

Universität Ulm
Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

Analyse des genomischen Status der Proto-Onkogene *c-Rel* und
BCL11A sowie deren RNA- und Proteinexpression in extranodalen
Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen und diffus großzelligen B-Zell-
Lymphomen des Gastrointestinaltraktes

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)
Der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Steve Ehrlich

aus

Leipzig

Ulm 2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas F. E. Barth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schmitt

Tag der Promotion: 24.04.2009

**Meiner Großmutter
Hannelore Beschnitt
gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	III, IV
1 Einleitung	1
1.1. Lymphome	1
1.2. Gastrointestinale B-Zell-Lymphome	2
1.2.1. Epidemiologie	2
1.2.2. Ätiologie	2
1.2.3. Histologie	3
1.3. Mechanismen zur Aktivierung von Proto-Onkogenen	4
1.3.1. Chromosomale Translokationen	6
1.3.2. DNA-Amplifikationen	7
1.3.3. Intragenische Mutationen	8
1.4. Der NF- κ B-Signalweg	8
1.5. Die Aktivierung von NF- κ B	12
1.5.1. Der klassische NF- κ B-Signalweg	13
1.5.2. Der alternative NF- κ B-Signalweg	14
1.6. NF- κ B im B-Zell-Lymphomen	16
1.7. Die NF- κ B-Untereinheit <i>c-Rel</i>	17
1.8. Das Proto-Onkogen <i>BCL11A</i>	18
1.9. Ziel der Arbeit	21
2 Material und Methoden	22
2.1. Geräte	22
2.2. Software und Online-Tools	23
2.3. Materialien	23
2.3.1. Lymphomkollektiv	23
2.3.2. Reagenzien	24
2.3.3. Lösungen und Puffer	25
2.4. Methoden	26
2.4.1. RNA-Extraktion mit Trizol	26
2.4.2. RT-PCR zur Gewinnung von cDNA	27

2.4.3. Agarosegelelektrophorese	29
2.4.4. Quantitative Real-time-PCR	29
2.4.5. Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH)	33
2.4.6. Immunhistochemie an Paraffinschnitten	34
3 Ergebnisse	36
3.1. Genomischer Status von <i>c-Rel</i> und <i>BCL11A</i>	36
3.2. RNA-Expressionslevel von <i>c-Rel</i> und <i>BCL11A</i>	38
3.3. Expression und intrazelluläre Verteilung der c-Rel- und BCL11A-Proteine	40
4 Diskussion	44
4.1. Der genomische Status von <i>c-Rel</i> und <i>BCL11A</i> in malignen B-Zell-Lymphomen	45
4.2. Transkriptlevel von <i>c-Rel</i> und Proteinexpression von c-Rel in B-Zell-Lymphomen des Gastrointestinaltraktes	46
4.3. Transkriptlevel von <i>BCL11A</i> und Proteinexpression von BCL11A in B-Zell-Lymphomen des Gastrointestinaltraktes	49
5 Zusammenfassung	51
6 Literaturverzeichnis	53

Abkürzungsverzeichnis

ABC-DLBCL	engl. activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
Ak	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
BAC	bacterial artificial chromosome
BCL	B cell lymphoma (Genfamilie)
CCD	engl. charge-coupled device
CD	engl. cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CGH	engl. comparative genomic hybridization
CHL	engl. classical Hodgkin´s lymphoma
CML	chronische myeloische Leukämie
C _T	engl. cycle treshold
DLB(C)L	engl. diffuse large B-cell lymphoma
DM	engl. double minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxyribonukleosid-5´-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylentetradiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FICTION	engl. Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigations of neoplasms
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung
FL	follikuläres Lymphom
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCB-DLBCL	engl. germinal center B-cell-like diffuse large cell B-cell lymphoma

HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen
ICC	Immunzytochemie
Ig	Immunglobulin
IKK	Inhibitor der κ B-Kinase
IL	Interleukin
I κ B	Inhibitor von Nuclear Factor κ B
Jak	Janus-Kinase
kb	Kilobasen
KZ	Keimzentrum
M	molar
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
MBL	engl. mediastinal (thymic) B-cell lymphoma
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MZ	Mantelzone
NF- κ B	engl. nuclear factor κ B
NHL	Non-Hodkin-Lymphom
NTC	engl. no template-control
PBS	engl. phosphate-buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
RHD	Rel-Homologiedomäne
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
sek	Sekunde(n)
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
U/min.	Umdrehungen pro Minute
WHO	engl. World Health Organization

1 Einleitung

1.1. Lymphome

Lymphome sind klonale bösartige Erkrankungen, die durch die Proliferation neoplastisch transformierter Zellen des lymphatischen Systems entstehen. Diese werden primär in Hodgkin-Lymphome (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und diese wiederum in B-Zell- und T-Zell-Lymphome gegliedert. Weitere Vorschläge zur Unterteilung basieren auf dem klinischen Verlauf in indolente und aggressive Verlaufsformen sowie der Lokalisation in extranodale und nodale Lymphome [38]. Die malignen Zellen können in verschiedenen Kompartimenten des Immunsystems (primäre lymphatische Organe: Knochenmark, Thymus; sekundäre lymphatische Organe: Lymphknoten, Milz, Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe = MALT) entstehen und sich zunächst dort, aber auch in anderen Organen ausbreiten. In etwa 95 % der Fälle entstehen Lymphome aus Zellen der B-Zell-Reihe.

Zur Diagnose werden Lymphknoten- und Knochenmarkbiopsien histologisch und zytologisch untersucht und zur weiteren Subtypisierung immunhistologische/zytologische Methoden zum Nachweis membranständiger, zytoplasmatischer und/oder nukleärer Antigene durch spezifische Antikörper eingesetzt. Aufgrund der klonalen Abstammung weisen die neoplastischen Zellen identische Umlagerungen der Immunglobulingene (B-Zell-Lymphome) bzw. der T-Zell-Rezeptorgene (T-Zell-Lymphome) auf. Diese Klonalitätsanalyse erfolgt mittels konventioneller Polymerase-Ketten-Reaktion mit genspezifischen Primern und dient, falls morphologisch und immunhistologisch nicht möglich, zur Abgrenzung der Diagnose gegenüber nicht-neoplastischen Ereignissen, wie entzündlichen Reaktionen.

1.2. Gastrointestinale B-Zell-Lymphome

1.2.1. Epidemiologie

Non-Hodgkin-Lymphome des Gastrointestinaltraktes (GIT) stellen mit 30-40 % der Fälle die größte Gruppe extranodaler Lymphome dar. Im Vergleich zu anderen Malignomen des GI-Traktes ist der Anteil der Lymphome mit 1-3 % niedrig. Der überaus größte Anteil dieser Tumorentität ist im Magen lokalisiert (74,7 %), gefolgt von Dünndarm (8,6 %) und Ileozökalregion (7 %). Ein isolierter Befall von Duodenum und Kolon tritt nur sehr selten auf. In 6,5 % sind mehrere Abschnitte des Gastrointestinaltraktes betroffen [50]. Die Inzidenz gastrointestinaler Lymphome beträgt 0,6-0,8/100.000 pro Jahr, Männer sind dabei etwas häufiger betroffen als Frauen (1,23:1). Lymphome des Gastrointestinaltraktes treten gehäuft in der 6.-7. Lebensdekade auf. Unterschieden werden die gastrointestinalen Lymphome nach aktueller WHO in extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome (MZBL; international code of disease for oncology ICD-O: 9699/3), die sekundär in diffus großzellige B-Zell Lymphome (ICD-O: 9680/3) transformieren können und primäre diffus großzellige B-Zell Lymphome (DLBL, die ebenfalls unter der ICD-O: 9699/3 geführt werden. Weitere Formen sind Burkitt-Lymphome, die intestinale Polypose (ICD-O: 9673/3), die eine Variante des Mantelzell-Lymphoms darstellt, das immunoproliferative Syndrom des Dünndarms (IPSID; ICD-O: 9764/3) sowie die seltenen gastrointestinalen primären und Sprue-assoziierten T-Zell-Lymphome (ICD-O: 9702/3 und 9717/3).

1.2.2. Ätiologie

Es gibt erhebliche Evidenzen für eine Assoziation der gastralen MALT-Lymphome mit *Helicobacter pylori*: Einerseits kommt primär im Magen kein lymphatisches Gewebe vor, sondern wird sekundär als Folge eines chronischen Entzündungsprozesses akquiriert, die durch eine *Helicobacter-pylori*-Infektion induziert werden kann; umgekehrt kann bei 60-90 % der MZBL *Helicobacter pylori* nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine antibiotische *Helicobacter-pylori*-Eradikationsbehandlung in einem Großteil der Fälle eine Regression des Lymphoms erreicht werden kann [115,116]. Auch das immunoproliferative Syndrom des Dünndarms (IPSID) scheint durch eine chronische Antigenstimulation im Rahmen von Infektionen wie z.B. mit *Campylobacter jejuni*

ausgelöst zu werden, somit erscheint eine zumindest initiale Antigenabhängigkeit bei der Entstehung des primär gastrointestinalen Lymphoms wahrscheinlich.

1.2.3. Histologie

In der 1988 von Isaacson et. al [37] vorgeschlagenen Klassifikation für Lymphome des GI-Traktes werden gastrointestinale B-Zell-Lymphome des MALT-Typs mit niedrigem und hohem Malignitätsgrad von nodalen Lymphomen abgegrenzt, die ebenfalls im Bereich des Gastrointestinaltraktes auftreten bzw. sekundär auf diesen übergreifen können. Extranodale Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ (MZBL-GI, MALT = mucosa associated lymphatic tissue) werden als eigenständige Tumorentität definiert. Dieser Lymphomtyp imitiert initial das physiologische MALT und kann deshalb oft ein erhebliches diagnostisches Abgrenzungsproblem von einer ausgeprägten chronischen Gastritis darstellen.

Histologische Hauptcharakteristika des entzündungsassoziierten MALT sind intramuköse Lymphfollikel, diffuse lympho-plasmazelluläre Infiltrate der Lamina propria sowie vereinzelt intraepitheliale B-Lymphozyten. Letztere entstammen der die Follikel umgebenden Marginalzone und dienen der Kontaktaufnahme mit intraluminalen Antigenen. Beim MZBL-GI sind diese intraepithelialen lymphoiden Zellen in Form von sogenannten lymphoepithelialen Läsionen (>3 intraepitheliale, gruppierte neoplastische B-Zellen) vermehrt und zerstören das Epithel. Diese lympho-epithelialen Läsionen sind ein differentialdiagnostisches Hauptcharakteristikum. Hinzu kommt die monomorphe intramuköse Proliferation der Marginalzonenzellen, welche oft Ähnlichkeiten mit Zentrozyten zeigen (centrocyte-like cells = CCL-Zellen) und deren Monoklonalität z.B. anhand der Leichtketten-Restriktion nachgewiesen werden kann. Als weiteres Hauptphänomen zeigen sie eine Kolonisierung und/oder Destruktion der follikulären Keimzentren. Differentialdiagnostisch ist das MZBL-GI von gelegentlich vorkommenden primären follikulären Lymphomen des GI-Traktes abzugrenzen, vor allem aber von der ausgeprägten reaktiven oligoklonalen lymphoiden Hyperplasie, welche die Charakteristika des normalen MALT, aber keine Monoklonalität, keine echten lymphoepithelialen Läsionen und keine Kolonisierung von Keimzentren aufweist.

Der typische Immunophänotyp der MZBL lautet: sIg⁺ (M,G,A), IgD⁻, CD 5⁻, CD 10⁻, CD 19⁺, CD 20⁺, Cd 79a⁺, CD 23⁻, CD 43^{+/-}, CD 11c^{+/-} [37].

Zytogenetisch teilen sich die MZBL grob in eine t(11;18)-positive und eine t(11;18)-negative Gruppe auf, die Daten hinsichtlich einer Trisomie 3 sind umstritten [117]. In ersten zytogenetischen Arbeiten zu extranodalen Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen des Gastrointestinaltrakts konnte diese Aberration 1989 zum ersten Mal als eine reziproke Translokation zwischen dem Chromosom 11 und dem Chromosom 18 beschrieben werden [55].

Ott et al. gelang es erstmals, die Translokation t(11;18)(q21;q21) als rekurrente Aberration in 40 % der extranodalen Marginalzonen-B-Zell-Lymphome als einzige nachweisbare chromosomale Aberration nachzuweisen, während diese Aberration in diffus großzelligen Lymphomen des GI-Traktes nicht vorlag [77]. Da in der t(11;18)-positiven Gruppe diese Aberration die einzige aktuell nachweisbare genomische Veränderung ist, zeichnen sich diese Lymphome durch eine hohe genomische Stabilität aus. Die t(11;18)-positive Variante scheint nicht in ein großzelliges B-Zell-Lymphom malignisieren zu können, so dass davon ausgegangen wird, dass dieser Lymphomtyp durch diese Translokation in einem biologisch inerten Zustand arretiert ist.

Im Gegensatz dazu ist die Gruppe der t(11;18)-negativen Lymphome genetisch durch ein typisches Muster von rekurrenten sekundären Veränderungen charakterisiert wie Zugewinnen von chromosomalem Material auf dem langen Arm von Chromosom 1, 7 und 12 sowie auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 charakterisiert [8,102].

1.3. Mechanismen zur Aktivierung von Proto-Onkogenen

Grundlegende physiologische Prozesse wie Wachstum, Entwicklung und Differenzierung sowie die Zellteilung, aber auch die Apoptose sind notwendigerweise streng reguliert, um die Physiologie eines Organismus in seinen kompensierten Grenzen zu gewährleisten. Störungen oder Ausfälle in der Regulation dieser Prozesse können zur Transformation und schließlich zur Tumorentstehung führen. Vor allem hämatologische Neoplasien zeigen oft charakteristische chromosomale Veränderungen, die hochspezifisch mit einer Lymphomentität vergesellschaftet sein

können und oft einen Einblick in die Pathophysiologie des entsprechenden Lymphoms erlauben. Diese an der Onkogenese beteiligten Gene können generell in zwei Klassen eingeteilt werden, in denen verschiedene Mutationen die Transformation und Tumorbildung verursachen: Tumorsuppressorgene und Proto-Onkogene.

Die Produkte von Tumorsuppressorgen agieren beispielsweise als Inhibitoren des Zellzyklus oder von Signaltransduktionswegen. Durch inaktivierende Mutationen kommt es zu einem Funktionsverlust, wodurch sie tumorigen wirken können. Der Funktionsverlust muss, der Two-hit-Hypothese von Knudson folgend biallelisch sein, demzufolge werden diese Mutationen als rezessiv bezeichnet, denn es wird davon ausgegangen, dass ein funktionsfähiges Allel ausreichend für die Physiologie der Zelle ist. Die prominentesten Vertreter dieser Klasse sind die Tumorsuppressorgene *TP53* und *RB* (Retinoblastoma), die typischerweise in der negativen Regulation des Zellzyklus oder Zellwachstums, der DNA-Reparatur sowie der Apoptose involviert sind.

Die Produkte von zellulären Proto-Onkogenen spielen ebenfalls eine Rolle in Prozessen wie dem Zellzyklus oder der Zellproliferation, in denen sie als Liganden, Zelloberflächenrezeptoren, intrazelluläre Signalmoleküle oder Transkriptionsfaktoren involviert sind. Im Gegensatz zu den Tumorsuppressorgen repräsentiert die Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen einen Funktionsgewinn, in dem das zelluläre Proto-Onkogen durch eine Mutation abnormal aktiviert wird. Aktivierte zelluläre Onkogene sind in ihren Effekten dominant, d.h. die Mutation einer Kopie kann bereits onkogen sein.

Im Folgenden werden drei wichtige Mechanismen beschrieben, die zur Aktivierung von Proto-Onkogenen führen können.

1.3.1 Chromosomale Translokationen

In malignen hämatopoetischen Neoplasien kommen neben unbalancierten häufig rekurrente reziproke Translokationen vor, die als wesentlicher Mechanismus zur Aktivierung von Proto-Onkogenen aufgeführt werden [114]. Diese Translokationen sind zum Teil definierend mit der jeweiligen Lymphomentität assoziiert. Auf molekularer Ebene führen chromosomale Translokationen in der Regel durch zwei Mechanismen zur Aktivierung von Proto-Onkogenen [52].

Der erste Mechanismus führt zu einer deregulierten Expression des translozierten Proto-Onkogens, wenn es unter die Kontrolle eines Enhancer-Elements des Translokationspartners kommt [53]. Bei B-Zell-Neoplasien findet sich der Bruchpunkt häufig im Immunglobulin-Schwerketten-Lokus auf Chromosom 14q32, etwas seltener sind die Loci der κ -Leichtkette (2q11) oder der λ -Leichtkette (22q11) involviert. Zum Beispiel kann das Proto-Onkogen *c-Myc* auf 8q24 durch eine reziproke chromosomale Translokation in Burkitt-Lymphomen aktiviert sein [62]. Die häufigste Translokation im Burkitt-Lymphom ist die $t(8;14)(q24;q32.3)$. Alternativ und seltener wird der distale Anteil von 8q reziprok nach 2q11 oder 22q11 transloziert. Es wird davon ausgegangen, dass es durch den Einfluss des Promoters der schweren oder leichten Ketten der Immunglobuline zu einer aberrant erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors *c-Myc* kommt, wodurch dieses vermehrte Proto-Onkogen auf vielschichtige Weise in die Zellphysiologie eingreift und so für die Lymphomgenese mitverantwortlich zu sein scheint [114]. Wenn ein Proto-Onkogen mit anti-apoptotischer Funktion durch Translokation und Überexpression onkogen aktiviert wird, führt dies zu einer Hemmung der Apoptose. Das *BCL2*-Gen ist beispielsweise in 80–90 % der folliculären Lymphome als Translokationspartner in der $t(14;18)(q32;q21)$ involviert. Dies führt zur Überexpression des BCL2-Proteins und zur Hemmung der Apoptose, was als wesentlicher onkogener Mechanismus in folliculären Lymphomen angesehen wird [39,40,106,114].

Im zweiten Mechanismus sind die Loci der Immunglobulinketten nicht an der Translokation beteiligt, sondern es werden zwei Gene bzw. Teile von Genen als Folge der reziproken Translokation fusioniert. Wenn durch die Translokation ein funktionsfähiges Fusionsprotein synthetisiert werden kann, wird dessen onkogene Eigenschaft durch eine unkontrollierte und konstitutive Aktivität verursacht. Als

bekanntestes Beispiel ist hier die bcr-abl-Translokation beim sogenannten Philadelphia-Chromosom t(9;22)(q34;q11) zu nennen, die sich in über 90 % der Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML) findet.

1.3.2 DNA-Amplifikationen

Die Amplifikation von DNA ist ein weiterer Mechanismus, der Proto-Onkogene aktivieren kann und daher eine Rolle in der Malignomentstehung spielt [104,110]. Die Größe des amplifizierten DNA-Abschnittes kann von wenigen hundert Kilobasen bis hin zu mehreren Megabasen variieren. Es wird davon ausgegangen, dass die erhöhte Kopienzahl zu einer Überexpression des Produktes des entsprechenden Proto-Onkogens führt und so eine konstitutive und onkogene Aktivität induziert.

Eines der bekanntesten Beispiele ist das *Her2/neu*-Gen in Mammakarzinomen, das amplifiziert vorliegen kann und mit einer erhöhten Proteinexpression für einen entsprechenden Wachstumsfaktor einhergeht. Die Blockade des Rezeptors durch den monoklonalen Antikörper Trastuzumab oder den Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib ist heute fester Bestandteil der postoperativen Chemotherapie bei Karzinomen mit nachgewiesener *Her2/neu*-Amplifikation.

In B-Zell-Lymphomen sind Genamplifikationen aus unterschiedlichen funktionellen Gruppen wie Transkriptionsfaktoren (z.B. *JunB* und *c-Rel*), Zellzyklusregulatoren (z.B. *MDM2* und *CCND3*) oder Kinasen (z.B. *JAK2* und *CDK4*) beschrieben [2,48,63,79,111].

Die präzisen Mechanismen, die zur DNA-Amplifikation führen, sind weitgehend ungeklärt [20,104]. Das amplifizierte Material kann extrachromosomal oder intrachromosomal vorliegen. So genannte Double Minute-„Chromosomen“ (DM, kleine winzige Chromosomen) repräsentieren extrachromosomale DNA-Amplifikationen. Es handelt sich dabei um Chromatin-ähnliche Strukturen, die in Abhängigkeit der Anzahl der Genkopien und des Amplikons in ihrer Größe variieren. Sie kommen in vielen soliden Tumoren und Leukämien vor und haben typischerweise kein Zentromer, d.h. sie werden während der Zellteilung nicht regulär an die Tochterzellen weitergegeben. 2006 wurden in folliculären Lymphomen erstmals DMs beobachtet, die das Gen des Transkriptionsfaktors *c-Rel*

enthielten [83]. Dagegen reflektieren HSRs (homogeneously staining regions) DNA-Amplifikationen innerhalb eines Chromosoms, die sich meistens auf dem Chromosom des ursprünglichen Genlokus befinden. Sie sind seltener in Tumoren und häufiger in Tumorzelllinien zu finden. Als Bestandteil des Chromosoms können sie im Gegensatz zu DMs während der Zellteilung normal weitergegeben werden.

1.3.3 Intragenische Mutationen

Im Gegensatz zu den oben genannten Mechanismen kommen Punktmutationen, Deletionen und Insertionen auch in Tumorsuppressorgenen vor. Der funktionelle Unterschied liegt darin, dass die Tumorsuppressorgene durch diese Mutationen inaktiviert (z.B. *TP53*, *RB-1*) und die Proto-Onkogene aktiviert werden (z.B. *K-Ras*).

1.4. Der NF- κ B-Signalweg

Jede Zelle steht mittels vielfältiger Rezeptoren in der Zellmembran in Kontakt mit der „Außenwelt“. Signale aus dem extrazellulären Raum können mit Hilfe intrazellulärer Mediatoren ins Zellinnere übertragen werden. Häufig findet eine Signalübertragung (Transduktion) bis in den Zellkern statt. Dabei initiieren eingehende Signale zum Teil vielfach verzweigte Signaltransduktionskaskaden, an deren Ende oft Transkriptionsfaktoren stehen. Diese sind Proteine, die mittels spezifischer Bindungsstellen innerhalb der Kontrollregion bestimmter Gene interagieren und dabei deren Expression und Aktivität beeinflussen, um so die Anpassung der Zelle an wechselnde Umweltbedingungen und somit das Überleben zu ermöglichen.

Einer dieser Transkriptionsfaktoren mit einer Vielzahl von Effektorgenen ist dabei der Nuclear Factor κ B. Dieser wurde 1986 von Sen und Baltimore erstmals in B-Zellen entdeckt und zunächst als ein B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor angesehen, der die Expression der Immunglobulin-Leichtkette Typ κ mitreguliert [98]. Mittlerweile ist bekannt, dass NF- κ B in praktisch allen kernhaltigen Zellen vorhanden ist, allerdings normalerweise in inaktiver Form. Dabei liegt der Faktor im Zytoplasma gebunden an spezifische Inhibitorproteine, sog. I κ Bs (inhibitors of NF- κ B) oder als ungebundene Form vor. Durch das „Pooling“ des Transkriptionsfaktors in einer inaktiven Form ist eine unmittelbare Transkriptionsaktivierung durch Kontrolle der subzellulären Translokation wesentlich schneller möglich, als wenn der Transkriptionsfaktor erst selbst induziert und translatiert werden müsste.

NF- κ B hat eine ausgesprochen pleiotrophe Wirkung und spielt eine zentrale Rolle bei Immun- und Entzündungsreaktionen, bei der Aufrechterhaltung der Homöostase in verschiedenen Organen, bei der Embryonalentwicklung sowie der Entstehung von Tumoren. „NF- κ B“ ist hierbei nicht die Bezeichnung für ein einzelnes Protein, sondern für ein Homo- oder promiske Heterodimere aus mindestens zwei Proteinen der Rel/NF- κ B-Transkriptionsfaktorfamilie. Beim Menschen sind bisher 5 Rel/NF- κ B-Proteine beschrieben worden: p50 mit seinem Vorläuferprotein p105; p52 mit seinem Vorläuferprotein p100, RelA (p65), RelB und c-Rel. Zusammen mit den bei *Drosophila melanogaster* gefundenen Proteinen Dorsal, Dif und Relish bilden sie die Rel/NF- κ B/Dorsal-Transkriptionsfaktorfamilie [24]. Gemeinsames Merkmal dieser Proteine ist die hochkonservierte Rel-Homologiedomäne (RHD) im N-terminalen Anteil. Diese enthält das nukleäre Translokationssignal sowie die Sequenzen für die Dimerisierung und DNA-Bindung. Im Gegensatz zu p50 und p52 besitzen RelA, RelB und c-Rel an ihrem C-terminalen Ende eine transkriptionsaktivierende Domäne (Transaktivierungsdomäne, TAD). Demzufolge wirken nur Dimere, die eines dieser Proteine enthalten, als Transkriptionsaktivatoren. Umgekehrt können z.B. p50-Homodimere die NF- κ B-induzierte Transkription inhibieren, wahrscheinlich indem sie Bindung transkriptionell aktiver NF- κ B-Komplexe blockieren [Abbildung 1].

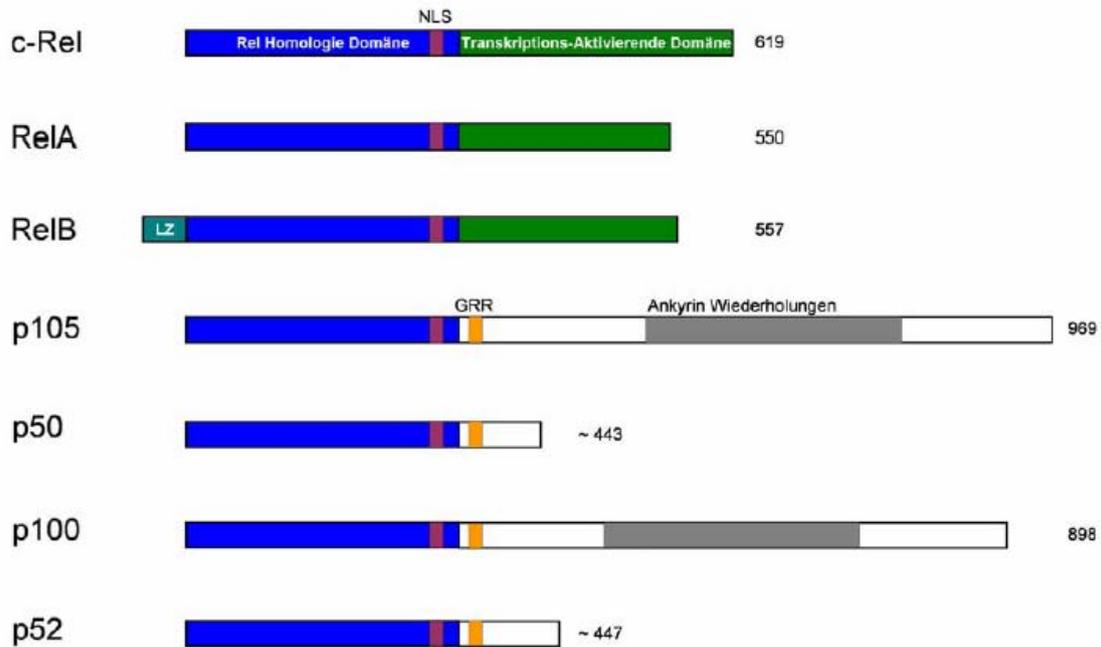


Abbildung 1: Die NF-κB Untereinheiten

Alle Untereinheiten von NF-κB besitzen N-terminal die Rel-Homologie-Domäne (blau). Die carboxyterminalen Sequenzen von c-Rel, RelA und RelB umfassen eine Transkriptions-aktivierende Domäne (grün), während p105 und p100, die Vorläufer von p50 und p52, so genannte Ankyrin-Wiederholungen (grau) in ihren C-terminalen Enden besitzen. Gemeinsam ist allen Proteinen eine Kernlokalisierungssequenz (NLS, grau) am Ende der RHD. p50/p105 und p52/p100 haben eine Glycin-reiche Region (GRR, orange) kurz hinter der Kernlokalisierungssequenz, die eine Signalsequenz für die proteolytische Spaltung von p105 und p100 zu p50 bzw. p52 darstellt.

In unstimulierten Zellen befindet sich NF-κB im Zytoplasma gebunden an spezifische Inhibitorproteine, die sog. IκBs. Es gibt verschiedene IκBs (IκB-α, IκB-β, IκB-ε etc.), über deren funktionelle Unterschiede wenig bekannt ist. Gemeinsam sind den IκBs repetitive Ankyrin-Sequenzen, die sich auch im C-terminalen Ende der Vorläuferproteine p105 und p100 der NF-κB-Proteine p50 bzw. p52 finden. Die Ankyrinrepeats vermitteln zum einen die IκB-Bindung an die Rel-Homologiedomäne (RHD) der Rel/NF-κB-Proteine, zum anderen maskieren sie die nukleäre Translokationssequenz, wodurch die NF-κB-Komplexe im Zytoplasma zurückgehalten werden. Nach Stimulation der Zelle erfolgt über verschiedene proximale Kinasen (Akt, MEKK-1, NAK) die Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes (IKK) aus IKK-α, IKK-β und IKK-γ/NEMO. IKK/NF-κB-aktivierende Faktoren sind z.B.

Chemikalien, Stress, ionisierende Strahlung, TNF- α bei bakteriellen und viralen Infektionen, Zytokine und Wachstumsfaktoren.

Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert I κ B an zwei spezifischen Serinresten im N-terminalen Anteil. Die Phosphorylierung von I κ B führt zu seiner Markierung mit Ubiquitin, welche wiederum die sofortige Degradation des I κ B-Proteins einleitet. Nach der proteolytischen Spaltung von I κ B im Proteasom wird NF- κ B freigesetzt und mittels seines nukleären Translokationssignals in den Zellkern transloziert, um die Transkription von Zielgenen zu aktivieren.

NF- κ B bindet an die regulatorischen Untereinheiten (Promoter-, Enhancerregionen) einer Vielzahl von Genen und reguliert dabei u.a. die Expression von:

- Proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12
- Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1
- Akute-Phase-Proteinen (Angiotensinogen, C3, saures Glykoprotein- α 1)
- Matrix-Metalloproteinase-1 (Kollagenase-1) und -3 (Stromelysin)
- Cyclooxygenase-2
- Induzierbare NO-Synthetase
- Antiapoptischen Proteinen wie TRAF-1, TRAF-2, cIAP-1, cIAP-2

Zu den durch NF- κ B induzierten Genen zählen auch diejenigen für die I κ B's. Zumindest für I κ B α ist gesichert, dass es imstande ist, nukleäres NF- κ B wieder von der DNA zu lösen und aktiv ins Zytoplasma zurück zu transportieren, so dass die Wirkung von NF- κ B durch einen Feedbackmechanismus gewährleistet ist.

Durch die pleiotrope Wirkung der durch NF- κ B aktivierten Gene wird eine Beteiligung von NF- κ B in verschiedenen Erkrankungen wie der chronischen Polyarthritis, Asthma bronchiale, beim septischen Schock, Arteriosklerose sowie bei der Transplantatabstoßung diskutiert [5,13,25,68,87].

Weiterhin ist die Beteiligung von NF- κ B an einer Reihe von hämatologisch-onkologischen Erkrankungen gesichert. Eine konstitutive, d.h. dauerhafte und nicht bedarfsadaptierte Aktivierung von NF- κ B (nachgewiesen durch eine überwiegend nukleäre Lokalisation von NF- κ B) konnte für die Mehrzahl der Hodgkin-Lymphome [26], bestimmte Unterarten der akuten myeloischen Leukämie [70] sowie in Mamma- und Koloncarcinomen nachgewiesen werden [28].

Dabei wird davon ausgegangen, dass die konstitutive Aktivierung von NF- κ B die Tumorzellen vor Zelltod durch Apoptose schützt und ihnen somit einen Selektionsvorteil verschafft. NF- κ B unterstützt die Zellzyklusprogression und die Proliferation durch Induktion von *c-Myc* und *Cyclin D1*. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Chemo-/Radiotherapie zu einer konstitutiven NF- κ B-Aktivierung und einem verminderten Ansprechen auf weitere Therapiezyklen kommen kann [17,90]. Grundsätzlich stellt die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade einen interessanten Ansatzpunkt für innovative zielgerichtete Therapieoptionen dar[56,76,89].

1.5. Die Aktivierung von NF- κ B

Wie oben ausgeführt, erfolgt die Aktivierung von NF- κ B typischerweise durch hintereinander geschaltete Phosphorylierungsschritte [109] einschließlich der aktivierenden Phosphorylierung des IKK-Komplexes, der schließlich I κ B phosphoryliert [26]. Die phosphorylierten I κ B Proteine werden daraufhin mit Ubiquitinproteinen markiert und im Proteasom abgebaut [16]. Die freien NF- κ B Dimere können daraufhin in den Zellkern translozieren und dort die Transkription von mehr als hundert heute bekannten Zielgenen regulieren.

Unterschiedliche Kombinationen von NF- κ B Untereinheiten haben überlappende aber dennoch verschiedene Eigenschaften in der Spezifität und Affinität der DNA Bindung [34,58,74,80,91]. So ist inzwischen beschrieben, dass auch NF- κ B Untereinheiten phosphoryliert werden. Beispielsweise kann RelA zum Beispiel von IKK α und IKK β an Serin 536 in der transkriptionsaktivierenden Domäne phosphoryliert werden, was dessen Transkriptionseffizienz erhöht [41,92,109]. Neben weiteren post-translationalen Modifikationen, wie die Acetylierung von RelA, können Interaktionen

von NF- κ B mit anderen Faktoren (z. B. p300/CBP und Sp1), die Transkriptionsaktivität beeinflussen [4, 15].

1.5.1. Der klassische NF- κ B-Signalweg

Im klassischen NF- κ B-Signalweg erfolgt nach der Degradation von I κ B α die Aktivierung und anschließende Translokation von zytoplasmatischem NF- κ B in den Zellkern nach der Degradation von I κ B α (siehe auch Abb. 2). In diesem Signalweg besteht der IKK Komplex aus den beiden katalytischen Untereinheiten, IKK α und IKK β sowie mehreren sogenannten NEMO-Proteinen (NF- κ B essential modulator). Die Aktivierung kann durch diverse Moleküle erfolgen, wie z.B. durch inflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-1, deren Signaltransduktion zur Aktivierung des NF- κ B Signalwegs gut beschrieben ist:

Die Bindung von TNF α an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) führt zur Oligomerisierung der Rezeptormoleküle und der Inhibitor SODD (Silencer of death domains) löst sich von diesem Komplex. Nacheinander werden die Adaptorproteine TRADD (TNF receptor associated death domain), RIP (receptor interacting protein) und TRAF (TNF receptor associated factor) 2 rekrutiert [42,103]. #

TRAF2 (Tumor necrosis factor receptor [TNFR] associated factor 2) vermittelt daraufhin die Rekrutierung des IKK-Komplexes zum TNF-Rezeptorkomplex. In Folge kommt es zu Modifikationen des IKK Komplexes einschließlich Ubiquitynylierung und Phosphorylierung von NEMO und Phosphorylierung von zwei Serinresten in der Aktivierungsschleife von IKK β (Ser177 und Ser181). Aktiviertes IKK β wiederum phosphoryliert I κ B α an den Serinen 32 und 36, was I κ B α als Substrat für den Ubiquitinligasekomplex zugänglich macht; ubiquitiniertes I κ B α wird anschließend vom Proteasom abgebaut. Dadurch wird die Kernlokalisierungssequenz von NF- κ B freigelegt und der aktivierte Transkriptionsfaktor transloziert in den Zellkern, um die Expression seiner Zielgene zu induzieren.

Der Abbruch der Signaltransduktion im klassischen NF- κ B Signalweg kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Am besten bekannt ist die Induktion der Transkription für I κ B α durch aktivierte NF- κ B-Dimere, d.h. in einem Feedback-Mechanismus wird die Expression des negativen Regulators erhöht. Auf diese Weise

neu synthetisiertes I κ B α transloziert in den Zellkern, bindet NF- κ B und exportiert es zurück in das Zytoplasma [26].

1.5.2. Der alternative NF- κ B-Signalweg

Einige Aktivatoren wie CD40L (CD40 Ligand), Lymphotoxin- β , BAFF (B-cell activating factor) und LPS (Lipopolysaccharid) können nicht nur den klassischen, sondern auch den alternativen NF- κ B Signalweg aktivieren. Die Bindung von CD40L an seinen Rezeptor führt, wie im klassischen Signalweg, zur Rekrutierung der zytoplasmatischen Adaptorproteine TRAF2, TRAF3 und TRAF6. Im Gegensatz zum klassischen wird im alternativen Signalweg daraufhin die Kinase NIK (NF- κ B inducing kinase) rekrutiert und durch Phosphorylierung aktiviert. In alternativen Signalweg besteht der IKK Komplex aus einem IKK α Homodimer, der wiederum von NIK phosphoryliert, d.h. aktiviert, wird. In Folge phosphoryliert IKK α p100, so dass nach dessen proteolytischer Prozessierung aktives p52 entsteht und es zur Aktivierung von NF- κ B Dimeren kommt, die in diesem Signalweg hauptsächlich aus p52:RelB bestehen [Abbildung 2].

Durch Aktivierung der beiden bekannten Signalwege entstehen unterschiedliche Kompositionen von nukleären NF- κ B Komplexen, die an ein unterschiedliches Spektrum von Promotoren/Enhancern binden und damit die Transkription verschiedener Zielgene regulieren [88,95].

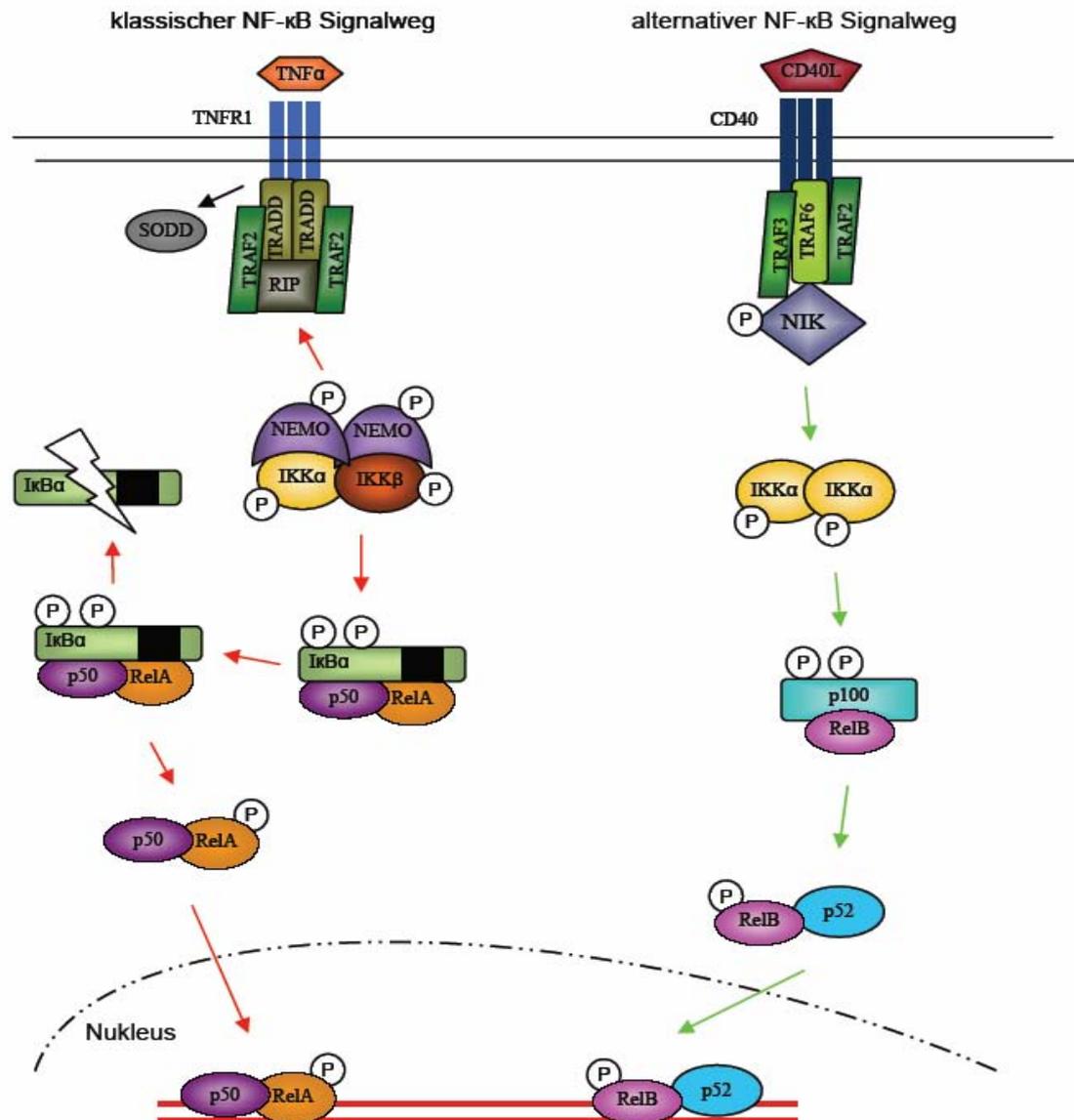


Abbildung 2: Aktivierung des klassischen und des alternativen NF-κB Signalwegs

Schematische Darstellung des klassischen (rote Pfeile) NF-κB Signalwegs, der über die Bindung des Liganden (TNF) an seinen Rezeptor (TNFR1) eine Signalkaskade auslöst, die die Adapterproteine TRADD, TRAF und RIP rekrutiert, bevor der IKK Komplex aktiviert wird. IκBα wird phosphoryliert und abgebaut und der freie NF-κB transloziert in den Zellkern, wo er an die κB Stelle im Promoter/Enhancer seiner Zielgene bindet. Die Bindung von CD40L an CD40 löst auch den alternativen Signalweg (grüne Pfeile) aus, der über TRAF Proteine NIK aktiviert. NIK phosphoryliert IKKα und IKKβ phosphoryliert p100, das zu p52 prozessiert wird, so dass NF-κB in den Kern eintreten kann (nach Viatour *et al.* [109]).

1.6. NF- κ B in B-Zell-Lymphomen

Chromosomale Veränderungen, die die Loci der NF- κ B Untereinheiten betreffen, können mit erhöhter und konstitutiver Aktivität von NF- κ B assoziiert sein [12]. Der *c-Rel*-Lokus in der chromosomalen Bande 2p16.1 ist in Lymphomen oft überrepräsentiert, während chromosomale Rearrangements des *RelA*-Lokus (11q13) und des *NF- κ B1*-Lokus (4q24) für p50/p105 nur selten betroffen sind [108]. Es sind keine Mutationen des *RelB*-Lokus (19q13) in Leukämien oder Lymphomen bekannt, wohingegen chromosomale Translokationen des *NF- κ B2* Lokus (10q24) für p52/p100 in vereinzelt Fällen für Leukämien (ALL, CML) beschrieben wurden [1,32]. Die chromosomalen Veränderungen des *NF- κ B2*-Lokus führen in p100 zu Deletionen im C-Terminus und induzieren eine konstitutive Aktivität von p52. In anderen malignen B-Zell-Lymphomen, wie einer Subgruppe der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL), mediastinalen B-Zell-Lymphomen und Hodgkin-Lymphomen ist eine erhöhte, konstitutive NF- κ B Aktivität nachgewiesen worden [12]. Beim Hodgkin-Lymphom ist als ätiologischer Mechanismus eine erhöhte DNA Bindungsaktivität der Untereinheiten c-Rel, RelA und p50 postuliert worden [55].

Basierend auf den Ergebnissen aus Genexpressionsanalysen folgerten Alizadeh und Kollegen 2000, dass die DLBCLs aus mindestens zwei Gruppen bestehen, die derzeit weitläufig als Keimzentrums-ähnliche (GCB, germinal center B-cell like) DLBCLs und aktivierte (ABC, activated B-cell like) DLBCLs bezeichnet werden [3,101]. Das bedeutet, dass diese Gruppen ein ähnliches RNA-Expressionsprofil wie die entsprechenden zellulären Äquivalente (Keimzentrums-B-Zellen bzw. aktivierte B-Zellen) zeigen sollen. In weiteren Studien, die neben DLBCLs auch mediastinale B-Zell-Lymphome (MBL) und einige klassische Hodgkin-Lymphome (cHL) sowie entsprechende Zelllinien untersuchten, fanden sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in den entsprechenden Genexpressionsprofilen [88,95]. Die Transkriptionsanalyse hinsichtlich der Signatur von NF- κ B Zielgenen zeigte, dass MBLs eine signifikant erhöhte Expression einer großen Zahl von NF- κ B Zielgenen im Vergleich zu anderen DLBCLs aufweisen [41]. Um die erhöhte Expression dieser NF- κ B Zielgene zu reproduzieren, wurde dies an unabhängigen, öffentlich zugänglichen Transkriptionsprofilen von DLBCLs und MBLs getestet. Auch in dieser Serie zeigten die MBLs eine signifikant höhere Expression von 79 % der getesteten NF- κ B Zielgene. In Genexpressionsanalysen zeigten ABC-DLBCLs eine erhöhte Expression

einer Gruppe von NF- κ B Zielgenen, die nicht in den GCB-DLBCLs beobachtet wurde, obwohl ausschließlich in GCB-DLBCLs (ca. 15 %) Amplifikationen von *c-Rel* gefunden wurden [41]. Allerdings wurden in ca. 20 % der Lymphome einer anderen Serie von DLBCLs erhöhte Kopienzahlen von *c-Rel* in allen Subtypen gefunden [23]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die aktiven NF- κ B-Proteine aus Kernextrakten von ABC- bzw. GCB-DLBCL-Zelllinien unterscheiden: in Zellen der ersteren finden sich am häufigsten p50:RelA-Dimere und in denen der GCB-DLBCL-Zelllinien mehr *c-Rel* enthaltende Komplexe. Eine DNA-Bindungsanalyse zeigte, dass ABC-DLBCL-Zelllinien eine höhere konstitutive Bindeaktivität von NF- κ B aufweisen als GCB-DLBCL-Zelllinien. Desweiteren wurde die Proliferation der Zellen einer ABC-DLBCL-Zelllinie durch einen I κ B α -Superrepressor gehemmt, wohingegen dies in Zellen einer GCB-DLBCL-Zelllinie nicht der Fall war [19]. Die unterschiedliche, teils widersprüchliche Aktivität und die Bedeutung der verschiedenen NF- κ B-Komplexe in den beiden DLBCL-Subtypen spiegeln die den pleiotropen Effekt der NF κ B-Proteine wider und weisen auf die komplexe Regulation dieses Signaltransduktionsweges hin.

1.7. Die NF- κ B-Untereinheit *c-Rel*

Die Entdeckung und Bezeichnung *c-Rel* geht auf das Retikuloendotheliose-Virus Rev-T, ein Retrovirus, zurück, das in verschiedenen Vogelarten Leukämien induziert. Dessen Onkogen *v-Rel* wurde 1983 von Stephens und Kollegen isoliert [100]. Zwei Jahre später wurde von Brownell aus der gleichen Arbeitsgruppe das humane Homolog *c-Rel* beschrieben [35]. Das *c-Rel*-Gen besteht aus 11 Exonen und liegt auf Chromosom 2p16.1. Die kodierende Sequenz der mRNA umfasst 1860 bp und wird in ein *c-Rel*-Protein mit 619 AS von 68,5 kDa translatiert. Das *c-Rel*-Protein wird in allen Stadien der B-Zell-Entwicklung exprimiert und zeigt die höchste Expression und konstitutive Kernlokalisation in reifen B-Zellen. In reifen B-Lymphozyten binden hauptsächlich p50:*c-Rel*-Heterodimere an die κ B-DNA-Sequenzen, wohingegen Prä-B-Zellen überwiegend induzierbare p50:RelA-Komplexe besitzen. Die Charakterisierung von *c-Rel*-knockout Mäusen zeigte, dass *c-Rel* für die Entwicklung, das Wachstum und das Überleben von B-Zellen wichtig ist. Die Mäuse entwickeln sich normal, zeigen aber Immundefizienzen [51,107].

Beim klassischen M. Hodgkin sind Zugewinne bzw. Amplifikationen von *c-Rel* mit nukleär lokalisiertem c-Rel-Protein assoziiert, was zu der Annahme führte, dass eine Erhöhung der Kopienzahl von *c-Rel* über einen Gendosis-Effekt in einem kausalen Zusammenhang mit der erhöhten NF- κ B-Aktivität steht [9]. Andere Studien sprechen gegen eine solche Korrelation, da *c-Rel*-Zugewinne bzw. -Amplifikationen im GCB-DLBCL Subtyp zwar häufiger sind als in ABC-DLBCLs, aber letztere eine deutlichere NF- κ B Signatur aufweisen [36]. Weiterhin wurde eine erhöhte Expression von NF- κ B-Zielgenen auch unabhängig von Veränderungen des *c-Rel*-Lokus gefunden [23]. Diese Daten wurden weiter kompliziert durch die Beobachtung, dass Lymphome mit einer *c-Rel*-Amplifikation vermehrt c-Rel-Protein im Kern aufweisen, während anderen Berichten zu Folge, diese Korrelation nicht vorhanden sei. [23,36,95]. Ebenso sind bislang die funktionellen Untersuchungen hinsichtlich der genauen Rolle von NF- κ B in den DLBCL Subtypen nicht eindeutig [30].

1.8. Das Proto-Onkogen *BCL11A*

Das Gen *BCL11A* (B-cell lymphoma/leukaemia 11a) ist auf 2p16.1 lokalisiert und kodiert einen Transkriptionsrepressor. Dieser besitzt ein charakteristisches DNA-bindendes Motiv, das als Zinkfinger bezeichnet wird [22]. Das namensgebende Element besteht aus einem Abschnitt von ungefähr 30 Aminosäuren, die klassischerweise von zwei Cysteinen und zwei Histidinen eingefasst werden. Diese vier Aminosäuren binden in ihrer Mitte ein Zinkion, so dass die dazwischen liegenden Aminosäuren eine finger-ähnliche Struktur bilden. Typischerweise haben Zinkfingerproteine mehrere dieser Motive in ihrer Sequenz hintereinander geschaltet.

Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA von *BCL11A* entstehen mindestens drei Transkriptvarianten mit einer Länge von 5,8 kb, 3,8 kb und 1,5 kb. Entsprechend ihrer Länge erhielten die Proteine die Bezeichnungen BCL11A-XL, BCL11A-L und BCL11A-S. Die mRNA-Expression von *BCL11A* ist in normalen humanen Geweben generell niedrig. Die höchsten Level finden sich im fetalen Gehirn sowie in adulten Lymphknoten, Thymus und Knochenmark [94]. Besonders in den Keimzentren von Lymphknoten scheinen die Transkripte zu akkumulieren, wie eine in situ-Hybridisierung mit einer RNA-Sonde zeigen konnte. In normalen B-Zellpopulationen und in plasmazytoiden dentritischen Zellen wird hauptsächlich das längste Transkript für die BCL11A-XL Isoform exprimiert [60,81]. Inzwischen gibt es Hinweise für die

Existenz weiterer Transkriptvarianten, wobei die Exone 1 und 2 von *BCL11A* konsistent in allen Isoformen vorkommen. Die unterschiedliche Verwendung von Exon 4-Sequenzen hat zur Folge, dass die *BCL11A*-Isoformen unterschiedliche Anzahlen von Zinkfingermotiven besitzen, die an den invarianten N-terminalen Zinkfinger der Exone 1 und 2 angefügt werden. Das längste Protein *BCL11A-XL* beispielsweise enthält 6 Zinkfinger motive [59,95].

Das humane und das murine *BCL11A* (*Evi9* [ecotropic viral integration site 9]) weisen eine zu 94 % identische Nukleotidsequenz und zu 95 % identische Proteinsequenz auf. Auch in der Maus wurden verschiedene Isoformen identifiziert. *BCL11A*-knockout-Mäuse sterben wenige Stunden nach der Geburt aus ungeklärter Ursache. Immunphänotypische Analysen in diesen Mäusen haben ergeben, dass *BCL11A* nicht für die Entwicklung von Makrophagen, Granulozyten oder Zellen der erythroiden Linie erforderlich ist. Allerdings fehlen ihnen B-Zellen der frühen Entwicklungsstadien, d.h. *BCL11A* spielt in der Entwicklung der B-Zell-Reihe eine entscheidende Rolle [60]. Frühere Beobachtungen zeigten, dass die L-Isoform der Maus mit *BCL6*, ebenfalls ein Repressor der Transkription, ko-lokalisiert, wenn dieser ektopisch exprimiert wird. Ko-Transfektionen und anschließende Ko-Immunpräzipitationen zeigten, dass humanes *BCL11A-L* und *BCL6* ebenfalls interagieren. Später wurde gezeigt, dass auch *BCL11A-XL* mit *BCL6* interagiert, während keine Interaktion zwischen *BCL11A-S* und *BCL6* detektiert wurde. Eine ähnliche Versuchsreihe zeigte, dass alle drei *BCL11A* Isoformen sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden können [59].

Erste Hinweise, dass *BCL11A* eine Rolle in hämatologischen Erkrankungen spielt, beruhen auf der Beobachtung von retroviralen Insertionen in der Nähe des murinen *BCL11A*-Lokus. Diese führen zu dessen Aktivierung und korrelieren mit der Entwicklung von myeloischen Leukämien und B-Zell-Lymphomen [57]. In der humanen Burkitt Lymphom Zelllinie NAB-2 wurde die Integration des Epstein-Barr-Virus (EBV) in der Nähe des *BCL11A*-Lokus auf 2p16 beschrieben [61]. Im Vergleich mit anderen EBV-positiven und EBV-negativen Burkitt-Lymphom-Zelllinien zeigten NAB-2 Zellen eine erhöhte *BCL11A*-Expression. Des Weiteren ist *BCL11A* in der Lage Zellen der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 zu transformieren [73].

Satterwhite und Kollegen untersuchten die Translokation t(2;14)(p13;q32.3) von vier Patienten mit malignen B-Zell-Neoplasien und zeigten, dass das *BCL11A* Gen auf den IgH-Lokus transloziert und deswegen die Expression dereguliert ist [94]. Diese Translokation wurde in B-Zell-Lymphomen jedoch nur selten nachgewiesen. Dagegen kommen chromosomale Zugewinne und Amplifikationen der Region 2p16 wesentlich häufiger vor und wurden z.B. in 20–50 % der DLBCLs, in ca. 50 % der cHLs und in bis zu 47 % der MBLs gefunden. Molekulargenetische Analysen zeigten, dass diese Veränderungen auch *BCL11A* betreffen [6,65,111].

In diversen humanen lymphoiden Zelllinien wurde eine endogene Expression von BCL11A-XL nachgewiesen [59,81]. Die Mehrheit der Zelllinien, die von T-Zell-Leukämien, multiplen Myelomen und Hodgkin Lymphomen stammten, war negativ für BCL11A-XL. Da normale Plasmazellen keine Expression von BCL11A-XL Proteinen zeigten, wird angenommen, dass die Expression des *BCL11A*-Gens während der Differenzierung zu Plasmazellen herunterreguliert wird [81]. Zielgene, die von BCL11A reguliert werden, sind derzeit noch nicht identifiziert.

1.9. Ziel der Arbeit

Die Vermehrung der Kopienzahl eines Proto-Onkogens durch Amplifikation ist einer der bekannten Mechanismen, der zur Aktivierung des entsprechenden Protoonkogens führt. Dabei wird davon ausgegangen, dass es auf Grund des vermehrten Gens kausal zu einer erhöhten Expression auf mRNA-Ebene kommt und diese wiederum in einer vermehrten Translation des entsprechenden Proteins mündet. Bekanntestes Beispiel für einen solchen Gendosismechanismus ist das Protoonkogen *ErbB2* (=Her2/neu) im Mammakarzinom.

Aufgrund der Beobachtung von häufigen chromosomalen Zugewinnen und Amplifikationen des kurzen Arms von Chromosom 2 einschließlich der kritischen Region 2p16 sowohl in Hodgkin- als auch in verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphomen wurden 13 gastrointestinale B-Zell-Lymphome hinsichtlich eines möglichen Gendosismechanismus für die Kandidatengene *c-Rel* und *BCL11A* untersucht.

Arbeitsziele waren im Einzelnen:

1. Erhebung des genomischen Status von *c-Rel* und *BCL11A* in einem Kollektiv von 13 gastrointestinalen B-Zell-Lymphomen.
2. Korrelation des genomischen Status mit der Expression der beiden Kandidatengene *c-Rel* und *BCL11A* auf mRNA-Ebene mittels real-time PCR.
3. Immunhistochemische Untersuchungen zur Bestimmung der Expression auf Proteinebene.
4. Kritische Evaluation eines möglichen Gendosis-Effektes der beiden Kandidatengene in gastrointestinalen B-Zell-Lymphomen am Beispiel von 5 extranodalen marginalen B-Zell Lymphomen vom MALT Typ (MZBL-GI) und 8 diffus großzelliger B-Zell Lymphome des Gastrointestinaltraktes auf dem Boden der erhobenen Datenmatrix.

2 Material und Methoden

2.1. Geräte

Analysenwaagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Axiophot Mikroskop (JVC KYF754)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Axiophot 25 Inversmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Bechergläser 10, 100, 250, 500 ml	Schott, Zwiesel, Deutschland
CCD-Kamera	Hamamatus, Haga, Japan
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Eismaschine	Inco-Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiophot2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Gelkammer	AGS, Heidelberg, Deutschland
Heizplatte	Pfennig Apparatebau, Kiel, Deutschland
iCycler Detektionssystem	Biorad, München, Deutschland
ImageMaster VDS	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Kryo-Mikrotom	Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland
Mikrozentrifuge	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Milli-QUF Plus	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Objektträger Superfrost Color	Menzel, Braunschweig, Deutschland
PCR-Thermocycler	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
pH-Meter	WtW, Weilheim Deutschland
Photometer Ultrospec 2100pro	Amersham, Freiburg, Deutschland
Pipetten 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler	Köttermann, Edison, U.S.A.
Thermofast 96-well PCR Platte	Abgene, Epsom, Surrey, UK
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tubes 0,5 ml/1,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, U.S.A
Wasserbäder	Köttermann, Edison, U.S.A.
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2. Software und Online-Tools

Adobe Photoshop Version 5.5	Adobe systems, San Jose, CA, U.S.A.
Microsoft Office 2000	Microsoft, U.S.A.
Isis Version 3.02	Metasystems, Altusheim, Deutschland
Diskus Software Version 4.5	Hilgers, Königswinter, Deutschland
iCycler iQ Optical System Version 3.1	BioRad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.
Image Master VDS	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dynatech MRX Verson 1.3.1.	Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, U.S.A.
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html
Primer 3 Express	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

2.3. Materialien

2.3.1. Lymphomkollektiv

Für die Untersuchung wurden insgesamt 13 Fälle ausgewählt, die aus dem diagnostischen Routineeingang der pathologischen Institute der Universitäten Heidelberg und Ulm stammen. Die CGH-Daten waren bereits im Zusammenhang mit früheren Publikationen generiert worden und wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt [9]. Die Lymphome wurden anhand der Morphologie und immunhistologisch (CD20, CD5, CD23; CD11c, CD38 und Ki-67) als extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ (MZBL-GI) oder primäre diffus großzellige B-Zell-Lymphome des Gastrointestinal-Traktes (DLBL-GI) nach den gängigen Kriterien der aktuellen WHO klassifiziert (ICD-O:9699/3; 9680/3; Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues; Blue Books; pp 157-160). 5 der 13 Tumoren wurden als MZBL-GI klassifiziert, die übrigen 8 als diffus großzellige Lymphome (DLBL-GI). Eine durch CGH bestätigte genomische Amplifikation der chromosomalen Region 2p14-16 fand sich hierbei in 3 Fällen, zwei DLBL-GI und einem MZBL-GI. Die übrigen 10 untersuchten Lymphome wurden als Vergleichsgruppe untersucht. Für die real-time-PCR wurde ausschließlich kryoasserviertes Material verwendet, für die immunhistochemischen Untersuchungen

(soweit Material hierfür verfügbar) in Paraffin eingebettetes Tumormaterial. Das Gewebe wurde gemäß den deutschen Richtlinien "Für die (Weiter-) Verwendung von menschlichen Körpermaterialien für Zwecke der medizinischen Forschung" (Bundesärztekammer 2003, (Deutsches Ärzteblatt 2003; 100 A1632)) gehandhabt. Die Zustimmung zu diesen Studien wurde von der hiesigen Ethikkommission erhalten.

2.3.2. Reagenzien

Aceton	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Antifade Lösung	Vector Labs., Burlingame, CA, US
DNA-ladder (1kb)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTP's (20 mM)	Amersham, Freiburg, Deutschland
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Essigsäure (99,8 %)	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
First Strand cDNA Puffer (5x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fixogum	Marabu, Tamm, Deutschland
Formamid	Baker, Deventer, Niederlande
Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Baker, Deventer, Niederlande
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
H ₂ O ₂	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol (reinst)	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland

NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaSCN	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Roche, Mannheim, Deutschland
RNAsin (RNase-Inhibitor)	Promega, Madison, WI, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase	Amersham, Freiburg, Deutschland
Tris	USB, Cleveland, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.3.3. Lösungen und Puffer

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Lösungen und Puffer verwendet:

10x PBS	80,0 g NaCl; 2,0 g KCl; 11,6 g Na ₂ HPO ₄ ; 2,0 g KH ₂ PO ₄ ; in 10 L mH ₂ O; pH 7-7,3
10x TAE	48,4 g Tris; 11,4 ml Essigsäure; 20 ml 0,5 M EDTA; in 1 L mH ₂ O; pH 7
20x SSC	175,3 g NaCl; 88,2 g NaCitrat; in 1 L mH ₂ O; pH 7
AEC Lösung	4 mg AEC; in 0,5 ml Formamid; 2,1 ml 0,1 M Essigsäure; 7,4 ml 0,1 M NaCH ₃ COO; 5 µl H ₂ O ₂
Citratpuffer	1,9 g Citronensäure; 0,7 g NaOH; in 800 ml mH ₂ O; pH 6
DAPI Lösung	70 µl DAPI; in 70 ml 2 x SSC
Denaturierungs- lösung	49 ml Formamid; 7 ml 20 x SSC; 7 ml 0,05 M NaPO ₄ ; auf 70 ml mit mH ₂ O; pH 7
Waschlösung A	150 ml Formamid; 30 ml 20 x SSC; 120 ml mH ₂ O; pH 7,0-7,2
Waschlösung B	2,5 ml 20 x SSC; 500 ml mH ₂ O; pH 7,0-7,2
Waschlösung C	500 ml 2 x SSC; 0,5 ml Tween 20

2.4. Methoden

2.4.1. RNA-Extraktion mit Trizol

Die RNA wurde aus Gefrierschnitten von kryokonserviertem (-80° C) Tumormaterial gewonnen. Dazu wurden entsprechende Gefrierschnitte am Mikrotom geschnitten und in ein FastPrep-Röhrchen mit 1 ml Trizol-Reagenz aufgenommen. Dieses wurde dann 30 Sekunden in einer Zentrifuge mit 5000 U/min durchmischt, anschließend 300 µl Chloroform zugegeben und nach erneutem Durchmischen für 15 Sekunden und 5 Minuten Ruhezeit für 15 Minuten in einer Kühlzentrifuge bei 4° C und 12000 U/min zentrifugiert. Anschließend zeigte sich eine Auftrennung in 3 Phasen: am Boden des Röhrchens eine rote proteinhaltige Phenolchloroform-Phase, dazwischen eine weiße DNA-haltige und darüber die farblose RNA-haltige Phase. Diese wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert, 500 µl Isopropanol zugefügt und zur RNA-Präzipitation erneut bei 4° C und 12000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA gewaschen. Dazu wurde zunächst der Überstand abpipettiert, 1 ml Ethanol 70 % zugegeben, die Mischung kurz aufgemischt, anschließend 5 Minuten bei 4° C und 7500 U/min zentrifugiert, der Überstand erneut abpipettiert und der Ansatz im Brutschrank bei 37° C ca. 20 Minuten getrocknet, bis am Boden des Eppendorfgefäßes ein gelartiges Pellet übrig blieb. Dieses wurde in 50 µl 1x RT-Puffer vorsichtig resuspendiert und 5 Minuten im Schüttler bei 50° C gelöst. Anschließend wurden je Ansatz 2 µl DNase (10 U/ml) hinzugefügt und der Ansatz für 30 Minuten bei 37° C im Schüttler inkubiert, um eventuell vorhandene DNA zu verdauen. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße auf Eis gestellt, 1 ml Ethanol 100 % zugefügt und der Ansatz zum Ausfällen der RNA über Nacht bei -20° C in den Kühlschrank gestellt.

Am nächsten Tag wurden die Eppendorfgefäße für 10 Minuten bei 4° C und 12000 U/min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, die RNA erneut mit 1 ml Ethanol 70 % gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 12000 U/min und 4° C zentrifugiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet erneut im Brutschrank bei 37° C getrocknet, in 50 µl autoklaviertes DEPC-Wasser aufgenommen und 10 Minuten bei 55° C im Schüttler gelöst. Ein Aliquot von 5 µl wurde zur Qualitätskontrolle in ein RNase-freies einprozentiges Agarosegel mit 100 µl Ethidiumbromid pipettiert sowie eine photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration durchgeführt. Als

Qualitätsmerkmal der erfolgreichen RNS-Extraktion wurden dabei die deutlich sichtbaren Banden der 28S- und 16S-Fragmente der ribosomalen RNA gewertet.

2.4.2. RT-PCR zur Gewinnung von cDNA

Es wurden jeweils 5 µg RNA im entsprechenden Volumen in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit DEPC-Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurde 1 µl Random Hexamer-Primer hinzugefügt und der Ansatz für 5 Minuten bei 80° C denaturiert, kurz an zentrifugiert und auf Eis gestellt. Parallel wurde der Mastermix für die einzelnen Proben (je 12 µl) entsprechend

5,00 µl 5x RT-Puffer

2,50 µl DTT

1,25 µl DNTPs

1,25 µl DEPC-Wasser

1,00 µl RNAsin

1,00 µl Superscript Reverse Transkriptase

vorbereitet und hinzugefügt, so dass sich ein Gesamt-Reaktionsvolumen von 25 µl ergibt. Anschließend wurden alle Proben auf 12° C im Cyclor 5 Minuten gekühlt und das Syntheseprogramm für cDNA wie folgt durchlaufen:

20° C 5 min

37° C 15 min

45° C 30 min

50° C 15 min

95° C 2 min

Nach Kühlung auf 4° C wurden die Proben durch Zugabe von 175 µl Millipore-H₂O auf eine Konzentration von 25 ng/µl aufgefüllt und bei -20° C eingefroren. Ein Aliquot von 5 µl wurde zur Qualitätskontrolle in ein 1%iges Agarosegel mit 100 µl Ethidiumbromid pipettiert.

Anschließend wurde zur Primeraustestung und Optimierung der Reaktionsbedingungen einmalig eine PCR wie folgt durchgeführt:

Mastermix:

5 µl 10x PCR Puffer
 2,5 µl dNTPs
 2,5 µl Taq Polymerase
 1 µl forward Primer (aus 1:10 Verdünnung)
 1 µl reverse Primer (aus 1:10 Verdünnung)
 4 µl Template (100 ng cDNA)
 auf 50 µl mit mH₂O auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde jeweils in 0,5 ml Tubes auf Eis pipettiert. Die Proben wurden bei 95° C in den Thermocycler gestellt und folgendes Programm benutzt:

1 Zyklus:	95° C	5 min
2 Zyklen:	95° C	1 min
	63° C	45 sek
	72° C	1 min
2 Zyklen:	95° C	1 min
	62° C	45 sek
	72° C	45 sek
2 Zyklen:	95° C	1 min
	61° C	45 sek
	72° C	45 sek
30 Zyklen:	95° C	1 min
	60° C	45 sek
	72° C	45 sek
1 Zyklus:	72° C	10 min
abschließend:	10° C	

2.4.3. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von PCR-Produkten wurde mittels Elektrophorese in einem einprozentigen Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 150 ml einfachen TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst, danach wurden 150 µl Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) zur späteren Visualisierung der PCR Produkte hinzugefügt und die flüssige Agarose in eine Gelform gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 bis 120 Volt. Zur Längebestimmung wurde ein Standard von 100 bis 2000 Basenpaaren verwendet. Unter UV-Licht wurden Bilder der Agarosegele zur Dokumentation aufgenommen (Image Master VDS).

2.4.4. Quantitative Real-time-PCR

Die Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während bzw. am Ende eines PCR-Zyklus (daher der Name "Real Time") durchgeführt und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht nötig; die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist gering. Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von interkalierenden DNA-Farbstoffen (z.B. Ethidiumbromid oder SYBR[®] Green). Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein (interkalieren) bzw. binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus.

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Außerdem können keine Multiplex-Messungen durchgeführt werden. Der Vorteil ist, dass nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden kann, anhand derer die

Fragmentlänge(n) und dadurch die Spezifität bestimmt werden kann. Bei dieser Kurvenanalyse wird die DNA durch Temperaturerhöhung „aufgeschmolzen“ und dann die Temperatur langsam erniedrigt. Bei einer für jede Sequenz spezifischen Temperatur (abhängig vom Anteil der Wasserstoffbrückenbindungen) bildet sich aus den Einzelsträngen wieder ein Doppelstrang, so dass die Fluoreszenz ansteigt. Verschiedene Rechenmodelle werden für die Quantifizierung herangezogen, wobei meistens ein Referenz-Gen (z.B. für GAPDH, Actin, Tubulin) mitgemessen wird, um einen relativen Mengen-Vergleich durchzuführen (relative Quantifizierung).

Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 30 bis 50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung (o.a. Melting, Schmelzen): Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 95° C erhitzt um die Stränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen.
2. Primerhybridisierung (primer annealing): Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 2-3 C unter ihrem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 und 65° C. Wird die Temperatur falsch gewählt, kann das dazu führen, dass die Primer sich nicht (Temperatur zu hoch) oder an falschen Stellen (Temperatur zu niedrig) an der Ausgangs-DNA anlagern.
3. Elongation (Polymerisation, Verlängerung): Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet. Die Temperatur hängt nun von der verwendeten DNA-Polymerase ab (zwischen 68 und 72° C); die Zeit, die dieser Schritt benötigt, ebenfalls von der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll.

Die Messung wurde am i-Cycler der Firma Biorad (München, Deutschland) durchgeführt. Für die Untersuchung von *c-Rel* wurden zwei Primerpaare ausgewählt; eins lag im Transaktivierungsdomäne (TAD) codierenden Teil, das andere in der Rel-Homologie-Domäne (RHD). Die entsprechenden Primersequenzen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer und ihre Sequenzen für die zu untersuchenden Gene *c-Rel* und *BCL11A* die Housekeeping-Gene *GAPDH* und *LMNB1*.

Gen	Primer	Sequenz
<i>c-Rel</i> (RHD)	forward (Exon 5)	5'-CCT GTT GTC TCG AAC CCA AT-3'
	reverse (Exon 7)	5'-TCC CAA TCG TTC AAC ACA AA-3'
<i>c-Rel</i> (TAD)	forward (Exon 10)	5'-CGG TTC AAT TGG AGA AGG AA-3'
	reverse (Exon 11)	5'-CCA TTG AGG CAT GAT GTG AC-3'
<i>BCL11A</i>	forward (Exon 1)	5'-AAC CCC AGC ACT TAA GCA AA-3'
	reverse (Exon 2)	5'-CCA ATG GGA AGT TCA TCT GG-3'
<i>GAPDH</i>	forward (Exon 5)	5'-CGA GAT CCC TCC AAA ATC AA-3'
	reverse (Exon 6)	5'-TTC ACA CCC ATG ACG AAC AT-3'
<i>Lamin B1</i>	forward (Exon 5)	5'-CCA GGG AAG AAC TGA TGG AA-3'
	reverse (Exon 6)	5'-CCG CCA TCT CTC TCT CTT TG-3'

Zunächst wurden die *c-Rel*- bzw. *BCL11A*-Transkriptlevel in lymphatischem Gewebe, (Tonsillen) bestimmt, um einen Schwellenbereich zu definieren. In diesem qRT-PCR-Experiment wurden die cDNAs von drei Tonsillen bezüglich der *c-Rel*- und *BCL11A*-Transkriptlevel analysiert, um den Mittelwert und die Standardabweichung zu ermitteln. Wie in diesem Experiment wurde in jedem qRT-PCR-Durchlauf ein Gemisch dieser Tonsillen cDNAs als Kalibrator verwendet. Der normale Expressionsbereich wurde schließlich aus dem Mittelwert \pm der vierfachen Standardabweichung berechnet. Als interne Kontrollen wurden RNA Expressionen von *c-Rel* und *BCL11A* auf diejenige der ubiquitär exprimierten Gene *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) und *LMB1* (Lamin B1) bezogen.

Die relative RNA Expression wurde nach der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ berechnet, wobei C_T (Cycle Threshold), der von der Herstellersoftware (iCycler iQ, BioRad) ermittelte PCR-Zyklus ist, bei dem die SYBR Green-Fluoreszenz für das entsprechende Produkt die Hintergrundfluoreszenz überschreitet, d.h. die Amplifikation des Produkts in die exponentielle Phase übergeht. ΔC_T ist die Differenz zwischen dem Messwert für die Referenz, d.h. der Mittelwert von *GAPDH* und *LMNB1*, und dem Messwert für *c-Rel* bzw. *BCL11A*. $\Delta\Delta C_T$ ist die Differenz zwischen dem ΔC_T Wert für die Probe (MBL bzw. Zelllinie) und dem ΔC_T Wert für den Kalibrator (Tonsille).

Die Proben und DEPC-H₂O als NTC (non template control, Negativkontrolle) wurden in Dreifach-Bestimmungen auf einer Thermo-Fast 96-well PCR Platte (ABgene, Epsom, Surrey, UK) aufgetragen. Jeder Reaktionsansatz von 20 µl enthielt folgende Komponenten und die qRT-PCR Bedingungen waren wie folgt:

Reaktionsmix:

12,5 ng Template (cDNA)
 je 300 nM Primer
 10 µl SYBR Green Supermix
 auf 20 µl mit H₂O

Reaktionsbedingungen:

1 Zyklus:	95° C	3 min
38 Zyklen:	95° C	25 sek
	60° C	15 sek
1 Zyklus	95° C	1 min

Schmelzkurvenanalyse:

66° C 1 min + 0,5° C (59x)
 15° C

Zur Überprüfung der Spezifität der PCR Produkte wurde an das Programm zur Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse angefügt. Dabei wird mit einer Temperatur von 66° C begonnen, die sukzessive um 0,5° C erhöht wird bis 95° C erreicht sind,

so dass die PCR Produkte bei ihrer entsprechenden Temperatur denaturieren. Da der SYBR Green-Fluoreszenzfarbstoff nur in doppelsträngigen PCR Produkten integriert, nimmt die Fluoreszenz bei der Denaturierungstemperatur ab und es entsteht in der Temperaturkurve für jedes Produkt ein spezifischer Peak. Sollten in der PCR Reaktion weitere Produkte entstanden sein, würden diese in der Kurve als zusätzliche Peaks erscheinen.

2.4.5. Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH)

Zur Bestimmung der Genkopienzahl von *c-Rel* und *BCL11A* wurde die molekularzytogenetische Methode der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Dazu wurden genspezifische BAC (bacterial artificial chromosomes) Sonden verwendet (*BCL11A*-Lokus: BAC Klon RP11-440P5 markiert mit Spectrum Orange (SO; Vysis, Downers Grove, IL, USA); *c-Rel*-Lokus: BAC Klon RP11-373L24 markiert mit Spectrum Green (SG; Vysis)). Die FISH-Analyse wurde an Schnitten von paraffiniertem Tumorgewebe durchgeführt.

Die Schnitte wurden zunächst dreimal für 10 min in Xylol entparaffiniert und zweimal für 5 min in Ethanol (absolut) dehydriert. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurden die Objektträger 20 min in eine Küvette mit 0,2 M Salzsäure gestellt, 3 min in mH_2O und weitere 3 min in zweifachem SSC gewaschen. Danach folgte eine Behandlung für 30 min in einmolarer NaSCN-Lösung (80° C), anschließend wurden die Präparate erneut gewaschen. Es folgte ein Verdau mit Pepsin (0,2 mg/ml Pepsin in HCl) für 8 bis 10 min; nach zweimaligem Waschen für 5 min in zweifachem SSC wurden die Proben 15 min in einprozentigem Paraformaldehyd plus 40 ml 0,5 M MgCl_2 -Lösung fixiert. Die Schnitte wurden 10 min in Denaturierungslösung bei 80° C inkubiert und danach je 5 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 %, absolut) auf Eis dehydriert. Der Sondenmix wurden entsprechend der Herstellerangaben der Firma Vysis zusammen gegeben (0,2 μl je Sonde + 1,4 μl Puffer + 0,4 μl mH_2O) und 5 min bei 72° C denaturiert, bevor sie auf das zuvor markierte Areal pipettiert wurden. Dann wurde der Bereich mit einem Deckglas (\varnothing 10 mm) und Fixogum luftdicht versiegelt und bei 37° C über Nacht in einer feuchten Kammer hybridisiert.

Nach Entfernen des Deckglases und des Fixogums wurden die Präparate dreimal 5 min in Waschlösung A (42° C) und dann dreimal 5 min in Waschlösung B (60° C) unter Schütteln gewaschen. Danach wurden die Schnitte zur Gegenfärbung der DNA 5 min in einer DAPI-Lösung (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) bei RT (Raumtemperatur) inkubiert und anschließend 3 min in Waschlösung C gewaschen. Um die Fluoreszenz vor zu schnellem Ausbleichen zu schützen wurden die Präparate in Antifade-Lösung (Vectashield) eingedeckelt.

Die Dokumentation der FISH Präparate erfolgte an einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop mit CCD (charged coupled device) Kamera; mit der Isis Software von Metasystems wurden repräsentative Bilder der jeweiligen Präparate aufgenommen. Zur weiteren Darstellung der Abbildungen wurden mit der Adobe Photoshop Software gearbeitet.

2.4.6. Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Zum Nachweis der Proteinexpression wurden immunhistochemische bzw. immunzytochemische Analysen durchgeführt, mit denen gleichzeitig die subzelluläre Lokalisierung des untersuchten Antigens bestimmt werden konnte. Dafür standen Paraffinschnitte von 16 der 20 MBL Geweben sowie Schnitte von paraffinierten Zellpellets von MedB-1, Karpas1106P und RC-K8 zur Verfügung. Zur Markierung von c-Rel-Proteinen wurden zwei polyklonale Antikörper (Kaninchen) verwendet, die freundlicherweise von Dr. N. Rice und Dr. M. Ernst des National Cancer Institute – Frederick Cancer Research and Development Center (NCI-FCRDC, Frederick, MD, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Der c-Rel-Antikörper #1158 (Aminosäuren 66 – 84) bindet an ein N-terminales Epitop der RHD (Rel-Homologiedomäne) und der Antikörper #265 an ein C-terminales Epitop (Aminosäuren 573 – 587) der TAD (Transaktivierungsdomäne). Zur Bestimmung der Expression und Lokalisation des Bcl11A-XL-Proteins wurde der monoklonale Antikörper Bcl11A/123 (aus Maus) freundlicherweise von Dr. K. Pulford (Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, UK) und Prof. M. Dyer (MRC Toxicology Unit/Leicester University, UK) zur Verfügung gestellt.

Der Nachweis von gebundenem Primär-Antikörper wurde mit dem Envision System (Dako, Carpintera, CA, USA) für die Detektion gebundenen Antikörpers nach Herstellerangaben durchgeführt. Nachdem die Schnitte auf den Objektträgern dreimal 10 min in Xylol entparaffiniert und eine Rehydrierung durch eine absteigende Acetonreihe (Aceton; absolut, 70 %, 40 %) erfolgte, wurden sie zur Rückgewinnung des Antigens für 20 min in 10 mM Citratpuffer (pH 6) in der Mikrowelle erhitzt. Die Objektträger wurden in einer Küvette unter fließendem Leitungswasser abgespült und danach in eine feuchte Kammer gelegt. Bevor 100 µl des spezifischen Primär-Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung zugegeben wurden (c-Rel 1:100; Bcl11A/123 1:10), wurde der Schnitt auf dem Objektträger mit einem Fettstift markiert.

Im Anschluss an die Inkubation von 30 bis 60 min wurde der ungebundene Primär-Antikörper in einfachem PBS ausgewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus oder anti-Kaninchen; Envision), der mit HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt ist. Die Objektträger wurden in PBS gewaschen und zur Visualisierung wurden 100 µl AEC-Lösung (3-amino-9-ethyl-carbazole), welches als Chromogen für die Peroxidase fungiert, auf den Schnitt pipettiert. Die Färbung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und schließlich durch Spülen unter Leitungswasser abgestoppt. Um die Gewebestruktur darzustellen, wurden die Schnitte mit Hämalaun gegen gefärbt und 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut, bevor das Präparat in Kaisers Glycerolgelatine eingedeckelt wurde.

Für die Dokumentation wurden Bilder der Präparate mit einem Axioskop Fotomikroskop (Zeiss), einer CCD (charged coupled device) Kamera und der Diskus Software aufgenommen. Zur weiteren Darstellung der Abbildungen wurde mit der Adobe Photoshop Software gearbeitet.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Vermehrung der Kopienzahl für die Proto-Onkogene *c-Rel* und *BCL11A* zu erhöhter RNA- und Proteinexpression führt. Dieser postulierte Gendosismechanismus soll hier an 13 Lymphomen des Gastrointestinaltraktes analysiert werden. In Fällen mit MZBL-GI sowie DLBL-GI wurden mittels CGH in 3/13 Fällen (23 %) DNA-Zugewinne in der chromosomalen Region 2p16 gefunden, die die Loci für Gene *c-Rel* und *BCL11A* beinhalten. In der Literatur sind diese vielfach als Zielgene dieser chromosomalen Region, nicht nur im MZBL, beschrieben worden.

3.1. Genomischer Status von *c-Rel* und *BCL11A*

Von 13 Fällen mit B-Zell-Lymphomen des Gastrointestinaltraktes wurde an Paraffinmaterial von 12 Fällen mittels FISH (Fluoreszenz in situ-Hybridisierung) eine Analyse des Genomstatus durchgeführt, d.h. die Kopienzahl von *c-Rel* und *BCL11A* bestimmt. Von drei Fällen (1, 2, 3) war aufgrund vorhergehender CGH-Untersuchungen bekannt, dass sie über vermehrtes Material von Chromosom 2 einschließlich der Bande 2p16 verfügen. Zur FISH Analyse wurden spezifische BAC (bacterial artificial chromosome) Sonden für die *c-Rel*- (RPCI-49805; Biotin-gelabelt) bzw. *BCL11A*- (RCPI-P544; Digoxigenin-gelabelt) Loci verwendet.

Tabelle 2: Ergebnisse der FISH-Analysen. R rot (*BCL11A*-Signal; BCL B cell lymphoma), G grün (*c-Rel*-Signal), F Fusionsignal aufgrund räumlicher Nähe, co Genkopien, CGH comparative genomic hybridization, FISH Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Fall	CGH (amp2p)	Auszählung FISH	Bewertung
1	amp2p	94 % 5F, 1 % 6F, 5 % 4F1R1G	5-6 co
2	amp2p	22 % 2F, 63 % 3F, 10 % 4F, 5 % 3F1R1G	3-4 co
3	amp2p	6 % 2F, 72 % 3F, 6 % 4F, 2 % 3F2R, 4 % 1F	3(4) co
4	andere	87 % 2F, 3 % 3F, 4 % 1F1R1G, 6 % 2F1R	2 co
5	o.B.	87 % 2F, 11 % 3F, 2 % 1F1R1G	2-3 co
6	o.B.	79 % 2F, 19 % 1F, 2 % 1F1R1G	1-2 co
7	andere	93 % 2F, 3 % 3F, 4 % 1F1R1G	2 co
8	andere	64 % 2F, 29 % 3F, 3 % 1F1R1G, 3 % 4F, 1 % 1F	2-3(4) co
9	andere	93 % 2F, 1 % 1F1R1G, 6 % 1F	2 co
10	andere	92 % 2F, 7 % 3F, 1 % 1F1R1G	2(3) co
11	andere	81 % 2F, 11 % 3F, 6 % 1F1R1G, 2 % 1F	2-3 co
12	andere	78 % 2F, 2 % 3F, 5 % 1F1R1G, 15 % 1F	1-2 co
13	o.B:	Kein Material für FISH	

Die Ergebnisse der FISH-Analyse korrelierten dabei mit Daten der CGH (siehe Abbildung 3 und Tabelle 2). In allen 3 Fällen mit Zugewinn in der chromosomalen Region 2p16 konnten zusätzliche Kopienzahlen nachgewiesen werden (3-6). Weiterhin fanden sich Zellen mit mehr als 2 Kopien in Lymphomen ohne Zugewinn auf 2p in der CGH.

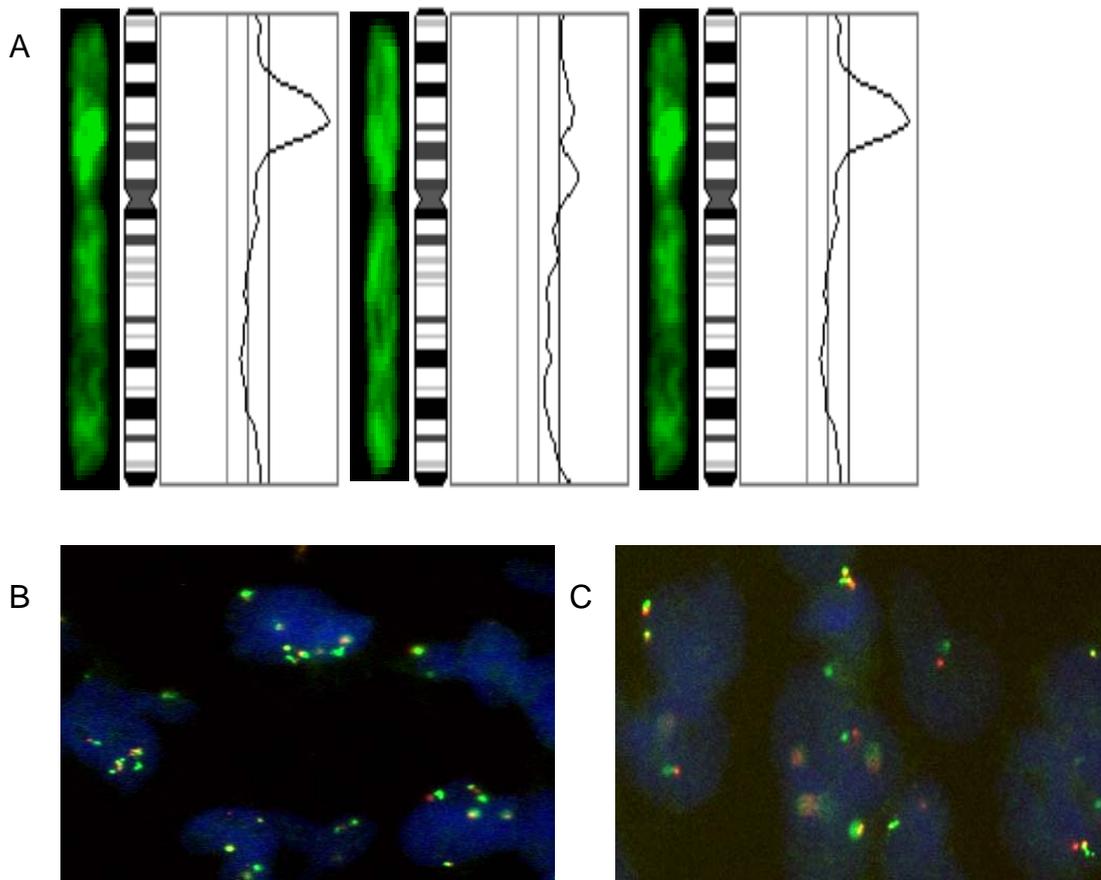


Abbildung 3: Dargestellt sind die CGH-Profile von Chromosom 2 der Fälle 1-3 (A, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. T. Barth) sowie exemplarisch FISH-Analysen der Fälle 1 (B) mit 4-5 Genkopien/Zelle und (C) 4 mit 2 Genkopien/Zelle. Eingesetzt wurden jeweils genspezifische Sonden für *c-Rel* (grün) und *BCL11A* (rot). CGH comparative genomic expression, FISH Fluoreszenz in situ Hybridisierung

3.2. RNA-Expressionslevel von *c-Rel* und *BCL11A*

Zur Bestimmung der Transkriptlevel von *c-Rel* und *BCL11A* wurde eine quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Dazu wurde aus kryoasserviertem Tumormaterial RNA extrahiert und mittels reverser Transkription cDNA gewonnen. Diese diente als Ausgangsmaterial (template) für die qRT-PCR. Als Bezugsgröße für die RNA-Expression der beiden Gene in humanem lymphatischem Gewebe wurde in dieser Arbeit die RNA bzw. cDNA aus drei unterschiedlichen Tonsillen verwendet. Ein Gemisch dieser cDNAs diente in jedem qRT-PCR Experiment als Kalibrator. Zur Berechnung der relativen Transkriptniveaus von *c-Rel* und *BCL11A* wurden die RNA Expressionen der beiden „housekeeping“-Gene *GAPDH* und *LMNB1* gemittelt und anschließend die RNA Expression der Zielgene darauf bezogen.

Zur relativen Quantifizierung niedriger, normaler oder erhöhter RNA Expression der Zielgene *c-Rel* bzw. *BCL11A* wurden die Werte für die drei Tonsillen in einem separatem qRT-PCR Experiment jeweils bestimmt. Dazu wurde der Mittelwert berechnet und die vierfache Standardabweichung subtrahiert bzw. addiert. Auf diese Weise wurde der Bereich zuverlässig festgelegt, in dem die RNA-Expression von *c-Rel* bzw. *BCL11A* in den Proben unterhalb, innerhalb oder oberhalb der Expression in den Tonsillen liegt. Im Folgenden wird dieser als normaler Expressionsbereich oder normale Expression bezeichnet. Die Schwellenwerte (cut off) wurden hierbei wie folgt festgelegt: *c-Rel* TAD/RHD 0,37-1,49, *BCL11A* 1,37-3,69.

Zur Detektion von *c-Rel*-Transkripten wurden zwei Primerpaare verwendet: Das erste Primerpaar amplifiziert ein Fragment der Rel-Homologie-Domäne (RHD) und das zweite Primerpaar ein Fragment der Transaktivierungsdomäne (TAD). Grund für die getrennte Detektion beider Domänen ist die Beschreibung trunkierter Proteinvarianten in lymphombasierten Zelllinien [46].

Als eine interne Kontrolle standen cDNAs von HEK (human embryonic kidney) 293-Zellen zur Verfügung, von denen ein Teil mit einem Leervektor (H-) und ein anderer Teil mit einem *c-Rel*-Expressionsvektor (H+) transfiziert wurden [92]. Die RNA-Expression von *c-Rel* ist in den HEK 293-Zellen mit Leervektor wie erwartet niedriger und in den mit *c-Rel* transfizierten Zellen höher als der normale Expressionsbereich.

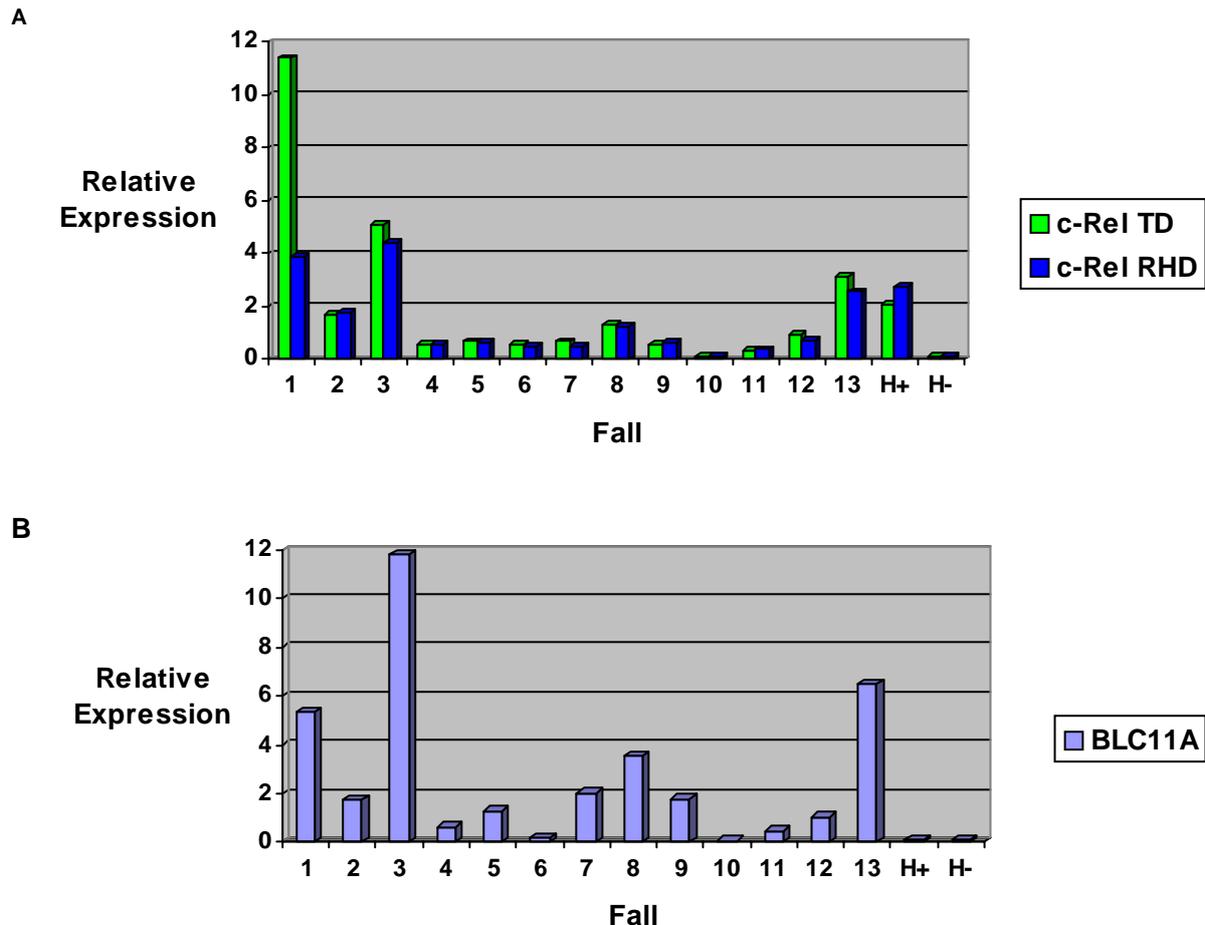


Abbildung 4 zeigt die Daten für die relative RNA-Expression von *c-Rel* (A) und *BCL11A* (B). TD Transaktivierungsdomäne, RHD Rel-Homologiedomäne, BCL B cell lymphoma H+ *c-Rel*-transduzierte HEK-Zellen H- Leervektor-transduzierte HEK-Zellen, HEK human embryonic kidney

Hierbei zeigt sich bei 2 Fällen (1 und 3) mit Zugewinn an genomischem Material auf 2p eine deutliche Überexpression von *c-Rel* auf RNA-Ebene (Abbildung 4), jedoch findet sich auch ein Fall (13) ohne Zugewinn in der CGH, der eine vergleichbar hohe Expression aufweist. Ähnlich stellt sich die Datenlage bezüglich der Expression von *BCL11A* dar; auch hier zeigen 2/3 CGH-positiven Fällen (1 und 3) eine deutliche Überexpression. Zur Qualitätskontrolle der jeweiligen qRT-PCR wurde nach jedem Lauf eine Gelelektrophorese in 1,5 %igem Agarosegel durchgeführt, um zusätzlich zur durchgeführten Schmelzkurvenanalyse die Amplifikation eines einzelnen DNA-Fragmentes definierter Basenpaarlänge verifizieren zu können. Die Durchführung der PCR erfolgte jeweils in Triplikaten, um eine Kontamination oder Evaporation während des Laufes auszuschließen, als Negativkontrolle wurde autoklaviertes Aqua dest. verwendet.

3.3. Expression und intrazelluläre Verteilung der c-Rel- und BCL11A-Proteine

Zur Analyse der Proteinexpression der Produkte von *c-Rel* und *BCL11A* konnten 11 von 13 Fällen mittels Immunhistochemie (IHC) an Paraffinmaterial untersucht werden. Für die Analyse von c-Rel-Proteinen wurden zwei polyklonale Antikörper (Ak) verwendet, wobei der Ak #1158 ein Epitop der RHD und der Ak #265 ein Epitop der TAD von c-Rel binden. Die Auswertung der IHC und ICC Färbungen und Intensitäten für c-Rel erfolgten im Vergleich zu denen c-Rel-positiver Zellen in den Keimzentren humaner Tonsillen (Abbildung 5).

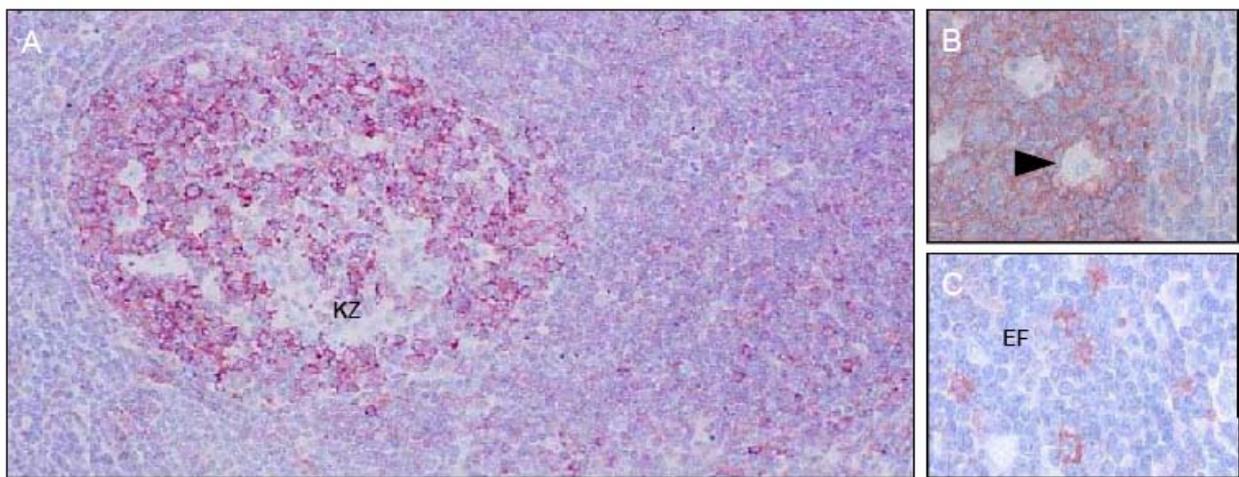


Abbildung 5: Expression von c-Rel in humaner Tonsille

Die Zellen im Keimzentrum (KZ) zeigen eine starke Färbung für c-Rel-Protein (hier: IHC mit c-Rel-Antikörper #265). B zeigt einen Ausschnitt vom Rand des Keimzentrums, C Zellen des extra-follikulären Bereiches (EF) sind bis auf einzelne Immunoblasten c-Rel negativ. Keimzentrumsmakrophagen in B (Pfeil) sind c-Rel negativ. IHC Immunhistochemie

Für die Expressionsanalyse des BCL11A-Proteins wurde der monoklonale Antikörper BCL11A/123 verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Karen Pulford), der spezifisch die BCL11A-XL-Isoform detektiert. Zur Auswertung der Bcl11A-XL Proteinmarkierung wurde die starke Färbung von Zellen in der tonsillären Mantelzone und in der extrafollikulären Region als Vergleich herangezogen (Abbildung 6). Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen für c-Rel sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

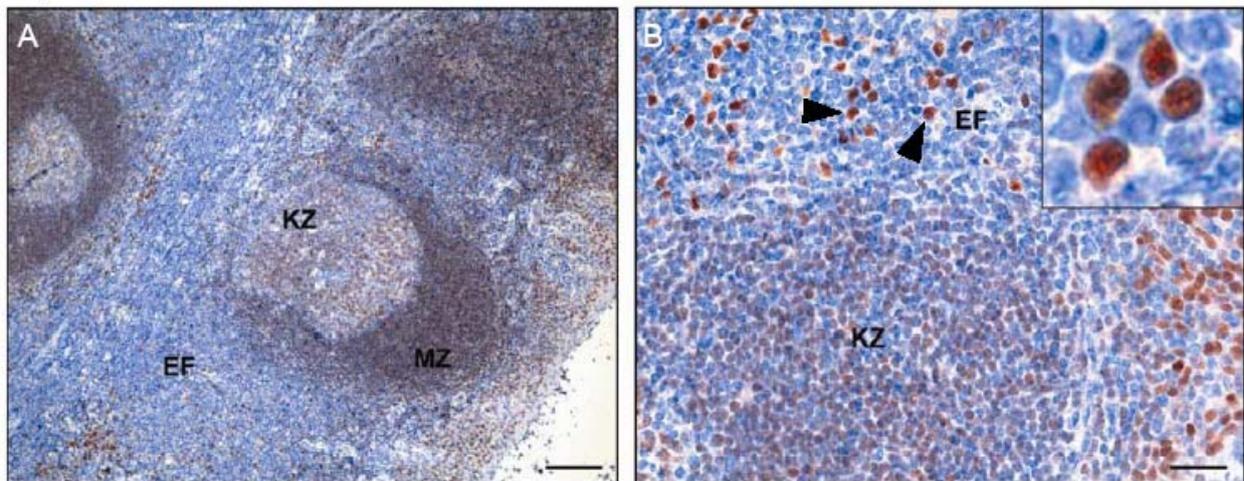


Abbildung 6: BCL11A-XL Proteinexpression in humaner Tonsille.

In A ist die positive Färbung für BCL11A-XL in den verschiedenen Arealen der Tonsille zu erkennen. Schwach BCL11A-XL-positive Zellen finden sich in den Zellen des Keimzentrums (KZ). Die Zellen der Mantelzone sowie einige Zellen im extrafollikulären Raum (EF) sind stark positiv für BCL11A-XL (B). Die Pfeilköpfe zeigen auf zwei repräsentative stark Bcl11A-XL positive Zellen im extrafollikulären Raum.

KZ-Keimzentrum, MZ-Mantelzone, EF-extrafollikulärer Raum, BCL B cell lymphoma

Skala (A)=100 µm, Skala (B)=50 µm.

Insgesamt sieht man eine deutliche zytoplasmatische Akkumulation von c-Rel-Protein in den Fällen mit durch CGH bestätigter Amplifikation im Bereich der chromosomalen Region 2p13-16., während sich im Kern nur in 10-50 % der Zellen c-Rel-Protein nachweisen lässt. Bei den übrigen Fällen ist die Verteilung sehr heterogen, so findet sich im Fall 9 beispielsweise ebenfalls in allen Zellen zytoplasmatisches c-Rel, während andere Fälle kaum oder nur eine schwache Anreicherung zeigen. Abbildung 7 zeigt exemplarisch den Fall 1.

Tabelle 3: Ergebnisse der Immunhistochemie für die intrazelluläre Anfärbung von c-Rel-Protein.

TAD Transaktivierungsdomäne, RHD Rel-Homologiedomäne, cyt zytoplasmatische Anfärbung, nuc nukleäre Anfärbung IHC Immunhistochemie

Fall	Immunhistochemie Rel TAD (#265)		Immunhistochemie Rel RHD (#1158)	
1	cyt.: 100 %	nuc.: 50 %	cyt.: 100 %	nuc.: 50 %
2	cyt.: 100 %	nuc.: 40 %	cyt.: 100 %	nuc.: 10-20 %
3	cyt.: 100 %	nuc.: 5-10 %	cyt.: 100 %	nuc.: neg.
4	cyt.: 30 %	nuc.: 10 %	cyt.: 30 %	nuc.: 10 %
5	cyt.: 70-80 %	nuc.: 10-20 %	cyt.: schwach	nuc.: 10-20 %
6	cyt.: 20-30 %	nuc.: 10 %	cyt.: schwach	nuc.: 10 %
7	cyt.: 70-80 %	nuc.: 10 %	cyt.: schwach	nuc.: neg.
8	cyt.: 10-20 %	nuc.: 5 %	cyt.: schwach	nuc.: 5 %
9	cyt.: 100 %	nuc.: 50 %	cyt.: 100 %	nuc.: 50 %
10	Kein Material für IHC			
11	cyt.: 30 %	nuc.: 5 %	cyt.: 100 %	nuc.: 10 %
12	cyt.: neg.	nuc.: neg.	cyt.: 10 %	nuc.: neg.
13	Kein Material für IHC			

Die Verteilung des Bcl11A-XL-Proteins ist ebenfalls heterogen, in der Mehrzahl der Fälle findet sich eine deutliche nukleäre Anreicherung; jedoch gibt es auch Fälle ohne detektierbares Bcl11A-XL.

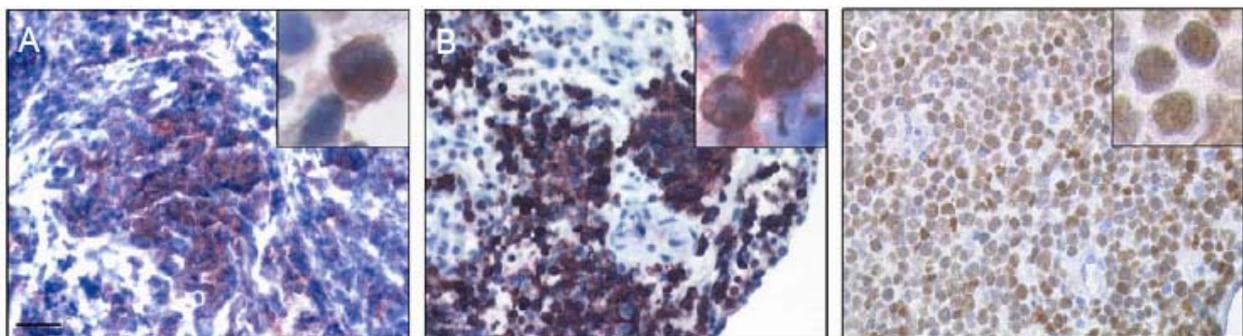


Abbildung 7: Fall 1: Immunhistochemie c-Rel (A RHD; B TD) und Bcl11A-XL (C). Vergrößerung 20x, Insert 40x. RHD Rel-Homologiedomäne TD Transaktivierungsdomäne

In Tabelle 4 sind alle Ergebnisse aus dieser Arbeit zusammengefasst. Als Schwellenwerte für die relative Über- bzw. Unterexpression wurden ermittelt: Für *c-Rel* (RHD und TAD) 1,49/ 0,37; für *BCL11A* 3,69/ 1,37.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse. Für die Bewertung des immunhistochemischen Nachweises von BCL11A-XL gilt:
+ bis 30 % positive Zellen, ++ 30-70 % positive Zellen, +++ mehr als 70 % positive Zellen.

Fall	CGH (nur 2p)	FISH c-Rel	FISH BCL 11A	RNA c-Rel (TAD)	RNA c-Rel (RHD)	RNA BCL11A	IHC c-Rel TD (#265)	IHC c-Rel RHD (#1158)	BCL11A
1 (DLBL)	amp 2p	5 (94%)	5 (94%)	11,39	3,89	5,35	c: + 100%; n: + 50%	c: + 100%; n: + 50%	+++
2 (DLBL)	amp 2p14-p15	3 (63%) 4 (15%)	3 (63%) 4 (15%)	1,73	1,78	1,75	c: + 100%; n: + 40%	c: pos; n: ~10-20%	negativ
3 (MZBL)	amp 2p14-p16	3(72%)	3 (72%)	5,11	4,4	11,8	c: + 100%; n: +5-10%.	c: + 100%; n: neg.	++
4 (DLBL)	andere	2 (87%)	2 (87%)	0,56	0,57	0,65	c: (+) 30%; n: (+)	c: (+) 30%; n: (+)	((+))
5 (DLBL)	o.B.	2 (87%)	2 (87%)	0,68	0,67	1,29	c: + 70-80%; n: + 20%	c: (+); n: + 10-20%	(+)
6 (DLBL)	o.B.	2 (79%) 1 (19%)	2 (79%) 1 (19%)	0,6	0,52	0,18	c: + 20-30%; n: + 10%	c: +; n: + 10%	negativ
7 (DLBL)	andere	2 (93%)	2 (93%)	0,69	0,49	2,02	c: + 70-80%; n: + 10%	c: +; n: -	+++
8 (DLBL)	andere	2 (64%) 3 (29%)	2 (64%) 3 (29%)	1,35	1,25	3,55	c: + 10-20%; n: + 5%	c: (+); n: + <5%	(++)
9 (DLBL)	andere	2 (93%)	2 (93%)	0,56	0,65	1,78	c: + 100%; n: + 50%	c: + 100%; n: + 50%	(+++)
10 (MZBL)	andere	2 (92%)	2 (92%)	0,12	0,11	0,06	c: -; n: -	n.a.	negativ
11 (MZBL)	andere	2 (81%) 3 (17%)	2 (81%) 3 (17%)	0,33	0,39	0,47	c: (+) 30%; n: (+) 5%	c: + 100%; n: + 10%	(+)
12 (MZBL)	andere	2 (78%) 3 (17%)	2 (78%) 3 (17%)	0,93	0,74	1,05	c: -; n: -	c: + 10%; n: -	negativ
13 (MZBL)	o.B.	k.M.	k.M.	3,15	2,58	6,5	k.M.	k.M.	k.M.

4 Diskussion

Amplifikationen von genetischem Material wurden initial in Mammakarzinomen und Neuroblastomen beschrieben [97]. Über die Relevanz von DNA-Amplifikationen in B-Zell-Lymphomen ist dagegen weniger bekannt. In verschiedenen aggressiven B-Zell-Lymphomen, wie z.B. diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL), mediastinalen B-Zell-Lymphomen (MBL), folliculären B-Zell-Lymphomen (FL) und Hodgkin-Lymphomen (HL), konnte durch vergleichende genomische Hybridisierung (CGH, comparative genomic hybridization) gezeigt werden, dass auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 sehr oft ein Zugewinn an genetischem Material nachzuweisen ist; die Definition der minimal überrepräsentierten Region beinhaltet die Banden 2p13-p16. Durch eine Vielzahl von CGH-Studien an B-Zell-Lymphomen kristallisierte sich heraus, dass diese Region zu den häufigsten aberranten Region in B-Zell-Lymphomen überhaupt zählt. Als attraktivste Kandidatengene dieser Region gelten die beiden Proto-Onkogene *c-Rel* und *BCL11A* in der chromosomalen Bande 2p16, die in einem Abstand von etwa 300 Kilobasen liegen. Anfänglich stand aufgrund der größeren Informationsmenge über das transformierende Potential von *c-Rel* dieses im Mittelpunkt der Untersuchungen und wurde oftmals in erhöhter Kopienzahl durch FISH mittels genspezifischer Sonden oder Southern Blot-Analysen in DLBCLs [35,82], in MBLs [44,78], in FLs [31] und in HLs [9] gefunden. *BCL11A* rückte etwas später in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Studien und konnte erstmals 2001 von Satterwhite und Kollegen in B-Zell-NHLs beschrieben und anschließend von Martin-Subero *et al.* (2002) in HLs konsistent koamplifiziert mit *c-Rel* nachgewiesen werden [65,94].

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde in Versuchsreihen auf DNA-, Transkript- und Proteinebene geprüft, ob eine Überrepräsentation der Gene *c-Rel* und *BCL11A* in extranodalen Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen (MZBL-GI) zu einer erhöhten Expression der entsprechenden Transkripte und Proteine führt. Hierzu wurde anhand von 13 B-Zell-Lymphomen des GI-Traktes (MZBL-GI und DLBL-GI) die Zahl der Genkopien mittels FISH bestimmt und anschließend die Transkriptlevel (mittels real-time-PCR) sowie die Proteinexpression (mittels Immunhistochemie) untersucht. Für Genamplifikationen ist ein sogenannter Gendosismechanismus (engl.: gene dose effect) postuliert; d.h. eine Amplifikation genetischer Sequenzen

führt zu erhöhter Transkription und Translation der Genprodukte. Es wird hierbei davon ausgegangen, dass die onkogene Aktivität durch die aberrant erhöhte Expression des entsprechenden Proteins erworben wird und es zu einer Dysregulation normaler physiologischer Prozesse (z.B. Zellproliferation oder -überleben) kommt. In der Literatur beschriebene Beispiele für diesen Mechanismus sind Amplifikationen von *BMI1* in Mantelzell-Lymphomen [10], *CCND3* und *BYSL* in DLBCLs [48,], *MCM7* in Prostatakarzinomen [86], *N-myc* in Neuroblastomen [54], *Her2/neu* und *Six1* in Mammakarzinomen [67,84] sowie *CDK4* und *MDM2* in malignen Melanomen [72]. Einige Proto-Onkogene können sowohl durch DNA-Amplifikationen als auch durch chromosomale Translokationen onkogen aktiviert werden, wie z.B. *CCND1* in Mammakarzinomen [85], *MALT1* in B-NHLs [93] oder *BCL2* in DLBCLs [69].

4.1. Der genomische Status von *c-Rel* und *BCL11A* in malignen B-Zell-Lymphomen

Joos et al. beschrieben 1996 erstmals häufige segmentale Imbalancen der Chromosomen 2, 9, 12 und X in der CGH bei mediastinalen B-Zell-Lymphomen. Aufgrund von high level-Amplifikationen auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 konnte die Konsensusregion auf die chromosomalen Banden 2p13-p16 eingegrenzt und *c-Rel* als ein Kandidatengen der Lymphomgenese im Bereich dieses Amplikons identifiziert werden [44].

Houldsworth et al. fanden ebenfalls 1996 erhöhte Kopienzahlen des *c-Rel*-Gens in diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) mittels Southern Blot [35]. Inzwischen wurden weitere B-Zell-Lymphome mit genomischen Zugewinnen und Amplifikationen von 2p16 einschließlich *c-Rel* beschrieben. In Hodgkin-Lymphomen wurden in 56 % (22/39) bzw. 55 % (24/44) vermehrte Kopienzahlen von *c-Rel* detektiert [45,65].

Satterwhite et al. identifizierten 2001 *BCL11A* als weiteres potentiell Kandidatengen in der Zielregion 2p13 und zeigten zum einen eine vermehrte Kopienzahl von *BCL11A* in B-NHLs sowie zum anderen eine gemeinsame Amplifikation von *BCL11A* und *c-Rel* [94].

Martin-Subero et al. beschrieben 2002 eine erhöhte Kopienzahl von *c-Rel* und *BCL11A* in 55% der untersuchten Hodgkin-Lymphome [65]. Lediglich in einem der HL-Fälle wurde eine Amplifikation ausschließlich von *c-Rel* beobachtet, so dass *c-Rel* als das wahrscheinlichere relevante Kandidatengen der Amplifikation in der chromosomalen Region angesehen wurde. Amplifikationen von *c-Rel* wurden außerdem in kutanen CD30-positiven anaplastisch-großzelligen Lymphomen gefunden[63].

Weniger et. al. zeigten 2006 eine erhöhte Kopienzahl von *c-Rel* und *BCL11A* in 75 % (15/20) mediastinaler B-Zell-Lymphome. Dies stellt nicht nur die höchste beschriebene Aberrationsrate für diese beiden Gene in B-Zell-Lymphomen, sondern auch die häufigste genetische Aberration in MBLs überhaupt dar. Für B-Zell-Lymphome des GI-Traktes liegen aktuell keine Daten bezüglich genetischer Amplifikationen in der Region 2p16 vor [112,113].

In der vorliegenden Arbeit wurden durch den Einsatz von spezifischen Sonden für *c-Rel* und *BCL11A* mittels FISH die Befunde einer vorhergegangenen CGH-Analyse bestätigt. Hierbei wurden in 3/13 Fällen (23%) von B-Zell-Lymphomen des GI-Traktes (MZBL-GI und DLBL-GI) Zugewinne an genetischem Material in der chromosomalen Region 2p13-2p16 gefunden. Die Resultate der FISH zeigten in 2 dieser Fälle sowie in einem Fall ohne Zugewinn in der CGH-Analyse eine erhöhte Kopienzahl (3-4) von *c-Rel* und *BCL11A*.

4.2. Transkriptlevel von *c-Rel* und die Proteinexpression von c-Rel in B-Zell-Lymphomen des GI-Traktes

Basierend auf Beobachtungen, dass eine vermehrte Expression von *c-Rel* zu einer Transformation hämatopoetischer Zellen führen kann [108] und der häufigen Überrepräsentation von *c-Rel* in B-Zell-Lymphomen wird eine vermehrte Kopienzahl von *c-Rel* als Ursache für eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B diskutiert. In situ-Hybridisierungen von Mausembryos und adulten Geweben zeigen eine Expression von *c-Rel*-mRNA in sich entwickelnden hämatopetischen Zellen [109]. Das c-Rel-Protein wird in allen Stadien der B-Zellentwicklung translatiert; die höchsten Expressionslevel finden sich dabei in reifen B-Zellen, in denen es konstitutiv nukleär nachgewiesen werden kann [29,33,49,105].

Die in der vorliegenden Arbeit als Referenz für die Expressionsanalyse verwendeten humanen Tonsillen zeigten eine starke Expression des *c-Rel*-Proteins in den Keimzentrumzellen und in einigen Zellen der extrafollikulären Bereiche. Dies entspricht den o.g. Daten und unterstützt die Annahme; dass *c-Rel* in der Ontogenese der B-Zellen und in der Keimzentrumreaktion eine Rolle spielt (Abbildung 5).

Verschiedene Autoren haben sich der Fragestellung angenommen, ob eine Erhöhung der Kopienzahl von *c-Rel* in Lymphomen zu einer erhöhten Transkription und Translation und letztlich zu einer konstitutiven Aktivierung von NF- κ B führt, kommen dabei jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen [30]. Eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B wurde zuerst in Zelllinien von Hodgkin-Lymphomen und später in mikrodisssezierten Hogkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS) beschrieben, wobei die NF- κ B-Aktivierung durch p50, p65 und *c-Rel* vermittelt wurde [7,12]. In einer der ersten Studien, die sich mit dem Gendosismechanismus von *c-Rel* beschäftigte, wurden 2003 von Barth et al. klassische Hodgkin-Lymphome mittels FICTION untersucht [9]. Diese Studie basierte auf der Beobachtung, dass HRS des klassischen Hodgkin-Lymphoms oftmals Zugewinne und Amplifikationen von *c-Rel* aufweisen [65]. Beim Vergleich klassischer Hodgkin-Lymphome mit erhöhtem und mit diploidem *c-Rel* konnte mittels Immunhistochemie und FICTION (fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigations of neoplasms) gezeigt werden, dass in der ersten Gruppe ein signifikant höherer Anteil der HRS eine nukleäre Färbung für *c-Rel* zeigte. In Analogie dazu zeigten Savage et al. ebenfalls 2003 eine nukleäre Färbung für *c-Rel* in 5 von 6 MBLs, die mit einer erhöhten mRNA-Expression von *c-Rel* korrelierte. Allerdings fehlte in dieser Untersuchung die Bestimmung der Kopienzahl von *c-Rel*, so dass die Frage nach einem Gendosismechanismus in dieser Untersuchung letztlich ungeklärt bleibt [95].

Kalaitzides et al. publizierten 2002 die Beobachtung, dass die Zelllinie RC-K8 (die aus einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom etabliert wurde) eine trunkierte Form des c-Rel-Proteins exprimiert, welches zu einer konstitutiven Aktivierung von NF- κ B führt [46,47]. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die immunhistochemischen Untersuchungen für c-Rel mit 2 Antikörpern durchgeführt: zum einen mit dem polyklonalen Antikörper #1158 gegen ein Epitop der C-terminal gelegenen Rel-Homologie-Domäne (RHD) und mit dem Ak #265 gegen ein Epitop der N-terminal gelegenen Transaktivierungsdomäne (TAD) von c-Rel.

Basierend auf den FISH, qRT-PCR und IHC-Analysen ließ sich in der vorliegenden Arbeit kein eindeutiger Zusammenhang der Kopienzahl von *c-Rel* mit der mRNA-Expression und der Proteinexpression bzw. subzellulären Lokalisation von c-Rel erkennen. Obwohl 2 der 3 Fälle mit bestätigten Zugewinnen in CGH und FISH (1 und 3) eine deutlich erhöhte Expression der *c-Rel*-mRNA zeigten, konnte nur im Fall 1 eine nukleäre Färbung für c-Rel in 50 % der Lymphomzellen nachgewiesen werden, hingegen im Fall 3 nur in 5-10 % der Zellen. Ein weiterer Fall (13) zeigte eine erhöhte mRNA-Expression, jedoch stand leider kein Material für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung. In einem weiteren Fall (09) zeigte sich eine starke nukleäre Färbung für c-Rel, ohne dass in diesem Fall eine erhöhte Anzahl von *c-Rel*-Kopien nachgewiesen werden konnte. Ein signifikanter Unterschied in der Färbung zwischen den beiden Antikörpern konnte nicht nachgewiesen werden.

Diese Beobachtungen stellen somit den postulierten Gendosismechanismus in Frage und weisen möglicherweise auf weitere Regulationsmechanismen der c-Rel-Proteinexpression hin.

4.3. Transkriptlevel von *BCL11A* und die Proteinexpression von BCL11A-XL in B-Zell-Lymphomen des GI-Traktes

Durch alternatives Spleißen der *BCL11A*-prä-mRNA entstehen verschiedene Isoformen. Satterwhite et al. beschrieben 2001 anfänglich 3 Haupttranskripte [94], inzwischen wurde eine vierte Variante beschrieben [59]. Somit existieren verschiedene Isoformen des Bcl11A-Proteins, die mit XL, L, S und XS bezeichnet werden. In normalen humanen Geweben wird primär das Transkript für die BCL11A-XL-Isoform exprimiert [81,94].

Ein Antikörper zur Detektion der XL-Isoform von BCL11A wurde erst 2006 publiziert. Pulford et al. detektierten nukleäres BCL11A-XL-Protein in Zellen der Mantelzone, in den meisten Zellen des Keimzentrums und in sogenannten plasmazytoiden dendritischen Zellen in den interfollikulären Bereichen von Tonsille und Lymphknoten [81] (vgl. Abbildung 6). In der vorliegenden Untersuchung wurde der Antikörper BCL11A/123 zum Nachweis von BCL11A-XL freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Karen Pulford zur Verfügung gestellt.

Die Datenlage zur Rolle von *BCL11A* in der Entstehung maligner Lymphome ist spärlich. Pulford et al. untersuchten DLBCLs mittels Gewebsmikroarrays und folgerten, dass die Transkriptlevel von *BCL11A* nicht durch Zugewinne bzw. Amplifikationen der chromosomalen Region 2p13-p16 beeinflusst werden und somit für *BCL11A* kein Gendosismechanismus postuliert werden kann [81].

Bea. et. al. analysierten neben *BCL11A* und *c-Rel* 12 weitere Gene der Region 2p14-p16 hinsichtlich deren RNA-Expression bei Auftreten von mittels CGH nachgewiesenen Zugewinnen bzw. Amplifikationen in MBLs und DLBCLs (ABC-DLBCLs und GCB-DLBCLs) [11]. Einschränkend muss angemerkt werden, dass die Kopienzahl der weiteren Kandidatengene nicht detailliert mittels genspezifischer DNA-Sonden analysiert wurde. Die Expression der entsprechenden Transkripte wurde nur in den Fällen von DLBCLs mit Zugewinnen im Bereich 2p14-p16 untersucht. Eine Überexpression von *BCL11A* auf mRNA-Ebene fand sich dabei in keiner der DLBCL-Untergruppen [11].

In der vorliegenden Arbeit wurden in 4/13 (30 %) der Fälle eine deutliche nukleäre Färbung für BCL11A-XL gefunden. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen genomischem Status, Expressionslevel und Proteinnachweis zeigte sich hierbei nicht. Ein Gendosiseffekt für BCL11A-XL in der Pathophysiologie maligner B-Zell-Lymphome lässt sich somit nicht eindeutig für diesen Lymphomtyp definieren.

Weniger et al. hatten in 20 MBLs in über 80 % Proteinmarkierungen für BCL11A-XL nachgewiesen, wobei der Anteil der Zellen mit Kernfärbung als auch die Intensität der Färbung heterogen war. Zwei Fälle waren komplett negativ, obwohl ein Zugewinn und normale bzw. erniedrigte *BCL11A* RNA-Expression vorlagen. Ein konsistenter Gendosismechanismus wurde für *BCL11A* in drei MBLs im Sinne einer erhöhten Genkopienzahl mit erhöhten Transkriptleveln und nukleärer Akkumulation von BCL11A-XL nachgewiesen. In dieser Arbeit zu MBL wurde die Schlußfolgerung gezogen, dass für *BCL11A* der Gendosismechanismus in einzelnen MBLs eine Erklärung für erhöhte RNA- und Proteinexpression sein kann [112,113].

Im gegebenen Zusammenhang ist die unterschiedliche Frequenz des Proteinnachweis für BCL11A in MZBL-GI und DLBL-GI interessant und weist auf eine unterschiedliche Bedeutung von BCL11A in diesen Lymphomtypen hin. Zwar sind beide Lymphome vom B-Zell-Typ und als extranodale B-Zell Lymphome definiert, beide weisen jedoch in der Immunologie, Genetik und letztendlich auch in der Klinik erhebliche Unterschied auf.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit weisen auf weitere regulatorische Mechanismen hin, die eine verstärkte Expression von BCL11A Proteine ohne messbar erhöhte Transkription begünstigen bzw. fördern. Festgehalten werden muss, dass BCL11A ebenso wie c-Rel aufgrund ihrer häufig nukleären (konstitutiven?) Akkumulation eine biologische Bedeutung Rolle auch in Lymphomen des GI Trakts zu spielen scheinen.

5 Zusammenfassung

B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome des Gastrointestinaltraktes (GI) stellen mit 30-40 % der Fälle die größte Gruppe extranodaler Lymphome dar. Unterschieden werden die gastrointestinalen Lymphome nach aktueller Klassifikation der WHO (World Health Organization) als jeweils eigenständige Entitäten in extranodale Marginalzonen B-Zell-Lymphome (MZBL-GI), die sekundär in diffus großzellige B-Zell-Lymphome transformieren können und primäre diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBL-GI). In einigen Fällen finden sich Zugewinne von genetischem Material im Bereich der chromosomalen Region 2p13-p16. In dieser Region lokalisieren die beiden Proto-Onkogene *c-Rel* und *BCL11A*, die folglich interessante potentielle Kandidatengene für die Entstehung und/oder Progression des malignen Zellklons darstellen. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist bislang nicht detailliert geklärt, ob diese beiden Gene die tatsächlichen Zielgene der gefundenen Amplifikationen sind und welche Rolle ihnen in der Pathogenese der gastrointestinalen B-Zell-Lymphome zukommt.

Molekularzytogenetische Untersuchungen an Hodgkin-Lymphomen konnten zeigen, dass Zugewinne an genomischem Material in dieser Region mit einer nukleären Akkumulation von c-Rel-Protein im Kern einhergehen und somit für diese Gene in Analogie zu *Her2/neu* beim Mamma-Karzinom oder *N-Myc* in Neuroblastomen ein möglicher Gendosismechanismus postuliert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden diesbezüglich Versuchsreihen auf Ebene der DNA, der mRNA-Expression und der Protein-Translation durchgeführt, um zu untersuchen, ob bei MZBL und DLBL des Gastrointestinaltraktes eine erhöhte Genkopienzahl von *c-Rel* und *BCL11A* zu einer erhöhten Expression der entsprechenden Transkripte und Proteine führt und somit für diese Subgruppen der B-NHL ein Gendosismechanismus postuliert werden kann. Dazu wurden insgesamt 13 Fälle gastrointestinaler B-NHL (5 extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome und 8 diffus großzellige B-Zell-Lymphome des Gastrointestinaltraktes) mittels FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung), qRT-PCR (quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion) und immunhistochemischer Techniken analysiert.

Vorhergehende CGH-Analysen (comparative genomic hybridization) zeigten in 3 von 13 Fällen (23 %) Zugewinne auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 einschließlich

der chromosomalen Region 2p16, die in allen 3 Fällen durch FISH bestätigt werden konnten. Weiterhin zeigte ein weiterer Fall eine erhöhte Kopienzahl von *c-Rel* und *BCL11A* in der FISH trotz normalem 2p-Profil in der CGH. In 4/13 Fällen (30 %) der Fälle konnte durch FISH mit genspezifischen Sonden für *c-Rel* und *BCL11A* ein Zugewinn an genetischem Material für die beiden untersuchten Gene festgestellt werden. Beide Gene lagen in der vorliegenden Studie jeweils koamplifiziert vor.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen genomischem Status und Ausmaß der Transkription ließ sich nicht zeigen. Aufgrund der geringen Fallzahl und der eingeschränkten Materialverfügbarkeit wurde auf eine explizite statistische Auswertung verzichtet. Zwar zeigten zwei der CGH-positiven Fälle auch eine deutlich erhöhte Transkription, jedoch wies der dritte CGH-positive Fall keine erhöhte Transkription auf. Umgekehrt fand sich in einem Fall mit unauffälligem genomischen Status bezüglich der untersuchten Gene eine erhöhte Expression sowie eine deutlich erhöhte Expression in einem vierten CGH-negativen Fall. Interessanterweise verhielten sich die Transkriptlevel beider Gene jeweils gleichläufig, d.h. entweder war die Transkription beider Gene erhöht bzw. im definierten Normalbereich.

Der immunhistochemische Proteinnachweis ergab ebenfalls keine eindeutige Korrelation im Sinne eines Gendosismechanismus. Nukleäres *c-Rel*-Protein konnte in 5/13 (38 %), ebenso in 5 Fällen (38 %) nukleäres *Bcl11A-XL*-Protein nachgewiesen werden. Ein konsistenter Gendosismechanismus für beide Gene konnte nur in einem DLBL nachgewiesen werden.

Zusammenfassend scheint ein Gendosismechanismus für *c-Rel* und *BCL11A* nur in Einzelfällen von B-Zell-Lymphomen des Gastrointestinaltraktes eine Erklärung für die Tumorgenese stringent im Sinne eines Gendosiseffektes darzustellen. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit weisen darauf hin, dass weitere regulatorische Mechanismen existieren, die eine verstärkte Expression beider Proteine unabhängig von erhöhten Transkriptleveln fördern. Aufgrund ihrer häufigen nukleären Lokalisation kann postuliert werden, dass in den Fällen, die eine nukleäre Lokalisation des *c-Rel* und *BCL11a*-Proteins aufweisen, diesen eine biologische, möglicherweise konstitutive Bedeutung in der Pathophysiologie vom marginalen B-Zell-Lymphomen und diffus großzelligen B-NHL des Gastrointestinaltraktes zukommt.

6 Literaturverzeichnis

1. Aguiar RC, Chase A, Oscier DG, Carapeti M, Goldman JM, Cross NC. Characterization of a t(10;12)(q24;p13) in a case of CML in transformation. *Genes Chromosomes Cancer* 20:408-411 (1997)
2. Al-Assar O, Rees-Unwin KS, Menasce LP, Hough RE, Goepel JR, Hammond DW, Hancock BW. Transformed diffuse large B-cell lymphomas with gains of the discontinuous 12q12-14 amplicon display concurrent deregulation of CDK2, CDK4 and GADD153 genes. *Br J Haematol* 133:612-621 (2006)
3. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Looso IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD ; Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503-511 (2000)
4. Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. cis-acting, element-specific transcriptional activity of differentially phosphorylated nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 280:244-252 (2005)
5. Aupperle K et al. NF- κ B regulation by I κ B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol* 166:2705-2711 (2001)
6. Baens M, Steyls A, Dierlamm J, De Wolf-Peeters C, Marynen P. Structure of the MLT gene and molecular characterization of the genomic breakpoint junctions in the t(11;18)(q21;q21) of marginal zone B-cell lymphomas of MALT type. *Genes Chromosomes Cancer* 29:281-291 (2000)
7. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dorken B. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100:2961-2969 (1997)
8. Barth TF, Bentz M, Leithäuser F, Stilgenbauer S, Siebert R, Schlotter M, Schlenk RF, Döhner H, Möller P. Pathogenetic complexity of gastric B-cell lymphoma. *Blood* 100:1095-1096 (2002)
9. Barth TF, Martin-Subero JI, Joos S, Menz CK, Hasel C, Mechttersheimer G, Pawaresch RM, Lichter P, Siebert R, Moller P. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 101:3681-3686 (2003)
10. Bea S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernandez L, Hernandez S, Fernandez PL, van LM, Colomer D, Campo E. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 61:2409-2412 (2001)

11. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Puig X, Yang L, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Grogan TM, Braziel R, Fisher RI, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Simon R, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Campo E, Rosenwald A. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 106:3183-3190 (2005)
12. Braun T, Carvalho G, Fabre C, Grosjean J, Fenaux P, Kroemer G. Targeting NF-kappaB in hematologic malignancies. *Cell Death Differ* 13:748-758 (2006)
13. Campbell IK, Gerondakis S, O'Donnel K, Wicks IP. Distinct roles for the NF-kappaB(p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 105:1799-1806 (2000)
14. Carrasco D, Weih F, Bravo R. Developmental expression of the mouse c-rel proto-oncogene in hematopoietic organs. *Development* 120:2991-3004 (1994)
15. Chen LF and Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat. Rev. Mol Cell Biol* 5:392-401 (2004)
16. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 7:758-765 (2005)
17. Cusack J et al. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implication for systemic NF-kappaB inhibition. *Cancer Res* 61:3535-3540 (2001)
18. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7824-7827 (1982)
19. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194:1861-1874 (2001)
20. Difilippantonio MJ, Petersen S, Chen HT, Johnson R, Jasin M, Kanaar R, Ried T, Nussenzweig A. Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *J Exp Med* 196:469-480 (2002)
21. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910-1916 (2000)
22. Durum SK. Bcl11: sibling rivalry in lymphoid development. *Nat Immunol* 4:512-514 (2003)
23. Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, Chen W, LaCasce AS, Cattoretti G, Kurtin P, Pinkus GS, De Leval L, Harris NL, Savage KJ, Neuberg D, Habermann TM,

- Dalla-Favera R, Golub TR, Aster JC, Shipp MA. NF-kappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 106:1392-1399 (2005)
24. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Ann Rev Immunol* 16:225-260 (1998)
 25. Ghosh S and Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 109:81-96 (2002)
 26. Gilmore TD. The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18:6842-6844 (1999)
 27. Gilmore TD, Cormier C, Jean-Jacques J, Gapuzan ME. Malignant transformation of primary chicken spleen cells by human transcription factor c-Rel. *Oncogene* 20:7098-7103 (2001)
 28. Gilmore T, Gapuzan ME, Kalaitzidis D, Starczynowski D. Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction pathway and cancer. *Cancer Treat Res* 115:241-265 (2003)
 29. Gilmore TD, Kalaitzidis D, Liang MC, Starczynowski DT. The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. *Oncogene* 23:2275-2286 (2004)
 30. Gilmore TD, Starczynowski DT, Kalaitzidis D. RELEVant gene amplification in B-cell lymphomas? *Blood* 103:3243-3244 (2004)
 31. Goff LK, Neat MJ, Crawley CR, Jones L, Jones E, Lister TA, Gupta RK. The use of real-time quantitative polymerase chain reaction and comparative genomic hybridization to identify amplification of the REL gene in follicular lymphoma. *Br J Haematol* 111:618-625 (2000)
 32. Gough SM, Benjes SM; McDonald M, Heaton D, Ganly P, Morris CM. Translocation (5;10)(q22;q24) in a case of acute lymphoblastic leukemia.
 33. Grumont RJ and Gerondakis S. The subunit composition of NF-kappa B complexes changes during B-cell development. *Cell Growth Differ* 5:1321-1331 (1994)
 34. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. the IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298:1241-1245 (2002)
 35. Houldsworth J, Mathew S, Rao PH, Dyomina K, Louie DC, Parsa N, Offit K, Chaganti RS. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* 87:25-29 (1996)
 36. Houldsworth J, Olshen AB, Cattoretti G, Donnelly GB, Teruya-Feldstein J, Qin J, Palanisamy N, Shen Y, Dyomina K, Petlakh M, Pan Q, Zelenetz AD, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 103:1862-1868 (2004)

37. Isaacson PG, Spencer J, Wright DH. Classifying gut lymphomas. *Lancet* 2 (8620):1488-1491 (1988)
38. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissue. *Am J Clin Pathol* 111:8-12 (1999)
39. Jager U, Bocskor S, Le T, Mitterbauer G, Bolz I, Chott A, Kneba M, Mannhalter C, Nadel B. Follicular lymphomas. BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood* 95:3520-3529 (2000)
40. Janumyan YM, Sansam CG, Chattopadhyay A, Cheng N, Soucie EL, Penn LZ, Andrews D, Knudson CM, Yang E. Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J* 22:5459-5470 (2003)
41. Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Brecher P, Cohen RA. Temporal control of NF-kappaB activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression. *J Biol Chem* 279:1323-1329 (2004)
42. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283:543-546 (1999)
43. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Cytogenetic evolution patterns in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 86:3905-3914 (1995)
44. Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, Brüderlein S, du MS, Bentz M, Möller P, Lichter P. 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 (1996)
45. Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, Siebert R, Harder L, Martin-Subero JI, Wolf J, Adamowicz M, Barth TF, Lichter P, Jauch A. 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 (2003)
46. Kalaitzidis D, Davis RE, Rosenwald A, Staudt LM, Gilmore TD. The human B-cell lymphoma cell line RC-K8 has multiple genetic alterations that dysregulate the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene* 21:8759-8768 (2002)
47. Kalaitzidis D and Gilmore TD. Genomic organization and expression of the rearranged REL proto-oncogene in the human B-cell lymphoma cell line RC-K8. *Genes Chromosomes Cancer* 34:129-135 (2002)
48. Kasugai Y, Tagawa H, Kameoka Y, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Identification of CCND3 and BYSL as candidate targets for the 6p21 amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res* 11:8265-8272 (2005)
49. Kistler B, Rolink A, Marienfeld R, Neumann M, Wirth T. Induction of nuclear factor-kappa B during primary B cell differentiation. *J Immunol* 160:2308-2317 (1998)

50. Koch P, del Valle F, Berdel WE, Willich NA, Reers B, Hidemann W, Grothaus-Pinke B, Reinartz G, Brockmann J, Temmesfeld A, Schmitz R, Rbe C, Probst A, Jaenke G, Bodenstein H, Junker A, Pott C, Schultze J, Heinecke A, Parwaresch R, Tiemann M, German Multicenter Group. Primary gastrointestinal non-Hodgkin´s lymphoma I: Anatomical and histological distribution, clinical features, and survival data of 371 patients registered in the German Multicenter Study (GIT NHL 01/92). *J Clin Oncol* 19:3874-3883 (2001)
51. Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlington D, Gerondakis S. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev* 9:1965-1977 (1995)
52. Kuppers R and La-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B-cell lymphomas. *Oncogene* 20:5580-5594 (2001)
53. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 5:251-262 (2005)
54. Lee KL, Ma JF, Shortliffe LD. Neuroblastoma: management, recurrence, and followup. *Urol Clin North Am* 30:881-890 (2003)
55. Levine EG, Arthur DC, Machnicki J, Fizzera G, Hurd D, Peterson B, Gajl-Peczalska KJ, Bloomfield CD. Four new recurring translocations in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 74:1796-1800 (1989)
56. Liang MC, Bardhan S, Li C, Pace EA, Porco J, Gilmore TD. Jesterone Dimer, a Synthetic Derivative of the Fungal Metabolite Jesterone, Blocks Activation of Transcription Factor Nuclear Factor κ B by Inhibiting the Inhibitor of κ B Kinase. *Mol Pharmacol* 64:1-9 (2003)
57. Li J, Shen H, Himmel KL, Dupuy AJ, Largaespada DA, Nakamura T, Shaughnessy JD, Jenkins NA, Copeland NG. Leukemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nat Genet* 23:348-353 (1999)
58. Liou HC and Hsia CY. Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease. *Bioessays* 25:767-780 (2003)
59. Liu H, Ippolito GC, Wall JK, Niu T, Probst L, Le BS, Pulford K, Banham AH, Stockwin L, Shaffer AL, Staudt LM, Das C, Dyer MJ, Tucker PW. Functional studies of BCL11A: characterization of the conserved BCL11A-XL splice variant and its interaction with BCL6 in nuclear paraspeckles of germinal center B cells. *Mol Cancer* 5:18-26 (2006)
60. Liu P, Keller JR, Ortiz M, Tessarollo L, Rachel RA, Nakamura T, Jenkins NA, Copeland NG. Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol* 4:525-532 (2003)
61. Luo WJ, Takakuwa T, Ham MF, Wada N, Liu A, Fujita S, Sakane-Ishikawa E, Aozasa K. Epstein-Barr virus is integrated between REL and BCL-11A in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2). *Lab Invest* 84:1193-1199 (2004)

62. Magrath I. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res* 55:133-270 (1990)
63. Mao X, Orchard G, Lillington DM, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker S. Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 101:1513-1519 (2003)
64. Mao X, Orchard G, Lillington DM, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker S. Genetic alterations in primary cutaneous CD30+ anaplastic large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 37:176-185 (2003)
65. Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Hansmann ML, Dyer MJ, Siebert R. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99:1474-1477 (2002)
66. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57:79-88 (1989)
67. Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa SM, Tagliabue E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci* 61:2965-2978 (2004)
68. Miagkov AV et al. NF- κ B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13859-13864 (1998)
69. Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 90:1168-1174 (1997)
70. Morotti A, Parvis G, Cillni D, Familiari U, Pautasso M, Bosa M, Messa F; Arruga F, Defilippi I, Catalano R, Rosso V, Carturan S, Bracco E, Guerrasio A, Saglio G. CD7/CD56-positive acute myeloid leukemia are characterized by constitutive phosphorylation of the NF- κ B subunit p65 at Ser536. *Leukemia* 21:1305-1306 (2007)
71. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 18:115-136 (2004)
72. Muthusamy V, Hobbs C, Nogueira C, Cordon-Cardo C, McKee PH, Chin L, Bosenberg MW. Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45:447-454 (2006)
73. Nakamura T, Yamazaki Y, Saiki Y, Moriyama M, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG. Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 20:3178-3186 (2000)

74. Nelson DE et al. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 306:704-708 (2004)
75. Ong ST, Le Beau MM. Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 25:447-460 (1998)
76. Orłowski RZ and Baldwin AS. NF-κB as a therapeutic target in cancer. *Trend Mol Med* 8:385-389 (2002)
77. Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, Ott MM, Müller-Hermelink HK. The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res* 57:3944-3948 (1997)
78. Palanisamy N, Abou-Elella AA, Chaganti SR, Houldsworth J, Offit K, Louie DC, Terayu-Feldstein J, Cigudosa JC, Rao PH, Sanger WG; Weisenburger DD, Chaganti RS. Similar patterns of genomic alterations characterize primary mediastinal large-B-cell lymphoma and diffuse large-B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 3:114-122 (2002)
79. Park CK, Lee CG, Lee JD. Detection of MYC gene amplification in malignant lymphomas. *J Korean Med Sci* 13:159-164 (1998)
80. Pomerantz JL and Baltimore D. Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell* 10:693-695 (2002)
81. Pulford K, Banham AH, Lyne L, Jones M, Ippolito GC, Liu H, Tucker PW, Roncador G, Lucas E, Ashe S, Stockwin L, Walewska R, Karran EL, Gascoyne RD, Mason DY, Dyer MJ. BCL11AXL protein: its distribution in normal and malignant tissues and use as a marker for plasmacytoid dendritic cells. *Leukemia* (2006)
82. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, Parsa NZ, Cigudosa JC, Louie DC, Popplewell L, Offit K, Jhanwar SC, Chaganti RS. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 92:234-240 (1998)
83. Reader JC, Zhao XF, Butler MS, Rapoport AP, Ning Y. REL-positive double minute chromosomes in follicular lymphoma. *Leukemia* (2006)
84. Reichenberger KJ, Coletta RD, Schulte AP, Varella-Garcia M, Ford HL. Gene amplification is a mechanism of Six1 overexpression in breast cancer. *Cancer Res* 65:2668-2675 (2005)
85. Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, James M, Steele D, Jones RL, Dowsett M. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. *Mod Pathol* 19:999-1009 (2006)

86. Ren B, Yu G, Tseng GC, Cieply K, Gavel T, Nelson J, Michalopoulos G, Yu YP, Luo JH. MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer Progression. *Oncogene* 25:1090-1098 (2006)
87. Rogler G et al. NF- κ B is activates in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 115:357-369 (1998)
88. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, Chan WC, Zhao T, Haioun C, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Campo E, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Connors JM, -Brazier R, Grogan TM, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Chiorazzi M, Zhao H, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Staudt LM. Molecular diagnosis of primar 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 (2003)
89. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. Antiinflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* 403 (6765):103-108 (2000)
90. Russo S et al. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF- κ B. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50:183-193 (2001)
91. Saccani S, Pantano S, Natoli G. Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell* 11:1563-1574 (2003)
92. Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W. IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* 274:30353-30356 (1999)
93. Sanchez-Isquierdo D, Buchonnet G, Siebert R, Gascoyne RD, Climent J, Karran L, Marin M, Blesa D, Horsman D, Rosenwald A, Staudt LM, Albertson DG, Du MQ, Ye H, Marynen P, Garcia-Conde J, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 101:4539-4546 (2003)
94. Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, Harder L, Nowak R, Arriola EL, Liu H, Price HP, Gesk S, Steinemann D, Schlegelberger B, Oscier DG, Siebert R, Tucker PW, Dyer MJ. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 98:3413-3420 (2001)
95. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Catoretti G, Neuberg D, De Leval L, Kurtin, Dal Cin P, Ladd C, Feuerhake F, Aguiar RC, Li S, Salles G, Berger F, Jing W, Pinkus GS, Habermann T, Dalla-Favera R, Harris NL, Aster JC, Golub TR, Shipp MA. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphomas differs from that of other large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 102:3871-3879 (2003)
96. Schlegelberger B. Cytogenetic subtyping of diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Hematol Suppl* 3:32-34 (2001)

97. Schwab M, Amler LC. Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1:181-193 (1990)
98. Sen R and Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequence. *Cell* 46:705-716 (1986)
99. Siebert R, Rosenwald A, Staudt LM, Morris SW. Molecular features of B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 13:316-324 (2001)
100. Stephens RM, Rice NR, Hiebsch RR, Bose HR, Gilden RV. Nucleotide sequence of v-rel: the oncogene of reticuloendotheliosis virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6229-6233 (1983)
101. Staudt LM and Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* 87:163-208 (2005)
102. Starostik P, Patzner J, Greiner A; Schwarz S, Kalla J, Ott G, Müller-Hermelink HK. Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. *Blood* 99:3-9 (2002)
103. Takada H, Chen NJ, Mirtsos C, Suzuki N, Wakeham A, Mak TW, Yeh WC. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol Cell Biol* 23:4026-4033 (2003)
104. Tanaka H, Bergstrom DA, Yao MC, Tapscott SJ. Widespread and nonrandom distribution of DNA palindromes in cancer cells provides a structural platform for subsequent gene amplification. *Nat Genet* 37:320-327 (2005)
105. Tarte K, Zhan F, De VJ, Klein B, Shaughnessy J Jr. Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood* 102:592-600 (2003)
- g
106. Tsujimoto Y, Louie E, Bashir MM, Croce CM. The reciprocal partners of both the t(14;18) and the t(11;14) translocations involved in B-cell neoplasms are rearranged by the same mechanism. *Oncogene* 2:347-351 (1988)
107. Tumang JR, Owyang A, Andjelic S, Jin Z, Hardy RR, Liou ML, Liou HC. C-Rel is essential for B lymphocyte survival and cell cycle progression. *Eur J Immunol* 28:4299-4312 (1998)
108. Turco MC, Romano MF, Petrella A, Bisogni R, Tassone P, Venuta S. NF-kappaB/Rel-mediated regulation of apoptosis in hematologic malignancies and normal hematopoietic progenitors. *Leukemia* 18:11-17 (2004)
109. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and I-kappaB proteins : implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 30:43-52 (2005)
110. Weber BL. Cancer genomics. *Cancer Cell*. 1:37-47 (2002)

111. Weniger MA, Barth TF, Moller P. Genomic alterations in Hodgkin's lymphoma. *Int J Hematol* 83:379-384 (2006)
112. Weniger MA, Pulford K, Gesk S, Ehrlich S, Banham AH, Lyne L, Martin-Subero JI, Siebert R, Dyer MJ, Moller P, Barth TF. Gains of the proto-oncogene BCL11A and nuclear accumulation of BCL11A(XL) protein are frequent in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* (2006)
113. Weniger MA, Gesk S, Ehrlich S, Martin-Subero JI, Dyer MJS, Siebert R, Möller P, Barth TFE. Gains of REL in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma Coincide with Nuclear Accumulation of REL Protein. *Genes Chromosomes Cancer* 46:406-415 (2007)
114. Willis TG and Dyer MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 96:808-822 (2000)
115. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, and Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 338:1175-1176 (1991)
116. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. *Lancet* 342(8871):575-7 (1993)
117. Wotherspoon AC, Finn TM, and Isaacson PG. Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood* 85:2000-2004 (1995)

Weniger MA, Ehrlich S, Leithäuser F, Martin-Subero JI, Mechttersheimer G, Siebert R, Möller P, Barth TF. Genomic and transcriptional status of REL A and C-Rel protein in mediastinal B-cell lymphoma.

Posterpräsentation auf der 16. Tumorzytogenetischen Arbeitstagung (15.05.-17.05.2003) in Celle

Rolle der Proto-Onkogene *c-Rel* und *BCL11A* in mediastinalen B-NHL und B-NHL des Gastrointestinaltraktes.

Vortrag im Rahmen des SFB 497 „Signale und Signalverarbeitung bei der zellulären Differenzierung“ am 23.09.2003, Universität Ulm

Weniger MA, Pulford K, Gesk S, Ehrlich S, Banham AH, Lyne L, Martin-Subero JI, Siebert R, Dyer MJ, Moller P, Barth TF. Gains of the proto-oncogene BCL11A and nuclear accumulation of BCL11A(XL) protein are frequent in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 20:1880-1882 (2006)

Weniger MA, Gesk S, Ehrlich S, Martin-Subero JI, Dyer MJ, Siebert R, Möller P, Barth TF. Gains of REL in primary mediastinal B-cell lymphoma coincide with nuclear accumulation of REL protein. *Genes Chromosomes Cancer*. 46:406-415 (2007)

Lebenslauf

Steve Ehrlich
Geb. 29.11.1978 in Leipzig

1985 bis 1991	15. POS in Suhl
1991 bis 1992	2. Städtisches Gymnasium in Suhl
1992 bis 1994	Johannes-Kepler-Gymnasium in Chemnitz
1994 bis 1998	Schelztorgymnasium in Esslingen a.N.
1998	Abitur
1998-1999	Zivildienst (Städtische Kliniken Esslingen a.N.)
01.10.1999	Immatrikulation an der Universität Ulm (Medizinische Fakultät)
Sommer 2001	Ärztliche Vorprüfung
Sommer 2002	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Sommer 2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation
Seit 01.01.2006	Assistenzarzt an der Medizinischen Hochschule Hannover Klinik für Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation (Direktor: Prof. Dr. med. A. Ganser)

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof Dr. med. P. Möller für die freundliche Überlassung des Themas sowie für Rat und Tat während der gesamten Promotionszeit.

Weiterhin danke ich Frau Dr. biol. hum. S. Brüderlein sowie Herrn PD Dr. med. F. Leithäuser und Herrn Dr. rer. Nat. I. Metzner für Hilfe und gute Ratschläge bei den Versuchsplanungen.

Laborarbeit ist nichts ohne die Hilfe von Spitzen-MTA´s- in diesem Sinne geht mein herzlicher Dank an Iwona Nerbas, Sabine Gantner, Beate Wotschke, Carola Dorsch und Michaela Bugk, die immer ein offenes Ohr für und Geduld mit den Doktoranden hatten!

Ich danke meinem Mitstreiter Herrn Dr. biol. hum. Marc A. Weniger für unschätzbare Ratschläge, Erklärungen und unzählige Stunden im Labor - ohne ihn wäre es nur halb so lustig gewesen.

Sven und Katharina Eggink, Robin Fehmer, Regina Gastl und Dr. med. Ekaterini Giannakidou danke ich für ihre Freundschaft über all die Jahre seit Studienbeginn!

Adi Althoff-Ott und Kai Debski wissen, wofür ich Ihnen dankbar bin!

Großen Dank schulde ich meinem Kollegen Dr. med. Matthias Port für den Crashkurs „Formatieren für Dummies“.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch.

Last but definitely not least danke ich Herrn Prof. Dr. med. T. Barth, der mit Engelsgeduld und Ansporn dafür gesorgt hat, diese Arbeit zu einem runden Ende zu bringen. Auch wenn der Weg manchmal steinig war- ich hätte mir keinen besseren Doktorvater wünschen können!!!