

# *Immunologiepraktikum 2004, Praktikumsteil ‚Klonalitätsuntersuchungen zu normalen und malignen Lymphozytenpopulationen‘*

## **Zeitplan:**

### **Dienstag, 2. März**

- 10 Vorbesprechung
- 11 Ansetzen von Oberflächenmarkierungen
- 12 von Lymphozytenpopulationen
- 13 Mittagspause
- 14 Durchflußzytometrie (FACS)
- 15 FACS
- 16 Theorie: Immunglobulin-
- 17 und T Zell Rezeptor-Gene

### **Donnerstag, 4. März**

- 10 Vorbesprechung
- 11 PCR-Amplifikation von *IGH*, *IGK*, *IGL*
- 12 und *TCRB* Genumlagerungen
- 13 Mittagspause
- 14 Gelelektrophorese von PCR-Produkten
- 15 Gelelektrophorese
- 16 Theorie: Molekularbiologie der
- 17 Leukämie- und Lymphomentstehung

### **Freitag, 5. März**

- 10 Vorbesprechung
- 11 PCR-Amplifikation von
- 12 Translokationsbruchpunkten
- 13 Mittagspause
- 14 Gelelektrophorese von PCR-Produkten
- 15 Gelelektrophorese
- 16 Diskussion der Ergebnisse, Identifizierung
- 17 der Leukämie- und Lymphomproben

## **Kontakt: Abteilung für Molekulare Stammzellbiologie**

### **Weitere Informationen:** <http://www.lymphocytes.de/>

PD Dr. Markus Mutschen, 0211-811-9964, [mueschen@itz.uni-duesseldorf.de](mailto:mueschen@itz.uni-duesseldorf.de); Dipl.-Biol. Niklas Feldhahn, [feldhahn@itz.uni-duesseldorf.de](mailto:feldhahn@itz.uni-duesseldorf.de); Dipl.-Biol. Stefanie Liedtke, [liedtke@itz.uni-duesseldorf.de](mailto:liedtke@itz.uni-duesseldorf.de); Dipl.-Biol. Mieke Sprangers, [sprangers@itz.uni-duesseldorf.de](mailto:sprangers@itz.uni-duesseldorf.de); Jana Mooster BSc, [mooster@itz.uni-duesseldorf.de](mailto:mooster@itz.uni-duesseldorf.de); Peter Wurst, [wurst@itz.uni-duesseldorf.de](mailto:wurst@itz.uni-duesseldorf.de); Paul Hadweh, [hadweh@itz.uni-duesseldorf.de](mailto:hadweh@itz.uni-duesseldorf.de)

*Tag I Durchflußzytometrische Analyse (FACS) der Expression von Oberflächenantigenen auf Lymphozytenpopulationen*

<b>Verwendete Antikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Expressionsmuster</b>
CD3	TCR-Korezeptor	Alle T Lymphozyten
CD10	Neutrale Endopeptidase	Unreife Lymphozytenvorläufer, Keimzentrums-B Zellen
CD13	Aminopeptidase N	Myeloische Vorläuferzellen
CD14	LPS-Rezeptor	Myeloische Zellen
CD19	BCR-Korezeptor	Alle B Zellen
CD20	Vermittelt B-Zell Kostimulation	Reife B Zellen
CD34	Adhäsionsmolekül	Unreife hämatopoetische Progenitorzellen
CD38	cADP Ribose-Hydrolase	Unreife Lymphozytenvorläufer, Keimzentrums-B Zellen
Anti-IgD	Ig-Isotyp	Naive B Zellen
Anti-IgM	Ig-Isotyp	Reife B Zellen
Anti-IgG	Ig-Isotyp	Memory-B Zellen
Anti-VpreB	Surrogat-Leichtkette	prä-B Zellen
Anti-Igκ	κ-Leichtkette	Reife B Zellen
Anti-Igλ	λ-Leichtkette	Reife B Zellen

**Normale Populationen: Polyklonal**

*Knochenmark, Thymus*

Prä-B Zellen: CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, VpreB<sup>+</sup>

Prä-T Zellen: CD7<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, preTα<sup>+</sup>

*Peripheres Blut*

Naive B Zellen: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>

Memory-B Zellen: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>, IgG<sup>+</sup>

*Lymphknoten, Tonsillen, Milz*

Keimzentrums B Zellen CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>

**Leukämien: Klonal**

*Knochenmark, Peripheres Blut*

Prä-B ALL: CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, VpreB<sup>+</sup>

Prä-T ALL: CD7<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, preTα<sup>+</sup>

Myeloische Leukämien: CD13<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>

**Lymphome: Klonal**

*Lymphknoten, Tonsillen, Milz*

Hodgkin-Lymphom: CD15<sup>+</sup>, CD30<sup>+</sup>

Non-Hodgkin-B Zell Lymphome:

Mantelzonen B Zell Lymphom: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>

Burkitt Lymphom: CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>

Diffus-großzelliges B Zell Lymphom CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>

T Zell Lymphome: CD3<sup>+</sup>, TCRβ<sup>+</sup>

Tag II: Analyse der Konfiguration von IGH, IGK, IGL und TCRB Genloci

**Normale Populationen: Polyklonal (alle V-Genfamilien beteiligt, heterogenes Bandenmuster)**

Zelltyp	IGH	IGK	IGL	TCRB
Prä-B Zellen:	VDJ	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn
Prä-T Zellen:	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn	VDJ
Naive B Zellen:	VDJ	VJ	VJ	Keimbahn
Memory-B Zellen:	VDJ	VJ	VJ	Keimbahn
Keimzentrums B Zellen	VDJ	VJ	VJ	Keimbahn

**Leukämien: Klonal (nur wenige V-Genfamilien beteiligt, einzelne Banden)**

Zelltyp	IGH	IGK	IGL	TCRB
Prä-B ALL:	VDJ	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn
Prä-T ALL:	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn	VDJ
Myeloische Leukämien:	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn

**Lymphome: Klonal (nur wenige V-Genfamilien beteiligt, einzelne Banden)**

Zelltyp	IGH	IGK	IGL	TCRB
B Zell Lymphome	VDJ	VJ/ Keimbahn	VJ/ Keimbahn	Keimbahn
T Zell Lymphome	Keimbahn	Keimbahn	Keimbahn	VDJ

PCR-Protokolle:

$V_H-D_HJ_H$

5	µl dNTP (2,5 mM)
5	µl 10 x PCR-Puffer
2	µl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
1	µl Taq DNA-Polymerase
3	µl J <sub>H</sub> -Primermix
30	µl H <sub>2</sub> O
1	µl Template
3	µl V <sub>H</sub> -Primer (6 unterschiedliche)

$V_K-J_K$

5	µl dNTP
5	µl 10 x PCR-Puffer
2,5	µl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
1	µl Taq DNA-Polymerase
2,5	µl J <sub>K</sub> -Primermix
30,5	µl H <sub>2</sub> O
1	µl Template
2,5	µl V <sub>K</sub> -Primer (6 verschiedene)

Cyclereinstellungen:

1.	95 °C	60 sec	
2.	95 °C	50 sec	
3.	63 °C	30 sec	40 x
4.	72 °C	60 sec	
5.	72 °C	5 min	
6.	10 °C	pause	

Cyclereinstellungen:

1.	95 °C	2 min	
2.	95 °C	50 sec	
3.	61 °C	30 sec	45 x
4.	72 °C	60 sec	
5.	72 °C	5 min	
6.	4 °C	pause	

### V<sub>λ</sub>-J<sub>λ</sub>

5	μl dNTP (2,5 mM)
5	μl 10 x PCR-Puffer
1,5	μl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
1	μl Taq DNA-Polymerase
2,5	μl J <sub>λ</sub> -Primermix
31,5	μl H <sub>2</sub> O
1	μl Template
2,5	μl V <sub>λ</sub> -Primer (8 verschiedene V <sub>λ</sub> -Mixe, da V <sub>λ</sub> 3A und V <sub>λ</sub> 3B)

#### Cyclereinstellungen:

1.	95 °C	2 min	
2.	95 °C	50 sec	
3.	63 °C	30 sec	40 x
4.	72 °C	60 sec	
5.	72 °C	5 min	
6.	4 °C	pause	

### TCRβ V-DJ

2	μl dNTP
5	μl 10 x PCR-Puffer
2	μl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
0,25	μl Taq DNA-Polymerase
3	μl J-Primermix
33,75	μl H <sub>2</sub> O
1	μl Template
3	μl V-Primer (8 verschiedene)

#### Cyclereinstellungen:

1.	95 °C	3 min	
2.	61 °C	30 sec	
3.	72 °C	90 sec	
4.	95 °C	60 sec	
5.	61 °C	30 sec	44 x
6.	72 °C	60 sec	
7.	72 °C	5 min	
8.	15 °C	pause	

## Tag III: *Typische transformierende Ereignisse in Leukämien und Lymphomen*

### 1. Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus:

Hodgkin-Lymphom: etwa 50% der Fälle

Non-Hodgkin-B Zell Lymphome:

Mantelzonen B Zell Lymphom selten

Burkitt Lymphom sporadisches BL: 30%, endemisches BL (Zentralafrika): >95%

Diffus-großzelliges B Zell Lymphom unbekannt

PCR-Protokoll:

EBV

0,3	μl Taq DNA-Polymerase
4	μl dNTP (2,5 mM)
5	μl 10 x PCR-Puffer
2	μl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
32,7	μl H <sub>2</sub> O
2,5	μl EBVF-Primer (2,5 μM)
2,5	μl EBVR2-Primer (2,5 μM)
1	μl Template

#### Cyclereinstellungen :

1.	95 °C	60 sec	
2.	95 °C	50 sec	
3.	58 °C	30 sec	35 x
4.	72 °C	60 sec	
5.	72 °C	5 min	
6.	10 °C	pause	

## 2. Translokationsereignisse in B Zell Non-Hodgkin Lymphomen

Stefanie Liedtke

Die Ig-Gen modellierenden Prozesse während der normalen B-Zell Entwicklung, wie V(D)J Umlagerung, somatische Hypermutation und Ig-Klassenwechsel spielen bei der Entstehung von B-Zell Lymphomen eine große Rolle, da diese Prozesse von DNA-Doppelstrangbrüchen begleitet werden (Shaffer *et al.*, 2002; Vega *et al.* 2003). Lymphome besitzen typische chromosomale Translokationen, die in vielen Fällen auf Fehler der V(D)J-Umlagerung, somatischen Hypermutation oder der Klassenwechsel-Rekombination zurückzuführen sind (Willis *et al.*, 2000). Beim Mantelzonen B Zell Lymphom (*low grade*), das aus B Zellen in den Mantelzonen von Sekundärfollikeln entsteht, findet man die Translokation t(11;14)(q13;q32), die möglicherweise während der V(D)J Umlagerung aufgetreten ist und eine Überexpression des *BCL1* Gens verursacht. Diese Überexpression führt zu einer verkürzten G1 Phase des Zellzyklus und beeinflusst in komplexer Weise auch die Expression anderer Gene, die den Zellzyklus kontrollieren (Imoto *et al.*, 1997).

Das Burkitt Lymphom (*high grade*) ist ein aggressives B Zell Lymphom mit der für dieses Lymphom typischen Translokation t(8;14)(q24;q32), die zu einer Überexpression des *MYC* Gens führt. Der Mechanismus, der dieser Translokation zugrunde liegt, ist der Ig-Klassenwechsel (Küppers *et al.*, 1999). Das *MYC* Gen beeinflusst verschiedene zelluläre Prozesse, wie z.B. die Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Die Überexpression führt zu einer erhöhten Proliferation der malignen Zellen (Bouchard *et al.*, 1999).

Das Diffus-Großzellige B Zell Lymphom ist die am weitesten verbreitete Lymphom-Entität der Non- Hodgkin Lymphome und besitzt in vielen Fällen eine Translokation des *BCL6* Gens t(3;14)(q27;32) und des *BCL2* Gens t(14;18)(q32;q21) in den *IGH* Lokus. Der Translokationsmechanismus beim Diffus-Großzelligem B Zell Lymphom ist wahrscheinlich mit Fehlern bei der somatischen Hypermutation verbunden (Pasqualucci *et al.*, 2001). *BCL6* spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Proliferation von B Zellen innerhalb der Keimzentren. Die Überexpression von *BCL6* blockiert die Plasmazell-Differenzierung durch Verzögerung der S Phase (Albagli *et al.* 1999). Die Translokation von *BCL2* und die daraus resultierende Überexpression führt zu einer Hemmung mitochondrial ausgelöster Apoptose und damit zu einer erhöhten Überlebensrate der malignen Zellen (Sanchez-Beato *et al.*, 2003).

Fusionsgen	Translokation	Entität
<i>BCL1-IGH</i>	t(11;14)(q13;q32)	Mantelzonen B Zell Lymphom
<i>BCL2-IGH</i>	t(14;18)(q32;q21)	Non-Hodgkin-B Zell Lymphome

## Literatur:

- Albagli O., Lantoin D., Quief S., Quignon F., Englert C., Kerckaert J.P., Montarras D., Pinset C., Lindon C. Overexpressed BCL6 (LAZ3) oncoprotein triggers apoptosis, delays S phase progression and associates with replication foci. *Oncogene*. 1999; 18: 5063-5075.
- Bouchard C., Thieke K., Maier A., Saffrich R., Hanley-Hyde J., Ansorge W., Reed S., Sicinski P., Bartek J., Eilers M. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J*. 1999; 18: 5321-5333.
- Imoto M., Doki Y., Jiang W., Han E.K., Weinstein I.B. Effects of cyclin D1 overexpression on G1 progression-related events. *Exp Cell Res*. 1997; 236: 173-180.
- Küppers R., Klein U., Hansmann M.L., Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. : *N Engl J Med*. 1999; 341: 1520-1529.
- Pasqualucci L., Neumeister P., Goossens T., Nanjangud G., Chaganti R.S., Kuppers R., Dalla-Favera R. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 2001; 412: 341-346.
- Sanchez-Beato M., Sanchez-Aguilera A., Piris M.A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*. 2003; 101: 1220-1235.
- Shaffer A.L., Rosenwald A., Staudt L.M. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 920-932
- Vega F., Medeiros, L.J. Chromosomal translocations involved in Non-Hodgkin Lymphomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127: 1148-1160
- Willis T.G., Dyer M.J. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood*. 2000; 96: 808-822

### **BCL1-IGH**

4	µl dNTP (2,5 mM)
5	µl 10 x PCR-Puffer
1,5	µl MgCl <sub>2</sub>
1	µl Taq DNA-Polymerase
29,5	µl H <sub>2</sub> O
4	µl F-Primer
4	µl R-Primer
1	µl Template

### **BCL2-IGH (optional)**

4	µl dNTP (2,5 mM)
5	µl 10 x PCR-Puffer
1,5	µl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
2	µl Taq DNA-Polymerase
4	µl R-Primer
28,5	µl H <sub>2</sub> O
1	µl Template
4	µl F-Primermix (3 verschiedene)

### Cyclereinstellungen :

1.	95 °C	7 min	
2.	95 °C	45 sec	
3.	60 °C	45 sec	35 x
4.	72 °C	90 sec	
5.	72 °C	6 min	
6.	15 °C	pause	

### Cyclereinstellungen :

1.	95 °C	7 min	
2.	95 °C	45 sec	
3.	60 °C	45 sec	35 x
4.	72 °C	90 sec	
5.	72 °C	6 min	
6.	15 °C	pause	

## **3. Frequent translocation events in acute lymphoblastic leukemia**

By Mieke Sprangers

There are four main types of leukemia namely acute and chronic lymphoblastic leukemia (ALL and CLL) and acute and chronic myelogenous leukemia (AML and CML).

Acute leukemia is characterized by very immature cells, called blasts. These blasts proliferate very quickly and overcrowd the healthy blood and bone marrow cells. This type of leukemia is frequently found in children and can often be cured despite aggressive evolution

of the tumor. The chronic varieties are almost exclusively found in adults. Here the malignant cells are more mature.

The hematopoietic stem cell can differentiate into two main lineages of white blood cells: lymphoid and myeloid cells. Lymphoid cells develop further into B and T lymphocytes. The myeloid precursors give rise to granulocytes, monocytes, erythrocytes and megakaryocytes.

The etiology of acute lymphoblastic leukemia is still largely unknown, yet a number of genetic aberrations associated with ALL have been identified. Up to 65% of leukemias carry aberrant gene rearrangements resulting from translocation events, which in some cases give rise to fusion transcripts (Sawinska *et al.*, 2004).

Examples include the following:

t(12;21) *TEL-AML1* (Carroll *et al.*, 2003)

This means a translocation involving breaks at chromosomes 12 and 21. It occurs in approximately 20% of all ALL patients. The patients have a favorable prognosis and good response to initial chemotherapeutic drug treatment.

t(1;19) *E2A-PBX* (Look, 1997)

Occurs in 5% of ALL childhood cases and requires aggressive treatment.

t(9;22) *BCR-ABL1*; Philadelphia translocation (Hantschel *et al.*, 2003)

This translocation represents about 30% of adult and only 5% of childhood cases. *ABL1* is a non-receptor tyrosine kinase that participates in many signalling pathways in the cytoplasm and in the nucleus. The translocation results in the activation of the *ABL1* proto-oncogene which fuses to the *BCR* gene.

t(4;11) *MLL-AF4* (Bertrand *et al.*, 2001)

This translocation is the most common in infants and it carries a very poor prognosis. The *MLL* protein is a homeotic regulator that positively regulates the maintenance of homeotic (*HOX*) gene expression during development including hematopoiesis. The *AF4* protein contains nuclear localization and GTP-binding domains, but little is known about its function. The leukemic cells carrying this translocation express both myeloid as lymphoid gene products. For this reason, one of the two fusion partners was termed *MLL* (mixed lineage leukemia).

Fusion genes	Translocation	Leukemia-Entity
<i>BCR-ABL1</i>	t(9;22)(q34;q11)	prä-B ALL
<i>E2A-PBX1</i>	t(1;19)(q23;p13)	prä-B ALL
<i>MLL-AF4</i>	t(4;11)(q21;q23)	pro-B ALL
<i>TEL-AML1</i>	t(12;21)(p12;q22)	prä-B ALL

## Literatur:

Bertrand, F.E. et al. Pro-B-cell to pre-B-cell development in B-lineage acute lymphoblastic leukemia expressing the MLL/AF4 fusion protein. *Blood* 2001; 98: 3398-3405

Carroll, W.L. et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. American Society of haematology, *Hematology* 2003; 102-131

Hantschel, O. et al. Regulation of the c-ABL and the BCR-ABL tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 33-44

Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. 1997; 278: 1059-64.

Sawinska, M. et al. Mechanism, detection and clinical significance of the reciprocal translocation t(12;21)(p12;q22) in the children suffering from acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 2004; 28: 35-42

## PCR-Protokoll:

### Gemeinsamer PCR Ansatz für

### *E2A-PBX1*, *BCR-ABL1*, *TEL-AML1* und *MLL-AF4*

1	µl dNTP (2,5 mM)
5	µl 10 x PCR-Puffer
2	µl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
1	µl Taq DNA-Polymerase
2,5	µl F-Primer
2,5	µl R-Primer
35,5	µl H <sub>2</sub> O
0,5	µl Template

### Cyclereinstellungen :

1. 95 °C 120 sec
2. 95 °C 50 sec
3. 63 °C 30 sec 35 x
4. 72 °C 60 sec
5. 72 °C 5 min
6. 4 °C pause