

# **Die Rolle von Tumorsuppressorgenmutationen in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät der Biologie  
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

**René Scholtysik**

aus Ratingen

April 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hemmo Meyer

Tag der Disputation: 11.07.2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis . . . . .	IV
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 B-Zell-Entwicklung . . . . .	2
1.1.1 Reifung von B-Zellen . . . . .	2
1.1.2 Die Keimzentrumsreaktion . . . . .	4
1.2 Pathogenese von B-Zell-Lymphomen . . . . .	5
1.3 Das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom . . . . .	8
1.4 Das Burkitt-Lymphom . . . . .	9
1.5 Einzelnukleotidpolymorphismus-Chips als Methode zur Bestimmung der Kopienzahl . . . . .	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	13
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Sammlung und Extraktion der DNA . . . . .	15
2.2 Einzelnukleotidpolymorphismus-Chips . . . . .	16
2.2.1 Restriktionsenzymspaltung & Ligation . . . . .	16
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	17
2.2.3 Fragmentierung . . . . .	18
2.2.4 Markierung der Oligonukleotide (Labeling) . . . . .	18
2.2.5 Hybridisierung . . . . .	18
2.2.6 Waschen und Färben . . . . .	19
2.2.7 Datenerfassung . . . . .	19

## Inhaltsverzeichnis

2.2.8	Genotypisierung und Kopienzahlanalyse . . . . .	20
2.2.9	Filterung von Kopienzahlpolymorphismen . . . . .	21
2.2.10	Detektion des Verlustes von Heterozygotie und uniparentaler Disomie . . . . .	22
2.2.11	Rekurrenzdetektion mittels GISTIC-Algorithmus . . . . .	22
2.3	PCR und Sequenzierung von <i>TNFSF7</i> , <i>TNFSF9</i> und der <i>hy3</i> -RNA . . .	23
2.4	Reverse-Transkriptions-PCR der mRNA in Fall MPI-248 . . . . .	26
2.5	PCR und Sequenzierung der genomischen Translokationsbruchpunkts- umgebung im Fall MPI-248 . . . . .	26
2.6	Gelelektrophorese . . . . .	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1	Genomische Aberrationen in Burkitt-Lymphomen . . . . .	30
3.2	Genomische Aberrationen in diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen . .	42
3.3	Rekurrente Deletionen auf Chromosom 19 in aggressiven Lymphomen	53
3.4	Charakterisierung einer neuartigen Translokation zwischen einem Proto- Onkogen und einem Tumorsuppressorgen . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	Einordnung der gefundenen Aberrationen der Burkitt-Lymphome . . . .	62
4.2	Einordnung der gefundenen Aberrationen in DLBCLs . . . . .	68
4.2.1	Rekurrente Veränderungen in GCB-DLBCLs . . . . .	69
4.2.2	Rekurrente Veränderungen in ABC-DLBCLs . . . . .	76
4.2.3	Rekurrente Veränderungen in den DLBCLs, Typ III . . . . .	80
4.3	<i>TNFSF7</i> und <i>TNFSF9</i> als neue potentielle Tumorsuppressorgene in aggressiven Lymphomen . . . . .	82
4.4	Gleichzeitige Deregulierung eines Protoonkogens und Inaktivierung ei- nes Tumorsuppressorgens durch ein Translokationsereignis im Fall MPI- 248 . . . . .	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>

## *Inhaltsverzeichnis*

<b>6 Ausblick</b>	<b>92</b>
<b>7 Anhänge</b>	<b>93</b>
7.1 Tabellen der starken Kopienzahlveränderungen in BLs . . . . .	93
7.2 Tabellen der Veränderungen im 2. Kollektiv (DLBCLs) . . . . .	96
7.2.1 Alle Lymphome . . . . .	96
7.2.2 ABC-DLBCLs . . . . .	99
7.2.3 GCB-DLBCLs . . . . .	101
7.2.4 DLBCL, „Typ III“ . . . . .	103
7.2.5 Starke Kopienzahlveränderungen im 2.Kollektiv . . . . .	104
7.3 Teilpublikationen . . . . .	112
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>

# Abkürzungsverzeichnis

ABC	ähnlich zu aktivierten B-Zellen, engl. activated B-cell like
aCGH	Oligonukleotidmatrix-CGH, engl. oligonucleotide array CGH
APC	Antigen-präsentierende Zelle, engl. antigen presenting cell
BL	Burkitt-Lymphom
cDNA	kodierende DNA, engl. coding DNA
CGH	komparative genomische Hybridisierung, engl. comparative genomic hybridisation
CNP	Kopienzahlpolymorphismus, engl. copy number polymorphism
DLBCL	diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom, engl. diffuse large B cell lymphoma
EBV	Epstein-Barr-Virus
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GC	Keimzentrum, engl. germinal center
GCB	Keimzentrums-B-Zell-ähnlich, engl. germinal center B-cell like
HMM	Hidden Markov Model
IG	Immunglobulin
LOH	Verlust der Heterozygotie, engl. loss of heterozygosity
mBL	molekulares Burkitt-Lymphom
MDR	minimaldeletierte Region
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure,
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. major histocompatibility complex
MMML	molekulare Mechanismen maligner Lymphome, Verbundprojekt der deutschen Krebshilfe
NK	natürlicher Killer, engl. natural killer

## *Abkürzungsverzeichnis*

PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus, engl. single nucleotide polymorphism
SNP-Chips	Einzelnukleotidpolymorphismus-Chips, engl. single nucleotide polymorphism chips
TdT	terminale Desoxynucleotidyltransferase
TMACL	Tetramethyl-Ammoniumchlorid
UPD	uniparentale Disomie

# 1 Einleitung

Zur Erhaltung der Homöostase ist es bei allen multizellulären Organismen notwendig, eine effektive Abwehr gegen Fremdstoffe und -organismen zu errichten. Im Menschen hat sich zu diesem Zweck ein komplexes Immunsystem herausgebildet. Es besteht im Wesentlichen aus zwei Teilen: Der evolutionär älteren, „angeborenen“ Immunität, die mit Hilfe vererbter Musterrezeptoren Eindringlinge erkennt und z.B. durch phagozytierende Zellen eliminiert, und der adaptiven Immunantwort, die durch ständige Anpassung in der Lage ist, spezifische, hoch effektive Reaktionen gegen Erreger zu zeigen. Außerdem bildet die adaptive Immunantwort im Laufe des Lebens eines Menschen ein immunologisches Gedächtnis, das es dem Organismus erlaubt, auf dieselben oder ähnliche Erreger in Zukunft schneller und noch effektiver zu reagieren.

Zellulär vermittelt wird die adaptive Immunantwort im Wesentlichen durch antigen-präsentierende Zellen (engl. antigen presenting cell, APC) und Lymphozyten. Die APCs haben hierbei die Aufgabe, Stoffe aus dem Organismus aufzunehmen, zu prozessieren und als Antigene auf MHC (engl. major histocompatibility complex)-Molekülen zu präsentieren. Lymphozyten unterteilen sich in „natural killer“(NK)-Zellen, T- und B-Zellen. NK-Zellen haben die Aufgabe, andere Zellen unter anderem durch MHC-vermittelte Signale zu überwachen und bei Störungen in der Zellfunktion zu töten. T-Zellen besitzen ebenfalls Liganden für MHC-Moleküle, die sogenannten T-Zell-Rezeptoren, und können so auf präsentiertes Antigen mit diversen zellvermittelten Effektorfunktionen reagieren. Hierbei unterscheidet man T-Helferzellen, die andere Zelltypen stimulieren und steuernd in Immunantworten eingreifen, zytotoxische

## 1 Einleitung

T-Zellen, die Zellen mit Fremdartigen eliminieren, und regulatorische T-Zellen, die z.B. die Toleranz von Selbstantigenen vermitteln. B-Zellen besitzen einen speziellen B-Zellrezeptor, mit dem sie Antigen direkt erkennen, und der auch in Form von Antikörpern mit Effektorfunktion sezerniert werden kann.

### 1.1 B-Zell-Entwicklung

B-Lymphozyten entstehen beim adulten Menschen aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Induziert durch verschiedene Differenzierungssignale entwickelt sich dort aus einer hämatopoetischen Stammzelle über mehrere Zwischenstadien eine reife B-Zelle mit einem funktionierendem, nicht-autoreaktiven B-Zellrezeptor, die dann das Knochenmark verlässt und in die Peripherie wandert (Rajewsky, 1996).

Detektiert die antigen-unerfahrene B-Zelle dort spezifisches Antigen mit ihrem B-Zellrezeptor und erhält Kostimulation von einer passenden T-Zelle, wird sie aktiviert und differenziert entlang eines von zwei möglichen Entwicklungspfaden. Entweder sie differenziert direkt zu einer kurzlebigen Plasmazelle, die ihren B-Zellrezeptor als Antikörper sezerniert, oder sie wandert unter Hilfe anderer Immunzellen in lymphoide Organe ein und nimmt dort an der sogenannten Keimzentrums (engl. germinal center, GC)-reaktion teil. In deren Verlauf teilt die B-Zelle sich in kurzen Zeitabständen und erhöht durch Mutation und Selektion die Affinität ihres B-Zellrezeptors. Außerdem findet im GC der Prozess des Klassenwechsels statt, der den Wechsel der Effektorfunktion eines Antikörpers erlaubt. Während dieser Reaktion werden so affinitätsgeiferte B-Zellen produziert, die schlußendlich als antikörper-sezernierende Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen das lymphoide Organ verlassen.

#### 1.1.1 Reifung von B-Zellen

Die funktionellen Stadien der B-Zellentwicklung werden anhand von sukzessiven Umlagerungen ihrer Immunglobulin(IG)-Gene eingeteilt. Als erster Schritt wird im Schwer-

## 1 Einleitung

ketten-Locus eines von 25 Diversitäts(DH)-Gensegmenten an eines von 6 Verbindungs(JH, engl. joining)-Segmenten angefügt. Vor dem entstandenen DH-JH-Komplex wird dann eines von 40 Variabilitäts(VH)-Segmenten eingefügt. Bei jedem dieser Rekombinationsprozesse können Exonukleasen Nukleotide an der Bruchstelle entfernen oder das Enzym terminale Desoxynukleotidyl-Transferase nicht-keimbahnkodierte Nukleotide einfügen. Schon aus statistischen Überlegungen heraus muß ein Großteil dieser Genumlagerungen zu Verschiebungen des Leserasters bzw. zu vorzeitigen Stop-Codons führen. Da für die nächste Stufe der B-Zellentwicklung eine intakte, produktive schwere Kette des IG-Locus unerlässlich ist, stirbt eine Vorläuferzelle durch Apoptose, sollten die Umlagerungsversuche auf beiden IG-Schwerkettenallelen unproduktiv sein (Rajewsky, 1996).

In den überlebenden Zellen wird als nächstes überprüft, ob die produktive VDJ-Umlagerung auch geeignet ist, einen preliminären B-Zellrezeptor zu bilden. Zu diesem Zweck wird die schwere Kette an ein Leichtkettensurrogat angelagert. Sollte die schwere Kette zu dieser Verbindung nicht in der Lage sein, versucht die prä-B-Zelle durch Umlagerung des zweiten Allels oder V-Gen-Ersetzung (Zhang, 2007) eine andere schwere Kette auszuprägen. Gelingt dies nicht, wird die Zelle wiederum durch Apoptose deletiert. Zellen mit funktioneller schwerer Kette proliferieren und beginnen mit der Umlagerung ihrer leichten Kette. Hierbei laufen ähnliche Vorgänge wie bei der schweren Kette ab, nur dass die leichte Kette keine D-Segmente aufweist und es insgesamt zwei Leichtketten ( $\kappa$  und  $\lambda$ ) zu je zwei Allelen gibt. Als erstes wird hierbei der  $\kappa$ -Locus rekombiniert, und nur wenn beide Allele kein funktionelles Genprodukt ergeben, wird die Umlagerung des  $\lambda$ -Locus begonnen (Bräuninger et al., 2001).

Durch die gemeinsame Bildung eines funktionellen Schwerketten- wie Leichtketten-Proteins kann die B-Zelle danach erstmals ihren spezifischen B-Zellrezeptor ausprägen. Dieser wird dann auf die Erkennung von Autoantigenen überprüft, und im Falle von Selbstreaktivität stehen der B-Zelle gegebenenfalls wieder die oben genannten Rettungsmechanismen der Benutzung der verbliebenen, nicht rearrangierten Allele bzw. der V-Gen-Ersetzung zur Verfügung (Zhang et al., 2003), um der

## 1 Einleitung

Deletion durch Apoptose oder der permanenten Stilllegung durch Anergie zu entkommen (Goodnow et al., 1988; Tiegs et al., 1993). Die Vielfalt möglicher Produkte der V(D)J-Rekombination und das zufällige Hinzufügen bzw. Entfernen von Basen an den Bruchpunkten sorgen dafür, dass es statistisch so gut wie ausgeschlossen ist, dass zwei B-Zellen einen exakt identischen B-Zell-Rezeptor ausbilden. Dieser dient deswegen oft als klonaler Marker für die Abkömmlinge einer einzelnen B-Zelle in weiteren Immunreaktionen bzw. der Tumorentwicklung.

### 1.1.2 Die Keimzentrumsreaktion

Sobald eine reife, naive B-Zelle in der Peripherie mit ihrem B-Zell-Rezeptor Antigen bindet, wird sie aktiviert. Erhält sie außerdem noch passende Signale von T-Zellen, wandert sie in das nächste sekundäre lymphoide Organ ein und nimmt an einer GC-Reaktion teil. Zu diesem Zweck bilden sich dort spezifische Strukturen aus, in denen vor allen Dingen dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen interagieren. Die aktivierten B-Zellen durchlaufen ein spezielles Keimzentrumsprogramm, in dessen Verlauf sie stark proliferieren und in großem Maße zufällige Mutationen in ihre IG-Gene einführen, die sogenannte somatische Hypermutation (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991). Der aus diesen veränderten Genen ausgeprägte B-Zell-Rezeptor wird dann von dendritischen und T-Zellen auf eine erhöhte Antigenspezifität überprüft. Der größte Teil der B-Zellen, der destruktive Mutationen in seinen IG-Genen erzeugt hat, stirbt durch Apoptose, so dass mit jeder Replikations- und Selektionsrunde die Affinität der verbliebenen B-Zellen gesteigert wird. Die Zellen, die das Keimzentrum dann als ausdifferenzierte Plasma- oder Gedächtniszelle verlassen, besitzen eine vielfach gesteigerte Spezifität für ihr Antigen (Rajewsky, 1996).

Während der GC-Reaktion findet, eingeleitet vermutlich durch noch nicht verstandene intrinsische und extrinsische Signale, außerdem der Klassenwechsel einzelner B-Zellen statt. Durch Doppelstrangbrüche werden hierbei Stücke des IG-Gens zwischen sogenannten „switch“-Regionen deletiert, um die dauerhafte Expression eines anderen konstanten Teils des IG-Gens zu ermöglichen. Der so ausgeprägte

## 1 Einleitung

Rezeptor bzw. Antikörper besitzt eine andere Effektorfunktion, und ist je nach verwendetem konstantem Anteil nicht mehr vom IgM-Typ, sondern vom IgA-, IgE-, oder IgG-Typ.

B-Zellen, die an der GC-Reaktion teilnehmen, haben einige besondere Eigenschaften, im Vergleich zu sonstigen somatischen Zellen. Sie besitzen eine der höchsten Zellteilungsraten im Menschen (Zellzyklus 6-12 Stunden, Schwickert et al., 2007), die mit besonderen Anforderungen an die Zellzyklusregulation einhergeht. Außerdem findet im GC regulär durch die Maschinerie der somatischen Hypermutation und des Klassenwechsels die Generation von genotoxischen DNA-Schäden statt. Es konnte gezeigt werden, dass die Hypermutationsmaschinerie neben den IG-Genen mit geringerer Frequenz auch andere Gene bearbeitet (sogenannte aberrante Hypermutation), es also in GC-B-Zellen auch zur Einführung von Mutationen in andere stark transkribierte Gene kommt (Peng et al., 1999; Müschen et al., 2002). Trotz dieser erforderlichen Toleranz gegenüber Stressfaktoren, die andere Zellen in die Apoptose treiben könnten, sind GC-Zellen auf ihre Art besonders anfällig für Todessignale. Schließlich ist nur durch die ständige, gezielte Elimination von B-Zellen im GC eine Selektion von B-Zellrezeptor-Varianten mit gesteigerter Affinität möglich. Dazu stehen GC-Zellen dauerhaft in Signalkontakt mit anderen Zellen des GC, hauptsächlich T- und dendritischen Zellen. Ein Verlust dieser Signalaktivität, z.B. in in-vitro-Kultur, führt zur sofortigen Apoptose der B-Zellen (Liu et al., 1989).

### 1.2 Pathogenese von B-Zell-Lymphomen

Historisch und klinisch wurde lange Zeit die Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome von den Hodgkin-Lymphomen unterschieden. Fortschritte im molekularbiologischen Verständnis aller Lymphomtypen lassen diese strikte Trennung jedoch immer mehr verschwimmen, da es in Pathogenese und Tumorevolution viele Gemeinsamkeiten zwischen diesen Gruppen gibt. Auf jeden Fall biologisch sinnvoll erscheint eine Trennung nach dem Ursprungszelltyp, aus dem das maligne Lymphom hervorgegangen

## 1 Einleitung

ist (NK-, T-, oder B-Zelle), da der Tumor oft noch Reste der ursprünglichen Zelldifferenzierung aufweist. Die Unterteilung in die einzelnen Lymphomentitäten erfolgt anhand von Morphologie der Zellen und des Gewebes, der Ausprägung immunhistochemischer Marker und dem Vorhandensein entitätsspezifischer genetischer Läsionen (Swerdlow, 2008).

Bei Betrachtung der klinischen Inzidenz fällt auf, dass der Großteil aller Lymphome von B-Zellen abstammt. Hierbei scheint die GC-Reaktion ein besonderes Risiko für die Entartung von Zellen darzustellen, da inzwischen durch die Detektion somatisch hypermutierter IG-Gene gezeigt werden konnte, dass sogar die Mehrzahl der Lymphome von GC- oder Post-GC-B-Zellen abstammt (Klein und Dalla-Favera, 2005). In seltenen Fällen von Kombinationslymphomen, d.h. dem Befund von zwei gleichzeitigen, verschiedenartigen Lymphomen im selben Patienten, wurde sogar durch gemeinsame und getrennte V-Gen-Mutationen der Nachweis geführt, dass beide Lymphome von derselben GC-Zelle abstammen (Bräuninger et al., 2006).

In der Tumorentwicklung ist es erforderlich, dass mehrere der zuvor genannten Kontrollinstanzen und Signalwege im GC dereguliert werden. Das gängige Modell geht davon aus, dass die hohe Teilungsrate zusammen mit der erhöhten Mutationsfrequenz einzelnen GC-B-Zellen erlaubt, somatische Mutationen in nicht-IG-Genen anzusammeln. So konnte z.B. gezeigt werden, dass im Blut eines gesunden Menschen ein Teil der Post-GC-B-Zellen Mutationen in nicht-IG-Genen (z.B. *BCL6*) tragen, die dem Mutationsmuster nach als aberrante Hypermutation im GC eingefügt wurden (Peng et al., 1999). Die Kombination von Treffern in verschiedenen Genen und Signalwegen erlaubt dem B-Zell-Klon dann, mehr und mehr der Kontrolle von Apoptosesignalen zu entgehen und unabhängig von äußeren Signalen zu proliferieren. Hierbei ist es interessant, dass einige Lymphomtypen zum Teil Anzeichen einer fortlaufenden somatischen Hypermutation innerhalb des Tumorklons zeigen (Gaidano et al., 2003; Pasqualucci et al., 2001). Die Mutationsmaschinerie des GC verschafft dem Tumor somit den Vorteil, weiterhin zufällige Mutationen in transkribierte Gene einzuführen und so ein Substrat für fortlaufende evolutionäre Selektionsprozesse zwi-

## 1 Einleitung

schen den Tumorzellen bereitzustellen.

Neben der Erzeugung zufälliger Mutationen in nicht-IG-Genen während der GC-Reaktion gibt es weitere Spuren der B-Zell-Entwicklung in Lymphomen. In mehreren Differenzierungsstadien normaler B-Zellen werden Doppelstrangbrüche in die DNA eingeführt und (kurzfristig) toleriert. So erfolgt das Rearrangement der IG-Gene im Knochenmark während der Reifung der B-Zelle durch das gezielte Ausschneiden von Gensegmenten. Während der somatischen Hypermutation kommt es regelmässig zu Doppelstrangbrüchen und diese sind im Prozess des Klassenwechsels sogar zwingend erforderlich, um Gensegmente dauerhaft zu entfernen. In Lymphomen detektiert man deswegen häufig chromosomale Translokationen, die anhand der Bruchpunkte ganz klar einem dieser Prozesse zuzuordnen sind. Denkbar ist, dass bei Vorhandensein eines anderen Doppelstrangbruchs zum Zeitpunkt der Einführung des Bruchs in das IG-Gen eine gewisse Fehlerrate beim Zusammenfügen der Bruchpunkte besteht, so dass in manchen B-Zellen reziproke Translokationen von IG-Genen zu nicht-IG-Genen entstehen. Erhöht wird diese Wahrscheinlichkeit gleichzeitiger Brüche noch durch die aberrante somatische Hypermutation im GC, die Doppelstrangbrüche in anderen stark transkribierten Genen ebenso wie in IG-Genen erzeugt. In den meisten Fällen werden solche Translokationen schädlich für die Zelle sein, aber einige wenige Translokationen scheinen der Zelle so starke klonale Vorteile zu verschaffen, dass sie regelmässig in Lymphomen detektiert werden (siehe z.B. die „Burkitt-Translokation“, Abschnitt 1.4).

Durch die Besonderheiten der GC-B-Zellen scheinen selbige zur Tumorentwicklung prädispositioniert zu sein. Zusammen mit der hohen Anzahl an B-Zellen im Körper und der Menge an GC-Reaktionen, die ein Mensch in seinem Leben generiert, ist dies vermutlich die Erklärung für den hohen Anteil der B-Zell-Lymphome.

### 1.3 Das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom

Dieses klinisch und morphologisch heterogene Lymphom stammt von GC-B-Zellen ab, was anhand somatisch mutierter IG-V-Gene gezeigt werden konnte (Lossos et al., 2000b). Es ist mit ca. 30% Anteil das häufigste B-Zell-Lymphom (Fisher, 2003). Lange Zeit war es unklar, ob und wie diese Entität weiter sinnvoll zu unterteilen ist. Erst groß angelegte Untersuchungen mittels Genexpressionsanalysen erlaubten es, zwei klinisch wie biologisch relevante Subgruppen zu erkennen (Rosenwald et al., 2002). Der Vergleich der Expressionssignaturen der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome (engl. diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) mit verschiedenen Stadien der normalen B-Zell-Entwicklung zeigte, dass die eine Gruppe eher GC-B-Zellen ähnelt (benannt GCB-DLBCL), die andere eher in-vitro-aktivierten B-Zellen (benannt ABC-DLBCL).

Klinisch weisen Patienten mit ABC-DLBCL hierbei deutlich schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeiten auf (Hill und Sweetenham, 2012), was vermutlich auch in der konstitutiven Aktivierung des Apoptoseresistenz verleihenden NF $\kappa$ B-Signalwegs in dieser Lymphomgruppe begründet liegt. Bereits bevor die Unterteilung in die Subgruppen möglich war, wurden häufige Veränderungen im FAS-Rezeptor und in den zentralen Signalmolekülen ATM und p53 beschrieben (Gronbaek et al., 1998, 2002; Stankovic et al., 2002). Untersuchungen zeigten, dass weitere genetische Läsionen präferentiell in einer der Entitäten detektiert werden. Nur Fälle von GCB-DLBCL zeigen das Phänomen der konstitutiv aktiven somatischen Hypermutation, mutieren also konstant IG- und nicht-IG-Gene (Lossos et al., 2000a). Diese Lymphome weisen auch z.B. bevorzugt Translokationen des *BCL2*-Lokus an eines der IG-Gene und Amplifikationen des *REL*-Gens auf (Rosenwald et al., 2002), wohingegen ABC-DLBCLs oft Translokationen von *BCL6* an diverse Partner tragen (Iqbal et al., 2007). Ebenfalls nur in der ABC-Gruppe findet man häufige Inaktivierungen des Transkriptionsfaktors *PRDM1* (Blimp1), der in gesunden B-Zellen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung zu Plasmazellen spielt (Mandelbaum et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass nur das Überleben der ABC-DLBCL-Zellen von einem chronischen Signal ihres

## 1 Einleitung

B-Zell-Rezeptors abhängt (Davis et al., 2010), ebenso wie nur diese Subgruppe eine konstitutive Aktivität des Enzyms *MALT1* aufweist (Hailfinger et al., 2009). In allen bisher untersuchten ABC-DLBCLs war der NF $\kappa$ B-Signalweg konstitutiv aktiv und liefert dem Klon so wichtige Überlebenssignale (Sweetenham, 2011), was durch Inaktivierung von negativen (z.B. *TNFAIP3*) oder Hyperaktivierung von positiven Regulatoren (z.B. *CARD11*, *TRAF2* und *TRAF5*) dieses Signalkomplexes bewirkt wird (Compagno et al., 2009). Inzwischen ist durch zahlreiche Studien klar geworden, dass die beiden DLBCL-Gruppen, sowohl was Pathogenese als auch molekulare Veränderungen betrifft, als zwei separate Entitäten betrachtet werden können (Schneider et al., 2011).

Ein seltener und schlecht charakterisierter Subtyp des DLBCLs ist das primär mediastinale B-Zell-Lymphom. In Genexpressionsanalysen wird es dem ABC-Subtyp zugeordnet und zeigt auch ähnliche Läsionen (z.B. *BCL6*-Translokationen und Aktivität des NF $\kappa$ B-Weges). Erweitert man die Vergleichsgruppen jedoch um andere Lymphome, zeigt die Genexpression deutliche Parallelen zum Hodgkin-Lymphom (Rosenwald et al., 2003; Savage et al., 2003), dem es auch von der Lokalisation und Morphologie ähnelt.

### 1.4 Das Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist ein aggressives Lymphom, das von ausgereiften B-Zellen abstammt. Es werden drei Subtypen unterschieden: Das sporadische BL, das hauptsächlich in der westlichen Welt vorkommt, das endemische BL, das vor allem aus dem tropischen Afrika bekannt ist, und das BL assoziiert mit Immunsuppression (Swerdlow, 2008). Etwa 90% der endemischen BL und 30% der sporadischen BL zeigen eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV), was aufzeigt, dass der Virus vermutlich eine Rolle in der Pathogenese des BL spielt, obwohl im EBV-positiven Lymphom kaum virale Gene ausgeprägt werden (Brady et al., 2007).

Die prägende genetische Läsion des BL ist die sogenannte „Burkitt-Transloka-

## 1 Einleitung

tion" t(8;14)(q24;q32) und ihre Varianten t(8;22) und t(2;8) (Hecht und Aster, 2000). All diese Translokationen bringen das *c-myc*-Protooncogen in die Nähe eines der menschlichen Immunglobulinloci. So gut wie jedes bisher untersuchte BL wies eine dieser Varianten auf, aber diese Läsion ist trotzdem nicht spezifisch für das BL, da sie selten auch in anderen Lymphomtypen gefunden wurde (Boerma et al., 2009). Der Effekt dieser Translokation ist eine stark erhöhte *c-myc*-Expression, getrieben durch die Immunglobulinenhancer, die dem Lymphomklon über eine Verstärkung von Proliferationssignalen erlaubt, schnell zu wachsen (Hecht und Aster, 2000). Gewöhnlich führt eine starke Expression des *c-myc*-Gens jedoch auch zur Verstärkung von Apoptose-signalen. Deswegen ist es für den BL-Klon besonders von Vorteil, wenn zusätzliche Läsionen diese Apoptosesignale unterbrechen. Einige der bisher beschriebenen Mutationen in BL stören den p53-Signalweg, entweder durch direkte Beeinträchtigung von *TP53* selbst oder von Teilen der untergeordneten Signalkaskade. Dies ermöglicht den BL-Zellen, innere und äußere Todessignale zu ignorieren (Hecht und Aster, 2000; Garrison et al., 2008). Verglichen mit anderen Lymphomen, die aus reifen B-Zellen entstehen, weist das BL wenige sekundäre chromosomale Veränderungen neben der typischen BL-Translokation auf. Die am häufigsten bisher durch zytogenetische Methoden beschriebenen Veränderungen sind Zugewinne auf 1q und auf den Chromosomen 7 und 12 (Boerma et al., 2009).

Wie in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, ist die Klassifizierung als BL aufgrund von morphologischen und/oder cytogenetischer Untersuchungen fehlerbehaftet (Hummel et al., 2006). In dieser Arbeit wurde deswegen eine Klassifizierung mit Hilfe von Genexpressionsanalysen angewendet (Hummel et al., 2006), um das molekulare BL (mBL) von Lymphomen zu unterscheiden, die eher den DLBCL zugeordnet werden müssen.

## 1.5 Einzelnukleotidpolymorphismus-Chips als Methode zur Bestimmung der Kopienzahl

Schon durch frühe Arbeiten in der Krebsforschung wurde klar, dass die Kopienzahl einen potenten Einfluß auf die Expressionsstärke von Onko- und Tumorsuppressorgenen haben kann (Brodeur, 1987). Eine der ersten im großen Maßstab einsetzbaren Methoden zur Aufklärung der Kopienzahl in einem gesamten Genom war die komparative genomische Hybridisierung (engl. comparative genomic hybridisation, CGH). Zu diesem Zweck werden eine Tumor- und eine Kontroll-DNA (aus normalen, diploiden Zellen) an Metaphasen-Ausstriche gewöhnlicher humaner Zellen hybridisiert. Da Tumor- und Kontroll-DNA mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und ihre Mengen normalisiert werden, lässt sich aus dem Verhältnis der beiden Fluoreszenzfarben direkt die Kopienzahl an der entsprechenden Stelle des Metaphase-Chromosoms ableiten. Die frühe, rein mikroskopisch-fotografische Auswertung ist natürlich sehr limitiert in der Auflösung, da nur einige Megabasen große Veränderungen auch zu einer detektierbaren Verschiebung der Farbe auf dem Chromosom führen. Eine deutliche Auflösungsverbesserung resultiert in der Verwendung von speziellen Chips, auf denen DNA-Fragmente als Sonden an vorher festgelegten Orten gebunden sind (Array-CGH, aCGH), und die mit Hilfe von speziellen hochauflösenden Scannern eingelesen werden. Die Sequenzen dieser DNA-Stücke entsprechen Regionen des Genoms, so dass eine Bindung der beiden fluoreszenzmarkierten Test-DNAs an den Ort des Chips Aussagen über die Kopienzahl dieses Stücks im Erbgut des Testsubjekts erlaubt. Frühe Chips dieser Art verwendeten Sonden, die aus zerschnittener humaner DNA bestanden und in Bakterien als künstliches bakterielles Chromosom vermehrt wurden (sogenannte BAC-Klone; z.B. in Chen et al., 1998; Wessendorf et al., 2002). Eine weitere Verbesserung der Abdeckung und Auflösung gelang durch die Einführung von Oligonukleotidsonden, die nach der kompletten Sequenzierung des menschlichen Genoms zur Abfrage von bestimmten DNA-Abschnitten gestaltet werden konnten (z.B. in Heidenblad et al., 2008). Heutzutage ist es möglich, bei ver-

## 1 Einleitung

schiedenen Herstellern aCGH-Chips zu bestellen, die eine beliebige Genomregion mit gewünschter Auflösung abdecken, nur begrenzt durch die Anzahl Sonden, die der Hersteller auf seiner Art von Chips gleichzeitig aufbringen und detektieren kann.

Auf ähnliche Art und Weise funktionieren auch Einzelnukleotidpolymorphismus-Chips (SNP-Chips): Es handelt sich ebenfalls um kleine Reaktionsgefäße, in denen an definierten Stellen festgelegte Oligonukleotide befestigt sind. Im Unterschied zur CGH wird allerdings nur eine fluoreszenzmarkierte Test-DNA auf diese Sonden hybridisiert. Durch verbessertes Sondendesign, z.B. die Benutzung von Kontrollsonden, die die unspezifische Bindung messen, und statistische Verfahren zur Interpretation des erhaltenen Fluoreszenzsignals (Affymetrix, 2006), ist es möglich, Aussagen über die Menge an Material zu machen, die an eine bestimmte Sonde gebunden hat. Die Sonden bestehen dabei oft aus Paaren, die sich nur an einer einzigen Stelle in ihrer Basenzusammensetzung unterscheiden. Entwickelt wurde dieses Verfahren ursprünglich, um polymorphe Bereiche des menschlichen Genoms zu genotypisieren. Diese sogenannten Einzelnukleotidpolymorphismen sind über das ganze Erbgut verteilte Stellen, an denen unterschiedliche Basenzusammensetzungen in der Keimbahn-DNA von Individuen detektiert wurden. In verschiedenen groß angelegten Studien konnte gezeigt werden, dass bei vielen Multifaktor-Merkmalen eine Assoziation zwischen Einzelnukleotid-Genotypen und ausgeprägtem Merkmal besteht, sogenannte genomweite Assoziationsstudien (z.B. Kim et al., 2011b). SNP-Chips erlauben es, relativ unkompliziert eine hohe Anzahl von Einzelnukleotidpolymorphismen in kurzer Zeit zu bestimmen, und haben genomweite Studien mit mehreren tausend Probanden erst ermöglicht.

Da SNP-Chips die Menge von hybridisiertem Material an Paaren von Sonden messen, die verschiedene Allele eines Einzelnukleotidpolymorphismus darstellen, bestimmen sie gleichzeitig den Genotyp und die Kopienzahl einer Test-DNA an den abgefragten Stellen. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erlaubt es, aus den einzelnen sondenspezifischen Kopienzahlen genomische Bruchpunkte zu bestimmen, an denen Zugewinne oder Verluste von DNA beginnen und enden, und so

unbalancierte Bereiche zu entdecken. Außerdem lässt sich mit den Genotypinformationen der Zustand der Polymorphismen als homo- oder heterozygot detektieren, was sowohl mit als auch ohne entsprechende Information über die Keimbahnkonfiguration des untersuchten Individuums zur Bestimmung von Bereichen mit uniparentaler Disomie dienen kann.

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Laufe der Entwicklung eines Tumors finden regelmässig Inaktivierungen von Genen statt, die vorteilhaft für die Entwicklung des Tumorzellklons sind. Zwei häufig beobachtete Inaktivierungsmöglichkeiten sind Mutation und/oder Deletion dieser Gene. Im Gegensatz zu vielen soliden Tumoren sind in der Gruppe der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome derzeit jedoch nur eine Hand voll rekurrenter Tumorsuppressorgene bekannt. Im Verlauf dieser Arbeit soll deswegen in dieser Tumorgruppe nach bisher unbekanntem Tumorsuppressorgen gesucht werden.

Zu diesem Zweck bestand im Rahmen des Verbundprojektes der Krebshilfe „Molekulare Mechanismen maligner Lymphome“ (MMML) Zugriff auf eine Materialbank, in der hunderte B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome gesammelt wurden. In dieser Arbeit soll mit Hilfe von Affymetrix SNP-Chips das vorhandene DNA-Material von BLs und DLBCLs auf rekurrente Deletionen untersucht werden. Die verwendeten SNP-Chips sind mit vom Hersteller ausgewählten Oligonukleotidsonden in der Lage, die Kopienzahl des menschlichen Genoms an ca. 250.000 Positionen zu bestimmen. Mit diesen Kopienzahlinformationen soll unter Heranziehung bioinformatischer Methoden herausgefunden werden, welches Chromosomenmaterial im jeweiligen Einzelfall verloren oder hinzugewonnen wurde. Durch Feststellung des Überlapps dieser Regionen zwischen verschiedenen Fällen derselben Tumorentität sollte es möglich sein, Gene zu detektieren, die statistisch bevorzugt in Regionen von Verlust oder Zugewinn liegen, da dies für den Tumorklon offenbar von Vorteil ist.

Des Weiteren soll die so erhaltene Liste von Genkandidaten mit unabhängigen

## 1 Einleitung

gen Methoden validiert werden. Da im Verbundprojekt von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls Genexpressionsdaten derselben Tumore erhoben wurden, bietet sich als erstes ein Abgleich der Kopienzahldaten mit der mRNA-Expression an. Bei einem herkömmlichen Tumorsuppressorgen wäre zu erwarten, dass die Expression in von einer Deletion betroffenen Tumoren niedrig oder womöglich gar nicht vorhanden ist. Eine weitere in anderen Tumoren bereits bewährte Methode ist die Überprüfung des verbliebenen Allels in Gewebe mit einem heterozygoten Verlust. Da ein klassisches Tumorsuppressorgen auf beiden Allelen inaktiviert werden muss, damit der Tumor einen Wachstumsvorteil erhält, beobachtet man in solchen Fällen oft eine Kombination von Deletion auf einem Allel und inaktivierender Mutation auf dem anderen Allel. Aus diesem Grund bietet sich in Tumoren, in denen der SNP-Chip nur noch ein Allel detektiert, die Überprüfung dieses noch vorhandenen Allels durch PCR-Amplifikation gefolgt von DNA-Sequenzierung der Produkte an. Werden Mutationen gefunden, die die Gen- oder Proteinfunktion beeinträchtigen, wäre das ein weiterer Hinweis auf die Relevanz dieses Gens für die Tumorentwicklung.

Das Ziel dieser Arbeit ist somit durch Entdeckung neuer Tumorsuppressorgene das Verständnis für die Vorgänge in der Pathogenese der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome zu vertiefen.

## **2 Material und Methoden**

Teile der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen eines Verbundprojekts der Krebshilfe durchgeführt. Der Verbund „molekulare Mechanismen maligner Lymphome“ hatte es sich zur Aufgabe gemacht, durch die umfassende, nach einheitlichen Kriterien durchgeführte Charakterisierung von hunderten gesammelter Lymphome ein besseres Verständnis für die gemeinsamen, aber auch entitätenspezifischen Mechanismen in der Pathogenese dieser Tumore zu gewinnen. Im Zuge dieser Arbeit wurde oft auf Ergebnisse aus Untersuchungen anderer am Verbund beteiligten Gruppen zurückgegriffen, z.B. für die Genexpression oder FISH-Analysen. Eine besonders enge Zusammenarbeit bestand mit der Bioinformatik in Leipzig und speziell Herrn Markus Kreuz, der hauptverantwortlich für den statistischen und bioinformatischen Teil der SNP-Chip-Analysen war, der bei der Menge an erhobenen Daten unerlässlich war. Wo Daten aus dem Verbund übernommen oder mit eigenen Daten kombiniert wurden, wird jeweils im Text deutlich gemacht.

### **2.1 Sammlung und Extraktion der DNA**

Biopsien der Tumorfälle wurden von erfahrenen Pathologen aus dem MMML-Konsortium anhand der WHO-Kriterien klassifiziert (Swerdlow, 2008). DNA aus Ganzschnittgewebe des Tumors wurde mit dem QiaAmp DNA Blood Kit nach Anleitung des Herstellers extrahiert (Qiagen, Hilden). Für das MMML-Projekt wurde zentral die Zustimmung des IRB der Universität Göttingen eingeholt (D403/05).

Die Konzentrationen und Reinheit der erhaltenen DNAs wurde mittels eines

NanoDrop-Geräts (ND-1000, Thermo Scientific) bestimmt, indem die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen gemessen wurde. Nach Lambert-Beer gilt:  $A=c*d*\epsilon$ , mit A: Absorption, c: Konzentration, d: Schichtdicke und  $\epsilon$ : Extinktionskoeffizient des Stoffes bei der betrachteten Wellenlänge. Verunreinigungen mit Protein führen oft zu einer Veränderung des Quotienten der Absorption bei 260 nm zu 280 nm von seinem Optimalwert zwischen 1,8 und 2,0. Kontaminationen mit anderen Stoffen (Lösungsmitteln etc.) sind oft an einer generellen Verformung der Absorptionsspektren erkennbar. Unreine DNAs wurden nach Möglichkeit ein weiteres Mal präpariert oder es wurde bei ausreichender DNA-Menge durch Ethanolfällung versucht, die DNA von den Kontaminanten zu trennen.

## 2.2 Einzelnukleotidpolymorphismus-Chips

Im Zuge dieser Arbeit kamen 250k-GeneChips der Firma Affymetrix (Santa Clara, Kalifornien, USA) zum Einsatz. Diese Chips existieren in zwei Ausführungen, die jeweils unterschiedliche Sonden tragen, passend zum durchgeführten Verdau mit den Restriktionsenzymen Styl oder Nspl. Sie erlauben es, die Kopienzahl und den Genotyp an jeweils ca. 250.000 Positionen des menschlichen Genoms abzufragen, an denen Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism, SNPs) in Datenbanken beschrieben wurden.

### 2.2.1 Restriktionsenzymspaltung & Ligation

Jeweils 250 ng genomische DNA wurden mit einem Restriktionsenzym (Styl oder Nspl, je nach geplantem Chiptyp) verdaut. Jede Reaktion bestand aus folgenden Komponenten: 9,75  $\mu$ l Wasser, 2  $\mu$ l 10-fach Puffer (NE-Puffer 2 für Nspl, NE-Puffer 3 für Styl; beide von New England Biolabs), 2  $\mu$ l bovines Serumalbumin (10x; New England Biolabs) und 1  $\mu$ l Restriktionsenzym (Nspl oder Styl; New England Biolabs). Nach Zugabe von 5  $\mu$ l DNA-Lösung (50 ng/ $\mu$ l) wurde folgender Temperaturverlauf

gewählt: 37°C für 2 Stunden, 65°C für 20 Minuten, Lagerung bis zur Entnahme bei 4°C.

An die dabei entstehenden überhängenden Enden wurden passende, von Affymetrix zur Verfügung gestellte Adapter ligiert. Die Ligation enthielt pro Reaktion 0,75 µl Adapter (passend zum verwendeten Restriktionsenzym; Affymetrix), 2,5 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10-fach; New England Biolabs), 2 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl; New England Biolabs). Diese Ligationsmischung wurde direkt dem Produkt des Verdauens hinzugefügt. Für die Reaktion wurde folgendes Temperaturprofil gewählt: 16°C für 3 Stunden, 70°C für 20 Minuten, Halten bei 4°C. Anschliessend wurden die 25 µl Ligationsprodukt jeder Reaktion mit 75 µl Wasser verdünnt, um die für die PCR geeignete DNA-Konzentration zu erreichen.

### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die nun folgende Amplifikation der Fragmente erfolgte wiederum nach Anleitung von Affymetrix auf dem GeneAmp-PCR-System 9700 (Applied Biosystems). Die PCR-Ursprungslösung enthielt folgende Komponenten (pro Reaktion): 39,5 µl Wasser, 10 µl Titanium-Taq-PCR-Puffer (10-fach, Clontech), 20 µl GC-Melt (5 M; Clontech), 14 µl dNTP-Lösung (jeweils 2,5 mM für jedes Nukleotid; Takara), 4,5 µl PCR-Primer 002 (100 µM; Affymetrix) und 2 µl Titanium-Taq-DNA-Polymerase (50X; Clontech). Jeder PCR-Reaktion wurden 10 µl des verdünnten Ligationsprodukts zugesetzt.

Die Primer-Oligonukleotide erkennen hierbei die in der Ligation angefügte Adaptersequenz. Der Temperaturzyklus (94°C für 3 min., 30 mal: 94°C für 30 s, 60°C für 45 s, 68°C für 15 s; abschliessend 68°C für 7 min., bei 4°C halten) erlaubt so eine gezielte Anreicherung von Fragmenten zwischen 500 und 1500 Basenpaaren Länge, die später durch passende Sonden auf den Chips detektiert werden können. Der Erfolg der PCR wurde mittels Gelelektrophorese auf einem zweiprozentigem Agarosegel überprüft, das mit Ethidiumbromid gefärbt wurde.

Der Affymetrix-Anleitung folgend wurden die PCR-Produkte anschliessend durch dreimaliges Waschen auf einer Filterplatte, die über einer Unterdruckkammer einge-

spannt war, gereinigt. Die Produktkonzentration und -Menge wurde nach erneutem Lösen in Tris-HCl-Puffer mittels Nanodrop-Photometer bestimmt.

### 2.2.3 Fragmentierung

90  $\mu\text{g}$  PCR-Produkt wurden mittels RB-Puffer (Affymetrix) auf ein Volumen von 45  $\mu\text{l}$  gebracht. Dieser Lösung wurden sodann 5  $\mu\text{l}$  10-fach Fragmentierungspuffer (Affymetrix) zugegeben. Vom frisch auf 0,05 Units/ $\mu\text{l}$  verdünnten Fragmentierungsreagenz (Affymetrix), das DNaseI enthält, wurden 5  $\mu\text{l}$  hinzupipettiert und der Reaktionsansatz gut vermischt. Im auf 37°C vorgeheizten PCR-Gerät wurde folgendes Temperaturprogramm ausgeführt: 37°C für 35 Minuten, 95°C für 15 Minuten, Ruhen bis zur Entnahme bei 4°C. Der Erfolg der Fragmentierung wurde durch Auftragen von 4  $\mu\text{l}$  des Ansatzes auf ein Agarosegel überprüft.

### 2.2.4 Markierung der Oligonukleotide (Labeling)

Eine Mischung aus 14  $\mu\text{l}$  5-fach TdT (terminale Desoxynucleotidyltransferase)-Puffer, 2  $\mu\text{l}$  GeneChip-DNA-Labeling-Reagenz (30 mM) und 3,5  $\mu\text{l}$  TdT (30 U/ $\mu\text{l}$ , alle Reagenzien von Affymetrix) wurde direkt dem nach der Gelkontrolle verbliebenen Fragmentierungsansatz hinzugefügt. Nach Herstellerangabe wurde folgendes Programm für die Markierung gewählt: 37°C für 4 Stunden, 95°C für 15 Minuten, bis zur Entnahme bei 4°C halten.

### 2.2.5 Hybridisierung

Die Stammlösung für die Hybridisierung enthielt folgende Komponenten (jeweils pro Reaktion): 12  $\mu\text{l}$  12-fach MES-Lösung (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, Sigma; enthält 70,4 g MES-Hydrat, 193,3 g MES-Natriumsalz auf 1000 ml), 13  $\mu\text{l}$  DMSO (Sigma), 13  $\mu\text{l}$  Denhardts Lösung (50-fach; Sigma), 3  $\mu\text{l}$  EDTA (0,5 M), 3  $\mu\text{l}$  Heringssperma-DNA (10 mg/ml; Promega), 2  $\mu\text{l}$  Oligo-Kontrollreagenz (Affymetrix), 3  $\mu\text{l}$  humane Cot-

## 2 Material und Methoden

1-DNA (Invitrogen), 1  $\mu\text{l}$  Tween-20 (3%; Pierce) und 140  $\mu\text{l}$  TMACL (Tetramethyl-Ammoniumchlorid; 5 M; Sigma). Diese Mischung wurde dann dem Produkt des vorhergehenden Reaktionsschritts zugesetzt (190  $\mu\text{l}$  Hybridisierungsmischung auf 70  $\mu\text{l}$  markiertes Produkt) und das Ganze dann auf 99°C für 10 Minuten erhitzt, um eine vollständige Denaturierung zu ermöglichen. Nach schneller Abkühlung auf Eis für 10 Sekunden wurde die Mixtur für eine Minute auf 49°C gebracht und danach in die SNP-Chip-Arrays injiziert. In einem Rotationsofen (60 Umdrehungen pro Minute) wurden die Chips dann für 16-18 Stunden bei 49°C hybridisiert.

### 2.2.6 Waschen und Färben

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Hybridisierungsmischung aus dem Chip entfernt und durch 270  $\mu\text{l}$  „Array Holding Buffer“ (100 ml: 8,3 ml 12-fach MES-Lösung, siehe 2.2.5; 18,5 ml NaCl, 5 molar; 0,1 ml Tween-20, 10%ig; in Wasser) ersetzt. Der Färbepuffer enthielt folgende Komponenten (pro Reaktion): 800,04  $\mu\text{l}$  Wasser, 360  $\mu\text{l}$  SSPE (20-fach; BioWhittaker Molecular Applications), 3,96  $\mu\text{l}$  Tween-20 (3%; Pierce), 24  $\mu\text{l}$  Denhardts Reagenz (50-fach; Sigma). Die so erhaltene Lösung wurde in zwei gleichgroße Aliquots geteilt. Aus dem ersten Aliquot wurde durch Hinzufügen von 6  $\mu\text{l}$  Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE; 1 mg/ml; Molecular Probes) die SAPE-Färbelösung hergestellt, aus dem zweiten durch Vermischen mit 6  $\mu\text{l}$  biotinyliertem Antikörper (0,5 mg/ml; Vector Laboratories) die Antikörper-Färbelösung. Diese Lösungen wurden anschliessend verwendet, um mit der Fluidic Station 450 die SNP-Chips unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Programme zu färben.

### 2.2.7 Datenerfassung

Das Einlesen der Fluoreszenzsignale erfolgte in einem GeneChip-Scanner 3000 mit G7 Update von Affymetrix. Um Qualitätswerte bestimmen zu können, wurde der BRLMM-Algorithmus (Affymetrix, 2006) der Genotyping Console (Affymetrix) angewandt. Nur Fälle, die die von Affymetrix ausgegebenen Qualitätsmerkmale aufwie-

sen (Call rate > 93%), wurden für die weiterführenden Analysen verwandt. Chips, die diese unterschritten, wurden nach Möglichkeit wiederholt.

### 2.2.8 Genotypisierung und Kopienzahlanalyse

Obwohl die folgenden Berechnungen in Leipzig im Rahmen des MMML-Verbundprojekts durchgeführt wurden, soll die Vorgehensweise zum Verständnis der Gesamtanalyse kurz dargestellt werden.

Zur Genotypisierung wurde der BRLMM-Algorithmus (Affymetrix, 2006) mit Standardparametern verwendet. Als Normalreferenzen wurden 39 von Affymetrix zur Verfügung gestellte Hapmap-Proben verwendet, die mit laboreigenen Referenzen kombiniert wurden. Es handelte sich hierbei um 20 Normal-DNAs (11 weiblich, 9 männlich) für die Styl-Chips und 10 Normal-DNAs (6 weiblich, 4 männlich) für die Nspl-GeneChips. Die mit diesen Proben erreichten medianen „call rates“ (Anteil der SNPs, dem ein eindeutiger Genotyp zugeordnet werden kann) der Software betragen 96,23% (Styl) und 98,96% (Nspl) im BL-Kollektiv. Die „call rates“ des DLBCL-Kollektivs waren vergleichbar.

Zur Kopienzahlanalyse wurden die Daten dieses Kollektivs dann in die Software CNAG v2.0 geladen (Nannya et al., 2005). CNAG wurde so eingestellt, dass es sich selbständig optimale Referenzen aus dem Vorrat der zur Verfügung stehenden Referenzen (s.o.) aussucht. Es wurden so z.B. für die BLs zu 97,6% (Styl) bzw. 81,6% (Nspl) laboreigene Referenzen gewählt, der Rest wurde aus den HapMap-Proben aufgefüllt. Datensätze von Tumorfällen, für die sowohl Styl- als auch Nspl-Daten vorlagen, wurden kombiniert, um ein Gesamtset mit ca. 500.000 Markern zu erhalten. Danach wurde für jeden Fall eine Segmentierung der Kopienzahlrohdaten mit Hilfe des „Hidden Markov Model“-Algorithmus (HMM) von CNAG vorgenommen.

Dies führte jedoch oft mit den Standardeinstellungen nicht zu einer „guten“ Segmentierung, d.h., die ausgegebenen Kopienzahlstufen des Hidden Markov Model sprangen oft zwischen zwei benachbarten Zuständen hin und her, obwohl die Rohdaten ganz eindeutig keine Sprünge zeigten. Dies ist ein bekanntes Problem

bei Hidden-Markov-Modellen auf verrauschten Datensätzen, da in einem solchen Fall das Rauschen der Daten zu Fehldetektionen von Stufenübergängen führt. Dazu kam im Falle dieses Tumorkollektivs, dass es Unterschiede im Tumorzellgehalt gab. Dadurch waren die Standardzustände des Modells nicht länger anwendbar, da durch den Normalzellgehalt quasi eine „Verdünnung“ der Kopienzahlen des Tumors eintritt. Außerdem wiesen die einzelnen Chips teilweise eine deutliche unterschiedliche Hybridisierungsqualität auf, was eine Standardisierung der HMM-Parameter durch unterschiedlich starkes Rauschen weiter erschwerte. Nach verschiedenen anderen Versuchen wurde deswegen zusammen mit der Bioinformatik beschlossen, für jeden Fall einzeln die Algorithmeinstellungen anzupassen, bis keine Sprünge mehr in eindeutig gleichförmigen Bereichen feststellbar waren bzw. eindeutig aberrante Bereiche undetektiert blieben.

Für die weitere Auswertung wurde für die vorliegende Arbeit zusammen mit der Bioinformatik festgelegt, dass Aberrationen mit einer Kopienzahl des HMM von 5 oder mehr als Amplifikationen, Aberrationen mit einer Kopienzahl von 0 als homozygote Deletionen behandelt werden sollten. Das einzelne X-Chromosom bei Tumoren männlicher Patienten machte es nötig, die Interpretation der HMM-Zustände dieser Fälle für das Geschlechtschromosom anzupassen: 1-3 Kopien wurden als normal festgelegt, mehr als 3 Kopien als Zugewinn und 0 Kopien als Verlust.

### 2.2.9 Filterung von Kopienzahlpolymorphismen

Um Keimbahnpolymorphismen auszuschließen, wurde die Liste der ausgegebenen rekurrenten Aberrationen von GISTIC mit Hilfe der „database of genomic variants“ (Stand Juni 2008, lafrate et al., 2004) gefiltert. Dabei wurden SNPs, die in Regionen liegen, die laut der Datenbank auch in „normalem“ Gewebe als Kopienzahl-Keimbahnpolymorphismus detektiert wurden, in den nachfolgenden Analysen nicht berücksichtigt. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse basieren zum größten Teil auf diesen gefilterten Daten; wo das nicht der Fall ist, wird gesondert darauf hingewiesen.

### **2.2.10 Detektion des Verlustes von Heterozygotie und uniparentaler Disomie**

Zu diesem Zwecke benutzte die Bioinformatik in Leipzig eine Methode des Programms dChip (Lin et al., 2004; Zhao et al., 2004), die ein HMM verwendet, um ohne Vorhandensein von patientenspezifischer Keimbahn-DNA Bereiche zu entdecken, die ihre Heterozygotie verloren haben (engl. loss of heterozygosity, LOH). Der Algorithmus „HMM considering haplotype (LD-HMM)“ (Beroukchim et al., 2006) wurde so eingestellt, dass er Kopplungs-Ungleichgewichte (engl. linkage disequilibrium) berücksichtigt. Der Parameter „LOH call threshold“ wurde auf 0,95 gesetzt und es wurde eine empirische Haplotypkorrektur angewandt. Das bedeutet, dass eine detektierte LOH-Region ausgeschlossen wurde, wenn ihre homozygoten Genotypen zu mehr als 95% mit entsprechenden Genotypen von 5% der Referenz-DNAs übereinstimmte. Als Referenz diente hier wieder das gleiche Kollektiv, das auch für die Kopienzahlanalysen eingesetzt wurde.

### **2.2.11 Rekurrenzdetektion mittels GISTIC-Algorithmus**

Die in der Kopienzahlanalyse ermittelten aberranten Segmente wurden von der Bioinformatik in Leipzig an den GISTIC-Algorithmus (Beroukchim et al., 2007) übergeben. Dieser ermittelt, welche Segmente aus verschiedenen Tumoren überlappen (getrennt nach Zugewinn/Verlust), und ist in der Lage, durch Vergleich mit der Nullhypothese von nur zufälligen Häufungen in einem statistischen Verfahren die Signifikanz der überlappenden Bereiche zu bestimmen. Das Programm berücksichtigt hierbei nicht nur die räumliche Ausdehnung von Segmenten, sondern auch das jeweilige Kopienzahlniveau, so daß z.B. eine homozygote Deletion stärker in die statistische Gewichtung eingeht als eine heterozygote Deletion. Das Ergebnis war eine Liste rekurrenter Aberrationen, repräsentiert durch eine Kernregion (peak region) mit dem höchsten G-score-Wert und jeweils einer weitergefaßten, dafür robusteren Region (wide peak). Für jeden einzelnen Tumorfall wurde dann geprüft, ob die Mehrzahl der Markersigna-

le mit einer von GISTIC detektierten rekurrenten Aberration übereinstimmt. War dies der Fall, wurde die Aberration im betreffenden Fall als präsent gekennzeichnet.

## 2.3 PCR und Sequenzierung von *TNFSF7*, *TNFSF9* und der *hy3*-RNA

Die Exons der beiden proteinkodierenden Gene *TNFSF7* und *TNFSF9* wurden mittels PCR amplifiziert, unter Einsatz von jeweils 3 Primerpaaren pro Gen, wobei jedes Paar ein Exon amplifizierte. Die nichtkodierende RNA *hy3* konnte mit einem einzigen Primerpaar per PCR vervielfältigt werden. Primersequenzen finden sich in Tabelle 2.3.1 auf der nächsten Seite, die Bedingungen der einzelnen Reaktionen in Tabelle 2.3.2 auf Seite 25.

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Bande des spezifischen Produkts, erkennbar an der korrekten Länge, wurde ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Sequenzierung nach Sanger erfolgte nach Herstellerangaben (Applied Biosystems, ABI): Je nach Größe des Produkts wurde eine optimale Menge Produkt-DNA gewählt, mit 3 pmol eines passenden Primers und 0,5 µl Big Dye vermischt und dann mit 5xSequencing Buffer und Wasser auf 20 µl und 1-fach Reaktionsbedingungen aufgefüllt. Die Sequenzierung erfolgte in Vorwärts- wie Rückwärtsrichtung unter Verwendung der gleichen Primer, die für die PCR verwendet wurden.

Das Sequenzreaktionsprodukt wurde ethanol-gefällt und auf dem ABI-3130-Sequencer analysiert. Die erhaltenen Elektropherogramme wurden mit der Software SeqScape (ABI) auf Abweichungen von der Wildtypsequenz untersucht. Die Sequenzierung aus beiden Richtungen des DNA-Strangs erlaubt es, Sequenzierartefakte, die sequenz-, also oft auch richtungsabhängig sind, von echten Veränderungen zu unterscheiden.

**Tabelle 2.3.1: Primersequenzen der Mutationsanalyse.**

<b>Gen</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Primersequenz, 5' nach 3'</b>
<i>TNFSF7</i>	Exon 1 - vorwärts	GATCTTCAGACTGGCAGCGG
	Exon 1 - rückwärts	TCTGTCTTTTCGGTCACGCGC
	Exon 2 - vorwärts	GGGACACATAGAACCTCTCTGC
	Exon 2 - rückwärts	CCTTCCTTCTCTCTCTGTGCC
	Exon 3 - vorwärts	TGTGCCTCAGTTTCCCTAAACC
	Exon 3 - rückwärts	ACACTCCCACCCCAACCC
<i>TNFSF9</i>	Exon 1 - vorwärts	CCTCCTTTTGTAGCCAAGCAGC
	Exon 1 - rückwärts	TGTAGAACAGGTGTCCCTGGG
	Exon 2 - vorwärts	GAAGTGAGTGGGGACAGAACC
	Exon 2 - rückwärts	CCCCCTTCTTCGTATCCCG
	Exon 3 - vorwärts	CTGACATGTTCCGGTGCTCAGC
	Exon 3 - rückwärts	CATGAAGGATGGAGTAGGATTCG
hy3-RNA	vorwärts	GCTGGGAATGCACGCATGAGC
	rückwärts	TGGTGGGGATTTTCGTAACCTGGGG

**Tabelle 2.3.2: Reaktionsbedingungen der PCRs für *TNFSF7*, *TNFSF9* und der *hy3*-RNA.**

Reaktionen		Reagenz	Volumen[ $\mu$ l]	Endkonzentration
<b>hy3-PCR</b>		genomische DNA	1	um 1 ng/ $\mu$ l
		dNTPs	0,6	0,2 mM
95°C	4 min	Betain	4	0,66 mM
Zyklus 40x:		Vorwärtsprimer	3,6	300 nM
95°C	50 s	Rückwärtsprimer	3,6	300 nM
62°C	30 s	Hifi-Puffer 3 (10-fach)	3	1-fach
72°C	60 s	Magnesiumchlorid	4,8	4 mM
Zyklus Ende		Hifi-Polymerase	0,5	—
72°C	5 min	Wasser	8,9	—
		Gesamt	30	
<b><i>TNFSF9</i> - alle PCRs</b>		genomische DNA	1	um 2 ng/ $\mu$ l
<b><i>TNFSF7</i> - Exon 1 &amp; 2</b>		dNTPs	0,4	0,2 mM
		Betain	4	1 mM
95°C	3,5 min	Vorwärtsprimer	2,4	300 nM
Zyklus 40x:		Rückwärtsprimer	2,4	300 nM
95°C	30 s	Hifi-Puffer 3 (10-fach)	2	1-fach
62°C	30 s	Magnesium	0,8	1 mM
72°C	60 s	Hifi-Polymerase	0,3	—
Zyklus Ende		Wasser	6,7	—
72°C	5 min	Gesamt	20	
<b><i>TNFSF7</i> - Exon 3</b>		genomische DNA	1	um 2 ng/ $\mu$ l
		dNTPs	0,4	0,2 mM
95°C	3,5 min	Betain	4	1 mM
Zyklus 40x:		Vorwärtsprimer	2,4	300 nM
95°C	30 s	Rückwärtsprimer	2,4	300 nM
62°C	30 s	Hifi-Puffer 3 (10-fach)	2	1-fach
72°C	60 s	Magnesium	2	2,5 mM
Zyklus Ende		Hifi-Polymerase	0,3	—
72°C	5 min	Wasser	5,5	—
		Gesamt	20	

## 2.4 Reverse-Transkriptions-PCR der mRNA in Fall

### MPI-248

Mit dem SensiScript-Kit (Qiagen) wurde eine Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) nach Anleitung durchgeführt. Es kamen Oligo-dT-Primer zum Einsatz, um gezielt reife mRNAs mit Hilfe ihres Poly-Adenin-Schwanzes revers zu transkribieren. Es wurden 50 ng RNA in einem Gesamtansatz von 20  $\mu$ l eingesetzt.

Das Produkt der RT-PCR wurde dann als Ausgangspunkt einer PCR verwendet, die sich in zwei Runden gliedert. Von der entstandenen kodierenden DNA (cDNA) wurden 10  $\mu$ l in die erste Runde der PCR eingesetzt. Verwendete Primer und PCR-Bedingungen sind in Tabellen 2.5.1 auf der nächsten Seite und 2.5.2 auf Seite 28 dargestellt. Das Produkt der zweiten Runde wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und anschliessend sequenziert, analog zu Abschnitt 2.3 auf Seite 23.

## 2.5 PCR und Sequenzierung der genomischen

### Translokationsbruchpunktumgebung im Fall

### MPI-248

Um die Auswirkungen der Translokation t(8;16) in Fall MPI-248 zu studieren, wurde der der8-Teil mit passenden Primern aus genomischer DNA amplifiziert und anschließend nach Sanger sequenziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.5.1 auf der nächsten Seite aufgelistet, die PCR-Bedingungen in Tabelle 2.5.2 auf Seite 28. Die erhaltenen Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Sequenzierung nach Sanger erfolgte in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung jeweils mit allen Primern, die in der PCR verwendet wurden, unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie in Abschnitt 2.3 auf Seite 23.

**Tabelle 2.5.1: Primer für die RT- und genomische PCR der Translokation in Fall MPI-248.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Primersequenz, 5' nach 3'</b>
<b>RT-PCR (alle Runden)</b>	
Vorwärts: Exon 1 - <i>SOCS1</i>	CCCGGAGCATGCGCGAGAGC
Rückwärts: Exon 2 - <i>MYC</i>	GCTGCTGCTGGTAGAAGTTCTCCTCCTC
<b>der8 (<i>MYC/SOCS1</i>)</b>	
1. Runde:	
<i>MYC</i> - vorwärts	CTTTGCACTGGAACCTTACAACACC
<i>SOCS1</i> - rückwärts 3	ACAGCAGAAAAATAAAGCCAGA
2. Runde:	
<i>MYC</i> - vorwärts	CTTTGCACTGGAACCTTACAACACC
<i>SOCS1</i> - rückwärts 1	AGGGGAAGGAGCTCAGGTAGTC
oder <i>SOCS1</i> - rückwärts 2	ACCAGGGGGACCCAGAGGGA
oder <i>SOCS1</i> - rückwärts 3	ACAGCAGAAAAATAAAGCCAGA
<b>Nichttransloziertes <i>SOCS1</i></b>	
1. Runde:	
<i>SOCS1</i> - vorwärts	GGCAGCTGCACGGCTCCTGG
<i>SOCS1</i> - rückwärts 3	ACAGCAGAAAAATAAAGCCAGA
2. Runde:	
<i>SOCS1</i> - vorwärts	GGCAGCTGCACGGCTCCTGG
<i>SOCS1</i> - rückwärts 2	ACCAGGGGGACCCAGAGGGA
oder <i>SOCS1</i> - rückwärts 3	ACAGCAGAAAAATAAAGCCAGA

**Tabelle 2.5.2: Reaktionsbedingungen der PCRs für *SOCS1* und *MYC* in Fall MPI-248.**

Reaktionen		Reagenz	Volumen[ $\mu$ l]	Endkonzentration
<b>PCR <i>SOCS1</i>/<i>MYC</i> auf cDNA</b>		cDNA	10	—
		dNTPs	3	0,2 mM
95°C	3 min 30 s	Hifi-Puffer 2	3	1-fach
	Zyklus 40x:	Betain	6	1 mM
95°C	30 s	Magnesiumchlorid	0,9	0,75 mM
60°C	30 s	Vorwärtsprimer	0,6	200 nM
72°C	1 min 30 s	Rückwärtsprimer	0,6	200 nM
	Zyklus Ende	Hifi-Polymerase	0,3	—
72°C	15 min	Wasser		—
		Gesamt	30	
<b><i>der8</i> - <i>MYC</i>/<i>SOCS1</i></b>		DNA	5 (1.Runde)	—
<b>nichttransloziertes <i>SOCS1</i></b>		PCR-Produkt	2 (2.Runde)	—
95°C	3 min 30 s	dNTPs	3	0,2 mM
	Zyklus 40x:	rTth-Puffer	9	1-fach
95°C	30 s	Betain	6	1 mM
60°C	30 s	Magnesiumchlorid	0,9	0,75 mM
68°C	3 min	Vorwärtsprimer	0,6	200 nM
	Zyklus Ende	Rückwärtsprimer	0,6	200 nM
72°C	15 min	rTth-Polymerase	0,3	—
		Wasser	variabel	—
		Gesamt	30	

## 2.6 Gelelektrophorese

Zur Trennung von Nukleinsäuren wurden in der vorliegenden Arbeit Agarosegele verwendet. Die Agarosekonzentration wurde hierbei je nach gewünschtem Trennbereich zwischen 1 und 2% variiert. Zur späteren Markierung der Nukleinsäuren wurde den Gelen Ethidiumbromid oder GelRed (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, Biotium) beigegeben. Als Lauf- und Gelpuffer kam 1x TAE-Puffer zum Einsatz (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA bei pH 8,0, in aqua dest.). Die aufzutrennenden Proben wurden zusammen mit Gelladepuffer (50% Glycerin v/v, je 0,25% w/v Bromphenolblau und Xylencyanol, in Laufpuffer) in vorbereitete Geltaschen geladen.

Durch Anlegen einer Spannung an den leitfähigen Laufpuffer wanderte die negativ geladene Nukleinsäure je nach Größe unterschiedlich schnell durch die Gelporen in Richtung des positiven Pols. Nach Beendigung des Laufs konnte die Nukleinsäure dank des zwischen die Basenpaare interkalierten, unter UV-Licht fluoreszierenden Farbstoffs sichtbar gemacht werden. Zur Beurteilung von DNA-Längen oder -Mengen wurden Größen- oder Mengenstandards im selben Gel mitaufgetrennt.

Zur Aufreinigung der aufgetrennten Nukleinsäuren vor der Weiterverwendung kam das QiaexII Gelelutions-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben zum Einsatz.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Genomische Aberrationen in Burkitt-Lymphomen

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 39 mBL mittels hochauflösender SNP-Chips untersucht. Alle als mBL eingestuftten Fälle hatten einen mBL-Index  $\geq 0,95$  in den preliminären Genexpressionsanalysen. Fünf der eingeschlossenen BL wurden als „core“-BL in der Klassifikation mittels Genexpression verwendet (Hummel et al., 2006). 29 wurden als „atypisch“ einsortiert.

Für 30 dieser Lymphome wurden beide Versionen der 250k Affymetrix Gene-Chips verwendet, um eine kombinierte Auflösung von ca. 500.000 abgefragten SNPs zu erreichen. Durch die Vorarbeiten anderer Gruppen im Rahmen des MMML-Verbundes war bekannt, dass nur in 35 von 38 untersuchten Tumoren (ein Tumor wurde nicht untersucht) eine „Burkitt-Translokation“ zwischen Ig-Gen und *c-myc* mittels FISH detektiert werden konnte (Hummel et al., 2006; Klapper et al., 2008). Die histologischen Diagnosen der Pathologen des Verbundprojekts stimmten nicht immer mit der Klassifizierung durch die Genexpression überein: 27 der Lymphome wurden auch von den Pathologen als BL eingestuft, 6 jedoch als centroblastische DLBCLs, eines als follikuläres Lymphom, Grad 3b, und fünf als unklassifizierbar anhand der WHO-Unterteilung.

Da die Signale einzelner Sonden der SNP-Chips verrauscht sind, wurde mit der Bioinformatik in Leipzig besprochen, dass nur aberrante Bereiche in die Kopienzahlanalyse einfließen sollten, die durch mindestens 5 aufeinanderfolgende SNPs detektiert wurden. Dies ergab im Endeffekt ein Detektionsfenster von 33,8 Kilobasen für

**Tabelle 3.1.1: Übersicht der genomischen Veränderungen in den 39 mBLs, nach der Filterung für Kopienzahlpolymorphismen**

Kollektiv	9 mBL (Styl-Chips, 250k)			30 mBL (Styl+Nspl, 500k)			Alle 39 mBL
	Gesamt	Ø	Median	Gesamt	Ø	Median	
Kopienzahl≠2	93	10,3	6	435	14,5	8,5	523.233
- Zugewinne	63	7	3	245	8,2	4	362.547
- Verluste	30	3,3	3	190	6,3	2,5	1.041.924
UPDs	58	6,4	4	460	15,3	14,5	770.662

Fälle mit 250.000 Meßpunkten bzw. 16,6 Kilobasen für Fälle mit 500.000 abgefragten SNPs. Die mit diesen Kriterien für alle 39 BLs in Leipzig durchgeführte bioinformatische Auswertung ergab 484 Zugewinne, 399 Verluste und 518 uniparentale Disomien (UPDs). Darunter waren auch 38 Amplifikationen mit mehr als 5 Kopien (Tabelle 7.1.1 auf Seite 94 im Anhang) und 30 homozygote Deletionen (Tabelle 7.1.2 auf Seite 95 im Anhang). Beim Abgleich dieser Bereiche mit Datenbanken zu menschlichen Polymorphismen stellte sich jedoch heraus, dass ein Teil der detektierten Veränderungen auch als Keimbahn-Veränderung in gesunden Menschen auftritt. Da in diesem Projekt leider keine Keimbahn-DNA der Patienten vorlag, um den somatischen Ursprung der Veränderungen zu bestätigen oder zu widerlegen, wurde eine Filterung der Bereiche anhand der „database of genomic variants“ vorgenommen. Alle Veränderungen, die zu mehr als 50% mit bekannten Keimbahn-Kopienzahlpolymorphismen (CNPs) überlappten, wurden als vermutlich nicht somatisch aussortiert. So blieben 308 Zugewinne und 220 Verluste genomischen Materials übrig (Tabelle 3.1.1). Von diesen waren 32 Amplifikationen und 6 homozygote Deletionen.

Ein Großteil der Sonden wurde jedoch im normalen Zustand von 2 Kopien gemessen: 15 Tumore zeigten 99% der Marker im Normalzustand, 14 weitere wiesen über 95% diploide Signale auf. Die mediane Größe der detektierten Kopienzahlveränderungen war 523.233 Basen, die kleinste gefundene Veränderung war ein 866

### 3 Ergebnisse

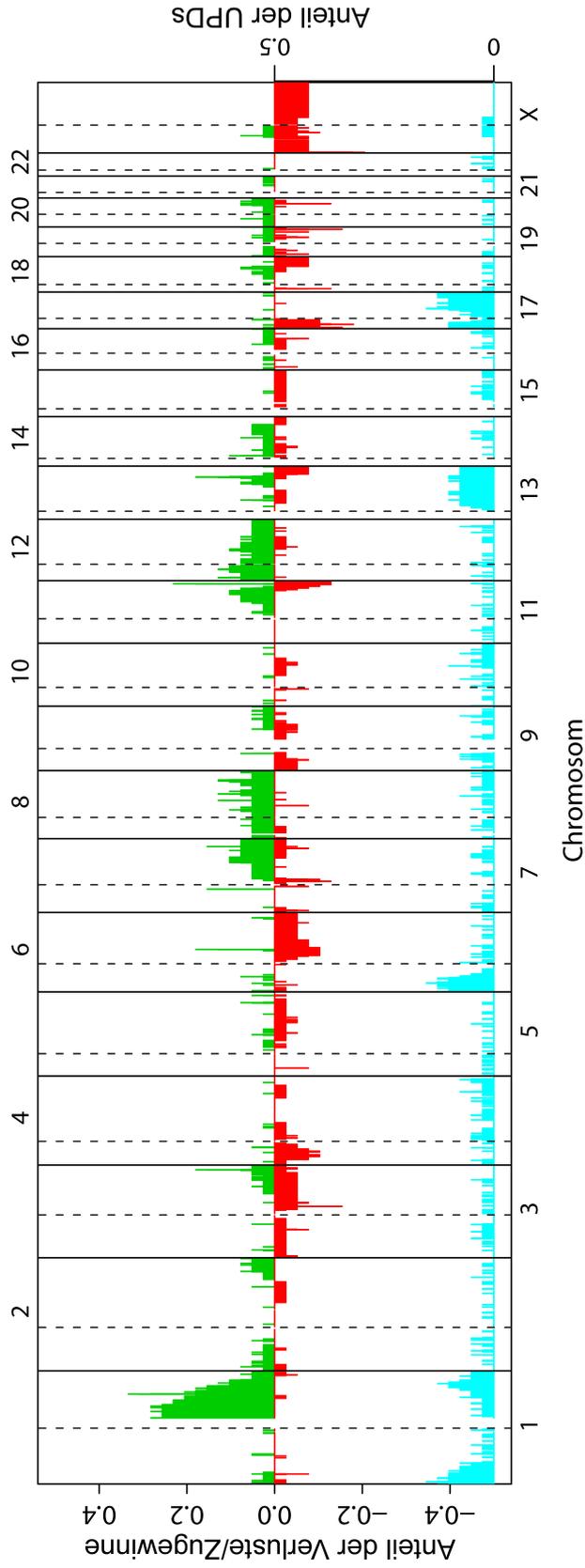
Basen langer Zugewinn. Die Frequenz der gefundenen Aberrationen über das gesamte BL-Kollektiv wird in Abbildung 3.1.1 auf der nächsten Seite dargestellt.

Der GISTIC-Algorithmus detektierte in diesem Datensatz 29 rekurrente Ereignisse (13 Zugewinne und 16 Verluste), die über der Signifikanzschwelle lagen (Abbildung 3.1.2 auf Seite 34, Tabellen 3.1.2 auf Seite 35 und 3.1.3 auf Seite 36). Die höchste Rekurrenz der Zugewinne (7 oder mehr der 39 BLs mit Zugewinn) wurde in den Regionen 1q25.1, 1q31.3, 3q27.2, 6q15, 11q24.3 und 13q31.3 gefunden. Die häufigsten Verluste (6 oder mehr Fälle mit Verlust) wurden für 3q13.13, 17p13.1, 19q13.42 und Xp22.33 detektiert.

Es war nicht möglich, die Rekurrenz von UPD-Ereignissen zu bestimmen, da zu wenige UPDs in den BLs gefunden wurden, um einen sinnvollen Grenzwert der Signifikanz zu erreichen. Regionen mit wenigstens ein paar überlappenden UPDs waren beide Arme von Chromosom 1 und 17, und die chromosomalen Arme 6p und 13q (wie in Abbildung 3.1.1 auf der nächsten Seite dargestellt).

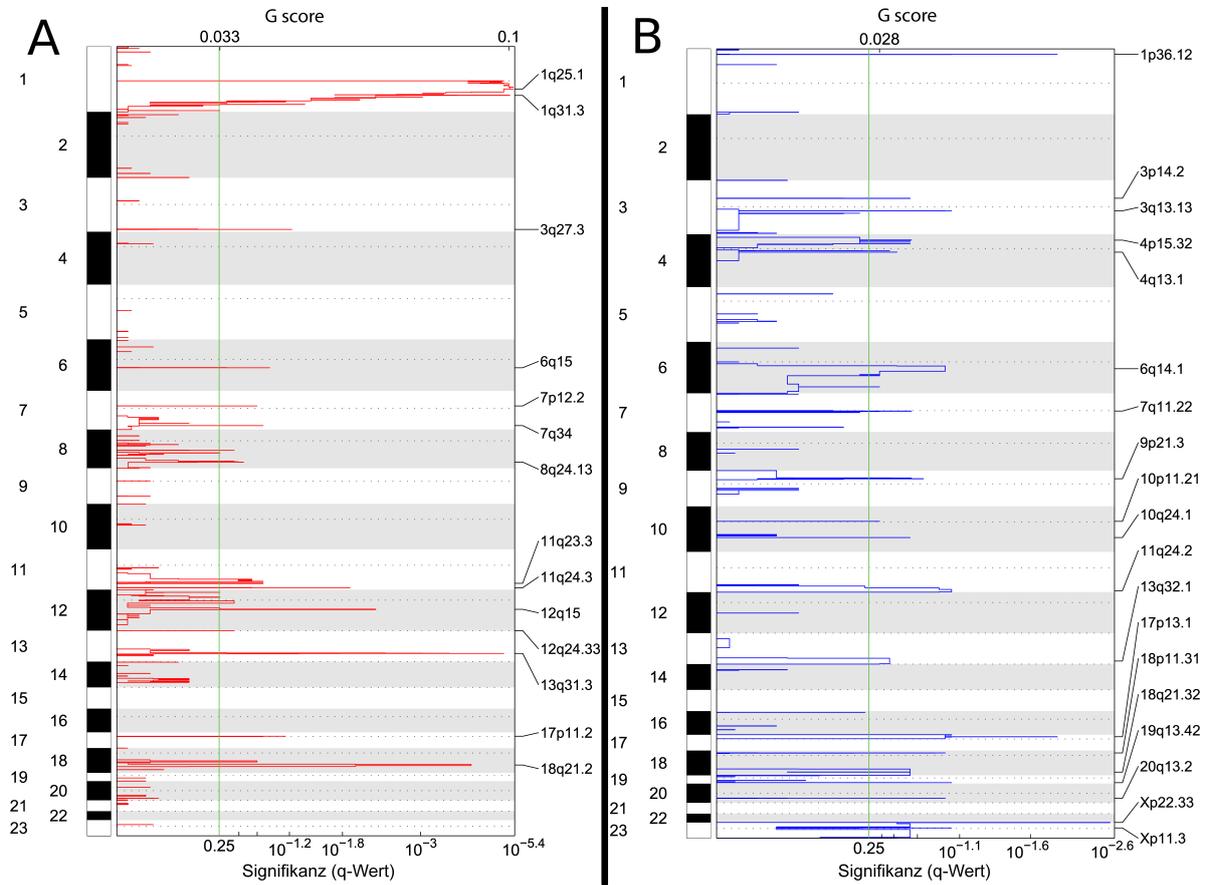
Einige Regionen enthielten Gene mit bereits bekannter Relevanz für BL oder Krebs im Allgemeinen. Die rekurrenten Zugewinne auf 3q27.3 (7 Fälle) betrafen z.B. immer *BCL6*. Obwohl eine Deregulation durch Translokation dieses Onkogens in DLBCLs beschrieben wurde (Sanchez-Beato et al., 2003), hatte keines der betroffenen BL eine durch FISH detektierbare Translokation (Hummel et al., 2006). Die Genexpression zeigte eine Erhöhung der *BCL6*-Ausprägung in den Fällen mit Zugewinn (Abbildung 3.1.3 auf Seite 37). In den untersuchten BLs scheint also eine Erhöhung der Expression des Keimzentrums-Transkriptionsfaktors *BCL6* nur durch genomische Zugewinne einen wiederkehrenden Vorteil für die Tumorklone darzustellen.

Deletierte Bereiche, die mit bekannten Tumorsuppressorgenen überlappten oder zumindest in ihrer Nähe lagen, waren 9p21.3 (2 Fälle) und 17p13.1, die *CDKN2B* bzw. *TP53* enthalten, zwei gut beschriebene Tumorsuppressoren in BL (Klangby et al., 1998; Gaidano et al., 1991; Heyman und Einhorn, 1996). Während der rekurrente Verlust auf 9p21.3 sich genau auf das Gen *CDKN2B* beschränkt, ist das Ziel auf 17p13.1 nicht so klar: Vier Fälle haben eine Kopie des gesamten Chromosomen-



**Abbildung 3.1.1: Frequenz der Aberrationen im BL-Kollektiv.** x-Achse: genomische Position, unterteilt in Chromosomen; y-Achse: Anteil der Fälle mit entsprechender Aberration, links Kopienzahl, rechts UPDs; Grün: Zugewinne, Rot: Verluste, Blau: UPDs; die gepunkteten vertikalen Linien markieren die Positionen der Zentromere. Aufgrund von Auflösungsbeschränkungen können nur Aberrationen dargestellt werden, die größer als ein Pixel sind. Einige kleine Aberrationen sind also nicht sichtbar. Die Daten enthalten keine SNPs mehr, die in Region von CNPs lagen; UPDs, die auch in normalen Referenzproben gefunden wurden, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Entnommen aus Scholtysik et al. (2010).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.1.2: Rekurrenz der Zugewinne (A) und Verluste (B) laut GISTIC.** x-Achse: Signifikanzpunktzahl als Ausgabe des Algorithmus (G score, oben) und statistische Signifikanz nach der Korrektur für multiples Testen (q-value, unten); y-Achse: Genomische Position mit Unterteilung nach Chromosomen. Am rechten Rand sind jeweils Bezeichnungen nach Zytobändern für Regionen über der Signifikanzschwelle angegeben. Entnommen aus Scholtysik et al. (2010).

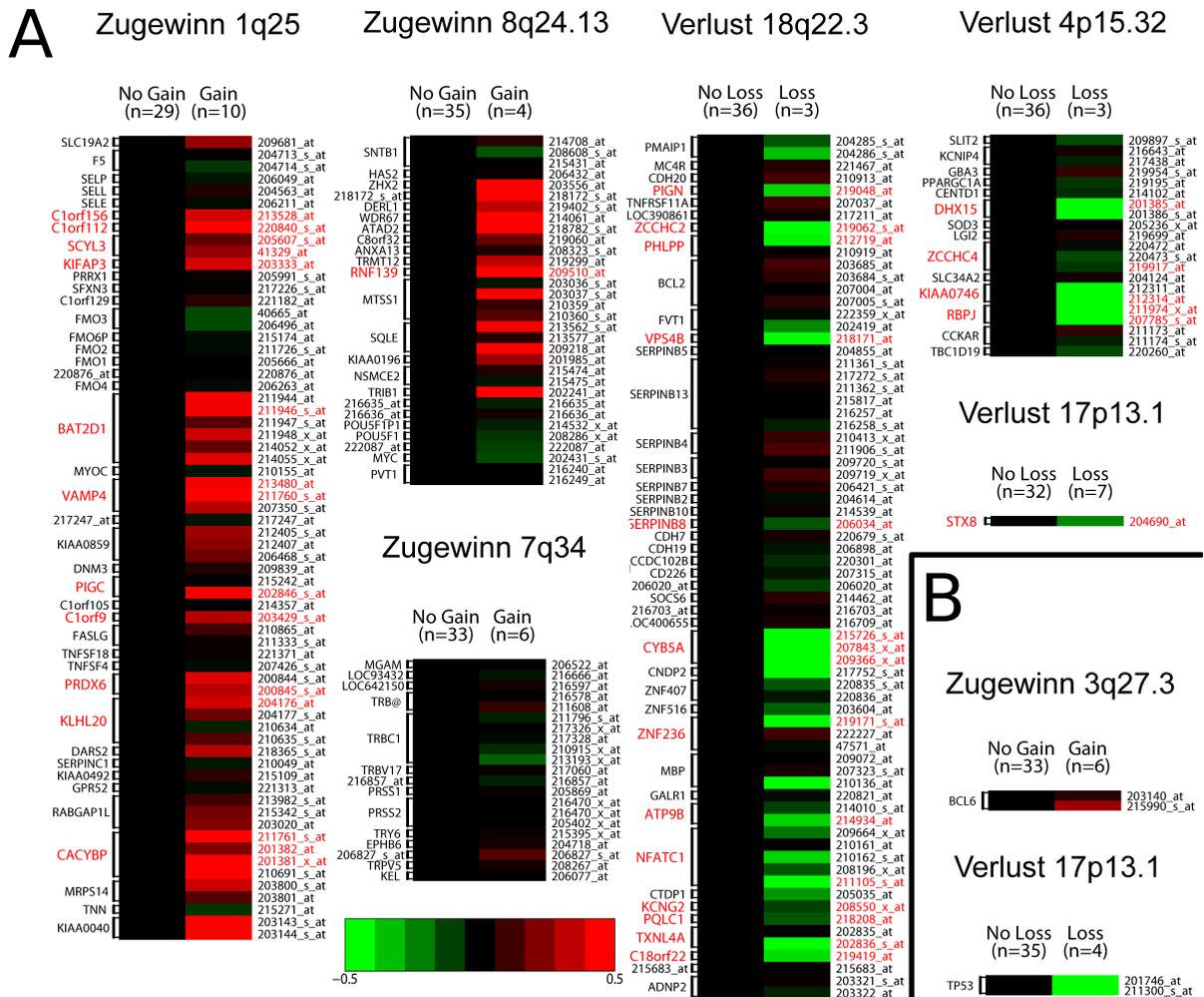
Tabelle 3.1.2: Rekurrente Zugewinne in 39 BLs, ermittelt mit GISTIC.

Zytoband	q-Wert	robuste Region	Kernregion	Anzahl (robust)	Anzahl (Kern)	ausgewählte Gene
1q25.1	6,38E-06	166.155.454-171.863.618	171.851.737-171.863.618	10	10	FASLG
1q31.3	7,93E-06	195.253.751-195.672.280	195.369.624-195.638.957	12	13	PTPRC
3q27.3	0,058	188.956.472-189.175.357	189.056.204-189.167.011	6	7	BCL6
6q15	0,095	91.249.512-91.370.379	91.269.731-91.295.723	6	7	MAP3K7
7p12.2	0,12	49.995.112-50.127.527	49.995.112-50.127.527	6	6	IKZF1
7q34	0,11	141.162.879-142.244.396	141.162.879-142.244.396	6	6	
8q24.13	0,16	121.784.261-129.821.355	126.106.216-126.249.512	4	5	MYC
11q23.3	0,11	115.828.212-118.580.638	117.008.605-118.321.365	3	3	
11q24.3	0,012	127.825.348-127.931.093	127.825.348-127.919.072	9	9	ETS1
12q15	0,0051	61.724.591-82.263.925	67.278.531-68.393.145	3	4	
12q24.33	0,19	128.465.362-132.449.811	131.860.026-132.008.369	2	3	
13q31.3	1,16E-05	90.362.259-90.843.579	90.766.137-90.811.413	7	7	mir-17-92
18q21.2	7,75E-05	49.301.605-55.260.237	49.999.396-53.164.071	2	3	POLI

Tabelle 3.1.3: Rekurrente Verluste in 39 BLs, ermittelt mit GISTIC.

Zytoband	q-Wert	robuste Region	Kernregion	Anzahl (robust)	Anzahl (Kern)	ausgewählte Gene
1p36.12	0,014	23.457.835-23.714.048	23.535.005-23.673.234	3	2	<i>E2F2</i>
3p14.2	0,15	60.396.160-60.637.030	60.452.472-60.580.245	3	3	<i>FHIT</i>
3q13.13	0,085	110.456.383-110.657.226	110.482.177-110.611.242	6	6	<i>DPPA4, DPPA2</i>
4p15.32	0,15	17.969.802-29.966.659	17.991.350-18.456.461	4	3	
6q14.3	0,094	76.830.186-107.898.353	78.151.877-96.248.104	4	4	
7q11.22	0,15	66.573.850-67.281.794	66.810.706-67.240.659	5	5	
10p11.21	0,22	36.983.732-37.133.784	37.007.511-37.106.346	3	3	
11q24.3	0,085	122.263.650-134.452.384	126.328.752-132.876.984	5	4	
13q33.2	0,20	96.008.275-114.142.980	96.913.194-112.193.013	3	3	
17p13.1	0,014	9.125.548-9.654.733	9.125.548-9.598.824	7	7	<i>STX8, TP53</i>
18p11.23	0,094	7.079.886-7.359.571	7.125.227-7.359.571	5	5	
18q22.3	0,15	55.355.976-76.117.153	55.355.976-76.117.153	3	3	
19q13.42	0,085	58.746.599-59.029.391	58.758.793-58.990.786	6	6	
20q13.2	0,094	49.856.082-50.168.587	49.958.057-50.144.808	5	5	
Xp22.33	0,0042	1-1.499.465	1-1.499.465	8	8	
Xp11.3	0,085	1-154.824.264	46.975.370-47.150.005	3	3	

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.1.3: Genexpression in rekurrent aberranten Regionen der BLs.** Grün: reduzierte Ausprägung, Rot: erhöhte Ausprägung. Der Unterschied der Genexpression zwischen aberranten und nicht-aberranten Fällen wird auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Für alle dargestellten Regionen (außer 7q24) ist ein klarer Gendosiseffekt feststellbar. Gen- und Sondengruppennamen in rot zeigen einen signifikanten Unterschied selbst nach Korrektur für multiples Testen. In A sind jeweils die gesamten betroffenen Regionen dargestellt, in B nur einzelne interessante Gene aus einer viel größeren Region. Entnommen aus Scholtysik et al. (2010).

### 3 Ergebnisse

arms verloren, damit also auch eine Kopie von *TP53* deletiert. In weiteren drei Fällen war eine UPD der gesamten Chromosomenregion feststellbar. Drei zusätzliche Fälle zeigten jedoch kleinere heterozygote Deletionen, etwa 2 Mb vom Gen *TP53* entfernt, die jeweils nur die Gene *STX8*, *USP43* und *WDR16* enthielten. In den Genexpressionsdaten ist nur *STX8* enthalten (die beiden anderen Gene wurden durch keine Sonden des verwendeten Chips abgedeckt), und dieses Genprodukt ist signifikant niedriger exprimiert in den Fällen mit der entsprechenden Deletion (Abbildung 3.1.3 auf der vorherigen Seite). Deletionen, die 13q14.3 und/oder 13q34 betreffen, wurden kürzlich durch FISH an BL im Kindesalter in über 40% der Fälle gefunden (Nelson et al., 2009), in den vorliegenden Daten ist ein Verlust nahe 13q32 jedoch nur in 3 von 39 Fällen (7,7%) detektierbar.

Die SNP-Chip-Daten zeigten in fünf Fällen einen Zugewinn bei 8q24.13, der Position von *MYC*. Bemerkenswerterweise war die Expression von *MYC* nicht signifikant unterschiedlich zwischen Fällen mit *MYC*-Zugewinn und Fällen mit *MYC*-Translokation (Abbildung 3.1.3 auf der vorherigen Seite), von der bekannt ist, dass sie eine starke Überexpression auslöst. Außerdem ist es interessant, dass drei der 39 BLs keine *MYC*-Translokation in den FISH-Untersuchungen aufwiesen (Hummel et al., 2006; Klapper et al., 2008). Obwohl dies natürlich keine kryptische Insertion in einen IG-Lokus ausschliessen kann, legt dies jedoch nahe, dass diese drei Lymphome keine typische „Burkitt-Translokation“ aufweisen. Nichtsdestotrotz wurden sie von der Genexpression als mBLs eingeordnet. Zwei dieser drei Fälle waren unter denen, die einen Zugewinn von *MYC* zeigten.

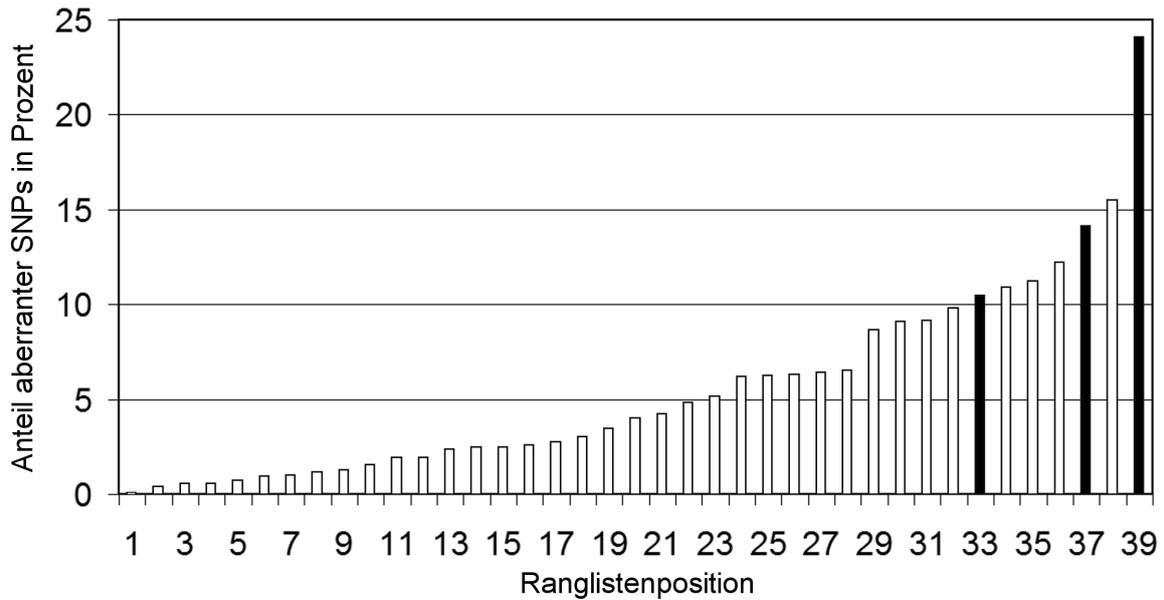
Der Zugewinn auf 1q31.3, vorhanden in 13 Fällen, enthielt das Gen *PTPRC*, einen Regulator von B-Zellrezeptor- und Zytokinsignalen (Hermiston et al., 2009), und zwei annotierte miRNA-Gene (*hsa-mir-181b-1* und *-213*). Die hohe Rekurrenz (33%) deutet hierbei auf eine große Bedeutung für die Tumorentwicklung hin. Da die Genexpressionsuntersuchungen keine signifikante Hochregulation von *PTPRC* in betroffenen Fällen feststellen konnte, müssen die miRNA-Gene als bedeutende Kandidatengene gelten.

### 3 Ergebnisse

Die Region 13q31.3, mit Zugewinnen in sieben Fällen, umfasste den miRNA-17-92-Supercluster. Nur einer dieser Fälle zeigte dabei mehr als fünf Kopien dieser Region. Für einige der betroffenen Fälle (aber leider nicht den Fall mit der Amplifikation) wurden im MMML-Verbund MikroRNA-Expressionsprofile aufgezeichnet. Ein Rückgriff auf diese Verbunddaten offenbarte, dass Fälle mit Zugewinn an dieser Position eine konsistent höhere Ausprägung der reifen miRNA besitzen, die allerdings nach der Korrektur für multiples Testen nicht signifikant war. Außerdem wiesen drei andere Fälle Verluste von 1p36.12 auf und vier weiteren Fällen zeigten große, damit überlappende UPDs. Dies ist interessant, da in dieser Region das Gen *E2F2* lokalisiert ist, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der im Promotor des miRNA-17-92-Clusters bindet.

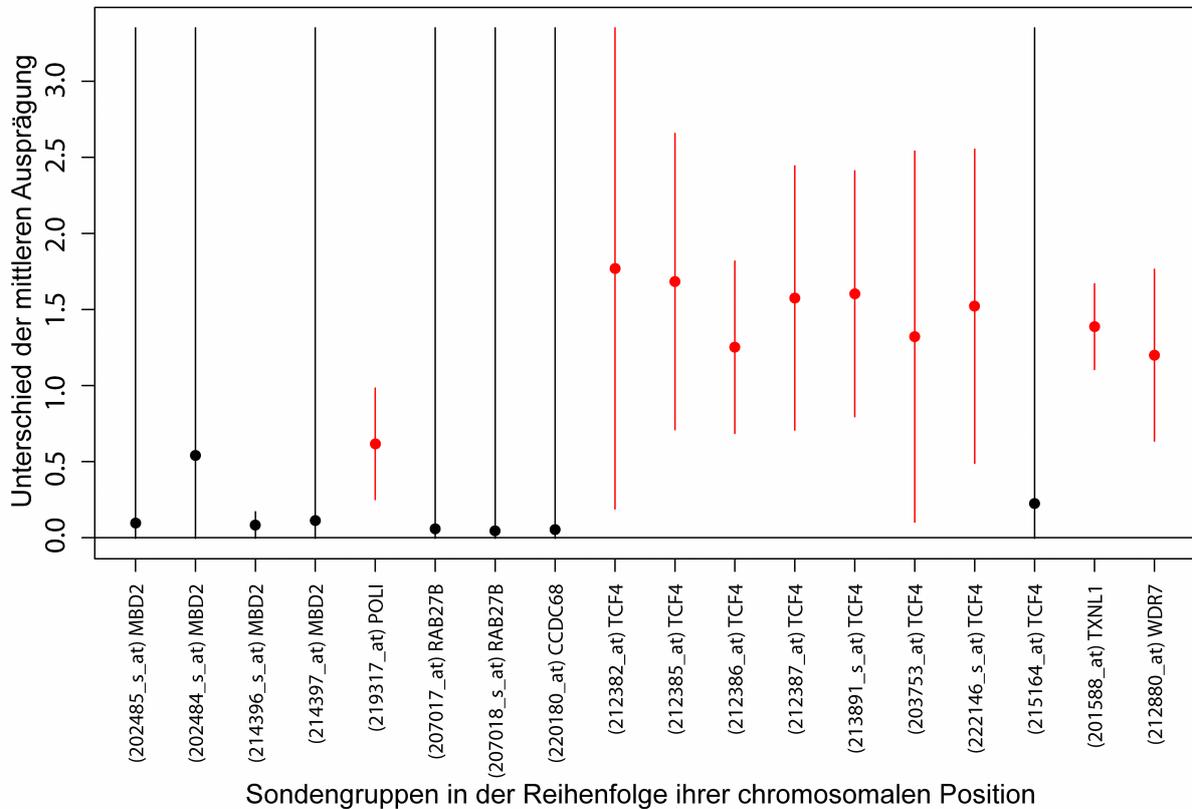
Drei BLs wiesen eine starke Amplifikation des Bereichs 18q21.2 auf. Bemerkenswerterweise waren diese drei Fälle auf einer Liste aller BLs, geordnet nach der Anzahl SNPs, die als aberrant detektiert wurden, an erster, dritter und siebter Position (Abbildung 3.1.4 auf der nächsten Seite). Die Genexpression dieses Bereichs weist das Gen *POLI*, das für die Polymerase Iota kodiert, als signifikant hochreguliert aus, neben drei weiteren Genen mit unklarer Relevanz (Abbildung 3.1.5 auf Seite 41).

Unter Benutzung der Expressionsdaten, die für alle BLs vorlagen (Hummel et al., 2006), war es in der vorliegenden Arbeit möglich, die Ausprägung von Genen in Fällen mit einer durch den SNP-Chip detektierten Aberration mit Fällen ohne eine solche zu vergleichen, um Gendosiseffekte durch die Kopienzahlveränderungen festzustellen. Einige exemplarische Regionen sind in Abbildung 3.1.3 auf Seite 37 dargestellt. Insgesamt konnte ein starker Gendosiseffekt festgestellt werden: Ein Zugewinn führte präferentiell zu einer Hochregulation der betroffenen Gene, wobei 12 von 108 Sondengruppen in Zugewinnen sogar nach der Korrektur für multiples Testen einen signifikanten Unterschied zeigten (kein einziges Gen war signifikant herabreguliert in einem Zugewinn). Ebenso zeigte die Mehrzahl der Gene in einem heterozygoten Verlust eine reduzierte Expression (52 von 258 Sondengruppen signifikant nach Korrektur für multiples Testen, zwei invers korreliert). Eine statistisch signifikante positive



**Abbildung 3.1.4: Korrelation des rekurrenten Zugewinns auf Chromosom 18 und dem Anteil aberranter SNPs pro Fall.** In einer Liste aller BLs, die nach dem Anteil aberranter SNPs geordnet wurde, werden die betroffenen Fälle an erster, dritter und siebter Position einsortiert (hier mit schwarzen Säulen markiert,  $p=0,0035$  im Mann-Whitney-U-Test). Entnommen aus Scholtysik et al. (2010).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.1.5: Differentielle Genexpression für den rekurrenten Zugewinn auf 18q21.2.** Simultane zweiseitige 95%ige „bootstrap“-Konfidenzintervalle für die Unterschiede in der Genausprägung zwischen Fällen mit und ohne Zugewinn auf 18q21.2. Einige Intervalle wurden abgeschnitten, um auf die Grafik zu passen. Die Schätzungen für die Unterschiede in der Genexpression sind durch dunkle Kreise markiert. Positive Werte zeigen hierbei stärkere Expression in Fällen mit Zugewinn an. Signifikante Sondengruppen sind in rot markiert. Eine davon ist dem Gen *POLI* zugeordnet. Entnommen aus Scholtysik et al. (2010).

Korrelation zwischen Kopienzahl und Gendosis konnte also in 17,5% aller Sonden-  
gruppen in aberranten Regionen nachgewiesen werden.

## 3.2 Genomische Aberrationen in diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen

In der vorliegenden Arbeit wurde, ebenfalls im Rahmen des MMML-Verbundprojektes, ein weiteres Kollektiv von Tumoren mittels derselben SNP-Chip-Technik untersucht, wie das Kollektiv der BLs (siehe 1.4). Dieses zweite Kollektiv umfaßte vor allen Dingen DLBCLs. Die Klassifizierung als DLBCL erfolgte hierbei wiederum, neben der Einschätzung von erfahrenen Pathologen, durch die Genexpression der Lymphome. Erstens wurde der Burkitt-Klassifikator (Hummel et al., 2006) eingesetzt, um eine klare Abgrenzung zum Kreis der BLs zu erreichen, und zweitens wurden die so als DLBCLs eingestuften Lymphome in ABC- und GCB-DLBCLs gegliedert. Einige Fälle konnten keiner der DLBCL-Gruppen klar zugeordnet werden, weil sie eine globale Genexpression zwischen den beiden Lymphomtypen aufwiesen, und wurden in eine intermediäre Gruppe sortiert (sogenannte „Typ III“-Lymphome). Sowohl die Genexpressionsanalysen als auch die Klassifizierung erfolgte durch Kooperationsgruppen im MMML.

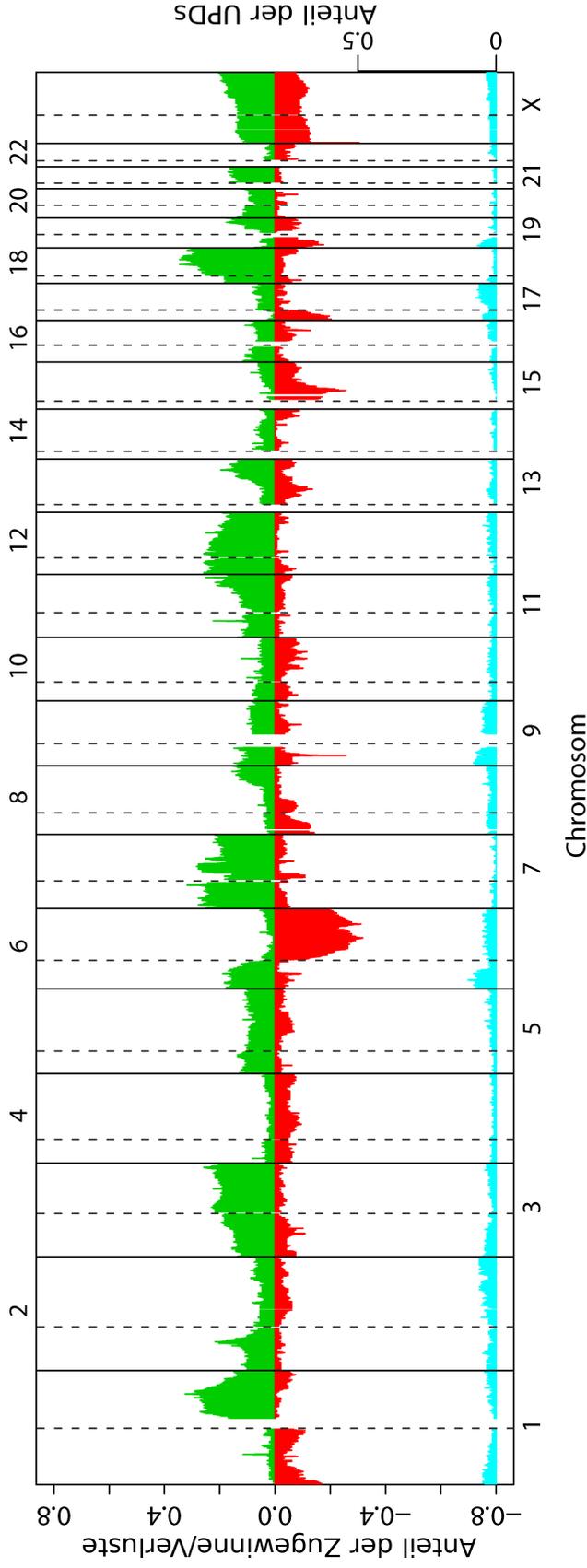
Ohne Filterung der Daten nach CNPs (siehe Abschnitt 2.2.9 auf Seite 21) wurden in den SNP-Chip-Analysen der 148 DLBCLs des zweiten Kollektivs 5064 Kopienzahlveränderungen detektiert. Nach der Filterung reduzierte sich diese Zahl auf 3969. Eine genaue Aufschlüsselung der gefilterten Daten findet sich in Tabelle 3.2.1 auf der nächsten Seite.

Die Frequenzen der gefundenen Aberrationen über das gesamte Genom ist in Abbildung 3.2.1 auf Seite 44 dargestellt, unterteilt nach Subgruppen in den Abbildungen 3.2.2 auf Seite 45, 3.2.3 auf Seite 46 und 3.2.4 auf Seite 47. Es fällt auf, dass die ABC-DLBCLs die meisten Kopienzahlaberrationen pro Fall aufwiesen.

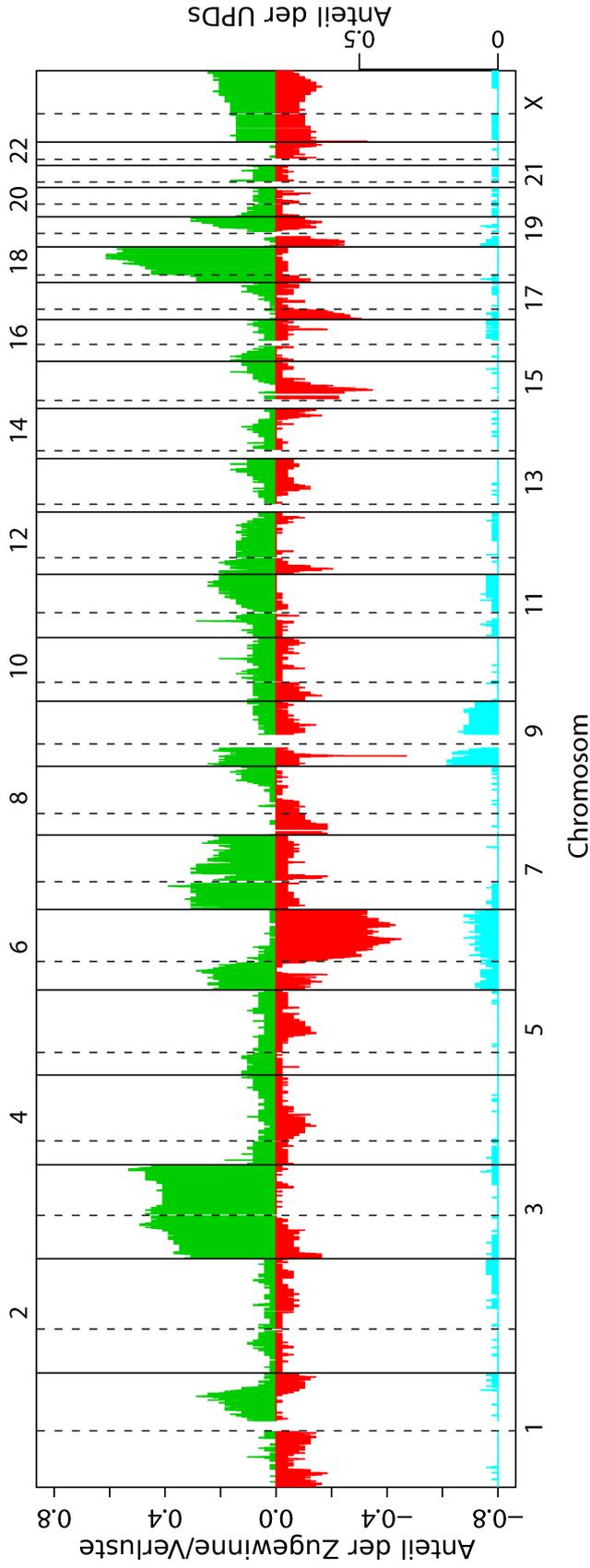
Zur Detektion rekurrent aberranter Genombereiche kam wiederum der GISTIC-

**Tabelle 3.2.1: Übersicht der genomischen Veränderungen in den 148 DLBCLs, nach der Filterung für Kopienzahlpolymorphismen**

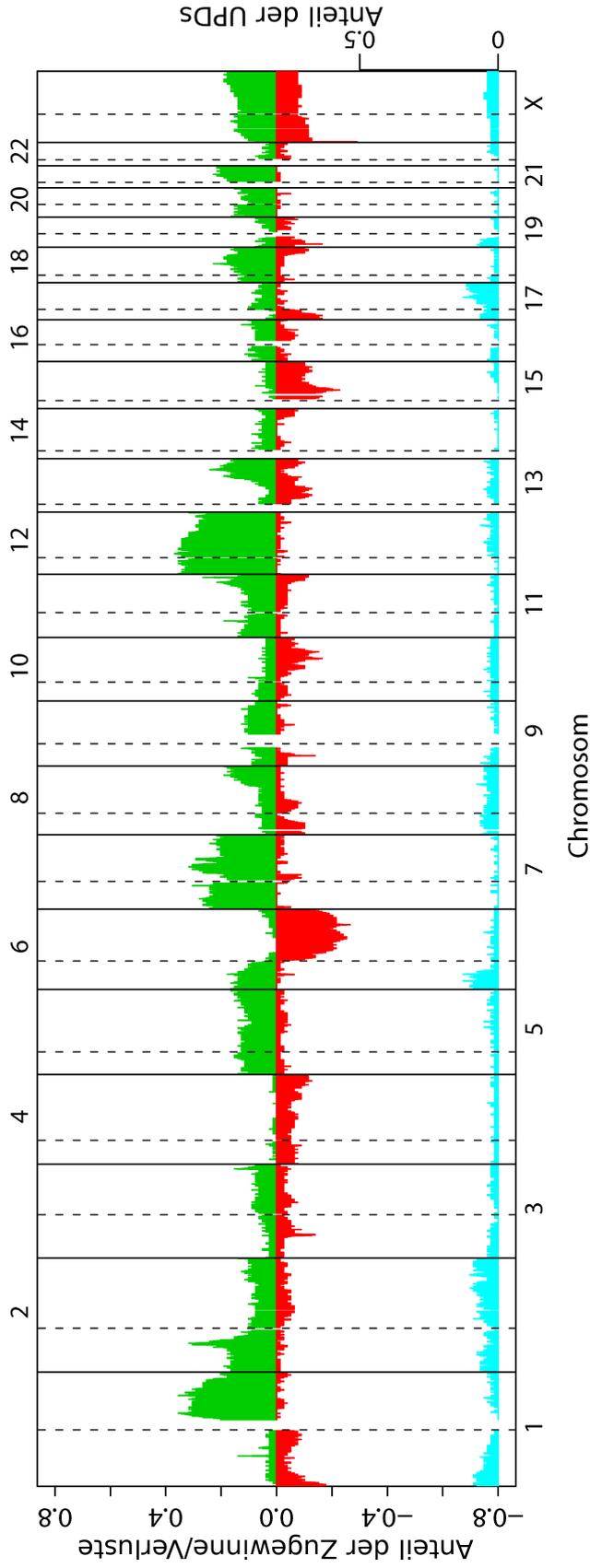
Kollektiv	Art der Veränderung	Anzahl	Durchschnitt	Median
			pro Fall	
79 GCB-DLBCLs	Kopienzahlveränderungen	2001	25,3	19
	- Zugewinne	1317	16,7	11
	- Verluste	684	8,7	6
	UPDs	795	10,1	4
49 ABC-DLBCLs	Kopienzahlveränderungen	1521	31	25
	- Zugewinne	856	17,4	13
	- Verluste	665	13,6	10
	UPDs	347	7,1	4
20 „Typ III“-DLBCLs	Kopienzahlveränderungen	447	22,4	18
	- Zugewinne	272	13,6	10,5
	- Verluste	175	8,8	6,5
	UPDs	162	8,1	4,5



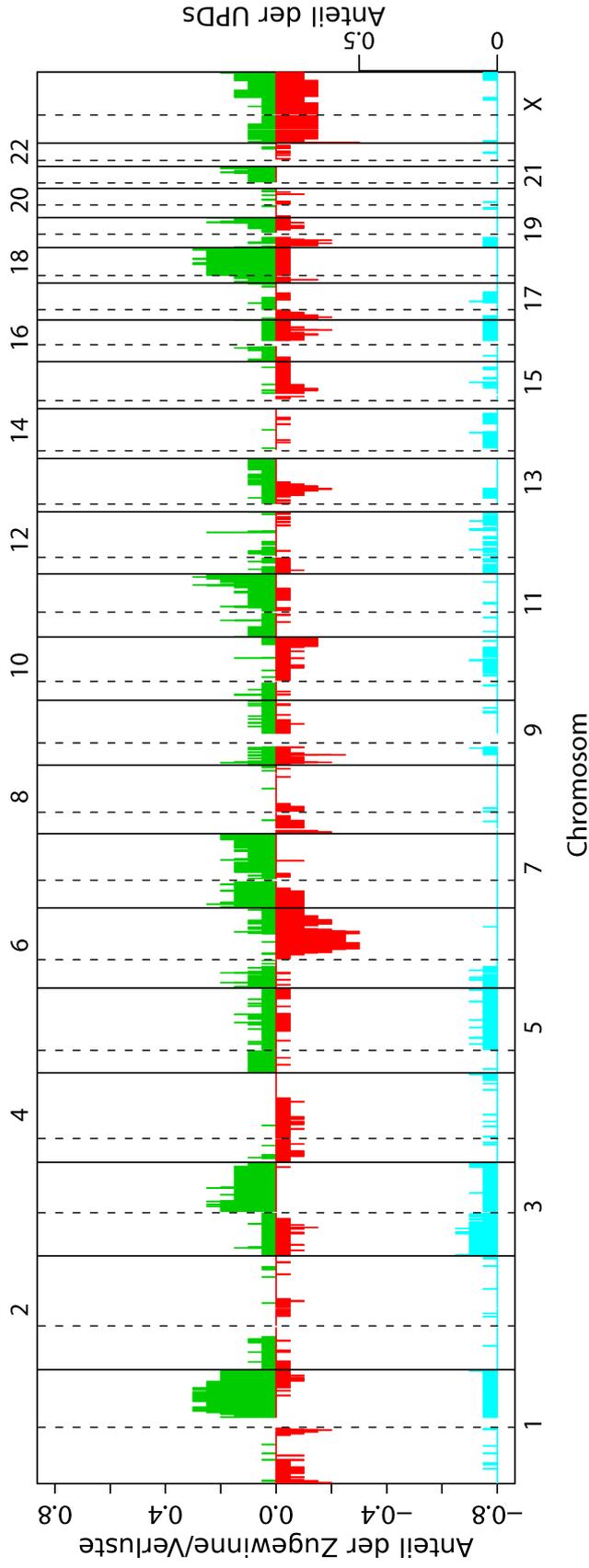
**Abbildung 3.2.1: Frequenz der Aberrationen im DLBCL-Kollektiv.** x-Achse: genomische Position, unterteilt in Chromosomen; y-Achse: Anteil der Fälle mit entsprechender Aberration, links Kopienzahl, rechts UPDs; Grün: Zugewinne, Rot: Verluste, Blau: UPDs; die gepunkteten vertikalen Linien markieren die Positionen der Zentromere. Aufgrund von Auflösungsbeschränkungen können nur Aberrationen dargestellt werden, die größer als ein Pixel sind. Einige kleine Aberrationen sind also nicht sichtbar. Die Daten enthalten keine SNPs mehr, die in Region von CNPs lagen; UPDs, die auch in normalen Referenzproben gefunden wurden, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Dargestellt sind alle DLBCLs, ungeachtet ihrer Subgruppenzugehörigkeit.



**Abbildung 3.2.2: Frequenz der Aberrationen in ABC-DLBCLs.** x-Achse: genomische Position, unterteilt in Chromosomen; y-Achse: Anteil der Fälle mit entsprechender Aberration, links Kopienzahl, rechts UPDs; Grün: Zugewinne, Rot: Verluste, Blau: UPDs; die gepunkteten vertikalen Linien markieren die Positionen der Zentromere. Aufgrund von Auflösungsbeschränkungen können nur Aberrationen dargestellt werden, die größer als ein Pixel sind. Einige kleine Aberrationen sind also nicht sichtbar. Die Daten enthalten keine SNPs mehr, die in Region von GNP's lagen; UPDs, die auch in normalen Referenzproben gefunden wurden, wurden ebenfalls ausgeschlossen.

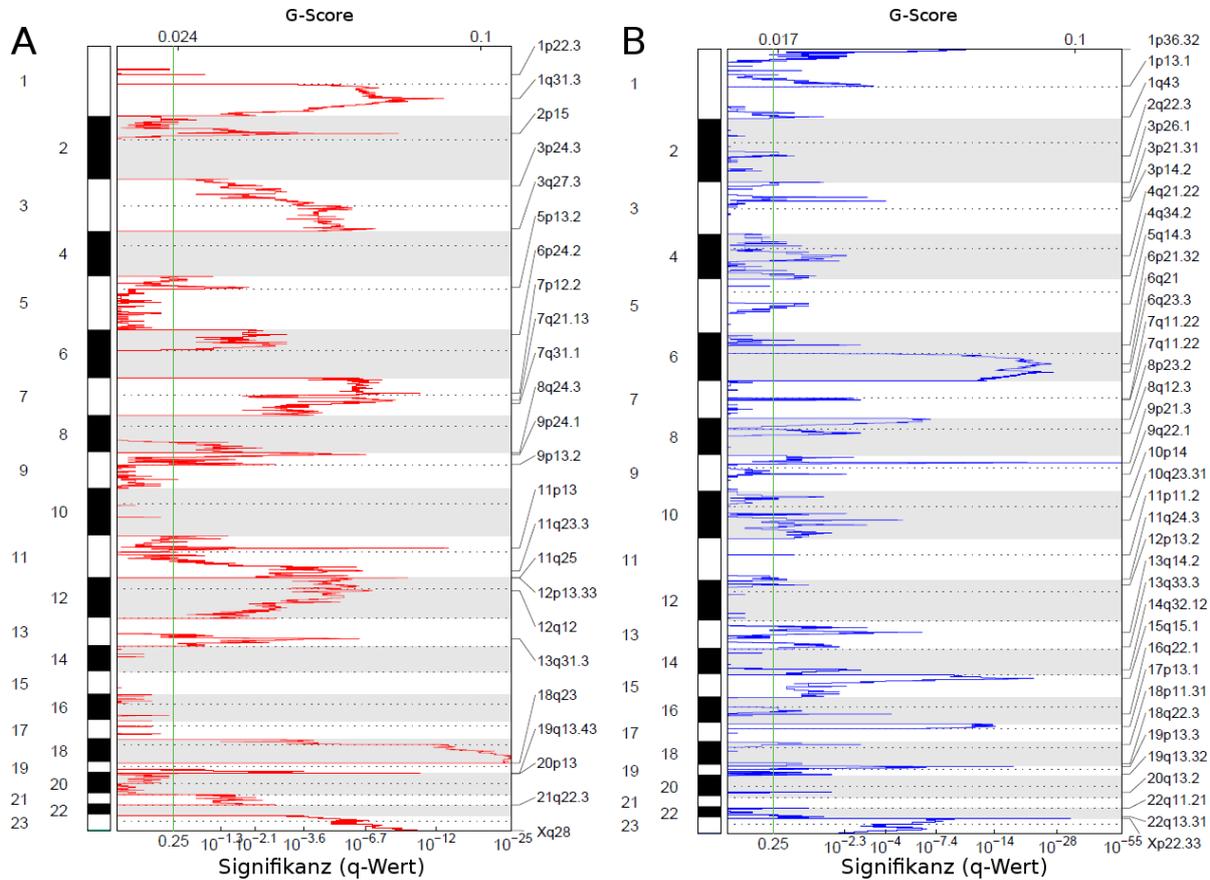


**Abbildung 3.2.3: Frequenz der Aberrationen in GCB-DLBCLs.** x-Achse: genomische Position, unterteilt in Chromosomen; y-Achse: Anteil der Fälle mit entsprechender Aberration, links Kopienzahl, rechts UPDs; Grün: Zugewinne, Rot: Verluste, Blau: UPDs; die gepunkteten vertikalen Linien markieren die Positionen der Zentromere. Aufgrund von Auflösungsbeschränkungen können nur Aberrationen dargestellt werden, die größer als ein Pixel sind. Einige kleine Aberrationen sind also nicht sichtbar. Die Daten enthalten keine SNPs mehr, die in Region von GNP's lagen; UPDs, die auch in normalen Referenzproben gefunden wurden, wurden ebenfalls ausgeschlossen.



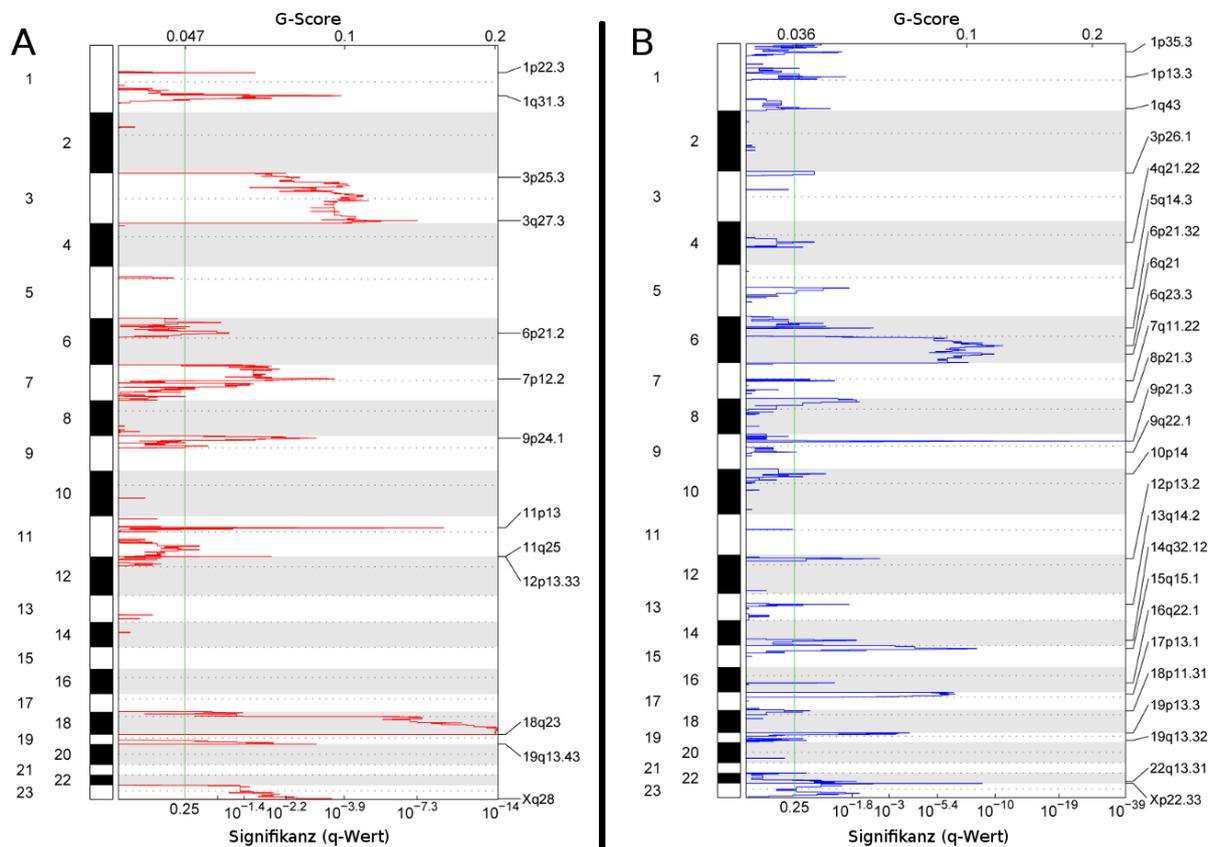
**Abbildung 3.2.4: Frequenz der Aberrationen in TypIII-DLBCLs.** x-Achse: genomische Position, unterteilt in Chromosomen; y-Achse: Anteil der Fälle mit entsprechender Aberration, links Kopienzahl, rechts UPDs; Grün: Zugewinne, Rot: Verluste, Blau: UPDs; die gepunkteten vertikalen Linien markieren die Positionen der Zentromere. Aufgrund von Auflösungsbeschränkungen können nur Aberrationen dargestellt werden, die größer als ein Pixel sind. Einige kleine Aberrationen sind also nicht sichtbar. Die Daten enthalten keine SNPs mehr, die in Region von GNP's lagen; UPDs, die auch in normalen Referenzproben gefunden wurden, wurden ebenfalls ausgeschlossen.

### 3 Ergebnisse



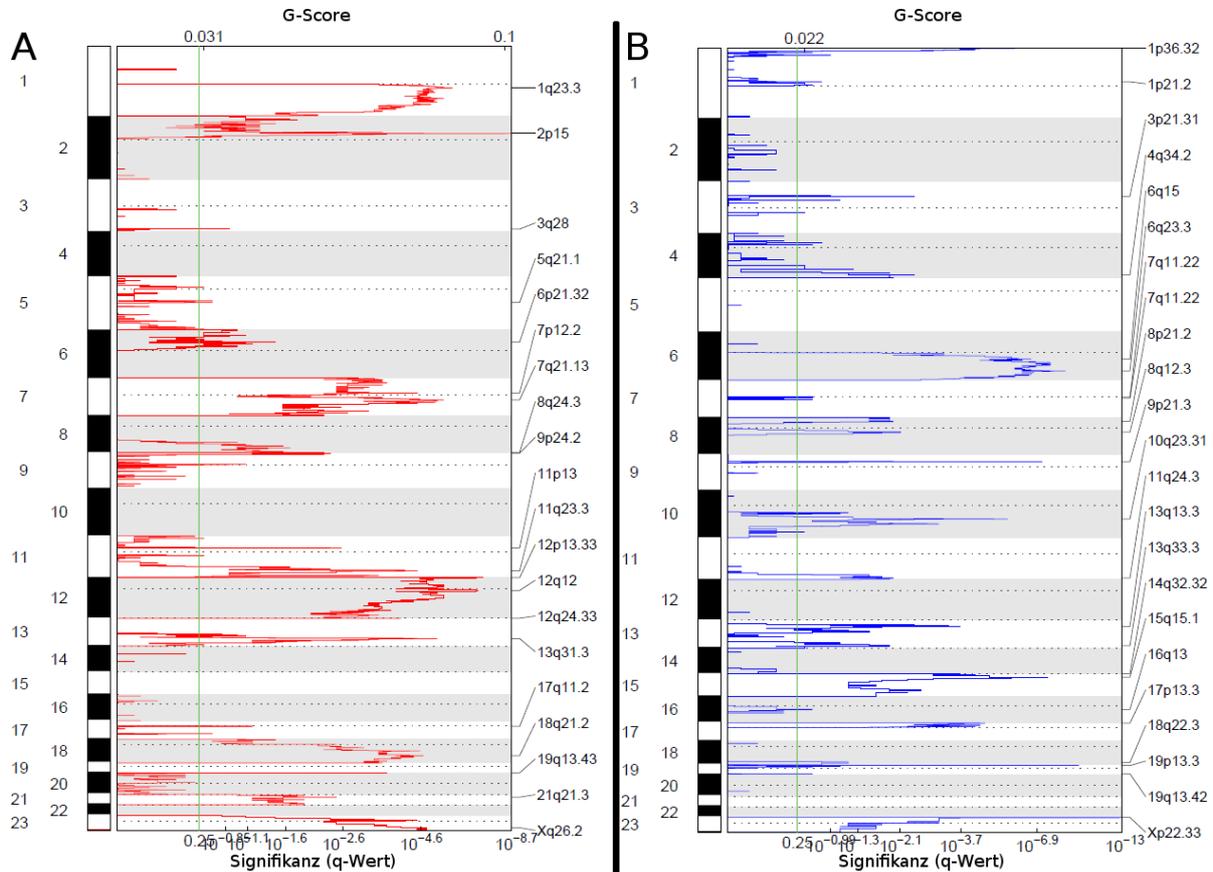
**Abbildung 3.2.5: Rekurrenz der Zugewinne (A) und Verluste (B) laut GISTIC, für alle 148 DLBCLs.** x-Achse: Signifikanzpunktzahl als Ausgabe des Algorithmus (G-Score, oben) und statistische Signifikanz nach der Korrektur für multiples Testen (q-Wert, unten); y-Achse: Genomische Position mit Unterteilung nach Chromosomen. Am rechten Rand sind jeweils Bezeichnungen nach Zytobändern für Regionen über der Signifikanzschwelle angegeben.

### 3 Ergebnisse



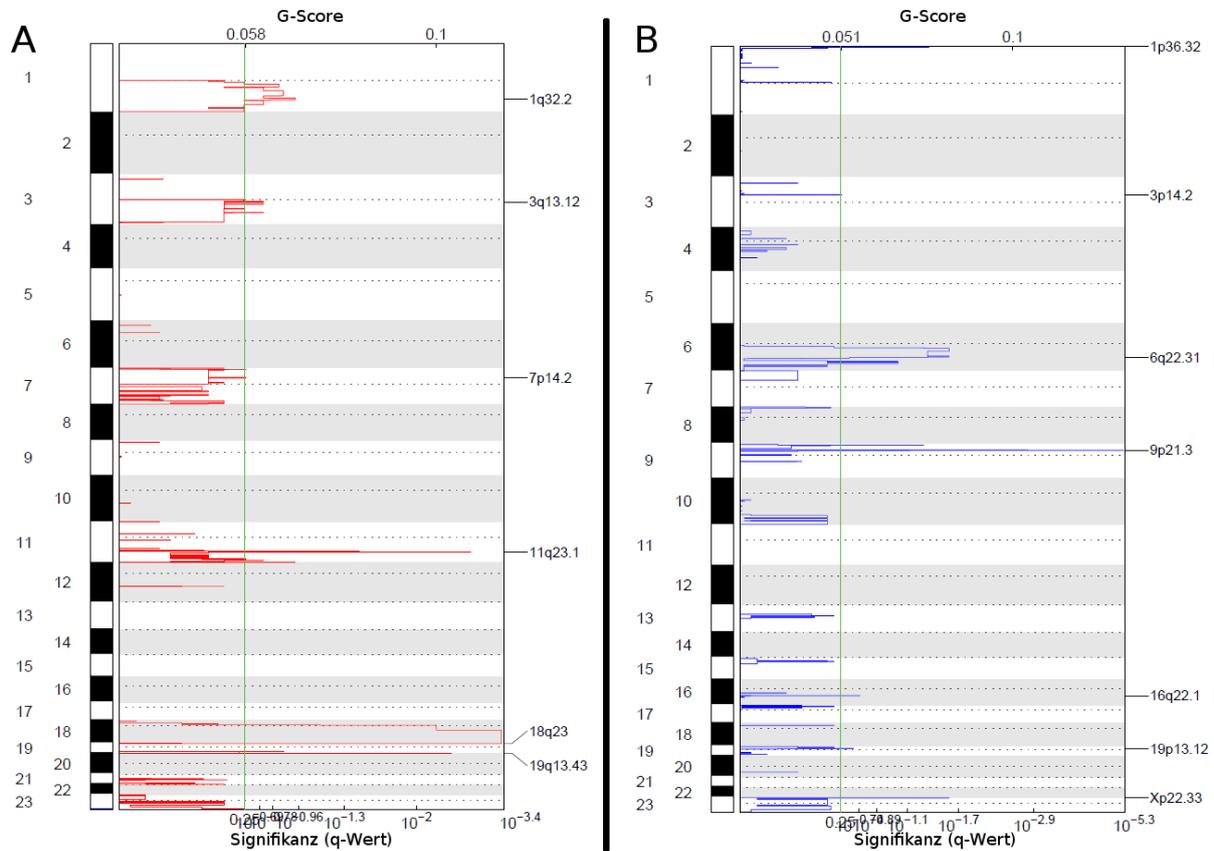
**Abbildung 3.2.6: Rekurrenz der Zugewinne (A) und Verluste (B) laut GISTIC, für alle 49 ABC-DLBCLs im 2. Kollektiv.** x-Achse: Signifikanzpunktzahl als Ausgabe des Algorithmus (G-Score, oben) und statistische Signifikanz nach der Korrektur für multiples Testen (q-Wert, unten); y-Achse: Genomische Position mit Unterteilung nach Chromosomen. Am rechten Rand sind jeweils Bezeichnungen nach Zytobändern für Regionen über der Signifikanzschwelle angegeben.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.2.7: Rekurrenz der Zugewinne (A) und Verluste (B) laut GISTIC, für alle 79 GCB-DLBCLs im 2. Kollektiv.** x-Achse: Signifikanzpunktzahl als Ausgabe des Algorithmus (G-Score, oben) und statistische Signifikanz nach der Korrektur für multiples Testen (q-Wert, unten); y-Achse: Genomische Position mit Unterteilung nach Chromosomen. Am rechten Rand sind jeweils Bezeichnungen nach Zytobändern für Regionen über der Signifikanzschwelle angegeben.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.2.8: Rekurrenz der Zugewinne (A) und Verluste (B) laut GISTIC, für alle 20 unklassifizierten („Typ III“) DLBCLs im 2. Kollektiv.** x-Achse: Signifikanzpunktzahl als Ausgabe des Algorithmus (G-Score, oben) und statistische Signifikanz nach der Korrektur für multiples Testen (q-Wert, unten); y-Achse: Genomische Position mit Unterteilung nach Chromosomen. Am rechten Rand sind jeweils Bezeichnungen nach Zytobändern für Regionen über der Signifikanzschwelle angegeben.

### *3 Ergebnisse*

Algorithmus zum Einsatz. Eine grafische Darstellung der so gefundenen Region findet sich in den Abbildungen 3.2.5 auf Seite 48, 3.2.6 auf Seite 49, 3.2.7 auf Seite 50 und 3.2.8 auf der vorherigen Seite. Eine tabellarische Auflistung befindet sich im Anhang (Abschnitt 7.2 auf Seite 96).

### 3.3 Rekurrente Deletionen auf Chromosom 19 in aggressiven Lymphomen

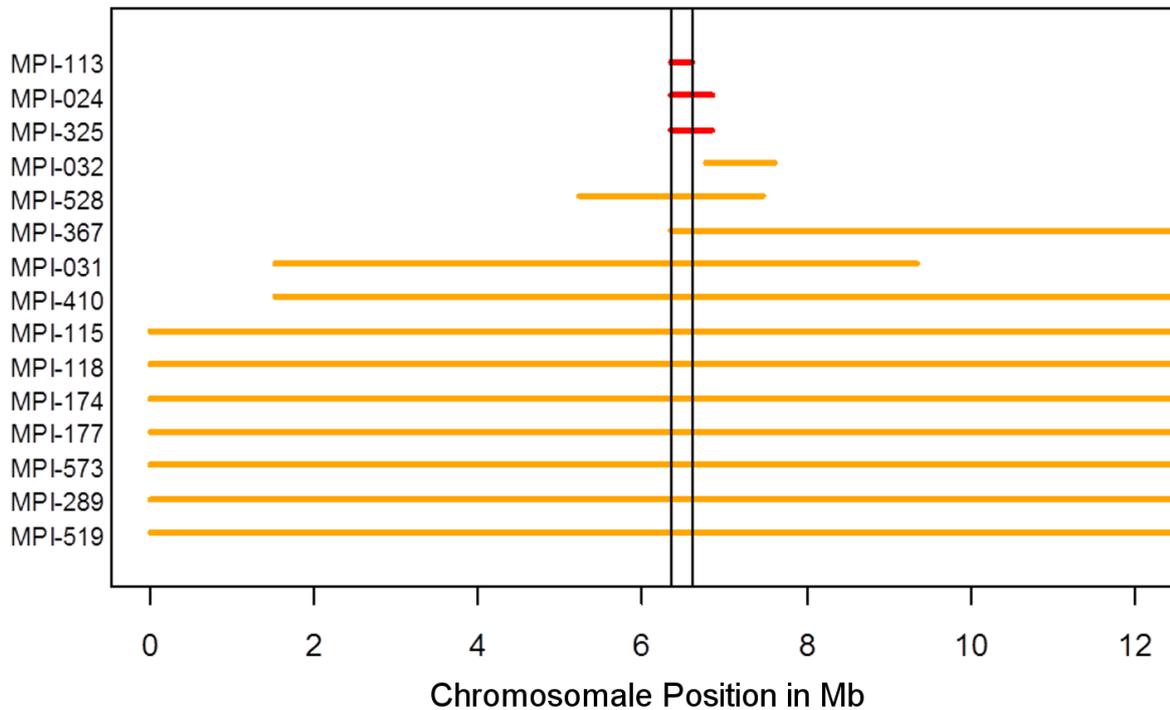
Während der eingehenden Analyse der ersten 98 Tumore, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, stach ein rekurrenter Verlust auf Chromosom 19 ins Auge, der in 9% der Fälle vorlag. Durch die Beteiligung am MMML-Verbundprojekt war es möglich, Zugriff auf 295 aCGH-Datensätze zu erhalten, die in Vorarbeiten generiert wurden (Hummel et al., 2006; Klapper et al., 2008). Dabei konnten sechs weitere Lymphome gefunden werden, die eine Deletion von 19p aufwiesen, obwohl die räumliche Auflösung durch die Abdeckung mit nur 37 BAC-Klonen gering war. Die nun insgesamt 15 betroffenen Lymphome umfaßten 5 GCB-DLBCLs, 6 ABC-DLBCLs, 2 intermediäre, also nicht klar von den BLs abtrennbare, GCB-DLBCLs und 2 mBLs, klassifiziert nach ihrer jeweiligen globalen Genexpression (Tabelle 3.3.1). Zusammenfassend ergab sich eine minimaldeletierte Region (MDR) zwischen Position 6.355.507 und 6.596.176 im Band p13 auf Chromosom 19 (Humanes Genom, Version 18; Abbildung 3.3.1 auf Seite 55). Drei der Deletionen wurden vom HMM der Kopienzahlanalyse als homozygot eingeordnet. Die Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel führte daraufhin FISH-Untersuchungen an zwei verfügbaren Fällen des Verbundes durch. Die Ergebnisse bestätigten den homozygoten Verlust in diesen Fällen, da 88% bzw. 76% der Kerne in MPI-325 bzw. MPI-024 ein Signalmuster zeigten, dass den Totalverlust dieses Bereichs anzeigt. Außerdem wurde in beiden Fällen durch die vereinzelte Detektion von Kernen mit einem normalen, disomatischen Muster der Nachweis geführt, dass es sich um ein somatisches Ereignis in den Tumorzellen handelt.

Da die Eingrenzung von Aberrationen mittels SNP-Chips durch das Rauschen im Signal der einzelnen Kopienzahlmarker ungenau ist und zusätzlich die Abdeckung der interessanten Region auf Chromosom 19 auf dem verwendeten 250k-Chip nicht sehr dicht war, wurden zwei der Tumore mit homozygoter Deletion in Kiel mit speziell angefertigten aCGH-Chips (sogenannte tiling Arrays) mit hoher Abdeckung der

**Tabelle 3.3.1: Klinische und molekulare Daten der 15 aggressiven Lymphome mit 19p13-Deletion.** „Intern. GCB“ in der Diagnose bedeutet, dass das Lymphom vom Algorithmus, der BLs und DLBCLs trennt, nicht klar eingeordnet werden konnte, also seine Genexpression in einer Grauzone zwischen den beiden Entitäten liegt. n.u., nicht untersucht.

Fall	Alter	Geschl.	Molekulare Diagnose	MYC-Bruch	BCL6-Bruch	Datenquelle	Deletions		Art der Deletion	Mutationsstatus	
							-beginn	-ende		TNFSF7 &	TNFSF9
MPI-024	64	w	Intern. GCB	n.u.	neg.	SNP-Chip	6.355.507	6.847.380	homozygot	n.u.	
MPI-031	67	w	ABC	non-IG-MYC	neg.	SNP-Chip	1.531.189	9.331.827	heterozygot	unmutiert	
MPI-032	63	w	mBL	IgH-MYC	neg.	SNP-Chip	6.771.951	7.597.698	heterozygot	unmutiert	
MPI-113	78	m	GCB	n.u.	pos.	SNP-Chip	6.355.507	6.596.178	homozygot	n.u.	
MPI-115	52	w	ABC	n.u.	neg.	Tiling Array	6.476.448	6.580.465			
MPI-118	81	m	ABC	n.u.	neg.	SNP-Chip	1	15.186.310	heterozygot	unmutiert	
MPI-174	60	w	ABC	n.u.	neg.	aCGH	1	45.806.674	heterozygot	unmutiert	
MPI-177	79	w	ABC	n.u.	neg.	aCGH	Chr. 19 komplett deletiert		heterozygot	unmutiert	
MPI-289	62	m	ABC	neg.	pos.	aCGH	Chr. 19 komplett deletiert		heterozygot	unmutiert	
MPI-325	51	m	Intern. GCB	neg.	neg.	aCGH	1	47.428.726	heterozygot	unmutiert	
MPI-367	69	m	GCB	neg.	pos.	SNP-Chip	6.355.507	6.847.380	homozygot	n.u.	
MPI-410	65	m	GCB	neg.	neg.	Tiling Array	6.376.896	6.799.932			
MPI-519	79	w	GCB	neg.	neg.	SNP-Chip	6.355.507	15.245.698	heterozygot	unmutiert	
MPI-528	9	m	mBL	IgL-MYC	neg.	SNP-Chip	1.531.189	12.651.506	heterozygot	unmutiert	
MPI-573	5	m	GCB	neg.	neg.	aCGH	Chr. 19 komplett deletiert		heterozygot	unmutiert	
							5.229.878	7.464.024	heterozygot	unmutiert	
							Chr. 19 komplett deletiert		heterozygot	unmutiert	

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.3.1: Deletionen auf Chromosom 19p13 innerhalb des Datensatzes der SNP-Chips und der aCGH.** Das Ausmaß der Deletionen in den einzelnen Fällen (y-Achse) ist mit farbigen Balken markiert. Gelb: heterozygoter Verlust, Rot: homozygoter Verlust. Vertikal eingezogene Linien begrenzen die MDR (6.355.507 bis 6.596.178). Auf der x-Achse ist die genomische Position in Megabasen aufgetragen. Entnommen aus Scholtysik et al. (2011).

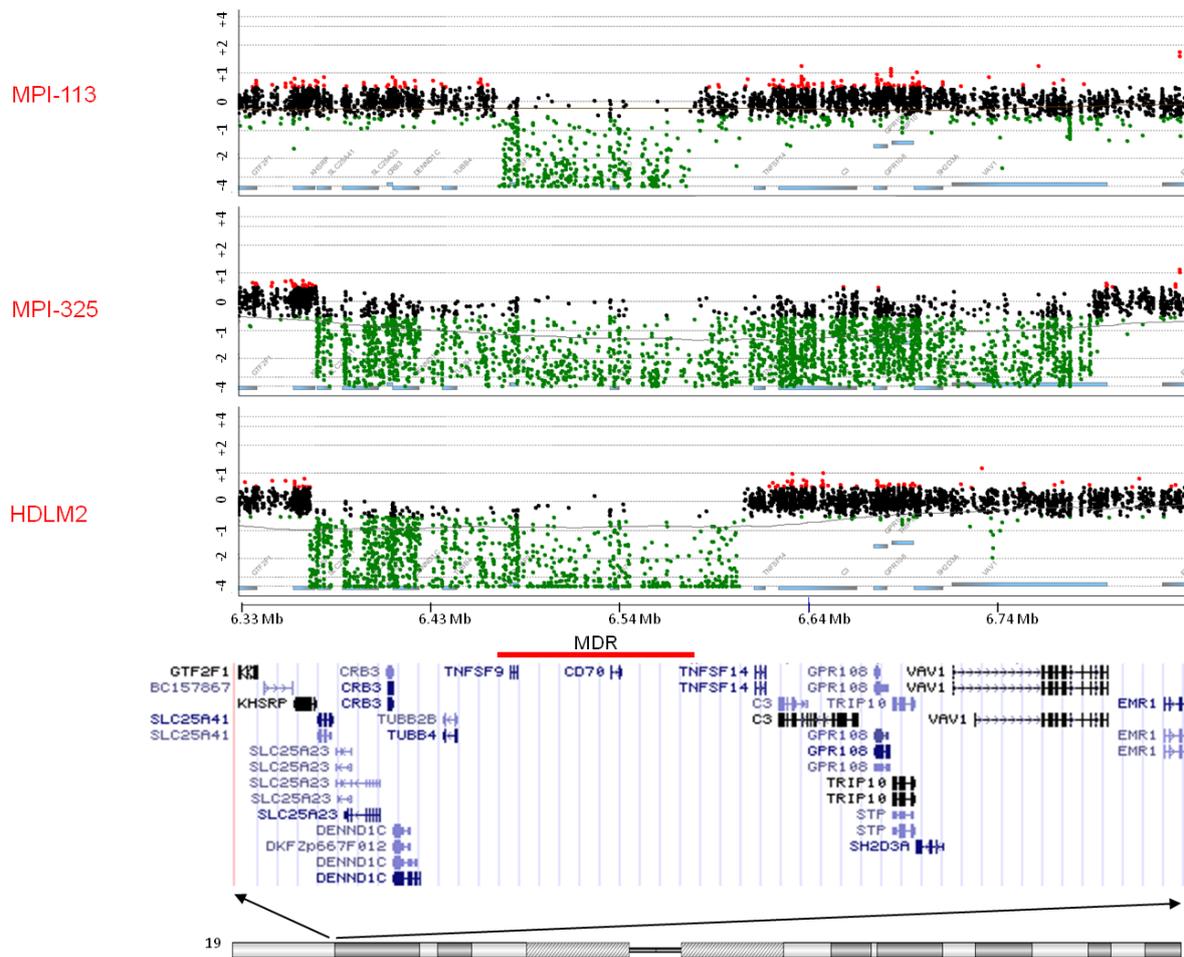
### 3 Ergebnisse

MDR untersucht (Abbildung 3.3.2 auf der nächsten Seite). Eine der deletierten Regionen konnte hierbei auf 57% der Größe eingegrenzt werden, die der SNP-Chip angezeigt hatte. Eingeschlossen in diese Untersuchung wurde außerdem die Hodgkin-Lymphom-Zelllinie HDLM2, da es aus anderen Experimenten die Indikation einer Deletion an exakt dieser Stelle gab (Giefing et al., 2008). Diese Deletion in der HDLM2-Zelllinie konnte als homozygot bestätigt werden (Abbildung 3.3.2 auf der nächsten Seite).

Innerhalb der kleineren MDR des Oligonukleotidsonden-Chips aus Kiel (Position 6.476.448 bis 6.580.465) sind zwei protein-kodierende Gene annotiert: *TNFSF7* (CD70) und *TNFSF9* (4-1BBL, CD137L), beides Mitglieder der TNF-Superfamilie. Um den Verdacht eines neuen Tumorsuppressorgens zu erhärten, wurden die kodierenden Bereiche beider Gene in den 12 gefundenen Fällen mit heterozygoter Mutation im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenziert. Alle erhaltenen Sequenzen des einzelnen, verbliebenen Allels entsprachen dem Wildtyp (Tabelle 3.3.1 auf Seite 54). Da außerdem das Gen für die nicht-proteinkodierende RNA *hy3* in der MDR lokalisiert ist, wurde dieses in 10 Fällen mit heterozygoter Deletion erfolgreich sequenziert. Auch hier wurden nur Wildtyp-Sequenzen detektiert.

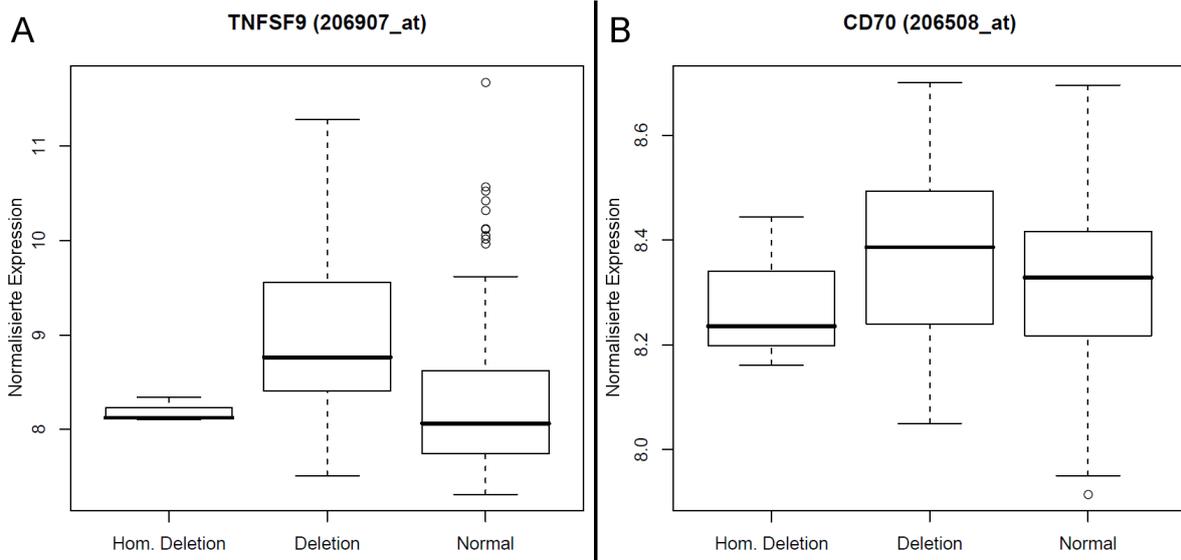
Da ein klassischer Tumorsuppressor komplett inaktiviert werden muss, um dem Tumor einen Vorteil zu verschaffen, wurden die vorliegenden Genexpressionsdaten der MMML-Fälle herangezogen, um eine mögliche Herabregulation der Expression der beiden Kandidatengene durch andere Mechanismen als destruktive Mutationen auf dem verbliebenen Allel festzustellen. Kein Gen innerhalb oder in der Nähe der MDR zeigte eine signifikant niedrigere Expression im Vergleich der betroffenen Fälle mit nicht betroffenen (Abbildung 3.3.3 auf Seite 58).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.3.2: Homozygote Deletion auf Chromosom 19, detektiert durch speziell angefertigte aCGH-Chips (Tiling Arrays).** Die Analysen der Fälle MPI-113, MPI-325 und der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie HDLM2 grenzen die Deletionen auf 19p13.3 weiter ein. Ein Wert von 0 zeigt dabei einen balanzierten Status an. Genannotationen im unteren Teil der Grafik stammen vom UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>, Fujita et al. 2010). Entnommen aus Scholtysik et al. (2011).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.3.3: Boxplots der Genexpression der beiden Tumorsuppressorgen-Kandidaten *TNFSF7* und *TNFSF9*.** In jedem Plot stellt die erste Spalte die Expression der Fälle mit homozygoter, die zweite Spalte die der Fälle mit heterozygoter Deletion und die letzte Spalte die Ausprägung in Fällen ohne Deletion auf 19p13 dar. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Entnommen aus Scholtysik et al. (2011).

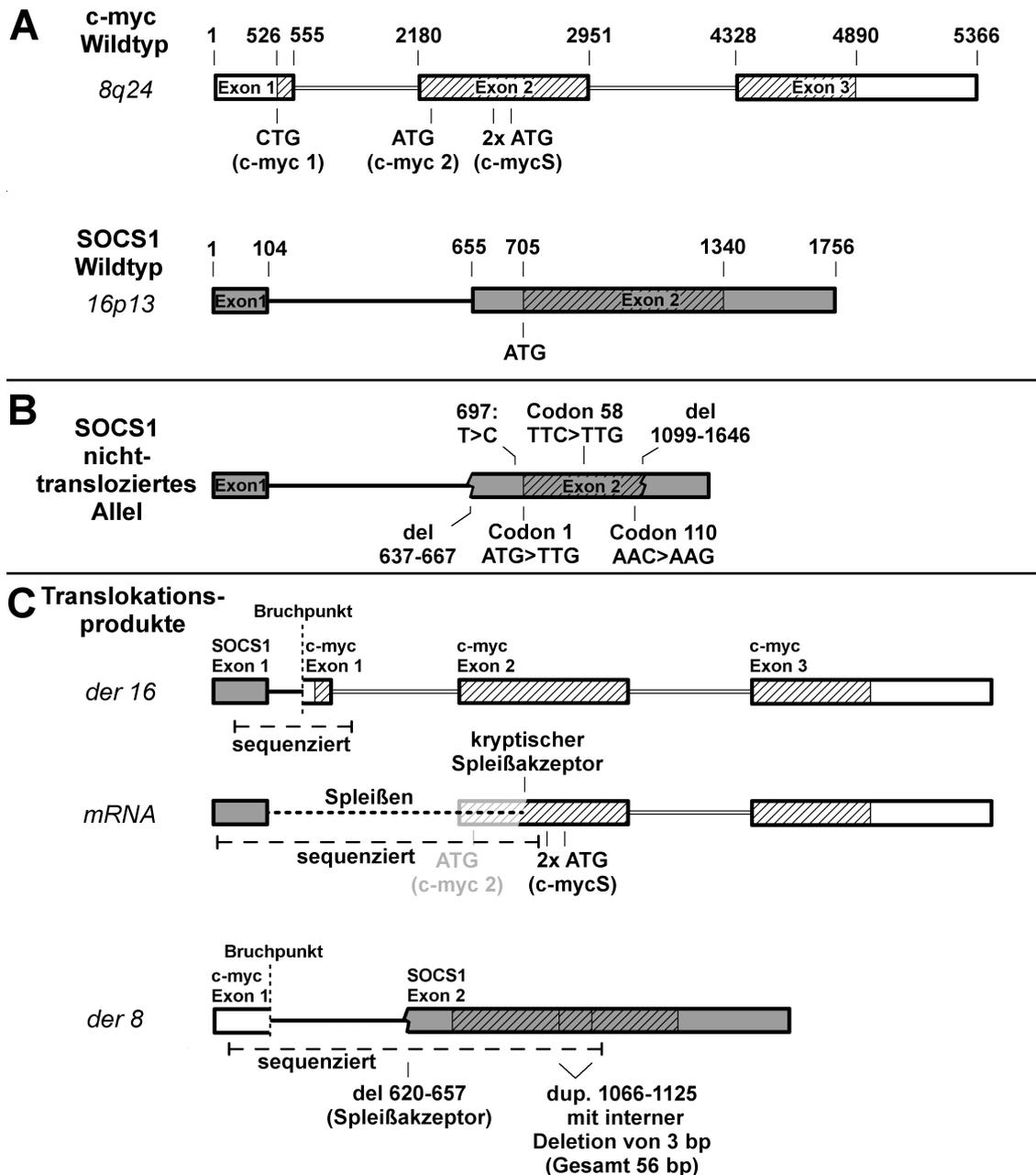
### **3.4 Charakterisierung einer neuartigen Translokation zwischen einem Proto-Onkogen und einem Tumorsuppressorgen**

Im Rahmen des MMML-Verbundprojektes wurde das Kollektiv der gesammelten Lymphomfälle von anderen Arbeitsgruppen auf neuartige Translokationen untersucht, bei denen nur einer der Translokationspartner bekannt war. Bei diesen Analysen wurde im Fall MPI-248 eine Translokation von MYC mit unbekanntem Partnergen entdeckt. Mit Hilfe von Long-Distance-PCR wurde in Vorarbeiten von Claudia Otto (geb. Philip) aus der Arbeitsgruppe von Ralf Küppers die Bruchpunktregion erfolgreich sequenziert und so das Partnergen als SOCS1 bestimmt. Dies machte die Translokation besonders interessant, da bisher keine Translokationen zwischen Onko- und Tumorsuppressorgen in der Literatur beschrieben sind. In der vorliegenden Arbeit sollte also genauer bestimmt werden, welchen Effekt die Translokation auf die Gene auf beiden Seiten des Bruchpunkt haben könnte.

Durch Wahl neuer Primer für eine direkte Bruchpunkt-umfassende PCR (s. Methoden) auf DNA- und RNA-Niveau und nachfolgende Sequenzierung der Produkte konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der durch die Translokation entstandene der8-Teil durch eine Duplikation im kodierenden Bereich mit resultierender Leserasterverschiebung nicht mehr für ein funktionelles SOCS1-Protein kodiert (Abbildung 3.4.1 auf der nächsten Seite, Abschnitt C). Der der16-Translokationsteil wurde jedoch bereits in der Vorarbeit von Claudia Otto in einer Konfiguration vorgefunden, die durchaus noch Transkription und Translation eines funktionsfähigen MYC-Proteins zulassen würde, da der kodierende Bereich intakt war.

Durch den MMML-Verbund war RNA des Falls verfügbar, was es ermöglichte, die aus der Translokation resultierenden Veränderungen der transkribierten mRNA des der16-Teils in der vorliegenden Arbeit zu bestimmen. Die detektierte mRNA zeigte ein unvorhergesehenes Spleißereignis zwischen dem Spleißdonor des Exons 1

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.4.1: Schematische Darstellung der vorgefundenen Veränderung der Translokationspartner in Fall MPI-248.** A: Die normale Struktur der Gene *MYC* und *SOCS1* zum Vergleich. Zahlen stellen Nukleotidpositionen laut Genbank dar. B: Die Struktur des nicht-translozierten Allels von *SOCS1* in Fall MPI-248. C: Struktur der Translokationsprodukte. Der Bruchpunkt liegt innerhalb von Intron 1 von *SOCS1* und Exon 1 von *Myc*. RT-PCR der mRNA des der16-Teils deckte das abgebildete Spleißereignis auf.

### 3 Ergebnisse

von *SOCS1* mit einem kryptischen Spleißakzeptor innerhalb der kodierenden Sequenz des Exons 2 von *MYC* (Abbildung 3.4.1 auf der vorherigen Seite). Obwohl dieses Spleißen einen Teil der kodierenden Bereichs von *MYC* entfernt, wurde nach Literaturrecherche klar, dass trotzdem noch funktionelle Isoformen von *MYC* aus dieser Vorlage translatierbar sind, auf die in der Diskussion eingegangen werden soll.

Da das translozierte *SOCS1*-Allel offenbar inaktiviert war, wurde in der vorliegenden Arbeit außerdem das andere, nicht-translozierte Allel von *SOCS1* aus genomischer DNA des Falls amplifiziert und sequenziert. Es zeigte sich, dass auch dieses Allel durch mehrere Mutationen zerstört wurde (Abbildung 3.4.1 auf der vorherigen Seite, Abschnitt C), so dass der vorliegende Tumor kein funktionelles *SOCS1*-Protein mehr bilden konnte.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einordnung der gefundenen Aberrationen der Burkitt-Lymphome

Zytogenetische und niedrig aufgelöste CGH-Analysen, die zuvor am BL durchgeführt wurden, haben nur wenige konsistente genomische Imbalancen aufgedeckt (Barth et al., 2004; Garcia et al., 2003). Ein mögliches Problem dieser früheren Untersuchungen war die Definition der Entität BL anhand nicht-molekularer Marker. Sie enthielten möglicherweise Lymphome, die eher dem diversen Kreis der DLBCLs zuzuordnen waren, die dann natürlich Veränderungen einbrachten, die in neueren Studien mit mBLs nicht reproduzierbar sind. In einer neueren Veröffentlichung, die konventionelle CGH mit einer Auflösung im Zytobandbereich auf eine Gruppe mBLs angewendet hat (Salaverria et al., 2008), ist die Verteilung der Imbalancen ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit: Zugewinne auf 1q, 18q24-ter und 13q31-32; rekurrente Verluste auf 17p. Der einzige, aber deutliche Unterschied sind die beschriebenen häufigen Zugewinne auf 7q. In der vorliegenden Arbeit konnten solche Zugewinne nur in wenigen der 39 eingeschlossenen mBLs gefunden werden, vielleicht aufgrund einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Fallkollektive.

Die einzige hochauflösende Untersuchung an BLs mit Hilfe von Oligonukleotidmatrix-CGH (engl. oligonucleotide array CGH, aCGH) untersuchte nur 13 Primärtumore (und einige Zelllinien) mit ca. 44.000 Sonden (Toujani et al., 2009), was Auflösung und Empfindlichkeit im Vergleich zum vorliegenden Ansatz mit 250k-SNP-Chips einschränkte. Auch in dieser Publikation wurden die BLs unter histologischen Ge-

#### 4 Diskussion

sichtspunkten ausgewählt. Die hochauflösende SNP-Chip-Untersuchung konnte viele der publizierten Aberrationen an primären mBLs reproduzieren, wobei oft eine höhere Rekurrenz und engere Grenzen der betroffenen Genombereiche beobachtet werden konnten.

Im Zuge des MMML-Verbundprojektes der deutschen Krebshilfe wurden einige der verwendeten mBLs bereits mittels CGH untersucht (Hummel et al., 2006; Klapper et al., 2008). Rückblickend ergibt sich eine gute Konkordanz zwischen den beiden Methoden. Wie erwartet detektierten die SNP-Chips zahlreiche Aberrationen, die die CGH aufgrund von Auflösungsbeschränkungen nicht wahrnehmen konnte. Insgesamt zeigten die CGH-Klone jedoch die korrekte Tendenz für jede Aberration in der SNP-Chip-Analyse. Ein Problem, das erst in der hochauflösenden Analyse der vorliegenden Arbeit akut wurde, war die Detektion von Keimbahn-Kopienzahlpolymorphismen. Da keine Keimbahn-DNA der Patienten im MMML vorlag, musste durch die Filterung mit Hilfe einer Datenbank fast die Hälfte aller detektierten Imbalanzen verworfen werden.

Obwohl der Vergleich der gefundenen Läsionen der BLs zu anderen aggressiven Lymphomen interessant wäre, scheitert ein direkter Vergleich am Mangel an Publikationen mit ähnlich hochauflösenden Verfahren. Trotzdem lassen sich einige allgemeine Aussagen treffen. Eine aCGH-Analyse mit 3000 BAC-Klonen detektierte eine mediane Anzahl von Kopienzahlveränderungen von 8,5 für DLBCLs (Hummel et al., 2006). Die deutlich höher aufgelösten SNP-Chip-Daten der vorliegenden Arbeit ergeben für BLs mediane Veränderungen von 6,0 für die 250k-Auflösung und 8,5 für die 500k-Auflösung. Trotz der deutlich gesteigerten Auflösung der eingesetzten Plattform erreichen die mBLs also gerade eben das Ausmaß der Veränderungen, die in DLBCLs schon bei niedriger Auflösung erkennbar sind. Eine andere Untersuchung mit 5000 BAC-Klonen fand mehr als 15 Regionen, die in wenigstens 20% der untersuchten DLBCLs eine Imbalanz zeigten (Oudejans et al., 2009). In den vorliegenden mBL-Daten finden sich nur zwei Imbalanzen in mehr als 20% der Tumore. Diese Vergleiche lassen den Schluß zu, dass BLs relativ stabile Genome haben, zumindest im

## 4 Diskussion

Vergleich zu DLBCLs.

Ein großer Vorteil der eingesetzten SNP-Chips, vor allen Dingen im Vergleich zur Methode der CGH, ist die Möglichkeit, UPDs zu detektieren. Innerhalb des vorliegenden BL-Kollektivs wird dieser Vorteil jedoch durch das Fehlen von Keimbahn-DNA eingeschränkt. Nichtsdestotrotz war es möglich, durch die statistische Analyse der Genotypfrequenzen robuste Aussagen zum Auftreten von LOHs zu treffen. In mehreren anderen Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass UPDs ein weiterer Weg sind, Tumorsuppressorgene zu inaktivieren (Nielaender et al., 2006; Fitzgibbon et al., 2005), neben Deletionen und/oder Mutationen. Bei der Planung der Analysen wurde deswegen erwartet, dass die Integration von LOHs und genomischen Verlusten in der vorliegenden Arbeit die noch genauere Lokalisation von Tumorsuppressorgen-Kandidaten erlauben würde. Stattdessen zeigen die erhaltenen LOH-Daten, dass es wenig Kongruenz zwischen UPDs und Kopienzahlverlusten gibt. Ein Blick auf die UPD-Daten der Abbildung 3.1.1 offenbart sogar, dass es generell keine starke Akkumulation von UPDs in bestimmten Bereichen gibt, anders als bei den Kopienzahl-aberrationen beobachtet. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass UPDs als alternativer Mechanismus zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen keine große Rolle in der Pathogenese von BLs spielen.

Durch das Vorliegen von Genexpressionsdaten aus dem MMML-Verbundprojekt für dieselben BLs, die in der vorliegenden Arbeit mit SNP-Chips analysiert wurden, konnte ein klarer Gendosiseffekt der rekurrent imbalanzieren Regionen aufgezeigt werden (Abbildung 3.1.3). Die einzige Ausnahme war der rekurrente Zugewinn auf 7q34, der neun Gene enthielt, von denen keines einen starken Dosis-effekt zeigte. Insgesamt unterstreicht dies, dass Zugewinn und Verlust von genomischen Material wichtige Mechanismen zur Deregulation von Genen im BL darstellen.

Vier der analysierten BL-Fälle besaßen durch eine große Deletion auf Chromosom 17 nur noch eine Kopie von *TP53*, das für den Tumorsuppressor p53 kodiert. Diese vier zeigten eine niedrigere *TP53*-Expression als die 35 nicht betroffenen Fälle (Abbildung 3.1.3). Drei weitere BLs wiesen UPDs auf, die mit *TP53* überlappten. Ein

#### 4 Diskussion

Rückgriff auf die Datenbank des MMML-Verbundes machte klar, dass für 33 der insgesamt 39 BLs *TP53*-Mutationsanalysen aus einer anderen Arbeitsgruppe vorlagen (unpubliziert). Zwei von zwei Fällen mit heterozygoter Deletion und zwei von zwei Fällen mit UPD trugen inaktivierende Mutationen auf dem verbliebenen Allel, verglichen mit 10 von 29 mutierten Fällen (34%) ohne Aberration laut SNP-Chip. Deletion wie UPD scheinen in diesen Tumoren also einen Mechanismus darzustellen, p53 dauerhaft zu inaktivieren. Erwähnt werden muss ausserdem, dass drei weitere Fälle kleine, heterozygote Deletionen in der Nähe von, aber nicht überlappend mit, *TP53* aufwiesen. Der Abstand betrug etwa 2 Mb, und jede der Deletionen umfasste die Gene *STX8*, *USP43* und *WDR16*. Da jedoch für keines der Gene bisher eine Rolle in der Krebs- oder B-Zell-Entwicklung beschrieben wurde und es keine differentielle Expression der Genprodukte zwischen B-Zell-Entwicklungsstufen gibt (unpublizierte Daten aus dem Labor von Ralf Küppers), bleibt die Relevanz dieser Deletionen unklar.

Ein signifikant hochreguliertes Gen in der amplifizierten Region 18q21.2, *POLI*, kodiert für die DNA-Polymerase Iota. Dieses Protein spielt eine Rolle als fehlerbehaftete Polymerase in der somatischen Hypermutation (Faili et al., 2002) und in einigen Formen der DNA-Reparatur (Petta et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Assoziation der Überexprimierung von *POLI* und einem hohen Anteil von aberranten Kopienzahlmarkern festgestellt werden (Abbildung 3.1.4). Die Ausprägung von *POLI* zeigte eine positive Korrelation mit zunehmender genomischer Instabilität im BL-Kollektiv (Spearman-Korrelation=0,3; p=0,06). Für Brustkrebszellen konnte bereits gezeigt werden, dass eine gesteigerte Menge Polymerase Iota zu einer höheren Mutationsfrequenz führt (Yang et al., 2004). Die vorliegenden Daten legen einen ähnlichen Zusammenhang im BL zumindest nahe. Interessanterweise hat eine Studie an Mäusen *POLI* sogar als neues Onkogen im Kolorektalen-Krebsmodell postuliert (Starr et al., 2009).

Diese Arbeit konnte zeigen, dass das *MYC*-Gen nicht nur Ziel von Translokationsereignissen ist, sondern auch von genomischen Zugewinnen in 5 der 39 mBLs. Die Tatsache, dass die Ausprägung von *MYC* in den fünf Fällen mit Zugewinn nicht

#### 4 Diskussion

anders war als in den übrigen Fällen, ist durch die enge Verknüpfung des BL-Phänotyps mit der *MYC*-Expression zu erklären. Nur Tumorklone, die eine starke *MYC*-Hochregulation zeigen, werden phänotypisch zu mBLs, egal auf welche Weise diese Hochregulation erreicht wird (Hummel et al., 2006). Dies zeigt auch der Einschluss von drei BLs im vorliegenden Kollektiv, die keine detektierbare *MYC*-Translokation aufwiesen, aber trotzdem als mBL klassifiziert wurden. Zwei dieser Fälle zeigten einen Zugewinn von Material an der Position von *MYC*. Es lässt sich also sagen, dass die häufigste Deregulationsmethode innerhalb der mBLs die Translokation an einen IG-Lokus ist, dass jedoch der Gewinn von *MYC*-Kopien ein weiterer Weg ist, die Ausprägung dieses wichtigen Gens zu steigern. Die drei BLs, die Zugewinne zusätzlich zur Translokation aufwiesen, repräsentieren vermutlich unbalanzierte Translokationsereignisse, in denen Material nahe des Bruchpunkts durch die DNA-Reparaturmaschinerie vervielfältigt wird. Für den einzelnen Fall ohne Translokation und ohne andere detektierte Auffälligkeit am *MYC*-Lokus, aber mit ähnlich starker *MYC*-Ausprägung wie bei den übrigen mBLs, bleibt der Mechanismus der Deregulation unbekannt. Im untersuchten Kollektiv war keine Assoziation zwischen *TP53*-Deletionen, die die pro-apoptotische Wirkung des *MYC*-Proteins einschränken können, und *MYC*-Zugewinnen feststellbar.

Eine weitere rekurrente Aberration, die die Deregulation von *MYC* beeinflusst, ist der Zugewinn des miRNA-17-92-Superclusters, der direkt vom *MYC*-Protein transaktiviert wird (O'Donnell et al., 2005). Für diese Ansammlung von miRNA-Genen konnte in anderen Arbeiten eine deutliche Überexpression gezeigt werden, und zwar in mehreren soliden Krebsarten (Volinia et al., 2006) und B-Zell-Tumoren (Tagawa et al., 2007), in denen auch Amplifikationen des Gens beschrieben wurden (Ota et al., 2004). Überexpression der codierten miRNAs in Mauslymphozyten reduziert die Apoptose dieser Zellen und führt zur beschleunigten Entwicklung von Lymphomen (Xiao et al., 2008), was der Definition eines Onkogens entspricht (He et al., 2005). Der Cluster und das *MYC*-Onkogen haben einen synergistischen Effekt auf die Entstehung aggressiver Krebsarten (Tagawa et al., 2007). Die miRNAs erlauben

#### 4 Diskussion

es dem Tumor dabei, der aktivierungs-induzierten Apoptose zu entgehen, die normalerweise durch *MYC*-Überexpression ausgelöst wird. Dies geschieht z.B. durch die reduzierte Ausprägung der miRNA-Zielgene *TGFBR2* (Tagawa et al., 2007), *BIM* und *PTEN* (Xiao et al., 2008; Mu et al., 2009).

Der miRNA-17-92-Supercluster wird seinerseits durch eine selbstregulierende Rückkopplung mit Proteinen der E2F-Familie kontrolliert (Sylvestre et al., 2007). Im vorliegenden Datensatz wiesen drei mBL-Fälle heterozygote Deletionen der Region 1p36.12 auf. In diesem Bereich liegt das Gen *E2F2*, dessen Genprodukt direkt den Promotor des miRNA-Superclusters bindet und seine Expression erhöht (Sylvestre et al., 2007). Die drei Fälle mit *E2F2*-Deletion hatten ein niedrigeres mRNA-Niveau dieses Transkriptionsfaktors als nicht betroffene Fälle, dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die Deletion eines positiven Regulators des miRNA-Clusters scheint auf den ersten Blick auch widersinnig, da das miRNA-Polycistron in anderen Tumoren des Kollektivs ja selektiv amplifiziert vorlag, eine höhere Dosis also vorteilhaft für den Klon ist. Eine Möglichkeit ist, dass die Expressionsverringerung des Transkriptionsfaktors E2F2 weitere Effekte auf den Tumor hat, die die Herabregulation des miRNA-Clusters aufwiegen. Ausserdem ist es möglich, dass in Tumoren mit Deletion von *E2F2* andere Transkriptionsfaktoren die Rolle dieses E2F-Familienproteins in der Regulation des miRNA-17-92-Clusters übernehmen, z.B. das stark überexprimierte *MYC* als direkter Transaktivator des Cluster-Promotors. Für diese Theorie spricht ein Mausmodell, in dem gezeigt werden konnte, dass E2F2 als Tumorsuppressor in B-Zellen von Mäusen mit konstitutiver *MYC*-Überexpression wirkt (Rempel et al., 2009). Die Mäuse mit einem heterozygoten Verlust von *E2F2* zeigten eine starke Haploinsuffizienz, die eine stark beschleunigte Entwicklung von *MYC*-getriebenen B-Zell-Lymphomen bewirkte. Dies legt nahe, dass auch in humanen, *MYC*-getriebenen BLs der Verlust eines Allels von *E2F2* einen starken Effekt auf die Entwicklung des Zellklons hat. Eine weitere interessante Beobachtung in unserem Datensatz ist, dass die Amplifikationen des miRNA-Clusters und die Deletionen von E2F2 niemals zusammen im gleichen Tumor gefunden wurden, eines der beiden Ereignisse also ver-

mutlich ausreicht, um das empfindliche Gleichgewicht der Rückkopplung dieser Faktoren zu stören.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit bereits beschriebene Aberrationen im BL mit hoher Auflösung bestätigt werden konnten, und zusätzlich viele neue rekurrente Veränderungen detektiert wurden, deren funktionale Signifikanz in weiteren Detailarbeiten geklärt werden muß. Auffallend viele der neuen Läsionen betreffen den Transkriptionsfaktor MYC direkt oder indirekt, was einerseits die herausragende Bedeutung dieses Proteins in der Pathogenese des BL unterstreicht, andererseits aber auch zeigt, dass die Deregulation dieses zentralen Faktors deutlich komplexer ist als bisher angenommen.

## 4.2 Einordnung der gefundenen Aberrationen in DLBCLs

Die im Ergebnisabschnitt vorgestellten Veränderungen finden im Großen und Ganzen Bestätigung durch die bisher publizierten Untersuchungen an DLBCLs. Bea et al. (2009) analysierten 64 DLBCLs (nicht unterteilt nach Subgruppen) mittels CGH und fanden dabei rekurrente Zugewinne auf 18q, Xq, 2p, 7q und 12p. Rekurrente Verluste beschrieben sie für 6q und 17p. Vergleicht man dazu Abbildung 3.2.1 auf Seite 44, so kann man alle diese Veränderungen auch im Kollektiv der vorliegenden Arbeit finden. Die Unterteilung in ABC- und GCB-Tumore erlaubt jedoch z.B. die Aussage, dass die 2p und 12p Zugewinne fast nur in den GCB-DLBCL auftreten. Außerdem ermöglicht die höhere Auflösung der SNP-Chips, die gefundenen Aberrationen enger einzugrenzen und so sinnvollere Kandidatenregionen zu benennen. Die größere Anzahl an Lymphomen führt zu einer repräsentativeren Abbildung der Zustände in dieser Entität.

Eine weitere wichtige Arbeit, die beim Blick in die bisherige Literatur erwähnt werden muss, ist Pasqualucci et al. (2011b). Die Autoren dieser Arbeit untersuchten 6 DLBCLs mit hochauflösenden SNP-Chips und massiv paralleler Sequenzierung.

## 4 Diskussion

Die so entdeckten Veränderungen wurden dann an weiteren Primärfällen bestätigt und mit genaueren Frequenzen gekennzeichnet. Zur Analyse rekurrenter Kopienzahlveränderungen war das Kollektiv von 6 Fällen selbstverständlich zu klein, aber eine wichtige Aussage dieser Arbeit ist die vorgefundene Komplexität der klonalen Aberrationen: Im Durchschnitt konnten mit den beschriebenen Methoden 30 klonale Veränderungen im kodierenden Genom eines Lymphoms gefunden werden. Außerdem wurden erstmals rekurrente Mutationen (in 24% der untersuchten Fälle) im *MLL2*-Gen beschrieben und die häufige Veränderungen von Genen beschrieben, die eine Rolle in der Erkennung des Tumors durch das Immunsystem, speziell zytotoxische T-Zellen, spielen.

Im Folgenden soll eine Betrachtung ausgewählter Gene innerhalb der als rekurrent aberrant erkannten Bereiche erfolgen, die aufgrund ihrer bekannten Funktion eine Rolle in der Pathogenese des DLBCL spielen könnten. Zur Beurteilung der Plausibilität einer Deregulierung war es in der vorliegenden Arbeit ebenfalls von Vorteil, dass globale Genexpressionsdaten der gleichen Fälle im MMML vorlagen, da so die Expression in Fällen mit genomischer Aberration mit den Fällen ohne entsprechende Kopienzahlveränderung verglichen werden konnte. Eine Veränderung der Genexpression durch eine Änderung der Kopienzahl des Gens kann hierbei ein Hinweis sein, dass die Aberration durch die Konzentrationsänderung der Genprodukte Effekte auf Zellfunktionen ausübt.

### 4.2.1 Rekurrente Veränderungen in GCB-DLBCLs

Das wohl herausstechendste Gen in der rekurrent hinzugewonnenen Region 2p15 ist *REL*, eine wichtige Untereinheit des NF $\kappa$ B-Komplexes. Außerdem ist in derselben durch GISTIC detektierten Region *BCL11A* annotiert. Beide Gene sind in der ebenfalls bereits als rekurrent aberrant erkannten Region als Onkogene diskutiert worden (Fukuhara et al., 2006). Für *BCL11A* wird hierbei als onkogener Effekt eine Deregulierung diverser Zielgene dieses Transkriptionsfaktors postuliert, wohingegen eine Überexpression von *REL* zu einer Hyperaktivität des NF $\kappa$ B-Komplexes führen kann (Star-

#### 4 Diskussion

czynowski et al., 2003). Beide Effekte würden so zu einem gesteigerten Überlebens- und Proliferationssignal in der Tumorzelle führen. Fukuhara et al. konnten bereits zeigen, dass in vielen Tumoren nicht nur beide Gene in erhöhter Kopienzahl vorliegen, sondern auch die Expression beider Genprodukte in betroffenen Lymphomen gesteigert ist. Auch in der vorliegenden Arbeit umfaßt die rekurrent hinzugewonne Region (33% der GCB-Fälle) beide Gene, und ein Rückgriff auf die Expressionsdaten des MMML-Verbundes zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Kopienzahl und Genexpression sowohl für *REL* als auch für *BCL11A*. Es erscheint also wahrscheinlich, dass die betroffenen Tumore durch Erhöhung der Kopienzahl in diesem Bereich des Genoms einen wichtigen Überlebensvorteil erwerben, indem sie sowohl den NF $\kappa$ B-Signalweg als auch die Zielgene des BCL11A-Transkriptionsfaktors deregulieren.

Ein weiterer, bereits als pathogenetisch relevant erkannter Faktor ist die konstitutive Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs in vielen DLBCLs (Meier et al., 2009). Im vorliegenden Kollektiv kann bestätigt werden, dass das Gen *JAK2* sich in einem rekurrent hinzugewonnenen Bereich (9p24.2, detektiert in 11% der Fälle) befindet und dies auch zu einer erhöhten Expression dieses wichtigen Moleküls führt. Bereits in der zitierten Arbeit von Meier et al. konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der JAK2-Dosis zu einer verstärkten Aktivierung nachgeschalteter STAT-Faktoren führt, und so die Signalaktivität in diesem Pfad steigert. Das JAK/STAT-Signal dient hierbei dem Tumorklon als weiteres anti-apoptotisches Signal, zur Übersteuerung ex- und intrinsischer Todessignale.

In der Region 11p13 befindet sich das Gen für den Oberflächenrezeptor CD44. Dieser interagiert mit einer Vielzahl von Liganden, darunter Hyaluronsäure, Kollagenen und anderen Molekülen der extrazellulären Matrix. Im vorliegenden GCB-Kollektiv zeigen 20% der GCB-DLBCLs eine Kopienzahlerhöhung dieses Gens. In der Literatur sind bereits Veränderungen dieses Locus beschrieben, jedoch bisher keine Zugewinne. Tzankov et al. (2003) konnten zeigen, dass die differentielle Expression von CD44-Isoformen in DLBCLs mit klinischen Parametern korreliert, also offenbar

#### 4 Diskussion

funktionelle Relevanz für den Lymphomklon besitzt. Außerdem wurde in einer anderen Arbeit eine rekurrente Translokation in verschiedenen malignen Lymphomen beschrieben, die den *CD44*-Lokus unter die Kontrolle eines IgH-Enhancers bringt und so die Expression von bestimmten CD44-Isoformen erhöht (Hu et al., 2010). Diese Translokation führte in den in dieser Arbeit getesteten Zelllinien zu Apoptoseresistenz durch konstitutive Aktivierung des CD44-Signals. Eine ähnliche Entdeckung wurde in Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie gemacht: Gesteigertes CD44-Signal dient diesen Zellen als Überlebenssignal (Herishanu et al., 2011). Es ist deswegen anzunehmen, dass auch in GCB-DLBCLs die Vermehrung der Genkopien zu einem pathologischen CD44-Signal durch Kontakt mit der extrazellulären Matrix führt, das den Zellen zur Überwindung von Todessignalen dient.

Eine interessante Beobachtung in der vorliegenden Arbeit war der rekurrente Zugewinn eines Bereichs auf 12q12 (in 39% der GCB-DLBCLs), der auch das Gen *HDAC7A* einschließt, das zudem eine differentielle Genausprägung in betroffenen Fällen im Vergleich zu Fällen mit zwei Kopien zeigte. *HDAC7A* kodiert für eine Histondeacetylase, die über ein Zusammenspiel mit anderen Faktoren den Acetylierungszustand an diversen Loci des menschlichen Genoms steuert. Es konnte in anderen Arbeiten bereits gezeigt werden, dass in der Progression zum Adenokarzinom eine Selektion für eine höhere *HDAC7A*-Expression stattfindet, es sich in diesem Kontext also um ein Onkogen handelt (Ouaïssi et al., 2008). Zhu et al. (2011) konnten zeigen, dass das HDAC7A-Protein an den MYC-Lokus bindet. Eine Reduktion der HDAC7A-Menge bewirkte in dieser Arbeit eine direkte Reduktion der MYC-Menge in Zelllinien, was zu Wachstumsstopp und Seneszenz führte. Eine andere Arbeit konnte aufzeigen, dass HDAC7A in der Regulation von Zielgenen direkt mit BCL6 kooperiert (Lemercier et al., 2002), einem Transkriptionsfaktor, der in DLBCLs oft durch Translokationen dereguliert ist (Wagner et al., 2011). Diese Befunde lassen *HDAC7A* auch als Onkogenkandidaten in DLBCLs plausibel erscheinen. Eine Deregulierung dieser Acetylase könnte dem Tumor die Deregulierung eines Netzes von Zielgenen erlauben, gerade in Kooperation mit anderen deregulierten Transkriptionsfaktoren oder Chromatinbe-

#### 4 Diskussion

standteilen. In diesem Zusammenhang, der Deregulierung des Chromatinzustands, ist es auch von Interesse, dass Pasqualucci et al. (2011a) rekurrente monoallelische Inaktivierungen von Acetylase-Genen in DLBCLs beschrieben haben, die direkten Einfluß auf die p53- und BCL6-Expression nehmen. Da diese quasi die „andere Seite“ der Acetylierungsregulierung darstellen, erscheint es insgesamt wahrscheinlich, dass eine Acetylierungs-Dosisveränderung in DLBCLs einen evolutionären Vorteil für den Tumorklon darstellt. Diese könnte dem Klon z.B. erlauben, epigenetisch stillgelegte Gene zu reexprimieren, indem Einfluß auf die Bindungsstärke von Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen genommen wird, die auf Chromatinmarkierungen reagieren.

Besonders erwähnenswert sind ebenfalls die rekurrenten Zugewinne in 25% der GCB-DLBCLs, die den Locus des miRNA-Clusters-17-92 auf 13q31.3 betreffen. Wie schon im Abschnitt über die BLs ( auf Seite 62) beschrieben, steuern die Produkte dieser Ansammlung von miRNA-Genen eine Vielzahl von zellulären Prozessen, die das Gleichgewicht aus Wachstum und Apoptose mitbestimmen. Die Expression dieses Clusters ist oftmals über eine Rückkopplung an die Expression von Zielgenen gekoppelt, so dass sich in nicht-malignen Zellen stabile Expressionsmuster einstellen können. Die genauen Effekte, die dies auf die Entwicklung des Lymphomklons hat und die in der Literatur bereits beschrieben sind, wurden im Abschnitt der BLs ausgeführt, so dass hier nicht noch einmal gesondert auf die Details eingegangen werden soll. Es bleibt festzuhalten, dass die Deregulation dieser miRNA-Gene über genomische Zugewinne sowohl in Burkitt- als auch in diffus großzelligen Lymphomen eine Rolle zu spielen scheint.

Ähnlich verhält es sich mit den rekurrenten Zugewinnen auf 18q21.2 (in 20% des GCB-Kollektivs). Das einzige Gen, das eine differentielle Genexpression in GCB-Fällen mit Zugewinn zeigte, war *POLI*. Dieses Gen kodiert die humane DNA-Polymerase Iota und war ebenfalls in den in dieser Arbeit untersuchten BLs dereguliert, in denen auch eine Assoziation der Ausprägungsstärke dieses Gens mit einer erhöhten Menge Aberrationen im Genom gezeigt werden konnte (Abschnitt 3.1). Es lässt sich

#### 4 Diskussion

also spekulieren, dass die Erhöhung der Mutationsfrequenz durch Verschiebung der verwendeten DNA-Reparaturprozesse hin zu mehr fehleranfälligen Komplexen ein gemeinsames Merkmal einiger BLs und GCB-DLBCLs darstellt.

Beim Blick auf die Regionen, die als rekurrenter Verlust detektiert wurden, befinden sich dort viele bekannte oder spekulative Tumorsuppressorgene. In der Region 1p36 (verloren in 18% der GCB-DLBCLs) sind drei Gene annotiert, die von verschiedenen Autoren als Tumorsuppressorgene diskutiert wurden. Das Produkt des Gens *DFFB*, das in unserem GCB-Kollektiv in Fällen mit Verlust signifikant niedriger exprimiert war, spielt eine Rolle in der Ausführung der Apoptose, in der es zur Fragmentierung der DNA beiträgt. Sein Einfluß auf die Regulation des Apoptoseeintritts ist unklar, aber in Zelllinienmodellen konnte eine gesteigerte Apoptoseresistenz bei Herabregulation von *DFFB* gezeigt werden (McDonald et al., 2005). In der gleichen Region befinden sich die beiden Gene *TP73* und *TP73-AS1*. *TP73-AS1* kodiert eine RNA, deren Fehlen offenbar in verschiedenen malignen Tumoren Apoptose- und Chemotherapieresistenz erzeugt (Pang et al., 2010). *TP73* wiederum kodiert p73, ein Protein, das zusammen mit p53 eine zentrale Instanz zur Einleitung der Apoptose darstellt. Vergleichbar mit p53 konnte in mehreren Tumorentitäten eine Inaktivierung von *TP73* durch Deletion, Mutation oder epigenetische Stilllegung beobachtet werden, was auf die Bedeutung dieses Genprodukts als Tumorsuppressor hindeutet (Pei et al., 2011).

In der Region 6q15 (verloren in 20% der GCB-DLBCLs) sind zwei Gene annotiert, die im Kontext dieser Entität interessant erscheinen. Das erste ist *CASP8AP2*, das einen Teil des CD95(FAS)-Signalkomplexes kodiert, der zur Aktivierung von Caspase8 beiträgt. Das Signal über CD95 erfolgt im Körper z.B. über Kontakt mit zytotoxischen Zellen, die dieses zur Elimination von aberranten Zellen verwenden (Waring und Müllbacher, 1999). Eine Herabregulation des *CASP8AP2*-Genprodukts reduziert in Zelllinien die Apoptoseneigung unter CD95-Signal (Milovic-Holm et al., 2007). Klinisch konnten Jiao et al. (2012) feststellen, dass eine niedrigere *CASP8AP2*-Expression mit einer schlechteren Prognose bei akut lymphatischer Leukämie asso-

#### 4 Diskussion

ziiert ist. Diese Beobachtung, zusammen mit der Rolle des Genprodukts im FAS-Signalkomplex, legt eine Funktion als Tumorsuppressorgen nahe.

In der gleichen rekurrent deletierten Region befindet sich das wichtige B-Zell-Gen *BACH2*. Das kodierte Protein ist ein zentraler Faktor, der die Entwicklung und Identität einer B-Zelle steuert (Alinikula et al., 2011; Nutt et al., 2011). Über Rückkopplungsschleifen ist *BACH2* in eine Vielzahl von Regulationsprozessen eingebunden, die zur normalen Funktion einer B-Zelle erforderlich sind. Z.B. reprimiert *BACH2* zusammen mit *BCL6* den Transkriptionsfaktor Blimp-1 und unterdrückt so die vorzeitige Differenzierung zu Plasmazellen (Ochiai et al., 2008). In retrospektiven klinischen Studien an DLBCL-Fällen konnten Sakane-Ishikawa et al. (2005) zeigen, dass eine niedrigere *BACH2*-Expression im Tumorklon mit einer signifikant schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten assoziiert ist. Es ist anzunehmen, dass der spätere Tumorklon im Laufe seiner Entwicklung das starre und gut kontrollierte Genexpressionsprogramm einer B-Zelle durchbrechen muss, um zu entarten. Dies könnte beispielsweise durch eine Reduktion der *BACH2*-Expression über einen Gendosiseffekt per Verlust genomischen Materials erfolgen, da dadurch vermutlich das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Differenzierungssignalen einer B-Zelle empfindlich gestört werden kann.

Das Gen *RHOBTB2* ist ein Tumorsuppressorkandidat, der in der Region 8p21.2 liegt. In der Literatur existieren Belege für eine Tumorsuppressorfunktion in Brustkrebs (Ling et al., 2010) und Blasenkrebs (Shi et al., 2008). Das Gen kodiert eine kleine Rho-GTPase, die eine Rolle in der Zellzykluskontrolle, der Apoptose, dem Zytoskelett und dem Membrantransport spielt (Siripurapu et al., 2005). Ein Faktor, der zur Bedeutung als Tumorsuppressorgen beiträgt, ist die Unterdrückung der Expression von *CCND1* (Cyclin D1) durch die Expression von *RHOBTB2* (Yoshihara et al., 2007). Da *CCND1* das Fortschreiten des Zellzyklus kontrolliert, führt eine Herabregulation dieses Genprodukts zu einer Verlangsamung oder sogar einem Stop der Zellteilung. Aus diesem Grunde sind Veränderungen in *CCND1* oder nachgeschalteten Signalproteinen weit verbreitet in malignen Tumoren (Musgrove et al., 2011). Eine

#### 4 Diskussion

Deletion von *RHOBTB2* könnte also einen Mechanismus darstellen, um die Menge Cyclin D1 in der Zelle zu erhöhen und so das Aufrechterhalten des Zellzyklus auch unter Bedingungen ermöglichen, unter denen nicht-veränderte Zellen ihre Proliferation stoppen würden.

Eine ähnliche Funktion besitzt die häufige Inaktivierung des Lokus von *CDKN2A* und *CDKN2B* auf 9p21.3, der im vorliegenden GCB-Kollektiv in 14% der Fälle deletiert ist. In der Literatur ist klar belegt, dass der Verlust von Genmaterial an dieser Position mit einer Reduzierung der Genprodukte einhergeht (Gendosiseffekt) und in DLBCLs zu einer signifikant schlechteren Prognose führt (Lee et al., 2010; Jardin et al., 2010). Die kodierten zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren 2A und 2B sind ebenfalls zentrale Steuerstellen für das Fortschreiten des Zellzyklus, wobei ein Verlust ihrer Ausprägung zum Verlust der Zellzykluskontrolle führt (Dominguez-Brauer et al., 2010). Da diese beiden Proteine auch eine wichtige Rolle in der Apoptoseeinleitung über den p53-Signalweg spielen (Dominguez-Brauer et al., 2010), ist ihr Verlust gleich auf mehreren Wegen von Vorteil für das Überleben des Tumorklons.

In der vorliegenden Arbeit wurden in 16% der GCB-DLBCLs Deletionen im Bereich 10q23.31 detektiert, die *CD95* (den FAS-Rezeptor) betreffen. Die Expression dieses Gens war in Fällen mit Deletion signifikant geringer als in Fällen mit zwei Kopien. FAS-Signal spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von B-Zellen, den Vorläuferzellen des DLBCLs (Küppers, 2005). Über das Auslösen dieses Signalweges durch andere Zellen, die einen Liganden ausprägen (z.B. zytotoxische T-Zellen), werden B-Zellen selektiert, die dann die Apoptose einleiten. Ein Verlust oder eine Reduzierung in der Expression von FAS könnte so einen wichtigen Schritt auf dem Weg hin zum Entkommen aus der Immunüberwachung darstellen (Küppers, 2005). Dass der Verlust von FAS eine funktionelle Auswirkung auf den DLBCL-Zellklon hat, ist durch eine Assoziation zwischen guter Prognose und hoher FAS-Expression in der Literatur bereits mehrfach gezeigt worden (Kojima et al., 2006; Chatzitoliou et al., 2010). Einen möglichen Mechanismus in DLBCLs, wie dieser Lokus besonders häufig von Mutationen betroffen sein kann, stellt die Maschinerie der somatischen Hypermutation be-

## 4 Diskussion

reit. Es konnte gezeigt werden, dass in normalen B-Zellen regelmässig Mutationen in den *CD95*-Lokus eingeführt werden, da dieses Gen offenbar ebenfalls, wenn auch in deutlich geringerer Frequenz als der Ig-Lokus, als Ziel der Hypermuation dient (Müschel et al., 2002). Da diese Mutationen teilweise auch zu Doppelstrangbrüchen mit nachfolgenden fehlerbehafteten Reparaturprozessen führen, ist sogar denkbar, dass auch die im SNP-Chip detektierten Verluste von Material an dieser Stelle ursprünglich durch Läsionen der somatischen Hypermuation begründet sind.

In der rekurrent deletierten Region 16q13 (in 8% der GCB-Fälle) liegt das Gen *CYLD*, dessen Expression in Fällen mit Deletion signifikant geringer war. Das Produkt dieses Gens hemmt die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Komplexes, der wiederum Einfluß auf diverse Zellsignalwege nimmt, und ist ein wichtiger Tumorsuppressor (Kovalenko et al., 2003). So führt ein Verlust der *CYLD*-Expression sowohl zum Ansteigen des Signals im WNT-Signalweg (Tauriello et al., 2010) als auch zu einer generellen Resistenz der Zellen gegen Apoptosesignale durch eine konstitutive NF $\kappa$ B-Aktivierung (Brummelkamp et al., 2003). Kopienzahlverluste dieses Gens sind ebenfalls in einigen Fällen des klassischen Hodgkin-Lymphoms beschrieben worden, wo sie auch zur Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signals beitragen (Schmidt et al., 2010).

Nur kurz erwähnt werden soll an dieser Stelle die rekurrente Deletion im Bereich 19p13.3 in 16% der GCB-DLBCLs, die die beiden Gene *TNFSF7* und *TNFSF9* einschließt. Auf die Bedeutung und das genaue Maß an Rekurrenz, das im Lymphomkollektiv der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, wird in den Abschnitten 3.3 auf Seite 53 und 4.3 auf Seite 82 eingegangen.

### 4.2.2 Rekurrente Veränderungen in ABC-DLBCLs

In der Rekurrenzanalyse dieser Lymphome wurden einige Regionen detektiert, die Gene enthalten, die auch in GCB-DLBCLs als rekurrent verändert erkannt werden konnten. Bei den Zugewinnen sind dies die Bereiche auf 9p24.1 (in 29%) und 11p13 (in 39% der ABC-DLBCLs), in denen die Gene *JAK2* bzw. *CD44* annotiert sind, bei den Verlusten *RHOBTB2* auf 8p21.3 (in 18%) und *CDKN2A+B* auf 9p21.3 (in 47%).

#### 4 Diskussion

Zur genauen Erörterung der möglichen Funktion der Aberrationen in der Entwicklung des DLBCL wird an dieser Stelle auf die Diskussion bei den GCB-DLBCLs verwiesen. Der überlappende Fund spricht für die große Bedeutung, die die Deregulation des JAK/STAT-Signalweges wie auch der Zellzyklus- und Apoptosekontrolle in der Pathogenese des DLBCL innehat.

Die sonstigen rekurrenten Zugewinne waren oft sehr groß oder erreichten eine geringe Signifikanz (siehe Abschnitt 7.2). In der Region 7p12.2 (Zugewinn in 19% der ABC-Fälle) stach das Gen *IKZF1* (IKAROS) heraus, das eine wichtige Funktion in der Kontrolle der Haematopoese und der Lymphozytendifferenzierung spielt. Seine genaue Funktion in DLBCLs ist unklar, auch bedingt dadurch, dass es ansonsten in Leukämien oft inaktiviert, also als Tumorsuppressor beschrieben wurde (Payne und Dovat, 2011). Da dieser Faktor jedoch eine ganze Reihe von Funktionen in gesunden Zellen ausführt und die Expression vieler Zielgene steuert, ist nicht auszuschliessen, dass auch eine Überexpression aufgrund von genomischen Zugewinnen pathogenetische Relevanz besitzen könnte.

Die Liste der detektierten Regionen mit rekurrentem Verlust in ABC-DLBCLs ist im Vergleich zu den anderen Subtypen lang, was auch an der schieren Anzahl der Verluste in dieser Lymphomgruppe begründet liegt. Exemplarisch sollen im Folgenden einige Gene in Verlustregionen, die im Kontext des DLBCL und der Pathogenese aus B-Zellen interessant erschienen, diskutiert werden.

Auf Chromosom 6 werden oft Deletionen in malignen Lymphomen detektiert, wobei in der Literatur eine Reihe von Zielgenen aufgezeigt werden konnte (Thelander et al., 2008). Im Bereich 6q21 (in der vorliegenden Arbeit in 41% der ABC-DLBCLs verloren) ist das Gen *PRDM1* (Blimp1) annotiert, das in ABC-DLBCLs als häufig inaktiviert beschrieben wurde (Mandelbaum et al., 2010). Es fungiert in dieser Entität als Tumorsuppressor, da seine Expression in B-Zellen gewöhnlich zu einer finalen Differenzierung in eine antikörper-sezernierende Plasmazelle führt (Mandelbaum et al., 2010). Die Inaktivierung erfolgt dabei häufig über Mutationen, aber auch Deletionen (Hangaishi und Kurokawa, 2010), und zeigt einen Synergieeffekt in der Onkogenese

#### 4 Diskussion

bei konstitutiv aktivem NF $\kappa$ B-Signal, wie es in ABC-DLBCLs vorliegt. (Calado et al., 2010).

Die Region 6q23.3 (deletiert in 43% der ABC-Tumore) enthält die Gene *TNFAIP3* (A20) und *MAP3K5*, die beide signifikant unterschiedliche Ausprägung zwischen Fällen mit Verlust oder normaler Kopienzahl in der vorliegenden Arbeit zeigten. TNFAIP3 ist ein negativer Regulator des NF $\kappa$ B-Komplexes und in ABC-DLBCLs durch Kombinationen von Deletion und Mutation rekurrent inaktiviert (Compagno et al., 2009). Sein Verlust trägt zur dauerhaften Aktivität dieses Signalkomplexes bei (Calado et al., 2010). *MAP3K5* kodiert eine Kinase, die an einer Reihe von Signalwegen beteiligt ist, die über p53 in Apoptose oder Seneszenz münden (Kim et al., 2011a). Ein Verlust dieses Gens könnte es dem Tumor also erlauben, einen von vielen Aktivierungsmechanismen für p53 stillzulegen. Neben diesen Kandidaten liegen noch weitere Tumorsuppressoren (z.B. *FOXO3A* und *HACE1*) in oder in der Nähe der vorgefundenen deletierten Regionen auf diesem Chromosom, die durch die Kopienzahlveränderungen in ihrer Ausprägung gestört werden könnten. Durch die statistische Herangehensweise des GISTIC-Algorithmus kann nicht ausgeschlossen werden, dass in einigen der ABC-DLBCLs auch diese Gene Ziele von pathogenetischer Relevanz darstellen.

Auf Chromosom 12 liegt ebenfalls ein Bereich, der häufig in Lymphomen und Leukämien deletiert ist, z.B. in akut lymphatischer Leukämie (Montpetit et al., 2004). In der vorliegenden Analyse erscheinen zwei Gene interessante Tumorsuppressor-kandidaten in der Region 12p13.2 (in 20% deletiert) zu sein. *CDKN1B* (KIP2) kodiert den Kinaseinhibitor p27, der das Fortschreiten des Zellzyklus hemmt (Lee und Kim, 2009). In vielen Tumoren konnte gezeigt werden, dass CDKN1B nicht mehr korrekt funktioniert, in den meisten bisher beschriebenen Fällen jedoch keine Mutationen aufweist (Lee und Kim, 2009). Stattdessen ist oft der Phosphorylierungszustand von CDKN1B oder seine zelluläre Lokalisation verändert. Lee und Kim (2009) erklären dies mit essentiellen Funktionen dieses Proteins außerhalb der direkten Zellzykluskontrolle, die durch eine vollständige Inaktivierung verloren gehen würden. Die Tatsa-

#### 4 Diskussion

che, dass dieses Gen im vorliegenden Kollektiv nicht nur rekurrent deletiert ist, sondern auch eine differentielle Ausprägung zwischen Tumoren mit Deletion und ohne aufweist, legt nahe, dass in einigen DLBCLs dieser Selektionsdruck gegen eine Inaktivierung überwunden wurde, vermutlich durch funktionelle Änderungen in anderen Signalwegen. Dadurch kann der Tumor, durch Deletion von *CDKN1B*, die Tumorsuppressorfunktion der Zellzykluskontrolle dieses Proteins reduzieren.

In der gleichen Region liegt das Gen *ETV6*. Dieses Gen ist als Translokationspartner von diversen Genen in Leukämien beschrieben (Bohlander, 2005), z.B. in der *ETV6/RUNX1*-Translokation in akuter lymphatischer Leukämie (Fuka et al., 2011). Davon abgesehen sind Mutationen auch in T-Zell-Leukämien detektiert worden (Van Vlierberghe et al., 2011). Das Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Funktion in der Hämatopoese besitzt, indem er vor allen Dingen reprimierend auf die Expression seiner Zielgene wirkt (Silva et al., 2008). Im Kollektiv der vorliegenden Arbeit wurde eine differentielle Expression dieses Gens in Fällen mit Deletion auf 12p13.2 und Fällen mit normaler Kopienzahl detektiert, was auf eine Tumorsuppressorfunktion hinweisen kann. In der Literatur ergibt sich kein einheitliches Bild. Denn während dieses Gen in einigen Entitäten und Tumorfällen als Proto-Onkogen behandelt wird (Fuka et al., 2011), gibt es in anderen Veröffentlichungen Beschreibungen von Inaktivierungen (Deletionen und/oder destruktive Mutationen), die eher für einen Tumorsuppressor sprechen würden (Silva et al., 2008). Es scheint so, als ob auch dieses Genprodukt, je nach Art und Zeitpunkt seiner Expression, tumorunterdrückende oder tumorfördernde Wirkung haben kann. Die gefundenen Deletionen in dieser Arbeit lassen also eine Funktion als Tumorsuppressor in ABC-DLBCLs möglich erscheinen.

Erwähnenswert ist ebenfalls die rekurrente Deletion auf 17p13.1 (in 27% der ABC-DLBCLs), die das Gen *TP53* enthält. Obwohl diese Region fast 4 Megabasen umfasst, ordnet der GISTIC-Algorithmus ihr eine hohe Signifikanz zu. Das kodierte Protein (p53) steht in Signalkaskaden der Apoptose- und Seneszenzregulation an zentraler Stelle. In vielen malignen Tumoren wurden Inaktivierungen dieses Signalge-

bers gefunden, da der Zellklon so diese unvorteilhaften Kontrollmechanismen in der Tumorentwicklung ignorieren kann (Cheung et al., 2009). Es scheint so, als sei auch in ABC-DLBCL die Reduktion der p53-Menge von Vorteil für die Klonentwicklung, denn in der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Reduktion der Genausprägung in Fällen mit Deletion festgestellt werden. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass das Signal über p53 in einigen DLBCLs durch direkte Mutation und Inaktivierungen in kooperierenden Faktoren ausgeschaltet ist (Grønbaek et al., 2002). Zusammen mit der Tatsache, dass für p53 auch der Verlust eines Allels durch Haploinsuffizienz eine Rolle in der Tumorentstehung spielen kann (Berger et al., 2011), legt dieser Befund nahe, dass die Reduktion der p53-Funktion pathogenetische Relevanz in betroffenen ABC-DLBCLs hat.

### 4.2.3 Rekurrente Veränderungen in den DLBCLs, Typ III

Da die Lymphome des Typs III keine echte Entität darstellen, sondern die Lymphome umfassen, die nicht klar entweder der ABC- oder der GCB-DLBCL-Gruppe zugeordnet werden konnten, findet sich in diesem Kollektiv eine große Heterogenität, sowohl was Genexpression als auch Kopienzahlveränderungen angeht. Die geringe Anzahl TypIII-Lymphome ist mit 20 Tumorfällen so gering, dass selbst unter weniger heterogenen Bedingungen nur wenige Rekurrenzen bestimmt werden könnten.

Ein Blick auf Abbildung 3.2.8 auf Seite 51 oder in Tabelle 7.2.4 auf Seite 103 macht klar, dass nur wenige der erkannten Rekurrenzen eine echte Eingrenzung auf Genebene erlauben. Die Zugewinne auf 1q32.1 und 7p14.2 ergaben rekurrente Regionen von ca. 30 bzw. 50 Megabasen Größe, in denen jeweils hunderte Gene annotiert sind, so dass die Nennung von Kandidatengenen reine Spekulation wäre. Im folgenden soll deswegen nur auf kleinere Bereiche mit weniger enthaltenen Genen eingegangen werden. Jedoch gilt selbst in diesen kleineren Regionen, dass die Genexpressionsanalyse nur wenige signifikante Veränderungen zwischen Fällen mit spezifischer Aberration und ohne aufspüren konnte, vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl in beiden Gruppen.

#### 4 Diskussion

Im rekurrent hinzugewonnenen Bereich 11q23.1 (in 35% der Typ3-DLBCLs) befindet sich z.B. das Gen *POU2AF1*, auch bekannt als *BOB1*, das signifikant höher exprimiert ist in Fällen mit genomischem Zugewinn an dieser Position. Es kodiert einen transkriptionellen Koaktivator, der eine wichtige Rolle in der Entwicklung von B-Zellen spielt (Salas und Eckhardt, 2003; Teitell, 2003) und außerdem nicht-transkriptionell in die Regulation der Signalkaskade des B-Zell-Rezeptors eingebunden ist (Siegel et al., 2006). Seine Bedeutung in Lymphomen ist unklar. In akut myeloider Leukämie konnte eine Assoziation zwischen Prognose und *BOB1*-Expression aufgezeigt werden (Advani et al., 2010), so dass es denkbar ist, dass auch in einigen Typ3-DLBCLs eine Deregulierung dieses zentralen B-Zellfaktors durch genomische Zugewinne funktionelle Relevanz für den Tumorklon haben könnte. Diese könnte beispielsweise in einer Beeinflussung des B-Zell-Rezeptorsignals bestehen, aber auch in der Deregulierung des Ausprägungsniveaus von Zielgenen, an deren Transkription *BOB1* beteiligt ist.

Bei den rekurrenten Verlusten der Typ3-Lymphome tauchen vor allen Dingen Regionen auf, die schon in GCB-DLBCLs als rekurrent verloren erkannt werden konnten. Der Verlust auf 1p36.32 umfasst hier ebenso *DFFB*, *TP73* und *TP73-AS1* wie in den GCB-DLBCLs. Auch die Regionen 6q22.31, 9p21.3 und 19p13.12 umfassen (trotz der leicht unterschiedlichen Benennung durch die GISTIC-Software, die durch unterschiedlich Grenzen der Regionen begründet ist) die gleichen Kandidatengene, die in den entsprechenden GCB-DLBCL-Bereichen diskutiert wurden. Für ihre funktionelle Erörterung wird an dieser Stelle also auf den vorhergehenden Abschnitt 4.2.1 verwiesen. Die statistische Signifikanz der Rekurrenzen ist in der Typ3-Gruppe jedoch geringer, und oft kommt der Vergleich der Genexpression zu keinem signifikanten Ergebnis. Beides ist jedoch durch die geringe Zahl an Typ3-DLBCLs erklärbar.

### 4.3 *TNFSF7* und *TNFSF9* als neue potentielle Tumorsuppressorgene in aggressiven Lymphomen

Schon das Muster von überlappenden heterozygoten und homozygoten Deletionen, das sich in der Analyse der ersten 98 Lymphome per SNP-Chip zeigte, ist typisch für ein Gen, dessen Expression einer Gegenselektion während der Tumorprogression unterliegt. Klassisch findet bei solchen Tumorsuppressorgenen in Fällen mit nur einer monoallelischen Deletion eine Inaktivierung des verbliebenen Allels durch Mutation oder epigenetische Stilllegung statt. In der vorliegenden Arbeit wurden in den 12 Fällen mit heterozygotem Verlust zumindest im kodierenden Bereich der in der MDR enthaltenen Gene keine einzige Veränderungen der Basenzusammensetzung gefunden. Das schließt natürlich formal gesehen nicht aus, dass es inaktivierende Mutationen ausserhalb der kodierenden Region gibt. Normalerweise sind inaktivierende Mutationen von Tumorsuppressorgenen, aufgrund ihrer Erzeugung durch zufällige Prozesse, jedoch über einen weiten Bereich des Gens verstreut. Es müsste also im vorliegenden Fall aus einem unbekanntem Grund eine starker Selektionsdruck für Veränderungen im nichtkodierenden Bereich bestehen, der erklären könnte, warum kein einziges der 12 Lymphome vom Wildtyp dieser beiden Gene abweicht. Allein schon die Anzahl der sequenzierten Fälle macht dies unwahrscheinlich. Interessanterweise ist es in letzter Zeit immer deutlicher geworden, dass viele Tumorsuppressorgene Haploinsuffizienz zeigen, also schon der Verlust eines Allels zu einer verringerten Ausprägung aus Gendosisgründen führt. Diese um 50% reduzierte Ausprägung führt bei haploinsuffizienten Genen bereits zu einem veränderten Phänotyp, der Selektionsvorteile in der Tumorentwicklung bereitstellt (Berger et al., 2011).

Falls die gefundenen Deletionen tatsächlich über Haploinsuffizienz eine Wirkung auf den Tumorklon haben sollten, müsste die Gendosis in Fällen mit Deletion verringert sein. Dies konnte weder für *TNFSF7* noch *TNFSF9* in den Genchipdaten

#### 4 Diskussion

des Verbundes bestätigt werden (Abbildung 3.3.3 auf Seite 58), was auf den ersten Blick auch gegen eine Inaktivierung des verbliebenen Allels durch Mutation und/oder epigenetische Mechanismen spricht. Die Interpretation der Genausprägungsdaten wird jedoch durch die Tatsache erschwert, dass das analysierte Material oft auch infiltrierende Nichttumorzellen enthielt, in einigen Verbundfällen sogar mehr als 30%. Da TNFSF7 und TNFSF9 z.B. auch in Monozyten und dendritischen Zellen ausgeprägt werden (Taraban et al., 2006; Laderach et al., 2003), könnte das Infiltrat den Expressionsverlust in den Tumorzellen „maskieren“. Dafür spricht, dass ähnliche Transkriptniveaus selbst in Fällen mit durch FISH- wie SNP-Analysen bestätigter homozygoter Deletion vorgefunden wurden, denn diese Transkripte können nur aus Nichttumorzellen stammen. Eine weitere Möglichkeit wäre der Nachweis der angenommenen Expressionsreduktion per Immunhistochemie auf Gewebeschnitten, doch leider ist diese Methode nicht sensitiv genug, um einen Verlust von 50% der Ausprägung nachzuweisen. Eine Isolation von Tumorzellen per Mikrodissektion hat leider das Problem, dass die notwendige immunhistochemische Markierung der Tumorzellen in den Gewebeschnitten eine nachfolgende quantitative RT-PCR an dem gewonnenen Material unmöglich macht.

Es gibt jedoch eine Reihe von Hinweisen in der Literatur über die Bedeutung der beiden Gene in der Tumorentwicklung. Beide gehören zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie und sind wichtige Signalmoleküle in Immunantworten. TNFSF7 ist ein bedeutender kostimulatorischer Faktor für T-Zellen, insbesondere CD8-positive zytotoxische T-Zellen (Dolfi et al., 2008), und konnte in einigen Modellen starke Immunreaktionen gegen Tumore auslösen (Arens et al., 2004). Auch TNFSF9 konnte in Modellsystemen Abwehrreaktionen gegen Tumore auslösen (Kim et al., 2008) und scheint sowohl die Entwicklung von zytotoxischen Effektorzellen zu fördern als selbige auch zu aktivieren (Grunebach et al., 2005; Vinay et al., 2004). Beide Tumornekrosefaktoren könnten also eine Rolle in der Erkennung und Bekämpfung des Tumors durch das Immunsystem spielen, so dass die Reduktion ihrer Expression einem Zellklon mit bereits vorliegenden onkogenen Veränderungen ein Entkommen aus der Im-

munüberwachung ermöglichen würde. Mäuse mit Verlust beider Allele von *TNFSF9* haben eine verstärkte Neigung, Lymphome mit GC-Abstammung zu entwickeln (Mid-dendorp et al., 2009), was zumindest in Mäusen *TNFSF9* als Tumorsuppressorgen etabliert.

Eine kürzlich publizierte Untersuchung von DLBCLs mit Hilfe von SNP-Chips und massiv-paralleler Sequenzierung detektierte kleine, fokale Deletionen in *TNFSF9* in 10 der 79 untersuchten Fälle (Pasqualucci et al., 2011b). Dabei wurde ebenfalls ein Muster von überlappenden homo- und heterozygoten Deletionen beobachtet, wobei ein Tumor eine homozygote Deletion besaß, die nur *TNFSF9* betraf. Die vorliegende Arbeit kann damit *TNFSF9*-Deletionen als rekurrentes Ereignis in DLBCLs bestätigen und erweitert diese Aussage um den Befund, dass in vielen Fällen auch *TNFSF7* in direkter Nachbarschaft betroffen ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auf dem verbliebenen Allel in heterozygoten Fällen keine somatischen Mutationen vorliegen, ein Punkt, der in der genannten Publikation nicht untersucht wurde (Pasqualucci et al., 2011b). Durch die breite Materialsammlung des MMML-Verbundes konnte die Rekurrenz sowohl auf das BL als auch eine Hodgkin-Lymphom-Zelllinie erweitert werden. Das alles deutet auf eine breitere Bedeutung von *TNFSF7* und *TNFSF9* als potentiell haploinsuffiziente Tumorsuppressorgene in einer Vielzahl von malignen Lymphomen hin.

### **4.4 Gleichzeitige Deregulierung eines Protoonkogens und Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens durch ein Translokationseignis im Fall MPI-248**

Bereits aus Vorarbeiten des MMML-Verbunds war bekannt, dass im DLBCL MPI-248 eine Translokation stattgefunden hat, die *MYC* auf Chromosom 8 direkt mit *SOCS1* auf Chromosom 16 verknüpft. Auch die Struktur und Position des Bruchpunkts war aus der Arbeit von Claudia Otto im Labor von Ralf Küppers bekannt. Die erhaltenen

#### 4 Diskussion

Sequenzen erlaubten jedoch nur begrenzt Rückschlüsse, welche Auswirkungen die Translokation auf Proteinebene hatte, also ob z.B. die kodierenden Bereiche der Gene intakt waren und ob produktives Spleißen zu erwarten war.

Die in den Vorarbeiten durchgeführten PCRs und Sequenzierungen zeigten, dass auf genomischer Ebene die kodierende Region des translozierten MYC intakt war. Da der Locus jedoch in einer Konfiguration vorgefunden wurde, in der die Transkription, vom *SOCS1*-Promotor getrieben, in Exon 1 von *SOCS1* beginnen müsste, um dann über den Bruchpunkt hinweg in die Sequenz von *MYC* zu wechseln, war unklar, welche Struktur die reife mRNA haben würde. Beispielsweise waren sowohl der Spleißdonor des Exons 1 von *SOCS1* als auch der Spleißdonor des Exonx 1 von *MYC* intakt, so dass die Exon-Intron-Struktur nicht klar vorhergesagt werden konnte. Da über die Materialsammlung des MMML-Verbundes RNA des Falls vorlag, konnte in der vorliegenden Arbeit die reife mRNA mit Hilfe von vorheriger RT-PCR sequenziert werden. Dies zeigte, dass zwar der erste Spleißdonor (des *SOCS1*-Parts) verwendet wird, jedoch unvorhergesehenerweise nicht der reguläre Spleißakzeptor des Exons 2 von *MYC*, sondern ein kryptischer Spleißakzeptor mitten in der kodierenden Region des *MYC*-Gens. Da dadurch ein Teil der Sequenz des MYC-Proteins verloren geht, war die erste Vermutung, dass dieses Allel von MYC durch die Translokation inaktiviert wurde, also nicht als Onkogen wirken kann. Intensivere Beschäftigung mit der Literatur über MYC-Expression und -Regulation offenbarte jedoch, dass es kürzere MYC-Isoformen (genannt MycS) gibt, die von zwei alternativen Startcodons initiiert werden und vor allem in einigen schnell proliferierenden Zelltypen und Tumorzellen gefunden wurden (Spotts et al., 1997). Andere Arbeiten konnten zeigen, dass diese kürzeren Formen durchaus noch Wachstum und Apoptose stimulieren können, aber durch den Verlust einer Transaktivierungsdomäne nicht auf alle Gene wirken, auf die Vollängen-MYC als Transkriptionsfaktor wirkt (Xiao et al., 1998).

Dies ist für diesen Fall besonders interessant, da das detektierte Spleißereignis einen kryptischen Spleißakzeptor direkt vor den beiden möglichen Startcodons für mycS verwendet. So ist, von dieser reifen mRNA, nur die Translation des verkürz-

#### 4 Diskussion

ten, in seiner Funktion eingeschränkten MycS-Proteins möglich. Dies könnte diesem Lymphom also eine Möglichkeit bieten, das Gleichgewicht der MYC-Isoformen zu Gunsten der MycS-Form zu verändern, wie es in vielen anderen Tumoren beobachtet wurde (Spotts et al., 1997). Obwohl die genauen Effekte einer solchen Verschiebung auf die Genexpression divers sind, ist anzunehmen, dass die Deregulation der betroffenen MYC-Zielgene, vielleicht in Kombination mit weiteren Veränderungen, dem Tumor einen Wachstumsvorteil verschaffen, und auch deswegen diese Translokation klonal selektiert wurde.

Außerdem wurde durch die Translokation offensichtlich der kodierende Bereich von *MYC* von seinem Promotor (und Teilen des 5'-untranslatierten Bereichs) getrennt, an dessen Stelle jetzt *SOCS1*-Sequenzen treten. Auch dies sollte profunde Auswirkungen auf die Expression von *MYC* haben, da ein kompletter Austausch wichtiger regulatorischer Elemente beider Gene stattgefunden hat. Welche genauen Effekte solch eine *MYC*-Expression hat, konnte anhand der vorliegenden Daten und Materialien nicht geklärt werden. Es kann nur spekuliert werden, dass diese Deregulation vorteilhaft für den Zellklon war, der sie erworben hat, da er sich offenbar in der Tumorevolution durchgesetzt hat.

Auf dem durch die Translokation entstandenen der8-Chromosom war aus Vorarbeiten die Lage und Umgebung des Bruchpunkts bekannt. Da beiderseites des Bruchpunkt jedoch nur wenige hundert Basen sequenziert wurden, war auf der *SOCS1*-Seite nicht bekannt, ob die kodierende Sequenz intakt war. Da der Bruchpunkt außerdem mitten in Exon 1 von *MYC* liegt und dadurch kein Spleißdonor vorhanden ist, war unklar, ob Spleißen stattfindet und welchen Effekt fehlendes Spleißen auf die Expression des translozierten *SOCS1* haben könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen mit passenden Primern versucht, den kodierenden Bereich und die Spleißstellen des translozierten *SOCS1*-Allels zu amplifizieren.

Durch die repetitive und GC-reiche Sequenz dieses Gens erschwert, ist dies nur für den vorderen Teil der kodierenden Region gelungen. Dies reichte jedoch aus, um festzustellen, dass dieses Allel inaktiviert wurde: neben einer Deletion des Spleiß-

#### 4 Diskussion

akzeptors mit unklarer Relevanz für die mRNA wurde vor allen Dingen eine Duplikation innerhalb des kodierenden Bereichs festgestellt, die zu einer Leserasterverschiebung führt. Das dadurch entstandene vorzeitige Stopcodon kurz nach der Duplikation erlaubt nur die Ausprägung eines Proteins, dem neben dem Einschub durch die Duplikation in die SH2-Domäne die letzten 65 von insgesamt 211 Aminosäuren der *SOCS1*-Sequenz fehlen, was die komplette SOCS-Box-Domäne deletiert. Somit ist anzunehmen, dass das exprimierte Protein nicht mehr die Funktionen von *SOCS1* erfüllen kann, also dieses *SOCS1*-Allel inaktiviert wurde.

Obwohl für *SOCS1* teilweise Haploinsuffizienz in der Literatur diskutiert wird, stellte sich die Frage, in welchem Zustand sich das andere *SOCS1*-Allel befand. Mit den bereits für die Untersuchung der Translokation etablierten Primern war es möglich, das nicht-translozierte Allel zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren. Nach dieser PCR wurden interessanterweise zwei Produktbanden im Gel sichtbar: eine mit der erwarteten Größe für Wildtyp-*SOCS1* und eine, die etwa 700 Basen kürzer erschien. Die Sequenzierung bestätigte, dass es sich bei der im Gel langsameren Bande um den Wildtyp handelte. Die andere, schnellere Bande erwies sich als stark mutierte *SOCS1*-Version, in der Veränderungen durch diverse Basenaustausche und Deletionen feststellbar waren.

Das Vorfinden von zwei Versionen von nicht-transloziertem *SOCS1* lässt sich dadurch erklären, dass in den vom MMML verwendeten Tumorsektionen immer auch Nichttumorzellen enthalten sind, z.B. Stromazellen oder infiltrierende Lymphozyten. Diese Zellen sollten ein Genom in Keimbahnkonfiguration enthalten, also zwei Wildtypallele von *SOCS1* aufweisen, die dann in der PCR ebenso amplifiziert und detektierbar gemacht werden wie das mutierte Allel der Tumorzellen. Diese Beobachtung eignet sich im vorliegenden Fall auch, den somatischen Ursprung der *SOCS1*-Mutationen im Lymphomklon abzusichern.

Die auf dem nicht-translozierten Allel vorgefundenen Veränderungen lassen nur den Schluß zu, dass auch dieses inaktiviert wurde: Schon die Deletion des Spleißakzeptors des zweiten Exons würde die Entstehung von Wildtyp-mRNA verhindern.

#### 4 Diskussion

Außerdem wurde das Startcodon durch einen Basenaustausch verändert, so daß keine Initiation der Translation an der korrekten Position zu erwarten ist. Diverse weitere Basenaustausche würden teilweise zu einer Veränderung der kodierten Aminosäure führen, sofern überhaupt noch Translation im korrekten Leseraster stattfindet. Das Ende des kodierenden Bereichs inklusive des Stopcodons und Teilen des 3'-untranslatierten Bereichs wurde deletiert.

Die Masse der vorgefundenen Veränderungen in beiden *SOCS1*-Allelen des Lymphoms wirkt auf den ersten Blick verwunderlich. Durch zufällige Mutationen, die dann in der Tumorentwicklung evolutionär selektiert werden, sollte nur eine inaktivierende Mutation pro Allel eingeführt werden können. Ist das Genprodukt erst einmal funktionslos, bieten weitere Mutationen keinen selektiven Vorteil mehr, sollten also nicht häufiger detektierbar sein als zufällige Mutationen im Genom, die sich selektiv neutral verhalten. Das Auffinden von mindestens drei potentiell zerstörerischen Mutationen (Spleißakzeptor-Deletion, Ersetzung des Startcodons und Deletion des Endes des kodierenden Bereichs; plus Aminosäureaustausche, deren Relevanz für die Proteinfunktion unklar ist) auf dem nicht-translozierten Allel ist also bemerkenswert. Die im Kontext des DLBCL plausibelste Erklärung ist die gezielte Erhöhung der Mutationsfrequenz einiger Gene durch aberrante somatische Hypermutation. Bei einigen DLBCL konnte gezeigt werden, dass die Maschinerie der Hypermutation während der Tumorentwicklung auch außerhalb der Keimzentrums Umgebung weiterhin aktiv bleibt (Pasqualucci et al., 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Maschinerie nicht nur die Ig-Gene mutiert, sondern mit niedrigerer Effizienz auch Mutationen in andere Gene einführt (Pasqualucci et al., 2001). Solche Mutationen, die vorteilhaft für die klonale Entwicklung sind, werden dann selektiert. Da es für ein Gen ausreicht, dass es exprimiert wird, um ein Ziel für aberrante somatische Hypermutation zu sein, können sich im Laufe der Klonentwicklung diverse Mutationen in den betroffenen Genen ansammeln, solange sie nicht die Transkription behindern.

Die somatische Hypermutation ist auch ein möglicher Mechanismus für die Bildung der detektierten Translokation. Sowohl *SOCS1* als auch *MYC* sind als Ziele ab-

#### 4 Diskussion

erranter Hypermutation beschrieben worden (Pasqualucci et al., 2001; Mottok et al., 2009; Yamane et al., 2011). Im Zuge der Hypermutation und der nachfolgenden Reparaturprozesse kann es zu Doppelstrangbrüchen kommen (Goossens et al., 1998). Liegen zwei oder mehr solcher Strangbrüche in derselben Zelle vor, kann es dabei zur Bildung von Translokationen kommen, indem die „falschen“ Chromosomenbruchstücke miteinander verbunden werden.

Zusammenfassend konnte im DLBCL-Fall MPI-248 somit nachgewiesen werden, dass beide Allele des Tumorsuppressors *SOCS1* inaktiviert wurden. Ein Allel wurde transloziert. Durch diese Translokation wurde außerdem die Expression von *MYC*, eines Gens direkt am Bruchpunkt auf dem Translokationspartner, im Gleichgewicht seiner Isoformen gestört, zusätzlich zur möglichen Deregulation durch die vorliegende Promotorersetzung. Obwohl die zeitliche Reihenfolge der beobachteten Mutationen unbekannt ist, lässt sich vermuten, dass die Translokation in diesem Fall gleichzeitig ein Allel von *SOCS1* inaktiviert als auch die Expression von *MYC* dereguliert hat, was dem Tumor auf diese Weise vorteilhafte Veränderungen in zwei wichtigen zellulären Signalwegen ermöglichte. Alle vorgefundenen Veränderung lassen sich gut durch aberrante somatische Hypermutation in diesem Tumorklon erklären.

## 5 Zusammenfassung

Durch die groß angelegte Materialsammlung des MMML-Verbundes war es in der vorliegenden Arbeit möglich, umfangreiche Kollektive von Tumorentitäten mit hochauflösenden SNP-Chips zu untersuchen. Gleichzeitig erlaubte die Vielzahl an vorliegenden Verbunddaten über diese Tumorfälle eine umfassende Charakterisierung und Einordnung der gefundenen Veränderungen.

Bei der Analyse der 39 mBL konnte die Bedeutung der MYC-Deregulation in dieser Lymphomgruppe bestätigt werden. Viele der von Deletionen oder Zugewinnen betroffenen Gene zeigen Anknüpfungspunkte an das MYC-Signal, das in BLs eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielt. Der Vergleich mit der Genexpression zeigte, dass genomische Kopienzahlveränderungen bei einer Vielzahl von Genen einen Gendosiseffekt bewirken, der pathogenetisch relevant sein kann.

Innerhalb des DLBCL-Kollektivs konnten ebenfalls umfangreiche Listen von Kandidatengenen mit einer potentiellen Rolle in der Tumorentwicklung erstellt werden. Die Klassifizierung in Subgruppen mit Hilfe der Genexpression erlaubte die Detektion von gemeinsamen und distinkten Veränderungen in ABC-, GCB- und Typ3-DLBCLs.

*TNFSF7* und *TNFSF9* sind von rekurrenten Verlusten in einigen der untersuchten Tumore betroffen, zeigen jedoch in keinem untersuchten heterozygot deletierten Lymphom Mutationen. Dies legt einen Haploinsuffizienzeffekt nahe, der für eine Tumorsuppressorfunktion dieser beiden Faktoren sprechen würde.

Im Fall MPI-248 konnte die aus Verbundarbeiten bereits bekannte Translokation zwischen *SOCS1* und *MYC* weiter charakterisiert werden. Es konnte aufgezeigt werden, dass in Fall 248 beide Allele von *SOCS1* inaktiviert sind, was vermutlich

## 5 Zusammenfassung

durch fortlaufende Hypermutation dieses Gens innerhalb des Tumorklons geschehen ist. Das translozierte *MYC*-Allel zeigt eine veränderte Isoformen-Ausprägung seiner mRNA, die dem Tumor Wachstumsvorteile gewähren könnte.

Die vorliegende Arbeit konnte somit einige neue Kandidatengene bestimmen, die in der Pathogenese dieser malignen Lymphome eine Rolle spielen, und damit das Verständnis der der Lymphomentwicklung zugrunde liegenden Mechanismen verbessern.

## 6 Ausblick

Die im MMML-Verbund vorliegenden Datensätze zu den einzelnen Tumorfällen erlauben in Zukunft eine tiefergehende Auswertung zu einzelnen Kandidatengen. Noch nicht erfolgt ist beispielsweise die Aggregation der vorliegenden Mutations- und Kopienzahldaten zu den einzelnen Tumorfällen, um Veränderungen zu finden, die sich gegenseitig ausschliessen oder begünstigen, da sie z.B. an verschiedenen Stellen den gleichen Signalweg betreffen. Dies könnte einen Einblick in die Selektionsprozesse geben, denen einzelne Zellfunktionen in der Tumorentwicklung unterworfen sind.

Bei den rekurrenten Deletionen der DLBCLs könnte es bei einigen kleineren Bereichen mit wenigen Kandidatengen (und womöglich überlappenden homozygoten Deletionen) interessant sein, heterozygot deletierte Fälle auf inaktivierende Mutationen auf dem verbliebenen Allel zu untersuchen, um so das Zielgen zu bestätigen. Zu diesem Zweck könnten auch ältere Verbundfälle ohne SNP-Chip-Daten, aber mit vorliegender CGH-Analyse und überlappenden Veränderungen eingeschlossen werden.

Eine eventuelle onkogene oder tumorsupprimierende Wirkung von Kandidatengen könnte auch in geeigneten Zellmodellen untersucht werden, indem die Expression der Zielgene künstlich herab- oder heraufgesetzt wird, beispielsweise über siRNAs oder die Expression aus viralen Konstrukten heraus. Diese Studien könnten aufzeigen, ob die im Kollektiv vorgefundenen Veränderungen eine funktionale Relevanz für die Zelllinie haben, indem sie z.B. Überleben, Wachstum, Stoffwechsel oder das Verhalten auf zellextrinsische Signale beeinflussen.

# **7 Anhänge**

## **7.1 Tabellen der starken Kopienzahlveränderungen in BLs**

## 7 Anhänge

**Tabelle 7.1.1:** Detektierte Amplifikationen in den BLs

Fall	Chromosom	Startbase	Stopbase	Überlappung CNPs [%]
MPI-018	1	149.770.061	151.758.544	7,52
MPI-018	1	155.151.979	156.150.021	4,42
MPI-018	1	156.301.926	181.026.453	20,81
MPI-018	3	197.185.030	199.505.740	100
MPI-018	10	61.547.712	62.700.755	0
MPI-018	10	63.250.873	63.655.389	0
MPI-018	10	64.459.413	64.904.559	15,09
MPI-018	17	18.857.962	19.455.348	28,95
MPI-018	17	19.500.060	20.403.550	3,53
MPI-018	21	26.736.201	28.137.133	18,08
MPI-018	21	28.375.852	29.161.798	1,44
MPI-048	13	90.766.136	90.843.580	0
MPI-048	18	49.301.604	55.369.820	11
MPI-071	18	46.018.071	46.199.252	16,22
MPI-071	18	49.015.687	55.260.238	11,01
MPI-078	11	117.008.604	118.321.366	0
MPI-078	12	40.185.579	46.868.499	14,01
MPI-078	14	76.056.803	78.134.215	31,76
MPI-078	14	80.033.917	81.769.270	9,43
MPI-078	14	86.596.899	89.467.100	7,87
MPI-080	2	57.302.517	57.361.887	100
MPI-089	1	238.321.944	238.338.426	0
MPI-089	16	84.838.392	84.849.716	100
MPI-095	10	1.001.958	1.115.769	0
MPI-095	11	60.549.760	60.586.836	100
MPI-095	12	67.278.530	68.393.146	0
MPI-095	13	94.338.710	96.975.940	0,67
MPI-171	1	166.220.861	166.345.649	0
MPI-171	1	171.851.736	171.863.619	0
MPI-532	3	196.743.818	199.505.740	100
MPI-532	11	65.015.493	67.383.143	37,79
MPI-532	11	71.399.055	73.405.476	4,74
MPI-532	11	106.658.439	108.075.704	45,25
MPI-532	11	109.909.301	111.443.258	0
MPI-532	11	112.720.334	113.364.827	0
MPI-532	18	41.456.402	44.041.120	5,23
MPI-532	18	49.999.395	53.164.072	10,18
MPI-532	18	64.827.828	65.617.861	88,35

**Tabelle 7.1.2:** Homozygote Deletionen in den BLs

Fall	Chromosom	Startbase	Stopbase	Überlappung CNPs [%]
MPI-001	22	21.389.135	21.576.156	100
MPI-003	14	105.071.276	105.238.706	100
MPI-006	7	38.011.359	38.176.607	100
MPI-006	9	19.990.277	21.880.326	11,65
MPI-006	9	21.990.770	22.402.948	0
MPI-006	14	105.553.453	106.142.730	100
MPI-016	22	21.276.793	21.576.156	100
MPI-018	10	98.407.920	98.587.392	0
MPI-018	17	51.512.358	51.532.981	100
MPI-018	22	21.405.412	21.582.785	100
MPI-032	1	23.457.834	23.714.049	0
MPI-048	22	20.711.025	21.576.156	100
MPI-048	X	636.217	890.087	100
MPI-071	14	105.399.872	105.988.336	100
MPI-081	8	12.040.126	12.446.597	100
MPI-082	22	21.105.150	21.576.156	100
MPI-082	X	46.975.369	47.150.006	0
MPI-085	14	105.399.872	105.988.336	100
MPI-095	22	21.105.150	21.576.156	100
MPI-101	6	29.957.598	30.023.128	100
MPI-101	9	43.618.057	64.197.638	100
MPI-114	6	79.019.345	79.109.332	100
MPI-114	X	22.718.153	22.793.958	100
MPI-171	3	75.476.955	75.647.561	100
MPI-528	18	62.053.230	62.063.122	100
MPI-528	22	21.020.620	21.576.156	100
MPI-529	1	23.535.004	23.673.235	0
MPI-529	22	21.083.648	21.576.156	100
MPI-532	6	29.980.936	30.023.128	100
MPI-532	22	21.058.712	21.576.156	100

## 7.2 Tabellen der Veränderungen im 2. Kollektiv (DLBCLs)

### 7.2.1 Alle Lymphome

**Tabelle 7.2.1:** Rekurrente Zugewinne in allen Lymphomen des 2. Kollektivs

Zytoband	Genomische Position	q-Wert	Anzahl
1p22.3	85.401.156-85.520.171	0,085238	8
1q31.3	195.198.009-195.638.957	1,2427E-014	49
2p15	58.298.652-61.431.058	5,6507E-010	33
3p24.3	18.186.331-19.018.731	0,0045853	24
3q27.3	187.713.445-187.781.082	3,4837E-008	35
5p13.2	7.111.694-37.602.816	0,010399	20
6p24.2	11.605.323-11.687.078	0,00084336	28
7p12.2	49.937.451-50.142.671	6,2115E-012	46
7q21.13	90.069.869-90.323.787	1,0082E-009	42
7q31.1	107.361.469-107.664.905	3,9376E-007	37
8q24.3	145.984.730-146.274.826	0,0030132	24
9p24.1	5.278.708-5.486.917	1,4666E-007	26
9p13.2	37.267.832-37.416.151	0,0019675	23
11p13	34.983.220-35.215.766	3,2041E-015	39
11q23.3	117.690.557-117.735.473	2,409E-007	33
11q25	134.408.261-134.452.384	2,9391E-006	33
12p13.33	1-95.915	8,4168E-011	47
12q12	43.358.611-45.047.590	5,4495E-008	40
13q31.3	90.688.608-90.897.077	3,9376E-007	31
18q23	75.983.560-76.117.153	8,8686E-026	51
19q13.43	63.712.862-63.811.651	6,2115E-012	37
20p13	1.225.158-1.847.766	0,21813	23
21q22.3	46.734.952-46.944.323	0,0019675	28
Xq28	149.903.639-154.824.264	1,1957E-011	34

## 7 Anhänge

**Tabelle 7.2.2:** Rekurrente Verluste in allen Lymphomen des 2. Kollektivs

Zytoband	Genomische Position	q-Wert	Anzahl
1p36.32	3.577.747-3.910.009	1,0901E-012	25
1p13.1	117.089.057-117.271.767	0,00034317	17
1q43	236.039.701-236.823.638	0,020968	12
2q22.3	145.612.299-146.124.383	0,10339	9
3p26.1	4.397.400-4.541.788	0,020968	12
3p21.31	48.561.702-49.978.635	0,00066398	17
3p14.2	60.385.747-60.510.770	8,9001E-005	17
4q21.22	82.346.683-83.773.027	0,0040977	14
4q34.2	177.691.681-177.818.103	0,033513	11
5q14.3	90.645.625-91.271.117	0,050103	10
6p21.32	32.406.921-32.432.794	0,0012403	15
6q21	106.718.399-106.790.568	3,6716E-027	45
6q23.3	137.740.308-137.860.303	1,0933E-027	46
7q11.22	66.775.858-66.951.121	0,0022778	16
7q11.22	69.967.743-71.155.717	0,0012403	16
8p23.2	2.784.654-6.259.545	1,0459E-007	22
8q12.3	61.842.504-64.475.160	0,0012403	12
9p21.3	21.944.954-21.981.751	6,376E-056	38
9q22.1	87.733.006-88.524.319	0,0040977	14
10p14	11.895.606-12.443.033	0,020968	12
10q23.31	90.544.398-91.007.975	1,0178E-005	17
11p11.2	46.471.581-46.699.710	0,10339	8
11q24.3	128.680.224-129.857.754	0,14497	9
12p13.2	11.802.482-12.099.275	0,050103	11
13q14.2	49.502.619-49.621.662	4,8208E-007	20
13q33.3	105.314.456-106.524.861	0,0072192	11
14q32.12	90.940.431-91.811.866	0,0012403	15
15q15.1	39.476.525-39.607.259	1,446E-022	38
16q22.1	67.163.841-67.669.898	4,398E-005	19
17p13.1	8.951.471-9.593.223	3,4285E-015	29
18p11.31	7.033.336-7.411.362	0,0012403	14
18q22.3	68.681.692-71.332.900	0,072405	12

## 7 Anhänge

Zytoband	Genomische Position	q-Wert	Anzahl
19p13.3	6.441.180-7.811.018	2,883E-018	28
19q13.32	52.785.168-53.380.179	0,012404	15
20q13.2	49.718.856-50.272.680	0,012404	12
22q11.21	16.328.318-16.474.988	0,050103	12
22q13.31	43.777.620-44.248.555	0,020968	11
Xp22.33	290.581-3.189.390	4,852E-033	45

## 7.2.2 ABC-DLBCLs

Tabelle 7.2.3: Rekurrente Zugewinne in 49 ABC-DLBCLs

Zytoband	Genomische Position	q-Wert	Anzahl
1p22.3	85.401.156-85.520.171	0,022466	4
1q31.3	195.082.432-195.638.957	0,00013172	15
3p25.3	11.119.851-11.855.759	0,0023412	18
3q27.3	187.713.445-187.781.082	3,9417E-008	26
6p21.2	40.028.653-41.419.344	0,063818	14
7p12.2	49.701.582-50.142.671	0,00021907	19
9p24.1	5.278.708-5.486.917	0,00082184	14
11p13	34.983.220-35.215.766	7,6611E-010	19
11q25	134.408.261-134.452.384	0,010668	15
12p13.33	1-138.614	0,16698	11
18q23	75.983.560-76.117.153	1,4221E-014	32
19q13.43	63.522.074-63.811.651	0,00082184	16
Xq28	145.785.625-154.824.264	0,00028044	13

**Tabelle 7.2.4:** Rekurrente Verluste in 49 ABC-DLBCLs

Zytoband	Genomische Position	q-Wert	Anzahl
1p35.3	28.288.816-29.257.721	0,028792	8
1p13.3	107.888.625-108.130.593	0,02343	8
1q43	236.039.701-236.823.638	0,054677	8
3p26.1	1-10.056.544	0,11484	9
4q21.22	82.346.683-83.773.027	0,11484	7
5q14.3	88.039.160-90.428.376	0,01898	7
6p21.32	32.406.921-32.822.760	0,0037074	10
6q21	106.182.258-106.362.128	8,152E-012	20
6q23.3	137.408.105-138.356.891	7,9875E-011	21
7q11.22	69.967.743-71.155.717	0,043645	9
8p21.3	20.564.603-23.217.927	0,0099916	9
9p21.3	21.944.954-21.981.751	1,8455E-039	23
9q22.1	87.733.006-88.524.319	0,23539	7
10p14	11.620.361-12.443.033	0,067803	8
12p13.2	11.802.482-12.099.275	0,0021736	10
13q14.2	49.502.619-49.621.662	0,01898	6
14q32.12	90.698.303-91.811.866	0,012012	9
15q15.1	38.831.012-39.913.282	4,292E-009	17
16q22.1	67.163.841-68.926.409	0,043645	9
17p13.1	7.233.451-8.499.452	2,6517E-007	13
18p11.31	2.648.678-3.189.306	0,13815	6
19p13.3	4.014.068-4.792.150	0,00013205	14
19q13.32	51.435.086-53.881.226	0,16001	9
22q13.31	43.777.620-44.248.555	0,012012	8
Xp22.33	290.581-3.189.390	1,2549E-009	16

## 7.2.3 GCB-DLBCLs

Tabelle 7.2.5: Rekurrente Zugewinne in 79 GCB-DLBCLs

Zytoband	Genomische Position	q-Wert	Anzahl
1q23.3	157.712.857-159.253.473	1,7699E-006	28
2p15	58.298.652-61.431.058	3,7641E-009	26
3q28	189.301.166-189.883.559	0,12678	12
5q21.1	97.942.890-98.954.389	0,18906	11
6p21.32	32.444.166-32.822.760	0,03383	15
7p12.2	49.937.451-50.142.671	2,8885E-005	23
7q21.13	90.069.869-90.619.017	3,7933E-006	25
8q24.3	145.984.730-146.274.826	0,0095267	16
9p24.2	2.746.757-2.850.772	0,0042421	9
11p13	34.983.220-35.215.766	0,0025516	16
11q23.3	117.690.557-117.735.473	2,8885E-005	18
12p13.33	1-95.915	9,6865E-008	34
12q12	43.358.611-45.047.590	1,5665E-007	31
12q24.33	130.121.743-131.818.476	9,1815E-005	25
13q31.3	90.688.608-90.897.077	6,4159E-006	20
17q11.2	25.960.930-26.258.630	0,06865	10
18q21.2	51.049.127-51.418.739	1,8628E-005	16
19q13.43	63.712.862-63.811.651	0,00022169	14
21q21.3	28.651.741-28.837.096	0,0032091	18
Xq26.2	129.034.826-134.887.061	1,422E-005	18

## 7 Anhänge

**Tabelle 7.2.6:** Rekurrente Verluste in 79 GCB-DLBCLs

Zytoband	Genomische Position	q-Wert	Anzahl
1p36.32	3.577.747-3.910.009	1,4443E-006	14
1p21.2	101.675.879-101.760.837	0,13157	7
3p21.31	48.561.702-49.978.635	0,0032308	11
4q34.2	177.691.681-177.818.103	0,0032308	10
6q15	90.760.002-90.787.158	2,3733E-007	16
6q23.3	137.740.308-137.860.303	2,6859E-009	21
7q11.22	66.572.216-66.951.121	0,17144	7
8p21.2	23.629.224-24.971.008	0,0092304	9
8q12.3	61.842.504-65.524.162	0,0064801	7
9p21.3	21.920.148-21.976.217	6,3633E-008	11
10q23.31	90.544.398-91.007.975	3,1134E-006	13
11q24.3	128.680.224-129.857.754	0,0092304	9
13q13.3	35.262.792-35.711.521	0,00018185	11
13q33.3	105.314.456-106.524.861	0,011042	8
14q32.32	101.584.769-102.682.314	0,13157	7
15q15.1	39.476.525-39.607.259	3,1419E-008	18
16q13	55.329.955-56.097.011	0,17144	6
17p13.3	2.932.536-3.109.056	2,5067E-005	13
18q22.3	68.681.692-71.332.900	0,057007	9
19p13.3	6.441.180-7.811.018	3,4059E-010	13
19q13.42	58.781.765-59.202.528	0,17144	6
Xp22.33	1-1.499.465	1,1115E-013	24

## 7.2.4 DLBCL, „Typ III“

**Tabelle 7.2.7:** Rekurrente Zugewinne und Verluste in 20 „Typ III“-DLBCLs

Art	Zytoband	Genomische Position	q-Wert	Anzahl
Zugewinn	1q32.2	202.488.142-206.962.090	0,11561	6
Zugewinn	3q13.12	108.851.651-109.471.304	0,19037	6
Zugewinn	7p14.2	36.176.270-37.764.156	0,24502	4
Zugewinn	11q23.1	110.677.390-111.067.901	0,001857	7
Zugewinn	18q23	75.983.560-76.117.153	0,00064356	7
Zugewinn	19q13.43	63.522.074-63.811.651	0,0033658	7
Verlust	1p36.32	2.450.788-3.577.745	0,021626	3
Verlust	3p14.2	60.353.173-60.532.891	0,2444	4
Verlust	6q22.31	119.927.181-120.944.077	0,021626	6
Verlust	9p21.3	21.806.215-22.057.275	9,4313E-006	5
Verlust	16q22.1	67.163.841-68.205.995	0,17543	4
Verlust	19p13.12	15.186.311-15.614.422	0,19749	4
Verlust	Xp22.33	1-3.189.390	0,021626	6

## 7.2.5 Starke Kopienzahlveränderungen im 2.Kollektiv

Tabelle 7.2.8: Homozygote Verluste im 2. Kollektiv

Fall	Chr.	Startbase	Stopbase	Klassifikationen		Überlappung
				mBL	GCB/ABC	CNPs
MPI-014	9	21.818.110	22.031.998	non-mBL	ABC	0
MPI-014	22	21.276.793	21.576.156	non-mBL	ABC	100
MPI-024	19	63.555.07	6.847.380	intermediate	GCB	64,86
MPI-026	9	21.850.428	22.194.445	intermediate	ABC	0
MPI-031	6	32.556.394	32.870.462	non-mBL	ABC	43,24
MPI-031	6	168.970.646	169.582.666	non-mBL	ABC	13,33
MPI-031	8	137.735.555	137.923.702	non-mBL	ABC	100
MPI-031	9	23.849.980	25.182.085	non-mBL	ABC	37,68
MPI-031	15	1	19.827.281	non-mBL	ABC	100
MPI-046	22	21.050.798	21.576.156	intermediate	GCB	100
MPI-099	12	1.479.403	1.518.630	intermediate	GCB	0
MPI-110	14	105.553.453	106.142.730	non-mBL	ABC	100
MPI-113	19	6.355.507	6.596.178	non-mBL	GCB	88,89
MPI-126	8	122.629.951	123.269.909	intermediate	ABC	8,11
MPI-126	9	21.944.953	23.646.538	intermediate	ABC	7,58
MPI-131	5	123.856.467	124.083.944	intermediate	ABC	0
MPI-131	11	46.289.469	46.699.711	intermediate	ABC	0
MPI-131	18	31.018.661	31.358.982	intermediate	ABC	0
MPI-162	4	153.626.548	154.007.783	intermediate	GCB	0
MPI-168	9	21.204.877	25.667.257	non-mBL	ABC	22,26
MPI-295	19	59942897	60.040.503	non-mBL	GCB	100

## 7 Anhänge

Fall	Chr.	Startbase	Stopbase	Klassifikationen		Überlappung
				mBL	GCB/ABC	CNPs
MPI-319	6	31.364.646	31.636.669	non-mBL	ABC	100
MPI-319	9	21.981.752	22.249.421	non-mBL	ABC	0
MPI-325	19	6.355.507	6.847.380	intermediate	GCB	64,86
MPI-404	1	3.643.337	3.910.010	non-mBL	GCB	34,78
MPI-404	10	89.676.489	91.049.139	non-mBL	GCB	30,94
MPI-689	8	61.842.503	65.524.163	non-mBL	GCB	9,44
MPI-689	19	6.441.179	7.035.307	non-mBL	GCB	78,95
MPI-689	20	23.088.535	23.554.393	non-mBL	GCB	5,33
MPI-690	9	21.880.326	25.515.914	intermediate	GCB	21,34
MPI-691	22	20.823.690	21.576.156	intermediate	GCB	100
MPI-698	9	21.818.110	22.194.445	intermediate	GCB	0
MPI-731	6	92.249.709	92.503.882	non-mBL	ABC	0
MPI-731	9	21.036.674	23.330.423	non-mBL	ABC	15,22
MPI-734	9	21.920.147	22.108.102	non-mBL	ABC	0
MPI-737	9	21.880.326	21.981.752	non-mBL	ABC	0
MPI-745	9	21.850.428	22.582.589	non-mBL	ABC	0
MPI-755	3	4.397.399	4.632.490	intermediate	GCB	0
MPI-755	13	31.506.479	31.714.366	intermediate	GCB	0
MPI-755	13	31.863.764	33.102.061	intermediate	GCB	0
MPI-755	13	33.505.585	35.711.522	intermediate	GCB	13,9
MPI-767	9	21.920.147	22.166.961	intermediate	GCB	0
MPI-769	6	32.406.920	32.822.761	non-mBL	ABC	68,33
MPI-791	9	20.986.709	21.121.559	non-mBL	ABC	0
MPI-791	9	21.880.326	22.846.899	non-mBL	ABC	7,89

## 7 Anhänge

Fall	Chr.	Startbase	Stopbase	Klassifikationen		Überlappung
				mBL	GCB/ABC	CNPs
MPI-791	X	9.078.777	9.400.882	non-mBL	ABC	44,44
MPI-796	19	6.355.507	6.847.380	non-mBL	GCB	64,86
MPI-801	2	209.941.749	209.947.165	non-mBL	GCB	0
MPI-802	7	100.531.443	100.705.312	non-mBL	GCB	100
MPI-806	13	47.962.967	49.621.663	non-mBL	ABC	31,31
MPI-813	6	90.760.001	91.076.890	non-mBL	GCB	0
MPI-815	3	75.476.420	75.647.561	non-mBL	GCB	100
MPI-822	22	21.031.117	21.576.156	non-mBL	ABC	100
MPI-832	22	23.983.115	24.244.331	non-mBL	ABC	100
MPI-840	1	2.389.972	4.313.087	non-mBL	unclassified	31,61
MPI-840	22	20.994.657	21.576.156	non-mBL	unclassified	100
MPI-849	9	21.255.259	23.470.786	intermediate	unclassified	15,25
MPI-855	6	104.005.863	106.362.129	non-mBL	ABC	18,38
MPI-855	14	105.170.875	106.142.730	non-mBL	ABC	100
MPI-855	17	3.526.607	12.017.794	non-mBL	ABC	18,53
MPI-856	9	21.944.953	22.057.276	non-mBL	ABC	0
MPI-858	22	21.050.798	21.576.156	non-mBL	ABC	100
MPI-876	3	75.476.420	75.779.859	non-mBL	GCB	100
MPI-881	6	106.182.257	106.790.569	non-mBL	ABC	4,92
MPI-881	9	21.777.848	22.031.998	non-mBL	ABC	0
MPI-902	1	2.505.420	3.337.753	non-mBL	unclassified	43,37

7 Anhänge

**Tabelle 7.2.9:** Detektierte Amplifikationen im 2. Kollektiv

Fall	Chr.	Startbase	Stopbase	Klassifikation		Überlappung
				mBL	GCB/ABC	CNPs
MPI-008	3	187713444	187781083	non-mBL	ABC	0
MPI-014	18	40294112	40345033	non-mBL	ABC	0
MPI-031	3	187713444	187781083	non-mBL	ABC	0
MPI-031	11	30948192	31376964	non-mBL	ABC	100
MPI-031	11	32680527	33837472	non-mBL	ABC	10,87
MPI-031	11	34992974	36915582	non-mBL	ABC	72,41
MPI-039	7	90069868	91383439	non-mBL	GCB	5,75
MPI-039	7	93369755	95665085	non-mBL	GCB	15,83
MPI-039	7	101685455	105270456	non-mBL	GCB	15,16
MPI-074	1	191645669	196768447	non-mBL	ABC	26,16
MPI-074	1	202075305	202359730	non-mBL	ABC	0
MPI-074	3	106064834	107981907	non-mBL	ABC	32,11
MPI-074	19	10055884	10230086	non-mBL	ABC	100
MPI-110	18	15092421	17579480	non-mBL	ABC	0
MPI-110	18	36841937	76117153	non-mBL	ABC	17,48
MPI-122	9	4783897	5555601	non-mBL	GCB	23
MPI-130	11	34943087	35739486	non-mBL	ABC	52,44
MPI-130	11	42027329	42701654	non-mBL	ABC	0
MPI-131	18	15092421	24662715	intermediate	ABC	8,05
MPI-131	18	35956480	36043292	intermediate	ABC	0
MPI-131	18	44442247	51852839	intermediate	ABC	5,78
MPI-131	18	52159141	76117153	intermediate	ABC	25,06

## 7 Anhänge

Fall	Chr.	Startbase	Stopbase	Klassifikation		Überlappung
				mBL	GCB/ABC	CNPs
MPI-133	11	35041168	35324715	non-mBL	ABC	79,03
MPI-162	10	53217408	53297839	intermediate	GCB	33,33
MPI-162	21	22680455	22735539	intermediate	GCB	0
MPI-187	3	196602407	198162271	intermediate	GCB	100
MPI-194	17	40872185	41015664	non-mBL	ABC	100
MPI-325	13	90688607	90957444	intermediate	GCB	0
MPI-367	9	1	6158335	non-mBL	GCB	34,35
MPI-379	9	1	5586111	non-mBL	GCB	36,52
MPI-379	9	37222221	43617278	non-mBL	GCB	23,78
MPI-407	12	43064862	46788841	intermediate	GCB	22,09
MPI-410	18	15092421	76117153	non-mBL	GCB	16,92
MPI-688	1	84044622	86348529	non-mBL	ABC	0
MPI-688	9	1764037	1937653	non-mBL	ABC	44
MPI-688	9	4411056	7253576	non-mBL	ABC	26,74
MPI-689	2	58077246	60288813	non-mBL	GCB	96,11
MPI-690	11	68831868	69484842	intermediate	GCB	15,28
MPI-691	6	35033349	39048774	intermediate	GCB	24,5
MPI-691	6	40638004	51033290	intermediate	GCB	15,47
MPI-700	15	19464910	20343286	intermediate	GCB	100
MPI-714	11	108980770	109501154	non-mBL	unclassified	0
MPI-714	11	109799063	111356416	non-mBL	unclassified	1,75
MPI-732	2	60549307	61982989	intermediate	GCB	68,67
MPI-766	3	111185623	112141868	non-mBL	GCB	24,56
MPI-766	3	113050584	113879876	non-mBL	GCB	1,03

## 7 Anhänge

Fall	Chr.	Startbase	Stopbase	Klassifikation		Überlappung
				mBL	GCB/ABC	CNPs
MPI-766	11	18884861	18927562	non-mBL	GCB	100
MPI-767	13	89960370	96003719	intermediate	GCB	8,07
MPI-780	9	114153914	114177309	non-mBL	GCB	100
MPI-781	9	2150378	2431593	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	2746756	2850773	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	6277142	6397799	non-mBL	GCB	30
MPI-781	9	10332841	10594375	non-mBL	GCB	57,14
MPI-781	9	12507596	12600410	non-mBL	GCB	100
MPI-781	9	13845908	13933319	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	21525799	21818110	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	22474702	22710921	non-mBL	GCB	37,5
MPI-781	9	22754293	22927343	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	28072946	28166868	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	29724029	29877375	non-mBL	GCB	57,14
MPI-781	9	30543329	30806505	non-mBL	GCB	10
MPI-781	9	32922194	33054336	non-mBL	GCB	18,18
MPI-781	9	34098324	34319110	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	36365709	36580688	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	73344611	73537083	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	75836877	76002013	non-mBL	GCB	33,33
MPI-781	9	88258614	88483520	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	103055050	103252765	non-mBL	GCB	0
MPI-781	9	110891000	111084976	non-mBL	GCB	0
MPI-783	2	59377105	61431059	intermediate	GCB	98,99

## 7 Anhänge

Fall	Chr.	Startbase	Stopbase	Klassifikation		Überlappung
				mBL	GCB/ABC	CNPs
MPI-799	2	59722275	63924511	non-mBL	GCB	69,03
MPI-799	17	21437192	26258631	non-mBL	GCB	32,54
MPI-799	17	56250979	57222011	non-mBL	GCB	0
MPI-799	17	58891134	60467052	non-mBL	GCB	22,83
MPI-812	11	34546067	36915582	non-mBL	ABC	71,32
MPI-812	11	40004992	40841086	non-mBL	ABC	39,68
MPI-812	11	41448977	41590861	non-mBL	ABC	0
MPI-813	11	35041168	35277581	non-mBL	GCB	69,77
MPI-815	9	114153914	114177309	non-mBL	GCB	100
MPI-820	1	79617317	79781103	non-mBL	ABC	0
MPI-820	1	82477073	82656592	non-mBL	ABC	0
MPI-820	1	82818990	82948146	non-mBL	ABC	50
MPI-820	1	84871661	84987571	non-mBL	ABC	0
MPI-820	1	85401155	85520172	non-mBL	ABC	0
MPI-820	1	85793474	86314860	non-mBL	ABC	0
MPI-820	1	86666419	86727200	non-mBL	ABC	0
MPI-820	11	10423959	10807098	non-mBL	ABC	2,7
MPI-820	11	29042621	29221955	non-mBL	ABC	0
MPI-820	11	33405848	35915081	non-mBL	ABC	44,12
MPI-820	11	47940857	49618505	non-mBL	ABC	51,35
MPI-821	7	49131269	50460358	non-mBL	ABC	14,08
MPI-821	7	53069167	53402462	non-mBL	ABC	83,33
MPI-823	21	35866104	35931538	non-mBL	unclassified	0
MPI-834	11	34992974	35215767	non-mBL	ABC	93,02

## 7 Anhänge

Fall	Chr.	Startbase	Stopbase	Klassifikation		Überlappung
				mBL	GCB/ABC	CNPs
MPI-835	11	116882728	117690556	intermediate	GCB	0
MPI-844	11	18884861	18931798	non-mBL	GCB	100
MPI-844	13	84801190	103363166	non-mBL	GCB	14,77
MPI-849	11	18884861	18927562	intermediate	unclassified	100
MPI-849	18	12100589	14452810	intermediate	unclassified	28,99
MPI-849	18	34339087	76117153	intermediate	unclassified	17,65
MPI-851	12	63957302	69776704	non-mBL	GCB	9,21
MPI-852	2	51532512	52500273	intermediate	GCB	47,83
MPI-852	2	57456439	63402144	intermediate	GCB	75,65
MPI-855	3	31115810	46028585	non-mBL	ABC	13,37
MPI-855	5	38528960	39983326	non-mBL	ABC	0
MPI-855	9	2979567	14980485	non-mBL	ABC	32,69
MPI-857	11	18884861	18931798	non-mBL	ABC	100
MPI-858	2	41334748	51736693	non-mBL	ABC	23
MPI-858	2	51995561	52924971	non-mBL	ABC	13,33
MPI-858	14	58997129	60758411	non-mBL	ABC	12,1
MPI-859	5	89917307	90350409	intermediate	GCB	0
MPI-859	5	95336927	98869989	intermediate	GCB	22,87
MPI-859	11	109716704	111689270	intermediate	GCB	1,49
MPI-859	11	112941697	115222139	intermediate	GCB	18,91
MPI-859	11	116869101	120839820	intermediate	GCB	0,51
MPI-881	18	15092421	76117153	non-mBL	ABC	16,92
MPI-904	X	45130788	47186419	non-mBL	GCB	7,41

### 7.3 Teilpublikationen

Scholtysik R, Kreuz M, Klapper W, Burkhardt B, Feller AC, Hummel M, Loeffler M, Rosolowski M, Schwaenen C, Spang R, Stein H, Thorns C, Trümper L, Vater I, Wessendorf S, Zenz T, Siebert R, Küppers R; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of Deutsche Krebshilfe.

Detection of genomic aberrations in molecularly defined Burkitt's lymphoma by array-based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis.

Haematologica. 2010 Dec;95(12):2047-55.

Hartmann S, Gesk S, Scholtysik R, Kreuz M, Bug S, Vater I, Döring C, Cogliatti S, Parrens M, Merlio JP, Kwiecinska A, Porwit A, Piccaluga PP, Pileri S, Hoefler G, Küppers R, Siebert R, Hansmann ML.

High resolution SNP array genomic profiling of peripheral T cell lymphomas, not otherwise specified, identifies a subgroup with chromosomal aberrations affecting the REL locus.

Br J Haematol. 2010 Feb;148(3):402-12.

Scholtysik R, Nagel I, Kreuz M, Vater I, Giefing M, Schwaenen C, Wessendorf S, Trümper L, Loeffler M, Siebert R, Küppers R.

Recurrent deletions of the TNFSF7 and TNFSF9 genes in 19p13.3 in diffuse large B-cell and Burkitt lymphomas.

Int J Cancer. 2011 Dec 31. doi: 10.1002/ijc.27416. Epub ahead of print.

# Literaturverzeichnis

- A. S. Advani, K. Lim, S. Gibson, M. Shadman, T. Jin, E. Copelan, M. Kalaycio, M. A. Sekeres, R. Sobecks, und E. Hsi. OCT-2 expression and OCT-2/BOB.1 co-expression predict prognosis in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 51(4):606–612, 2010.
- Affymetrix. BRLMM: an improved genotype calling method for the genechip human mapping 500k array set. Technical report, 2006.
- J. Alinikula, K.-P. Nera, S. Junttila, und O. Lassila. Alternate pathways for Bcl6-mediated regulation of B cell to plasma cell differentiation. *Eur J Immunol*, 41(8):2404–2413, 2011.
- R. Arens, K. Schepers, M. A. Nolte, M. F. van Oosterwijk, R. A. van Lier, T. N. Schumacher, und M. H. van Oers. Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8+ T cell formation. *J Exp Med*, 199(11):1595–605, 2004.
- T. F. Barth, S. Muller, M. Pawlita, R. Siebert, J. U. Rother, G. Mechttersheimer, J. Kitinya, M. Bentz, und P. Moller. Homogeneous immunophenotype and paucity of secondary genomic aberrations are distinctive features of endemic but not of sporadic Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with MYC rearrangement. *J Pathol*, 203(4):940–5, 2004.
- S. Bea, I. Salaverria, L. Armengol, M. Pinyol, V. Fernandez, E. M. Hartmann, P. Jares, V. Amador, L. Hernandez, A. Navarro, G. Ott, A. Rosenwald, X. Estivill, und E. Campo. Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications, and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood*, 113(13):3059–69, 2009.
- C. Berek, A. Berger, und M. Apel. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, 67(6):1121–1129, 1991.
- A. H. Berger, A. G. Knudson, und P. P. Pandolfi. A continuum model for tumour suppression. *Nature*, 476(7359):163–9, 2011.
- R. Beroukhim, M. Lin, Y. Park, K. Hao, X. Zhao, L. A. Garraway, E. A. Fox, E. P. Hochberg, I. K. Mellinghoff, M. D. Hofer, A. Descazeaud, M. A. Rubin, M. Meyerson, W. H. Wong, W. R. Sellers, und C. Li. Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Comput Biol*, 2(5):e41, 2006.
- R. Beroukhim, G. Getz, L. Nghiemphu, J. Barretina, T. Hsueh, D. Linhart, I. Vivanco, J. C. Lee, J. H. Huang, S. Alexander, J. Du, T. Kau, R. K. Thomas, K. Shah, H. Soto, S. Perner, J. Prensner,

## Literaturverzeichnis

- R. M. DeBiasi, F. Demichelis, C. Hatton, M. A. Rubin, L. A. Garraway, S. F. Nelson, L. Liao, P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, M. Meyerson, T. A. Golub, E. S. Lander, I. K. Mellingshoff, und W. R. Sellers. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(50):20007–12, 2007.
- E. G. Boerma, R. Siebert, P. M. Kluin, und M. Baudis. Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge. *Leukemia*, 23(2):225–34, 2009.
- S. K. Bohlander. ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*, 15(3):162–174, 2005.
- G. Brady, G. J. MacArthur, und P. J. Farrell. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol*, 60(12):1397–402, 2007.
- G. M. Brodeur. The involvement of oncogenes and suppressor genes in human neoplasia. *Adv Pediatr*, 34:1–44, 1987.
- T. R. Brummelkamp, S. M. B. Nijman, A. M. G. Dirac, und R. Bernards. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF- $\kappa$ B. *Nature*, 424(6950):797–801, 2003.
- A. Bräuninger, T. Goossens, K. Rajewsky, und R. Küppers. Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol*, 31(12):3631–3637, 2001.
- A. Bräuninger, R. Schmitz, D. Bechtel, C. Renné, M.-L. Hansmann, und R. Küppers. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*, 118(8):1853–1861, 2006.
- D. P. Calado, B. Zhang, L. Srinivasan, Y. Sasaki, J. Seagal, C. Unitt, S. Rodig, J. Kutok, A. Tarakhovskiy, M. Schmidt-Supprian, und K. Rajewsky. Constitutive canonical NF- $\kappa$ B activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer Cell*, 18(6):580–589, 2010.
- A. Chatzitolios, I. Venizelos, G. Tripsiannis, G. Anastassopoulos, und N. Papadopoulos. Prognostic significance of CD95, P53, and BCL2 expression in extranodal non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol*, 89(9):889–896, 2010.
- X. Chen, J. A. Knauf, R. Gonsky, M. Wang, E. H. Lai, S. Chissoe, J. A. Fagin, und J. R. Korenberg. From amplification to gene in thyroid cancer: a high-resolution mapped bacterial-artificial-chromosome resource for cancer chromosome aberrations guides gene discovery after comparative genome hybridization. *Am J Hum Genet*, 63(2):625–637, 1998.
- K.-J. J. Cheung, D. E. Horsman, und R. D. Gascoyne. The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br J Haematol*, 146(3):257–269, 2009.

- M. Compagno, W. K. Lim, A. Grunn, S. V. Nandula, M. Brahmachary, Q. Shen, F. Bertoni, M. Ponzoni, M. Scandurra, A. Califano, G. Bhagat, A. Chadburn, R. Dalla-Favera, und L. Pasqualucci. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 459(7247):717–721, 2009.
- R. E. Davis, V. N. Ngo, G. Lenz, P. Tolar, R. M. Young, P. B. Romesser, H. Kohlhammer, L. Lamy, H. Zhao, Y. Yang, W. Xu, A. L. Shaffer, G. Wright, W. Xiao, J. Powell, J.-K. Jiang, C. J. Thomas, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, N. A. Johnson, L. M. Rimsza, E. Campo, E. S. Jaffe, W. H. Wilson, J. Delabie, E. B. Smeland, R. I. Fisher, R. M. Braziel, R. R. Tubbs, J. R. Cook, D. D. Weisenburger, W. C. Chan, S. K. Pierce, und L. M. Staudt. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 463(7277):88–92, 2010.
- D. V. Dolfi, A. C. Boesteanu, C. Petrovas, D. Xia, E. A. Butz, und P. D. Katsikis. Late signals from CD27 prevent Fas-dependent apoptosis of primary CD8+ T cells. *J Immunol*, 180(5):2912–21, 2008.
- C. Dominguez-Brauer, P. M. Brauer, Y.-J. Chen, J. Pimkina, und P. Raychaudhuri. Tumor suppression by ARF: gatekeeper and caretaker. *Cell Cycle*, 9(1):86–89, 2010.
- A. Faili, S. Aoufouchi, E. Flatter, Q. Gueranger, C. A. Reynaud, und J. C. Weill. Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature*, 419(6910):944–7, 2002.
- R. I. Fisher. Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment. *Semin Oncol*, 30(2 Suppl 4):3–9, 2003.
- J. Fitzgibbon, L. L. Smith, M. Raghavan, M. L. Smith, S. Debernardi, S. Skoulakis, D. Lillington, T. A. Lister, und B. D. Young. Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res*, 65(20):9152–4, 2005.
- P. A. Fujita, B. Rhead, A. S. Zweig, A. S. Hinrichs, D. Karolchik, M. S. Cline, M. Goldman, G. P. Barber, H. Clawson, A. Coelho, M. Diekhans, T. R. Dreszer, B. M. Giardine, R. A. Harte, J. Hillman-Jackson, F. Hsu, V. Kirkup, R. M. Kuhn, K. Learned, C. H. Li, L. R. Meyer, A. Pohl, B. J. Raney, K. R. Rosenbloom, K. E. Smith, D. Haussler, und W. J. Kent. The UCSC Genome Browser database: update 2011. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue):D876–82, 2010.
- G. Fuka, M. Kauer, R. Kofler, O. A. Haas, und R. Panzer-Grümayer. The leukemia-specific fusion gene ETV6/RUNX1 perturbs distinct key biological functions primarily by gene repression. *PLoS One*, 6(10):e26348, 2011.
- N. Fukuhara, H. Tagawa, Y. Kameoka, Y. Kasugai, S. Karnan, J. Kameoka, T. Sasaki, Y. Morishima, S. Nakamura, und M. Seto. Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*, 97(6):499–504, 2006.

## Literaturverzeichnis

- G. Gaidano, P. Ballerini, J. Z. Gong, G. Inghirami, A. Neri, E. W. Newcomb, I. T. Magrath, D. M. Knowles, und R. Dalla-Favera. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(12): 5413–7, 1991.
- G. Gaidano, L. Pasqualucci, D. Capello, E. Berra, C. Deambrogi, D. Rossi, L. Maria Larocca, A. Gloghini, A. Carbone, und R. Dalla-Favera. Aberrant somatic hypermutation in multiple subtypes of AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 102(5):1833–1841, 2003.
- J. L. Garcia, J. M. Hernandez, N. C. Gutierrez, T. Flores, D. Gonzalez, M. J. Calasanz, J. A. Martinez-Climent, M. A. Piris, C. Lopez-Capitan, M. B. Gonzalez, M. D. Odero, und J. F. San Miguel. Abnormalities on 1q and 7q are associated with poor outcome in sporadic Burkitt's lymphoma. A cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Leukemia*, 17(10):2016–24, 2003.
- S. P. Garrison, J. R. Jeffers, C. Yang, J. A. Nilsson, M. A. Hall, J. E. Rehg, W. Yue, J. Yu, L. Zhang, M. Onciu, J. T. Sample, J. L. Cleveland, und G. P. Zambetti. Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B-cell lymphomagenesis. *Mol Cell Biol*, 28(17):5391–402, 2008.
- M. Giefing, J. Arnemann, J. I. Martin-Subero, I. Nielander, S. Bug, S. Hartmann, N. Arnold, E. Tiaci, M. Frank, M. L. Hansmann, R. Kuppers, und R. Siebert. Identification of candidate tumour suppressor gene loci for Hodgkin and Reed-Sternberg cells by characterisation of homozygous deletions in classical Hodgkin lymphoma cell lines. *Br J Haematol*, 142(6):916–24, 2008.
- C. C. Goodnow, J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Wotherspoon, R. H. Loblay, und K. Raphael. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, 334(6184): 676–682, 1988.
- T. Goossens, U. Klein, und R. Küppers. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(5):2463–2468, 1998.
- K. Grønbaek, J. Worm, E. Ralfkiaer, V. Ahrenkiel, P. Hokland, und P. Guldborg. ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 100(4):1430–1437, 2002.
- K. Gronbaek, P. T. Straten, E. Ralfkiaer, V. Ahrenkiel, M. K. Andersen, N. E. Hansen, J. Zeuthen, K. Hou-Jensen, und P. Guldborg. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood*, 92(9):3018–24, 1998.
- K. Gronbaek, J. Worm, E. Ralfkiaer, V. Ahrenkiel, P. Hokland, und P. Guldborg. ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 100(4):1430–7, 2002.

## Literaturverzeichnis

- F. Grunebach, K. Kayser, M. M. Weck, M. R. Muller, S. Appel, und P. Brossart. Cotransfection of dendritic cells with RNA coding for HER-2/neu and 4-1BBL increases the induction of tumor antigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Gene Ther*, 12(9):749–56, 2005.
- S. Hailfinger, G. Lenz, V. Ngo, A. Posvitz-Fejfar, F. Rebeaud, M. Guzzardi, E.-M. M. Penas, J. Dierlamm, W. C. Chan, L. M. Staudt, und M. Thome. Essential role of MALT1 protease activity in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(47):19946–19951, 2009.
- A. Hangaishi und M. Kurokawa. Blimp-1 is a tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Int J Hematol*, 91(1):46–53, 2010.
- L. He, J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon, und S. M. Hammond. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043):828–33, 2005.
- J. L. Hecht und J. C. Aster. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol*, 18(21):3707–21, 2000.
- M. Heidenblad, D. Lindgren, T. Jonson, F. Liedberg, S. Veerla, G. Chebil, S. Gudjonsson, A. Borg, W. Månsson, und M. Höglund. Tiling resolution array CGH and high density expression profiling of urothelial carcinomas delineate genomic amplicons and candidate target genes specific for advanced tumors. *BMC Med Genomics*, 1:3, 2008.
- Y. Herishanu, F. Gibellini, N. Njuguna, I. Hazan-Halevy, M. Farooqui, S. Bern, K. Keyvanfar, E. Lee, W. Wilson, und A. Wiestner. Activation of CD44, a receptor for extracellular matrix components, protects chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug induced apoptosis through MCL-1. *Leuk Lymphoma*, 52(9):1758–1769, 2011.
- M. L. Hermiston, J. Zikherman, und J. W. Zhu. CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunol Rev*, 228(1):288–311, 2009.
- M. Heyman und S. Einhorn. Inactivation of the p15INK4B and p16INK4 genes in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*, 23(3-4):235–45, 1996.
- B. T. Hill und J. Sweetenham. Clinical implications of the molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2012.
- X.-T. Hu, Y.-W. Chen, A. C T. Liang, W.-Y. Au, K.-Y. Wong, T. S K. Wan, M. L Y. Wong, L. Shen, K.-K. Chan, T. Guo, K.-M. Chu, Q. Tao, C.-S. Chim, F. Loong, W. W L. Choi, L. Lu, C.-C. So, L. C. Chan, Y.-L. Kwong, R. H S. Liang, und G. Srivastava. CD44 activation in mature B-cell malignancies by a novel recurrent IGH translocation. *Blood*, 115(12):2458–2461, 2010.
- M. Hummel, S. Bentink, H. Berger, W. Klapper, S. Wessendorf, T. F. Barth, H. W. Bernd, S. B. Cogliatti, J. Dierlamm, A. C. Feller, M. L. Hansmann, E. Haralambieva, L. Harder, D. Hasenclever, M. Kuhn, D. Lenze, P. Lichter, J. I. Martin-Subero, P. Moller, H. K. Muller-Hermelink, G. Ott,

## Literaturverzeichnis

- R. M. Parwaresch, C. Pott, A. Rosenwald, M. Rosolowski, C. Schwaenen, B. Sturzenhofecker, M. Szczepanowski, H. Trautmann, H. H. Wacker, R. Spang, M. Loeffler, L. Trumper, H. Stein, und R. Siebert. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*, 354(23):2419–30, 2006.
- A. J. Iafrate, L. Feuk, M. N. Rivera, M. L. Listewnik, P. K. Donahoe, Y. Qi, S. W. Scherer, und C. Lee. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*, 36(9):949–51, 2004.
- J. Iqbal, T. C. Greiner, K. Patel, B. J. Dave, L. Smith, J. Ji, G. Wright, W. G. Sanger, D. L. Pickering, S. Jain, D. E. Horsman, Y. Shen, K. Fu, D. D. Weisenburger, C. P. Hans, E. Campo, R. D. Gascoyne, A. Rosenwald, E. S. Jaffe, J. Delabie, L. Rimsza, G. Ott, H. K. Müller-Hermelink, J. M. Connors, J. M. Vose, T. McKeithan, L. M. Staudt, W. C. Chan, und Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 21(11):2332–2343, 2007.
- J. Jacob, G. Kelsoe, K. Rajewsky, und U. Weiss. Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*, 354(6352):389–392, 1991.
- F. Jardin, J. P. Jais, T. J. Molina, F. Parmentier, J. M. Picquenot, P. Ruminy, H. Tilly, C. Bastard, G. A. Salles, P. Feugier, C. Thieblemont, C. Gisselbrecht, A. de Reynies, B. Coiffier, C. Haioun, und K. Leroy. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood*, 116(7):1092–104, 2010.
- Y. Jiao, L. Cui, C. Gao, W. Li, X. Zhao, S. Liu, M. Wu, G. Deng, und Z. Li. CASP8AP2 is a promising prognostic indicator in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 36(1):67–71, 2012.
- H. D. Kim, T-S. Kim, und J. Kim. Aberrant ribosome biogenesis activates c-Myc and ASK1 pathways resulting in p53-dependent G1 arrest. *Oncogene*, 30(30):3317–3327, 2011a.
- J. Kim, S. Oh, H. Min, Y. Kim, und T. Park. Practical issues in genome-wide association studies for physical activity. *Ann N Y Acad Sci*, 1229:38–44, 2011b.
- Y. Kim, J. W. Strehl, M. Gorschluter, C. Ziske, und I. G. Schmidt-Wolf. Prevention of lethal tumor growth and generation of long-lasting immunity in vivo using CD137L and interleukin-12 gene transfer. *In Vivo*, 22(3):337–43, 2008.
- U. Klangby, I. Okan, K. P. Magnusson, M. Wendland, P. Lind, und K. G. Wiman. p16/INK4a and p15/INK4b gene methylation and absence of p16/INK4a mRNA and protein expression in Burkitt's lymphoma. *Blood*, 91(5):1680–7, 1998.
- W. Klapper, M. Szczepanowski, B. Burkhardt, H. Berger, M. Rosolowski, S. Bentink, C. Schwaenen, S. Wessendorf, R. Spang, P. Moller, M. L. Hansmann, H. W. Bernd, G. Ott, M. Hummel,

## Literaturverzeichnis

- H. Stein, M. Loeffler, L. Trumper, M. Zimmermann, A. Reiter, und R. Siebert. Molecular profiling of pediatric mature B-cell lymphoma treated in population-based prospective clinical trials. *Blood*, 112(4):1374–81, 2008.
- U. Klein und R. Dalla-Favera. New insights into the phenotype and cell derivation of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol*, 294:31–49, 2005.
- Y. Kojima, H. Tsurumi, N. Goto, M. Shimizu, S. Kasahara, T. Yamada, N. Kanemura, T. Hara, M. Sawada, M. Saio, T. Yamada, T. Takahashi, E. Tomita, T. Takami, und H. Moriwaki. Fas and Fas ligand expression on germinal center type-diffuse large B-cell lymphoma is associated with the clinical outcome. *Eur J Haematol*, 76(6):465–472, 2006.
- A. Kovalenko, C. Chable-Bessia, G. Cantarella, A. Israël, D. Wallach, und G. Courtis. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature*, 424(6950):801–805, 2003.
- R. Küppers. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 5(4):251–62, 2005.
- D. Laderach, A. Wesa, und A. Galy. 4-1BB-ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12. *Cell Immunol*, 226(1):37–44, 2003.
- E.-S. Lee, L.-H. Kim, W. A. Abdullah, und S.-C. Peh. Expression and alteration of p16 in diffuse large B cell lymphoma. *Pathobiology*, 77(2):96–105, 2010.
- J. Lee und S. S. Kim. The function of p27 KIP1 during tumor development. *Exp Mol Med*, 41(11):765–771, 2009.
- C. Lemerrier, M.-P. Brocard, F. Puvion-Dutilleul, H.-Y. Kao, O. Albagli, und S. Khochbin. Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor. *J Biol Chem*, 277(24):22045–22052, 2002.
- M. Lin, L. J. Wei, W. R. Sellers, M. Lieberfarb, W. H. Wong, und C. Li. dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics*, 20(8):1233–40, 2004.
- L.-J. Ling, C. Lu, G.-P. Zhou, und S. Wang. Ectopic expression of RhoBTB2 inhibits migration and invasion of human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 10(11):1115–1122, 2010.
- Y. J. Liu, D. E. Joshua, G. T. Williams, C. A. Smith, J. Gordon, und I. C. MacLennan. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*, 342(6252):929–931, 1989.
- I. S. Lossos, A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, W. C. Chan, P. O. Brown, D. Botstein, L. M. Staudt, und R. Levy. 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 U S A*, 97(18):10209–10213, 2000a.

## Literaturverzeichnis

- I. S. Lossos, C. Y. Okada, R. Tibshirani, R. Warnke, J. M. Vose, T. C. Greiner, und R. Levy. Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 95(5): 1797–1803, 2000b.
- J. Mandelbaum, G. Bhagat, H. Tang, T. Mo, M. Brahmachary, Q. Shen, A. Chadburn, K. Rajewsky, A. Tarakhovskiy, L. Pasqualucci, und R. Dalla-Favera. BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*, 18(6): 568–579, 2010.
- J. M. McDonald, V. Dunmire, E. Taylor, R. Sawaya, J. Bruner, G. N. Fuller, K. Aldape, und W. Zhang. Attenuated expression of DFFB is a hallmark of oligodendrogliomas with 1p-allelic loss. *Mol Cancer*, 4:35, 2005.
- C. Meier, S. Hoeller, C. Bourgau, P. Hirschmann, J. Schwaller, P. Went, S. A. Pileri, A. Reiter, S. Dirnhofer, und A. Tzankov. Recurrent numerical aberrations of JAK2 and deregulation of the JAK2-STAT cascade in lymphomas. *Mod Pathol*, 22(3):476–487, 2009.
- S. Middendorp, Y. Xiao, J. Y. Song, V. Peperzak, P. H. Krijger, H. Jacobs, und J. Borst. Mice deficient for CD137 ligand are predisposed to develop germinal center-derived B-cell lymphoma. *Blood*, 114(11):2280–9, 2009.
- K. Milovic-Holm, E. Krieghoff, K. Jensen, H. Will, und T. G. Hofmann. FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies. *EMBO J*, 26(2):391–401, 2007.
- A. Montpetit, J. Larose, G. Boily, S. Langlois, N. Trudel, und D. Sinnett. Mutational and expression analysis of the chromosome 12p candidate tumor suppressor genes in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18(9):1499–1504, 2004.
- A. Mottok, C. Renné, M. Seifert, E. Oppermann, W. Bechstein, M.-L. Hansmann, R. Küppers, und A. Bräuninger. Inactivating SOCS1 mutations are caused by aberrant somatic hypermutation and restricted to a subset of B-cell lymphoma entities. *Blood*, 114(20):4503–4506, 2009.
- M. Müschen, K. Rajewsky, M. Krönke, und R. Küppers. The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. *Trends Immunol*, 23(2):75–80, 2002.
- P. Mu, Y. C. Han, D. Betel, E. Yao, M. Squatrito, P. Ogradowski, E. de Stanchina, A. D'Andrea, C. Sander, und A. Ventura. Genetic dissection of the miR-17 92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev*, 23(24):2806–11, 2009.
- E. A. Musgrove, C. E. Caldon, J. Barraclough, A. Stone, und R. L. Sutherland. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(8):558–572, 2011.
- Y. Nannya, M. Sanada, K. Nakazaki, N. Hosoya, L. Wang, A. Hangaishi, M. Kurokawa, S. Chiba, D. K. Bailey, G. C. Kennedy, und S. Ogawa. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res*, 65(14):6071–9, 2005.

## Literaturverzeichnis

- M. Nelson, S. L. Perkins, B. J. Dave, P. F. Coccia, J. A. Bridge, E. R. Lyden, N. A. Heerema, M. A. Lones, L. Harrison, M. S. Cairo, and W. G. Sanger. An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence in situ hybridization and its impact on survival in children and adolescents with Burkitt lymphoma: results from the Children's Oncology Group study CCG-5961. *Br J Haematol*, pages e-pub ahead of print 4 Nov 2009, 2009.
- I. Nielaender, J. I. Martin-Subero, F. Wagner, J. A. Martinez-Climent, and R. Siebert. Partial uniparental disomy: a recurrent genetic mechanism alternative to chromosomal deletion in malignant lymphoma. *Leukemia*, 20(5):904–5, 2006.
- S. L. Nutt, N. Taubenheim, J. Hasbold, L. M. Corcoran, and P. D. Hodgkin. The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Semin Immunol*, 23(5):341–349, 2011.
- K. Ochiai, A. Muto, H. Tanaka, S. Takahashi, and K. Igarashi. Regulation of the plasma cell transcription factor Blimp-1 gene by Bach2 and Bcl6. *Int Immunol*, 20(3):453–460, 2008.
- K. A. O'Donnell, E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang, and J. T. Mendell. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043):839–43, 2005.
- A. Ota, H. Tagawa, S. Karnan, S. Tsuzuki, A. Karpas, S. Kira, Y. Yoshida, and M. Seto. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*, 64(9):3087–95, 2004.
- M. Ouaïssi, I. Sielezneff, R. Silvestre, B. Sastre, J.-P. Bernard, J. S. Lafontaine, M. J. Payan, L. Dahan, N. Pirrò, J. F. Seitz, E. Mas, D. Lombardo, and A. Ouaïssi. High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas. *Ann Surg Oncol*, 15(8):2318–2328, 2008.
- J. J. Oudejans, W. N. van Wieringen, S. J. Smeets, M. Tijssen, S. J. Vosse, C. J. Meijer, G. A. Meijer, M. A. van de Wiel, and B. Ylstra. Identification of genes putatively involved in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphomas by integrative genomics. *Genes Chromosomes Cancer*, 48(3):250–60, 2009.
- J. C.-S. Pang, K. K.-W. Li, K.-M. Lau, Y. L. Ng, J. Wong, N. Y.-F. Chung, H.-M. Li, Y.-L. Chui, V. W. Y. Lui, Z.-p. Chen, D. T.-M. Chan, W. S. Poon, Y. Wang, Y. Mao, L. Zhou, and H.-K. Ng. KIAA0495/PDAM is frequently downregulated in oligodendroglial tumors and its knockdown by siRNA induces cisplatin resistance in glioma cells. *Brain Pathol*, 20(6):1021–1032, 2010.
- L. Pasqualucci, P. Neumeister, T. Goossens, G. Nanjangud, R. S. Chaganti, R. Kuppers, and R. Dalla-Favera. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, 412(6844):341–6, 2001.
- L. Pasqualucci, D. Dominguez-Sola, A. Chiarenza, G. Fabbri, A. Grunn, V. Trifonov, L. H. Kasper, S. Lerach, H. Tang, J. Ma, D. Rossi, A. Chadburn, V. V. Murty, C. G. Mullighan, G. Gaidano, R. Rabadan, P. K. Brindle, and R. Dalla-Favera. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*, 471(7337):189–95, 2011a.

## Literaturverzeichnis

- L. Pasqualucci, V. Trifonov, G. Fabbri, J. Ma, D. Rossi, A. Chiarenza, V. A. Wells, A. Grunn, M. Mesina, O. Elliot, J. Chan, G. Bhagat, A. Chadburn, G. Gaidano, C. G. Mullighan, R. Rabadan, und R. Dalla-Favera. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*, 43(9):830–7, 2011b.
- Kimberly J. Payne und Sinisa Dovat. Ikaros and tumor suppression in acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncog*, 16(1-2):3–12, 2011.
- J.-H. Pei, S.-Q. Luo, Y. Zhong, J.-H. Chen, H.-W. Xiao, und W.-X. Hu. The association between non-Hodgkin lymphoma and methylation of p73. *Tumour Biol*, 32(6):1133–1138, 2011.
- H. Z. Peng, M. Q. Du, A. Koulis, A. Aiello, A. Dogan, L. X. Pan, und P. G. Isaacson. Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells. *Blood*, 93(7):2167–2172, 1999.
- T. B. Petta, S. Nakajima, A. Zlatanou, E. Despras, S. Couve-Privat, A. Ishchenko, A. Sarasin, A. Yasui, und P. Kannouche. Human DNA polymerase iota protects cells against oxidative stress. *Embo J*, 27(21):2883–95, 2008.
- K. Rajewsky. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381(6585):751–758, 1996.
- R. E. Rempel, S. Mori, M. Gasparetto, M. A. Glozak, E. R. Andrechek, S. B. Adler, N. M. Laakso, A. S. Lagoo, R. Storms, C. Smith, und J. R. Nevins. A role for E2F activities in determining the fate of Myc-induced lymphomagenesis. *PLoS Genet*, 5(9):e1000640, 2009.
- A. Rosenwald, G. Wright, W. C. Chan, J. M. Connors, E. Campo, R. I. Fisher, R. D. Gascoyne, H. K. Muller-Hermelink, E. B. Smeland, J. M. Giltneane, E. M. Hurt, H. Zhao, L. Averett, L. Yang, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, R. Simon, R. D. Klausner, J. Powell, P. L. Duffey, D. L. Longo, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, W. G. Sanger, B. J. Dave, J. C. Lynch, J. Vose, J. O. Armitage, E. Montserrat, A. López-Guillermo, T. M. Grogan, T. P. Miller, M. LeBlanc, G. Ott, S. Kvaloy, J. Delabie, H. Holte, P. Krajci, T. Stokke, und L. M. Staudt. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346(25):1937–1947, 2002.
- A. Rosenwald, G. Wright, K. Leroy, X. Yu, P. Gaulard, R. D. Gascoyne, W. C. Chan, T. Zhao, C. Haioun, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. C. Lynch, J. Vose, J. O. Armitage, E. B. Smeland, S. Kvaloy, H. Holte, J. Delabie, E. Campo, E. Montserrat, A. Lopez-Guillermo, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, J. M. Connors, R. Braziel, T. M. Grogan, R. I. Fisher, T. P. Miller, M. LeBlanc, M. Chiorazzi, H. Zhao, L. Yang, J. Powell, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, R. Simon, R. D. Klausner, und L. M. Staudt. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*, 198(6):851–862, 2003.
- Emiko Sakane-Ishikawa, Shin-Ichi Nakatsuka, Yasuhiko Tomita, Shigeki Fujita, Itsuko Nakamichi, Tetsuya Takakuwa, Haruo Sugiyama, Shirou Fukuhara, Masayuki Hino, Akihisa Kanamaru, Toshihiro Soma, Machiko Tsukaguchi, Kazuhiko Igarashi, Yuzuru Kanakura, Katsuyuki Aozasa,

- und Osaka Lymphoma Study Group . Prognostic significance of BACH2 expression in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*, 23(31): 8012–8017, 2005.
- Mabel Salas und Laurel A. Eckhardt. Critical role for the Oct-2/OCA-B partnership in Ig-secreting cells. *J Immunol*, 171(12):6589–6598, 2003.
- I. Salaverria, A. Zettl, S. Bea, E. M. Hartmann, S. S. Dave, G. W. Wright, E. J. Boerma, P. M. Kluin, G. Ott, W. C. Chan, D. D. Weisenburger, A. Lopez-Guillermo, R. D. Gascoyne, J. Delabie, L. M. Rimsza, R. M. Braziel, E. S. Jaffe, L. M. Staudt, H. K. Muller-Hermelink, E. Campo, und A. Rosenwald. Chromosomal alterations detected by comparative genomic hybridization in subgroups of gene expression-defined Burkitt's lymphoma. *Haematologica*, 93(9):1327–34, 2008.
- M. Sanchez-Beato, A. Sanchez-Aguilera, und M. A. Piris. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*, 101(4):1220–35, 2003.
- K. J. Savage, S. Monti, J. L. Kutok, G. Cattoretti, D. Neuberg, L. De Leval, P. Kurtin, P. Dal Cin, C. Ladd, F. Feuerhake, R. C. T. Aguiar, S. Li, G. Salles, F. Berger, W. Jing, G. S. Pinkus, T. Habermann, R. Dalla-Favera, N. L. Harris, J. C. Aster, T. R. Golub, und M. A. Shipp. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 102(12):3871–3879, 2003.
- A. Schmidt, R. Schmitz, M. Giefing, J. I. Martin-Subero, S. Gesk, I. Vater, A. Massow, E. Maggio, M. Schneider, M.-L. Hansmann, R. Siebert, und R. Küppers. Rare occurrence of biallelic CYLD gene mutations in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 49(9):803–809, 2010.
- C. Schneider, L. Pasqualucci, und R. Dalla-Favera. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol*, 28(2):167–77, 2011.
- R. Scholtysik, M. Kreuz, W. Klapper, B. Burkhardt, A. C. Feller, M. Hummel, M. Loeffler, M. Rosolowski, C. Schwaenen, R. Spang, H. Stein, C. Thorns, L. Trumper, I. Vater, S. Wessendorf, T. Zenz, R. Siebert, und R. Kuppers. Detection of genomic aberrations in molecularly defined Burkitt's lymphoma by array-based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis. *Haematologica*, 95(12):2047–55, 2010.
- R. Scholtysik, I. Nagel, M. Kreuz, I. Vater, M. Giefing, C. Schwaenen, S. Wessendorf, L. Trümper, M. Loeffler, R. Siebert, und R. Küppers. Recurrent deletions of the TNFSF7 and TNFSF9 genes in 19p13.3 in diffuse large B-cell and Burkitt lymphomas. *Int J Cancer*, 2011.
- T. A. Schwickert, R. L. Lindquist, G. Shakhar, G. Livshits, D. Skokos, M. H. Kosco-Vilbois, M. L. Dustin, und M. C. Nussenzweig. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature*, 446(7131):83–87, 2007.

## Literaturverzeichnis

- Y. Shi, J.-Y. Chen, J. Yang, B. Li, Z.-H. Chen, und C.-G. Xiao. DBC2 gene is silenced by promoter methylation in bladder cancer. *Urol Oncol*, 26(5):465–469, 2008.
- R. Siegel, U. Kim, A. Patke, X. Yu, X. Ren, A. Tarakhovsky, und R. G. Roeder. Nontranscriptional regulation of SYK by the coactivator OCA-B is required at multiple stages of B cell development. *Cell*, 125(4):761–774, 2006.
- F P G. Silva, B. Morolli, C. T. Storlazzi, A. Zagaria, L. Impera, B. Klein, H. Vrieling, H. C. Kluin-Nelemans, und M. Giphart-Gassler. ETV6 mutations and loss in AML-M0. *Leukemia*, 22(8):1639–1643, 2008.
- V. Siripurapu, J. Meth, N. Kobayashi, und M. Hamaguchi. DBC2 significantly influences cell-cycle, apoptosis, cytoskeleton and membrane-trafficking pathways. *J Mol Biol*, 346(1):83–89, 2005.
- G. D. Spotts, S. V. Patel, Q. Xiao, und S. R. Hann. Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol*, 17(3):1459–1468, 1997.
- T. Stankovic, G. S. Stewart, P. Byrd, C. Fegan, P A H. Moss, und A M R. Taylor. ATM mutations in sporadic lymphoid tumours. *Leuk Lymphoma*, 43(8):1563–1571, 2002.
- D. T. Starczynowski, J. G. Reynolds, und T. D. Gilmore. Deletion of either C-terminal transactivation subdomain enhances the in vitro transforming activity of human transcription factor REL in chicken spleen cells. *Oncogene*, 22(44):6928–6936, 2003.
- T. K. Starr, R. Allaei, K. A. Silverstein, R. A. Staggs, A. L. Sarver, T. L. Bergemann, M. Gupta, M. G. O’Sullivan, I. Matise, A. J. Dupuy, L. S. Collier, S. Powers, A. L. Oberg, Y. W. Asmann, S. N. Thibodeau, L. Tessarollo, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, R. T. Cormier, und D. A. Largaespada. A transposon-based genetic screen in mice identifies genes altered in colorectal cancer. *Science*, 323(5922):1747–50, 2009.
- J. W. Sweetenham. Molecular signatures in the diagnosis and management of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol*, 18(4):288–92, 2011.
- S. H. Swerdlow. *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. World Health Organization classification of tumours. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 4th edition, 2008.
- Y. Sylvestre, V. De Guire, E. Querido, U. K. Mukhopadhyay, V. Bourdeau, F. Major, G. Ferbeyre, und P. Chartrand. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem*, 282(4):2135–43, 2007.
- H. Tagawa, K. Karube, S. Tsuzuki, K. Ohshima, und M. Seto. Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci*, 98(9):1482–90, 2007.

## Literaturverzeichnis

- V. Y. Taraban, T. F. Rowley, D. F. Tough, und A. Al-Shamkhani. Requirement for CD70 in CD4+ Th cell-dependent and innate receptor-mediated CD8+ T cell priming. *J Immunol*, 177(5):2969–75, 2006.
- D. V. F. Tauriello, A. Haegebarth, I. Kuper, M. J. Edelmann, M. Henraat, M. R. Canninga-van Dijk, B. M. Kessler, H. Clevers, und M. M. Maurice. Loss of the tumor suppressor CYLD enhances Wnt/beta-catenin signaling through K63-linked ubiquitination of Dvl. *Mol Cell*, 37(5):607–619, 2010.
- Michael A. Teitell. OCA-B regulation of B-cell development and function. *Trends Immunol*, 24(10):546–553, 2003.
- E. F. Thelander, K. Ichimura, M. Corcoran, G. Barbany, A. Nordgren, M. Heyman, M. Berglund, A. Mungall, R. Rosenquist, V. P. Collins, D. Grandér, C. Larsson, und S. Lagercrantz. Characterization of 6q deletions in mature B cell lymphomas and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 49(3):477–487, 2008.
- S. L. Tiegs, D. M. Russell, und D. Nemazee. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med*, 177(4):1009–1020, 1993.
- S. Toujani, P. Dessen, N. Ithzar, G. Danglot, C. Richon, Y. Vassetzky, T. Robert, V. Lazar, J. Bosq, L. Da Costa, C. Perot, V. Ribrag, C. Patte, J. Wiels, und A. Bernheim. High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *PLoS One*, 4(9):e7089, 2009.
- A. Tzankov, A.-C. Pehrs, A. Zimpfer, S. Ascani, A. Lugli, S. Pileri, und S. Dirnhofer. Prognostic significance of CD44 expression in diffuse large B cell lymphoma of activated and germinal centre B cell-like types: a tissue microarray analysis of 90 cases. *J Clin Pathol*, 56(10):747–752, 2003.
- P. Van Vlierberghe, A. Ambesi-Impiombato, A. Perez-Garcia, J. E. Haydu, I. Rigo, M. Hadler, V. Tosello, G. Della Gatta, E. Paietta, J. Racevskis, P. H. Wiernik, S. M. Luger, J. M. Rowe, M. Rue, und A. A. Ferrando. ETV6 mutations in early immature human T cell leukemias. *J Exp Med*, 208(13):2571–2579, 2011.
- D. S. Vinay, B. K. Choi, J. S. Bae, W. Y. Kim, B. M. Gebhardt, und B. S. Kwon. CD137-deficient mice have reduced NK/NKT cell numbers and function, are resistant to lipopolysaccharide-induced shock syndromes, and have lower IL-4 responses. *J Immunol*, 173(6):4218–29, 2004.
- S. Volinia, G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris, und C. M. Croce. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7):2257–61, 2006.
- S. D. Wagner, M. Ahearne, und P. Ko Ferrigno. The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy. *Br J Haematol*, 152(1):3–12, 2011.

## Literaturverzeichnis

- P. Waring und A. Müllbacher. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol*, 77(4):312–317, 1999.
- Swen Wessendorf, Björn Fritz, Gunnar Wrobel, Michelle Nessling, Stefan Lampel, Daniel Göettel, Manfred Kuepper, Stefan Joos, Ton Hopman, Felix Kokocinski, Hartmut Döhner, Martin Bentz, Carsten Schwäenen, und Peter Lichter. Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest*, 82(1):47–60, 2002.
- C. Xiao, L. Srinivasan, D. P. Calado, H. C. Patterson, B. Zhang, J. Wang, J. M. Henderson, J. L. Kutok, und K. Rajewsky. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*, 9(4):405–14, 2008.
- Q. Xiao, G. Claassen, J. Shi, S. Adachi, J. Sedivy, und S. R. Hann. Transactivation-defective c-MycS retains the ability to regulate proliferation and apoptosis. *Genes Dev*, 12(24):3803–3808, 1998.
- A. Yamane, W. Resch, N. Kuo, S. Kuchen, Z. Li, H.-w. Sun, D. F. Robbiani, K. McBride, M. C. Nussenzweig, und R. Casellas. Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nat Immunol*, 12(1):62–69, 2011.
- J. Yang, Z. Chen, Y. Liu, R. J. Hickey, und L. H. Malkas. Altered DNA polymerase  $\epsilon$  expression in breast cancer cells leads to a reduction in DNA replication fidelity and a higher rate of mutagenesis. *Cancer Res*, 64(16):5597–607, 2004.
- T. Yoshihara, D. Collado, und M. Hamaguchi. Cyclin D1 down-regulation is essential for DBC2's tumor suppressor function. *Biochem Biophys Res Commun*, 358(4):1076–1079, 2007.
- Z. Zhang. VH replacement in mice and humans. *Trends Immunol*, 28(3):132–137, 2007.
- Z. Zhang, M. Zemlin, Y.-H. Wang, D. Munfus, L. E. Huye, H. W. Findley, S. L. Bridges, D. B. Roth, P. D. Burrows, und M. D. Cooper. Contribution of Vh gene replacement to the primary B cell repertoire. *Immunity*, 19(1):21–31, 2003.
- X. Zhao, C. Li, J. G. Paez, K. Chin, P. A. Janne, T. H. Chen, L. Girard, J. Minna, D. Christiani, C. Leo, J. W. Gray, W. R. Sellers, und M. Meyerson. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res*, 64(9):3060–71, 2004.
- C. Zhu, Q. Chen, Z. Xie, J. Ai, L. Tong, J. Ding, und M. Geng. The role of histone deacetylase 7 (HDAC7) in cancer cell proliferation: regulation on c-Myc. *J Mol Med (Berl)*, 89(3):279–289, 2011.