

Institut für Zellbiologie

(Tumorforschung)



**Bedeutung von B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren,
insbesondere EBF1,
für die Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Verena Bohle
aus Steinfurt

Februar 2012

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

2. Gutachter: Prof. Dr. Shirley Knauer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 04. April 2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis.....	9
1. Einleitung.....	10
1.1 Das humane Immunsystem	10
1.1.1 Angeborenes Immunsystem.....	10
1.1.2 Adaptives Immunsystem	10
1.1.3 B-Zellentwicklung.....	11
1.1.4 Transkriptionsfaktoren der B-Zellentwicklung	13
1.1.5 Early B Cell Factor 1 (EBF1)	17
1.2 Maligne Lymphome	19
1.2.1 B-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL).....	19
1.2.1.1 Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)	20
1.2.1.2 Follikuläres Lymphom (FL).....	20
1.2.1.3 Burkitt Lymphom (BL).....	20
1.2.2 Hodgkin-Lymphom (HL)	21
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Zellkultur	26
2.1.1 Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien.....	26
2.1.2 Kultivierung von Zellen	26
2.1.3 Zellzahlbestimmung.....	27
2.1.4 Untersuchung auf Mycoplasmen	27
2.1.5 Identifikation von HL-Linien mittels Sequenzierung	27
2.1.6 Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von Zellen (FACS).....	29
2.1.7 MTS-Assay	29
2.2 Bakterielle-Arbeitstechniken	29
2.2.1 Bakterienkultur	29
2.2.2 Transformation von Bakterien	30
2.3 RNA-Techniken.....	31
2.3.1 RNA Isolation.....	31
2.3.2 Reverse Transkription.....	31
2.3.3 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	31
2.3.4 Micro-Arrays	32
2.4 DNA-Arbeitstechniken.....	33
2.4.1 Isolierung genomischer, eukariotischer DNA	33
2.4.2 Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i>	33

2.4.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	34
2.4.4	Klonierung.....	35
2.4.4.1	TA-Klonierung.....	35
2.4.4.2	Produktion von überhängenden A-Enden	35
2.4.4.3	Restriktionsverdau	35
2.4.4.4	Klenow-Fragment: Auffüllen bzw. abdauen von DNA-Enden	36
2.4.4.5	DNA-Dephosphorylierung.....	36
2.4.4.6	DNA-Phosphorylierung.....	36
2.4.4.7	Ligation von DNA.....	36
2.4.5	PCR-Techniken	37
2.4.5.1	PCR	37
2.4.5.2	RT-PCR	39
2.4.5.3	sqRT-PCR	39
2.4.5.4	Quantitative RT-PCR.....	40
2.4.5.5	Quantitative PCR - Copy Number Assay.....	40
2.4.5.6	DNA-Sequenzierung.....	41
2.4.5.7	Bisulfit-Sequenzierung.....	43
2.4.6	Reinigung von PCR-Fragmenten	45
2.4.7	Gelelektrophorese	45
2.4.8	Reinigung von DNA- bzw. PCR-Fragmenten aus Agarosegelen.....	45
2.5	Protein-Arbeitstechniken	45
2.5.1	Isolation von Keimzentrums B-Zellen aus humanen Tonsillen	45
2.5.1.1	Aufreinigung von TMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation	46
2.5.1.2	CD77-MACS	46
2.5.1.3	CD20-CD38-Sortierung	47
2.5.2	Western Blot	47
2.5.2.1	Protein Isolation.....	48
2.5.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	48
2.5.2.3	SDS-Page.....	49
2.5.2.4	Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Blotting).....	49
2.5.2.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen mit Antikörpern.....	49
2.5.2.6	Detektion der untersuchten Proteine im Western Blot	50
2.6	Retrovirale Arbeitstechniken	51
2.6.1	Herstellung von Viruspartikeln.....	51
2.6.2	Virustitration	52
2.6.3	Infektion	52
2.6.4	Sortierung infizierter Zellen per FACS.....	53
2.6.5	„cDNA“-Synthese viraler RNA	53
3.	Ergebnisse	54
3.1	Herunterregulation des B-Zelltranskriptionsfaktors E2A in B-Zelllinien unter Verwendung von shRNA-exprimierenden Retroviren.....	54
3.1.1	Herstellung der pSM2c shRNA-Vektoren	54

3.1.2	Virusproduktion mit pSM2-shPSMC2 und pSM2-shPSMC5 Vektoren	55
3.1.3	Umklonierung der shRNAs in pVig	56
3.1.4	Virusproduktion mit pVig-shPSMC2 und pVig-shPSMC5 Vektoren	56
3.1.5	Infektion von B-Zelllinien mit pVig-shPSMC2 und pVig-shPSMC5 Viren.....	57
3.1.6	Virusproduktion mit dem pGIPZ-shRNA-System	58
3.1.7	Optimierung der Infektion mit pGIPZ-Viren	58
3.1.8	Infektion von B-Zelllinien mit pGIPZ-Viren.....	59
3.2	Expression des B-Zelltranskriptionsfaktors EBF1 in HL-Linien.....	60
3.2.1	Etablierung der EBF1-Reexpression in Hodgkinzellen	60
3.2.1.1	Klonierung des pGIPZ-Spe-EBF1 Plasmids.....	60
3.2.1.2	EBF1-Expression in HL-Linien	62
3.2.1.3	Analyse der EBF1-Reexpression in HL-Linien	63
3.2.2	Änderungen der Genexpression durch EBF1-Reexpression	65
3.2.2.1	Analyse positiv und negativ regulierter EBF1-Zielgene per RT-PCR.....	65
3.2.2.2	Genchipanalysen von EBF1-transduzierten HL-Linien	69
3.2.2.3	Wird CD79A-Protein in EBF1-transduzierten Zellen reexprimiert?	77
3.2.3	Promotormethylierungen in EBF1-transduzierten HL-Linien.....	78
3.2.4	EBF1 Mutationsanalyse.....	82
3.2.5	Analyse der Fitness EBF1-transduzierter HL-Linien	83
3.2.5.1	Stoffwechselaktivitäten EBF1-transduzierter HL-Linien	83
3.2.5.2	Löst die EBF1-Reexpression vermehrtes Zellsterben aus?	85
4.	Diskussion	89
4.1	Herunterregulation des B-Zelltranskriptionsfaktors E2A in B-Zelllinien unter Verwendung von shRNA-exprimierenden Retroviren.....	90
4.2	Expression des B-Zelltranskriptionsfaktors EBF1 in HL-Linien.....	91
4.2.1	Änderungen der Genexpression durch EBF1-Reexpression	92
4.2.2	Promotormethylierungen in EBF1-transduzierten Hodgkinzellen	97
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	99
5.	Zusammenfassung der Arbeit.....	102
6.	Literaturverzeichnis	103
7.	Anhang	116
7.1	Weitere Daten zur qRT-PCR der EBF1-Zielgene (3.2.2.1).....	116
	Publikationen	117
	Danksagung	118
	Eidesstattliche Erklärungen	119
	Lebenslauf.....	120

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BL	Burkitt Lymphom
BSA	Rinderalbumin aus Blutserum (engl. <i>Bovine serum albumin</i> oder "Fraction V")
C	Cytosin
CpG	CpG-Dinukleotid/Cytosin-Phosphat-Guanin (5' – 3')
SWR	Klassenwechsel (engl. class switch recombination)
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (engl. diffuse large B cell lymphoma)
DMEM	Zellkulturmedium: <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
EBF1	früher B-Zell-Faktor (engl. <i>early B cell factor</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat bzw. Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
FACS	Durchflusszytometrische Zellsortierung (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FDR	Rate der falsch-positiven Ergebnisse (engl. <i>false discovery rate</i>)
FL	Folikuläres Lymphom
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Keimzentrum (engl. germinal centre)
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSEA	Gengruppen Anreicherungs Analyse (engl. <i>gene set enrichment analyse</i>)
HF	High Fidelity Polymerase (Fermentas)
HL	Hodgkin-Lymphom
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IMDM	Iscove's Modifiziertes Dulbecco's Medium
LB	Medium zur Kultivierung von Bakterien (engl. <i>lysogeny broth</i>)
mA	milli Ampere
MACS	magnetisch-aktivierte Zellsortierung (engl. <i>magnetic activated cell sorting</i>)
Mi-2/NuRD	engl. <i>Mi-2/nucleosome remodeling and histone deacetylase</i>
MPP	multipotente Vorläuferzelle (engl. <i>multipotent progenitor</i>)

mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
MSigDB	Datenbank der GSEA (engl. <i>Molecular Signatures Database</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PBS ^{-/-}	PBS ohne Magnesium, ohne Calcium
PBS ^{+/+}	PBS mit Magnesium, mit Calcium
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RPMI	RPMI-1640, Lymphozytenmedium, entwickelt am Rosswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SHM	somatische Hypermutation
shRNA	kurze Haarnadeln-bildende RNA (engl. <i>short-hairpin RNA</i>)
siRNA	kleine inhibierende RNA (engl. <i>small interfering RNA</i>)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOB	komplexes Medium für Bakterienkultur (engl. <i>super optimal broth</i>)
SOC	SOB-Medium plus 20 mM Glucose
SWI/SNF	engl. related to yeast switch/sucrose non-Fermenter
T	Thymin
tGFP	TurboGFP/Turbo grün fluoreszierendes Protein
TMC	Tonsilläre mononukleäre Zellen (engl. <i>tonsillar mononuclear cells</i>)
U	Uracil
V	Volt
V	Viren
vs	versus
W	Watt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Expression von Transkriptionsfakoren im Laufe der B-Lymphopoese (Ramirez et al., 2010).....	14
Abbildung 2: Netzwerk von Transkriptionsfaktoren in B-Zellen (Kee, 2009)	15
Abbildung 3: Die Struktur von EBF1.....	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung des retroviralen Vektors pSM2.....	55
Abbildung 5: Analyse verschiedener env-Proteine auf die Infizierbarkeit von B-Zelllinien	59
Abbildung 6: Real-time PCR von shRNA-behandelten Karpas-422.....	60
Abbildung 7: Strategie zur Herstellung des Vektors pGIPZ-Spel.	61
Abbildung 8: EBF1-Expression in HL-Linien	63
Abbildung 9: Semiquantitative RT-PCR von EBF1 in EBF1- und <i>empty</i> -infizierten HL-Linien.....	64
Abbildung 10: EBF1-Proteinanalyse in EBF1- und <i>empty</i> -infizierten HL-Linien	65
Abbildung 11: Regulation von EBF1 Zielgenen in EBF1-infizierten HL-Linien.	67
Abbildung 12: EBF1-Zielgen qRT-PCR von EBF1- und <i>empty</i> -transduzierten HL-Linien.....	68
Abbildung 13: <i>Unsupervised Hierarchical Clustering</i> von transduzierter L-1236 und L-428	70
Abbildung 14: CD79A-Proteinanalyse in EBF1-transduzierten HL-Linien	77
Abbildung 15: Oligonukleotidpositionen der Bisulfidsequenzierungen	79
Abbildung 16: Komprimierte Darstellung der untersuchten PCR-Fragmente und Zelltypen.....	80
Abbildung 17: Darstellung aller sequenzierten CpGs der untersuchten PCR-Fragmente und Zelltypen	81
Abbildung 18: MTS-Assay von transduzierten L-1236-Zellen	84
Abbildung 19: PI/tGFP-FACS transduzierter HL-Linien.....	86
Abbildung 20: Replikate der tGFP qPCR zur Stabilitätsprüfung.....	87
Abbildung 21: Transduzierte Zellen der PI-positiven Population	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Zelllinien	26
Tabelle 2:	Mutationen in HL-Linien	28
Tabelle 3:	Oligonukleotidsequenzen der spezifischen Mutationen in HL Linien....	28
Tabelle 4:	PCR-Ansätze der spezifischen Mutationen in HL Linien	28
Tabelle 5:	Verwendete Restriktionsenzyme	36
Tabelle 6:	Kontrollfärbungen CD77-MACS	47
Tabelle 7:	Verwendete AK für Kontrollfärbung des CD77-MACS.....	47
Tabelle 8:	Färbeansätze CD20-CD38-Sortierung	47
Tabelle 9:	Zusammensetzung SDS-Polyacrylamid Gel.....	49
Tabelle 10:	Verwendete 1. Antikörper.....	50
Tabelle 11:	Verwendete 2. Antikörper.....	50
Tabelle 12:	Verwendete Plasmide zur Herstellung viraler Partikel.....	51
Tabelle 13:	Änderungen der qRT-PCR Gene in den Genchips.....	70
Tabelle 14:	Differentiell ausgeprägte Gene zwischen EBF1- und <i>empty</i> - transduzierten Zellen.....	71
Tabelle 15:	Gemeinsam ausgeprägte Gene zwischen den Linien L-1236 und L-428	73
Tabelle 16:	Überblick über die durch EBF1-Expression demethylierten CpGs	82
Tabelle 17:	$\Delta\Delta$ Ct-Werte der qRT-PCR der EBF1 Zielgen.....	116

1. Einleitung

Der in dieser Arbeit untersuchte Tumortyp, das Hodgkin-Lymphom (HL), hat seinen Ursprung in B-Zellen. Diese sind wichtiger Bestandteil des Immunsystems und werden daher im Folgenden in einen groben Kontext gestellt und deren Entwicklung genauer betrachtet.

1.1 Das humane Immunsystem

Die Aufgaben des Immunsystems bestehen in der Abwehr von Pathogenen wie z. B. Viren, Bakterien und Pilzen, anderen körperfremden Stoffen wie Toxinen und in der Vernichtung eigener entarteter Zellen. Es unterteilt sich in das evolutionär ältere angeborene Immunsystem und das jüngere adaptive Immunsystem, das ab der Überklasse der Gnathostomata (Kiefernäuler) beschrieben wird.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem, das auch unspezifisches Immunsystem genannt wird, liefert eine erste schnelle Reaktion auf Pathogene. Die Mehrheit der Infektionen im menschlichen Körper wird so abgewehrt. Teil dieses Systems sind physische Barrieren wie z. B. die Haut, die durch Sekretion von Lipiden und Peptiden außerdem noch bakterizid ist. Zelluläre Bestandteile sind eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, plasmazytoide dendritische Zellen, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK) und neutrophile Granulozyten. Einige der Zellen tragen Rezeptoren (z. B. toll-ähnliche Rezeptoren, engl. *Toll-like Receptor* - TLR) gegen Bestandteile von Pathogenen, die so spezifisch erkannt und über Phagozytose eliminiert werden können. Weiterer Bestandteil ist das Komplementsystem. Dies ist eine Gruppe von Plasmaproteinen, die der Abwehr von Mikroorganismen dient. Bei einer krankhaften Fehlfunktion kann aber auch eigenes Gewebe geschädigt werden. Bestimmte Proteinfragmente dieser Gruppe können die Membranen von Pathogenen bedecken und kennzeichnen diese somit für Phagozyten als fremd. Andere Fragmente locken als Chemokine weitere Phagozyten an. Einige Proteine des Komplementsystems bilden Poren in den Membranen von Bakterien, so dass diese auslaufen.

1.1.2 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem, das auch erworbenes Immunsystem genannt wird, erlernt den Umgang mit Pathogenen und kann diese Informationen in Form von Gedächtniszellen speichern. Es übt seine Aufgabe entweder direkt über Zellen

(zellvermittelte Immunantwort) oder über spezifische Antikörper (humorale Immunantwort) aus. Die Zellen des Adaptiven Immunsystems sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC), dendritische Zellen, sowie T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen). T-Zellen entwickeln sich im Knochenmark und im Thymus. Allen T-Zellen ist die Expression des T-Zellrezeptors (TCR) gemeinsam. Die drei Subtypen, zytotoxische T-Zelle, regulatorische T-Zelle und T-Helferzelle, haben jeweils unterschiedliche Funktionen. Erstere erkennen von Pathogenen befallene Zellen an einer Antigenpräsentation über den MHC-I-Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex) und können sie bei der Bindung weiterer Rezeptoren in die Apoptose treiben. Regulatorische T-Zellen überwachen die Immunantwort und verhindern damit überschießende Immunreaktionen, die dem Körper mehr schaden als nutzen. T-Helferzellen erkennen Antigene, die über den MHC-II-Komplex präsentiert werden. Je nach T-Helfer-Subtyp führt das zur Stimulierung der zellvermittelten oder humoralen Immunantwort. B-Zellen stammen postnatal aus dem Knochenmark und können sich in den Keimzentren der Lymphknoten oder Tonsillen weiter differenzieren. Sie produzieren antigenspezifische Antikörper, die das Antigen auf verschiedene Weise der Vernichtung zuführen. Die Vielzahl unterschiedlicher Antikörper ist nicht direkt durch die Keimbahn kodiert, sondern wird durch Prozesse wie V(D)J-Rekombination und somatische Hypermutation (SHM) gewonnen. B-Zellen werden entweder über die häufigere T-Zell-abhängige oder die seltenere T-Zell-unabhängige Immunantwort aktiviert. Bei der T-Zell-abhängigen Antwort werden Antigene über den B-Zellrezeptor (BCR) aufgenommen und diese T-Zellen über den MHC-II-Komplex präsentiert. Für die T-Zell-unabhängige Antwort wird nur die Aufnahme bestimmter Antigene durch den BCR benötigt; die folgende Reaktion ist jedoch nicht so intensiv und lang anhaltend wie die durch T-Zellen stimulierte.

1.1.3 B-Zellentwicklung

Die B-Zellentwicklung beginnt im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. In einer festgelegten Reihenfolge findet mit Hilfe der Enzyme RAG-1 und RAG-2 (*recombination-activating genes*) die somatische Rekombination der Immunglobuline (Ig) statt (McBlane et al., 1995), die jede B-Zelle mit einem individuellen BCR ausstattet. Der Antikörper (AK) besteht aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten, die jeweils eine variable und eine konstante Region enthalten. Die variable Region der schweren Ketten besteht aus je einem V-, D- und

J-Segment, die der leichten Ketten aus je einem V- und J-Segment. Von jedem dieser Segmente sind zwischen vier und 50 Stück je Allel vorhanden (Cook und Tomlinson, 1995; Hieter et al., 1982; Kawasaki et al., 1997; Schable und Zachau, 1993; Vasicek und Leder, 1990; Williams et al., 1996). In der schweren Kette wird zunächst D mit J verknüpft, dann V mit DJ. In der leichten Kette wird V direkt mit J verknüpft. Es wird zunächst die schwere Kette, dann die leichte Kette hergestellt. Es gibt einen schwere Kettenlocus, von dem nur ein Allel vollständig rekombiniert wird. Wenn das entstandene Protein nicht funktional ist, wird das zweite Allel rekombiniert. Ähnlich wird auch bei der leichten Kette verfahren, nur dass hier zwei Loci existieren, Igk und Igl. Zuerst werden die κ -Allele rekombiniert und ggf. anschließend die λ -Allele (Blackwell und Alt, 1989; Gellert, 2002). Die Verbindung der VDJ- bzw. VJ-Segmente findet nicht basengenau statt, so dass hier über zwei verschiedene Wege P- bzw. N-Nukleotide eingefügt werden können. Der so entstehende BCR wird im Laufe der V(D)J-Rekombination mehrfach auf Funktionalität und Autoreaktivität geprüft. Zellen die keine weiteren Möglichkeiten einer sinnvollen Rekombination haben oder autoreaktiv sind, werden eliminiert. Überlebende Zellen verlassen als naive B-Zellen das Knochenmark und zirkulieren im Blut und im peripheren lymphatischen Gewebe.

In einem Keimzentrum (GC, engl. germinal centre), z. B. in Tonsillen oder Lymphknoten, wird der BCR von aktivierten B-Zellen, die Kontakt zu einem passenden Antigen hatten und von T-Zellen aktiviert wurden, modifiziert (Küppers et al., 1993). Die sogenannten Centroblasten proliferieren im GC stark; ihre Verdopplungszeit beträgt nur sechs bis zwölf Stunden (Allen et al., 2007; MacLennan, 1994). Die V-Gene der Centroblasten werden im GC mutiert, so dass die Wahrscheinlichkeit steigt, dass ein noch spezifischerer AK entsteht. Entscheidendes Enzym für die sogenannte SHM ist AID (*activation-induced cytidine deaminase*) (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). AID desaminiert vorwiegend Cytidine von spezifischen Erkennungssequenzen der DNA der variablen Regionen ($V_H D_H J_H$ und $V_L J_L$) der schweren und leichten Immunglobuline in Centroblasten (Neuberger und Milstein, 1995; Rogozin und Kolchanov, 1992). Das entstehende Uracil wird mit Hilfe fehleranfälliger Reparaturmechanismen inkorrekt ausgetauscht, so dass hauptsächlich Punktmutationen seltener Deletionen oder Duplikationen entstehen (Goossens et al., 1998). Die Antigenaffinität des neuen BCRs der sogenannten Centrocyten wird mit Hilfe von T-Zellen und follikulären dendritischen

Zellen im GC getestet. Rezeptoren mit geringerer Affinität oder Autoreaktivität führen die Zelle der Apoptose zu. Eine verbesserte Affinität kann zu einer nochmaligen SHM (Kepler und Perelson, 1993) oder zu der weiteren Differenzierung führen.

Centrocyten können im GC einer weiteren somatischen Veränderung unterliegen, dem Klassenwechsel (CSR, engl. class switch recombination). Naive B-Zellen exprimieren IgM und IgD, die durch alternatives Spleißen gewonnen werden. Beim CSR findet eine Veränderung des C-Terminus der schweren Kette auf genomischer Ebene statt. Die stromaufwärts liegenden Isotypen IgM und IgD werden über DNA Rekombination mit Hilfe des sogenannten *non-homologous end joining* aus der DNA entfernt und der nun nächstliegende Isotyp (IgG, IgA oder IgE) exprimiert. Die unterschiedlichen Isotypen haben jeweils verschiedene Aufgaben und Wirkbereiche. Bedeutendes Enzym für diese Reaktion ist ebenfalls AID (Muramatsu et al., 2000; Okazaki et al., 2002; Revy et al., 2000). Der CSR kann auch unabhängig von T-Zellen außerhalb des GCs erfolgen. Zellen, die das GC verlassen, differenzieren zu Gedächtnis-B-Zellen oder Antikörper sezernierenden Plasmazellen.

1.1.4 Transkriptionsfaktoren der B-Zellentwicklung

Die Entwicklung von B-Zellen kann aus Sicht der aktiven Transkriptionsfaktoren in mindestens drei Bereiche unterteilt werden: a) Entwicklung von Hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zur B-Zelle, b) Aufrechterhaltung des B-Zellprofils und c) Differenzierung von GC-B-Zellen zu AK sezernierenden Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen. Aufgrund einer Vielzahl von Mausmodellen sind die Daten mehrheitlich in der Maus gewonnen, es wird jedoch angenommen, dass diese überwiegend auf das humane System übertragbar sind.

Wichtige Transkriptionsfaktoren in der frühesten B-Zellentwicklung sind Ikaros (Gen: *Ikzf1*), Gfi1, PU.1 (SPI-1; Gen: *Sfp1*) und E2A (TCF-3, E12/E47; Gen: *Tcf2a*) (Abbildung 1). PU.1 entscheidet mit seinem Expressionslevel über eine myeloide oder lymphoide Entwicklung (DeKoter und Singh, 2000). Ein niedriger Spiegel führt dabei zu B-Zellen ein hoher zu myeloiden Zellen. Gfi1 ist ein Repressor, der in der Lage ist die positive autoregulatorische Expression von PU.1 zu durchbrechen (Spooner et al., 2009), wodurch der PU.1 Level sinkt und die lymphoide Linie bevorzugt wird. Die Expression von Gfi1 wiederum wird vom Transkriptionsfaktor Ikaros begünstigt. Zusammen mit E2A leiten Ikaros und PU.1 die Transkription verschiedener lymphoider Gene ein (Dias et al., 2008).

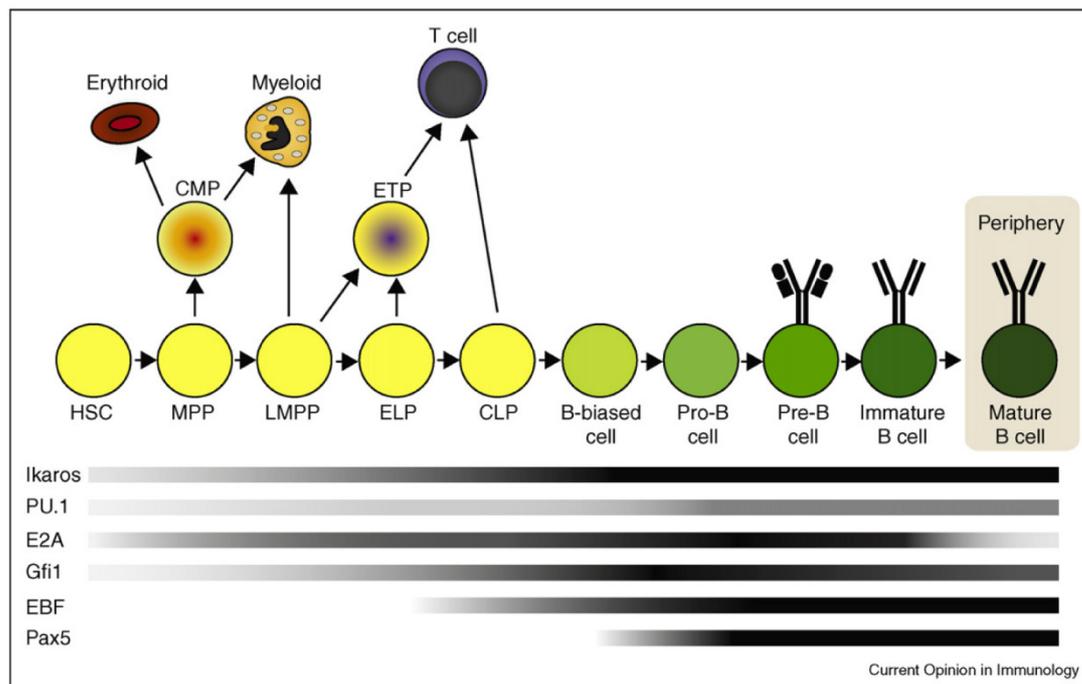


Abbildung 1: Expression von Transkriptionsfaktoren im Laufe der B-Lymphopoese (Ramirez et al., 2010)

Die schattierten Balken zeigen, in welchen Entwicklungsstufen die Transkriptionsfaktoren exprimiert werden. Die Grau-Intensität stellt den Expressionslevel dar, wobei schwarz hohe Expression bedeutet. HSC (*hematopoietic stem cell*), MPP (*multipotent progenitor*), LMPP (*lymphoid-primed MPP*), ELP (*early lymphoid progenitor*), CLP (*common lymphoid progenitor*), CMP (*common myeloid progenitor*), ETP (*early T lineage progenitor*).

Haupttranskriptionsfaktoren der B-Zelle sind E2A, EBF1 (*early B cell factor 1*; OLF1; COE-1 - *Collier, Olf and EBF transcription factor 1*) und PAX5 (*paired box gene 5*; BSAP - *B cell specific activator protein*) (Bain et al., 1994; Lin und Grosschedl, 1995; Urbanek et al., 1994; Zhuang et al., 1994). Frühere Analysen u. a. mit sogenannten knockout (ko) Mäusen legten den Schluss nahe, dass E2A EBF1 aktiviert und dieses wiederum PAX5. Mit der Zeit hat sich das Bild erweitert und es scheint eher ein Netz von Regulationen zu sein (Abbildung 2). Alle drei Faktoren werden in der weiteren B-Zellentwicklung, mit Ausnahme der Plasmazellen, exprimiert. Viele B-Zellgene werden von verschiedenen Kombinationen dieser Transkriptionsfaktoren gemeinsam reguliert.

Von E2A werden zwei Spleißvarianten E12 und E47 exprimiert (Murre et al., 1989). Durch die komplette Abschaltung von E2A in Mäusen bleibt die B-Zellentwicklung im Stadium der Pro-B-Zelle stehen (Bain et al., 1994; Zhuang et al., 1994). In sogenannten *conditional knockouts* zeigt sich, dass E2A für Pro-B-, Pre-B- und unreifen B-Zellen im Knochenmark notwendig ist, außerdem ist hier die Entwicklung der Keimzentren gestört. Entbehrlich ist E2A für reife B-Zellen und Plasmazellen (Kwon et al., 2008). Transkriptionsfaktoren anderer Linien wie z. B. Notch1 aus der

T-Zelllinie und ID2 aus der NK-Linie, können E2A und damit die B-Zelllinie inhibieren (Becker-Herman et al., 2002; Nie et al., 2003; Ordentlich et al., 1998).

EBF1 wird in den CLPs über IL-7 (IL-7 → IL-7R → pSTAT5) (Dias et al., 2005) und u. a. über E2A (Roessler et al., 2007; Smith et al., 2002) aktiviert (siehe 1.1.5). Zusammen mit E2A kann EBF1 die Expression verschiedener B-zellspezifischer Gene, wie z. B. $\lambda 5$, VpreB, CD79A (Ig α , mb-1), CD79B (Ig β , B29), RAG1 und RAG2 positiv regulieren (O'Riordan und Grosschedl, 1999). Zielgen von EBF1 ist außerdem PAX5 (O'Riordan und Grosschedl, 1999).

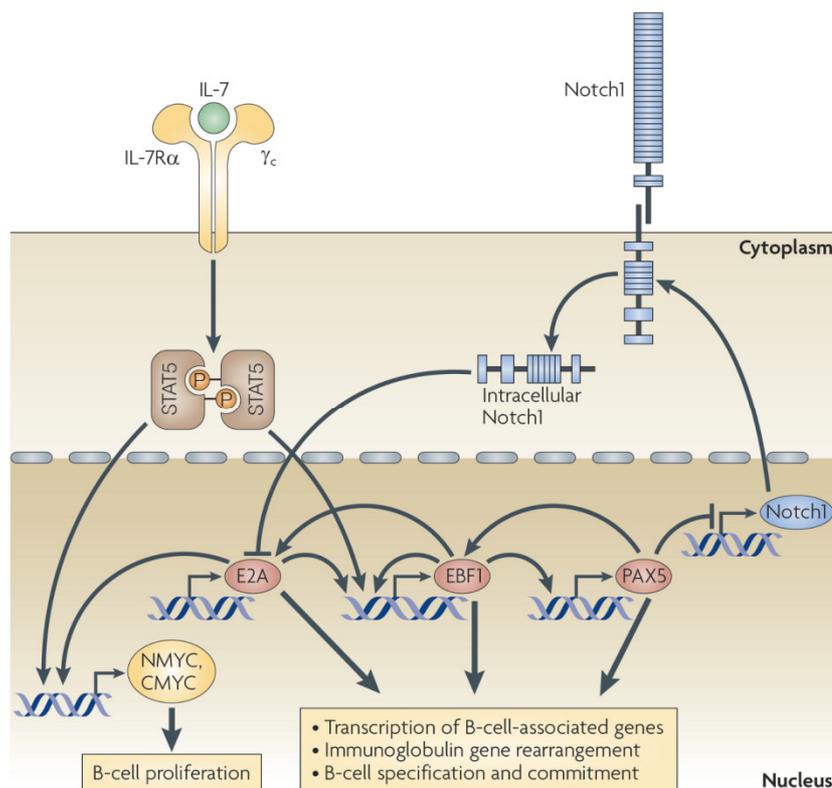


Abbildung 2: Netzwerk von Transkriptionsfaktoren in B-Zellen (Kee, 2009)

E2A und IL-7-Signale aktivieren EBF1, wobei E2A in CLP durch Notch1-Signale abgebaut werden kann. Gewinnen E2A und EBF1 die Oberhand und aktivieren PAX5, so kann PAX5 die Notch1-Transkription inhibieren. PAX5 aktiviert auch EBF1, EBF1 wiederum sich selbst und E2A, so dass eine stabile Expression der drei Haupttranskriptionsfaktoren in B-Zellen aufgebaut werden kann.

Der PAX5-Locus hat zwei verschiedene Promotoren (Busslinger et al., 1996; Palmisano et al., 2003), die zu zwei alternativen Exon 1 führen. Über alternatives Spleißen werden verschiedene Isoformen in normalen und malignen B-Zellen exprimiert (Arseneau et al., 2009). Ein sogenannter *Enhancer* in Intron 5 hat Bindungsstellen für PU.1, IRF4, IRF8 und NF- κ B (Decker et al., 2009). EBF1 produziert im PAX5 Promotor hypersensitive Stellen, die Transkription ermöglichen (Decker et al., 2009). Die Expression von PAX5 erfolgt in der Pro-B-Zelle (VDJ-

Rekombination der schweren Kette). Die Funktion liegt in der Unterdrückung fremder Gene, wie z. B. Repression des T-Zell Faktors Notch1 und Aktivierung von B-zelltypischen Genen (Delogu et al., 2006; Holmes et al., 2008; Pridans et al., 2008; Schebesta et al., 2007; Souabni et al., 2002).

Nach der Aktivierung durch T-Zellen regulieren B-Zellen BCL6 (B cell CLL/lymphoma 6), ein Repressor, der die Keimzentrumsreaktion und Antikörperreifung kontrolliert, hoch (Dent et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ye et al., 1997). Zum Ende der Keimzentrumsreaktion wird die BCL6 Expression durch BCR- und CD40-Signale wieder heruntergefahren. Weiterer Faktor in Keimzentren ist BOB1 (OCAB, POU2af1: POU domain class 2, associating factor 1), dessen Fehlen in ko Mäusen die Bildung von Keimzentren und CSR stört (Hess et al., 2001; Kim et al., 1996; Schubart et al., 1996). BOB1 stimuliert zusammen mit OCT1 (*Octamer-binding transcription factor 1*) und OCT2 die Transkription von Ig-Genen (Scheidereit et al., 1987; Shah et al., 1997).

Um nach der erfolgreich abgeschlossenen Keimzentrumsreaktion Antikörper sezernierende Plasmazellen zu bilden, wird PAX5 herunterreguliert und Blimp1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*; Gen: Prdm 1) hochreguliert (Kallies et al., 2007; Nera et al., 2006; Turner et al., 1994). Letzteres kann erst nach Herunterregulation von BCL6 erfolgen, da Blimp1 ein reprimiertes Zielgen von BCL6 ist (Shaffer et al., 2000). Gleichzeitig ist Blimp1 in der Lage BCL6 auszuschalten, ebenso wie E2A, EBF1, PAX5, Ikaros und PU.1 (Schebesta et al., 2002; Shaffer et al., 2002), wodurch weitere typische B-Zellgene herunterreguliert werden. Neben XBP1 (*X-box binding protein*) (Reimold et al., 2001) ist auch IRF4 (*interferon regulatory factor 4*, MUM1) (Klein et al., 2006; Sciammas et al., 2006) ein Faktor, der für die vollständige Differenzierung von Plasmazellen notwendig ist. Ebenso wie Blimp1 ist IRF4 (Saito et al., 2007; Sciammas et al., 2006) in der Lage BCL6 zu reprimieren, wodurch die Zelle die Möglichkeit bekommt sich weiter zu differenzieren.

Die Zusammenhänge zur Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen sind bisher nicht gut untersucht. Es bestehen Widersprüche über die Notwendigkeit von BCL6. Auf der einen Seite scheint BCL6 nicht für Gedächtnis-B-Zellen notwendig zu sein (Kuo et al., 2007; Toyama et al., 2002). Auf der anderen Seite wird beschrieben, dass phosphoryliertes STAT5 über die Expression von BCL6 die weitere Differenzierung in

Richtung Gedächtnis-B-Zellen lenkt (Scheeren et al., 2005). Hier besteht weiterer Klärungsbedarf, insbesondere über die Rolle von STAT5.

Neben den hier erwähnten Transkriptionsfaktoren gibt es noch einige weitere, die eventuell nicht essentiell sind, oder deren Bedeutung aufgrund mangelnden Wissens zurzeit unterschätzt wird.

1.1.5 Early B Cell Factor 1 (EBF1)

EBF1 ist Teil der EBF/Olf/Collier-Familie. EBF bedeutet *early B cell factor*, OLF stammt von *olfactory neuronal transcription factor 1*, Collier beruht auf einem entsprechenden Gen aus *Drosophila melanogaster*. EBF1 wird auch COE1 genannt, entsprechend der Bedeutung *Collier, Olf and EBF transcription factor 1*. Die Familie wird ab den Metazoen exprimiert und hat in Maus und Mensch je vier Mitglieder (Daburon et al., 2008). EBF1 wird nicht nur in B-Zellen, sondern auch in Neuronen und Adipozyten ausgeprägt (Akerblad et al., 2002; Wang und Reed, 1993; Wang et al., 1997).

Das 591 Aminosäuren lange Protein besteht aus mehreren Domänen (Abbildung 3). N-Terminal beginnt es mit der DNA-binde-Domäne (DBD) mit einem sogenannten *Zinc-knuckle* gefolgt von der IPT/TIG-Domäne (*immunoglobulin, plexins, transcription factors-like/transcription factor immunoglobulin*) und einer atypischen helix-loop-helix Domäne. C-Terminal schließt das Protein mit einer Transaktivierungsdomäne (TAD) ab. Die DBD ist mitsamt Zn-knuckle für DNA-Bindung zuständig; sie bindet die palindromische Konsensussequenz 5'-TCCCNNGGGA-3' (Travis et al., 1993; Treiber et al., 2010b). Die ITP/TIG-Domäne scheint ebenso wie die HLHLH-Domäne die Homodimerisierung zu vollziehen (Fields et al., 2008; Hagman et al., 1995; Siponen et al., 2010; Treiber et al., 2010a). Die atypische Helix-Loop-Helix-Domäne ist evolutionär aus verdoppelten Exons entstanden (Daburon et al., 2008).

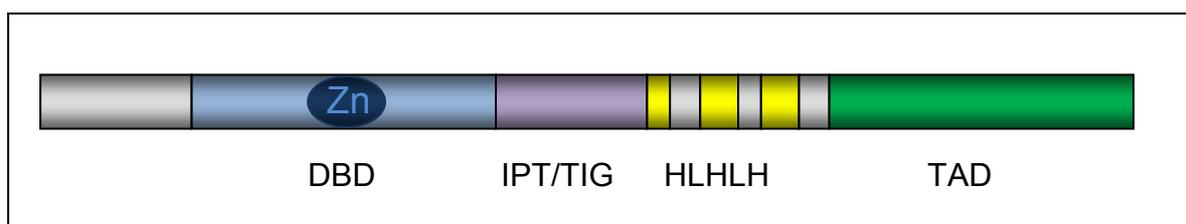


Abbildung 3: Die Struktur von EBF1

DBD - DNA-binde-Domäne; Zn – *zinc-knuckle*; IPT/TIG - *immunoglobulin, plexins, transcription factors-like/transcription factor immunoglobulin*; HLHLH - atypische *helix-loop-helix* Domäne, besser *helix-loop-helix-loop-helix*; TAD - Transaktivierungsdomäne

EBF1 besitzt zwei Promotoren. Der etwas schwächere, stromaufwärts liegende (Ebf1 α) wird von IL-7-Signalen, E47 und EBF1 selbst reguliert. Der stärkere Promotor (Ebf1 β) wird von Ets1, PAX5 und PU.1 aktiviert (Roessler et al., 2007; Smith et al., 2002). Es entstehen zwei Isoformen, die sich in bisherigen Untersuchungen funktional nicht unterscheiden (Roessler et al., 2007).

In EBF1 *knockout* Mäusen entwickeln sich B-Zellen nur bis zum Beginn der IgH Rekombination, es ist folglich essentiell für die weitere Differenzierung der B-Zelllinie (Lin und Grosschedl, 1995). In der Vergangenheit wurde PAX5 als wichtigster Faktor der B-Zellentwicklung und Aufrechterhaltung bezeichnet (Cobaleda et al., 2007). Eventuell wird hier die Bedeutung von EBF1 unterschätzt, das in Zellen ohne PU.1, IL-7R, IL-7 oder E2A in der Lage ist, die B-Zellentwicklung zu vollziehen (Dias et al., 2005; Kikuchi et al., 2005; Medina et al., 2004; Seet et al., 2004). In den E2A defizienten B-Vorläuferzellen wird gezeigt, dass die Expression von EBF1 zu CD19-positiven Zellen geführt hat, während durch die Reexpression von PAX5 in diesen Zellen sich keine CD19-positiven Zellen entwickeln (Seet et al., 2004). Ebenso kann es in Vorläuferzellen (MPP), die kein PAX5 exprimieren, alternative Linien unterdrücken und die B-Zelldifferenzierung einleiten. Dabei wurde in Pro-B-Zellen festgestellt, dass Notch1 (T-Zellfaktor) und ID2 (NK-Zellfaktor), auch unabhängig von PAX5, durch EBF1 in der Expression unterdrückt werden (Pongubala et al., 2008). Im Gegenzug dazu scheint Notch1 aber auch in der Lage zu sein die DNA-Bindung von EBF1 zu stören (Smith et al., 2005). Untersuchungen zu der vermutlich bisher umfangreichsten Liste positiv und negativ regulierter EBF1 Zielgene der Maus zeigen auch, dass viele dieser Gene in Kollaboration mit anderen wichtigen Transkriptionsfaktoren wie E2A und insbesondere PAX5 exprimiert werden (Treiber et al., 2010b).

EBF1 scheint auch bei der Modifizierung von Chromatin eine Rolle zu spielen. Für den CD79A-Locus (mb-1) wurde gezeigt, dass EBF1 CpGs demethylieren und Chromatin umstrukturieren kann (Maier et al., 2004). Weitere Analysen legen dar, dass EBF1 mit Unterstützung von PAX5 über Chromatin umstrukturierende Komplexe den CD79A-Promotor umorganisieren kann; SWI/SNF spielt dabei eine aktivierende Rolle, während Mi-2/NuRD hemmend wirkt (Gao et al., 2009). EBF1-Expression in einer T-Vorläuferzelllinie zeigt, dass es in der Lage ist, Promotoren positiver Zielgene zu besetzen und entsprechende Histone über H3K4m2 zu

modifizieren, was für ein zur Transkription vorbereitetes Chromatin spricht (Treiber et al., 2010b).

1.2 Maligne Lymphome

Lymphome sind monoklonale Neoplasien der lymphoiden Zellen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) teilt diese in Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und HL ein (Swerdlow, 2008). Die NHL werden in B-Zell-, T-Zell- und NK-Zelllymphome unterteilt. Das HL gehört zu den B-Zelllymphomen, obwohl es gelegentlich (in ca. 1 - 2 % der Fälle) von T-Zellen abstammt (Muschen et al., 2000a; Seitz et al., 2000). Eine weitere Unterteilung der Gruppen findet unter zytomorphologischen, immunologischen und genetischen Gesichtspunkten statt.

Etwa 95 % der Lymphome haben ihren Ursprung in B-Zellen (Küppers, 2005). Dies liegt vermutlich darin begründet, dass die B-Zellentwicklung mehrere Prozesse beinhaltet, die transformierende Ereignisse in den Zellen hervorrufen können. Reziproke chromosomale Translokationen können bei der V(D)J-Rekombination im Knochenmark sowie der SHM oder dem CSR im GC entstehen, da hier DNA-Strangbrüche induziert werden. Die SHM kann in Form von der aberranten SHM (ASHM) auch nicht Ig-Gene betreffen (Gordon et al., 2003; Liu et al., 2008; Muschen et al., 2000b). Wie in der SHM ist auch hier nur die 5'-Region der Gene betroffen. Bekanntestes betroffenes Gen ist der Keimzentrumsfaktor BCL6 (Pasqualucci et al., 1998; Shen et al., 1998). B-Zelllymphome (B-NHL) stammen vorwiegend von Keimzentrums- oder Postkeimzentrums-B-Zellen ab, wie Analysen der somatisch mutierten IgV-Gene gezeigt haben (Küppers et al., 1999; Stevenson et al., 1998).

1.2.1 B-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL)

Es gibt eine Vielzahl von Lymphomen, die in indolente (schmerzfrei – langsam verlaufend) und aggressive Entitäten unterteilt werden. Die beiden häufigsten B-NHL sind das Diffus großzellige B-Zell-Lymphom und das Follikuläre Lymphom, die ca. ein Drittel bzw. ein Fünftel aller B-NHL ausmachen. Das Burkitt-Lymphom ist mit 2 % aller B-NHL eher selten. Es betrifft im Allgemeinen Kinder und Jugendliche und ist in dieser Population mit 35 % als häufig zu bezeichnen (Fisher, 2003). In vielen B-NHL sind die Ig-Gene an chromosomalen Translokationen beteiligt (Küppers und Dalla-Favera, 2001).

1.2.1.1 Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)

Das DLBCL gehört zu den aggressiven Lymphomen und wird in drei Gruppen unterteilt, die über Microarrayanalysen festgelegt wurden: Das *GC-DLBCL* (*germinal centre-like*), das *ABC-DLBCL* (*activated B cell-like*) und das seltene *primär mediastinale B-Zell-Lymphom* (PMBL) (Alizadeh et al., 2000; Rosenwald et al., 2002; Rosenwald et al., 2003; Savage et al., 2003; Wright et al., 2003). Die drei Subtypen entstehen aus unterschiedlichen Differenzierungsstufen von B-Zellen, verwenden unterschiedliche onkogene Signalwege und werden unterschiedlich behandelt (Staudt und Dave, 2005). Im Gegensatz zum GC-DLBCL haben ABC-DLBCL und PMBL einen konstitutiven NF- κ B Signalweg. Außerdem wurde in den Genexpressionsanalysen entdeckt, dass PMBL dem HL auf molekularer Ebene ähnelt. Typische genetische Veränderungen sind BCL2/IgH Translokationen und Rel-Amplifikation im GC-DLBCL, BCL6-Translokationen im ABC-DLBCL und PMBL sowie Rel-Amplifikationen ebenfalls im PMBL (Iqbal et al., 2007; Joos et al., 1996; Rosenwald et al., 2002). Sowohl GC-DLBCL als auch ABC-DLBCL zeigen mutierte IgV-Gene, was auf einen Keimzentrumsursprung hinweist, wobei SHM im ABC-Typ nicht mehr aktiv ist (Lossos et al., 2000).

1.2.1.2 Follikuläres Lymphom (FL)

Das FL gehört zu den indolenten Lymphomen. Eine rasche Medikation ist meist nicht notwendig. In einigen Fällen kann es sich aber im langjährigen Verlauf zu einem aggressiven sekundären B-NHL entwickeln (Bende et al., 2007). In 90 % der Fälle ist eine IgH-Translokation mit dem anti-apoptotischen BCL2 (BCL2/IgH) vorhanden (Bende et al., 2007; Cleary und Sklar, 1985; Tsujimoto et al., 1985), die allein aber nicht pathogen ist, wie normale Zellen die diese Translokation tragen, zeigen. Weitere transformierende Ereignisse sind bisher nicht beschrieben. Wie mutierte IgV-Gene und aktive SHM zeigen, stammt das FL vermutlich von GC-B-Zellen ab (Bahler und Levy, 1992).

1.2.1.3 Burkitt Lymphom (BL)

Das BL gehört ebenfalls zu den aggressiven Lymphomen. Es wird in drei Typen unterteilt: Das *endemische BL*, das eine der häufigsten Tumorerkrankung von Kindern in Malaria verseuchten Gebieten des tropischen Afrikas ist und auch vorwiegend dort vorkommt. Es ist in 95 % der Fälle mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) assoziiert. Das *sporadische BL*, das überwiegend in gemäßigten Klimazonen

vorkommt und nur in 30 % der Fälle mit EBV assoziiert ist (Kutok und Wang, 2006). Das HIV-assoziierte BL, das in Kombination mit einer HIV-Infektion auftritt. Das BL ist ein extrem schnell wachsender Tumor. Ursprung des BLs ist wahrscheinlich das GC, wie die CD77-Expression (Aiello et al., 1990) und die mutierten IgV-Gene mit aktiver SHM vermuten lassen (Chapman et al., 1995; Klein et al., 1995). Gemeinsam ist allen Subtypen die MYC/Ig Translokation (Hummel et al., 2006). Häufig ist das BL auch mit Mutationen in p53 assoziiert (Gaidano et al., 1991).

1.2.2 Hodgkin-Lymphom (HL)

Das HL ist in der westlichen Welt eines der häufigsten Lymphome. Bevorzugt trifft es Menschen im Alter von 20 bis 30 Jahren oder wieder ab dem 65. Lebensjahr, dabei erkranken Männer etwas häufiger als Frauen. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei etwa drei Fällen pro 100.000 Einwohner. Symptome sind u. a. schmerzlose Lymphknotenschwellungen am Hals oder hinter dem Brustbein (Mediastinum), Fieber, Gewichtsverlust, Müdigkeit. Über Chemo- und/oder Strahlentherapie werden mittlerweile ca. 90 % der früh diagnostizierten Patienten geheilt (Diehl et al., 2005). Dennoch ist die allgemeine Lebenserwartung aufgrund von Sekundärerkrankungen durch die Therapie reduziert (Aleman et al., 2003; Hancock und Hoppe, 1996; Henry-Amar und Somers, 1990; Mauch et al., 1995; Ng et al., 2002). Es wird über Morphologie, Immunophänotyp und Klinik in zwei Gruppen unterteilt, das *klassische HL* (cHL; ca. 93 % der HL) und das *noduläre Lymphozyten-prädominanten HL* (NLPHL; ca. 7%). Das cHL wird histologisch weiterhin unterteilt in nodulär-sklerosierend (ca. 60 % der HL), gemischtzellig (28 %), lymphozytenreich (5%) und lymphozytenarm (0,3 %). Typisch für das cHL sind die großen einkernigen bzw. mehrkernigen Hodgkin-/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen, die nur ca. 1 % des Tumorgewebes ausmachen. Das die HRS-Zellen umgebende Gewebe ist infiltriert von T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen (Weiss, 2007).

Der Ursprung des cHL ist im Allgemeinen eine reife B-Zelle. Erst spät wurde über Einzelzellanalysen gezeigt, dass HRS-Zellen rekombinierte V-Gene haben, die bedingt durch SHM mutiert und innerhalb eines Tumors klonal verwandt sind (Bräuninger et al., 1999; Irsch et al., 1998; Kanzler et al., 1996; Küppers et al., 1994). Ca. 25 % der cHL-Fälle zeigen sogenannte "verkrüppelte" BCRs (Kanzler et al., 1996). Dies würde in normalen B-Zellen zu Apoptose führen (Lam et al., 1997) und

lässt für das cHL annehmen, dass der Ursprung dieser Entität in prä-apoptischen GC-B-Zellen liegt, die durch weitere, transformierende Ereignisse der Apoptose entkommen sind (Kanzler et al., 1996; Küppers et al., 1998). Viele Fälle mit verkrüppelten BCRs sind gleichzeitig EBV-positiv (Bräuninger et al., 2006). EBV kann durch die Expression von LMP2a die BCR-Aktivität imitieren und stellt somit eventuell einen Mechanismus zum Überleben dar (Bechtel et al., 2005; Caldwell et al., 1998; Mancao und Hammerschmidt, 2007). In seltenen Fällen stammt das cHL auch von T-Zellen ab, wie die Anwesenheit eines rekombinierten TCR in Abwesenheit eines rekombinierten BCR zeigt (Muschen et al., 2000a; Seitz et al., 2000).

Das HL hat einen konstitutiven NF- κ B-Signalweg, ein Fehlen dieses Signals führt in HL-Linien zur Apoptose (Bargou et al., 1997). Die Oberflächenrezeptoren CD30, CD40 und RANK, die auf HRS-Zellen exprimiert werden, können NF- κ B aktivieren (Carbone et al., 1995a; Carbone et al., 1995b; Fiumara et al., 2001; Horie et al., 2002). Verschiedene Mutationen in Proteinen, die am NF- κ B-Weg beteiligt sind, aktivieren diesen Signalweg ebenfalls: Chromosomale Gewinne von Rel (40 % der Fälle) und NIK (20 %, *NF- κ B-*incucing kinase*) sowie inaktivierende Mutationen in NF- κ B-Inhibitoren I κ B α (10%, NFKBIA), I κ B ϵ (10 %, NFKBIE) und A20 (40%, TNFAIP3) (Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 1999; Joos et al., 2002; Jungnickel et al., 2000; Kato et al., 2009; Lake et al., 2009; Martin-Subero et al., 2002; Schmitz et al., 2009a; Steidl et al., 2010). Interessanterweise tritt die A20-Mutation vorwiegend in EBV-negativen Fällen auf. In EBV-positiven Fällen ist das Virusprotein LMP1 in der Lage CD40 zu imitieren und so NF- κ B zu aktivieren (Gires et al., 1997). Eine kürzlich im Internet erschienene Publikation zeigt, dass Notch1 ebenfalls NF- κ B im HL aktivieren kann (Schwarzer et al., 2011).*

Ebenfalls konstitutiv aktiv ist der JAK/STAT-Signalweg (Januskinasen - *Just another kinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription*) im HL (Baus und Pfitzner, 2006; Kube et al., 2001; Scheeren et al., 2008; Skinnider et al., 2002). Inaktivierende Mutationen im SOCS1-Gen, einem negativen Regulator von STAT-Aktivität, sind in 40 % der HL Fälle gefunden worden (Weniger et al., 2006). Es wird außerdem noch eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs durch die Cytokine IL13 und IL21, die von HRS-Zellen exprimiert werden, beschrieben (Kapp et al., 1999; Lamprecht et al., 2008). Eine chromosomale Amplifikation von 9p24, in der JAK2 liegt, wurde im HL auch nachgewiesen (Joos et al., 2003; Joos et al., 2000).

Beim cHL wird von einem Verlust der B-Zellidentität gesprochen. Dies zeigt sich durch einen Phänotyp der sowohl in immunhistologischen Analysen als auch auf molekularer Ebene keiner normalen hämatopoetischen Linie ähnelt. So haben Genexpressionsanalysen gezeigt, dass es einen allgemeinen Verlust der Expression von B-zellspezifischen Genen gibt (Schwering et al., 2003). Betroffen sind u. a. Gene wie CD79A, CD79B, CD20, CD19, BLNK, BOB1 (OBF), Pu.1 (Spi1) und OCT2 (Re et al., 2001; Stein et al., 2001; Torlakovic et al., 2001; Watanabe et al., 2000). Linienfremde Gene, wie z. B. Granzym B, CD3 und CD4 der T-Zelle, TARC und Fascin der dendritischen Zelle sowie CD15 der Granulozyten und auch wichtige Transkriptionsfaktoren wie Notch1 (T-Zelle), Gata3 (T-Zelle) und ID2 (NK-Zelle) werden dagegen in HRS-Zellen ausgeprägt (Atayar et al., 2005; Jundt et al., 2002b; Oudejans et al., 1996; Pinkus et al., 1997; Renne et al., 2006; van den Berg et al., 1999). Es wird spekuliert, dass der Verlust der B-Zellgene zum Überleben der HRS-Zellen beiträgt. Eine normale B-Zelle benötigt zum Überleben ein konstitutives BCR-Signal; fehlt dieses, so wird die Apoptose eingeleitet. Zellen mit defekten BCR können somit nur überleben, wenn sie ihren Phänotyp verändern. Bisher wurde noch kein transformierendes Ereignis beschrieben, das diese Reprogrammierung auslöst.

Die heterogene Expression verschiedener Regulatorproteine hat auch Einflüsse auf die drei Haupt-B-Zelltranskriptionsfaktoren E2A, EBF1 und PAX5. Der B-Zelltranskriptionsfaktor E2A wird in HRS-Zellen exprimiert (Hertel et al., 2002; Mathas et al., 2006), jedoch meist schwächer als in Kontrollzellen. Außerdem wird er von den zwei linienfremden Proteinen ID2 (inhibitor of differentiation and DNA binding 2; NK-Zellen) und ABF1 (activated B cell factor) an der Ausübung seiner Funktion als Transkriptionsfaktor gestört (Küppers et al., 2003; Mathas et al., 2006; Renne et al., 2006). EBF1 mRNA wird im Vergleich zu Kontrollzellen schwächer bis gar nicht in HL-Linien ausgeprägt (Hertel et al., 2002; Mathas et al., 2006). Interessanterweise zeigt EBF1 in Linien, die von T-Zellen abstammen eine stärkere Expression als in B-Zell-HL-Linien (Hertel et al., 2002). Eine immunhistologische Untersuchung der EBF1-Expression in primären Fällen steht noch aus. Notch1, das stark in HRS-Zellen exprimiert wird (Jundt et al., 2002a), scheint in diesen die Expression von E2A und EBF1 und seiner Zielgene zu inhibieren (Jundt et al., 2008). PAX5 wird häufig im cHL exprimiert. Es gibt jedoch große Variationen in der Anzahl wie auch in der Intensität der positiven Zellen von primären Fällen; ebenso zeigen die Linien nur teilweise eine meist schwächere Expression (Foss et al., 1999; Hertel et

al., 2002; Krenacs et al., 1998; Mathas et al., 2006). Untersuchungen auf Mutationen im PAX5-Gen in HL-Linien verliefen negativ (Schwering et al., 2003).

Neben dem gestörten Gleichgewicht der Transkriptionsfaktoren scheinen auch epigenetische Faktoren bei der aberranten Genexpression im HL eine Rolle zu spielen. Für die B-Zellgene SYK, BOB.1 (OBF1) und CD79B wird gezeigt, dass ihre Promotoren in Linien und primären Fällen methyliert sind (Doerr et al., 2005; Ushmorov et al., 2006). Über eine 5-aza-dC- (5-aza-desoxycytidin) Behandlung konnte die Expression der methylierten Gene erreicht werden (Doerr et al., 2005; Ushmorov et al., 2006). Eine genomweite Analyse der DNA-Methylierung in HL-Linien zeigt, dass hypermethylierte Promotoren bevorzugt in B-Zellgenen zu finden sind (Ammerpohl et al., 2012). Untersuchungen zu Histonmodifikationen in HL-Zellen zeigen inaktivierte H3K9/14-deacetylierte und H3K27-trimethylierte Histone in B-zellspezifischen Genen (Seitz et al., 2011).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Trotz der guten Heilungschancen des HLs ist es für eine spezifischere nebenwirkungsärmere Therapie notwendig die Biologie des HLs zu verstehen. Die Bedeutung des „Verlustes der B-Zellidentität“ für die Pathogenese des HL ist bisher nicht geklärt. Wenn eine prä-apoptotische GC-B-Zelle durch ein unbekanntes transformierendes Ereignis ihre B-Zellsignatur verliert, so kann sie vielleicht ihrer Bestimmung entgehen und überleben. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu klären, ob deregulierte Transkriptionsfaktoren wie E2A und EBF1 zum HRS-zelltypischen Phänotyp beitragen und das Überleben dieser Zellen beeinflussen können.

Der Verlust der B-Zellsignatur soll über eine Herunterregulation von E2A in CG-B-Zellen simuliert werden. Hierfür soll zunächst ein E2A-shRNA-exprimierendes virales Vektorsystem in B-Zelllinien etabliert werden. Die Inhibierung von E2A in B-Zellen soll zeigen, ob dies zu einem HL-ähnlichen Phänotyp führt (Fehlen von B-Zellgenen, Expression linienfremder Gene wie z. B. ID2 und ABF1) und ob E2A essentiell für die Ausprägung verschiedener B-Zellgene ist.

In einer weiteren Experimentreihe soll getestet werden, ob und mit welchen Konsequenzen in HL-Zellen die B-Zellsignatur wieder hergestellt werden kann. Es soll in dem Zusammenhang eine stabile Expression von EBF1 über virale Vektoren in HL-Linien etabliert werden. In EBF1-transduzierten HL-Linien soll das

Expressionsmuster von EBF1-Zielgenen untersucht und mit dem von B-Zellen verglichen werden. Hierbei sollen sowohl positiv regulierte Zielgene der B-Zelle als auch linienfremde negativ regulierte Zielgene individuell untersucht werden. Genchipanalysen sollen Aufschluss über die Expression weiterer bekannter und unbekannter EBF1 Zielgene geben. Wenn der Verlust der B-Zellidentität zum Überleben der HRS-Zelle beiträgt, kann die Wiederherstellung des B-Zellstatus in HL-Zellen im Extremfall zur Apoptose führen. Daher soll die Fitness der EBF1-Transduzierten Zellen untersucht werden. Das HL zeigt im Vergleich zu B-Zellen ein degeneriertes DNA-Methylierungsmuster. EBF1 scheint in normalen B-Zellen in diesem Bereich eine regulierende Funktion einzunehmen. Hier soll untersucht werden inwieweit diese auch in HL-Zellen eine Bedeutung hat. Die Suche nach Mutationen in EBF1 soll klären, ob dies die Ursache für die mangelnde EBF1-Expression in HRS-Zellen ist.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Linie	Zelltyp	Optimale Zelldichte [Zellen/mL]	Medium* (+10-20% FCS und 1x P/S)	Literatur
L-1236	humanes HL	0,3-0,5 x 10 ⁶	RPMI 1640	(Wolf et al., 1996)
L-428	humanes HL	0,2-0,5 x 10 ⁶	RPMI 1640	(Schaadt et al., 1979)
U-HO1	humanes HL	0,4-1,0 x 10 ⁶	80% IMDM + 20% RPMI 1640	(Mader et al., 2007)
KM-H2	humanes HL	0,3-1,0 x 10 ⁶	RPMI 1640	(Kamesaki et al., 1986)
HDLM-2	humanes HL	0,5-1,0 x 10 ⁶	RPMI 1640	(Drexler et al., 1986)
Raji	humanes BL	0,5-1,0 x 10 ⁶	RPMI 1640	(Pulvertaft, 1964)
293T	humane embryonale Niere	-	DMEM	(Graham et al., 1977)

* Die Medien RPMI 1640, IMDM und DMEM sind mit stabilem Glutamat versetzt. P/S – Penicillin/Streptomycin (PAA)

2.1.2 Kultivierung von Zellen

Die Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Suspensionszellen wurden durch Zugabe von frischem Medium oder durch Zentrifugation (115-180 g, 4 °C, 5'), Entnahme von verbrauchtem Medium und anschließender Zugabe von frischem Medium in der optimalen Zelldichte gehalten.

Bei adhärennten Zellen wurde bei dichten Platten das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 1x PBS⁻ (phosphatgepufferte Salzlösung, Invitrogen) gewaschen und die Zellen einige Sekunden mit *Trypsin-EDTA* (PAA) überschichtet, um diese zu lösen. Die abgelösten Zellen wurden in Medium aufgenommen und mit frischem Medium in geringerer Konzentration zur Kultivierung auf neue Platten überführt.

Eingefrorene Zellaliquots wurden im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, die Zellen wurden mit ca. 10 mL vorgewärmtem Medium versetzt, gewaschen, in frischem Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche/-schale überführt.

Zur Lagerung wurden Zellen eingefroren. Die Zellen wurden gezählt und zentrifugiert. Je 5x10⁶ Zellen wurde 1,5 mL Gefriermedium (Zelltypspezifisches Medium mit 10 % DMSO) auf das Zellpellet gegeben und die Zellen resuspendiert. In jedes

Kryoröhrchen wurden ca. 1,5 mL Suspension gegeben, die langsam in einem Kryoeinfriergerät auf ca. -80 °C abgekühlt wurden. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl einer Suspension (adhärente Zellen vorher mit Hilfe von Trypsin lösen) wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden von den neun Großquadraten die vier Eckquadrate (jeweils 16 Kleinquadrate) ausgezählt, wobei auf den Linien liegende Zellen nur gezählt wurden, wenn sie auf der oberen oder linken Linie lagen. Um vitale (ungefärbte) von toten (blau gefärbten) Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension mit Trypanblaulösung (Invitrogen) versetzt. Die Zellkonzentration einer Lösung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellkonzentration} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right] = \frac{(\sum \text{vier Eckquadrate})}{4} \times 10^4 \times \text{Verdünnung}$$

2.1.4 Untersuchung auf Mycoplasmen

Die parasitär lebenden Bakterien der Gattung *Mycoplasma* können den Stoffwechsel von befallenen Zellen und damit auch Ergebnisse einiger Experimente beeinflussen. Die verwendeten Zelllinien wurden daher regelmäßig mit dem *PCR Mycoplasma Test Kit* von AppliChem nach Herstellerangaben getestet.

2.1.5 Identifikation von HL-Linien mittels Sequenzierung

Die Vertauschung bzw. Kontamination von Zelllinien ist ein verbreitetes und bekanntes Problem. Die verwendeten HL-Linien wurden daher mittels bekannter Mutationen identifiziert: Es wurde gDNA isoliert (2.4.1), PCRs mit den in Tabelle 2 und Tabelle 3 beschriebenen Oligonukleotiden (Primern) sowie Reagenzien aus Tabelle 4 angesetzt. Die DNA-Fragmente wurden bei folgenden PCR-Bedingungen amplifiziert:

IkB α Exon3/4 + A20	95 °C 5'/(95 °C 30"/61 °C 30"/72 °C 90")x40/72 °C 5'/15 °C ∞
IkB α Exon5	95 °C 5'/(95 °C 30"/63 °C 30"/72 °C 90")x40/72 °C 5'/15 °C ∞

Die PCR-Produkte wurden gereinigt und in eine Standardsequenzierreaktion (2.4.5.6) mit den in Tabelle 2 und Tabelle 3 angegebenen Primern eingesetzt und sequenziert.

Tabelle 2: Mutationen in HL-Linien

Linie	Gen	Mutation	PCR-Primer	Seq-Primer	Quelle
KM-H2	IkBa (GI:187423894; NG_007571.1)	Δ6457-6670 Exon3/Intron3	3a, 4c (wt 744 bp, KMH2 530 bp)	3a 4c	(Cabannes et al., 1999; Ito et al., 1995)
L-428	IkBa (GI:187423894; NG_007571.1)	C7238T Exon 5	5a, 5c (381 bp)	5a 5c	GI:6688191
U-HO1	A20/TNFAIP3 (GI:28932977; AY248754.1)	Δ5862-5869 bzw. Δ5864-5871 Exon 2	A20E2intF, A20E2R (wt: 464 bp, UHO1 456 bp)	A20E2seqF A20E2R	(Schmitz et al., 2009b)
SUP- HD1	A20/TNFAIP3 (GI:28932977; AY248754.1)	Dupl. 6010-6019 Exon 2	A20E2intF, A20E2R (wt: 464 bp, SUP-HD1 474 bp)	A20E2seqF A20E2R	(Küppers, 2011)
L-1236	A20/TNFAIP3 (GI:28932977; AY248754.1)	G9482A Exon 3	A20E3intF, A20E3R (307 bp)	A20E3seqF A20E3R	(Schmitz et al., 2009b)
HDML-2	A20/TNFAIP3 (GI:28932977; AY248754.1)	Dupl.10230-10258 Exon 4	A20E4-5intF, A20E4-5R (wt: 589, HDLM2 618 bp)	A20E4-5intF A20E4-5R	(Schmitz et al., 2009b)

Primer = Oligonukleotid

Tabelle 3: Oligonukleotidsequenzen der spezifischen Mutationen in HL Linien

Primer	Sequenz (5'-3')	Gen
3a	CCT GTC TAG GAG GAG CAG CAC	IkBa
4c	ATA AGC ACG AGG AGC CTG ACT CA	IkBa
5a	AGC AGA AAT TCC AAA TGC AGC CAT	IkBa
5c	GGA GGG TGA AGG GAA TGG CAC	IkBa
A20E2intF	GTT TCC TGC AGG CAG CTA TAG AGG	A20
A20E2R	AGC TTC ATG AAT GGG GAT CCA GCA G	A20
A20E2seqF	CCT TTT CAG GTG TTG GAG AG	A20
A20E3intF	ACC TTT GCT GGG TCT TAC ATG CAG	A20
A20E3R	TAT GCC CAC CAT GGA GCT CTG TTA G	A20
A20E3seqF	TCC TTT CTG TCC TCA GGT	A20
A20E4-5intF	TAC AGG GAG TAC AGG ATA CAT TCA AGC	A20
A20E4-5R	GGA AAA CCC TGA TGT TTC AGT GTC TAG	A20

Tabelle 4: PCR-Ansätze der spezifischen Mutationen in HL Linien

	IkBa: Exon3/4	IkBa: Exon5	A20
dNTP (2 mM)	5 µL	5 µL	5 µL
10xPCR-Puffer (HF2)	5 µL	5 µL	5 µL
Primer forward (2,5 µM)	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Primer reverse (2,5 µM)	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL	1 µL	3 µL
Betain (5M)	10 µL	10 µl	10 µl
H2O	20,7 µL	21,7 µL	20,7 µL
DNA (ca. 100 ng)	2 µL	2 µl	1 µl
Polymerase	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL

HF2 = Puffer 2 aus Expand High Fidelity PCR System (Roche)

2.1.6 Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung von Zellen (FACS)

Die durchflusszytometrischen Analysen bzw. Sortierungen von transduzierten Zellen (tGFP+) wurden an einem *BD FACSCanto* bzw. *FACSDiva* (BD Biosciences) durchgeführt. Vor der Messung wurden die Zellen 1 bis 5-mal in PBS^{-/-}/0,5 % BSA gewaschen, in 0,5 – 3 mL PBS^{-/-}/0,5 % BSA resuspendiert und in ein Analyseröhrchen überführt. Durch Zugabe von 1 - 2 µL 500 µg/mL Propidiumiodid (PI, Invitrogen) wurden tote Zellen identifiziert. PI diffundiert durch die Membran von Zellen. In lebenden wird es wieder herausgepumpt und in toten interkaliert es in DNA und färbt diese rot.

Durch Zugabe einer definierten Menge *CountBright™ Absolute Counting Beads for flow cytometry* (Invitrogen) zu einem definierten Volumen ungewaschener Zellen kann man die zu analysierenden Zellen zählen bzw. die Zellzahl in größeren Volumina hochrechnen.

2.1.7 MTS-Assay

Diese Methode dient dazu den Energieumsatz und damit die Fitness von Zellen zu bestimmen. Einer definierten Zellzahl (hier 10.000 oder 20.000 Zellen/well) in 100 µL Medium, jeweils im Quadruplikat in einer flachen 96-well-Platte, wurden 20 µL *CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent* (Promega) zugegeben. NADH und NADPH der Zellen bio reduziert das MTS-Tetrazoliumsalz des Reagenzes, das zu farbigem Formazan wird. Diese Reaktion wurde über vier Stunden bei 490 nm im ELISA-Reader dokumentiert.

2.2 Bakterielle-Arbeitstechniken

2.2.1 Bakterienkultur

Bakterien, insbesondere *Escherichia coli*, werden zur Vermehrung von Plasmiden verwendet. Für Plasmidisolationen wurden diese in *LB-Medium* (engl. lysogeny broth, Carl Roth) bei 37 °C und ca. 250 rpm geschüttelt. Zur Vereinzelung wurden die Bakterien auf agarosehaltigen LB-Platten (Agar-Agar, Carl Roth) ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

Die verwendeten Medien/Platten wurden entsprechend der Sequenz der Plasmide mit Antibiotikum versetzt, um die Bakterien positiv zu selektionieren: Ampicillin (100 µg/mL), Kanamycin (50 µg/mL) und Chloramphenicol (50 µg/mL).

2.2.2 Transformation von Bakterien

Um Plasmide zu vermehren müssen diese zunächst per Transformation in kompetente Bakterien gebracht werden. Durch einen kurzen Hitzeschock nehmen die (meist mit Calciumionen) vorbehandelten Bakterien DNA auf:

Es wurden 30 μL kompetente Bakterien (hier XL1-blue, Stratagene; DH10 β pir116, Open Biosystems; DH5 α , Invitrogen) mit 0,5 μL *β -Mercaptoethanol* 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von DNA (0,1 - 50 ng Plasmid-DNA: oder 3 μL Ligationsansatz) wurde das Gemisch 30 Minuten auf Eis gegeben. Die Bakterien-DNA-Mischung wurde 45 Sekunden bei 42 °C geschockt und anschließend 2 Minuten auf Eis gekühlt. Das Reaktionsvolumen wurde mit 970 μL warmem SOC-Medium (Sigma-Aldrich) aufgefüllt und eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Es wurden je 20 und 200 μL der Bakterien auf Antibiotika-haltige LB-Platten ausgespatelt und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen.

Konnte eine sogenannte „Blau-Weiß-Selektion“ durchgeführt werden, wurde auf den Platten vor der Verwendung 100 μL IPTG (100 mM) und 20 μL X-Gal (50 mg/mL) ausgespatelt und vollständig einziehen gelassen.

IPTG (100 mM): 1,2 g Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)
 50 mL H₂O
 sterilfiltrieren
 Lagerung 4 °C

X-Gal (50 mg/mL): 50 mg 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)
 1mL N,N-Dimethylformamid
 Lagerung -20 °C

Die „Blau-Weiß-Selektion“ ermöglicht ein schnelleres Auffinden von positiven Klonen: Dabei enthält das Plasmid an der Klonierungsstelle das lacZ Gen, das für β -Galactosidase codiert. Bei einem Plasmid ohne Insert kann das Enzym β -Galactosidase vollständig exprimiert werden und X-Gal mit Hilfe von Sauerstoff in einen blauen Farbstoff umwandeln. Die betroffenen Kolonien sind blau. Hat das Plasmid ein Insert aufgenommen, ist das lacZ Gen unterbrochen; β -Galactosidase wird nicht exprimiert und die Kolonien bleiben weiß. IPTG stimuliert dabei den lac-Promotor.

2.3 RNA-Techniken

2.3.1 RNA Isolation

Die RNA von sortierten Zellen wurde nach Herstellerangaben mit einem Kieselgel-basierten Kit, dem RNeasy® Micro Kit (QIAGEN), isoliert. Hierbei wurde das Protokoll für $\leq 1 \times 10^5$ Zellen ohne DNase-Verdau verwendet. Die RNA wurde in 12 μ L RNase-freiem Wasser eluiert.

Größere RNA-Mengen wurden über eine Phenol-Chloroform-Fällung gewonnen. Hierbei wurde Trizol (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription kleiner RNA-Mengen (< 50 ng) wurde nach Herstellerangaben mit dem *Sensiscript® Reverse Transcription Kit* (QIAGEN) durchgeführt. Mehr als 50 ng RNA wurden mit dem *Omniscript® Reverse Transcription Kit* in cDNA umgeschrieben. Die verwendeten Oligonukleotide waren *Random Hexamers* (Applied Biosystems) und der RNase-Inhibitor *RNasin Plus* (Promega).

Für die cDNA-Synthese mit genspezifischen Oligonukleotiden (3.2.4) wurde *SuperScript III* (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Diese Reverse Transkriptase synthetisiert optimal bei einer relativ hohen Temperatur von 42 – 55 °C, was bei der Verwendung von genspezifischen Oligonukleotiden (hier: EBF2136R: 5'-CTC TGG GAC TTG TAT CAG ATT ACT C-3') vorteilhaft ist.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA wurde unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Entweder im NanoDrop ND-1000 Spektrometer (Thermo scientific), das die Konzentration automatisch im Computer berechnet oder im BioMate 3 UV/VIS-Spektrophotometer (Thermo Spectronic). Im letzteren wird die RNA-Konzentration wie folgt berechnet:

$$RNA - Konzentration \left[\frac{ng}{\mu L} \right] = OD_{260nm} \times Verdünnung \times 40 \frac{ng}{\mu L}$$

Mit der zusätzlichen Messung der Absorption bei 280 nm und Bestimmung des Quotienten $OD_{260 \text{ nm}}/OD_{280 \text{ nm}}$ erhält man ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure. Für RNA ist ein Wert von 2,0 optimal.

2.3.4 Micro-Arrays

Die Genchipanalysen wurden vom BioChip Labor im Hause (PD Dr. L. Klein-Hitpass) nach folgendem Protokoll durchgeführt: Je Chip wurden 150 ng gesamt RNA (siehe 2.3.1; *RNeasy Micro Kit*, G1AGEN) mit dem *Ambion WT Expression Kit* (Applied Biosystems) amplifiziert und über den *GeneChip WT Terminal Labeling and Hybridization Kit* (Affymetrix) markiert und hybridisiert. Das Waschen und die Färbung erfolgten nach dem Standard Affymetrix GeneChip Protokoll (Version 2) in der *GeneChip Fluidics Station 450* (Affymetrix), die Messung auf dem *GC Scanner 3000 7G* (Affymetrix).

Die Arraydaten wurden mit Hilfe der Bioinformatikerin Dr. Claudia Döring (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main) folgenden statistischen Analysen unterzogen:

- Um technische Variabilität zu berücksichtigen wurden die Chip-Daten nach dem VSN-Modell von Huber normalisiert (Döring, 2009).
- Differentielle Genexpression: Die statistische Analyse wurde mit der Software R, Version 2.12 durchgeführt (R Development Core Team, 2005). Weitere Software Pakete wurden vom *Bioconductor Projekt* verwendet (Gentleman et al., 2004). Die Daten wurden zunächst über einen Intensitäts- und einen Varianzfilter bereinigt. Hierbei sollten Intensitäten von über 100 in mindestens 25 % der Proben erreicht werden, wenn die zu vergleichenden Gruppen gleich groß waren (Intensitätsfilter). Außerdem sollten der Quartilsabstand der log₂ Intensitäten mindestens 0,5 betragen, wenn die zu vergleichenden Gruppen gleich groß waren (Varianzfilter). P-Werte wurden mit dem Zweistichproben t-Test (bei gleicher Varianz) berechnet, um differentiell exprimierte Gene der beiden Gruppen zu identifizieren. Die Rate der falsch Positiven (FDR) wurde nach Benjamini und Hochberg berechnet, um das Problem des Multiplen-Testens zu berücksichtigen (Hochberg und Benjamini, 1990). Außerdem wurde ein sogenannter *fold change* (FC, n-fache Änderung) für jedes Gen der beiden Gruppen berechnet. Die Listen der differentiellen Genexpression wurden, wie im Ergebnisteil angegeben, nach verschiedenen FDR und FC Kriterien gefiltert.
- Durchführung einer Gene Set Enrichment Analyse (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005), um durch EBF1 regulierte Gengruppen zu identifizieren. Es wurde mit der Permutationseinstellung „*Phenotype*“

ausgewertet. Diese Einstellung wird bevorzugt empfohlen; optimal ist jedoch eine Gruppengröße von mindestens sieben. In der hier vorliegenden Arbeit sind nur drei Wiederholungen pro Gruppe vorhanden. Da es sich hier um stabile Replikate einer Zelllinie handelte und nicht um variable Replikate z. B. von verschiedenen Patienten, die mit einem Medikament behandelt wurden, wurde trotz geringer Gruppengröße die Permutationstypeneinstellung „*Phenotype*“ verwendet. Des Weiteren wurden Standardeinstellungen angewandt. Die drei analysierten Kollektionen (c2 alle, c2 Biocarta Signalwege oder KEGG Signalwege) entstammten der Gruppe c2, die sogenannte *curated genes* aus verschiedenen Signalweg Datenbanken und Publikationen aus PubMed enthielten.

2.4 DNA-Arbeitstechniken

2.4.1 Isolierung genomischer, eukariotischer DNA

Genomische, eukariotische DNA wurde über den *Gentra Puregene Kit* (QIAGEN), *QIAamp DNA Micro Kit* (QIAGEN) oder *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit* (QIAGEN) - wenn nicht anders angegeben - nach Herstellerangaben isoliert.

Bei dem *Gentra Puregene Kit* wurden die Zellen lysiert und die DNA nach einer Reinigung alkoholisch gefällt. Diese Methode wurde z. B. bei der DNA Isolierung zur Bisulfidsequenzierung (2.4.5.7) verwendet.

Die beiden QIAamp Kits verwenden Kieselgelsäulen an der die DNA der lysierten Zellen gebunden wird. Diese wird anschließend gewaschen und eluiert. Der DNA Micro Kit eignet sich besonders für kleine Zellmengen und kleine Elutionsvolumina wie z. B. bei der tGFP-qPCR (3.2.5.2).

2.4.2 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Kleine Plasmidmengen (ca. 2 – 3 mL Bakterienkultur) wurden mit dem *QIAprep Miniprep Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben oder nach folgendem Protokoll ohne Kieselgelsäulen isoliert:

5 mL LB-Medium mit 10 µL Ampicillin (50 ng/µL) versetzen, mit einer Bakterienkolonie animpfen und über Nacht bei 37 °C und ca. 200 rpm schütteln. Bakterien eine Minute bei 13000 rpm (= ca. 16000 g) und RT in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß abzentrifugieren. Pellet in 300 µL S1 (Resuspension Buffer aus Nucleobond PC 500, Macherey-Nagel) lösen. 300 µL S2 (Lysis Buffer aus Nucleobond PC 500) zugeben, vorsichtig umschwenken, 5 Minuten bei RT

inkubieren. 300 µL S3 (Neutralization Buffer aus Nucleobond PC 500) zugeben, vorsichtig umschwenken, 10 Minuten auf Eis inkubieren. Zelltrümmer 15 Sekunden bei 13000 rpm (ca. 16000 g) (RT oder 4 °C) abzentrifugieren. Überstand (ca. 900 µL) in neues 1,5 mL Reaktionsgefäß geben, 630 µL Isopropanol zugeben und 20x schwenken. Plasmide 30 Sekunden bei 13000 rpm (ca. 16000 g) (4°C oder RT) pelletieren und mit 500 µL 70% EtOH waschen. Das Pellet wird anschließend getrocknet und in 30 – 50 µL H₂O oder TE (QIAGEN) aufgenommen.

Größere Plasmidmengen (ca. 100 mL Bakterienkultur) wurden mit *NucleoBond® PC 500* (Macherey-Nagel) oder *EndoFree Plasmid Purification Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert. Beide Kits verwenden Kieselgelsäulen zur DNA Gewinnung. Der EndoFree Plasmid Purification Kit hat einen zusätzlichen Reinigungsschritt bei dem Endotoxine (Lipopolysaccharide - LPS) entfernt werden. Endotoxine beeinflussen die Transfektionseffizienz und müssen daher z. B. bei der Virusherstellung (2.6.1) entfernt werden.

2.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde wie die RNA-Bestimmung unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, entweder im *NanoDrop ND-1000 Spektrometer* (Thermo scientific), das die Konzentration automatisch im Computer berechnet oder im *BioMate 3 UV/VIS-Spektrophotometer* (Thermo Spectronic). Im letzteren wurde die DNA-Konzentration wie folgt berechnet:

$$DNA - Konzentration \left[\frac{ng}{\mu L} \right] = OD_{260nm} \times Verdünnung \times 50 \frac{ng}{\mu L}$$

Mit der zusätzlichen Messung der Absorption bei 280 nm und Bestimmung des Quotienten $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ erhält man ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure. Reine DNA ergibt einen Wert von 1,8. Ist der Wert kleiner, spricht das für eine Verunreinigung mit Phenol oder Proteinen.

Die Konzentration von DNA (z. B. PCR-Fragmente für die Sequenzierung) kann auch im Agarosegel (2.4.7) bestimmt werden. Es wurde dafür ein geringes definiertes Volumen der Probe neben einem definierten Volumen einer Massenleiter (z. B. *Low Mass Ladder* – Invitrogen) auf ein Gel aufgetragen. Die Massenleiter zeigt die Intensität verschiedener DNA-Mengen an. Vergleicht man diese mit der Intensität der

Probe, kann deren Masse abgeschätzt werden. Dabei wurde beachtet, dass DNA-Mengen unter 5 – 10 ng im Gel kaum mehr sichtbar sind, dass aber zu starke Banden wegen Übersättigung schlecht abgeschätzt werden können.

2.4.4 Klonierung

Klonierung ist die Vervielfältigung von DNA. Hierbei wird ein DNA-Fragment in einen Vektor bzw. ein Plasmid integriert. Das Plasmid kann mittels Transformation (2.2.2) in Bakterien gebracht, dort vervielfältigt und anschließend wieder isoliert (2.4.2) werden.

Je nach weiterer Verwendung der Plasmide reicht eine schnelle TA-Klonierung aus (z. B. für die Sequenzierung, 3.2.4, 3.2.3). Oder die einzelnen Fragmente werden über Restriktionsverdau, Dephosphorylierung des Vektors, Phosphorylierung des Inserts, Auffüllen/Abdauen von überhängenden 5'/3'-Enden und Ligation exakt passend zueinander gebracht (z. B. EBF1-Plasmid zur Virusproduktion 3.2.1.1).

2.4.4.1 TA-Klonierung

Zur schnellen Klonierung steht der *pGEM-T Easy Vector* (Promega) zur Verfügung. Dieser Kit enthält ein geöffnetes Plasmid mit 3' überhängenden Thymidin-Enden. Da einige thermostabile Polymerasen (z. B. *Taq* Polymerase) überhängende Adenin-Enden produzieren, können die so amplifizierte PCR-Produkte direkt in den Vektor ligiert werden. Diese Klonierung wurde im Allgemeinen nach Herstellangaben durchgeführt. Im Zusammenhang mit massenhaften *pGEM-T Easy* Klonierungen für die Methylierungsstudie (2.4.5.7) wurde das Protokoll wie folgt verändert: Der Gesamtansatz wurde auf 7 µL verkleinert, wobei die Ligase und der Vektor je um die Hälfte auf 0,5 µL reduziert wurden.

2.4.4.2 Produktion von überhängenden A-Enden

PCR-Produkte, die keine überhängenden A-Enden haben, wurden wie folgt für die TA-Klonierung vorbereitet:

X DNA [ng]
2 µL 10 x Fermentas Puffer
2 µL 25mM MgCl₂ (Fermentas)
2 µL dNTPs (2 mM)
0,3 µL Taq DNA Polymerase (Fermentas)
ad 20 µL H₂O
Inkubation 30 Minuten bei 72 °C

2.4.4.3 Restriktionsverdau

Die Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Puffer	Hersteller
BamHI	BamHI	Fermentas
BamHI/HindIII	Tango	Fermentas
XbaI/HindIII	Tango	Fermentas
EcoRI/XhoI	Orange	Fermentas
Sall/BpiI = BbvII = BbsI	Orange	Fermentas
BamHI/ BpiI = BbvII = BbsI	Green	Fermentas
EcoRI	EcoRI	Fermentas
SpeI/BamHI	Tango	Fermentas
NcoI	Tango	Fermentas
XhoI	Red	Fermentas
EcoRI/NotI	Orange	Fermentas

2.4.4.4 Klenow-Fragment: Auffüllen bzw. abdauen von DNA-Enden

Das *Klenow-Enzyme* (Roche) kann DNA-Fragmente mit einzelsträngigen, überhängenden 5'-Enden auffüllen bzw. 3'-Enden abdauen und damit sogenannte „blunt ends“ für eine entsprechende Ligation produzieren. Das *Klenow-Fragment* wurde nach Herstellerangaben verwendet.

10x Filling Buffer 500 mM Tris (pH 7,5)
 100 mM MgCl₂
 10 mM DTT
 500 µg/mL BSA

2.4.4.5 DNA-Dephosphorylierung

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP, New England Biolabs) katalysiert die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA, z. B. Plasmiden und verhindert damit die Religation von Vektoren. Das Enzym wurde nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.4.6 DNA-Phosphorylierung

T4 Polynukleotide Kinase (Fermentas) phosphoryliert 5' Enden von DNA. Dies optimiert die Ligation von Inserts in Vektoren. Das Enzym wurde nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.4.7 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren wurde im Allgemeinen mit der *T4 DNA Ligase* (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der *pGEM-T Easy Vector* von Promega enthält im Kit eine eigene Ligase, die entsprechend verwendet wurde.

2.4.5 PCR-Techniken

2.4.5.1 PCR

- Zur Klonierung von GFP aus *pADTracksiGata3* in verschiedene *pSM2*-Vektoren (Open Biosystems, Thermo Scientific) wurde GFP mit Primern, die einen Überhang für einen BamHI-Restriktionsverdau besitzen (grün markiert), amplifiziert:

Primer	Sequenz (5'-3')
GFP5031F	TAA TAG GGG ACC GGATCC CAT TTT ATG TTT CAG GTT CAG GGG G
GFP19421R	TTG GAC TCG GGG GGATCC ATA GTA ATC AAT TAC GGG GTC ATT AG

Reagenzien	Primer/Volumina [μ l]
Primer	GFP5031F + GFP19421R
Endkonz. dNTPs [mM]	0,2
Endkonz. je Primer [μ M]	0,2
10x High Fidelity Puffer 2 [μ L]	5
DNA [μ g]	0,1
High Fidelity Enzyme Mix (Roche)	0,75
ad H ₂ O [μ L]	50

Programm: 95 °C 5'/(95 °C 15"/60 °C 30"/72 °C 2')35x/72 °C 5'

- Kontroll-PCR, um zu testen, ob pSM2-Virusüberstand Viruspartikel enthält:

Primer	Sequenz (5'-3')
GFP1188F	GTG GTG CAG ATG AAC TTC AGG
GFP1939R	GTA ATC AAT TAC GGG GTC ATT AG
PSM-03F	ATC GTT GCC TGC ACA TCT TGG
SM2839R	GAA GTG ATC TTC CGT CAC AGG

Reagenzien	Primer/Volumina [μ l]
Primer	GFP1188F + GFP1939R PSM-03F + SM2839R
Endkonz. dNTPs [mM]	0,2
Endkonz. je Primer [μ M]	0,3
10x Puffer [μ L]	5
„cDNA“ [μ L]	9
Taq DNA Polymerase (Fermentas)	0,75
ad H ₂ O [μ L]	50

Programm: 95 °C 5'/(95 °C 15"/60 °C 30"/72 °C 2')45x/72 °C 5'

- Herstellung des Plasmids pGIPZ-Spel

Primer	Sequenz (5'-3')
pGIPZ- <i>SpeI</i> -F	ATT ACC ACT AGT GCG TCT GGA ACA ATC AAC CTC TGG ATT AC
pGIPZ- <i>SpeI</i> -R	CTC GGT ACT AGT GGT ATT ATC GTG TTT TTC AAA GGA AAA CCA C

Reagenzien	Primer/Volumina [μ l]
Primer	pGIPZ-SpeI-F+ pGIPZ-SpeI-R
Endkonz. dNTPs [mM]	0,2
Endkonz. je Primer [μ M]	0,4
3,3x Puffer II [μ L]	15
Endkonz. Mg ²⁺ [mM]	1,6
DNA [5 ng/ μ L]	20 μ L
rTth DNA Polymerase (Applied Biosystems)	1 μ L (Hot Start)
ad H ₂ O [μ L]	50

Programm: 94 °C 1'/(94 °C 15"/57 °C 30"/68 °C 10')45x/72 °C 10'

- Herstellung des EBF1-Inserts mit überhängenden SpeI-Enden

Primer	Sequenz (5'-3')
EBF-SpeI-F	CAT CTA ACT AGT ATG TTT GGG ATT CAG GAA AGC ATC C
EBF-SpeI-R	CAT CTA ACT AGT TCA CAT AGG AGG AAC AAT CAT GCC

Reagenzien	Primer/Volumina [μ l]
Primer	EBF-SpeI-F+ EBF-SpeI-R
Endkonz. dNTPs [mM]	0,2
Endkonz. je Primer [μ M]	0,3
10x Puffer [μ L]	2,5
DNA [100 ng/ μ L]	1 μ L
Ultra Pfu Polymerase (Agilent Technologies)	0,2 μ L
ad H ₂ O [μ L]	25

Programm: 95 °C 2,5'/(95 °C 30"/61 °C 30"/72 °C 4,5')43x/72 °C 10'

- Zur Sequenzierung von EBF1 gDNA in KMH2 wurden zwei PCRs im Bereich von Exon 1, Intron 1 und Exon 2 durchgeführt:

Primer	Sequenz (5'-3')
EBF243F	TTC AAG GGG GAG GAG ATT TTC C
EBF8844R	CAG CAG CTG CCG CTG CC
EBF243F	TTC AAG GGG GAG GAG ATT TTC C
EBF6677R	CGG CTG CTT CTC AAA GTG AGC

Reagenzien	Primer/Volumina [μ l]	
	EBF243F, EBF8844R	EBF243F, EBF6677R
Primer		
Endkonz. dNTPs [mM]	0,2	0,2
Endkonz. je Primer [μ M]	0,3	0,3
10x Puffer + KCl [μ L]	5	5
MgCl ₂ [mM]	2,5	1
Betain [M]	1	1
DNA [μ g]	1	1
Taq DNA Polymerase (Fermentas)	0,75	0,75
ad H ₂ O [μ L]	50	50

Programm: 95 °C 5'/(95 °C 30"/58 °C 30"/72 °C 3')45x/72 °C 5'

2.4.5.2 RT-PCR

Zur Sequenzierung der EBF1 mRNA wurden vier verschiedene überlappende RT-PCRs durchgeführt:

Primer	Sequenz (5'-3')
EBF243F	TTC AAG GGG GAG GAG ATT TTC C
EBF616R	CCG GTA GTG AAT TCC GTT ATT GG
EBF483F	AAT CCA ACT TCT TCC ACT TCG TCC
EBF1068R	GGA GTA GCA TGT TCC AGA TAA GAG
EBF938F	GTC AAT GTG GAT GGC CAT GTC C
EBF1610R	GTT GTC CAC TGA ACG AAT TCA CG
EBF1474F	GGA AAT CAT TCT GAA GAG AGC GG
EBF2136R	CTC TGG GAC TTG TAT CAG ATT ACT C

Reagenzien	Primer/Volumina [μ l]	
	EBF243F, EBF616R EBF483F, EBF1068R EBF938F, EBF1610R	EBF1474F, EBF2136R
Primer		
Endkonz. dNTPs [mM]	0,2	0,2
Endkonz. je Primer [μ M]	0,3	0,3
10x Puffer + KCl [μ L]	5	5
MgCl ₂ [mM]	4	2,5
Betain [M]	1	1
cDNA Menge [μ g]	1	1
Taq DNA Polymerase (Fermentas)	0,75	0,75
ad H ₂ O [μ L]	50	50

Programm: 95 °C 3'/(95 °C 20"/58 °C 20"/72 °C 40")42x/72 °C 5'

2.4.5.3 sqRT-PCR

Es wurde die Expression der mRNA/cDNA verschiedener EBF1-Zielgene und EBF1 in EBF1/Kontrollvektor-infizierten HL-Linien per semiquantitativer RT-PCR überprüft.

Primer	Sequenz (5'-3')	mRNA	PCR-Zyklen		
			L1236	L428	KMH2
Act23F	AGC CTC GCC TTT GCC GAT C	β -Aktin	27	30	30
Act96R	AGC GCG GCG ATA TCA TCA TCC				
GDH85F	CCA CAT CGC TCA GAC ACC ATG	GAPDH	27	30	30
GDH193R	TGA AGG GGT CAT TGA TGG CAA C				
EBF1170F	GTA CCA TGC TGG TCT GGA GTG	EBF1	36	36	36
EBF1262R	GTG TGA CTT CCA CAA CAC CAG G				
CD19_854F	CAA CCT GAC CAT GTC ATT CCA CC	CD19	39	45	45
CD19_976R	CAC AGG CAG AAG ATC AGA TAA GCC				
CD79a_133F	ATC TGG TAC CCT GGG ACT GC	CD79a	36	45	45
CD79a_300R	GGA CCT TGT GCA TCC ACA GG				
CD79b_36F	AGC CTC GGA CGT TGT CAC G	CD79b	42	45	45
CD79b_195R	GAT TCC GGT ACC GGT CCT C				
PAX5_899F	GTC CCA GCT TCC AGT CAC AG	PAX5	33	39	39
PAX5_1069R	CGG AGA CTC CTG AAT ACC TTC G				
ID2_423F	CTC GCA TCC CAC TAT TGT CAG C	ID2	30	33	31
ID2_601R	GAA CAC CGC TTA TTC AGC CAC AC				

No1_96F	GAA TGG CGG GAA GTG TGA AGC	Notch1	36	39	36
No1_261R	TGC AGG CAT AGT CTG CCA CG				

Reagenzien	Primer/Volumina [μ l]
Primer	für alle Amplikons
Endkonz. dNTPs [mM]	0,2
Endkonz. je Primer [μ M]	0,3
10x Expand High Fidelity Buffer 3 (Roche) [μ L]	2
25 mM MgCl ₂ (Roche) [mM]	2,5
Betain [M]	1
cDNA (10000 Zellen/20 μ L cDNA) [μ L]	1
Taq DNA Polymerase (Fermentas)	0,3
ad H ₂ O [μ L]	20

Programm: 95 °C 3'/(95 °C 15"/60 °C 15"/72 °C 20")Xx

2.4.5.4 Quantitative RT-PCR

Die Messungen wurden auf dem *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) mit bereits validierten *TaqMan Gene Expression Assays* (Primer/Sonde) für GAPDH (Hs99999905_m1), β -Actin (Hs99999903_m1), CD79b/mb1 (Hs00236881_m1), E2A/TCF3 (Hs00413032_m1), PSMC2 (Hs00792473_m1), PSMC5 (Hs00267687_m1), ID2 (Hs00747379_m1), CD19 (Hs00174333_m1), Pax5 (Hs00277134_m1), Notch1 (Hs01062014_m1), Foxo1 (Hs01054576_m1) sowie für dieses Projekt hergestellte Primer-Sonden-Mischungen (Assays-by-Design, Applied Biosystems) für Pax5-alpha und Pax5-beta nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Primer-Paare sind Exon-überspannend, d. h. sie können keine genomische DNA amplifizieren, sofern das überspannte Intron ausreichend groß ist. Es wurde der *TaqMan Universal PCR MasterMix, No AmpErase UNG* (Applied Biosystems) verwendet. Die cDNA wurde im Messansatz (10 bzw. 20 μ L) 1:10 - 1:30 verdünnt eingesetzt, um Inhibition der PCR durch Reagenzien der Reversen Transkription zu vermeiden. Das verwendete Programm lautet 10' 95°C/(15" 95°C/1' 60°C)x45. Unterschiede in der Genexpression wurden mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{GVI} - Ct_{RG})_{Probe} - (Ct_{GVI} - Ct_{RG})_{Kontrollprobe}$$

Ct = *Cycle threshold*, Messwert der Real-time PCR; Gvi = Gen von Interesse; RG = Referenzgen; Probe = EBF1 infiziert; Kontrollprobe = Kontrollinfektion

2.4.5.5 Quantitative PCR - Copy Number Assay

Die Messungen wurden auf dem *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) mit bereits validierten *TaqMan Copy Number Assays* (Primer/Sonde) für RNase P (# 4403326) sowie für dieses Projekt hergestellte Primer-Sonden-

Mischungen (Custom TaqMan Copy Number Assay, Applied Biosystems) für tGFP (# tGFP_CC70K86, 4400294) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die beiden Sonden tragen unterschiedliche Farbstoffe, so dass die Reaktion als Duplex-PCR stattfinden konnte. Es wurde der *TaqMan Universal PCR MasterMix, No AmpErase UNG* (Applied Biosystems) mit 20 ng DNA pro Messansatz verwendet. Das durchgeführte Programm lautet 10' 95°C/(15" 95°C/1' 60°C)x45. Unterschiede der Kopienzahl der Gene wurden mit der $\Delta\Delta$ -Methode berechnet:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{GVI} - Ct_{RG})_{Probe} - (Ct_{GVI} - Ct_{RG})_{Kontrollprobe}$$

Ct = *Cycle threshold*, Messwert der Real-time PCR; GVI = Gen von Interesse; RG = Referenzgen; Probe = PI-positive Zellen, Kontrollprobe = PI-negative, tGFP-positive Zellen der gleichen Infektion

2.4.5.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger (Sanger et al., 1977) auf einem *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurde der *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) vorwiegend nach Herstellerangaben verwendet. Das verwendete Volumen Big Dye Terminator wurde, um Kosten zu sparen, von 4 μ L auf 0,5 μ L in einem 20 μ L-Ansatz reduziert. Das Volumen des Puffers wurde entsprechend angepasst.

Die erhaltenen Fragmente wurden über folgende ethanolische Fällung gereinigt: Den 20 μ L Sequenzieransatz mit 40 μ L Wasser, 150 μ L Ethanol (100%) und 6 μ L 3M Natriumacetat/Dextranblau versetzen, mischen und 30 Minuten bei Raumtemperatur und 13000 rpm (ca. 16000 g) abzentrifugieren. Überstand abnehmen, leicht blaues Pellet mit 200 μ L Ethanol (70%) waschen und an der Luft trocknen. Bis zur Messung Lagerung bei ca. 4 °C.

Die erhaltenen Daten/Elektropherogramme wurden je nach Fragestellung und Umfang der Datenmenge manuell gesichtet, mit Sequenzen aus der PubMed-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verglichen oder mit der Analysesoftware *SeqScape* (Version 2.5; Applied Biosystems) untersucht.

Folgende Primer wurden für Sequenzierreaktionen verwendet:

GFP-PCR-Produkt (3.1.1):

Primer	Sequenz (5'-3')
GFP503F	CAT TTT ATG TTT CAG GTT CAG GGG G
GFP1266R	GCC ACA AGT TCA GCG TGT CC

GFP1188F	GTG GTG CAG ATG AAC TTC AGG
GFP1939R	GTA ATC AAT TAC GGG GTC ATT AG

Kontrolle Minis (3.1.1):

Primer	Sequenz (5'-3')	Bemerkung
GFP1188F	GTG GTG CAG ATG AAC TTC AGG	GFP-spezifisch
GFP1939R	GTA ATC AAT TAC GGG GTC ATT AG	GFP-spezifisch
PSM-03F	ATC GTT GCC TGC ACA TCT TGG	Plasmid-spezifisch
SM2839R	GAA GTG ATC TTC CGT CAC AGG	Plasmid-spezifisch

Kontrolle komplettes pSMC2-Plasmid (3.1.1):

Primer	Sequenz (5'-3')
PSM-01F	GGG CCA AGA ACA GAT GGT CC
PSM-02F	GCG TCT TGT CTG CTG CAG C
GFP503F	CAT TTT ATG TTT CAG GTT CAG GGG G
GFP1266R	GCC ACA AGT TCA GCG TGT CC
GFP1188F	GTG GTG CAG ATG AAC TTC AGG
GFP1939R	GTA ATC AAT TAC GGG GTC ATT AG
CMVrev	GCT ATG AAC TAA TGA CCC CG
PSM-03F	ATC GTT GCC TGC ACA TCT TGG
PSM-04F	TCT GGA GTG AAT ACC ACG ACG
PSM-05F	GCA GCT CGC GTC GTG CAG
PSM-06F	CGT GGT TCC TGG CCA CCG T
PSM-07F	GAG AGG CTC TAA GGG CTT CTC
PSM-08F	TAC CGT AAA GCA CGA GGA AGC
PSM-09F	GCG AAA CGA TCC TCA TCC TG
PSM-01R	TCT CTC TAA CAG CCT TGT ATC G
SM2839R	GAA GTG ATC TTC CGT CAC AGG

Kontrolle EBF1-Sequenz (3.2.1):

Primer	Sequenz (5'-3')
pCEP4 US	AAA TGG GCG GTA GGC GTG TAC G
pCEB4 LS	CTG CAT TCT AGT TGT GGT TTG TCC
EBF SRUS1	GAT TCC AGG TCG TGG TGT CTA CG
EBF SRUS2	GGG ATG CCA CAC AAC AAC CAG G
EBF SRUS3	CTA CGT GCG CCT CAT TGA CTC C
EBF SRUS4	GTA CGT GCC GAG CAC CAC TCC

Kontrolle pGIPZ-SpeI-EBF1 (3.2.1):

Primer	Sequenz (5'-3')
pGIPZ-4473F	CAC GTT GTG AGT TGG ATA GTT GTG G
EBF1-SpeI-F	ATT ACC ACT AGT GCG TCT GGA ACA ATC AAC CTC TGG ATT AC
EBF SRUS3	CTA CGT GCG CCT CAT TGA CTC C
EBF SRUS1	GAT TCC AGG TCG TGG TGT CTA CG
EBF SRUS2	GGG ATG CCA CAC AAC AAC CAG G
EBF SRUS4	GTA CGT GCC GAG CAC CAC TCC
pGIPZ-IRES-R	GAA AGC CAT ACG GGA AGC AAT AGC

EBF1 Mutationsanalyse (3.2.4):

Primer	Sequenz (5'-3')
EBF243F	TTC AAG GGG GAG GAG ATT TTC C
EBF616R	CCG GTA GTG AAT TCC GTT ATT GG
EBF483F	AAT CCA ACT TCT TCC ACT TCG TCC
EBF1068R	GGA GTA GCA TGT TCC AGA TAA GAG

EBF938F	GTC AAT GTG GAT GGC CAT GTC C
EBF1610R	GTT GTC CAC TGA ACG AAT TCA CG
EBF1474F	GGA AAT CAT TCT GAA GAG AGC GG
EBF2136R	CTC TGG GAC TTG TAT CAG ATT ACT C

Sequenzierung von EBF1 auf genomischer Ebene in KM-H2 (3.2.4):

Primer	Sequenz (5'-3')
EBF243F	TTC AAG GGG GAG GAG ATT TTC C
EBF8844R	CAG CAG CTG CCG CTG CC
EBF6677R	CGG CTG CTT CTC AAA GTG AGC
EBF8724R	GCA GAC AGC TCC AGG TCC

2.4.5.7 Bisulfit-Sequenzierung

In humaner DNA können bestimmte Cytosine nur, wenn dem C ein G folgt (\rightarrow CpG), über Methylierungen markiert werden. Gene, deren Promotorbereich methyliert ist, werden im Allgemeinen nicht transkribiert. Das Methylierungsmuster einer DNA kann durch Sequenzierung Bisulfit-behandelter DNA untersucht werden. Durch die Bisulfitbehandlung wird unmethyliertes Cytosin zu Uracil. In einer folgenden PCR und anschließender Sequenzierung klonierter PCR-Fragmente zeigt sich, welche Cytosine methyliert waren und Cs bleiben sowie welche zu Us/Ts transformiert wurden. Man beachte, dass die verwendeten Primer spezifisch für Bisulfit-behandelte DNA sein müssen (keine oder wenig CpGs) und dass mit einem Primerpaar nur einer der beiden DNA-Stränge amplifiziert wird.

Zur DNA-Gewinnung wurden 100.000 tGFP-positive sortierte Zellen in das Protokoll (inkl. RNase-Verdau) für 10.000 - 100.000 Zellen (Gentra Puregene; siehe 2.4.1) eingesetzt. Die DNA wurde in 25 μ L Elutions Puffer gelöst.

Die gelöste DNA wurde durch Zugabe von 2,5 μ L 3 M NaOH und Inkubation für 30 Minuten bei 42 °C denaturiert. Zur Modifikation unmethylierter Cs wurden 255 μ L 3,9 M Natriumhydrogensulfit (= Bisulfit; Sigma; pH 5,0; frisch angesetzt), 15 μ L 10 mM Hydrochinon (Sigma; frisch angesetzt) und 2,5 μ L Wasser zur DNA gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 55 °C inkubiert und dreimal bei 95 °C denaturiert: (3h 55 °C, 5' 95 °C) x3, 3h 55 °C. Die DNA wurde mit *DNA Clean and Concentrator* (Zymo Research) gereinigt und in 25 μ L TE (QIAGEN) resuspendiert. Durch Zugabe von 2,5 μ L 3 M NaOH und Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C wurde die DNA denaturiert. Zur Neutralisierung wurden 13,8 μ L 9 M Ammoniumacetat (pH 7,0) zugegeben. Über eine ethanolische Fällung wurde die DNA gereinigt: 124 μ L 100% EtOH und 1 μ L Glykogen zugeben und mischen; 10 Minuten Inkubation bei -20 °C;

Zentrifugation 10 Minuten 14000 rpm (ca. 18000 g) 4°C; 2x mit 200 µL 70% EtOH waschen; trocknen; resuspendieren in 50 µL. Die modifizierte DNA ist instabil und wurde bei -20 °C gelagert und innerhalb weniger Wochen verwendet.

Für die Promotoren von CD19, CD79B, Pax5α und Pax5β wurden je ein bis zwei CpG-reiche Fragmente amplifiziert, über ein Agarosegel aufgetrennt, mit dem *QIAEX II Kit* (QIAGEN) gereinigt und in 20 µL 10 mM Tris (pH 8,5) eluiert:

Primer	Sequenz (5'-3')
CD19-BS-1aF	TAT TTT GGT GTT TAG GTT GGA GTG TAG T
CD19-BS-1aR	CAA AAA TAT AAA CCC CTT AAA ATA AAA ACC
CD19-BS-2aF	AAG GGG TTT ATA TTT TTG TGT AGA AAA TAG AA
CD19-BS-2aR	AAA CAC CCA ACC ACA ACT CAA AT
CD79b-BS-1aF	GTT TTG GGT TTT TTT AGA TGT TTG ATT T
CD79b-BS-1aR	TAC TCC CCT CTA TCT ATA CTT ACC C
CD79b-BS-2aF	AGG ATT TTA GTT GTG TTG TTT AAG TTG G
CD79b-BS-2aR	CTA AAA ATA AAA ACA AAC CCC ACA AAC
PAX5a-BS-1aF	TTG GAT GGT TGG GAA TTT TG
PAX5a-BS-1aR	CCC AAA CTT TTA TAA AAA TTA AAA AAA A
PAX5b-BS-1aF	TTT TGG AGA TTT TTT TTA TTT TTA TTT TTT AAT
PAX5b-BS-1aR	CCC CAT TAA CTA AAC AAC CCA CA
PAX5b-BS-2bF	TTT GTG GGT TGT TTA GTT AAT GGG G
PAX5b-BS-2bR	AAA AAA ACA AAA AAT CCC AAC CAC CAA AAC

Reagenzien	Primer/Volumina [µl]	
Primer	CD79b-BS-2aF + CD79b-BS-2aR	CD19-BS-1aF + CD19-BS-1aR CD19-BS-2aF + CD19-BS-2aR CD79b-BS-1aF + CD79b-BS-1aR PAX5a-BS-1aF + PAX5a-BS-1aR PAX5b-BS-1aF + PAX5b-BS-1aR
Endkonz. dNTPs [mM]	0,2	0,2
Endkonz. je Primer [µM]	0,3	0,3
HF3 10x Puffer [µL]	5	5
HF MgCl ₂ [mM]	2,5	4,0
Betain [M]	1	1
DNA Menge [µg]	0,1	0,1
High Fidelity Enzyme Mix (Roche) [µL]	0,75	0,75
ad H ₂ O [µL]	50	50

Programm: 94 °C 5'/(94 °C 30"/56 °C 30"/72 °C 45") 45x/72 °C 5'

Reagenzien	Primer/Volumina [µl]
Primer	PAX5b-BS-2bF + PAX5b-BS-2bR
Endkonz. dNTPs [mM]	0,2
Endkonz. je Primer [µM]	0,3
HF3 10x Puffer [µL]	5
HF MgCl ₂ [mM]	4,0
Betain [M]	1
DNA Menge [µg]	0,1
High Fidelity Enzyme Mix (Roche) [µL]	0,75
ad H ₂ O [µL]	50

Programm: 94 °C 5'/(94 °C 30"/62 °C 30"/72 °C 45") 45x/72 °C 5'

Die PCR-Fragmente wurden per TA-Klonierung (2.4.4.1) in Plasmide gebracht und sequenziert.

2.4.6 Reinigung von PCR-Fragmenten

Zur direkten Reinigung von PCR-Produkten wurde der *MinElute PCR Purification Kit* (QIAGEN) oder der *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben verwendet. Beide Kits verwenden Kieselgelsäulen zur Fixierung der DNA.

2.4.7 Gelelektrophorese

Die zu untersuchenden Proben (z. B. Restriktionsverdau, PCR) wurden entsprechend ihrem Volumen mit Gelladepuffer (6x Orange DNA Loading Dye, Fermentas) versetzt und in die Taschen eines 0,8 – 2 %igen TAE-Agarosegels (größere DNA = geringer prozentiges Gel; kleinere DNA-Fragmente = höher prozentiges Gel) geladen. Durch Anlegen einer Spannung von 100 – 120 V wird die negativ-geladene DNA zur Anode gezogen und trennt sich dabei ihrer Größe nach auf. Die DNA wird durch Zugabe von DNA-interkalierenden Farbstoffen und UV-Licht sichtbar gemacht. Dabei wurden 5µL *Ethidiumbromid* (Ethidiumbromidlösung 1 %, Carl Roth) pro 100 mL Gel bis Frühjahr 2010, danach 10 µL *GelRed* (Biotium) pro 100 mL Gel verwendet.

50 x TAE Puffer	2 M Tris-Acetat
	50 mM EDTA, pH 8,0
	ad 1 L ddH ₂ O

2.4.8 Reinigung von DNA- bzw. PCR-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA-Fragmenten, die über ein Agarosegel getrennt und damit aufgereinigt wurden, wurde der *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) oder der *QIAEX II Kit* (QIAGEN) verwendet. Der erstgenannte Kit verwendet Kieselgelsäulen zum Binden der DNA. Der andere benutzt Kieselgelpartikel, die mit der gebundenen DNA abzentrifugiert werden können.

2.5 Protein-Arbeitstechniken

2.5.1 Isolation von Keimzentrums B-Zellen aus humanen Tonsillen

Als Positivkontrolle für den Western Blot wurden humane CD77-positive GC-B-Zellen aus tonsillären mononukleären Zellen (TMCs) per MACS isoliert. CD77 galt als Centroblastenmarker (Mangenev et al., 1991; Pascual et al., 1994), neuere Analysen

haben aber gezeigt, dass im Expressionsprofil von CD77⁺ und CD77⁻ GC-B-Zellen kein Unterschied besteht (Hogerkorp und Borrebaeck, 2006; Klein et al., 2003b). Alternativ wurden aus technischen Gründen CD20-positive CD38-intermediäre Zellen - eine Markerkombination, die für gesamt GC-B-Zellen steht - aus TMCs sortiert.

2.5.1.1 Aufreinigung von TMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Tonsillen wurden mechanisch zerkleinert und über verschiedene Siebe ($\geq 50 \mu\text{M}$) von Bindegewebe gereinigt. Je 35 mL der Zellsuspension in PBS⁻/0,5 % BSA wurde in einem 50 mL Falcon über 15 mL Ficoll Paque PLUS (Amersham)/ Pancoll (PAN Biotech) oder LSM 1077 Lymphozytentrennmedium (PAA) geschichtet. Die verschiedenen Zelltypen wurden 35 Minuten in der Zentrifuge bei 1500 rpm (389 rcf) und 4 °C getrennt. Die tonsillären mononukleären Zellen (TMC), die die GC-B-Zellen enthielten, befinden sich in der Phase zwischen Ficoll/Pancoll/LSM 1077 und PBS⁻. Diese Zellen wurden abgenommen, zweimal in PBS⁻/0,5 % BSA gewaschen, in PBS⁻/0,5 % BSA resuspendiert und gezählt.

2.5.1.2 CD77-MACS

Die Zellen von Interesse tragen den Oberflächenmarker CD77 und können somit positiv angereichert werden. Pro 10^8 TMCs wurden 80 μL AK (*FITC Mouse Anti-Human CD77*, BD # 551353) und 170 μL PBS⁻/0,5 % BSA zu den Zellen gegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Ungebundener AK wurde mit ca. 20 mL PBS⁻/0,5 % BSA bei 1500 rpm (389 rcf) und 4 °C ausgewaschen.

Je 10^7 potentieller CD77-positiver Zellen (Annahme: max. 20 % der TMCs sind CD77-positiv) wurden 10 μL *FITC-Beads* (Miltenyi Biotec, #120-000-293) und 40 μL PBS⁻/0,5 % BSA zu den Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Ungebundene Beads wurden mit ca. 20 mL PBS⁻/0,5 % BSA bei 1500 rpm (389 rcf) und 4 °C ausgewaschen.

Das Pellet wurde in ca. 50 mL PBS⁻/0,5 % BSA resuspendiert und über die mit PBS⁻/0,5 % BSA kalibrierte, im Magneten befindliche Säule gegeben. Die Säulen/Zellen wurden dreimal mit je 3 mL PBS⁻/0,5 % BSA gewaschen. Nach Entfernung des Magneten wurden die Zellen von Interesse dreimal mit je 3 mL PBS⁻/0,5 % BSA eluiert.

Die TMCs, der Durchlauf und das Eluat wurden mit verschiedenen Färbungen im FACS kontrolliert:

Tabelle 6: Kontrollfärbungen CD77-MACS

Zellen	AK1	AK2	Bedeutung der Färbung
TMC	CD19	CD3	Verteilung B- und T-Zellen in TMC (50:50)
TMC	CD20	CD77	Verteilung GC- (15-25%) und andere B-Zellen
DL	CD19	CD3	Verteilung B- und T-Zellen
DL	CD20	CD77	Verteilung GC- und andere B-Zellen
EL	CD20	CD77	Reinheit GC-B-Zellen

Es wurden dabei folgende Antikörper mit einem Volumen von 5 μL / $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen verwendet, die je in 20 μL PBS⁻/0,5 % BSA 10 – 15 Minuten bei RT mit den entsprechenden Zellen inkubiert wurden:

Tabelle 7: Verwendete AK für Kontrollfärbung des CD77-MACS

CD3	FITC anti-human CD3, BD # 555332
CD19	PE anti-human CD10, BD # 555413
CD20	PE Mouse Anti-Human CD20, BD # 555623
CD77	FITC Mouse Anti-Human CD77, BD # 551353

Die gefärbten Zellen wurden mit 900 μL PBS⁻/0,5 % BSA gewaschen und im *BD FACSCanto* (BD Biosciences) gemessen.

2.5.1.3 CD20-CD38-Sortierung

Im Zusammenhang mit einem degradierten CD-77-Antikörper wurden alternativ CD20-positive CD38-intermediäre GC-B-Zellen sortiert.

Die beiden TMC-Proben wurden mit folgenden AK-Volumina versetzt:

Tabelle 8: Färbeansätze CD20-CD38-Sortierung

Tonsille	CD20-PE (BD #555623) [μL]	CD38-Fitc (BD #555459) [μL]	TMC-Volumen [μL]
1	50	35	450
2	60	40	500

Die Zellen wurden 20 Minuten auf Eis gefärbt, mit PBS⁻/0,5 % BSA gewaschen, mit der *FACSDiva* sortiert und im *BD FACSCanto* (BD Biosciences) reanalysiert.

2.5.2 Western Blot

Ein Western Blot dient zur qualitativen Untersuchung von Proteinen; in einem groben Maße kann er auch für quantitative Bestimmungen verwendet werden. Hierfür wurden Proteine isoliert, in einem Polyacrylamidgel der Größe nach getrennt, die getrennten Proteine wurden auf eine *Hybond ECL Nitrocellulosemembran* (Amersham) transferiert und die zu untersuchenden Proteine mit spezifischen, HRP-markierten Antikörpern und *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham) sichtbar gemacht.

Die Ladekontrolle sollte mindestens 10 kDa zum Protein von Interesse unterschiedlich sein, damit für beide Analysen derselbe Blot verwendet werden kann.

2.5.2.1 Protein Isolation

Es wurden folgende Reagenzien hergestellt:

Ripa-Puffer:	5 mL	1 M Tris-HCl pH 7,2
	3 mL	5 M NaCl
	0,5 mL	20% SDS (Endkonzentration 0,1%)
	1g	Natriumdesoxycholat
	1 mL	Triton X100
	ad 100 mL	H ₂ O bidest
		steril filtrieren mit 0,45 µm Filter
		Lagerung bei 4 °C

10x Proteaseinhibitionslösung:	1 Tablette <i>cOmplete Protease Inhibitor Cocktail</i> (Roche)
	700 µL Ripa-Puffer
	Lagerung bei -20 °C

Verwendete Zellen wurden 10 Minuten bei 4 °C und 1000-1400 rpm (190-372 rcf) pelletiert. 1x Proteaseinhibitorlösung wurde mit Ripa-Puffer hergestellt. Das Zellpellet wurde in 1x Proteaseinhibitorlösung resuspendiert und in ein frisches, gekühltes Reaktionsgefäß überführt. 1×10^5 – 5×10^6 Zellen wurden dabei mit 25 – 100 µL Ripa-Puffer lysiert. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden 15 Minuten bei 1400 rpm (372 rcf) und 4 °C abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues gekühltes Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Die Proben wurden ggf. bei -80 °C gelagert.

2.5.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Messansatz wurde wie folgt zusammen gegeben:

700 µL	H ₂ O
99 µL	PBS ⁻
1 µL	Zellextrakt/1x Proteaseinhibitor-Ripa-Puffer (=Leerprobe)
200 µL	Bradford-Reagenz (<i>Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i> , Bio Rad, Raumtemperatur)

Alle Proben wurden im doppelten Ansatz gemessen. Die Messung erfolgte zwischen 5 und 30 Minuten nach Ansetzen der Messlösungen. Die Messung erfolgte bei 595 nm im Photometer, als Leerprobe diente 1x Proteaseinhibitor-Ripa-Puffer. Mit Hilfe einer Eichgeraden wurde die Konzentration der Proben interpoliert.

2.5.2.3 SDS-Page

Das Gel setzt sich aus einem 4 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel (Trennbereich von ca. 20 – 150 kDa) zusammen, die übereinander zwischen zwei Glasplatten gegossen wurden:

Tabelle 9: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamid Gel

je 2 Gele:	Sammelgel	Trenngel 10%
H ₂ O	6,5 mL	10 mL
0,5 M Tris-HCl/0,4% SDS (w/v) pH 6,8	2,5 mL	-
1,5 M Tris-HCl/0,4% SDS (w/v) pH 8,8	-	5 mL
40 % AA	1 mL	5 mL
TEMED	11 µL	12 µL
APS	17 µL	34 µL

Entsprechende Mengen der Proteinproben (10 - 150 µg) wurden mit 1 M DTT (Endkonzentration 0,1 M), 5x Gelladepuffer (*Non-Reducing Lane Marker Sample Puffer*, Thermo Scientific) und Wasser versetzt. Bei 99 °C wurden die Proteine 5 Minuten denaturiert und auf Eis gegeben. Die Proben sowie 10 µL einer Proteinleiter (SM0671, Fermentas) wurden in die Taschen des Gels gegeben und bei einer Spannung von 100 V laufen gelassen bis die Banden von Interesse ausreichend getrennt waren.

2.5.2.4 Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Blotting)

Alle folgenden Papiere und Membranen wurden jeweils einzeln in 1x Blotpuffer getränkt. Vier *Whatman*-Papiere wurden in der Blotkammer (Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, BIO-RAD) luftblasenfrei übereinander geschichtet, darauf eine *Hybond ECL Nitrocellulosemembran* (Amersham) sowie das Gel und vier weitere *Whatman*-Papiere. Die Kammer wurde geschlossen und für 90 Minuten bei 70 mA/Blot und 300 W laufen gelassen.

5x Blot-Puffer: 125 mM Tris (M = 121 g/mol)
 970 mM Glycin (M = 75 g/ml)
 pH 8,3

2.5.2.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit Antikörpern

Je Antikörper wurde das verwendete Reagenz und die verwendete Konzentration optimiert. Bei der Verwendung von *Milchpulver* (Merck) wurden alle folgenden Waschschrte mit TBS-Lösungen durchgeführt. Bei der Verwendung von *Blocking Reagenz* (Roche) fanden PBS^{+/+}-Lösungen (10x PBS^{+/+}, Invitrogen) Verwendung.

10x TBS: 200 mM Tris (M = 121,14 g/mol)
 1,35 M NaCl

TBST/PBST = plus Tween20 (Sigma-Aldrich)

Um unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren, wurde die Membran eine Stunde in 10 % *Milchpulver* (in TBST 0,1 %) bzw. 2,5 % *Blocking-Reagenz* (in PBS ^{+/+}) geschwenkt und damit geblockt. Nach Möglichkeit wurde die geblockte Membran horizontal zwischen Protein von Interesse und Ladekontrolle durchgeschnitten. Die beiden Membranteile wurden je mit der entsprechenden 1. Antikörperlösung (AK in 5 % *Milchpulver*/TBST 0,1 % oder in 0,5 % *Blocking Reagenz*) überschichtet und über Nacht/ mindestens 1 Stunde bei 4 °C schütteln gelassen. Überschüssiger AK wurde mit einer Serie von Waschschrritten entfernt: 3x kurz in TBST 0,1 %/PBST 0,1 %, 2x 10 Minuten in TBST 0,1 %/PBST 0,1 % schwenken. Der HRP gekoppelte 2. AK wurde in 5 % *Milchpulver*/TBST 0,1 % oder in 0,5 % *Blocking Reagenz* gelöst und für eine Stunde bei RT auf die gewaschene Membran gegeben. Nach der Inkubation wurde die Membran wie folgt gewaschen: 3x kurz in TBST 0,1 %/PBST 0,1 %, 2x 10 Minuten in TBST 0,1 %/PBST 0,1 % und 1x 10 Minuten in TBST 0,2 %/PBST 0,1 % schwenken.

Tabelle 10: Verwendete 1. Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung	Reagenz
EBF1	Maus	H00001879-M01, Abnova	1:100 - 1:10000	MP/TBS
EBF (C20)	Ziege	sc-15888, Santa Cruz	1:100	MP/BR
COE1	Kaninchen	AB5949, Chemicon International	1:333	MP/BR
CD79A	Kaninchen	ab-79414, abcam	1:500	BR
CD79B	Ratte	sc-59115, Santa Cruz	1:100	BR
β-Aktin	Ziege	sc-1616, Santa Cruz	1:500	MP/BR
GAPDH	Ziege	sc-31915, Santa Cruz	1:200	MP
β-Tubulin	Maus	69126, MP Biomedicals	1:200	BR

MP – *Milchpulver* (Merck), BR – *Blocking Reagenz* (Roche)

Tabelle 11: Verwendete 2. Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Kaninchen	711-036-152; Jackson Immuno Research	1:10000
Anti-Maus	115-036-062, Jackson Immuno Research	1:2000
Anti-Ziege	sc-2350, Santa Cruz	1:10000
Anti-Ratte	112-035-003, Dianova	1:5000

2.5.2.6 Detektion der untersuchten Proteine im Western Blot

Die AK-gebundenen Membranen wurden mit 1 mL *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (Amersham) nach Herstellerangaben überschichtet. Die abgetropfte Membran wurde in eine Fotokassette gelegt und ein Film (*Amersham Hyperfilm ECL*, GE Healthcare) - je nach Antikörper - für Sekunden oder Minuten

belichtet. Die Filme wurden in einem *Curix 60* (AGFA) entwickelt. Auf den entwickelten Filmen wurden die Banden der Leiter übertragen.

2.6 Retrovirale Arbeitstechniken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Viruspartikel hergestellt, die zur Bestimmung der Infektiosität titriert und für Infektionen von HL- bzw. B-Zelllinien verwendet wurden.

Der Umgang mit viralen Partikeln unterliegt den Sicherheitsbestimmungen der Stufe S2.

2.6.1 Herstellung von Viruspartikeln

Für die Herstellung viraler Partikel müssen das leere modifizierte Virusgenom und die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* gleichzeitig in einer Zelle sein. Hierfür werden im Allgemeinen drei Plasmide cotransfiziert. Es gibt aber auch Systeme, wie das unten beschriebene LinX-System, in dem die notwendigen viralen Gene von den Produktionszellen stabil exprimiert werden. Hier wird dann nur das Virusgenom transfiziert. Folgende virale Systeme wurden verwendet:

Tabelle 12: Verwendete Plasmide zur Herstellung viraler Partikel

Virusgenom	<i>gag/pol</i>	<i>env</i>	Plasmidverhältnis	Produktionszellen
pSM2	-	-	-	LinX (<i>gag/pol/env</i>)
pVig	Δ sp2	HitG (VSV-G)	2,5:1,75:1	293T
pGIPZ	psMPAX2	pMD2.G (VSV-G)	2,5:1,75:1	293T
pGIPZ	psMPAX2	HitG (VSV-G)	2,5:1,75:1	293T
pGIPZ	psMPAX2	pGALV-DAW/M620 (GALV)	2,5:1,75:1	293T
pGIPZ	psMPAX2	Galv-TM (GALV)	2,5:1,75:1	293T
pGIPZ	psMPAX2	RD114-TR (RD114)	2,5:1,75:1	293T
pGIPZ	psMPAX2	pCI-MEA (MuLV)	2,5:1,75:1	293T

Es wurden verschiedene Transfektionsmethoden getestet. Hierbei wurden *CalPhos* (Clontech), *PolyFect* (QIAGEN), *Lipofectamine LTX* (Invitrogen), *Fugene HD* (Promega), *ExGen* (Fermentas), *Tfx 20* (Promega), *GeneJuice* (Merck) und *Transfast* (Promega) nach Herstellerangaben verwendet.

Eine weitere Calcium-Phosphat-Transfektion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Am Vortag der Transfektion wurden 3×10^6 Zellen (293T/LinX) in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Das Medium wurde drei bis vier Stunden vor der Transfektion gewechselt. 20 μ g Plasmid (293T)/10 μ g Plasmid (LinX) wurden in 240 μ L H₂O vorgelegt, 240 μ L 37 °C warmer Puffer A wurde zugeben und 2 Minuten

inkubiert. Unter vortexen wurde 480 µL Puffer B zugetropft und 30 Minuten inkubiert. Das Präzipitat wurde auf die ausgesäten Zellen getropft und über Nacht kultiviert. Nach 16 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch ein geringeres Volumen (6 mL DMEM) ersetzt.

Puffer A 0,5 M CaCl₂
 0,1 M HEPES
 ad 250 mL H₂O dest.
 pH 6,95
 steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C

Puffer B 0,05 M HEPES
 0,75 mM NaH₂PO₄
 0,75 mM Na₂HPO₄
 0,28 M NaCl
 ad 250 mL H₂O dest.
 pH 6,95
 steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C

Der Virus wurde für alle Methoden zwei bzw. drei Tage nach der Transfektion geerntet. Dafür wurde das Medium abgenommen, mit 45 µm Filtern steilfiltriert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.6.2 Virustitration

Um die Infektiosität der Virusüberstände zu bestimmen, wurden diese auf der Produktionszelllinie getestet. Es wurde dabei angenommen, dass eine tGFP-positive Zelle ein Viruspartikel aufgenommen hat.

Jeder Virusüberstand wurde mit zwei Verdünnungen (z. B. 1:10, 1:50, 1:100, 1:200) je im Duplikat vermessen. In entsprechend viele Wells einer 24-well-Platte wurden am Vortag der Infektion je 1x10⁵ Zellen ausgesät, so dass man annehmen kann, dass am Tag der Infektion 2x10⁵ Zellen je Well vorhanden sind. Für die Infektion wurden die Virusverdünnungen in einem Gesamtvolumen von 500 µL mit DMEM angesetzt und auf den mediumfreien Zellrasen gegeben. Drei Tage später wurden die Zellen mechanisch gelöst, gewaschen und im FACS (mit PI) vermessen. Mit Hilfe des Anteils tGFP-positiver Zellen wurde der Virustiter (VT) berechnet:

$$VT \left[\frac{\text{Viren}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Anzahl 293T Zellen} \times \text{Anteil GFP – positiver Zellen}}{\text{verwendetes Volumen Virus [mL]}}$$

2.6.3 Infektion

In Testreihen wurden die optimalen MOIs (*multiplicity of infection*) der verschiedenen verwendeten Viren und Zelllinien bestimmt. Für HL Linien und das letztendlich

verwendete pGIPZ-System sind acht MOI optimal. Für die Infektion wurden die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 1000 rpm/ 173 rcf, 5 Minuten), das Medium bis auf 5 - 15% entfernt, frisches Medium und der entsprechende Virusüberstand (in Abhängigkeit von der MOI, dem Virustiter und der Zellzahl) hinzugegeben, so dass sich die Zellen in einer optimalen Dichte befanden. Zur besseren Infektion wurde 0,5 µL/mL (Stock 10 µg/µL) Polybren (= Hexadimethrinbromid) hinzugefügt. Bis zur Analyse wurden die Zellen in Zellkulturflaschen im Inkubator kultiviert.

2.6.4 Sortierung infizierter Zellen per FACS

Das letztendlich verwendete pGIPZ-System exprimiert *TurboGFP* (tGFP, aus dem Ruderfußkrebs *Pontellina plumata*). Dieser Farbstoff ermöglicht eine Sortierung infizierter Zellen per FACS (2.1.6) und stellt für weitere Analysen nahezu 100% infizierte Proben zur Verfügung.

2.6.5 „cDNA“-Synthese viraler RNA

Um den Virusüberstand per PCR zu testen, wurde er wie folgt behandelt:

DNase-Verdau, um möglicherweise noch vorhandenes Plasmid zu beseitigen:

34 µL	Virusüberstand (Kontrollen: H ₂ O, Plasmid)
4 µL	10x Puffer
2 µL	RQ1 RNase-free DNase (Promega)
30 Minuten,	37 °C

Die RNA-Isolation wurde mit Trizol nach Herstellerangaben durchgeführt. RNA wurde als Pellet in die nächste Reaktion eingesetzt.

Die cDNA-Synthese wurde mit dem QIAGEN *SensiScript Kit* und Random Hexamer (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Herunterregulation des B-Zelltranskriptionsfaktors E2A in B-Zelllinien unter Verwendung von shRNA-exprimierenden Retroviren

Da das cHL weitestgehend die Expression von B-Zellgenen inklusive typischer Transkriptionsfaktoren verloren hat, soll in einem ersten Teilprojekt untersucht werden wie sich B-Zelllinien verhalten in denen der Transkriptionsfaktor E2A ausgeschaltet wird.

3.1.1 Herstellung der pSM2c shRNA-Vektoren

Es wird von Open Biosystems pSM2 (pSHAG-MAGIC version 2.0) ein MSCV (Murine Stem Cell Virus) retroviraler Vektor vertrieben, der mit einer Bibliothek unterschiedlicher shRNAs (*short hairpin RNA*) ausgestattet ist. Da der Verlust von B-Zelltranskriptionsfaktoren in B-Zellen zu einem raschen Tod führen könnte, werden zunächst Kontrollplasmide verwendet, um das virale System als Ganzes zu etablieren. Die verwendeten Plasmide codieren shRNAs gegen die Proteasomuntereinheiten PSM2 und PSM5 und sind in der Literatur bereits erfolgreich getestet worden (Silva et al., 2005). pSM2 enthält kein farbiges Markergen für Sortierungen, so dass zunächst in beide Vektoren GFP einkloniert werden soll. Das grün-fluoreszierende Protein wird mitsamt CMV-Promotor aus dem im Labor vorliegenden Vektor pAdTracksiGata3 amplifiziert (2.4.5.1). Die Primer haben überhängende Enden, die einen BamHI-Verdau ermöglichen. Das verdaute Fragment wird phosphoryliert (2.4.4.6), um die Ligation zu begünstigen. Vor der Klonierung wird per Sequenzierung kontrolliert, dass das Fragment der Sollsequenz entspricht. Die Plasmide werden zunächst mit einem BamHI/HindII- bzw. XbaI/HindIII-Verdau positiv auf ihre Identität geprüft. Sie haben eine BamHI-Schnittstelle zwischen dem LTR und dem U6-Promotor, in die GFP einkloniert werden soll. Nach dem Verdau werden die Vektoren dephosphoryliert (2.4.4.5), um die Religation der BamHI geöffneten Vektoren zu minimieren. Für die Transformation (2.2.2) der Ligationsansätze werden DH10 β pir116- Bakterien verwendet, die das π -Protein (Pir-Gen) enthalten, das für die Replikation des Plasmids benötigt wird. Diese Klonierungsstrategie führt, auch nach mehreren Versuchen, nicht zum gewünschten Erfolg wie verschiedene Restriktionsverdau (BamHI/HindIII) bzw. Kontrollsequenzierungen zeigen. Es wird nur ein einzelnes pSMC2-shPSMC5-Plasmid gewonnen.

Die Strategie wird wie folgt verändert: Ein weiteres pSM2-Plasmid mit einer shRNA gegen Gata3 aus unserer Arbeitsgruppe aus einem Projekt von Jens Stanelle konnte erfolgreich über die BamHI-Schnittstelle mit GFP ergänzt werden. Dieses Plasmid dient als Grundlage zur Umklonierung der shRNAs gegen PSMC2 und PSMC5 entweder über XhoI/EcoRI- oder über Sall/Bpil-Schnittstellen. Das einzelne Plasmid aus der ersten Klonierungstrategie und fünf weitere aus der neuen Strategie werden komplett sequenziert und stimmen mit der Sollsequenz überein.

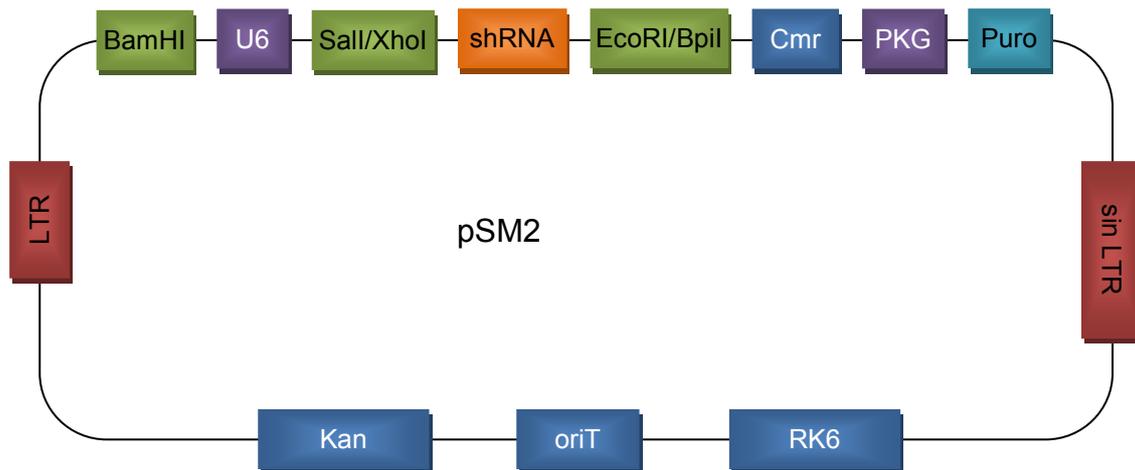


Abbildung 4: Schematische Darstellung des retroviralen Vektors pSM2.

U6, PKG = Promotor; Puro = eukaryotische Selektion; Cmr (Chloramphenicol), Kan (Kanamycin) = bakterielle Selektion; RK6, OriT = bakterielle Gene für Replikation und Transfer; LTR = 5' long terminal repeat, sinLTR = 3' selbst inaktivierendes long terminal repeat, Sequenzen zur Integration ins Wirtsgenom und Steuerung der Expression umliegender Gene.

3.1.2 Virusproduktion mit pSM2-shPSMC2 und pSM2-shPSMC5 Vektoren

Passend zum Vektor pSM2 bietet Open Biosystems die ebenfalls von Greg Hannon (Cold Spring Harbor Laboratory) entwickelte Verpackungslinie *LinX* an. Die auf HEK 293T Zellen (humane embryonale Niere) basierende Linie enthält die Virusgene gag, pol und env, die für Verpackung und Replikation benötigt werden, stabil integriert ins Genom.

In diese Linie werden per Calcium-Phosphat-Transfektion die beiden Vektoren mit shRNAs gegen PSMC2 und PSMC5 gebracht. Der Virusüberstand wird steril filtriert und auf 293T Zellen der Titer bestimmt. Die niedrige Transfektionseffizienz spiegelt sich im virus-freien Virusüberstand wider – es werden bei der Titration keine GFP-positiven Zellen detektiert.

Eine deutlich bessere Transfektionseffizienz von 50 – 70 % zeigt die Verwendung des Transfektionsreagenz PolyFect (QIAGEN). Bei der Titration können jedoch keine

GFP-positiven Zellen im FACS nachgewiesen werden. Um zu testen, ob wenige oder nicht infektiöse Viren produziert wurden, werden die Virusüberstände außerdem per PCR (2.4.5.1) mit Primern, die spezifisch für GFP bzw. den Vektor sind, kontrolliert. Hierfür wird zunächst virale cDNA aus dem Überstand hergestellt (2.6.5), die als Template der PCR dient. Die Positiv-Kontrollen und Negativ-Kontrollen zeigen, dass die Strategie grundsätzlich funktioniert, doch die produzierten Virusüberstände enthalten keine nachweisbaren Mengen Viren.

3.1.3 Umklonierung der shRNAs in pVig

Das lentivirale pVig-System und seine Coplasmide (Δ sp2 und HitG) werden hier im Labor bereits erfolgreich verwendet. Bevorzugt soll die teilweise bereits validierte shRNA-Bibliothek des pSM2-Vektors weiter verwendet werden. Es werden daher die beiden vorhandenen shRNAs mitsamt Promotor über die BamHI- und BpI-Schnittstellen in diesen Vektor umkloniert. Die shRNAs PSMC2 und PSMC5 werden mit den beiden Enzymen ausgeschnitten und mit einem Klenow-Fragment (2.4.4.4) sogenannte *blunt-ends* (glatte DNA-Enden) produziert. Das pVig-siGata3-Plasmid wird Sall XhoI verdaut, so dass die Gata3-siRNA-Kassette entfernt wird. Anschließend wird das Plasmid ebenfalls mit dem Klenow-Fragment behandelt und dephosphoryliert (2.4.4.5). Die beiden shRNAs werden in das Plasmid ligiert und XL1 blue Zellen damit transformiert. Vier Minipräparationen (3x shPSMC2 und 1x shPSMC5) werden über drei Restriktionsverdauungen (EcoRI, SpeI/BamHI- bzw. NcoI) für richtig befunden.

3.1.4 Virusproduktion mit pVig-shPSMC2 und pVig-shPSMC5 Vektoren

Eine Virusproduktion mit den Coplasmoden Δ sp2 und HitG auf 293T Zellen per Calcium-Phosphat-Transfektion und eine anschließende Titration auf 293T Zellen zeigt, dass der Virusüberstand geringe Mengen infektiöser Partikel enthält.

Um zu testen, ob sich evtl. andere Zellen besser zur Titration eignen, werden mit einem funktionierenden Virusüberstand von Jens Stanelle (pVig-siGata3) 293T Zellen mit HeLa- und 293-Zellen verglichen. Hierbei werden je Linie Triplikate von 1:10 und 1:100 Verdünnungen des Virus auf je 1×10^5 Zellen gegeben und drei Tage später im FACS analysiert. 293T Zellen lassen sich durchschnittlich zu 69 %, 293 Zellen zu 54 % und HeLa Zellen zu 21 % infizieren. Mit 293T Zellen verwenden wir bereits gut infizierbare Zellen.

Zur Optimierung der Virusproduktion werden verschiedene Transfektionsmethoden mit pVig samt Coplasmide Δ sp2 und HitG getestet und die Transfektionseffizienz im FACS über den Anteil GFP-positiver Zellen bestimmt und verglichen. Es werden in diesem Experiment PolyFect (QIAGEN), *CalPhos* (Clontech), *Lipofectamine LTX* (Invitrogen), *Fugene HD* (Roche/Promega), *ExGen* (Fermentas), *Tfx 20* (Promega) und *Transfast* (Promega) verwendet. ExGen zeigt mit 61% die höchste Transfektionseffizienz, gefolgt von Lipofectamine mit 55 % und Fugene mit 36 %. Die Titerung dieser Virusüberstände auf 293T Zellen zeigt, dass die mit Lipofectamine ($2,9 \times 10^5$ V/mL), Fugene ($1,7 \times 10^5$ V/mL) und ExGen ($1,0 \times 10^5$ V/mL) produzierten Viren auch die höchsten Titer haben. Obwohl ExGen in dieser Messung nicht den besten Titer produziert, wird aus laborinternen Gründen zunächst mit diesem Reagenz gearbeitet.

3.1.5 Infektion von B-Zelllinien mit pVig-shPSMC2 und pVig-shPSMC5 Viren

In weiteren in unserer Arbeitsgruppe geplanten Experimenten sollen auch Gene in HL-Linien herunter reguliert werden. Zwar gelten HL-Linien als schwer infizierbar, aber wenn das System mit diesen Zellen funktioniert, wird es vermutlich auch mit anderen B-Zelllinien funktionieren. Es werden daher L1236- und L428- Zellen (beides HL) infiziert, aus dem gesamten Ansatz nach 48, 72 bzw. 96 Stunden RNA isoliert und per Real-time PCR die Expression von PSMC2 und PSMC5 kontrolliert. Bei der Messung von L1236, die eine Infektionseffizienz von 43 - 48 % der lebenden Zellen aufweist, wird die PSMC2 mRNA nach 72 Stunden soweit herunter reguliert, dass sie in 40 Zyklen nicht mehr nachweisbar ist. PSMC5 zeigt nach 72 Stunden keine Reduktion. Die Analyse von L428, die eine Infektionseffizienz von 35 - 50 % der lebenden Zellen aufweist, zeigt keine Regulation von PSMC2 oder PSMC5 mRNA. Die bestimmten Infektionseffizienzen liegen im Bereich der lebenden Zellen; die RNA wird aber aus allen Zellen gewonnen. Hier liegt der Anteil der GFP-positiven Zellen z. B. für L428 nur bei maximal 2,5 %. Für weitere Analysen wäre die Sortierung von GFP-positiven Zellen im FACS sinnvoll. Da dies jedoch mehr experimentellen Aufwand bedeutet und für Folgeexperimente eine deutliche Materialbeschränkung (z. B. für Western Blot) mit sich bringt, wird zunächst noch das folgende System getestet:

3.1.6 Virusproduktion mit dem pGIPZ-shRNA-System

Die pGIPZ-Plasmide sind, wie die pSMC2-Vektoren, mit vielen verschiedenen shRNAs erhältlich und codieren bereits für tGFP als Marker. Die dazu gehörigen Verpackungsplasmide sind psPAX2 (Addgene plasmid 12260, Didier Trono, Lausanne) und pMD2.G (Addgene plasmid 12259, Didier Trono, Lausanne). Es werden Plasmide mit shRNAs gegen GAPDH, PSMC2 (Kontrollen) und gegen E2A sowie ein non-silencing Vektor erworben. Nach der Cotransfektion der drei Plasmide (pGIPZ, psPAX2 und pMD2.G) in 293T-Zellen mit ExGen konnten Virusüberstände mit einer Konzentration von $3 - 6 \times 10^6$ Viren/mL gewonnen werden. Hiermit können Zellen infiziert werden ohne die jeweils empfohlene Mindestdichte der Linien zu unterschreiten.

3.1.7 Optimierung der Infektion mit pGIPZ-Viren

Um eine passende B-Zelllinie für die Herunterregulation von E2A zu finden, werden verschiedenen Linien (Daudi & BL2 (BL), Karpas-422 & OCI-LY7 (DLBCL)) mit verschiedenen MOI (1 – 10) eines „non-silencing“ Konstrukts infiziert und die Infektionseffizienz im FACS bestimmt. Mit 10 MOI erreichen Daudi-Zellen 70% tGFP-positive Zellen, Karpas-422 erreicht 30 %, BL2 knapp 15 % und OCI-LY7 unter 1 % GFP-positive Zellen. Um die Sortierung von Zellen zu vermeiden, sollen die Infektionsraten gesteigert werden.

Der Pseudotyp bestimmt über das Hüllprotein, welche Zellen infiziert werden können. Er wird vom envelope-Gen (env) festgelegt. Die im Labor vorliegenden env-Plasmide werden mit dem pGIPZ-non-silencing und dem psPAX2 Plasmid in eine Virusproduktion eingesetzt und verschiedene B-Zelllinien (Daudi, Raji, Ramos & BL2 (BL), L1236, L428, KMH2 & HDLM2 (HL)) damit infiziert.

Die beiden VSV-G Plasmide (pMD2.G und HitG) haben bei fünf der acht getesteten Linien (L1236, BL2, Daudi, Ramos, HDLM2) die höchste Infektiosität. Bei der Linie L428 infiziert zwar der GALV-Pseudotyp (34% + 28 %) besser, doch ist der Unterschied zu VSV-G (28 % + 23 %) nicht extrem. Die Linien KMH2 und Raji lassen sich von GALV bzw. RD114 (Abbildung 5) deutlich besser infizieren. Da 75% der Linien gut mit dem für das pGIPZ-Konstrukt vorgesehenen Plasmid pMD2.G zu infizieren sind, wird es weiterhin für Produktionen verwendet. Die Sortierung von tGFP-positiven Zellen lässt sich nun aber nicht mehr vermeiden.

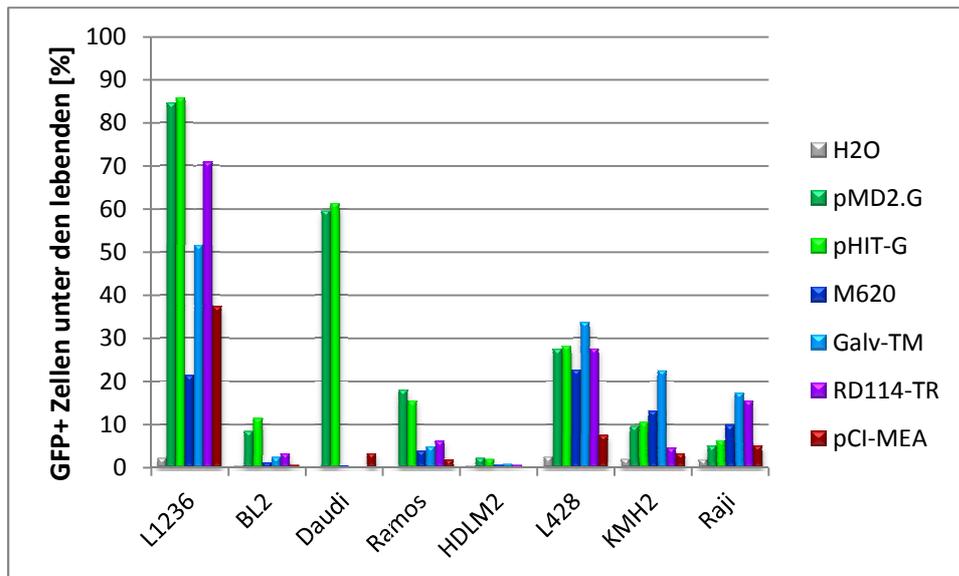


Abbildung 5: Analyse verschiedener env-Proteine auf die Infizierbarkeit von B-Zelllinien
 HitG und pMD2.G codieren für VSV-G, pGALV-DAW/M620 und Galv-TM für GALV, RD114-TR für RD114 und pCI-MEA für MuLV.

3.1.8 Infektion von B-Zelllinien mit pGIPZ-Viren

Für die Infektion einer B-Zelllinie mit dem shRNA-Virus gegen PSMC2, GAPDH und E2A wird Karpas-422 (DLBCL) gewählt, die bei der Testung verschiedener MOIs hohe Infektionsraten erreicht hat. Daudi hat in den Vorversuchen (3.1.7) zwar höhere Infektionsraten, ist jedoch EBV positiv und wird der Sicherheitsstufe 2 zugeordnet, daher wird sie zunächst nicht für Analysen verwendet. Vier Tage nach der Infektion von Karpas-422 werden je Konstrukt tGFP-positive und PI-negative Zellen sortiert. Von den sortierten Zellen wird cDNA hergestellt, die in einer Real-time PCR gemessen werden. Hierbei wird β -Aktin als Referenzgen und der Virus mit der non-silencing-Sequenz als Normalkontrolle verwendet.

Die $\Delta\Delta C_t$ -Werte zum non-silencing Konstrukt und zum Referenzgen β -Aktin liegen bei allen drei getesteten shRNA-Viren um null (Abbildung 6), d. h. es hat keine Regulation stattgefunden.

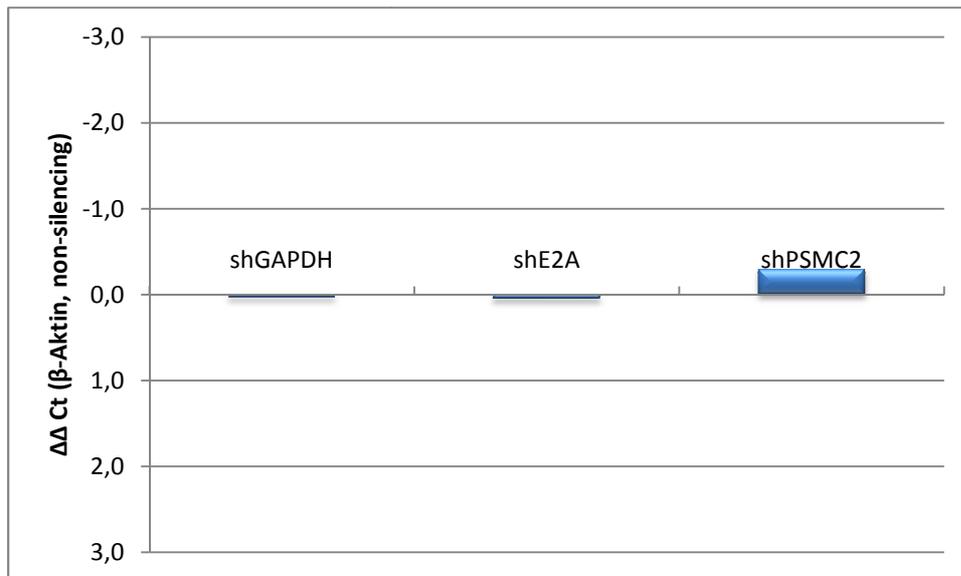


Abbildung 6: Real-time PCR von shRNA-behandelten Karpas-422.

Gemessen wurden jeweils die mRNAs, die von den shRNAs reguliert werden sollten und das Referenzgen β -Aktin. Normalisiert wurde gegen das Referenzgen und die Normalkontrolle des non-silencing Virus.

Auf Grund der mäßigen inhaltlichen Erkenntnisse aus diesem Teilprojekt und dem parallel stattfindenden, erfolgversprechenderem Teilprojekt 3.2, wird an dieser Stelle die Herunterregulation von B-Zelltranskriptionsfaktoren in B-Zelllinien bis auf weiteres ruhen gelassen.

3.2 Expression des B-Zelltranskriptionsfaktors EBF1 in HL-Linien

Zellen des HL haben das Expressionsmuster ihrer Herkunftszellen, der B-Zellen, zum großen Teil verloren. Was passiert, wenn ein wichtiger B-Zelltranskriptionsfaktor in diesen Zellen reexprimiert wird? Kann die B-Zellsignatur wieder hergestellt werden? Werden die Promotoren bisher stillgelegter Gene wieder demethyliert? Kann eine HRS-Zelle, von der vermutet wird, dass der Verlust der Expression der B-Zellgene das Überleben der Zellen ermöglicht, die Expression eines B-Zelltranskriptionsfaktors überleben? Diese Fragen sollen in den folgenden Experimenten untersucht werden.

3.2.1 Etablierung der EBF1-Reexpression in Hodgkinzellen

3.2.1.1 Klonierung des pGIPZ-Spe-EBF1 Plasmids

In Zusammenarbeit mit Roland Schmitz aus unserer Arbeitsgruppe entsteht per PCR aus dem pGIPZ-non-silencing-Vektor (3.1.6) ein Plasmid, das nach der IRES-site eine SpeI-Schnittstelle enthält, in die ein beliebiges Gen, hier EBF1, zur Expression kloniert werden kann:

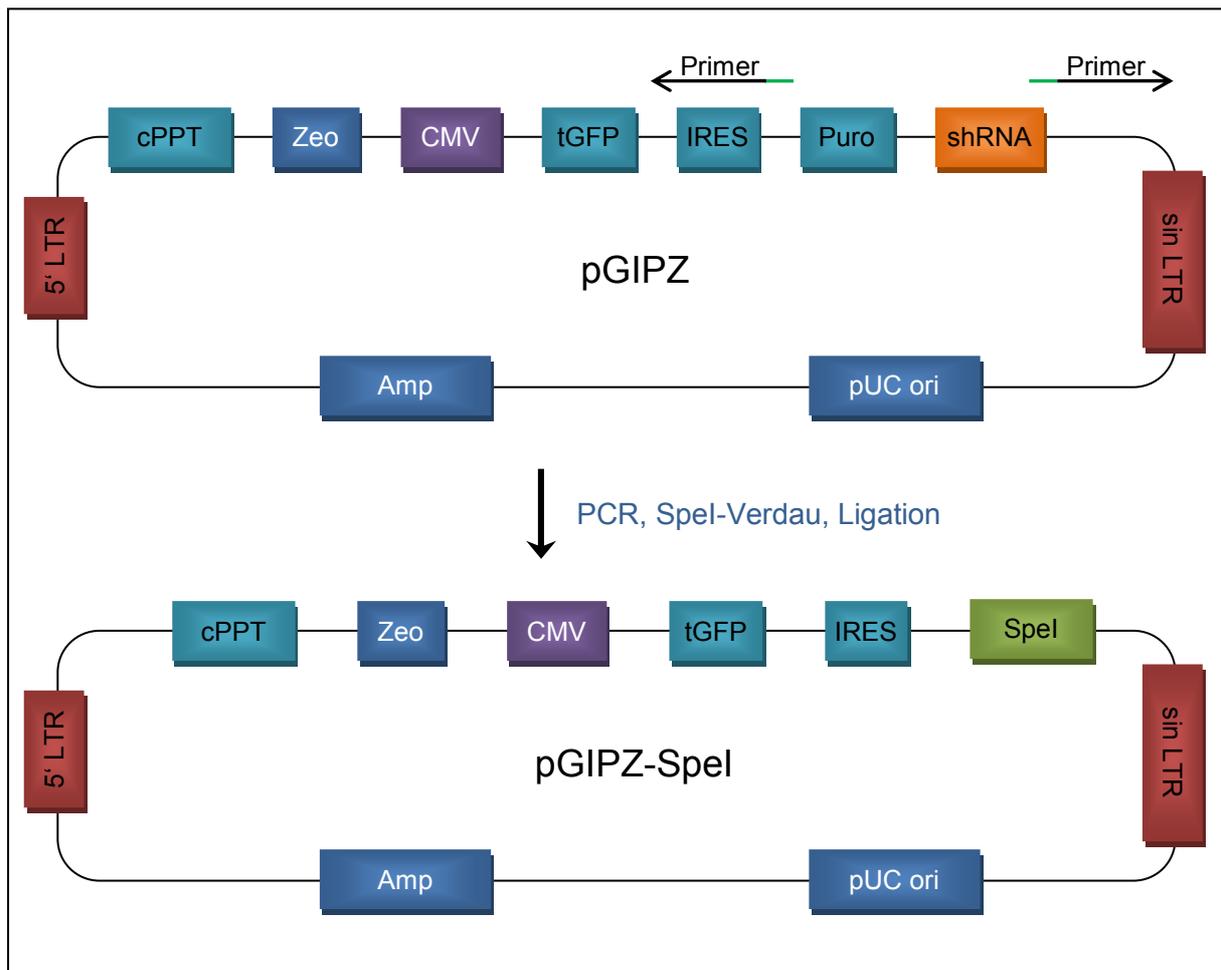


Abbildung 7: Strategie zur Herstellung des Vektors pGIPZ-Spel.

Zeo + Amp = bakterielle Selektionsmarker; pUC ori = Sequenz zur Replikation und Verbleib in E. coli; cPPT = zentraler Polypurintrakt, hilft bei der Translokation in den Zellkern von nicht teilenden Zellen; tGFP = Turbo GFP; Marker zur optischen Erkennung z. B. FACS; Puro = eukaryotischer Selektionsmarker; CMV = RNA Polymerase II Promotor; IRES = interne ribosomale Eintrittsstelle, initiiert Bindung von mRNA an Ribosomen; 5'LTR = 5' long terminal repeat, sinLTR = 3' selbst inaktivierendes long terminal repeat, Sequenzen zur Integration ins Wirtsgenom und Steuerung der Expression umliegender Gene.

Von unserer Kooperationsgruppe aus Frankfurt am Main haben wir den Vektor pCEP4_EBF_20 bekommen, der die mRNA von EBF1 (GI 36054140 im Bereich von 279 – 2063 bp; cds 284...2059) enthält. Die Sequenz wird von uns mit verschiedenen Primern per Sequenzierung überprüft. Mit diesem Plasmid als Matrize und Oligonukleotiden, die überhängende SpeI-Enden besitzen, wird ein EBF1-PCR-Produkt hergestellt, das in die SpeI Schnittstelle des pGIPZ-Spel kloniert wird. Ein per EcoRI/NotI-Restriktionsverdau analysierter und für richtig befundener Klon (#4) wird im Bereich von EBF1 per Sequenzierung ebenfalls bestätigt. Die EBF1-Expression des Vektors in 293T-Zellen wird im WB mit untransfizierten und B-Zellen zum Vergleich gezeigt. Der pGIPZ-Spel Klon #15 wird als Kontrollplasmid verwendet und in folgenden Experimenten mit „empty“ bezeichnet.

3.2.1.2 EBF1-Expression in HL-Linien

Bevor EBF1 in HL-Linien überexprimiert wird, soll untersucht werden, wie hoch die endogene EBF1 Expression ist. Die Literatur ist hier nicht ganz eindeutig: Zum einen wird gezeigt, dass die HL-Linien L-1236, L-428, KM-H2 und HDLM-2 im Vergleich zu anderen B-Zelllinien EBF1 mRNA nicht exprimieren, im Gegensatz zu L591 (Mathas et al., 2006). Zum anderen wird eine leichte Expression in L-428 und KM-H2 und eine stärkere in L540 und HDLM-2 präsentiert (Hertel et al., 2002).

Für den Western Blot (WB) werden drei verschiedene EBF1-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen und verschiedenen Blocking Reagenzien getestet. Der monoklonale Antikörper von Abnova ist den beiden polyklonalen deutlich überlegen. Als Ladekontrolle wird GAPDH etabliert.

Da angenommen wird, dass die Ursprungszellen des HL aus dem GC stammen, werden als Vergleichskontrolle in dem WB CD77-positive GC-B-Zellen aus Tonsillen verwendet. CD77+ galt als Marker für Centroblasten (Pascual et al., 1994). Es wurde allerdings über Genchips gezeigt, dass die Unterteilung Centroblasten, Centrocyten über CD77 nicht so klar vorgenommen werden kann (Hogerkerp und Borrebaeck, 2006; Klein et al., 2003a; Klein et al., 2003b). Für unsere Analyse spielt das jedoch eine untergeordnete Rolle, da allgemein GC-B-Zellen als EBF1 Positivkontrolle ausreichend sind.

Die Ladekontrolle GAPDH (Abbildung 8) zeigt in mehreren WBs einen unterschiedlichen Gehalt in einer konstanten Menge Protein (15 µg) in verschiedenen Proben. Im Bereich der quantitativen RT-PCR wird darauf hingewiesen, dass sogenannte Haushaltsgene oder besser Referenzgene z. B. durch Proliferation reguliert werden (Caradec et al., 2010; Glare et al., 2002; Meyer-Siegler et al., 1992). Daher sollte im quantitativen Bereich die Wahl eines Referenzgens optimiert werden oder mehrere Referenzgene verwendet werden. Für die nur bedingt quantitative Aussage eines Western Blots wird das nicht empfohlen, scheint hier aber angebracht. Es wird ebenfalls β -Aktin verwendet, was aber zu technisch unsauberem Blots führt. Andere Ladekontrollen, wie z. B. Tubulin, sind mit ihrem Molekulargewicht zu nah an EBF1, weshalb weiterhin GAPDH verwendet wird.

SUP-HD1 und die von T-Zellen abstammende HDLM-2 exprimieren geringe Mengen EBF1 (Abbildung 8). Werden diese mit den beiden GC-B-Zellproben verglichen, so

zeigt sich eine ähnlich hohe Expression, wenn sich auf die absolute Proteinmenge je Spur (15 µg) bezogen wird und eine niedrigere Expression, wenn diese mit der GAPDH-Menge normalisiert wird. KM-H2, L-428 und L1236 exprimieren nur Spuren von EBF1 im Vergleich zu GC-B-Zellen, unabhängig von der Ladekontrolle. Die jüngste HL-Linie, U-HO1, zeigt eine deutliche EBF1-Bande. Im Vergleich zur absoluten Proteinmenge je Spur kann von einer Überexpression gesprochen werden. Wird der EBF1-Gehalt zur Ladekontrolle normalisiert, so hat diese Linie ähnlich viel EBF1 wie GC-B-Zellen.

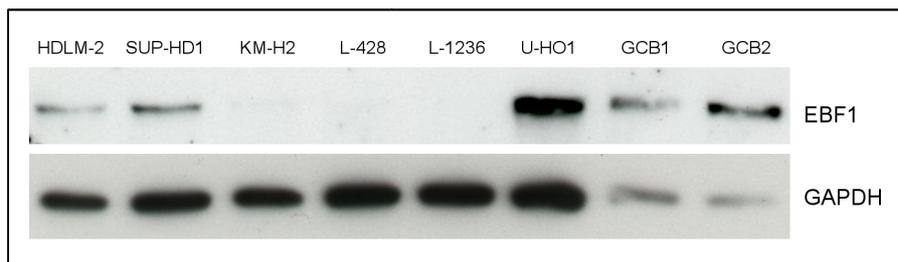


Abbildung 8: EBF1-Expression in HL-Linien

Die Linien HDLM-2 und SUP-HD haben geringe Mengen EBF1-Protein. KM-H2, L428 und L1236 zeigen hier kein EBF1-Signal. U-HO1 exprimiert deutlich EBF1, ebenso die GC-B-Zellen (GCB) zweier Donoren. Die GAPDH-Banden zeigen gleichmäßige Ladung im Bereich der Lymphomproben, die Kontrollen haben ein deutlich schwächeres Signal.

3.2.1.3 Analyse der EBF1-Reexpression in HL-Linien

Per semiquantitativer RT-PCR (2.4.5.3) und WB (2.5.2) wird die EBF1-Expression des Konstrukts in verschiedenen HL-Linien untersucht. Die Zellen werden mit je acht MOI des EBF1- bzw. *empty*-Virus infiziert. An drei Zeitpunkten, im Bereich von drei bis zehn Tagen nach der Infektion, werden tGFP+/PI- Zellen per FACS sortiert und für eine cDNA-Synthese bzw. Proteinlysate verwendet. Als Positivkontrolle im WB und zum Vergleich der Expressionstärke werden ebenfalls Lysate von CD77+ oder CD20+/CD38-intermediären GC-B-Zellen aufgetragen. Als Ladekontrolle im Western Blot wird ebenfalls β -Aktin verwendet, das jedoch häufig zu technischen Problemen führt. In späteren Experimenten wird daher GAPDH als Ladekontrolle verwendet.

Die semiquantitative RT-PCR für EBF1 zeigt eine deutlich erhöhte Expression der EBF1 mRNA in den Zellen, die mit dem EBF1-Virus transduziert wurden (Abbildung 9).

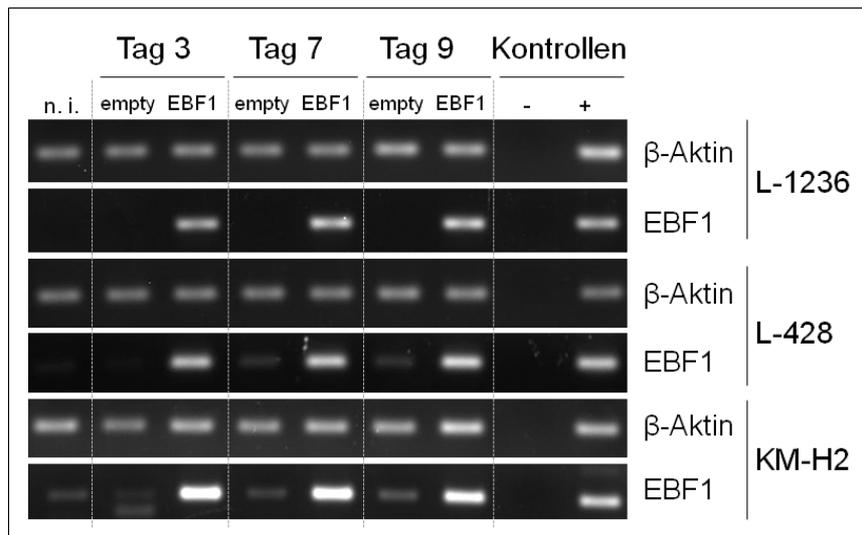


Abbildung 9: Semiquantitative RT-PCR von EBF1 in EBF1- und *empty*-infizierten HL-Linien

Die β -Aktin-Banden zeigen, dass die verschiedenen cDNAs eine vergleichbare Konzentration aufweisen. Die EBF1-Expression ist in allen drei Linien an allen drei untersuchten Zeitpunkten deutlich zu sehen. n. i. = nicht infiziert.

Die Western Blots zeigen in allen untersuchten Linien im Gegensatz zu nicht infizierten (UB) und *empty*-transduzierten Kontrollzellen eine deutliche EBF1-Expression in EBF1-transduzierten Zellen (Abbildung 10). Der EBF1-Überstand ist also in der Lage EBF1-Protein in HL-Zellen zu exprimieren. Im Vergleich zu den tonsillären GC-B-Zellen (GCB) muss in unserem Experiment von einer Überexpression gesprochen werden, es liegt also kein physiologischer EBF1-Level vor. In den Linien L-1236, L-428 und KM-H2 ist der EBF1-Level von nicht infizierten (UB) und *empty*-transduzierten Kontrollzellen deutlich niedriger als vom gesunden Pendant, den GC-B-Zellen. Die Linie U-HO1 zeigt eine schwache EBF1 Expression, die vielleicht sogar ähnlich hoch ist wie die der Kontrollzellen. Dennoch zeichnet auch diese Linie einen Verlust der B-Zellidentität aus, z. B. durch fehlende Immunglobulin und CD19 Expression (Mader et al., 2007). Möglicherweise liegt EBF1 hier in einer defekten oder inaktiven Form vor.

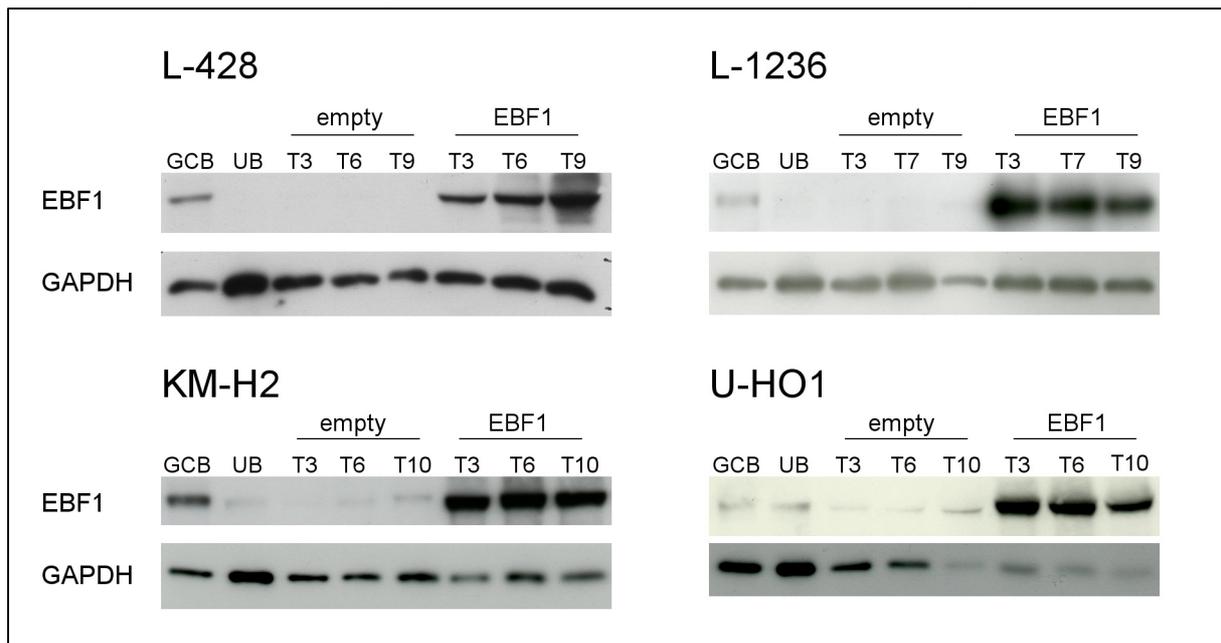


Abbildung 10: EBF1-Proteinanalyse in EBF1- und *empty*-infizierten HL-Linien

Die L-428, L-1236 und KM-H2 Blots zeigen deutliche EBF1-Expression in GC-B- und EBF1-transduzierten Zellen und weniger bis keine EBF1-Expression in nicht- und *empty*-transduzierten Zellen. Die Linie U-HO1 zeigt in nicht-transduzierten Zellen fast so viel EBF1-Protein wie in GC-B-Zellen. GCB = tonsilläre GC-B-Zellen (L-1236, KM-H2, U-HO1: CD77+; L-428: CD20+/CD38intermediär); UB = unbehandelte Zellen der entsprechenden Linie; T = Tag nach der Infektion.

Insgesamt zeigen die sqRT-PCR und der Western Blot, dass der EBF1-Virus EBF1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene exprimiert.

3.2.2 Änderungen der Genexpression durch EBF1-Reexpression

3.2.2.1 Analyse positiv und negativ regulierter EBF1-Zielgene per RT-PCR

Zunächst wird die kostengünstige, aber aufwändiger zu etablierende Methode der semiquantitativen PCR (2.4.5.3) angewendet, um ausgewählte EBF1-Zielgene zu untersuchen. Aus Mangel an humanen Daten wurden teilweise EBF1-Zielgene aus Untersuchungen an Mäusen ausgewählt. Positive Zielgene sind CD19 (Gisler et al., 1999; Mansson et al., 2004; Walter et al., 2008), CD79A (= mb-1/Ig α) (Gisler et al., 2000; Hagman et al., 1991), CD79B (= B29/Ig β) (Akerblad et al., 1999) und PAX5 (O’Riordan und Grosschedl, 1999). Die Expression von ID2 und Notch1 soll laut (Pongubala et al., 2008; Thal et al., 2009) von EBF1 inhibiert werden. Als Referenzgene werden β -Aktin und GAPDH (ohne Abbildung) verwendet.

Die PCR-Reaktionen werden wie folgt optimiert: Die Oligonukleotide sind so entworfen, dass kurze Amplikons mit einer Länge von 100 – 200 bp entstehen, die über einem Intron liegen. Außerdem haben die Oligonukleotide

Schmelztemperaturen in einem ähnlichen Bereich, so dass möglichst wenig unterschiedliche PCR-Maschinen verwendet werden müssen. Jedes Amplikon wird bei drei verschiedenen Oligonukleotid-Anlagerungstemperaturen und drei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen getestet, denn gerade im Bereich einer quantitativen Bestimmung können nicht optimale PCR-Bedingungen Ergebnisse verzerren.

Je Linie und Amplikon wird der exponentielle Bereich der PCR auf folgende Weise bestimmt: Es werden je Amplikon vier gleiche PCR-Reaktionen angesetzt, die jeweils im Abstand von drei Zyklen aus der PCR-Maschine entfernt werden. Eine konstante Menge des PCR-Ansatzes wird im Agarosegel analysiert. Bei Aufnahmeeinstellungen, die nicht zu überbelichteten Banden führen, kann sehr deutlich erkannt werden, ab welcher Zykluszahl die Banden eine Sättigung erreichen. Je Linie wird dieses Etablierungsexperiment mehrfach wiederholt.

Die Zelllinien L1236, L428 und KMH2 werden mit EBF1 bzw. *empty*-Virusüberstand infiziert. An drei Zeitpunkten, zwischen drei und zehn Tagen nach der Infektion, werden 10.000 tGFP+/PI- Zellen sortiert. Aus diesen wird RNA gewonnen, die komplett in eine cDNA-Synthese eingesetzt wird. Die cDNAs werden in die semiquantitative PCR eingesetzt und im Gel analysiert. Die Zellzahl je PCR-Reaktion beträgt durchschnittlich 500 Zellen.

Die Linie L1236 (Abbildung 9) zeigt eine Hochregulation der B-Zellgene CD19, CD79A und -B sowie PAX5. Unerwarteter Weise wird der T-Zelltranskriptionsfaktor, Notch1, ebenfalls hochreguliert, obwohl für die Maus eine Herunterregulation durch EBF1 beschrieben wird (Pongubala et al., 2008). Zur Kontrolle, ob die Notch1-Oligonukleotide evtl. ein anderes Gen amplifizieren und wir deshalb eine Hochregulation sehen, wird dieses PCR-Produkt sequenziert. Es handelt sich hierbei tatsächlich um Notch1. ID2 ändert seine Expression durch die Anwesenheit von EBF1 nicht.

Die Linie L428 (Abbildung 9) exprimiert in den EBF1-infizierten Zellen ebenfalls die B-Zellgene CD19, CD79A und -B. PAX5 bleibt in diesen Zellen in seiner Expression unverändert, ebenso der T-Zelltranskriptionsfaktor Notch1. ID2 (ohne Abbildung) zeigt keine Expressionsänderung.

KMH2 (Abbildung 9) reagiert auf EBF1-Reexpression ebenfalls mit einer Hochregulation von CD19, CD79A und -B. PAX5, Notch1 und ID2 ändern ihre Expression nicht.

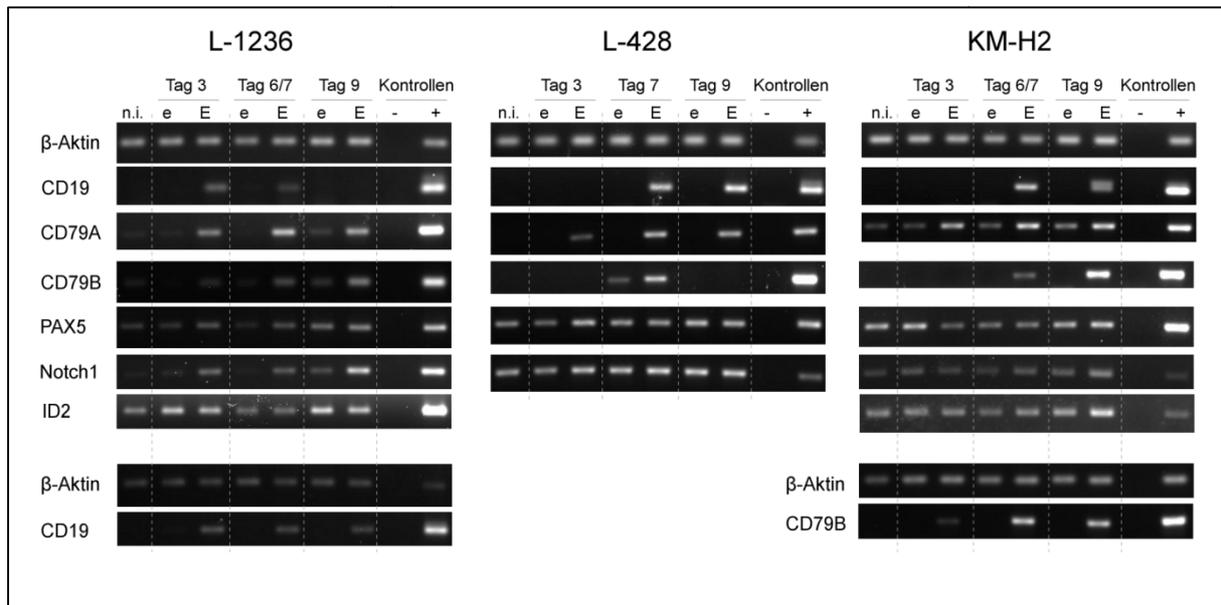


Abbildung 11: Regulation von EBF1 Zielgenen in EBF1-infizierten HL-Linien.

Alle β -Aktin-Banden zeigen, dass die verschiedenen cDNAs eine vergleichbare Konzentration aufweisen. Linie L-1236, obere RT-PCR: CD19 wird an Tag 3 und Tag 7 hochreguliert. CD79A, CD79B und PAX5 werden an allen drei Tagen hochreguliert, ebenso das eigentlich negativ regulierte Notch1. ID2 verändert die Expression nicht. Untere RT-PCR: In einer weiteren Transduktion zeigt CD19 eine Hochregulation an allen drei Messtagen. Linie L-428: CD19 wird an Tag 7 und Tag 9 hochreguliert. CD79A wird an allen drei Tagen hochreguliert, CD79B nur an Tag 7. PAX5 und Notch1 verändern die Expression nicht. Linie KM-H2, obere RT-PCR: CD19 wird an Tag 7 und Tag 9 hochreguliert, CD79A an allen drei Tagen, CD79B nur an Tag 7 und 9. PAX5, Notch1 und ID2 verändern die Expression nicht. In einer weiteren Transduktion zeigt CD79B eine Hochregulation an allen drei Messtagen. n.i. = nicht infizierte Zellen.

Für jede Linie wurde die sqRT-PCR mindestens dreimal von zwei unabhängigen Transduktionen durchgeführt. Die Reexpression der B-Zellgene CD19, CD79A und -B ist immer zu beobachten, wobei die Intensität der Hochregulation an den verschiedenen Tagen nicht immer konstant ist. Da sie jedoch regelmäßig auftritt, muss sie als Reaktion auf die EBF1-Reexpression gedeutet werden.

Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR zeigen deutliche Tendenzen, die mit einer *TaqMan* Real-time PCR überprüft werden sollen. Unterschiede in der Genexpression zwischen EBF1- und *empty*-transduzierten HL-Zellen werden über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode (2.4.5.4) berechnet. Da B-Zellgene in HRS-Zellen im Allgemeinen nicht oder kaum exprimiert werden und der entsprechende C_t -Wert dann vom Gerät als „Undetermined“ bezeichnet wird, wird für die Berechnung der $\Delta\Delta C_t$ -Werte für diese Fälle der letzte gemessene Zyklus als hypothetischer C_t -Wert angenommen.

Je negativer der $\Delta\Delta C_t$ -Wert, desto höher ist die Hochregulation des entsprechenden Gens.

Im Jahr 2007 wurde eine neue HL-Linie U-HO1 beschrieben (Mader et al., 2007), die sich gut transduzieren lässt. Diese wird ebenfalls per qRT-PCR untersucht. In die Analyse wird Foxo1 (*forkhead box O1*), ein weiteres EBF1-Zielgen der Maus, aufgenommen (Zandi et al., 2008). Genchipanalysen unserer Gruppe zeigen, dass das Gen in verschiedenen B-Zelluntergruppen deutlich stärker exprimiert wird als in Patientenproben und HL-Linien, es scheint daher ein gutes Kandidatengen zu sein.

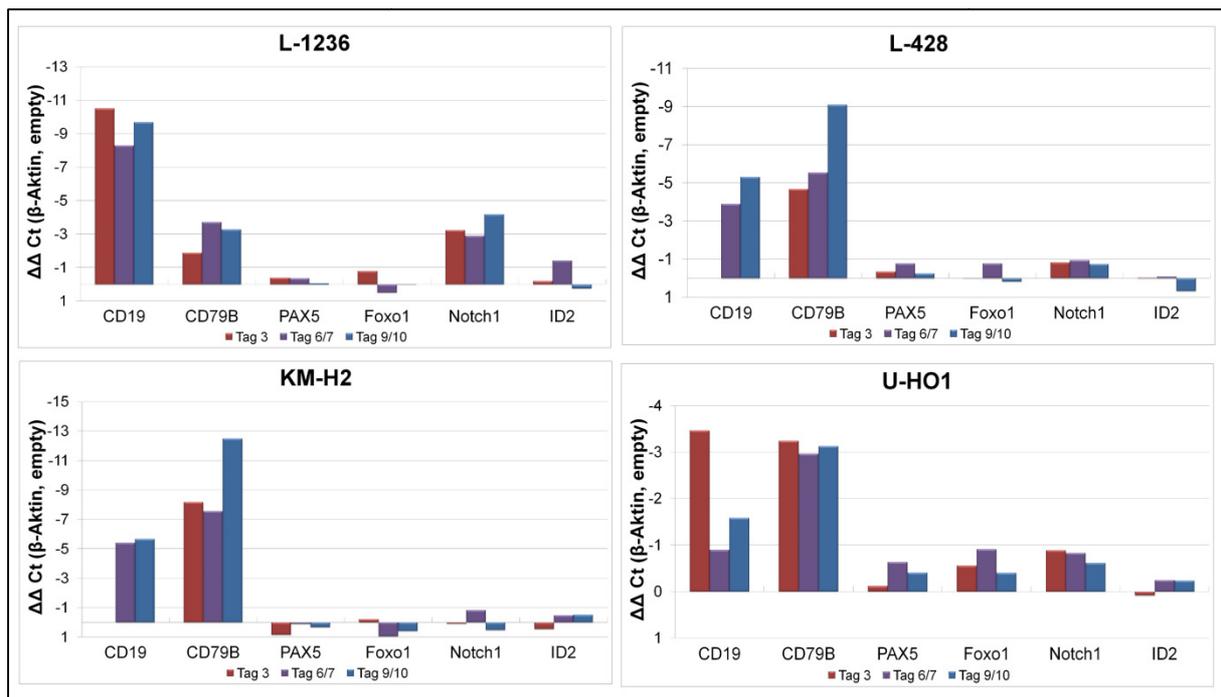


Abbildung 12: EBF1-Zielgen qRT-PCR von EBF1- und *empty*-transduzierten HL-Linien

Es sind hier unterschiedliche Transduktionen und qRT-PCRs der Linien zusammengefasst. Alle Proben sind jeweils gegen den zugehörigen *empty*-Wert und β -Aktin normalisiert worden. In allen vier Linien wird deutlich CD19 und CD79B reexprimiert. PAX5, Foxo1 und ID2 ändern ihre Expression in allen Linien nicht. Notch1 erreicht in L-1236 den Schwellenwert von -1, so dass dies als Hochregulation gewertet werden muss. In den anderen Linien ändert es seine Expression nicht.

Auch die Real-time PCR (Abbildung 12) zeigt die Hochregulation der B-Zellgene CD19 und CD79B in transduzierten HRS-Zellen. Rein rechnerisch werden diese Gene zwischen 1,9-fach (U-HO1, CD19, Tag 6/7) und über 5000-fach (KM-H2, CD79B, Tag 9/10) hochreguliert. Bei der Interpretation dieser Werte ist allerdings Vorsicht angebracht, da der Ct-Wert der *empty*-Kontrollzellen häufig „undetermined“ ist und somit der letzte gemessene Zyklus als Ct-Wert angenommen wird. Theoretisch wird damit die Hochregulation unterschätzt, es kann aber nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass trotz positiver Kontrolle das *empty*-Duplikat/Quadruplikat aus technischen Gründen negativ ist.

PAX5 wird in diesen Messungen nicht reguliert. Auch eine Analyse der beiden PAX5-Isoformen, PAX5 α und PAX5 β (Palmisano et al., 2003), zeigt keine Regulation durch EBF1-Reexpression (Tabelle 17). Ebenso verhalten sich Foxo1 und ID2.

Die Daten der beiden RT-PCR-Techniken zeigen, dass EBF1 in der Lage ist, einzelne B-Zellgene in HL-Linien wieder zu aktivieren.

3.2.2.2 Genchipanalysen von EBF1-transduzierten HL-Linien

Die positiven RT-PCR-Ergebnisse der EBF1-Zielgene legen nahe, nach weiteren regulierten Genen über Genchipanalysen zu suchen. Es werden die beiden Linien L-1236 und L-428 mit dem EBF1- und dem Kontrollüberstand transduziert. Von jeder Linie werden je drei Ansätze jeweils mit beiden Viren infiziert. Acht Tage nach der Infektion werden aus allen zwölf Ansätzen jeweils mehrere hunderttausend tGFP+/PI- Zellen per FACS sortiert. Deren isolierte RNA wird per NanoChip im Agilent 2100 Bioanalyzer auf ihre Qualität geprüft. Die RNA wird für den *Human Gene 1.0 ST Array* (Affymetrix) verwendet. Die Sonden des Chips sind jeweils über die gesamte Länge eines Gens verteilt, mit durchschnittlich 26 Sonden pro Gen, wodurch verschiedene Transkripte detektiert werden. Mehr als 99 % der RefSeq-Datenbank werden durch den Chip abgedeckt. Die statistischen Auswertungen werden von der Bioinformatikerin Dr. Claudia Döring (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main), wie in *Material und Methoden* beschrieben, durchgeführt.

Ein sogenanntes *Unsupervised Hierarchical Clustering* zeigt deutlich, dass sich die jeweiligen *empty*- und EBF1-transduzierten Zellen voneinander unterscheiden (Abbildung 13). Die Gruppierung der Linien zueinander und damit die Trennung der beiden EBF1-transduzierten Fälle veranschaulicht, dass der biologische Unterschied der Linien größer ist als der gemeinsame Effekt, den die EBF1-Reexpression in den Linien erzielt.

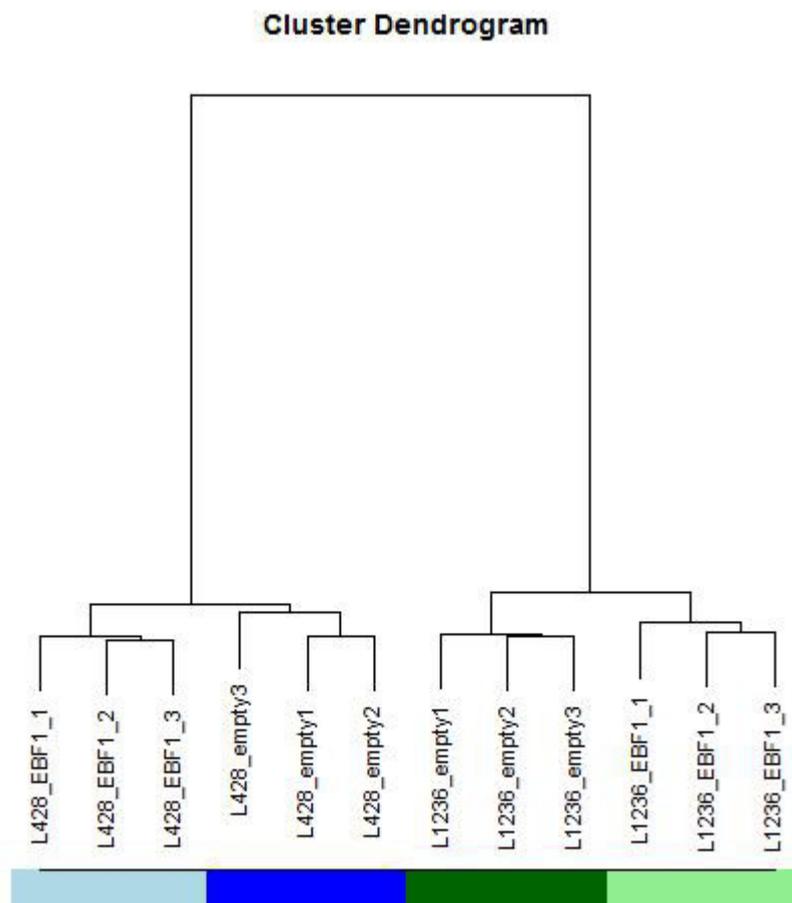


Abbildung 13: Unsupervised Hierarchical Clustering von transduzierter L-1236 und L-428

Die 464 verwendeten Gene im Cluster haben eine Standardabweichung von mindestens eins. Die Grafik stammt aus R (www.r-project.org).

Die gezielte Suche nach den in der qRT-PCR untersuchten Genen zeigt, dass der Effekt für die Mehrheit der Gene überraschend gering ist (Tabelle 13). Nur CD79A mit einem 2,3-fachen (*False discovery rate* (FDR) 0,009) und Notch1 mit einem 1,6-fachen Anstieg (FDR 0,024) in L-1236 zeigen einen signifikanten Effekt. Dennoch bestätigen die Messwerte die RT-PCR Ergebnisse. Auch hier wird die Hochregulation von Notch1 in L-1236 gesehen, obwohl laut Literatur eine Herunterregulation (Pongubala et al., 2008) erwartet würde. Des Weiteren wird eine schwache, nicht signifikante Hochregulation von CD79A (FDR 0,106) in L-428 und CD79B (FDR 0,051) in L-1236 gesehen, die aufgrund der Signalstärke vom Hintergrundrauschen kaum unterschieden werden kann.

Tabelle 13: Änderungen der qRT-PCR Gene in den Genchips

Linie	Gen Symbol	n-fache Änderung (EBF1 vs. <i>empty</i>)	FDR (EBF1 vs. <i>empty</i>)	n-fache Änderung Beschreibung
L428	EBF1	22,8	0,009	EBF1 hoch vs <i>empty</i>
	CD79A *	1,2	0,106	EBF1 hoch vs <i>empty</i>

L1236	EBF1	62,8	0,002	EBF1 hoch vs <i>empty</i>
	CD79A	2,3	0,009	EBF1 hoch vs <i>empty</i>
	CD79B *	1,2	0,051	EBF1 hoch vs <i>empty</i>
	NOTCH1	1,6	0,024	EBF1 hoch vs <i>empty</i>

* Wird bei diesen Genen ein Intensitätsfilter angewendet, der schwache Signale die vom Hintergrundrauschen kaum unterschieden werden können, eliminiert, so erscheinen diese Gene als nicht exprimiert.

Die beiden Linien zeigen einen deutlichen Unterschied in der Anzahl der Gene, die durch EBF1-Expression reguliert werden. Bei einer FDR von 5% und Verwendung eines Intensitätsfilters (Daten mit durchweg niedrigen Expressionswerten, die nahe dem Hintergrundrauschen sind, werden nicht ausgewertet) hat die Linie L-1236 298 differentiell exprimierte Gene und L-428 nur 113. Davon sind für L-1236 30 annotierte Gene (34 insgesamt) und für L-428 21 Gene um mehr als das Doppelte hoch- oder um weniger als die Hälfte herunterreguliert (Tabelle 14).

Tabelle 14: Differentiell ausgeprägte Gene zwischen EBF1- und *empty*-transduzierten Zellen

Gensymbol	FC	RefSeq	Transkript ID	Genname
In EBF1-transduzierten L-1236 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (<i>empty</i>)				
EBF1	62,8	NM_024007	8115543	early B cell factor 1
SLC22A4	5,0	NM_003059	8107909	solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), member 4
PLXNA1	3,4	NM_032242	8082314	plexin A1
OR5E1P	3,2	NR_027711	7938261	olfactory receptor, family 5, subfamily E, member 1 pseudogene
CCL22	2,9	NM_002990	7996022	chemokine (C-C motif) ligand 22
FAR2	2,7	NM_018099	7954631	fatty acyl CoA reductase 2
LRP1	2,7	NM_002332	7956301	low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor)
SEMA7A	2,6	NM_003612	7990345	semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group)
IL7	2,6	NM_000880	8151447	interleukin 7
FCER2	2,5	NM_002002	8033420	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
CST1	2,5	NM_001898	8065412	cystatin SN
CYP4Z1	2,4	NM_178134	7901287	cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 1
CD79A	2,3	NM_001783	8029136	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha
DUSP7	2,2	NM_001947	8087833	dual specificity phosphatase 7
MAPKBP1	2,2	NM_014994	7982985	mitogen-activated protein kinase binding protein 1
NTRK1	2,2	NM_001007792	7906244	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1

Gensymbol	FC	RefSeq	Transkript ID	Genname
CYP4Z2P	2,2	NR_002788	7915896	cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 2 pseudogene
XPNPEP2	2,0	NM_003399	8169836	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound
NCF4	-2,0	NM_013416	8072744	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa
NMI	-2,0	NM_004688	8055702	N-myc (and STAT) interactor
CCR4	-2,1	NM_005508	8078442	chemokine (C-C motif) receptor 4
CP110	-2,1	NM_014711	7993664	CP110 protein
WDR63	-2,1	NM_145172	7902660	WD repeat domain 63
MOSC2	-2,2	NM_017898	7909866	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2
HOXB9	-2,2	NM_024017	8016476	homeobox B9
NCF2	-2,2	NM_000433	7922773	neutrophil cytosolic factor 2
CRLF2	-2,3	NM_022148	8171105	cytokine receptor-like factor 2
CYP19A1	-2,3	NM_031226	7988767	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1
HLA-DQA1	-2,3	NM_002122	8118556	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
SLC26A4	-2,5	NM_000441	8135436	solute carrier family 26, member 4
In EBF1-transduzierten L-428 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (empty)				
EBF1	22,8	NM_024007	8115543	early B cell factor 1
FCER2	5,1	NM_002002	8033420	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
MRAP2	3,5	NM_138409	8120961	melanocortin 2 receptor accessory protein 2
SLC26A4	3,5	NM_000441	8135436	solute carrier family 26, member 4
CXCL9	3,1	NM_002416	8101118	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
TFPI2	2,6	NM_006528	8141016	tissue factor pathway inhibitor 2
SEMA7A	2,5	NM_003612	7990345	semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group)
NELF	2,2	NM_001130969	8165552	nasal embryonic LHRH factor
GNG11	2,2	NM_004126	8134257	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11
PRKCDBP	2,1	NM_145040	7946142	protein kinase C, delta binding protein
CHRNA1	2,1	NM_001039523	8056877	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)
PRKCH	2,1	NM_006255	7974835	protein kinase C, eta
CD40	2,1	NM_001250	8063156	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
FOS	2,1	NM_005252	7975779	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CCL22	2,0	NM_002990	7996022	chemokine (C-C motif) ligand 22
LGALS3BP	2,0	NM_005567	8018975	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein
GCET2	-2,0	NM_001008756	8089478	germinal center expressed transcript 2

RFTN1	-2,0	NM_015150	8085665	raftlin, lipid raft linker 1
AICDA	-2,3	NM_020661	7960910	activation-induced cytidine deaminase
CRLF2	-2,5	NM_022148	8171105	cytokine receptor-like factor 2
MYBPC2	-3,7	NM_004533	8030677	myosin binding protein C, fast type

Die differentiell exprimierten Gene sind signifikant mit einer FDR von 5 %. Nicht annotierte Gene sind nicht aufgeführt.

Die Liste der Gene, die bei einer FDR von 5% und einem FC < -1,5 und > 1,5 in beiden Linien durch EBF1 reguliert wird, beläuft sich auf 22, davon sind 21 annotiert (Tabelle 15). Für 21 der 22 Gene findet die Regulation in beiden Linien in die gleiche Richtung statt. Im Fall von SLC26A4 wird in L-1236 eine Herunterregulation und in L-428 eine Hochregulation gemessen.

Tabelle 15: Gemeinsam ausgeprägte Gene zwischen den Linien L-1236 und L-428

Gensymbol	FC (L-1236)	FC (L-428)	Transkript ID	Genname
EBF1	62,8	22,8	8115543	early B cell factor 1
SLC22A4	5,0	1,7	8107909	solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), member 4
CCL22	2,9	2,0	7996022	chemokine (C-C motif) ligand 22
SEMA7A	2,6	2,5	7990345	semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group)
FCER2	2,5	5,1	8033420	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
DUSP7	2,2	1,6	8087833	dual specificity phosphatase 7
DPCR1	1,9	1,6	8118061	diffuse panbronchiolitis critical region 1
SCARB1	1,6	1,8	7967544	scavenger receptor class B, member 1
CCDC126	1,6	1,9	8131871	coiled-coil domain containing 126
KCNMB1	1,6	1,6	8115756	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1
CD274	1,5	1,9	8154233	CD274 molecule
CTNS	1,5	1,7	8003824	cystinosis, nephropathic
GCET2	-1,6	-2,0	8089478	germinal center expressed transcript 2
ZNF589	-1,6	-1,6	8079598	zinc finger protein 589
IL2RB	-1,6	-1,6	8075886	IL2RB // interleukin 2 receptor, beta
ANKRD26	-1,6	-1,6	7932637	ankyrin repeat domain 26
TSPAN2	-1,7	-1,5	7918857	tetraspanin 2 // 1p13.2 // 10100 /// ENST00000369516 // T
TMBIM4	-1,7	-1,5	7964745	transmembrane BAX inhibitor motif containing 4
SDC4	-1,8	-1,9	8066513	syndecan 4
SMC6	-1,8	-1,5	8050443	structural maintenance of chromosomes 6
NCF4	-2,0	-1,5	8072744	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa
CRLF2	-2,3	-2,5	8171105	cytokine receptor-like factor 2
SLC26A4	-2,5	3,5	8135436	solute carrier family 26, member 4

Alle Gene sind signifikant mit einer FDR von 5% und haben mindestens eine Regulation von FC \pm 1,5. Nicht annotierte Gene sind nicht aufgeführt.

Die Liste der Gene, die auf den ersten Blick offensichtlich in einem B-Zellzusammenhang stehen und durch EBF1 hochreguliert werden, z. B. CD79A, CD40, ist kurz. Es werden daher an dieser Stelle exemplarisch einige differentiell exprimierte Gene kurz in einen B-Zell oder HRS-Zell-Zusammenhang gebracht:

IL7 wird in L-1236 Zellen bei EBF1-Expression 2,6-fach hoch reguliert. In der Literatur wird gezeigt, dass HRS-Zellen IL7 mRNA exprimieren (Foss et al., 1995), außerdem prägen HL-Linien und HRS-Zellen den zugehörigen Rezeptor IL7R aus – es scheint hier eine autokrine Wirkung vorzuliegen (Cattaruzza et al., 2009). Die Expressionswerte beider Gene zeigen, dass auch *empty*- und EBF1-transduzierte Zellen beide Gene exprimieren. Die eigene Stimulation findet möglicherweise auch hier statt.

Der bereits in der sqRT-PCR gemessenen Co-Faktor des BCR, CD79A, wird in der Linie EBF1-transduzierten L-1236 signifikant hochreguliert.

CXCL9/MIG, normalerweise von Monocyten und Makrophagen exprimiert, wird auch in HRS-Zellen ausgeprägt (Maggio et al., 2002). Die eigenen Chip-Daten zeigen, dass es in L-428 ebenfalls vorhanden ist, wobei es in EBF1-transduzierten Zellen 3,1-fach hoch reguliert wird. Es scheint, als würde die aberrante Genexpression hier noch verstärkt.

AICDA/AID, ein Schlüsselenzym der SHM und des CSR, wird in B-Zellen des GC exprimiert. Im cHL wird es im Allgemeinen nicht ausgeprägt (Greiner et al., 2005). Dies stimmt soweit überein mit der Linie L-1236. L-428 exprimiert AID, wobei es unter EBF1-Einfluss herunterreguliert wird, aber trotzdem noch vorhanden bleibt. Teile der B-Zellsignatur werden hier nicht wiederhergestellt, wobei deutlich gesagt werden muss, dass AID nicht zur B-Zellsignatur außerhalb des GC gehört.

CCL22/MDC/ABCD-1 wird von aktivierten B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert und ist in der Lage aktivierte T-Zellen über Chemotaxis anzulocken (Schaniel et al., 1998). Für HRS-Zellen wird ebenfalls die Ausprägung dieses Gens beschrieben (Maggio et al., 2002). Es wird vermutet, dass u. a. über die Sekretion dieses Chemokins Zellen des im HL typischen Infiltrats angelockt werden (Poppema, 2005). In L-1236 wird es 2,9-fach in L-428 2-fach in EBF-1-transduzierten Zellen hochreguliert, es wird hier also das HL-typische Expressionsprofil verstärkt.

Der oben angesprochene Rezeptor der T-Zellen, die durch CCL22 angelockt werden, ist CCR4, welcher in HRS-Zellen nicht exprimiert wird (Vermeer et al., 2002). Auch Genchip-Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen keine Expression in primären HL-Fällen und HL-Linien (Brune et al., 2008 und persönliche Kommunikation mit V. Brune). Die Genchips der transduzierten Linien zeigen jedoch deutliche Expressionen für alle vier Ansätze und eine signifikante negative 2,1-fache Regulation in L-1236/EBF1-Zellen. Offenbar gibt es auch Artefakte, die trotz Verwendung eines Kontrollvirus zu falschen Ergebnissen führen. Die gleichzeitige Messung nicht transduzierter Zellen und der Vergleich dieser mit den *empty*-transduzierten könnte den Effekt durch die Infektion besser eingrenzen.

GCET2/HGAL ist ein in GC exprimiertes Gen, während es in anderen B-Zelltypen kaum zu finden ist (Pan et al., 2003). Es ist ein Membranprotein, das vermutlich mit den Protein Tyrosin Kinasen (PTK) LYN, LCK oder SYK in B-Zellen interagiert (Pan et al., 2007). Für das HL wird eine Expression in 75 % der Fälle beschrieben (Natkunam et al., 2007). In den EBF1-transduzierten Linien L-1236 und L-428 wird es 1,6-fach bzw. 2-fach herunterreguliert. Interessant wäre es, das GCET2-Expressionsniveau der HL-Linien zum Niveau in normalen GC-Zellen zu vergleichen. Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Genchips (Brune et al., 2008 und persönliche Kommunikation mit V. Brune) zeigen für dieses Transkript in nahezu allen Fällen jedoch nur Expressionswerte, die im Bereich des Hintergrundrauschens liegen und damit als nicht exprimiert gelten.

IL2RB/p75/CD122 wird in differenzierten B-Zellen, wie Centroblasten, Centrocyten und Gedächtnis-B-Zellen, ausgeprägt (Klein et al., 2003b). Primäre HL-Fälle und HL-Linien, bis auf HDLM-2, werden als negativ für IL2RB-Protein beschrieben (Gruss et al., 1992; Hsu et al., 1990). Die hier untersuchten Linien zeigen in allen vier Ansätzen eine IL2RB-Ausprägung und eine je 1,6-fache signifikante Herunterregulation in EBF1-transduzierten Zellen. Die im Rahmen eines anderen Projekts in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Genchips zeigen eine deutlich stärkere Expression in primären HL-Fällen und HL-Linien im Vergleich zu Centroblasten, Centrocyten und Gedächtnis-B-Zellen (Brune et al., 2008 und persönliche Kommunikation mit V. Brune). Hiernach würde sich die IL2RB-Ausprägung durch die Reexpression von EBF1 wieder dem normalen B-Zellniveau annähern. Anzumerken bleibt jedoch eine widersprüchliche IL2RB-Expression auf mRNA und Protein-Niveau. Die Genchips

messen den mRNA-Gehalt, während in den anderen Studien Proteine mit AK detektiert wurden. Möglicherweise wird die exprimierte mRNA nicht translatiert. Ein negatives Ergebnis kann auch immer durch einen technischen Ausfall verursacht sein. Weitere Färbungen mit unterschiedlichen AK und Positivkontrollen könnten den tatsächlichen IL2RB-Status von HRS-Zellen klären.

Eine Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) vergleicht vorgefertigte Gengruppen, die z. B. in einem inhaltlichen oder örtlichen Zusammenhang stehen, mit den Ergebnissen von Genchipanalysen. In der vorliegenden Arbeit werden die Listen c2alle, c2 Biocarta Signalwege oder KEGG Signalwege (*MSigDB database v3.0*), die sogenannte *curated genes* aus verschiedenen Signalweg Datenbanken und Publikationen aus PubMed enthalten, verwendet. Hierbei zeigt die GSEA bei einer maximalen FDR von 25% keine regulierten Gengruppen, die mit Daten der Literatur in einen sinnvollen Zusammenhang gebracht werden können. Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung mit positiv und negativ regulierten EBF1 Zielgenen der Maus aus ChIP-Sequenzierungs und ChIP auf Chip Experimenten (Treiber et al., 2010b) zeigt ebenfalls keine Gengruppen, die in den EBF1-transduzierten Zellen signifikant reguliert sind. Zwei EBF1-Zielgene aus der Treiber-Publikation werden in den hier transduzierten Zellen der Linien L-1236 und L-428 ebenfalls signifikant reguliert: SEMA7A und DUSP7, wobei DUSP7 in der Maus herunter- und in diesen Zellen hoch reguliert wird. Für beide Gene ist kein B-Zellzusammenhang beschrieben. SEMA7A wird in aktivierten T-Zellen exprimiert (Suzuki et al., 2007) und DUSP7/PYST2 ist z. B. stark ausgeprägt in AML (Levy-Nissenbaum et al., 2003). Das in beiden Linien hochregulierte SLC22A4 – in L-1236 mit FC 5,0 – ist zwar kein in der Treiber-Studie beschriebenes EBF1-Zielgen, aber der SLC22A-Promotor wird von Runx1 reguliert (Maeda et al., 2007), welches in der Treiber-Liste EBF1-Zielgen ist. In L-1236 wird Runx1 1,7-fach (FDR 0,0002) reguliert, während L-428 keine signifikante Änderung zeigt. Es scheint als sei SLC22A4 indirekt von EBF1 ausgeprägt worden.

Auch, wenn die Genchip-Daten mit den Ergebnissen der qRT-PCR konform sind, so zeigen sich auch einige differentiell exprimierten Gene, die mit einer B-Zellsignatur nicht in Zusammenhang gebracht werden können. Die Situation in HL-Zellen scheint komplexer, als dass ein einziger reexprimierter Transkriptionsfaktor den B-Zellstatus wieder herstellen könnte.

3.2.2.3 Wird CD79A-Protein in EBF1-transduzierten Zellen reexprimiert?

Die sqRT-PCR und der Microarray der Linie L-1236 zeigt, dass CD79A mRNA in EBF1-transduzierten Zellen exprimiert wird. Für CD79B wird dies in der sqRT-PCR und der qRT-PCR gezeigt. Möglicherweise kann hier auch die Expression der Proteine nachgewiesen werden. Der schnellste Weg ein Oberflächenprotein wie CD79 nachzuweisen wäre eine FACS Analyse. Die starke tGFP-Expression erschwert es jedoch eine weitere Farbe (z. B. PE) zu detektieren, da extrem grüne Zellen in den roten PE-Kanal scheinen und eventuelle Effekte damit überdecken. Dies zeigt eine erfolglose Messung von CD19 in transduzierten HL-Linien (ohne Abbildung). Es werden daher WBs mit CD79-Antikörpern durchgeführt. Der CD79B-Antikörper zeigt in der Etablierungsphase mit B-Zellprotein nur sehr schwache Signale bei sehr langer Belichtungszeit. Um auch möglicherweise schwache Reexpression zu erkennen wird der Western Blot nur mit dem sensitiveren CD79A-Antikörper durchgeführt.

Die Linien L-428, U-HO1 und L-1236 wurden mit je acht MOI des *empty*- und des EBF1-Konstruktes transduziert. Neun Tage nach der Infektion wurden mehrere hunderttausend PI-/tGFP⁺-Zellen sortiert und für das Proteinlysate genutzt. CD79A wiegt 43 kDa und kann daher nicht mit den normalerweise verwendeten Ladekontrollen β -Aktin (43 kDa) und GAPDH (30-40 kDa) verwendet werden. β -Tubulin ist hier mit 55 kDa als Kontrolle geeignet.

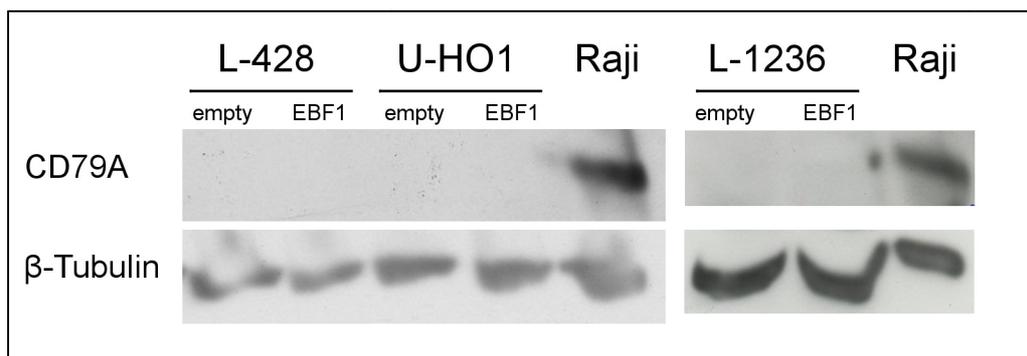


Abbildung 14: CD79A-Proteinanalyse in EBF1-transduzierten HL-Linien

Im L-428/U-HO1-WB sind 70 μ g Protein je Lane geladen, im L-1236-WB 30 μ g Protein je Lane. Raji fungiert als CD79A-Positivkontrolle, β -Tubulin ist die Ladekontrolle.

Je Blot zeigt die Tubulinkontrolle eine gleichmäßige Ladung. Die Raji-Positivkontrolle zeigt deutlich eine CD79A-Expression, die in den EBF1-transduzierten HL-Linien nicht vorhanden ist. Eine CD79A sqRT-PCR aus den identischen Transduktionen dieser Western Blots zeigt, dass CD79A-mRNA exprimiert wird. Es ist möglich, dass

aus der RNA zu wenig Protein exprimiert wird, so dass der WB nicht sensitiv genug ist. CD79A wird im Komplex mit je zwei Immunglobulin-schwere- und -leichte-Ketten-Proteinen sowie CD79B aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) entlassen (Brouns et al., 1995). In HRS-Zellen werden Immunglobuline nicht exprimiert, somit bleibt das Protein im ER und geht evtl. bei der Zellyse zum großen Teil verloren. Es sind weitere Experimente notwendig um zu klären, ob das Fehlen der Bande ein technisches Artefakt ist oder dem Expressionsstatus entspricht.

3.2.3 Promotormethylierungen in EBF1-transduzierten HL-Linien

Über HRS-Zellen ist bekannt, dass einige Promotoren B-zellspezifischer Gene methyliert sind. So wird über Bisulfitsequenzierung gezeigt, dass der CD79B-Promotor in HL-Linien methyliert ist (Doerr et al., 2005). Das Gleiche wird für den CD79B-Promotor in primären HL-Fällen gezeigt (Ushmorov et al., 2006). Außerdem wird über methylierungssensitiven Restriktionsverdau dargestellt, dass der CD19-Promotor in HL-Linien methyliert ist (Ushmorov et al., 2006). In Mauszellen wird gezeigt, dass EBF1 direkt oder indirekt die Häufigkeit von Methylierungen an fernen CpGs des CD79A Promotors reduzieren kann (Maier et al., 2004). Es liegt daher nahe, in den EBF1-transduzierten Zellen nach Veränderungen im Promotorbereich von B-Zellgenen zu schauen. Es werden die drei HL-Linien L-1236, L-428 und KM-H2 mit EBF1- und *empty*-Überstand transduziert. Neun Tage nach der Infektion werden je 1×10^5 PI-/tGFP⁺-Zellen per FACS sortiert und daraus DNA isoliert. Die DNA wird per Bisulfit-Behandlung konvertiert und für PCRs im Promotorbereich von CD19, CD79B, PAX5 α und PAX5 β verwendet. Die PCR-Fragmente werden in pGEM T-easy ligiert und in den Plasmiden sequenziert.

Die verwendeten Oligonukleotide werden mit Hilfe der Software *MethPrimer* von (Li und Dahiya, 2002) entworfen und decken ungefähr den Bereich von 500 bp vor Exon 1 und Teile von Exon 1 ab (Abbildung 15). Einige CpGs des CD19- und des CD79B-Promotors sind durch die Arbeiten von (Doerr et al., 2005) und (Ushmorov et al., 2006) in HL-Linien bereits untersucht und sind tendenziell methyliert.

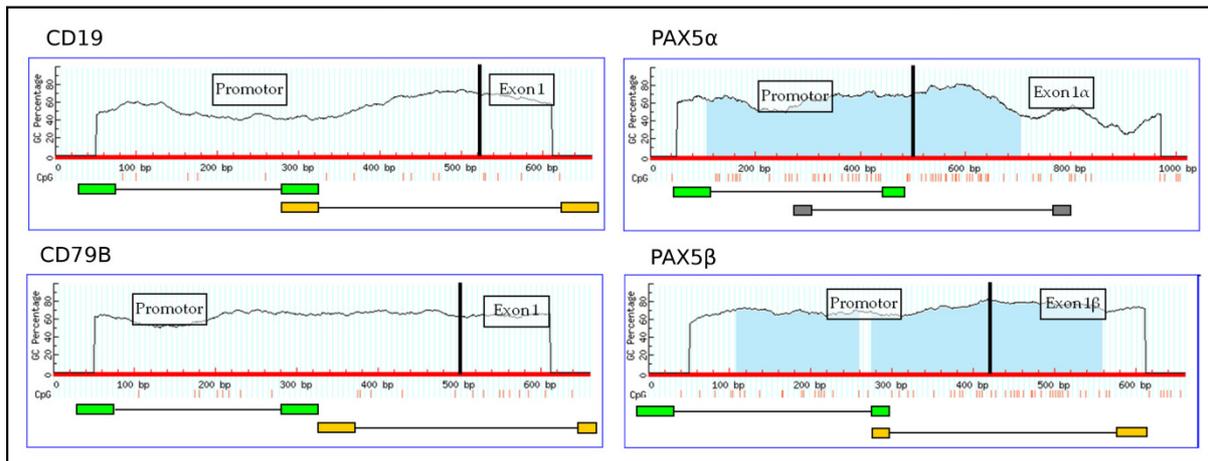


Abbildung 15: Oligonukleotidpositionen der Bisulfidsequenzierungen

Für die vier Promotorregionen von CD19, CD79B, PAX5 α und PAX5 β werden insgesamt acht PCR-Produkte entworfen. Die Oligonukleotide (grün, gelb, grau) liegen dabei in CpG-freien Regionen. CpGs werden durch rote, kurze und vertikale Linien unterhalb der Basennummerierung dargestellt. Das erste PCR-Produkt ist mit grünen Oligonukleotiden markiert, die Gelben zeigen jeweils das zweite PCR-Fragment an, in grau sind nicht funktionierende Primer markiert. Blau schattiert sind CpG-Inseln, hier: Bereiche von mindestens 100 bp mit einem GC-Anteil von mindestens 50 % und einem beobachtetem/erwartetem CpG-Quotienten von mindestens 0,6.

Die Plasmide werden nur in einer Richtung sequenziert, da es aus technischen Gründen kaum möglich ist den T-reichen Strang im Gegensatz zum A-reichen Strang zu sequenzieren. Je Ansatz (Linie, Vektor, Gen, PCR-Fragment) werden sieben bis elf Plasmide sequenziert. Zum Vergleich werden die mutmaßlichen Ursprungszellen des HL, CD77-positive GC-B-Zellen aus Tonsillen, sequenziert. Die Zusammenfassung der Sequenzdaten (Abbildung 16) zeigt, dass CD77-positive tonsilläre GC-B-Zellen in allen untersuchten Bereichen unmethyliert sind. Die HL-Linien sind, bis auf CpGs in den PAX5 β -Amplikons, verschieden stark methyliert. In einigen Fällen sind leichte Unterschiede in den Grautönen zwischen den entsprechenden *empty*- und EBF1-transduzierten Linien zu beobachten. Entgegen den Erwartungen aus (Maier et al., 2004) scheint es so als würde die EBF1-Reexpression die Methylierung für das Amplikon CD19-1 in der Linie L-428 verstärken, ebenso für PAX5 α in KM-H2. Den Erwartungen entspricht die Linie KM-H2 mit dem Amplikon CD19-1 und L-1236-Zellen mit PAX5 α -1.

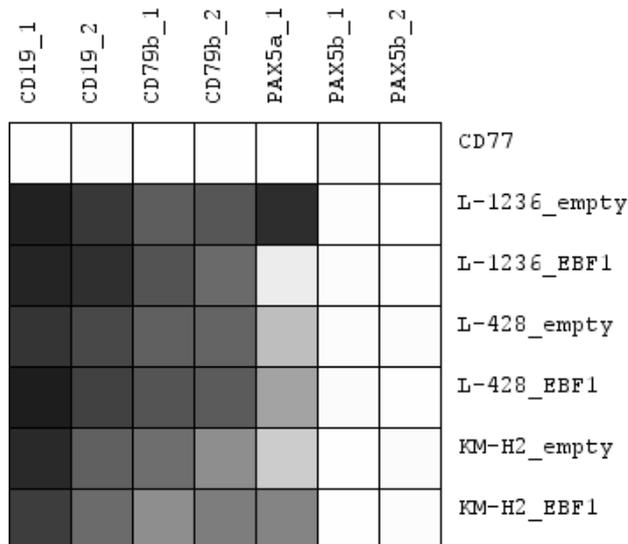


Abbildung 16: Komprimierte Darstellung der untersuchten PCR-Fragmente und Zelltypen

Alle CpGs eines PCR-Fragmentes sind in einem Quadrat zusammengefasst. Weiße Quadrate (□) bedeuten 100 % unmethyliert, schwarze Quadrate (■) 100 % methyliert, die grauen Felder sind zwischen den beiden Zuständen angeordnet. Das Diagramm entstammt der Software BiG Analyzer HAT (Lutsik et al., 2011).

Die Betrachtung der verschiedenen CpGs der Amplikons (Abbildung 17) zeigt einzelne Positionen, die eventuell durch EBF1-Reexpression demethyliert werden (Tabelle 16): Im CD19-Promotor der Linie L-428 ist CG6 des zweiten Fragments in *empty*-Zellen zu 10 % (1/10) unmethyliert und in EBF1-Zellen zu 36 % (4/11). Im gleichen Fragment in der Linie KM-H2 ist CG1 in *empty*-Zellen zu 0% (0/9) und in EBF1-Zellen zu 63% (5/8) unmethyliert. Der CD79B-Promotor in KM-H2 scheint an drei CpGs durch EBF1 demethyliert zu werden: CG4 (*empty* 0 % (0/9), EBF1 50 % (3/6)), CG5 (*empty* 0 % (0/9), EBF1 56 % (5/9)) und CG6 (*empty* 0 % (0/9), EBF1 33 % (3/9)). In L-1236 im Fragment CD79B-2 werden CG5 (*empty* 13 % (1/8), EBF1 63 % (5/8)), CG6 (*empty* 0 % (0/8), EBF1 50 % (4/8)) und CG7 (*empty* 0 % (0/8), EBF1 25 % (2/8)) demethyliert. Der PAX5 α -Promotor wird in der Linie L-1236 über die gesamte gemessene Länge von CG1 bis CG29 tendenziell durch EBF1-Expression demethyliert (Abbildung 17). Die Linien L-428 und KM-H2 verhalten sich hier der L-1236 entgegengesetzt und scheinen tendenziell durch EBF1 methyliert zu werden. Der PAX5 β -Promotor ist in HL-Linien, wie in CD77-positiven GC-B-Zellen unmethyliert und bleibt es auch unter EBF1 Einfluss.

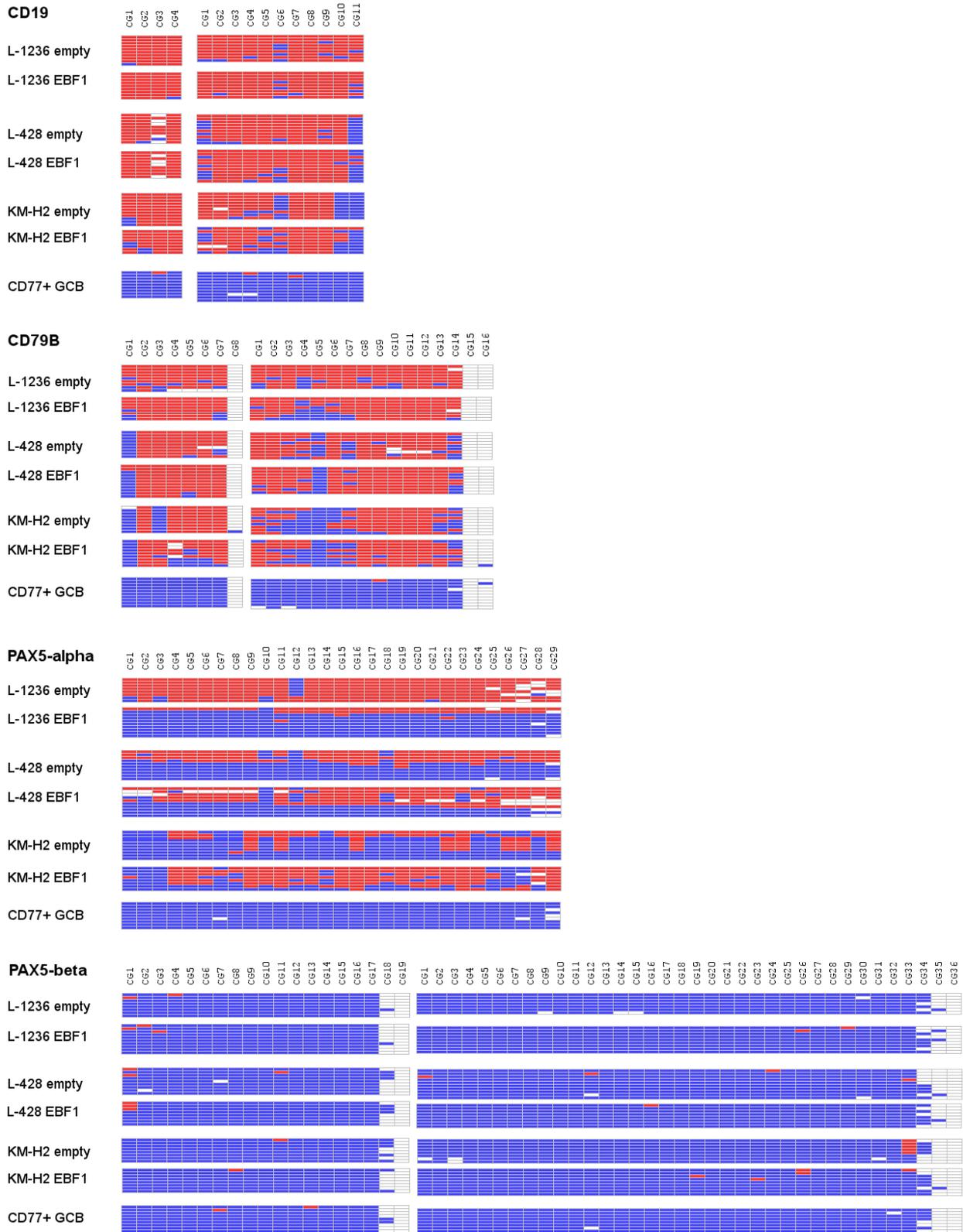


Abbildung 17: Darstellung aller sequenzierten CpGs der untersuchten PCR-Fragmente und Zelltypen

Jedes CpG jedes sequenzierten Klons ist durch ein Rechteck dargestellt. Jede Reihe in jedem Block (CpGs sind jeweils ab CG1 durchnummeriert) entspricht dabei einem Klon. Blaue Rechtecke entsprechen unmethylierten, rote methylierten CpGs. Weiße lassen keine Aussage über den Methylierungszustand zu. Die einzelnen Diagramme entstammen der Software BiG Analyzer HT (Lutsik et al., 2011). GCB = GC-B-Zellen.

Tabelle 16: Überblick über die durch EBF1-Expression demethylierten CpGs

PCR	Linie	CG	<i>empty</i>	EBF1	CG	<i>empty</i>	EBF1	CG	<i>empty</i>	EBF1
CD19-2	L-428	CG6	10 % (1/10)	36 % (4/11)						
CD19-2	KM-H2	CG1	0% (0/9)	63% (5/8)*						
CD79B-1	KM-H2	CG4	0 % (0/9)	50 % (3/6)*	CG5	0 % (0/9)	56 % (5/9)	CG6	0 % (0/9)	33 % (3/9)
CD79B-2	L-1236	CG5	13 % (1/8)	63 % (5/8)	CG6	0 % (0/8)	50 % (4/8)	CG7	0 % (0/8)	25 % (2/8)
PAX5α	L-1236	komplett								

Es ist der Anteil der unmethylierten CpGs dargestellt, in Klammern befindet sich die Anzahl der unmethylierten Positionen von allen Positionen.* Nicht in die Berechnung einbezogen wurden CpGs deren Methylierungszustand unklar ist (weiße Kennzeichnung - Abbildung 17).

Bei den wenigen durch EBF1 veränderten CpGs könnte es sich eventuell um Positionen mit regulatorischer Bedeutung handeln. Im Ganzen muss jedoch gesagt werden, dass EBF1 die Methylierung der verschiedenen Promotoren, bis auf PAX5α in L-1236, kaum beeinflusst.

3.2.4 EBF1 Mutationsanalyse

Der Verlust der B-Zellsignatur in HRS-Zellen bezieht sich nicht nur auf diverse Zielgene der B-Zelltranskriptionsfaktoren, sondern auch auf einige B-Zelltranskriptionsfaktoren selbst. EBF1 ist außerdem als Zielgen der aberanten SHM beschrieben, wenn auch mit einer niedrigeren Mutationsrate als z. B. BCL6 (Liu et al., 2008). Im folgenden Abschnitt soll geklärt werden, ob Mutationen in der EBF1-Sequenz vorliegen, die zu einem nicht funktionellen Protein führen oder die Expression z. B. über Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau (NMD) verhindern.

Es wird aus den HL-Linien L-1236, L-428, KM-H2, HDLM-2, U-HO1 und SUP-HD1 sowie als Kontrolle CD77-positive Zellen von zwei Spendern gesamt RNA isoliert und in einer genspezifischen cDNA-Synthese revers transkribiert. Vier überlappende PCR-Produkte (2.4.5.2) über die gesamte kodierende mRNA (Exon 1 bis Exon 16; GI:36054140) werden je Linie sequenziert. Das dritte Amplikon muss aufgrund von vier verschiedenen Isoformen kloniert und dann sequenziert werden. Die Sequenzierung der CD77-positiven Zellen zeigt, dass diese Isoformen auch in normalen GC-B-Zellen vorkommen.

Der SNP rs1368298 zeigt für L-1236, L-428 und U-HO1 einen heterozygoten Zustand, es sind mindestens in diesen Linien beide Allele vorhanden.

In den Linien L-1236, L-428, HDLM-2, U-HO1 und SUP-HD1 liegen keine Mutationen im kodierenden Bereich vor. KM-H2 zeigt in der RT-PCR eine Doppelbande für das Amplikon 1. Die Sequenzierung dieses Bereichs (2.4.5.1, 2.4.5.6) von KM-H2 auf genomischer Ebene (Chromosom 5) mit Hilfe zweier PCRs zeigt auf einem Allel eine

T158526351G Transition im Intron1 in der Spleißstelle zum Exon 1 und eine Insertion 158526347insG in Intron 1, ebenfalls nahe der Spleißstelle. Dies führt zur Verwendung einer alternativen Spleißstelle, wodurch Exon 1 um 56 bp verkürzt wird und eine Leserasterverschiebung entsteht. Das veränderte Leseraster hat ein frühzeitiges Stopp-Codon zur Folge, das auf dem betroffenen Allel theoretisch zu einem verkürztem Protein (35 AS, normal 591 AS) führt, wenn es nicht über NMD vernichtet wird.

Das Ergebnis zeigt, dass die Linien HDLM-2, SUP-HD1 und U-HO1, die im Western Blot EBF1-Signale zeigen (Abbildung 8), wt EBF1 exprimieren. Von den drei nicht exprimierenden Linien, L-1236, L-428 und KM-H2, hat nur eine bzw. ein Allel eine Mutation. Hier kann nicht von einem häufigen Ereignis gesprochen werden. Mutationen in der kodierenden Sequenz von EBF1 sind damit vermutlich nicht die Ursache für fehlendes Protein oder die fehlende Expression der EBF1 Zielgene.

3.2.5 Analyse der Fitness EBF1-transduzierter HL-Linien

Es wird vermutet, dass der Verlust der B-Zellidentität ausschlaggebend für das Überleben der prä-apoptotischen Vorläuferzellen des HL ist. In Abschnitt 3.2.2.1 wird gezeigt, dass durch die EBF1-Reexpression B-Zellgene wieder exprimiert werden. Möglicherweise wird durch die teilweise Wiederherstellung des B-Zellprofils die Fitness der HRS-Zellen eingeschränkt. Dies wird mit zwei unterschiedlichen Methoden überprüft:

3.2.5.1 Stoffwechselaktivitäten EBF1-transduzierter HL-Linien

Mit dem *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)* wird die Stoffwechselaktivität von EBF1- und *empty*-transduzierten Zellen bestimmt. In diesem sogenannten MTS-Assay wird gelbes Tetrazoliumsalz durch NADH und NADPH zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert. Dieser Farbumschlag wird im ELISA-Reader über vier Stunden in 10 Minuten Intervallen gemessen und steht für die Glykolyseaktivität der Zellen.

Mindestens zweimal werden die vier HL-Linien L-1236, L-428, KM-H2 und U-HO1 mit je acht MOI des *empty*- und des EBF1-Überstandes transduziert. Je drei bzw. fünf Tage nach der Infektion werden eine konstante Anzahl PI-/tGFP+-Zellen (10.000 bzw. 20.000, je als Quadruplikat) sortiert und in je einem *Well* einer *96-Well-Platte*

zur Erholung in Kultur genommen. Zwei Tage später wird der Stoffwechsel per MTS-Assay (2.1.7) im ELISA-Reader bei 490 nm gemessen.

Die Linien L-428, KM-H2 und U-HO1 werden jeweils mindestens zweimal gemessen und zeigen keine Änderung in der Stoffwechselaktivität zwischen *empty*- und EBF1-transduzierten Zellen (ohne Abbildung). Die Linie L-1236 (Abbildung 18) zeigt eine Verringerung der Stoffwechselaktivität in EBF1-transduzierten Zellen.

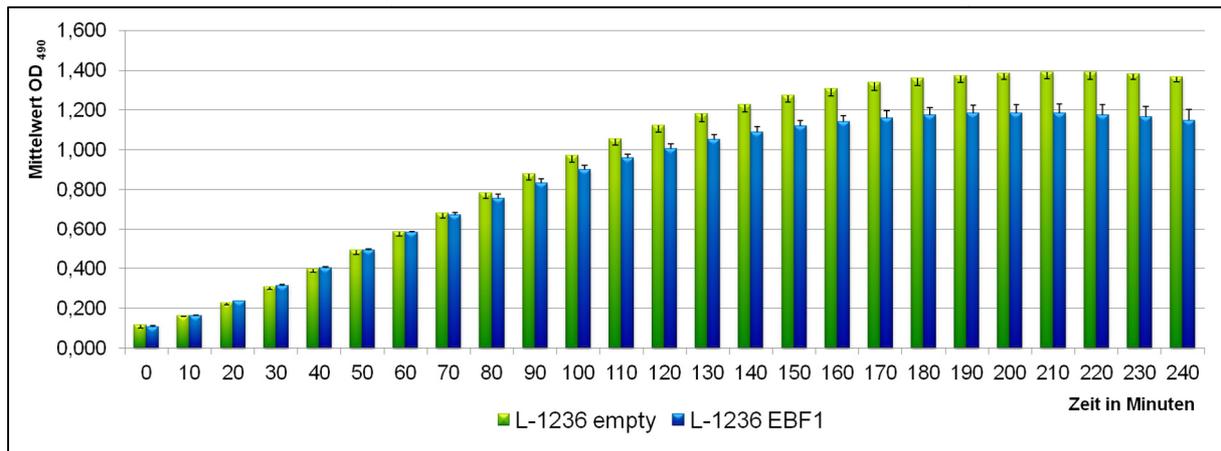


Abbildung 18: MTS-Assay von transduzierten L-1236-Zellen

Die Zellen werden drei Tage nach der Infektion in Aliquots à 10.000 Zellen sortiert, für zwei Tage kultiviert und dann im ELISA-Reader bei 490 nm gemessen. Der Zweistichproben-t-Test für gepaarte Proben ergibt einen p-Wert von $5,4 \times 10^{-6}$ für die beiden Messreihen.

Die EBF1 Reexpression und die Reexpression direkter und indirekter EBF1-Zielgene reduziert die Fitness der Linie L-1236 im MTS-Assay. Der stärkste Effekt wird bei der Sortierung nach drei Tagen und Messung nach fünf Tagen beobachtet. Die Linien L-428, KM-H2 und U-HO1 sind bisher nur nach fünf Tagen sortiert und nach sieben Tagen gemessen worden. Wenn diese Linien ebenfalls drei Tage nach der Transduktion sortiert würden, könnte hier evtl. auch noch ein Effekt beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Genchipanalysen, die zeigen, dass sich das Expressionsmuster in L-1236 durch EBF1-Reexpression deutlich stärker ändert als in L-428, so ist es auch möglich, dass die Änderung der Expression in L-428 nicht ausreicht, um die Zellen in ihrer Fitness zu beeinträchtigen.

Durch die Kultivierung der Zellen nach der Sortierung kann dieser Assay nicht zeigen, ob die niedrigere Stoffwechselrate durch ein Absterben der Zellen und damit einer geringeren Zellzahl nach zwei Tagen oder durch eine geringere Stoffwechselrate pro Zelle verursacht wird. Wenn die Zellen allerdings direkt nach der Sortierung gemessen würden, wird der Stoffwechsel von extrem gestressten

Zellen gemessen, was vermutlich das Ergebnis auch beeinflussen würde. Es soll daher untersucht werden, ob durch EBF1-Reexpression vermehrt Zellen sterben.

3.2.5.2 Löst die EBF1-Reexpression vermehrtes Zellsterben aus?

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, wird vermutet, dass HRS-Zellen durch den Verlust der B-Zellidentität überleben können. Durch die EBF1-Expression und dessen Zielgene könnte vermehrtes Zellsterben ausgelöst werden. Transduzierte Zellen sind mit tGFP-markiert und lassen sich im FACS in der lebenden Population leicht detektieren. Wie wir beobachten können und auch in der Literatur für GFP beschrieben ist, verliert die Zelle durch den Zelltod ihre Fluoreszenz (Lowder et al., 2000). Tote Zellen (PI-positiv) erscheinen im FACS tGFP-negativ. Es wird daher im FACS die Anzahl tGFP+/PI- (transduzierte, lebende Zellen) und tGFP-/PI+ (transduzierte und nicht transduzierte, tote Zellen) bestimmt und verglichen.

Es werden HL-Linien und zur Kontrolle Raji (BL) mit *empty*- und EBF1-Überstand transduziert. Der Ansatz wird entsprechend der Anzahl der Messtage (Triplikat pro Messung) in 100 µL Aliquots in einzelne *Wells* überführt. Je Messtag wird das komplette Wellvolumen mit einer definierten Menge sogenannter *Counting Beads* (Invitrogen) versetzt und im FACS gemessen.

Abbildung 19 zeigt deutlich, dass weniger HL-Zellen EBF1-transduziert sind als *empty*-transduziert. Aber auch die Kontrollzellen Raji zeigen diesen Effekt. Wenn EBF1-Reexpression und dessen Folgen einen toxischen Effekt hat, dann ist er nicht nur auf HL-Linien beschränkt. Vielleicht handelt es sich hier aber auch um ein technisches Artefakt, da die beiden viralen Konstrukte mit ca. 5700 bp (*empty*) und ca. 7500 bp (EBF1) unterschiedlich groß sind. Dadurch sind die beiden Viren evtl. unterschiedlich effizient in der Infektion oder Integration ins Genom. Für dieses Teilexperiment wäre es sinnvoll einen weiteren *empty*-Vektor zu erstellen, der neben tGFP noch ein weiteres Gen (z. B. Luciferase) enthält, damit die Virusgröße vergleichbar ist.

Die Anzahl der toten Zellen bei den *empty*- und EBF1-transduzierten U-HO1 und Raji Zellen unterscheidet sich nicht. Die Linie L-428 zeigt aber deutlich, dass die EBF1-transduzierte Kultur mehr PI-positive Zellen enthält als die *empty*-Kontrollkultur (Abbildung19). Dadurch, dass tGFP in toten Zellen nicht mehr fluoresziert, kann im FACS nicht unterschieden werden, ob hier mehrheitlich transduzierte oder nicht

transduzierte Zellen gestorben sind. Um den Anteil transduzierter Zellen in der PI-positiven Population zu messen wird eine qPCR für tGFP etabliert.

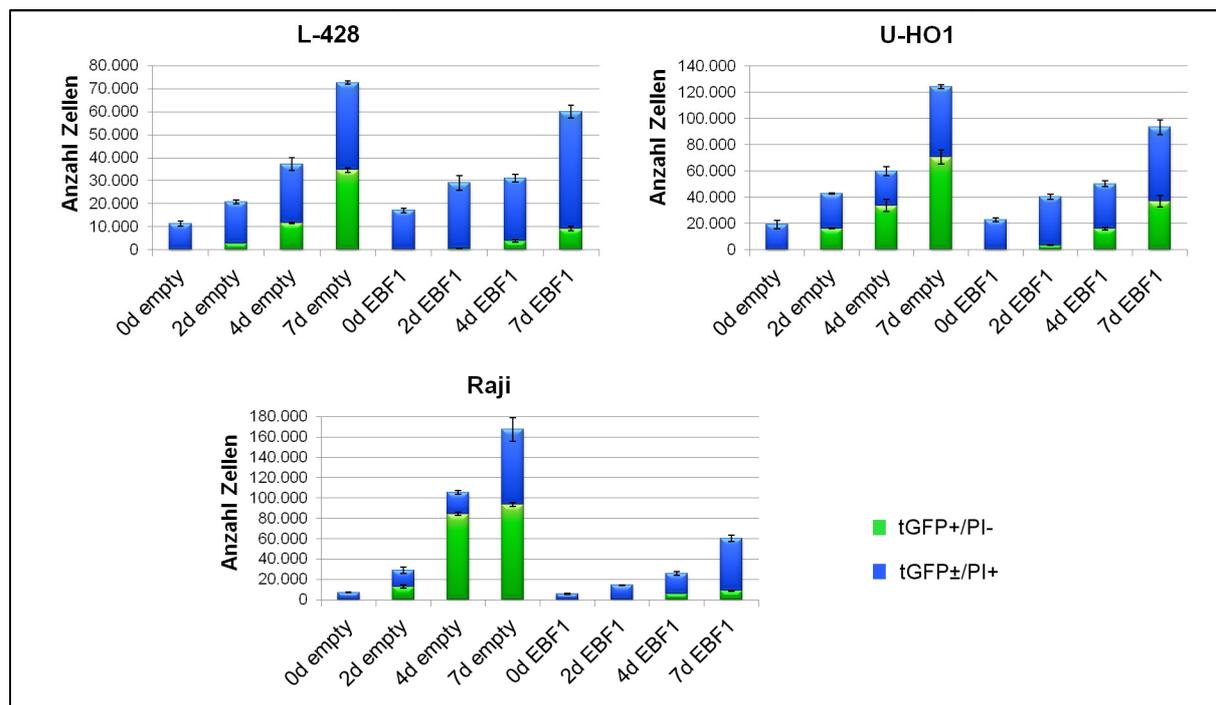


Abbildung 19: PI/tGFP-FACS transduzierter HL-Linien

Die Linie L-428 wird jeweils mit beiden Überständen transduziert. Die Ansätze werden gleichmäßig auf je eine Kulturfasche pro Messtag aufgeteilt. An den Messtagen (Tag 4 & 6) werden jeweils 100 µL homogenisierte Kultur (im Duplikat) wie oben beschrieben zur Zellzahlbestimmung im FACS gemessen und mit dem absoluten Kulturvolumen verrechnet. Außerdem werden tGFP-/PI+ und tGFP+/PI- Zellen in Aliquots zu 25.000 aus den restlichen Zellen sortiert und zur Isolation von DNA verwendet. In der qPCR werden RNase P als Referenzgen und tGFP jeweils im Quadruplikat gemessen. Die tGFP C_t-Werte werden gegen RNase P und gegen die entsprechende tGFP-positive Population des Tages und des Virus normalisiert. Es wird dabei angenommen, dass pro Zelle nur ein viraler Partikel aufgenommen wird. Wenn die PI-positive Population den gleichen ΔC_t -Wert hat wie die tGFP-positive, so waren alle toten Zellen transduziert; ist er kleiner, so gibt der $\Delta\Delta C_t$ -Wert den Anteil der tGFP-positiven Zellen in der toten Population an. Diese werden wiederum mit den im FACS bestimmten Zellzahlen verrechnet.

Die zu messenden tGFP und RNase P C_t-Werte liegen vermutlich sehr nahe beieinander. Um zu untersuchen, ob Messschwankungen den zu messenden Wert überdecken können, werden aus jeweils drei parallelen Zellaliquots einer Sortierung

(Tag 4 und Tag 6; *empty* und EBF1) DNA isoliert und jeweils eine qPCR-Analyse durchgeführt. Rein technisch betrachtet ist die qPCR sehr stabil. Obwohl die zwölf gemessenen $\Delta\Delta C_t$ -Werte sehr nahe beieinander im Bereich von -1,2 bis 0,6 liegen und je vier C_t -Werte pro $\Delta\Delta C_t$ -Werte für Schwankungen verantwortlich sein können, sind die Werte sehr gut reproduzierbar (Abbildung 20).

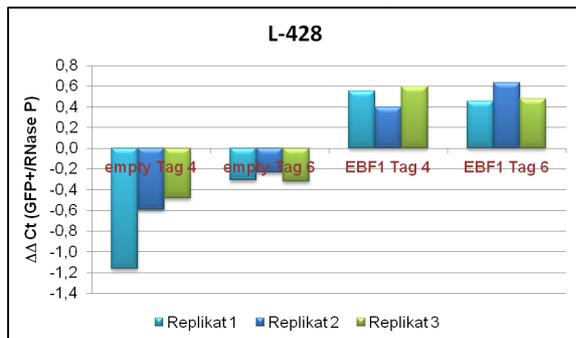


Abbildung 20: Replikate der tGFP qPCR zur Stabilitätsprüfung

Ein $\Delta\Delta C_t$ -Wert von null bedeutet, dass alle Zellen in der PI-positiven Population transduziert sind, ein positiver Wert, dass die Zellen der PI-positiven Population teilweise transduziert sind und ein negativer Wert, dass theoretisch mehr als 100% tGFP-positive Zellen in PI+ sind.

Die Verbindung dieser Werte mit den im FACS gemessenen Zellzahlen (Abbildung 21) zeigt, dass unter den toten Zellen der EBF1-Transduktion (Balken 5 und 11) im Vergleich zur lebenden Population (Balken 4 und 10) überproportional viele tGFP-positive Zellen sind. Die *empty*-behandelten Kontrollzellen haben ebenfalls überproportional viele transduzierte Zellen unter den toten (Balken 2 und 8 im Vergleich zu Balken 1 und 7). Der toxische Effekt stammt offensichtlich nicht von der EBF1-Reexpression, sondern von der Infektion an sich. Auffällig ist auch, dass theoretisch in der PI-positiven Population mehr als 100% der Zellen tGFP-positiv sind (vergleiche negative $\Delta\Delta C_t$ -Werte in Abbildung 20). Das bedeutet, dass die toten Zellen vermutlich mehr virale Partikel aufnehmen als die transduzierten lebenden und nicht alle toten Zellen tGFP-positiv sind, sondern einige viel tGFP-DNA enthalten und andere wiederum negativ sind. Damit ist aber die Grundannahme, dass je Zelle ein viraler Partikel aufgenommen wird, nicht gegeben und es kann nicht berechnet werden wie viele der toten Zellen transduziert sind. Der qPCR-Assay ist somit ebenfalls nicht zur Untersuchung des Zellsterbens durch EBF1-Reexpression geeignet.

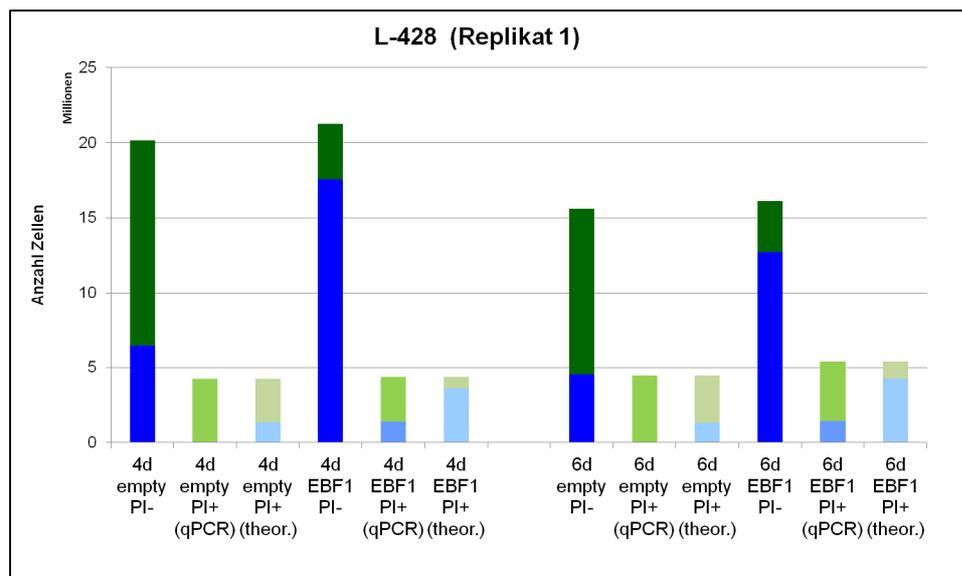


Abbildung 21: Transduzierte Zellen der PI-positiven Population

Es werden die Messtage vier und sechs analysiert, jeweils *empty*- und EBF1-transduzierte Zellen. Die drei Balken dieser vier Gruppen unterteilen sich wie folgt: Der erste Balken stellt die Anzahl der lebenden Zellen (PI-) dar, transduzierte in grün ■ und nicht transduzierte in blau ■, gemessen im FACS mit Counting Beads. Der zweite Balken hat die Höhe der im FACS gezählten toten Zellen, die Farben zeigen den durch die qPCR gemessenen Anteil transduzierter ■ und nicht transduzierter ■ Zellen in dieser Population. Der dritte Balken hat ebenfalls die Höhe der toten Zellen, die Unterteilung in transduzierte □ und nicht transduzierte □ Zellen erfolgt aufgrund der Annahme, dass sich die toten Zellen so verhalten wie die lebenden (Balken 1).

Mit den bisherigen Experimenten konnte nicht geklärt werden, ob EBF1-Reexpression HL-Zellen vermehrt in die Apoptose führt. Der MTS-Assay hat allerdings gezeigt, dass transduzierte L-1236 Zellen einen verringerten Stoffwechsel haben.

Um diesen Aspekt der EBF1-Reexpression weiter zu verfolgen, können auch weitere Apoptoseassays etabliert und durchgeführt werden, beispielsweise kann die Aktivität früher Caspasen in transduzierten Zellen bestimmt werden.

4. Diskussion

Die Pathogenese des HL ist noch nicht vollständig geklärt. Neben EBV, konstitutiv aktiven Signalwegen, vermuteter prä-apoptotischer Abstammung, chromosomale Instabilität und Einflüsse des Mikromilieus, spielt vermutlich auch der Verlust der B-Zellidentität eine wichtige Rolle. Ein Kennzeichen der GC-B-Zellen ist die Apoptoseanfälligkeit, die durch die mangelnde Expression von anti-apoptotischen Faktoren wie z. B. BCL2 (Klein et al., 2003b) im GC erreicht wird. Die normale GC-B-Zelle erhält essentielle Überlebenssignale über den BCR, hierbei wird sie im GC regelmäßig auf einen funktionalen bzw. nicht autoreaktiven BCR geprüft. Bei einem negativen Ergebnis kann durch das Fehlen anti-apoptotischer Faktoren in der Zelle schnell die Apoptose ausgelöst werden. Eine GC-B-Zelle, die dieser Prüfung nicht entspricht, kann vermutlich durch das Fehlen der typischen B-Zellgene und damit der typischen B-Zellsignalwege der Apoptose entkommen. Unklar ist bisher, welches transformierende Ereignis den Verlust der B-Zellidentität auslöst. Da Transkriptionsfaktoren eine entscheidende regulatorische Funktion in der zelltypischen Genexpression ausüben und diese neben den allgemeinen B-Zellgenen ebenfalls im HL dereguliert sind, wird hier untersucht, welchen Effekt diese in der Pathogenese des HLs haben. Deskriptive Analysen sind notwendig, aber nur beschränkt aussagekräftig. Daher werden hier funktionelle Untersuchungen in Zelllinien durchgeführt. Zelllinien haben zwar den Nachteil, dass sie an die Kultur adaptiert sind und evtl. nicht tumortypische Merkmale tragen, dennoch entsprechen sie im Wesentlichen dem tumorspezifischen Phänotyp. Außerdem sind Zelllinien, im Gegensatz zu selten erhältlichen primären Fällen, die nur wenige HRS-Zellen enthalten und nicht kultivierbar sind, in größeren Mengen verfügbar.

Die Aufgaben der Transkriptionsfaktoren werden von unterschiedlichen Standpunkten aus untersucht. Zum einen kann die Herunterregulation dieser in B-Zelllinien zeigen, inwiefern B-zellspezifische Gene weiterhin ausgeprägt werden und/oder ob linienfremde Gene in ihrer Expression steigen. Zum anderen können in HL-Linien reexprimierte B-Zelltranskriptionsfaktoren vielleicht die Ausprägung von B-zellspezifischen Genen begünstigen und/oder die Ausprägung linienfremder Gene unterdrücken. Falls somit eine Art B-Zellsignatur wieder hergestellt wird, wird ggf. auch die Apoptosesensitivität erneut aktiv und es tritt vermehrtes Zellsterben auf.

4.1 Herunterregulation des B-Zelltranskriptionsfaktors E2A in B-Zelllinien unter Verwendung von shRNA-exprimierenden Retroviren

Zu Beginn der hier beschriebenen Experimente ist bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren E2A und EBF1 für die Differenzierung von B-Zellen notwendig sind (Bain et al., 1994; Lin und Grosschedl, 1995; Zhuang et al., 1994). Inwieweit die beiden Transkriptionsfaktoren für die Aufrechterhaltung des B-Zellphänotyps eine Bedeutung haben, ist noch nicht geklärt. Daher wird mittels shRNA-Expression zunächst die Funktion von E2A in GC-B-Zelllinien untersucht.

Die Transfektion von hämatopoetischen Zelllinien, insbesondere des HL, ist nicht trivial. Für eine Elektroporation liegen kaum etablierte Protokolle der hier verwendeten Linien vor. Experimente aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass nur wenige Zellen die Prozedur überleben. Die Lipofektion mit kationischen Lipidvesikeln war mit einigen der hier verwendeten Zielzellen ebenfalls nicht erfolgreich. Die Verwendung eines retroviralen Vektors hat neben hohen Überlebensraten und relativ hohen Transduktionsraten in den verwendeten Linien noch den Vorteil einer stabilen Transduktion.

Mit dem Vektor pSM2 konnte kein Virus-haltiger Überstand produziert werden. Möglicherweise hat die Umklonierung von GFP in den Vektor das essentielle Verpackungssignal Ψ (Psi) zerstört. Die vorhandenen Vektorkarten sind ungenau und zeigen dessen Position nicht präzise an, so dass dies nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Die ungefähre maximale retrovirale Genomgröße wird mit 8 – 10 kb angegeben (Miller, 1997). Der Vektor (ca. 7100 bp) und das Insert (1440 bp) haben zusammen 8,5 kb, hier besteht die Möglichkeit, dass der Virus nicht verpackt wird und das dies die Ursache für die fehlende Virusproduktion ist.

Der Virus aus dem Vektor pVig transduziert nur wenige Zellen und zeigt kaum Regulation der shRNA Zielgene. Die mangelnde Regulation beruht vermutlich auf der Tatsache, dass in der qRT-PCR sogenannte *bulk* Zellen (transduzierte und nicht transduzierte, lebende und tote) gemessen werden. Hierbei überlagern die mehrheitlich nicht transduzierten Zellen die Messung. Die geringe Infektionseffizienz vermag am niedrigen Titer der pVig-Viren von maximal 3×10^5 V/mL liegen. Bei einer Infektion mit 10 MOI haben die Zellen eine Konzentration von 3×10^4 Zellen/mL, dies ist für B- und HL-Linien weit unterhalb der empfohlenen Dichte von ca. 2×10^5 – 1×10^6 Zellen/mL. Dies bedeutet neben der Infektion weiteren Stress für die Zelle und

beeinflusst u. U. die Transduktionsrate und die Rate der überlebenden Zellen. Bei der Verwendung dieses Konstrukts wäre eine Konzentration der Viren per Ultrazentrifugation angebracht und u. U. auch die Sortierung transduzierter Zellen per FACS.

Obwohl mit dem pGIPZ-Virus technisch eine optimale Infektion mit hohen Virustitern durchgeführt wird und die transduzierten Zellen für die qRT-PCR per FACS sortiert werden, kann keine Regulation der drei shRNA-Zielgene detektiert werden. Zwei der shRNAs (GAPDH und PSMC2) werden in anderen Linien als erfolgreich beschrieben. Aus laboreigenen Erfahrungen ist bekannt, dass gleiche shRNA-Sequenzen in unterschiedlichen Linien unterschiedlich effizient sein können. Aus diesem Grund werden in der Etablierungsphase eines Experiments meist gleichzeitig mehrere shRNAs gegen ein Zielgen getestet. Bei einer möglichen Weiterführung dieses Experiments wäre dies theoretisch das weitere Vorgehen.

Im Jahr 2008 zeigt eine Publikation über sogenannte *E2A conditional knockouts* (Aicda-cre und CD23-cre), dass fehlendes E2A zwar die Anzahl und Größe der GC reduziert, nicht aber den CSR oder die allgemeine Genexpression behindert (Kwon et al., 2008). Hiernach wäre vermutlich kein Effekt durch E2A-shRNA in GC-B-Zelllinien auf die B-zellspezifische Genexpression detektiert worden. E2A scheint also notwendig in GC, aber nicht essentiell.

4.2 Expression des B-Zelltranskriptionsfaktors EBF1 in HL-Linien

Bisher wurden keine umfangreichen Untersuchungen zum Fehlen von EBF1 in HL-Linien durchgeführt. In B-Vorläuferzellen aus E2A-defizienten Mäusen kann durch die Expression von EBF1 die Reifung von CD19-positiven Zellen detektiert werden (Seet et al., 2004). EBF1 scheint essentiell für die B-Zellentwicklung und Expression von B-zellspezifischen Genen zu sein. Aus einer Studie des Jahres 2002 geht hervor, dass transiente EBF1 Reexpression in HL-Linien in der Lage ist plasmidcodierte Reportergene, die unter der Kontrolle des CD79A- bzw. CD19-Promotors stehen, zu exprimieren (Hertel et al., 2002). Eine Untersuchung zum endogenen CD19-Promotor konnte bei Hertel et al. per FACS keine Reexpression feststellen. Weiterreichende Experimente wurden hier nicht durchgeführt.

4.2.1 Änderungen der Genexpression durch EBF1-Reexpression

Die Reexpression von EBF1 in den HL-Linien L-1236, L-428, KM-H2 und U-HO1 induziert die Ausprägung einzelner B-Zellgene, wie hier per sqRT-PCR und Real-time RT-PCR gezeigt werden konnte. Dabei wird CD19, CD79A und CD79B in allen untersuchten Linien hochreguliert und PAX5 nur in L-1236. Der Transkriptionsfaktor EBF1 ist also aktiv in HL-Zellen und kann Teile der B-Zellsignatur wiederherstellen. Im Gegensatz zu den Reporterexperimenten von Hertel et al. (2002; siehe 4.2) kann hier endogene Expression nachgewiesen werden. Im Unterschied zu deren Studie wird hier der Nachweis auf mRNA-Ebene erbracht, was die Verwendung von sensitiveren Methoden erlaubt.

Auffällig sind die Schwankungen der Expressionen an unterschiedlichen Messtagen in beiden Experimenten. Die hohe verwendete Zyklenzahl in der sqRT-PCR und die späten Ct-Werte in der Real-time RT-PCR zeigen, dass die Ausprägung der B-Zellgene zwar vorhanden ist, aber nicht so stark wie in normalen B-Zellen. Dieser Messbereich unterliegt hohen technischen Schwankungen. Daher ist es auch sinnvoll, die theoretisch berechenbaren n-fachen Änderungen als Tendenzen zu betrachten und nicht als fixe Werte. Dennoch sind die erhaltenen Ergebnisse real, da eine hohe Anzahl von Wiederholungen und die Untersuchung mit zwei verschiedenen PCR-Techniken, die jeweils unterschiedliche Primer-Paare verwenden, identische Ergebnisse zeigen.

Die Promotoren verschiedener (B-Zell-)Gene werden im Allgemeinen von Gruppen von Faktoren reguliert. Der CD79A-Promotor z. B. hat Bindestellen für Ets, EBF1/BlyF, LyF/micro B (IKAROS) und Sp1 (Leduc und Cogne, 1996) und CD79B für Sp1, Ets, OCT, IKAROS/LyF1 und EBF1 (Akerblad et al., 1999; Thompson et al., 1996). Die verschiedenen regulatorischen Elemente des CD19-Promotors der Maus werden von E2A, EBF1 und PAX5 aktiviert (Walter et al., 2008). Der PAX5-Locus trägt Bindestellen für die regulatorischen Elemente EBF1, STAT5 (Hirokawa et al., 2003) und EBF1, PU.1, IRF4, IRF8 und NF- κ B (Decker et al., 2009). Weitere EBF1-Zielgene werden vermutlich ein ähnlich heterogenes Spektrum von Faktoren zur Ausprägung benötigen. Da HL-Zellen ein aberrantes Expressionsprofil aufweisen, werden möglicherweise einige dieser Faktoren im HL nicht exprimiert. Dies kann erklären, warum die alleinige Reexpression von EBF1 den B-Zellstatus nicht im vollen Umfang herstellen kann. Entweder sind die Cofaktoren zur Reexpression von

CD79A, CD79B und CD19 nicht von großer Bedeutung, oder sie werden in ausreichendem Maße in HL-Linien exprimiert, oder sie sind ihrerseits EBF1 Zielgene und werden hier reexprimiert. Gegen die letzte Annahme spricht jedoch, dass die Genchipdaten (3.2.2.2) keine Regulation der hier genannten Faktoren zeigen. Der Vergleich der qPCR-Daten und Genchip-Daten (3.2.2.2) zeigt allerdings auch, dass die qRT-PCR deutlich sensitiver ist und Gene geringerer Expressionsstärke im Hintergrundrauschen des Arrays verschwinden. Weitere Real time RT-PCR Analysen könnten die Expression dieser Faktoren in transduzierten HL-Linien klären.

Ein anderer Grund für die relativ schwache Reexpression von B-Zellgenen könnte die weiterhin vorhandene Ausprägung der hemmenden Faktoren ID2 und Notch1 sein. Die beiden Faktoren ändern ihre Expressionsstärke unter Einfluss von reexprimierten EBF1 nicht – mit Ausnahme einer sogar höheren Notch1-Expression in L-1236 –, obwohl eine Notch1 Herunterregulation über EBF1 durch Hinweise aus normalen B-Zellen (Pongubala et al., 2008) und über PAX5 (Souabni et al., 2002) erwartet wird. EBF1 wird durch das virale Konstrukt exprimiert und PAX5 ist in Maßen vorhanden, wie die Δ Ct-Werte der *empty*-Kontrollzellen zeigen. Wobei die Expression sehr heterogen ist: L-428 und KM-H2 exprimieren etwas PAX5 α und kein PAX5 β ; L-1236 exprimiert etwas PAX5 α und viel PAX5 β ; U-HO1 exprimiert beide Isoformen stark. Die gemessenen PAX5-Niveaus sind in allen HL-Linien im Vergleich zu einer exemplarisch gemessenen cDNA aus CD77-positiven GC-Zellen niedriger (ohne Abbildung). Folgende Effekte werden den beiden Proteinen Notch1 und ID2 zugeschrieben: Notch1 wird im HL als Inhibitor von E2A und EBF1 und deren Zielgenen dargestellt (Jundt et al., 2008), wodurch die endogene E2A-Expression hier evtl. weiterhin niedrig gehalten wird. Die EBF1-Expression sollte hiervon nicht betroffen sein, da sie nicht über den eigenen Promotor reguliert wird. ID2 wird eine hemmende Interaktion mit PAX5 in Überexpressionsexperimenten in Fibroblasten zugesprochen (Roberts et al., 2001). Diese konnte allerdings in HL-Linien bisher nicht nachgewiesen werden (Eickernjäger, 2010). Außerdem hemmt ID2 die Funktion von E2A in HL-Zellen (Eickernjäger, 2010; Mathas et al., 2006; Renne et al., 2006). Somit können insbesondere EBF1-Zielgene, die in Kooperation mit E2A aktiviert werden (ca. zwei Drittel der EBF1-Zielgene (Lin et al., 2010)), nicht vollständig angeschaltet werden.

Unter der Annahme, dass sich *empty*-infizierte Kontrollzellen wie die entsprechende unbehandelte Linie verhalten, so kann man über die ΔCt -Werte (zu β -Aktin) die Expressionen der untersuchten Gene vergleichen. Die Betrachtung der ΔCt -Werte der Linie U-HO1 zeigt, dass CD19 und CD79B genauso schwach exprimiert werden wie in den anderen drei untersuchten HL-Linien, und dass PAX5 (ohne Unterscheidung zwischen der α - und β -Form) zwar stärker als in L-428 und KM-H2 exprimiert wird, aber vergleichbar zu L-1236 ist. Interessant ist daher die Frage, warum U-HO1 trotz relativ hoher EBF1-Expression (vergl. WB, 3.2.1.2) eine schwache B-Zellsignatur hat und auch in der Real-time PCR die niedrigsten Reexpressionsraten von EBF1-Zielgenen (Abbildung 12) zeigt. Möglicherweise sind Notch1 und ID2 hier der reprimierende Faktor. Im Vergleich zu den drei anderen untersuchten HL-Linien sind Notch1 und ID2 in der Linie U-HO1 am stärksten exprimiert (ohne Abbildung).

Auffällig ist noch die Tatsache, dass Notch1 in der Linie L-1236 sogar hoch reguliert wird, obwohl eine Herunterregulation durch EBF1 in Maus-B-Zellen beschrieben wird (Pongubala et al., 2008). Hierfür wurde bisher keine Erklärung gefunden. Trotz der stärkeren Expression dieses Inhibitors der B-Zellsignatur wird in der qRT-PCR (Abbildung 12) hier die höchste CD19-Reexpression detektiert. Bei Betrachtung der ΔCt -Werte in *empty*-Kontrollzellen zeigt sich, dass L-1236 die niedrigste Notch1-Expression der untersuchten Linien hat. Durch die Hochregulation von Notch1 in EBF1-transduzierten L-1236 Zellen hat es eine Expression vergleichbar zu U-HO1 und KM-H2.

Zusammenfassend ist EBF1 in der Lage die B-Zellsignatur teilweise und in einer milden Ausprägung wieder herzustellen, nicht aber linienfemde, reprimierende Faktoren wie ID2 und Notch1 in ihrer Expression zu inhibieren.

Der Vergleich der transduzierten HL-Linien über die Daten der Genchipsanalyse zeigt in einem *Unsupervised Hierarchical Clustering*, dass die beiden Hauptarme von den beiden Linien gebildet werden und nicht von den beiden viralen Konstrukten. Die beiden Linien sind in ihrer Genexpression also unterschiedlicher als der gemeinsame Effekt der induzierten EBF1-Expression. Dies verwundert nicht bei der Beobachtung, dass nur vier Gene jeweils in beiden Linien mindestens 2-fach hoch- oder herunterreguliert sind (Tabelle 15). Eine Ursache für die mangelnde gemeinsame differentielle Genexpression kann die Heterogenität der Linien sein, ein

Umstand für den HRS-Zellen bekannt sind. Viele Gene werden nur in einigen HL-Fällen exprimiert und dann auch nicht in allen HRS-Zellen des Klons.

Die Ergebnisse der Real-time PCR können im Kern mit den Ergebnissen der Genchips bestätigt werden. Einige der in der qRT-PCR detektierten Gene können in den Genchips aufgrund der Nähe zum Hintergrundrauschen nicht ausgewertet werden. Während in der Real-time PCR unabhängig von der Zellzahl wenige Kopien pro Ansatz detektiert werden können, so benötigt ein Genchip mehrere Kopien pro Zelle (bei 30.000 Zellen, 150 ng RNA pro Chip), um ein Signal zu bekommen. Schwach exprimierte Gene und deren differentielle Expression können mit einem Genchip kaum nachgewiesen werden.

Auffallend ist auch die Anzahl der differentiell exprimierten Gene der beiden Linien L-1236 und L-428. So werden in der ersteren 2,6-fach mehr Gene reguliert. Auch dies ist ein Hinweis auf die Heterogenität der Linien. Die beiden Linien exprimieren möglicherweise unterschiedliche (Mengen von) Faktoren, die EBF1 unterstützen oder in seiner Aktivität hemmen können. Hierbei können Proteine wie z. B. Transkriptionsfaktoren oder Enzyme für epigenetische Aktivitäten eine Rolle spielen.

Eines der stark regulierten Gene der Genchipanalyse ist FCER2/CD23. Es wird von B-Zellen und anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert. Genchips zeigen, dass es in B-Zellen hauptsächlich von Gedächtniszellen und in einem schwächeren Umfang von Centroblasten und Centrocyten ausgeprägt wird (Klein et al., 2003b). U. a. ist es an der Regulation der IgE-Expression beteiligt (Acharya et al., 2010). Immunhistologische Untersuchungen von primären HL-Fällen zeigen widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Expression. Während drei Studien HRS-Zellen eine seltene CD23 Expression bescheinigen (Angel et al., 1987; Jarrett et al., 1991; Salama et al., 2010) zeigt eine Publikation häufige Expression (Rowlands et al., 1990). In den EBF1-transduzierten Zellen ist es mit einer 5,1-fachen Hochregulation in L-428 das am stärksten regulierte Gen. In L-1236 wird es 2,5-fach positiv reguliert und liegt damit im Bereich der zehn am stärksten regulierten Gene. Die Expressionswerte der in dieser Arbeit durchgeführten Genchips zeigen eine starke Expression in L-1236 und eine mittlere Expression in L-428, die in EBF1-transduzierten Zellen auf den L-1236/*empty*-Level ansteigt. Durch die EBF1-Reexpression scheint die bereits vorhandene CD23-Expression weiter verstärkt zu werden. Möglicherweise wird dies durch die verstärkte Ausprägung von CD40 (2,1-

fach hochreguliert in L-428/EBF1) erreicht. Aktiviertes CD40 kann die CD23-Expression positiv beeinflussen (Sukumar et al., 2006). Wie CD40 aktiviert wird ist allerdings unklar, denn der Ligand CD40L liegt in den hier untersuchten Zellen mit seinen Expressionswerten (5,6 – 5,9) knapp unter dem Schwellenwert von sechs, der für nicht interpretierbare Daten wegen des Hintergrundrauschens angenommen wird. Evtl. liegt aber dennoch eine Expression vor, die ausreichend ist, um CD40 zu aktivieren. Der CD40-Promotor wiederum hat eine EBF1-Bindestelle, dessen Chromatin im Laufe der B-Zellentwicklung zu reiferen, EBF1-exprimierenden B-Zellen schrittweise aktiviert wird (Treiber et al., 2010b). Da die Linien auch in den *empty*-Kontrollzellen CD23 und CD40 exprimieren, kann nicht pauschal von einer Wiederherstellung des B-Zellstatus gesprochen werden, sondern muss auch der Expressionslevel dieser Daten mit denen in normalen B-Zellen verglichen werden; solche Daten liegen jedoch hier nicht vor.

Insgesamt zeigen die Genchipdaten, dass in einzelnen Bereichen durchaus eine B-Zellsignatur wieder hergestellt wird (z. B. für CD79A), die jedoch auch immer im Zusammenhang mit normalen B-Zellen zu betrachten ist. Andererseits zeigen auch einige Gene eine gegenteilige Entwicklung (z. B. CXCL9), die vermutlich auf weiterhin vorhandene dominante, linienfremde, regulatorische Proteine zurückzuführen ist.

Die Analyse der Expression des B-zellspezifischen Proteins CD79A in HL-Zellen per Western Blot zeigt kein Signal für dieses Protein in EBF1-transduzierten Zellen. Wie bereits im Abschnitt 3.2.2.3 erwähnt, kann es sein, dass aufgrund der geringen mRNA-Mengen nur sehr wenig Protein exprimiert wird. Möglicherweise kann eine Lyse der Zellen in unterschiedliche Fraktionen (Holden und Horton, 2009) eine vollständige Zersetzung aller Kompartimente und eine Anreicherung von CD79A in der Membranfraktion bewirken. Somit stünde ein konzentriertes Präparat für einen weiteren Western Blot zur Verfügung. Bei den hier notwendigen Mengen von mehreren Millionen tGFP-positiver Zellen ist eine technische Limitierung zu beachten. Alternativ könnte jedoch versucht werden, sortierte Zellen durch weitere Kultivierung zu vermehren.

Möglicherweise kann CD79A hier aber auch nicht als Protein nachgewiesen werden. Zum einen ist die Expression von CD79A vermutlich stark reguliert, wie der Zusammenbau des BCR-Komplexes, bei dem CD79A eine limitierende Rolle spielt,

zeigt (Brouns et al., 1995). Wenn diese Regulation auf posttranskriptionaler Ebene oder durch Hemmung der Translation stattfindet und im HL aktiv ist, ist es auch möglich, dass die Translation des Proteins nicht erfolgt. Zum anderen ist CD79A nur im Komplex mit dem BCR und CD79B stabil. Dieser Komplex wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) assembliert. Durch den in HL-Zellen fehlenden BCR findet im ER keine Zusammenbau statt. CD79A wird evtl. nicht korrekt gefaltet und dadurch posttranslational degradiert.

4.2.2 Promotormethylierungen in EBF1-transduzierten Hodgkinzellen

Die Promotoren der untersuchten Gene CD19, CD79B, PAX5 α und PAX5 β zeigen nur an einzelnen CpGs tendenziell eine Demethylierung durch EBF1. Die tGFP-positive Population besteht offensichtlich aus einem Gemisch von Zellen, in deren DNA nur einige CpGs demethyliert werden und das auch nicht in jeder Zelle/jedem Allel. An Mäusen wurde gezeigt, dass die Menge des exprimierten EBF1 einen Einfluss auf die exprimierten Zielgene zu haben scheint (Mansson et al., 2008); evtl. ist auch der mögliche Einfluss von EBF1 auf Methylierungen dosisabhängig. Mögliche Ursache für unterschiedliche EBF1-Expressionsraten könnte die Menge Virus sein, die eine Zelle aufgenommen hat. Zusätzlich wirkt sich wahrscheinlich auch die Integrationsstelle auf den Level der EBF1-Expression aus.

Die untersuchten Promotoren von CD19 und CD79B in *empty*-transduzierten Kontrollzellen entsprechen im Allgemeinen der gängigen Vorstellung, dass methylierte Bereiche keine oder wenig mRNA exprimieren. Der PAX5 β -Promotor weicht davon jedoch ab. Er ist in HL-Linien, wie in CD77-positiven GC-B-Zellen, unmethyliert (und bleibt es auch unter EBF1 Einfluss). Interessanterweise wird PAX5 β mRNA nur in L-1236 (*empty* und EBF1), nicht aber in L-428 und KM-H2 exprimiert, wie Real-time PCRs zeigen (ohne Abbildung). Es gibt hier offensichtlich einen von Promotor-Methylierungen unabhängigen hemmenden Mechanismus, der die Transkription von PAX5 β in L-428 und KM-H2 unterdrückt. Möglicherweise ist hier der kürzlich beschriebene, durch DNA-Methylierungen regulierte *Enhancer* in Intron fünf inaktiv (Decker et al., 2009). Es ist aber auch denkbar, dass in den HL-Linien, die in Bezug auf ihre Genexpression sehr heterogen sind, unterschiedliche Level von weiteren, an der Transkription von PAX5 β beteiligten Faktoren ausgeprägt werden und somit in L-428 und KM-H2 PAX5 β nicht exprimieren.

Die Demethylierung des PAX5 α -Promotors in EBF1-transduzierten L-1236 wirkt sich nicht in einer verstärkten Expression der α -Isoform aus, wie Isoform-spezifische Real-time RT-PCRs zeigen (Tabelle 17). Die Betrachtung des entsprechenden L-1236/*empty* Δ Ct-Wertes und der Vergleich mit einer exemplarisch gemessenen Probe CD77-positiver GC-B-Zellen (ohne Abbildung) zeigt, dass PAX5 α zwar in L-1236 exprimiert wird, aber mit einem deutlich geringeren Level als in den GC-B-Zellen. Auch hier scheint, wie schon im oberen Abschnitt erläutert, ein von Methylierungen des Promotors unabhängiger Mechanismus die vollständige Expression von PAX5 α in L-1236 zu unterdrücken.

Bisulfidsequenzierungen in nicht transduzierten weiteren HL-Linien (ohne Abbildung) zeigen einen unmethylierten PAX5 β -Promotor in U-HO1 und in der von T-Zellen abstammenden HD-LM2 einen methylierten Zustand. Hier zeigen exemplarisch durchgeführte RT-PCRs die entsprechend erwartete Expression (ohne Abbildung). Obwohl in der Decker-Studie für den PAX5-Promotor der Maus in normalen B-Zellen keine epigenetische Regulation durch DNA-Methylierungen vermutet wird (Decker et al., 2009), ist für PAX5 α in den Lymphom-Linien L-1236, L-428, KM-H2 sowie HDLM-2 und für PAX5 β in HDLM-2 eine Methylierung der DNA detektierbar. Auch in anderen Tumoren wie dem Mammakarzinom und Bronchialkarzinom wurden methylierte Bereiche in den α - und β -Promotoren beschrieben (Palmisano et al., 2003). Eine weitere umfangreiche Studie bestätigt, dass Hypermethylierung im cHL vorwiegend B-zellspezifische Gene betrifft (Ammerpohl et al., 2012) und somit vermutlich zum Verlust der B-Zellidentität beiträgt. Trotz des beschriebenen Einflusses von EBF1 auf Methylierungen im CD79A-Locus (Maier et al., 2004) kann in diesem Lymphom-Umfeld keine weitreichende Demethylierung detektiert werden. Interessanterweise wird in der Publikation von Maier et al. (2004) Runx1 als Kooperationspartner bei der Aktivierung von CD79A beschrieben. Die Genchip-Analyse (aus 3.2.2.2) zeigt, dass in L-1236 Runx1 1,7-fach (FDR 0,0002) und auch CD79A 2,3-fach (FDR 0,0003) hochreguliert wird.

Vielleicht wäre bei der Analyse des CD79A-Promotors in L-1236 eine deutlichere Demethylierung festgestellt worden. Die Genchip-Analyse zeigt keine Expression für Runx1 in L-428/EBF1, was vielleicht den geringen Einfluss von EBF1 auf die schwache CD79A-Expression (FC 1,2; FDR 0,106) erklärt. Die Analyse des CD79A-Promotors könnte zeigen, ob in HL-Zellen die Demethylierung im Allgemeinen gestört

ist oder ob die Funktion von EBF1 in diesem Zusammenhang nur auf den CD79A-Promotor beschränkt ist.

In der globalen Methylierungsstudie des cHL von Ammerpohl sind weitere hypermethylierte Gene beschrieben (Ammerpohl et al., 2012), die hier in den Genchips der EBF1-transduzierten Zellen hochreguliert werden. Hierzu gehören FCER2 (L-1236 2,5-fach; L-428 5,1-fach) und SEMA7A (L-1236 2,6-fach; L-428 2,5-fach). Auch hier können weitere Analysen klären, ob EBF1 in Linien des cHL eine demethylierende Funktion einnimmt.

Bis auf die Demethylierung durch EBF1 im PAX5 α -Promotor in der Linie L-1236 sind die Effekte eher auf einzelne CpGs beschränkt oder nicht vorhanden. Trotzdem zeigen die Ergebnisse der quantitativen RT-PCRs (3.2.2.1) eine Reexpression von CD19 und CD79B in den untersuchten Linien. Möglicherweise sind die entscheidenden regulatorischen CpGs nicht in dieser Analyse detektiert worden. Ein anderer Grund für die schwache detektierte Demethylierung könnte sein, dass nicht jede Zelle CD19 und/oder CD79B reexprimiert, sondern nur einzelne transduzierte Zellen. Vielleicht ist damit die Anzahl der hier analysierten Klone (sieben bis elf pro PCR-Fragment) zu gering und es werden vorwiegend unbeeinflusste Klone gemessen.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine EBF1-Expression in verschiedenen HL-Linien erfolgreich etabliert werden. Analysen der Genexpression in EBF1-transduzierten HL-Linien per RT-PCR und Genchips zeigen, dass EBF1 einen Einfluss auf einzelne, nicht aber auf die globalen B-Zellgene hat. EBF1 hat damit eine Funktion im Zusammenhang mit der verlorenen B-Zellsignatur. Eine weitere unbekannte Hürde verhindert jedoch eine umfangreichere Reexpression von B-Zellgenen, die vermutlich HL-spezifisch ist. Dies lässt eine Studie mit plasmidcodierten Reportergenen unter dem Einfluss des CD79A- bzw. CD19-Promotors vermuten, in der das Reportergen in Daudi Zellen im Gegensatz zu HL-Zellen vielfach erhöht exprimiert wird (Hertel et al., 2002). Real-time RT-PCR-Analysen könnten das Expressionsniveau weiterer notwendiger B-Zell-Transkriptionsfaktoren in EBF1-transduzierten Zellen messen und Hinweise auf das Fehlen einer globalen B-Zellsignatur liefern.

Ein Hinweis auf verstärkte Apoptose in EBF1-transduzierten Zellen wurde noch nicht erbracht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass EBF1-Reexpression die Stoffwechselaktivität von L-1236 reduziert. Hier sind noch weitere Untersuchungen, wie z. B. die Messung der Aktivität von frühen Caspasen in transduzierten Zellen, notwendig.

Die Transkriptionsfaktoren der lymphatischen Linie scheinen in einem empfindlichen netzartigen Gleichgewicht zueinander zu stehen und nicht in einem linearen on-off-Verhältnis. Um einen weitreichenderen Einblick in deren Wechselwirkungen im HL zu erhalten, sollte dies in weiteren funktionellen Experimenten berücksichtigt werden. Es müssen daher in einer Vielzahl von Experimenten regulatorische Proteine, wie E2A, EBF1, PAX5, ID2, ABF1 und Notch1, einzeln und in diversen Zweier, Dreier Gruppen usw. durch Reexpression oder shRNAs ein- bzw. ausgeschaltet und das jeweilige Transkriptom analysiert werden. Mindestens sollte in einem dieser Arbeit folgendem Experiment neben einer EBF1-Reexpression parallel eine Inhibierung von ID2, ABF1 und Notch1 erfolgen. HL-Zellen lassen sich vermutlich nicht mit verschiedenen Viren gleichzeitig transduzieren; außerdem muss die mehrfache Selektion praktikabel sein, weshalb stabile Linien etabliert werden sollten. Diese können schrittweise mit weiteren Eigenschaften ergänzt werden. Falls das neue Transkriptom nicht zu vitalen Zellen führt, müssen die jeweiligen Faktoren induzierbar sein. Anschließende ChIP-Seq- und ChIP-PCR-Analysen können zeigen, wo die Transkriptionsfaktoren in dem jeweiligen Zellzusammenhang binden und welche Gene exprimiert werden. Individuelle ChIP oder RT-PCR-Analysen wären bei der Vielzahl von Proben zu zeitaufwändig, auch wenn sie verlässlichere und sensitivere Ergebnisse liefern würden.

In dieser sehr umfangreichen Experimentreihe wurden andere regulatorische Faktoren, wie Inhibierung der Translation durch siRNAs und Epigenetik, noch nicht berücksichtigt. Diese scheinen auch eine wichtige Rolle in der B-Zelldifferenzierung bzw. im HL einzunehmen. So ist die Bildung von GC durch fehlende siRNAs (Dicer knockout in *Aicda-Cre*) gestört (Xu et al., 2012). Globale Methylierungsstudien in HL-Linien zeigen methylierte B-Zellgene, die überwiegend nicht exprimiert werden (Ammerpohl et al., 2012). Untersuchungen zu Histonmodifikationen in HL-Zellen zeigen inaktivierte H3K9/14-deacetylierte und H3K27trimethylierte Histone in B-zellspezifischen Genen (Seitz et al., 2011). Auch diese Effekte können nicht durch

individuelle Experimente in den etablierten Linien gemessen werden, sondern müssen über genomweite siRNA-Analysen, Methylierungsstudien (Bibikova et al., 2011; Bibikova et al., 2009) und histonspezifische ChIP-on-Chip oder ChIP-Seq Experimente analysiert werden. Die erhaltenen Daten kann ein interdisziplinäres Team aus Biologen und Bioinformatikern verarbeiten.

Bisher zeigt die Datenlage, dass der Verlust von EBF1 zur verlorenen B-Zellsignatur im HL beiträgt und die Fitness der HL-Zellen steigert.

5. Zusammenfassung der Arbeit

Besonderes Charakteristikum des von B-Zellen abstammenden Hodgkin-Lymphoms ist die heterogene Ausprägung verschiedenster Gene. Diese umfasst neben einem Verlust der B-Zellsignatur die aberrante Ausprägung von Genen anderer hämatopoetischen Linien. Die Rolle dieses ungewöhnlichen Expressionsmusters für die Pathogenese des HL ist bisher unbekannt.

Um einen Einblick in die möglichen Mechanismen dieser Dedifferenzierung zu erhalten wurde EBF1, einer der wichtigsten B-Zelltranskriptionsfaktoren der B-Zelle, der in HL-Linien im Allgemeinen nicht oder nur schwach ausgeprägt ist, reexprimiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von EBF1 in HL-Linien erfolgreich etabliert werden. Die funktionellen Experimente mit den transduzierten Linien haben gezeigt, dass EBF1 in der Lage ist verschiedene positiv regulierte B-Zellzielgene wie CD19, CD79A und CD79B in HL-Linien wieder auszuprägen. Für andere B-Zellzielgene wie PAX5 und Foxo1 trifft das nicht zu. Ebenso konnten negativ regulierte Zielgene anderer Linien wie ID2 und Notch1 nicht in ihrer Ausprägung unterdrückt werden. Im Gegenteil, in der Linie L-1236 war ein Anstieg der Notch1-Expression zu beobachten. Eine globale B-Zellsignatur konnte durch die Reexpression von EBF1 nicht wieder hergestellt werden, wie Analysen über Genchips gezeigt haben. Der in der Literatur beschriebene Einfluss von EBF1 auf DNA-Methylierungen in nicht malignen Zellen konnte für einzelne untersuchte CpGs in den Promotoren von CD19, CD79B und PAX5 α bestätigt werden. Ein Nachweis eines negativen Einflusses der EBF1-Reexpression auf die allgemeine Fitness der Zellen konnte für die Linie L-1236 erbracht werden. Eine Mutationsanalyse der EBF1 cDNA in den HL-Linien L-1236, L-428, KM-H2, HDLM-2, U-HO1 und SUP-HD1 detektiert eine Protein-verkürzende Mutation in einem der KM-H2-Allele. Mutationen in EBF1 sind somit vermutlich nicht der Grund für fehlendes EBF1-Protein.

Die Daten zeigen, dass EBF1 in der Lage ist die B-Zellsignatur teilweise wieder herzustellen. Es beeinflusst das DNA-Methylierungsmuster geringfügig und kann in der Linie L-1236 die Fitness der Zellen reduzieren. EBF1 trägt somit zum Verlust des B-Zellphänotyps bei. Weitere funktionelle Analysen, die andere B-Zelltranskriptionsfaktoren und reprimierende Faktoren anderer Linien umfassen, können diesen gewonnenen Einblick noch vertiefen.

6. Literaturverzeichnis

- Acharya, M., Borland, G., Edkins, A.L., Maclellan, L.M., Matheson, J., Ozanne, B.W. und Cushley, W. (2010) CD23/FcepsilonRII: molecular multi-tasking. *Clin Exp Immunol*, 162, 12-23.
- Aiello, A., Delia, D., Fontanella, E., Giardini, R., Rilke, F. und Della Porta, G. (1990) Expression of differentiation and adhesion molecules in sporadic Burkitt's lymphoma. *Hematol Oncol*, 8, 229-238.
- Akerblad, P., Lind, U., Liberg, D., Bamberg, K. und Sigvardsson, M. (2002) Early B-cell factor (O/E-1) is a promoter of adipogenesis and involved in control of genes important for terminal adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 22, 8015-8025.
- Akerblad, P., Rosberg, M., Leanderson, T. und Sigvardsson, M. (1999) The B29 (immunoglobulin beta-chain) gene is a genetic target for early B-cell factor. *Mol Cell Biol*, 19, 392-401.
- Aleman, B.M., van den Belt-Dusebout, A.W., Klokmann, W.J., Van't Veer, M.B., Bartelink, H. und van Leeuwen, F.E. (2003) Long-term cause-specific mortality of patients treated for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*, 21, 3431-3439.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein, D., Brown, P.O. und Staudt, L.M. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403, 503-511.
- Allen, C.D., Okada, T., Tang, H.L. und Cyster, J.G. (2007) Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science*, 315, 528-531.
- Ammerpohl, O., Haake, A., Pellissery, S., Giefing, M., Richter, J., Balint, B., Kulis, M., Le, J., Bibikova, M., Drexler, H.G., Seifert, M., Shaknovic, R., Korn, B., Küppers, R., Martin-Subero, J.I. und Siebert, R. (2012) Array-based DNA methylation analysis in classical Hodgkin lymphoma reveals new insights into the mechanisms underlying silencing of B cell-specific genes. *Leukemia*, 26, 185-188.
- Angel, C.A., Warford, A., Campbell, A.C., Pringle, J.H. und Lauder, I. (1987) The immunohistology of Hodgkin's disease--Reed-Sternberg cells and their variants. *J Pathol*, 153, 21-30.
- Arseneau, J.R., Laflamme, M., Lewis, S.M., Maicas, E. und Ouellette, R.J. (2009) Multiple isoforms of PAX5 are expressed in both lymphomas and normal B-cells. *Br J Haematol*, 147, 328-338.
- Atayar, C., Poppema, S., Blokzijl, T., Harms, G., Boot, M. und van den Berg, A. (2005) Expression of the T-cell transcription factors, GATA-3 and T-bet, in the neoplastic cells of Hodgkin lymphomas. *Am J Pathol*, 166, 127-134.
- Bahler, D.W. und Levy, R. (1992) Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 6770-6774.
- Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M. und et al. (1994) E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell*, 79, 885-892.
- Bargou, R.C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M.Y., Arnold, W., Royer, H.D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C. und Dorken, B. (1997) Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*, 100, 2961-2969.
- Baus, D. und Pfitzner, E. (2006) Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *Int J Cancer*, 118, 1404-1413.
- Bechtel, D., Kurth, J., Unkel, C. und Küppers, R. (2005) Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood*, 106, 4345-4350.
- Becker-Herman, S., Lantner, F. und Shachar, I. (2002) Id2 negatively regulates B cell differentiation in the spleen. *J Immunol*, 168, 5507-5513.
- Bende, R.J., Smit, L.A. und van Noesel, C.J. (2007) Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*, 21, 18-29.
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J.M., Delano, D., Zhang, L., Schroth, G.P., Gunderson, K.L., Fan, J.B. und Shen, R. (2011) High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98, 288-295.
- Bibikova, M., Le, J., Barnes, B., Saedinia-Melnyk, S., Zhou, L., Shen, R. und Gunderson, K.L. (2009) Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium((R)) assay. *Epigenomics*, 1, 177-200.

- Blackwell, T.K. und Alt, F.W. (1989) Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals. *Annu Rev Genet*, 23, 605-636.
- Bräuninger, A., Hansmann, M.L., Strickler, J.G., Dummer, R., Burg, G., Rajewsky, K. und Küppers, R. (1999) Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 340, 1239-1247.
- Bräuninger, A., Schmitz, R., Bechtel, D., Renne, C., Hansmann, M.L. und Küppers, R. (2006) Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*, 118, 1853-1861.
- Brouns, G.S., de Vries, E. und Borst, J. (1995) Assembly and intracellular transport of the human B cell antigen receptor complex. *Int Immunol*, 7, 359-368.
- Brune, V., Tiacci, E., Pfeil, I., Döring, C., Eckerle, S., van Noesel, C.J., Klapper, W., Falini, B., von Heydebreck, A., Metzler, D., Bräuninger, A., Hansmann, M.L. und Küppers, R. (2008) Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J Exp Med*, 205, 2251-2268.
- Busslinger, M., Klix, N., Pfeffer, P., Graninger, P.G. und Kozmik, Z. (1996) Deregulation of PAX-5 by translocation of the Emu enhancer of the IgH locus adjacent to two alternative PAX-5 promoters in a diffuse large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6129-6134.
- Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F. und Hay, R.T. (1999) Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene*, 18, 3063-3070.
- Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J. und Longnecker, R. (1998) Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*, 9, 405-411.
- Caradec, J., Sirab, N., Keumeugni, C., Moutereau, S., Chimingqi, M., Matar, C., Revaud, D., Bah, M., Manivet, P., Conti, M. und Loric, S. (2010) 'Desperate house genes': the dramatic example of hypoxia. *Br J Cancer*, 102, 1037-1043.
- Carbone, A., Ghoghini, A., Gruss, H.J. und Pinto, A. (1995a) CD40 antigen expression on Reed-Sternberg cells. A reliable diagnostic tool for Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, 146, 780-781.
- Carbone, A., Ghoghini, A., Gruss, H.J. und Pinto, A. (1995b) CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, 147, 912-922.
- Cattaruzza, L., Ghoghini, A., Olivo, K., Di Francia, R., Lorenzon, D., De Filippi, R., Carbone, A., Colombatti, A., Pinto, A. und Aldinucci, D. (2009) Functional coexpression of Interleukin (IL)-7 and its receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg cells: Involvement of IL-7 in tumor cell growth and microenvironmental interactions of Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*, 125, 1092-1101.
- Chapman, C.J., Mockridge, C.I., Rowe, M., Rickinson, A.B. und Stevenson, F.K. (1995) Analysis of VH genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intraclonal heterogeneity. *Blood*, 85, 2176-2181.
- Cleary, M.L. und Sklar, J. (1985) Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 7439-7443.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A. und Busslinger, M. (2007) Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol*, 8, 463-470.
- Cook, G.P. und Tomlinson, I.M. (1995) The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today*, 16, 237-242.
- Daburon, V., Mella, S., Plouhinec, J.L., Mazan, S., Crozatier, M. und Vincent, A. (2008) The metazoan history of the COE transcription factors. Selection of a variant HLH motif by mandatory inclusion of a duplicated exon in vertebrates. *BMC Evol Biol*, 8, 131.
- Decker, T., Pasca di Magliano, M., McManus, S., Sun, Q., Bonifer, C., Tagoh, H. und Busslinger, M. (2009) Stepwise activation of enhancer and promoter regions of the B cell commitment gene Pax5 in early lymphopoiesis. *Immunity*, 30, 508-520.
- DeKoter, R.P. und Singh, H. (2000) Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*, 288, 1439-1441.
- Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T. und Busslinger, M. (2006) Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity*, 24, 269-281.
- Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., Allman, D. und Staudt, L.M. (1997) Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science*, 276, 589-592.
- Dias, S., Mansson, R., Gurbuxani, S., Sigvardsson, M. und Kee, B.L. (2008) E2A proteins promote development of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Immunity*, 29, 217-227.

- Dias, S., Silva, H., Jr., Cumano, A. und Vieira, P. (2005) Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med*, 201, 971-979.
- Diehl, V., Klimm, B. und Re, D. (2005) Hodgkin lymphoma: a curable disease: what comes next? *Eur J Haematol Suppl*, 6-13.
- Doerr, J.R., Malone, C.S., Fike, F.M., Gordon, M.S., Soghomonian, S.V., Thomas, R.K., Tao, Q., Murray, P.G., Diehl, V., Teitell, M.A. und Wall, R. (2005) Patterned CpG methylation of silenced B cell gene promoters in classical Hodgkin lymphoma-derived and primary effusion lymphoma cell lines. *J Mol Biol*, 350, 631-640.
- Döring, C. (2009) Präprozessierungs-Algorithmen für Affymetrix Microarrays. Dissertation im Fachbereich Informatik und Mathematik der Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Drexler, H.G., Gaedicke, G., Lok, M.S., Diehl, V. und Minowada, J. (1986) Hodgkin's disease derived cell lines HDLM-2 and L-428: comparison of morphology, immunological and isoenzyme profiles. *Leuk Res*, 10, 487-500.
- Eickernjäger, M. (2010) Die Charakterisierung der Rolle B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktoren und des ID2 in der Dedifferenzierung und Pathogenese der Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen im klassischen Hodgkin Lymphom. Dissertation im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H.D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H. und Dorken, B. (1999) Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood*, 94, 3129-3134.
- Fields, S., Ternyak, K., Gao, H., Ostraat, R., Akerlund, J. und Hagman, J. (2008) The 'zinc knuckle' motif of Early B cell Factor is required for transcriptional activation of B cell-specific genes. *Mol Immunol*, 45, 3786-3796.
- Fisher, R.I. (2003) Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment. *Semin Oncol*, 30, 3-9.
- Fiumara, P., Snell, V., Li, Y., Mukhopadhyay, A., Younes, M., Gillenwater, A.M., Cabanillas, F., Aggarwal, B.B. und Younes, A. (2001) Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood*, 98, 2784-2790.
- Foss, H.D., Hummel, M., Gottstein, S., Ziemann, K., Falini, B., Herbst, H. und Stein, H. (1995) Frequent expression of IL-7 gene transcripts in tumor cells of classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, 146, 33-39.
- Foss, H.D., Reusch, R., Demel, G., Lenz, G., Anagnostopoulos, I., Hummel, M. und Stein, H. (1999) Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood*, 94, 3108-3113.
- Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirose, S., Taniguchi, M., Miyasaka, N. und Tokuhisa, T. (1997) Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med*, 186, 439-448.
- Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J.Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E.W., Magrath, I.T., Knowles, D.M. und Dalla-Favera, R. (1991) p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5413-5417.
- Gao, H., Lukin, K., Ramirez, J., Fields, S., Lopez, D. und Hagman, J. (2009) Opposing effects of SWI/SNF and Mi-2/NuRD chromatin remodeling complexes on epigenetic reprogramming by EBF and Pax5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 11258-11263.
- Gellert, M. (2002) V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem*, 71, 101-132.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y. und Zhang, J. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, 5, R80.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. und Hammerschmidt, W. (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J*, 16, 6131-6140.
- Gisler, R., Akerblad, P. und Sigvardsson, M. (1999) A human early B-cell factor-like protein participates in the regulation of the human CD19 promoter. *Mol Immunol*, 36, 1067-1077.
- Gisler, R., Jacobsen, S.E. und Sigvardsson, M. (2000) Cloning of human early B-cell factor and identification of target genes suggest a conserved role in B-cell development in man and mouse. *Blood*, 96, 1457-1464.

- Glare, E.M., Divjak, M., Bailey, M.J. und Walters, E.H. (2002) beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*, 57, 765-770.
- Goossens, T., Klein, U. und Küppers, R. (1998) 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, 2463-2468.
- Gordon, M.S., Kanegai, C.M., Doerr, J.R. und Wall, R. (2003) Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Igbeta, CD79b) and mb1 (Igalpha, CD79a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4126-4131.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. und Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- Greiner, A., Tobollik, S., Buettner, M., Jungnickel, B., Herrmann, K., Kremmer, E. und Niedobitek, G. (2005) Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J Pathol*, 205, 541-547.
- Gruss, H.J., Brach, M.A., Drexler, H.G., Bonifer, R., Mertelsmann, R.H. und Herrmann, F. (1992) Expression of cytokine genes, cytokine receptor genes, and transcription factors in cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Res*, 52, 3353-3360.
- Hagman, J., Gutch, M.J., Lin, H. und Grosschedl, R. (1995) EBF contains a novel zinc coordination motif and multiple dimerization and transcriptional activation domains. *Embo J*, 14, 2907-2916.
- Hagman, J., Travis, A. und Grosschedl, R. (1991) A novel lineage-specific nuclear factor regulates mb-1 gene transcription at the early stages of B cell differentiation. *Embo J*, 10, 3409-3417.
- Hancock, S.L. und Hoppe, R.T. (1996) Long-Term Complications of Treatment and Causes of Mortality After Hodgkin's Disease. *Semin Radiat Oncol*, 6, 225-242.
- Henry-Amar, M. und Somers, R. (1990) Survival outcome after Hodgkin's disease: a report from the international data base on Hodgkin's disease. *Semin Oncol*, 17, 758-768.
- Hertel, C.B., Zhou, X.G., Hamilton-Dutoit, S.J. und Junker, S. (2002) Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene*, 21, 4908-4920.
- Hess, J., Nielsen, P.J., Fischer, K.D., Bujard, H. und Wirth, T. (2001) The B lymphocyte-specific coactivator BOB.1/OBF.1 is required at multiple stages of B-cell development. *Mol Cell Biol*, 21, 1531-1539.
- Hieter, P.A., Maizel, J.V., Jr. und Leder, P. (1982) Evolution of human immunoglobulin kappa J region genes. *J Biol Chem*, 257, 1516-1522.
- Hirokawa, S., Sato, H., Kato, I. und Kudo, A. (2003) EBF-regulating Pax5 transcription is enhanced by STAT5 in the early stage of B cells. *Eur J Immunol*, 33, 1824-1829.
- Hochberg, Y. und Benjamini, Y. (1990) More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med*, 9, 811-818.
- HogerCorp, C.M. und Borrebaeck, C.A. (2006) The human CD77- B cell population represents a heterogeneous subset of cells comprising centroblasts, centrocytes, and plasmablasts, prompting phenotypical revision. *J Immunol*, 177, 4341-4349.
- Holden, P. und Horton, W.A. (2009) Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines. *BMC Res Notes*, 2, 243.
- Holmes, M.L., Pridans, C. und Nutt, S.L. (2008) The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5. *Immunol Cell Biol*, 86, 47-53.
- Horie, R., Watanabe, T., Morishita, Y., Ito, K., Ishida, T., Kanegae, Y., Saito, I., Higashihara, M., Mori, S. und Kadin, M.E. (2002) Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene*, 21, 2493-2503.
- Hsu, S.M., Tseng, C.K. und Hsu, P.L. (1990) Expression of p55 (Tac) interleukin-2 receptor (IL-2R), but not p75 IL-2R, in cultured H-RS cells and H-RS cells in tissues. *Am J Pathol*, 136, 735-744.
- Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T.F., Bernd, H.W., Cogliatti, S.B., Dierlamm, J., Feller, A.C., Hansmann, M.L., Haralambieva, E., Harder, L., Hasenclever, D., Kuhn, M., Lenze, D., Lichter, P., Martin-Subero, J.I., Moller, P., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Parwaresch, R.M., Pott, C., Rosenwald, A., Rosolowski, M., Schwaenen, C., Sturzenhofecker, B., Szczepanowski, M., Trautmann, H., Wacker, H.H., Spang, R., Loeffler, M., Trumper, L., Stein, H. und Siebert, R. (2006) A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*, 354, 2419-2430.
- Iqbal, J., Greiner, T.C., Patel, K., Dave, B.J., Smith, L., Ji, J., Wright, G., Sanger, W.G., Pickering, D.L., Jain, S., Horsman, D.E., Shen, Y., Fu, K., Weisenburger, D.D., Hans, C.P., Campo, E., Gascoyne, R.D., Rosenwald, A., Jaffe, E.S., Delabie, J., Rimsza, L., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Connors, J.M., Vose, J.M., McKeithan, T., Staudt, L.M. und Chan, W.C. (2007)

- Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 21, 2332-2343.
- Irsch, J., Nitsch, S., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., Tesch, H., Diehl, V., Jox, A., Küppers, R. und Radbruch, A. (1998) Isolation of viable Hodgkin and Reed-Sternberg cells from Hodgkin disease tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10117-10122.
- Ito, C.Y., Adey, N., Bantch, V.L. und Baldwin, A.S., Jr. (1995) Structure and evolution of the human IKBA gene. *Genomics*, 29, 490-495.
- Jarrett, R.F., Armstrong, A., Wilkins, B.S. und Jones, D.B. (1991) Immunohistochemical determination of CD23 expression in Hodgkin's disease using paraffin sections. *J Pathol*, 164, 345-346.
- Joos, S., Granzow, M., Holtgreve-Grez, H., Siebert, R., Harder, L., Martin-Subero, J.I., Wolf, J., Adamowicz, M., Barth, T.F., Lichter, P. und Jauch, A. (2003) Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer*, 103, 489-495.
- Joos, S., Kupper, M., Ohl, S., von Bonin, F., Mechttersheimer, G., Bentz, M., Marynen, P., Moller, P., Pfreundschuh, M., Trumper, L. und Lichter, P. (2000) Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res*, 60, 549-552.
- Joos, S., Menz, C.K., Wrobel, G., Siebert, R., Gesk, S., Ohl, S., Mechttersheimer, G., Trumper, L., Moller, P., Lichter, P. und Barth, T.F. (2002) Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood*, 99, 1381-1387.
- Joos, S., Otano-Joos, M.I., Ziegler, S., Bruderlein, S., du Manoir, S., Bentz, M., Moller, P. und Lichter, P. (1996) Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood*, 87, 1571-1578.
- Jundt, F., Acikgoz, O., Kwon, S.H., Schwarzer, R., Anagnostopoulos, I., Wiesner, B., Mathas, S., Hummel, M., Stein, H., Reichardt, H.M. und Dorken, B. (2008) Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, 22, 1587-1594.
- Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Mathas, S., Stein, H. und Dorken, B. (2002a) Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 99, 3398-3403.
- Jundt, F., Kley, K., Anagnostopoulos, I., Schulze Probsting, K., Greiner, A., Mathas, S., Scheiderei, C., Wirth, T., Stein, H. und Dorken, B. (2002b) Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood*, 99, 3060-3062.
- Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Bräuninger, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K. und Küppers, R. (2000) Clonal deleterious mutations in the I kappa B alpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med*, 191, 395-402.
- Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B.S., Lew, A.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M. und Nutt, S.L. (2007) Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity*, 26, 555-566.
- Kamesaki, H., Fukuhara, S., Tatsumi, E., Uchino, H., Yamabe, H., Miwa, H., Shirakawa, S., Hatanaka, M. und Honjo, T. (1986) Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood*, 68, 285-292.
- Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M.L. und Rajewsky, K. (1996) Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*, 184, 1495-1505.
- Kapp, U., Yeh, W.C., Patterson, B., Elia, A.J., Kagi, D., Ho, A., Hessel, A., Tipword, M., Williams, A., Mirtsos, C., Itie, A., Moyle, M. und Mak, T.W. (1999) Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med*, 189, 1939-1946.
- Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y., Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, S., Ishikawa, Y., Okamoto, K., Tobinai, K., Nakagama, H., Nakahata, T., Yoshino, T., Kobayashi, Y. und Ogawa, S. (2009) Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*, 459, 712-716.
- Kawasaki, K., Minoshima, S., Nakato, E., Shibuya, K., Shintani, A., Schmeits, J.L., Wang, J. und Shimizu, N. (1997) One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res*, 7, 250-261.
- Kee, B.L. (2009) E and ID proteins branch out. *Nat Rev Immunol*, 9, 175-184.
- Kepler, T.B. und Perelson, A.S. (1993) Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunol Today*, 14, 412-415.

- Kikuchi, K., Lai, A.Y., Hsu, C.L. und Kondo, M. (2005) IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J Exp Med*, 201, 1197-1203.
- Kim, U., Qin, X.F., Gong, S., Stevens, S., Luo, Y., Nussenzweig, M. und Roeder, R.G. (1996) The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature*, 383, 542-547.
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K. und Dalla-Favera, R. (2006) Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol*, 7, 773-782.
- Klein, U., Klein, G., Ehlin-Henriksson, B., Rajewsky, K. und Küppers, R. (1995) Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Mol Med*, 1, 495-505.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A. und Dalla-Favera, R. (2003a) Gene expression dynamics during germinal center transit in B cells. *Ann N Y Acad Sci*, 987, 166-172.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A. und Dalla-Favera, R. (2003b) Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2639-2644.
- Krenacs, L., Himmelmann, A.W., Quintanilla-Martinez, L., Fest, T., Riva, A., Wellmann, A., Bagdi, E., Kehrl, J.H., Jaffe, E.S. und Raffeld, M. (1998) Transcription factor B-cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas. *Blood*, 92, 1308-1316.
- Kube, D., Holtick, U., Vockerodt, M., Ahmadi, T., Haier, B., Behrmann, I., Heinrich, P.C., Diehl, V. und Tesch, H. (2001) STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*, 98, 762-770.
- Kuo, T.C., Shaffer, A.L., Haddad, J., Jr., Choi, Y.S., Staudt, L.M. und Calame, K. (2007) Repression of BCL-6 is required for the formation of human memory B cells in vitro. *J Exp Med*, 204, 819-830.
- Küppers, R. (2005) Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 5, 251-262.
- Küppers, R. (2011) Biology of Hodgkin's lymphoma. *Hematology Education: the education programme for the annual congress of the European Hematology Association*.
- Küppers, R. und Dalla-Favera, R. (2001) Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*, 20, 5580-5594.
- Küppers, R., Hansmann, M.L. und Rajewsky, K. (1998) Clonality and germinal centre B-cell derivation of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Ann Oncol*, 9 Suppl 5, S17-20.
- Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L. und Rajewsky, K. (1999) Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, 341, 1520-1529.
- Küppers, R., Klein, U., Schwering, I., Distler, V., Bräuningner, A., Cattoretti, G., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Califano, A., Hansmann, M.L. und Dalla-Favera, R. (2003) Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest*, 111, 529-537.
- Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R. und Hansmann, M.L. (1994) Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 10962-10966.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M.L. und Rajewsky, K. (1993) Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J*, 12, 4955-4967.
- Kutok, J.L. und Wang, F. (2006) Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol*, 1, 375-404.
- Kwon, K., Hutter, C., Sun, Q., Bilic, I., Cobaleda, C., Malin, S. und Busslinger, M. (2008) Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity*, 28, 751-762.
- Lake, A., Shield, L.A., Cordano, P., Chui, D.T., Osborne, J., Crae, S., Wilson, K.S., Tosi, S., Knight, S.J., Gesk, S., Siebert, R., Hay, R.T. und Jarrett, R.F. (2009) Mutations of NFKB1A, encoding I kappa B alpha, are a recurrent finding in classical Hodgkin lymphoma but are not a unifying feature of non-EBV-associated cases. *Int J Cancer*, 125, 1334-1342.
- Lam, K.P., Kuhn, R. und Rajewsky, K. (1997) In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*, 90, 1073-1083.
- Lamprecht, B., Kreher, S., Anagnostopoulos, I., Johrens, K., Monteleone, G., Jundt, F., Stein, H., Janz, M., Dorken, B. und Mathas, S. (2008) Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. *Blood*, 112, 3339-3347.

- Leduc, I. und Cogne, M. (1996) Regulatory elements of the mb-1 gene encoding the Ig-alpha component of the human B-cell antigen receptor. *Mol Immunol*, 33, 1277-1286.
- Levy-Nissenbaum, O., Sagi-Assif, O., Kapon, D., Hantisteanu, S., Burg, T., Raanani, P., Avigdor, A., Ben-Bassat, I. und Witz, I.P. (2003) Dual-specificity phosphatase Pyst2-L is constitutively highly expressed in myeloid leukemia and other malignant cells. *Oncogene*, 22, 7649-7660.
- Li, L.C. und Dahiya, R. (2002) MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18, 1427-1431.
- Lin, H. und Grosschedl, R. (1995) Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature*, 376, 263-267.
- Lin, Y.C., Jhunjhunwala, S., Benner, C., Heinz, S., Welinder, E., Mansson, R., Sigvardsson, M., Hagman, J., Espinoza, C.A., Dutkowski, J., Ideker, T., Glass, C.K. und Murre, C. (2010) A global network of transcription factors, involving E2A, EBF1 and Foxo1, that orchestrates B cell fate. *Nat Immunol*, 11, 635-643.
- Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H. und Schatz, D.G. (2008) Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature*, 451, 841-845.
- Lossos, I.S., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Chan, W.C., Brown, P.O., Botstein, D., Staudt, L.M. und Levy, R. (2000) Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10209-10213.
- Lowder, M., Unge, A., Maraha, N., Jansson, J.K., Swiggett, J. und Oliver, J.D. (2000) Effect of starvation and the viable-but-nonculturable state on green fluorescent protein (GFP) fluorescence in GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* A506. *Appl Environ Microbiol*, 66, 3160-3165.
- Lutsik, P., Feuerbach, L., Arand, J., Lengauer, T., Walter, J. und Bock, C. (2011) BiQ Analyzer HT: locus-specific analysis of DNA methylation by high-throughput bisulfite sequencing. *Nucleic Acids Res*, 39, W551-556.
- MacLennan, I.C. (1994) Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 12, 117-139.
- Mader, A., Bruderlein, S., Wegener, S., Melzner, I., Popov, S., Muller-Hermelink, H.K., Barth, T.F., Viardot, A. und Moller, P. (2007) U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. *Cytogenet Genome Res*, 119, 204-210.
- Maeda, T., Hirayama, M., Kobayashi, D., Miyazawa, K. und Tamai, I. (2007) Mechanism of the regulation of organic cation/carnitine transporter 1 (SLC22A4) by rheumatoid arthritis-associated transcriptional factor RUNX1 and inflammatory cytokines. *Drug Metab Dispos*, 35, 394-401.
- Maggio, E.M., Van Den Berg, A., Visser, L., Diepstra, A., Kluiver, J., Emmens, R. und Poppema, S. (2002) Common and differential chemokine expression patterns in rs cells of NLP, EBV positive and negative classical Hodgkin lymphomas. *Int J Cancer*, 99, 665-672.
- Maier, H., Ostraat, R., Gao, H., Fields, S., Shinton, S.A., Medina, K.L., Ikawa, T., Murre, C., Singh, H., Hardy, R.R. und Hagman, J. (2004) Early B cell factor cooperates with Runx1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription. *Nat Immunol*, 5, 1069-1077.
- Mancao, C. und Hammerschmidt, W. (2007) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood*, 110, 3715-3721.
- Mangeney, M., Richard, Y., Coulaud, D., Tursz, T. und Wiels, J. (1991) CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis. *Eur J Immunol*, 21, 1131-1140.
- Mansson, R., Tsapogas, P., Akerlund, M., Lagergren, A., Gisler, R. und Sigvardsson, M. (2004) Pearson correlation analysis of microarray data allows for the identification of genetic targets for early B-cell factor. *J Biol Chem*, 279, 17905-17913.
- Mansson, R., Zandi, S., Anderson, K., Martensson, I.L., Jacobsen, S.E., Bryder, D. und Sigvardsson, M. (2008) B-lineage commitment prior to surface expression of B220 and CD19 on hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 112, 1048-1055.
- Martin-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Sonoki, T., Tucker, P.W., Schlegelberger, B., Grote, W., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Hansmann, M.L., Dyer, M.J. und Siebert, R. (2002) Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99, 1474-1477.
- Mathas, S., Janz, M., Hummel, F., Hummel, M., Wollert-Wulf, B., Lusatis, S., Anagnostopoulos, I., Lietz, A., Sigvardsson, M., Jundt, F., Johrens, K., Bommert, K., Stein, H. und Dorken, B. (2006) Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol*, 7, 207-215.
- Mauch, P.M., Kalish, L.A., Marcus, K.C., Shulman, L.N., Krill, E., Tarbell, N.J., Silver, B., Weinstein, H., Come, S., Canellos, G.P. und Coleman, C.N. (1995) Long-term survival in Hodgkin's

- disease relative impact of mortality, second tumors, infection, and cardiovascular disease. *Cancer J Sci Am*, 1, 33-42.
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M. und Oettinger, M.A. (1995) Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*, 83, 387-395.
- Medina, K.L., Pongubala, J.M., Reddy, K.L., Lancki, D.W., Dekoter, R., Kieslinger, M., Grosschedl, R. und Singh, H. (2004) Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Dev Cell*, 7, 607-617.
- Meyer-Siegler, K., Rahman-Mansur, N., Wurzer, J.C. und Sirover, M.A. (1992) Proliferative dependent regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in human cells. *Carcinogenesis*, 13, 2127-2132.
- Miller, A. (1997) Development and Applications of Retroviral Vectors. In John M Coffin, S.H.H., and Harold E Varmus (ed.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M.J., Patterson, N., Mesirov, J.P., Golub, T.R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E.S., Hirschhorn, J.N., Altshuler, D. und Groop, L.C. (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*, 34, 267-273.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. und Honjo, T. (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102, 553-563.
- Murre, C., McCaw, P.S. und Baltimore, D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, 56, 777-783.
- Muschen, M., Rajewsky, K., Bräuninger, A., Baur, A.S., Oudejans, J.J., Roers, A., Hansmann, M.L. und Küppers, R. (2000a) Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med*, 191, 387-394.
- Muschen, M., Re, D., Jungnickel, B., Diehl, V., Rajewsky, K. und Küppers, R. (2000b) Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med*, 192, 1833-1840.
- Natkunam, Y., Hsi, E.D., Aoun, P., Zhao, S., Elson, P., Pohlman, B., Naushad, H., Bast, M., Levy, R. und Lossos, I.S. (2007) Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein identifies a subset of classic Hodgkin lymphoma of germinal center derivation and improved survival. *Blood*, 109, 298-305.
- Nera, K.P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J.M. und Lassila, O. (2006) Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity*, 24, 283-293.
- Neuberger, M.S. und Milstein, C. (1995) Somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol*, 7, 248-254.
- Ng, A.K., Bernardo, M.P., Weller, E., Backstrand, K.H., Silver, B., Marcus, K.C., Tarbell, N.J., Friedberg, J., Canellos, G.P. und Mauch, P.M. (2002) Long-term survival and competing causes of death in patients with early-stage Hodgkin's disease treated at age 50 or younger. *J Clin Oncol*, 20, 2101-2108.
- Nie, L., Xu, M., Vladimirova, A. und Sun, X.H. (2003) Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities. *Embo J*, 22, 5780-5792.
- Okazaki, I.M., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Yoshikawa, K. und Honjo, T. (2002) The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature*, 416, 340-345.
- Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C.P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S. und Kadesch, T. (1998) Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 18, 2230-2239.
- O'Riordan, M. und Grosschedl, R. (1999) Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity*, 11, 21-31.
- Oudejans, J.J., Kummer, J.A., Jiwa, M., van der Valk, P., Ossenkuppele, G.J., Kluin, P.M., Kluin-Nelemans, J.C. und Meijer, C.J. (1996) Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, 148, 233-240.
- Palmisano, W.A., Crume, K.P., Grimes, M.J., Winters, S.A., Toyota, M., Esteller, M., Joste, N., Baylin, S.B. und Belinsky, S.A. (2003) Aberrant promoter methylation of the transcription factor genes PAX5 alpha and beta in human cancers. *Cancer Res*, 63, 4620-4625.
- Pan, Z., Shen, Y., Du, C., Zhou, G., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Greiner, T.C., McKeithan, T.W. und Chan, W.C. (2003) Two newly characterized germinal center B-cell-associated genes, GCET1 and GCET2, have differential expression in normal and neoplastic B cells. *Am J Pathol*, 163, 135-144.

- Pan, Z., Shen, Y., Ge, B., Du, C., McKeithan, T. und Chan, W.C. (2007) Studies of a germinal centre B-cell expressed gene, GCET2, suggest its role as a membrane associated adapter protein. *Br J Haematol*, 137, 578-590.
- Pascual, V., Liu, Y.J., Magalski, A., de Bouteiller, O., Banchereau, J. und Capra, J.D. (1994) Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med*, 180, 329-339.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K. und Dalla-Favera, R. (1998) BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11816-11821.
- Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Langhoff, E., Matsumura, F., Yamashiro, S., Mosialos, G. und Said, J.W. (1997) Fascin, a sensitive new marker for Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Evidence for a dendritic or B cell derivation? *Am J Pathol*, 150, 543-562.
- Pongubala, J.M., Northrup, D.L., Lancki, D.W., Medina, K.L., Treiber, T., Bertolino, E., Thomas, M., Grosschedl, R., Allman, D. und Singh, H. (2008) Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nat Immunol*, 9, 203-215.
- Poppema, S. (2005) Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 231-238.
- Pridans, C., Holmes, M.L., Polli, M., Wettenhall, J.M., Dakic, A., Corcoran, L.M., Smyth, G.K. und Nutt, S.L. (2008) Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. *J Immunol*, 180, 1719-1728.
- Pulvertaft, J.V. (1964) Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet*, 1, 238-240.
- R Development Core Team. (2005) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramirez, J., Lukin, K. und Hagman, J. (2010) From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr Opin Immunol*, 22, 177-184.
- Re, D., Muschen, M., Ahmadi, T., Wickenhauser, C., Staratschek-Jox, A., Holtick, U., Diehl, V. und Wolf, J. (2001) Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res*, 61, 2080-2084.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallesse, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F. und Glimcher, L.H. (2001) Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 412, 300-307.
- Renne, C., Martin-Subero, J.I., Eickernjager, M., Hansmann, M.L., Küppers, R., Siebert, R. und Bräuninger, A. (2006) Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*, 169, 655-664.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeuze, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A. und Durandy, A. (2000) Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*, 102, 565-575.
- Roberts, E.C., Deed, R.W., Inoue, T., Norton, J.D. und Sharrocks, A.D. (2001) Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding. *Mol Cell Biol*, 21, 524-533.
- Roessler, S., Gyory, I., Imhof, S., Spivakov, M., Williams, R.R., Busslinger, M., Fisher, A.G. und Grosschedl, R. (2007) Distinct promoters mediate the regulation of Ebf1 gene expression by interleukin-7 and Pax5. *Mol Cell Biol*, 27, 579-594.
- Rogozin, I.B. und Kolchanov, N.A. (1992) Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1171, 11-18.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltneane, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Powell, J., Duffey, P.L., Longo, D.L., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Grogan, T.M., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T. und Staudt, L.M. (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346, 1937-1947.
- Rosenwald, A., Wright, G., Leroy, K., Yu, X., Gaulard, P., Gascoyne, R.D., Chan, W.C., Zhao, T., Haioun, C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Smeland, E.B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Campo, E., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Connors, J.M., Braziel, R., Grogan, T.M., Fisher, R.I., Miller, T.P., LeBlanc, M., Chiorazzi, M., Zhao, H., Yang, L., Powell, J., Wilson, W.H., Jaffe,

- E.S., Simon, R., Klausner, R.D. und Staudt, L.M. (2003) 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, 851-862.
- Rowlands, D.C., Hansel, T.T. und Crocker, J. (1990) Immunohistochemical determination of CD23 expression in Hodgkin's disease using paraffin sections. *J Pathol*, 160, 239-243.
- Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L. und Dalla-Favera, R. (2007) A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell*, 12, 280-292.
- Salama, M.E., Rajan Mariappan, M., Inamdar, K., Tripp, S.R. und Perkins, S.L. (2010) The value of CD23 expression as an additional marker in distinguishing mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma from Hodgkin lymphoma. *Int J Surg Pathol*, 18, 121-128.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-5467.
- Savage, K.J., Monti, S., Kutok, J.L., Cattoretti, G., Neuberger, D., De Leval, L., Kurtin, P., Dal Cin, P., Ladd, C., Feuerhake, F., Aguiar, R.C., Li, S., Salles, G., Berger, F., Jing, W., Pinkus, G.S., Habermann, T., Dalla-Favera, R., Harris, N.L., Aster, J.C., Golub, T.R. und Shipp, M.A. (2003) 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, 3871-3879.
- Schaadt, M., Fonatsch, C., Kirchner, H. und Diehl, V. (1979) Establishment of a malignant, Epstein-Barr-virus (EBV)-negative cell-line from the pleura effusion of a patient with Hodgkin's disease. *Blut*, 38, 185-190.
- Schable, K.F. und Zachau, H.G. (1993) The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 374, 1001-1022.
- Schaniel, C., Pardali, E., Sallusto, F., Speletas, M., Ruedl, C., Shimizu, T., Seidl, T., Andersson, J., Melchers, F., Rolink, A.G. und Sideras, P. (1998) Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. *J Exp Med*, 188, 451-463.
- Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G.A. und Busslinger, M. (2007) Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity*, 27, 49-63.
- Schebesta, M., Heavey, B. und Busslinger, M. (2002) Transcriptional control of B-cell development. *Curr Opin Immunol*, 14, 216-223.
- Scheeren, F.A., Diehl, S.A., Smit, L.A., Beaumont, T., Naspetti, M., Bende, R.J., Blom, B., Karube, K., Ohshima, K., van Noesel, C.J. und Spits, H. (2008) IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood*, 111, 4706-4715.
- Scheeren, F.A., Naspetti, M., Diehl, S., Schotte, R., Nagasawa, M., Wijnands, E., Gimeno, R., Vyth-Dreese, F.A., Blom, B. und Spits, H. (2005) STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nat Immunol*, 6, 303-313.
- Scheidereit, C., Heguy, A. und Roeder, R.G. (1987) Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer-binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter in vitro. *Cell*, 51, 783-793.
- Schmitz, R., Hansmann, M.L., Bohle, V., Martin-Subero, J.I., Hartmann, S., Mechttersheimer, G., Klapper, W., Vater, I., Giefing, M., Gesk, S., Stanelle, J., Siebert, R. und Kuppers, R. (2009a) TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med*, 206, 981-989.
- Schmitz, R., Hansmann, M.L., Bohle, V., Martin-Subero, J.I., Hartmann, S., Mechttersheimer, G., Klapper, W., Vater, I., Giefing, M., Gesk, S., Stanelle, J., Siebert, R. und Küppers, R. (2009b) TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med*, 206, 981-989.
- Schubart, D.B., Rolink, A., Kosco-Vilbois, M.H., Botteri, F. und Matthias, P. (1996) B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature*, 383, 538-542.
- Schwarzer, R., Dorken, B. und Jundt, F. (2011) Notch is an essential upstream regulator of NF-kappaB and is relevant for survival of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Leukemia*, Early Online.
- Schwering, I., Bräuninger, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M.L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K. und Küppers, R. (2003) Loss of the B-lineage-specific gene

- expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 101, 1505-1512.
- Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M. und Singh, H. (2006) Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity*, 25, 225-236.
- Seet, C.S., Brumbaugh, R.L. und Kee, B.L. (2004) Early B cell factor promotes B lymphopoiesis with reduced interleukin 7 responsiveness in the absence of E2A. *J Exp Med*, 199, 1689-1700.
- Seitz, V., Hummel, M., Marafioti, T., Anagnostopoulos, I., Assaf, C. und Stein, H. (2000) Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood*, 95, 3020-3024.
- Seitz, V., Thomas, P.E., Zimmermann, K., Paul, U., Ehlers, A., Joosten, M., Dimitrova, L., Lenze, D., Sommerfeld, A., Oker, E., Leser, U., Stein, H. und Hummel, M. (2011) Classical Hodgkin's lymphoma shows epigenetic features of abortive plasma cell differentiation. *Haematologica*, 96, 863-870.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K. und Staudt, L.M. (2002) Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*, 17, 51-62.
- Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P. und Staudt, L.M. (2000) BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*, 13, 199-212.
- Shah, P.C., Bertolino, E. und Singh, H. (1997) Using altered specificity Oct-1 and Oct-2 mutants to analyze the regulation of immunoglobulin gene transcription. *Embo J*, 16, 7105-7117.
- Shen, H.M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X. und Storb, U. (1998) Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science*, 280, 1750-1752.
- Silva, J.M., Li, M.Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M.C., Rickles, R.J., Siolas, D., Hu, G., Paddison, P.J., Schlabach, M.R., Sheth, N., Bradshaw, J., Burchard, J., Kulkarni, A., Cavet, G., Sachidanandam, R., McCombie, W.R., Cleary, M.A., Elledge, S.J. und Hannon, G.J. (2005) Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet*, 37, 1281-1288.
- Siponen, M.I., Wisniewska, M., Lehtio, L., Johansson, I., Svensson, L., Raszewski, G., Nilsson, L., Sigvardsson, M. und Berglund, H. (2010) Structural determination of functional domains in early B-cell factor (EBF) family of transcription factors reveals similarities to Rel DNA-binding proteins and a novel dimerization motif. *J Biol Chem*, 285, 25875-25879.
- Skinnider, B.F., Elia, A.J., Gascoyne, R.D., Patterson, B., Trumper, L., Kapp, U. und Mak, T.W. (2002) Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99, 618-626.
- Smith, E.M., Akerblad, P., Kadesch, T., Axelson, H. und Sigvardsson, M. (2005) Inhibition of EBF function by active Notch signaling reveals a novel regulatory pathway in early B-cell development. *Blood*, 106, 1995-2001.
- Smith, E.M., Gisler, R. und Sigvardsson, M. (2002) Cloning and characterization of a promoter flanking the early B cell factor (EBF) gene indicates roles for E-proteins and autoregulation in the control of EBF expression. *J Immunol*, 169, 261-270.
- Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M. und Busslinger, M. (2002) Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity*, 17, 781-793.
- Spooner, C.J., Cheng, J.X., Pujadas, E., Laslo, P. und Singh, H. (2009) A recurrent network involving the transcription factors PU.1 and Gfi1 orchestrates innate and adaptive immune cell fates. *Immunity*, 31, 576-586.
- Staudt, L.M. und Dave, S. (2005) The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol*, 87, 163-208.
- Steidl, C., Telenius, A., Shah, S.P., Farinha, P., Barclay, L., Boyle, M., Connors, J.M., Horsman, D.E. und Gascoyne, R.D. (2010) Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood*, 116, 418-427.
- Stein, H., Marafioti, T., Foss, H.D., Laumen, H., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Wirth, T., Demel, G. und Falini, B. (2001) Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*, 97, 496-501.
- Stevenson, F., Sahota, S., Zhu, D., Ottensmeier, C., Chapman, C., Oscier, D. und Hamblin, T. (1998) Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev*, 162, 247-259.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. und Mesirov, J.P. (2005) Gene set enrichment

- analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15545-15550.
- Sukumar, S., Conrad, D.H., Szakal, A.K. und Tew, J.G. (2006) Differential T cell-mediated regulation of CD23 (Fc epsilonRII) in B cells and follicular dendritic cells. *J Immunol*, 176, 4811-4817.
- Suzuki, K., Okuno, T., Yamamoto, M., Pasterkamp, R.J., Takegahara, N., Takamatsu, H., Kitao, T., Takagi, J., Rennert, P.D., Kolodkin, A.L., Kumanogoh, A. und Kikutani, H. (2007) Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature*, 446, 680-684.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. IARC Press.
- Thal, M.A., Carvalho, T.L., He, T., Kim, H.G., Gao, H., Hagman, J. und Klug, C.A. (2009) Ebf1-mediated down-regulation of Id2 and Id3 is essential for specification of the B cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 552-557.
- Thompson, A.A., Wood, W.J., Jr., Gilly, M.J., Damore, M.A., Omori, S.A. und Wall, R. (1996) The promoter and 5' flanking sequences controlling human B29 gene expression. *Blood*, 87, 666-673.
- Torlakovic, E., Tierens, A., Dang, H.D. und Delabie, J. (2001) The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, 159, 1807-1814.
- Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y. und Tokuhisa, T. (2002) Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity*, 17, 329-339.
- Travis, A., Hagman, J., Hwang, L. und Grosschedl, R. (1993) Purification of early-B-cell factor and characterization of its DNA-binding specificity. *Mol Cell Biol*, 13, 3392-3400.
- Treiber, N., Treiber, T., Zocher, G. und Grosschedl, R. (2010a) Structure of an Ebf1:DNA complex reveals unusual DNA recognition and structural homology with Rel proteins. *Genes Dev*, 24, 2270-2275.
- Treiber, T., Mandel, E.M., Pott, S., Gyory, I., Firner, S., Liu, E.T. und Grosschedl, R. (2010b) Early B cell factor 1 regulates B cell gene networks by activation, repression, and transcription-independent poisoning of chromatin. *Immunity*, 32, 714-725.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. und Croce, C.M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228, 1440-1443.
- Turner, C.A., Jr., Mack, D.H. und Davis, M.M. (1994) Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell*, 77, 297-306.
- Urbanek, P., Wang, Z.Q., Fetka, I., Wagner, E.F. und Busslinger, M. (1994) Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell*, 79, 901-912.
- Ushmorov, A., Leithauser, F., Sakk, O., Weinhausel, A., Popov, S.W., Moller, P. und Wirth, T. (2006) Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 107, 2493-2500.
- van den Berg, A., Visser, L. und Poppema, S. (1999) High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*, 154, 1685-1691.
- Vasicek, T.J. und Leder, P. (1990) Structure and expression of the human immunoglobulin lambda genes. *J Exp Med*, 172, 609-620.
- Vermeer, M.H., Dukers, D.F., ten Berge, R.L., Bloemena, E., Wu, L., Vos, W., de Vries, E., Tensen, C.P., Meijer, C.J. und Willemze, R. (2002) Differential expression of thymus and activation regulated chemokine and its receptor CCR4 in nodal and cutaneous anaplastic large-cell lymphomas and Hodgkin's disease. *Mod Pathol*, 15, 838-844.
- Walter, K., Bonifer, C. und Tagoh, H. (2008) Stem cell-specific epigenetic priming and B cell-specific transcriptional activation at the mouse Cd19 locus. *Blood*, 112, 1673-1682.
- Wang, M.M. und Reed, R.R. (1993) Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature*, 364, 121-126.
- Wang, S.S., Tsai, R.Y. und Reed, R.R. (1997) The characterization of the Olf-1/EBF-like HLH transcription factor family: implications in olfactory gene regulation and neuronal development. *J Neurosci*, 17, 4149-4158.
- Watanabe, K., Yamashita, Y., Nakayama, A., Hasegawa, Y., Kojima, H., Nagasawa, T. und Mori, N. (2000) Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. *Histopathology*, 36, 353-361.

- Weiss, L.M., Warnke, R. and Hansmann, M.L., ed. (2007) Pathology of Hodgkin Lymphoma. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Weniger, M.A., Melzner, I., Menz, C.K., Wegener, S., Bucur, A.J., Dorsch, K., Mattfeldt, T., Barth, T.F. und Moller, P. (2006) Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*, 25, 2679-2684.
- Williams, S.C., Frippiat, J.P., Tomlinson, I.M., Ignatovich, O., Lefranc, M.P. und Winter, G. (1996) Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. *J Mol Biol*, 264, 220-232.
- Wolf, J., Kapp, U., Bohlen, H., Kornacker, M., Schoch, C., Stahl, B., Mucke, S., von Kalle, C., Fonatsch, C., Schaefer, H.E., Hansmann, M.L. und Diehl, V. (1996) Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood*, 87, 3418-3428.
- Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, E.H., Wiestner, A. und Staudt, L.M. (2003) A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9991-9996.
- Xu, S., Guo, K., Zeng, Q., Huo, J. und Lam, K.P. (2012) The RNase III enzyme Dicer is essential for germinal center B-cell formation. *Blood*, 119, 767-776.
- Ye, B.H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R.S., Rothman, P., Stall, A.M., Pandolfi, P.P. und Dalla-Favera, R. (1997) The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*, 16, 161-170.
- Zandi, S., Mansson, R., Tsapogas, P., Zetterblad, J., Bryder, D. und Sigvardsson, M. (2008) EBF1 is essential for B-lineage priming and establishment of a transcription factor network in common lymphoid progenitors. *J Immunol*, 181, 3364-3372.
- Zhuang, Y., Soriano, P. und Weintraub, H. (1994) The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell*, 79, 875-884.

7. Anhang

7.1 Weitere Daten zur qRT-PCR der EBF1-Zielgene (3.2.2.1)

Tabelle 17: $\Delta\Delta$ Ct-Werte der qRT-PCR der EBF1 Zielgen

Infektion	Linie	CD19			CD79B			PAX5			PAX5a			PAX5b			Notch1			ID2			Foxo1		
		3	6/7	9/10	3	6/7	9/10	3	6/7	9/10	3	6/7	9/10	3	6/7	9/10	3	6/7	9/10	3	6/7	9/10	3	6/7	9/10
1	L1236	-4,7	-3,6	-5,6	-1,8	-2,6	-3,5	-1,2	-0,8	-1,8	-0,7	-1,3	0,3	-0,5	-1,0	0,2	-3,2	-2,9	-4,2	-0,2	-1,4	0,2			
1	L1236							-0,6	-0,4	0,2	-0,6	0,0	0,5	-0,4	0,2	0,4							-0,8	0,5	0,0
2	L1236	-4,4	-2,2	-5,7	-0,8	-4,3	-6,9	-0,4	-0,4	-0,1	-1,3	0,7	0,1	-0,4	0,4	0,6	-3,1	-2,3	-2,5	-1,9	0,5	0,4			
3	L1236	-10,6	-8,3	-9,7	-1,9	-3,7	-3,3	-0,1	-0,2	1,4							-1,3	-1,2	-0,9				-0,5	-0,5	†
1	KMH2		-5,4	-5,7	4,7	-8,8	-5,8	0,8	0,1	0,3	0,4	†	0,1	0,5	†	-0,2	0,1	-0,8	0,5	-0,8	†	-0,5			
1	KMH2							1,0	-0,5	0,6	0,9	-0,1	0,7	1,1	0,3	0,0							1,0	-3,2	1,9
2	KMH2	2,7	-6,3	0,2	8,2	-7,5	-12,5	0,2	-0,3	-0,7	-0,1	-0,4	-0,4	4,4	-7,6	-1,0	-0,7	-1,4	-1,2	0,5	-0,5	-0,5			
3	KMH2	-3,1	-1,7	†	-6,6	-4,9	†	0,5	-0,6	†	0,1	-0,8	†	-1,4	-0,6	†	-0,8	-1,3	†	0,3	0,0	†			
4	KMH2																						-0,2	1,0	0,6
1	L428		-3,9	-5,3	-4,7	-5,5	-9,1	-0,3	-0,8	-0,3	-0,5	-0,8	0,3	0,9	-0,1	1,4	-0,8	-0,9	-0,7	0,0	-0,1	0,7			
1	L428							0,9	-1,1	0,4	1,0	-1,1	0,6	3,7	-2,3	0,2							0,0	-0,8	0,2
2	L428	0,7	-5,6	†	-1,4	-4,0	†	0,1	0,7	†	0,3	0,6	†	-3,7	0,0	†	0,4	0,3	†	0,6	1,2	†			
3	L428							0,5	-1,2	1,1							0,2	0,1	0,3				-0,5	-0,7	13,7*
4	L428																						-0,1	-0,7	-0,6
1	UHO1	†	-3,0	†	†	-3,6	†	†	-0,6	†	†	-1,5	†	†	-0,1	†	†	-0,9	†	†	-1,6	†			
2	UHO1				-2,0	-6,5	0,4	-1,0	0,2	-0,2	-1,3	-1,8	0,3	-0,5	0,2	0,7	-1,2	-1,6	-1,3	0,1	-0,2	-0,2			
3	UHO1	-3,5	-0,9	-1,6	-3,2	-3,0	-3,1	-0,1	-0,6	-0,4	-0,5	-1,1	-0,8	0,2	0,1	0,2	-0,9	-0,8	-0,6	0,4	-0,1	0,2	-0,7	-1,3	-0,3
4	UHO1																						-0,6	-0,9	-0,4

* zu GAPDH, da Actin nicht detektiert; † nicht gemessen, technischer Ausfall oder Bakterien in Transduktion; Identische Transduktionen mit jeweils unabhängigen Zellaliquots/cDNA-Synthese/qRT-PCR

Legende:

$\Delta\Delta$ Ct > -3	Hochregulation
$\Delta\Delta$ Ct < -2	Hochregulation
$\Delta\Delta$ Ct < -1	Hochregulation
$\Delta\Delta$ Ct [-1; 0[vermutlich keine Regulation
$\Delta\Delta$ Ct]0; 1]	vermutlich keine Regulation
$\Delta\Delta$ Ct > 1	Herunterregulation
EBF1 und empty undetermined	

Publikationen

Eckerle S, Brune V, Döring C, Tiacci E, **Bohle V**, Sundström C, Kodet R, Paulli M, Falini B, Klapper W, Chaubert AB, Willenbrock K, Metzler D, Bräuninger A, Küppers R, Hansmann ML: *Gene expression profiling of isolated tumour cells from anaplastic large cell lymphomas: insights into its cellular origin, pathogenesis and relation to Hodgkin lymphoma*. Leukemia. 2009 Nov;23(11):2129-38. PMID: 19657361

Schmitz R, Hansmann ML, **Bohle V**, Martin-Subero JI, Hartmann S, Mechttersheimer G, Klapper W, Vater I, Giefing M, Gesk S, Stanelle J, Siebert R, Küppers R.: *TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma*. J Exp Med. 2009 May 11;206(5):981-9. PMID: 19380639

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Ralf Küppers herzlich für die Betreuung und stetige Diskussionsbereitschaft, außerdem für die notwendige Toleranz mir gegenüber Beruf und Familie gleichzeitig bestmöglich zu realisieren.

Ich danke der Deutschen Krebshilfe für die Förderung dieses Projekts (Verbundprojekt 108687). Ebenfalls danke ich den anderen Teilnehmern dieses Verbundes für den regen Informationsaustausch und die regelmäßigen Diskussionsrunden.

Großen Dank schulde ich Gwen Lorenz und Klaus Lennartz, die mir im Labor und am FACS, auch zu ungewöhnlichen Zeiten, technisch eine große Hilfe gewesen sind. Ebenso wie Katharina Waldhelm, Julia Jesdinsky-Elsenbruch, Kerstin Heise und Andrea Kopplin.

Unseren Kooperationsgruppen in Frankfurt am Main (Senckenbergisches Institut für Pathologie) sowie Münster/Gießen (Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie/ Institut für Pathologie) danke ich für die wertvollen Diskussionen. Insbesondere Claudia Döring danke ich sehr für die statistische Auswertung der Genchips und diverser anderer Experimente sowie für die Beratung in statistischen Fragen.

Unserer gesamten Arbeitsgruppe danke ich für eine schöne Zeit, besonders der mittlerweile stark ausgedünnten Frauenriege.

Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Bedeutung von B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren, insbesondere EBF1, für die Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Verena Bohle befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. Ralf Küppers

Erklärung:

Hiermit erkläre ich gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Verena Bohle

Erklärung:

Hiermit erkläre ich gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Verena Bohle

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.