

Funktionelle Validierung von Onkogenen bei molekularen Subtypen von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen (DLBCL)

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Sören-Sebastian Wenzel
aus Siegburg

Februar 2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom November 2009 bis Februar 2014 unter der Leitung von Prof. Dr. Georg Lenz am Molekularen Krebsforschungszentrum (MKFZ) der Charité - Universitätsmedizin Berlin - angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Georg Lenz
2. Gutachterin: Prof. Dr. Petra Knaus
Tag der Disputation: 21. August 2014

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Dissertation am MKFZ der Charité sowohl fachlich als auch moralisch unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Frau Professorin Dr. Knaus vom Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin für ihre Bereitschaft danken, das Zweitgutachten zu verfassen und mir damit die Promotion am MKFZ der Charité zu ermöglichen.

Des Weiteren geht mein Dank an meine Kollegen Herrn Dr. Hendrik Nogai, Frau Annette Wolf, Herrn Matthias Pfeifer und Herrn André Weilemann für die fruchtbaren Diskussionen und die gute Stimmung im Labor.

Besonderen Dank schulde ich weiterhin Frau Hannelore Madle und Frau Kerstin Dietze für die tatkräftige Unterstützung der experimentellen Arbeiten im Labor sowie allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lenz, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zudem danke ich Herrn Dr. Stephan Hailfinger vom Institut für Biochemie der Universität Lausanne für die kompetente Unterstützung bei der Durchführung der Immunpräzipitation und Herrn Profosser Dr. Alexander Tzankov vom Institut für Pathologie des Universitätskrankenhauses Basel für die immunhistochemischen Färbungen.

Ich danke außerdem Herrn Michael Grau vom Institut für Physik der Philipps-Universität Marburg für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen und die zahlreichen bioinformatischen Analysen.

Meinen aufrichtigsten Dank schulde ich Herrn Professor Dr. Georg Lenz vom MKFZ der Charité, der mich während der gesamten Arbeit an diesem Projekt intensiv betreut und mit seinen wertvollen Ratschlägen und unermüdlichem Einsatz stets geholfen hat. Ohne seine Unterstützung wäre die Dissertation in dieser Form nicht möglich gewesen.

Herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre bedingungslose Hilfe und den Rückhalt während meiner Promotion bedanken.

Vor allem aber danke ich Katrin Klemm, meinem Schwefel wenn ich Pech habe, meiner Julia wenn ich Romeo wäre und meinem Klaus wenn ich Klaus hieße.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Entwicklung von B-Zellen	1
1.1.1 Keimzentrumsreaktion	3
1.1.2 B-Zell Entwicklung bei pathologischen Prozessen	4
1.2 Maligne Lymphome	4
1.2.1 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome	5
1.3 Deregulierte Signalwege bei DLBCL	8
1.3.1 Apoptose	9
1.3.2 NF- κ B-Signalweg	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit	16
2 Veröffentlichte Ergebnisse	18
2.1 Manuskript I	18
2.2 Manuskript II	19
3 Diskussion	21
3.1 Identifikation Subtyp-spezifischer Onkogene bei DLBCL	21
3.1.1 Expressionsanalysen zur Identifikation deregulierter Onkogene	22
3.2 Funktionelle Validierung von MCL1 bei molekularen DLBCL-Subtypen	23
3.2.1 Deregulation von MCL1	24
3.2.2 Molekulare Mechanismen der Deregulation von MCL1	25
3.2.3 Funktionelle Analysen von MCL1	26
3.3 Funktionelle Validierung von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ bei molekularen DLBCL-Subtypen	29
3.3.1 Deregulation von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$	29
3.3.2 Molekulare Mechanismen der Deregulation von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$	30
3.3.3 Funktionelle Analysen von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$	31
3.4 Klinische Relevanz	33
3.4.1 Aktueller Stand der Diagnostik und Therapie	33
3.4.2 Innovative Ansätze zur Behandlung von DLBCL	33
3.5 Fazit	35
3.6 Ausblick	35

4 Zusammenfassung	36
5 Summary	38
Literaturverzeichnis	39
Publikationen	i
Lebenslauf	ii
Anhang	iii
5.1 Zusatzinformationen für Manuskript I	iii
5.2 Zusatzinformationen für Manuskript II	iii

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>Activated B-cell-like</i> (aktivierter B-Zell Subtyp)
aCGH	<i>Array comparative genomic hybridization</i>
AID	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i>
APAF1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
BAFF-R	<i>B-cell activating factor receptor</i>
Bak	<i>BCL2 homologous antagonist/killer</i>
BATF	<i>Basic leucine zipper transcription factor</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCR	<i>B-cell receptor</i> (B-Zell Rezeptor)
BH	<i>BCL2 homology</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
C	<i>Cytosin</i>
CARD11	<i>Caspase recruitment domain family, member 11</i>
Caspase	<i>Cysteiny-Aspartat-spezifische Protease</i>
CBM-Komplex	<i>CARD11/BCL10/MALT1-Komplex</i>
CD10	<i>Cluster of differentiation 10</i> (alias MME)
CD79A/B	<i>Cluster of differentiation 79 A/B</i>
CDC25A	<i>Cell division cycle 25 A</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CHOP	<i>Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (Doxorubicin), Oncovin[®] (Vincristin), Prednison</i>
CREBBP	<i>cAMP response element binding protein (CREB) binding protein</i>
CSR	<i>Class switch recombination</i> (Klassenwechsel)
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DLBCL	<i>Diffuse large B-cell lymphoma</i> (diffuses großzelliges B-Zell Lymphom)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EBI3	<i>Epstein-Barr virus induced 3</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FDC	<i>Follicular dendritic cell</i> (follikuläre dendritische Zelle)
G	<i>Guanin</i>
GCB	<i>Germinal center B-cell-like</i> (Keimzentrums-B-Zell Subtyp)
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
HL	<i>Hodgkin Lymphom</i>

Ig	Immunglobulin
IκB	<i>Inhibitor of NF-κB</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IKK	<i>IκB-kinase</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JAK	Janus Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
LMO2	<i>LIM domain only 2</i>
MCL1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MM	Multiplres Myelom
MME	<i>Membrane metallo-endopeptidase (alias CD10)</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
N	Any (Guanin, Adenin, Cytosin oder Thymin)
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i>
PAX5	<i>Paired box 5</i>
PEST	Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S), Threonin (T)
PI3K	<i>Phosphatidylinositide 3-kinase</i>
PRDM1	<i>PR domain zinc finger protein 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
R	Purine (Adenin oder Guanin)
RAG1/2	<i>Recombination activating gene 1 and 2</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SHM	<i>Somatic hypermutation (somatische Hypermutation)</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
Src	Sarcoma
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
tBid	<i>Truncated Bid</i>
T_H-Zelle	T-Helferzelle
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFAIP3	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 (alias A20)</i>
V(D)J	<i>Variable (V), diversity (D), joining (J)</i>
WHO	<i>World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)</i>
Y	Pyrimidine (Cytosin oder Thymin)

1 Einleitung

Die Neubildung von Körpergewebe ist ein grundlegender und präzise regulierter Prozess eines jeden vielzelligen Organismus. Kommt es jedoch zu einer unkontrollierten Vermehrung von körpereigenen Zellen, so spricht man von einem Tumor. Grundsätzlich kann man gutartige (benigne) und bösartige (maligne) Tumore voneinander unterscheiden. Gutartige Tumore zeichnen sich durch ein langsames und nicht-invasives Wachstum aus, während maligne Tumore umliegendes Gewebe infiltrieren und zerstören. Zudem bilden maligne Tumore häufig Absiedelungen, sog. Metastasen, in entfernten Körperbereichen und führen häufig durch die Beeinträchtigung lebenswichtiger Organfunktionen zum Tod (Pschyrembel, 2012).

Tumore des lymphatischen Systems werden auch als Lymphome bezeichnet und machen ca. 4,1% der weltweiten Krebsneuerkrankungen aus (Ferlay *et al.*, 2010). Seit der Erstbeschreibung von Thomas Hodgkin im Jahr 1832 hat sich unser Wissensstand über diese heterogene Gruppe von Erkrankungen stetig erweitert. So deuten experimentelle Studien darauf hin, dass alle Lymphome aus unterschiedlichen Vorläuferzellen der Lymphozyten entstehen, die sich durch die kumulative Anreicherung von genetischen Läsionen Wachstumsvorteile verschaffen und auf Grundlage der klonalen Evolution die Eigenschaften maligner Tumore erwerben (Greaves & Maley, 2012; Shaffer *et al.*, 2002b). Zudem weist die Beobachtung, dass der Großteil aller Lymphome von B-Zellen abstammt, auf einen wesentlichen Einfluss der normalen B-Zell Entwicklung bei der Entstehung von Lymphomen hin (Küppers, 2005).

1.1 Entwicklung von B-Zellen

Die Entwicklung von B-Zellen findet beim Menschen im lymphatischen System statt. Es handelt sich dabei um Gewebeverbände und Organe, die alle an der Immunantwort beteiligten Zellen zusammenfassen. Das Knochenmark und der Thymus gehören zu den primären lymphatischen Organen, während die Milz, die Lymphknoten und das mit der Schleimhaut-assoziierte Gewebe die sekundären bzw. peripheren lymphatischen Organe darstellen (Neumann, 2008).

Die B-Zell Entwicklung beginnt mit der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in reife, naive B-Zellen im Knochenmark bzw. in der fetalen Leber. Diese Differenzierung wird im Wesentlichen von den Transkriptionsfaktoren PU.1, E2A und PAX5 koordiniert und ist durch strukturelle Veränderungen des B-Zell Rezeptors (BCR) geprägt (Buslinger, 2004).

Der BCR setzt sich aus jeweils zwei identischen schweren (H, *heavy chain*) und leichten (L, *light chain*) Ketten der Immunglobuline (Ig) sowie den signaltransduzierenden Transmembranproteinen CD79A und CD79B zusammen. Die membranständigen Ig ermöglichen die Bindung von Antigenen und damit die Auslösung einer spezifischen Immunantwort gegen Pathogene. Sie bilden die humorale Antwort des adaptiven Immunsystems. Um eine möglichst große Zahl unterschiedlicher

Ig gegen eine Vielzahl von Pathogenen bilden zu können, werden die kodierenden Gensegmente während der frühen B-Zell Entwicklung neu kombiniert. Dieser Prozess wird V(D)J-Rekombination genannt (Murphy, 2012).

Die V(D)J-Rekombination

Die schweren und leichten Ketten der Ig besitzen konstante (C_H1-3 und C_L) und variable (V_H und V_L) Regionen. Die variable Region der leichten und schweren Kette bildet die Antigenbindungsstelle und wird von mehreren Gensegmenten kodiert. Die variable Region der schweren Kette wird von V_H (*variable*), D_H (*diversity*) und J_H (*joining*) Gensegmenten auf dem Chromosom 14 kodiert, während die variable Region der leichten Kette von V_L und J_L Gensegmenten auf dem κ -Lokus auf dem Chromosom 2 und dem λ -Lokus auf dem Chromosom 22 kodiert wird. Durch die zufällige Zusammenlagerung einzelner Kopien dieser Segmente entsteht ein großes Repertoire an unterschiedlichen Antikörperspezifitäten.

Die V(D)J-Rekombination wird im Wesentlichen von den Proteinen RAG1 und RAG2 (*recombination-aktivated gene 1 and 2*) katalysiert, die an eine Rekombinations-Signal-Sequenz zwischen den kodierenden Gensegmenten binden und DNA-Doppelstrangbrüche erzeugen. Diese Doppelstrangbrüche werden daraufhin durch den zelleigenen Reparaturprozess *non-homologous end-joining* (NHEJ) repariert (Fugmann *et al.*, 2000). Auf diese Weise wird jeweils ein V_H , D_H und J_H Gensegment der schweren Kette und ein V_L und J_L Gensegment der leichten Kette rekombiniert, die zur Erzeugung eines funktionsfähigen Ig notwendig sind.

Während der B-Zell Entwicklung erfolgt zuerst die D_H - J_H Rekombination der schweren Kette, gefolgt von der V_H - D_H - J_H Rekombination. Durch das Hinzufügen oder Entfernen von Nukleotiden an den Schnittstellen der Segmente kann die Antikörperdiversität zusätzlich erhöht werden. Kommt es zu einer nicht-produktiven Rekombination, wird die Umlagerungsreaktion auf dem zweiten Allel fortgesetzt. Ist auch diese nicht-produktiv, stirbt die B-Zelle ab. Eine produktive Rekombination und Expression der schweren Kette wird für die weitere Differenzierung der B-Zelle benötigt. Sie bildet den prä-BCR, dessen Expression die IgH-Rekombination des zweiten Allels verhindert (Allelausschluss). Zusätzlich wird die Rekombination der leichten Kette initiiert, die analog zur IgH-Rekombination abläuft (Jung *et al.*, 2006).

Erfolgreich rekombinierte schwere und leichte Ketten werden als Teil des BCR exprimiert. Ist dieser autoreaktiv, kommt es zu sekundären Rekombinationen (dem sog. *receptor editing*), oder zum programmierten Zelltod (Halverson *et al.*, 2004). Sobald B-Zellen einen funktionsfähigen und nicht autoreaktiven BCR exprimieren, verlassen sie als reife, naive B-Zellen das Knochenmark und zirkulieren im Blut sowie in den sekundären lymphatischen Organen. Bindet ein passendes Antigen an den BCR, wird der Rezeptor samt Antigen in die Zelle aufgenommen und das Antigen von MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse-II Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Erkennt nun eine T-Helferzelle (T_H) dieses Antigen, kommt es zu einer Keimzentrumsreaktion (Rajewsky, 1996).

1.1.1 Keimzentrumsreaktion

Die T-Zell-abhängige Aktivierung von Antigen-bindenden B-Zellen findet in der T-Zellzone von sekundären lymphatischen Organen statt. Zur vollständigen Aktivierung benötigen B-Zellen neben der Bindung des T-Zell Rezeptors an ihr MHC-II/Peptid-Komplex auch eine kostimulatorische Interaktion zwischen ihrem CD40 Rezeptor und des Liganden CD40L der T_H-Zelle. Aktivierte B-Zellen wandern zum (primären) Lymphfollikel, einer Ansammlung zirkulierender B-Zellen und follikulär dendritischer Zellen (FDC) und proliferieren mit einer Verdopplungszeit von ca. 7 Stunden außergewöhnlich schnell (Liu *et al.*, 1991). Innerhalb weniger Tage bildet sich eine charakteristische Struktur aus, die als Keimzentrum bezeichnet wird (Abbildung 1.1a, Seite 5). Ein Lymphfollikel mit Keimzentrum wird auch Sekundärfollikel genannt (MacLennan *et al.*, 1992).

Das Keimzentrum selbst kann in eine dunkle und helle Zone unterteilt werden. Die dunkle Zone wird von dicht gepackten und sich schnell teilenden B-Zellen, den sog. Zentroblasten, gebildet, während sich die helle Zone aus kleineren und sich nicht-teilenden B-Zellen, den sog. Zentrozyten, T_H-Zellen und FDCs zusammensetzt. Während der Keimzentrumsreaktion finden zwei Prozesse statt, die zur weiteren Veränderung des Ig beitragen: (a) Die somatische Hypermutation (SHM) und (b) der Klassenwechsel (CSR).

(a) Die somatische Hypermutation

Als SHM wird das Einfügen von Punktmutationen, kleinen Deletionen oder Duplikationen in die variable Region der schweren und leichten Kette bezeichnet (Goossens *et al.*, 1998; Küppers *et al.*, 1993). Dieser Prozess findet nach der Differenzierung von aktivierten B-Zellen in Zentroblasten innerhalb der dunklen Zone des Keimzentrums statt und führt letztendlich zur Affinitätsreifung des Ig.

Die Mutationen werden von AID (*activation-induced cytidine deaminase*) vermittelt. AID induziert durch die Desaminierung von Cytidinen fehleranfällige Reparaturmechanismen innerhalb bestimmter Nukelotid-Sequenzen (sog. *hotspot*-Motive) der V(D)J-Region (Bross *et al.*, 2000). Dadurch steigt die Mutationsrate von etwa 1 : 100 000 000 (10^{-8}) auf 1 : 1 000 (10^{-3}), d.h. dass eine Mutation innerhalb von ca. 10^3 Basenpaaren auftritt (Araten *et al.*, 2005). Da die von der SHM betroffene Region die Bindungsstelle des Ig zum Antigen kodiert, können die Mutationen die Bindungsaffinität erhöhen oder verringern.

Nach Abschluss der SHM wandern die Zentroblasten in die helle Zone des Keimzentrums und differenzieren in Zentrozyten. Dort treffen sie auf ihr spezifisches Antigen, das von FDC präsentiert wird. Weist der BCR eine erhöhte Affinität zu ihrem Antigen auf, so erhalten die Zentrozyten ein Überlebenssignal (positive Selektion). Zentrozyten mit einer verringerten Rezeptoraffinität sterben ab (Allen *et al.*, 2007).

(b) Der Klassenwechsel

CSR bezeichnet die Umlagerung der konstanten Region der schweren Kette. Dieser Prozess findet in Zentrozyten mit affinitätsgereiftem Ig innerhalb der hellen Zone des Keimzentrums statt und führt zur Entstehung verschiedener Antikörperklassen.

Während die variable Region der schweren und leichten Kette die Antigenspezifität bestimmt, legt die konstante Region der schweren Kette die Antikörperklasse und damit die Effektorfunktion fest. Insgesamt gibt es fünf verschiedene Klassen mit jeweils unterschiedlichen Funktionen während der humoralen Immunantwort: IgG₁₋₄, IgE, IgM, IgD und IgA₁₋₂. Da die V(D)J-Region während des Klassenwechsels nicht verändert wird, bleibt die Spezifität des Ig erhalten (Manis *et al.*, 2002).

Wie auch bei der SHM wird der Klassenwechsel durch AID induziert. Dabei kommt es zu einem Austausch der ursprünglich exprimierten konstanten Region C_μ für IgM gegen andere konstante Regionen der unterschiedlichen Klassen (C_δ für IgD, C_γ für IgG, C_ε für IgE und C_α für IgA) durch eine Rekombination an den jeweils vorgelagerten *switch* Regionen.

Nach erfolgter CSR verlassen die Zentrozyten das Keimzentrum und differenzieren zu Ig-sezierenden Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen.

1.1.2 B-Zell Entwicklung bei pathologischen Prozessen

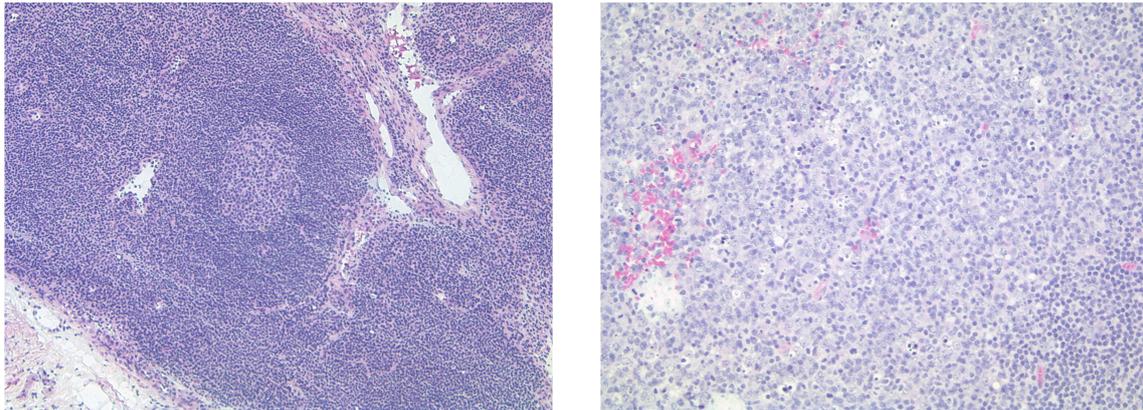
Die drei Schlüsselmechanismen der B-Zell Entwicklung (V[D]J-Rekombination, SHM und CSR) gewährleisten eine sehr flexible und gezielte Immunabwehr gegen eine Vielzahl von Pathogenen. Sie stellen allerdings auch eine stete Gefahr für die genomische Integrität dar, sobald die Kontrollmechanismen versagen. So können die Proteine RAG1/2 bei einer fehlerhaften V(D)J-Rekombination zu einer chromosomalen Translokation wie t(14;18)(q32;q21) führen, die das Gen *BCL2* auf den *IgH*-Lokus transloziert und die Expression von *BCL2* dereguliert (Bakhshi *et al.*, 1985). Im Zuge der SHM kann die Deregulation der AID-Aktivität zu Mutationen in Onkogenen wie *c-MYC* oder *PIM1* führen und deren Funktion verändern (Pasqualucci *et al.*, 2001). Zudem kann AID beim CSR eine aberrante *switch* Translokation induzieren, wie die *c-MYC-IgH* Translokation (Lenz *et al.*, 2007).

Diese Entgleisungen der Mechanismen der normalen B-Zell Entwicklung können den ersten Schritt bei der Entstehung von Tumoren des lymphatischen Systems darstellen und erklären – zumindest teilweise – die Anfälligkeit von B-Zellen zu malignen Transformationen (Abbildung 1.1b, Seite 5).

1.2 Maligne Lymphome

Bösartige Tumore des lymphatischen Systems werden als maligne Lymphome bezeichnet. Der Begriff umfasst eine Reihe von Entitäten mit unterschiedlichen morphologischen, genetischen und klinischen Eigenschaften. Die aktuelle Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sieht eine Unterteilung nach ihrer Morphologie, ihrem Phäno- und Genotyp sowie ihrer Herkunft (B- und T-Lymphozyten) vor, wobei über 90% der malignen Lymphome von B-Zellen ausgehen (Swerdlow *et al.*, 2008).

Eine Vielzahl von experimentellen Studien deuten darauf hin, dass maligne B-Zell Lymphome aus normalen Vorläuferzellen während der B-Zell Entwicklung entstehen (Alizadeh *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2001; Rosenwald *et al.*, 2002). Die Anhäufung genetischer Läsionen wie chromosomale Translokationen, Amplifikationen, Mutationen und Deletionen kann die normale B-Zell



(a) Normaler Lymphknoten

(b) Infiltrat eines DLBCL

Abbildung 1.1: Histologische Schnittpräparate. Histologischer Schnitt durch (a) einen normalen Lymphknoten mit einem charakteristischen Keimzentrum und (b) ein Infiltrat eines diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms (DLBCL) mit unregelmäßig geformten Lymphomzellen. Die unterschiedlichen Gewebestrukturen wurden mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. *Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Korinna Jöhrens, Institut für Pathologie CCM/CVK, Charité - Universitätsmedizin Berlin.*

Entwicklung unterbrechen, indem sie die Proliferation der B-Zelle steigern, Apoptose verhindern und eine weitere Differenzierung blockieren (Shaffer *et al.*, 2002b). So scheinen maligne B-Zell Lymphome in einem bestimmten Differenzierungsstadium arretiert zu sein. Entsprechend weisen viele Lymphome Eigenschaften von bestimmten nicht-malignen Gegenstücken auf, die zur Klassifizierung herangezogen werden können (Abbildung 1.2, Seite 6).

1.2.1 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome

Das diffuse großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) stellt mit einem Anteil von 30-40% den häufigsten Lymphom-Subtyp dar (Nogai *et al.*, 2011). Klinisch handelt es sich um ein sehr aggressives Lymphom, das unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tod betroffener Patienten führt. Bei der Behandlung von DLBCL-Patienten hat sich eine Anthrazyklin-basierte Chemotherapie, meist bestehend aus Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (Doxorubicin), Oncovin[®] (Vincristin), Prednison (CHOP), bewährt (Fisher *et al.*, 1993). Durch die zusätzliche Gabe des monoklonalen CD20 Antikörpers Rituximab (Handelsname Mabthera[®]) zum CHOP-Regime (R-CHOP) konnten die Therapieergebnisse deutlich verbessert werden (Coiffier *et al.*, 2010).

Das DLBCL ist eine heterogene Gruppe maligner B-Zell Lymphome, die nach der aktuellen WHO-Klassifikation in eine Vielzahl unterschiedlicher Varianten und Subtypen unterteilt werden. Die Unterteilung basiert in erster Linie auf morphologischen, biologischen, immunhistochemischen oder klinischen Parametern (Campo *et al.*, 2011). Die WHO betont allerdings den provisorischen Charakter dieser Parameter, die für die eindeutige Unterteilung aller DLBCL-Fälle unzureichend ist (Swerdlow *et al.*, 2008).

Mit Hilfe der Genexpressionsanalysen gelang es erstmals, diese heterogene diagnostische Kategorie in zwei vorherrschende molekulare Subtypen zu unterteilen: (a) Den Keimzentrums-B-Zell (GCB) Subtyp und (b) den aktivierten B-Zell (ABC) Subtyp (Alizadeh *et al.*, 2000; Rosen-

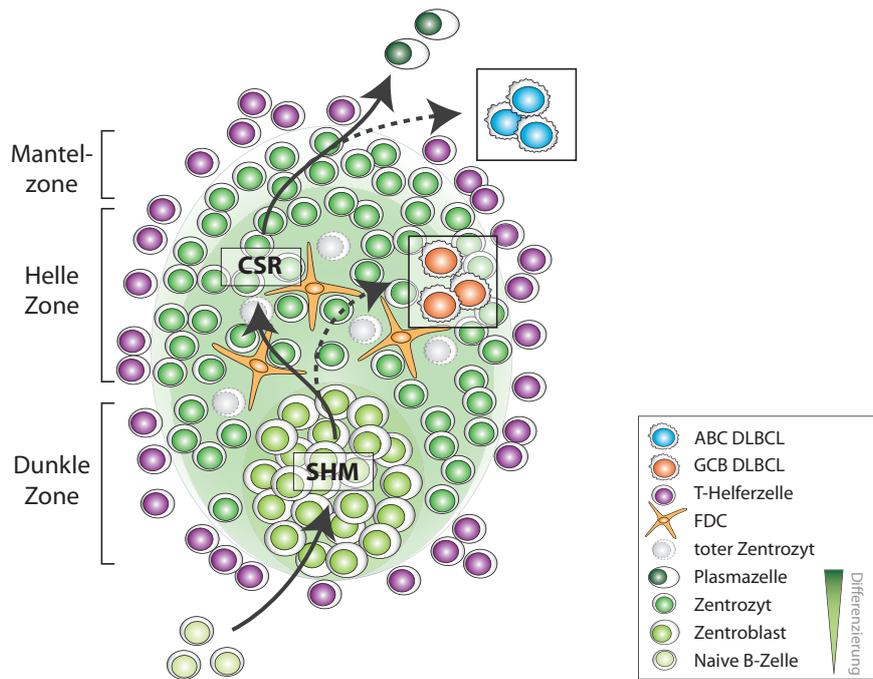


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Keimzentrums und der möglichen Ursprungsorte der molekularen DLBCL-Subtypen. Reife, naive B-Zellen wandern nach dem Antigenkontakt in sekundäre lymphatische Organe und bilden ein Keimzentrum, das in eine dunkle und helle Zone unterteilt werden kann. In der dunklen Zone proliferieren die Keimzentrums-B-Zellen, die sog. Zentroblasten, stark und fügen zufällige Mutationen in der variablen Region ihrer Immunglobuline ein. Dieser Prozess wird somatische Hypermutation (SHM) genannt. Anschließend differenzieren die Zentroblasten in sog. Zentrozyten und wandern in die helle Zone, wo der BCR von follikulären dendritischen Zellen (FDC) und T-Zellen auf eine erhöhte Antigen-spezifität überprüft wird. Dort kommt es durch Rekombination der konstanten Region der schweren Kette zum Klassenwechsel (CSR) der Antikörper, bevor sie als ausdifferenzierte Plasma- oder Gedächtniszellen das Keimzentrum verlassen. Kommt es allerdings während der normalen B-Zell-Entwicklung zu einer Anhäufung von genetischen Aberrationen, kann die weitere Differenzierung unterbrochen und die Entstehung von B-Zell-Lymphomen begünstigt werden. Das DLBCL ist eine heterogene diagnostische Kategorie und experimentelle Studien konnten zeigen, dass eine Subgruppe den Keimzentrums-B-Zellen (GCB) ähnelt, während eine andere Subgruppe viele Eigenschaften von aktivierten B-Zellen (ABC) aufweist. *Modifiziert nach Murphy (2012).*

wald *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2003). Weitere Studien konnten zeigen, dass diese molekularen Subtypen aus unterschiedlichen Vorläuferzellen während der B-Zell-Entwicklung entstehen, unterschiedliche klinische Verläufe aufweisen und sich durch die Deregulation unterschiedlicher Signalwege aufgrund rekurrenter genetischer Läsionen auszeichnen (Lenz & Staudt, 2010; Lenz *et al.*, 2008b;c).

(a) Der Keimzentrums-B-Zell Subtyp

Der GCB-Subtyp weist ein Genexpressionsprofil von Keimzentrums-B-Zellen auf. So zeichnen sich GCB DLBCL durch eine hohe Genexpression von *BCL6*, *MME (CD10)* und *LMO2* aus, die normalerweise von Keimzentrums-B-Zellen exprimiert werden (Alizadeh *et al.*, 2000; Rosenwald *et al.*, 2002). Zudem weisen GCB DLBCL eine fortlaufende SHM der *Ig*-Gene auf, so dass ihr Ursprung aus B-Zellen des Keimzentrums vermutet wird (Lossos *et al.*, 2000).

Tabelle 1.1: Charakteristische genetische Aberrationen von GCB und ABC DLBCL.

Genetische Aberration	GCB	ABC	Deregulation
	DLBCL (%)	DLBCL (%)	
<i>PTEN</i> Verlust	55	14	PI3K/mTOR Aktivierung
<i>MDM2</i> Amplifikation	12	0	
<i>CDKN2A</i> Deletion	4	30	Genomische Instabilität
<i>CREBBP</i> Mutation	32	13	
<i>EZH2</i> Mutation	22	0	Epigenetische Veränderungen
<i>MLL2</i> Mutation	27	20	
<i>BCL2</i> Translokation	45	0	
<i>BCL2</i> Amplifikation	10	34	Hemmung von Apoptose
<i>PRDM1</i> Mutation/Deletion	0	23	
<i>SPIB</i> Amplifikation	3	26	Arrest in der Differenzierung
<i>CARD11</i> Mutation	4	10	
<i>A20</i> Mutation	2	25	NF- κ B Aktivierung
<i>MYD88</i> Mutation	10	40	
<i>CD79A/B</i> Mutationen	3	20	

Zusammengefasst aus Bea *et al.* (2005); Compagno *et al.* (2009); Davis *et al.* (2010); Lenz *et al.* (2008a;c); Morin *et al.* (2010); Ngo *et al.* (2011); Pasqualucci *et al.* (2011a;b); Pfeifer *et al.* (2013); Wright *et al.* (2003)

ABC (aktivierter B-Zell Subtyp), GCB (Keimzentrums-B-Zell Subtyp), DLBCL (diffuses großzelliges B-Zell Lymphom)

Zu den charakteristischen genetischen Läsionen des GCB-Subtyps zählt die Translokation t(14;18)(q32;q21), die ca. 45% aller GCB DLBCL-Patienten aufweisen. Diese Translokation bringt das anti-apoptotische Gen *BCL2* unter die Kontrolle des *IgH*-Promotors, wodurch *BCL2* überexprimiert und die Induktion von Apoptose inhibiert wird (Rosenwald *et al.*, 2002). Des Weiteren kommt es bei ca. 55% der GCB DLBCL-Patienten durch chromosomale Deletionen, genetische Mutationen oder mutmaßliche post-transkriptionelle Mechanismen zu einem Verlust der Expression des Tumorsuppressor *phosphatase and tensin homologue (PTEN)* (Pfeifer *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2008). *PTEN* ist ein negativer Regulator des PI3K/AKT Signalweges, dessen Aktivierung die Zellproliferation steigert und das Wachstum und Überleben der Zelle fördert. Ebenfalls kann bei ca. 10% der GCB DLBCL-Patienten eine Amplifikation des Onkogens *MDM2* detektiert werden, das die Expression des Tumorsuppressors p53 unterdrückt und damit wichtige DNA-Reparaturmechanismen beeinträchtigt (Lenz *et al.*, 2008a). Schließlich weisen viele GCB DLBCL-Patienten inaktivierende Mutationen in Genen auf, die an der Modifikation von Histonen beteiligt sind. Neben der Histon-Acetyltransferase *CREBBP* sind die Histon-Methyltransferasen *EZH2* und *MLL2* bei jeweils ca. 30%, 20% und 25% aller GCB DLBCL-Patienten mutiert, wobei *MLL2* Mutationen auch bei ca. 20% aller ABC DLBCL-Patienten vorkommen (Morin *et al.*, 2010; Pasqualucci *et al.*, 2011a;b). Auch wenn die genauen Auswirkungen dieser Mutationen aufgrund der genomweiten Einflüsse der Proteine auf die Regulation der Transkription noch immer unklar sind, gibt es Hinweise auf eine gezielte Aktivierung bestimmter Onkogene bzw. Inaktivierung bestimmter Tumorsuppressorgene (Pasqualucci *et al.*, 2011a). So konnten Pasqualucci *et al.* (2011a) zahlreiche Mutationen in *CREBBP* mit einer geringen Acetylierung von *BCL6* und p53 in Verbindung bringen, die zu einer entsprechenden Aktivierung von *BCL6* und Inaktivierung von p53 führen.

(b) Der aktivierte B-Zell Subtyp

Der ABC-Subtyp weist eine Gensignatur aktivierter B-Zellen auf. So zeichnen sich ABC DLBCL durch eine hohe Expression des Transkriptionsfaktors *XBP1* aus, der für die terminale Differenzierung von Zentrozyten zu Ig-sezernierenden Plasmazellen unverzichtbar ist (Shaffer *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2003). Eine hohe Anzahl an klonalen Mutationen innerhalb der *Ig*-Gene ohne fortlaufende SHM deuten auf einen Ursprung aus Post-Keimzentrums-B-Zellen hin (Lossos *et al.*, 2000). Allerdings ist die vollständige Differenzierung zu Plasmazellen durch verschiedene genetische Aberrationen blockiert, so dass die meisten Lymphome des ABC-Subtyps keinen Klassenwechsel durchführen (Lenz *et al.*, 2007).

Zu den charakteristischen genetischen Läsionen des ABC-Subtyps zählen Mutationen und Deletionen von *PRDM1*, die ca. 25% der ABC DLBCL-Patienten aufweisen (Pasqualucci *et al.*, 2006). Da das von *PRDM1* kodierte Protein Blimp-1 die Differenzierung zu Plasmazellen induziert, indem es viele Gene der Keimzentrumsreaktion herunterreguliert, führt die Inaktivierung von Blimp-1 zu einem Arrest in der weiteren B-Zell Entwicklung (Shaffer *et al.*, 2002a). Alternativ führt auch eine Amplifikation des Transkriptionsfaktors *SPIB*, eine Translokation des Repressors *BCL6* oder eine Überexpression der microRNA *let-7* zu einer Herunterregulation der Blimp-1 Expression (Iqbal *et al.*, 2007; Lenz *et al.*, 2008c; Nie *et al.*, 2010). Des Weiteren kann bei ca. 35% der ABC DLBCL-Patienten eine Amplifikation des *BCL2*-Lokus detektiert werden, die zu einer Überexpression von *BCL2* und Hemmung von Apoptose führt (Lenz *et al.*, 2008c). Daneben weisen etwa 30% der ABC DLBCL-Patienten eine chromosomale Deletion auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 auf, die u.a. *CDKN2A* betrifft. Die von *CDKN2A* kodierten Proteine $p16^{\text{INK4A}}$ und $p14^{\text{ARF}}$ sind für die Regulation des Zellzyklus bzw. für die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden von Bedeutung und ihre Inaktivierung kann zu genomischer Instabilität führen (Lenz *et al.*, 2008c; Tagawa *et al.*, 2005). Der ABC-Subtyp zeichnet sich weiter durch verschiedene Mutationen in Mitgliedern des NF- κ B-Signalweges aus, die zur konstitutiven Aktivierung des Signalweges führen und sowohl die Zellproliferation und das Überleben der Zelle steigern als auch die Induktion von Apoptose verringern (Davis *et al.*, 2001; Karin, 2009). So können bei ca. 10% aller ABC DLBCL-Patienten *missense* Mutationen im Stützprotein *CARD11* nachgewiesen werden, ca. 20% weisen Mutationen in den signaltransduzierenden Transmembranproteinen *CD79A/B* auf und bei ca. 40% können Mutationen im Adapterprotein *MYD88* detektiert werden (Davis *et al.*, 2010; Lenz *et al.*, 2008a; Ngo *et al.*, 2011; siehe Abschnitt 1.3.2, Seite 13). Zudem weisen ca. 30% der ABC DLBCL-Patienten eine inaktivierende Mutation und/oder Deletion des negativen NF- κ B Regulators *A20* (*TNFAIP3*) auf (Compagno *et al.*, 2009).

1.3 Deregulierte Signalwege bei DLBCL

Die Deregulation bestimmter Signalwege bei DLBCL stellt nicht nur eine bloße Begleiterscheinung (ein sog. Epiphänomen) einer genomischen Instabilität dar, vielmehr sind die DLBCL-Subtypen von der Aktivität bestimmter Signalwege abhängig. In sog. *achilles heel screens* konnten unterschiedliche Gene bei den DLBCL-Subtypen identifiziert werden, die zentrale Mitglieder wichtiger Signalkaskaden kodieren und deren Aktivität essentiell für das Überleben der Lymphomzellen ist

(Bidère *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2010; Ngo *et al.*, 2006; 2011; Rui *et al.*, 2010). So konnte bei Zelllinienmodellen gezeigt werden, dass die Lymphomzellen nach der Herunterregulation dieser Gene absterben. Viele dieser Studien zeigen eine zentrale Eigenschaft von malignen Lymphomen: Die Hemmung von Apoptose (Shaffer *et al.*, 2002b). Einen Mechanismus zur Hemmung von Apoptose stellen genetische Aberrationen von Mitgliedern des Apoptose-Apparates dar. Die Aufrechterhaltung anti-apoptotischer Stimuli durch die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren macht einen weiteren Mechanismus aus.

1.3.1 Apoptose

Bei Apoptose handelt es sich um einen physiologischen Prozess, der zum kontrollierten Zelltod führt. Apoptose ist von zentraler Bedeutung für die Homöostase, für die Embryonalentwicklung sowie für die Entwicklung des Immunsystems (Elmore, 2007). So ist Apoptose essentiell für die Keimzentrumsreaktion, um B-Zellen nach erhöhter Bindungsaffinität ihres BCR zu selektionieren und B-Zellen mit autoreaktiven BCR auszuschließen (Allen *et al.*, 2007; siehe Abschnitt 1.1.1, Seite 3).

Die Regulation von Apoptose ist stark konserviert und streng kontrolliert, da eine Fehlsteuerung eine Reihe von pathologischen Erkrankungen hervorruft (Danial & Korsmeyer, 2004). Generell werden zwei Signalwege zur Auslösung von Apoptose unterschieden: (a) Der extrinsische und (b) der intrinsische Signalweg. Beide Signalwege aktivieren Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteasen (Caspasen), die zahlreiche Proteine mit einer unspezifischen, aspartathaltigen Erkennungssequenz spalten (Timmer & Salvesen, 2007). Diese Caspasen werden als inaktive Vorstufen, den sog. Pro-Caspasen, synthetisiert und erst durch eine (auto)proteolytische Spaltung aktiviert. Je nach Funktion werden Caspasen in Initiator- und Effektor-Caspasen unterschieden. Die Initiator-Caspasen (u.a. Caspase 8, 9 und 10) lösen Apoptose aus und leiten frühe apoptotische Signale an die Effektor-Caspasen (u.a. Caspase 3, 6 und 7) weiter, die wiederum zahlreiche Proteine spalten und die Bestandteile der Zelle kontrolliert abbauen. Darüber hinaus aktivieren Caspasen auch bestimmte DNasen, sog. Caspase-aktivierte DNasen, die das Chromatin in charakteristische Fragmente teilen (Enari *et al.*, 1998).

(a) Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird durch die Bindung extrazellulärer Liganden an bestimmte Rezeptoren der *tumor necrosis factor* (TNF) Familie, den sog. Todesrezeptoren, aktiviert, die in ihrem zytoplasmatischen Teil eine sog. Todesdomäne besitzen (Baker & Reddy, 1998). Durch die Ligandenbindung kommt es zu einer Trimerisierung des Rezeptors und Ausbildung einer intrazellulären Struktur, an die das Protein *Fas-associated death domain protein* (FADD) und die inaktive Vorstufe der Initiator-Caspase 8, die Pro-Caspase 8, binden. Zusammen bilden diese Proteine einen Komplex namens *death-inducing signaling complex* (DISC) (Kischkel *et al.*, 1995; Peter & Kramer, 2003). Aufgrund der räumlichen Nähe kommt es zu einer auto-proteolytischen Prozessierung und Aktivierung von Pro-Caspase 8 zu Caspase 8, die wiederum die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert (Hughes *et al.*, 2009). Die Effektor-Caspasen spalten daraufhin zahlreiche zelluläre Proteine und leiten Apoptose ein (Abbildung 1.3, Seite 11).

Die Induktion des extrinsischen Signalweges kann durch die Caspasen-vermittelte Spaltung von Bid (*BCL2 homology 3 interacting domain death agonist*) zu tBid (*truncated Bid*) verstärkt werden, das eine Verbindung zum intrinsischen Signalweg herstellt (Kaufmann *et al.*, 2007; siehe Abschnitt 1.3.1, Seite 10). Abhängig von der Aktivierung des intrinsischen Signalweges durch die Rezeptor-vermittelte Apoptose werden Typ I und Typ II Zellen voneinander unterschieden: Bei Typ I Zellen ist die Aktivierung der Effektor-Caspasen für die Induktion von Apoptose ausreichend, Typ II Zellen sind hingegen auf die Aktivierung des intrinsischen Signalweges angewiesen (Scaffidi *et al.*, 1998).

(b) Der intrinsische Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird von Proteinen der *B-cell lymphoma 2* (BCL2) Familie reguliert, deren Mitglieder sich durch konservierte BCL2 Homologie (BH) Domänen auszeichnen und in drei Gruppen unterteilt werden können: (i) Die anti-apoptotischen Mitglieder BCL2, BCL-XL, BCL-W, BCL2A1 und MCL1 mit 4 BH-Domänen (BH1-4), (ii) die *multidomain* (BH1-3) pro-apoptotischen Mitglieder Bax and Bak und (iii) die *BH3-only* pro-apoptotischen Mitglieder Bim, Bad, BMF, NOXA, HRK, PUMA, Bik und Bid (Youle & Strasser, 2008).

Die pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der BCL2-Familie können über ihre BH-Domänen miteinander interagieren und sich gegenseitig neutralisieren. So bilden die BH1-, BH2- und BH3-Domänen der anti-apoptotischen Mitglieder eine hydrophobe Tasche, an die pro-apoptotische Mitglieder mit ihrer BH3-Domäne binden können (Liu *et al.*, 2003; Petros *et al.*, 2000; Sattler *et al.*, 1997). Jegliche Störung des Gleichgewichtes innerhalb der BCL2-Familie kann zur Induktion oder Hemmung von Apoptose führen (Adams & Cory, 1998).

Der intrinsische Signalweg kann durch DNA-Schäden, zellulären Stress, UV-Strahlung und einen Mangel an Wachstumsfaktoren ausgelöst werden. In den meisten Fällen führen die entsprechenden Signale zur Induktion der *BH3-only* Proteine, den sog. Sensoren von Apoptose. Diese lösen daraufhin die Interaktion der anti-apoptotischen Proteine, den sog. Wächtern von Apoptose, mit den pro-apoptotischen *multidomain* Proteinen Bax und Bak, den sog. Effektoren von Apoptose, aus. Die Freisetzung von Bax und Bak führt zur Bildung von Poren in der äußeren mitochondrialen Membran und zur Sekretion von pro-apoptotischen Faktoren (u.a. Cytochrom c) aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in das Zytoplasma (Green & Kroemer, 2004). Cytochrom c bindet an das Protein *apoptotic protease activating factor 1* (APAF1) und einer inaktiven Vorstufe der Initiator-Caspase 9 (Pro-Caspase 9). Zusammen bilden diese Proteine einen Komplex namens Apoptosom (Srinivasula *et al.*, 1998). Dieser Komplex führt zur Aktivierung von Caspase 9, die wiederum die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert und Apoptose auslöst (Abbildung 1.3, Seite 11).

Deregulation von Apoptose bei molekularen DLBCL-Subtypen

Viele genetische Aberrationen, die man bei unterschiedlichen malignen Lymphom-Subtypen nachweisen kann, führen zur Deregulation wichtiger Regulatoren von Apoptose (Shaffer *et al.*, 2002b). Insbesondere chromosomale Aberrationen stellen einen verbreiteten Mechanismus zur Deregulation der Expression bestimmter Mitglieder des Apoptose-Apparates dar. So kann

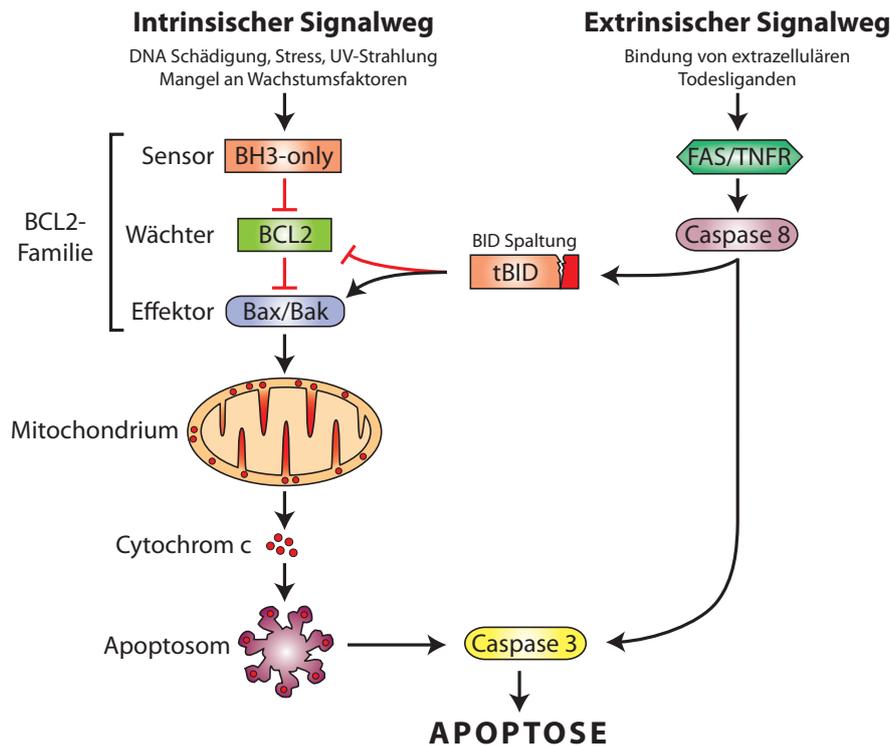


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Induktion von Apoptose. Apoptose kann über den intrinsischen und extrinsischen Signalweg ausgelöst werden. Der intrinsische Signalweg wird durch intrazelluläre Signale induziert und von pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der BCL2-Familie reguliert. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten von pro-apoptotischen BCL2-Proteinen führt zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und Freisetzung von Cytochrom c. Cytochrom c bildet mit APAF1 und Caspase 9 das Apoptosom und löst über eine Caspase-Kaskade Apoptose aus. Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung extrazellulärer Liganden an Rezeptoren der TNF-Familie und der Aktivierung einer Caspase-Kaskade durch Caspase 8 ausgelöst. Dabei kann die Spaltung des pro-apoptotischen BCL2-Mitglieds Bid zu einer Aktivierung des intrinsischen Signalweges führen. *Modifiziert nach Youle & Strasser (2008).*

sowohl die Hemmung pro-apoptotischer Proteine durch chromosomale Deletionen als auch die erhöhte Expression anti-apoptotischer Proteine durch chromosomale Translokationen oder Amplifikationen zur Hemmung von Apoptose beitragen (Galteland *et al.*, 2005; Mestre-Escorihuela *et al.*, 2007).

Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 (Seite 6 ff.) dargestellt, weisen ca. 45% der GCB DLBCL-Patienten die chromosomale Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ auf. Diese Translokation bringt das *BCL2*-Gen (auf dem chromosomalen Locus 18q21) in die Nachbarschaft und unter die Kontrolle des *IgH*-Enhancers (auf dem chromosomalen Locus 14q32) und führt zu einer konstitutiven *BCL2* Expression (Huang *et al.*, 2002; Rosenwald *et al.*, 2002). Obwohl ABC DLBCL-Patienten diese Translokation nicht aufweisen, ist eine hohe *BCL2* Expression auch mit diesem Subtyp assoziiert. Diese kann häufig auf eine Amplifikation des *BCL2*-Lokus zurückgeführt werden (Bea *et al.*, 2005; Lenz *et al.*, 2008c; Monni *et al.*, 1997). Abgesehen von chromosomalen Aberrationen kann auch die konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalweges zu einer hohen *BCL2* Expression im ABC-Subtyp führen (Catz & Johnson, 2001; siehe Abschnitt 1.3.2, Seite 12).

MCL1

MCL1 ist ein anti-apoptotisches Mitglied der BCL2-Familie und verhindert die Induktion von Apoptose, indem es die Oligomerisation von Bax und Bak blockiert. Die Apoptose-hemmende Funktion von MCL1 kann durch die selektive Interaktion mit den pro-apoptotischen BH3-*only* Proteinen NOXA, Bim und tBid oder durch diverse post-translationale Modifikationen von MCL1 verhindert werden (Chen *et al.*, 2005). So weist die N-terminale Region von MCL1 eine PEST-Sequenz auf, die reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) ist und häufig bei streng regulierten Proteinen mit einer kurzen Halbwertszeit vorkommt (Kozopas *et al.*, 1993; Rogers *et al.*, 1986). Neben der Ubiquitylierung kann auch die Spaltung und/oder Phosphorylierung von MCL1 zu dessen Degradation und Induktion von Apoptose führen (Opferman, 2006).

Die Expression von MCL1 wird durch verschiedene Differenzierungs-, Wachstums- und Überlebensfaktoren über die Aktivierung verschiedener Signalwege, u.a. MAPK/ERK, JAK/STAT und PI3K/AKT (Epling-Burnette *et al.*, 2001; Townsend *et al.*, 1999), induziert und spielt sowohl während der Embryonalentwicklung als auch bei verschiedenen Zelltypen des adulten Organismus eine wichtige Rolle (Krajewski *et al.*, 1995; Rinkenberger *et al.*, 2000).

1.3.2 NF- κ B-Signalweg

Zusätzlich zur Manipulation von Mitgliedern des Apoptose-Apparates stellt auch die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges einen sehr verbreiteten Mechanismus zur Hemmung von Apoptose bei Tumoren des lymphatischen Systems dar (Staudt, 2010). So führt die konstitutive Aktivierung von NF- κ B bei ABC DLBCL zur Expression der anti-apoptotischen Proteine BCL2, BCL-XL und BCL2A1 (Catz & Johnson, 2001; Grumont *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999).

NF- κ B umfasst die strukturverwandten Untereinheiten RelA (p65), RelB, Rel (c-Rel), NF- κ B1 (p50 und das Vorläufer-Protein p105) und NF- κ B2 (p52 und das Vorläufer-Protein p100) (Hayden & Ghosh, 2008; Jost & Ruland, 2007). Diese Untereinheiten bilden Homo- oder Heterodimere und werden bei nicht-stimulierten Zellen von verschiedenen Mitgliedern der *inhibitor of NF- κ B* (I κ B) Familie im Zytoplasma gebunden und inaktiviert. Die Aktivierung kann je nach Stimulation verschiedener Rezeptoren über zwei Signalwege erfolgen: (a) Den klassischen (kanonischen) und (b) den alternativen (nicht-kanonischen) Signalweg.

(a) Der klassische Signalweg

Die Stimulation u.a. des BCR, des TNR, des TLR (*Toll-like receptor*) und des IL-1 (*interleukin-1 receptor*) induziert den klassischen NF- κ B-Signalweg (Bonizzi & Karin, 2004). Die Induktion führt zur Aktivierung des I κ B-Kinase (IKK) Komplexes, der aus den Untereinheiten IKK α , - β und - γ (NEMO) besteht. IKK β katalysiert die Phosphorylierung von I κ B α an den Serinen 32 und 36 (Brown *et al.*, 1995). Diese Phosphorylierung führt zur Polyubiquitinierung von I κ B α durch die E3 Ubiquitin-Ligase β -TrCP und anschließender Degradierung durch das Proteasom (Kroll *et al.*, 1999). Dadurch werden die von I κ B α gebundenen NF- κ B-Dimere (meist p50/p65) freigelassen, translozieren in den Nukleus und regulieren die Expression spezifischer NF- κ B-Zielgene (Hayden & Ghosh, 2008).

(b) Der alternative Signalweg

Eine Stimulation u.a. von CD40 oder des BAFF-R (*B-cell activating factor receptor*) induziert den alternativen NF- κ B-Signalweg (Bonizzi & Karin, 2004). Im Gegensatz zum klassischen Signalweg führt die Induktion zur Aktivierung von IKK α -Homodimeren durch die NF- κ B induzierende Kinase (NIK) (Senftleben *et al.*, 2001). IKK α phosphoryliert das Präkursor-Protein p100, das im Zytosol meist mit RelB assoziiert ist. Diese Phosphorylierung führt zur Polyubiquitinierung und proteasomalen Prozessierung von p100 zu p52 (Xiao *et al.*, 2001). Das so entstandene p52 bildet mit RelB das NF- κ B-Heterodimer p52/RelB, transloziert anschließend in den Nukleus und reguliert einen spezifischen Satz von NF- κ B-Zielgenen (Hayden & Ghosh, 2008).

NF- κ B-Aktivierung bei molekularen DLBCL-Subtypen

Die konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalweges ist ein charakteristisches Kennzeichen von ABC DLBCL (Davis *et al.*, 2001). Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen konnte sowohl bei DLBCL-Patienten als auch bei Zelllinienmodellen die Expression vieler NF- κ B-Zielgene beim ABC- im Vergleich zum GCB-Subtyp gezeigt werden (Compagno *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2001). Viele dieser Gene spielen bei normalen B-Zellen eine physiologische Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen, verringern aber bei Lymphomzellen die Induktion von Apoptose und die Sensitivität gegenüber chemotherapeutischen Wirkstoffen (Baldwin, 2001; Karin, 2009).

Zahlreiche funktionelle Analysen bei Zelllinienmodellen haben weitere Hinweise auf die Bedeutung von NF- κ B bei ABC DLBCL geliefert. So legte die konstitutive Phosphorylierung von I κ B α bei ABC DLBCL-Zelllinien die Aktivierung des klassischen Signalweges nahe (Davis *et al.*, 2001). Zusätzlich zeigte die Unterbrechung des NF- κ B-Signalweges mittels einer nicht-phosphorylierbaren I κ B α -Mutante oder durch niedermolekulare Inhibitoren, dass der ABC-Subtyp von der NF- κ B-Aktivierung abhängig ist (Davis *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2005).

Im Laufe der Zeit konnten verschiedene genetische Läsionen bei ABC DLBCL als Ursache für diese konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalweges identifiziert werden (Staudt, 2010). Allerdings betreffen diese Läsionen in erster Linie Komponenten der vorgelagerten Signaltransduktion und nicht die NF- κ B-Untereinheiten selbst (Abbildung 1.4, Seite 15).

In einer wegweisenden Arbeit von Ngo *et al.* (2006) konnte zunächst das Stützprotein CARD11 als wichtiger Regulator der NF- κ B-Aktivierung bei ABC DLBCL identifiziert werden. Bei normalen B-Zellen bildet CARD11 mit BCL10 und MALT1 einen Signalkomplex (CBM-Komplex) nach der Stimulation des BCR aus, der den klassischen NF- κ B-Signalweg über die Phosphorylierung von IKK β aktiviert (Rawlings *et al.*, 2006). *Missense* Mutationen in der *coiled-coil* Domäne von *CARD11*, die ca. 10% der ABC DLBCL-Patienten ausweisen, entkoppeln jedoch die Aktivierung des CBM-Komplexes von der Stimulation des BCR und führen zu einer konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalweges (Lamason *et al.*, 2010; Lenz *et al.*, 2008a).

Mit dem Nachweis von inaktivierenden Mutation und/oder Deletionen des negativen NF- κ B-Regulators A20 bei ca. 30% der ABC DLBCL-Patienten konnte anschließend verdeutlicht werden, dass auch Defekte in den selbstregulatorischen Mechanismen des NF- κ B-Signalweges zu dessen konstitutiven Aktivierung beitragen können (Compagno *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2009). So stellt die Expression von A20, die normalerweise von NF- κ B induziert wird, eine

negative Rückkopplungsschleife dar, bei der A20 u.a. IKK γ und MALT1 deubiquitiniert und die Aktivierung von NF- κ B terminiert (Lin *et al.*, 2008; Wertz *et al.*, 2004).

Nachfolgend konnte eine chronisch aktive Stimulation des BCR bei ABC DLBCL festgestellt werden (Davis *et al.*, 2010). So exprimieren die Lymphomzellen einen Großteil der Gene, die auch bei normalen B-Zellen durch die Stimulation des BCR induziert werden (Alizadeh *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2001). Der BCR setzt sich aus einem membranständigem Ig und den Transmembranproteinen CD79A und CD79B zusammen. Bindet ein Antigen an das Ig, kommt es zur Aktivierung von Tyrosinkinase der *sarcoma* (Src) Familie, die mit dem BCR assoziiert sind (Gauld & Cambier, 2004). Diese Kinasen phosphorylieren bestimmte Tyrosine in dem sog. ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) von CD79A/B und aktivieren auf diese Weise neben dem CBM-Komplex auch den mTOR-, MAP Kinase- und NFAT-Signalweg (Dal Porto *et al.*, 2004). *Missense* Mutationen der Tyrosine im ITAM von CD79A/B, die bei ca. 20% der ABC DLBCL-Patienten detektiert werden können, steigern die Expression des BCR auf der Zelloberfläche und verringern deren Rückkopplungshemmung (Davis *et al.*, 2010). Damit stellt die chronische Aktivierung des BCR einen alternativen Mechanismus zur Aktivierung des CBM-Komplexes und des NF- κ B-Signalweges dar.

Schließlich konnten auch rekurrente Mutationen in dem Adapterprotein MYD88 bei ca. 40% der ABC DLBCL mit der konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalweges assoziiert werden (Ngo *et al.*, 2011). Normalerweise wird MYD88 von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, wie den TLR, aktiviert (Jiang *et al.*, 2006). Mutationen in der *Toll/IL-1 receptor* (TIR) Domäne von MYD88 führen allerdings zur spontanen Komplexbildung mit Kinasen der *interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK) Familie (insbesondere IRAK1 und IRAK4) und damit zur konstitutiven Signaltransduktion (Ngo *et al.*, 2011).

Zusammenfassend weisen über 50% aller ABC DLBCL-Patienten somatische Mutationen in Regulatoren des NF- κ B-Signalweges auf (Compagno *et al.*, 2009). Der Großteil dieser Läsionen betrifft Mitglieder des klassischen NF- κ B-Signalweges. Mutationen in Mitgliedern des alternativen NF- κ B-Signalweges sind bislang kaum dokumentiert, die Aktivierung dieses Signalweges konnte allerdings bei ABC DLBCL-Patienten bereits beobachtet werden (Compagno *et al.*, 2009).

Regulation der NF- κ B-abhängigen Genexpression

Im Gegensatz zu den gut charakterisierten Mechanismen, die bei ABC DLBCL-Patienten zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führen, ist die Regulation spezifischer NF- κ B-Zielgene unklar. So binden alle NF- κ B-Dimere an die relativ unspezifische Konsensus-Sequenz GGGRNYYYCC (das sog. κ B-Motiv) in der Promotor- und Enhancer-Region ihrer Zielgene, aber auch in einer Vielzahl anderer chromosomaler Regionen (Chen & Ghosh, 1999; Martone *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 2006). Die Zusammensetzung der Hetero- und Homodimere beeinflusst zwar die DNA-Bindungsspezifität, kann aber weder die Vermittlung bestimmter zellulärer Antworten auf verschiedene Stimuli erklären, noch wird sie der kritischen Rolle der NF- κ B-Aktivierung für eine Vielzahl von physiologischen Prozessen gerecht (Hoffmann *et al.*, 2006).

Einen wesentlichen Beitrag zur spezifischen Genregulation wird der Rekrutierung unterschiedlicher Koaktivatoren und -repressoren durch die NF- κ B-Dimere zugesprochen (Ghosh & Hayden,

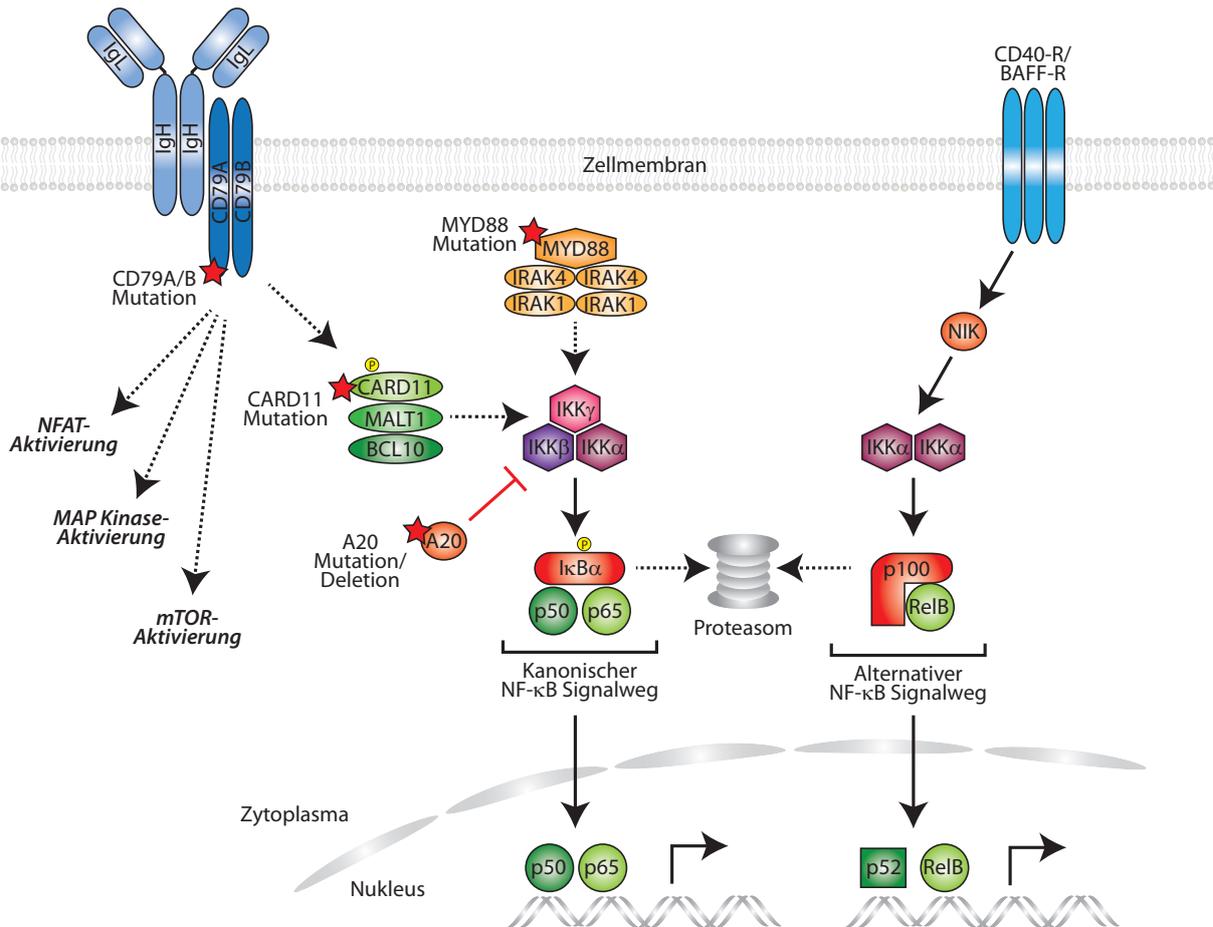


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges bei ABC DLBCL. Die konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalweges ist ein charakteristisches Merkmal bei ABC DLBCL-Patienten. Mutationen in CD79A/B führen zur chronischen Aktivierung des BCR und des CBM-Komplexes. Dieser aktiviert den klassischen NF- κ B-Signalweg über die Phosphorylierung von IKK β und kann durch *CARD11* Mutationen von der Stimulation des BCR entkoppelt werden. Ebenfalls führen Mutationen in dem Adapterprotein MYD88 zur proteasomalen Degradation von I κ B α und Freisetzung von p50/p65-Dimeren. Diese translozieren in den Nucleus und regulieren die Expression bestimmter Zielgene. Im Gegensatz zum klassischen Signalweg führt eine Stimulation u.a. des CD40- oder BAFF-Rezeptors zu einer Aktivierung von NIK und IKK α -Homodimeren und zur Induktion des alternativen Signalweges. Die proteasomale Prozessierung von p100 zu p52 führt zur Translokation von p52/RelB-Dimeren in den Nucleus und Expression bestimmter Zielgene. \rightarrow (Signaltransduktion), \dashrightarrow (Signaltransduktion über nicht dargestellte Proteine), \dashv (Inhibition der Signaltransduktion), \uparrow (Genexpression), \star (genetische Läsion), \textcircled{P} (Phosphorylierung)

2008). Insbesondere den atypischen Mitgliedern der I κ B-Familie kommt eine unerwartete Funktion bei der Regulation der NF- κ B-abhängigen Genexpression zu (Hinz *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu den typischen I κ B-Mitgliedern (I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ), die konstitutiv exprimiert werden und im Zytoplasma die NF- κ B-Aktivität inhibieren, zeichnen sich die atypischen I κ B-Mitglieder (BCL3, I κ B ζ , I κ BNS und I κ B η) durch eine induzierbare Expression und vorwiegende Lokalisation im Nucleus aus (Fiorini *et al.*, 2002; Ohno *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 2004; Yamauchi *et al.*, 2010). Die Interaktion atypischer I κ B-Mitglieder mit NF- κ B-Dimeren können die DNA-Bindung stabilisieren und die Transkription von NF- κ B-Zielgenen verhindern oder transaktivieren (Ghosh & Hayden, 2008).

I κ B ζ

Das atypische I κ B-Mitglied I κ B ζ wird in ruhenden, nicht-stimulierten Zellen kaum exprimiert, jedoch durch bestimmte Stimuli des angeborenen Immunsystems stark induziert. So induzieren IL-1 und Lipopolysaccharide (LPS) eine hohe Expression von I κ B ζ (Eto *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2004; Yamazaki *et al.*, 2001). I κ B ζ interagiert im Nukleus mit NF- κ B-Untereinheiten über eine C-terminale Ankyrin-Domäne, die eine Homologie zu den atypischen I κ B-Mitgliedern BCL3 und I κ BNS aufweist (Fiorini *et al.*, 2002; Kitamura *et al.*, 2000; Ohno *et al.*, 1990). Die N-terminale Region zeigt allerdings keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen auf (Muta, 2006).

Die Wirkung von I κ B ζ auf den NF- κ B-Signalweg ist bislang ungeklärt. Während erstmalige Reporteranalysen auf eine inhibitorische Wirkung auf den NF- κ B-Signalweg hinwiesen (Yamazaki *et al.*, 2001), konnte in Verbindung mit bestimmten NF- κ B-Dimeren eine transaktivierende Aktivität von I κ B ζ festgestellt werden (Motoyama *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2004). So binden I κ B ζ mit p50-Homodimeren an den *IL-6* Promotor und induzieren dessen Expression (Yamamoto *et al.*, 2004).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das DLBCL ist ein sehr aggressives Lymphom und führt unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tod. Mittlerweile kann ein Großteil der Patienten durch ein optimiertes Chemotherapie-regime geheilt werden. Trotz dieser Fortschritte gibt es immer noch große Unterschiede in der Überlebensrate zwischen GCB und ABC DLBCL-Patienten (Lenz *et al.*, 2008b). So weist der GCB-Subtyp mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von über 70% einen deutlich besseren Verlauf als der ABC-Subtyp mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 50% auf (Lenz *et al.*, 2008b). Genetische Aberrationen, die zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege führen, stellen einen möglichen Grund für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf der molekularen DLBCL-Subtypen dar. Allerdings sind noch viele der zugrunde liegenden molekularen und zellbiologischen Mechanismen unverstanden und ihre genaue Bedeutung bei der molekularen Pathogenese der DLBCL-Subtypen unklar.

Eine Vielzahl experimenteller Studien konnten belegen, dass die Lymphomzellen der DLBCL-Subtypen von der Aktivität spezifischer Signalwege abhängig sind (Davis *et al.*, 2010; Lenz *et al.*, 2008c; Ngo *et al.*, 2006; 2011; Pfeifer *et al.*, 2013). Diese Abhängigkeit bietet die Möglichkeit, spezifische Zielstrukturen zu entdecken, die im Rahmen einer Lymphomtherapie pharmakologisch inhibiert werden können. Denn sollte es gelingen, Subtyp-spezifische Onkogene zu inhibieren, ließen sich nicht nur DLBCL-Patienten effektiver behandeln, sondern auch Nebenwirkungen der Behandlung verringern. Aus diesem aktuellen Problemfeld der Diagnose und Behandlung von DLBCL-Patienten resultieren folgende Zielsetzungen der vorliegenden Dissertation:

1. Identifikation neuer Subtyp-spezifischer Onkogene und Signalkaskaden bei den molekularen DLBCL-Subtypen.
2. Untersuchung der Onkogene auf eine Beteiligung bei der molekularen Pathogenese der DLBCL-Subtypen.

3. Funktionelle Validierung der Onkogene bei DLBCL-Zelllinienmodellen.
4. Analyse der Onkogene als potentielle Zielstrukturen, die im Rahmen einer Behandlung von klinisch ungünstig verlaufenden DLBCL-Patienten pharmakologisch inhibiert werden können.

2 Veröffentlichte Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die funktionelle Bedeutung Subtyp-spezifischer Onkogene bei der molekularen Pathogenese der DLBCL-Subtypen untersucht. Der Schwerpunkt lag auf der Untersuchung der molekularen Pathogenese des klinisch ungünstig verlaufenden ABC-Subtyps. Dabei konnten die Subtyp-spezifischen Onkogene *MCL1* und *I κ B ζ* identifiziert und funktionell validiert werden. Die Ergebnisse wurden in den Fachzeitschriften LEUKEMIA (Manuskript I) und BLOOD (Manuskript II) veröffentlicht und stellen die Grundlage dieser kumulativen Arbeit dar.

2.1 Manuskript I

Das Manuskript I mit dem Titel „*MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma*“ (Kurztitel: „*Role of MCL1 in DLBCL*“) wurde am 6. September 2012 zur Veröffentlichung in der Fachzeitschrift LEUKEMIA eingereicht und am 17. Dezember akzeptiert. Die Veröffentlichung erfolgte zunächst als *article preview* am 21. Dezember und anschließend in der Druckausgabe Juni, Band 27, Nummer 6, Seite 1381–1390. Die Publikation kann unter folgender DOI-Adresse abgerufen werden: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.367>. Die Eigenleistungen des Autors an dem Manuskript sind in der Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Eigenleistung des Autors am Manuskript I mit dem Titel „*MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma*“.

Kategorie	Eigenanteil (%)
Versuchsplanung	70
Versuchsdurchführung	80
Auswertung der Daten	80
Verfassung des Manuskriptes	60

Zusammenfassung

Die Hemmung von Apoptose ist ein wesentliches Merkmal maligner Tumore und trägt zur Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika bei. *MCL1* ist ein Apoptose-hemmendes Mitglied der BCL2-Familie und wird bei unterschiedlichen soliden und hämatologischen Tumoren hoch exprimiert. Um die Rolle von *MCL1* bei der molekularen Pathogenese von molekularen DLBCL-Subtypen zu untersuchen, wurde die *MCL1* Expression bei DLBCL-Patienten auf RNA-Ebene mittels Genexpressionsanalysen ($n = 350$) und auf Protein-Ebene mittels Immunhistochemie ($n = 249$) untersucht. Dabei konnte eine signifikante Überexpression der *MCL1*-mRNA

($p = 2,7 \times 10^{-10}$) und des MCL1-Proteins ($p = 0,001$) bei ABC im Vergleich zu GCB DLBCL-Patienten nachgewiesen werden. Zur Analyse der molekularen Mechanismen, die zur hohen MCL1 Expression beitragen, wurden die *array comparative genomic hybridisation* (aCGH) Daten von 203 DLBCL-Patienten ausgewertet. Bei mehr als 25% der ABC DLBCL-Patienten konnte eine chromosomale Amplifikation des *MCL1*-Lokus detektiert werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die konstitutive Aktivierung des JAK/STAT Signalweges zur MCL1 Deregulation bei ABC DLBCL beiträgt. Funktionelle Analysen von MCL1 offenbarten, dass sowohl die Herunterregulation der MCL1 Expression mittels *small hairpin* RNA (shRNA), als auch die Behandlung mit dem MCL1-Inhibitor Obatoclax Zelltod bei Zelllinienmodellen mit einer hohen MCL1 Expression induziert. Die Apoptose-hemmende Funktion von MCL1 konnte auf eine Interaktion mit dem pro-apoptotischen Protein Bak mittels Immunpräzipitation zurückgeführt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Expressionslevel von MCL1 die Sensitivität von Zelllinien gegenüber diversen Chemotherapeutika beeinflusst. Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse, dass MCL1 eine zentrale Rolle bei der molekularen Pathogenese bei MCL1-positiven DLBCL-Fällen spielt und dass die spezifische Hemmung von MCL1 bei der Behandlung dieser Fälle von therapeutischem Nutzen sein kann.

2.2 Manuskript II

Das Manuskript II mit dem Titel „*IκBζ controls the constitutive NF-κB target gene network and survival of ABC DLBCL*“ (Kurztitel: „*IκBζ signaling in ABC DLBCL*“) wurde am 10. Juni 2013 zur Veröffentlichung in der Fachzeitschrift BLOOD eingereicht und am 10. Juli akzeptiert. Die Veröffentlichung erfolgte zunächst als *first edition* am 18. Juli und anschließend in der Druckausgabe September, Band 122, Nummer 13, Seite 2242–2250. Die Publikation kann unter folgender DOI-Adresse abgerufen werden: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-06-508028>. Die Eigenleistungen des Autors an dem Manuskript sind in der Tabelle 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.2: Eigenleistung des Autors am Manuskript II mit dem Titel „*IκBζ controls the constitutive NF-κB target gene network and survival of ABC DLBCL*“.

Kategorie	Eigenanteil (%)
Versuchsplanung	50
Versuchsdurchführung	60
Auswertung der Daten	60
Verfassung des Manuskriptes	50

Zusammenfassung

Das ABC DLBCL zeichnet sich durch die konstitutive Aktivierung des NF-κB-Signalweges aus. Allerdings ist die Regulation spezifischer NF-κB-Zielgene noch weitgehend unklar. Um potentielle Regulatoren des NF-κB-Signalweges zu identifizieren, wurden die Genexpressionsdaten von 350 primären DLBCL-Patienten nach differentiell-exprimierten NF-κB Regulatoren untersucht. Dabei konnte eine signifikante Überexpression des atypischen IκB-Mitglieds IκBζ bei ABC im Vergleich

zu GCB DLBCL-Patienten nachgewiesen werden ($p = 5,7 \times 10^{-37}$). Die Herunterregulation von I κ B ζ mittels shRNA induzierte nur bei ABC und nicht bei GCB DLBCL-Zelllinienmodellen Zelltod. Überraschenderweise zeigten Genexpressionsanalysen, dass die Herunterregulation von I κ B ζ die Expression einer Vielzahl von typischen NF- κ B-Zielgenen beeinflusst. Bei der Analyse, durch welche molekulare Mechanismen I κ B ζ die Aktivität von NF- κ B beeinflusst, konnte eine starke Interaktion zwischen I κ B ζ und den NF- κ B-Untereinheiten p50 und p52 mittels Luciferase-Reporter-Assay und Immunpräzipitation festgestellt werden. Diese Ergebnisse legen nicht nur eine regulatorische Funktion von I κ B ζ auf den klassischen, sondern auch auf den alternativen NF- κ B-Signalweg bei ABC DLBCL nahe, dessen Rollen bei der molekularen Pathogenese noch immer unklar ist. Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass I κ B ζ eine essentielle Rolle bei der Regulation NF- κ B-abhängiger Zielgene bei ABC DLBCL spielt und eine vielversprechende Zielstruktur bei der Behandlung von ABC DLBCL-Patienten darstellen kann.

3 Diskussion

Das DLBCL ist eine heterogene diagnostische Kategorie, die anhand von Genexpressionsanalysen in zwei vorherrschende molekulare Subtypen unterteilt werden kann: Den GCB- und den ABC-Subtyp. Der GCB-Subtyp zeichnet sich durch die Expression von Genen aus, die typischerweise von Keimzentrums-B-Zellen exprimiert werden, während der ABC-Subtyp vermehrt Gene exprimiert, deren Expression für aktivierte B-Zellen kennzeichnend ist. Diese Unterteilung der DLBCL in molekulare Subgruppen ist auch von großer klinischer Bedeutung, da GCB DLBCL-Patienten wesentlich besser auf eine Standardtherapie nach dem R-CHOP Protokoll ansprechen als ABC DLBCL-Patienten.

Charakteristische genetische Läsionen der molekularen DLBCL-Subtypen stellen einen möglichen Grund für das unterschiedliche klinische Verhalten dar. So zeichnet sich der GCB-Subtyp u.a. durch chromosomale Translokationen von *BCL2*, Verlust von *PTEN* und Amplifikationen von *MDM2* aus. Im Gegensatz dazu weist der ABC-Subtyp u.a. eine konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, Deletionen von *CDKN2A* und Amplifikationen von *BCL2* auf. Allerdings ist die Bedeutung vieler genetischen Aberrationen bei der molekularen Pathogenese der DLBCL-Subtypen noch immer unklar.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Identifikation und funktionelle Untersuchung von Onkogenen, die bei der molekularen Pathogenese der DLBCL-Subtypen eine Rolle spielen. Denn obwohl eine Vielzahl von experimentellen Studien bereits belegen konnten, dass die Lymphomzellen der DLBCL-Subtypen von der Aktivität spezifischer Signalwege abhängig sind und nach deren Hemmung absterben (Davis *et al.*, 2010; Ngo *et al.*, 2006; 2011; Pfeifer *et al.*, 2013), sind viele der zugrunde liegenden molekularen und zellbiologischen Mechanismen weiterhin unverstanden. Diese galt es in der vorliegenden Dissertation zu untersuchen, um potentielle Zielstrukturen für eine spezifische Lymphomtherapie zu identifizieren.

3.1 Identifikation Subtyp-spezifischer Onkogene bei DLBCL

Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass sich die molekularen DLBCL-Subtypen in der Expression von tausenden Genen unterscheiden (Alizadeh *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2003). Einige dieser Gene können aufgrund der unterschiedlichen Ursprungszellen beider Subtypen differentiell exprimiert sein und die physiologische Veränderung der Genexpression während der B-Zell Entwicklung darstellen. Andere können aufgrund charakteristischer genetischer Läsionen in einem der beiden Subtypen dereguliert sein. Je nach Funktion können diese Subtyp-spezifischen Gene unterschiedlich zur Entstehung von DLBCL beitragen.

Ein Ziel der vorliegenden Dissertation war die Identifikation von Subtyp-spezifischen Onkogenen, die bei der molekularen Pathogenese von DLBCL beteiligt sind. Die differentielle Expression

diente als erster Hinweis auf eine potentielle Subtyp-spezifische Funktion des entsprechenden Proteins, die darauffolgend funktionell untersucht werden sollte.

3.1.1 Expressionsanalysen zur Identifikation deregulierter Onkogene

Eine Voraussetzung zur Identifikation Subtyp-spezifischer Onkogene bei DLBCL ist die Kenntnis über deren Expression in einem geeigneten Bezugssystem. Als solches diente (a) ein Patientenkollektiv von 350 DLBCL-Patienten, das von Lenz *et al.* (2008b) mittels DNA-Microarrays untersucht und (b) ein Patientenkollektiv von 249 DLBCL-Patienten, das von Nagel *et al.* (2010) auf einem *tissue*-Microarray zusammengestellt worden war.

(a) DNA-Microarrays

Die Genexpressionsanalyse mittels DNA-Microarray stellt eine sehr effiziente Methode zur parallelen Untersuchung der genomweiten Genexpression dar und hat wesentlich zur Aufdeckung wichtiger pathogenetischer Informationen von DLBCL beigetragen (Lenz & Staudt, 2010). Die DNA-Microarray Technologie basiert auf der Markierung der zu untersuchenden RNA mit Fluoreszenzfarbstoffen (direkt oder indirekt) und anschließender Hybridisierung an Transkript-spezifische Sonden, die an definierten Positionen eines Trägermaterials, dem sog. Microarray, aufgebracht sind (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006). Die Expression eines Genes kann daraufhin durch die Analyse des Fluoreszenzsignals einer korrespondierenden Sonde des Arrays ermittelt werden, das proportional zur relativen Menge der RNA ist.

Die genomweite Quantifizierung der Genexpression von DLBCL-Patientenproben ermöglicht die Identifikation von Genen, deren Rolle bei der molekularen Pathogenese der DLBCL-Subtypen noch unbekannt sind. Dadurch können völlig neue Aspekte der zugrunde liegenden Biologie der DLBCL-Subtypen aufgedeckt werden, die anhand der individuellen Analyse einzelner Gene nur schwer zu identifizieren sind (Staudt & Dave, 2005). Auch wenn u.a. die Integrität der RNA, die Effizienz der Fluoreszenzmarkierung und die Spezifität der Hybridisierung die Quantifizierung der Genexpression beeinflussen kann (Auer *et al.*, 2003; Binder & Preibisch, 2005; Ma *et al.*, 2006), konnte die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Daten dieser Methode in vielen Studien gezeigt werden (Staudt & Dave, 2005).

Das in der vorliegenden Dissertation verwendete Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 350 Patienten, bei denen von mehreren Pathologen nach den Kriterien der WHO ein primäres DLBCL diagnostiziert wurde (Lenz *et al.*, 2008b). Mit Hilfe der genomweiten Genexpressionsanalyse mittels DNA-Microarray konnte ein sog. Genexpressionsprofil für jeden DLBCL-Patienten erstellt werden. Dieses Genexpressionsprofil war insbesondere für die Unterscheidung der molekularen DLBCL-Subtypen wichtig, da das Expressionslevel eines einzigen Genes für die genaue Zuordnung der Patienten nicht geeignet ist (Alizadeh *et al.*, 2000; siehe Abschnitt 1.2.1, Seite 5). So erfolgte die Einteilung der DLBCL-Patientenproben in die molekularen Subtypen anhand der Expression spezifisch ausgewählter Gene (Lenz *et al.*, 2008b; Wright *et al.*, 2003).

(b) Tissue-Microarrays

Die *tissue*-Microarray Technologie ermöglicht die parallele Untersuchung von kleinen Gewebeprobe unterschiedlicher Patienten, die nebeneinander auf einem Objektträger aufgebracht sind (Tzankov *et al.*, 2005). Zur Stabilisierung und Konservierung werden die Gewebeprobe mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (sog. FFPE-Gewebe), aus denen dann zylindrische Kerne gestanzt und in einem leeren Paraffinblock, dem sog. Empfängerblock, angeordnet werden. Horizontale Schnitte durch diesen Empfängerblock werden daraufhin auf einen Objektträger übertragen und mittels verschiedener molekularer Methoden, u.a. Immunhistochemie, untersucht (Tzankov *et al.*, 2005).

Mit Hilfe von *tissue*-Microarrays kann das Expressionslevel von Proteinen bei vielen DLBCL-Gewebeprobe parallel untersucht werden. Auf diese Weise können abweichende Reaktionsbedingungen ausgeschlossen sowie intra- und interindividuelle Unterschiede bei der Interpretation der Ergebnisse minimiert werden, die bei einer sukzessiven Untersuchung einzelner Gewebeschnitte häufig auftreten (Tzankov *et al.*, 2005). So eignet sich die *tissue*-Microarray Technologie insbesondere zur Validierung differentiell exprimierter Gene, die z.B. mit Hilfe von DNA-Microarrays identifiziert wurden. Da der Tumorzellgehalt in Biopsien von DLBCL-Patienten in der Regel relativ hoch ist, stellt die Ausstanzung repräsentativer Gewebeprobe kein wesentliches Problem dar. Zudem wird die Homogenität des Kerns durch regelmäßige Hämatoxylin und Eosin Färbungen kontrolliert, so dass die Ergebnisse von *tissue*-Microarrays sehr gute Übereinstimmungen im Vergleich zur Analyse konventioneller Gewebeschnitte zeigen (Tzankov *et al.*, 2003; 2005).

Der in der vorliegenden Dissertation verwendete *tissue*-Microarray setzte sich aus 249 Gewebeprobe von DLBCL-Patienten zusammen (Nagel *et al.*, 2010). Die Klassifikation der molekularen DLBCL-Subtypen erfolgte anhand des sog. Tally-Algorithmus (Meyer *et al.*, 2011). Dieser Algorithmus ermöglichte die Einteilung der untersuchten DLBCL-Patienten in GCB und *non*-GCB aufgrund der Expression Subtyp-spezifischer Proteine, die mittels Immunhistochemie quantifiziert wurden. Die *non*-GCB Kategorie setzte sich aus ABC DLBCL und unklassifizierten DLBCL-Patienten zusammen, wobei der ABC-Subtyp den Großteil dieser Kategorie ausmachte (Meyer *et al.*, 2011; Nagel *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu den Algorithmen von Choi *et al.* (2009) und Hans *et al.* (2004) berücksichtigte der Tally-Algorithmus alle Ergebnisse der Immunhistochemie bei der Klassifikation und schrieb keine bestimmte Reihenfolge der Färbungen vor (Meyer *et al.*, 2011). So zeigte die Klassifikation von DLBCL-Patienten mit dem Tally-Algorithmus die größte Übereinstimmung mit den Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays (Meyer *et al.*, 2011).

3.2 Funktionelle Validierung von MCL1 bei molekularen DLBCL-Subtypen

Die Deregulation von anti-apoptotischen Proteinen spielt bei der Entstehung von malignen Lymphomen eine zentrale Rolle (Shaffer *et al.*, 2002b; siehe Abschnitt 1.3.1, Seite 10). Angesichts der Beobachtung von Zhou *et al.* (2001), dass MCL1 transgene Mäuse häufig Lymphome entwickeln, die histologisch dem DLBCL sehr ähnlich sind, wurde im Rahmen der vorliegenden

Dissertation die Rolle von MCL1 bei der molekulare Pathogenese von DLBCL untersucht.

MCL1 ist ein Apoptose-hemmendes Mitglied der BCL2-Familie (siehe Abschnitt 1.3.1, Seite 12). Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass MCL1 bei verschiedenen soliden und hämatologischen Tumoren dereguliert ist und zur Hemmung von Apoptose beiträgt (Derenne *et al.*, 2002; Kaufmann *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine hohe MCL1 Expression zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führen kann (Nguyen *et al.*, 2007; Pepper *et al.*, 2008).

3.2.1 Deregulation von MCL1

Die Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays in einem Patientenkollektiv von 350 DLBCL-Patienten zeigte eine signifikante Überexpression von *MCL1* bei ABC im Vergleich zu GCB DLBCL-Patienten ($p = 2,7 \times 10^{-10}$). Diesen Ergebnissen entsprechend konnte in einem unabhängigen Patientenkollektiv von 249 DLBCL-Patienten eine signifikante MCL1 Überexpression bei ABC/*non*-GCB im Vergleich zu GCB DLBCL-Patienten auf Protein-Ebene detektiert werden ($p = 0,001$). Übereinstimmend konnte eine signifikante Überexpression von MCL1 bei ABC im Vergleich zu GCB DLBCL-Zelllinien auf RNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden. Allerdings konnte sowohl bei einer kleinen Gruppe von GCB DLBCL-Patienten und -Zelllinien eine hohe MCL1 Expression als auch bei manchen ABC DLBCL-Patienten und -Zelllinien eine geringe MCL1 Expression festgestellt werden.

Diese Ergebnisse legen zum einen nahe, dass eine erhöhte Expression der *MCL1*-mRNA zu einer erhöhten Translation und Expression des MCL1-Proteins bei ABC DLBCL führt. Zum anderen implizieren die Ergebnisse, dass MCL1 hauptsächlich bei ABC DLBCL auf RNA- und Protein-Ebene überexprimiert wird, während bei GCB DLBCL eine deutlich geringere Expression von MCL1 vorliegt. Die sporadische Deregulation von MCL1 bei einigen GCB DLBCL verdeutlicht aber, dass die MCL1 Expression bei beiden molekularen Subtypen dereguliert sein kann.

In einer Studie von Cho-Vega *et al.* (2004) konnte eine hohe MCL1 Expression bei 84% der DLBCL-Patientenproben mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation zeigen aber, dass viele DLBCL-Patienten keine signifikante MCL1 Expression aufweisen. Die Verwendung von zwei unabhängigen Patientenkollektiven und Detektionsmethoden bekräftigen diese Ergebnisse, da auf diese Weise eine Verzerrungen der Ergebnisse durch eine selektive Zusammenstellung der Patienten und/oder durch methodenabhängige Artefakte stark verringert wird. Zudem wurden in der Studie von Cho-Vega *et al.* (2004) die DLBCL-Patienten nicht in die molekularen Subtypen differenziert. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hohe Anzahl an MCL1-positiven DLBCL-Patienten auf einer Überrepräsentation des ABC-Subtyps in dem untersuchten Patientenkollektiv basiert. Da es sich zudem in jener Studie um ein relativ kleines Patientenkollektiv ($n = 31$) handelt, können bereits kleine Veränderungen in der Zusammenstellung der Patienten eine große Auswirkung auf die relative Häufigkeit eines Subtyp-spezifischen Merkmals haben. Davon abgesehen erschwert die Verwendung unterschiedlicher Färbemethoden, Antikörper und *cut-offs* zur Einteilung von MCL1-positiven und -negativen Proben einen direkten Vergleich der Ergebnisse.

3.2.2 Molekulare Mechanismen der Deregulation von MCL1

Als Ursache für die Deregulation der MCL1 Expression in DLBCL-Patienten und -Zelllinien konnten verschiedene molekulare Mechanismen identifiziert werden. Angesichts der komplexen chromosomalen Veränderungen bei DLBCL, die häufig in einen funktionellen Zusammenhang mit der Deregulation von bestimmten Onkogenen gebracht werden können (Lenz *et al.*, 2008c), wurde zunächst der *MCL1*-Lokus auf chromosomale Veränderungen mittels aCGH untersucht. Diese Methode basiert auf der kompetitiven Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA von Tumorzellen und normalen Zellen an chromosomale Sonden eines DNA-Microarrays. Durch die Markierung der Proben mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen kann das Verhältnis der entsprechenden Signale bestimmt und auf die Anzahl der Kopien einer bestimmten chromosomalen Region geschlossen werden. Weicht das Verhältnis von 1 : 1 ab, liegt je nach Orientierung der Abweichung eine chromosomale Amplifikation oder Deletion beim Tumor vor.

Bei der Untersuchung des *MCL1*-Lokus auf Chromosom 1q21 mittels aCGH bei DLBCL-Zelllinien konnten chromosomale Amplifikationen bei MCL1-positiven Zelllinien festgestellt werden. Die *MCL1*-Lokus Amplifikation ging mit einer hohen MCL1 Expression einher und lieferte einen ersten Hinweis, dass chromosomale Amplifikationen zu einer erhöhten MCL1 Expression bei DLBCL beitragen können.

Übereinstimmend konnten *MCL1*-Lokus Amplifikationen auch bei DLBCL-Patienten detektiert werden, wie die Analyse eines aCGH-Datensatzes von 203 primären DLBCL-Patienten ergab. Diese konnten signifikant häufiger bei ABC im Vergleich zu GCB DLBCL-Patienten nachgewiesen werden ($p = 0,034$). Zudem führten die *MCL1*-Lokus Amplifikationen bei ABC DLBCL-Patienten zu einer signifikanten Überexpression von MCL1 ($p = 0,004$). Bei GCB DLBCL-Patienten konnte hingegen kein Zusammenhang zwischen *MCL1*-Lokus Amplifikation und MCL1 Expression festgestellt werden ($p = 0,85$).

Diese Ergebnisse implizieren, dass die chromosomale Amplifikation des *MCL1*-Lokus einen molekularen Mechanismus zur Deregulation der *MCL1* Expression bei einem signifikanten Anteil von ABC DLBCL darstellt. Damit erweitern die Ergebnisse die Beobachtungen von Rao *et al.* (1998) und Green *et al.* (2011), die in kleineren Studien eine *MCL1*-Lokus Amplifikationen bei DLBCL-Patienten feststellen konnten, ohne jedoch die Subtyp-spezifische Prävalenz dieser Amplifikationen bei ABC DLBCL-Patienten und deren Korrelation mit der MCL1 Expression zu erkennen.

Neben numerischen Veränderungen des *MCL1*-Lokus könnten auch strukturelle Veränderungen, wie z.B. balancierte chromosomale Translokationen von *MCL1*, zu einer Überexpression von MCL1 beitragen. Diese konnten zwar mit Hilfe der aCGH nicht detektiert und daher nicht untersucht werden, allerdings gibt es bisher weder bei DLBCL noch bei anderen Tumorentitäten Hinweise auf solche balancierten Translokationen von *MCL1* (Mitelman *et al.*, 2014). Auch wenn die chromosomale Region 1q21 bei vielen DLBCL-Patienten von Translokationen betroffen ist, handelt es sich in der Regel um unbalancierte Translokationen, die zu quantitativen Veränderungen des entsprechenden Chromosomenabschnittes führen und somit auch mittels aCGH nachweisbar sind (Manola *et al.*, 2008; Morin *et al.*, 2013).

Vorherige Arbeiten zeigten, dass die MCL1 Expression von dem Transkriptionsfaktor *signal*

transducer and activator of transcription 3 (STAT3) reguliert werden kann (Isomoto *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011). STAT3 gehört zu der STAT-Familie, deren Mitglieder bei der Differenzierung, der Zellproliferation und dem Überleben der Zelle eine wesentliche Rolle spielen und durch verschiedene Zytokine über eine Rezeptor-vermittelte Phosphorylierung von Janus Kinasen (JAK) aktiviert werden (Calo *et al.*, 2003). Die Aktivierung von STAT3 wird über die autokrine Sekretion von IL-6 und IL-10 induziert (Finbloom & Winestock, 1995; Zhong *et al.*, 1994). Eine Studie von Lam *et al.* (2008) konnte durch die Expression einer nicht-phosphorylierbaren I κ B α -Mutante zeigen, dass die Expression von IL-6 und IL-10 von der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges abhängig ist. Da sich ABC im Vergleich zu GCB DLBCL durch eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B auszeichnet (Davis *et al.*, 2001; siehe Abschnitt 1.2.1, Seite 5), weist der ABC-Subtyp eine relativ hohe Expression und Aktivierung von STAT3 auf (Ding *et al.*, 2008; Lam *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Dissertation konnte sowohl nach der Behandlung von MCL1-positiven Zelllinien mit einem pan-JAK-Inhibitor (JAK-Inhibitor I) als auch mit einem direkten STAT3-Inhibitor (WP1066) ein deutlicher Rückgang der MCL1 Expression beobachtet werden. Übereinstimmend konnte eine erhöhte Aktivierung in Form einer Phosphorylierung von STAT3 mittels Immunhistochemie bei ABC DLBCL-Patienten detektiert werden, die signifikant mit der MCL1 Expression korrelierte ($p = 0,037$).

Zusammenfassend verdeutlichen diese Untersuchungen, dass neben einer chromosomalen Amplifikation des *MCL1*-Lokus auch eine Aktivierung von STAT3 zur MCL1 Deregulation bei ABC DLBCL-Patienten beiträgt. Interessanterweise scheinen sich aber beide Mechanismen der MCL1 Deregulation nicht auszuschließen, wie die Detektion eines chromosomalen Zugewinns des *MCL1*-Lokus und einer STAT3-abhängigen MCL1 Expression bei der ABC DLBCL-Zelllinie OCI-Ly3 verdeutlichte.

3.2.3 Funktionelle Analysen von MCL1

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte sowohl bei primären DLBCL-Patienten als auch bei etablierten DLBCL-Zelllinien nachgewiesen werden, dass MCL1 signifikant bei ABC im Vergleich zu GCB DLBCL überexprimiert wird. Insofern stellen DLBCL-Zelllinien ein geeignetes Modellsystem für funktionelle Analysen dar.

Herunterregulation von MCL1 mittels shRNA

Um die funktionelle Bedeutung von MCL1 bei der molekularen Pathogenese von DLBCL zu untersuchen, wurde die MCL1 Expression bei DLBCL-Zelllinien mittels RNA Interferenz herunterreguliert. Dazu wurden die DLBCL-Zelllinien mit bestimmten Oligonukleotidsequenzen retroviral transduziert, die eine komplementäre Sequenz zur mRNA des Zielgens aufwiesen. Nach der Integration dieser Oligonukleotidsequenzen in das Wirtsgenom erfolgte deren Expression und Prozessierung zu sog. shRNA durch ein zelleigenes Enzymsystem. Die anschließende Hybridisierung der shRNA an die mRNA des Zielgens induzierte dessen Degradation und ermöglichte dadurch eine sehr spezifische, post-transkriptionelle Herunterregulation der Genexpression (Hannon, 2002).

Die Herunterregulation der Expression von MCL1 mittels shRNA induzierte nur bei DLBCL-Zelllinien mit einer hohen MCL1 Expression Zelltod. Weitere Analysen ergaben, dass dieser toxische Effekt der MCL1-Herunterregulation auf der Induktion von Apoptose basierte. Bei den übrigen DLBCL-Zelllinien mit einer geringen MCL1 Expression hingegen hatte die Herunterregulation von MCL1 keine Auswirkung auf deren Viabilität.

Um einen sog. *off-target*-Effekt der verwendeten shRNA auszuschließen, bei der die Expression unbeteiligter Gene durch eine unspezifische Bindung der shRNA an die entsprechende mRNA beeinträchtigt wird (Jackson *et al.*, 2003), wurden in der vorliegenden Dissertation zwei unterschiedliche shRNA gegen *MCL1* verwendet. Beide shRNA zeigten unabhängig voneinander den gleichen toxischen Effekt bei den untersuchten DLBCL-Zelllinien. Zudem konnte durch die Überexpression einer exogenen *MCL1* cDNA in einem sog. *rescue*-Experiment die shRNA-vermittelte Toxizität kompensiert werden.

Zusammenfassend implizieren diese Ergebnisse, dass MCL1 eine zentrale Rolle bei der Hemmung von Apoptose bei MCL1-positiven DLBCL-Zelllinien spielt. Übereinstimmend konnte auch bei Zelllinienmodellen anderer Tumorentitäten, die sich durch eine Deregulation der MCL1 Expression auszeichnen, eine Induktion von Apoptose nach der Herunterregulation von MCL1 nachgewiesen werden (Derenne *et al.*, 2002; Lestini *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Darüber hinaus legen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation eine nicht-redundante Funktion von MCL1 in Bezug auf andere anti-apoptotische BCL2-Mitglieder nahe, die bei vielen DLBCL-Patienten und -Zelllinien ebenfalls dereguliert sind (Mehra *et al.*, 2002; Monni *et al.*, 1997; Rosenwald *et al.*, 2002). So hatte die erhöhte Expression der anti-apoptotischen Proteine BCL2 und BCL-XL, die bei einer Subgruppe von DLBCL-Zelllinien detektiert werden konnte, keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber der Herunterregulation von MCL1. Folglich bildet die Deregulation von MCL1, die in der vorliegenden Dissertation festgestellt werden konnte, die Grundlage bei der molekularen Pathogenese einer Subgruppe von DLBCL.

Eine mögliche Erklärung für die zentrale Rolle von MCL1 bei der molekularen Pathogenese von DLBCL stellt dessen Bedeutung für die B-Zell Entwicklung dar. So konnte in konditionalen *MCL1 knockout* Mäusen gezeigt werden, dass MCL1 essentiell für die Entwicklung von T- und B-Zellen sowie für das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen ist (Opferman *et al.*, 2003; 2005). Dazu konnte eine Studie von Vikstrom *et al.* (2010) zeigen, dass MCL1 eine wesentliche Rolle bei der Bildung von Keimzentren spielt. Wie in Abschnitt 1.1.1 (Seite 3) dargestellt, führt die Keimzentrumsreaktion u.a. zur positiven Selektion von B-Zellen mit einer erhöhten Affinität ihres BCR zu einem bestimmten Antigen. Diese Selektion wird durch die Expression pro- oder anti-apoptotischer Proteine des intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Signalweges gesteuert (Fischer *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2001). Eine Erhöhung der Rezeptoraffinität führt zur Expression anti-apoptotischer Mitglieder der BCL2-Familie (u.a. MCL1) und zum Überleben der B-Zelle (Smith *et al.*, 1994; 2000). So konnten Vikstrom *et al.* (2010) zeigen, dass MCL1 ein zentraler anti-apoptotischer Regulator für B-Zellen des Keimzentrums und aktivierte B-Zellen ist.

Charakterisierung der Interaktionspartner von MCL1

Die anti-apoptotische Funktion von MCL1 beruht auf der Interaktion von MCL1 mit einer Reihe von anderen Proteinen (siehe Abschnitt 1.3.1, Seite 10 ff.). So bilden die BH-Domänen von MCL1 eine globuläre Tasche, an die pro-apoptotische BCL2-Mitglieder mit ihrer BH3-Domäne binden können (Sattler *et al.*, 1997).

Bei der Suche nach Bindungspartnern von MCL1 bei DLBCL-Zelllinien konnte eine Interaktion mit Bak, Bim und NOXA mittels Immunpräzipitation festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor beschriebene Interaktion von MCL1 mit Bak (Willis *et al.*, 2005), Bim (Han *et al.*, 2005) und NOXA (Chen *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu konnte keine Interaktion mit tBid detektiert werden, die in einer Studie von Clohessy *et al.* (2006) beschrieben wurde. Allerdings konnte auch nur das vollständige, nicht-trunkierte Bid bei den untersuchten DLBCL-Zelllinien nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt), mit dem MCL1 nicht interagieren kann (Clohessy *et al.*, 2006).

Die Apoptose-hemmende Funktion von MCL1 bei DLBCL konnte durch die hier dargestellten Ergebnisse auf die Interaktion mit Bak und damit auf die Blockierung der Porenbildung in der äußeren mitochondrialen Membran zurückgeführt werden. Im Umkehrschluss suggerieren diese Ergebnisse, dass die Freisetzung von Bak durch die Herunterregulation von MCL1 oder durch die Interaktion der BH3-*only* Proteine Bim und NOXA mit MCL1 zur Freisetzung von Cytochrom c und zur Induktion von Apoptose führen kann. Entsprechend stellt die hohe Expression von MCL1, die in der vorliegenden Dissertation bei DLBCL-Patienten und -Zelllinien gezeigt werden konnte, einen effektiven Mechanismus zur Hemmung von Apoptose dar. Rekurrente Deletionen des MCL1 Interaktionspartners NOXA, die in einer Studie von Mestre-Escorihuela *et al.* (2007) bei DLBCL-Patienten identifiziert werden konnten und einen analogen Mechanismus zur Deregulation von MCL1 darstellen, bekräftigen diese zentrale Stellung von MCL1 bei der Hemmung von Apoptose bei DLBCL.

Bedeutung von MCL1 bei der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika

Chemotherapeutika können über unterschiedliche Mechanismen zu einer Induktion von Apoptose führen (Johnstone *et al.*, 2002). Folglich spielt die Hemmung von Apoptose nicht nur bei der Entstehung von DLBCL sondern auch bei der Resistenz von Lymphomzellen gegenüber Chemotherapeutika eine wichtige Rolle (Muris *et al.*, 2006). Da viele Chemotherapeutika das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen BCL2-Proteinen stören, kommt den anti-apoptotischen BCL2-Proteinen eine besondere Rolle bei der Ausbildung von Resistenzmechanismen zu (Adams & Cory, 2007; Fulda & Debatin, 2006).

Um den Beitrag von MCL1 zur Entstehung von Chemoresistenzen bei DLBCL-Patienten zu untersuchen, wurde MCL1 bei der MCL1-defizienten DLBCL-Zelllinie HT exprimiert bzw. bei den MCL1-positiven Zelllinien U2932 und TMD8 herunterreguliert und mit den Chemotherapeutika Doxorubicin, Etoposid und Vincristin behandelt, die auch zur Behandlung von DLBCL-Patienten eingesetzt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von MCL1 die Sensitivität gegenüber diesen Chemotherapeutika verringert, während die Herunterregulation von MCL1 die Chemosensitivität verstärkt.

Diese Ergebnisse implizieren, dass MCL1 eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung von Resistenzmechanismen bei DLBCL-Zelllinien spielt. So verschiebt eine hohe Expression von MCL1 das sensible Gleichgewicht der BCL2-Proteine zugunsten des Überlebens der Lymphomzellen und erhöht deren Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Substanzen. Im Umkehrschluss führt die Herunterregulation von MCL1 zu einem Ungleichgewicht zugunsten der pro-apoptotischen BCL2-Proteine und Induktion von Apoptose.

Zusammen mit bereits publizierten Daten aus anderen Tumorentitäten, die eine hohe MCL1 Expression mit einer Chemoresistenz bei Zelllinienmodellen und mit einem Therapieversagen bei Patienten korrelieren konnten (Backus *et al.*, 2001; Ji *et al.*, 2009; Lestini *et al.*, 2009; Saxena *et al.*, 2004), suggerieren die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation, dass die pharmakologische Hemmung von MCL1 bei DLBCL-Patienten mit einer hohen MCL1 Expression von therapeutischen Nutzen sein kann.

3.3 Funktionelle Validierung von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ bei molekularen DLBCL-Subtypen

Die konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalweges bei ABC DLBCL kann durch die Induktion von anti-apoptotischen Proteinen zur Hemmung von Apoptose beitragen (Catz & Johnson, 2001; Grumont *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Allerdings ist die Regulation spezifischer NF- κ B-Zielgene noch immer unklar. Eine Studie von Lenz *et al.* (2008c) konnte eine rekurrente chromosomale Amplifikation des *I}\kappa\text{B}\zeta*-Lokus bei ABC DLBCL-Patienten identifizieren, die eine Rolle von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ bei der molekularen Pathogenese von DLBCL suggeriert und in der vorliegenden Dissertation näher untersucht wurde.

$\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ ist ein atypisches Mitglied der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Familie, das in ruhenden, nicht-stimulierten Zellen kaum exprimiert, durch bestimmte Stimuli jedoch stark induziert wird (siehe Abschnitt 1.3.2, Seite 16). Im Vergleich zur konstitutiven Expression der typischen $\text{I}\kappa\text{B}$ -Mitgliedern, die im Zytoplasma NF- κ B-Untereinheiten binden und inaktivieren, legt die induzierbare Expression und vorwiegend nukleäre Lokalisation von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ eine transaktivierende bzw. transreprimierende Funktion bei der Expression von NF- κ B-Zielgenen nahe.

3.3.1 Deregulation von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$

Anhand der Genexpressionsanalysen mittels DNA-Microarrays konnte festgestellt werden, dass *I}\kappa\text{B}\zeta* signifikant höher bei ABC im Vergleich zu GCB DLBCL-Patienten exprimiert ist ($p = 5,7 \times 10^{-37}$). Übereinstimmend konnte bei ABC im Vergleich zu GCB DLBCL-Zelllinien eine signifikante Überexpression sowohl der *I}\kappa\text{B}\zeta*-mRNA als auch des $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Proteins detektiert werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine erhöhte Expression der *I}\kappa\text{B}\zeta*-mRNA zu einer erhöhten Translation des $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Proteins führt. Zudem suggeriert diese Korrelation zwischen *I}\kappa\text{B}\zeta*-mRNA und -Protein, dass sich ABC DLBCL-Patienten durch eine Überexpression von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene auszeichnen.

Eine Deregulation von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ wurde bei hämatologischen Tumoren bislang weder beschrieben noch funktionell untersucht. Eine Studie von Goransson *et al.* (2009) bei Liposarkomen konnte

allerdings zeigen, dass $I\kappa B\zeta$ mit bestimmten Onkogenen interagiert und die Expression von bestimmten NF- κ B-Zielgenen reguliert (siehe Abschnitt 3.3.3, Seite 32). Trotz der noch nicht vollständig untersuchten Wirkung von $I\kappa B\zeta$ auf die Expression NF- κ B-abhängiger Zielgene deutet die Überexpression von $I\kappa B\zeta$ bei ABC DLBCL auf eine aktivierende Funktion hin, da sich dieser Subtyp durch die konstitutive Aktivierung von NF- κ B auszeichnet.

3.3.2 Molekulare Mechanismen der Deregulation von $I\kappa B\zeta$

Die Untersuchung des $I\kappa B\zeta$ -Lokus auf Chromosom 3q12 bei DLBCL-Zelllinien mittels aCGH offenbarte keine numerischen Aberrationen in der Kopienzahl bei Zelllinienmodellen mit einer hohen $I\kappa B\zeta$ Expression. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte eine Studie von Lenz *et al.* (2008c) bei primären DLBCL-Patienten eine Amplifikation eines 1,08 Mb großen Bereiches auf dem kleinen Arm von Chromosom 3 identifizieren, auf dem u.a. $I\kappa B\zeta$ kodiert ist. Diese Amplifikation konnte in ca. 10% der ABC DLBCL-Patienten nachgewiesen werden, jedoch nicht bei GCB DLBCL-Patienten (Lenz *et al.*, 2008c).

Angesichts der hohen $I\kappa B\zeta$ Expression bei ABC DLBCL-Zelllinien ohne chromosomale Amplifikation des $I\kappa B\zeta$ -Lokus legen diese Ergebnisse zumindest bei den Zelllinienmodellen einen alternativen Mechanismus zur Deregulation der $I\kappa B\zeta$ Expression nahe. Übereinstimmend zeigten weitere Analysen bei ABC DLBCL-Zelllinien, dass die $I\kappa B\zeta$ Expression von NF- κ B reguliert wird. So führte die Expression positiver Regulatoren des NF- κ B-Signalweges mit aktivierenden Mutationen (*MyD88* L265P und *CARD11* L244P), die bei ABC DLBCL-Patienten nachgewiesen werden können (Tabelle 1.1, Seite 7), zu einer deutlichen Induktion der $I\kappa B\zeta$ Expression.

Da die konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalweges ein charakteristisches Kennzeichen von ABC DLBCL ist (Davis *et al.*, 2001; siehe Abschnitt 1.3.2, Seite 13), implizieren diese Ergebnisse, dass $I\kappa B\zeta$ in erster Linie durch die Aktivierung von NF- κ B bei ABC DLBCL dereguliert wird. So ist dieser Signalweg wahrscheinlich auch bei ABC DLBCL-Patienten mit einer chromosomalen Amplifikation des $I\kappa B\zeta$ -Lokus konstitutiv aktiv und stellt möglicherweise die Ursache für die hohe $I\kappa B\zeta$ Expression bei diesen Fällen dar. Abschließend können aber chromosomale Amplifikationen als Ursache für die hohe $I\kappa B\zeta$ Expression bei einem Bruchteil der ABC DLBCL-Patienten nicht ausgeschlossen werden.

Allerdings konnte bei der NF- κ B-abhängigen ABC DLBCL-Zelllinie U2932 keine Expression von $I\kappa B\zeta$ nachgewiesen werden. Zudem konnte weder bei Hodgkin Lymphom (HL)- und Multiples Myelom (MM)-Zelllinien noch bei HL- und MM-Patienten eine hohe Expression von $I\kappa B\zeta$ nachgewiesen werden, obwohl beide Entitäten durch eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B charakterisiert sind (Annunziata *et al.*, 2007; Bargou *et al.*, 1997). Diese Daten implizieren, dass die Expression von $I\kappa B\zeta$ von zusätzlichen Stimuli reguliert wird, die in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden. So konnte eine Studie von Yamazaki *et al.* (2005) zeigen, dass die Stabilisierung der $I\kappa B\zeta$ -mRNA durch post-transkriptionelle Mechanismen wesentlichen Einfluss auf das Expressionslevel von $I\kappa B\zeta$ hat.

3.3.3 Funktionelle Analysen von I κ B ζ

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte sowohl bei primären DLBCL-Patienten als auch bei etablierten DLBCL-Zelllinien gezeigt werden, dass sich ausschließlich der ABC-Subtyp durch eine hohe I κ B ζ Expression auszeichnet. Diese Ergebnisse zeigen damit, dass DLBCL-Zelllinien ein geeignetes Modellsystem für funktionelle Analysen darstellen.

Herunterregulation von I κ B ζ mittels shRNA

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von I κ B ζ bei der molekularen Pathogenese von DLBCL wurde dessen Expression bei DLBCL-Zelllinien mittels shRNA herunterreguliert und die Viabilität der Zelllinien gemessen, analog zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von MCL1 (siehe Abschnitt 3.2.3, Seite 26).

Die Herunterregulation der Expression von I κ B ζ mittels shRNA induzierte nur bei ABC DLBCL-Zelllinien mit einer hohen I κ B ζ Expression Zelltod. Im Gegensatz dazu wirkte sich die Herunterregulation von I κ B ζ weder bei GCB DLBCL- noch bei HL- und MM-Zelllinien auf deren Viabilität aus. Da die shRNA-vermittelte Toxizität bei ABC DLBCL-Zelllinien sowohl mit zwei unabhängigen shRNA gegen I κ B ζ gezeigt, als auch durch die Überexpression einer I κ B ζ cDNA in einem sog. *rescue*-Experiment kompensiert werden konnte, können *off-target*-Effekte als Ursache für den Zelltod weitgehend ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass I κ B ζ nicht nur durch die konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalweges bei ABC DLBCL exprimiert wird, sondern auch für die Zellproliferation und das Überleben der Zellen benötigt wird.

Charakterisierung der Interaktionspartner von I κ B ζ

Da I κ B ζ eine C-terminale Ankyrin-Domäne besitzt, über die eine Interaktion mit NF- κ B-Untereinheiten möglich ist (Kitamura *et al.*, 2000; siehe Abschnitt 1.3.2, Seite 16), wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation nach potentiellen Bindungspartnern von I κ B ζ gesucht. Bei 293T-Zellen konnte zunächst mittels Luciferase-Reporter-Assay eine Interaktion zwischen I κ B ζ und p50 sowie p52, aber nicht zwischen I κ B ζ und RelA, RelB und Rel nachgewiesen werden. Diese Interaktionen konnten bei DLBCL-Zelllinien mittels Immunpräzipitation bestätigt werden.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte eine Interaktion zwischen I κ B ζ und p50 ebenfalls in einer Studie von Trinh *et al.* (2008) beschrieben werden. Allerdings konnte in der vorliegenden Dissertation keine Interaktion mit p65 festgestellt werden, die zuvor von Totzke *et al.* (2006) beschrieben wurde. Vielmehr konnte eine Interaktion zwischen I κ B ζ und p52 detektiert werden, die bislang noch nicht beschrieben wurde.

Während p50 eine wichtige Rolle im klassischen NF- κ B-Signalweg spielt, ist p52 mit dem alternativen NF- κ B-Signalweg assoziiert (Bonizzi & Karin, 2004; siehe Abschnitt 1.3.2, Seite 12). Folglich zeigen die Ergebnisse, dass I κ B ζ sowohl mit Komponenten des klassischen als auch des alternativen NF- κ B-Signalweges interagiert.

Die Interaktion von I κ B ζ mit p52 deutet auf eine bisher unbekannte regulatorische Funktion von I κ B ζ auf den alternativen NF- κ B-Signalweg bei DLBCL hin. Da der Fokus vieler Studien auf die konstitutive Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalweges bei ABC DLBCL gerichtet

wurde, ist die Rolle des alternativen NF- κ B-Signalweges bei der molekularen Pathogenese von DLBCL noch immer unklar (Jost & Ruland, 2007). Allerdings zeigte eine Studie von Pham *et al.* (2011), in der eine Deregulation von NIK bei DLBCL nachgewiesen und mit einer Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalweges assoziiert werden konnte, dass der alternative NF- κ B-Signalweg ebenfalls konstitutiv bei ABC DLBCL aktiv ist. Zudem konnten Neri *et al.* (1991) bereits chromosomale Aberrationen des *NF- κ B2*-Lokus bei DLBCL nachweisen, die zur Aktivierung des alternative Signalweges führen können (Ishikawa *et al.*, 1997). Zusammen mit den bereits publizierten Daten über die konstitutive Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalweges bei ABC DLBCL (Davis *et al.*, 2001; siehe Abschnitt 1.3.2, Seite 13), legen die im Rahmen der vorliegende Dissertation gezeigten Ergebnisse eine zentrale Stellung von I κ B ζ bei der Regulation beider NF- κ B-Signalwege bei ABC DLBCL nahe.

Bedeutung von I κ B ζ für die NF- κ B-Aktivität

Die Wirkung von I κ B ζ auf den NF- κ B-Signalweg ist bislang ungeklärt. So konnte I κ B ζ sowohl eine transaktivierende als auch eine transreprimierende Funktion zugeschrieben werden (Kitamura *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2001; siehe Abschnitt 1.3.2, Seite 16). Um den Einfluss von I κ B ζ auf die Genexpression bei DLBCL zu untersuchen, wurde die Expression von I κ B ζ bei einer ABC DLBCL-Zelllinie mittels shRNA herunterreguliert und die genomweite Veränderung der Genexpression mittels DNA-Microarrays analysiert.

Mit Hilfe der Genexpressionsanalysen konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass die Expression einer Reihe von Genen durch die Herunterregulation von I κ B ζ gehemmt wird, die von NF- κ B abhängig sind oder eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und bei der Immunantwort spielen. So konnte u.a. eine signifikante Deregulation von *SOCS3*, *BATF*, *BCL3*, *CDC25A*, *IL5RA* und *EBI3* nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse implizieren, dass die Herunterregulation von I κ B ζ die Aktivität von NF- κ B dereguliert. Übereinstimmend konnte mittels *gene set enrichment analysis* (GSEA) festgestellt werden, dass die I κ B ζ -Signatur eine signifikante Anreicherung von Genen enthält, die auch durch einen IKK β -Inhibitor (MLN120b) dereguliert werden. Zudem stimmte die I κ B ζ -Signatur signifikant mit der eines MALT1-Inhibitors (*z*-VRPR-fmk) überein, der ebenfalls die Expression von NF- κ B-Zielgenen beeinflusst (Hailfinger *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnte in der I κ B ζ -Signatur auch eine signifikante Anreicherung von Genen identifiziert werden, durch deren Expression sich ABC DLBCL auszeichnen und von anderen aggressiven Lymphomen unterscheiden.

Zusammenfassend suggerieren die hier dargestellten Ergebnisse, dass I κ B ζ eine essentielle Rolle bei der Regulation von NF- κ B-Zielgenen bei ABC DLBCL spielt. So konnte auch bei anderen ABC DLBCL-Zelllinien die Hemmung von NF- κ B-abhängigen Zielgenen nach der Herunterregulation von I κ B ζ nachgewiesen werden. Wie erwartet konnte zudem ein Rückgang der Phosphorylierung von I κ B α und STAT3 nach der Herunterregulierung von I κ B ζ beobachtet werden, da die Phosphorylierung von STAT3 über die autokrine Sekretion von IL-6 und IL-10 induziert wird und diese von der Aktivierung von NF- κ B abhängig ist (Lam *et al.*, 2008). Diese I κ B ζ -abhängige Aktivierung von STAT3 könnte auch die Korrelation zwischen NF- κ B- und STAT3-Aktivierung bei ABC DLBCL erklären, die Lam *et al.* (2008) identifizieren konnte.

3.4 Klinische Relevanz

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse der identifizierten Onkogene MCL1 und I κ B ζ als potentielle Zielstrukturen, die im Rahmen einer Behandlung von klinisch ungünstig verlaufenden DLBCL-Patienten pharmakologisch inhibiert werden können. Obwohl sich unser Wissensstand über das DLBCL seit dessen Erstbeschreibung signifikant verbessert hat, bleiben zahlreiche Fragen bzgl. der Behandlung offen. So kommt es insbesondere bei ABC DLBCL häufig zu einem Therapieversagen und einer Entstehung von Rezidiven, die sich nur schwer therapieren lassen (Gisselbrecht *et al.*, 2010).

3.4.1 Aktueller Stand der Diagnostik und Therapie

Im klinischen Alltag werden die molekularen DLBCL-Subtypen bislang nicht voneinander differenziert. Vor allem hält die Komplexität der Genexpressionsanalyse und die Notwendigkeit nach frischem oder tiefgefrorenem Gewebe deren Einzug in die Routinediagnostik ab. Die Verwendung von wenigen immunhistochemischen Markern stellt zwar eine realisierbare Alternative zur Reproduktion der mit Hilfe von DNA-Microarrays identifizierten Subgruppen dar, ist aber noch nicht ausreichend standardisiert (de Jong *et al.*, 2007). So erfolgt heutzutage die Erstlinientherapie bei fast allen DLBCL-Patienten nach dem gleichen R-CHOP Protokoll (Armitage, 2012; Dührsen *et al.*, 2012).

3.4.2 Innovative Ansätze zur Behandlung von DLBCL

Um die Prognose von DLBCL-Patienten mit klinisch ungünstigem Verlauf zu verbessern, müssen innovative Behandlungsansätze für eine spezifische Lymphomtherapie entwickelt werden. In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass (a) MCL1 und (b) I κ B ζ attraktive Zielstrukturen bei der Behandlung von DLBCL-Patienten darstellen.

(a) Hemmung von MCL1

Die hier gezeigte Rolle von MCL1 bei der Hemmung von Apoptose bei DLBCL und dessen Bedeutung für die Sensitivität von DLBCL-Zelllinien gegenüber diversen Chemotherapeutika verdeutlicht, dass die spezifische Hemmung von MCL1 von therapeutischem Nutzen sein kann. MCL1 kann pharmakologisch durch das BH3-Mimetikum Obatoclax (GX15-070) gehemmt werden. Dieser sog. *small molecule* Inhibitor ist der BH3-Domäne pro-apoptotischer BCL2-Mitglieder nachempfunden, die in der globulären Tasche von MCL1 bindet (Nguyen *et al.*, 2007).

Die Behandlung MCL1-positiver und -negativer DLBCL-Zelllinien mit diesem Inhibitor in der vorliegenden Dissertation zeigte, dass MCL1-positive Zelllinien sensitiver gegenüber Obatoclax sind als MCL1-negative Zelllinien. Des Weiteren konnte eine Induktion von Apoptose gezeigt werden, die durch die Freisetzung von Bak erklärt werden kann (Abbildung 3.1, Seite 34). Allerdings handelt es sich bei Obatoclax um einen pan-BCL2-Inhibitor, der neben MCL1 auch die anti-apoptotischen BCL2-Mitglieder BCL2, BCL-XL und BCL-W inhibiert (Nguyen *et al.*, 2007). Die Induktion von Apoptose kann also durch die Hemmung von BCL2, BCL-XL und BCL-W nicht ausgeschlossen werden.

Die hier gezeigten Daten legen nahe, dass die Hemmung von MCL1 einen effektiven therapeutischen Ansatz bei DLBCL-Patienten darstellen könnte. Diese Hypothese wird durch eine aktuelle Studie von Kelly *et al.* (2014) bei Mausmodellen bekräftigt, in der das Tumorwachstum von c-MYC-abhängigen Lymphomen signifikant durch die Hemmung von MCL1 beeinträchtigt werden konnte. Darüber hinaus betont der hier gezeigte Einfluss der MCL1 Expression auf die Chemosensitivität von DLBCL-Zelllinien dessen therapeutische Relevanz (siehe Abschnitt 3.2.3, Seite 28). Übereinstimmend mit diesen Daten konnte die Studie von Nguyen *et al.* (2007) zeigen, dass Obatoclox die MCL1-vermittelte Apoptoseresistenz überwinden kann. Unabhängig davon konnte mit dem BCL2-spezifischen BH3-Mimetikum ABT-737, das MCL1 nicht binden kann (Oltersdorf *et al.*, 2005), gezeigt werden, dass die Entstehung von Resistenzen gegenüber diesem Inhibitor maßgeblich von einer hohen Expression von MCL1 vermittelt wird (Konopleva *et al.*, 2006; van Delft *et al.*, 2006).

Die Wirkung von Obatoclox wird bereits in mehreren klinischen Studien bei der Behandlung von Lymphomen und Leukämien untersucht (Goard & Schimmer, 2013). Auch wenn Obatoclox als Monotherapie bisher nur begrenzte Therapieerfolge aufweist, konnte die Kombination mit dem Protease-Inhibitor Bortezomib vorläufige Erfolge bei der Behandlung von Mantelzelllymphomen und MM verzeichnen (Goy *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2012).

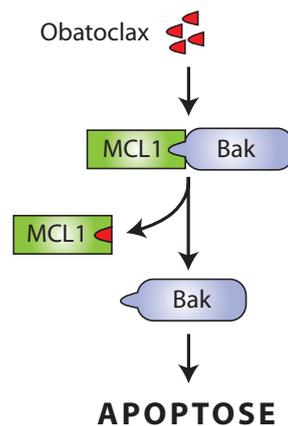


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Obatoclox zur Induktion von Apoptose. MCL1 verhindert die Induktion von Apoptose bei DLBCL, indem es die Oligomerisation des pro-apoptotischen BCL2-Mitglieds verhindert (Willis *et al.*, 2005). Das BH3-Mimetikum Obatoclox besetzt die hydrophobe Bindungstasche von MCL1, verhindert die Interaktion mit Bak und induziert bei MCL1-abhängigen Zelllinien Apoptose (Nguyen *et al.*, 2007).

(b) Hemmung von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$

Angesichts der signifikanten Überexpression von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ bei ABC im Vergleich zu GCB DLBCL und dessen Rolle bei der Regulation von NF- κB -Zielgenen stellt die Hemmung von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ eine aussichtsreiche Therapieoption bei der Behandlung von ABC DLBCL-Patienten dar. Auch wenn die direkte pharmakologische Hemmung von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ aufgrund einer fehlenden katalytischen Aktivität schwierig ist, führen diverse Inhibitoren des NF- κB -Signalweges ebenfalls zu dessen Herunterregulation. So konnte in der vorliegenden Dissertation eine signifikante Anreicherung

der $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Zielgene in den Signaturen detektiert werden, die mit Hilfe eines $\text{IKK}\beta$ -Inhibitors und eines MALT1-Inhibitors erstellt wurden. Sowohl der $\text{IKK}\beta$ -Inhibitor MLN120b als auch der MALT1-Inhibitor z-VRPR-fmk zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse in vorklinischen Studien (Hailfinger *et al.*, 2009; Lam *et al.*, 2005).

Unabhängig von der Hemmung von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ zeichnen die hier präsentierten Daten die Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ als interessanten diagnostischen und prognostischen Marker von ABC DLBCL aus, da sowohl DLBCL-Patienten als auch -Zelllinien eine Subtyp-spezifische Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ aufwiesen. Sollte es zudem gelingen, $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ immunhistochemisch zu detektieren, wäre eine genauere Einteilung von DLBCL-Patienten in die molekularen Subgruppen mittels immunhistochemischen Markern denkbar.

3.5 Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte sowohl das anti-apoptotische BCL2-Mitglied MCL1 als auch das atypische $\text{I}\kappa\text{B}$ -Mitglied $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ als Subtyp-spezifische Onkogene von ABC DLBCL identifiziert werden. Bei der funktionellen Untersuchung beider Proteine bei Zelllinienmodellen konnten ihre zentrale Rollen bei der molekularen Pathogenese von DLBCL erstmals charakterisiert werden. Angesichts der Bedeutung von MCL1 für die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber diversen Chemotherapeutika und der Schlüsselposition von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ bei der Regulation von NF- κB -abhängigen Zielgenen stellt die therapeutische Hemmung beider Proteine einen innovativen Behandlungsansatz für die spezifische Therapie von DLBCL-Patienten mit klinisch ungünstigem Verlauf dar.

3.6 Ausblick

Die Translation wissenschaftlicher Erkenntnisse in die klinische Anwendung ist eine zentrale Aufgabe der modernen Medizin. Eine Voraussetzung zur Verbesserung der ungünstigen Prognose von ABC DLBCL-Patienten und zur Entwicklung neuer therapeutischer Behandlungsansätze ist das Verständnis der molekularen Mechanismen der Pathogenese von DLBCL. Diese Bestrebung wird zu spezifischen und weniger toxischen Behandlungsstrategien von Patienten mit DLBCL führen.

4 Zusammenfassung

Das diffuse großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) stellt mit einem Anteil von ca. 30-40% den häufigsten Lymphom-Subtyp bei Erwachsenen dar. Es ist eine heterogene diagnostische Kategorie, die anhand von Genexpressionsanalysen in zwei vorherrschende molekulare Subtypen unterteilt werden kann: Den Keimzentrums-B-Zell (GCB) Subtyp und den aktivierten B-Zell (ABC) Subtyp. Mehrere Studien konnten zeigen, dass diese molekularen Subtypen aus unterschiedlichen Vorläuferzellen während der B-Zell Entwicklung entstehen, von der Aktivierung bestimmter Signalwege abhängig sind und unterschiedliche klinische Verläufe aufweisen.

Die Deregulation bestimmter Onkogene und Signalwege kann zur Entstehung der unterschiedlichen DLBCL-Subtypen beitragen. Allerdings sind viele der zugrunde liegenden molekularen und zellbiologischen Mechanismen immer noch unverstanden. Daher sollte in der vorliegenden Dissertation Subtyp-spezifische Onkogene bei den molekularen DLBCL-Subtypen identifiziert und ihre molekulare Funktion bei der Pathogenese von DLBCL untersucht werden.

Bei primären DLBCL-Patienten konnte mittels Genexpressionsanalysen ($n = 350$; $p = 2,7 \times 10^{-10}$) und Immunhistochemie ($n = 249$; $p = 0,001$) gezeigt werden, dass ABC DLBCL eine signifikante Überexpression des anti-apoptotischen Proteins MCL1 aufweisen. Die Auswertung von *array comparative genomic hybridisation* (aCGH) Daten bei DLBCL-Patienten und -Zelllinien zeigte, dass die aberrante MCL1 Expression häufig auf chromosomale Amplifikationen zurückzuführen ist. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die konstitutive Aktivierung des JAK/STAT Signalweges zu einer MCL1 Deregulation bei DLBCL führt. Weitere funktionelle Analysen von MCL1 bei DLBCL-Zelllinien haben gezeigt, dass sowohl die Herunterregulation der MCL1 Expression mittels shRNA, als auch die Behandlung mit dem BH3-Mimetikum Obatoclax nur bei Zelllinien mit einer hohen MCL1 Expression toxisch ist und Apoptose auslöst. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Expressionslevel von MCL1 die Sensitivität von DLBCL-Zelllinien gegenüber diversen Chemotherapeutika beeinflusst.

Des Weiteren konnte bei der Analyse von Genexpressionsdaten von 350 primären DLBCL-Patienten eine signifikante Überexpression von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$, einem atypischen Mitglied der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Familie, bei ABC DLBCL identifiziert werden ($p = 5,7 \times 10^{-37}$). Die Herunterregulation von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ mittels shRNA induzierte nur bei ABC DLBCL-Zelllinien und nicht bei GCB DLBCL-Zelllinien Zelltod. Überraschenderweise zeigten Genexpressionsanalysen, dass die Herunterregulation von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ die Expression einer Vielzahl von typischen NF- κB -Zielgenen beeinflusst. Zudem konnte eine Interaktion zwischen $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ und den NF- κB -Untereinheiten p50 und p52 festgestellt werden, die auf eine regulatorische Funktion von $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ auf den klassischen und alternativen NF- κB -Signalweg deutet.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation die funktionelle Bedeutung von MCL1 und $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ bei der molekularen Pathogenese von DLBCL. Sowohl der

Einfluss von MCL1 auf die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber diversen Chemotherapeutika als auch die Schlüsselposition von I κ B ζ bei der Regulation NF- κ B-abhängiger Zielgene zeigen, dass eine spezifische Hemmung ihrer Aktivität einen therapeutischen Nutzen haben kann und sprechen für weitere Evaluationen in zukünftigen Studien.

5 Summary

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) accounts for approximately 30-40% of all malignant lymphoma cases in adults. DLBCL is a heterogeneous diagnostic category and gene expression studies have identified two major molecular subgroups of DLBCL, termed germinal center B-cell-like (GCB) DLBCL and activated B-cell-like (ABC) DLBCL. Further studies revealed that these subgroups arise from different stages of normal B-cell differentiation, utilize distinct oncogenic mechanisms, and differ in their clinical behaviour.

Deregulation of certain oncogenes and signaling pathways may contribute to the development of different DLBCL subtypes. However, many of the underlying molecular and biological mechanisms are not yet fully understood. Therefore, the aim of the present study was to identify novel subtype-specific oncogenes and to elucidate their molecular function in the pathogenesis of DLBCL.

Evaluation of gene expression profiling data from 350 DLBCL patient samples revealed the anti-apoptotic BCL2-Family member MCL1 to be upregulated in ABC compared to GCB DLBCL primary patient samples ($p = 2.7 \times 10^{-10}$). Immunohistochemistry confirmed high MCL1 protein expression predominantly in ABC DLBCL in an independent patient cohort ($n = 249$; $p = 0.001$). Analysis of array comparative genomic hybridisation (aCGH) data of DLBCL samples showed that aberrant expression of MCL1 is often caused by chromosomal amplifications. Additionally, constitutive STAT3 signaling was shown as a different mechanism leading to high MCL1 expression. Further analyses revealed that inhibition of MCL1 either by shRNA or treatment with the BH3-mimetic obatoclax induced apoptotic cell death only in MCL1 expressing DLBCL cell lines. Moreover, MCL1 expression levels affected sensitivity of DLBCL cell lines to chemotherapeutic agents commonly used in the treatment of DLBCL patients, indicating that MCL1 contributes to therapy resistance.

In addition to these results, gene expression analyses showed that the atypical I κ B-family member I κ B ζ is expressed in the ABC subtype of DLBCL at significant higher levels compared to GCB DLBCL patients ($n = 350$; $p = 5.7 \times 10^{-37}$). Knockdown of I κ B ζ using shRNA was toxic to ABC but not to GCB DLBCL cell lines. Gene expression profiling after I κ B ζ knockdown revealed a large number of known NF- κ B target genes to be regulated by I κ B ζ . Further analyses detected a physical interaction of I κ B ζ with both p50 and p52 NF- κ B subunits, indicating that I κ B ζ regulates a specific set of NF- κ B target genes by interacting with components of the classical and alternative NF- κ B pathway in ABC DLBCL.

Collectively, the results of this study reveal the functional significance of I κ B ζ and MCL1 in the molecular pathogenesis of DLBCL. Both the effect of MCL1 on the sensitivity towards diverse chemotherapeutic agents as well as the key position of I κ B ζ in the regulation of NF- κ B-dependent target genes suggest that their specific inhibition might be an effective therapeutic approach, and call for further evaluation in future studies.

Literaturverzeichnis

- Adams, J. M. and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281** (5381), 1322–1326.
- Adams, J. M. and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26** (9), 1324–1337.
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M. R., Byrd, J. C., Botstein, D., Brown, P. O., and Staudt, L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403** (6769), 503–511.
- Allen, C. D., Okada, T., and Cyster, J. G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* **27** (2), 190–202.
- Annunziata, C. M., Davis, R. E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., Dave, S., Hurt, E. M., Tan, B., Zhao, H., Stephens, O., Santra, M., Williams, D. R., Dang, L., Barlogie, B., Shaughnessy, J. D., Kuehl, W. M., and Staudt, L. M. (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* **12** (2), 115–130.
- Araten, D. J., Golde, D. W., Zhang, R. H., Thaler, H. T., Gargiulo, L., Notaro, R., and Luzzatto, L. (2005). A quantitative measurement of the human somatic mutation rate. *Cancer Res.* **65** (18), 8111–8117.
- Armitage, J. O. (2012). My treatment approach to patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Mayo Clin. Proc.* **87** (2), 161–171.
- Auer, H., Lyianarachchi, S., Newsom, D., Klisovic, M. I., Marcucci, G., Marcucci, U., and Kornacker, K. (2003). Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis. *Nat. Genet.* **35** (4), 292–293.
- Backus, H. H., van Riel, J. M., van Groeningen, C. J., Vos, W., Dukers, D. F., Bloemena, E., Wouters, D., Pinedo, H. M., and Peters, G. J. (2001). Rb, mcl-1 and p53 expression correlate with clinical outcome in patients with liver metastases from colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **12** (6), 779–785.
- Baker, S. J. and Reddy, E. P. (1998). Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* **17** (25), 3261–3270.

- Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L., and Korsmeyer, S. J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41** (3), 899–906.
- Baldwin, A. S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J. Clin. Invest.* **107** (3), 241–246.
- Bargou, R. C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M. Y., Arnold, W., Royer, H. D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., and Dörken, B. (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Invest.* **100** (12), 2961–2969.
- Bea, S., Zettl, A., Wright, G., Salaverria, I., Jehn, P., Moreno, V., Burek, C., Ott, G., Puig, X., Yang, L., Lopez-Guillermo, A., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Grogan, T. M., Braziel, R., Fisher, R. I., Smeland, E. B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Simon, R., Powell, J., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Montserrat, E., Muller-Hermelink, H. K., Staudt, L. M., Campo, E., and Rosenwald, A. (2005). Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* **106** (9), 3183–3190.
- Bidère, N., Ngo, V. N., Lee, J., Collins, C., Zheng, L., Wan, F., Davis, R. E., Lenz, G., Anderson, D. E., Arnoult, D., Vazquez, A., Sakai, K., Zhang, J., Meng, Z., Veenstra, T. D., Staudt, L. M., and Lenardo, M. J. (2009). Casein kinase 1alpha governs antigen-receptor-induced NF-kappaB activation and human lymphoma cell survival. *Nature* **458** (7234), 92–96.
- Binder, H. and Preibisch, S. (2005). Specific and nonspecific hybridization of oligonucleotide probes on microarrays. *Biophys. J.* **89** (1), 337–352.
- Bonizzi, G. and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25** (6), 280–288.
- Bross, L., Fukita, Y., McBlane, F., Demolliere, C., Rajewsky, K., and Jacobs, H. (2000). DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity* **13** (5), 589–597.
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* **267** (5203), 1485–1488.
- Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 55–79.
- Calo, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., and Russo, A. (2003). STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* **197** (2), 157–168.

- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., and Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* **117** (19), 5019–5032.
- Catz, S. D. and Johnson, J. L. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* **20** (50), 7342–7351.
- Chen, F. E. and Ghosh, G. (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* **18** (49), 6845–6852.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* **17** (3), 393–403.
- Cho-Vega, J. H., Rassidakis, G. Z., Admirand, J. H., Oyarzo, M., Ramalingam, P., Paraguya, A., McDonnell, T. J., Amin, H. M., and Medeiros, L. J. (2004). MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum. Pathol.* **35** (9), 1095–1100.
- Choi, W. W., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Piris, M. A., Banham, A. H., Delabie, J., Braziel, R. M., Geng, H., Iqbal, J., Lenz, G., Vose, J. M., Hans, C. P., Fu, K., Smith, L. M., Li, M., Liu, Z., Gascoyne, R. D., Rosenwald, A., Ott, G., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Jaye, D. L., Staudt, L. M., and Chan, W. C. (2009). A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin. Cancer Res.* **15** (17), 5494–5502.
- Clohessy, J. G., Zhuang, J., de Boer, J., Gil-Gomez, G., and Brady, H. J. (2006). Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **281** (9), 5750–5759.
- Coiffier, B., Thieblemont, C., Van Den Neste, E., Lepage, G., Plantier, I., Castaigne, S., Lefort, S., Marit, G., Macro, M., Sebban, C., Belhadj, K., Bordessoule, D., Ferme, C., and Tilly, H. (2010). Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* **116** (12), 2040–2045.
- Compagno, M., Lim, W. K., Grunn, A., Nandula, S. V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R., and Pasqualucci, L. (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **459** (7247), 717–721.
- Dal Porto, J. M., Gauld, S. B., Merrell, K. T., Mills, D., Pugh-Bernard, A. E., and Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Mol. Immunol.* **41** (6-7), 599–613.
- Dalma-Weiszhausz, D. D., Warrington, J., Tanimoto, E. Y., and Miyada, C. G. (2006). The affymetrix GeneChip® platform: an overview. *Meth. Enzymol.* **410**, 3–28.

- Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* **116** (2), 205–219.
- Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U., and Staudt, L. M. (2001). Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* **194** (12), 1861–1874.
- Davis, R. E., Ngo, V. N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R. M., Romesser, P. B., Kohlhammer, H., Lamy, L., Zhao, H., Yang, Y., Xu, W., Shaffer, A. L., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Jiang, J. K., Thomas, C. J., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Johnson, N. A., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Wilson, W. H., Delabie, J., Smeland, E. B., Fisher, R. I., Braziel, R. M., Tubbs, R. R., Cook, J. R., Weisenburger, D. D., Chan, W. C., Pierce, S. K., and Staudt, L. M. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **463** (7277), 88–92.
- de Jong, D., Rosenwald, A., Chhanabhai, M., Gaulard, P., Klapper, W., Lee, A., Sander, B., Thorns, C., Campo, E., Molina, T., Norton, A., Hagenbeek, A., Horning, S., Lister, A., Raemaekers, J., Gascoyne, R. D., Salles, G., and Weller, E. (2007). Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications—a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J. Clin. Oncol.* **25** (7), 805–812.
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Amiot, M. (2002). Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* **100** (1), 194–199.
- Ding, B. B., Yu, J. J., Yu, R. Y., Mendez, L. M., Shaknovich, R., Zhang, Y., Cattoretti, G., and Ye, B. H. (2008). Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **111** (3), 1515–1523.
- Dührsen, U., Fridrik, M. A., and Schmitz, N. *Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLB-CL)*. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. Berlin September 2012.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35** (4), 495–516.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391** (6662), 43–50.
- Epling-Burnette, P. K., Zhong, B., Bai, F., Jiang, K., Bailey, R. D., Garcia, R., Jove, R., Djeu, J. Y., Loughran, T. P., and Wei, S. (2001). Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.* **166** (12), 7486–7495.

- Eto, A., Muta, T., Yamazaki, S., and Takeshige, K. (2003). Essential roles for NF-kappa B and a Toll/IL-1 receptor domain-specific signal(s) in the induction of I kappa B-zeta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301** (2), 495–501.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* **127** (12), 2893–2917.
- Finbloom, D. S. and Winestock, K. D. (1995). IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J. Immunol.* **155** (3), 1079–1090.
- Fiorini, E., Schmitz, I., Marissen, W. E., Osborn, S. L., Touma, M., Sasada, T., Reche, P. A., Tibaldi, E. V., Hussey, R. E., Kruisbeek, A. M., Reinherz, E. L., and Clayton, L. K. (2002). Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol. Cell* **9** (3), 637–648.
- Fischer, S. F., Bouillet, P., O'Donnell, K., Light, A., Tarlinton, D. M., and Strasser, A. (2007). Proapoptotic BH3-only protein Bim is essential for developmentally programmed death of germinal center-derived memory B cells and antibody-forming cells. *Blood* **110** (12), 3978–3984.
- Fisher, R. I., Gaynor, E. R., Dahlborg, S., Oken, M. M., Grogan, T. M., Mize, E. M., Glick, J. H., Coltman, C. A., and Miller, T. P. (1993). Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **328** (14), 1002–1006.
- Fugmann, S. D., Lee, A. I., Shockett, P. E., Villey, I. J., and Schatz, D. G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 495–527.
- Fulda, S. and Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25** (34), 4798–4811.
- Galteland, E., Sivertsen, E. A., Svendsrud, D. H., Smedshammer, L., Kresse, S. H., Meza-Zepeda, L. A., Myklebost, O., Suo, Z., Mu, D., Deangelis, P. M., and Stokke, T. (2005). Translocation t(14;18) and gain of chromosome 18/BCL2: effects on BCL2 expression and apoptosis in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* **19** (12), 2313–2323.
- Gauld, S. B. and Cambier, J. C. (2004). Src-family kinases in B-cell development and signaling. *Oncogene* **23** (48), 8001–8006.
- Ghosh, S. and Hayden, M. S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **8** (11), 837–848.
- Gisselbrecht, C., Glass, B., Mounier, N., Singh Gill, D., Linch, D. C., Trneny, M., Bosly, A., Ketterer, N., Shpilberg, O., Hagberg, H., Ma, D., Briere, J., Moskowitz, C. H., and Schmitz, N. (2010). Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J. Clin. Oncol.* **28** (27), 4184–4190.

- Goard, C. A. and Schimmer, A. D. (2013). An evidence-based review of obatoclox mesylate in the treatment of hematological malignancies. *Core Evid* **8**, 15–26.
- Goossens, T., Klein, U., and Küppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** (5), 2463–2468.
- Goransson, M., Andersson, M. K., Forni, C., Stahlberg, A., Andersson, C., Olofsson, A., Mantovani, R., and Aman, P. (2009). The myxoid liposarcoma FUS-DDIT3 fusion oncoprotein deregulates NF-kappaB target genes by interaction with NFKBIZ. *Oncogene* **28** (2), 270–278.
- Goy, A., Ford, P., Feldman, T., Pecora, A., Goldberg, S., Donato, M., Siegel, D., Panush, D., and Berger, M. S. (2007). A Phase 1 Trial of the Pan Bcl-2 Family Inhibitor Obatoclox Mesylate (GX15-070) in Combination with Bortezomib in Patients with Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma. *ASH Annual Meeting Abstracts* **110** (11), 2569.
- Greaves, M. and Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* **481** (7381), 306–313.
- Green, D. R. and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305** (5684), 626–629.
- Green, M. R., Aya-Bonilla, C., Gandhi, M. K., Lea, R. A., Wellwood, J., Wood, P., Marlton, P., and Griffiths, L. R. (2011). Integrative genomic profiling reveals conserved genetic mechanisms for tumorigenesis in common entities of non-Hodgkin’s lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* **50** (5), 313–326.
- Grumont, R. J., Rourke, I. J., and Gerondakis, S. (1999). Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev.* **13** (4), 400–411.
- Hailfinger, S., Lenz, G., Ngo, V., Posvitz-Fejfar, A., Rebeaud, F., Guzzardi, M., Penas, E. M., Dierlamm, J., Chan, W. C., Staudt, L. M., and Thome, M. (2009). Essential role of MALT1 protease activity in activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106** (47), 19946–19951.
- Halverson, R., Torres, R. M., and Pelandra, R. (2004). Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat. Immunol.* **5** (6), 645–650.
- Han, J., Goldstein, L. A., Gastman, B. R., Rabinovitz, A., and Rabinowich, H. (2005). Disruption of Mcl-1-Bim complex in granzyme B-mediated mitochondrial apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280** (16), 16383–16392.
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature* **418** (6894), 244–251.
- Hans, C. P., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Gascoyne, R. D., Delabie, J., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., Campo, E., Braziel, R. M., Jaffe, E. S., Pan, Z., Farinha, P., Smith, L. M., Falini, B., Banham, A. H., Rosenwald, A., Staudt, L. M., Connors, J. M., Armitage, J. O.,

- and Chan, W. C. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103** (1), 275–282.
- Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132** (3), 344–362.
- Hinz, M., Arslan, S. C., and Scheidereit, C. (2012). It takes two to tango: IκBs, the multifunctional partners of NF-κB. *Immunol. Rev.* **246** (1), 59–76.
- Hodgkin, T. (1832). On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans* **17**, 68–114.
- Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25** (51), 6706–6716.
- Huang, J. Z., Sanger, W. G., Greiner, T. C., Staudt, L. M., Weisenburger, D. D., Pickering, D. L., Lynch, J. C., Armitage, J. O., Warnke, R. A., Alizadeh, A. A., Lossos, I. S., Levy, R., and Chan, W. C. (2002). The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* **99** (7), 2285–2290.
- Hughes, M. A., Harper, N., Butterworth, M., Cain, K., Cohen, G. M., and MacFarlane, M. (2009). Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival. *Mol. Cell* **35** (3), 265–279.
- Iqbal, J., Greiner, T. C., Patel, K., Dave, B. J., Smith, L., Ji, J., Wright, G., Sanger, W. G., Pickering, D. L., Jain, S., Horsman, D. E., Shen, Y., Fu, K., Weisenburger, D. D., Hans, C. P., Campo, E., Gascoyne, R. D., Rosenwald, A., Jaffe, E. S., Delabie, J., Rimsza, L., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., Connors, J. M., Vose, J. M., McKeithan, T., Staudt, L. M., and Chan, W. C. (2007). Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* **21** (11), 2332–2343.
- Ishikawa, H., Carrasco, D., Claudio, E., Ryseck, R. P., and Bravo, R. (1997). Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF-kappaB2. *J. Exp. Med.* **186** (7), 999–1014.
- Isomoto, H., Kobayashi, S., Werneburg, N. W., Bronk, S. F., Guicciardi, M. E., Frank, D. A., and Gores, G. J. (2005). Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* **42** (6), 1329–1338.
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P. S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21** (6), 635–637.
- Ji, M., Li, J., Yu, H., Ma, D., Ye, J., Sun, X., and Ji, C. (2009). Simultaneous targeting of MCL1 and ABCB1 as a novel strategy to overcome drug resistance in human leukaemia. *Br. J. Haematol.* **145** (5), 648–656.

- Jiang, Z., Georgel, P., Li, C., Choe, J., Crozat, K., Rutschmann, S., Du, X., Bigby, T., Mudd, S., Sovath, S., Wilson, I. A., Olson, A., and Beutler, B. (2006). Details of Toll-like receptor:adapter interaction revealed by germ-line mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (29), 10961–10966.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108** (2), 153–164.
- Jost, P. J. and Ruland, J. (2007). Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* **109** (7), 2700–2707.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F. W. (2006). Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 541–570.
- Karin, M. (2009). NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1** (5), a000141.
- Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y., Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, S., Ishikawa, Y., Okamoto, K., Tobinai, K., Nakagama, H., Nakahata, T., Yoshino, T., Kobayashi, Y., and Ogawa, S. (2009). Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* **459** (7247), 712–716.
- Kaufmann, S. H., Karp, J. E., Svingen, P. A., Krajewski, S., Burke, P. J., Gore, S. D., and Reed, J. C. (1998). Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. *Blood* **91** (3), 991–1000.
- Kaufmann, T., Tai, L., Ekert, P. G., Huang, D. C., Norris, F., Lindemann, R. K., Johnstone, R. W., Dixit, V. M., and Strasser, A. (2007). The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest. *Cell* **129** (2), 423–433.
- Kelly, G. L., Grabow, S., Glaser, S. P., Fitzsimmons, L., Aubrey, B. J., Okamoto, T., Valente, L. J., Robati, M., Tai, L., Fairlie, W. D., Lee, E. F., Lindstrom, M. S., Wiman, K. G., Huang, D. C., Bouillet, P., Rowe, M., Rickinson, A. B., Herold, M. J., and Strasser, A. (2014). Targeting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53. *Genes Dev.* **28** (1), 58–70.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14** (22), 5579–5588.
- Kitamura, H., Kanehira, K., Okita, K., Morimatsu, M., and Saito, M. (2000). MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett.* **485** (1), 53–56.

- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L., Neri, A., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2001). Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J. Exp. Med.* **194** (11), 1625–1638.
- Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P. P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y. X., Sneed, T., Verhaegen, M., Soengas, M., Ruvolo, V. R., McQueen, T., Schober, W. D., Watt, J. C., Jiffar, T., Ling, X., Marini, F. C., Harris, D., Dietrich, M., Estrov, Z., McCubrey, J., May, W. S., Reed, J. C., and Andreeff, M. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **10** (5), 375–388.
- Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P., and Craig, R. W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** (8), 3516–3520.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K., and Reed, J. C. (1995). Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am. J. Pathol.* **146** (6), 1309–1319.
- Kroll, M., Margottin, F., Kohl, A., Renard, P., Durand, H., Concordet, J. P., Bachelierie, F., Arenzana-Seisdedos, F., and Benarous, R. (1999). Inducible degradation of IkappaBalpha by the proteasome requires interaction with the F-box protein h-betaTrCP. *J. Biol. Chem.* **274** (12), 7941–7945.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M. L., and Rajewsky, K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J.* **12** (13), 4955–4967.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **5** (4), 251–262.
- Lam, L. T., Davis, R. E., Pierce, J., Hepperle, M., Xu, Y., Hottelot, M., Nong, Y., Wen, D., Adams, J., Dang, L., and Staudt, L. M. (2005). Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin. Cancer Res.* **11** (1), 28–40.
- Lam, L. T., Wright, G., Davis, R. E., Lenz, G., Farinha, P., Dang, L., Chan, J. W., Rosenwald, A., Gascoyne, R. D., and Staudt, L. M. (2008). Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor-kappaB pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **111** (7), 3701–3713.
- Lamason, R. L., McCully, R. R., Lew, S. M., and Pomerantz, J. L. (2010). Oncogenic CARD11 mutations induce hyperactive signaling by disrupting autoinhibition by the PKC-responsive inhibitory domain. *Biochemistry* **49** (38), 8240–8250.

- Lee, H. H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J., and Cheng, G. (1999). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** (16), 9136–9141.
- Lenz, G. and Staudt, L. M. (2010). Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **362** (15), 1417–1429.
- Lenz, G., Nagel, I., Siebert, R., Roschke, A. V., Sanger, W., Wright, G. W., Dave, S. S., Tan, B., Zhao, H., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Gascoyne, R. D., Campo, E., Jaffe, E. S., Smeland, E. B., Fisher, R. I., Kuehl, W. M., Chan, W. C., and Staudt, L. M. (2007). Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J. Exp. Med.* **204** (3), 633–643.
- Lenz, G., Davis, R. E., Ngo, V. N., Lam, L., George, T. C., Wright, G. W., Dave, S. S., Zhao, H., Xu, W., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Fisher, R. I., Chan, W. C., and Staudt, L. M. (2008a). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* **319** (5870), 1676–1679.
- Lenz, G., Wright, G., Dave, S. S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., Xu, W., Tan, B., Goldschmidt, N., Iqbal, J., Vose, J., Bast, M., Fu, K., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Armitage, J. O., Kyle, A., May, L., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Troen, G., Holte, H., Kvaloy, S., Dierickx, D., Verhoef, G., Delabie, J., Smeland, E. B., Jares, P., Martinez, A., Lopez-Guillermo, A., Montserrat, E., Campo, E., Braziel, R. M., Miller, T. P., Rimsza, L. M., Cook, J. R., Pohlman, B., Sweetenham, J., Tubbs, R. R., Fisher, R. I., Hartmann, E., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., Wrench, D., Lister, T. A., Jaffe, E. S., Wilson, W. H., Chan, W. C., and Staudt, L. M. (2008b). Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **359** (22), 2313–2323.
- Lenz, G., Wright, G. W., Emre, N. C., Kohlhammer, H., Dave, S. S., Davis, R. E., Carty, S., Lam, L. T., Shaffer, A. L., Xiao, W., Powell, J., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Rimsza, L. M., Fisher, R. I., Weisenburger, D. D., Chan, W. C., and Staudt, L. M. (2008c). Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** (36), 13520–13525.
- Lestini, B. J., Goldsmith, K. C., Fluchel, M. N., Liu, X., Chen, N. L., Goyal, B., Pawel, B. R., and Hogarty, M. D. (2009). Mcl1 downregulation sensitizes neuroblastoma to cytotoxic chemotherapy and small molecule Bcl2-family antagonists. *Cancer Biol. Ther.* **8** (16), 1587–1595.
- Lin, S. C., Chung, J. Y., Lamothe, B., Rajashankar, K., Lu, M., Lo, Y. C., Lam, A. Y., Darnay, B. G., and Wu, H. (2008). Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF-kappaB inhibitor A20. *J. Mol. Biol.* **376** (2), 526–540.
- Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y., and MacLennan, I. C. (1991). Sites of specific B

- cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur. J. Immunol.* **21** (12), 2951–2962.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J. W. (2003). The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* **19** (3), 341–352.
- Liu, L., Nam, S., Tian, Y., Yang, F., Wu, J., Wang, Y., Scuto, A., Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, L., and Jove, R. (2011). 6-Bromoindirubin-3'-oxime inhibits JAK/STAT3 signaling and induces apoptosis of human melanoma cells. *Cancer Res.* **71** (11), 3972–3979.
- Lossos, I. S., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Chan, W. C., Brown, P. O., Botstein, D., Staudt, L. M., and Levy, R. (2000). Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** (18), 10209–10213.
- Ma, C., Lyons-Weiler, M., Liang, W., LaFramboise, W., Gilbertson, J. R., Becich, M. J., and Monzon, F. A. (2006). In vitro transcription amplification and labeling methods contribute to the variability of gene expression profiling with DNA microarrays. *J Mol Diagn* **8** (2), 183–192.
- MacLennan, I. C., Liu, Y. J., and Johnson, G. D. (1992). Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol. Rev.* **126**, 143–161.
- Manis, J. P., Tian, M., and Alt, F. W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* **23** (1), 31–39.
- Manola, K. N., Georgakakos, V. N., Stavropoulou, C., Spyridonidis, A., Angelopoulou, M. K., Vlachadami, I., Katsigiannis, A., Roussou, P., Pantelias, G. E., and Sambani, C. (2008). Jumping translocations in hematological malignancies: a cytogenetic study of five cases. *Cancer Genet. Cytogenet.* **187** (2), 85–94.
- Martone, R., Euskirchen, G., Bertone, P., Hartman, S., Royce, T. E., Luscombe, N. M., Rinn, J. L., Nelson, F. K., Miller, P., Gerstein, M., Weissman, S., and Snyder, M. (2003). Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** (21), 12247–12252.
- Mehra, S., Messner, H., Minden, M., and Chaganti, R. S. (2002). Molecular cytogenetic characterization of non-Hodgkin lymphoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* **33** (3), 225–234.
- Mestre-Escorihuela, C., Rubio-Moscardo, F., Richter, J. A., Siebert, R., Climent, J., Fresquet, V., Beltran, E., Agirre, X., Marugan, I., Marin, M., Rosenwald, A., Sugimoto, K. J., Wheat, L. M., Karran, E. L., Garcia, J. F., Sanchez, L., Prosper, F., Staudt, L. M., Pinkel, D., Dyer, M. J., and Martinez-Climent, J. A. (2007). Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* **109** (1), 271–280.
- Meyer, P. N., Fu, K., Greiner, T. C., Smith, L. M., Delabie, J., Gascoyne, R. D., Ott, G., Rosenwald, A., Braziel, R. M., Campo, E., Vose, J. M., Lenz, G., Staudt, L. M., Chan, W. C., and Weisenburger, D. D. (2011). Immunohistochemical methods for predicting cell of origin

- and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J. Clin. Oncol.* **29** (2), 200–207.
- Mitelman, F., Johansson, B., and Mertens, F. (2014). Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. *Online*. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K., Klefstrom, J., Alitalo, K., and Knuutila, S. (1997). BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **90** (3), 1168–1174.
- Morin, R. D., Johnson, N. A., Severson, T. M., Mungall, A. J., An, J., Goya, R., Paul, J. E., Boyle, M., Woolcock, B. W., Kuchenbauer, F., Yap, D., Humphries, R. K., Griffith, O. L., Shah, S., Zhu, H., Kimbara, M., Shashkin, P., Charlot, J. F., Tcherpakov, M., Corbett, R., Tam, A., Varhol, R., Smailus, D., Moksa, M., Zhao, Y., Delaney, A., Qian, H., Birol, I., Schein, J., Moore, R., Holt, R., Horsman, D. E., Connors, J. M., Jones, S., Aparicio, S., Hirst, M., Gascoyne, R. D., and Marra, M. A. (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* **42** (2), 181–185.
- Morin, R. D., Mungall, K., Pleasance, E., Mungall, A. J., Goya, R., Huff, R. D., Scott, D. W., Ding, J., Roth, A., Chiu, R., Corbett, R. D., Chan, F. C., Mendez-Lago, M., Trinh, D. L., Bolger-Munro, M., Taylor, G., Hadj Khodabakhshi, A., Ben-Neriah, S., Pon, J., Meissner, B., Woolcock, B., Farnoud, N., Rogic, S., Lim, E. L., Johnson, N. A., Shah, S., Jones, S., Steidl, C., Holt, R., Birol, I., Moore, R., Connors, J. M., Gascoyne, R. D., and Marra, M. A. (2013). Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood* **122** (7), 1256–1265.
- Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., and Muta, T. (2005). Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein. *J. Biol. Chem.* **280** (9), 7444–7451.
- Muris, J. J., Meijer, C. J., Ossenkoppele, G. J., Vos, W., and Oudejans, J. J. (2006). Apoptosis resistance and response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* **24** (3), 97–104.
- Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunobiology*. New York. Garland Science 8. edition.
- Muta, T. (2006). IkappaB-zeta: an inducible regulator of nuclear factor-kappaB. *Vitam. Horm.* **74**, 301–316.
- Nagel, S., Hirschmann, P., Dirnhofer, S., Gunthert, U., and Tzankov, A. (2010). Coexpression of CD44 variant isoforms and receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM, CD168) is an International Prognostic Index and C-MYC gene status-independent predictor of poor outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Exp. Hematol.* **38** (1), 38–45.

- Neri, A., Chang, C. C., Lombardi, L., Salina, M., Corradini, P., Maiolo, A. T., Chaganti, R. S., and Dalla-Favera, R. (1991). B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50. *Cell* **67** (6), 1075–1087.
- Neumann, J. (2008). *Immunbiologie: Eine Einführung*. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag.
- Ngo, V. N., Davis, R. E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., Lenz, G., Lam, L. T., Dave, S., Yang, L., Powell, J., and Staudt, L. M. (2006). A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* **441** (7089), 106–110.
- Ngo, V. N., Young, R. M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K. H., Kohlhammer, H., Xu, W., Yang, Y., Zhao, H., Shaffer, A. L., Romesser, P., Wright, G., Powell, J., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Ott, G., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Fisher, R. I., Braziel, R. M., Tubbs, R. R., Cook, J. R., Weisenburger, D. D., Chan, W. C., and Staudt, L. M. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* **470** (7332), 115–119.
- Nguyen, M., Marcellus, R. C., Roulston, A., Watson, M., Serfass, L., Murthy Madiraju, S. R., Goulet, D., Viallet, J., Belec, L., Billot, X., Acoca, S., Purisima, E., Wiegmans, A., Cluse, L., Johnstone, R. W., Beauparlant, P., and Shore, G. C. (2007). Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104** (49), 19512–19517.
- Nie, K., Zhang, T., Allawi, H., Gomez, M., Liu, Y., Chadburn, A., Wang, Y. L., Knowles, D. M., and Tam, W. (2010). Epigenetic down-regulation of the tumor suppressor gene PRDM1/Blimp-1 in diffuse large B cell lymphomas: a potential role of the microRNA let-7. *Am. J. Pathol.* **177** (3), 1470–1479.
- Nogai, H., Dörken, B., and Lenz, G. (2011). Pathogenesis of non-Hodgkin’s lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **29** (14), 1803–1811.
- Nogai, H., Wenzel, S. S., Hailfinger, S., Grau, M., Kaergel, E., Seitz, V., Wollert-Wulf, B., Pfeifer, M., Wolf, A., Frick, M., Dietze, K., Madle, H., Tzankov, A., Hummel, M., Dörken, B., Scheidereit, C., Janz, M., Lenz, P., Thome, M., and Lenz, G. (2013). IκB-ζ controls the constitutive NF-κB target gene network and survival of ABC DLBCL. *Blood* **122** (13), 2242–2250.
- Ohno, H., Takimoto, G., and McKeithan, T. W. (1990). The candidate proto-oncogene *bcl-3* is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* **60** (6), 991–997.
- Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Kitada, S., Korsmeyer, S. J., Kunzer, A. R., Letai, A., Li, C., Mitten, M. J., Nettesheim, D. G., Ng, S., Nimmer, P. M., O’Connor, J. M., Oleksijew, A., Petros, A. M., Reed, J. C., Shen, W., Tahir, S. K., Thompson, C. B., Tomaselli, K. J., Wang, B., Wendt, M. D., Zhang, H., Fesik, S. W., and Rosenberg,

- S. H. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435** (7042), 677–681.
- Opferman, J. T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M. D., Ong, C. C., and Korsmeyer, S. J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* **426** (6967), 671–676.
- Opferman, J. T., Iwasaki, H., Ong, C. C., Suh, H., Mizuno, S., Akashi, K., and Korsmeyer, S. J. (2005). Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* **307** (5712), 1101–1104.
- Opferman, J. T. (2006). Unraveling MCL-1 degradation. *Cell Death Differ.* **13** (8), 1260–1262.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412** (6844), 341–346.
- Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S. V., Aster, J. C., Murty, V. V., Shipp, M. A., and Dalla-Favera, R. (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J. Exp. Med.* **203** (2), 311–317.
- Pasqualucci, L., Dominguez-Sola, D., Chiarenza, A., Fabbri, G., Grunn, A., Trifonov, V., Kasper, L. H., Lerach, S., Tang, H., Ma, J., Rossi, D., Chadburn, A., Murty, V. V., Mullighan, C. G., Gaidano, G., Rabadan, R., Brindle, P. K., and Dalla-Favera, R. (2011a). Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* **471** (7337), 189–195.
- Pasqualucci, L., Trifonov, V., Fabbri, G., Ma, J., Rossi, D., Chiarenza, A., Wells, V. A., Grunn, A., Messina, M., Elliot, O., Chan, J., Bhagat, G., Chadburn, A., Gaidano, G., Mullighan, C. G., Rabadan, R., and Dalla-Favera, R. (2011b). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet.* **43** (9), 830–837.
- Pepper, C., Lin, T. T., Pratt, G., Hewamana, S., Brennan, P., Hiller, L., Hills, R., Ward, R., Starczynski, J., Austen, B., Hooper, L., Stankovic, T., and Fegan, C. (2008). Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* **112** (9), 3807–3817.
- Peter, M. E. and Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* **10** (1), 26–35.
- Petros, A. M., Nettesheim, D. G., Wang, Y., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E. D., Zhang, H., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. (2000). Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci.* **9** (12), 2528–2534.
- Pfeifer, M., Grau, M., Lenze, D., Wenzel, S. S., Wolf, A., Wollert-Wulf, B., Dietze, K., Nogai, H., Storek, B., Madle, H., Dörken, B., Janz, M., Dirnhofer, S., Lenz, P., Hummel, M., Tzankov, A., and Lenz, G. (2013). PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110** (30), 12420–12425.

- Pham, L. V., Fu, L., Tamayo, A. T., Bueso-Ramos, C., Drakos, E., Vega, F., Medeiros, L. J., and Ford, R. J. (2011). Constitutive BR3 receptor signaling in diffuse, large B-cell lymphomas stabilizes nuclear factor- κ B-inducing kinase while activating both canonical and alternative nuclear factor- κ B pathways. *Blood* **117** (1), 200–210.
- Pschyrembel, W. (2012). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Berlin. de Gruyter 263. edition.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381** (6585), 751–758.
- Rao, P. H., Houldsworth, J., Dyomina, K., Parsa, N. Z., Cigudosa, J. C., Louie, D. C., Popplewell, L., Offit, K., Jhanwar, S. C., and Chaganti, R. S. (1998). Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **92** (1), 234–240.
- Rawlings, D. J., Sommer, K., and Moreno-Garcia, M. E. (2006). The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **6** (11), 799–812.
- Rinkenberger, J. L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., and Korsmeyer, S. J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.* **14** (1), 23–27.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234** (4774), 364–368.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Giltneane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Powell, J., Duffey, P. L., Longo, D. L., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Sanger, W. G., Dave, B. J., Lynch, J. C., Vose, J., Armitage, J. O., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Grogan, T. M., Miller, T. P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T., and Staudt, L. M. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **346** (25), 1937–1947.
- Rui, L., Emre, N. C., Kruhlak, M. J., Chung, H. J., Steidl, C., Slack, G., Wright, G. W., Lenz, G., Ngo, V. N., Shaffer, A. L., Xu, W., Zhao, H., Yang, Y., Lamy, L., Davis, R. E., Xiao, W., Powell, J., Maloney, D., Thomas, C. J., Moller, P., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., Savage, K., Connors, J. M., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Weisenburger, D. D., Chan, W. C., Gascoyne, R. D., Levens, D., and Staudt, L. M. (2010). Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. *Cancer Cell* **18** (6), 590–605.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275** (5302), 983–986.

- Saxena, A., Viswanathan, S., Moshynska, O., Tandon, P., Sankaran, K., and Sheridan, D. P. (2004). Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* **75** (1), 22–33.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Kramer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17** (6), 1675–1687.
- Schreiber, J., Jenner, R. G., Murray, H. L., Gerber, G. K., Gifford, D. K., and Young, R. A. (2006). Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (15), 5899–5904.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., and Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293** (5534), 1495–1499.
- Shaffer, A. L., Lin, K. I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A., Giltane, J. M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., and Staudt, L. M. (2002a). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17** (1), 51–62.
- Shaffer, A. L., Rosenwald, A., and Staudt, L. M. (2002b). Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **2** (12), 920–932.
- Shaffer, A. L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Qian, S. B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B. K., Rosenwald, A., Hurt, E. M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Yewdell, J. W., Calame, K., Glimcher, L. H., and Staudt, L. M. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* **21** (1), 81–93.
- Smith, K. G., Weiss, U., Rajewsky, K., Nossal, G. J., and Tarlinton, D. M. (1994). Bcl-2 increases memory B cell recruitment but does not perturb selection in germinal centers. *Immunity* **1** (9), 803–813.
- Smith, K. G., Light, A., O’Reilly, L. A., Ang, S. M., Strasser, A., and Tarlinton, D. (2000). bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. *J. Exp. Med.* **191** (3), 475–484.
- Song, L., Coppola, D., Livingston, S., Cress, D., and Haura, E. B. (2005). Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **4** (3), 267–276.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* **1** (7), 949–957.

- Staudt, L. M. and Dave, S. (2005). The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv. Immunol.* **87**, 163–208.
- Staudt, L. M. (2010). Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2** (6), a000109.
- Stewart, A. K., Trude, S., Zonder, J. A., Hayman, S. R., Erlichman, C., Fruth, B., LaPlant, B., and Sullivan, D. (2012). Phase I trial of obatoclox mesylate in combination with bortezomib for treatment of relapsed multiple myeloma. *J Clin Oncol* **30** (Suppl 15), 8013.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., and Vardiman, J. W. (2008). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon. IARC 4. edition.
- Tagawa, H., Suguro, M., Tsuzuki, S., Matsuo, K., Karnan, S., Ohshima, K., Okamoto, M., Morishima, Y., Nakamura, S., and Seto, M. (2005). Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **106** (5), 1770–1777.
- Takahashi, Y., Ohta, H., and Takemori, T. (2001). Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* **14** (2), 181–192.
- Timmer, J. C. and Salvesen, G. S. (2007). Caspase substrates. *Cell Death Differ.* **14** (1), 66–72.
- Totzke, G., Essmann, F., Pohlmann, S., Lindenblatt, C., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2006). A novel member of the IkappaB family, human IkappaB-zeta, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding. *J. Biol. Chem.* **281** (18), 12645–12654.
- Townsend, K. J., Zhou, P., Qian, L., Bieszczad, C. K., Lowrey, C. H., Yen, A., and Craig, R. W. (1999). Regulation of MCL1 through a serum response factor/Elk-1-mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the BCL2 family to the induction of hematopoietic cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **274** (3), 1801–1813.
- Trinh, D. V., Zhu, N., Farhang, G., Kim, B. J., and Huxford, T. (2008). The nuclear I kappaB protein I kappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA. *J. Mol. Biol.* **379** (1), 122–135.
- Tzankov, A., Pehrs, A. C., Zimpfer, A., Ascani, S., Lugli, A., Pileri, S., and Dirnhofer, S. (2003). Prognostic significance of CD44 expression in diffuse large B cell lymphoma of activated and germinal centre B cell-like types: a tissue microarray analysis of 90 cases. *J. Clin. Pathol.* **56** (10), 747–752.
- Tzankov, A., Went, P., Zimpfer, A., and Dirnhofer, S. (2005). Tissue microarray technology: principles, pitfalls and perspectives—lessons learned from hematological malignancies. *Exp. Gerontol.* **40** (8-9), 737–744.

- van Delft, M. F., Wei, A. H., Mason, K. D., Vandenberg, C. J., Chen, L., Czabotar, P. E., Willis, S. N., Scott, C. L., Day, C. L., Cory, S., Adams, J. M., Roberts, A. W., and Huang, D. C. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* **10** (5), 389–399.
- Vikstrom, I., Carotta, S., Luthje, K., Peperzak, V., Jost, P. J., Glaser, S., Busslinger, M., Bouillet, P., Strasser, A., Nutt, S. L., and Tarlinton, D. M. (2010). Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory. *Science* **330** (6007), 1095–1099.
- Wenzel, S. S., Grau, M., Mavis, C., Hailfinger, S., Wolf, A., Madle, H., Deeb, G., Dörken, B., Thome, M., Lenz, P., Dirnhofer, S., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., Tzankov, A., and Lenz, G. (2013). MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* **27** (6), 1381–1390.
- Wertz, I. E., O’Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., Ma, A., Koonin, E. V., and Dixit, V. M. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* **430** (7000), 694–699.
- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* **19** (11), 1294–1305.
- Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, E. H., Wiestner, A., and Staudt, L. M. (2003). A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** (17), 9991–9996.
- Xiao, G., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol. Cell* **7** (2), 401–409.
- Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D. P., Patterson, H. C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J. M., Kutok, J. L., and Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat. Immunol.* **9** (4), 405–414.
- Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K., and Akira, S. (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* **430** (6996), 218–222.
- Yamauchi, S., Ito, H., and Miyajima, A. (2010). IkappaBeta, a nuclear IkappaB protein, positively regulates the NF-kappaB-mediated expression of proinflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (26), 11924–11929.
- Yamazaki, S., Muta, T., and Takeshige, K. (2001). A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J. Biol. Chem.* **276** (29), 27657–27662.

- Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S., and Takeshige, K. (2005). Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor-kappaB regulator, IkappaB-zeta, via Toll/Interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.* **280** (2), 1678–1687.
- Youle, R. J. and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** (1), 47–59.
- Zhang, H., Guttikonda, S., Roberts, L., Uziel, T., Semizarov, D., Elmore, S. W., Levenson, J. D., and Lam, L. T. (2011). Mcl-1 is critical for survival in a subgroup of non-small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene* **30** (16), 1963–1968.
- Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **264** (5155), 95–98.
- Zhou, P., Levy, N. B., Xie, H., Qian, L., Lee, C. Y., Gascoyne, R. D., and Craig, R. W. (2001). MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* **97** (12), 3902–3909.

Publikationen

Manuskript I: MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma.

Sören-Sebastian Wenzel, Michael Grau, Cory Mavis, Stephan Hailfinger, Annette Wolf, Hannelore Madle, George Deeb, Bernd Dörken, Margot Thome, Peter Lenz, Stephan Dirnhofer, Francisco J. Hernandez-Ilizaliturri, Alexandar Tzankov, and Georg Lenz.

Leukemia. 2013. 27 (6), 1381-1390.

Manuskript II: $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ controls the constitutive NF- κB target gene network and survival of ABC DLBCL.

Hendrik Nogai,* Sören-Sebastian Wenzel,* Stephan Hailfinger, Michael Grau, Eva Kaergel, Volkhard Seitz, Brigitte Wollert-Wulf, Matthias Pfeifer, Annette Wolf, Mareike Frick, Kerstin Dietze, Hannelore Madle, Alexandar Tzankov, Michael Hummel, Bernd Dörken, Claus Scheidereit, Martin Janz, Peter Lenz, Margot Thome, and Georg Lenz. *These authors contributed equally to this study.

Blood. 2013. 122 (13), 2242-2250.

PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma.

Matthias Pfeifer, Michael Grau, Dido Lenze, Sören-Sebastian Wenzel, Annette Wolf, Brigitte Wollert-Wulf, Kerstin Dietze, Hendrik Nogai, Benjamin Storek, Hannelore Madle, Bernd Dörken, Martin Janz, Stephan Dirnhofer, Peter Lenz, Michael Hummel, Alexandar Tzankov, and Georg Lenz.

Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013. 110 (30), 12420-12425.

Molecular Genetics of Rare Lymphomas.

Sören-Sebastian Wenzel and Georg Lenz.

In: *Rare Lymphomas, Hematologic Malignancies* (Martin Dreyling and Michael E. Williams, eds) pp. 61-69. Springer Berlin Heidelberg 2014.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung dieser Arbeit nicht veröffentlicht.

Anhang

5.1 Zusatzinformationen für Manuskript I

Die Zusatzinformationen für das Manuskript I mit dem Titel „*MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma*“ können unter folgender DOI-Adresse abgerufen werden: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.367>.

5.2 Zusatzinformationen für Manuskript II

Die Zusatzinformationen für das Manuskript II mit dem Titel „*I κ B ζ controls the constitutive NF- κ B target gene network and survival of ABC DLBCL*“ können unter folgender DOI-Adresse abgerufen werden: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-06-508028>.