomas." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 241-58.
- Dejardin, E., N. M. Droin, et al. (2002). "The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways." Immunity 17(4): 525-35.
- Dierlamm, J., M. Baens, et al. (1999). "The apoptosis inhibitor gene *API2* and a novel 18q gene, *MLT*, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas." Blood 93(11): 3601-9.
- Dillon, S. R., J. A. Gross, et al. (2006). "An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets." Nat Rev Drug Discov 5(3): 235-46.
- Drexler HG, M. A., MacLeod RA. (2000). "Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research." Leuk Res 24(11): 881-911.
- Du, M. Q. (2007). "MALT lymphoma : recent advances in aetiology and molecular genetics." J Clin Exp Hematop 47(2): 31-42.
- Du, M. Q., T. C. Diss, et al. (2000). "Clone-specific PCR reveals wide dissemination of gastric MALT lymphoma to the gastric mucosa." J Pathol

- 192(4): 488-93.
- Ely, K. R., R. Kodandapani, et al. (2007). "Protein-protein interactions in TRAF3." Adv Exp Med Biol 597: 114-21.
- Endo, T., M. Nishio, et al. (2007). "BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway." Blood 109(2): 703-10.
- Farinha, P. and R. D. Gascoyne (2005). "Molecular pathogenesis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma." J Clin Oncol 23(26): 6370-8.
- Fischbach, W., M. E. Goebeler-Kolve, et al. (2004). "Long term outcome of patients with gastric marginal zone B cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue (MALT) following exclusive Helicobacter pylori eradication therapy: experience from a large prospective series." Gut 53(1): 34-7.
- Forst, R. T. (1999). "Zukuntorientierte Klinische Forschung in Deutschland-Biostatistik." Deutsche Medizinische Wochenschrift (124).
- Freedman, A. S. (2004). Clinical and pathologic features of the marginal zone lymphomas.
- Giulietti, A., L. Overbergh, et al. (2001). "An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression." Methods 25(4): 386-401.
- Groom, J., S. L. Kalled, et al. (2002). "Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome." J Clin Invest 109(1): 59-68.
- Gross, J. A., J. Johnston, et al. (2000). "TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease." Nature 404(6781): 995-9.
- Han, K. H. (2004). "Association between Helicobacter pylori infection and gastrointestinal malignancy." from www.uptodate.com.
- Hatzoglou, A., J. Roussel, et al. (2000). "TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase." J Immunol 165(3): 1322-30.
- He, B., A. Chadburn, et al. (2004). "Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL." J Immunol 172(5): 3268-79.
- Hu, S., M. Q. Du, et al. (2006). "cIAP2 is a ubiquitin protein ligase for BCL10 and is dysregulated in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas." J Clin Invest

- 116(1): 174-81.
- Hussell, T., P. G. Isaacson, et al. (1993). "The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*." Lancet 342(8871): 571-4.
- Hussell, T., P. G. Isaacson, et al. (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(2): 122-7.
- Isaacson, P. and D. H. Wright (1983). "Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma." Cancer 52(8): 1410-6.
- Isaacson, P. G. and M. Q. Du (2004). "MALT lymphoma: from morphology to molecules." Nat Rev Cancer 4(8): 644-53.
- Jiang, Y., M. Ohtsuji, et al. (2001). "Polymorphism and chromosomal mapping of the mouse gene for B-cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (Baff) and association with the autoimmune phenotype." Immunogenetics 53(9): 810-3.
- Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity." Annu Rev Immunol 18: 621-63.
- Kelly, K., E. Manos, et al. (2000). "APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death." Cancer Res 60(4): 1021-7.
- Khare, S. D., I. Sarosi, et al. (2000). "Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3370-5.
- Lesley, R., Y. Xu, et al. (2004). "Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF." Immunity 20(4): 441-53.
- Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF- κ B regulation in the immune system." Nat Rev Immunol 2(10): 725-34.
- Liu, Y., L. Xu, et al. (2002). "Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands." Cell 108(3): 383-94.
- Lucas, P. C., L. M. McAllister-Lucas, et al. (2004). "NF- κ B signaling in lymphocytes: a new cast of characters." J Cell Sci 117(Pt 1): 31-9.
- Lucas, P. C., M. Yonezumi, et al. (2001). "Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF- κ B signaling pathway." J Biol Chem 276(22): 19012-9.
- Mackay, F. and C. Ambrose (2003). "The TNF family members BAFF and APRIL:

- the growing complexity." Cytokine Growth Factor Rev 14(3-4): 311-24.
- Mackay, F. and J. L. Browning (2002). "BAFF: a fundamental survival factor for B cells." Nat Rev Immunol 2(7): 465-75.
- Mackay, F. and C. R. Mackay (2002). "The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity." Trends Immunol 23(3): 113-5.
- Mackay, F., P. Schneider, et al. (2003). "BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival." Annu Rev Immunol 21: 231-64.
- Mackay, F., P. A. Silveira, et al. (2007). "B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling." Curr Opin Immunol 19(3): 327-36.
- Mackay, F., S. A. Woodcock, et al. (1999). "Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations." J Exp Med 190(11): 1697-710.
- Marsters, S. A., M. Yan, et al. (2000). "Interaction of the TNF homologues BLYS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI." Curr Biol 10(13): 785-8.
- Mini_Kit_Handbook, Q. R. (2001). RNeasy® Mini Kit Handbook: 10, 11, 13.
- Moore, P. A., O. Belvedere, et al. (1999). "BLYS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator." Science 285(5425): 260-3.
- Nakagawa, M., M. Seto, et al. (2006). "Molecular pathogenesis of MALT lymphoma: two signaling pathways underlying the antiapoptotic effect of API2-MALT1 fusion protein." Leukemia 20(6): 929-36.
- Nakamura, S., T. Matsumoto, et al. (2003). "Chromosomal translocation t(11;18)(q21;q21) in gastrointestinal mucosa associated lymphoid tissue lymphoma." J Clin Pathol 56(1): 36-42.
- Nardelli, B., O. Belvedere, et al. (2001). "Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells." Blood 97(1): 198-204.
- Novak, A. J., J. R. Darce, et al. (2004). "Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival." Blood 103(2): 689-94.
- Plas, D. R., J. C. Rathmell, et al. (2002). "Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications." Nat Immunol 3(6): 515-21.
- Probes, M. (2001). RiboGreen® Quantitation Reagent And Kit. Product Information.
- Qiagen (2003). QuantiTect™ SYBR® Green PCR: 10, 11, 30, 32.

- Qiagen (2004). Critical Factors for Successful Real-Time PCR.
- Rennert, P., P. Schneider, et al. (2000). "A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth." J Exp Med 192(11): 1677-84.
- Rohrer, C. (2000). "Efficient and reliable PCR setup using PCR MasterMix, Christian Rohrer, Eppendorf AG, Hamuburg."
- Schneider, P., F. MacKay, et al. (1999). "BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth." J Exp Med 189(11): 1747-56.
- Schneider, P., F. MacKay, et al. (1999). "BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth." J Exp Med 189(11): 1747-56.
- Stolte, M., E. Bayerdorffer, et al. (2002). "Helicobacter and gastric MALT lymphoma." Gut 50 Suppl 3: III19-24.
- Strasser, A., S. Whittingham, et al. (1991). "Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease." Proc Natl Acad Sci U S A 88(19): 8661-5.
- Sutherland, A. P., F. Mackay, et al. (2006). "Targeting BAFF: immunomodulation for autoimmune diseases and lymphomas." Pharmacol Ther 112(3): 774-86.
- Tangye, S. G., V. L. Bryant, et al. (2006). "BAFF, APRIL and human B cell disorders." Semin Immunol 18(5): 305-17.
- Thiede, C., B. Alpen, et al. (1998). "Ongoing somatic mutations and clonal expansions after cure of Helicobacter pylori infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue B-cell lymphoma." J Clin Oncol 16(12): 3822-31.
- Thompson, J. S., S. A. Bixler, et al. (2001). "BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF." Science 293(5537): 2108-11.
- Thompson, J. S., P. Schneider, et al. (2000). "BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population." J Exp Med 192(1): 129-35.
- von Bulow, G. U. and R. J. Bram (1997). "NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily." Science 278(5335): 138-41.
- Wiedermann C., S. H. L. (2004). "Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung." BIOSpektrum 10: 99-102.
- Willis, T. G., D. M. Jadayel, et al. (1999). "Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types." Cell 96(1): 35-45.

- Woodland, R. T., M. R. Schmidt, et al. (2006). "BLyS and B cell homeostasis." Semin Immunol 18(5): 318-26.
- Wotherspoon, A. C., C. Doglioni, et al. (1992). "Low-grade gastric B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT): a multifocal disease." Histopathology 20(1): 29-34.
- Wu, Y., D. Bressette, et al. (2000). "Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS." J Biol Chem 275(45): 35478-85.
- Wundisch, T., T. D. Kim, et al. (2003). "Etiology and therapy of Helicobacter pylori-associated gastric lymphomas." Ann Hematol 82(9): 535-45.
- Wundisch, T., C. Thiede, et al. (2005). "Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after Helicobacter pylori eradication." J Clin Oncol 23(31): 8018-24.
- Xia, X. Z., J. Treanor, et al. (2000). "TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation." J Exp Med 192(1): 137-43.
- Xu, S. and K. P. Lam (2001). "B-cell maturation protein, which binds the tumor necrosis factor family members BAFF and APRIL, is dispensable for humoral immune responses." Mol Cell Biol 21(12): 4067-74.
- Yan, M., J. R. Brady, et al. (2001). "Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency." Curr Biol 11(19): 1547-52.
- Yanai, A., Y. Hirata, et al. (2003). "Helicobacter pylori induces antiapoptosis through nuclear factor-kappaB activation." J Infect Dis 188(11): 1741-51.
- Ye, H., H. Liu, et al. (2003). "Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of H pylori in gastric MALT lymphoma." Blood 102(3): 1012-8.
- Yu, G., T. Boone, et al. (2000). "APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity." Nat Immunol 1(3): 252-6.
- Zhang, Q., R. Siebert, et al. (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(1): 63-8.
- Zhou, H., M. Q. Du, et al. (2005). "Constitutive NF-kappaB activation by the t(11;18)(q21;q21) product in MALT lymphoma is linked to deregulated ubiquitin ligase activity." Cancer Cell 7(5): 425-31.

Zucca, E., F. Bertoni, et al. (2000). "The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type." Blood 96(2): 410-9.

6.7 Publikation

Abstract – The American Society of Hematology 2009, Publication Number 1938

“Expression of the B-Cell Stimulatory Factors BAFF and APRIL in Gastric MALT Lymphomas”

Visvakanth Sivanathan^{1*}, Thomas Wündisch^{2*}, Theo Daniel Kim^{3*}, Andreas Neubauer², Johannes N. Steif^{4*} and Minh Huynh^{2*}

¹Internal Medicine, St. Vincenz and Elisabeth Hospital, Mainz, Germany;

²Hematology, Oncology and Immunology, University Hospital, Marburg,

Germany; ³Hematology, Oncology and Immunology, Charité Universitätsmedizin

Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, Germany; ⁴Hematology, Oncology and

Immunology, Hospital Osnabrück GmbH, Osnabrück, Germany

6.8 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Berger, Bertalanffy, Bette, Beyer, Bien, Bonzel, Bullinger, Cardesa, Carrera, Christiansen, Daut, Dippold, Eilers, Feuser, Gemsa, Geueke, Geus, Gil Villar, Görg, Gotzen, Griss, Gudermann, Happle, Hellinger, Hertl, Hesse, Hoffmann, Jungclas, Kann, Kern, Klenk, Klose, Köhler, König, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Lang, Legrand, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Martin, Meinhardt, Moll, Moodsdorf, Moran Penco, Mutters, Neubauer, Neumüller, Ortel, Plappert, Quiles, Renschmidt, Renz, Repp, Richter, Röhm, Röhrenbeck, Rosenow, Rothmund, Sawatzki, Schifferli, Schmidt, Schüffel, Seitz, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wölfel, Wulf, Wündisch

6.9 Danksagung

Hiermit bedanke ich mich besonders bei Herrn PD Dr. Thomas Wündisch für das Ermöglichen dieser Dissertation und die konstruktive Kritik, mit dessen Hilfe ich die Chance bekam selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. Des Weiteren danke ich meinem engagierten Betreuer Dr. Theo Kim für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Promotionsarbeit.

Ich möchte den Mitarbeitern des Labors der Hämatologie und Onkologie und der Biometrie der Philipps Universität Marburg danken, die bei der Durchführung und Auswertung der Versuche eine große Hilfe waren. Ein großes Dankeschön geht vor allem an Frau Kathleen Stabla, Frau Dr. Birgit Samans und Herrn Prof. Dr. Richard Pibernik.

Dank der Unterstützung von zahlreichen Freunden konnte ich diese Arbeit zum Abschluss bringen. Dabei gilt ein besonderer Dank meinen Mitbewohnern/innen für das Erstellen der Graphiken; Inga Heute und Julia Dennert für das Korrekturlesen. An dieser Stelle möchte ich auch Andrea Geuecke, Anna Legrand und Peter Olbrich stellvertretend für die anderen Freunde erwähnen, die mir mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Zum Schluss und von ganzen Herzen danke ich meinen Eltern und meiner Schwester, die mich mit ihrer unermüdlichen Unterstützung bis hierhin begleitet haben und noch weiter begleiten werden.

Danke, Visva.

Für meine Familie.