

**Untersuchungen zur  
somaticischen Hypermutation  
an molekular charakterisierten  
aggressiven B-Zell-Lymphomen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von

**HEIKO TRAUTMANN**  
Kiel 2007

Referent/in:

Korreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Prof. Dr. rer. nat. Norbert Arnold

Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C.G. Bosch

Kiel, 08. Dezember 2008

Kiel, 08. Dezember 2008

Der Dekan

# Inhaltsverzeichnis

1	<b>EINLEITUNG</b> .....	1
1.1	Maligne Lymphome.....	1
1.1.1	Diffus großzellige Lymphome.....	1
1.1.2	Burkitt-Lymphome .....	2
1.1.3	Der molekulare Burkitt-Lymphom (mBL)-Prädiktor.....	2
1.1.4	Behandlung aggressiver B-NHL.....	3
1.2	Ontogenese der B-Lymphozyten.....	4
1.2.1	Das Immunglobulinschwerkettengen IgH .....	4
1.2.1.1	Somatische Hypermutation der Immunglobulin-Gene.....	6
1.3	Onkogene und Lymphompathogenese.....	7
1.3.1	Das Proto-Onkogen c-MYC .....	7
1.3.1.1	Die MYC-Translokation.....	9
1.3.1.2	Deregulation von MYC.....	9
1.3.1.3	Modell eines genetischen MYC-Klassifikators.....	10
1.3.2	Das Proto-Onkogen BCL6.....	11
1.3.2.1	Die BCL6-Translokation.....	12
1.3.2.2	Deregulation von BCL6.....	12
1.3.3	Der nukleäre Transkriptionsfaktor NFκB.....	13
1.3.3.1	Das Proto-Onkogen REL.....	13
1.3.3.2	Aktivierung von Rel/NFκB.....	14
1.3.3.3	Regulation von Rel/NFκB.....	16
1.3.3.4	Biomedizinische Bedeutung von Rel/NFκB.....	16
1.4	Fragestellung.....	17
2	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	18
2.1	Geräte.....	18
2.2	Chemikalien.....	18
2.3	Software.....	19
2.4	Probenmaterial.....	20
2.5	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	20
2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	21
2.6.1	Kontrollgen-PCR: Überprüfung der Amplifizierbarkeit .....	22
2.6.2	Real-Time-Quantitative-PCR .....	24
2.6.2.1	Bestimmung der amplifizierbaren DNA: Albumin-RQ-PCR.....	25

2.6.3	GeneScan der Immunglobulinschwerkettengene .....	26
2.6.4	MYC-PCR für das Mutationsscreening (dHPLC).....	27
2.6.5	BCL6-PCR für das Mutationsscreening (dHPLC).....	28
2.6.6	REL-PCR für das Mutationsscreening (dHPLC).....	29
2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.8	DNA-Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.....	31
2.8.1	Ethanolfällung von DNA.....	31
2.8.2	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	31
2.9	Denaturation High Performance Liquid Chromatographie .....	32
2.10	Direkte DNA-Sequenzierung.....	34
2.10.1	Aufreinigung der Sequenzierprodukte.....	36
2.10.2	IgH-Direktsequenzierung (FR1).....	36
2.10.3	MYC-Direktsequenzierung.....	37
2.10.4	BCL6-Direktsequenzierung.....	37
2.10.5	REL-Direktsequenzierung.....	37
2.11	Quantitative Allelische Diskriminierung von REL-S525P.....	38
2.12	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	38
2.12.1	Blau-Weiß-Klonierung.....	39
2.12.2	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> Bakterien.....	40
2.13	Funktionelle Analyse der REL-S525P-Mutation.....	41
2.14	Statistische Auswertung.....	41
3	<b>ERGEBNISSE.....</b>	42
3.1	Einschlusskriterien und Klassifizierung .....	42
3.1.1	Klassifizierung des Gesamtkollektivs (WHO-Kriterien) .....	43
3.1.2	Molekularer Burkitt-Lymphom-Prädiktor und Wright-Klassifikator .....	43
3.2	DNA-Qualitätskontrolle.....	44
3.2.1	Messung der DNA-Konzentration (NanoDrop).....	44
3.2.2	Kontrollgen-PCR.....	44
3.2.3	Albumin-Quantifizierung.....	44
3.3	Immunglobulinschwerkettengen (IgH).....	45
3.3.1	IgH-Klonalitätsanalyse mittels GeneScan.....	45
3.3.2	IgH-Mutationsanalyse.....	45
3.3.3	Verteilung der IgH-Mutationsfrequenz (IgH-MF).....	47
3.3.4	IgH-Mutationsfrequenz in Abhängigkeit vom MYC-Status.....	48
3.3.5	Ig-VH-Familienverwendung.....	50

3.3.5.1	Altersabhängige Ig-VH-Familienverwendung .....	51
3.3.6	Ig-DH und Ig-JH Familienverwendung.....	54
3.3.6.1	Ig-DH-Familienverwendung.....	54
3.3.6.2	Ig-JH-Familienverwendung.....	54
3.3.7	Korrelation der IgH-MF mit dem klinischen Verlauf.....	55
3.4	MYC.....	56
3.4.1	Mutationsanalyse der MYC-Promotorregion.....	56
3.4.1.1	Korrelation des MYC-Mutationsstatus mit der mRNA-Expression.....	58
3.4.2	Mutationsscreening der MYC-TAD.....	59
3.4.3	Mutationsmuster der MYC-TAD.....	61
3.4.4	Auswirkungen von MYC-Mutationen auf das Gesamtüberleben.....	63
3.5	BCL6.....	64
3.5.1	BCL6-Mutationsscreening.....	64
3.5.2	BCL6-Mutationsanalyse des Major Mutation Cluster.....	64
3.5.3	Korrelation des BCL6-Mutationsstatus mit der mRNA-Expression .....	66
3.5.4	BCL6-mRNA-Expression innerhalb der molekularen Gruppen.....	67
3.5.5	Bcl6: Proteinexpression im Vergleich zur mRNA Expression.....	68
3.5.6	BCL6: Mutationen und Translokationen in Korrelation mit dem Gesamtüberleben .....	68
3.6	REL.....	70
3.6.1	REL-Mutationsscreening.....	70
3.6.2	REL-Mutationsanalyse.....	70
3.6.3	Charakterisierung der REL-S525P-Mutation.....	71
3.6.4	Funktionelle Untersuchungen von S525P.....	73
3.6.4.1	REL-Mutationsvarianten.....	73
3.6.4.2	Transformierende Aktivität verschiedener REL-Varianten.....	73
3.6.4.3	Rel-vermittelte Transkriptionsaktivierung.....	75
3.6.4.4	REL-Serin 525 als IKK-Zielsequenz.....	77
3.6.4.5	Einfluss von REL-S525P auf den TNFa-induzierten Signalweg .....	78
4	<b>DISKUSSION.....</b>	80
4.1	Analyse der IG-Umlagerungen bei aggressiven B-NHL.....	81
4.1.1	Klonalitätsnachweis mittels IgH-PCR.....	81
4.1.2	B-Zell-Lymphome lassen sich anhand des somatischen Hypermutationsstatus ihren physiologischen Ursprungszellen zuordnen.....	82
4.1.3	Der IgH-Mutationsstatus definiert innerhalb der molekularen Gruppen Entitäten mit verschiedenem Entstehungsmechanismus.....	84

4.1.4	Die IgH-Mutationsfrequenz definiert möglicherweise eine neue physiologische Ursprungszelle für eine Subgruppe maligner Lymphome mit geringer IgH-Mutationsfrequenz.....	85
4.1.5	Die IgH-Mutationsanalyse gibt Hinweise auf eine unterschiedliche Genese der MYC.pos Lymphome.....	86
4.2	Bedeutung von Mutationen des MYC-Gens.....	87
4.2.1	Mutationen der MYC-Promotorregion (IG-MYC) implizieren den Einfluss von AID.....	87
4.2.2	Punktmutationen in den MYC-Boxen könnten bei IG-MYC.pos Patienten einen differenziellen Einfluss auf das Gesamtüberleben haben .....	89
4.2.2.1	Einfluss von Punktmutationen in der MYC-Box 1.....	89
4.2.2.2	Einfluss von Punktmutationen in der Myc-Box 2 .....	90
4.3	Bedeutung von Mutationen des BCL6-Gens.....	90
4.3.1	BCL6-Mutationen treten in Clustern auf und sind ein indirekter Nachweis für genetische Instabilität bei GCB-Lymphomen .....	91
4.3.2	Die BCL6-mRNA-Expression ist unabhängig von BCL6-Mutationen und BCL6-Translokationen .....	92
4.4	Bedeutung von Mutationen des REL-Gens.....	93
4.4.1	REL-S525P ist eine hochkonservierte Phosphorylierungsstelle mit Bedeutung für die Transaktivierung.....	94
4.4.2	REL-S525P beeinträchtigt die TNFa-Regulation.....	94
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	96
6	<b>SUMMARY.....</b>	97
7	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	98
8	<b>ANHANG.....</b>	113
9	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	115
10	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	117

## Abkürzungsverzeichnis

A/C/T/G	Adenin / Cytosin / Thymin / Guanin
ABC	activated B cell; aktivierte B-Zelle
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase
AS	Aminosäure
B-NHL	B-Zell non-Hodgkin-Lymphom
BL	Burkitt-Lymphom
BLL	Burkitt-Like Lymphoma; atypisches Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaar
BZR	B-Zell-Rezeptor
CB	Coomassie-Blau
CDR	Complementary Determining Region; komplementäre Determinierungsregion
CGH	Comparative Genomic Hybridization; vergleichende Genomhybridisierung
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin (Vincristin), Prednison
CLL	chronische lymphatische Leukämie
dH <sub>2</sub> O	destilliertes H <sub>2</sub> O
dHPLC	denaturing high performance liquid chromatography; denaturierende Hochleistungs-Flüssigchromatographie
DLBCL	Diffuse Large B-cell Lymphoma; diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	desoxyribonucleic acid; Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxy-Nucleosid-(ATCG)-Triphosphate
eBL	endemisches Burkitt-Lymphom
EBV	Epstein-Barr-Virus
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FL	Follikuläres Lymphom
FR	Framework Region
GCB	geminal center B cell; B-Zelle vom Keimzentrumstyp
GST	Glutathion-S-Transferase
HIV/AIDS	Human Immunodeficiency-Virus / Acquired Immune deficiency syndrome
HL	Hodgkin-Lymphom
IG	Immunglobulin
IgH	Immunoglobuline gene for heavy chain; Immunglobulinschwerkettengen
IKK	Inhibitor-Kinase-Komplex
IMGT	ImMunoGeneTics, <a href="http://www.imgt.org">www.imgt.org</a>
mBL	molekulares Burkitt-Lymphom
MCL	Mantle Cell Lymphoma; Mantelzell-Lymphom
MF	Mutationsfrequenz

---

MIF	MYC-Intron-Faktor
MMC	Major mutation cluster; Hauptmutationsbereich
MMML	Molekulare Mechanismen maligner Lymphome
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mRNA	messenger ribonucleic acid; Boten-Ribonukleinsäure
MTC	Major translocation cluster; Haupttranslokationsbereich
Myc.pos	positives MYC-Bruchereignis
n.s.	nicht signifikant
NA	nicht angegeben
ND	nicht definiert
NFkB	nuclear factor kappa B
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche Killer-Zellen
non-mBL	nicht molekulares-Burkitt-Lymphom
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerasekettenreaktion
R/S	Replacement / Silencing
RHD	REL-Homologie-Domäne
RQ-PCR	Realtime Quantitative polymerase chain reaction; Quantitative PCR
sBL	sporadisches Burkitt-Lymphom
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate; Natriumdodecylsulfat
SHM	somatische Hypermutation
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borat-EDTA
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
UTR	untranslatierte Region
V/D/J	Variable/Diversity/Joining
WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

## 1 Einleitung

### 1.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome lassen sich allgemein in zwei Gruppen einteilen. So gibt es Hodgkin-Lymphome, die sich aufgrund der charakteristischen Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen (Stein & Hummel, 1999) von den Non-Hodgkin-Lymphomen unterscheiden lassen. Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) werden entsprechend ihrer zellulären Herkunft in Neoplasien der B-, T- und natürlichen Killer (NK) Zellreihe unterschieden, wobei 90 % der malignen Lymphome von B-Zellen ausgehen (Armitage & Weisenburger, 1998). B-NHL umfassen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die sich in Morphologie, Immunphänotyp, Genetik und klinischer Präsentation stark unterscheiden.

Die Einteilung der NHL berücksichtigt neben klassischen histopathologischen Merkmalen auch molekulare und klinische Charakteristika, die in die aktuelle Klassifikation der World Health Organisation (WHO) Eingang gefunden haben. Insgesamt 15 unterschiedliche B-Zell-Lymphome lassen sich anhand der aktuellen WHO-Klassifizierung der malignen Lymphome (2001) beschreiben (Jaffe *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2007). Neben der Immunhistochemie hat der Nachweis chromosomal Translokationen mittels zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden einen wesentlichen Beitrag für die genaue Zuordnung in pathologische Subgruppen geleistet. Durch chromosomale Translokationen, die häufig mit Beteiligung der Immunglobuline auftreten, können verschiedene Gene unter die Regulation des Immunglobulinlokus kommen. Dies kann zu einer Deregulierung oder konstitutiven Expression führen. Dabei handelt es sich bei den translozierten Genen häufig um potentielle Onkogene wie z.B. MYC oder BCL6, die einen Beitrag zur Tumorentstehung leisten (Küppers & Dalla-Favera; 2001). Das *Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project* (1997) zählt zu den häufigsten B-Zell-Lymphomen die diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) mit 30,6 % der Fälle, die Follikulären Lymphome (FL) mit 22,1 %, Mantelzell-Lymphome (MCL) mit 6 % sowie Burkitt-Lymphome (BL) mit 2,5 % der Fälle.

#### 1.1.1 Diffus großzellige Lymphome

Die DLBCL stellen eine sehr heterogene Gruppe dar, die sich nur schwer anhand der Molekulargenetik, Zytogenetik, Morphologie und Immunhistologie unterscheiden lässt. Die DLBCL weisen eine hohe Anzahl an genetischen Aberrationen auf, die auch prognostische Bedeutung haben (Alizadeh *et al.*, 2000; Bea *et al.*, 2005; Rosenwald *et al.*, 2002)

Die exakte Stadieneinteilung aggressiver NHL anhand morphologischer Charakteristika ist häufig schwierig und eine genauere Unterteilung aggressiver Lymphome ist erst durch neue Untersuchungsmethoden wie der Genexpressionsanalyse möglich geworden (Alizadeh *et al.*, 2000; Rosenwald *et al.*, 2002). Mittels Genexpressionsanalyse lassen sich innerhalb der DLBCL zwei neue Gruppen unterscheiden: DLBCL mit einem den Keimzentrumszellen ähnlichen Genexpressionsmuster (germinal-center B-cell / GCB-like-Typ) und DLBCL mit einem Genexpressionsmuster, das dem von aktivierte B-Zellen ähnelt (activated B-cell / ABC-like-Typ; Wright *et al.*, 2003). Eine Unterteilung anhand dieses „Wright-Klassifikators“ hat klinische Bedeutung, da Patienten mit einem DLBCL vom GCB-Typ eine günstigere Prognose als Patienten mit einem DLBCL vom ABC-Typ haben (Alizadeh *et al.*, 2000; Rosenwald *et al.*, 2002).

### 1.1.2 Burkitt-Lymphome

Burkitt-Lymphome (BL) werden in der aktuellen WHO-Klassifikation (2001) maligner Lymphome als eigenständige Tumorentität definiert und in drei Typen unterschieden. Das endemische BL (eBL), dass hauptsächlich in Äquatorial-Afrika und Südamerika zu finden ist und dort zu den häufigsten paediatrischen Neoplasien zählt, sowie das weltweit auftretende sporadische BL (sBL) und das HIV-assoziierte BL. Atypische BL / Burkitt-like Lymphome (BLL) stellen einen seltenen Grenzfall zwischen dem klassischen Burkitt-Lymphom und dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom dar (McClure *et al.*, 2005). Das BL zählt zu den Neoplasien mit den höchsten Proliferationsraten (Ki-67-Index > 90 %; Harris *et al.*, 1994). Charakteristisch für nahezu alle BL ist die Translokation t(8;14), durch die das MYC-Proto-Onkogen durch Juxtaposition zu einem Immunglobulinlokus transloziert wird. Durch die resultierende Deregelation von MYC kommt es in den betroffenen Zellen zu einer Zellzyklus-Progression und einer gesteigerten Zellproliferation (Kelly & Siebenlist, 1985, 1986).

### 1.1.3 Der molekulare Burkitt-Lymphom (mBL)-Prädiktor

Im Rahmen des Verbundprojektes „*Molekulare Mechanismen Maligner Lymphome*“ konnte eine Gensignatur für das molekulare Burkitt-Lymphom (mBL) identifiziert werden, die durch die differentielle Expression von 64 Genen charakterisiert ist (Hummel *et al.*, 2006). Dadurch ist es möglich, jeder Probe anhand ihres individuellen Genexpressionsprofils einen mBL-Signatur-Index zuzuordnen, der zwischen 0 und 1 liegt. Dieser mBL-Index zeigt die Ähnlichkeit einer Probe mit der mBL-Gensignatur an. Proben mit einem mBL-Index von > 0,95 werden als mBL bezeichnet, bei < 0,05 als

non-mBL. Alle Fälle mit einem mBL-Index zwischen 0,05 und 0,95 konnten keiner der beiden Gruppen eindeutig zugeordnet werden und wurden als Zwischengruppe (Intermediate) definiert. Die Diagnose der Proben, die dem mBL-Prädiktor zugrunde liegen, wurden durch die strenge Anwendung der in Tab. 1 gelisteten Kriterien der WHO-Klassifikation gestellt.

<b>- Auszug aus der WHO-Klassifikation (2001) -</b>	
<b>klassisches Burkitt-Lymphom (BL)</b>	
1	Diffuses monotonen Infiltrationsmuster mittelgroßer neoplastischer Zellen mit runden Kernen und verklumptem Chromatin, relativ klarem Parachromatin sowie multiplen basophilen mittelgroßen Nukleolen
2	zahlreiche Mitosen und Apoptosen
3	Ki-67 Index $\geq 90$
4	mikroskopisches „Sternenhimmelbild“
5	deutliche Expression von CD20, BCL6, CD10
6	keine Expression von CD5 und BCL2
<b>Diffus Großzelliges Lymphom (DLBCL)</b>	
1	Zellkerngröße mehr als zweimal so groß wie in normalen Lymphozyten
2	deutliche Expression von CD20
3	variable Expression von BCL6, CD10, BCL2 sowie CD5
4	hohe Proliferationsrate, Ki-67 Index $\geq 40$

*Tabelle 1: Auswahlkriterien für die Konsensusdiagnose der Burkitt- und DLBC-Lymphome anhand der WHO-Klassifikation (2001).*

### 1.1.4 Behandlung aggressiver B-NHL

Der histopathologischen Heterogenität der aggressiven Lymphome entspricht eine große klinische Variabilität, die sich u.a. in einem unterschiedlichen Therapieansprechen sowie damit verbunden im krankheitsfreien Verlauf und im Gesamtüberleben der Patienten widerspiegelt (Engelhard *et al.*, 1997; Vose, 1998). Es handelt sich um schnell wachsende solitär nodale (60%) oder extranodale (40%) Tumore mit einem aggressiven klinischen Verlauf (Engelhard *et al.*, 1997). Mittels konventioneller antrazyklinhaltiger Chemotherapieprotokolle erreichen  $\frac{2}{3}$  der Patienten eine Remission. Langfristig geheilt werden jedoch nur ca. 30-40 % der Patienten. Dabei gilt das CHOP-Schema in Kombination mit einem monoklonalen anti-CD20 Antikörper (Rituximab) inzwischen als Standardtherapie für Patienten mit DLBCL (Pfreundschuh *et al.*, 2006).

## 1.2 Ontogenese der B-Lymphozyten

B-Zell-Lymphome entstehen aus verschiedenen Entwicklungsstadien der normalen B-Lymphozyten. Während der B-Zell-Entwicklung vollziehen sich charakteristische Veränderungen der Immunglobulingene (IG). Die unreife Pro-B-Zelle im Knochenmark lagert im Rahmen des VDJ-Rearrangement die schwere Kette des Immunglobulingens um (IgH). Dabei werden zunächst die DH- und JH-Segmente umgelagert (frühe Pro-B-Zelle); danach erfolgt die Verknüpfung der VH-Segmente mit den D-JH-Segmenten (späte Pro-B-Zelle). Resultiert aus dem Umlagerungsprozess ein funktioneller, nicht-autoreaktiver B-Zell-Rezeptor (BZR) werden die Zellen als naive IgM & IgD positive B-Zellen ins Blut entlassen (Janeway *et al.*, 2002, Klein *et al.*, 1998).

In den Follikeln eines Lymphknotens können sich nach einem Antigenkontakt so genannte Keimzentren bilden, in denen eine starke B-Zell-Proliferation stattfindet. Während der Keimzentrumsreaktion erfolgt die somatische Hypermutation (SHM), bei der Punktmutationen in die VH- und VL-Regionen eingefügt werden. Auch werden B-Zellen selektiert, die eine hohe Affinität zum Antigen aufweisen (Affinitätsreifung). Durch Deletionen in der konstanten Region eines Immunglobulingens während der Keimzentrumsreaktion kann es zu einem so genannten Klassenwechsel kommen. Nach einem Klassenwechsel werden andere Immunglobulin-Klassen exprimiert (z.B. Klassenwechsel von IgM zu IgG). Durch die Keimzentrumsreaktion werden Gedächtniszellen und Plasmazellen gebildet. Expressionsanalysen zeigten die spezifische Aktivierung bestimmter Gene während der Keimzentrumsreaktion (Shaffer *et al.*, 2002). Durch diese genetische Signatur können B-Lymphozyten während und nach der Keimzentrumsreaktion (GCB) von solchen ohne Keimzentrumskontakt (ABC) unterschieden werden.

### 1.2.1 Das Immunglobulinschwerekettenigen IgH

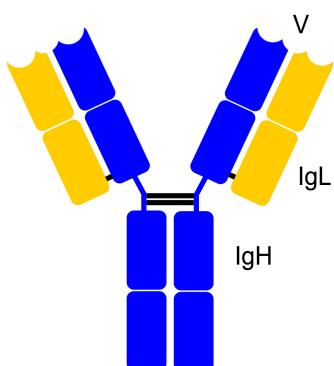


Abbildung 1: Aufbau eines Antikörpers. IgL: leichte Polypeptidkette, IgH: schwere Polypeptidkette, V: Variable, antigen-bindende Domäne

Für eine möglichst hohe Antikörper-Vielfalt (Abb. 1) werden drei verschiedene molekulare Mechanismen kombiniert:

1. *somatische Rekombination*
2. *junktionale Diversifikation*
3. *somatische Hypermutation*

Die somatische Rekombination findet im Knochenmark statt. Die V-Domäne von IgH setzt sich aus je einem V-(*Variable*),

D-(*Diversity*) und J-(*Joining*)-Segment zusammen, welche im IgH-Gen als VH, DH und JH bezeichnet werden. Die V-Domäne von IgL besteht hingegen lediglich aus je einem V- und J-Segment. Während der somatischen Rekombination wird im IgH-Gen zunächst eines der 6 JH-Gensegmente mit einem der 27 D-Segmenten des Schwerekettenlokus rekombiniert. Durch das Hinzufügen eines von 88 VH-Gensegmenten wird das bisher inkomplette Rearrangement vervollständigt. Während der somatischen Rekombination gehen zudem an den Kontaktstellen der V-, D- und J-Segmente durch den Einfluss von Exonukleasen einige Nukleotide verloren oder es werden durch die TdT (*Terminale-desoxynukleotidyl-Transferase*) neue eingefügt. Diese bis zu 25 wahllos deletierten bzw. inserierten Basen an den Kontaktstellen (N-Regionen) tragen entscheidend zur rekombinatorischen Vielfalt der Immunglobuline bei (*junktionale Diversifikation*; van Dongen & Wolvers-Tettero, 1991). Ein V-Segment zeichnet sich zudem durch je drei Regionen mit konservierten Sequenzen (*Framework Regions*; FR) und dazwischen liegenden hypervariablen Regionen (*complementary determining regions*; CDR) aus. Die FRs stellen dabei konservierte Struktursequenzen dar, welche hauptsächlich der Formgebung des späteren Antikörpers dienen. Die CDRs sorgen ihrerseits durch eine hohe Mutationsanfälligkeit für eine maximale Differenzierung der antigenbindenden Regionen. Der Prozess des VDJ-Rearrangements ist schematisch in Abb. 2 dargestellt.

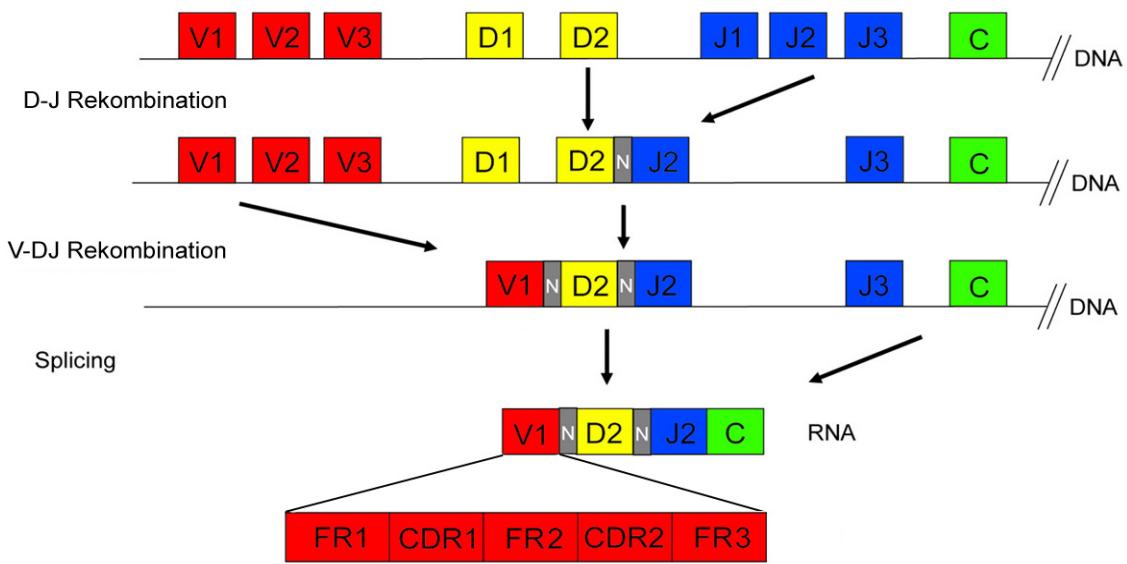


Abbildung 2: Schematische Darstellung des VDJ-Rearrangements sowie der junktionalen Diversifikation während der somatischen Rekombination in der V-Domäne. V: Variable-Segmente, D: Diversity-Segmente, J: Joining-Segmente, C: Konstante Region. N: N-Regionen.

### 1.2.1.1 Somatische Hypermutation der Immunglobulin-Gene

Der Mechanismus der somatischen Hypermutation findet hauptsächlich während der Keimzentrumsreaktion in den lymphatischen Organen (z.B. Lymphknoten, Milz) statt. Die V-Domänen der IG-Gene weisen hierbei eine stark erhöhte Mutationsrate von etwa  $10^{-2}$  pro Basenpaar und Generation auf (McKean *et al.*, 1984). Dies entspricht einem Vielfachen der natürlichen, basalen Mutationsrate somatischer Zellen (Araten *et al.*, 2005; McKean *et al.*, 1984) und wird daher als somatische Hypermutation bezeichnet. Der Vorgang der SHM findet dabei auf einem definierten Bereich der rearrangierten IgH-Gene statt. Die Initiation erfolgt ca. 150 bp 3' des IG-Promotor, verläuft über die gesamte kodierende Sequenz der rearrangierten VDJ-Region und endet nach etwa 2 kB im nicht-kodierenden Bereich vor der konstanten Region (Rada *et al.*, 1994; Rada & Milstein, 2001; Rogerson, 1994). Im Rahmen dieser Prozesse können  $10^7$  bis  $10^{14}$  verschiedene Immunglobuline entstehen (Sanz, 1991; Tonegawa, 1983). Art und Anzahl der Mutationen in diesem Gen-Abschnitt ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Zumeist finden nur einzelne Basenaustausche und nur selten Deletionen oder Insertionen statt (Wilson *et al.*, 1998). A/T- und G/C-Basenpaare sind von den Mutationen zwar gleich stark betroffen, jedoch treten deutlich häufiger Transitionen als Transversionen auf (Golding *et al.*, 1987). Noch heute wird der Mechanismus der SHM kontrovers diskutiert. Ursache für die SHM sind nach einer Hypothese von Brenner & Milstein (1966) fehleranfällige Polymerasen. Diese Hypothese besagt, dass ein Enzym einzelne Basen aus einem DNA-Strang herausschneidet, damit ein freies 3'-Ende entsteht. Darauf folgt die Degradierung der DNA durch eine 3'-Exonuklease, wodurch ein Einzelstrang entsteht. Diese entstandene Lücke in der doppelsträngigen DNA wird dann *de novo* von den fehleranfälligen Polymerasen geschlossen, wobei zufällig unpassende Basen (= Mutationen) eingesetzt werden. Inzwischen konnten derartige fehleranfällige Polymerasen nachgewiesen werden so z.B. eta, iota und zeta (Zeng *et al.*, 2001; Faili *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2003). Das Enzym, welches die Läsionen der DNA verursacht, konnte ebenfalls identifiziert werden; es handelt sich um die Aktivierungsinduzierte Cytidin Deaminase (AID). AID wird als essentiell für die SHM angesehen (Muramatsu *et al.*, 2000). So wird die Deregulation der Aktivität der AID als Ursache für verschiedene Lymphome diskutiert. AID kann genomweit agieren (Wang *et al.*, 2004) und ist nicht nur für Hypermutationen des IgH-Lokus verantwortlich (Pasqualucci *et al.*, 2001). Zudem ist eine Deregulation der AID-Aktivität möglicherweise für die charakteristische, klassische IG-MYC-Translokation der Burkitt-Lymphome verantwortlich (Ramiro *et al.*, 2004).

Für das Verständnis der Pathogenese und Biologie der malignen Lymphome ist die Kenntnis über die Entwicklung und Differenzierung lymphatischer Zellen sowie die

Kenntnis genetischer Alterationen und deren mutmaßliche Entstehung ausgesprochen wichtig. Die Untersuchung der somatischen Hypermutation der variablen Regionen des IgH-Gens geben dabei entscheidende Hinweise auf bestimmte Entwicklungsstadien der B-Zell-Entwicklung, die zur Einteilung der Lymphome verwendet werden können (Küppers *et al.*, 1999).

### 1.3 Onkogene und Lymphompathogenese

In der Lymphompathogenese spielt die Aktivierung von Onkogenen durch chromosomale Translokationen und somatische Hypermutation eine bedeutende Rolle. Als Onkogene werden zelluläre Gene bezeichnet, die Krebs verursachen, wenn ihre Funktion oder Expression gestört ist. Onkogene entstehen aus Proto-Onkogenen, welche in der gesunden Zelle z.B. als Gene für Wachstumsfaktoren oder Transkriptionsfaktoren die Funktionalität des Zellzyklus (Proliferation, Apoptose) kontrollieren. Proto-Onkogene können durch Mutationen zu Onkogenen werden, indem sie z.B. durch eine Translokation unter die Regulation eines aktivierenden Promotors geraten oder sich durch Punktmutationen die Fähigkeit zur Aktivierung bestimmter Promotoren verändert. Nukleäre Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, aber auch tumorspezifische Chromosomenaberrationen (z.B. Translokation von c-MYC) und Viren (z.B. die Humanen T-Zell-Lymphotropen Viren HTLV-I und -II) werden als Proto-Onkogene angesehen. Die Aktivierung eines Proto-Onkogens zum Onkogen führt zu einer Verstärkung der wachstumsfördernden Wirkung des darauf basierenden Proteins. Zugrundeliegende Mutationen können die Funktion und Regulation der betroffenen Proteine verändern. Dabei kann zwischen zwei verschiedenen Mechanismen unterschieden werden. Eine Strukturveränderung eines Proteins kann zu einer erhöhten Aktivität führen, die mit einer reduzierten Regulierbarkeit des veränderten Proteins einhergehen kann. Weiterhin können Veränderungen in der Transkription eines Gens zu einer Überexpression und damit zu einer erhöhten Konzentration des Proteins führen (Janeway *et al.*, 2002).

#### 1.3.1 Das Proto-Onkogen c-MYC

Das Proto-Onkogen c-MYC (MYC) kodiert für das nukleäre Phosphoprotein Myc, das als Transkriptionsfaktor eine Schlüsselposition in der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellwachstum, Zellproliferation und Apoptose einnimmt und in normalen Zellen einer strikten Kontrolle unterliegt (Goruppi *et al.*, 1994; Thompson, 1998). Drei Exons bilden das MYC-Gen: Exon 1 ist nicht kodierend, während die Exons 2 und 3 die

Informationen für die Myc-Proteine (64-67 kDa) enthalten. Die Expression des MYC-Gens wird unter anderem von Transkriptionsfaktoren in der Promotorregion kontrolliert (Abb. 3 A; Zajac-Kaye *et al.*, 2000). Es sind auch mehrere Proteinbindungstellen identifiziert, die innerhalb des Intron 1 liegen und als MYC-Intron-Faktoren (MIF 1-3, Abb. 3 A) bezeichnet werden (Yu *et al.*, 1993). MIF-1 bietet eine Bindungsstelle für ein nukleäres Phosphoprotein; in Burkitt-Lymphomen kann dieser Regelmechanismus durch eine Punktmutation unterbrochen sein (Zajac-Kaye *et al.*, 1988). Die Myc-Proteine (439 AS) können in verschiedene Domänen unterteilt werden, welche der Kernlokalisierung, Bindung an die DNA sowie der Oligomerisierung dienen. Die N-terminale Domäne (AS 1-143) enthält innerhalb der Transaktivierungsdomäne (TAD) die konservierten MYC-Boxen 1 (AS 45-63) und 2 (AS 129-143). Die MYC-Boxen werden als essentiell für die Transaktivierung der Zielgene angesehen (Pelengaris *et al.*, 2002). Die Zentral-Region des Myc-Proteins (AS 144-355) enthält die Kernlokalisierungssequenz. Die C-terminale Region (AS 356-439) enthält das charakteristische basische Helix-Loop-Helix Leucin-Zipper-Motiv, das über eine Heterodimerisierung mit Max (Abb. 3 B) eine sequenzspezifische Bindung an die so genannte E-Box (CACGTG) in der Promotorregion Myc-regulierter Gene bindet, wodurch die transkriptionelle Aktivität des Zielgens beeinflusst wird (Schuhmacher *et al.*, 2001).

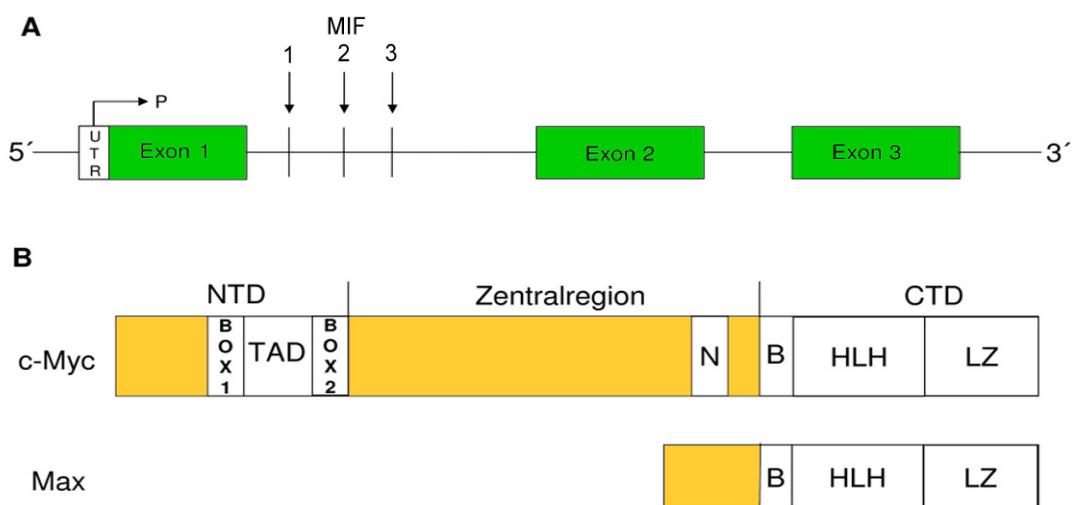


Abbildung 3: **A:** Schematische Darstellung des MYC-Gens mit Intron/Exon Struktur. UTR: Untranslatierte Region, P: Promotor, MIF-1,-2,-3: Myc-Intron-Faktoren 1, 2 und 3

**B:** Schematischer Aufbau der Myc-Untereinheiten c-Myc und Max. NTD: N-terminale Domäne, TAD: Transaktivierungsdomäne, Box 1, 2: Myc-Box 1 bzw. 2, N: Kernlokalisierungsregion, B: basisches HLH: Helix-Loop-Helix-Motiv, LZ: Leucin-Zipper-Motiv

### 1.3.1.1 Die MYC-Translokation

In einer Vielzahl von Tumoren kommt es durch verschiedene Mechanismen wie Genamplifikation, chromosomal Translokationen oder Mutation im Bereich der nicht kodierenden Regionen zu einer deregulierten Expression von MYC. Die t(8;14) (q24;q32) Translokation (80 % der Fälle) ist die häufigste Chromosomentranslokation bei BL und führt zu einer deregulierten Expression von MYC, was mit der Pathogenese und malignen Transformation des BL assoziiert ist (Harris *et al.*, 1994; Obaya *et al.*, 1999; Pelengaris & Khan, 2003). Neben der t(8;14)-Translokation kommen variante Translokationen wie die t(2;8)(p11;q24) in ~ 15 % der Fälle, t(8,22)(q24;q11) in ~ 5 % der Fälle vor (Boxer & Dang, 2001). Translokationen mit Beteiligung von MYC können aber auch in 1-15 % der DLBCL nachgewiesen werden (Klein, 1994; Kramer *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2002; Vitolo *et al.*, 2002). Diesen Translokationen ist gemeinsam, dass durch den MYC-Bruch das MYC-Gen unter die Kontrolle von konstitutiv exprimierten Immunglobulin-Genen gelangt. Als Translokationspartner von MYC sind die Immunglobulin-Schwereketten (IgH) auf Chromosom 14 sowie die leichten Ketten *kappa* auf Chromosom 2 oder *lambda* auf Chromosom 22 beschrieben. Die transformierende Aktivität von Myc ist mit der selektiven transkriptionellen Aktivierung und Deaktivierung verschiedener Schlüsselgene der malignen Transformation assoziiert (Li *et al.*, 2003).

### 1.3.1.2 Deregulation von MYC

Eine deregulierte Expression und verstärkte transformierende Aktivität von Myc kann auch durch Mutationen in der regulatorischen Region des Gens (Exon1-Intron1) des translozierten MYC-Allels hervorgerufen werden (Johnston & Carroll, 1992; Pasqualucci *et al.*, 2001). Mutationen im Bereich der transkriptionell aktivierenden Domäne (TAD) treten im Bereich der hoch konservierten MYC-Boxen-1 und -2 auf und sind bei ca. 50 % der BL zu finden (Hoang *et al.*, 1995). Diese Mutationen treten in MYC-Box-1 gehäuft an in-vivo Phosphorylierungsstellen (Thr58, Ser62) auf und führen zu einer erhöhten transformierenden Aktivität von Myc (Hoang *et al.*, 1995). Darüber hinaus wird der Ubiquitin / Proteasom vermittelte Umsatz des Myc-Proteins vermindert (Bahram *et al.*, 2000). Durch Mutationen im Bereich der TAD wird die Bindung des p107-Proteins an die TAD vermindert, was zu einer verminderten Induktion des Zellzyklus-Arrest in der G1 Phase führt (Gu *et al.*, 1994). MYC-Box-2 Mutationen hingegen beeinflussen die Apoptoseregulation (Fest *et al.*, 2002). Die Myc vermittelte Apoptose kann über zwei unabhängige Mechanismen verlaufen; zum einen über die Formierung von Myc / MIZ1 Komplexen und die Beeinflussung der p53 / p19ARF vermittelte Zellzyklusregulation (Ceballos *et al.*, 2005) als auch über p53 unabhängige Mechanismen

wie die transkriptionelle Aktivierung von FAS, FASL, BAX und BIM (Sánchez-Beato *et al.*, 2003). Ebenso konnte gezeigt werden, dass MYC-Mutanten zwar die Fähigkeit zur Aktivierung von p53 besitzen, über die fehlende Induktion von BIM die Apoptoseinduktion jedoch behindern (Hemann *et al.*, 2005).

Um diese teilweise sehr heterogenen zytogenetischen Veränderungen zusammenfassen und gruppieren zu können, wurde im Rahmen des MMML-Verbundes eine Klassifizierung erarbeitet, die das MYC-Gen als zentralen prognostischen Faktor annimmt.

### 1.3.1.3 Modell eines genetischen MYC-Klassifikators

Basierend auf den Ergebnissen der FISH- und CGH-Untersuchungen wurde im Rahmen des MMML-Verbundprojektes der Nachweis der MYC-Translokationen als zentrales genetisches Ereignis sowie zusätzliche genetische Aberrationen als Grundlage für einen genetischen Klassifikator herangezogen. Dabei stellten neben einem (IG-) MYC-Bruch das Auftreten weiterer Translokationen sowie der Komplexitätsgrad chromosomal Aberrationen wichtige Kriterien dar (Hummel *et al.*, 2006).

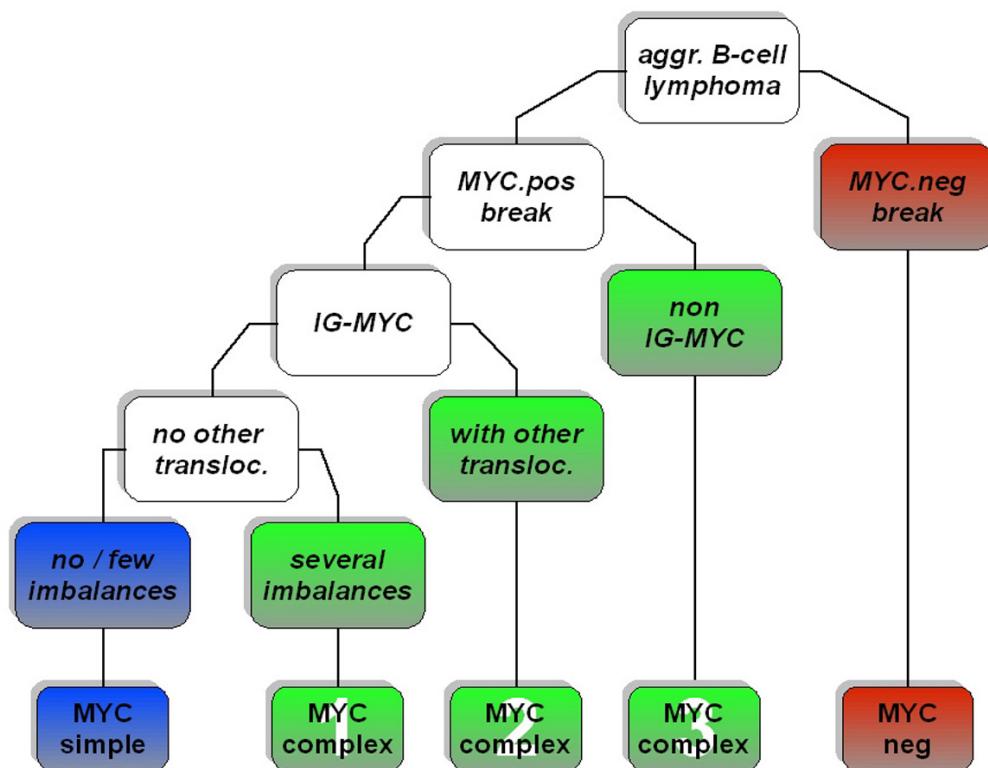


Abbildung 4: MYC-Klassifikation

Klassifizierungsmodell basierend auf MYC-Bruchereignissen sowie weiteren chromosomal Translokationen, genetischer Komplexität. Die heterogene Gruppe der MYC.pos Fälle kann so anhand des Grades weiterer Aberrationen besser differenziert werden.  
(verändert nach Hummel *et al.*, 2006)

In einem mehrstufigen Modell (Abb. 4) wurde das Kollektiv der aggressiven B-Zell-Lymphome zunächst hinsichtlich des Vorhandenseins eines MYC-Bruchs unterteilt (MYC.pos vs. MYC.neg). In der Gruppe der MYC.pos Lymphome kann man Fälle ohne zusätzliche chromosomale Veränderungen (MYC.simple) von Fällen mit einem hohen Komplexitätsscore und vielen Imbalancen wie (-6q, -17p, -9p, +18q21, +7q22) (MYC.complex 1) sowie einer dritten Gruppe mit zusätzlichen Chromosomen-Translokationen (*BCL2*, *BCL6*) (MYC.complex 2) unterscheiden. MYC positive Fälle mit einem nicht-IG-Translokationspartner wurden als MYC.complex 3 bezeichnet.

Basierend auf dieser MYC-Klassifikation sollte berücksichtigt werden, dass sich MYC.pos Fälle hinsichtlich des Musters chromosomaler Aberrationen (*IgH*, *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, *REL*) sowie numerischer Chromosomenaberrationen stark voneinander unterscheiden und dies möglicherweise Unterschiede für die Pathogenese und die Prognose impliziert.

### 1.3.2 Das Proto-Onkogen BCL6

Das BCL6-Gen (B-cell lymphoma 6) auf Chromosom 3 (3q27) kodiert für ein Transkriptionsrepressorprotein (706 AS, 92-98 kDa), das spezifisch in B-Zellen vorkommt und während der Keimzentrumsreaktion aktiviert wird; Bcl6 ist für die Formierung von B-Zell-Keimzentren essentiell (Cattoretti *et al.*, 1995; Shaffer *et al.*, 2002). Das BCL6-Gen umfasst insgesamt 24 kB auf 11 Exons und besonders die Region des Intron 1 wird als hochkonserviert beschrieben (Jardin & Sahota, 2005). Das Bcl6-Protein ist im Zellkern lokalisiert (Cattoretti *et al.*, 1995).

Charakteristisch für den Bcl6-Transkriptionsfaktor ist die DNA-bindende Zinkfinger-Struktur in der C-terminalen Region des Proteins. Die N-terminale Domäne enthält die Motive für die Homodimerisierung sowie die Interaktionen mit Ko-Repressoren und anderen Zinkfingerproteinen. Es wird angenommen, dass die Interaktion mit diesen Ko-Repressoren einen Einfluss auf die repressive Wirkung von Bcl6 hat (Ohno, 2006). Gene, deren Promotoren das Sequenzmotiv 5'-TTCCT(A/C)GAA-3' enthalten, stellen regulatorische Ziele von Bcl6 dar. So konnten bisher über 400 Bcl6-Zielgene identifiziert werden (Polo *et al.*, 2006).

### 1.3.2.1 Die BCL6-Translokation

Translokationen mit Beteiligung des BCL6-Gens gehören mit 20-40 % zu den häufigsten chromosomal Translokationen bei DLBCL (Offit & Chaganti, 1991; Rowley, 1990) und finden sich zu einem Großteil in einer Region, die das erste nicht kodierende Exon und die 5'-Region des Intron 1 umfasst. Diese Region wird daher als Major Translocation Cluster (MTC; Bastard *et al.*, 1994) bezeichnet. Als Translokationspartner wurden sowohl die Immunglobulin-Gene als auch über 20 weitere non-Ig-Loci identifiziert (Akasaka *et al.*, 2000). Innerhalb der MTC Region findet sich eine ca. 800 bp umfassende Region, in der eine deutlich erhöhte Mutationsrate nachgewiesen werden konnte. Diese Region wird, analog zum MTC, als Major Mutation Cluster (MMC, Abb. 5) bezeichnet (Jardin *et al.*, 2002a).



Abbildung 5: Schematische Darstellung der 5'-Region des BCL6-Gens.  
E1-5 (grün): Exon 1 bis 5, MMC: Major Mutation Cluster

### 1.3.2.2 Deregulation von BCL6

Durch die beschriebenen Veränderungen kann es zu einer konstitutiven Expression von BCL6 kommen, wodurch eine Differenzierungsblockade der B-Zellen und aberranter Proliferation induziert werden kann (Parekh *et al.*, 2007). Dies trägt maßgeblich zur Lymphomentstehung von DLBCL bei (Iqbal *et al.*, 2007). Die Bedeutung von BCL6-Translokation bzw. somatische Hypermuation für die BCL6-mRNA- und Proteinexpression ist bisher wenig untersucht und wird kontrovers diskutiert (Iqbal *et al.*, 2007; Jardin *et al.*, 2002b).

Bezüglich der prognostischen Relevanz einer BCL6-Translokation gibt es keine einheitliche Einschätzung; verschiedene Studien konnten einen günstigen Einfluss auf die Prognose zeigen (Jerkeman *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 1998) oder eine ungünstige Prognose (Barrans *et al.*, 2002) bzw. keinen Einfluss nachweisen (Bastard *et al.*, 1994).

### 1.3.3 Der nukleäre Transkriptionsfaktor NFkB

Der Nukleäre Faktor kB (NFkB) ist ein Transkriptionsfaktor, der von Sen & Baltimore (1986) erstmals als Nukleus-lokalisiertes Protein reifer B-Lymphozyten beschrieben wurde, dass an ein Sequenzmotiv des Enhancers der k-Kette der Immunglobuline bindet. Heute ist bekannt, dass NFkB ein Transkriptionsfaktor für über 400 Gene ist und in nahezu allen Zellen in einer induzierbaren, inhibitorgebundenen Form vorliegt (Karin & Lin, 2002). Aufgrund der Lokalisation des inhibitorgebundenen NFkB im Zytoplasma kann als Reaktion auf zellulären Stress binnen kürzester Zeit NFkB aktiviert werden und umfassend die Transkription der Zielgene initiieren. Die Bedeutung der aktivierten Zielgene steht meist im Zusammenhang mit Proliferation und Zelldifferenzierung sowie proinflammatorischen und anti-apoptotischen Mechanismen (Carmody & Chen, 2007).

#### 1.3.3.1 Das Proto-Onkogen REL

Eine Untereinheit eines Transkriptionsfaktors aus der NFkB-Proteinfamilie, welches als Rel bezeichnet wird, wird vom humanen Proto-Onkogen c-REL (REL) kodiert. Rel ist ein 587 Aminosäuren umfassendes Polypeptid, das entweder als Homo- oder Heterodimer mit anderen NFkB-Proteinen an spezifische Sequenzmotive bindet (Gilmore *et al.*, 2004). Nach Gilmore (2006) werden die NFkB-Untereinheiten in zwei Unterfamilien eingeteilt (Abb. 6); die Familie der Rel-Proteine und die Familie der NFkB. Gemeinsam ist allen Vertretern beider Unterfamilien die N-terminale REL-Homologie-Domäne (RHD), die innerhalb der NFkB-Proteine hochkonserviert ist. Die N-terminale RHD vermittelt die Bindung an die Sequenzmotive, die Dimerisierung beider Untereinheiten sowie die Bindung an den NFkB-Inhibitor I kB (Hayden & Ghosh, 2004). Im Gegensatz dazu ist die C-terminale Region (AS 296-587), die als Transaktivierungsdomäne (TAD) bezeichnet wird, nur gering konserviert (Starczynowski *et al.*, 2005).

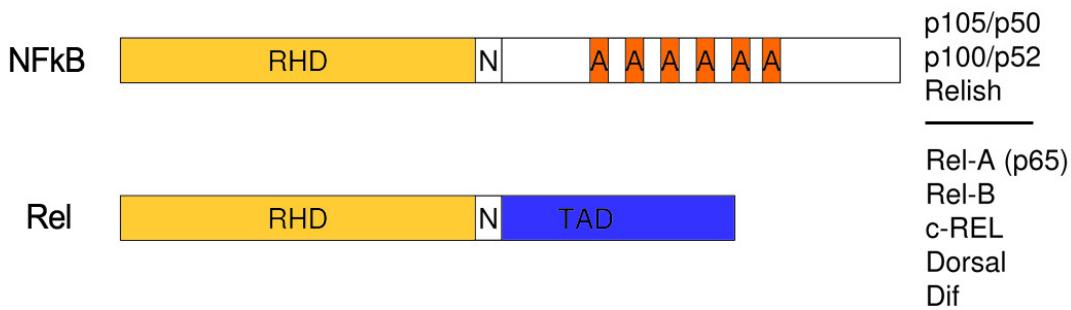


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus der verschiedenen *NfkB*-Untereinheiten modifiziert nach Gilmore (<http://people.bu.edu/gilmore/NFkB/>). RHD: REL-Homologie-Domäne, N: Nucleus-Lokalisierungssequenz, A: Ankyrin-Wiederholungen; TAD: Transaktivierungsdomäne. p105 dient als Vorläuferprotein zu p52; p100 stellt den Vorläufer von p52 dar. Relish, Dorsal und Dif sind *NFkB*-Proteine von *Drosophila sp.*

Nur die Rel-Proteine zeigen in ihren C-terminalen Bereichen die charakteristische REL-TAD (Abb. 6). Aktuell sind in der C-terminalen TAD zwei Untereinheiten bekannt, welche als TAD I (AS 422-497) und TAD II (AS 518 – 587) (Martin *et al.*, 2001; Starczynowski *et al.*, 2003) bezeichnet werden.

### 1.3.3.2 Aktivierung von Rel/NFkB

Die Aktivität von NFkB ist in hohem Maße reguliert (Gilmore, 2006). Im Zytosol liegen die NFkB-Dimere in Form eines inaktiven Komplexes vor, die an ein Inhibitorprotein (IkB) gebunden sind. Die vielfältigen Kombinationen der humanen Inhibitorproteine (Kombinationen aus den Untereinheiten: IkBa, IkB $\beta$ , IkB $\gamma$ , IkB $\epsilon$ ) weisen dabei eine spezifische Affinität zu den verschiedenen NFkB-Dimeren auf. Durch die Bindung an das Inhibitorprotein wird die Kernlokalisationssequenz maskiert, was dazu führt, dass die transaktivierende Funktion von NFkB inhibiert wird. Die Aktivierung von NFkB erfolgt durch zahlreiche extrazelluläre Signale (Gilmore *et al.*, 2004). Bisher sind zwei Wege der Aktivierung von NFkB beschrieben. Im klassischen Signalweg wird durch ein extrazelluläres Signal (z.B. durch Zytokine) mit Hilfe eines Enzym-Komplexes aus Serin-Kinasen (IKK) das Inhibitorprotein IkB abgespalten. Das durch die Phosphorylierung aktivierte NFkB-Dimer kann in den Zellkern wandern und dort die Transkription der Zielgene regulieren. Der Rel/NFkB-Transkriptionsfaktor bindet an 9-10 Basenpaare lange DNA-Fragmente, die als kB-sites (Zielsequenz: 5'-GGGRNWYYCC-3', W: A/T, R: A/G, Y: C/T, N: A/C/T/G; Gilmore, 2006) bezeichnet werden. Zu den Zielgenen von Rel/NFkB zählen über 400 Gene für Zytokine und ihre Modulatoren, Enzyme, Immunrezeptoren, Stress-Response-Gene, Apoptose-Regulations-Gene sowie Gene für

andere Transkriptions- und Wachstumsfaktoren (<http://people.bu.edu/gilmore/NFkB/>). Zu den NFkB-Zielgenen gehören auch die Gene, die für Untereinheiten des Inhibitorproteins I kB kodieren. Durch die Proteinbiosynthese gebildetes I kB kann in den Zellkern translozieren, NFkB von der DNA entfernen und der inaktivierte Komplex wird zurück ins Zytoplasma transportiert. Der klassische Signalweg der NFkB-Aktivierung ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

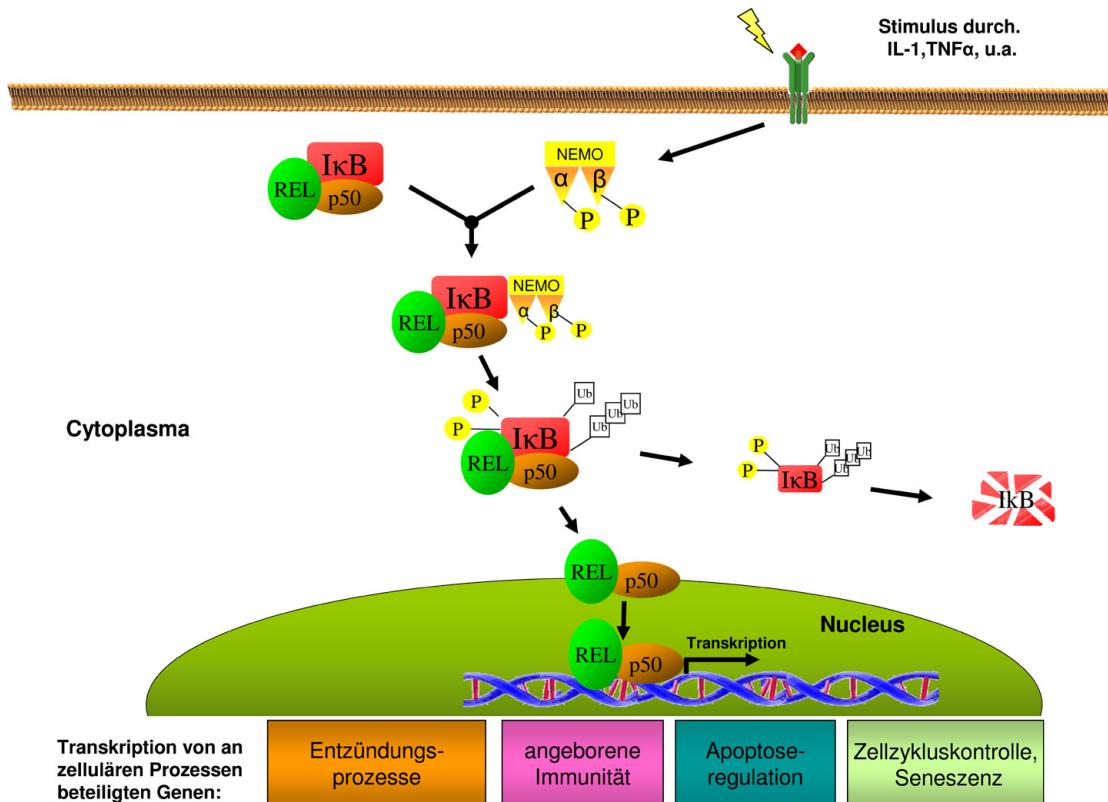


Abbildung 7: Schematische und vereinfachte Darstellung des klassischen Signalweges zur Aktivierung von NFkB sowie schematischer Überblick der Prozesse, die durch NFkB-Regulation unterliegen.

Durch extrazelluläre Signale wird die IK-Kinase aktiviert, die ihrerseits an den I kB-Komplex bindet. Durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung des Inhibitors (I kB) wird dieser vom Rel/p50-Dimer gelöst und im Proteasom abgebaut. Das freie Rel/p50-Dimer kann in den Nukleus passieren, bindet an kB-Zielsequenzen und transaktiviert die Zielgen-Transkription. Die Transaktivierung des eigenen Inhibitors I kB bewirkt die erneute Inhibierung und Rückführung des Dimers ins Zytoplasma (nicht dargestellt).

In einem alternativen Signalweg wird nach der Aktivierung durch Signale wie z.B. CD40 die NFkB-induzierende Kinase (NIK) durch Phosphorylierung aktiviert. NIK aktiviert wiederum ein IKKa-Homodimer, welches zur Aktivierung des RelB/p100-Heterodimers führt. Durch proteolytische Spaltung entsteht aus der inaktiven Untereinheit p100 die aktive Form p52 (Gilmore, 2006).

### 1.3.3.3 Regulation von Rel/NFκB

Die Regulation der IκB-/NFκB-Interaktion durch die Serin-Kinasen (IKK) wird als zentraler Schritt der Aktivierung von NFκB angesehen (Gilmore, 2006). In den meisten Zellen besteht IKK aus drei Untereinheiten: den katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$  (NEMO von NFκB Essential Modulator). Im klassischen Signalweg der NFκB-Aktivierung folgt auf die Aktivierung durch Zytokine die Phosphorylierung von zwei Serinresten der IKK $\beta$ -Untereinheit, die wiederum die Phosphorylierung von Serinen der IKK $\alpha$ -Untereinheit zur Folge hat. Durch die Phosphorylierung von Serinen der IKK $\alpha$ -Untereinheit wird zum einen die Kernlokalisierungssequenz demaskiert, zum anderen dient IKK $\alpha$  als Substrat für die Ubiquitinierung und den folgenden Transport des Inhibitors ins Proteasom. Nach neueren Erkenntnissen werden jedoch durch die IKK nicht nur die Untereinheiten des Inhibitors IκB, sondern auch die TAD der NFκB-Untereinheiten phosphoryliert (Harris *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2005). Eine Phosphorylierung eines Serins in der TAD von RelA erhöhte dessen Transkriptionseffizienz; die REL-TAD kann also durch Phosphorylierung spezifischer Serine reguliert werden (Fognani *et al.*, 2000; Harris *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2005; Martin & Fresno, 2000; Martin *et al.*, 2001).

### 1.3.3.4 Biomedizinische Bedeutung von Rel/NFκB

Die bedeutendste Rolle von Rel im gesunden Individuum besteht in der Regulation von B- und T-Lymphozyten-Funktionen. Daher können Veränderungen von REL häufig in Verbindung mit Lymphomen gebracht werden. Die starke Amplifikation sowie Mutationen, Insertionen und Deletionen des REL-Lokus stellen rekurrente genetische Abergartungen in verschiedenen menschlichen B-Zell-Lymphomen dar (follikulären Lymphomen, Hodgkin-Lymphomen, mediastinalen Lymphomen sowie extranodalen Lymphomen; Gilmore *et al.*, 2004). Unter anderem ist REL mRNA in *de novo* DLBCL hoch exprimiert und diese erhöhte Expression korreliert mit einer erhöhten Expression der Rel-Zielgene; in Abhängigkeit von der Erkrankungsart lassen sich jedoch stark schwankende Aktivierungsmuster der Zielgene beobachten (Rhodes *et al.*, 2005).

## 1.4 Fragestellung

Die Charakterisierung maligner Lymphome durch molekular zytogenetische Methoden und Genexpressionsanalysen hat in den letzten Jahren wesentlich zu einem verbesserten Verständnis der Biologie und Entstehung aggressiver B-NHL geführt. Neben der differenziellen Genexpression, die histologisch nicht zu unterscheidende Subtypen aggressiver Lymphome weiter klassifizieren kann, ist die Untersuchung zur Aktivierung von Onkogenen hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung für die Entstehung von Lymphomen in den Vordergrund des Interesses gerückt.

Transformierende Ereignisse in der Lymphomentstehung treten in sequenzieller Abfolge auf und verändern molekulare Regelwerke der normalen B-Zell-Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Über die genetischen Mechanismen, die zur Aktivierung von Onkogenen bei aggressiven Lymphomen führen, ist bisher noch wenig bekannt. Chromosomale Translokationen und somatische Mutationen involvieren häufig Schlüsselgene der Tumorentstehung, unter anderem MYC (Zellproliferation und Apoptose), BCL6 (B-Zell-Differenzierung) und REL (Transkriptionsfaktor). Durch die Genexpressionsanalyse werden die kausalen Zusammenhänge molekularer Veränderungen nicht erfasst.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten in Ergänzung zur molekularen Charakterisierung aggressiver B-Zell-Lymphome mittels Genexpressionsanalyse die Aktivierung ausgewählter Onkogene durch somatische Mutationen analysiert werden. Diese Untersuchungen sollen zu einem besseren Verständnis der Prozesse führen, welche die Initiation, Progression und letztlich auch den klinischen Verlauf der aggressiven Lymphome determinieren. Diese Arbeit soll verschiedene Fragen zur malignen Pathogenese aggressiver Lymphome beantworten:

- Können Mutationen von Onkogenen mit der Tumorentstehung von aggressiven Lymphomen in Zusammenhang gebracht werden ?
- Lassen sich die molekular charakterisierten Gruppen aggressiver Lymphome anhand des Hypermutationsstatus der Immunglobulin-Schwerkettengene charakterisieren und unterschiedlichen Stadien der physiologischen B-Zell-Entwicklung zuordnen ?
- Zeigt die somatische Hypermutation von Onkogenen unterschiedliche Muster in den molekularen Subgruppen ?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Somatischen Hypermutation und genetischer Instabilität als Ursache der Tumorentstehung ?
- Können Mutationen von Onkogenen als prognostische Marker herangezogen werden ?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Automatische GeneScan-Analyse	Applied Biosystems	ABI-377
Automatischer Sequenzierer	Applied Biosystems	ABI-3100 Avant
dHPLC	Transgenomic	WAVE System 3500
Doppel-Plattenzentrifuge	Heraeus	Labofuge 400
Gel-Dokumentation	BioRAD	Universal Hood II
Gel-Elektrophoresekammern	Peqlab Biotechnology	40-2314
Kapillare 36 cm	Applied Biosystems	ABI-3100 Avant
Laborwaage	Sartorius	PT-1200
pH-Meter	WTW	pH 526
Photometer	NanoDrop Technologies	ND-1000
Real-Time-PCR	Applied Biosystems	ABI 7300 (96 well) ABI 7900 HT (96+384 well)
Rotations-Mischer	Scientific Industries	Vortex Gene 2 G560E
Schüttel-Wärmeschrank	Gerhard	Thermoshake TH05/THL5
Sephadex-System	Millipore	Multiscreen MAHVN4510
Spannungsgeber	BioRad	PowerPac 300
Sterilisator	VWR	Varioklav 135S
Thermocycler	Applied Biosystems	GeneAmp PCR System 9700
Tisch-Kleinzentrifuge	Eppendorf	54150
Unterdruck-Rahmen	Millipore	Multi-Screen 384
UV-Transilluminator	Spectroline	TC-312-A
Wasserbad	Julabo	MP-PA

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Geräte

### 2.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung
TBE-Puffer (10x), Ultra Pure Grade	Amresco Inc.	Agarose-Gelelektrophorese
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Agarose-Gelelektrophorese
Low DNA-Mass Ladder	Invitrogen Co.	Agarose-Gelelektrophorese
peqGOLD Universal-Agarose	Peqlab Biotechnologie	Agarose-Gelelektrophorese
Tris-Puffer, PUFFERAN, ≥99,9 %	Carl Roth	Agarose-Gelelektrophorese Heteroduplex-Analyse
Wave Optimized Buffer A	Transgenomic Ltd.	dHPLC
Wave Optimized Buffer B	Transgenomic Ltd.	dHPLC
Roti Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1	Carl Roth	DNA-Aufreinigung
Ethanol absolut	Merck	DNA-Aufreinigung
GeneScan 500 ROX Längenstandard	Applied Biosystems	Genescan
TEMED for electrophoresis, > 99%	Sigma-Aldrich	Heteroduplex-Analyse
Harnstoff, UltraPure Grade	Amresco Inc.	Heteroduplex-Analyse
Formamid deionisiert, UltraPure Grade	Amresco Inc.	Heteroduplex-Analyse
Essigsäure (100%), p.A.	Merck	Heteroduplex-Analyse
EDTA Dihydrat, Biotechnology Grade	Amresco Inc.	Heteroduplex-Analyse

## Chemikalien Fortsetzung

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Dimethylsulfoxide (DMSO) > 99,9%	Sigma-Aldrich	Heteroduplex-Analyse
Ammonium persulfate, ACS grade	Amresco, Inc.	Heteroduplex-Analyse
Acrylamid/Bis 40%, 29,5:1	Serva Electrophoresis	Heteroduplex-Analyse
LB Broth, Miller	Sigma-Aldrich	Klonierung
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Applichem	Klonierung
X-Gal für die Molekularbiologie	Applichem	Klonierung
Ampicillin Natriumsalz	Sigma Aldrich	Klonierung
SELECT Agar	GIBCO/Invitrogen	Klonierung
Hefe-Extrakt, SERVABACTER	Serva Electrophoresis	Klonierung
Trypton, mikrobiologisch getestet	Sigma-Aldrich	Klonierung
TA Cloning Kit pGEM-T System	Promega	Klonierung
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen	Klonierung
dNTP Mix	Carl Roth	PCR
High Fidelity PCR System	Roche Applied Science	PCR
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems	PCR
Dextran	Carl Roth	PCR
Oligonukleotide (Primer, Sonden)	TIB Molbiol	PCR, Sequenzierung
Wizard Plus Miniprep DNA Purification System	Promega	Plasmidpräparation
Natriumchlorid, p.A.	Merck	Puffersubstanz
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems	RT-PCR
SNaPshot Multiplex Kit	Applied Biosystems	quantitative allelische Diskriminierung
POP-6 Polymer for Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Sequenzierung
HiDi Formamid	Applied Biosystems	Sequenzierung
BigDye 1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	Sequenzierung
Sephadex G-50 Fine Sepharose	GE Healthcare	Sequenzierung

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien für die verschiedenen molekularbiologischen Analysen/Methoden

## 2.3 Software

Bezeichnung der Software	Hersteller	Anwendung
GeneScan 3.1	Applied Biosystems	Auswertung GeneScan
Sequence Detector 2.0	Applied Biosystems	Auswertung Realtime-PCR
Quantity One 1-D	BioRad	Gel-Dokumentation
BioEdit 7.0.0	Ibis Biosciences	Auswertung Sequenzierung
Wavemaker 3	Transgenomic Ltd.	Auswertung dHPLC
GraphPad Prism 3.0	GraphPad Software Inc.	Statistische Auswertung

Tabelle 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Software-Produkte

## 2.4 Probenmaterial

In dieser Arbeit wurden 228 DNA-Proben untersucht, die im Rahmen des Verbundprojektes „Molekulare Mechanismen Maligner Lymphome“ (MMML), einer durch die Deutsche Krebshilfe (DKH) geförderten, multizentrischen Studie eingeschlossen wurden. Die untersuchten Materialien wurden in den Jahren 1984-2003 für diagnostische Zwecke asserviert und in der ersten Förderperiode (2003-2006) retrospektiv von den teilnehmenden Instituten in die Studie eingebracht. Kriterien für den Studieneinschluss war die histologische Diagnose Burkitt-Lymphom (BL), Burkitt-like-Lymphom (BLL) oder diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (*engl.* diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL). Die Diagnose wurde durch die Begutachtung der Paraffin- und Gefrierschnitte mit histologischen Giemsa- und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen sowie immunhistochemischen Färbungen mit den Markern Ki-67 (Proliferationsmarker), CD3 (T-Zell-Marker), CD20 (B-Zell-Marker) und CD68 (Makrophagen-Marker) durch die deutschen Referenzpathologen gestellt. Die Paneldiagnosen wurden in gemeinsamen Sitzungen aller teilnehmenden Referenzpathologen analog zur WHO-Klassifikation der malignen Lymphome (2001) einstimmig gestellt (Tab. 1). Das wesentliche Einschlusskriterium für ein Lymphknotengewebe war ein Tumorgehalt von mindestens 70 %. Die DNA-Extraktion erfolgte konform zum Studienprotokoll in den teilnehmenden Institutionen. Diese Vorarbeiten waren nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Das eingeschlossene Probenmaterial wurde der II. Medizinischen Klinik im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UK-SH) Campus Kiel zur molekulargenetischen Untersuchung zur Verfügung gestellt.

## 2.5 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Mit Hilfe eines Mikro-Volumen Spektrophotometers (ND-1000, NanoDrop Technologies) wurde die DNA-Konzentration anhand der DNA-spezifischen Licht-Absorption bei 260 nm gegen dH<sub>2</sub>O als Referenz gemessen. Eine Einheit der Optischen Dichte (OD) entspricht hierbei einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml (ssDNA: 40 µg/ml; RNA: 33 µg/ml) (Sambrook *et al.*, 1989). Zudem wurde die Reinheit der Probe bestimmt, die sich aus der Relation der charakteristischen Absorption von DNA bei 260 nm zu 280 nm (Protein) ergibt. Bei einer Reinheit von < 1,8 wurde die DNA-Lösung einem zusätzlichen Reinigungsschritt unterzogen (siehe Kap. 2.8) und erneut gemessen. Reinheiten von 1,8 bis 2 wurden akzeptiert und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist die durch eine thermostabile Polymerase vermittelte zyklische Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes, welcher durch zwei Oligonukleotide, die als Primer bezeichnet werden, begrenzt wird. Mullis *et al.* (1986) etablierte dieses Verfahren, in welchem in einem ersten Schritt die DNA bei  $> 90$  °C reversibel denaturiert wird (*Denaturation*), so dass die DNA in Einzelsträngen vorliegt. Im zweiten Schritt, dessen Temperatur stark von der Schmelztemperatur der gewählten Primer abhängt, lagern sich diese an komplementäre Stränge des zu vervielfältigenden DNA-Fragmentes an (*Annealing*). Während der Elongationsphase synthetisiert die thermostabile Polymerase die Verlängerung der Primer mithilfe von einzelnen Nukleotiden (dNTPs), so dass am Ende eines PCR-Zyklus wieder doppelsträngige DNA-Fragmente vorliegen. Dieser Prozess aus Annealing, Elongation und Denaturierung wird mehrere Male wiederholt, so dass durch diese Methode eine exponentielle spezifische Vermehrung eines DNA-Fragmentes gewährleistet werden kann (Abb. 8).

Der in dieser Arbeit standardmäßig verwendete PCR-Reaktionsansatz basiert, sofern nicht anders angegeben, auf dem *Expand High Fidelity* System von Roche (Tab. 5). Dieses PCR-System beinhaltet eine Polymerase-Mischung aus *Taq*- und *Tgo*-DNA-Polymerasen und bietet durch den Anteil an *Tgo*-Polymerasen eine „Korrekturlese-Funktion“ (engl. *proof-reading*), die in einer geringen Fehlerrate resultiert ( $< 4,8 \times 10^{-6}$ ). Diese Korrekturlese-Aktivität basiert auf einer enzymatischen 3'-5' Exonuklease-Aktivität, die den zufällig falschen Einbau eines Nukleotids durch die Polymerase erkennen und beheben kann.

Reagenzien	Menge/Ansatz
10x PCR-Puffer	5 ml
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dATP, dTTP, dCTP, dGTP	je 200 µM
Primer (FP + RP)	je 0,4 µM
Roche High-Fidelity Polymerase	1 U
Genomische DNA	50-500 ng
Aqua dest.	ad 50 µl

Tabelle 5: Zusammensetzung des standardmäßig verwendeten PCR-Reaktionsansatzes

Dieser proof-reading PCR-Reaktionsansatz (Tab. 5) wurde für alle dHPLC-Untersuchungen sowie die daran anschließenden Sequenzierungen verwendet, um das Risiko falsch positiver Messergebnisse durch Synthesefehler der Polymerase zu minimieren.

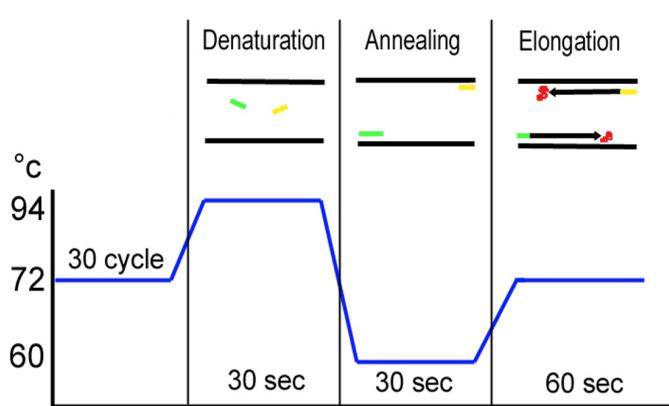


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus

Oben: Die beiden in der Reaktion befindlichen Primer (gelb/grün) liegen in der Denaturierungsphase einzelsträngig vor. In der Annealing-Phase binden die Primer an die komplementären Sequenzabschnitte. In der Elongationsphase synthetisiert die Polymerase (rot) vom 3'-Ende der Primer ausgehend die neuen DNA-Strände.

Unten: Die blaue Linie zeigt den Temperaturverlauf während einer PCR (30malige Wiederholung) in der Reaktion.

In dieser Arbeit wurde für alle untersuchten Gen-Fragmente, sofern nicht anders angegeben, nach 2 min initialer Denaturierung ein Zyklus aus 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Primer-Annealing bei 60 °C und 60 sec Elongation bei 72 °C mit 30 Wiederholungen genutzt (Abb. 8).

In den folgenden Abschnitten sind die PCR-Reaktionen, die für die Amplifikationen der einzelnen Gen-Abschnitte genutzt wurden, kurz dargestellt. Die PCR sowie eine Variante der PCR, die als Realtime Quantitative PCR (RQ-PCR) bezeichnet wird, wurde einerseits zur Kontrolle der amplifizierbaren DNA genutzt, andererseits diente diese PCR auch einer Amplifikation von spezifischen Genabschnitten für die nachgeschaltete Analyse mittels dHPLC, Direktsequenzierung oder Klonierung.

### 2.6.1 Kontrollgen-PCR: Überprüfung der Amplifizierbarkeit

Um Aussagen über die Qualität und Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA machen zu können, wurde nach der photometrischen Konzentrationsmessung mittels Nano-Drop eine Kontrollgen-PCR angeschlossen. Diese u.a. durch das molekulargenetische Labor der II. Medizinischen Klinik im Rahmen des europäischen BIOMED2-Projektes etablierte Methode generiert in einem Multiplex-PCR-Ansatz fünf unterschiedliche DNA-Fragmente mit Längen von je 100-400 bp und 600 bp. Es wurden 4 Gene ausgewählt: RAG1 (11q13), PLZF (11q23.1), TBXAS1 (7q34) und AF4 (4q21). Diese Gene eignen sich sehr gut für die Kontrollgen-PCR, da sie ausreichend große und konservierte Exons bieten, die aufgrund relativ weniger Polymorphismen oder bekannter Mutationen zuverlässig amplifiziert werden können.

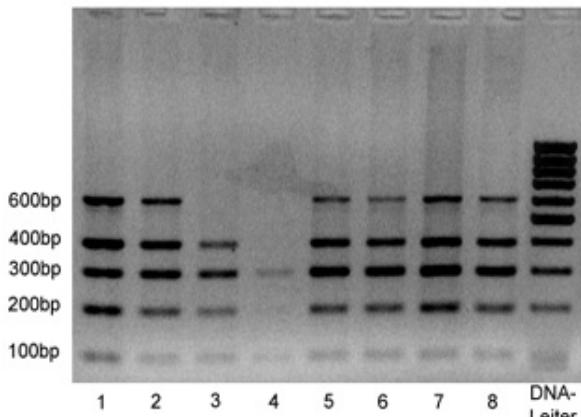


Abbildung 9: Agarosegel einer Kontrollgen-PCR

Es wurden auf das Agarosegel 8 Proben (1-8) und ein Längenstandard aufgetragen. Von Probe 3 ließ sich nicht die max. Bande von 600 bp amplifizieren. Die DNA-Qualität von Probe 4 ließ keine erfolgreiche Amplifikation zu.

Die Kontrollgen-PCR basiert auf dem System der AmpliTaq Gold Polymerase von Applied Biosystems (Tab. 6). Diese robuste Polymerase besitzt keine proof-reading Aktivität und zeichnet sich durch eine hohe Synthesegeschwindigkeit und Stabilität aus. AmpliTaq Gold liegt in einer inaktiven Konformation vor und benötigt zur Aktivierung ihrer Syntheseaktivität eine initiale 10 minütige Denaturierungsphase (94 °C), gefolgt von 30 Zyklen:

Denaturierung (94 °C / 30 sec),  
Annealing (60 °C / 30 sec),  
Elongation (72 °C / 60 sec).

Fragment-länge	Primer-Bezeichnung	Konzentration	Primer-Sequenzen (5' » 3')
100 bp	56866_FP 56862_RP	0,5 µM 0,5 µM	GCC CGA CAT TCT GCA AGT CC GGT GTT GCC GGG AAG GGT T
200 bp	56854_FP 56860_RP	0,5 µM 0,5 µM	TGA GCT GCA AGT TTG GCT GAA TGT TGA CTC GAT CCA CCC CA
300 bp	56855_FP 56956_RP	0,5 µM 0,5 µM	TGC GAT GTG GTC ATC ATG GTG CGT GTC ATT GTC GTC TGA GGC
400 bp	56857_FP 62297_RP	0,5 µM 0,5 µM	CCG CAG CAA GCA ACG AAC C GCT TTC CTC TGG CGG CTC C
600 bp	62295_FP 62296_RP	1 µM 1 µM	CAT CCA TGG GCC GGA CAT AA GGA GCA GCA TTC CAT CCA GC
10x PCR-Puffer MgCl <sub>2</sub> dATP, dTTP, dCTP, dGTP AmpliTaq Gold Polymerase Genomische DNA Aqua dest.		5 ml 3 mM je 200 µM 1 U 250 ng ad 50 µl	

Tabelle 6: Kontrollgen-PCR: Primer und Reaktionsansatz

In einer der Kontrollgen-PCR nachgeschalteten Agarosegel-Elektrophorese konnte dann anhand des Auftretens und der Intensität der einzelnen Banden eine Aussage über die Amplifizierbarkeit der extrahierten Gesamt-DNA getroffen werden (Abb. 9). Eine positive Kontrollgen-PCR zeigte sowohl die Eignung einer DNA-Probe für die weiteren Analysen an und diente auch als Hinweis darauf, ob die Probe ausreichend amplifizierbare DNA, eine geringe DNA-Fragmentierung und einen niedrigen Anteil an PCR-Hemmstoffen enthielt.

## 2.6.2 Real-Time-Quantitative-PCR

Die Real-Time-Quantitative-PCR (RQ-PCR) ist eine weitere Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren auf Basis einer Polymerase-Ketten-Reaktion, welche zusätzlich die Möglichkeit einer präzisen Echtzeit-Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während der gesamten Dauer einer PCR-Reaktion durchgeführt, wobei die Leuchtintensität innerhalb der Reaktion proportional zur Menge an neu synthetisiertem PCR-Produkt zunimmt. Die Zugabe einer zusätzlichen Fluoreszenzfarbstoff-markierten FRET-Sonde (*Förster resonance energy transfer*) zu einer Standard-PCR nutzt die 5'-3'-Exonukleaseaktivität von speziellen *Taq*-Polymerasen aus. FRET-Sonden haben eine Länge von 15-30 bp und besitzen am 5'-Ende ein Donor-Fluorochrom (Reporter, z.B. 6-Carboxy-Fluorescein, FAM), das durch den Detektions-Laser angeregt wird. Diese Energie wird jedoch nicht in Fluoreszenzstrahlung umgewandelt, sondern durch den FRET strahlungsfrei an ein am 3'-Ende der Sonde befindliches Akzeptor-Fluorochrom (dunkler Quencher, z.B. 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin TAMRA) abgeführt. Wird der räumliche Abstand zwischen Reporter und Quencher jedoch zu groß, nimmt der FRET proportional zur Distanz ab und der Reporter beginnt nach Laseranregung zu fluoreszieren. Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die intakte Sonde auf dem komplementären DNA-Strang, wobei durch die intakte Sonde noch keine Fluoreszenz emittiert wird. Aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase bei der Synthese des neuen Strangs wird diese FRET-Sonde dann im Laufe eines PCR-Zyklus hydrolysiert und zerstört. Reporter und Quencher werden räumlich voneinander getrennt, der FRET ist aufgehoben und die laserangeregte Fluoreszenz kann mit Hilfe einer CCD-Kamera im ABI-7900HT detektiert werden (Abb. 10).

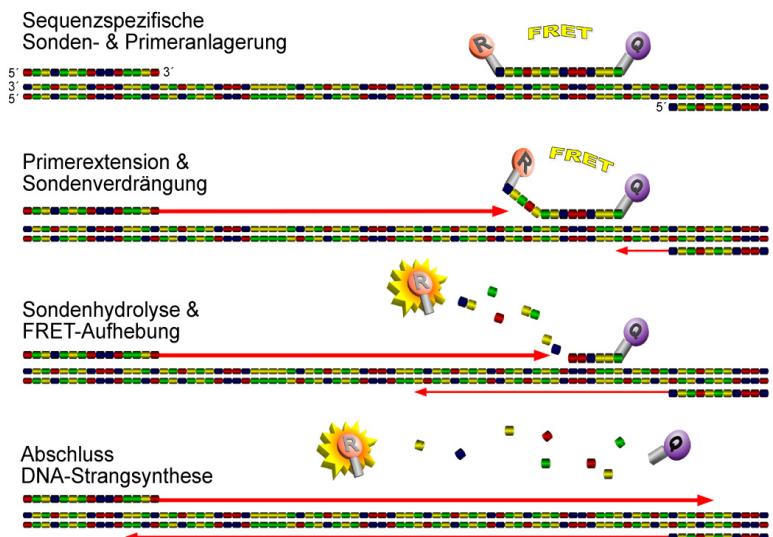


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer RQ-PCR  
Nach der Hybridisierung von Primerpaar und Sonde wird durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase die Sonde vom Gegenstrang abgespalten und zerstört. Durch die räumliche Trennung von Reporter und Quencher wird der FRET unterbrochen und die Fluoreszenz wird messbar.

### 2.6.2.1 Bestimmung der amplifizierbaren DNA: Albumin-RQ-PCR

Zusätzlich zur rein qualitativen Aussage der Kontrollgen-PCR wurde zur genauen Bestimmung der Quantität der Proben-DNA mit Hilfe einer Albumin-RQ-PCR die Anzahl an amplifizierbaren Kopien des Albumin-Gens pro 1 µl DNA-Lösung bestimmt (Pongers-Willemse *et al.*, 1998). Dieses Kontrollgen oder auch *housekeeping gene* ist definitionsgemäß in jedem humanen Genom mit exakt zwei Kopien vertreten und kann somit als interne Referenz genutzt werden. Eine detaillierte Aufstellung der Zusammensetzung sowie der Laufbedingungen der Albumin-RQ-PCR zeigt Tabelle 7 bzw. Abb. 11.

Reagenzien		Menge je Ansatz	Primer-Sequenzen (5' » 3')
Primer	Alb_FP Alb_RP	0,3 µM 0,3 µM	CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CTC TCC TTC TCA GAA AGT GTG CAT
TaqMan-Sonde	Alb_Q	0,1 µM	( <i>FAM</i> )-TGC TGA AAC ATT CAC CTT CCA TGC AGA ( <i>TAMRA</i> )
2x ABI-Taqman Puffer		10 µl	
Probenvolumen		1 µl	
dH <sub>2</sub> O		ad 20 µl	

Tabelle 7: Zusammensetzung der RQ-PCR für die Albumin-Quantifizierung

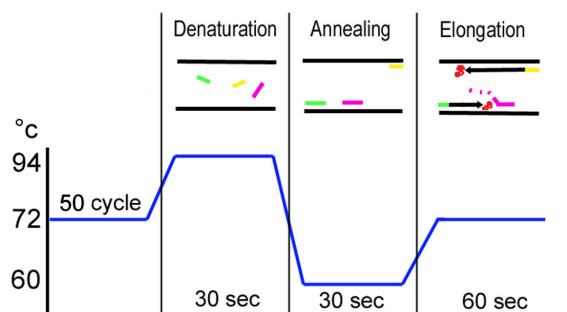


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines RQ-PCR Zyklus

Die beiden in der Reaktion befindlichen Primer (grün, gelb) sowie die FRET-Sonde (pink) liegen in der Denaturierungsphase wie die DNA einzelsträngig vor. In der Annealing-Phase binden die Primer sowie die Sonde an ihre komplementären Sequenzabschnitte. In der Elongationsphase synthetisiert die Polymerase (rot) vom Primer ausgehend die neuen DNA-Stränge. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase wird die Sonde hydrolysiert. Das Fluoreszenzsignal in jeder Probe wird kontinuierlich detektiert.

Anhand einer seriellen Verdünnungsreihe ( $10^0$ - $10^{-5}$ ) von 500 ng buffy-coat DNA in dH<sub>2</sub>O und der daraus resultierenden Eichgerade konnte die Menge an Albumin-Genen in jeder Probe bestimmt und die Konzentration amplifizierbarer DNA individuell berechnet werden. Die so errechnete DNA-Konzentration diente als Grundlage für alle weiteren PCR-Untersuchungen.

### 2.6.3 GeneScan der Immunglobulinschwerkettengene

Zum Nachweise der Klonalität der B-Zellen wurde eine Klonalitätsanalyse des Immunglobulinschwerkettengens (engl. IgH) mittels Konsensus-PCR durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch eine hochauflösende Fragmentlängenanalyse (HRFS - „High Resolution Fragment Analysis“ oder „GeneScan“) der Immunglobulin-Schwerkettengene auf einem automatischen Sequenziertechnik (Applied Biosystems 377). Die Verwendung eines 3'-Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primers in der PCR erlaubte es im automatischen Sequenziertechnik, die Länge eines PCR-Produktes basengenau zu bestimmen. Beim Vorgang des Rearrangements der VH-DH-JH-Segmente werden in den Antikörperbindungsstellen zwischen den konservierten FRs zufällige Mutationen eingefügt, welche zu der für die Funktionalität des Immunsystems nötigen, hohen Variabilität der Antikörper führen. Diese Variabilität der CDRs ist auch für die unterschiedlichen Längen der PCR-Fragmente verantwortlich. Polyklonale B-Zell-Populationen und analog die darauf basierend amplifizierten DNA-Fragmente sind im Längenspektrum normalverteilt und lassen sich daher im GeneScan entsprechend darstellen. Eine expandierte monoklonale B-Zell-Population ist derart überrepräsentiert, dass größtenteils B-Zellklon-Fragmente einer spezifischen Länge entstehen. Dies zeigt sich als deutlicher, monoklonaler Peak im GeneScan. Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung der Lösungen für den Nachweis der Klonalität der B-Zellen mittels Fragmentlängenanalyse (FR1-GeneScan). Der FR1-GeneScan basiert auf dem System der AmpliTaq Gold Polymerase von Applied Biosystems. In die PCR wurde der VH-Primer-Mix sowie ein fluoreszenzmarkierter antisense JH-Konsensusprimer eingesetzt.

Um die hochvariable, für die Antigenbindung verantwortliche CDR genauer zu charakterisieren, wurde ein Primermix verwendet, der vorwärts (sense oder FP) in der Immunglobulin-Schwerkettengen Framework-Region 1 (FR1) und rückwärts (antisense oder RP) in der FR4 (JH) bindet. Die sechs sense-Primer wurden so gewählt, dass sie in einer konservierten FR1 binden, um eins der dort möglichen sechs verschiedenen VH-Gene spezifisch zu erfassen. Ein FAM-markierter (5-Carboxy-Fluorescein) Antisense-Primer lag in der JH-Konsensusregion, so dass alle J-Gene mit einem Primer gleichzeitig erfasst werden konnten. Die daraus entstehenden PCR-Fragmente deckten bei Längen von ca. 300-360 bp das gesamte mögliche rearrangierte VH-DH-JH-Segment der schweren Immunglobulin-Kette einer B-Zelle ab.

Reagenzien		Konz.	Primer-Sequenzen (5' » 3')
VH- Primermix	VH 1	0,5 µM	CCT CAG TGA AGG TCT CCT GCA AGG
	VH 2	0,5 µM	TCC TGC GCT GGT GAA GCC ACA CA
	VH 3	0,5 µM	GAA GAT CTC TCC TGT GCA GCC TCT GG
	VH 4	0,5 µM	GTG GAT CCT GTC CCT CAC CTG CGC TG
	VH 5	0,5 µM	GAA AAA GCC CGG GGA GTC TCT GA
	VH 6	0,5 µM	GAA GAT CTC TCA CTC ACC TGT GCC ATC
JH Primer	JH (*FAM)	0,5 µM	(FAM)-CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C
10 x PCR-Puffer MgCl <sub>2</sub> dATP, dTTP, dCTP, dGTP AmpliTaq Gold Polymerase Genomische DNA Aqua dest.		5 ml 1,5 mM je 200 µM 1 U 500 ng ad 50 µl	

Tabelle 8: FR1-GeneScan-PCR: Primer und Reaktionsansatz

1 µl PCR-Produkt wurde mit 0,5 µl ROX-Längenstandard sowie 10,5 µl Formamid vermischt, bei 94 °C für 5 min denaturiert, auf Eis gelagert und abschließend mit dem ABI 377 Sequenziert nach Angaben des Herstellers analysiert. Dazu wurde zwischen die mit 0,2 mm Spacern getrennten Analyseplatten ein 4,5 %iges Polyacrylamid-Formamid-Gel gegossen. Für das Gel wurden 13,44 g Harnstoff mit 5,5 ml Rotiphorese 29:1 Polyacrylamid, 12,8 ml Formamid und 8 ml dH<sub>2</sub>O vermischt. Im Anschluss an eine Ultrafiltration durch einen 0,2 µm Filter mit kombinierter Entgasung wurde durch die Zugabe und das Mischen von 4 ml 10x TBE-Puffer, 30 µl TEMED und 450 µl 10 % APS die Polymerisation gestartet. Die Lösung wurde nach Herstellerangaben zwischen die Analyseplatten gegossen und polymerisierte nach dem Einsticken eines Kamms zur Taschenbildung unter Luftabschluss für mindestens 30 min bei RT. Nach dem Aufbau der Messeinrichtung wurden die Proben aufgetragen und bei 3 KV, ~50 W und 55 °C Geltemperatur innerhalb von 3,5 h aufgetrennt und die fluoreszenzmarkierten PCR-Fragmente mittels eines Lasers detektiert. Die Fragmentlängen und -mengen wurden abschließend mit Hilfe der zugehörigen GeneScan Software bestimmt und als Elektropherogramm ausgegeben.

#### 2.6.4 MYC-PCR für das Mutationsscreening (dHPLC)

Für das dHPLC-Mutationsscreening der verschiedenen MYC-Fragmente wurde der Standard-PCR-Reaktionsansatz (Tab. 5) verwendet. Es wurde die MYC-Promotorregion (Exon / Intron 1) mit drei überlappenden DNA-Fragmenten und MYC-Exon 2 mit zwei überlappenden DNA-Fragmenten amplifiziert (Tab. 9 bzw. Abb. 12)

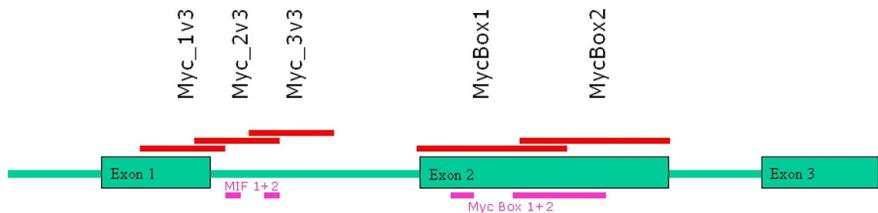


Abbildung 12: Schematische Darstellung des MYC-Gens

Rot die überlappende Position der verwendeten PCR-Fragmente, Grün der Aufbau der Exon-Intron Struktur, Pink die Lage der untersuchten Regionen MIF-1+2 sowie MYC-Box 1+2

PCR	Primer	dHPLC-Temp. (°C)	Primer-Sequenzen (5' » 3')
MYC-Promotor Exon/Intron 1	MYC_1v3 FP	58 / 63	AGC CCT CCC GCT GAT CCC CCC AGT TAC CAT AAC TAC TCT GA
	MYC_1v3 RP		AGC ACC GAA GTC CAC TTG CCT TT CCA AGG AGC TCA GGA TGC AAG G
	MYC_2v3 FP	55 / 60	ATA TAT TCA CGC TGA CTC CCG GC TAC CCA ACA CCA CGT CCT AAC AC
	MYC_2v3 RP		ATC CCC GCT TTG TGT GCC C CTG GCC TCC TAC CAG GCT G
	MYC_3v3 FP	58 / 63	TCC ACG GCC GAC CAG CTG GAG AT TAA GCG AAG CCC GCC CAG G
	MYC_3v3 RP		
MYC-Box1	MB1 FP	nur Direkt-sequenzierung	CCT CCC GCT TTG TGT GCC C
	MB1 RP		CTG GCC TCC TAC CAG GCT G
	MB2 FP		
	MB2 RP		

Tabelle 9: Primer für das MYC-dHPLC Mutationsscreening sowie für die Direktsequenzierung

Die Messung der Proben erfolgte wie in Kap. 2.9 beschrieben auf einem Transgenomic WAVE 3500 dHPLC System. Die Messwerte wurden mit der Transgenomic Navigator Software analysiert und als Elektropherogramm der Signalstärke gegen die Zeitachse ausgegeben.

## 2.6.5 BCL6-PCR für das Mutationsscreening (dHPLC)

Für das dHPLC-Mutationsscreening der beiden BCL6-Fragmente wurde der Standard-PCR-Reaktionsansatz (Tab. 5) verwendet. BCL6-Intron 1 wurde mit zwei sich überlappenden DNA-Fragmenten amplifiziert (Abb. 13 und Tab. 10).



Abbildung 13: Schematische Darstellung des *BCL6*-Gens

Rot die überlappende Position der untersuchten PCR-Fragmente, Grün der schematische Aufbau der Exon-Intron Struktur

PCR		dHPLC Temp. (°C)	Primer-Sequenzen (5' » 3')
BCL6 Set 1	BCL6_S1 FP BCL6_S1 RP	53 / 58 / 63	CCG CTG CTC ATG ATC ATT ATT TT TCA CAA GCC GTA CGC AAG C
BCL6 Set 2	BCL6_S2 FP BCL6_S2 RP	53 / 58 / 63	CTA GTC TGG GGG CTG TCT GG TAG ACA CGA TAC TTC ATC TCA T

Tabelle 10: Primer für das *BCL6*-dHPLC Mutationsscreening und die Direktsequenzierung

Die Messung der Proben erfolgte wie in Kap. 2.9 beschrieben auf einem Transgenomic WAVE 3500 dHPLC System. Die Messwerte wurden mit der Transgenomic Navigator Software analysiert und als Elektropherogramm der Signalstärke gegen die Zeitachse ausgegeben.

### 2.6.6 REL-PCR für das Mutationsscreening (dHPLC)

Das dHPLC-Mutationsscreening der REL-Fragmente wurde mit dem Standard-PCR-Reaktionsansatz (Tab. 5) durchgeführt. Es wurden drei Primerpaare gewählt, um das gesamte REL-Exon 10 amplifizieren zu können (Abb. 14).

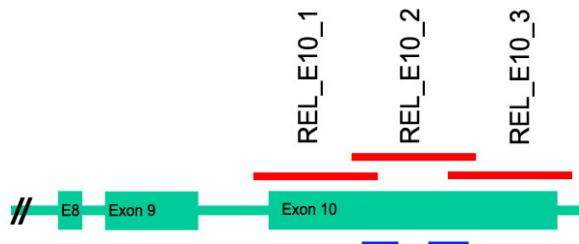


Abbildung 14: Schematische Darstellung des *REL*-Gens.

Die Position der untersuchten DNA-Fragmente ist in Rot, der Aufbau der Exon-Intron-Struktur in Grün und die Lage des S525P-Primerpaars ist in Blau dargestellt.

Das Primerpaar REL-S525 wurde speziell zur Untersuchung von REL Serin 525 in Exon 10 mittels Direkt-Sequenzierung entwickelt.

PCR		dHPLC Temp (°C)	Primer-Sequenzen (5' » 3')
REL Exon 10	REL_E10-1_FP	55 / 60	GTA AAA TAA ATT TTT CCT CCC ACA
	REL_E10-1_RP		TAA ATC TGC TGA TGG CAT GG
	REL_E10-2_FP	58 / 59	GGT ATC CCA CCA TTC CTG A
	REL_E10-2_RP		CTG CAC AAC TGA AGT CAG A
REL S525P	REL_E10-3_FP	53 / 58	CAG TGA CAG CAT GGG AGA GA
	REL_E10-3_RP		TAG GTG GTA TCA AGA TTT AAA AGG ATT T
REL S525P	REL_S525_FP	nur Seq.	ATG TCA GCA GGC GCC AAT TCC A
	REL_S525_RP		GCA CAA CTG AAG TCA GAT CCC TC

Tabelle 11: Primer für das REL-dHPLC Mutationsscreening und die Direktsequenzierung

Die Messung der Proben erfolgte wie in Kap. 2.9 beschrieben auf einem Transgenomic WAVE 3500 dHPLC System. Die Messwerte wurden mit der Transgenomic Navigator Software analysiert und als Elektropherogramm der Signalstärke gegen die Zeitachse ausgegeben.

## 2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der durch eine PCR amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Zur longitudinalen Auftrennung der Amplifikationsprodukte wurde eine horizontale Gelelektrophorese-Kammer mit 2 %igen (w/v) Agarose-Gelen genutzt. Für ein Gel wurde 1 g Agarose in 50 ml 1x TBE-Puffer (0,1 M Tris-HCl, 83 mM Borsäure, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA) durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Agarose < 60 °C, wurde ein Tropfen Ethidiumbromidlösung (EtBr) (10 mg / ml) hinzugegeben, gemischt und in die Gießvorrichtung gefüllt. Zum Laden der PCR-Produkte in das Gel wurden 6 µl PCR-Produkt mit 2 µl Auftragspuffer (50 % Glycerin, 45,5 % dH<sub>2</sub>O, 0,5 % (w / v) Bromphenolblau) versetzt und parallel zu einem separaten Längenstandard (Low Mass DNA Ladder, Invitrogen) in das Agarosegel pipettiert. Die Elektrophorese lief in 1x TBE-Puffer bei 200 V (~300 mA) für ca. 15 min. Nach Auftrennung der PCR-Produkte wurden die Gele mit einer digitalen Bild-Dokumentation (BioRad) auf einem UV-Tisch fotografiert und ausgewertet. Hierbei nutzt man die Eigenschaft des Ethidiumbromids aus, dass es in die Doppelhelikalstruktur der DNA interkaliert und nur dann unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 266 nm fluoresziert.

## 2.8 DNA-Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung von DNA-Proben mit unzureichender Amplifizierbarkeit sowie der Aufbereitung von PCR-Fragmenten wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde die Probe mit dH<sub>2</sub>O ad 300 µl verdünnt und mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung versetzt. Dem Mischen der Lösungen folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei > 10000 g. Es bildeten sich zwei Phasen, die durch eine dünne Kahmhaut aus denaturierten Proteinen voneinander getrennt waren. Die untere Phase bildete das schwerere Phenol, die obere Phase das leichtere Chloroform, in welchem die gelöste DNA vorlag. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform versetzt, um das restliche Phenol vollständig zu entfernen. Der Mischung des Chloroform / DNA-Gemisches folgte erneut eine Zentrifugation bei > 10000 g. Die aufgereinigte Chloroform / DNA-Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Ethanol-basierten DNA-Fällung unterzogen.

### 2.8.1 Ethanolfällung von DNA

Die Ethanolfällung einer DNA-Lösung bietet die Möglichkeit, mit einfachen Mitteln eine optimal aufgereinigte DNA zu erhalten. Hierzu wurden die Proben mit dH<sub>2</sub>O ad 300 µl verdünnt, mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 3 Volumen absolutem Ethanol (vorgekühlt auf -20 °C) versetzt. Zur Fällung der DNA aus dem Ethanol wurde das Gemisch 12 h bei -20 °C gelagert und anschließend durch Zentrifugation bei > 10000 g und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 300 µl 70 % Ethanol resuspendiert und gewaschen, um abschließend erneut die DNA zu pelletieren. Das Ethanol wurde abgenommen und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Je nach gewünschter DNA-Konzentration wurde das Pellet in einer geeigneten Menge dH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (10-50 µl) resuspendiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

### 2.8.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde ein membranbasiertes Vakuum-System der Firma Millipore verwendet. Die gesamte PCR-Reaktion wurde in ein Well der Vakuum-Filterplatte gegeben, ad 300 µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und bei einem Unterdruck von < 250 mbar durch die mikroporöse Membran mit einer Porenweite von 0,2 µm gezogen. Alle Salze, Proteine oder freien Nukleotide passierten die Membran ungehindert. Die PCR-Produkte > 30 bp blieben auf der Membran zurück. Je nach gewünschter DNA-Konzentration wurde die DNA in einer geeigneten Menge dH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (20-50 µl) unter schütteln (90 U / min) resuspendiert und bei -20 °C eingelagert.

## 2.9 Denaturation High Performance Liquid Chromatographie

Mit Hilfe der erstmals von Oefner & Underhill (1995) beschriebenen dHPLC (denaturation-high-performance-liquid-chromatography) werden PCR-Fragmente sequenzspezifisch aufgetrennt, um hiermit Aussagen über die Homo- bzw. Heterogenität einer PCR-Probe treffen zu können.

Durch Denaturierung der PCR-Produkte bei  $> 94\text{ }^{\circ}\text{C}$  und kontrolliertem Abkühlen ( $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ) der nun in Einzelsträngen vorliegenden DNA auf Raumtemperatur lagern sich die Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen zusammen. Sequenzgleiche Einzelstränge lagern sich zu Homoduplices zusammen. Enthält aber einer der beiden Einzelstränge eine Mutation, bilden sich Heteroduplices (Abb. 15).

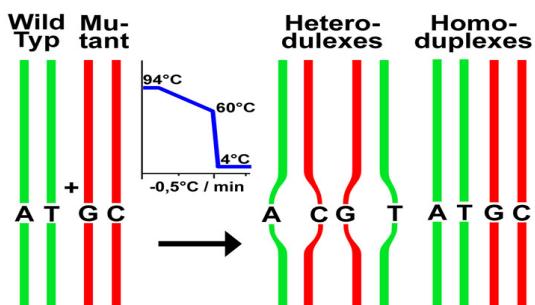


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Hetero- und Homoduplexbildung

Das Gemisch der unterschiedlichen Stränge der Wildtyp-DNA und Mutanten-DNA (links) wird denaturiert und bei  $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$  bis auf  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  renaturiert. Danach erfolgt die sofortige Lagerung auf Eis. Dabei kommt es zur Bildung von Heteroduplices (Mitte) und sequenzgleichen Homoduplices (rechts).

Die renaturierten Doppelstrang-DNA-Fragmente (dsDNA) können nun aufgrund der unterschiedlichen Bindungseigenschaften der dsDNA an die Matrix mit Hilfe einer hochauflösenden Polymermatrix in Homo- und Heteroduplices getrennt werden. Diese schnelle, kostengünstige und sensible Screening-Methode zur Mutationsanalyse basiert auf dem Prinzip der Flüssigchromatographie. Herzstück der HPLC-Anlage (Transgenomic) ist eine in den Chromatographen integrierte Matrix (feste Phase), die kontinuierlich von TEAA-Puffer (0,1 M Triethylammonium-Acetat; flüssige Phase, Puffer A) durchflossen wird. Die positiv geladenen Ammoniumionen des TEAA binden an die negativ geladenen Phosphatreste der injizierten Proben-DNA. Die Alkylkette hingegen reagiert mit der hydrophoben Oberfläche der Säulen-Matrix. TEAA dient somit als Brückenmolekül zwischen dem hydrophoben Säulenmaterial und den negativ geladenen DNA-Fragmenten. Die Säulen-Matrix besteht aus  $2,0\text{ }\mu\text{m}$  ( $+/ - 0,15$ ) großen, mit Divinylbenzol vernetzten Polystyrol-Polymeren, die hydrophob und elektrisch neutral sind. Nachdem die PCR-Produkte an die Matrix gebunden haben, wird dem Puffer 1 ein linear ansteigender Anteil Acetonitril-Puffer (Puffer B) beigemischt. Mit steigender Konzentration des hydrophilen Acetonitrils im Elutionspuffer werden die Wechselwirkungen zwischen DNA, TEAA und der Säulenmatrix zunehmend reduziert und die DNA wird eluiert.

Die dHPLC-basierte Detektion von Sequenzvarianten in PCR-Produkten ist stark temperaturabhängig. Die Retentionszeit doppelsträngiger DNA unter nicht denaturierenden Bedingungen < 50 °C ist durch den entsprechenden Gehalt an Phosphatgruppen und damit TEAA-Bindungsstellen ausschließlich von der Länge der PCR-Fragmente abhängig (Oefner & Underhill, 1995). Um Homo- und Heteroduplices gleicher Länge unterscheiden zu können, sind partiell denaturierende Bedingungen nötig. Die nicht homologen Basenpaarungen verändern den Schmelzpunkt der Hetero- gegenüber den Homoduplices, führen also zu einer niedrigeren Denaturierungs temperatur als bei vergleichbaren Homoduplices. Optimale Trennergebnisse der dHPLC sind bei einer Analysetemperatur zu erwarten, bei der noch 70 % bis 85 % des Fragments als dsDNA vorliegen. Abhängig vom

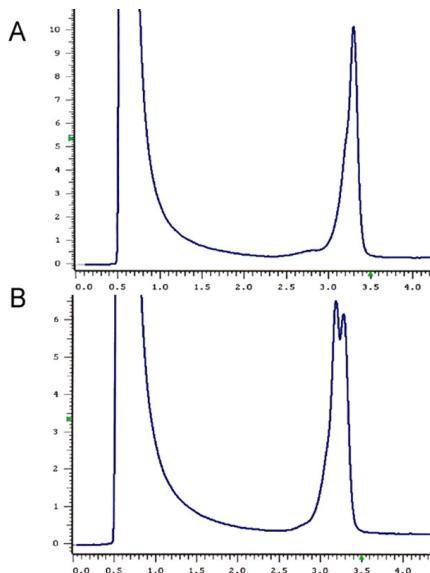


Abbildung 16: dHPLC-Messungen

y-Achse: Signalstärke  
x-Achse: Zeit (min)

A: Der erste hohe Peak (0,6 min) wird durch Reste der PCR-Reagenzien (Primer, freie dNTPs, Polymerase) erzeugt. Der zweite Peak erscheint bei einer Retentionszeit von ca. 3,3 min. Die auf der Säulen-Matrix gebundene DNA wurde gleichzeitig eluiert.

B: wie A, jedoch 2 Peaks durch die zeitversetzte Elution von zwei PCR-Produkten unterschiedliche Sequenz.

Matrix einen Peak auf der Zeitachse (Abb. 16 A; gleiche Retentionszeit). Heterogene PCR-Produkte mit Mutationen zeigen hingegen meist zwei zeitlich getrennte Peaks (Abb. 16 B). Die labileren Heteroduplices eluieren früher von der Matrix als Homoduplices und liefern im UV-Detektor jeweils ein eigenes Signal. Theoretisch sollten bei heterozygoten Mutati-

GC-Gehalt, der Fragmentlänge und der Lage der Mutationen liegen die Analysetemperaturen meist zwischen 55 °C und 70 °C. Die für jedes untersuchte PCR-Produkt ideale Temperatur kann entweder experimentell oder theoretisch mit Hilfe von Analyse-Programmen (z.B. Wavemaker, Transgenomic) berechnet werden. Aufgrund der partiellen Denaturierung in Schmelzdomänen bei unterschiedlichen Temperaturen eluieren die thermolabileren Heteroduplices schneller als die Homoduplices von der Säulen-Matrix. Die eluierten DNA-Fragmente werden im Laufpuffer durch einen UV-Detektor geschwemmt, der eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 254 nm erlaubt. Mit Hilfe der Auswertesoftware wird aus der Laufzeit der Einzelmessung und der UV-Detektion ein Absorptions-Zeit-Chromatogramm errechnet und das Elutionsmuster sowie die Retentionszeit der einzelnen Peaks bestimmt.

PCR-Produkte ohne Mutationen zeigen durch die zeitgleiche Elution der Homoduplices von der

onträgern im Chromatogramm vier distinkte Peaks zu erkennen sein, je zwei Hetero- und Homoduplex-Peaks. Die Abstände der Retentionszeiten sind aber zumeist so gering, dass die minimalen abweichenden Elutionszeitpunkte der komplementären Stränge vom UV-Detektor nicht erfasst werden können (Xiao & Oefner, 2001). Die Retentionszeiten bei Heteroduplices sind abhängig von der Art der Mutation, der Position auf dem DNA-Fragment sowie den benachbarten Basen um die Mutation (Ke & Wartell, 1993).

Proben, die in der dHPLC-Messung durch Veränderungen der Retentionszeiten auffielen, wurden zur Abklärung der Laufzeitveränderung und Charakterisierung einer möglichen Mutation direkt sequenziert. Zudem ist es möglich, die zeitlich getrennten Eluate am Auslass der dHPLC-Messeinrichtung manuell zu sammeln und nach einer Ethanolfällung der DNA-Fragmente direkt zu sequenzieren. So lassen sich auch sehr geringe Anteile an Heteroduplices in der Probe zuverlässig herausfiltern und sequenzieren.

## 2.10 Direkte DNA-Sequenzierung

Die direkte Sequenzierung stellt die zur Zeit beste Methode dar, genaue Informationen über die Basenabfolge einer Nukleinsäure zu erhalten. Die Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchreaktion nach Sanger *et al.* (1977), die ein modifiziertes Verfahren der PCR darstellt. Hierzu wird eine voramplifizierte, aufgereinigte DNA verwendet, welche mit nur einem Primer (5' oder 3') in die Sequenzierreaktion (Abb. 17) gegeben wird. Zusätzlich werden zu den üblichen vier dNTPs neben Puffer und Polymerase auch vier fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) in geringer Konzentration hinzugegeben. Die ddNTPs unterscheiden sich von den dNTPs durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe. Somit können diese ddNTPs mit dem funktionellen 5'-Phosphatrest in einen neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut werden, aber durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe ist keine Verbindung zum nächsten Nukleotid möglich und es kommt zu einem Kettenabbruch. ddNTPs werden in den neu synthetisierten DNA-Strang statistisch gleich häufig eingebaut und es entstehen daher unzählige Fragmente, die alle eine Base Längenunterschied aufweisen. Nach einer Aufreinigung der Sequenzierreaktion können die nun fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente mit Hilfe eines automatischen Sequenzierers durch ein hochauflösendes Polymer in einer Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt und durch Laserdetektion qualitativ und quantitativ analysiert werden. Die Analyse erfolgte auf einem ABI 3100-Avant mit einer Kapillarlänge von 36 cm nach Anweisung des Herstellers (Tab. 12).

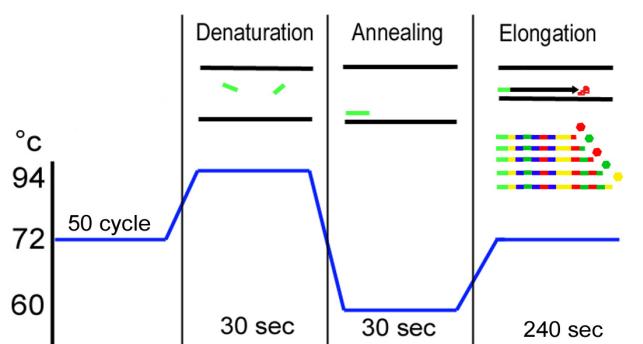
Parameter	Wert
Kapillarlänge	4 x 36 cm
Sequenzier-Polymer	PoP 6
Polymer-Füllmenge je Lauf	54 steps
Proben-Injektionsdauer	8 s
Proben-Injektionsspannung	1 kV
Laufspannung	14 kV
Lauftemperatur	54 °C
Laufdauer	2000 s

*Tabelle 12: Laufbedingungen für die Direktsequenzierung auf dem ABI 3100 Avant 4-Kapillar-Sequenzer*

Für die Direkt-Sequenzierung wurde das ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet (Tab. 13). Die Sequenzierungsreaktion wurde, sofern nicht anders beschrieben, entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzanalyse erfolgte auf einem 4-Kapillar 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Reagenzien	Menge je Ansatz
ABI BigDye-Mix	1 µl
5x BigDye-Puffer	7 µl
je 1 Primer (5 pmol)	2 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	1-10 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 20µl

*Tabelle 13: Zusammensetzung des verwendeten Sequenzierreaktionsansatzes.*



*Abbildung 17: Schematische Darstellung eines Sequenzierreaktions-Zyklus.*

Der einzige in der Reaktion befindliche Primer (Grün) liegt in der Denaturierungsphase wie die DNA einzelsträngig vor. In der Annealing-Phase bindet der Primer an die komplementären Sequenzabschnitte. In der Elongationsphase synthetisiert die Polymerase (Rot) vom Primer ausgehend die neuen DNA-Stränge. Der Einbau eines fluoreszenzmarkierten ddNTPs in den Synthesestrang führt zu einem Kettenabbruch.

### 2.10.1 Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Für eine Sequenzierung auf dem ABI 3100 Avant ist es notwendig, die Cycle-Sequencing-Reaktionen aufzureinigen und von freien BigDye-Terminatoren, dNTPs, Primern, Proteinen und Salzen zu befreien. Dazu wurde die entsprechende Anzahl an Wells einer MultiScreen-HV Platte (Millipore) mit Hilfe einer Dosierhilfe mit Sephadex 50 beladen. Das dosierte Sephadex G-50 wurde in jedem Well durch die Zugabe von 320 µl dH<sub>2</sub>O zum Quellen gebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der gequollenen Sepharose wurde durch einen 5 min Zentrifugationsschritt in der Plattenzentrifuge bei 1000 g die überschüssige Flüssigkeit entzogen. Es bildete sich eine feste, granuläre Säule, die mit der Cycle-Sequencing-Reaktion und zusätzlichen 15 µl dH<sub>2</sub>O mittig beladen wurde. Alle Hemmstoffe und Reaktionsreste wurden von der Sepharose adsorbiert. PCR-Fragmente > 40 bp wurden nicht gebunden und konnten in einem weiteren Zentrifugationsschritt (1000 g / 7 min) durch die Sepharose in eine darunterstehende 96-Well Mikrotiterplatte geleitet werden. Die aufgereinigten Sequenzier-Produkte wurden im Anschluss bei -20 °C eingelagert oder nach Zugabe des 0,5-fachen Volumens HiDi-Formamid direkt im ABI 3100 Avant Sequenzierer prozessiert.

### 2.10.2 IgH-Direktsequenzierung (FR1)

Für die Direktsequenzierung der rearrangierten VH-DH-JH Fragmente wurden dieselben Primer-Sequenzen verwendet, die schon im GeneScan Anwendung fanden (Tab. 8). Im ersten Schritt dieser Direktsequenzierung wurde alleinig der reverse JH-Konsensus-Primer eingesetzt (Tab. 14). Mit Hilfe der generierten JH-Sequenz war es möglich, den spezifischen VH-Primer der klonalen B-Zell-Population zu bestimmen. In einer zweiten Sequenzierung wurde die Probe dann mit dem klonspezifischen VH-Primer sequenziert. Je DNA-Strang wurden zwei Sequenzen generiert und in der Alignment-Software SeqEd (ABI) abgeglichen. Die generierte Konsensussequenz wurde abschließend mit Hilfe der IMGT/V-Quest-Software ([www.imgt.cines.fr](http://www.imgt.cines.fr)) analysiert und die verwendeten VH-DH-JH-Familien sowie die IgH-Mutationsfrequenz gegenüber der hinterlegten Keimbahnsequenz der IMGT-Datenbank bestimmt. Der Mutationsstatus wurde als prozentuale Abweichung von der nächsten, vergleichbaren Keimbahnsequenz angegeben. Eine Sequenz wurde als unmutiert bewertet, wenn die Übereinstimmung mit der Keimbahnsequenz > 98 % betrug.

Reagenzien			Primer-Sequenzen (5' » 3')
ein VH-spezifischer Primer	VH 1	0,1 µM	CCT CAG TGA AGG TCT CCT GCA AGG
	VH 2	0,1 µM	TCC TGC GCT GGT GAA GCC ACA CA
	VH 3	0,1 µM	GAA GAT CTC TCC TGT GCA GCC TCT GG
	VH 4	0,1 µM	GTG GAT CCT GTC CCT CAC CTG CGC TG
	VH 5	0,1 µM	GAA AAA GCC CGG GGA GTC TCT GA
	VH 6	0,1 µM	GAA GAT CTC TCA CTC ACC TGT GCC ATC
JH-Primer	JH kons	0,1 µM	CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C
Cycle-Sequencing Mix			ad 20 µl

Tabelle 14: Reaktionsansatz der FR1-Direktsequenzierung: VH-spezifische und JH-Konsensus-Primersequenzen.

### 2.10.3 MYC-Direktsequenzierung

Die Direktsequenzierung der verschiedenen MYC-Fragmente wurde mit dem BigDye Cycle-Sequencing Mix (Tab. 13) durchgeführt (Primer Tab. 9). Je DNA-Strang wurden zwei Sense- und Antisense-Sequenzen generiert und in der Alignment Software BioEdit (Ibis Biosciences) mit der Datenbank-Referenzsequenz (NT\_008046) abgeglichen. Jede in beiden Sequenzierrichtungen nachgewiesene Abweichung von der Referenzsequenz wurde als Mutation gewertet.

### 2.10.4 BCL6-Direktsequenzierung

Die Direktsequenzierung der verschiedenen BCL6-Fragmente wurde mit dem BigDye Cycle-Sequencing Mix (Tab. 13) durchgeführt (Primer Tab. 10). Je DNA-Strang wurden zwei Sense- und Antisense- Sequenzen generiert und in der Alignment Software BioEdit (Ibis Biosciences) mit der Datenbank-Referenzsequenz (NT\_005612) abgeglichen. Jede in beiden Sequenzierrichtungen nachgewiesene Abweichung von der Referenzsequenz wurde als Mutation gewertet.

### 2.10.5 REL-Direktsequenzierung

Die Direktsequenzierung der verschiedenen REL-Fragmente wurde mit dem BigDye Cycle-Sequencing Mix (Tab. 13) durchgeführt (Primer Tab. 11). Je DNA-Strang wurden zwei Sense- und Antisense-Sequenzen generiert und in der Alignment Software BioEdit (Ibis Biosciences) mit der Datenbank-Referenzsequenz (NT\_022184) abgeglichen. Jede in beiden Sequenzierrichtungen nachgewiesene Abweichung von der Referenzsequenz wurde als Mutation gewertet.

## 2.11 Quantitative Allelische Diskriminierung von REL-S525P

Für die quantitative allelische Diskriminierung der heterozygoten REL-S525P Proben in Blut- und Tumorproben wurde das SNaPshot Multiplex System (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers verwendet. Mit Hilfe des SNaPshot-Systems ist es möglich, mittels allelenspezifischer, (ddNTP)-fluoreszenzmarkierter Primer den relativen Anteil zweier Sequenzfragmente in einer Probe zu bestimmen. Dazu wurde durch Mischung von mutierten in unmutierte PCR-Produkte eine Standard-Eichgerade generiert (0 %, 5 %, 20 % bis 100 %). Die Analyse erfolgte mit dem in Tab. 11 genannten REL-S525P Primerpaar und wurde in Triplikaten auf dem ABI 3100 Avant-Sequenzer analysiert. Die aufgezeichneten TAMRA (ddCTP) und ROX (ddTTP) Signale wurden mittels ABI GeneScan Software ausgewertet und das Ergebnis anhand der Eichgeraden bestimmt.

## 2.12 Klonierung von DNA-Fragmenten

Eine Klonierung dient der Vereinzelung von DNA-Fragmenten verschiedener Basenabfolge. In einer PCR werden klonale DNA-Fragmente gleicher Länge generiert, deren Sequenz sich aber unterscheiden kann (intraklonale Heterogenität). Eine direkte Sequenzierung einer solchen Probe wäre nicht auswertbar, da sich die verschiedenen Signale überlagern würden. Um PCR-generierte DNA-Fragmente verschiedener Basensequenz zu vereinzeln, werden diese daher in ein Plasmid eingebracht (Ligation), welches über eine Bindungsstelle für DNA-Fragmente (multiple cloning site) sowie einen Selektionsmarker (z.B. lacZ-Gen, Gene für Antibiotikumresistenz) verfügt. In einem weiteren Schritt wird das Plasmid in eine kompetente Bakterienzelle, meist *E. coli*, eingeschleust (Transformation). Diese transformierten *E. coli*-Zellen werden auf ein geeignetes selektives Medium (Tab. 15) ausplattiert und bei geeigneten Bedingungen (optimal: 24 h bei 37 °C) inkubiert, bis sie zu Kolonien herangewachsen sind. Der Vektor kann daraufhin mit Hilfe einer Plasmidpräparation isoliert werden. Da bei der Ligation jeder Vektor genau ein DNA-Fragment und bei der Transformation jede Bakterienzelle genau ein Plasmid aufnehmen kann, ist somit die Vereinzelung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Sequenz gewährleistet.

<b>SOC-Medium</b>	Menge	<b>LB-Miller Medium</b>	Menge	<b>LB-Amp Medium</b>	Menge
Trypton	20 g	Trypton	10 g	Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	500 mg	NaCl	10 g	NaCl	10 g
KCl	186 mg			Agar	15 g
MgSO <sub>4</sub>	2,46 g			Ampicillin	500 mg
MgCl <sub>2</sub>	2,03 g			X-Gal	40 mg
Glukose	3 g			IPTG	40 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l pH 7,0	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l pH 6,4-7,5	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l pH 6,4-7,5

*Tabelle 15: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien. Alle Medien wurden vor Verwendung 20 min bei 121 °C sterilisiert.*

### 2.12.1 Blau-Weiß-Klonierung

Für die Blau-Weiß-Klonierung wurden Bakterien mit einem inaktiven lacZ-Gen verwendet. lacZ codiert für das Enzym β-Galaktosidase, mit dessen Hilfe in der Zelle Laktose in Glukose und Galaktose gespalten wird. Nebenbei hydrolysiert β-Galaktosidase auch X-Gal (5-Brom-4Chlor-3Indolyl-β-D-galaktosid) und durch Luftoxidation entsteht ein blauer, schwer löslicher Indigofarbstoff. Die inaktive Form der β-Galaktosidase kann aber durch Komplementation ersetzt werden. Das lacZ-Gen ist auf dem pGemT-Vektor kodiert und enthält zugleich den multiplen Klonierungsbereich. Wird nun ein DNA-Fragment / Insert in diesen Klonierungsbereich ligiert, ist die kodierende Sequenz auch für die Vektor-β-Galaktosidase unterbrochen und die Proteinsynthese wird unterbunden. Somit kann keinerlei aktive β-Galaktosidase in den Bakterien synthetisiert werden; X-Gal wird nicht hydrolysiert und die Kolonie erscheint weiß, was ein klares Zeichen für einen erfolgreich ligierten Vektor darstellt. Blaue Kolonien hingegen deuten darauf hin, dass entweder das eingeschlossene Plasmid kein inseriertes DNA-Fragment enthält oder die Zelle das Plasmid nicht aufgenommen hat. Zur Ligation von Vektor- und Insert-DNA wurden beide Teile im gleichen molaren Verhältnis in eine Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt (Tab. 16). Bei 4 °C über Nacht verbindet eine Einheit (Unit) T4 DNA-Ligase (pGEM-T System, Promega) die dsDNA-Fragmente unter ATP-Hydrolyse mittels Phosphodiesterbindungen. Dabei werden die dsDNA-Fragmente an ihren komplementären Einzelstrang-Sequenzüberhängen (sticky ends) mit dem Vektor verbunden.

Ligationsansatz	Menge
Vektor pGem-T	1 µl
2x Ligations-Puffer	10 µl
PCR-Produkt	bis 8 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung des Ligationsansatzes für die Blau-Weiß-Klonierung

Für die Transformation wurden 50 µl kompetenter DH5α-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2-5 µl Ligationsansatz versetzt. Nach 15 min Inkubation auf Eis folgte ein exakt 30 sek dauernder Hitzeschock bei 42 °C, gefolgt von einer weiteren 10 min Inkubation auf Eis. Nach der darauf folgenden Zugabe von 200 µl temperiertem, antibiotika-freiem SOC-Medium wurden die Zellen bei 37 °C für 1 h im Schüttelschrank inkubiert. Anschließend wurden 50-100 µl der Zellsuspension auf temperierten (37 °C) Agarplatten (0,2 mM IPTG, 40 µg / ml X-Gal und 50 µg / ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37 °C für 16 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden pro Transformationsansatz 12 weiße Kolonien in Reagenzröhren mit je 5 ml LB-Amp-Medium überimpft und erneut für 24 h bei 37 °C im Kulturschüttler inkubiert.

Für die Plasmid-Extraktion wurden 3 ml Medium einer Plasmid-Präparation entsprechend den Anweisungen des Herstellers unterzogen (Kap. 2.12.2). Die verbleibenden 2 ml Medium wurden mit dem 0,5 fachen Volumen autoklavierter Glycerinlösung (80-99 %) vermischt und bei -80 °C als Dauerkultur eingelagert.

### 2.12.2 Plasmidpräparation aus *E. coli* Bakterien

Zur Präparation von Plasmid-DNA (Wizard Plus Miniprep DNA Purification System, Promega) aus den transformierten *E.coli*-Kolonien wurden 3 ml der LB-Medium-Kulturen für 1 min bei > 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 200 µl Resuspensionspuffer hinzugegeben und das Zellpellet durch Vortexen in Lösung gebracht. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lysispuffer, gefolgt von einer 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Zellproteine wurden im dritten Schritt durch Zusatz von 200 µl Neutralisationslösung ausgefällt. Durch 15 min Zentrifugation (4 °C) bei > 13000 g wurden die Zellreste pelletiert, der überführte Überstand mit einem Volumen absolutem Isopropanol versetzt und erneut 20 min. bei > 13000 g bei 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde zweimalig mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und jeweils 5 min. bei > 13000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei 37 °C getrocknet und abschließend in 100 µl Aqua gelöst.

## 2.13 Funktionelle Analyse der REL-S525P-Mutation

Die Detektion, molekulare Charakterisierung sowie Subklonierung der REL-S525P-Mutation erfolgte im Rahmen dieser Arbeit; die Konzeption zur weiteren funktionellen Analyse und die nachfolgenden Auswertungen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Daniel Starczynowski (Labor von Prof. Dr. Thomas D. Gilmore, Boston University); der experimentelle Teil der Expressionsanalysen an verschiedenen Zellsystemen wurde freundlicherweise von Daniel Starczynowski (Boston University) durchgeführt.

Im Rahmen dieser Expressionsanalyse wurden zahlreiche Plasmide und Reportergene verwendet. Eine detaillierte Auflistung ist im Anhang zu finden.

## 2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse wurde mit dem Programm GraphPadPrism 3.0 durchgeführt. Für die deskriptive Darstellung der Messwerte in Tabellen und Grafiken wurde die Funktion „Column Statistics“ verwendet, um folgende statistische Kennwerte zu errechnen: n (Anzahl der Proben / Messwerte), Mittelwert, Standardabweichung und Min / Max (kleinster und größter Messwert).

Unter der Annahme, dass die Messwerte nicht normalverteilt sind, wurde zusätzlich der Median (mittelster Wert nach der Rangfolge) sowie das erste und dritte Quartil errechnet ( $x_{25}$  und  $x_{75}$  trennen jeweils die äußeren 25 % der geordneten Werte).

Für die grafische Darstellung der Messwerte wurden Box-Plots verwendet. Die zentrale Box wird vom unteren und oberen Quartil begrenzt und die innere Linie stellt den Median dar. Somit liegt die Hälfte aller Messwerte einer Gruppe innerhalb der geschlossenen Box. Die jeweils äußeren 25 % der Messwerte werden mit Abstandsbalken und die Extremwerte mit einem Kreis (Wert weicht mehr als 1,5 Boxlängen ab) in den Box-Plots dargestellt.

Wenn keine Normalverteilung der Messwerte zu erwarten war, wurden die Gruppen mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test verglichen. Eine beobachtete Assoziation zwischen zwei Faktoren wurde als nicht zufällig angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert)  $< 0,05$  war. Eine Assoziation wurde als hochsignifikant bezeichnet, wenn der p-Wert  $< 0,01$  war. Bei p-Werten  $\geq 0,05$  wurde keine Assoziation der Faktoren angenommen und als somit nicht signifikant bezeichnet.

Die Aussagen zum Gesamtüberleben, beginnend mit dem Zeitpunkt der Diagnose, wurden mittels einer Kaplan-Meier-Analyse erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einschlusskriterien und Klassifizierung

##### 3.1.1 Klassifizierung des Gesamtkollektivs (WHO-Kriterien)

Alle 228 untersuchten Proben wurden von den sechs Direktoren der deutschen Referenzzentren für Lymphknotenpathologie in gemeinsamen Sitzungen diagnostiziert und anhand der beschriebenen Methoden sowie den in Tab. 1 gelisteten adaptierten Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO 2001) klassifiziert. Die einstimmigen Konsensusdiagnosen wurden ohne Kenntnis der zytogenetischen Untersuchungen anhand der histologischen Schnitte sowie deren Färbungen gestellt. Die Konsensusdiagnosen der 228 Proben aus den gemeinsamen Sitzungen der Referenzpathologen (Prof. Feller, Lübeck; Prof. Hansmann, Frankfurt; Prof. Möller, Ulm; Prof. Müller-Hermelink, Würzburg; Prof. Stein, Berlin und Prof. Parwaresch, Kiel) sind in Tab. 17 aufgeführt.

##### 3.1.2 Molekularer Burkitt-Lymphom-Prädiktor und Wright-Klassifikator

Die im Rahmen des MMML-Verbundes mittels Genexpressions-, FISH- und CGH-Analysen generierten Daten zur molekularen Charakterisierung des Probenkollektivs sowie die immun-histochemischen Analysen wurden zur Verfügung gestellt und waren nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Die Anwendung des molekularen Burkitt-Lymphom-Prädiktors auf die in dieser Arbeit untersuchten 228 Fälle klassifizierte 54 Proben als molekulare Burkitt-Lymphome (*mBL*) mit einem Burkitt-Score von  $> 0,95$ . Mit einem Burkitt-Score von  $< 0,05$  wurden 124 Fälle als *non-mBL* und 50 Fälle mit einem Burkitt-Score zwischen 0,05 und 0,95 als *Intermediate* klassifiziert. Die Anwendung des Wright-Klassifikators zur Klassifizierung des Probenkollektivs zeigte bei 56 Proben die Genexpressions-Signatur aktiver B-Zellen (*ABC*), wohingegen 130 Fälle eine Keimzentrumssignatur (*GCB*) exprimierten. 42 Fälle ließen sich keinen der beiden genannten Subtypen zuordnen und wurde als unklassifiziert (*unclassified*) eingestuft.

Die Charakterisierung des Probenkollektivs ist in Tab. 17 zusammengefasst.

Gesamtkollektiv									
Molekulare Diagnose		Gesamt		mBL		non-mBL		Intermediate	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Gesamt-Probenanzahl		228	100	54	100	124	100	50	100
Alter	≤ 14 Jahre	51	22	33	61	7	6	11	22
	> 14 Jahre	177	78	21	39	117	94	39	78
Geschlecht	♀	90	39	16	30	51	41	23	46
	♂	136	60	38	70	71	57	27	54
	NA	2	1	0	0	2	2	0	0
Konsensusdiagnose									
Burkitt-Lymphom	sporadisch	24	11	22	41	0	0	2	4
	atypisch	22	10	15	28	3	2	4	8
DLBC-Lymphom	regulär	40	17	2	4	27	22	11	22
	anaplastisch	4	2	0	0	4	3	0	0
	centroblastisch	97	43	8	15	66	53	23	46
	immunoblastisch	10	4	0	0	5	4	5	10
	plasmoblastisch	10	4	0	0	9	7	1	2
Follikuläres Lymphom Grad 3b		3	2	1	2	1	2	1	2
B-Zell-Lymphom (unklassifiziert)		18	8	6	11	9	7	3	6
Wright-Klassifikator	ABC	56	25	0	0	48	39	8	16
	GCB	130	57	49	91	44	35	37	74
	unclassified	42	18	5	9	32	26	5	10
BCL6-Bruch	positiv	32	14	0	0	26	21	6	12
	negativ	190	83	53	98	94	76	43	86
	NA	6	3	1	2	4	3	1	2
BCL2-Bruch t(14;18)	positiv	22	10	1	2	11	9	10	20
	negativ	204	89	53	98	111	90	40	80
	NA	2	1	2	4	0	0	0	0
MYC-Translokation	IG-MYC	71	31	48	89	6	5	17	34
	non-IG-MYC	14	6	1	2	3	2	10	20
	negativ	138	61	4	7	111	90	23	46
	NA	5	2	1	2	4	3	0	0
MYC-Klassifikation	MYC.simple	48	21	39	72	1	1	8	19
	MYC.complex	41	18	10	19	12	10	19	38
	MYC.negativ	138	61	4	7	111	90	23	46
	NA	1	1	1	2	0	0	0	0
Gesamt-überleben	lebend	100	44	37	69	45	36	18	36
	tot	80	35	10	19	49	40	21	42
	NA	48	21	7	13	30	24	11	22

Tabelle 17: Morphologische, immun-histochemische, genetische und molekulare Charakterisierung des untersuchten Gesamtkollektivs.  
n: Anzahl; NA: nicht angegeben; Prozentwerte gerundet

## 3.2 DNA-Qualitätskontrolle

### 3.2.1 Messung der DNA-Konzentration (NanoDrop)

Die photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm ergab bei 161 von 228 Proben einen optimalen DNA-Gehalt von 50 - 600 ng /  $\mu$ l bei einer Reinheit  $\geq 1,8$  (Relation der Absorption bei 260 / 280 nm). 23 Proben wiesen initial einen zu geringen DNA-Gehalt von < 50 ng /  $\mu$ l auf und wurden nach einer Ethanolfällung (Kap. 2.8.1) in einem reduzierten Volumen dH<sub>2</sub>O gelöst und so auf mindestens 50 ng /  $\mu$ l aufkonzentriert. 22 Proben mit einem initial zu hohen DNA-Gehalt von > 500 ng /  $\mu$ l wurden durch Zugabe von dH<sub>2</sub>O auf eine Arbeitskonzentration von 300 ng /  $\mu$ l eingestellt.

22 Proben wiesen eine zu geringe Reinheit von < 1,8 auf. An diesen qualitativ zu schlechten Proben wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Kap. 2.8) mit angeschlossener Ethanolfällung durchgeführt. Die zur Lösung der DNA zugegebene Menge an dH<sub>2</sub>O wurde jeweils so gewählt, dass eine optimale DNA-Konzentration erreicht wurde (300 ng /  $\mu$ l). Somit konnten alle 228 Proben für die weiteren Untersuchungen verwendet werden.

### 3.2.2 Kontrollgen-PCR

Basierend auf den Messergebnissen des NanoDrop-Photometers (Kap. 3.2.1) wurde von 45 Proben mit einer initial unzureichenden Reinheit oder DNA-Konzentration nach den Verdünnungs- oder Aufreinigungsschritten eine Kontrollgen-PCR durchgeführt. Die Kontrollgen-PCR (Kap. 2.6.1) amplifizierte bei 33 untersuchten Proben erfolgreich das 600 bp Fragment. Bei 12 Proben konnte aufgrund von z.B. zu starker DNA-Fragmentierung kein 600 bp langes Fragment amplifiziert werden. Mit der ausreichenden Amplifizierung des 400 bp-Fragments konnten diese 12 Proben in den weiteren Untersuchungen verwendet werden.

### 3.2.3 Albumin-Quantifizierung

Alle in den weiteren Untersuchungen verwendeten 228 Proben wurden mittels quantitativer Albumin-PCR hinsichtlich ihres amplifizierbaren DNA-Gehaltes für die PCR überprüft. Von den 228 DNA-Proben stimmten bei 203 Proben die Ergebnisse der Albumin-Quantifizierung mit den Messwerten der NanoDrop-basierten photometrischen DNA-Konzentrationsbestimmung überein (< 20 % Abweichung). Bei 25 Proben wichen die berechnete Anzahl an amplifizierbaren DNA-Kopien teilweise deutlich von den NanoDrop-Ergebnissen ab ( $\geq 20\%$ ). Für diese 25 Proben wurde für alle Untersuchungen die aus der Albumin-Quantifizierung errechnete DNA-Konzentration genutzt.

### 3.3 Immunglobulinschwerkettengen (IgH)

#### 3.3.1 IgH-Klonalitätsanalyse mittels GeneScan

Die IgH-Klonalitätsanalyse mittels GeneScan wurde an 228 Proben durchgeführt. 176 Proben (77,2 %) konnten in der GeneScan-Analyse mit einem klonalen Signal, 18 Proben (7,9 %) mit einem monoklonal-biallelischen Signal, 6 Proben (2,6 %) mit einem klonalen Signal vor polyklonalem Hintergrund und 24 Proben (10,5 %) mit einem rein polyklonalen Signal gemessen werden. 4 Proben (1,8 %) lieferten auch nach Veränderungen der Reaktionsbedingungen und Primer sowie weiteren DNA-Aufreinigungsschritten keine auswertbaren PCR-Signale. Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der IgH-GeneScan Analyse innerhalb der molekularen Gruppen.

IgH-Status \ mol. Diagnose	<b>mBL</b>	<b>non-mBL</b>	<b>Intermediate</b>	<b>Gesamt</b>
monoklonal	43	96	37	176
monoklonal-biallelisch	7	6	5	18
klonal vor polyklonal	0	3	3	6
polyklonal	3	17	4	24
kein PCR-Signal	1	2	1	4
<b>Gesamt</b>	<b>54</b>	<b>124</b>	<b>50</b>	<b>228</b>

Tabelle 18: IgH-GeneScan Analyse von 228 Proben innerhalb der molekularen Gruppen

#### 3.3.2 IgH-Mutationsanalyse

Die IgH-Mutationsanalysen der insgesamt 200 Proben mit einem klonalen Signal in der IgH-Klonalitätsanalyse konnten an 187 Proben erfolgreich durchgeführt werden. 13 Proben ließen sich mit den zur Verfügung stehenden Mitteln und Methoden nicht erfolgreich sequenzieren. Für die 187 sequenzierten Proben wurde mit Hilfe der IMGT-Datenbank „V-Quest“ (<http://imgt.cines.fr>) die Mutationsfrequenz (MF) berechnet sowie die verwendeten VH-, DH- und JH-Fragmente bestimmt. Die mediane IgH-Mutationsfrequenz im Gesamtkollektiv betrug 7,85 %. 22 Proben (11,8 %) wiesen eine Mutationsfrequenz von < 2 % im Vergleich zur Referenz-Keimbahnsequenz auf und wurden definitionsgemäß als nicht hypermutiert angesehen.

Die Analyse der IgH-Sequenzierungsdaten zeigte eine ungleichgewichtige Verteilung der medianen IgH-Mutationsfrequenz innerhalb der molekularen Gruppen (Tab. 19). Innerhalb der Gruppe der mBL konnte für die Fälle ≤ 14 Jahre eine mediane IgH-MF von 3,3 % bestimmt werden; in 14 von 30 untersuchten Fällen (46,6 %) zeigten sich die Merkmale der Antigenselektion und in 24 von 30 Fällen (80 %) konnte ein funktionsell rearrangierter B-Zell-Rezeptor nachgewiesen werden. Mittels Klonierungsexperi-

menten zur Sequenzvereinzelung konnten in drei von sechs Fällen fortlaufende Mutationen („ongoing mutations“, OM) nachgewiesen werden.

In der Gruppe der mBL > 14 Jahren betrug die mediane IgH-MF 6,5 %; nur 5 von 20 untersuchten Fällen (25 %) wiesen Merkmale der Antigenselektion auf und in 19 von 20 Fällen (95 %) wurde ein funktioneller B-Zell-Rezeptor nachgewiesen. In 5 von 5 klonierten Fällen konnten fortlaufende Mutationen nachgewiesen werden.

Für die Gruppen der non-mBL, Intermediate und die anhand des Wright-Klassifikators definierten ABC und GCB können die Ergebnisse der IgH-Sequenzanalyse der Tabelle 19 entnommen werden.

	mBL		non-mBL	Intermediate	non-mBL + Intermediate	
	≤14	>14	alle Fälle	alle Fälle	ABC	GCB
<b>mediane IgH-MF (%)</b>	<b>3,3      6,5</b>		<b>11,8</b>		<b>6,8</b>	
<b>Antigen-selektion (ja / Gesamt)</b>	14 / 30 46,6 %	5 / 20 25,0 %	37 / 82 45,1 %	11 / 31 35,5 %	18 / 41 43,9 %	15 / 44 34,1 %
<b>funktioneller B-Zell-Rezeptor (ja / Gesamt)</b>	24 / 30 80,0 %	19 / 20 95,0 %	67 / 82 81,7 %	27 / 31 87,1 %	35 / 41 85,4 %	37 / 44 84,1 %
<b>fortlaufende Mutationen (ja / Gesamt)</b>	3 / 6 50,1 %	5 / 5 100 %	14 / 25 56,0 %	2 / 3 66,6 %	4 / 12 33,3 %	12 / 15 80,0 %

Tabelle 19: Ergebnisse der IgH-Sequenzauswertung

Darstellung der Ergebnisse, getrennt in die molekularen Gruppen und deren Subklassifikationen. Angegeben wurde die mediane IgH-MF innerhalb der Gruppen, die Anzahl der Fälle mit Zeichen der Antigenselektion (selektiert / untersucht), Nachweis eines funktionellen B-Zell-Rezeptors (funktional / untersucht) sowie die Anzahl der klonierten Proben mit nachgewiesenen „ongoing mutations“ (OM), (OM positiv / insgesamt kloniert).

### 3.3.3 Verteilung der IgH-Mutationsfrequenz (IgH-MF)

Die Verteilung der IgH-MF innerhalb des untersuchten Gesamtkollektivs zeigt eine deutliche zweigipflige Verteilung mit Maxima bei ca. 4 % und ca. 13 % IgH-MF (Abb. 18).

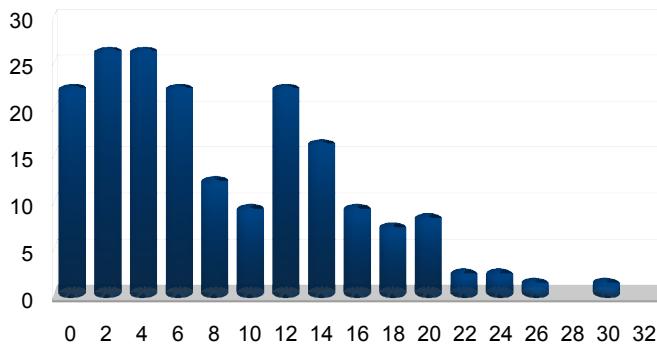


Abbildung 18:  
Verteilung der IgH-MF im Gesamtkollektiv  
Die MF wurde in 2 % Schritten gruppiert.  
Y-Achse: Anzahl (n) der Proben je Gruppe  
X-Achse: IgH-MF in 2 % Schritten gruppiert

Die in Abbildung 18 zu sehende Verteilung der IgH-MF im Gesamtkollektiv wurde weiterführend innerhalb in die einzelnen molekularen Gruppen analysiert.

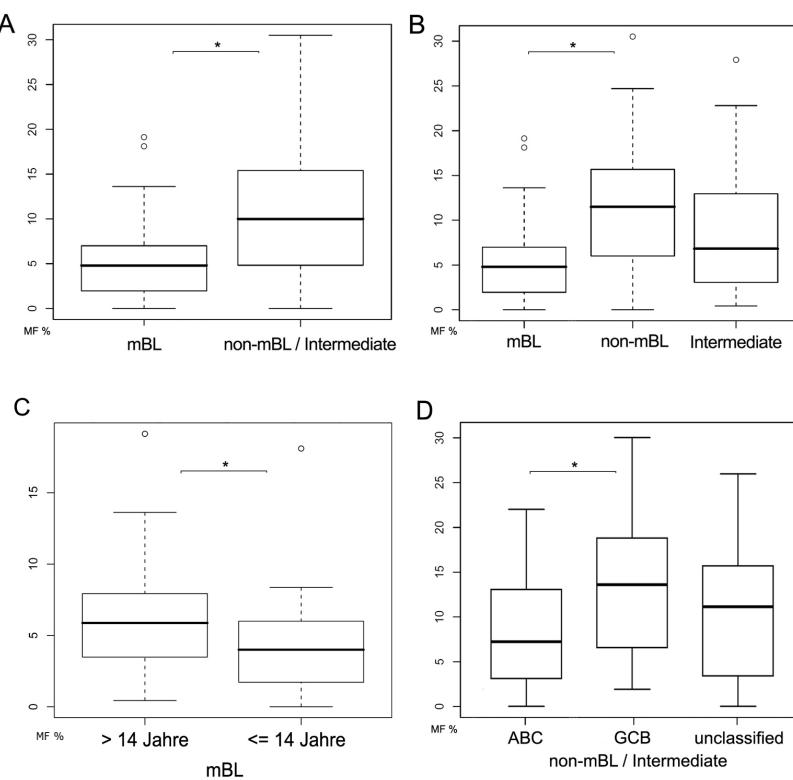


Abbildung 19: Verteilung der IgH-Mutationsfrequenz

- A:** Box-Plot-Darstellung der IgH-MF der mBL im Vergleich zur non-mBL / Intermediate Gruppe.
  - B:** IgH-MF in allen drei molekularen Gruppen.
  - C:** Altersabhängige Verteilung der IgH-MF innerhalb der mBL.
  - D:** IgH-MF der Fälle mit ABC-, GCB- und unclassified-Signatur (nur non-mBL / Intermediate)
- (\*):  $p < 0,05$

Die Analyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Fällen der mBL (4,9 %) im Vergleich zur Gruppe der non-mBL / Intermediate (10,4 %,  $p < 0,01$ ; Abb. 19 A).

Die weitere Trennung in die molekularen Gruppen mBL (4,9 %), non-mBL (11,8 %) und Intermediate (6,8 %) (Abb. 19 B) zeigte, dass ein signifikanter Unterschied in der medianen IgH-Mutationsfrequenz zwischen den mBL und den non-mBL besteht ( $p < 0,01$ ). Innerhalb der mBL zeigt sich eine altersabhängige Verteilung der IgH-MF. Während die Gruppe der Kinder ( $\leq 14$  Jahre) eine mediane IgH-MF von 3,3 % aufwies, war die Gruppe der Erwachsenen ( $> 14$  Jahre) mit 6,5 % signifikant höher mutiert ( $p < 0,05$ ; Abb. 19 C). Der Vergleich der anhand des Wright-Klassifikators definierten Subtypen ABC, GCB und unklassifiziert innerhalb der non-mBL / Intermediate zeigte einen signifikanten Unterschied der medianen IgH-MF zwischen den ABC und GCB (7,3 % vs. 13,1 %,  $p < 0,01$ ; Abb. 19 D).

### 3.3.4 IgH-Mutationsfrequenz in Abhängigkeit vom MYC-Status

Teilt man das Untersuchungskollektiv nach dem Vorhandensein einer MYC-Translokation auf, so zeigten die MYC.pos Fälle, die die Mehrheit der mBL einschließen, eine signifikant niedrigere IgH-MF als die MYC.neg Fälle. (Abb. 20 A; 4,8 % bzw. 11,0 % ;  $p < 0,01$ ).

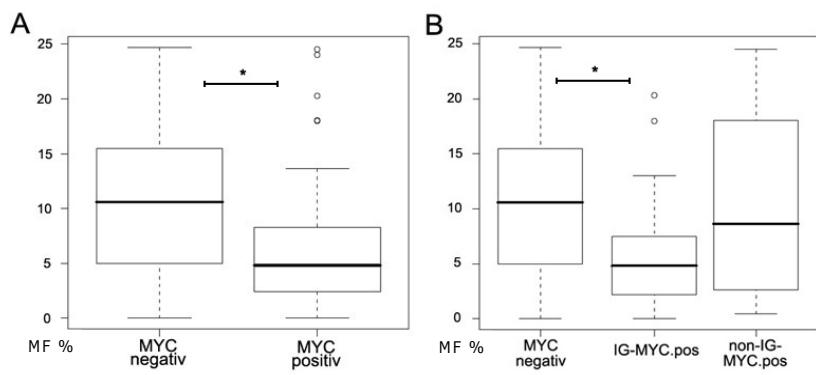


Abbildung 20: IgH-Mutationsfrequenz in Abhängigkeit vom MYC-Status

**A:** Box-Plot-Darstellung der IgH-MF des Gesamtkollektivs der MYC.neg / MYC.pos Fälle.

**B:** Box-Plot-Darstellung wie in A, jedoch weitere Auf trennung der MYC.pos Gruppe anhand des Translokationspartners in MYC.neg, IG-MYC.pos und non-IG-MYC.pos. (\*):  $p < 0,01$

Betrachtet man die MYC.pos-Fälle mit einem anderen Translokationspartner als den IG-Genen, so zeigen diese eine höhere mediane IgH-MF von 8,6 % im Vergleich zu den IG-MYC-translozierten Fällen (4,8 %; Abb. 20 B).

In der Gruppe der MYC.pos Lymphome kann man Fälle ohne zusätzliche chromosomale Veränderungen (MYC.simple) von Fällen mit einem hohen Komplexitätsscore und vielen chromosomal Imbalanzen (wie z.B. -6q, -17p, -9q; MYC.complex 1) und Fällen mit zusätzlichen chromosomal Translokationen (MYC.complex 2) sowie Fällen mit einem non-IG-Translokationspartner (MYC.complex 3) unterscheiden. Bei einer Korrelation der IgH-MF mit dem Vorhandensein komplexer genetischer Aberrationen, zeigte sich, dass sich die Gruppe der MYC.simple, wie in Abb. 21 zu sehen, mit einer

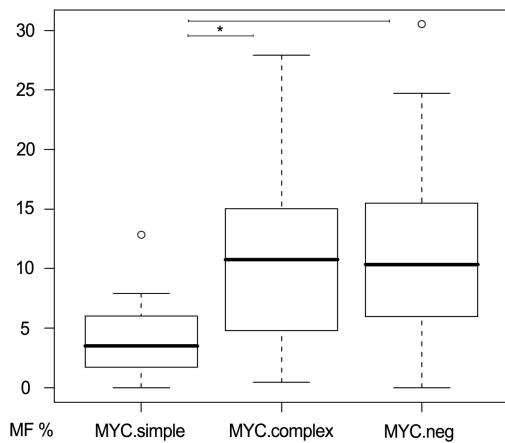


Abbildung 21:

Box-Plot-Darstellung der Verteilung der IgH-MF innerhalb der MYC.simple, MYC.complex, MYC.neg Fälle.  
(\*):  $p < 0,05$

signifikant geringeren medianen IgH-MF (3,7 %) von den Gruppen der MYC.complex (11,7 %) und MYC.neg (11,0 %) abgrenzen ließ ( $p < 0,05$ ).

Um den Einfluss einer non-IG-MYC-Translokation (MYC.complex 3) oder zusätzlicher Translokationen bei IG-MYC-Fällen (MYC.complex 2) auf die IgH-MF abschätzen zu können, wurde eine weitere Trennung der MYC.complex Gruppe in die einzelnen Subgruppen durchgeführt. Dies ergab im ersten Schritt für die Gruppe der MYC.complex 1 (3,8 %) im Vergleich zur kombinierten Gruppe der MYC.complex 2+3 (12,8 %) einen signifikanten Unterschied in der Verteilung der IgH-MF ( $p < 0,01$ ; Abb. 22 A). Die vollständige Trennung der MYC.complex in die drei Subgruppen (Abb. 22 B) gegenüber MYC.simple und MYC.neg zeigte deutliche Unterschiede in der Verteilung der Mutationsfrequenz innerhalb der MYC.complex Fälle. Während sich die MYC.complex 1 (3,8 %) mit ihren ausschließlichen Imbalanzen signifikant von der Gruppe der MYC.complex 2 (13,1 %) mit ihren komplexen chromosomal Veränderungen abgrenzen ließen, umfasste die IgH-MF der MYC.complex 3, also Fälle mit anderen Translokationspartnern als dem IgH-Locus ein sehr weites Spektrum (Median 8,9 %). Eine Abgrenzung der MYC.complex 3 anhand der IgH-Mutationsfrequenz war daher nicht möglich (Abb. 22 B).

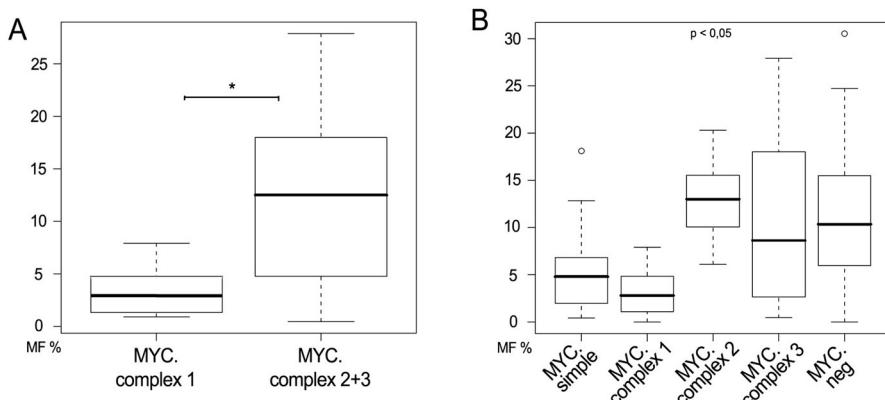


Abbildung 22:

**A:** Box-Plot-Darstellung der IgH-MF der MYC.complex Fälle. Trennung in MYC.complex 1 / 2+3.  
**B:** Box-Plot-Darstellung wie A, jedoch weitere Trennung der MYC.complex-Gruppe in die drei Subgruppen (1,2,3).  
(\*) $: p < 0,05$

Eine weiterführende Betrachtung der IgH-MF in den molekularen Gruppen der mBL, non-mBL oder Intermediate getrennt in MYC.pos oder MYC.neg Fälle war aufgrund zu kleiner Fallzahlen nicht möglich.

### 3.3.5 Ig-VH-Familienverwendung

Eine Analyse der verwendeten VH-Familien konnte an 182 Proben durchgeführt werden. Fünf Proben wiesen starke Mutationen auf, so dass eine Bestimmung der verwendeten VH-Familie nicht möglich war. Im gesamten Probenkollektiv zeigte sich eine bevorzugte Verwendung der VH3- (47 %) und VH4-Familien (35 %), gefolgt von VH1 (12 %), VH5 (4 %) und als sehr seltene Familien mit einem Anteil von < 2 % VH2 und VH6 (Abb. 23). Zwischen den VH-Familien wurden unterschiedliche Mutationssichten beobachtet. Dabei war die VH3-Familie mit einer medianen MF von 11,1 % gegenüber den anderen Familien (VH1,-4,-5) mit durchschnittlich 8 % stärker mutiert. Die Verteilung der VH-Familienverwendung innerhalb der drei molekularen Gruppen zeigte, dass in der Gruppe der mBL mit einem Anteil von 44,7 % präferentiell Segmente der VH4-Familie verwendet wurden, gefolgt von einer 36,2 %igen VH3-Familienverwendung. Die Gruppe der non-mBL zeigte eine bevorzugte Verwendung der VH3 vor der VH4-Familie mit 50,5 % bzw. 36,1 %. Die Intermediate nutzten mit 52,6 % zumeist die VH3-Familie, mit 18 % die VH4-Familie und mit 16 % die relativ seltene VH5-Familie.

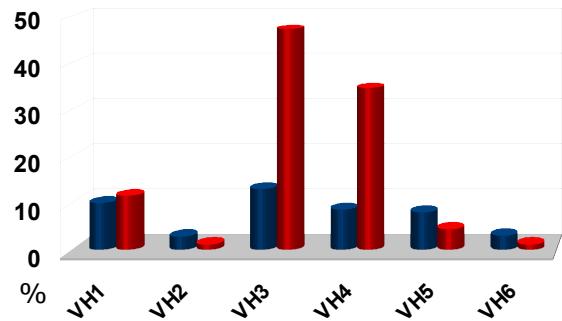


Abbildung 23:

Mediane IgH-MF in % (Blau) und VH-Familienverwendung (rot) der einzelnen VH-Familien in Prozent, bezogen auf das auswertbare Gesamtkollektiv (= 100 %).

molekulare Gruppe				
Ig-VH Familie	mBL	non-mBL	Intermediate	Total (Zeile)
<b>VH1</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>21</b>
	33,33 %	47,62 %	19,05 %	11,54 %
	14,89 %	10,31 %	10,53%	
<b>VH2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
	50,00 %	50,00 %	0,00 %	1,10 %
	2,13 %	1,03 %	0,00 %	
<b>VH3</b>	<b>17</b>	<b>49</b>	<b>20</b>	<b>86</b>
	19,77 %	56,98 %	23,26 %	47,25 %
	36,17 %	50,52 %	52,63 %	
<b>VH4</b>	<b>21</b>	<b>35</b>	<b>7</b>	<b>63</b>
	33,33 %	55,56 %	11,11 %	34,62 %
	44,68 %	36,08 %	18,42 %	
<b>VH5</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>8</b>
	0,00 %	25,00 %	75,00 %	4,40 %
	0,00 %	2,06 %	15,79 %	
<b>VH6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
	50,00 %	0,00 %	50,00 %	1,10 %
	2,13 %	0,00 %	2,63 %	
<b>Total (n) (Spalte)</b>	<b>47</b>	<b>97</b>	<b>38</b>	<b>182</b>

Tabelle 20:

Aufschlüsselung der Ig-VH Familienverwendung innerhalb der molekularen Gruppen, mBL, non-mBL und Intermediate

1. Feld: Häufigkeit (n) der Verwendung der links angegebenen VH-Familie je Gruppe
2. Feld: %-Anteil der Häufigkeit der VH-Familie im Gesamtkollektiv (jede Zeile = 100 %)
3. Feld: %-Anteil der Häufigkeit der VH-Familie innerhalb einer mol. Gruppe (Spalte = 100 %)

### 3.3.5.1 Altersabhängige Ig-VH-Familienverwendung

Das Alter der einzelnen Patienten bei Diagnosestellung variierte stark. Ein Häufung der Erst-Erkrankung war im kindlichen Alter, ein zweiter Gipfel war bei den adulten Patienten um das 60. Lebensjahr zu finden (Abb. 24 A). Die Korrelation der molekularen Gruppen mit dem Alter bei Diagnosestellung zeigte, dass die Gruppe der mBL hauptsächlich paediatrische Fälle aufwies. Die Gruppe der non-mBL hingegen beinhaltete vornehmlich adulte Fälle um das 60. Lebensjahr. Die Intermediate-Fälle stellten sich als eine heterogene Erkrankung dar, die sowohl bei Kindern als auch bei adulten Patienten auftrat.

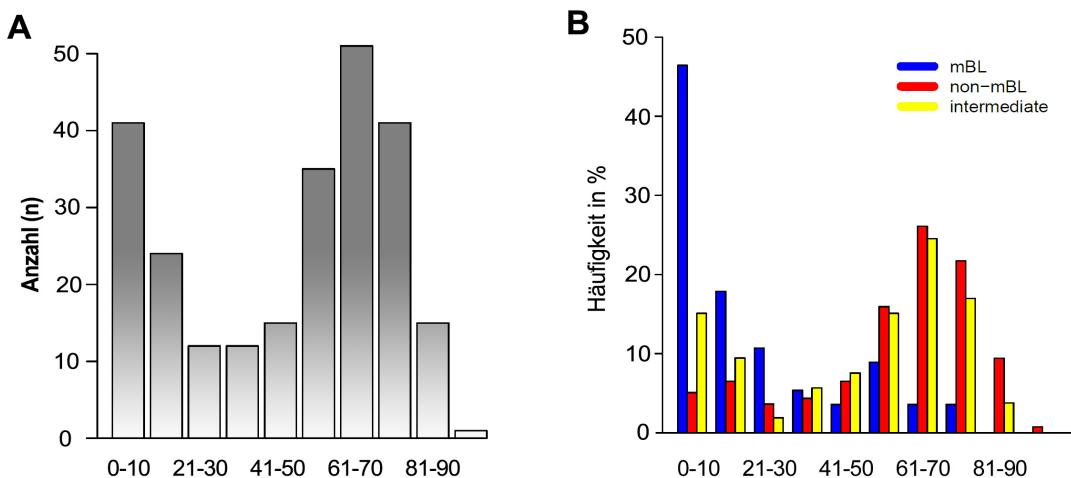


Abbildung 24:

Altersverteilung innerhalb der Gesamtkollektivs bei Erstdiagnose. Die Gruppierung erfolgte in 10-Jahres-Schritten.

**A:** Anzahl (n) der Patienten je Altersklasse (Gesamtkollektiv).

**B:** Relative Häufigkeit einer Altersklasse an den molekularen Gruppen.

Es wurden Berechnungen für eine maximale Gruppentrennung des Gesamtkollektivs und der einzelnen molekularen Gruppen anhand des Alters durchgeführt, um altersabhängige Unterschiede der VH-Familienverwendung zu erkennen.

Wie in Abb. 24 B dargestellt, waren bei  $> 60$  Jahren (entsprechend der Häufung der non-mBL in diesem Alter),  $> 30$  Jahren und  $> 14$  Jahren (als Abgrenzung zwischen den paediatrischen und adulten Fällen) mögliche Trengrenzen zu erwarten. Die Trennung des Gesamtkollektivs bei  $> 60$  Jahren und  $> 30$  Jahren zeigte keine deutlichen Unterschiede in der spezifischen VH-Familienverwendung. Die Trennung in einen paediatrischen Arm  $\leq 14$  Jahre und einen adulten Arm  $> 14$  Jahre zeigte jedoch deutliche Unterschiede in der spezifischen VH-Familienverwendung. Wie am gesamten Probenkollektiv in Abb. 25 dargestellt, fanden in der Altersgruppe der  $\leq 14$ -Jährigen die VH4-34 und VH4-39 Fragmente eine häufigere Verwendung als in der Gruppe der adulten Fälle.

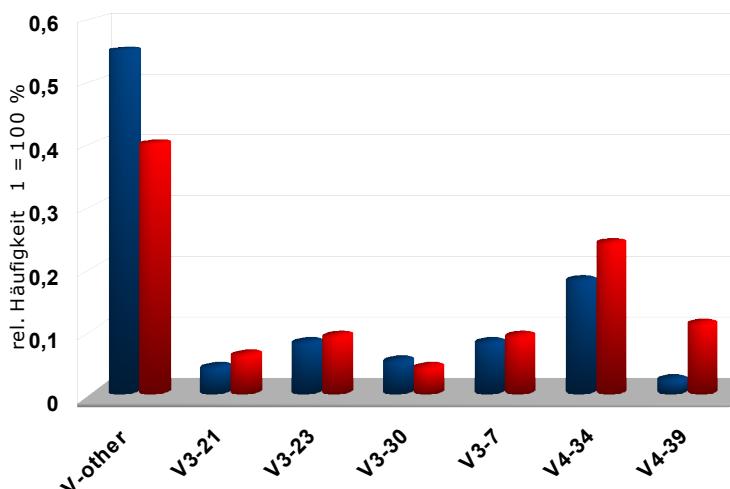


Abbildung 25:

Häufigkeit der Verwendung des angegebenen VH-Gens im Gesamtkollektiv, getrennt nach Alter  $> 14$  Jahre.

Es sind nur VH-Fragmente mit einer Häufigkeit von  $> 4$  % dargestellt.

Links/Blau: adulte Patienten  $> 14$  Jahre

Rechts/Rot: paed. Patienten  $\leq 14$  Jahre

Bei der Betrachtung der Unterschiede in der VH-Familienverwendung innerhalb der molekularen Gruppen mit der oben ermittelten Alterstrennung von  $<> 14$  Jahren (Tab. 21) zeigte sich, dass in der Gruppe der mBL eine deutliche Bevorzugung der VH4-Familie bei den paediatrischen Fällen  $\leq 14$  Jahren zu finden war. Von den in der Gruppe der mBL insgesamt 21 verwendeten VH4-Genen entfielen 18 (85,7 %) auf mBL-Fälle  $\leq 14$  Jahre.

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Verwendung der VH4-Familie innerhalb der molekularen Burkitt-Lymphome ein nahezu exklusives Merkmal der Altersklasse  $\leq 14$  Jahre ist. Hingegen zeigten die Gruppen der non-mBL und der Intermediate bei einer Trennung der Gruppen  $<> 14$  Jahren keine signifikanten Unterschiede. Die VH-Familienverwendung war hier nicht altersabhängig verschieden.

Ig-VH Familie	molekulare BL		
	<b>&gt; 14 Jahre</b>	<b><math>\leq 14</math> Jahre</b>	<b>Total (Reihe)</b>
<b>VH1</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>7</b>
	71,4 %	28,6 %	14,9 %
	27,8 %	6,9 %	
<b>VH2</b>	0	<b>1</b>	1
	0,0 %	100 %	2,1 %
	0,0 %	3,4 %	
<b>VH3</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>17</b>
	52,9 %	47,1 %	36,2 %
	50,0 %	27,5 %	
<b>VH4</b>	<b>3</b>	<b>18</b>	<b>21</b>
	14,3 %	85,7 %	44,7 %
	16,7 %	62,1 %	
<b>VH6</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
	100 %	0,0 %	2,1 %
	5,6 %	0,0 %	
<b>Total (Spalte)</b>	<b>18</b>	<b>29</b>	<b>47</b>

Tabelle 21:

Aufschlüsselung der IgVH Verwendung innerhalb der molekularen Gruppe der mBL  $<> 14$  Jahre

1. Feld: Häufigkeit (n) der Verwendung der links angegebenen VH-Familie je Altersklasse
2. Feld: %-Anteil der verwendeten VH-Gene innerhalb der mBL (jede Zeile =100 %)
3. Feld: %-Anteil der verwendeten VH-Gene innerhalb der Altersklassen (jede Spalte =100 %)

### 3.3.6 Ig-DH und Ig-JH Familienverwendung

#### 3.3.6.1 Ig-DH-Familienverwendung

Die Analyse der DH-Familienverwendung von 170 auswertbaren Fällen zeigte eine präferenzielle Nutzung der DH3- und DH2-Familien mit 29,6 % bzw. 26,1 % (Abb. 26). Die DH1 und DH6-Familien fanden mit je 13 %, DH4 und DH5 mit je 8 % und DH7 in nur 1,8 % der Fälle Verwendung. Ein Vergleich zwischen den einzelnen molekularen Gruppen sowie einer Alterstrennung von  $\leq 14$  Jahren zeigte keine Unterschiede, was auf eine gruppen- und altersunabhängige Verwendung der DH-Familien hindeutet.

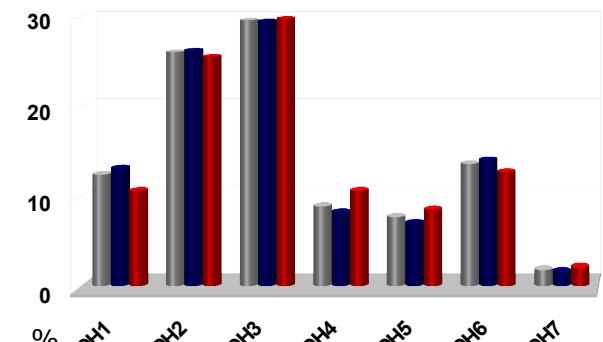


Abbildung 26: Ig-DH-Familienverwendung im Gesamtkollektiv  $> 14$  Jahre und  $\leq 14$  Jahre

Balkendiagramm der relativen Häufigkeit der Verwendung der angegebenen DH-Familien in Prozent (%). (Grau) Gesamtkollektiv, (Blau)  $> 14$  Jahre, (Rot)  $\leq 14$  Jahre, ( $p = n.s.$ )

#### 3.3.6.2 Ig-JH-Familienverwendung

Die Analyse der JH-Familienverwendung von 177 analysierbaren Fällen zeigte eine deutliche präferenzielle Nutzung der JH4-Familie in 46,9 % der Fälle (Abb. 27). Die JH6-Familie fand in 20,3 % und JH3 sowie JH5 in jeweils 15 % der Proben eine Verwendung. JH1 und JH2 wurden nur in fünf Fällen (2,8 %) genutzt. Ein Vergleich zwischen den einzelnen molekularen Gruppen sowie einer Alterstrennung von  $<> 14$  Jahren zeigte keine signifikanten Unterschiede, was auch hier auf eine gruppen- und altersunabhängige Verwendung der JH-Familien hindeutet.

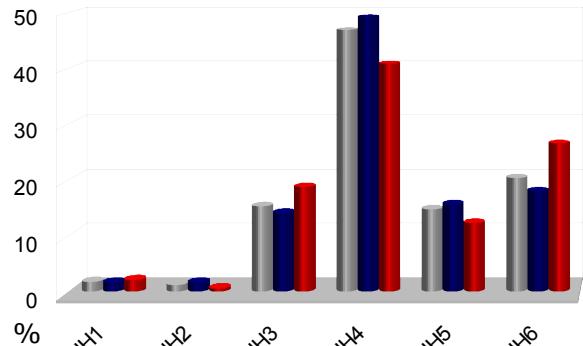


Abbildung 27: Ig-JH-Familienverwendung im Gesamtkollektiv;  $> 14$  Jahre und  $\leq 14$  Jahre

Balkendiagramm der relativen Häufigkeit der Verwendung der angegebenen JH-Familien in Prozent (%). (Grau) Gesamtkollektiv, (Blau)  $> 14$  Jahre, (Rot)  $\leq 14$  Jahre, ( $p = n.s.$ )

### 3.3.7 Korrelation der IgH-MF mit dem klinischen Verlauf

Die Korrelation der IgH-Mutationsfrequenz mit den auswertbaren klinischen Daten des untersuchten Kollektivs zeigte, dass allein die Mutationsfrequenz des IgH-Lokus einen eigenständigen prognostischen Parameter bietet, der mit dem Überleben von Patienten mit aggressiven Lymphomen korreliert. Wie in Abb. 28 dargestellt, konnten bisher die klinischen Verläufe von 81 Patienten analysiert werden. Dabei zeigt sich in einer Kaplan-Meier-Darstellung, dass Fälle mit einer IgH-Mutationsfrequenz von < 10 % eine signifikant schlechtere Prognose mit einem medianen Überleben von 13 Monaten im Vergleich zu Fällen mit einer hohen IgH-MF von  $\geq 10\%$  (38,4 Monate) haben.

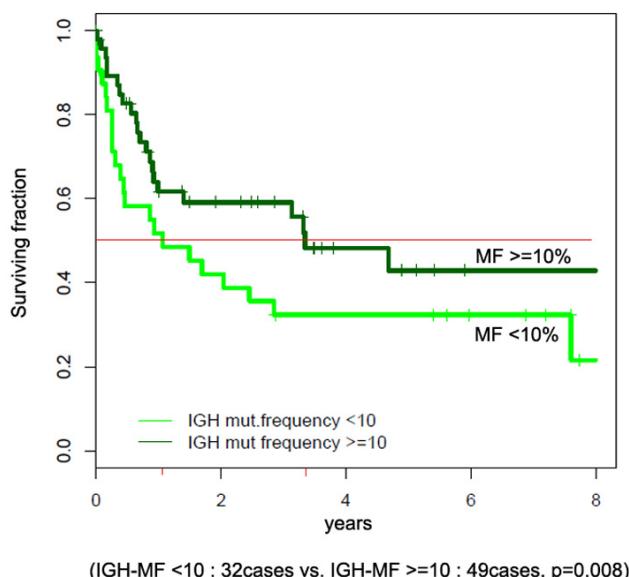


Abbildung 28: Kaplan-Meier Kurve

Korrelation der MF mit dem klinischen Verlauf von 81 Patienten des Gesamtkollektivs. Die obere Kurve enthält 49 Fälle mit einer MF  $\geq 10\%$ , die untere Kurve 32 Fälle mit einer MF < 10 %. Das mediane Überleben beträgt 13 bzw. 38,4 Monate. ( $p < 0,01$ )

### 3.4 MYC

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mutationsanalysen des MYC-Gens durchgeführt. Dazu wurde das MYC-Intron 1 inklusive der darin liegenden regulatorischen Regionen MIF-1, 2 und 3 sowie das gesamte Exon 2 mit den darin enthaltenen regulatorischen Regionen der MYC-Box 1 und 2 analysiert.

#### 3.4.1 Mutationsanalyse der MYC-Promotorregion

Das Mutationsscreening der MYC-Promotorregion wurde ausschließlich mittels Direkt-Sequenzierung durchgeführt. Von den 228 Proben des Gesamtkollektivs konnten 223 Fälle untersucht werden. Davon wiesen 151 Fälle keine Mutation in der MYC-Promotorregion auf und bei 72 Proben konnten Punktmutationen nachgewiesen werden. Die mediane Mutationsfrequenz innerhalb der mutierten Fälle betrug 0,23 % (Tab. 22).

MYC-Promotorregion	molekulare Gruppe			Gesamt
	mBL	non-mBL	Intermediate	
Gesamt (n)	53	121	49	223
davon mutiert (n)	<b>30</b>	<b>29</b>	<b>13</b>	<b>72</b>
mediane MF (%) der mutierten Fälle	0,63	0,12	0,23	0,23

Tabelle 22: MYC-Promotormutationen innerhalb der molekularen Gruppen

Die Verteilung der MYC-Promotormutationen innerhalb der molekularen Gruppen (Abb. 29 A) zeigte einen signifikanten Unterschied der Gruppe der mBL (0,63 %) zu den Gruppen der non-mBL (0,12 %) oder Intermediate (0,23 %). Die Verteilung der MYC-Promotormutationen innerhalb der molekularen Subtypen ABC, GCB und Unklassifiziert mit dem jeweiligen Median von 0,12 % ist in Abb. 29 B dargestellt. Die GCB-Gruppe enthielt deutlich mehr Fälle mit hohen Mutationsfrequenzen.

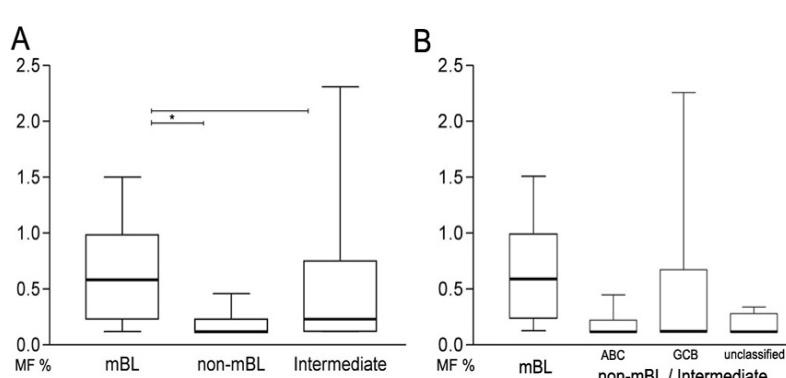


Abbildung 29: Box-Plot Darstellung der MYC-Promotor Mutationsfrequenz innerhalb der mol. Gruppen mBL, non-mBL und Intermediate

**A:** alle 3 molekularen Gruppen  
(\*)  $p < 0,01$  (Burkitt-Signatur)

**B:** weitere Trennung der non-mBL / Intermediate in die molekularen Subtypen (Wright-Klassifikator).

In Abhängigkeit vom MYC-Status konnte im untersuchten Kollektiv eine signifikant höhere Mutationsfrequenz in der Gruppe der MYC.pos im Vergleich zu den MYC.neg nachgewiesen werden (0,56 % bzw. 0,12 %;  $p < 0,001$ ; Abb. 30 A). Die weiterführende Auftrennung der MYC.pos Fälle anhand des MYC-Komplexitätsgrads zeigte, dass die MYC.simple eine signifikant höhere Mutationsfrequenz aufwiesen als die MYC.complex (0,56 % bzw. 0,2 %;  $p < 0,05$ ; Abb. 30 B). Die weitere Differenzierung der MYC.complex-Fälle war aufgrund zu geringer Fallzahlen innerhalb der drei Subgruppen MYC.complex 1-3 nicht sinnvoll.

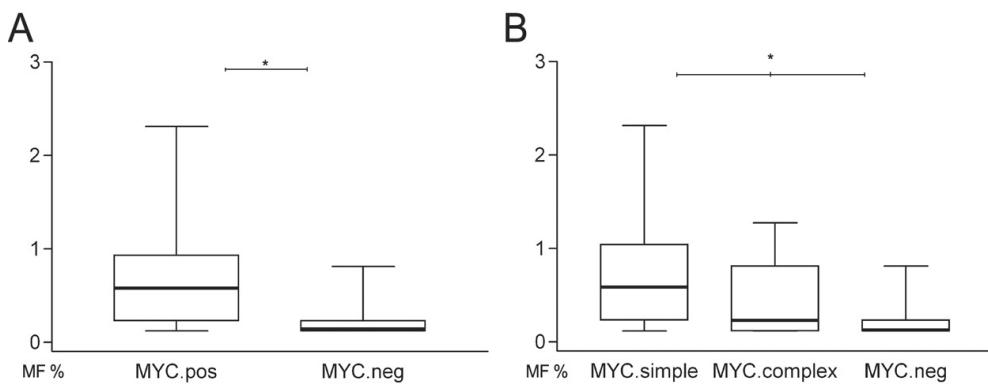


Abbildung 30: MYC-Promotormutationen

**A:** Box-Plot-Darstellung der medianen Mutationsfrequenz der MYC.pos und MYC.neg Fälle in Abhängigkeit vom MYC-Status. (\*): $p < 0,001$

**B:** Box-Plot-Darstellung wie A, jedoch Auftrennung der MYC.pos Gruppe anhand der MYC-Komplexität in MYC.simple, MYC.complex und MYC.neg. (\*): $p < 0,05$

Die Verteilung der 252 charakterisierten Punktmutationen im untersuchten DNA-Abschnitt der MYC-Promotorregion zeigte für alle molekularen Gruppen ein zufälliges Verteilungsmuster bei einer mittleren Mutationsrate von  $4,1 \times 10^{-3}$ /Base (Abb. 31). Zusätzlich lassen sich zwei Mutationscluster mit einer > 3-fachen Mutationsrate als in der Gesamtregion nachweisen. Das erste Mutationscluster liegt am 3'-Ende der MIF-1 Region von Base 346-365 ( $1,2 \times 10^{-2}$ /Base). Das zweite Cluster liegt von Base 530-539 ( $1,5 \times 10^{-2}$ /Base) am 3'-Ende der MIF-3 Region.

Publizierte Polymorphismen in dieser Region waren nur sehr selten nachweisbar und sind in der Darstellung (Abb. 31) sowie der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

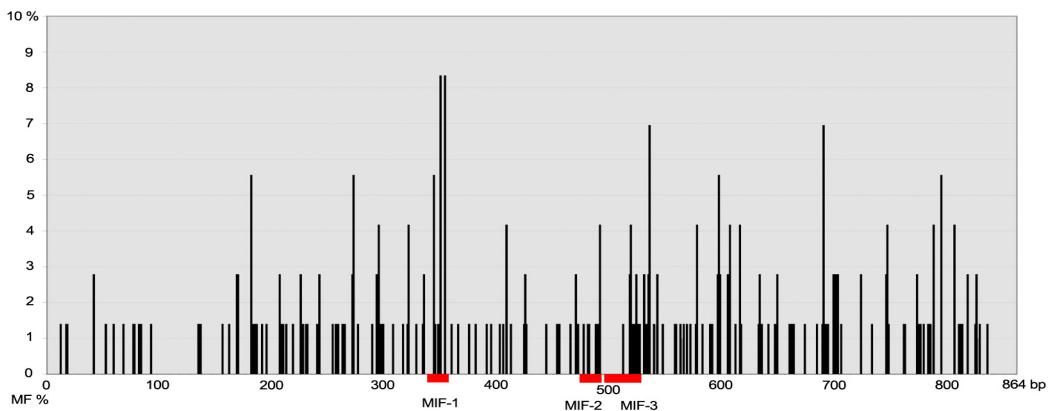


Abbildung 31:

Balkendarstellung der relativen Anzahl an Punktmutationen im 864 bp Abschnitt des MYC-Intron 1 von 72 Proben in %. Die Lage der MIF-1, 2+3 Region ist rot gekennzeichnet. Darstellung ohne bekannte Polymorphismen.

In der MIF-1 Region wiesen 13 Proben insgesamt 18 Punktmutationen auf. 10 von 13 Fällen (76,9 %) wiesen einen IG-MYC-Bruch auf und 8 von 13 Fällen (61,5 %) wurden als mBL  $\leq$  14 Jahre klassifiziert. In der MIF-2 Region wiesen 8 Fälle jeweils eine Mutation auf. 7 der 8 Fälle (87,5 %) gehörten zur Gruppe der mBL  $\leq$  14 Jahre mit einem IG-MYC-Bruch. Ein Fall wies keine MYC-Translokation auf (Intermediate, GCB). Die 12 Mutationen der MIF-3 Region wurden in 10 Fällen nachgewiesen, von denen 9 IG-MYC.pos und 8 Fälle den mBL angehörten. Auch bei der Analyse der MIF-3-Region konnte ein Fall ohne MYC-Translokation identifiziert werden (Intermediate, GCB), welcher allerdings nicht mit dem in der MIF-2-Region charakterisierten MYC.neg Fall identisch war.

### 3.4.1.1 Korrelation des MYC-Mutationsstatus mit der mRNA-Expression

Die Auswertung der im MMML-Verbund generierten und zur Verfügung gestellten mRNA-Expressionsdaten zeigte eine erhöhte mRNA-Expression von MYC und Myc-Zielgenen innerhalb der mBL-Gruppe (Abb. 32 A + B).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und MYC-Genexpression / Myc-Zielgenexpression wurde durch eine Korrelation zwischen MYC-Promotormutationen und mRNA-Expressionsdaten untersucht. Die normierten Genexpressionsdaten von MYC sowie Myc-spezifischer Zielgene (Dave *et al.*, 2006) wurden in Scatter-Plots dargestellt (Abb. 32 A+B). Im Vergleich zu den non-mBL / Intermediate zeigten die mBL insgesamt höhere Expressionswerte für MYC und Myc-Zielgene. Das Auftreten von Mutationen hatte in keiner molekularen Gruppe Auswirkungen auf die MYC- oder Myc-Zielgen mRNA-Expression (Abb. 32 A+B).

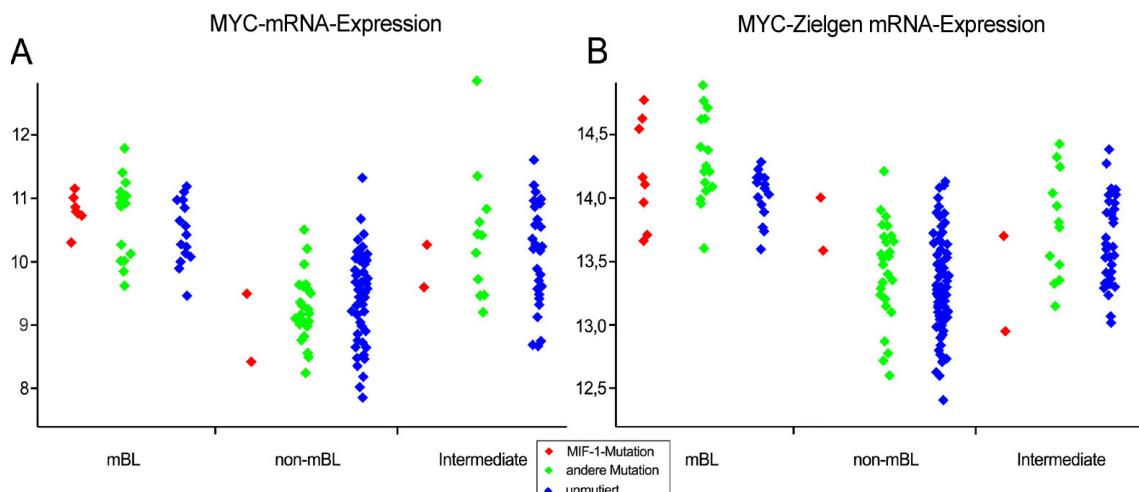


Abbildung 32: MYC- und Myc-Zielgen mRNA-Expression in Abhängigkeit von MYC-Promotormutationen. Das Auftreten von Mutationen in der regulatorischen MIF-1 Region (Rot) wurde im Vergleich zu Mutationen der gesamten Promotorregion (Grün) sowie unmutierten Fällen (Blau) betrachtet. Jede Raute steht für das relative, normierte und einheitenlose mRNA-Expressionsniveau eines Patientens.

**A:** normierte MYC-mRNA-Expression

**B:** normierte Myc-Zielgen mRNA-Expression

### 3.4.2 Mutationsscreening der MYC-TAD

Für das Mutationsscreening der MYC-transaktivierenden Domäne (TAD) wurde ein Screening aller Proben mittels dHPLC durchgeführt. Von den insgesamt 228 Proben konnten 186 Proben auf der dHPLC analysiert werden. 143 Proben wiesen ein unauffälliges Elutionsprofil auf, 43 Proben zeigten aberrante Elutionsprofile, die alle in der Direktsequenzierung bestätigt werden konnten. 33 nachträglich erhaltene Proben wurden ohne dHPLC-Messung nur mittels Direkt-Sequenzierung analysiert; 11 dieser Proben wiesen Mutationen auf (Tab. 23). 54 der insgesamt 219 Fälle (24,7 %) wiesen Mutationen der MYC-TAD-Region auf. Die mediane MYC-TAD-Mutationsfrequenz innerhalb der mutierten Fälle betrug 0,27 %.

MYC-TAD	molekulare Gruppe			Gesamt
	mBL	non-mBL	Intermediate	
Gesamt (n)	52	118	49	219
davon mutiert (n)	<b>32</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>54</b>
mediane MF (%)	<b>61,5 %</b>	<b>10,2 %</b>	<b>20,4 %</b>	<b>24,7 %</b>

Tabelle 23: Verteilung der MYC-TAD-Mutationen innerhalb der molekularen Subgruppen

Innerhalb der molekularen Gruppen der mBL (0,27 %), non-mBL (0,2 %) und Intermediate (0,34 %) ließ sich anhand der MYC-TAD-Mutationsfrequenz keine signifikanten Unterschiede beobachten ( $p = \text{n.s.}$ ; Abb. 33).

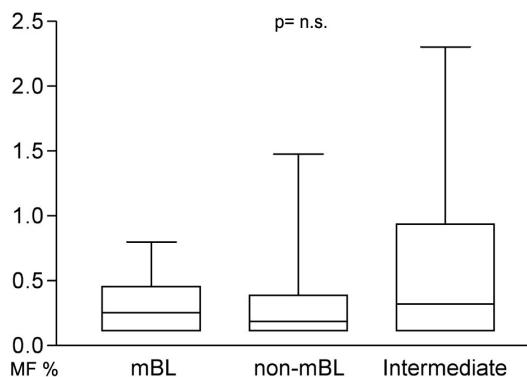


Abbildung 33: MYC-TAD Mutationsfrequenz der molekularen Gruppen mBL, non-mBL und Intermediate.  $p = \text{n.s.}$

Die Verteilung der Mutationen innerhalb der MYC.pos / MYC.neg Fälle zeigte jedoch signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen (0,27 % bzw. 0,13 %;  $p < 0,05$ ; Abb. 34 A). Die Auftrennung der Gruppe der MYC.pos anhand ihrer MYC-Komplexität (Abbildung 34 B) zeigte, dass die Gruppe der MYC.complex mit 0,4 % die höchste mediane MF aufwies, gefolgt von den MYC.simple mit 0,27 %. Die weitere Differenzierung von MYC.complex war aufgrund zu geringer Fallzahlen innerhalb der drei Subgruppen MYC.complex 1-3 nicht sinnvoll.

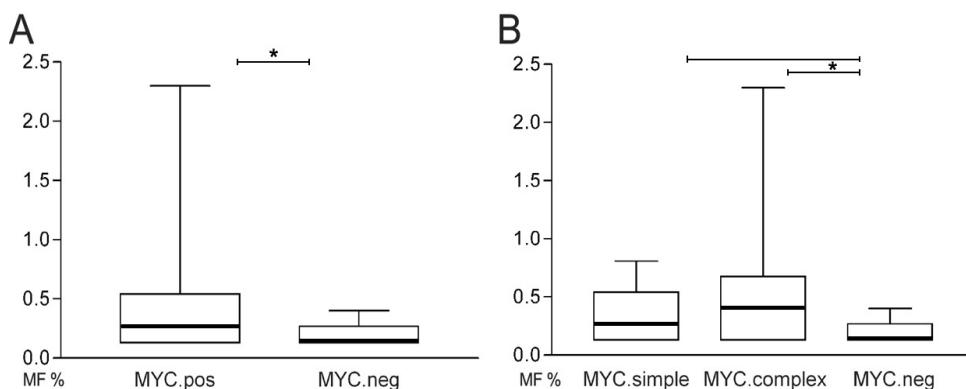


Abbildung 34:

- A:** Box-Plot-Darstellung der MYC-TAD-Mutationsfrequenz getrennt in MYC.pos / MYC.neg Fälle  
**B:** Box-Plot-Darstellung wie in A, jedoch weitere Auftrennung der MYC.pos-Gruppe anhand der MYC-Komplexität in MYC.simple, MYC.complex und MYC.neg. (\*):  $p < 0,05$

### 3.4.3 Mutationsmuster der MYC-TAD

In der Direktsequenzierung zeigten 54 Proben Mutationseignisse. Insgesamt wurden 131 Punktmutationen charakterisiert; im untersuchten Bereich konnten keine bekannten Polymorphismen nachgewiesen werden.

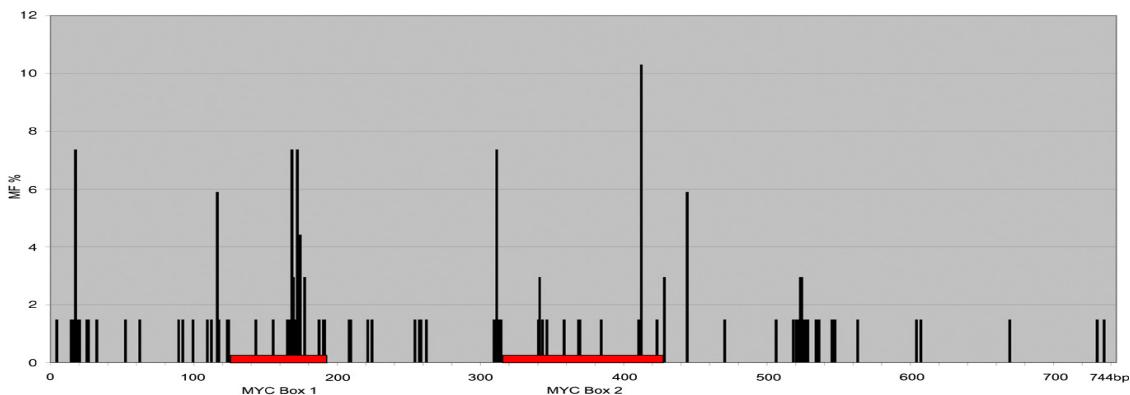


Abbildung 35: Verteilung der 131 Punktmutationen innerhalb der MYC-TAD

Balkendarstellung der gemessenen Mutationen im 744 bp Abschnitt der MYC-TAD von 54 Proben in %. Darstellung ohne bekannte Polymorphismen.

Die Verteilung der 131 identifizierten Punktmutationen zeigte innerhalb der molekularen Gruppen ein weitgehend zufälliges Verteilungsmuster in der untersuchten MYC-TAD-Region (mittlere Mutationsrate  $3,2 \times 10^{-3}/\text{Base}$ ). Von den 54 Fällen mit Mutationen im untersuchten Bereich wurden 22 Fälle mit insgesamt 26 Punktmutationen in der MYC-Box 1 identifiziert. Diese Mutationen führten bei 20 Triplets zu einem Aminosäure-Austausch und traten in vier Fällen als stille Mutationen auf. In zwei Fällen traten jeweils zwei Mutationen in einem Triplet auf. Von den 22 Fällen mit MYC Box-1 Mutationen wiesen 21 Fälle eine IG-MYC-Translokation auf und diese konnten in 17 Fällen als mBL diagnostiziert werden. Die übrigen 5 Fälle wurden als Intermediate mit GCB-Signatur charakterisiert. In der MYC-Box 1 ließ sich von Base 166 bis 178 ein Cluster mit vermehrt auftretenden Mutationseignissen ( $3,2 \times 10^{-2}/\text{Base}$ ) definieren (Abb. 35).

Dieses Mutationscluster wurden hauptsächlich durch Mutationen der AS 56-60 gebildet, von denen Pro57 und Thr58 bekannte *in vivo* Phosphorylierungsstellen innerhalb der MYC-Box 1 sind (Tab. 24).

Position	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
AS	A	P	S	E	D	I	W	K	K	F	E	L	L	P	T	P	P	L	S	P	S	R

Tabelle 24: Verteilung der AS-Veränderungen innerhalb der MYC-TAD Box 1

Obere Zeile: Nummerierung der AS im Leseraster, zweite Zeile Code der Aminosäure

◊: Replacement-Mutation □: Silent-Mutation

In der MYC-Box 2 konnten 21 Mutationen in 14 Fällen nachgewiesen werden. Davon wiesen acht Fälle eine Mutation der AS 138 (Phe138) auf (Tab. 25).

Position	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143			
AS	L	G	G	D	M	V	N	Q	S	F	I	C	D	P	D	D	E	T	F	I	K	N	I	I	I	Q	D	C	M	W	S	G	F	S	A	A	A	K			
										◊	◊	◊		◊		◊		◊		◊		◊		◊		◊		◊		◊		◊		◊		◊		◊		◊	

Tabelle 25: Verteilung der Mutationen innerhalb der MYC-TAD Box 2

Obere Zeile Nummerierung der AS im Leseraster, zweite Zeile Code der Aminosäure

◊: Replacement-Mutation □: Silent-Mutation

### 3.4.4 Auswirkungen von MYC-Mutationen auf das Gesamtüberleben

Das Auftreten von Mutationen in der Promotorregion und in den hochkonservierten MYC-Boxen 1 und 2 wurde mit den zur Verfügung stehenden Daten zum Gesamtüberleben von mBL-Patienten korreliert.

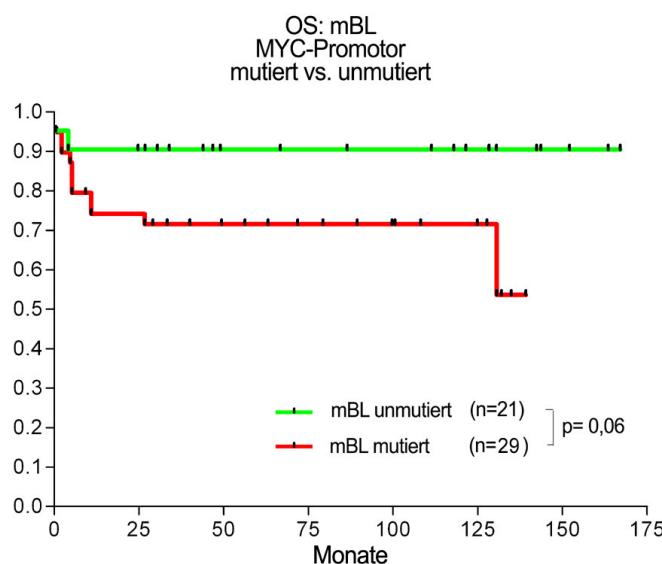


Abbildung 36:

Kaplan-Meier-Plot des Gesamtüberlebens innerhalb der Gruppe der mBL in Abhängigkeit vom MYC-Promotormutationsstatus .

Das Auftreten von Promotormutationen in der Gruppe der mBL war mit einem ungünstigeren Gesamtüberleben im Vergleich zu den unmutierten mBL assoziiert (Abb. 36). Alle Fälle mit Ausnahme von drei unmutierten wiesen eine IG-MYC-Translokation auf.

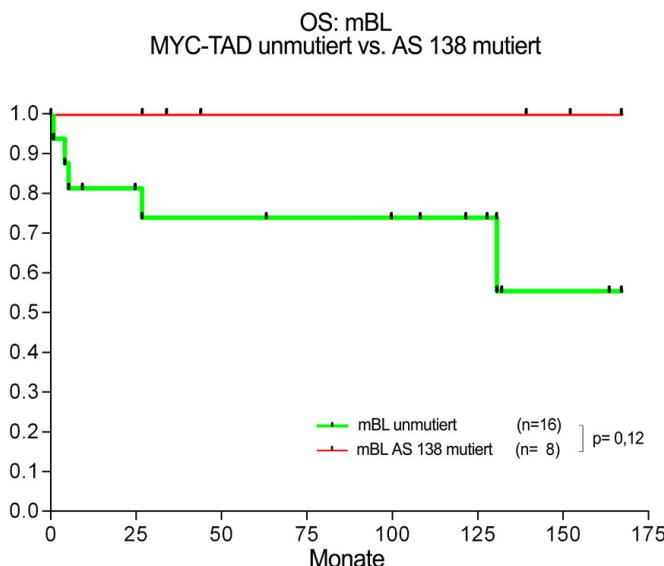


Abbildung 37:

Kaplan-Meier-Plot des Gesamtüberlebens innerhalb der Gruppe der mBL in Abhängigkeit vom MYC-TAD-Mutationsstatus und AS 138 Mutationen

Das Auftreten von Mutationen in der MYC-Box 1 zeigte keine Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens (Ergebnisse nicht abgebildet), wohingegen der Nachweis einer Mutation an AS 138 mit einer günstigen Prognose auf das Gesamtüberleben assoziiert war (Abb. 37).

### 3.5 BCL 6

#### 3.5.1 BCL6-Mutationsscreening

Von den 228 Proben des Gesamtkollektivs wurden 192 Proben für die BCL6-Mutationsanalyse verwendet. 36 Proben standen für die BCL6-Mutationsanalyse aufgrund fehlender Proben-DNA nicht mehr zur Verfügung. Für das Mutationsscreening des *Major Mutation Cluster* (MMC) in der BCL6-5`UTR im Intron 1, wurde ein Vorscreening aller Proben mit Hilfe der dHPLC durchgeführt. 192 Proben wurden mittels dHPLC analysiert, von denen 73 Proben ein unauffälliges und 119 Proben ein aberrantes Elutionsprofil aufwiesen.

#### 3.5.2 BCL6-Mutationsanalyse des Major Mutation Cluster

Die BCL6-Mutationsanalysen der mittels dHPLC identifizierten 119 Proben mit einem aberranten Elutionsprofil konnten an 113 Fällen erfolgreich durchgeführt werden (Tab. 26). 6 Proben ließen sich mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht erfolgreich sequenzieren.

Die mediane BCL6-MMC-Mutationsfrequenz im untersuchten Proben-Kollektiv betrug 0,56 %.

In der Sequenzanalyse zeigten sich 61 Proben (54,0 %) mit 1-3 Mutationen, 36 Fälle (31,9 %) mit 4-8 Mutationen je Probe und 16 Proben (14,2 %) mit mehr als 8 Mutationen.

Die Verteilung innerhalb der molekularen Gruppen (Abb. 38) zeigte eine signifikant geringere mediane BCL6-Mutationsfrequenz der Gruppe der mBL (0,28 %) im Gegensatz zu den Gruppen der non-mBL (0,56 %) oder Intermediate (0,71 %) ( $p < 0,05$ ).

Bei einer Aufteilung der non-mBL / Intermediate in die molekularen Subtypen ABC, GCB und unklassifiziert zeigte die mediane BCL6-Mutationsfrequenz keine signifikanten Unterschiede (Abb. 39).

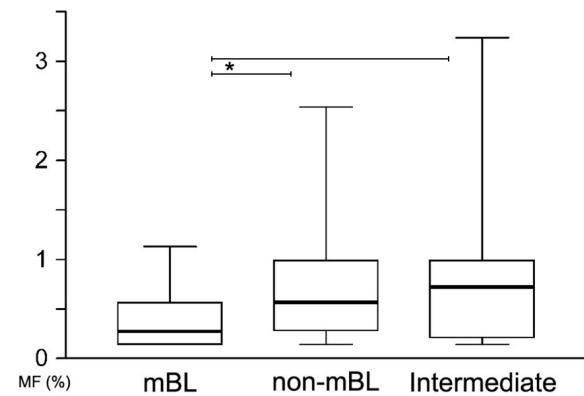


Abbildung 38: Box-Plot-Darstellung der BCL6-MMC-Mutationsfrequenz innerhalb der molekularen Subgruppen. (\*): $p < 0,05$

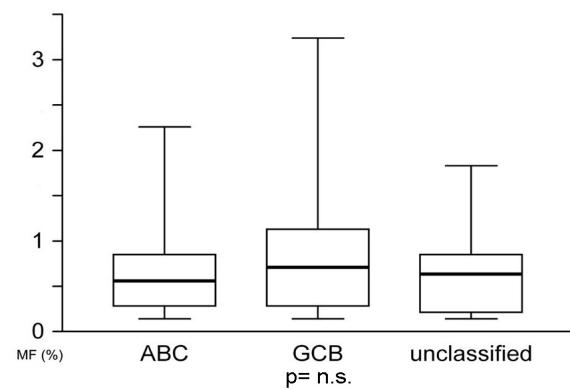


Abbildung 39: Box-Plot-Darstellung der BCL6-MMC-Mutationsfrequenz innerhalb der molekularen Subtypen der non-mBL / Intermediate.  $p = 0,96$

BCL6-Intron 1 Sequenzierung	molekulare Gruppe			Gesamt				
	mBL	non-mBL	Intermediate					
Gesamt (n)	38	109	39	186				
davon mutiert (n)	<b>20</b> 52,6 %	<b>69</b> 63,3 %	<b>24</b> 60,7 %	<b>113</b> 60,7 %				
mediane MF (%) der mutierten Fälle	<b>0,28</b>	<b>0,56</b>	<b>0,71</b>	<b>0,56</b>				
Mittlere Mutationsrate ( $\times 10^{-3}/\text{bp}$ )	3,6	7,8	7,8	7,4				
Wright-Klassifikator	-	ABC	GCB	unkla.	ABC	GCB	unkla.	
Anzahl mutiert	20	25	26	18	4	18	2	
BCL6-Bruch (%)	0	8,0	30,8	22,2	0	11,1	50	
mediane MF (%)	0,28	0,56	0,56	0,56	0,35	0,92	n.a.	

Tabelle 26: Ergebnisse der BCL6-Mutationsanalyse in den molekularen Gruppen und Subtypen

Die insgesamt 541 charakterisierten Punktmutationen in der hier untersuchten Region des MMC der BCL6-5' UTR betrafen am häufigsten die Base G (G>C>T>A) und zeigen etwas häufiger Transversionen (53 %) als Transitionen (47 %). Zwei Proben wiesen Deletionen auf ( $\Delta 13$  bp,  $\Delta 75$  bp). Die 541 Mutationen verteilten sich über die gesamte untersuchte Region und ließen vier Mutationscluster erkennen, die eine > 2-fache Mutationsrate als die Gesamtregion aufwies (im Mittel  $7,4 \times 10^{-3}/\text{Base}$ ; Abb. 40).

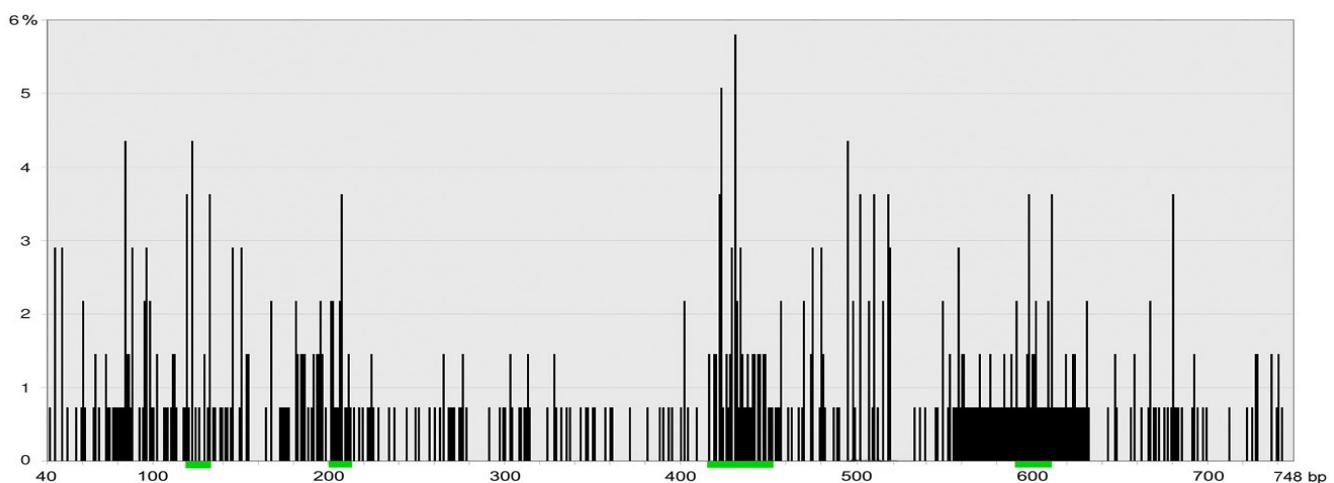


Abbildung 40:

Verteilung der 541 gefundenen Mutationen im 748 bp langen Abschnitt des MMC (BCL6-5' UTR) von 113 Proben in %. Darstellung ohne die bekannten Polymorphismen an Pos. 123, 397, 502 und 520. Grün: vier Mutationscluster mit einer mindestens 2-fach höheren Mutationsrate als in der gesamten MMC-Region.

Bei Betrachtung der Verteilung der Mutationen (Abb. 40) innerhalb der molekularen Subgruppen, waren ausschließlich die GCB-Fälle für die Clusterbildung verantwortlich. Während die Fälle der mBL oder ABC eine zufällige Verteilung der Mutationen im Untersuchungsbereich aufwiesen, waren nur die Fälle der GCB von einer erhöhten Mutationsrate von  $> 1,5 \times 10^{-2}/\text{Base}$  in den definierten Clustern I-IV betroffen (Tab.27).

BCL6 5`UTR MMC	Position (bp)	Mutationsrate ( $\times 10^{-2}/\text{bp}$ )
Cluster I	119-132	1,50
Cluster II	201-212	1,69
Cluster III	416-457	1,58
Cluster IV	590-611	1,64
Gesamt	40-748	0,74

Tabelle 27: Mutationscluster innerhalb der BCL6-MMC-Region mit einer mindestens 2-fach höheren Mutationsrate im Vergleich zur mittleren Mutationsrate. Referenz-Sequenz: NT\_005612

Die Auswertung der vier bekannten Polymorphismen im BCL6-MMC zeigte folgende Verteilung: Position 123 (C>T; 10,6 % der Fälle), Position 397 (C>G, 21,2 %), 502 (A>G; 4,4 %) und 520 (del T; 25,7 %).

### 3.5.3 Korrelation des BCL6-Mutationsstatus mit der mRNA-Expression

Die Korrelation der BCL6-mRNA-Expression mit dem BCL6-Status (mutiert / unmutiert) zeigte keinen signifikanten Zusammenhang beider Parameter (Abb. 41). Es konnte lediglich ein schwacher Trend zu einer höheren BCL6-mRNA-Expression in Fällen mit BCL6-Mutationen beobachtet werden ( $p= \text{n.s.}$ ).

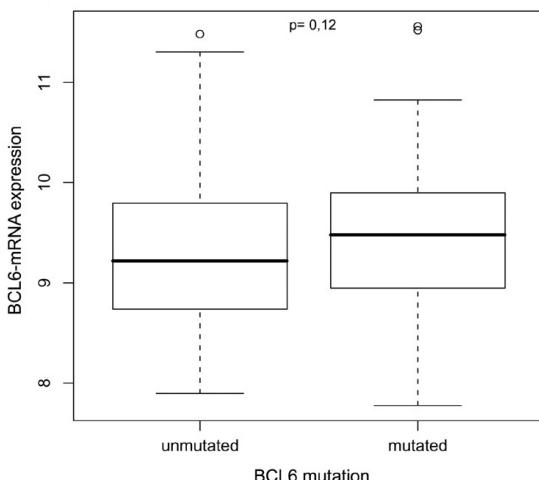
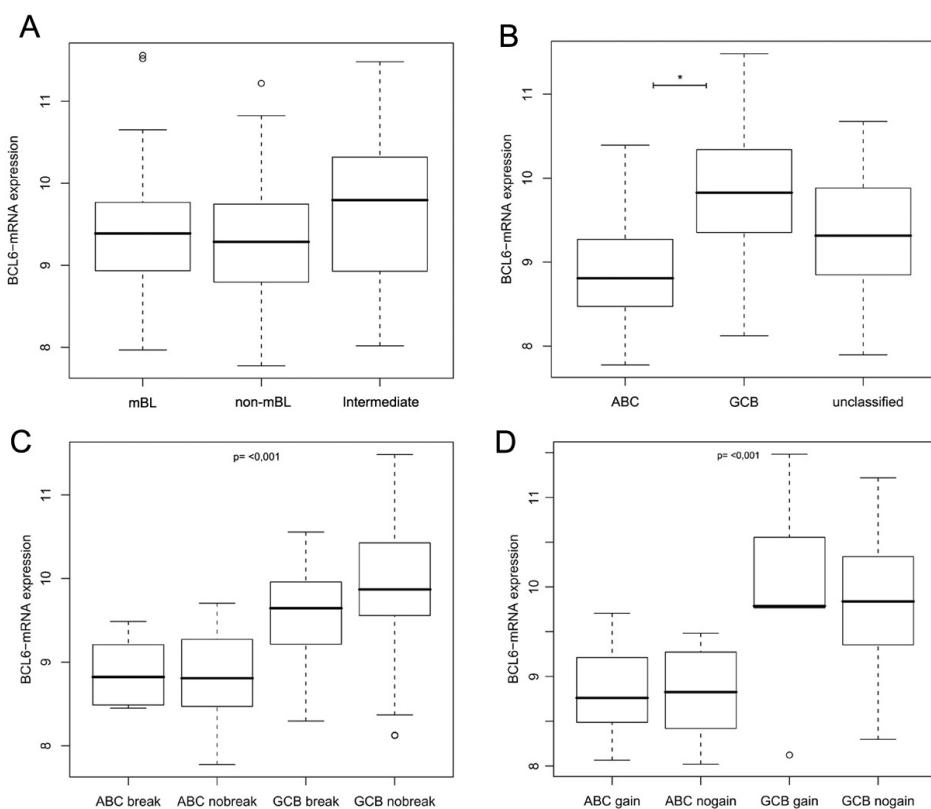


Abbildung 41: Box-Plot-Darstellung der normalisierten BCL6-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der BCL6-Mutationsfrequenz. ( $p= \text{n.s.}$ )

### 3.5.4 BCL6-mRNA-Expression innerhalb der molekularen Gruppen

Die anhand der Genexpression erhobenen Daten zur BCL6-mRNA-Expression zeigten innerhalb der molekularen Subgruppen keine Unterschiede (Abb. 42 A). Nur die Intermediate wiesen eine vergleichsweise leicht erhöhte BCL6-mRNA-Expression ( $p= 0,07$ ) auf. Die anhand des Wright-Klassifikators definierten Subtypen ABC / GCB und unklassifiziert zeigten einen deutlichen Unterschied in der BCL6-mRNA-Expression mit einer signifikant höheren Expression in der Gruppe der GCB ( $p < 0,001$ ; Abb. 42 B).



**Abbildung 42:** Box-Plot-Darstellung der normalisierten BCL6-mRNA-Expression des Gesamtkollektivs im Vergleich zur:  
**A:** mol. Gruppe,  $p= 0,07$     **B:** Subtyp ABC/GCB,  $p < 0,001$   
**C:** BCL6-Bruch,  $p < 0,001$     **D:** Zugewinn 3q27,  $p < 0,001$

Durch Amplifikationen auf dem Chromosom 3q27 sowie einer BCL6-Translokation kann es zu einer veränderten BCL6-Expression kommen; daher wurde die BCL6-mRNA-Expression mit dem Nachweis eines BCL6-Bruches (Abb. 42 C) oder mit 3q27-Zugewinnen (Abb. 42 D) korreliert. Innerhalb der klar definierten ABC- und GCB-Subtypen zeigten diese chromosomal Veränderungen keinen signifikanten Einfluss auf die BCL6-mRNA-Expression. Einzig der Parameter des Wright-Klassifikators war für die Höhe der mRNA-Expression entscheidend.

### 3.5.5 Bcl6: Proteinexpression im Vergleich zur mRNA Expression

Im Rahmen der immunhistochemischen Diagnostik der Verbundfälle wurde eine Bcl6-Proteinfärbung durchgeführt. Es wurde eine Klassifizierung in 5 Kategorien vorgenommen, die auf der Expressionsstärke der Anti-Bcl6-Färbeintensität in Gewebe schnitten basiert (0 = fehlend (0 %), 1 bis 4 entspricht der Klassifizierung in Quartilen; 1-100 % Färbeintensität). Die Analysen wurden im Rahmen des MMML-Projektes erhoben und im Verbund zur Verfügung gestellt.

Die BCL6-mRNA-Expression korrelierte hoch signifikant mit den Ergebnissen der Bcl6-Proteinfärbung und folglich der Bcl6-Proteinexpression (Abb. 43).

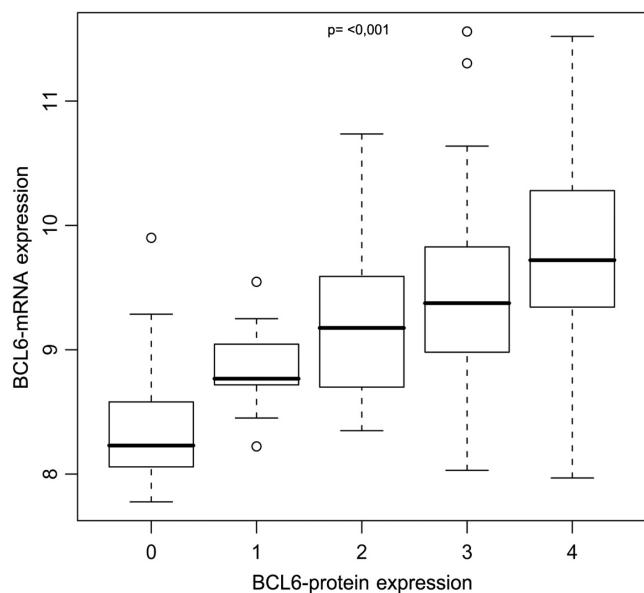


Abbildung 43:

Box-Plot-Darstellung der normierten BCL6-mRNA-Expression gegen die immunhistochemisch definierten 5 Klassen der Bcl6-Proteinexpression

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der BCL6-mRNA-Expression wurde in weiteren Berechnungen die Bcl6-Proteinexpression weder durch das Ereignis einer BCL6-Translokation noch von 3q27-Zugewinnen oder BCL6-Mutationen beeinflusst.

### 3.5.6 BCL6: Mutationen und Translokationen in Korrelation mit dem Gesamtüberleben

Anhand der innerhalb des Verbundprojektes zur Verfügung stehenden klinischen Daten zum Gesamtüberleben innerhalb des Patientenkollektivs konnten die verschiedenen BCL6-Aberrationen hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz untersucht werden. Der Nachweis von BCL6-Mutationen sowie das Vorhandensein eines BCL6-Bruchs wurde mit dem Gesamtüberleben in den molekularen Subgruppen korreliert und als Kaplan-Meier-Plot dargestellt. In Abbildung 44 A ist zu erkennen, dass für die Gruppe der mBL-Mutationen des BCL6-MMC keine prognostische Bedeutung haben.

Innerhalb der Gruppe der non-mBL / Intermediate (Abb. 44 B) zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Parameter der ABC / GCB-Signatur und dem Gesamtüberleben dieser Patienten (17,1 Monate bzw. 39,8 Monate medianes Gesamtüberleben;  $p= 0,014$ ; Abb. 44 B).

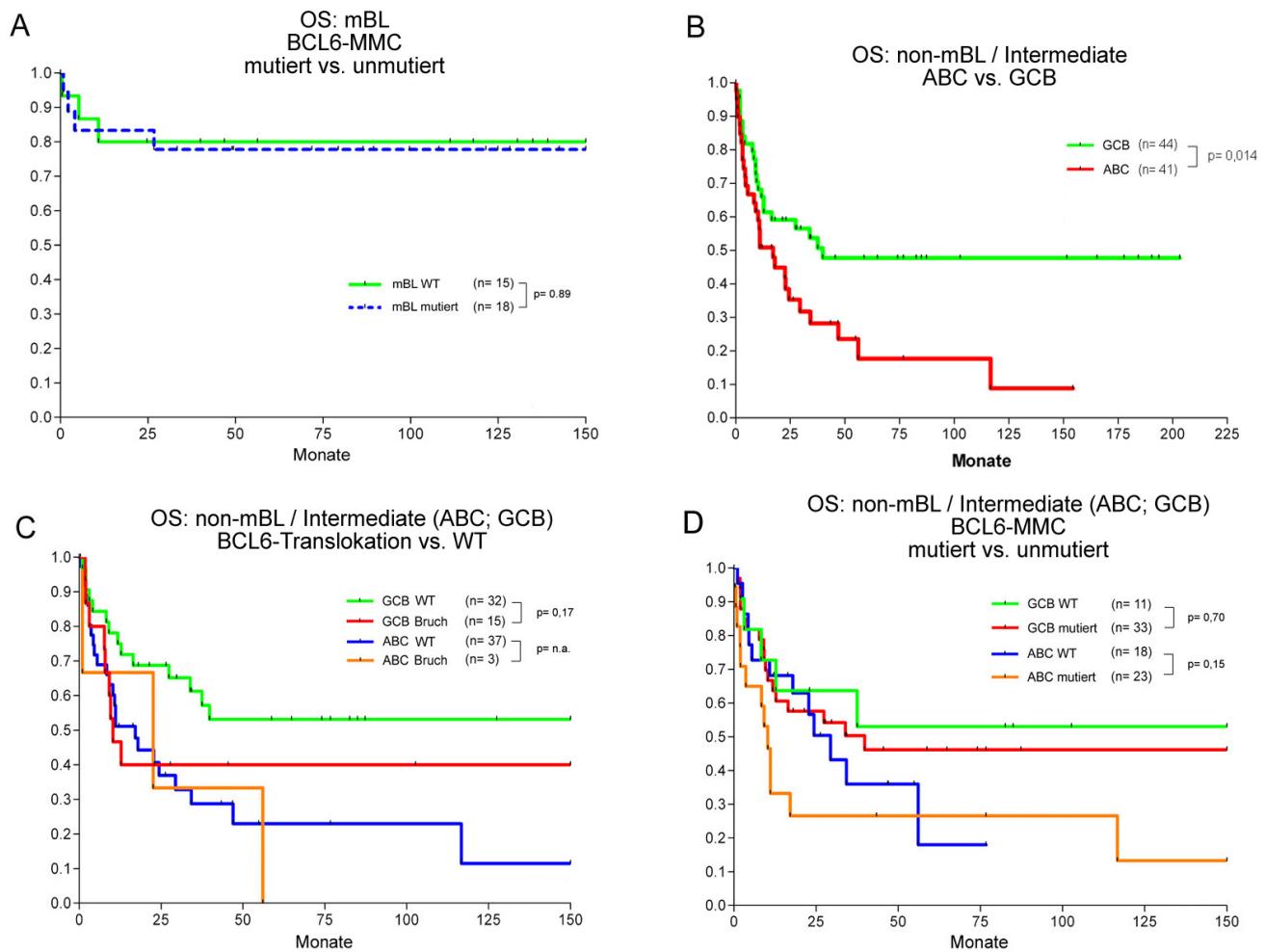


Abbildung 44:

- A:** Darstellung des Gesamtüberlebens (Kaplan-Meier-Plot) innerhalb der Gruppe der mBL in Abhängigkeit vom BCL6-5'UTR-Mutationsstatus.
- B:** Gesamtüberleben der non-mBL / Intermediate, abhängig von der ABC / GCB-Signatur.
- C:** Darstellung des Gesamtüberlebens innerhalb der Gruppe der non-mBL / Intermediate, getrennt nach ABC- / GCB-Signatur in Abhängigkeit vom Nachweis einer BCL6-Translokation.
- D:** Darstellung des Gesamtüberlebens innerhalb der Gruppe der non-mBL / Intermediate, getrennt nach ABC- / GCB-Signatur in Abhängigkeit vom BCL6-MMC-Mutationsstatus.

Das Ereignis eines BCL6-Bruches sowie das Auftreten von Mutationen hatte auf das Gesamtüberleben der betroffenen Patienten keine signifikante Auswirkung (Abb. 44 C und D). Die Fälle der GCB mit einem BCL6-Bruch hatten eine etwas schlechtere Prognose, die aufgrund der geringen Fallzahlen jedoch nicht signifikant ist (Abb. 44 C). In Abhängigkeit vom BCL6-Mutationsstatus (Abb. 44 D) haben ABC-Fälle mit BCL6-Mutationen eine schlechtere Prognose. Dies stellte aber aufgrund der

geringen Fallzahlen nur einen Trend dar. Die Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens im untersuchten Kollektiv zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der ABC-/ GCB-Signatur; die Keimzentrumssignatur (GCB) war mit einem deutlich günstigeren Gesamtüberleben assoziiert. Der Nachweis von Mutationen oder Translokationen des BCL6-Gens waren von untergeordneter prognostischer Bedeutung.

## 3.6 REL

### 3.6.1 REL-Mutationsscreening

Von den insgesamt 228 DNA-Proben konnte an 183 Proben ein dHPLC-Mutationsscreening des REL-Gens (REL Exon 10) durchgeführt werden. Von diesen 183 untersuchten Proben zeigten 139 (76,0 %) ein unauffälliges Elutionsprofil und wurden als unmutiert / negativ eingestuft (Tab. 28). 37 Fälle (20,2 %) fielen durch eine veränderte Retentionszeit (Shift) auf. 7 Fälle (3,8 %) wiesen ein aberrantes Elutionsprofil (positiv) auf, dass sich in 2 bis mehreren Elutionspeaks darstellte.

REL-Exon 10 dHPLC	negativ	Shift	positiv	Summe
Anzahl Proben	139 (76,0 %)	37 (20,2 %)	7 (3,8 %)	183

Tabelle 28: Ergebnisse der dHPLC-Messungen des REL-Exon 10 von 183 Proben

### 3.6.2 REL-Mutationsanalyse

Alle 44 Fälle mit einem aberranten Elutionsprofil (Shift oder positiv) in den dHPLC-Messungen wurden zur Überprüfung direkt sequenziert. In keiner der Proben mit einer veränderten Retentionszeit (Shift) im dHPLC-Elutionsprofil konnte mittels Direktsequenzierung eine Mutation in REL-Exon 10 nachgewiesen werden. Mit Hilfe der dHPLC ist es möglich, Mutationen zuverlässig bis zu einem Anteil von 10 % in der Proben-DNA nachzuweisen. Aus diesem Grund wurden von allen dHPLC-positiven sowie 15 der oben genannten Shift-Proben Klonierungsexperimente zur Sequenzvereinzelung durchgeführt, um auch unterrepräsentierte Subklone mit Mutationen detektieren zu können. Bei jeder PCR-Probe wurden je Klonierung 12 einzelne Klonkolonien ausgewählt; die DNA wurde mittels einer Plasmidpräparation extrahiert und sequenziert. Die Analyse der 15 Shift-Proben lieferte keine Anhaltspunkte für Mutationen. Von den insgesamt sieben Proben mit einem initial aberranten Elutionsprofil in der dHPLC konnte in vier Fällen eine Punktmutation in der untersuchten Region nachgewiesen werden. Für drei Fälle mit aberranten Elutionsprofilen konnte mit den zur Verfügung

stehenden Mitteln keine Mutation nachgewiesen werden. Die Ursache für die veränderten Elutionsprofile ist bisher unklar.

Von den vier Fällen mit nachgewiesenen Mutationen konnte in zwei Fällen eine identische Punktmutation charakterisiert werden. Im Elektropherogramm von zwei Proben (103-92 und 224-92) zeigte sich an Aminosäuren-Position 525 ein Doppelpeak durch die sich überlagernden Basen C und T (Abb. 45). Diese Basenveränderung bewirkt im Leseraster einen Aminosäurenaustausch von Wildtyp-Serin -S- (WT) zur Mutation-Prolin -P- (Mut). Diese Veränderung wird durch die Beschreibung der Mutation als S525P ausgedrückt.

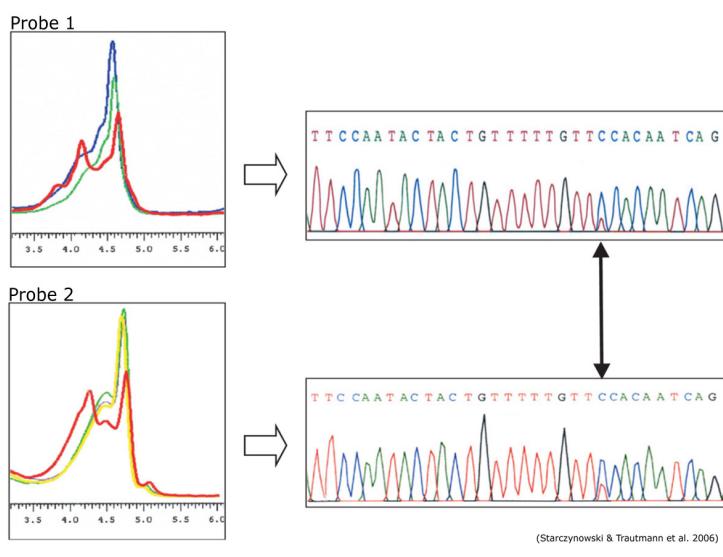


Abbildung 45: dHPLC-Messungen der Proben 103-92 (Probe 1) und 224-92 (Probe 2) sowie die zugehörigen Elektropherogramme der Direktsequenzierung von REL-Exon 10.

Links: Beide Fälle zeigten in der dHPLC-Messung eine deutlich veränderte Elutionskurve (Rot) im Vergleich zu den unmutierten WT-Kontrollen (Gelb, Grün, Blau)

Rechts: Die Sequenzierung von REL-Exon 10 zeigte im Elektropherogramm einen Doppelpeak von C und T im Codon 525. Im Leseraster führt diese Mutation zu einem Aminosäurenaustausch des Codons 525 von TCA-Serin (WT) zu CCA-Prolin (Mut).

(Starczynowski & Trautmann et al. 2006)

Zusätzlich wurden in zwei weiteren Proben (MPI-024 und MPI-205) Mutationen im REL-Exon 10 detektiert. MPI-024 wies eine Mutation (REL-T401A) und MPI-205 zwei Mutationen (REL-S354A und REL-I430T) auf.

Histologisch handelte es sich bei Probe 103-92 um ein mediastinales B-Zell-Lymphom, bei Probe 224-92 um ein folliculäres Lymphom (Tab. 29) mit komplexen Veränderungen des Karyotyps. Bei MPI-024 sowie MPI-205 handelte es sich jeweils um ein DLBCL. In den weiterführenden Untersuchungen wurde die Analyse auf die REL-S525P-Mutation beschränkt, da es aus der Arbeitsgruppe von T.D. Gilmore in Boston Hinweise darauf gab, dass diese Mutation mit einer veränderten Transformationsaktivität von Rel in Verbindung stehen könnte.

### 3.6.3 Charakterisierung der REL-S525P-Mutation

In beiden REL-S525P mutierten Fällen wurde mittels quantitativer allelischer Diskriminierung eine Überrepräsentation des mutierten REL-Gens im Verhältnis 85:15 bei

Probe 103-92 bzw. 75:25 in Probe 224-92 nachgewiesen. Um zu untersuchen, ob es sich um eine Keimbahnmutation des REL-Exon 10 handelt, konnte von Probe 103-92 zusätzlich Gewebe aus dem diagnostischen Lymphknoten ohne Nachweis einer Lymphominfiltation untersucht werden. Die DNA-Probe des möglichst tumorfreien Gewebes wies ebenfalls die REL-Mutation S525P im gleichen Verhältnis auf. Von Probe 224-92 stand in den Sammlungen der teilnehmenden pathologischen Institute sowie in den initial beteiligten Kliniken kein zusätzliches Vergleichsmaterial zur Verfügung.

Probe Nr.	B-Zell-Lymphom	AS 525 Codon	Alter bei Diagnose	Relation Mut:WT Allel	Keimbahn-mutation	Karyotyp
103-92	Mediastinal	TCA>CCA	24	85:15 <sub>a</sub>	Ja	50,XX,+X,der(8)t(8;10(q24;q21), +9,+9,+21,+2mar[11]/51, idem, +5[3]/46,22]
224-92	Follikulär	TCA>CCA	56	75:25	ND	47,XX,+X,der(3)t(1;3(q12;q27), del(6)(q11), del(13)(q12-13q33), t(14;18)(q32;q21)[7]/46,XX[11]

<sub>a</sub>: Im peripheren Blut betrug die Relation von Mut:WT 50:50

Tabelle 29: Charakterisierung der Fälle mit einer REL-S525P-Mutation

Zur Abklärung eines möglichen Polymorphismus an AS-Position 525 wurde eine umfassende Datenbankanalyse (Single Nucleotide Polymorphism Datenbank; UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) durchgeführt. In publizierten Sequenzen sowie SNP-Datenbanken wurde bisher kein derartiger Polymorphismus beschrieben. Als Kontrolle wurden zu den initial untersuchten 183 Proben zusätzlich 166 DNA-Proben einer gesunden Kontrollgruppe analysiert. Es ließ sich bei keinem der untersuchten DNA-Materialien ein Polymorphismus von REL an der Position AS 525 nachweisen.

	508	525	537
Mensch	SSSMS-AGANSNTTVFV <b>S</b> QSD-AFEGSDFS		
Schimpanse	SSSMS-AGANSNTTVFV <b>S</b> QSD-AFEGSDFS		
Ratte	TASMSAAGTSS-SSVFV <b>S</b> QSD-TFNRPHFS		
Maus	PASLS-AGTSS-SSVFV <b>S</b> QSD-AFDRSNFS		
Huhn	AACPPVAAPGS--TPFSS <b>Q</b> PNLADTAVYNS		
Truthahn	ATCPPGSAWQH--S-FSS <b>Q</b> PNVADRAVY-S		

↓  
P

Abbildung 46: Alignment des humanen c-REL Darstellung der REL-AS 508-537 von verschiedenen Spezies. Das konservierte Serin 525 ist in Rot, das durch die Mutation S525P kodierte Prolin (P) ist in Blau dargestellt.

Die beschriebene Mutation und der daraus resultierende Austausch der Aminosäure Serin zu Prolin an AS-Position 525 liegt im Bereich der konservierten REL-TAD. Die Aminosäuresequenz der REL-TAD variierte sowohl zwischen verschiedenen Rel-Proteinen einer Art als auch phylogenetisch sehr stark; die AS 525 jedoch ist über zahlreiche Spezies hinweg hoch konserviert (Abb. 46).

### 3.6.4 Funktionelle Untersuchungen von S525P

#### 3.6.4.1 REL-Mutationsvarianten

Die experimentellen Arbeiten zur funktionellen Bedeutung der charakterisierten REL-S525P-Mutation wurden in Kooperation mit Daniel Starczynowski und Thomas. D. Gilmore (Boston University, USA) durchgeführt. Die Planung, Konzeptionierung und Auswertung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Daniel Starczynowski; die Ergebnisse dieser Zusammenarbeit wurden gemeinsam publiziert (Starczynowski & Trautmann *et al.*, 2007).

Es wurde zunächst untersucht, ob die neu charakterisierte REL-S525P-Mutation funktionelle Auswirkungen auf die transformierende Aktivität von Rel hat. Dazu wurden Experimente (*Liquid Outgrowth Transformation Assay*; Gilmore *et al.*, 2001) mit Wildtyp-REL, einer künstlichen REL-Deletionsmutante (REL  $\Delta$ 424-490) und der zuvor beschriebenen REL S525P-Mutante durchgeführt.

Die künstliche Deletionsmutante REL  $\Delta$ 424-490 zeichnet sich durch den Verlust der gesamten Subdomäne I der REL-TAD aus (Abb. 47). Diese REL  $\Delta$ 424-490 Mutation hat in vorhergehenden *in vitro*-Experimenten an Hühner-Milzzellen bereits eine deutlich erhöhte transformierende Aktivität gezeigt (Starczynowski *et al.*, 2003) und wurde in dieser Versuchsreihe u.a. als Positiv-Kontrolle verwendet.

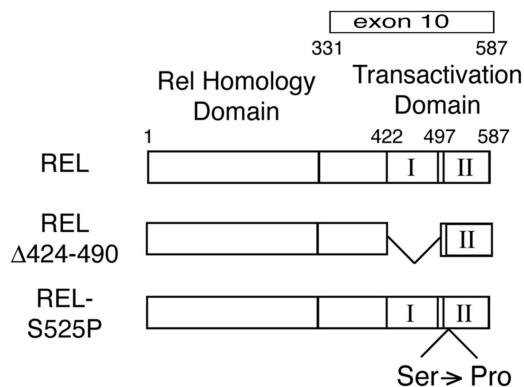


Abbildung 47: Schematische Darstellung der untersuchten REL-Varianten in den Transformationsversuchen. AS 422-587 der C-terminalen Domäne beinhaltet zwei transaktivierende Subdomänen, Subdomäne I (AS 422-497) und Subdomäne II (AS 518-587) (Starczynowski *et al.*, 2003). Oben die REL-Wildtyp Form (AS 331-587). Bei der mittleren REL  $\Delta$ 424-490 Variante fehlt die gesamte TAD-Subdomäne I. REL-S525P hat einen einzelnen AS-Austausch am Anfang der Subdomäne II von Serin zu Prolin.

#### 3.6.4.2 Transformierende Aktivität verschiedener REL-Varianten

In einem Transformationsassay mit Hühner-Milzzellen zeigte sich, dass die neue Variante REL-S525P sowie die Deletionsvariante REL-Δ424-490 im Vergleich zu Wildtyp-REL eine signifikant höhere transformierende Aktivität bewirkten (Tab. 30). In mehreren Versuchsreihen betrug die durchschnittliche Transformationsdauer von REL-S525P-transfizierten Hühner-Milzzellen 17,5 Tage, von REL-Δ424-490-transfizierten Zellen 15,3 Tage und von WT-REL-transfizierten Zellen 19,5 Tage.

Transfizierte REL-Variante	Mittlere Anzahl der Tage bis zur Transformation	Relative Dauer bis zur Transformation in %
REL WildTyp	19,5 $\pm$ 0,7	100 $\pm$ 2,3
REL $\Delta$ 424-490	15,3* $\pm$ 0,7	76,7 $\pm$ 2,2
REL S525P	17,5* $\pm$ 0,7	86,5 $\pm$ 2,9

Tabelle 30: Transformationsgeschwindigkeit von Hühner-Milzzellen

Die erste Spalte beschreibt die transfizierte REL-Variante, Spalte zwei gibt die mittlere Transformationsdauer aus sieben unabhängigen Experimenten in Tagen an. Die dritte Spalte gibt die normierte Transformationsdauer relativ zum WT-REL (=100%) an. Ergebnisse als Mittelwerte +/- : Standardfehler, (\*): $p < 0,05$

Kontrolluntersuchungen zur Lokalisation der Rel-Proteine im Zellverbund ergaben, dass sich die transfizierte REL-S525P-Variante hinsichtlich der Menge und Lokalisation des Rel-Proteins nicht von WT-REL unterschied. Durch eine Anti-Rel Immun-Fluoreszenzfärbung (Abb. 48) konnten keine Unterschiede in den transfizierten Hühner-Milzzellen nachgewiesen werden.

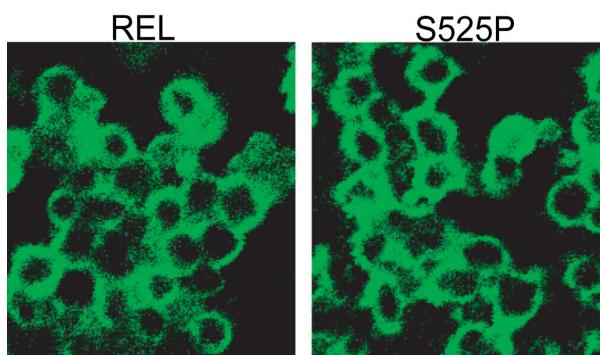


Abbildung 48:  
Anti-Rel-Immunfluoreszensfärbung

Auch die Menge an Rel-Protein innerhalb des Nukleus war bei WT-REL und S525P vergleichbar (Abb. 49). Kernextrakte der WT-REL Zellen sowie der transfizierten S525P-Zelllinie zeigten im Anti-Rel Western-Blot gleiche Signalintensitäten. Dies ergab keine Hinweise auf eine veränderte Rel-Proteinmenge im Kern.

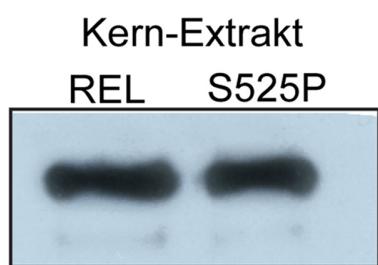


Abbildung 49: Kern-Extrakte von WT-REL- und REL-S525P-transfizierten Hühnermilzzellen in einem Anti-Rel Western-Blot

### 3.6.4.3 Rel-vermittelte Transkriptionsaktivierung

Drei verschiedene Expressionsassays wurden mit Reporter-Plasmiden (s. Anhang) durchgeführt, die unterschiedliche κB-Bindungsstellen ( $\text{IkB}\alpha$ ,  $3\text{x-}\kappa\text{B}$ ,  $\text{SOD2}$ ) enthielten. Diese Versuche wurden in drei transienten Transfektionsassays an der humanen, embryonalen Nierenzelllinie A293 durchgeführt.

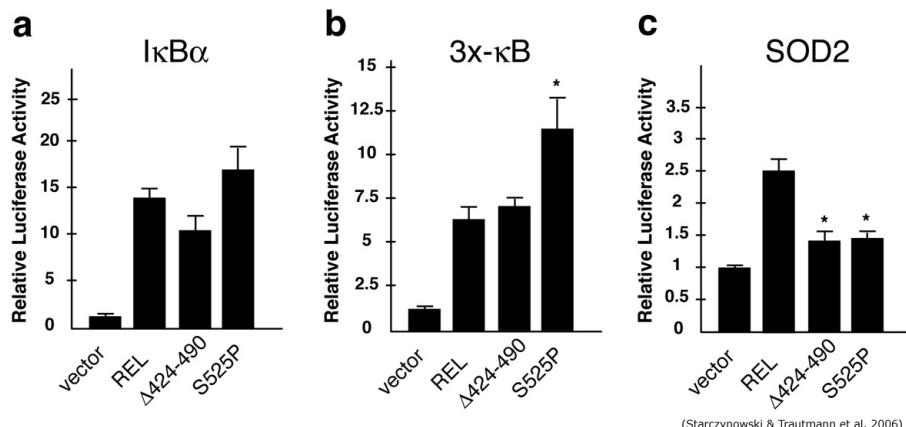


Abbildung 50: Auswirkungen auf die Rel-vermittelte Transkriptionsaktivierung

(a-c)  $\kappa\text{B}$ -Reportergen-Experimente wurden mit den angegebenen Luziferase-Gen-Kassetten in transfizierten A293-Zellen durchgeführt. Die Luziferase-Aktivität wurde auf den Leer-Vektor (= 1,0) normalisiert. Die angegebenen Werte stammen aus drei unabhängigen Triplikat-Messungen. Ergebnisse als Mittelwerte mit Fehlerbalken (Standardfehler). (\*):  $p < 0,05$

In der untersuchten A293-Zelllinie zeigte REL-S525P im Vergleich zu WT-REL in zwei der drei  $\kappa\text{B}$ -Promotorsystemen signifikante Unterschiede in der Fähigkeit der Transaktivierung. WT-REL, REL- $\Delta 424-490$  und REL-S525P transaktivierten den  $\text{IkB}\alpha$ -Promotor in vergleichbarem Ausmaß; REL-S525P aktivierte den multimeren (3X)  $\kappa\text{B}$ -Promotor nahezu zweimal stärker als WT-REL oder REL- $\Delta 424-490$  (Abb. 50 a,b). Im Gegensatz zu WT-REL waren REL- $\Delta 424-490$  und REL-S525P signifikant schwächer (minus 65%) zur Transaktivierung des menschlichen Superoxid-Dismutase ( $\text{SOD2}$ )-Promotors in der Lage (Abb. 50 c).

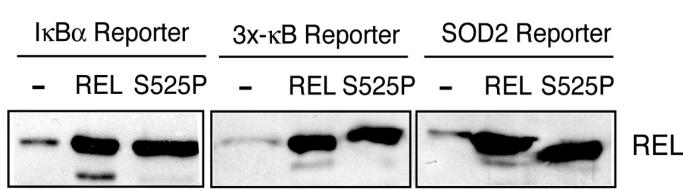


Abbildung 51: Anti-Rel Western Blot

Zellextrakte der mit Vektor (-), WT-REL- oder REL-S525P transient transfizierten A293-Zellen der  $\text{IkB}\alpha$ -,  $3\text{x-}\kappa\text{B}$ - und  $\text{SOD2}$ -Reportergen-Kassetten in einem Anti-Rel Western Blot

Vergleichende Western-Blot-Messungen an gepoolten Zellextrakten der mit WT-REL oder REL-S525P transient transformierten A293-Zellen zeigten bei den drei einzelnen

Reporter-Gen-Versuchen, dass WT-REL und REL-S525P nahezu auf gleichem Niveau exprimiert wurden (Abb. 51).

Der Gehalt an Mangan-Superoxid-Dismutase-Protein (MnSod) wurde mittels Western-Blot bestimmt, um zu untersuchen, ob sich die in Abbildung 50 c dargestellte reduzierte Aktivierung des SOD2-Promotors auch in der Expression des endogenen SOD2-Gens und damit dem Proteingehalt in der Zelle widerspiegelt. Als weitere Kontrolle wurde eine mit REL-S533,536A stabil transformierte Zelllinie verwendet, die zuvor in verschiedenen Transformations- und Transaktivierungsversuchen ein mit WT-REL vergleichbares Expressionsmuster gezeigt hat (Martin *et al.*, 2001; Starczynowski *et al.*, 2005).

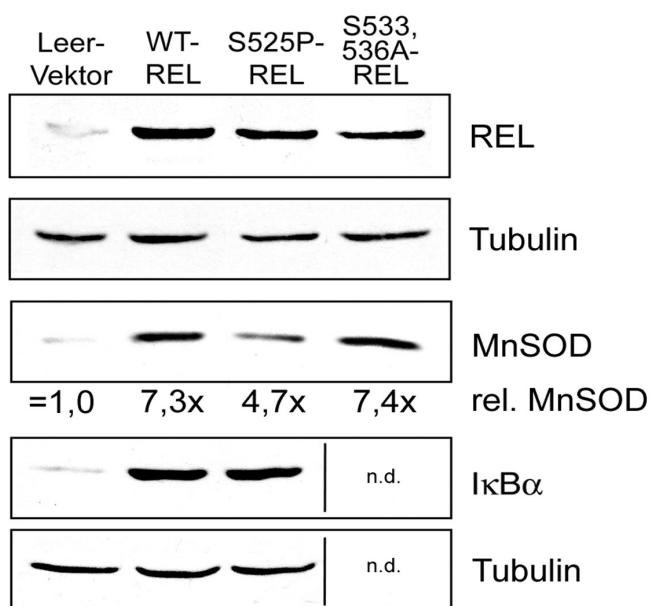


Abbildung 52: MnSOD-Proteinexpression in A293-Zellen

Anti-Rel, -MnSOD und -IkBa Western Blots; Tubulin als interne Kontrolle (= 100 %).

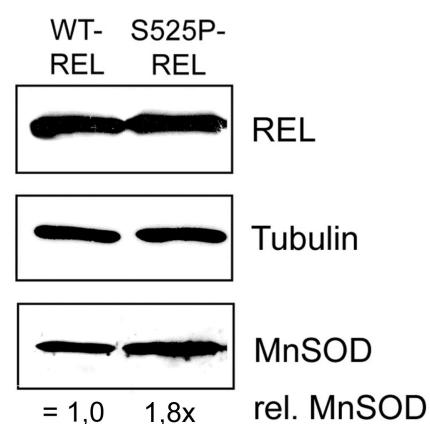


Abbildung 53: MnSOD-Proteinexpression in Hühner-Milzzellen

Anti-Rel und Anti-MnSOD Western Blots; Tubulin als interne Kontrolle (= 100 %).

Der Gehalt an MnSod-Protein in den REL-S525P überexprimierenden A293-Zellen war im Vergleich zu Zellen, die nur mit dem Vektor (=1) transfiziert wurden, 4,7-mal höher; der MnSod-Gehalt in den mit WT-REL oder REL-S533,536A transfizierten Zellen war 7,5-fach erhöht (Abb. 52 oben).

Die Menge an nachweisbarem IkBa-Protein in den mit WT-REL oder REL-S525P transfizierten A293-Zellen lag auf gleichem Niveau (Abb. 52 unten).

Die REL-S525P überexprimierenden Hühner-Milzzellen zeigten hingegen ein anderes Bild. Der Gehalt an MnSod-Protein war im Vergleich zu WT-REL-transfizierten Zellen 1,8-fach erhöht (Abb. 53).

### 3.6.4.4 REL-Serin 525 als IKK-Zielsequenz

REL-Serin 525 liegt innerhalb einer AS-Sequenz, die der Serin-Kinase (IKK) Zielsequenz (Konsensussequenz: SxxD, s. Tabelle 31) zahlreicher bekannter Phosphorylierungsstellen von NF-κB gleicht. So ähnelt sie z.B. einer Phosphorylierungsstelle innerhalb des IκBa-Inhibitors (Ser32, Ser36) oder dem verwandten NFκB RelA/p65 (Ser536).

Protein	AS-Sequenz	Position
WT-REL	TVFVS <u>QSD</u>	Ser525
Rel-A / p65	EDF <u>S</u> IA <u>D</u>	Ser536
IκBa	<u>S</u> GL <u>D</u> SMK <u>D</u> E	Ser32, Ser36
Konsensus	<u>S</u> XX <u>D</u>	

Tabelle 31: Beispiele der bekannten Proteinzielsequenzen der Serin-Kinase IKK

Die Mutation REL-S525P könnte somit den Verlust einer Phosphorylierungsstelle der Serin-Kinase bedeuten. Um der Frage nachzugehen, ob REL-Ser525 ein Substrat für die IKK-vermittelte Phosphorylierung ist, wurden *Immunkomplex-Kinase-Assays* durchgeführt. Hierzu wurde aus den transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen A293 mit FLAG-Epitopen (N-DYKDDDDK-C) markierte IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  gewonnen und jeweils deren Fähigkeit untersucht, GST-REL- oder GST-REL-S525A-Konstrukte (AS 500-530) in einem Immunkomplex-Kinase-Assay zu phosphorylieren (Abb. 54). Als Kontrolle wurde ein GST-REL-S525A-Konstrukt gewählt, bei dem das potentielle Phosphorylierungsziel REL-Ser525 durch Alanin (A) ersetzt wurde.

Hierbei phosphorylierten Flag-IKK $\alpha$  sowie Flag-IKK $\beta$  das GST-REL-Konstrukt, aber nicht GST-REL-S525A (Abb. 54). Eine Kontrollfärbung des GST-REL- und GST-REL-S525A SDS-Gels mit Coomassie Blau (CB) zeigte, dass in den A293-Zellen gleiche Mengen an GST-Rel-Proteinen sowie der FLAG-IKK Proteine exprimiert wurden (Abb. 54).

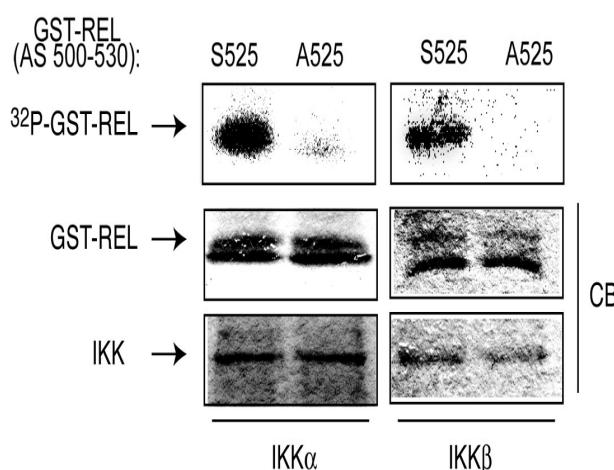


Abbildung 54: REL Ser525 als Ziel der IKK $\alpha$ - und IKK $\beta$ -Phosphorylierung

A293 Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für FLAG-IKK $\alpha$  und FLAG-IKK $\beta$  transfiziert. Ein Kinase-Assay mit GST-REL oder GST-REL-S525A (AS 500-530) als Substrat wurde mit anti-FLAG Immuno-Präzipitaten durchgeführt. Die Kinase-Reaktionen wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt, mittels Phosphoimager analysiert (oben) und mit Coomassie-Blau (CB) gefärbt. Die CB-Färbung zeigt eine gleichverteilte Beladung des Gels an. Das jeweilige  $^{32}$ P-GST-REL-Signal zeigt, dass GST-REL S525 im Gegensatz zu GST-REL S525A durch beide IKK phosphoryliert werden kann.

### 3.6.4.5 Einfluss von REL-S525P auf den TNF $\alpha$ -induzierten Signalweg

REL-Ser525 wurde bisher noch nicht als ein Ziel von TNF $\alpha$  beschrieben. Um zu überprüfen, ob TNF $\alpha$  die Transaktivierung durch REL-S525P direkt beeinflussen kann, wurde ein GAL4-REL Reportergen-Versuch in transfizierten A293-Zellen in An- / Abwesenheit von TNF $\alpha$  durchgeführt. In Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen (Starczynowski *et al.*, 2005) zeigte sich, dass eine TNF $\alpha$ -Gabe die Transaktivierung von GAL4-REL etwa verdoppelte (Abb. 55). Im Gegensatz dazu wurde die Transaktivierung von GAL4-REL-S525P nach Zugabe von TNF $\alpha$  nicht signifikant verändert.

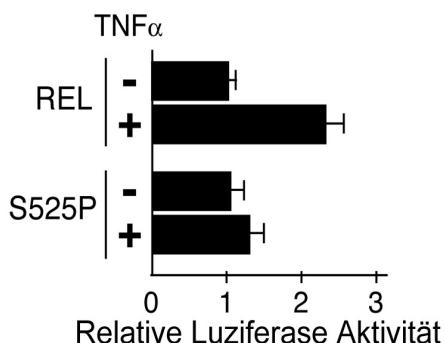


Abbildung 55: TNF $\alpha$ -Transaktivierung

GAL4-REL-Fusionsproteine mit der gesamten TAD von WT-REL (oben) oder REL-S525P (unten) wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Expression eines GAL4-Luziferase Reporter-Assays in A293-Zellen in An- oder Abwesenheit von transfiziertem TNF $\alpha$  zu aktivieren. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 h ausgehungert und dann mit TNF $\alpha$  stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen wurden relativ (=1) zum unstimulierten Versuch (-) dargestellt.

Zur Untersuchung der Auswirkung der apoptotischen Wirkung von TNF $\alpha$  auf die REL-S525P-Mutation wurden REL oder REL-S525P-transformierte Hühner-Milzzellen mit TNF $\alpha$  stimuliert. Nach 16 h Inkubation mit TNF $\alpha$  waren etwa 60 % der WT-REL transformierten Zellen in Apoptose (Abb. 56). Im Gegensatz dazu zeigten REL-S525P transformierte Zellen keine Steigerung der Apoptoserate nach einer TNF $\alpha$ -Behandlung.

In Kontrollgruppen von WT-REL- und REL-S525P-transformierten Zellen zeigte sich nach 16 h Kultivierung ohne TNF $\alpha$ -Zugabe eine Apoptose von 25 bis 40 %. Eine Kontrollbehandlung mit 10 mg / ml des Zellgifts Cycloheximid (CHX) zeigte für beide Systeme eine vergleichbare Apoptoserate auf dem Niveau der TNF $\alpha$ -behandelten WT-REL-Zellen.

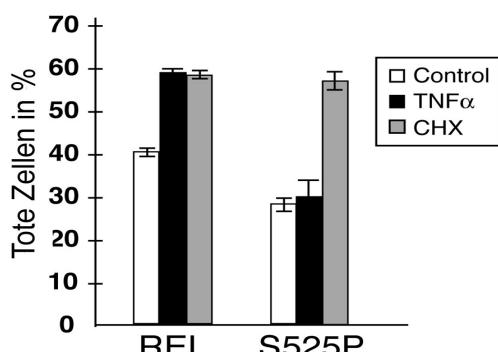


Abbildung 56: Ergebnisse der Messungen zur Apoptose-Rate

Hühner-Milzzellen wurden mit WT-REL oder REL-S525P transformiert, mit 250 nM TNF $\alpha$  oder 10  $\mu$ g/ml CHX für 16 h behandelt und abschließend die Apoptoserate mittels Trypan-Blau Färbung bestimmt.

Diese Ergebnisse zeigten, dass REL-S525P transformierte Hühnermilz-Zellen deutlich weniger auf eine TNFa-induzierte Apoptose reagierten als WT-REL transformierte Zellen. Die nahezu gleiche Apoptoserate von 60 % bei WT-REL und REL-S525P zeigte zudem deutlich, dass REL-S525P transformierte Zellen keine generell höhere Resistenz gegen Zellgifte besaßen.

## 4 Diskussion

Aggressive Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe (B-NHL) sind sowohl klinisch als auch biologisch eine sehr heterogene Gruppe von B-Zell-Neoplasien, die sich auch hinsichtlich ihrer Prognose unterscheiden. Daher spielt die exakte Klassifizierung u.a. eine große Rolle für die zu wählende Behandlungsstrategie. Neben histopathologischen Kriterien haben molekulare Methoden in den letzten Jahren wesentlich zu einem verbesserten Verständnis der Biologie und Entstehung aggressiver B-NHL geführt und sind in die aktuelle WHO-Klassifikation (2001) der malignen Lymphome eingeflossen. Dabei beruht die exakte Klassifikation unter anderem auf dem Nachweis chromosomal Translokationen wie beispielsweise der  $t(8;14)$ , die für die Diagnose eines Burkitt-Lymphoms wegweisend ist (Douglass *et al.*, 1980).

Die Einteilung nodaler Lymphome erfolgt daneben auch nach der Abstammung aus verschiedenen B-Zell-Kompartimenten des Lymphfollikels. Durch die Analyse der somatischen Hypermutation des IG-Lokus hat man wegweisende Erkenntnisse über die Entstehung maligner Lymphome gewonnen und kann diese anhand des IG-Mutationmusters einer Ursprungszelle des lymphatischen Gewebes zuordnen (Küppers *et al.*, 1997).

Die Aktivierung von Onkogenen kann nicht nur durch chromosomal Translokationen, sondern auch durch somatische Mutationen erfolgen. Diese können z.B. im Rahmen der antigenabhängigen Expansion spezifischer B-Zell-Klone im Keimzentrum eingeführt werden, die mit der Akquirierung somatischer Mutationen der hypervariablen Region der IG-Gene verbunden ist. (Küppers *et al.*, 1999; Pasqualucci *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit, die an molekular charakterisierten Fällen des MMML-Verbundprojektes der Deutschen Krebshilfe durchgeführt wurde, sollten u.a. anhand der IgH-Mutationsanalyse molekular definierte Subgruppen maligner Lymphome weiter aufgeschlüsselt werden. Weiterhin sollte die Aktivierung verschiedener Onkogene durch somatische Mutation als pathogenetischer Mechanismus der Lymphomentstehung untersucht werden.

Diese Untersuchungen sollen zusammen mit einer molekularen Klassifikation aggressiver Lymphome zu einem besseren Verständnis der Prozesse führen, welche die Initiation, Progression und letztlich auch den klinischen Verlauf maligner Lymphome bestimmen.

## 4.1 Analyse der IG-Umlagerungen bei aggressiven B-NHL

### 4.1.1 Klonalitätsnachweis mittels IgH-PCR

Die Rekombination der Gensegmente des Immunglobulin-Lokus dient der Synthese von IG-Molekülen, die zusammen mit anderen Molekülen in membrangebundener Form den B-Zell-Rezeptor (BZR) bilden und / oder in den Plasmazellen zytoplasmatisch exprimiert und als Antikörper sezerniert werden (Ollila & Vihinen, 2005). Die monoklonal umgelagerten IG können zum Klonalitätsnachweis einer B-Zell-Expansion herangezogen werden und die spezifische Sequenz des VH-N-DH-N-JH Rearrangements stellt den genetischen Fingerabdruck eines Tumorklons dar.

Für die Klonalitätsanalyse aggressiver B-Zell-Lymphome wurde ein Multiplex-PCR-Ansatz zur Detektion klonal rearrangierter Immunglobulin-Schwerkettengene verwendet, dessen Sensitivität unter Verwendung von VH- und JH-Konsensusprimern vor einem polyklonalen B-Zell-Hintergrund bei ca.  $10^{-2}$  bis  $10^{-3}$  (1-0,1%) liegt (van Dongen *et al.*, 2003). Mittels dieser Multiplex-PCR und anschließender GeneScan-Analyse wurden in 200 Fällen (87%) monoklonale VDJ-Umlagerungen detektiert. Dies entspricht den publizierten Daten für den Klonalitätsnachweis bei DLBCL, die im Rahmen eines europäischen Verbundprojektes zur PCR-basierten Klonalitätsanalyse bei B-Zell-Malignomen erhoben wurden (Evans *et al.*, 2007). In einer Arbeit von Rosenquist *et al.* (1999) ließen sich mittels Multiplex-PCR-Analysen des IgH-Genlokus lediglich in 60 % der DLBCL-Fälle molekulare VDJ-Umlagerungen nachweisen.

Eine Reihe von Faktoren beeinträchtigen die PCR-Amplifikation klonaler Immunglobulin-Schwerkettengene wie z.B. eine ineffektive Primerbindung durch unspezifische Anlagerung der Primer an mehrere potenzielle V- und J- Segmente. Ein weiterer Faktor insbesondere bei Keim- und Post-Keimzentrums-Lymphomen ist das Auftreten von somatischer Hypermutation. Punktmutationen sind auf der gesamten Länge des VDJ-Segments des IgH-Gens nachweisbar und beeinträchtigen die PCR-Amplifikation, wenn sie im Bereich der Primer-Bindungsstellen auftreten. Bei einer relativ hohen medianen IgH-MF von 7,85 % im Gesamtkollektiv ist davon auszugehen, dass Mutationen im Bereich der Primerbindungsstellen der gewählten IgH-Multiplex-PCR für den fehlenden Klonalitätsnachweis von 13 Fällen verantwortlich sind.

Als weitere mögliche Ursache für den fehlenden IgH-Klonalitätsnachweis kommt eine exzessive Exonukleaseaktivität im Bereich der junktionalen VH-DH und DH-JH Region in Betracht, die durch die Degradation von Basen im Bereich der 5'-JH-Sequenz zu einem Verlust der JH-Primerbindungssequenz führen kann (Evans *et al.*, 2007).

Ebenso kann für den fehlenden Klonalitätsnachweis auch eine zu geringe DNA-Quantität / -Qualität oder das Vorhandensein von PCR-Hemmstoffen verantwortlich sein. Alle in diese Arbeit eingeschlossenen Proben wiesen jedoch in der photometrischen Konzentrationsmessung sowie in der durchgeführten Kontrollgen-PCR / Albumin-RT-PCR eine ausreichende Menge und Qualität an amplifizierbarer DNA auf.

#### 4.1.2 B-Zell-Lymphome lassen sich anhand des somatischen Hypermutationsstatus ihren physiologischen Ursprungszellen zuordnen

B-Zell-Lymphome entstehen aus verschiedenen Entwicklungsstadien der normalen B-Lymphozyten. Anhand der Genexpressionsanalyse kann das Reifungsstadium der B-Zelle untersucht und eine Einteilung in bestimmte Entwicklungsstadien vorgenommen werden. Diese Einteilung wird wesentlich ergänzt durch den Nachweis der somatischen Hypermutation des Immunglobulin-Schwerkettengens. Die somatische Mutation der variablen Regionen des IgH-Gens kann als Marker für einen erfolgten Keimzentrumskontakt verwendet werden, da Prä-Keimzentrums-B-Zellen unmutiert sind. Darüber hinaus ist der Nachweis intraklonaler Heterogenität eine weitere Bestätigung für die Abstammung eines Lymphoms aus Keimzentrums-B-Zellen. Anhand der somatischen Hypermutationsanalyse der klonalen IgH-Genumlagerungen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Einteilung der bereits mittels Genexpressionsanalyse charakterisierten aggressiven Lymphome vorgenommen werden. Insbesondere war es möglich, innerhalb der molekularen Gruppen weitere Subgruppen zu definieren, die offensichtlich eine unterschiedliche Genese haben. Anhand der molekularen Charakterisierung der klonal rearrangierten IgH-Gene konnte die Entstehung der sporadischen mBL erstmals an einer größeren Serie klinischer Fälle einer späten Keimzentrums-B-Zelle zugeordnet werden. Die Ursprungszelle des morphologisch klassifizierten Burkitt-Lymphoms ist trotz intensiver Untersuchung bisher nicht eindeutig definiert. Basierend auf der Untersuchung von IG-Rearrangements postulieren verschiedene Autoren die Abstammung aus Keimzentrums-B-Zellen (Chapman *et al.*, 1995; Chapman *et al.*, 1996), Memory B-Zellen (Bellan *et al.*, 2005; Isobe *et al.*, 2002; Tamaru *et al.*, 1995) oder einem dazwischen liegenden Reifungsstadium (Klein *et al.*, 1995).

Darüber hinaus wurden bisher sehr unterschiedliche Ergebnisse zum Einfluss von Antigenselektion während der klonalen Expansion von Burkitt-Lymphomen publiziert. Dabei wird zwischen endemischen BL (eBL) und sporadischen (sBL) Burkitt-Lymphomen unterschieden. Einige Autoren postulieren, dass sBL im Gegensatz zu eBL keine Zeichen von Antigenselektion und fortlaufender somatischer Mutation zeigen und somit von Gedächtnis-B-Zellen abstammen, bei denen der Prozess der somati-

schen Hypermutation abgeschaltet ist (Bellan *et al.*, 2005; Tamaru *et al.*, 1995). Andere Autoren wiederum zeigten, dass Antigenselektion offensichtlich in der Pathogenese eine Rolle spielt (Chapman *et al.*, 1995; Isobe *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 1995). Diese Daten stammen in der Mehrheit aus Untersuchungen an Zelllinien oder sehr kleinen Patientenkollektiven. In der größten bisher publizierten Untersuchung von Bellan *et al.* (2005) wurden insgesamt 31 primäre Lymphknotenbiopsate von Fällen mit endemischen, sporadischen und HIV-assoziierten Burkitt-Lymphomen untersucht. Die Autoren beschrieben sBL mit einer niedrigen IgH-MF von 1,5 % und fehlenden Zeichen der Antigenselektion. Im Gegensatz dazu wiesen die eBL und AIDS-assoziierten Burkitt-Lymphome eine mediane IgH-MF von 5 % und Zeichen der Antigenselektion auf. Darüber hinaus fanden die Autoren eine Verteilung der VH-Genverwendung wie in normalen B-Zellen. Bellan *et al.* (2005) postulierten daher den Ursprung von sBL aus so genannten frühen Zentroblasten, da in diesen Zeichen der Antigenselektion und der fortlaufenden Mutationen fehlen. Im Gegensatz dazu wurden die EBV-positiven eBL, die Zeichen der Antigenselektion bei fehlenden fortlaufenden Mutationen zeigten, den (Post-Keimzentrums-) Gedächtnis-B-Zellen als physiologischer Ursprungszelle zugeordnet (Bellan *et al.*, 2005).

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den hier erhobenen Daten von 50 molekular klassifizierten sBL. In dem hier untersuchten Kollektiv „sporadischer Burkitt-Lymphome“ ließ sich zum einen eine deutlich höhere IgH-MF von 4,9 % dokumentieren. Auch konnte bei 19 von 50 Fällen (38 %) anhand der geringen R/S-Ratio in den konservierten Framework-Regionen eine Selektion der B-Zellen auf die Expression eines funktionellen BZR beobachtet werden. Zudem zeigten acht der elf klonierten mBL-Fälle (72 %) eine deutliche intraklonale Heterogenität als Zeichen für fortlaufende Mutationen, was belegt, dass die Tumorzelle zum Zeitpunkt der malignen Transformation unter dem Einfluss keimzentrumsspezifischer Prozesse stand.

Diese Ergebnisse belegen am größten bisher untersuchten Patientenkollektiv der sBL, dass molekular klassifizierte sporadische Burkitt-Lymphome ihren Ursprung aus späten Keimzentrums-B-Zellen nehmen, deren klonale Expansion unter Antigen-einfluss und unter Beteiligung keimzentrumsspezifischer Prozesse stattgefunden hat. Diese These wird auch von anderen Autoren unterstützt (Chapman *et al.*, 1995; Isobe *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 1995). Da die mediane IgH-MF von mBL deutlich unter der von Keimzentrums-Blasten liegt, ist anzunehmen, dass es sich um späte Keimzentrums-B-Zellen handelt, die für einen funktionellen BZR selektiert wurden.

Als alternative Hypothese kommt in Betracht, dass mBL aus Gedächtnis-B-Zellen entstehen, die nach einer Antigenstimulation ein zweites Mal ins Keimzentrum eintreten, um dort eine weitere Affinitätsreifung durchzuführen (Isobe *et al.*, 2002). Für einige Fälle von MALT-Lymphomen (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) oder der

chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) wurde dies bereits beschrieben (Qin *et al.*, 1997; Korganow *et al.*, 1994).

Darüber hinaus hat die Gruppe der paediatrischen Burkitt-Lymphome trotz eines übereinstimmenden Genexpressionsprofils mit adulten mBL wahrscheinlich eine andere Genese, was sich an einer restriktierten VH-Familienverwendung festmachen lässt.

Während in der molekularen Subgruppe der non-mBL / Intermediate präferenziell die Gene der VH3-Familie rearrangiert werden, kann in den mBL eine deutliche Bevorzugung der VH4-Familie mit den sehr häufig verwendeten Genen VH4-34 und VH4-39 nachgewiesen werden. Allerdings kommen VH4-Rearrangements fast ausschließlich in der Gruppe der mBL  $\leq 14$  Jahre vor, wohingegen bei mBL  $> 14$  Jahre überwiegend Gene der VH3-Familie verwendet werden.

Diese ungewöhnlich restriktive VH-Familienverwendung bei paediatrischen mBL lässt vermuten, dass bei der Entstehung dieser Lymphome entweder ein infektiöser Prozess oder die Stimulation durch Vakzine oder Autoantigene eine Rolle gespielt hat. Die Verwendung des VH4-34 Gens konnte dabei bereits in Verbindung gebracht werden mit dem Auftreten von Autoantikörpern gegen Erythrozytenantigene und beim systemischen *Lupus erythematoses* (Silberstein *et al.*, 1991; Stevenson *et al.*, 1993).

#### 4.1.3 Der IgH-Mutationsstatus definiert innerhalb der molekularen Gruppen Entitäten mit verschiedenem Entstehungsmechanismus

Die Gruppe der molekular klassifizierten non-mBL umfasst eine sehr heterogene Gruppe aggressiver Lymphome, die anhand histologischer Kriterien überwiegend der Gruppe der DLBCL zugeordnet werden (Hummel *et al.*, 2006). Diese Heterogenität spiegelte sich auch in der großen Varianz der IgH-MF wider (IgH-MF: 0-26%) und belegt, dass DLBCL aus stark mutierten Keimzentrums-B-Zellen hervorgehen (Klein *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 1994). In der Gruppe der non-mBL zeigten 37 von 82 Fällen (45,1 %) und bei den Intermediate 11 von 31 (35,5 %) Fällen eine R/S-Ratio  $< 1,6$  in den Framework-Regionen als Zeichen einer Selektion auf die Expression eines funktionellen BZR. Dies legt nahe, dass die Entstehung dieser Lymphome abhängig von der Expression eines funktionellen B-Zell-Rezeptors (BZR) ist und die Aktivierung der Lymphomzellen durch BZR-Signale eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt (Küppers, 2005; Shaffer *et al.*, 2002). Der Nachweis von fortlaufenden Mutationen in mehr als der Hälfte der non-mBL / Intermediate belegt, dass die B-Zelle zum Zeitpunkt der malignen Transformation unter dem Einfluss keimzentrumsspezifischer Prozesse stand (Klein *et al.*, 1998; Küppers, 2005; Lossos *et al.*, 2000).

Wendet man die „*cell of origin*“-Signatur auf das im Rahmen des Verbundprojektes untersuchte non-mBL-Kollektiv an, so lassen sich Lymphome mit einer GCB-Signatur und einer günstigen Prognose von Lymphomen mit einer ABC-Signatur unterscheiden (Hummel *et al.*, 2006). In der IgH-Mutationsanalyse ließen sich beide molekularen Gruppen deutlich voneinander trennen; die als GCB klassifizierten Fälle zeigten eine mediane IgH-MF von 13,1 % im Vergleich zu den ABC mit 7,3 % ( $p < 0,01$ ).

Die hohe Mutationsfrequenz und der Nachweis fortlaufender Mutationen des VDJ-Rearrangements in den GCB-Lymphomen bestätigt, dass diese aus stark mutierten Keimzentrums-B-Zellen hervorgehen, die auch nach der malignen Transformation den Mutationsprozess nicht abschalten. Dies belegen auch die Daten von Lossos *et al.* (2000), der zeigen konnte, dass nur in GCB-Subtypen fortlaufende Mutationen vorkommen; ein Unterschied der IgH-MF zwischen GCB- und ABC-Subtypen konnte in diesem relativ kleinen Kollektiv nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den GCB könnten ABC-Lymphome entweder von Post-Keimzentrums-B-Zellen abstammen, deren Mutationsmaschinerie bereits gestoppt wurde oder von Keimzentrums-B-Zellen, bei denen das transformierende Ereignis die GCB-Expressionssignatur verändert und die somatische Hypermutation abgeschaltet hat (Lossos *et al.*, 2000; Lossos, 2005). Somit könnten ABC-Lymphome potenziell auch von aktivierte B-Zellen abstammen, die somatische Mutation außerhalb des Keimzentrums, beispielsweise in der Milz, erfahren haben. Dieser alternative Mechanismus wurde bereits im transgenen Mausmodell beobachtet (William *et al.*, 2002).

#### 4.1.4 Die IgH-Mutationsfrequenz definiert möglicherweise eine neue physiologische Ursprungszelle für eine Subgruppe maligner Lymphome mit geringer IgH-Mutationsfrequenz

Ein Teil der Fälle des untersuchten Kollektivs zeigte eine für aggressive Lymphome ungewöhnlich geringe IgH-MF von < 2 % ( $n=21$ ) bzw. einen unmutierten IgH-Lokus ( $n=5$ ). Ein völlig unmutierter IgH-Lokus ist für aggressive B-NHL untypisch und wird eigentlich nur bei so genannten Prä-Keimzentrums-Lymphomen wie dem Mantelzell-Lymphom (MCL) oder der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) nachgewiesen, die in ihrer Entwicklung keinen Keimzentrumskontakt haben (Hummel *et al.*, 1994; Shaffer *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2007).

Bei den unmutierten bzw. gering mutierten Fällen dieses Kollektivs (< 2 % IgH-MF) könnte es sich um Lymphome handeln, die aus einer kürzlich beschriebenen B-Zell-Population mit Charakteristika sowohl naiver B-Zellen als auch Keimzentrums-B-Zellen hervorgegangen sind (Kolar *et al.*, 2007). Diese Zellen exprimieren AID und sind gering somatisch mutiert. Der Phänotyp (IgD(+)CD38(-)CD23(-)FSC(hi)CD71(+)) ist

einzigartig und stellt möglicherweise das Zwischenstadium zwischen einer naiven und einer Keimzentrums-B-Zelle dar. Diese Zellen könnten die Ursprungszellen der Keimzentrumsreaktion und möglicherweise auch die physiologischen Vorläufer von Mantelzell-Lymphomen (MCL) sein (Kolar *et al.*, 2007).

Eine weitere Erklärung für die geringe Mutationsfrequenz ist die Beobachtung, dass nicht allein die Frequenz der somatischen Mutationen in den CDR ausschlaggebend für die Affinität des Antikörpers zu einem spezifischen Antigen ist, sondern auch die Position der Replacement-Mutation (R). Hat die Zelle die entscheidende R-Mutation zur Affinitätssteigerung in den CD-Regionen erlangt, so kann es sogar zu einer Gegenselektion weiterer Mutationen kommen, die in einer insgesamt niedrigen R/S-Ratio resultiert (Küppers *et al.*, 1997). So wurde schon von Allen *et al.* (1988) beschrieben, dass antigenselektionierte, hochaffine Antikörper eine unerwartet niedrige R/S-Ratio aufweisen können. Da bei 19 der 21 Fälle mit geringer MF (< 2 %) ein inframe VDJ-Rearrangement generiert wurde und sieben dieser Fälle anhand der R/S-Ratio der FR die Zeichen der Antigenselektion zeigten, kann man annehmen, dass in diesen Fällen ein funktioneller BZR mit einer geringen Mutationsfrequenz generiert wurde.

#### 4.1.5 Die IgH-Mutationsanalyse gibt Hinweise auf eine unterschiedliche Genese der MYC.pos Lymphome

Teilt man das Untersuchungskollektiv nur nach dem Vorhandensein einer MYC-Translokation auf, so umfasst die Gruppe der MYC.pos Lymphome neben den MYC.pos mBL (90,7 % MYC.pos) auch Fälle der molekularen Intermediate (54 % MYC.pos) und non-mBL (7,2 % MYC.pos). Die Analyse des IgH-Mutationsstatus zeigt nicht nur signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom Nachweis eines MYC-Bruchs (MYC.pos 4,8 % vs. MYC.neg 11,0 %;  $p < 0,001$ ), sondern auch in Abhängigkeit vom MYC-Komplexitäts-Score. MYC.pos Fälle mit zusätzlichen chromosomal Veränderungen (MYC.complex 2) waren unabhängig vom Komplexitätsgrad der genetischen Veränderung (4,8 % vs. 12,2 %;  $p < 0,01$ ) signifikant stärker mutiert als Fälle mit ausschließlichen Imbalanzen (MYC.complex 1).

Anhand der IgH-Mutationsanalyse kann man bei den mBL davon ausgehen, dass das initial transformierende Ereignis eine MYC-Translokation im Bereich der Switch-Region ist, die bei einer späten Keimzentrums-B-Zelle stattfindet. Im Gegensatz dazu ist es im Fall der stark mutierten non-mBL / Intermediate wahrscheinlich, dass die somatische Hypermutation zu genetischer Instabilität führt und dadurch das Auftreten chromosomal Translokationen begünstigt (Goosens *et al.*, 1998; Küppers & Dalla-Favera, 2001). Fälle mit zusätzlichen Translokationen akquirieren diese wahrscheinlich stufenweise, getriggert durch somatische Mutation und daraus resultierender genetischer

Instabilität. Die t(14;18)-Translokation, die zu einem frühen Zeitpunkt in der B-Zell-Entwicklung erworben wird sowie die BCL6-Translokation, die während der Keimzentrumsreaktion auftritt, sind so genannte primäre genetische Veränderungen, verursacht durch genetische Instabilität im Rahmen des somatischen Hypermutationsprozesses. Die t(8;14)-Translokation tritt dann zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorentwicklung als sekundäre Veränderung („second hit“) auf und verändert die Genexpressionssignatur dieser Zellen.

Die Ergebnisse legen einen sequenziellen Ablauf verschiedener Chromosomen-Translokationen (primäres und sekundäres Bruchereignis) und damit verschiedene Mechanismen der malignen Transformation von MYC.pos Lymphomen nahe. Daraus ergeben sich auch wichtige Implikationen für die Prognose aggressiver Lymphome.

## 4.2 Bedeutung von Mutationen des MYC-Gens

Rekurrente Translokationen, die wichtige Onkogene wie BCL2, BCL6 und MYC involvieren, sind bei aggressiven B-Zell-Lymphomen häufig nachweisbar (Akasaka *et al.*, 2000b; Bastard *et al.*, 1994; Iqbal *et al.*, 2007). Diese Translokationen resultieren aus einem illegitimen Rearrangement in Folge von Doppelstrangbrüchen, die während der VDJ-Rekombination oder der Klassenwechsel-Rekombination des Immunglobulingens auftreten. Dabei spielt die somatische Hypermutation eine bedeutende Rolle, da hier auch Strangbrüche mit Deletionen und Insertionen auftreten, die zur genetischen Instabilität führen (Goosens *et al.*, 1998; Küppers & Dalla-Favera, 2001).

Auch für das MYC-Onkogen ist eine deregulierte Expression durch chromosomal Translokationen auf Chromosom 8 sowie eine Aktivierung durch aberrante somatische Hypermutation der Promotorregion bekannt (Pasqualucci *et al.*, 2001).

### 4.2.1 Mutationen der MYC-Promotorregion (IG-MYC) implizieren den Einfluss von AID

Mutationen im Bereich der Promotorregion treten hauptsächlich im Zusammenhang mit einer MYC-Translokation im translozierten Allel auf, das überwiegend exprimiert wird (Bemark & Neuberger, 2000). Innerhalb des untersuchten Gesamtkollektivs weisen sowohl MYC-translozierte als auch nicht translozierte Lymphome Mutationen in der MYC-Promotorregion auf. Zwar zeigt die Gruppe der mBL die höchste Inzidenz (56,6 %) sowie die höchste mediane MF (0,63 %) in der Promotorregion, jedoch zeigen auch 21,3 % der MYC.neg non-mBL / Intermediate-Lymphome Mutationen in dieser Region. Besonders die Gruppe der GCB-Lymphome weist dabei Fälle mit MYC-Promotormutationen auf (n=11).

Dies legt nahe, dass bei MYC.neg non-mBL / Intermediate ein Mechanismus aktiv ist, der unabhängig vom IG-Lokus und dessen SHM-Maschinerie ist.

In einer Untersuchung von Wang *et al.* (2004) konnte gezeigt werden, dass durch die *Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase* (AID) genomweite Mutationen verursacht werden können, wenn auch in einem geringeren Ausmaß als es bei der SHM der IG-Gene zu finden ist (Pasqualucci *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2000).

Dieser Zusammenhang wird auch für andere Gene, u.a. für PAX-5 und PIM1 (Pasqualucci *et al.*, 2001), RHO/TTF (Preudhomme *et al.*, 2000), CD95/FAS (Müschen *et al.*, 2000 a,b) oder auch BCL6 (Akasaka *et al.*, 2000b; Migliazza *et al.*, 1995; Pasqualucci *et al.*, 1998) vermutet, da diese Gene ebenfalls unabhängig von chromosomalen Translokationen mutiert sind. Es ist daher zu vermuten, dass in Fällen ohne MYC-Translokation AID als Mutator aktiv ist.

Bezüglich der Verteilung von Mutationen in der MYC-Promotorregion konnten in dieser Arbeit zwei Mutationscluster definiert werden, die eine > 3fache Mutationsrate im Vergleich zur Gesamtsequenz aufwiesen. Diese Cluster liegen jeweils am 3' Ende der MIF-1 und MIF-3 Region, die als regulatorische Bindungsstellen beschrieben wurden. Itkes *et al.* (2000) und Reinhold *et al.* (1995) konnten nachweisen, dass die MIF-Regionen u.a. über die Bindung der Transkriptionsfaktoren MIBP1 und RFX1 (MHC class II regulatory factor) einer direkten Kontrolle der Transkriptionsregulation von Myc unterliegen. Punktmutationen der MIF-1-Bindungstelle können die regulatorische Funktion des MYC-Inton-binding-Protein 1 (MIBP1)-Transkriptionsfaktors blockieren, wodurch es zu einer veränderten MYC-Expression kommt (Zajac-Kaye *et al.*, 1988).

In dieser Arbeit konnte keine Korrelation der Frequenz oder der Verteilung von MYC-Promotormutationen mit der Expression von MYC-mRNA und Myc-Zielgenen gefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Effekte der Hypermutation nicht allein auf der deregulierten MYC-Expression beruhen, sondern vielmehr in der Beeinflussung des komplexen Regelwerks der Myc-regulierten Zellproliferation und Apoptoseinduktion liegen.

4.2.2 Punktmutationen in den MYC-Boxen könnten bei IG-MYC.pos Patienten einen differenziellen Einfluss auf das Gesamtüberleben haben

#### 4.2.2.1 Einfluss von Punktmutationen in der MYC-Box 1

Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl MYC-translozierte als auch nicht translozierte Lymphome Mutationen in der MYC-TAD aufweisen. Bisher wurde überwiegend an Zelllinien und kleinen Fallkollektiven gezeigt, dass Mutationen in der TAD-Domäne von MYC vorkommen. In funktionellen Untersuchungen am Mausmodell konnten Hemann *et al.* (2005) zeigen, dass die in Burkitt-Lymphomen identifizierten MYC-Mutationen Pro57 und Thr58 einerseits ihre Fähigkeit zur Transformation behalten, aber andererseits einen Apoptosedefekt haben; sie können das BH-3-only Protein Bim nicht induzieren.

In dieser Arbeit konnte das beschriebene Mutationscluster in der MYC-Box 1 (AS 56-60) an einem großen, klinisch und molekular exakt definierten Kollektiv untersucht werden. Innerhalb dieses Mutationsclusters zeigte sich eine besonders häufige Veränderung der bekannten funktionsassoziierten Phosphorylierungsstellen an AS 57/58. Für Burkitt-Lymphome wurde beschrieben, dass die AS Thr58 häufig von Mutationen betroffen ist. So konnte in mehreren Untersuchungen die zentrale Bedeutung von Mutationen der AS 57/58 für eine reduzierte Transaktivierungsfähigkeit von Myc und einem damit einhergehenden Überlebensvorteil für B-Zellen gezeigt werden (Albert *et al.*, 1994; Alvarez *et al.*, 1991; Henriksson *et al.*, 1993). Zudem kann eine Mutation von Pro57 die Phosphorylierung des bedeutsameren Thr58 verhindern (Pulverer *et al.*, 1994). Durch den Verlust dieser Phosphorylierungsstellen wird beispielsweise die  $\alpha$ -Tubulin Bindung an das Myc-Protein gestört und es kommt im Zellkern zu einer Stabilisierung von Myc-Protein; die Halbwertszeit von Myc verdreifachte sich (Niklinski *et al.*, 2000). Zusätzlich konnte Bahram *et al.* (2000) zeigen, dass Mutationen, die zum Verlust einer der genannten Phosphorylierungsstellen führten, eine reduzierte ubiquitin- und proteasomvermittelte Degradation von Myc zur Folge haben. Somit könnten Zellen mit AS 57/58-Mutationen auch ohne MYC-Translokationen einen Überlebensvorteil durch die höhere Myc-Halbwertszeit und veränderte Transaktivierungsfähigkeit von Myc erhalten und daher zur Pathogenese von BL beitragen.

Der Mechanismus der defekten Apoptose-Induktion durch MYC-Mutanten könnte eine Erklärung für die ungünstige Prognose MYC-translozierter DLBCL darstellen.

#### 4.2.2.2 Einfluss von Punktmutationen in der Myc-Box 2

In insgesamt 14 Fällen mit MYC-Box 2 Mutationen konnte bei acht Patienten (57,1 %) eine Mutation der AS 138 detektiert werden; alle acht an der AS 138 mutierten Fälle wiesen eine IG-MYC-Translokation auf und zeichneten sich durch eine überdurchschnittlich gute Prognose auf das Gesamtüberleben aus.

Im Myc-Protein wird durch die MYC-Box 2 unter anderem die Bindung des Myc-Aktivator-Komplexes aus TRRAP und HAT vermittelt, die wichtig für die Transaktivierung von Myc-Zielgenen ist (Fuchs *et al.*, 2001; Pelengaris *et al.*, 2002). Alterationen der MYC-Box 2 könnten also einen entscheidenden Einfluss auf die transaktivierenden Fähigkeiten von Myc haben. Beispielsweise würde die AS 138-Mutation zu einem Verlust einer wichtigen Phosphorylierungsstelle und einer Zerstörung der Aktivator-Bindungsstelle des Myc/Max-Dimers führen, ohne die im weiteren Verlauf die TRRAP / HAT-vermittelte Modifikation der Histone nicht gewährleistet werden kann. So führt eine Mutation der AS 138 zu einer deutlich reduzierten Transaktivierungsfähigkeit und damit reduzierten Aktivität des Myc-Proteins, was zu einer verbesserten Prognose dieser Patienten führen könnte.

Dieser Mechanismus scheint auch eine prognostische Relevanz zu haben, wie der Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit und ohne AS 138-Mutation zeigt. Im untersuchten Kollektiv zeichneten sich die Patienten mit einer AS 138-Mutation durch ein deutlich günstigeres Gesamtüberleben aus. Durch die Position der Punktmutation in der TAD können offensichtlich sowohl krankheitsaktivierende Mechanismen induziert (AS 57/58) als auch protektive (AS 138) vermittelt werden.

Im Gegensatz zur Promotorregion wurden Mutationen in den MYC-Boxen 1 und 2 bis auf zwei Fälle nur in MYC.pos Fällen nachgewiesen. Dies legt nahe, dass Mutationen im Bereich der TAD durch die Mutationsmaschinerie des IG-Gens vermittelt werden.

### 4.3 Bedeutung von Mutationen des BCL6-Gens

DLBCL sind häufig von Veränderungen des Proto-Onkogens BCL6 betroffen. BCL6 ist essenziell für die Formierung von Keimzentren im Lymphknoten und die Proliferation von Keimzentrums-B-Zellen und wird daher von normalen Keimzentrums-B-Zellen exprimiert (Dent *et al.*, 1997). Die Abschaltung von BCL6 ist für die weitere Differenzierung und Ausreifung von Post-Keimzentrums-B-Zellen notwendig. Durch chromosomale Translokationen oder aberrante SHM kann es zu einer deregulierten BCL6-Expression kommen. Chromosomale Translokationen unter Beteiligung des Lokus 3q27 können in 30-40 % der DLBCL nachgewiesen werden (Bastard *et al.*, 1994; Lossos *et al.*, 2003). Häufige Bruchpartner stellen die Immunglobulingene dar, aber

auch zahlreiche non-IG Gene wie IL-21R, MBNL, JAW1, CD71 und CIITA-8 sind bekannt (Chen *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2000). Beide molekularen Veränderungen (Translokation und Mutation) können zu einer deregulierten BCL6-Expression führen (Ye *et al.*, 1995). Eine alterierte BCL6-Expression scheint eine wichtige Rolle in der onkogenen Transformation aggressiver B-Zell-Lymphome einzunehmen, was in Maus-Modellen bereits bestätigt werden konnte (Cattoretti *et al.*, 2005).

#### 4.3.1 BCL6-Mutationen treten in Clustern auf und sind ein indirekter Nachweis für genetische Instabilität bei GCB-Lymphomen

Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in der BCL6-Region bei 61 % der Fälle aggressiver B-Zell-Lymphome unabhängig von einem BCL6-Bruchereignis auftreten. Diese Mutationsfrequenz entspricht den in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten für BCL6-Mutationen bei B-Zell-Neoplasien (Capello *et al.*, 2000; Lossos & Levy, 2000; Vitolo *et al.*, 2002). Das Mutationsmuster der BCL6-Mutationen in diesem Untersuchungskollektiv zeigte die charakteristischen Merkmale der somatischen Hypermutation der Immunglobuline, wie sie z.B. im Zusammenhang mit Translokationsereignissen unter Immunglobulingenbeteiligung gefunden wurden (Migliazza *et al.*, 1995). Dazu zählt das Überwiegen von Transitionen über Transversionen, das Fehlen von Mikro-Insertionen oder Mikro-Deletionen (nur  $\Delta$ 13 bp und  $\Delta$ 75 bp in diesem Kollektiv), das Auftreten von Hypermutationsclustern (Kim *et al.*, 1981) sowie präferenzielle Mutationsmotive wie TAC, AGC oder RGYW (R= Purin, Y= Pyrimidin und W= A oder T) und deren komplementären Sequenzen (Betz *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1996).

Im untersuchten Probenkollektiv traten BCL6-Mutationen überwiegend unabhängig von einem BCL6-Bruchereignis auf. Darüber hinaus konnte keine Korrelation zwischen dem BCL6- und dem IgH-Mutationsstatus gezeigt werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass es sich hier um einen vom BCL6-Bruchereignis unabhängigen, alternativen Mechanismus handeln könnte wie z.B. einer Lokus-spezifischen Hypermutation, die unabhängig von der IgH-Mutationsmaschinerie aktiv ist. In diesem Zusammenhang konnten Lossos *et al.* (2004) und Smit *et al.* (2003) nachweisen, dass das Editing-Enzym AID eine wichtige Funktion für die somatische Hypermutation und den Klassenwechsel der Immunglobulingene besitzt, dass aber auch Gene wie BCL6 der AID-Aktivität unterliegen.

Die Verteilung der BCL6-Mutationen unterschied sich erheblich innerhalb der molekularen Subgruppen. Das Auftreten von somatischen Mutationen in Mutationsclustern mit einer hohen Mutationsfrequenz konnte vor allem in der Gruppe der GCB-

Lymphome gezeigt werden. Dabei konnten vier verschiedene Cluster mit hohen Mutationsraten ( $> 1,5 \times 10^{-2} \times \text{bp}^{-1}$ ) definiert werden (Cluster I-IV). Solch hohe Mutationsraten werden sonst nur bei hypermutierten IgH-Genen nach der Keimzentrumsreaktion gefunden ( $0,4-10,6 \times 10^{-2} \times \text{bp}^{-1}$ ; Ikematsu *et al.*, 1993; Chang & Casali, 1994). Diese Mutationscluster ließen sich nur im Kollektiv der GCB nachweisen, während in den Gruppen der ABC und unclassified das Auftreten von Punktmutationen gleichverteilt war. Das Auftreten von Hypermutationsclustern im BCL6-MMC ist für DLBCL und FL beschrieben worden (Artiga *et al.*, 2002; Iqbal *et al.*, 2007; Jardin *et al.*, 2005); ihre Bedeutung ist jedoch bislang unklar. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Bildung von Hypermutationsclustern durch den Prozess der somatischen Hypermutation zu genetischer Instabilität führt, die in der Gruppe der GCB das Auftreten rekurrenter BCL6-Translokationen begünstigt. Diese Vermutung lässt sich dadurch belegen, dass in den GCB die höchste Frequenz chromosomal Translokationen mit Beteiligung des BCL6-Lokus nachzuweisen ist.

Genetische Instabilität als Folge somatischer Hypermutation wird für das Auftreten verschiedener chromosomal Translokationen, unter anderem von MYC-Translokationen, verantwortlich gemacht (Goosens *et al.*, 1998; Küppers & Dalla-Favera, 2001) und trägt somit wesentlich zur malignen Transformation bei (Pasqualucci *et al.*, 1998).

#### 4.3.2 Die BCL6-mRNA-Expression ist unabhängig von BCL6-Mutationen und BCL6-Translokationen

Die Analyse der Genexpressionsdaten innerhalb der Subtypen ABC, GCB und unclassified zeigt für die GCB-Fälle die höchste BCL6-mRNA-Expression. Damit stellt sich die GCB-KeimzentrumsSIGNatur als dominierendes Merkmal für die BCL6-mRNA-Expression heraus. Eine hohe BCL6-Expression in GCB-Zellen wurde bereits von Cattoretti *et al.* (1995) als essenziell für die Formierung von Keimzentren beschrieben. Weder BCL6-Mutationen noch BCL6-Translokationen zeigten im Rahmen dieser Arbeit einen Einfluss auf die mRNA- oder Proteinexpression von BCL6. In anderen Publikationen sind aktivierende Effekte von BCL6-Mutationen auf die BCL6-Expression beschrieben (Wang *et al.*, 2002; Akasaka *et al.*, 2000a). Dies scheint allerdings auf einige wenige Regionen beschränkt zu sein (Wang *et al.*, 2002; Margalit *et al.*, 2006). Bei diesen Regionen handelt es sich entweder um Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren oder um regulatorische Sequenzen z.B. für das Tumorsuppressorgen p53. Die fehlenden Auswirkungen von BCL6-Mutationen im Bereich des p53-Response-Elements auf die BCL6-Genexpression im untersuchten Kollektiv hat ihre Ursache am ehesten in der kleinen Fallzahl; die neun Patienten mit je einer Mutation im Bereich des p53-RE zeigten lediglich einen Trend zu einer erhöhten BCL6-mRNA-Expression im Vergleich

zu allen mutierten Fällen (n= 113). Auch wenn kein direkter Einfluss von BCL6-Translokationen und somatischen Mutationen auf die Protein- bzw. mRNA-Expression von BCL6 gezeigt werden konnte, so sind möglicherweise bislang unbekannte Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der regulatorischen Region von Bcl6 durch Mutationen betroffen. Dies ist Thema weitergehender Untersuchungen zur Bcl6-induzierten Tumorentwicklung im Rahmen des MMML-Verbundprojektes.

Bezüglich der prognostischen Bedeutung der BCL6-Translokation zeigen verschiedene Studien entweder einen prognostisch günstigen Einfluss einer BCL6-Translokation (Jerkeman *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 1998) oder eine ungünstige Prognose BCL6-translozierter Fälle (Barrans *et al.*, 2002). Die Ergebnisse implizieren weder einen Einfluss einer BCL6-Translokation noch von BCL6-Mutationen auf das Gesamtüberleben in den molekularen Subgruppen. Auch die kürzlich publizierte Untersuchung von Iqbal *et al.* (2007) konnte keinen konsistenten Einfluss von BCL6-Veränderungen auf die Expression von Bcl6-Zielgenen zeigen. Damit bleibt die Auswirkung dieser molekularen Veränderungen auf die Pathogenese von B-Zell-Lymphomen weiter unklar.

#### 4.4 Bedeutung von Mutationen des REL-Gens

Die Amplifikation des REL-Lokus auf Chromosom 2p scheint mit der Entstehung der aggressiven Lymphome in Zusammenhang zu stehen und ist besonders häufig bei GCB klassifizierten Lymphomen nachweisbar (Gilmore *et al.*, 2004; Rosenwald *et al.*, 2002). Neben der Amplifikation konnte Starczynowski *et al.* (2003; 2005) an B-Zell-Lymphomen *in vitro* aktivierende Mutationen nachweisen; durch Punktmutationen oder Deletionen innerhalb der REL-TAD wurde die transformierende Aktivität von Rel deutlich gesteigert.

Daher wurden Mutationsanalysen der funktional bedeutsamen REL-TAD durchgeführt. Es konnte eine bisher unbekannte Punktmutation (REL-S525P) als funktionelle Phosphorylierungsstelle von Rel identifiziert werden, deren Verlust Auswirkungen auf die transaktivierenden Eigenschaften von Rel und damit auch auf die Aktivierung des NFkB-Signalweges hat. Ein Zusammenhang dieser veränderten Eigenschaften von Rel mit der Entstehung maligner Lymphome ist über die Biologie der Keimzentrums-B-Zellen herzustellen, die allgemein eine geringe Expression von NFkB-Zielgenen zeigen (Rosenwald *et al.*, 2002; Shaffer *et al.*, 2002).

#### 4.4.1 REL-S525P ist eine hochkonservierte Phosphorylierungsstelle mit Bedeutung für die Transaktivierung

Für die transaktivierenden Fähigkeiten von Rel ist die Phosphorylierung von Serinen in der Transaktivierungsdomäne von zentraler Bedeutung (Gilmore, 2006). So konnte mittels *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden, dass IKK- und NIK-assoziierte Kinasen die Serine innerhalb der AS-Positionen 422-540 von Rel phosphorylieren (Harris *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2005; Sánchez-Valdepeñas *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass beide katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes (IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ ) REL-Ser525 phosphorylieren können. Dennoch scheint Ser525 nur eine von mehreren C-terminalen IKK-Bindungsstellen zu sein. Die Analyse der Konsensussequenzen zeigte, dass es sich bei REL-Ser525 um eine evolutiv hoch konservierte Aminosäure handelt, die möglicherweise eine wichtige Funktion in der Regulation der Rel-Transaktivierung hat. Der Verlust einer wichtigen Phosphorylierungsstelle durch die REL-S525P-Mutation könnte somit eine Ursache für ein verändertes Transaktivierungspotenzial von REL-S525P darstellen. So konnte z.B. trotz einer verringerten Transaktivierung des SOD2-Promotors ein erhöhter Proteingehalt von MnSOD gemessen werden. Die Langzeitexpression verschiedener Zielgene ist eine Erklärung für dieses Ergebnis. Da Rel auch das Gen für seinen eigenen Inhibitor (IKB $\alpha$ ) transaktiviert (Gilmore, 2006), könnte die S525P-Mutation in verringerten Inhibitorproteinkonzentrationen resultieren, was eine verlängerte Transkription anderer NF $\kappa$ B-Zielgene zur Folge hätte. Obwohl bisher noch keine verringerte IKB $\alpha$ -Transaktivierung durch S525P nachgewiesen werden konnte, vermuteten auch Kralova *et al.* (2002) sowie Starczynowski *et al.* (2003) für Mutationen in der TAD eine Langzeitexpression bestimmter Rel-Zielgene als Ursache für die erhöhten Proteinkonzentrationen trotz eines geringeren Transaktivierungspotentials.

#### 4.4.2 REL-S525P beeinträchtigt die TNF $\alpha$ -Regulation

Offensichtlich sind REL-S525P-Zellen gegenüber der apoptotischen Wirkung von TNF $\alpha$  nahezu resistent. Die TNF $\alpha$ -Stimulation induziert unter anderem den klassischen NF $\kappa$ B-Signalweg und es kommt zur Transaktivierung zahlreicher Zielgene (Gilmore, 2006). Im Allgemeinen wird NF $\kappa$ B als Apoptose-Inhibitor angesehen; es wird jedoch auch eine indirekte pro-apoptotische Wirkung u.a. über den Fas-Signalweg diskutiert (Karin & Lin, 2002; Barkett & Gilmore, 1999). Weiterhin konnten Ravi *et al.* (1998) zeigen, dass Rel/NF $\kappa$ B-Proteine Substrate für die TNF $\alpha$  induzierte Caspase-Kaskade darstellen, die zur Apoptose führt. So könnte NF $\kappa$ B in der TNF $\alpha$  getriggerten Homöostase ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Apoptose- und Überlebenssignalen

vermitteln. Durch die REL-S525P-Mutation könnte es in transformierten Zellen zu einer Verschiebung dieses dynamischen Gleichgewichts zugunsten der Überlebenssignale kommen. Ebenso könnte sowohl die differenzielle Transaktivierungsfähigkeit als auch der mögliche Verlust der funktionellen Phosphorylierungsstelle Ser525 zur Positivselektion maligne transformierter B-Zellen beitragen. Dies würde zu einem Überlebensvorteil der malignen REL-S525P-Zellen führen.

Aufgrund der sehr geringen Allelfrequenz (< 0,5 %) in den bisher untersuchten Proben erscheint ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten der charakterisierten REL-S525P-Mutation und der Entstehung von Lymphomen unwahrscheinlich. Sollte diese Mutation zur Lymphomgenese beitragen können, stellt sie eher eine Prädisposition als eine tumorspezifische somatische Mutation dar.

## 5 Zusammenfassung

Die Aktivierung von Onkogenen durch Translokationen oder somatische Mutationen trägt wesentlich zur Pathogenese von Lymphomen bei. Im Verbundprojekt „Molekulare Mechanismen maligner Lymphome“ generierte Genexpressionsprofile und molekularzytogenetische Daten ermöglichen eine Klassifizierung von 228 histologisch diagnostizierten aggressiven B-Zell-Lymphomen in molekulare Burkitt-Lymphome (mBL), non-mBL sowie eine Intermediate-Gruppe.

Im Fokus dieser Arbeit stand die Mutationsanalyse der klonal rearrangierten Immunglobulinschwerkettengene (IgH) in den molekularen Gruppen, um mögliche weitere Subgruppen zu identifizieren und einen Zusammenhang zwischen somatischer Hypermutation, genetischer Instabilität und charakteristischen Gen-Translokationen in verschiedenen Stadien der B-Zell-Ontogenese herzustellen. Der Einfluss der somatischen Hypermutation auf bekannte, für die Pathogenese aggressiver Lymphome relevante Proto-Onkogene (c-MYC, BCL6, c-REL) sowie eine mögliche prognostische Bedeutung stellten eine weitere zentrale Frage dar.

Die Mutationsanalyse wurde mittels eines kombinierten Verfahrens aus PCR, Denaturierender Hochleistungs-Flüssigchromatographie (dHPLC), Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten spezifischer Genregionen der genannten IgH- sowie Proto-Onkogene durchgeführt. Innerhalb der molekularen Gruppen konnten anhand der Ergebnisse der IgH-Mutationsanalyse weitere Subgruppen unterschiedlicher Genese definiert werden. Die Gruppe der paediatrischen mBL weist trotz eines übereinstimmenden Genexpressionsprofils mit adulten mBL offensichtlich eine andere Genese auf, die vermutlich auf die Aktivierung des lymphatischen Systems durch Infektionen, Vakzine oder Autoantigene zurückzuführen ist. Die Gruppe der MYC.pos Lymphome konnte anhand des IgH-Mutationsstatus in weitere molekulare Subgruppen differenziert werden, die im Rahmen der Lymphomentstehung zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine chromosomal Schädigung erfahren. Die Ergebnisse lassen einen sequenziellen Ablauf von Chromosomentranslokationen (primäres und sekundäres Bruchereignis) und darauf basierend verschiedene Mechanismen der malignen Transformation vermuten. Daraus ergeben sich auch wichtige Implikationen für die Prognose aggressiver Lymphome.

Die Ergebnisse belegen, dass die Präsenz einer aberranten somatischen Hypermutationsmaschinerie und ihr Einfluss auf verschiedene Onkogene offensichtlich einen potenzen Mechanismus für die maligne Transformation lymphatischer B-Zellen darstellt, der wahrscheinlich auch die Aktivierung bislang unbekannter Onkogene einschließt.

## 6 Summary

The activation of oncogenes by translocations or somatic mutations contributes to lymphoma pathogenesis. Within the joint project "Molecular mechanisms of malignant lymphoma", 228 histologically diagnosed aggressive B-cell lymphoma were classified into distinct molecular subgroups. Based on gene expression and FISH data, these subgroups were termed molecular Burkitt lymphoma (mBL), non-mBL and Intermediate. The present study was focused on mutation analysis of rearranged immunoglobuline heavy chain genes (IgH) within the different molecular groups. Mutation analysis was performed in order to allow further subgrouping within the molecular groups and to establish a possible link between somatic hypermutation, genetic instability and characteristic gene translocations in the different stages of B-cell ontogenesis. The impact of somatic hypermutation on protooncogenes relevant for pathogenesis of aggressive lymphoma (c-MYC, BCL6, REL) and its prognostic relevance was another major topic of this study. Mutation status of the respective genes was assessed using a combined approach of PCR, denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC), cloning and sequencing of selected DNA fragments. IgH mutation analysis allowed the definition of further subgroups within the molecular groups of DLBCL. A differential pathogenesis can be assumed for these different entities based on the results. Moreover, IgH mutation analysis revealed a different pathogenesis of pediatric mBL. Gene expression profiles of adult and pediatric mBL did not reflect this distinction, underlining the crucial importance of mutation analysis for the exact molecular classification of DLBCL. The genesis of pediatric mBL may probably be due to the activation of the lymphatic system by infections, vaccines or autoantigens. The group of MYC.pos lymphoma could also be divided into distinct molecular subgroups based on IgH mutation analysis. These distinct molecular subgroups may be subjected to sequential chromosome translocations (primary and secondary break), implicating differential and aberrant mechanisms of malignant transformation. These findings probably have important implications for the prediction of aggressive lymphoma. Thus, the presence of an aberrant somatic hypermutation machinery probably includes the activation of yet unknown oncogenes can be regarded as a potent mechanism for the malignant transformation of lymphocytic cells.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akasaka, H.; Akasaka, T.; Kurata, M.; Ueda, C.; Shimizu, A.; Uchiyama, T. & Ohno, H.** (2000a): Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays.  
*Cancer Research* 60: 2335-2341
- Akasaka, T.; Ueda, C.; Kurata, M.; Akasaka, H.; Yamabe, H.; Uchiyama, T. & Ohno, H.** (2000b): Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6.  
*Blood* 96: 2907-9
- Albert, T.; Urlbauer, B.; Kohlhuber, F.; Hammersen, B. & Eick, D.** (1994): Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines.  
*Oncogene* 9: 759-63
- Alizadeh, A.A.; Eisen, M.B.; Davis, R.E.; Ma, C.; Lossos, I.S.; Rosenwald, A.; Boldrick, J.C.; Sabet, H.; Tran, T.; Yu, X. et al.** (2000): Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling.  
*Nature* 403: 503-11
- Allen, D.; Simon, T.; Sablitzky, F.; Rajewsky, K. & Cumano, A.** (1988): Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti-hapten response.  
*EMBO J* 7: 1995-2001
- Alvarez, E.; Northwood, I.C.; Gonzalez, F.A.; Latour, D.A.; Seth, A.; Abate, C.; Curran, T. & Davis, R.J.** (1991): Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase.  
*J Biol Chem* 266: 15277-85
- Araten, D.J.; Golde, D.W.; Zhang, R.H.; Thaler, H.T.; Gargiulo, L.; Notaro, R. & Luzzatto, L.** (2005): A quantitative measurement of the human somatic mutation rate.  
*Cancer Res* 65: 8111-7
- Armitage, J.O. & Weisenburger, D.D.** (1998): New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project.  
*J Clin Oncol* 16: 2780-95
- Artiga, M.; Sáez, A.; Romero, C.; Sánchez-Beato, M.; Mateo, M.; Navas, C.; Mollejo, M. & Piris, M.A.** (2002): A short mutational hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas.  
*Am J Pathol* 160: 1371-80
- Bahram, F.; von der Lehr, N.; Cetinkaya, C. & Larsson, L.G.** (2000): c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover.  
*Blood* 95: 2104-10

- Barkett, M. & Gilmore, T.D.** (1999): Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors.  
*Oncogene* 18: 6910-24
- Barrans, S.L.; O'Connor, S.J.M.; Evans, P.A.S.; Davies, F.E.; Owen, R.G.; Haynes, A.P.; Morgan, G.J. & Jack, A.S.** (2002): Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma.  
*Br J Haematol* 117: 322-32
- Bastard, C.; Deweindt, C.; Kerckaert, J.P.; Lenormand, B.; Rossi, A.; Pezzella, F.; Fruchart, C.; Duval, C.; Monconduit, M. & Tilly, H.** (1994): LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients.  
*Blood* 83: 2423-7
- Bea, S.; Zettl, A.; Wright, G.; Salaverria, I.; Jehn, P.; Moreno, V.; Burek, C.; Ott, G.; Puig, X.; Yang, L. et al.** (2005): Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction.  
*Blood* 106: 3183-90
- Bellan, C.; Lazzi, S.; Hummel, M.; Palummo, N.; de Santi, M.; Amato, T.; Nyagol, J.; Sabattini, E.; Lasure, T.; Pileri, S.A. et al.** (2005): Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas.  
*Blood* 106: 1031-6
- Bemark, M. & Neuberger, M.S.** (2000): The c-MYC allele that is translocated into the IgH locus undergoes constitutive hypermutation in a Burkitt's lymphoma line.  
*Oncogene* 19: 3404-10
- Betz, A.G.; Neuberger, M.S. & Milstein, C.** (1993): Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V genes.  
*Immunol Today* 14: 405-11
- Boxer, L.M. & Dang, C.V.** (2001): Translocations involving c-myc and c-myc function.  
*Oncogene* 20: 5595-610
- Brenner, S. & Milstein, C.** (1966): Origin of antibody variation.  
*Nature* 211: 242-3
- Capello, D.; Vitolo, U.; Pasqualucci, L.; Quattrone, S.; Migliaretti, G.; Fassone, L.; Ariatti, C.; Vivenza, D.; Gloghini, A.; Pastore, C. et al.** (2000): Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia.  
*Blood* 95: 651-9
- Carmody, R. & Chen, Y.** (2007): Nuclear Factor-kappa B: Activation and regulation during toll-like receptor signaling.  
*Cellular & Molecular Immunology* 4: 31-41
- Cattoretti, G.; Chang, C.C.; Cechova, K.; Zhang, J.; Ye, B.H.; Falini, B.; Louie, D.C.; Offit, K.; Chaganti, R.S. & Dalla-Favera, R.** (1995): BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells.  
*Blood* 86: 45-53

- Cattoretti, G.; Pasqualucci, L.; Ballon, G.; Tam, W.; Nandula, S.V.; Shen, Q.; Mo, T.; Murty, V.V. & Dalla-Favera, R.** (2005): Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell* 7: 445-55
- Ceballos, E.; Muñoz-Alonso, M.J.; Berwanger, B.; Acosta, J.C.; Hernández, R.; Krause, M.; Hartmann, O.; Eilers, M. & León, J.** (2005): Inhibitory effect of c-Myc on p53-induced apoptosis in leukemia cells. Microarray analysis reveals defective induction of p53 target genes and upregulation of chaperone genes. *Oncogene* 24: 4559-71
- Chang, B. & Casali, P.** (1994): The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today* 15: 367-73
- Chapman, C.J.; Mockridge, C.I.; Rowe, M.; Rickinson, A.B. & Stevenson, F.K.** (1995): Analysis of VH genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intraclonal heterogeneity. *Blood* 85: 2176-81
- Chapman, C.J.; Zhou, J.X.; Gregory, C.; Rickinson, A.B. & Stevenson, F.K.** (1996): VH and VL gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation, intraclonal heterogeneity, and a role for antigen selection. *Blood* 88: 3562-8
- Chen, Y.; Liang, A.C.T.; Au, W.Y.; Chu, K.; Wong, K.; Hu, X.; Lu, L.; Tang, J.C.O.; Chan, K.; Beh, S. et al.** (2003): Multiple BCL6 translocation partners in individual cases of gastric lymphoma. *Blood* 102: 1931-2; author reply 1932
- Dave, S.S.; Fu, K.; Wright, G.W.; Lam, L.T.; Kluin, P.; Boerma, E.; Greiner, T.C.; Weisenburger, D.D.; Rosenwald, A.; Ott, G. et al.** (2006): Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 354: 2431-42
- Dent, A.L.; Shaffer, A.L.; Yu, X.; Allman, D. & Staudt, L.M.** (1997): Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276: 589-92
- Diaz, M.; Watson, N.B.; Turkington, G.; Verkoczy, L.K.; Klinman, N.R. & McGregor, W.G.** (2003): Decreased frequency and highly aberrant spectrum of ultraviolet-induced mutations in the hprt gene of mouse fibroblasts expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta. *Mol Cancer Res* 1: 836-47
- Douglass, E.C.; Magrath, I.T.; Lee, E.C. & Whang-Peng, J.** (1980): Cytogenetic studies in non-African Burkitt lymphoma. *Blood* 55: 148-55
- Engelhard, M.; Brittinger, G.; Huhn, D.; Gerhartz, H.H.; Meusers, P.; Siegert, W.; Thiel, E.; Wilmanns, W.; Aydemir, U.; Bierwolf, S. et al.** (1997): Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood* 89: 2291-7

- Evans, P.A.S.; Pott, C.; Groenen, P.J.T.A.; Salles, G.; Davi, F.; Berger, F.; Garcia, J.F.; van Krieken, J.H.J.M.; Pals, S.; Kluin, P. et al.** (2007): Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936.  
*Leukemia* 21: 207-14
- Faili, A.; Aoufouchi, S.; Flatter, E.; Guéranger, Q.; Reynaud, C. & Weill, J.** (2002): Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota.  
*Nature* 419: 944-7
- Fest, T.; Mougey, V.; Dalstein, V.; Hagerty, M.; Milette, D.; Silva, S. & Mai, S.** (2002): c-MYC overexpression in Ba/F3 cells simultaneously elicits genomic instability and apoptosis.  
*Oncogene* 21: 2981-90
- Fognani, C.; Rondi, R.; Romano, A. & Blasi, F.** (2000): cRel-TD kinase: a serine/threonine kinase binding in vivo and in vitro c-Rel and phosphorylating its transactivation domain.  
*Oncogene* 19: 2224-2232
- Fuchs, M.; Gerber, J.; Drapkin, R.; Sif, S.; Ikura, T.; Ogryzko, V.; Lane, W.S.; Nakatani, Y. & Livingston, D.M.** (2001): The p400 complex is an essential E1A transformation target.  
*Cell* 106: 297-307
- Gilmore, T.** (2006): Introduction to NF-kappa B: players, pathways, perspectives  
*Oncogene* 25: 6680-6684
- Gilmore, T.; Kalaitzidis, D.; Liang, M. & Starczynowski, D.** (2004): The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil.  
*Oncogene* 23: 2275-2286
- Golding, G.B.; Gearhart, P.J. & Glickman, B.W.** (1987): Patterns of somatic mutations in immunoglobulin variable genes.  
*Genetics* 115: 169-76
- Goosens, A.N.; Weening, J.J. & Schut, N.H.** (1998): A young woman from Somalia with acute renal failure.  
*Nephrol Dial Transplant* 13: 1832-4
- Goruppi, S.; Gustincich, S.; Brancolini, C.; Lee, W. & Schneider, C.** (1994): Dissection of C-Myc Domains Involved in S-Phase Induction of Nih3T3 Fibroblasts.  
*Oncogene* 9: 1537-1544
- Gu, W.; Bhatia, K.; Magrath, I.T.; Dang, C.V. & Dalla-Favera, R.** (1994): Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107.  
*Science* 264: 251-4
- Harris, J.; Olière, S.; Sharma, S.; Sun, Q.; Lin, R.; Hiscott, J. & Grandvaux, N.** (2006): Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon.  
*J Immunol* 177: 2527-35

- Harris, N.L.; Jaffe, E.S.; Stein, H.; Banks, P.M.; Chan, J.K.; Cleary, M.L.; Delsol, G.; De Wolf-Peeters, C.; Falini, B.; Gatter, K.C. et al.** (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group.  
*Blood* 84: 1361-92
- Hayden, M. & Ghosh, S.** (2004): Signaling to NF-kappa B  
*Genes & Development* 18: 2195-2224
- Hemann, M.T.; Bric, A.; Teruya-Feldstein, J.; Herbst, A.; Nilsson, J.A.; Cordon-Cardo, C.; Cleveland, J.L.; Tansey, W.P. & Lowe, S.W.** (2005): Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants.  
*Nature* 436: 807-11
- Henriksson, M.; Bakardjiev, A.; Klein, G. & Lüscher, B.** (1993): Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential.  
*Oncogene* 8: 3199-209
- Hoang, A.T.; Lutterbach, B.; Lewis, B.C.; Yano, T.; Chou, T.Y.; Barrett, J.F.; Raffeld, M.; Hann, S.R. & Dang, C.V.** (1995): A link between increased transforming activity of lymphoma-derived MYC mutant alleles, their defective regulation by p107, and altered phosphorylation of the c-Myc transactivation domain.  
*Mol Cell Biol* 15: 4031-42
- Hummel, M.; Bentink, S.; Berger, H.; Klapper, W.; Wessendorf, S.; Barth, T.F.E.; Bernd, H.; Cogliatti, S.B.; Dierlamm, J.; Feller, A.C. et al.** (2006): A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling.  
*N Engl J Med* 354: 2419-30
- Hummel, M.; Tamaru, J.; Kalvelage, B. & Stein, H.** (1994): Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle.  
*Blood* 84: 403-7
- Ikematsu, H.; Kasaian, M.T.; Schettino, E.W. & Casali, P.** (1993): Structural analysis of the VH-D-JH segments of human polyreactive IgG mAb. Evidence for somatic selection.  
*J Immunol* 151: 3604-16
- Iqbal, J.; Greiner, T.C.; Patel, K.; Dave, B.J.; Smith, L.; Ji, J.; Wright, G.; Sanger, W.G.; Pickering, D.L.; Jain, S. et al.** (2007): Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma.  
*Leukemia* 21: 2332-43
- Isobe, K.; Tamaru, J.; Nakamura, S.; Harigaya, K.; Mikata, A. & Ito, H.** (2002): VH gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma: somatic mutation and intraclonal diversity with special reference to the tumor cells involving germinal center.  
*Leuk Lymphoma* 43: 159-64
- Itkes, A.; Allegra, C.J. & Zajac-Kaye, M.** (2000): Multiprotein complexes present at the MIF motifs flanking the promoter of the human c-myc gene.  
*FEBS Lett* 474: 23-8

- Jaffe E.S. , Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W.** (2001): Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.  
*IARC Press, Lyon* : 352 pages
- Janeway, C.; Travers, P.; Walport, M. & Shlomchik, M.** (2002): *Immunologie, Spectrum Akademischer Verlag*
- Jardin, F. & Sahota, S.** (2005): Targeted somatic mutation of the BCL6 proto-oncogene and its impact on lymphomagenesis.  
*Hematology* 10: 115-129
- Jardin, F.; Bastard, C.; Contentin, N.; Parmentier, F.; Tilly, H.; Stevenson, F. & Sahota, S.** (2002a): Analysis of the major mutation cluster of the first BCL-6 intron in B-cell non Hodgkin's lymphomas with t(3;14)(q27;q32) reveals the translocated allele as preferentially targeted by the somatic mutation mechanism  
*Blood* 100: 38A-38A
- Jardin, F.; Buchonnet, G.; Parmentier, F.; Contentin, N.; Lepretre, S.; Lenain, P.; Picquenot, J.; Laberge, S.; Bertrand, P.; Stamatoullas, A. et al.** (2002b): Follicle center lymphoma is associated with significantly elevated levels of BCL-6 expression among lymphoma subtypes, independent of chromosome 3q27 rearrangements.  
*Leukemia* 16: 2318-2325
- Jardin, F.; Ruminy, P.; Parmentier, F.; Picquenot, J.M.; Courel, M.N.; Bertrand, P.; Buchonnet, G.; Tilly, H. & Bastard, C.** (2005): Clinical and biological relevance of single-nucleotide polymorphisms and acquired somatic mutations of the BCL6 first intron in follicular lymphoma.  
*Leukemia* 19: 1824-30
- Jerkeman, M.; Aman, P.; Cavallin-Stahl, E.; Torlakovic, E.; Akerman, M.; Mitelman, F. & Fioretos, T.** (2002): Prognostic implications of BCL6 rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma--a Nordic Lymphoma Group study.  
*Int J Oncol* 20: 161-5
- Johnston, J.M. & Carroll, W.L.** (1992): c-myc hypermutation in Burkitt's lymphoma.  
*Leuk Lymphoma* 8: 431-9
- Karin, M. & Lin, A.** (2002): NF-kappaB at the crossroads of life and death.  
*Nat Immunol* 3: 221-7
- Ke, S. & Wartell, R.** (1993): Influence of Nearest-Neighbor Sequence on the Stability of Base-Pair Mismatches in Long DNA - Determination by Temperature-Gradient Gel-Electrophoresis.  
*Nucleic Acids Research* 21: 5137-5143
- Kelly, K. & Siebenlist, U.** (1985): The role of c-myc in the proliferation of normal and neoplastic cells.  
*J Clin Immunol* 5: 65-77
- Kelly, K. & Siebenlist, U.** (1986): The regulation and expression of c-myc in normal and malignant cells.  
*Annu Rev Immunol* 4: 317-38

- Kim, S.; Davis, M.; Sinn, E.; Patten, P. & Hood, L.** (1981): Antibody diversity: somatic hypermutation of rearranged VH genes.  
*Cell* 27: 573-81
- Klein, G.** (1994): Role of EBV and Ig/myc translocation in Burkitt lymphoma.  
*Antibiot Chemother* 46: 110-6
- Klein, U.; Goossens, T.; Fischer, M.; Kanzler, H.; Braeuninger, A.; Rajewsky, K. & Küppers, R.** (1998): Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells.  
*Immunol Rev* 162: 261-80
- Klein, U.; Klein, G.; Ehlin-Henriksson, B.; Rajewsky, K. & Küppers, R.** (1995): Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes.  
*Mol Med* 1: 495-505
- Kolar, G.R.; Mehta, D.; Pelayo, R. & Capra, J.D.** (2007): A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID.  
*Blood* 109: 2545-52
- Korganow, A.S.; Martin, T.; Weber, J.C.; Lioure, B.; Lutz, P.; Knapp, A.M. & Pasquali, J.L.** (1994): Molecular analysis of rearranged VH genes during B cell chronic lymphocytic leukemia: intraclonal stability is frequent but not constant.  
*Leuk Lymphoma* 14: 55-69
- Kralova, J.; Liss, A.S.; Bargmann, W.; Pendleton, C.; Varadarajan, J.; Ulug, E. & Bose, H.R.J.** (2002): Differential regulation of the inhibitor of apoptosis ch-IAP1 by v-rel and the proto-oncogene c-rel.  
*J Virol* 76: 11960-70
- Kramer, M.H.; Hermans, J.; Wijburg, E.; Philippo, K.; Geelen, E.; van Krieken, J.H.; de Jong, D.; Maartense, E.; Schuuring, E. & Kluin, P.M.** (1998): Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma.  
*Blood* 92: 3152-62
- Küppers, R.** (2005): Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis.  
*Nat Rev Cancer* 5: 251-62
- Küppers, R. & Dalla-Favera, R.** (2001): Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas.  
*Oncogene* 20: 5580-94
- Küppers, R.; Goossens, T. & Klein, U.** (1999a): The role of somatic hypermutation in the generation of deletions and duplications in human Ig V region genes and chromosomal translocations.  
*Curr Top Microbiol Immunol* 246: 193-8
- Küppers, R.; Klein, U.; Hansmann, M.L. & Rajewsky, K.** (1999b): Cellular origin of human B-cell lymphomas.  
*N Engl J Med* 341: 1520-9
- Küppers, R.; Rajewsky, K. & Hansmann, M.L.** (1997): Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression.  
*Eur J Immunol* 27: 1398-405

- Lawrence, T.; Bebien, M.; Liu, G.Y.; Nizet, V. & Karin, M.** (2005): IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation.  
*Nature* 434: 1138-43
- Li, Y.; Welm, B.; Podsypanina, K.; Huang, S.; Chamorro, M.; Zhang, X.; Rowlands, T.; Egeblad, M.; Cowin, P.; Werb, Z. et al.** (2003): Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15853-8
- Lossos, I.S.** (2005): Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma.  
*J Clin Oncol* 23: 6351-7
- Lossos, I.S. & Levy, R.** (2000): Mutation analysis of the 5' noncoding regulatory region of the BCL-6 gene in non-Hodgkin lymphoma: evidence for recurrent mutations and intraclonal heterogeneity.  
*Blood* 95: 1400-5
- Lossos, I.S.; Akasaka, T.; Martinez-Clement, J.A.; Siebert, R. & Levy, R.** (2003): The BCL6 gene in B-cell lymphomas with 3q27 translocations is expressed mainly from the rearranged allele irrespective of the partner gene.  
*Leukemia* 17: 1390-7
- Lossos, I.S.; Alizadeh, A.A.; Eisen, M.B.; Chan, W.C.; Brown, P.O.; Botstein, D.; Staudt, L.M. & Levy, R.** (2000): Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10209-13
- Lossos, I.S.; Levy, R. & Alizadeh, A.A.** (2004): AID is expressed in germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large-cell lymphomas and is not correlated with intraclonal heterogeneity.  
*Leukemia* 18: 1775-9
- Margalit, O.; Amram, H.; Amariglio, N.; Simon, A.J.; Shaklai, S.; Granot, G.; Minsky, N.; Shimoni, A.; Harmelin, A.; Givol, D. et al.** (2006): BCL6 is regulated by p53 through a response element frequently disrupted in B-cell non-Hodgkin lymphoma.  
*Blood* 107: 1599-607
- Martin, A. & Fresno, M.** (2000): Tumor necrosis factor-alpha activation of NF-kappa B requires the phosphorylation of Ser-471 in the transactivation domain of c-Rel.  
*Journal of Biological Chemistry* 275: 24383-24391
- Martin, A.; San Antonio, B. & Fresno, M.** (2001): Regulation of nuclear factor kappa B transactivation - Implication of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C xi IN c-Rel activation by tumor necrosis factor alpha.  
*Journal of Biological Chemistry* 276: 15840-15849
- McClure, R.F.; Remstein, E.D.; Macon, W.R.; Dewald, G.W.; Habermann, T.M.; Hoering, A. & Kurtin, P.J.** (2005): Adult B-cell lymphomas with Burkitt-like morphology are phenotypically and genotypically heterogeneous with aggressive clinical behavior.  
*Am J Surg Pathol* 29: 1652-60

- McKean, D.; Huppi, K.; Bell, M.; Staudt, L.; Gerhard, W. & Weigert, M.** (1984): Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3180-4
- Migliazza, A.; Martinotti, S.; Chen, W.; Fusco, C.; Ye, B.H.; Knowles, D.M.; Offit, K.; Chaganti, R.S. & Dalla-Favera, R.** (1995): Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12520-4
- Mullis, K.; Falloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G. & Erlich, H.** (1986): Specific Enzymatic Amplification of Dna Invitro - the Polymerase Chain-Reaction  
*Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273
- Muramatsu, M.; Kinoshita, K.; Fagarasan, S.; Yamada, S.; Shinkai, Y. & Honjo, T.** (2000): Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme.  
*Cell* 102: 553-63
- Müschen, M.; Re, D.; Bräuninger, A.; Wolf, J.; Hansmann, M.L.; Diehl, V.; Küppers, R. & Rajewsky, K.** (2000a): Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells.  
*Cancer Res* 60: 5640-3
- Müschen, M.; Re, D.; Jungnickel, B.; Diehl, V.; Rajewsky, K. & Küppers, R.** (2000b): Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction.  
*J Exp Med* 192: 1833-40
- Nakamura, N.; Nakamine, H.; Tamaru, J.; Nakamura, S.; Yoshino, T.; Ohshima, K. & Abe, M.** (2002): The distinction between Burkitt lymphoma and diffuse large B-Cell lymphoma with c-myc rearrangement.  
*Mod Pathol* 15: 771-6
- Niklinski, J.; Claassen, G.; Meyers, C.; Gregory, M.A.; Allegra, C.J.; Kaye, F.J.; Hann, S.R. & Zajac-Kaye, M.** (2000): Disruption of Myc-tubulin interaction by hyperphosphorylation of c-Myc during mitosis or by constitutive hyperphosphorylation of mutant c-Myc in Burkitt's lymphoma.  
*Mol Cell Biol* 20: 5276-84
- Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project** (1997): A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma.  
*Blood* 89: 3909-3918
- Obaya, A.J.; Mateyak, M.K. & Sedivy, J.M.** (1999): Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle.  
*Oncogene* 18: 2934-41
- Oefner, P. & Underhill, P.** (1995): Comparative Dna-Sequencing by Denaturing High-Performance Liquid-Chromatography (dHPLC)  
*American Journal of Human Genetics* 57: 1547-1547
- Offit, K. & Chaganti, R.S.** (1991): Chromosomal aberrations in non-Hodgkin's lymphoma. Biologic and clinical correlations.  
*Hematol Oncol Clin North Am* 5: 853-69

- Ohno, H.** (2006): Pathogenetic and clinical implications of non-immunoglobulin ; BCL6 translocations in B-cell non-Hodgkin's lymphoma.  
*J Clin Exp Hematop* 46: 43-53
- Ollila, J. & Vihinen, M.** (2005): B cells  
*Int J Biochem Cell Biol* 37: 518-23
- Parekh, S.; Polo, J.M.; Shakhnovich, R.; Juszczynski, P.; Lev, P.; Ranuncolo, S.M.; Yin, Y.; Klein, U.; Cattoretti, G.; Dalla Favera, R. et al.** (2007): BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms.  
*Blood* 110: 2067-74
- Pascual, V.; Liu, Y.J.; Magalski, A.; de Bouteiller, O.; Banchereau, J. & Capra, J.D.** (1994): Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil.  
*J Exp Med* 180: 329-39
- Pasqualucci, L.; Migliazza, A.; Fracchiolla, N.; William, C.; Neri, A.; Baldini, L.; Chaganti, R.S.; Klein, U.; Küppers, R.; Rajewsky, K. et al.** (1998): BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11816-21
- Pasqualucci, L.; Neumeister, P.; Goossens, T.; Nanjangud, G.; Chaganti, R.S.; Küppers, R. & Dalla-Favera, R.** (2001): Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas.  
*Nature* 412: 341-6
- Pelengaris, S. & Khan, M.** (2003): The many faces of c-MYC.  
*Arch Biochem Biophys* 416: 129-36
- Pelengaris, S.; Khan, M. & Evan, G.** (2002): c-MYC: More than just a matter of life and death.  
*Nature Reviews Cancer* 2: 764-776
- Pfreundschuh, M.; Trümper, L.; Osterborg, A.; Pettengell, R.; Trneny, M.; Imrie, K.; Ma, D.; Gill, D.; Walewski, J.; Zinzani, P. et al.** (2006): CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group.  
*Lancet Oncol* 7: 379-91
- Polo, J.; Juszczynski, P.; Cerchietti, L.; Monti, S.; Ye, K.; Shipp, M. & Melnick, A.** (2006): A BCL6 target gene signature predicts the biological behavior and classification of diffuse large B-cell lymphoma.  
*Blood* 108: 186A-186A
- Pongers-Willemse, M.J.; Verhagen, O.J.; Tibbe, G.J.; Wijkhuijs, A.J.; de Haas, V.; Roovers, E.; van der Schoot, C.E. & van Dongen, J.J.** (1998): Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes.  
*Leukemia* 12: 2006-14

- Preudhomme, C.; Roumier, C.; Hildebrand, M.P.; Dallery-Prudhomme, E.; Lantoine, D.; Laï, J.L.; Daudignon, A.; Adenis, C.; Bauters, F.; Fenaux, P. et al.** (2000): Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma.  
*Oncogene* 19: 2023-32
- Pulverer, B.J.; Fisher, C.; Vousden, K.; Littlewood, T.; Evan, G. & Woodgett, J.R.** (1994): Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo.  
*Oncogene* 9: 59-70
- Qin, Y.; Greiner, A.; Hallas, C.; Haedicke, W. & Müller-Hermelink, H.K.** (1997): Intraclonal offspring expansion of gastric low-grade MALT-type lymphoma: evidence for the role of antigen-driven high-affinity mutation in lymphomagenesis.  
*Lab Invest* 76: 477-85
- Rada, C. & Milstein, C.** (2001): The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially.  
*EMBO J* 20: 4570-6
- Rada, C.; Gonzalezfernandez, A.; Jarvis, J. & Milstein, C.** (1994): The 5' Boundary of Somatic Hypermutation in A V-Chi Gene Is in the Leader Intron.  
*European Journal of Immunology* 24: 1453-1457
- Ramiro, A.R.; Jankovic, M.; Eisenreich, T.; Difilippantonio, S.; Chen-Kiang, S.; Muramatsu, M.; Honjo, T.; Nussenzweig, A. & Nussenzweig, M.C.** (2004): AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo.  
*Cell* 118: 431-8
- Ravi, R.; Bedi, A.; Fuchs, E.J. & Bedi, A.** (1998): CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB.  
*Cancer Res* 58: 882-6
- Reinhold, W.; Emens, L.; Itkes, A.; Blake, M.; Ichinose, I. & Zajac-Kaye, M.** (1995): The myc intron-binding polypeptide associates with RFX1 in vivo and binds to the major histocompatibility complex class II promoter region, to the hepatitis B virus enhancer, and to regulatory regions of several distinct viral genes.  
*Mol Cell Biol* 15: 3041-8
- Rhodes, D.; Kalyana-Sundaram, S.; Mahavisno, V.; Barrette, T.; Ghosh, D. & Chinnaiyan, A.** (2005): Mining for regulatory programs in the cancer transcriptome.  
*Nature Genetics* 37: 579-583
- Rogerson, B.J.** (1994): Mapping the upstream boundary of somatic mutations in rearranged immunoglobulin transgenes and endogenous genes.  
*Mol Immunol* 31: 83-98
- Rosenquist, R.; Lindström, A.; Holmberg, D.; Lindh, J. & Roos, G.** (1999): V(H) gene family utilization in different B-cell lymphoma subgroups.  
*Eur J Haematol* 62: 123-8
- Rosenwald, A.; Wright, G.; Chan, W.C.; Connors, J.M.; Campo, E.; Fisher, R.I.; Gascoyne, R.D.; Muller-Hermelink, H.K.; Smeland, E.B.; Giltnane, J.M. et al.** (2002): The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma.  
*N Engl J Med* 346: 1937-47

- Rowley, J.D.** (1990): Recurring chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma.  
*Semin Hematol* 27: 122-36
- Sambrook, J.; Fritsch, E. & Maniatis, T.** (1989): *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Beato, M.; Sánchez-Aguilera, A. & Piris, M.A.** (2003): Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas.  
*Blood* 101: 1220-35
- Sánchez-Valdepeñas, C.; Martín, A.G.; Ramakrishnan, P.; Wallach, D. & Fresno, M.** (2006): NF-kappaB-inducing kinase is involved in the activation of the CD28 responsive element through phosphorylation of c-Rel and regulation of its transactivating activity.  
*J Immunol* 176: 4666-74
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-7
- Sanz, I.** (1991): Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions.  
*J Immunol* 147: 1720-9
- Schuhmacher, M.; Kohlhuber, F.; Hölzel, M.; Kaiser, C.; Burtscher, H.; Jarsch, M.; Bornkamm, G.W.; Laux, G.; Polack, A.; Weidle, U.H. et al.** (2001): The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc.  
*Nucleic Acids Res* 29: 397-406
- Sen, R. & Baltimore, D.** (1986): Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences.  
*Cell* 46: 705-716
- Shaffer, A.L.; Rosenwald, A. & Staudt, L.M.** (2002): Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation.  
*Nat Rev Immunol* 2: 920-32
- Shen, H.M.; Michael, N.; Kim, N. & Storb, U.** (2000): The TATA binding protein, c-Myc and survivin genes are not somatically hypermutated, while Ig and BCL6 genes are hypermutated in human memory B cells.  
*Int Immunol* 12: 1085-93
- Silberstein, L.E.; Jefferies, L.C.; Goldman, J.; Friedman, D.; Moore, J.S.; Nowell, P.C.; Roelcke, D.; Pruzanski, W.; Roudier, J. & Silverman, G.J.** (1991): Variable region gene analysis of pathologic human autoantibodies to the related i and I red blood cell antigens.  
*Blood* 78: 2372-86
- Smit, L.A.; Bende, R.J.; Aten, J.; Guikema, J.E.J.; Aarts, W.M. & van Noesel, C.J.M.** (2003): Expression of activation-induced cytidine deaminase is confined to B-cell non-Hodgkin's lymphomas of germinal-center.  
*Cancer Res* 63: 3894-8

- Smith, D.S.; Creadon, G.; Jena, P.K.; Portanova, J.P.; Kotzin, B.L. & Wysocki, L.J.** (1996): Di- and trinucleotide target preferences of somatic mutagenesis in normal and autoreactive B cells.  
*J Immunol* 156: 2642-52
- Starczynowski, D.; Reynolds, J. & Gilmore, T.D.** (2003): Deletion of either C-terminal transactivation subdomain enhances the in vitro transforming activity of human transcription factor REL in chicken spleen cells.  
*Oncogene* 22: 6928-6936
- Starczynowski, D.T.; Reynolds, J.G. & Gilmore, T.D.** (2005): Mutations of tumor necrosis factor alpha-responsive serine residues within the C-terminal transactivation domain of human transcription factor REL enhance its in vitro transforming ability.  
*Oncogene* 24: 7355-68
- Starczynowski, D.T.; Trautmann, H.; Pott, C.; Harder, L.; Arnold, N.; Africa, J.A.; Leeman, J.R.; Siebert, R. & Gilmore, T.D.** (2007): Mutation of an IKK phosphorylation site within the transactivation domain of REL in two patients with B-cell lymphoma enhances REL's in vitro transforming activity.  
*Oncogene* 26: 2685-94
- Stein, H.; Hummel, M.; Jöhrens, K. & Anagnostopoulos, I.** (2007): Classification and pathogenesis of malignant lymphomas.  
*Internist (Berl)* 48: 351
- Stein, H.S. & Hummel, M.** (1999): Hodgkin's disease: biology and origin of Hodgkin and Reed-Sternberg cells.  
*Cancer Treat Rev* 25: 161-8
- Stevenson, F.K.; Spellerberg, M.B.; Treasure, J.; Chapman, C.J.; Silberstein, L.E.; Hamblin, T.J. & Jones, D.B.** (1993): Differential usage of an Ig heavy chain variable region gene by human B-cell tumors.  
*Blood* 82: 224-30
- Tamaru, J.; Hummel, M.; Marafioti, T.; Kalvelage, B.; Leoncini, L.; Minacci, C.; Tosi, P.; Wright, D. & Stein, H.** (1995): Burkitt's lymphomas express VH genes with a moderate number of antigen-selected somatic mutations.  
*Am J Pathol* 147: 1398-407
- Thompson, E.** (1998): The many roles of c-Myc in apoptosis.  
*Annual Review of Physiology* 60: 575-600
- Tonegawa, S.** (1983): Somatic generation of antibody diversity.  
*Nature* 302: 575-81
- van Dongen, J.J. & Wolvers-Tettero, I.L.** (1991): Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects.  
*Clin Chim Acta* 198: 1-91
- van Dongen, J.J.M.; Langerak, A.W.; Brüggemann, M.; Evans, P.A.S.; Hummel, M.; Lavender, F.L.; Delabesse, E.; Davi, F.; Schuuring, E. et al.** (2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.  
*Leukemia* 17: 2257-317

- Vitolo, U.; Botto, B.; Capello, D.; Vivenza, D.; Zagonel, V.; Gloghini, A.; Novero, D.; Parvis, G.; Calvi, R.; Ariatti, C. et al.** (2002): Point mutations of the BCL-6 gene: clinical and prognostic correlation in B-diffuse large cell lymphoma. *Leukemia* 16: 268-75
- Vose, J.M.** (1998): Current approaches to the management of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 25: 483-91
- Wang, C.L.; Harper, R.A. & Wabl, M.** (2004): Genome-wide somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7352-6
- Wang, X.; Li, Z.; Naganuma, A. & Ye, B.H.** (2002): Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15018-23
- William, J.; Euler, C.; Christensen, S. & Shlomchik, M.J.** (2002): Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 297: 2066-70
- Wilson, P.C.; de Bouteiller, O.; Liu, Y.J.; Potter, K.; Banchereau, J.; Capra, J.D. & Pascual, V.** (1998): Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med* 187: 59-70
- Wright, G.; Tan, B.; Rosenwald, A.; Hurt, E.H.; Wiestner, A. & Staudt, L.M.** (2003): A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9991-6
- Xiao, W. & Oefner, P.** (2001): Denaturing high-performance liquid chromatography: A review *Human Mutation* 17: 439-474
- Xu, W.S.; Liang, R.H. & Srivastava, G.** (2000): Identification and characterization of BCL6 translocation partner genes in primary gastric high-grade B-cell lymphoma: heat shock protein 89 alpha is a novel fusion partner gene of BCL6. *Genes Chromosomes Cancer* 27: 69-75
- Ye, B.H.; Chaganti, S.; Chang, C.C.; Niu, H.; Corradini, P.; Chaganti, R.S. & Dalla-Favera, R.** (1995): Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J* 14: 6209-17
- Yu, B.W.; Ichinose, I.; Bonham, M.A. & Zajac-Kaye, M.** (1993): Somatic mutations in c-myc intron I cluster in discrete domains that define protein binding sequences. *J Biol Chem* 268: 19586-92
- Zajac-Kaye, M.; Ben Baruch, N.; Kastanos, E.; Kaye, F. & Allegra, C.** (2000): Induction of Myc-intron-binding polypeptides MIBP1 and RFX1 during retinoic acid-mediated differentiation of haemopoietic cells. *Biochemical Journal* 345: 535-541

**Zajac-Kaye, M.; Gelmann, E. & Levens, D.** (1988): A Point Mutation in the C-Myc Locus of A Burkitt-Lymphoma Abolishes Binding of A Nuclear-Protein.  
*Science* 240: 1776-1780

**Zeng, X.; Winter, D.B.; Kasmer, C.; Kraemer, K.H.; Lehmann, A.R. & Gearhart, P.J.** (2001): DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes.  
*Nat Immunol* 2: 537-41

## 8 Anhang

Für die REL-Funktionsanalysen wurden folgende Plasmide und Vektoren verwendet.

### **Expressions-Plasmide**

**SG424:** Expressionsplasmid mit GAL4 DNA-binding-Domäne (DBD)

**SG-3'REL:** Wild-typ c-Rel (AS 278-587) GAL4 DBD; pBluescript SK+-REL wurde mit BamHI-KpnI verdaut, BamHI-KpnI sites in SG424 subkloniert

**SG-3'RELD424-490:** REL (AS 278-423,491-587) verbunden mit GAL4 DBD; pBluescript SK+-RELD424-490 BamHI-KpnI BamHI-KpnI sites

**SG-3'REL-S533,536A:** REL-Mutante GAL4 DBD; pBluescript SK+-REL-S533,536A BamHI-KpnI BamHI-KpnI sites in pSG424

**SG-3'REL-S525P:** REL-Mutante GAL4 DBD; pBluescript SK+-REL-S525P BamHI-KpnI BamHI-KpnI sites in pSG424

**SG-3'REL-S525D:** REL-Mutante verbunden mit GAL4 DBD; pBluescript SK+-REL-S525D wurde mit BamHI-KpnI verdaut und in BamHI-KpnI sites in pSG424 subkloniert

**CM216:** CMV-Promotor Expressionsvektor für REL. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Inder Verma (Salk Institute)

**pcDNA3.1(-):** CMV Promotor Expressionsvektor (Promega)

**pcREL-S533,536A:** pcDNA3.1(-) mit REL-S533,536A; REL-S533,536A wurde als XbaI-HindIII Fragment von JD-REL-S533,536A in pcDNA3.1(-) subkloniert; Verdau mit XbaI-HindIII

**pcREL-S525P:** pcDNA3.1(-) mit REL-S525P; REL-S525P XbaI-HindIII-Fragment von JD-REL-S525P in pcDNA3.1(-) subkloniert; Verdau mit XbaI-HindIII

**pcRELD424-490:** pcDNA3.1(-) mit REL D424-490; REL D424-490 wurde als XbaI-HindIII Fragment von JD-REL D424-490 in pcDNA3.1(-) subkloniert; Verdau mit XbaI-HindIII

**pcDNA-FLAG-IKKalpha:** pcDNA mit menschlichem IKKalpha FLAG-Tag

**pcDNA-FLAG-IKKbeta:** pcDNA mit menschlichem IKKbeta FLAG-Tag

**pcDNA-GSK3beta:** pcDNA mit einer konstitutiv aktiven menschlichen GSK3beta. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Geoffrey Cooper (Boston University)

**pGEX-KG:** Expressionsplasmid mit einer GST-Domäne vor einer Multiple cloning site

**pGEX-3'REL:** C-terminale AS von Wild-Typ REL (AS 323-587) verbunden mit GST; das REL-PCR Fragment wurde mit EcoRI-HindIII verdaut und in pGEX-KG (EcoRI-HindIII) subkloniert (Michael Garbati, Gilmore laboratory)

**pGEX-3'REL-S525P:** REL-S525P (AS 323-587) verbunden mit GST; das REL PCR Fragment wurde mit EcoRI-HindIII verdaut und in pGEX-KG (EcoRI-HindIII) subkloniert (Michael Garbati, Gilmore laboratory)

**pGEX-3'REL:** C-terminale AS von Wildtyp-REL (AS 500-530) verbunden mit GST; das REL PCR Fragment wurde mit EcoRI-HindIII verdaut und in pGEX-KG (EcoRI-HindIII) subkloniert

**pGEX-3'REL-S525A:** REL-S525A (AS 500-530) verbunden mit GST; das REL PCR Fragment wurde mit EcoRI-HindIII verdaut und in pGEX-KG (EcoRI-HindIII) subkloniert

### **Reporter-Plasmide**

**3x-kB-pGL2:** 3x-kB-Luziferase-pGL2 Reporterplasmid mit einem c-fos Promotorelement und drei Kopien des Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I kB-Elements (TGGGGATTCCCCA) vor dem Luziferase Gen

**IkB-pGL2:** IkBa-Luziferase-pGL2 Reporterplasmid mit einem 1,3 kb HindIII- EcoRI Fragment eines genomischen Klons von Hühner-IkB; enthält die Information für den Transkriptionsstart und 900 bp Sequenzinformation vor dem Luziferase-Gen. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Bose (University of Texas, Austin).

**SOD2-pGL3:** SOD2-Luziferase-pGL3 Reporterplasmid mit einem 3,3 kb -Fragment des menschlichen SOD2-Promotors und 0,4 kb des SOD2 Intron-Enhancers vor dem Luziferase-Gen. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Abid (Harvard Medical School)

**GAL4-site-Luc:** Reporterplasmid mit 5 GAL4 Bindungsstellen vor dem Promotor und Luziferase Gen. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Lipsick (Stanford Medical School)

**CMV-bgal:** CMV Promotor gesteuertes Expressionsplasmid für b-Galaktosidase; für die Normalisierung der Transfektionseffizienz genutzt.

**pGK-bgal:** SV40 Promotor gesteuertes Expressionsplasmid für b-Galaktosidase; für die Normalisierung der Transfektionseffizienz genutzt

## 9 Publikationen

### **Originalartikel:**

**Starczynowski\*, D.T.; Trautmann\*, H.; Pott, C.; Harder, L.; Arnold, N.; Africa, J.A.; Leeman, J.R.; Siebert, R. & Gilmore, T.D.** (2007): Mutation of an IKK phosphorylation site within the transactivation domain of REL in two patients with B-cell lymphoma enhances REL's in vitro transforming activity. **Oncogene** 26: 2685-94  
(\*gemeinsame Erstautorenschaft)

**Hummel, M.; Bentink, S.; Berger, H.; Klapper, W.; Wessendorf, S.; Barth, T.F.E.; Bernd, H.; Cogliatti, S.B.; Dierlamm, J.; Feller, A.C.; Hansmann, M.; Haralambieva, E.; Harder, L.; Hasenclever, D.; Kühn, M.; Lenze, D.; Licher, P.; Martin-Subero, J.I.; Möller, P.; Müller-Hermelink, H.; Ott, G.; Parwaresch, R.M.; Pott, C.; Rosenwald, A.; Rosolowski, M.; Schwaenen, C.; Stürzenhofecker, B.; Szczepanowski, M.; Trautmann, H.; Wacker, H.; Spang, R.; Loeffler, M.; Trümper, L.; Stein, H.; Siebert, R.** (2006):  
A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. **N Engl J Med** 354: 2419-30

### **Vorträge:**

**Trautmann H., Starczynowski D.T., Pott C., Harder L., Arnold N., Siebert R., Kneba M., Gilmore T.D.**

REL in vitro transforming activity is enhanced by an activating mutation (Ser525Pro) within the transactivation domain of REL in two patients with human B-cell lymphomas. **Onkologie** 2006;29(suppl 3):43

### **Posterpräsentationen:**

**H. Trautmann, C. Pott, R. Siebert, M. Kneba**

Establishment of quantitative real-time-PCR (RQ-PCR) assays for monitoring of REL and Bcl11A amplification in NHL.  
**Onkologie** 2003;26(Sonderheft 5):164

**Trautmann H., Pott C., Kneba M., Harder L., Arnold N., Siebert R.**

Gene Amplification and Mutation Analysis of REL in B cell Lymphoma.  
**Onkologie** 2004;27(suppl 3):216

**Trautmann H., Siebert R., Harder L., Arnold N., German Cancer Aid Network 'MMML', Kneba M., Pott C.**

DHPLC: A powerful screening method for large scale discovery of somatic hypermutations in NHL. **Onkologie** 2005;28(suppl 3):93

**Heiko Trautmann, Daniel T. Starczynowski, Christiane Pott, Lana Harder, Norbert Arnold, Reiner Siebert, Michael Kneba and Thomas D. Gilmore**

An Activating Mutation (Ser525Pro) within the Transactivation Domain of REL in Two Patients with Human B-Cell Lymphomas Enhances REL's In Vitro Transforming Activity. **Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)**, Nov 2005; 106: 2617.

**C. Pott, C. Schrader, H. Trautmann, S. Irmer, N. Derner, M. Ritgen, R. Siebert, L. Harder, M. Unterhalt, W. Hiddemann, M.L. Hansmann, R. Parwaresch, M. Kneba**

VH mutational status and VH gene usage define molecular heterogeneity in mantle cell lymphoma. **Onkologie** 2003;26(suppl 5):1-235

**Christiane Pott, Heiko Trautmann, Lana Harder, Michael Kneba, Reiner Siebert on behalf of the MMML-Network**

Significant Differences in the IGVH and BCL6 Mutation Status in Aggressive B-Cell Lymphomas with and without MYC Breakpoints.

**Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)**, Nov 2005; 106: 161.

## 10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert (siehe Abschnitt 9)

Kiel, den .....

.....  
Heiko Trautmann