

# DIE ROLLE DES TUMORSUPPRESSORS PTEN BEI DER MOLEKULAREN PATHOGENESE DIFFUSER GROßZELLIGER B-ZELL-LYMPHOME

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

Matthias Pfeifer

aus Dresden

2014

# **I. GUTACHTER**

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Arbeit wurden im Zeitraum von Juni 2010 bis Juni 2013 unter Leitung von Professor Dr. Georg Lenz am Molekularen Krebsforschungszentrum der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Georg Lenz

2. Gutachter: Prof. Dr. Burghardt Wittig

Disputation am 23.10.2014

## **II. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst angefertigt wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Matthias Pfeifer

Berlin, Mai 2014

### III. DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde, wie soeben beeidet, von mir geschrieben, doch allein hätte ich auf verlorenem Posten gestanden.

Mein aufrichtiger Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater und Mentor Professor Dr. Georg Lenz, der dieses Projekt stets aufmerksam und interessiert begleitet hat. Ohne seinen Rat, seine Hilfe und seine Unterstützung wäre diese Arbeit unmöglich gewesen. Vielen Dank!

Professor Dr. Burghardt Wittig danke ich besonders für die schnelle und unkomplizierte Entscheidung meine Arbeit als Gutachter zu bewerten. Für seine Bemühungen und sein Urteil bin ich sehr dankbar.

Bedanken möchte ich mich auch bei Professor Dr. Alexandar Tzankov und Professor Dr. Michael Hummel für die Bereitstellung und Untersuchung der Patientenbiopsien. Brigitte und Martin von der AG Dörken herzlichen Dank für die Hilfe bei der Durchführung der Mikroarrays. ∞ vielen Dank an Michael Grau, der mit Logik und mathematischem Sachverstand die Berechnungen in diesem Projekt bewerkstelligt hat.

Bei Annette, Sören, Andre, Halo, Kerstin, Mareike, Tabea, Lisa und Hendrik möchte ich mich für die gute Zeit im Labor bedanken - ohne euch wär's nie klargegangen.

Meiner Familie und allen Freunden gebührt Dank für die Unterstützung, die sie mir entgegengebracht haben.

Finalmente un beso enorme a Dörte, la más guapa y más importante del mundo. Gracias por ti y por tu amor. Eres esencial!

Danke an euch alle!

## IV. INHALTSVERZEICHNIS

I.	<b>GUTACHTER</b> .....	<b>2</b>
II.	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>3</b>
III.	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>4</b>
IV.	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>5</b>
V.	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>9</b>
VI.	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>10</b>
VII.	<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>11</b>
1	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>12</b>
1.1	<b>Tumorgenese und Tumorheterogenität</b> .....	<b>12</b>
1.2	<b>Klassifikation der Lymphome</b> .....	<b>13</b>
1.3	<b>Genetische Modifikationen in der B-Zell-Entwicklung</b> .....	<b>14</b>
1.3.1	Die Keimzentrumsreaktion .....	16
1.4	<b>Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome</b> .....	<b>17</b>
1.4.1	Molekulare Pathogenese von ABC DLBCL .....	19
1.4.2	Molekulare Pathogenese von GCB DLBCL .....	21
1.5	<b>Der Tumorsuppressor PTEN</b> .....	<b>23</b>
1.5.1	Die Struktur von PTEN.....	24
1.5.2	Funktionen von PTEN.....	25
1.5.3	Die Regulation von PTEN .....	26
1.6	<b>PI3K und AKT im Phospholipid-Signalsystem</b> .....	<b>29</b>
1.6.1	PTEN als PI3K/AKT-Antagonist.....	29
1.6.2	Physiologische Konsequenzen einer AKT-Aktivierung.....	31
1.7	<b>Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>33</b>
2	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>34</b>

<b>2.1</b>	<b>PTEN-Expression bei DLBCL</b> .....	<b>34</b>
2.1.1	Etablierung der PTEN-Färbung .....	34
2.1.2	Differentielle PTEN-Expression bei DLBCL .....	35
2.1.3	PTEN-Expression bei DLBCL Zelllinien .....	37
2.1.4	<i>PTEN</i> -Mutationen bei DLBCL .....	38
2.1.5	Chromosomaler <i>PTEN</i> -Verlust bei DLBCL .....	39
<b>2.2</b>	<b>AKT-Aktivierung bei DLBCL</b> .....	<b>42</b>
2.2.1	Konstitutive AKT-Aktivierung bei DLBCL Zelllinien .....	42
2.2.2	Konstitutive AKT-Aktivierung bei primären DLBCL Biopsien .....	42
<b>2.3</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung des PTEN-Verlustes</b> .....	<b>43</b>
2.3.1	PTEN-Expression induziert Zytotoxizität .....	43
2.3.2	Untersuchung der PTEN-induzierten Zytotoxizität .....	45
2.3.3	Funktionelle Charakterisierung der DLBCL <i>PTEN</i> -Mutanten .....	46
2.3.4	<i>In vitro</i> PTEN-Expression inhibiert den AKT/mTOR-Signalweg .....	48
2.3.5	Zytotoxizität durch Hemmung von AKT .....	49
<b>2.4</b>	<b>Der PI3K/AKT-Signalweg reguliert die MYC-Expression</b> .....	<b>51</b>
2.4.1	Effekte von PTEN auf die Genexpression bei GCB DLBCL .....	51
2.4.2	Herunterregulation von MYC trägt zu PTEN-induzierter Zytotoxizität bei .....	53
2.4.3	MYC ist essentiell für das Überleben von GCB DLBCL Zelllinien .....	54
<b>2.5</b>	<b>PI3K als molekulare Zielstruktur bei PTEN-defizienten GCB DLBCL Linien</b> .....	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>58</b>
3.1	Molekularbiologische Untersuchungen der PTEN-Expression bei DLBCL .....	58
3.2	Definition eines neuen GCB DLBCL Subtyp .....	59
3.3	Molekulare Ursachen der PTEN-Defizienz bei GCB DLBCL .....	60
3.4	PTEN-induzierte Seneszenz und Lymphomgenese .....	62
3.5	Diagnostischer Nutzen der PTEN-Defizienz bei DLBCL .....	63
3.6	Die Rolle der MYC-Expression bei der Pathogenese von DLBCL .....	63
3.7	PI3K als Zielstruktur zur Behandlung von GCB DLBCL .....	64
3.8	Zukunftsperspektive .....	66
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>67</b>

<b>4.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>69</b>
<b>4.3</b>	<b>Puffer.....</b>	<b>70</b>
<b>4.4</b>	<b>Amplifikation von Plasmid-DNA und Transformation.....</b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b>Eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien.....</b>	<b>71</b>
<b>4.6</b>	<b>Retrovirale Vektoren.....</b>	<b>71</b>
<b>4.7</b>	<b>Patientenproben.....</b>	<b>73</b>
4.7.1	Molekulare Charakterisierung der Kohorte 1 .....	73
4.7.2	Molekulare Charakterisierung der Kohorte 2 .....	74
<b>4.8</b>	<b>Immunhistochemischer Nachweis von PTEN.....</b>	<b>74</b>
<b>4.9</b>	<b>Methoden zur Modifikation und Analyse von Nukleinsäuren .....</b>	<b>75</b>
4.9.1	Extraktion von Plasmid-DNA.....	75
4.9.2	Extraktion von genomischer DNA .....	75
4.9.3	Extraktion von RNA.....	75
4.9.4	Bestimmung des RNA- und DNA-Gehaltes .....	75
4.9.5	Analyse der <i>PTEN</i> -Kopienzahl mittels quantitativer genomischer PCR.....	76
4.9.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA .....	76
4.9.7	Amplifikation von cDNAs mittels PCR.....	76
4.9.8	Amplifikation chromosomaler DNA mittels PCR .....	77
4.9.9	Aufreinigung von amplifizierter DNA .....	78
4.9.10	Klonierung von cDNAs .....	79
4.9.11	Klonierung von shRNAs .....	79
4.9.12	Klonierung von großen Abschnitte chromosomaler DNA .....	80
4.9.13	Gerichtete Mutagenese .....	80
<b>4.10</b>	<b>Retrovirale Transduktion .....</b>	<b>81</b>
4.10.1	Transfektion eukaryotischer 293TCeB Zellen.....	81
4.10.2	Retrovirale Transduktion von DLBCL Zelllinien .....	83
4.10.3	Selektionierung transduzierter DLBCL Zellen.....	83
4.10.4	Expression von shRNAs .....	83
4.10.5	Expression von cDNAs .....	84
4.10.6	Ko-Expressionsexperimente .....	84
<b>4.11</b>	<b>Durchflusszytometrische Analysen.....</b>	<b>85</b>
4.11.1	Durchflusszytometrische Analyse transduzierter Zellen .....	85
4.11.2	Durchflusszytometrische Analyse der Zellteilung .....	85

4.11.3	Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose .....	86
<b>4.12</b>	<b>Komparative genomische Hybridisierung.....</b>	<b>86</b>
<b>4.13</b>	<b>Genomweite Genexpressionsanalysen .....</b>	<b>86</b>
4.13.1	Illumina HT-12 v4 Mikroarrays .....	87
<b>4.14</b>	<b>Nachweis von Proteinen mittels Immuno-Blot .....</b>	<b>88</b>
4.14.1	Extraktion von Proteinen .....	88
4.14.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen .....	88
4.14.3	Immuno-Blot.....	89
4.14.4	Detektion von Proteinen.....	89
<b>4.15</b>	<b>Viabilitätsmessungen .....</b>	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>104</b>

## V. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Differenzierung und Reifung der B-Lymphozyten .....	15
Abbildung 2: Klassifizierung der DLBCL in molekulare Subtypen.....	18
Abbildung 3: Struktur des Tumorsuppressors PTEN .....	25
Abbildung 4: Regulationsebenen von <i>PTEN</i> .....	27
Abbildung 5: Deregulation der PI3K/AKT-Kaskade durch Verlust von PTEN.....	30
Abbildung 6: Etablierung der immunhistochemischen PTEN-Färbung.....	34
Abbildung 7: Immunhistochemische Bestimmung der PTEN-Expression bei DLBCL Biopsien .....	35
Abbildung 8: PTEN-Expression bei DLBCL Subtypen .....	36
Abbildung 9: Nachweis der PTEN-Expression und AKT-Aktivierung bei DLBCL Zelllinien .....	37
Abbildung 10: <i>PTEN</i> -Mutationen bei DLBCL Zelllinien und Patientenbiopsien .....	38
Abbildung 11: Heterozygote Deletionen von <i>PTEN</i> bei DLBCL.....	40
Abbildung 12: Genomische <i>PTEN</i> -Kopienanzahl bei DLBCL .....	41
Abbildung 13: AKT-Aktivierung bei GCB DLBCL Patientenproben.....	43
Abbildung 14: Exogene PTEN-Expression bei DLBCL Zelllinien.....	44
Abbildung 15: Anti-proliferative Effekte exogener PTEN-Expression bei GCB DLBCL Zelllinien.....	45
Abbildung 16: Exogenes PTEN induzierte Apoptose bei der GCB DLBCL Zelllinien BJAB .....	46
Abbildung 17: Stabilitäts- und Funktionsverlust der <i>PTEN</i> -Mutanten .....	47
Abbildung 18: PTEN-Expression verminderte die AKT-Aktivierung bei GCB DLBCL .....	48
Abbildung 19: Phosphatase-defiziente <i>PTEN</i> -Mutanten induzierten keine Zytotoxizität .....	49
Abbildung 20: Konstitutiv-aktives <i>AKT</i> ( <i>caAKT</i> ) reduzierte die PTEN-induzierte Zytotoxizität bei GCB DLBCL Zelllinien.....	50
Abbildung 21: PTEN-Expression veränderte das Genexpressionsprofil der GCB DLBCL Zelllinie HT .....	52
Abbildung 22: PTEN-Expression deregulierte die Expression des Transkriptionsfaktors MYC .....	53
Abbildung 23: MYC kompensierte die PTEN-induzierte Zytotoxizität .....	54
Abbildung 24: GCB DLBCL Zelllinien waren abhängig von MYC .....	55
Abbildung 25: PI3K-Inhibition bei GCB DLBCL Zelllinien .....	56
Abbildung 26: Definition eines neuen GCB DLBCL Subtyps .....	60
Abbildung 27: Retrovirale Expressionsvektoren für cDNAs und shRNAs.....	72
Abbildung 28: Schematischer Ablauf der retroviralen Transduktion .....	82
Abbildung 29: Chromatogramme der identifizierten <i>PTEN</i> -Mutationen bei DLBCL.....	104
Abbildung 30: Herunterregulation von MYC durch PI3K-Inhibition .....	105

## VI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Charakteristische genetische Aberrationen bei DLBCL. ....	20
Tabelle 2: Zusammenfassung der PTEN-Analysen bei DLBCL Zelllinien. ....	41
Tabelle 3: DLBCL Zelllinien, deren molekularer Subtyp sowie Kulturmedien. ....	71
Tabelle 4: Oligonukleotide zur Amplifikation eukaryotischer cDNAs. ....	77
Tabelle 5: Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation kodierender <i>PTEN</i> -Bereiche und Hybridisierungstemperaturen. ....	78
Tabelle 6: Oligonukleotide zur Sequenzierung klonierter cDNAs. ....	79
Tabelle 7: Oligonukleotide zur Mutagenese der <i>PTEN</i> cDNA. ....	80
Tabelle 8: Untersuchungen der DLBCL Kohorte 1. ....	106
Tabelle 9: Annotierung der Patientenproben aus Abbildung 13. ....	107
Tabelle 10: Deregulierte Gene nach PTEN-Expression bei der GCB DLBCL Zelllinie HT ( $P = 0,00025$ ). .....	108
Tabelle 11: Differentiell regulierte Gensignaturen nach PTEN-Expression bei HT. ....	114

## VII. ABKÜRZUNGEN

7AAD	7-Aminoactinomycin
aCGH	Array-basierte Komparative Genomhybridisierung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CMV	Cytomegalievirus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
dsDNA	Doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FLAG	DYKDDDDK-Epitop
GEO	<i>Gene expression omnibus</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunoglobulin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle
kb	Kilobase(n)
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NHEJ	<i>Non-homologous-end-joining</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGK	Phosphoglyceratkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	RPMI-1640
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
ÜN	Über Nacht
UTR	<i>Untranslated region</i>

# 1 EINLEITUNG

Das lymphatische System gliedert sich in die primären lymphatischen Organe Thymus und Knochenmark, die sekundären lymphatischen Organe, beispielsweise Milz, Tonsillen und Lymphknoten sowie das Lymphgefäßsystem<sup>1</sup>. Eine wichtige Funktion des lymphatischen Systems ist die Bildung und Differenzierung der Zellen des Immunsystems<sup>1</sup>. Fehler in diesem Entwicklungs- und Differenzierungsprozess können zur Entstehung maligner Lymphome führen<sup>2-4</sup>. Als maligne Lymphome bezeichnet man Tumoren, die sich aus Zellen des lymphatischen Systems etablieren und sich primär dort ausbreiten. Die Inzidenz von Lymphomen in Deutschland lag im Jahr 2008 geschlechterunabhängig bei 15.158 Neuerkrankungen<sup>5</sup>.

## 1.1 Tumorgenese und Tumorheterogenität

Tumorzellen entwickeln sich innerhalb eines mikroanatomischen Milieus, das für das multizelluläre Zusammenleben optimiert ist und die unkontrollierte Teilung entarteter Zellen normalerweise unterbindet<sup>6</sup>. Die Initiation und anschließende Progression von Tumoren ist in der Regel mit der Ausbildung spezifischer Charakteristika verbunden. Zu diesen Eigenschaften zählen unter anderem die Fähigkeit zu unbeschränkter Proliferation und unbegrenztem Wachstum, Vermeidung der Apoptose, Veränderungen des Metabolismus der Tumorzellen, genetische Instabilität, Förderung der Angiogenese, verstärkte Motilität, die Fähigkeit der Immunantwort auszuweichen und die Aufrechterhaltung tumorfördernder Inflammation<sup>7</sup>.

Um diese Fähigkeiten zu erlangen, muss es den entarteten Zellen gelingen tumorsuppressive Automatismen abzuschalten und onkogene Mechanismen zu aktivieren. Neoplasien erreichen dies schrittweise in einem langwierigen Prozess klonaler Evolution, der den Prinzipien Darwins natürlicher Selektion folgt<sup>8,9</sup>. Durch diesen Vorgang eignen sich einzelne Zellen sogenannte *Driver*-Mutationen an, die einen selektiven Überlebensvorteil innerhalb der mikroanatomischen Milieus bedeuten<sup>6</sup>. Der evolutive Charakter dieses Prozesses hat zur Folge, dass sich innerhalb einzelner Klone selektiv vorteilhafte Mutationen anreichern und mit der Zeit genetisch instabile und heterogene

Tumoren entstehen können<sup>6,10,11</sup>. Auch Lymphome entstehen in einem solchen Prozess der Tumorgenese und können ihrerseits starke tumorale Heterogenität aufweisen<sup>12,13</sup>.

## 1.2 Klassifikation der Lymphome

Medizinhistorisch begann die wissenschaftliche Untersuchung der Lymphome 1832 mit der Erstbeschreibung des sogenannten *Morbus Hodgkin* durch *Thomas Hodgkin*<sup>14</sup>. Mit zunehmenden technischen und diagnostischen Möglichkeiten erfolgte die Entdeckung weiterer Lymphom-Subtypen, wodurch die Notwendigkeit bestand, die Vielzahl lymphatischer Neoplasien zu kategorisieren um deren generelles Verständnis und das Behandlungspotential zu optimieren. Die ersten etablierten Einteilungen beruhten im Wesentlichen auf den klinischen Ausprägungen der Erkrankungen, sowie deren pathologischen Erscheinungsbildern<sup>15-18</sup>. 1994 wurde in Zusammenarbeit amerikanischer und europäischer Pathologen die sogenannte *R.E.A.L. (Revised-European-American-Lymphoma)*-Klassifizierung ausgearbeitet<sup>19</sup>, welche einen ersten internationalen Konsens hinsichtlich der Einteilung und Definition einzelner Entitäten erzielte. Erstmals kombinierte diese Klassifizierung sowohl morphologische und klinische als auch immunophänotypische und molekulargenetische Eigenschaften distinkter, maligner Lymphom-Entitäten<sup>19</sup>. Ein durch die Weltgesundheitsorganisation (*WHO*) berufenes, internationales Expertengremium arbeitet seither an der Aktualisierung der *R.E.A.L.*-Klassifikation, welche als *WHO*-Klassifikation letztmalig 2008 veröffentlicht wurde<sup>20</sup>. Diese Klassifizierung teilt Lymphome in 5 Gruppen, hauptsächlich ihren zellulären Ursprüngen folgend, ein<sup>21</sup>:

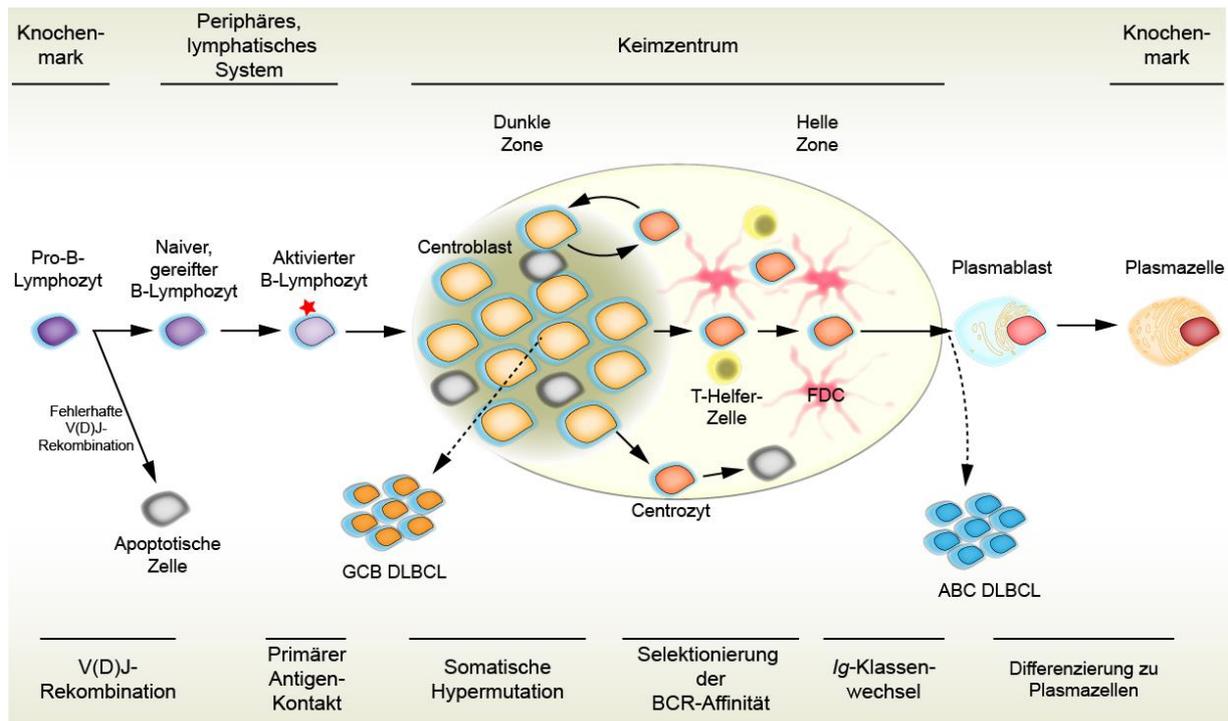
- Lymphome mit B-Zell-Ursprung
- Lymphome mit T- bzw. NK-Zell-Ursprung
- Hodgkin-Lymphome
- Lymphome die sich aus Histiozyten und Dendriten ableiten
- Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankungen

B-Zell-Lymphome können in zahlreiche weitere Subtypen unterteilt werden, beispielsweise Burkitt Lymphome, Mantelzelllymphome oder diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL)<sup>20-22</sup>. Sie sind durch klinische, pathologische und molekularbiologische Methodik voneinander abgrenzbar und weisen phänotypische Ähnlichkeit zu B-Zellen verschiedener Differenzierungsstadien auf.

### 1.3 Genetische Modifikationen in der B-Zell-Entwicklung

Die Differenzierung von B-Zellen umfasst verschiedene Entwicklungsstadien und beginnt innerhalb der primären, lymphatischen Organe, während die vollständige Ausdifferenzierung der B-Zellen in den sekundären Organen des lymphatischen Systems erfolgt<sup>1</sup>. Die B-Zell-Entwicklung ist eng assoziiert mit unterschiedlichen DNA-Modifikationen, die grundlegend für die Ausbildung der ausgeprägten Antikörpervielfalt und -affinität des erworbenen Immunsystems sind<sup>1</sup>. Diese DNA-Veränderungen prädisponieren B-Zellen allerdings auch für die Entwicklung genetischer Aberrationen, die die Entstehung von Lymphomen verursachen können<sup>1</sup>.

B-Lymphozyten entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark<sup>23</sup>. Die Differenzierung der Pro-B-Lymphozyten, den Vorläufer-B-Zellen, wird durch die zufällige Rekombination von Genen, welche die variablen Regionen der leichten und schweren Ketten der Immunoglobuline kodieren, initiiert<sup>24</sup>. Die Gene der schweren Ketten (*IgH*) setzen sich aus verschiedenen V- (*variable*), D- (*diversity*) und J-Segmenten (*joining*) zusammen, während die Gene der leichten Ketten (*IgL*) aus V- und J-Segmenten bestehen<sup>25</sup>. Dieser als V(D)J-Rekombination benannte Vorgang ist für die menschliche Antikörpervielfalt verantwortlich und wird von den Rekombinasen RAG1 und RAG2 (*recombinase activating gene 1/2*) katalysiert<sup>26</sup>. Beide induzieren DNA-Doppelstrangbrüche an Signalsequenzen innerhalb der *Ig*-Segmente, welche durch *NHEJ* (*non-homologous end joining*)-Reparatur religiert werden<sup>27</sup>. In direkter Folge exprimieren B-Zellen ihr Hauptmerkmal, den B-Zell-Rezeptor (BCR). Nur B-Lymphozyten, die einen funktionsfähigen BCR besitzen, überleben, differenzieren zu gereiften, naiven B-Zellen und verlassen das Knochenmark<sup>25</sup>.



**Abbildung 1:** Differenzierung und Reifung der B-Lymphozyten. Die Differenzierung der B-Lymphozyten ist mit zahlreichen genetischen Veränderungen und Umlagerungen assoziiert. So kommt es bei der Differenzierung von pro-B-Lymphozyten zu gereiften B-Zellen zur Umlagerung und Rekombination der *Ig*-Gene (V(D)J-Rekombination). Bei Fehlern während dieses Prozesses reagieren betroffene Zellen normalerweise mit der Einleitung von Apoptose. Naive, gereifte B-Lymphozyten exprimieren einen funktionsfähigen BCR, wandern in die Peripherie und werden nach Kontakt mit Antigenen aktiviert. Diese aktivierten B-Zellen entwickeln sich zu Centroblasten und beginnen innerhalb der Lymphknoten stark zu proliferieren, so dass sich innerhalb weniger Tage ein Keimzentrum mit der typischen zweigeteilten Morphologie bildet. Die dunkle Zone setzt aus sich schnell teilenden Centroblasten zusammen, in denen hohe AID-Aktivität die sogenannte somatische Hypermutation (SHM) katalysiert, was zu ständigen Veränderungen der variablen Bereiche der *Ig* und somit des BCR führt. Kommt es dabei zu irregulären pathologischen Veränderungen, leiten Centroblasten normalerweise Apoptose ein. Centroblasten wandern nach der SHM aus der dunklen in die helle Zone und interagieren als Centrozyten mit einer Matrix aus Antigen-präsentierenden follikulären Dendriten (FDC) und T-Helfer-Zellen. Dabei konkurrieren die Centrozyten um wenige Antigen-Bindungsstellen was die Selektionierung von Lymphozyten mit hochaffinem BCR zur Folge hat. Nur Centrozyten mit hochaffinem BCR erhalten Ko-Stimulanz von T-Helfer-Zellen und induzieren den *Ig*-Klassenwechsel. Daraufhin erfolgt die Ausdifferenzierung der Centrozyten erst zu Plasmablasten und im Verlauf zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Erhalten Centrozyten keine T-Zell-vermittelte Ko-Stimulanz oder können keine FDCs binden, wandern sie zurück in die dunkle Zone und beginnen erneut zu proliferieren oder leiten Apoptose ein. Kommt es in diesem Ablauf zu genetischen Aberrationen können unter Umständen Kontrollmechanismen ausfallen und es kann zur Entstehung von malignen Lymphomen kommen. So können die Ursprungszellen vieler DLBCL den B-Zellen des Keimzentrums bzw. den aktivierten B-Zellen zugeordnet werden (Siehe 1.4).

Gereifte B-Zellen werden durch Antigen-Kontakt aktiviert und wandern daraufhin in sekundäre, lymphatische Organe ein, in denen eine Keimzentrumsreaktion initiiert wird. Diese leitet die vollständige Reifung der aktivierten B-Zellen zu ausdifferenzierten Plasma- oder Gedächtniszellen ein, welche Antikörper synthetisieren bzw. für eine erneute, rasche Immunantwort verantwortlich sind<sup>1</sup>. Auch in diesem Entwicklungsabschnitt kommt es zur Induktion genetischer Modifikationen, die durch die Deaminase AID (*activation induced deaminase*) katalysiert werden<sup>28</sup>. Zum einen kommt es zur so genannten somatischen Hypermutation (SHM), einem Prozess, der

zu Mutationen einzelner Basen oder zu kleinen Deletionen bzw. Insertionen im variablen Bereich der *Ig*-Gene führt<sup>29</sup>. Dadurch wird die Affinität der Antikörper und somit die Bindungsfähigkeit des BCR zu spezifischen Antigenen verbessert<sup>25</sup>. Zum anderen kommt es im Verlauf der Keimzentrumsreaktion zu einem *Ig*-Klassenwechsel (CSR, *class switch recombination*). Dieser Vorgang wird ebenfalls durch AID katalysiert und führt zur Rekombination der konstanten Regionen der schweren Kette der *Ig*-Gene. So wechselt die exprimierte Immunoglobulin-Klasse von IgM zu IgG, IgA oder IgE<sup>1,30</sup> und es entstehen verschiedene, funktionelle Antikörper, die dann sezerniert werden können.

### 1.3.1 Die Keimzentrumsreaktion

Nach ihrer Aktivierung durch Antigene und T-Helfer-Zellen differenzieren B-Lymphozyten zu Centroblasten und beginnen stark zu proliferieren. So entwickelt sich innerhalb weniger Tage die typische Morphologie eines Keimzentrums, die man in eine dunkle (DZ, *dark zone*) und eine helle Zone (LZ, *light zone*) einteilen kann<sup>31,32</sup>. Die DZ wird von schnell proliferierenden Centroblasten gebildet<sup>31,32</sup>, bei denen durch hohe AID-Aktivität ständige genetische Veränderungen der variablen Bereiche der *Ig*-Gene auftreten<sup>29,33,34</sup>. Diese manifestieren sich mit jeder Zellteilung als Mutationen und führen so zu einer veränderten Antigenaffinität des BCR. Führen die induzierten Mutationen zu einem Funktionsverlust des BCR, wird die Proliferation der Zelle in der Regel inhibiert und Apoptose eingeleitet. Die LZ des Keimzentrums setzt sich vor allem aus einem Netzwerk Antigen-präsentierender folliculärer dendritischer Zellen (FDC, *follicular dendritic cell*) und überwiegend CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen zusammen<sup>25,32,35</sup>. Innerhalb dieses Netzwerkes laufen unter anderem drei wichtige Prozesse der B-Zell-Reifung ab: die Selektion von B-Zellen, welche hoch-affine Antikörper produzieren, die CSR sowie die Initiation der Differenzierung zu Plasma- und Gedächtniszellen. Centroblasten, die erfolgreich die SHM durchlaufen haben, differenzieren zu Centrozyten und wandern in die LZ<sup>32</sup>. Dort konkurrieren sie um die BCR-Bindung an präsentierte Antigene der FDC und Ko-Stimulanz durch CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen. So werden Centrozyten mit hoch-affinem BCR selektiert und in diesen CSR induziert<sup>32</sup>. Nach erfolgreicher CSR wird der Differenzierungsprozess hin zur Plasmazelle initiiert<sup>32</sup>. Centrozyten, die keine T-Zell-Stimulanz erhalten, leiten normalerweise Apoptose ein

oder wandern zurück in die DZ und beginnen als Centroblasten erneut zu proliferieren<sup>32</sup>.

Der Ablauf der Keimzentrumsreaktion erfolgt unter stringenter Kontrolle unterschiedlicher Regulatoren. Die BCL6 (*B cell lymphoma 6*)-Expression beispielsweise ist für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Keimzentrumsreaktion bei B-Zellen essentiell<sup>36,37</sup>. BCL6 fördert die Proliferation der Centroblasten, verhindert die frühzeitige Differenzierung zu Plasma- oder Gedächtniszellen und reguliert die Reaktion auf genotoxischen Stress, der durch SHM und CSR auftritt<sup>38</sup>. Ein weiterer wichtiger Regulator mit hoher Aktivität in der Keimzentrumsreaktion ist IRF8 (*interferon regulatory factor 8*), der die Expression von AID steuert<sup>39</sup>. Die Differenzierung zur Plasmazelle wird durch verringerte BCL6-Expression nach CSR eingeleitet. Dadurch erhöht sich die Expression des Transkriptionsfaktors BLIMP1 (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*)<sup>40,41</sup>, der die Plasmazelldifferenzierung orchestriert<sup>42</sup>. Somit kommt es zuerst zur Differenzierung zu Plasmablasten und schließlich zur Entstehung ausdifferenzierter, Antikörper-sezernierender Plasmazellen<sup>42,43</sup>.

Sowohl die genetische Instabilität als auch die starke Proliferation der Centroblasten machen die Keimzentrumsreaktion zu einem kritischen Stadium der B-Zell-Entwicklung, aus dem sich unterschiedliche Lymphom-Subtypen wie das Burkitt-Lymphom oder DLBCL entwickeln können<sup>3</sup>.

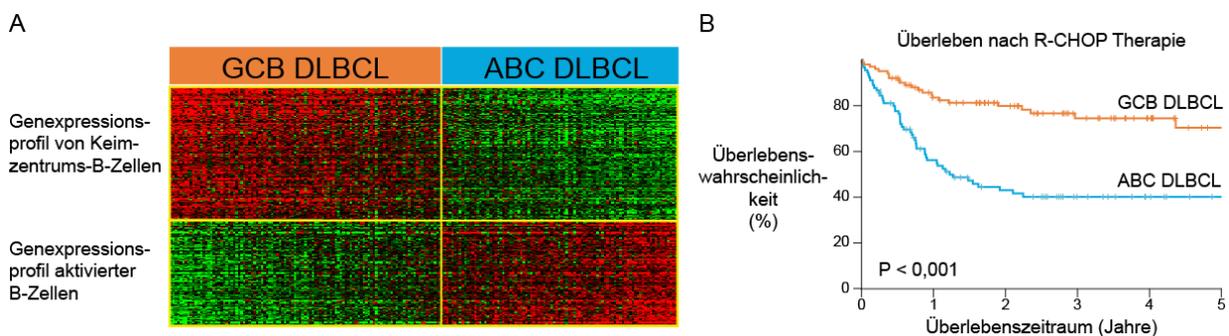
## 1.4 Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome

Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom ist der am häufigsten diagnostizierte B-Zell-Lymphom-Subtyp erwachsener Menschen<sup>44</sup>. Bei den DLBCL handelt es sich um aggressive Lymphome, die sich durch besonders hohe Wachstums- und Proliferationsraten auszeichnen. Unbehandelt führt ein DLBCL in der Regel zum Tod<sup>45</sup>. Grundsätzlich stellen DLBCL eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen bezüglich ihrer Morphologie, ihrer Biologie sowie den molekularen Mechanismen ihrer Pathogenese dar<sup>3,46</sup>. Untergruppen der DLBCL sind jedoch mit konventionellen diagnostischen Methoden kaum zu differenzieren.

Genomweite Genexpressionsanalysen führten in der letzten Dekade zur Etablierung einer molekularen Klassifizierung in zwei vorherrschende DLBCL Subtypen<sup>47</sup> (Abbildung 2).

Zum einen konnte der sogenannte ABC (*Activated B-cell-like*) DLBCL Subtyp definiert werden, dessen Genexpressionsprofil dem aktivierter B-Zellen ähnelt. Im Gegensatz dazu weisen die sogenannten GCB (*Germinal center B-cell-like*) DLBCL ein Genexpressionsprofil von Keimzentrums-B-Zellen auf. Beide Subtypen machen jeweils etwa 40% aller DLBCL aus<sup>48,49</sup> und weisen neben unterschiedlichen Genexpressionsprofilen auch unterschiedliche genetische Aberrationen auf<sup>3</sup>.

Auch aus prognostischer Sicht ist die Einteilung in ABC und GCB DLBCL von Bedeutung. DLBCL werden heute durch Gabe einer standardisierten Chemotherapie (CHOP, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisolon) in Kombination mit dem monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab behandelt. Diese als R-CHOP abgekürzte Therapie verbesserte den Behandlungserfolg im Vergleich zu alleiniger CHOP-Behandlung signifikant<sup>50-52</sup> und führt zur dauerhaften Heilung von ca. 60% der Erkrankten<sup>49</sup>. Patienten mit ABC und GCB DLBCL weisen jedoch unterschiedliche Überlebensraten nach einer R-CHOP-Therapie auf. Während Patienten mit ABC DLBCL eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 40% aufweisen, liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit von GCB DLBCL Patienten bei über 70% (Abbildung 2)<sup>49</sup>.



**Abbildung 2:** Klassifizierung der DLBCL in molekulare Subtypen. **A)** Die Klassifizierung der DLBCL in ABC und GCB Lymphome erfolgt mittels Genexpressionsanalysen. Mit Hilfe des sogenannten Wright-Algorithmus<sup>53</sup> kann eine Einteilung in diese Subtypen erfolgen. **B)** Patienten mit ABC DLBCL weisen ein signifikant schlechteres Überleben nach einer R-CHOP-Therapie im Vergleich zu Patienten mit GCB DLBCL auf. (Abbildung modifiziert nach Pfeifer und Lenz, 2013<sup>54</sup> und Lenz und Staudt, 2010<sup>3</sup>).

### 1.4.1 Molekulare Pathogenese von ABC DLBCL

Patientenproben mit ABC DLBCL weisen eine hohe Expression von AID und stark mutierte Immunoglobulin-Gene auf. Dies impliziert, dass die SHM stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu weisen sie in aller Regel keinen *Ig*-Klassenwechsel auf<sup>55</sup>. Der zelluläre Ursprung der ABC DLBCL konnte bisher nicht endgültig aufgeklärt werden. Eventuell resultieren ABC DLBCL aus aktivierten B-Zellen<sup>47,53</sup>, die aber keine CSR durchlaufen haben. Alternativ werden AID-positive, extra-follikuläre B-Zellen als Ursprung der ABC DLBCL diskutiert<sup>56</sup>. Das Genexpressionsprofil der ABC DLBCL ähnelt dem aktivierter B-Zellen, die in der differentiellen Transition zu Plasmazellen sind<sup>47,53</sup>. Die terminale Differenzierung zu Plasmazellen wird bei ABC DLBCL jedoch durch Inaktivierung des Transkriptionsfaktors BLIMP1 durch verschiedene genetische Aberrationen verhindert<sup>48,57-61</sup>.

Das charakteristische Merkmal der ABC DLBCL ist deren Abhängigkeit von konstitutiver Aktivität des anti-apoptotischen NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor- $\kappa$ B*)-Signalweges<sup>62</sup>. Dementsprechend induzierte die Hemmung der Zellplasma-Nukleus-Transition von Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B-Familie Zelltod bei ABC DLBCL Zelllinien<sup>62,63</sup>. Die Aktivierung dieser Signalkaskade wird bei ABC DLBCL durch verschiedene genetische Läsionen hervorgerufen. Über 50% der ABC DLBCL Patientenproben weisen Mutationen bei Regulatoren der NF- $\kappa$ B-Kaskade auf<sup>64</sup>. So führen unter anderem rekurrente Mutationen von *CARD11* (*caspase recruitment domain family, member 11*) bei etwa 10% der ABC DLBCL<sup>64,65</sup> oder *MYD88* (*myeloid differentiation primary response 88*) bei etwa 29% der ABC DLBCL<sup>66</sup> zu einer konstitutiven Aktivierung von NF- $\kappa$ B.

*CARD11* fungiert als Gerüstprotein für einen Komplex (CBM) der sich außerdem aus *BCL10* (*B-cell CLL/lymphoma 10*) und *MALT1* (*mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*) zusammensetzt (zusammengefasst in Thome, 2004<sup>67</sup>). Mutationen von *CARD11* bewirken Anomalien der *CARD11*-Konformation und können zu einer konstitutiven Assoziation des CBM-Komplexes und zur Phosphorylierung und Aktivierung von IKK $\beta$  (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*) führen<sup>65</sup>. Aktives IKK $\beta$  katalysiert die Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B-Antagonisten NFKBIA (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*)<sup>65</sup>, welche zur Dissoziation von NFKBIA und

NF- $\kappa$ B führt. Freie NF- $\kappa$ B-Familienmitglieder translozieren in den Nukleus und vermitteln die transkriptionale Aktivierung ihrer Zielgene<sup>65</sup>.

Mutationen von *MYD88* führen zu einer verstärkten Bindung der Kinase IRAK4 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 4*) die in direkter Folge IRAK1 verstärkt phosphoryliert. Dadurch wird TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase*) rekrutiert<sup>66</sup>, wodurch sich ein Signalkomplex bildet der unter anderem die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Kaskade zur Folge hat<sup>66</sup>. Sowohl mutiertes *CARD11* als auch *MYD88* sind essentiell für das Überleben betroffener ABC DLBCL Zelllinien<sup>65,66,68</sup>. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch durch Mutationen von *CD79A* und *CD79B*, welche den BCR chronisch aktivieren, NF- $\kappa$ B-Signale positiv moduliert werden<sup>69</sup>.

**Tabelle 1: Charakteristische genetische Aberrationen bei DLBCL.**

Genetische Aberration	ABC DLBCL (% der Fälle)	GCB DLBCL (% der Fälle)	Funktionelle Relevanz	Referenz
<i>PTEN</i> -Deletion (10q23.3)	0	15	Modulierung der <i>PTEN</i> -Aktivität	<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>48</sup>
<i>miR-17-92</i> -Amplifikation (13q31.3)	0	12		<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>48</sup>
<i>BCL2</i> -Translokation t(14;18)	0	45	Inhibition von Apoptose	<i>Iqbal et al., 2004</i> <sup>70</sup>
<i>BCL2</i> -Amplifikation 18q21	47	16		<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>48</sup>
<i>MCL1</i> -Amplifikation (1q21)	25	12		<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>48</sup> <i>Wenzel et al., 2012</i> <sup>71</sup>
<i>MDM2</i> -Amplifikation	0	12		<i>Lenz et al., 2008</i>
<i>BCL6</i> -Translokation (3q27)	24	10		<i>Iqbal et al., 2007</i> <sup>59</sup>
<i>BCL6</i> -Mutation	44	74		<i>Iqbal et al., 2007</i> <sup>59</sup>
<i>p53</i> -Mutation	14 - 24	10 - 34		<i>Zainuddin et al., 2009</i> <sup>72</sup> <i>Young et al., 2008</i> <sup>73</sup>
<i>EZH2</i> -Mutation	0	21	Epigenetische Modifikationen	<i>Morin et al., 2009</i> <sup>74</sup>
<i>CREBBP</i> -Mutation	17	41		<i>Pasqualucci et al., 2011</i> <sup>75</sup>
<i>EP300</i> -Mutation	1	6		<i>Pasqualucci et al., 2011</i> <sup>76</sup>
<i>A20</i> -Mutation	24	2	Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Kaskade	<i>Compagno et al., 2009</i> <sup>64</sup>
<i>A20</i> -Deletion	50	22		<i>Compagno et al., 2009</i> <sup>64</sup> <i>Honma et al., 2009</i> <sup>77</sup>
<i>NFKB1Z</i> -Amplifikation (3p12)	10	0		<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>48</sup> <i>Nogai et al., 2013</i> <sup>63</sup>
<i>MYD88</i> -Mutation	29	1		<i>Ngo et al., 2011</i> <sup>66</sup>
<i>CARD11</i> -Mutation	10	4		<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>65</sup>
<i>CD79B</i> -Mutation	21	3		<i>Davis et al., 2010</i> <sup>69</sup>
<i>SPIB</i> -Amplifikation (19q13.3)	26	3		Differenzierungsdefekte
<i>BLIMP1</i> -Mutation/Deletion	24	0	<i>Tam et al., 2006</i> <sup>57</sup> <i>Pasqualucci et al., 2006</i> <sup>58</sup>	
<i>CDKN2A</i> -Deletion (9p21)	30	4	Verlust der Zellzykluskontrolle	<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>48</sup>
<i>CDKN2B</i> -Deletion (9p21)	30	4		<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>48</sup>

Zahlreiche weitere genetische Aberrationen treten charakteristisch bei ABC oder GCB DLBCL auf und sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

#### 1.4.2 Molekulare Pathogenese von GCB DLBCL

Der zelluläre Ursprung von GCB DLBCL sind wahrscheinlich Keimzentrums-B-Zellen, da das Genexpressionsprofil der Lymphomzellen dem normaler Keimzentrums-B-Zellen ähnelt<sup>47</sup>. Sie sind charakterisiert durch die Expression keimzentrumspezifischer Oberflächenproteine und Transkriptionsfaktoren wie CD10 und CD38<sup>47,53</sup> bzw. LMO2<sup>78</sup> (*LIM domain only 2*) und BCL6<sup>59</sup>. GCB DLBCL exprimieren AID und durchlaufen reguläre CSR<sup>55</sup>.

Die Expression des transkriptionalen Repressors BCL6 ist ein Merkmal normaler Keimzentrums-B-Zellen und auch der GCB DLBCL. Die konstitutive BCL-6 Expression bei GCB DLBCL<sup>59,70,79</sup> ist unter anderem für deren Keimzentrums-B-Zell-Charakter mitverantwortlich, wobei die konstitutive BCL6-Aktivität auch durch verschiedene genetische Mechanismen beeinflusst wird. So kann im Normalfall eine Inaktivierung von BCL6 durch CREBBP (*CREB binding protein*)- und EP300 (*E1A binding protein p300*)-vermittelte Acetylierung erfolgen<sup>80</sup>. Beide Acetyltransferasen weisen jedoch prädominant bei GCB DLBCL inaktivierende Mutationen auf (Tabelle 1)<sup>75</sup>. Diese Mutationen können dazu führen, dass es zu Acetylierungsdefekten und somit verstärkter BCL6-Aktivität kommt<sup>75</sup>. Des Weiteren weisen GCB DLBCL eine im Vergleich zu ABC DLBCL höhere Mutationsfrequenz von *BCL6* auf<sup>59</sup>. Ob diese Mutationen die Aktivität und Expression von BCL6 tatsächlich beeinflussen ist jedoch ungeklärt<sup>59</sup>.

Ein wesentlicher Aspekt normaler Keimzentrums-B-Zellen ist deren physiologische Tendenz Apoptose einzuleiten, unter anderem durch die BCL-6-vermittelte Repression des antiapoptotischen Proteins *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*)<sup>81,82</sup>. Die Inhibition von Apoptose erfolgt bei GCB DLBCL durch verschiedene molekulare Mechanismen. So führt die t(14;18) (q32;q21) Translokation in etwa 45% der Fälle<sup>70</sup> dazu, dass *BCL2* auf das Chromosom 14 transloziert und somit unter den Einfluss des *IgH*-Promotors gerät<sup>83</sup>. Dadurch kommt es zu konstitutiver *BCL2*-Expression, was die Induktion von Apoptose unterbindet<sup>84</sup>.

Die Sensitivität gegenüber DNA-Schäden kann bei normalen Keimzentrums-B-Zellen maßgeblich die Induktion von Apoptose fördern. Bei diesem Vorgang spielt unter anderem die Aktivität von p53 eine wichtige Rolle, dessen Funktion und Regulation bei GCB DLBCL durch verschiedene genetische und regulatorische Aberrationen gestört sein kann. So kann die p53-Genexpression beispielsweise durch konstitutiv exprimiertes BCL6 stark verringert werden, da p53 ein direktes Zielgen BCL6-vermittelter transkriptionaler Repression ist<sup>85</sup>. Weitere Mechanismen der Verringerung der p53-Aktivität sind unter anderem p53-Mutationen<sup>72,73</sup> oder Amplifikationen des p53-Antagonisten *MDM2*. Diese treten bei etwa 12% der Fälle auf. MDM2 bindet p53 und verhindert dessen Funktion als Transkriptionsfaktor<sup>86</sup>. Des Weiteren kann p53 durch CREBBP bzw. EP300 spezifisch acetyliert werden. Zur transkriptionalen Aktivierung pro-apoptotischer Gene durch p53 sind diese spezifischen Acetylierungen essentiell (zusammengefasst in *Kruse und Gu, 2009*<sup>87</sup>). Wegen der bereits beschriebenen inaktivierenden Mutation beider Acetyltransferasen CREBBP bzw. EP300 bei etwa 40% der GCB DLBCL<sup>75,76</sup> kann so die transkriptionale Induktion von Apoptose infolge von DNA-Schäden durch p53 verhindert werden.

Vorarbeiten zeigten, dass ca. 10 bis 15% der GCB DLBCL hetero- bzw. homozygote Deletionen des Tumorsuppressors *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) aufweisen<sup>48</sup>. Außerdem ist der mikroRNA (miR) Cluster *miR17~92* bei etwa 15% der GCB DLBCL amplifiziert. miRs sind endogene, ca. 23 Nukleotide große RNAs, die eine wichtige Rolle in der eukaryotischen Genregulation übernehmen<sup>88</sup>. Sie binden spezifisch an mRNAs und reprimieren post-transkriptional deren Translation<sup>88</sup>. Die Expression des *miR17~92* Clusters kann so unter anderem die Translation der *PTEN* mRNA unterbinden<sup>89</sup>. PTEN ist ein Antagonist der onkogenen Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalkaskade, deren konstitutive Aktivität bei DLBCL nachgewiesen wurde<sup>90,91</sup>.

## 1.5 Der Tumorsuppressor PTEN

Zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen assoziierten 1984 erstmals einen partiellen bzw. kompletten Verlust von Chromosom 10 mit dem Auftreten von Hirn-, Blasen- und Prostata-Karzinomen<sup>92</sup>. Erst 1997 identifizierten zwei wissenschaftliche Gruppen unabhängig voneinander das auf Chromosom 10 lokalisierte Gen *PTEN* als mutmaßlichen Tumorsuppressor<sup>93,94</sup>. Zeitnah wurde die tumorsuppressive Rolle von *PTEN* anhand von *Knockout*-Maus-Modellen in verschiedenen Organsystemen durch mehrere Arbeitsgruppen bestätigt<sup>95-97</sup>. Diese Untersuchungen zeigten, dass homozygote Inaktivierung von *PTEN* in der murinen Keimbahn-DNA mit embryonaler Letalität assoziiert war und *Pten*<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht überlebensfähig waren<sup>95,96</sup>. Die heterozygote *PTEN*-Inaktivierung bei *Pten*<sup>+/-</sup>-Mäusen steigerte deren Tumor-Anfälligkeit und induzierte unter anderem Kolonkarzinome und Leukämien<sup>95,96</sup>. Der B-Zell-spezifische homozygote *PTEN-Knockout* bei *bPten*<sup>fllox/fllox</sup>-Mäusen führte zu Splenomegalie sowie Lymphadenopathien im Mesenterium<sup>98</sup>. Weiterführende Untersuchungen PTEN-defizienter B-Zell-Populationen dieser *bPTEN*<sup>fllox/fllox</sup>-Mäuse wiesen deren verstärkte Proliferation und Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli nach<sup>98</sup>. Mittlerweile zählt PTEN zu den am besten erforschten Tumorsuppressoren, wobei durch eine Vielzahl tumorassoziierter Studien das Verständnis der Struktur, der Funktion und der Regulation von *PTEN* stark verbessert wurde.

Die tumorsuppressive Aktivität von *PTEN* weist hierbei Besonderheiten auf. Lange galt das sogenannte *Two-Hit*-Modell als grundlegend für den Funktionsverlust von Tumorsuppressoren. Demnach muss es zu zwei genetischen Ereignissen kommen, damit beide Tumorsuppressor-Allele ausgeschaltet werden und ein Tumor initiiert wird. Die Tumorinduktion durch Verlust von Retinoblastoma 1 (*RB1*) funktioniert nach diesem Prinzip<sup>99</sup>. Für *PTEN* aber konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Verringerungen der *PTEN*-Genexpression zur Induktion von Tumoren führen, ohne dass genetische Aberrationen zwingend auftreten müssen. So wurde ein hypomorphes Maus-Modell (*Pten*<sup>hy</sup>) entwickelt, in welchem sich die *PTEN*-Expressionsstärke im Vergleich zum Wildtyp nuanciert verringern lässt<sup>100</sup>. Schon ein 20%iger Rückgang der *PTEN*-Expression verschlechterte das Überleben der *Pten*<sup>hy/+</sup>-Mäuse signifikant<sup>100</sup>. So steigerte 20%ige *PTEN*-Reduktion bei der untersuchten *Pten*<sup>hy/+</sup>-Maus-Kohorte unter anderem

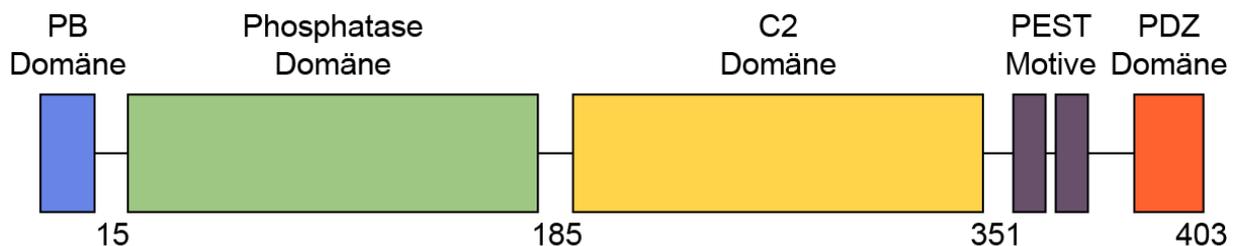
die Inzidenz von Mammakarzinomen, Uteruskarzinomen oder autoimmunen Lymphadenopathien<sup>100</sup>. Die Verringerung der *PTEN*-Expression auf 50% bei heterozygoten *Pten*<sup>+/-</sup>-Mäusen erhöhte unter anderem die Inzidenz von Lymphomadenopathien, Uteruskarzinomen und prostatichen, intraepithelialen Neoplasien<sup>100</sup>. Somit führte eine geringe Reduktion der *PTEN*-Expression zur Induktion unterschiedlicher Tumoren.

Eine weitere Besonderheit im Zusammenhang mit dem Verlust der *PTEN*-Expression zeigte sich bei der Untersuchung der Proliferation muriner, embryonaler Fibroblasten (MEF). MEF mit homozygotem Verlust der *PTEN*-Expression proliferierten unerwarteter Weise im gleichen Maße wie MEF mit normalem *PTEN*-Status<sup>101</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten nur MEF mit heterozygotem *PTEN*-Verlust verstärkte Proliferation<sup>101</sup>. Entsprechend den Beobachtungen konnte nachgewiesen werden, dass akuter *PTEN*-Verlust bei MEF zur Induktion von Seneszenz führte<sup>101</sup>. Seneszenz ist ein tumorsuppressiver Schutzmechanismus und stellt physiologisch einen sehr stabilen Zellzyklus-Arrest dar<sup>102</sup>. Die Induktion *PTEN*-assoziierter Seneszenz stellt somit einen Vorgang dar, der die Tumorgenese und -progression verhindern kann<sup>103</sup>. Demnach kann bei funktionellen Mausmodellen ein dezenter Rückgang bzw. heterozygoter Verlust der *PTEN*-Genexpression tumorfördernder als homozygoter *PTEN*-Verlust sein<sup>101</sup>.

### 1.5.1 Die Struktur von *PTEN*

*PTEN* ist ein circa 105 kb großes Gen mit neun Exonen auf Chromosom 10q23. Es kodiert für eine nicht-redundante Phosphatase, welche die Phosphorylierung sowohl von Polypeptiden als auch von Phosphoinositiden hydrolysieren kann<sup>104,105</sup>. Detaillierte Einblicke in die Struktur des 403 Aminosäuren großen Tumorsuppressors lieferten die Studien der Forschungsgruppe um *Pier Paolo Pandolfi*, die 1999 die Kristallstruktur publizierte<sup>106</sup>. Aus dieser Arbeit ging hervor, dass *PTEN* aus zwei großen, funktionalen Domänen aufgebaut ist, einer N-terminalen, katalytischen Phosphatase-Domäne sowie einer C-terminalen C2-Domäne (Abbildung 3)<sup>106</sup>. Die Phosphatase-Domäne besitzt, im Gegensatz zu vergleichbaren Domänen anderer Phosphatasen, ein vergrößertes katalytisches Zentrum, welches die Bindung und Hydrolyse der Phosphoinositide zulässt. Diese *PTEN*-spezifische Besonderheit ist evolutionär konserviert und tumorassoziierte Mutationen innerhalb dieser Phosphatase-Domäne führen häufig

zu verminderter katalytischer Aktivität<sup>104,107</sup>. Die C-terminale C2-Domäne kann Phospholipid-Membranen binden und so PTEN membranständig lokalisieren<sup>108</sup>. Zudem regulieren post-transkriptionale Modifikationen der C2-Domäne die PTEN-Aktivität. Mutationen in dieser Domäne verringern die tumorsuppressive Funktion von PTEN<sup>106</sup>. Neben den beiden großen Domänen wurden eine N-terminale PIP2-bindende (PB) Domäne, zwei C-terminale PEST (Pro, Glu, Ser, Thr)-Motive sowie ein PDZ-Protein-Interaktions-Motiv identifiziert (Abbildung 3)<sup>106,109,110</sup>.



**Abbildung 3:** Struktur des Tumorsuppressors PTEN. PTEN besitzt zwei funktionelle Domänen, eine N-terminale, katalytische Phosphatase-Domäne und eine C-terminale, regulatorische C2-Domäne. Weitere Domänen sind zwei C-terminale PEST-Motive und eine PDZ-Protein-Interaktionsdomäne sowie eine PIP2-bindende-(PB) Domäne (Abbildung modifiziert nach *Zhang et al.*, 2010<sup>109</sup>).

### 1.5.2 Funktionen von PTEN

Die bedeutendste katalytische Funktion von PTEN ist die Hydrolyse des *second messengers* Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) zu Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP2)<sup>104,111</sup>. Dies begründet die tumorsuppressive Wirkung von PTEN, da PIP3 den onkogenen Proteinkinase B (AKT)-Signalweg aktiviert. Der Verlust der katalytischen Funktion von PTEN beeinflusst unterschiedliche biologische Prozesse, die für die Entstehung und das Überleben maligner Zellen von entscheidender Bedeutung sind.

Neben der Regulation des AKT-Signalweges spielt PTEN auch bei anderen Prozessen eine wichtige Rolle. So beeinflusst PTEN im Nukleus die genomische Integrität, unabhängig von der Phosphatase-Aktivität, indem es unter anderem die Expression des DNA-Reparatur-Enzyms RAD51 positiv reguliert<sup>112</sup>. RAD51 reduziert beispielsweise die Inzidenz spontaner DNA-Doppelstrangbrüche<sup>113</sup>. Verschiedene Studien belegten zudem, dass nukleäres PTEN die Aktivität der E3-Ligase APC/C steigert, in dem es

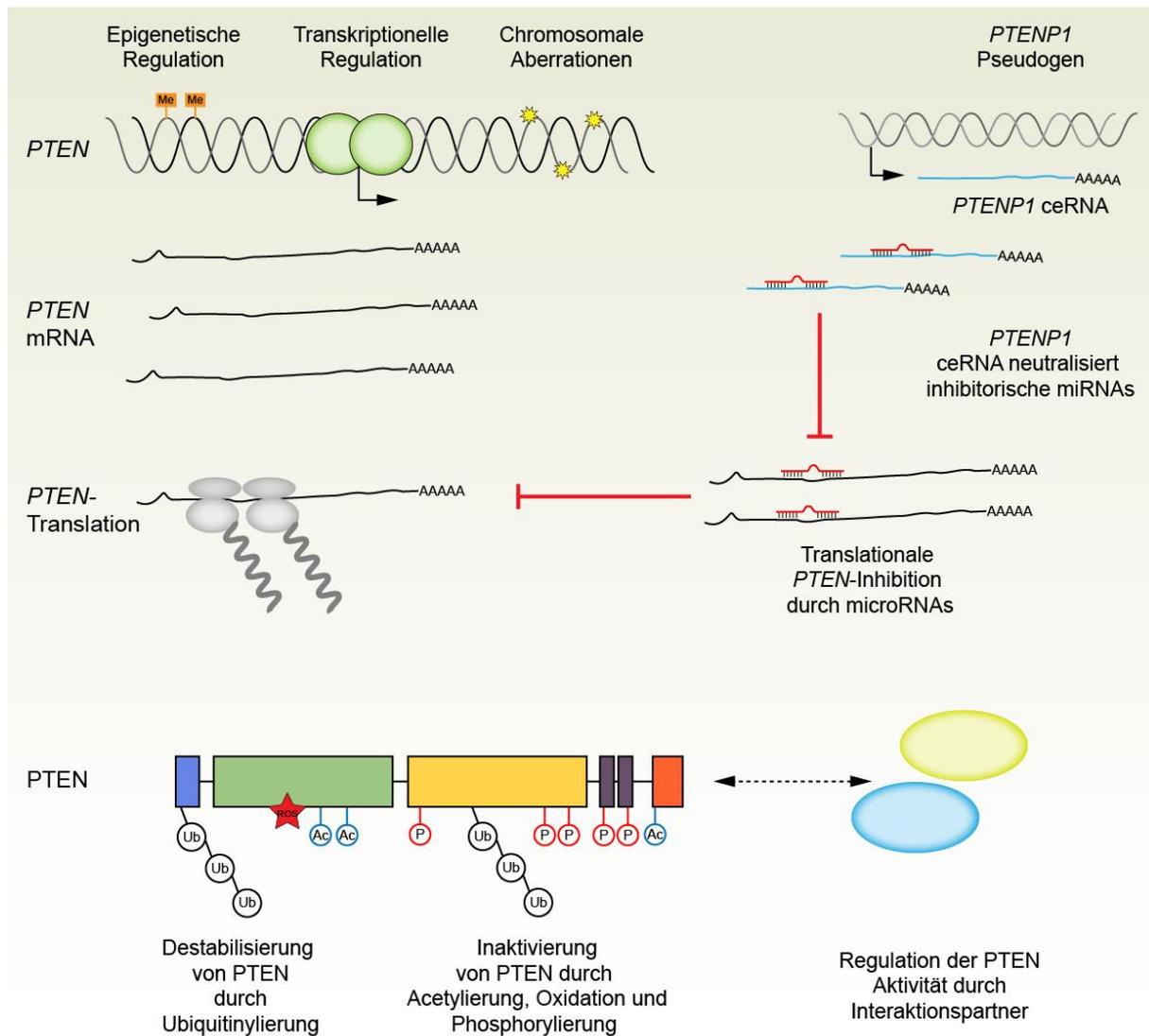
deren Assoziation mit CDH1 (*fizzy/cell division cycle 20 related 1*) fördert. Die resultierende Aktivitätssteigerung hat tumorsuppressives Potential, da der APC/C-CDH1-Komplex die Degradierung von Onkoproteinen wie PLK1 (*polo-like-kinase 1*) oder Aurora-Kinasen kontrolliert<sup>114,115</sup>.

### 1.5.3 Die Regulation von PTEN

Die Regulation der Expression und Aktivität von *PTEN* erfolgt durch zahlreiche Mechanismen. Bei normalem Gewebe und unter physiologischen Bedingungen wird *PTEN* konstitutiv exprimiert<sup>110,116,117</sup>.

Eine der häufigsten Ursachen für den Expressions- bzw. Funktionsverlust von *PTEN* sind genetische Veränderungen wie somatische Mutationen oder chromosomale Deletionen (Abbildung 4). Viele Tumoren weisen Mutationen des *PTEN*-Lokus auf. So ist *PTEN* bei über 60% der Endometriumkarzinome und bei über 30% der Glioblastome mutiert<sup>118</sup>. Untersuchungen des *BROAD Institute* im Rahmen des *Tumorscape*-Programmes<sup>119</sup> zu Deletionen des *PTEN*-Lokus bei 8055 Biopsien 27 verschiedener Tumor-Entitäten detektierten chromosomale Deletionen des Tumorsuppressors bei durchschnittlich 30% der untersuchten Neoplasien. So traten chromosomale Verluste des *PTEN*-Lokus bei nahezu 90% der Glioblastome, bei über 60% der kutanen Melanome und ca. 40% der Prostatakarzinome auf (Stand: 25. Oktober 2013; <http://www.broadinstitute.org/tumorscape>)<sup>119</sup>.

Auf der Ebene transkriptionaler Regulation erfolgt die Repression der *PTEN*-Expression unter anderem durch epigenetisches *Silencing* oder irreguläre Promotor-Methylierung<sup>110</sup> (Abbildung 4). So konnte bei ca. 48% der papillären Schilddrüsenkarzinome<sup>120</sup> bzw. etwa 60% der kutanen Melanome<sup>121</sup> Hypermethylierung des *PTEN*-Lokus nachgewiesen werden. Transkriptionale Regulation von *PTEN* kann darüber hinaus durch klassische, kompetitive Aktivator-Repressor-Interaktion erfolgen. So konkurrieren beispielsweise die reprimierenden Transkriptionsfaktoren SNAI1 (*snail family zinc finger 1*) und ID1 (*inhibitor of DNA binding 1*) mit p53, einem transkriptionalen Aktivator der *PTEN*-Expression, um die Bindung am *PTEN*-Promotor<sup>122,123</sup>.



**Abbildung 4:** Regulationsebenen von *PTEN*. Transkriptional kann die *PTEN*-Expression durch epigenetische Promotor- und Histonmodifikationen, sowie durch klassische Aktivator-Repressor-Interaktionen beeinflusst werden. Aberrationen wie Mutationen oder genomischer Kopienverlust tragen zu einer *PTEN*-Inaktivierung bei. Post-transkriptional repräsentiert ein Netzwerk von miRs die Initiation der Translation. Dieses Netzwerk wird auch durch die ceRNA des *PTEN*-Pseudogens *PTENP1* kontrolliert, welche als Köder miRs bindet, die gegen die *PTEN* mRNA gerichtet sind. Post-translational erfolgt die Regulation der *PTEN*-Stabilität und Aktivität durch Acetylierung, Oxidation, Phosphorylierung, Ubiquitinierung sowie Protein-Protein-Interaktionen (Abbildung modifiziert nach *Berger et al., 2011*)<sup>99</sup>.

Post-transkriptional wird die Regulation von *PTEN* durch eine Vielzahl von miRs vermittelt (zusammengefasst durch *Song et al., 2012*)<sup>110</sup>. Wichtig erscheint hier insbesondere der *miR-17~92* Cluster, dessen genomischer Locus bei lymphoproliferativen Erkrankungen, wie beispielsweise GCB DLBCL, amplifiziert ist<sup>48,89</sup>.

Ein neuartiger Ansatz post-transkriptionaler Regulation wurde durch funktionelle Untersuchungen des *PTEN*-Pseudogens *PTENP1* identifiziert. Das *PTENP1*-Transkript ist zu 90% homolog zu der mRNA von *PTEN*, insbesondere in der kodierenden Region und der ersten Hälfte der 3'-UTR<sup>124</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass das *PTENP1*-Transkript gegen die *PTEN* mRNA gerichtete miRs bindet und dadurch die Expression von PTEN stabilisiert (Abbildung 4). Mechanistisch sind kompetitive, endogene RNAs (ceRNAs) bedeutend, da der genomische Verlust von *PTENP1* bei Darm- und Prostatakrebs beobachtet wurde und mit einem Rückgang der PTEN-Expression assoziiert war<sup>124</sup>.

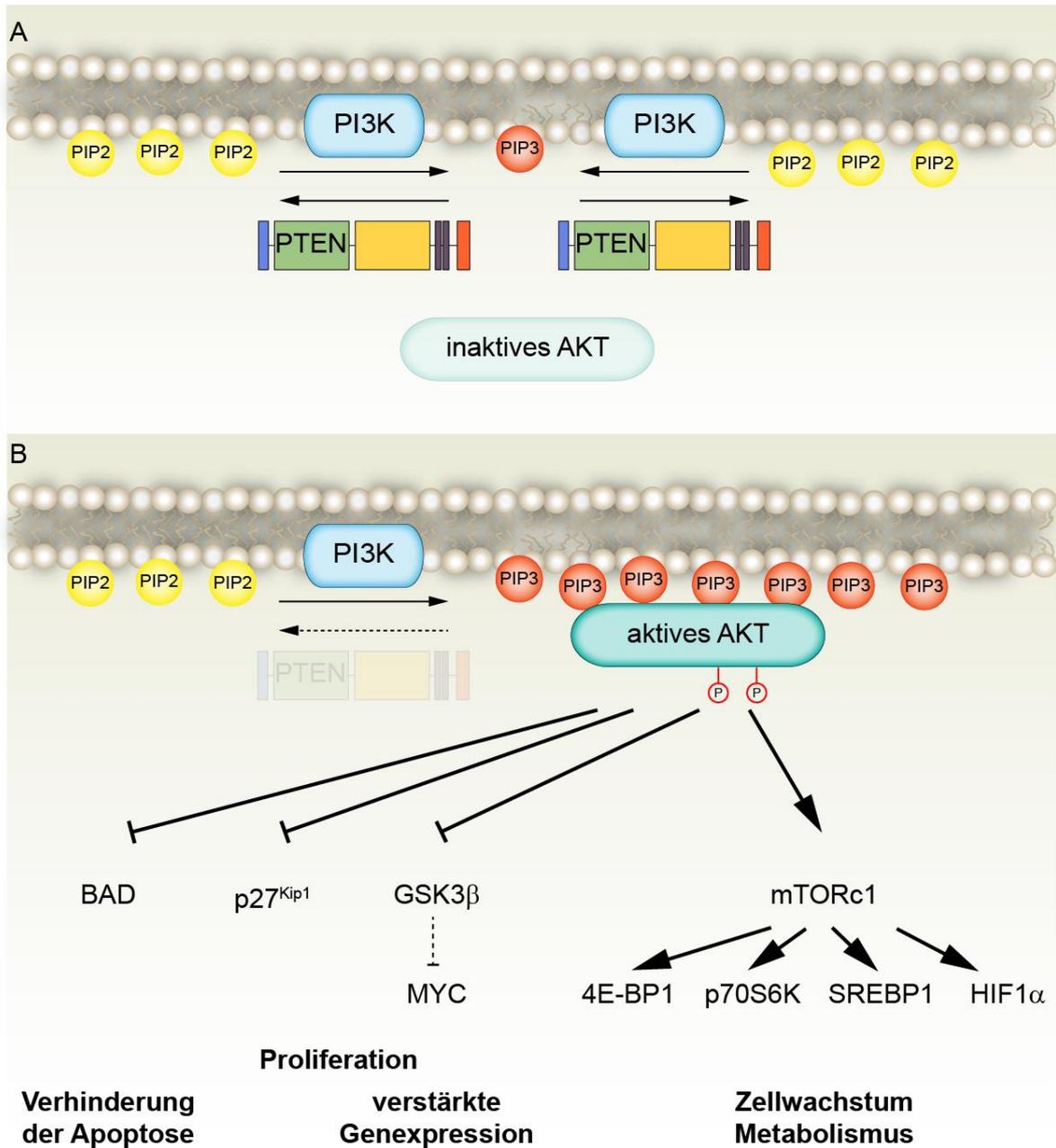
Auf post-translationaler Ebene wird die Aktivität und Stabilität von PTEN durch unterschiedliche Modifikationen wie Phosphorylierung<sup>125-127</sup>, Acetylierung<sup>128</sup>, Oxidierung<sup>129</sup> oder Ubiquitylierung<sup>127,130</sup> moduliert. PTEN interagiert vornehmlich über den C-Terminus, mit einer Vielzahl an Proteinen, die die Aktivität des Tumorsuppressors sowohl positiv als auch negativ modulieren (zusammengefasst in *Song et al., 2012*)<sup>110</sup>.

## 1.6 PI3K und AKT im Phospholipid-Signalsystem

Das Phosphatidylinositol-Signalsystem ist ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Phospholipid-Signalmolekülen, modifizierenden Enzymen sowie Effektorproteinen (zusammengefasst in *Bunney und Katan, 2010*<sup>131</sup>; *Vanhaesebroeck et al., 2012*<sup>132</sup>). Diese sind an der Regulation zellulärer Prozesse, wie der Aktivität von Signalkaskaden, dem vesikulären Transport, der Dynamik des Zytoskeletts sowie am Metaboliten-Transport durch die Zellmembran maßgeblich beteiligt<sup>131</sup>. Eine bedeutende Rolle innerhalb dieses Netzwerkes spielen die PI3K der Klasse I, welche beispielsweise durch Tyrosin-Rezeptor-Kinasen, aber auch BCR-abhängig aktiviert werden<sup>133</sup>. Diese PI3K wandeln PIP2 unter Verbrauch von ATP zu PIP3 um<sup>132,134</sup>. PIP3 fungiert innerhalb der Zellmembran als Adaptormolekül für AKT, das nach Membranlokalisierung sukzessiv an T308 und S473 phosphoryliert und dadurch aktiviert wird<sup>135-139</sup> (Abbildung 5).

### 1.6.1 PTEN als PI3K/AKT-Antagonist

Aufgrund seiner PIP3-Lipidphosphatase-Aktivität ist PTEN der Hauptregulator der PI3K/AKT-Signalkaskade<sup>104,110,111</sup>. Der Tumorsuppressor hydrolysiert den *second messenger* PIP3 und verhindert somit die initiale AKT-Aktivierung (Abbildung 5A). Der Verlust der PTEN-Funktion führt zu einer Akkumulation von PIP3 in der Zellmembran und somit zu einer unkontrollierten Aktivierung der onkogenen AKT-Kaskade<sup>110</sup>. Konstitutive Aktivität dieses Signalweges wurde bisher bei einer Vielzahl von Tumoren, beispielsweise Glioblastome, malignen Melanomen oder Lungenkarzinomen<sup>140</sup>, welche auch Aberrationen von *PTEN* aufweisen<sup>141-143</sup>, nachgewiesen. Auch bei hämatologischen Neoplasien, wie beispielsweise chronischen myeloischen Leukämien oder DLBCL, konnte eine konstitutive Aktivierung der PI3K /AKT-Kaskade infolge von *PTEN*-Aberrationen gezeigt werden<sup>90,144</sup>.



**Abbildung 5:** Deregulation der PI3K/AKT-Kaskade durch Verlust von PTEN. **A)** PTEN ist der Hauptantagonist des PI3K-Signalweges. PTEN hydrolysiert den *second messenger* PIP3 der durch PI3K aus PIP2 generiert wird. Durch die Aktivität von PTEN ist die Menge an PIP3 stark reguliert wodurch die Membranlokalisierung von AKT limitiert ist. Deshalb erfolgt keine Aktivierung des PI3K-Effektors AKT. **B)** Verlust der PTEN-Expression führt zu Deregulation der PI3K/AKT-Kaskade. Es kommt zur Akkumulation von PIP3, was eine starke Membranlokalisierung und die unkontrollierte Aktivierung von AKT zur Folge hat. Aktiviertes AKT reguliert die Funktion zahlreicher sekundärer Effektoren und moduliert Prozesse wie Proliferation, Genexpression, Wachstum, Metabolismus und verhindert die Induktion von Apoptose.

### 1.6.2 Physiologische Konsequenzen einer AKT-Aktivierung

Aktiviertes AKT (p-AKT) fungiert als Kinase und beeinflusst die Aktivität zahlreicher Regulatoren des Stoffwechsels, des Zellwachstums, des Zellüberlebens, der Proliferation sowie der Angiogenese<sup>145</sup>. Die Deregulation dieser zentralen, biologischen Prozesse ist als Kennzeichen von Tumoren definiert<sup>7</sup>. Sie ist für die Entstehung und das Fortbestehen von Tumorzellen essentiell.

Entscheidenden Einfluss auf das Überleben von Zellen hat p-AKT unter anderem durch die Blockade pro-apoptotischer Signale von Proteinen der sogenannten *BCL2*-Familie. So wird beispielsweise BAD (*BCL2-associated agonist of cell death*), ein zentraler Faktor bei der Induktion der Apoptose, direkt durch Phosphorylierung an S136 an der Initiation der apoptotischen Kaskade gehindert<sup>146,147</sup> (Abbildung 5B).

Eine wichtige Rolle nimmt p-AKT in der Induktion des Zellwachstums ein. So hemmt es durch Phosphorylierung die Aktivität von TSC2 (*tuberous sclerosis 2*)<sup>148-150</sup>. TSC2 ist ein Inhibitor des mTORc1 (*mechanistic target of rapamycin*)-Aktivators Rheb (*Ras homolog enriched in brain*)<sup>151</sup>. Durch Ausschalten von TSC2 aktiviert p-AKT indirekt den mTORc1-Komplex und moduliert so die Aktivität klassischer mTORc1-Zielproteine wie p70S6K (*ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1*), 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*), SREBP1 (*sterol regulatory element binding transcription factor 1*) oder HIF1 $\alpha$  (*hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*)<sup>152-155</sup>. Diese Faktoren bewirken eine verstärkte Proteinbiosynthese und einen erhöhten Lipidstoffwechsel, die vermehrte Bereitstellung von Nukleotiden und Makromolekülen sowie das Intensivieren der Glykolyse und des Energiestoffwechsels, was zu verstärktem Zellwachstum führt<sup>156</sup> (Abbildung 5B)

AKT stimuliert die Proliferation unter anderem durch Phosphorylierung des Cyclin-abhängigen Zellzyklus-Inhibitors p27<sup>Kip1</sup>, was zu dessen zytoplasmatischer Lokalisierung und zur Attenuierung seiner proliferationshemmenden Aktivität im Nukleus führt<sup>157-159</sup>. Dadurch wird ein negativer Kontrollmechanismus im Zellzyklus umgangen und Zellteilung verstärkt. Weiteren Einfluss auf die Zellproliferation und Genexpression hat p-AKT durch die Phosphorylierung und direkte Inaktivierung der Kinase GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3  $\beta$* )<sup>160</sup>. GSK3 $\beta$  katalysiert die T58-Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors MYC (*v-myc avian myelocytomatosis viral*

*oncogene homolog*), wodurch dessen proteasomale Degradation vermittelt wird<sup>161</sup>. Inaktivierung von GSK3 $\beta$  stabilisiert somit MYC<sup>162</sup>, der als genereller Verstärker aktiver Genexpression gilt<sup>163</sup>. p-AKT-vermittelte MYC-Stabilisierung kann dadurch die Auswirkungen p-AKT-induzierter, onkogener Genexpressionsprofile verstärken (Abbildung 5B).

## 1.7 Fragestellung der Arbeit

Aberrationen des Tumorsuppressors PTEN führen bei Tumoren in der Regel zu einer Deregulation von Schlüssel-Signal-Kaskaden, die die Malignität der betroffenen Neoplasien propagieren. Eine Vorarbeit lieferte erste Hinweise auf ein differentielles Auftreten von *PTEN*-Aberrationen bei ABC und GCB Lymphomen<sup>48</sup>, die funktionelle Rolle von PTEN bei der Pathogenese von DLBCL wurde bisher nur unvollständig untersucht<sup>164,165</sup>.

Diese Arbeit sollte zur Charakterisierung der Rolle von PTEN an der Pathogenese der DLBCL beitragen. Insofern sollte die funktionelle Bedeutung von PTEN bei der molekularen Pathogenese der DLBCL, auch hinsichtlich deren Einteilung in ABC und GCB Lymphome, aufgeklärt werden, da diese Klassifizierung in molekulare Subtypen immer mehr an klinischer Relevanz gewinnt<sup>21,166-168</sup>.

Anhand zweier unabhängiger DLBCL Patientenkollektive wurde die PTEN-Expression auf Unterschiede zwischen ABC und GCB DLBCL untersucht. Weiterführend sollten durch die Identifikation adäquater Zelllinienmodelle funktionelle Fragestellungen bezüglich eines Verlustes des Tumorsuppressors PTEN bei DLBCL beantwortet werden.

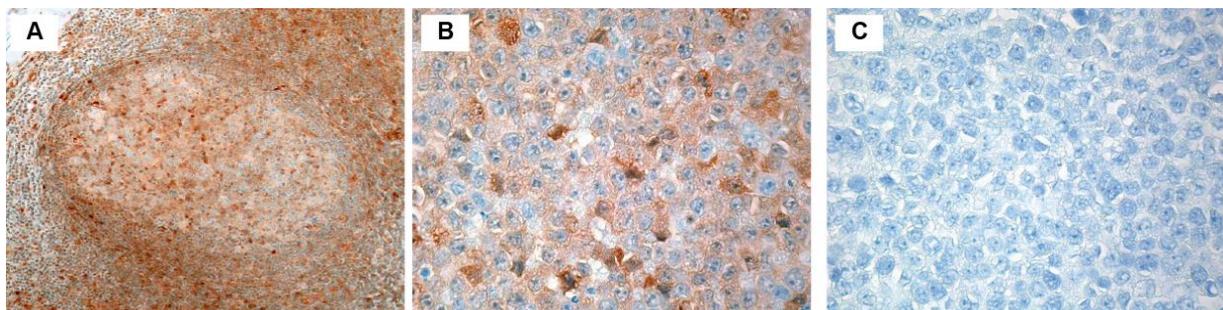
Da der Therapieerfolg bei der Behandlung insbesondere rezidivierender und refraktärer DLBCL heutzutage noch unbefriedigend ausfällt, war die Identifikation neuer Therapieoptionen bei dieser Arbeit von zentraler Bedeutung. Durch die Identifikation onkogener Signal-Kaskaden die im Zusammenhang mit *PTEN*-Aberrationen bei DLBCL stehen, sollten möglicherweise neue therapeutische und diagnostische Zielstrukturen identifiziert werden.

## 2 ERGEBNISSE

### 2.1 PTEN-Expression bei DLBCL

#### 2.1.1 Etablierung der PTEN-Färbung

Die Expression von PTEN bei primären DLBCL Patientenproben wurde immunhistochemisch in enger Kooperation mit Professor Dr. Alexandar Tzankov durchgeführt. Die Bedingungen der PTEN-Detektion wurden durch die Färbung von acht Tonsillen und zwei normalen Lymphfollikeln etabliert. Erwartungsgemäß wurde bei der Mehrzahl der Zellen PTEN detektiert (Abbildung 6A). So exprimierten 80% der Centrozyten und 50% der Centroblasten in heller und dunkler Zone der Lymphfollikel PTEN. Zudem konnte bei 60 - 80% der inter- und perifollikulären Zellen PTEN-Expression nachgewiesen werden. Die weitere Etablierung der PTEN-Färbung erfolgte anhand PTEN-negativer bzw. PTEN-positiver DLBCL Zelllinien. Bei allen getesteten Zelllinien war im Vorfeld mittels Immuno-Blot die PTEN-Expression getestet worden (Abbildung 9). So konnte bei TMD8, OCI-Ly10 und OCI-Ly19 immunhistochemisch PTEN detektiert werden (Abbildung 6B). Im Gegensatz dazu war bei den PTEN-defizienten DLBCL Modellen BJAB, HT und OCI-Ly1 keine PTEN-Expression feststellbar (Abbildung 6C)

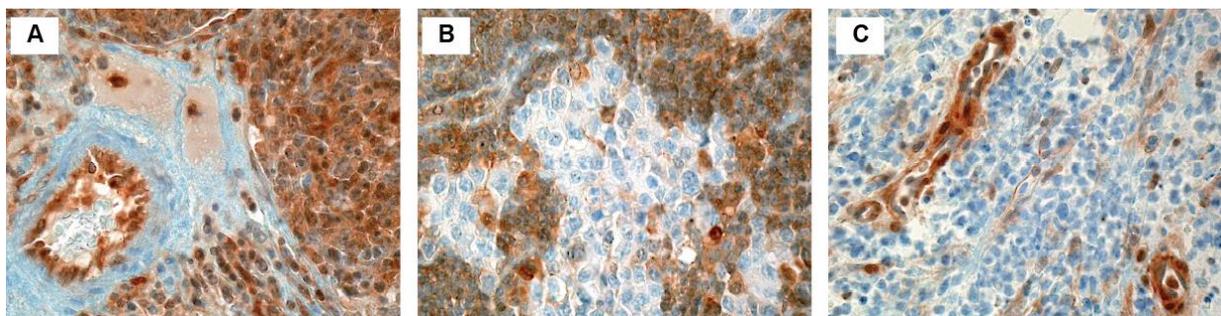


**Abbildung 6:** Etablierung der immunhistochemischen PTEN-Färbung. A) Nachweis der PTEN-Expression bei einem normalen Lymphfollikel. Bei der Mehrzahl der Centroblasten und Centrozyten in heller und dunkler Zone, sowie bei inter- und perifollikulären Zellen wurde PTEN immunhistochemisch nachgewiesen. B) Bei der PTEN-positiven ABC DLBCL Zelllinie TMD-8 konnte PTEN nachgewiesen werden. C) Bei der PTEN-defizienten Zelllinie HT konnte immunhistochemisch kein PTEN nachgewiesen werden; (Vergrößerung A, 120x; B und C, 400x).

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung bestätigten die Resultate der Untersuchungen im Immuno-Blot.

### 2.1.2 Differentielle PTEN-Expression bei DLBCL

Die immunhistochemischen Analysen der PTEN-Expression erfolgten anhand der im vorherigen Abschnitt definierten Parameter bei zwei unterschiedlichen DLBCL Patientenkohorten. Um tatsächlich PTEN-defiziente Patientenproben zu identifizieren wurde ein Grenzwert, der Biopsien mit weniger als 5% PTEN-positiven Lymphomzellen als PTEN-defizient definierte, adaptiert.



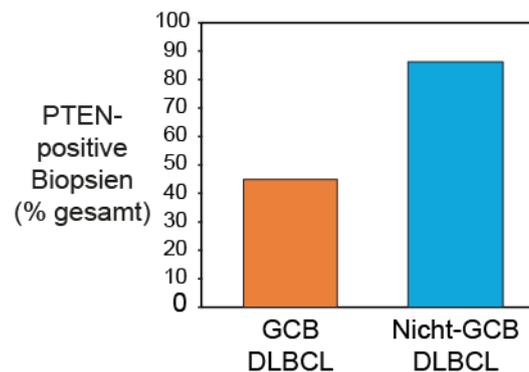
**Abbildung 7:** Immunhistochemische Bestimmung der PTEN-Expression bei DLBCL Biopsien. A) PTEN-positive DLBCL Patientenproben mit interner Negativ-Kontrolle (vaskuläre, glatte Muskelzellen). B) PTEN-negative DLBCL Biopsie mit interner Positiv-Kontrolle (infiltrierende, reaktive Lymphozyten) C) PTEN-negative Biopsie mit interner Positiv-Kontrolle (Blutgefäß); (Vergrößerung A-C, 320x).

Kohorte 1 bestand aus 34 DLBCL Biopsien, die im Vorfeld durch Genexpressionsstudien in ABC DLBCL, GCB DLBCL und unklassifizierbare DLBCL eingeteilt worden waren<sup>169</sup>. Insgesamt exprimierten 22 Biopsien (65%) der Kohorte 1 PTEN. Die unterschiedlichen molekularen DLBCL Subtypen zeigten aber ein deutlich differentielles PTEN-Expressionsmuster. So wurde bei 88% (7/8) der ABC DLBCL und 75% (6/8) der unklassifizierbaren DLBCL PTEN-Expression nachgewiesen, während im Gegensatz nur 50% (9/18) der GCB DLBCL PTEN exprimierten ( $P = 0,08$ ; exakter Test nach Fisher).

Um diese Ergebnisse in einer zweiten, deutlich größeren Kohorte zu bestätigen, wurde die unabhängige Kohorte 2 hinsichtlich ihrer PTEN-Expression immunhistochemisch

analysiert. Die Klassifizierung der DLBCL Kohorte 2 in unterschiedliche molekulare Subtypen erfolgte immunhistochemisch mittels des sogenannten *Tally*-Algorithmus. Dieser immunhistochemische Färbealgorithmus ermöglichte eine Einteilung der DLBCL in GCB DLBC und Nicht-GCB DLBCL anhand des immunhistochemischen Nachweises der Antigene CD10, GCET1 (*germinal center B-cell-expressed transcript-1*), IRF4 (*interferon regulatory factor 4*), FOXP1 (*forkhead box P1*) sowie LMO2<sup>170</sup>. Nicht-GCB DLBCL entsprechen weitgehend den ABC DLBCL.

Kohorte 2 setzte sich aus 249 primären DLBCL Biopsien zusammen, von denen 214 Proben (86%) hinsichtlich ihres PTEN-Status auswertbar waren (Abbildung 7A-C). Innerhalb dieser Kohorte waren 44% (31/71) der GCB DLBCL PTEN-positiv, während 87% (124/143) der nicht-GCB DLBCL PTEN exprimierten ( $P = 1,0 \times 10^{-11}$ ; exakter Test nach Fisher).



**Abbildung 8:** PTEN-Expression bei DLBCL Subtypen. Durch immunhistochemische PTEN-Färbung bei 248 primären Patientenbiopsien konnte ein differentieller PTEN-Verlust detektiert werden. So zeigten 55 % der GCB DLBCL keine PTEN-Expression im Vergleich zu nur 14 % der nicht-GCB DLBCL ( $P = 2,1 \times 10^{-11}$ ; exakter Test nach Fisher).

Anhand von insgesamt 248 primären DLBCL Patientenproben konnte ein Verlust der PTEN-Expression bei 55% (49/89) der GCB DLBCL im Vergleich zu nur 14% (22/159) bei den nicht-GCB DLBCL detektiert werden ( $P = 2,1 \times 10^{-11}$ ; Exakter Test nach Fisher; Abbildung 8).

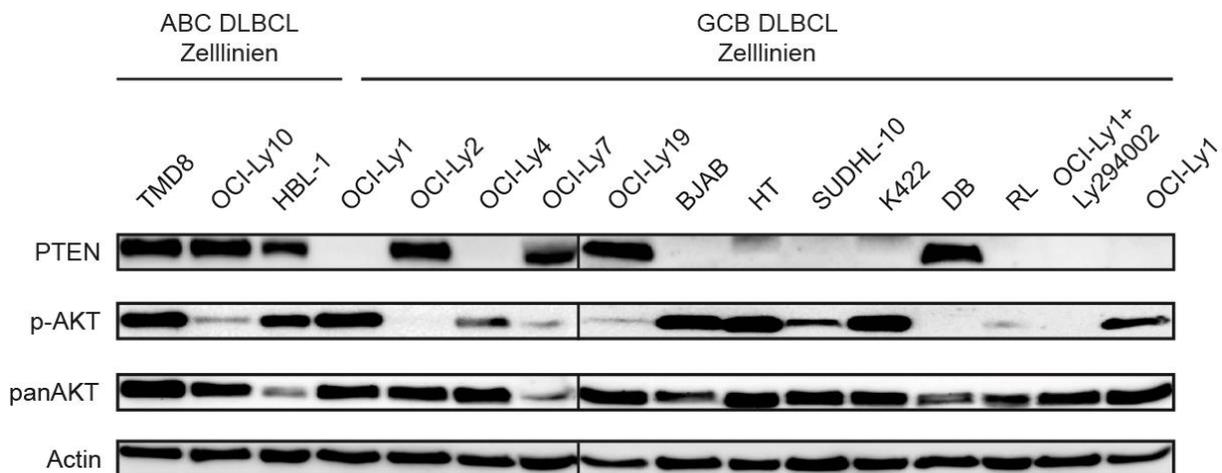
Diese Ergebnisse implizierten, dass PTEN-Verlust prädominant bei GCB DLBCL auftritt, so dass diese hinsichtlich ihres PTEN-Status in zwei Gruppen, PTEN-negative sowie -positive GCB DLBCL, unterteilt werden können.

### 2.1.3 PTEN-Expression bei DLBCL Zelllinien

Um zu überprüfen ob GCB DLBCL geeignete Modellsysteme für die Charakterisierung der funktionellen Rolle von PTEN bei der Pathogenese von DLBCL darstellten, wurde bei 14 DLBCL Zelllinien die PTEN-Expression mittels Immuno-Blot untersucht (Abbildung 9).

PTEN-Expression konnte wie erwartet bei allen drei untersuchten ABC DLBCL Zelllinien (HBL-1, OCI-Ly10 und TMD8) nachgewiesen werden<sup>91</sup>. Im Gegensatz dazu konnte nur bei vier von elf GCB DLBCL Zelllinien (DB, OCI-Ly2, OCI-Ly7 und OCI-Ly19) Expression von PTEN gezeigt werden. Die Mehrzahl der untersuchten GCB DLBCL Zelllinien (7/11) war PTEN-defizient.

Somit bestätigten diese Ergebnisse die Beobachtungen innerhalb der Patientenkohorten. Aus diesem Grund stellen GCB DLBCL Zelllinien geeignete Modellsysteme für die funktionelle Charakterisierung von PTEN-Verlust bei GCB DLBCL dar.

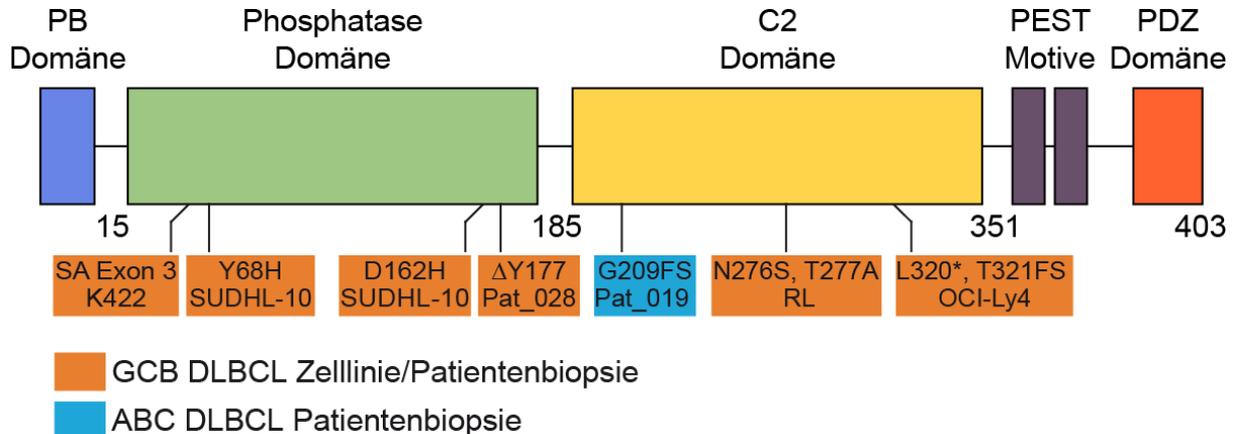


**Abbildung 9:** Nachweis der PTEN-Expression und AKT-Aktivierung bei DLBCL Zelllinien. Mittels Immuno-Blot konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten ABC DLBCL Zelllinien PTEN exprimierten. GCB DLBCL Zelllinien waren durch ein differentielles PTEN-Expressionsmuster charakterisiert. PTEN-defiziente GCB DLBCL Zelllinien wiesen konstitutive AKT-Aktivierung (p-AKT) auf, wohingegen bei PTEN-positiven GCB DLBCL keine AKT-Aktivität detektierbar war. OCI-Ly1 wurde auf beiden Blots als p-AKT-Positiv-Kontrolle genutzt. OCI-Ly1, behandelt mit dem pan-PI3K-Inhibitor Ly294002, diente als p-AKT-Negativ-Kontrolle.

### 2.1.4 *PTEN*-Mutationen bei DLBCL

Um die molekularen Mechanismen der fehlenden *PTEN*-Expression bei GCB DLBCL zu untersuchen, wurden die kodierenden *PTEN*-Exone bei 14 DLBCL Zelllinien und 34 DLBCL Biopsien aus Kohorte 1 amplifiziert und mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Vorhergehende Studien zu *PTEN*-Mutationen bei unterschiedlichen malignen Lymphom-Subtypen deuteten auf eine eher niedrige Mutationsfrequenz hin<sup>171-173</sup>. Jedoch fokussierten sich diese Untersuchungen nicht auf Unterschiede im Auftreten von *PTEN*-Mutationen zwischen ABC und GCB DLBCL.

Bei den hier untersuchten Zelllinien konnten sieben *PTEN*-Mutationen identifiziert werden. Alle Mutationen traten bei GCB DLBCL Modellen auf (K422, OCI-Ly4, SUDHL-10 und RL). Diese Mutationen führten zur Veränderung von Aminosäuren, Verschiebungen des Leserasters, Stop-Codons oder defekten *Splice*-Akzeptor-Stellen (SA) (Abbildung 10, Anhang: Abbildung 29, Tabelle 2).



**Abbildung 10:** *PTEN*-Mutationen bei DLBCL Zelllinien und Patientenbiopsien. Sequenziert wurden die kodierenden Exone von *PTEN*. Der überwiegende Teil der Mutationen trat bei GCB DLBCL Zelllinien oder Patientenproben auf. Nur bei einer ABC DLBCL Patientenbiopsie konnte eine Mutation identifiziert werden. Alle Mutationen konnten den beiden funktionellen Hauptdomänen von *PTEN* zugeordnet werden. Es traten „*Splice*“-Akzeptor-Mutationen (SA), Aminosäure-Substitutionen, Deletionen ( $\Delta$ ) sowie Leserasterverschiebungen (FS) und Stop-Codons auf.

Die Zelllinie SUDHL-10 wies zwei Aminosäure-Substitutionen auf (Y68H/D162H). Durch Klonierung des betreffenden Sequenzabschnittes (Exone 3-5) und anschließender Sanger-Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass beide Mutationen auf dem gleichen *PTEN*-Allel lagen. Auch beide Aminosäuresubstitutionen bei der Zelllinie

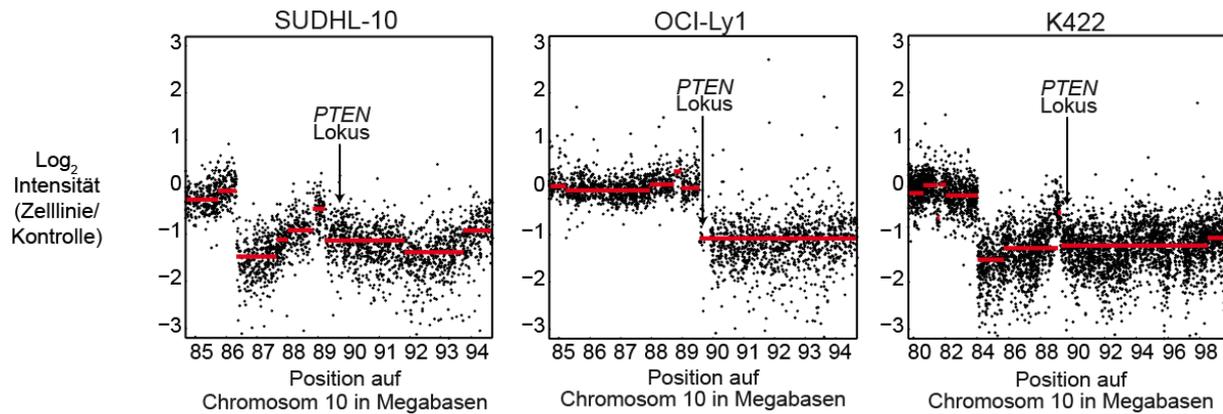
RL (N276S; T277A) konnten dem gleichen *PTEN*-Allel zugeordnet werden. OCI-Ly4 wies ebenfalls zwei *PTEN*-Mutationen auf. Zum einen ein Stop-Codon an Position 320 (L320\*) sowie eine Verschiebung des Leserasters ab Position 321 (T321FS). Beide Mutationen befanden sich auf unterschiedlichen *PTEN*-Allelen. Bei der Zelllinie K422 wurde eine mutierte *Splice*-Akzeptorstelle im Exon 3 von *PTEN* identifiziert (SA Exon 3).

Innerhalb der Kohorte 1 wurden Mutationen des Tumorsuppressors *PTEN* bei jeweils einer GCB DLBCL (3bp Deletion,  $\Delta$ Y170, DLBCL\_028) und einer ABC DLBCL Biopsie (Verschiebung des Leserasters, G209 FS, DLBCL\_019) nachgewiesen (Abbildung 10). Dabei handelte es sich um somatische, tumorspezifische Mutationen, da diese innerhalb der korrespondierenden nicht-tumoralen Patienten-DNA nicht detektierbar waren (Anhang: Abbildung 29 E, F). Alle identifizierten Mutationen befanden sich entweder in der Phosphatase- oder in der C2-Domäne (Abbildung 10) und somit in den funktionellen Hauptdomänen von *PTEN*. Interessanterweise exprimierten alle GCB DLBCL die *PTEN*-Mutationen aufwiesen kein *PTEN* (Abbildung 9; Abbildung 17B). Deshalb wurde der Einfluss der Mutationen auf die Funktion und Stabilität von *PTEN* im späteren Verlauf der Arbeit überprüft.

### 2.1.5 Chromosomaler *PTEN*-Verlust bei DLBCL

Neben Mutationen können auch Veränderungen der chromosomalen *PTEN*-Kopienanzahl zu einem Verlust der *PTEN*-Expression beitragen. Dementsprechend wurde die genomische *PTEN*-Kopienanzahl mittels aCGH und quantitativer genomischer PCR bei DLBCL Zelllinien und Patientenproben untersucht.

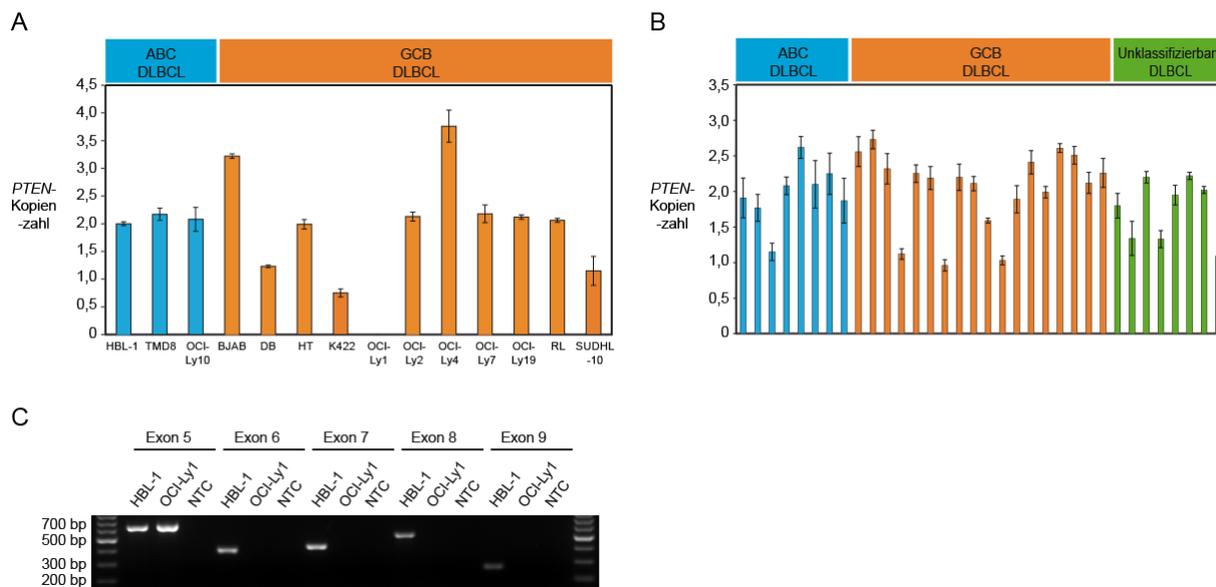
Die Ermittlung der *PTEN*-Kopienzahl durch aCGH auf Basis genomischer DNA erfolgte bei 12 DLBCL Zelllinien (BJAB, DB, HBL-1, HT, K422, OCI-Ly1, OCI-Ly2, OCI-Ly7, OCI-Ly10, RL, SUDHL-10 und TMD8). Die bioinformatische Auswertung der Daten wurde in Kooperation mit Michael Grau durchgeführt. Heterogener *PTEN*-Verlust konnte bei den DLBCL Zelllinien DB, K422, OCI-Ly1 und SUDHL-10 detektiert werden (Abbildung 11; Tabelle 2).



**Abbildung 11:** Heterozygote Deletionen von *PTEN* bei DLBCL. Bei den *PTEN*-defizienten GCB DLBCL Zelllinien SUDHL-10, OCI-Ly1 und K422 wurden *PTEN*-Aberrationen durch aCGH nachgewiesen. Dargestellt ist das Log<sub>2</sub>-Verhältnis einzelner Sonden am *PTEN*-Lokus auf Chromosom 10, relativ zu einer männlichen Versuchskontrolle mit Wildtyp *PTEN*-Lokus. Jeder Punkt markiert den Messwert einer Sonde. Rote Linien markieren das berechnete Mittel nach Segmentierung.

Um die Ergebnisse der aCGH zu validieren, wurde die *PTEN*-Kopienanzahl durch eine quantitative genomische PCR bei 14 DLBCL Zelllinien (BJAB, DB, HBL-1, HT, K422, OCI-Ly1, OCI-Ly2, OCI-Ly4, OCI-Ly7, OCI-Ly10, OCI-Ly19, RL, SUDHL-10 und TMD8) bestimmt. Diese Untersuchung bestätigte die Resultate der aCGH-Analyse bezüglich der genomischen *PTEN*-Verluste (Abbildung 12A; Anhang: Tabelle 2). Einzig die GCB DLBCL Zelllinie OCI-Ly1 wies in der quantitativen PCR-Analyse einen homozygoten *PTEN*-Verlust im Gegensatz zur aCGH-Untersuchung auf. Durch PCR-Amplifikation wurde nachgewiesen, dass OCI-Ly1, auf dem zweiten *PTEN*-Allel eine interne Deletion der Exone 6 – 9 aufwies (Abbildung 12C), die durch aCGH aufgrund der zu geringen Auflösung nicht detektiert werden konnte.

Um zu untersuchen, ob auch bei primären Patientenproben *PTEN*-Deletionen auftreten, wurde wiederum die quantitative genomische PCR angewendet. Bei den Biopsien der Kohorte 1 konnten bei drei von 18 GCB DLBCL (DLBCL\_028; DLBCL\_054; DLBCL\_071), einer von acht ABC DLBCL (DLBCL\_041) und drei von acht unklassifizierbaren DLBCL (DLBCL\_013; DLBCL\_042; DLBCL\_063) heterozygote *PTEN*-Deletionen detektiert werden (Abbildung 12B; Anhang: Tabelle 8). Bei vier von sieben primären DLBCL Biopsien war der heterozygote *PTEN*-Verlust mit einem Verlust der *PTEN*-Expression assoziiert.



**Abbildung 12:** Genomische *PTEN*-Kopienanzahl bei DLBCL. A) Bei GCB DLBCL Zelllinien traten heterozygote *PTEN*-Deletionen auf. Bei OCI-Ly1 wurde durch quantitative genomische PCR ein homozygoter *PTEN*-Verlust detektiert. B) Bei 34 primären DLBCL Patientenproben der Kohorte 1 wurden die genomischen *PTEN*-Kopien untersucht. Es konnten *PTEN*-Deletionen bei ABC und GCB Lymphomen detektiert werden. Die Analyse erfolgte mittels genomischer quantitativer PCR. C) PCR-Amplifikation konnte eine partielle Deletion der *PTEN*-Exone 6 - 9 bei OCI-Ly1 nachweisen (NTC – *Non-Template-Control*).

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der *PTEN*-Analysen bei DLBCL Zelllinien.

DLBCL Zelllinie	DLBCL Subtyp	<i>PTEN</i> -Mutationsstatus	<i>PTEN</i> -Kopienanzahl	<i>PTEN</i> -Inaktivierungsmuster	<i>PTEN</i> -Expression	AKT-Aktivierung
HBL-1	ABC	Wildtyp	2	keine Aberration	+	+
OCI-Ly10	ABC	Wildtyp	2	keine Aberration	+	+
TMD8	ABC	Wildtyp	2	keine Aberration	+	+
DB	GCB	Wildtyp	1	Monoallelische Inaktivierung	+	-
OCI-Ly2	GCB	Wildtyp	2	keine Aberration	+	-
OCI-Ly7	GCB	Wildtyp	2	keine Aberration	+	-
OCI-Ly19	GCB	Wildtyp	2	keine Aberration	+	-
OCI-Ly1	GCB	Δ Exon 5-9	1x Exon 1-5	Biallelische Inaktivierung	-	+
OCI-Ly4	GCB	L320*, T321FS	4	Monoallelische Inaktivierung	-	+
BJAB	GCB	Wildtyp	3	keine Aberration	-	+
HT	GCB	Wildtyp	2	keine Aberration	-	+
RL	GCB	N276S, T277A	2	Monoallelische Inaktivierung	-	-
SUDHL-10	GCB	Y68H, D162H	1	Biallelische Inaktivierung	-	+
K422	GCB	SA Exon3	1	Biallelische Inaktivierung	-	+

+ Proteinexpression bzw. Phosphorylierung im Immuno-Blot nachweisbar  
 - Proteinexpression bzw. Phosphorylierung im Immuno-Blot nicht nachweisbar  
 Δ Deletion

## 2.2 AKT-Aktivierung bei DLBCL

### 2.2.1 Konstitutive AKT-Aktivierung bei DLBCL Zelllinien

Als eine primäre funktionelle Konsequenz einer reduzierten PTEN-Expression ist die konstitutive Aktivierung der onkogenen PI3K/AKT-Signalkaskade beschrieben<sup>110</sup>. Um zu überprüfen ob der PTEN-Verlust bei DLBCL Zelllinien auch zu einer konstitutiven Aktivierung der onkogenen PI3K/AKT-Kaskade führt, wurden 14 DLBCL Zelllinien hinsichtlich ihres p-AKT mittels Immuno-Blot überprüft.

Bei allen ABC DLBCL Zelllinien wurde, wie schon in einer Vorarbeit festgestellt<sup>91</sup>, konstitutive AKT-Aktivierung trotz PTEN-Expression nachgewiesen (Abbildung 9; Tabelle 2). Somit sind bei ABC DLBCL vermutlich andere molekulare Mechanismen für die AKT-Aktivierung verantwortlich.

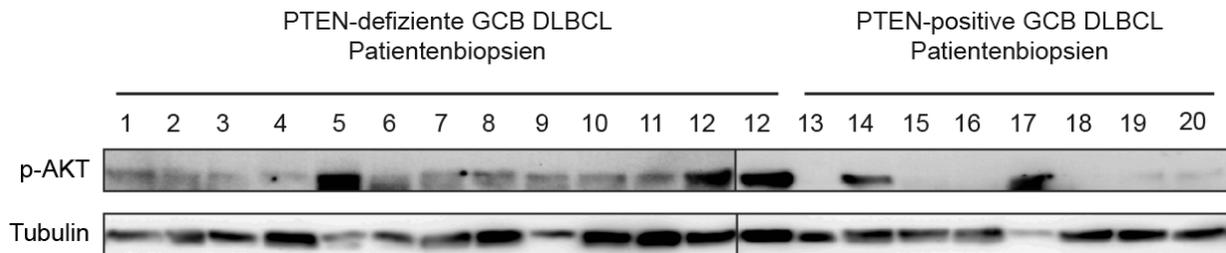
Bei GCB DLBCL Zelllinien konnte eine inverse Korrelation zwischen PTEN-Expression und Aktivierung von AKT gezeigt werden. Zelllinien ohne PTEN-Expression wiesen eine starke Phosphorylierung von AKT (BJAB, HT, K422, OCI-Ly1, OCI-Ly4, SUDHL-10) mit der Ausnahme von RL auf. Im Gegensatz dazu zeigten PTEN-positive GCB DLBCL Zelllinie keine oder allenfalls sehr schwache AKT-Aktivierung.

### 2.2.2 Konstitutive AKT-Aktivierung bei primären DLBCL Biopsien

Um zu untersuchen, ob auch bei primären Patientenproben ein PTEN-Verlust und onkogene Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges invers korreliert sind, wurde die AKT-Aktivierung bei DLBCL Biopsien ermittelt. Dazu erfolgte der Nachweis von p-AKT mittels Immuno-Blot bei acht PTEN-positiven und 12 PTEN-defizienten primären GCB DLBCL Patientenproben (Anhang, Tabelle 9).

Die Untersuchung bestätigte die Ergebnisse der Zelllinienanalyse. Bei allen PTEN-negativen Biopsien (12/12) konnte p-AKT und somit konstitutive Aktivität der PI3K/AKT-Kaskade nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war nur bei zwei von acht PTEN-positiven Proben ein Nachweis von p-AKT möglich (Abbildung 13). Die restlichen

PTEN-positiven Biopsien zeigten entweder eine sehr schwache oder keine AKT-Aktivierung. Diese Ergebnisse implizieren, dass PTEN-Verlust den primären molekularen Mechanismus der konstitutiven PI3K/AKT-Aktivierung bei GCB Lymphomen darstellt ( $P = 7,2 \times 10^{-7}$ ; zweiseitiger exakter Test nach Fisher).



**Abbildung 13:** AKT-Aktivierung bei GCB DLBCL Patientenproben. PTEN-defiziente GCB DLBCL Biopsien weisen eine starke Aktivierung von AKT auf, während bei dem überwiegenden Teil PTEN-positiver Biopsien keine oder nur sehr schwache AKT-Aktivierung detektiert wurde. Der Nachweis von aktiviertem AKT (p-AKT) bei GCB DLBCL Patientenbiopsien erfolgte mittels Immuno-Blot. Alle Biopsien waren im Vorfeld hinsichtlich ihres PTEN-Status immunhistochemisch charakterisiert worden. Biopsie 12 wurde als interne Positiv-Kontrolle auf beiden Blots genutzt. (Annotierung der Proben: Anhang, Tabelle 9).

## 2.3 Funktionelle Charakterisierung des PTEN-Verlustes

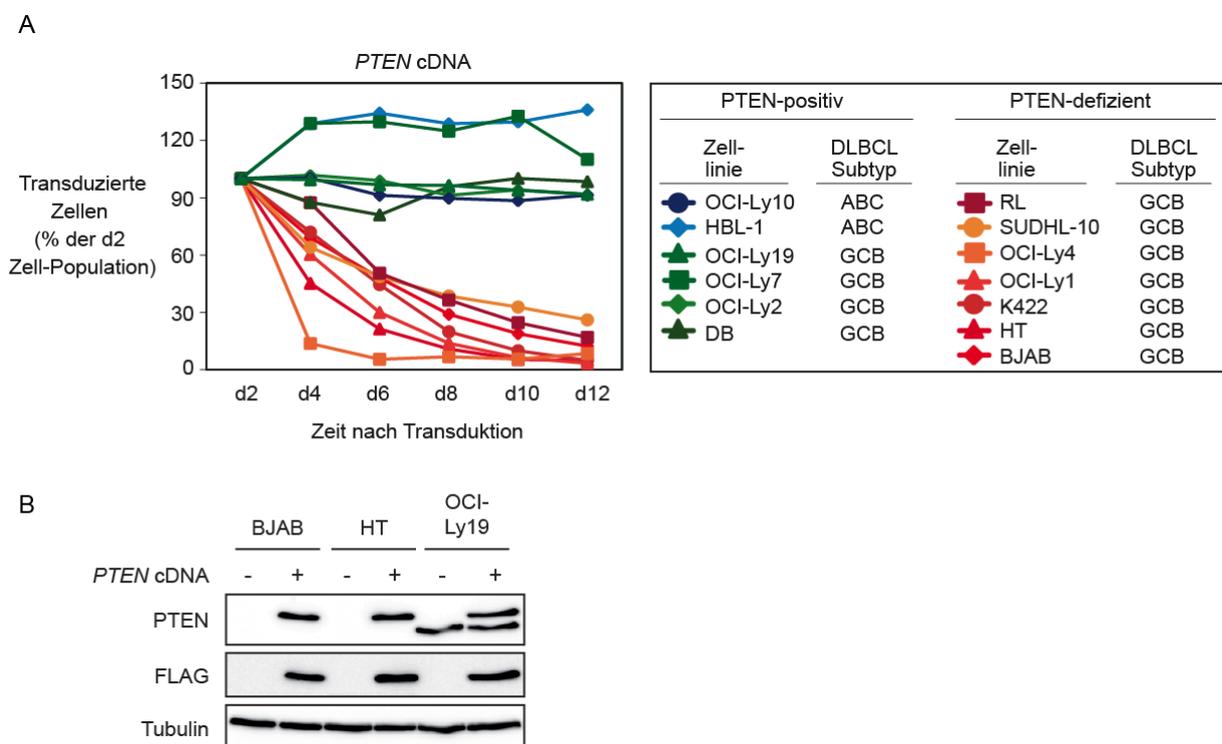
### 2.3.1 PTEN-Expression induziert Zytotoxizität

Der Verlust der PTEN-Expression und die gleichzeitige Aktivierung der PI3K/AKT-Signalkaskade konnte sowohl bei primären GCB DLBCL Patientenproben als auch bei GCB DLBCL Zelllinien-Modellen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund stellen diese Zelllinien geeignete Modellsysteme für die funktionellen Untersuchungen dar.

Um die funktionelle Bedeutung des Verlustes von PTEN zu untersuchen, wurde die *PTEN* cDNA bei PTEN-positiven und PTEN-defizienten DLBCL Zelllinien retroviral transduziert. Dazu wurde das retrovirale Expressionssystem pMSCV-IRES-GFP (Abbildung 27) genutzt. Dieses ermöglicht die parallele, konstitutive Expression zum einen der *PTEN* cDNA und zum anderen einer *GFP* cDNA (Grün-Fluoreszierendes-Protein). Durch die konstitutive Ko-Expression des GFP konnte die Proliferation der PTEN-transduzierten Zell-Populationen durchflusszytometrisch gemessen werden. Diese Messungen machten es möglich Effekte der PTEN-Expression auf die Entwicklung der

transduzierten Zell-Populationen zu bestimmen und innerhalb der verschiedenen Zelllinien miteinander zu vergleichen.

Die exogene *PTEN*-Expression induzierte Zytotoxizität selektiv bei allen *PTEN*-defizienten GCB DLBCL Zelllinien. Im Gegensatz dazu blieben sowohl ABC DLBCL als auch *PTEN*-positive GCB DLBCL Linien nach Transduktion der *PTEN* cDNA unbeeinträchtigt (Abbildung 14A). Diese Daten implizieren, dass der Verlust von *PTEN* für das Überleben *PTEN*-defizienter GCB DLBCL essentiell ist.



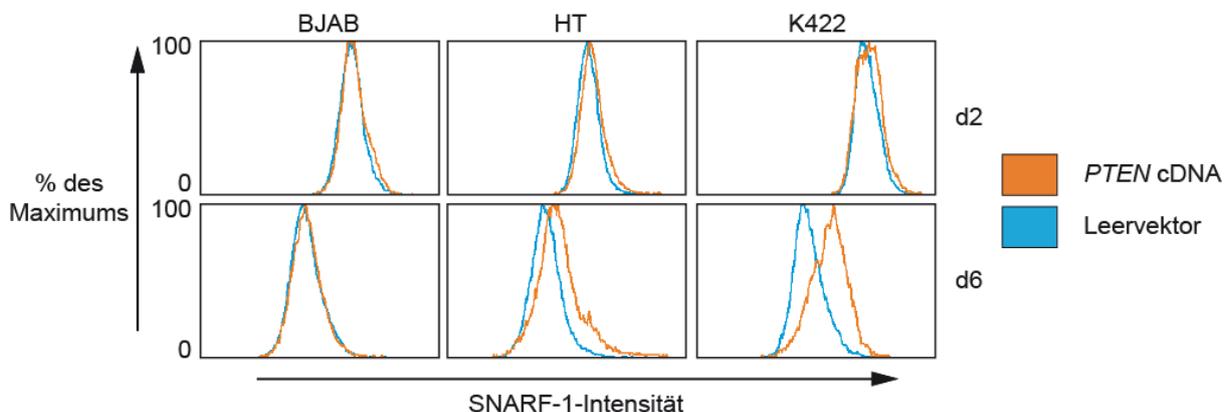
**Abbildung 14:** Exogene *PTEN*-Expression bei DLBCL Zelllinien. **A)** Transduktion eines exogenen *PTEN*-Allels induzierte selektive Toxizität bei *PTEN*-defizienten GCB DLBCL Zelllinien. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment von mindestens acht Wiederholungen. **B)** Exogenes *PTEN* wird sowohl bei *PTEN*-defizienten als auch -positiven DLBCL Zelllinien in vergleichbarer Intensität exprimiert.

Um auszuschließen, dass diese Ergebnisse nur auf unterschiedlicher Proteinexpression des exogenen *PTEN*-Allels bei einzelnen Zelllinien beruhen, wurde exogenes *PTEN* mittels Immuno-Blot bei den Zelllinien BJAB, HT und OCI-Ly19 nachgewiesen. Diese Analyse zeigte, dass exogenes *PTEN* bei DLBCL Zelllinien in vergleichbarer Intensität exprimiert wurde (Abbildung 14 B).

### 2.3.2 Untersuchung der PTEN-induzierten Zytotoxizität

Um zusätzliche Einblicke in die molekularen Mechanismen der PTEN-induzierten, Zytotoxizität bei PTEN-defizienten GCB DLBCL zu erhalten, wurden Untersuchungen zur zellulären Proliferation und zur Induktion von Apoptose durchgeführt.

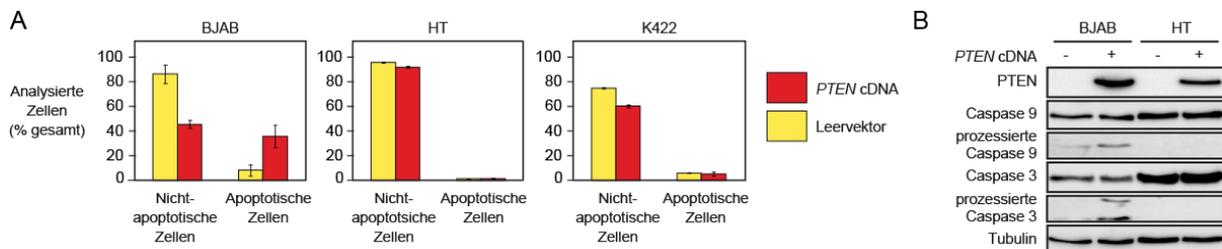
Potentielle anti-proliferative Effekte exogener PTEN-Expression wurden durch eine SNARF-1-Färbung untersucht. SNARF-1 ist ein aminoreaktiver Farbstoff der intrazelluläre Proteine irreversibel markiert und sich bei jeder Zellteilung verdünnt. Anhand der Abnahme der Farbintensität lässt sich die Proliferation von Zellpopulationen durchflusszytometrisch analysieren. Die GCB DLBCL Zelllinien BJAB, HT und K422 wurden mit SNARF-1 markiert und nachfolgend mit der *PTEN* cDNA retroviral transduziert. Im Vergleich zur Kontrollpopulation, die mit Leervektor transduziert war, verminderte sich die Proliferation bei HT ( $P = 1,6 \times 10^{-17}$ ; zweiseitiger *t*-Test) und K422 ( $P = 5,1 \times 10^{-33}$ ; zweiseitiger *t*-Test) signifikant (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu blieb die Proliferation bei der Zelllinie BJAB von PTEN-Expression unverändert ( $P = 0,52$ ; zweiseitiger *t*-Test).



**Abbildung 15:** Anti-proliferative Effekte exogener PTEN-Expression bei GCB DLBCL Zelllinien. SNARF-1-gefärbte Zellen wurden mit Leervektor oder *PTEN* cDNA transduziert. Über einen Zeitraum von sechs Tagen wurde die Intensität des SNARF-1-Farbstoffes und somit die Zellteilung bei transduzierten Zellen gemessen. Bei Leervektor-transduzierten HT ( $P = 1,6 \times 10^{-17}$ ; zweiseitiger *t*-Test) und K422 ( $P = 5,1 \times 10^{-33}$ ; zweiseitiger *t*-Test) Zellen nahm die Farbintensität signifikant stärker ab als in den entsprechend *PTEN*-transduzierten Zellen. Keinen anti-proliferativen Effekt induzierte exogenes PTEN bei BJAB Zellen ( $P = 0,52$ ; zweiseitiger *t*-Test).

Um zu überprüfen ob PTEN-Expression bei GCB DLBCL Zelllinien Apoptose induziert, wurde das Auftreten apoptotischer, Annexin V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup> Zellen innerhalb der *PTEN*-

transduzierten Population durchflusszytometrisch bestimmt. Diese Analyse zeigte, dass *PTEN*-Transduktion nur bei der Zelllinie BJAB Apoptose induzierte, während bei HT und K422 kein apoptotischer Effekt nachweisbar war (Abbildung 16A).



**Abbildung 16:** Exogenes *PTEN* induzierte Apoptose bei der GCB DLBCL Zelllinien BJAB. **A)** Durchflusszytometrischer Nachweis apoptotischer Zellen durch Annexin-V/7-AAD Färbung nach 72h Expression einer *PTEN* cDNA. Nur bei BJAB Zellen wurde eine Zunahme apoptotischer Zellen (Annexin-V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) detektiert, während bei HT und K422 keine Zunahme im Vergleich zu Leervektor-transduzierten Zellen nachweisbar war. **B)** Nachweis der Induktion von Apoptose mittels Immuno-Blot. Einem Prozessierung der Caspasen 3 und 9 als Marker der Apoptose ist nach 48h exogener *PTEN*-Expression nur bei BJAB nachweisbar.

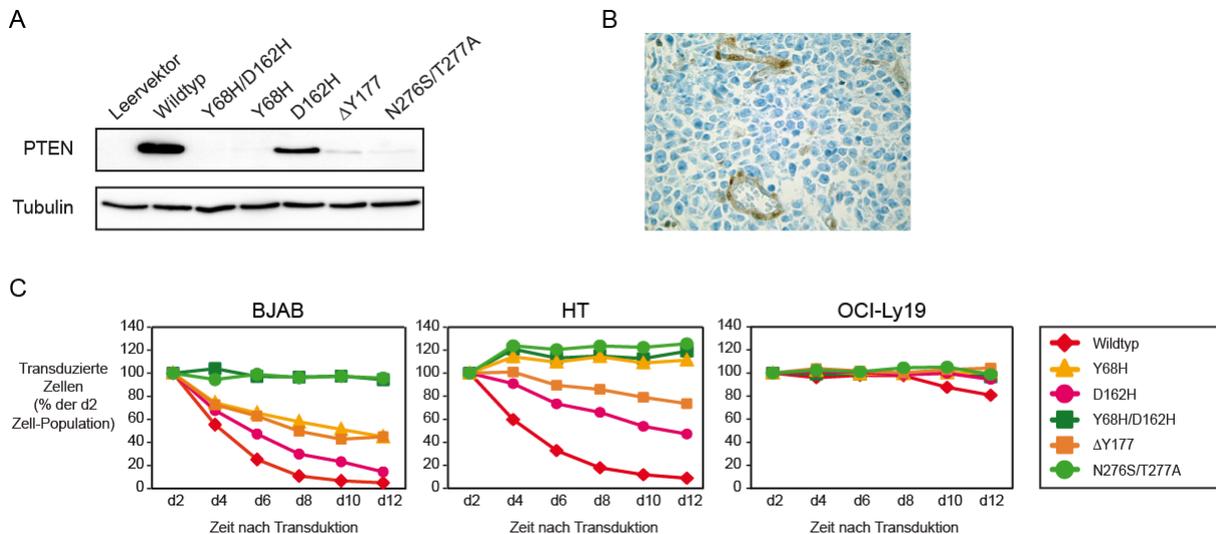
Zur Bestätigung der Apoptose-Induktion bei BJAB durch *PTEN*-Expression wurde die Spaltung der Caspasen 3 und 9, welche typische apoptotische Marker darstellen<sup>174</sup>, mittels Immuno-Blot bei den GCB DLBCL Zelllinien BJAB und HT überprüft. Die retrovirale Transduktion der *PTEN* cDNA führte nur bei BJAB Zellen zu einer verstärkten Prozessierung der Caspasen 3 bzw. 9 (Abbildung 16B).

Zusammengefasst suggerieren diese Resultate, dass exogene *PTEN*-Expression bei *PTEN*-defizienten GCB DLBCL zur Induktion von Apoptose und zur Inhibition der Proliferation führte. Diese Effekte können für die *PTEN*-induzierte Zytotoxizität funktionell ursächlich sein.

### 2.3.3 Funktionelle Charakterisierung der DLBCL *PTEN*-Mutanten

Die exogene Expression von *PTEN* induzierte Zytotoxizität selektiv bei *PTEN*-defizienten GCB DLBCL Zelllinien. Ein Teil der Zelllinien wies *PTEN*-Mutationen auf. Um zu untersuchen, ob diese mutierten *PTEN*-Proteine noch funktionell sind, wurden dementsprechend mutierte *PTEN* cDNAs (Y68H, D162H, Y68H/D162H, ΔY177,

N276S/T277A) durch gerichtete Mutagenese im pMSCV-Expressionssystem erzeugt und bei drei GCB DLBCL Zelllinien (BJAB, HT und OCI-Ly19) exprimiert.



**Abbildung 17:** Stabilitäts- und Funktionsverlust der *PTEN*-Mutanten. **A)** Nachweis der exogenen *PTEN*-Mutanten-Expression bei HT 48h nach Transduktion. Verglichen zur Expression von WT *PTEN* war nur die D162H *PTEN*-Variante mittels Immuno-Blot detektierbar. **B)** Immunhistochemische Färbung der *PTEN*-negativen GCB DLBCL Biopsie DLBCL\_028, welche eine interne Deletion von *PTEN* aufwies (ΔY177). **C).** Exogene Expression der DLBCL *PTEN*-Mutanten bei BJAB und HT zeigte eine deutliche Abschwächung der *PTEN*-induzierten Zytotoxizität. Nur *PTEN* D162H induzierte weiterhin Zytotoxizität. Bei der *PTEN*-positiven GCB DLBCL Zelllinie OCI-Ly19 wurde weder durch WT *PTEN* noch durch *PTEN*-Mutanten Toxizität hervorgerufen.

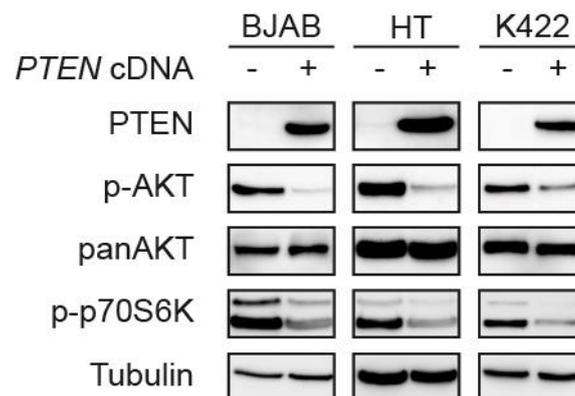
Die Analyse der Proteinexpression der verschiedenen exogen exprimierten *PTEN*-Mutanten nach retroviraler Transduktion bei der GCB DLBCL Zelllinie HT offenbarte, dass im Vergleich zum WT nur die D162H *PTEN*-Mutante stabil exprimiert wurde (Abbildung 17A). Im Gegensatz dazu konnten die restlichen Mutanten mittels Immuno-Blot nicht detektiert werden. Zudem konnte bei der GCB DLBCL Biopsie DLBCL\_028, bei welcher eine 3bp-Deletion (ΔY177) identifiziert wurde, immunhistochemisch keine *PTEN*-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 17B). Diese Ergebnisse suggerierten einen Verlust der Proteinstabilität durch *PTEN*-Mutationen und deuteten so einen Verlust der *PTEN*-Funktionalität an.

Neben der Überprüfung der Proteinexpression exogener *PTEN*-Mutanten erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der retroviral transduzierten Zellpopulationen. Diese Analyse bestätigte, dass nur die Expression der *PTEN* D162H cDNA bei BJAB und HT Zellen Zytotoxizität induzierte und somit im Vergleich zu WT *PTEN* Funktionalität aufweist (Abbildung 17C). Alle anderen *PTEN*-Mutanten induzierten keine oder allenfalls

eine signifikant abgeschwächte Zytotoxizität. Diese Ergebnisse deuteten einen Verlust der PTEN-Funktion durch die Mehrzahl der identifizierten Mutationen an.

### 2.3.4 *In vitro* PTEN-Expression inhibiert den AKT/mTOR-Signalweg

Um die molekularen Konsequenzen exogener *PTEN*-Expression auf Proteinebene zu analysieren, wurde die *PTEN* cDNA bei den GCB DLBCL Zelllinien BJAB, HT und K422 retroviral transduziert und die AKT-Aktivität mittels Immuno-Blot untersucht. Wie zu erwarten war, konnte eine starke Abnahme der Aktivität des PI3K-Haupteffektors AKT infolge der *PTEN*-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 18).

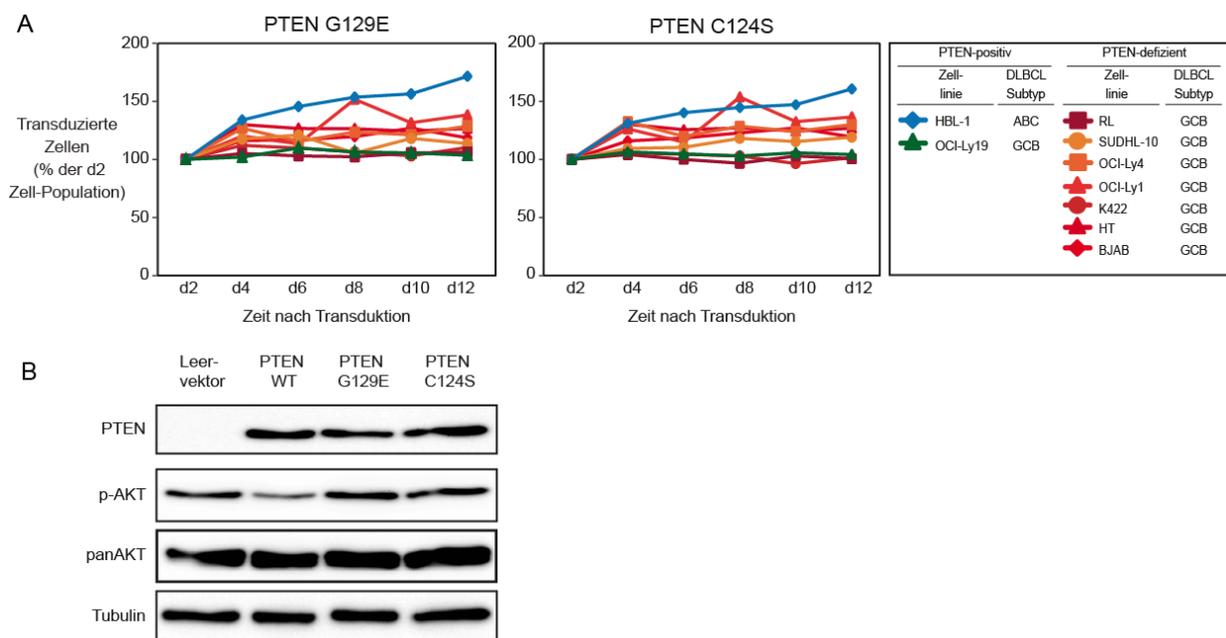


**Abbildung 18:** PTEN-Expression verminderte die AKT-Aktivierung bei GCB DLBCL. Die *PTEN* cDNA wurde bei den PTEN-defizienten GCB DLBCL Zelllinien HT, BJAB und K422 retroviral transduziert und exprimiert. Mittels Immuno-Blot der Proteinlysate konnte ein deutlicher Rückgang der Phosphorylierung von AKT an S473 (p-AKT) nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde ein Rückgang von aktiviertem p70S6K detektiert. Die Phosphorylierung von p70S6K an T389 (p-p70S6K) wird durch mTORc1 katalysiert. Ein Verlust der mTORc1-Aktivität führt zum Verlust der Phosphorylierung und zur Inaktivität dieser Kinase. Die Aktivität von mTORc1 wird durch AKT moduliert. Somit kann Inaktivierung von AKT durch *PTEN*-Expression direkten Einfluss auf die mTORc1-Aktivität haben.

Zusätzlich konnte die Abnahme der Aktivität von p70S6K gezeigt werden. p70S6K gilt als klassisches mTORc1-Zielprotein und wird unter anderem durch mTORc1-vermittelte Phosphorylierung aktiviert<sup>156</sup>. Die Expression von *PTEN* führte zu einem Rückgang der p70S6K-Phosphorylierung und somit zu einer Hemmung der Aktivität<sup>175</sup>. Dieser Rückgang der p70S6K-Aktivität deutete auf eine Inaktivierung von mTORc1 durch *PTEN*-Expression und Inaktivierung der AKT-Kaskade hin<sup>155,156</sup>.

### 2.3.5 Zytotoxizität durch Hemmung von AKT

Um zu untersuchen ob bei PTEN-defizienten GCB DLBCL PTEN-induzierte Zytotoxizität aufgrund der Hemmung des konstitutiv-aktiven PI3K/AKT-Signalweges hervorgerufen wurde, sollten die Effekte einer exogenen Expression bereits publizierter, Phosphatase-defizienter *PTEN*-Mutanten (C124S, G129E)<sup>104,176</sup> analysiert werden. Beide Mutationen waren im aktiven Zentrum der Phosphatase-Domäne lokalisiert und verhinderten die Hydrolyse des *second messengers* PIP3 durch PTEN<sup>176</sup>. Somit konnte keine Regulation des PI3K/AKT-Signalweges durch diese PTEN-Mutanten erfolgen.

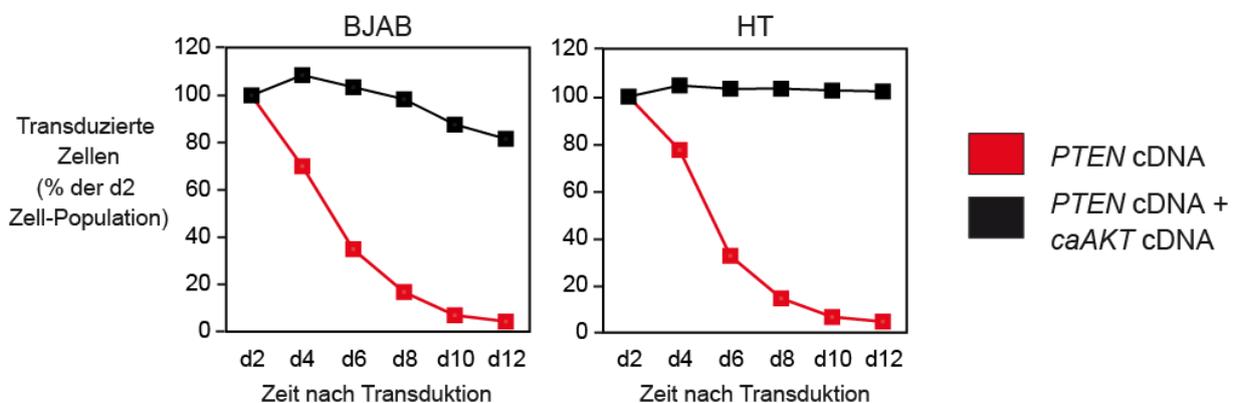


**Abbildung 19:** Phosphatase-defiziente *PTEN*-Mutanten induzierten keine Zytotoxizität. **A)** Retrovirale Expression der *PTEN*-Mutanten G129E und C124S hatte keinen zytotoxischen Effekt bei DLBCL Zelllinien. **B)** Exogene Expression der Phosphatase-defizienten *PTEN*-Mutanten führte zu keiner Verringerung der AKT-Aktivierung (p-AKT) im Vergleich zu WT *PTEN*-Expression bei der GCB DLBCL Zelllinie HT. Die cDNA von WT *PTEN* sowie die der C124S und G129E *PTEN*-Mutanten wurden bei HT retroviral transduziert und die Proteinlysate mittels Immunoblot analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der verschiedenen *PTEN*-Varianten vergleichbar war.

Die retrovirale Transduktion der Phosphatase-defizienten PTEN cDNAs erfolgte bei neun DLBCL Zelllinien (BJAB, HBL-1, HT, K422, OCI-Ly1, OCI-Ly4, OCI-Ly19, RL, SUDHL-10). Tatsächlich rief die Transduktion der *PTEN*-Mutanten C124S und G129E bei DLBCL Zelllinien keine Zytotoxizität hervor (Abbildung 19A). Um auszuschließen, dass Unterschiede in der Proteinexpression ursächlich für diesen Phänotyp waren, wurde mittels Immuno-Blot die Expression der PTEN-Mutanten bei der GCB DLBCL Zelllinie HT überprüft. Die Expression von PTEN C124S sowie G129E war vergleichbar mit der Expression von WT PTEN (Abbildung 19B). Außerdem wurde mittels Immuno-Blot die Aktivität von AKT untersucht. Diese Analyse zeigte, dass nur die exogene Expression von WT PTEN zu einem Rückgang der S473 Phosphorylierung von AKT und somit zu dessen Inaktivierung führte (Abbildung 19B).

Die Daten suggerierten, dass PTEN-induzierte Zytotoxizität bei GCB DLBCL funktionell durch eine Hemmung PI3K/AKT-Signalkaskade hervorgerufen wurde.

Die bisherigen Untersuchungen implizierten, dass AKT eine zentrale Rolle beim Überleben der PTEN-defizienten GCB DLBCL spielte. Um die Bedeutung von AKT bei der PTEN-induzierten Zytotoxizität zu bestätigen, wurde ein Ko-Expressions-experiment durchgeführt. Dazu erfolgte die retrovirale Transduktion der cDNA eines konstitutiv-aktiven *AKT* (*caAKT*)-Allels<sup>177,178</sup> bei den GCB DLBCL Zelllinien BJAB und HT. Dieses *caAKT* war N-terminal durch ein Myristoylierungssignal erweitert, wodurch es zu ekto-pischer, konstitutiver Membranlokalisierung und somit zu einer PI3K- und PIP3-unabhängigen Phosphorylierung und Aktivierung von *caAKT* kam<sup>177</sup>.



**Abbildung 20:** Konstitutiv-aktives *AKT* (*caAKT*) reduzierte die PTEN-induzierte Zytotoxizität bei GCB DLBCL Zelllinien. Die retrovirale Transduktion von *PTEN* induzierte erwartungsgemäß Zytotoxizität bei den GCB DLBCL Zelllinien BJAB und HT. Im Vergleich zu alleiniger *PTEN*-Expression kompensierte die gleichzeitige *caAKT* cDNA-Expression den PTEN-induzierten zytotoxischen Effekt nahezu komplett.

Gleichzeitig wurde die *PTEN* cDNA bei den GCB DLBCL Zelllinien BJAB und HT retroviral transduziert. Die Entwicklung der transduzierten Populationen wurde durchflusszytometrisch gemessen. Alleinige Expression von PTEN induzierte starke Zytotoxizität in beiden GCB DLBCL Zelllinien. Im Gegensatz dazu führte die gleichzeitige Expression von caAKT und PTEN zu keiner Induktion von Zytotoxizität (Abbildung 20).

Die nahezu komplette Reduktion PTEN-induzierter Zytotoxizität durch Ko-Expression von caAKT bei beiden untersuchten GCB DLBCL Zelllinien legte nahe, dass die PTEN-induzierte Zytotoxizität durch die Hemmung von AKT hervorgerufen wurde.

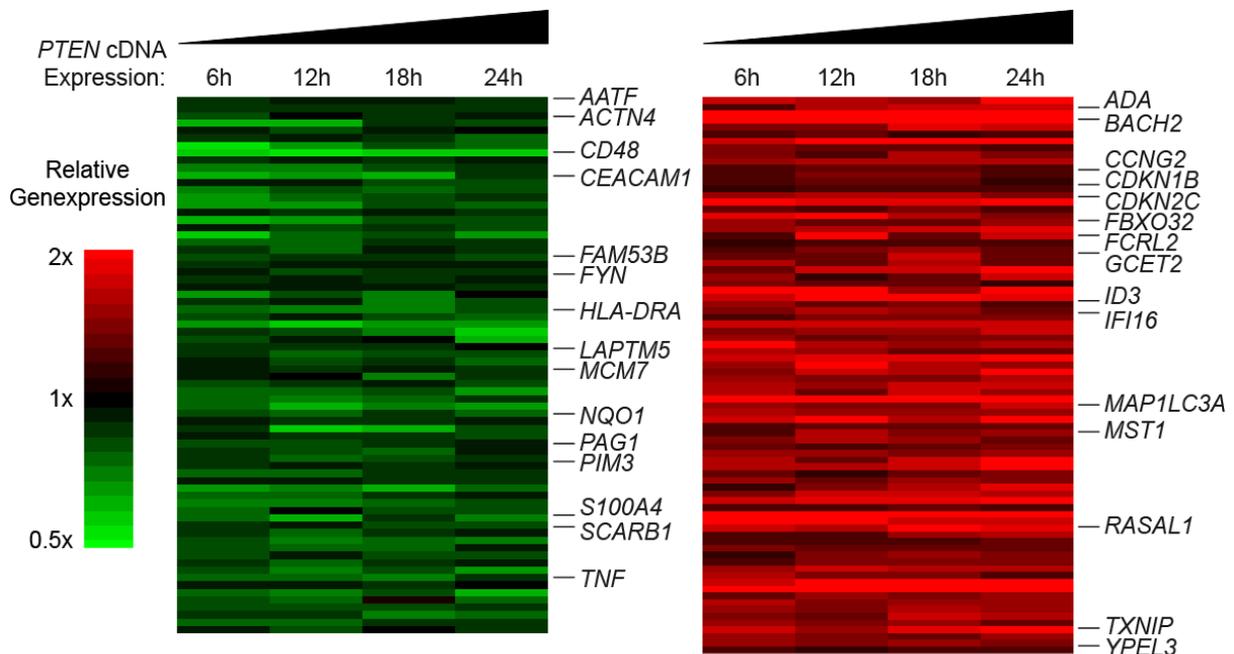
## 2.4 Der PI3K/AKT-Signalweg reguliert die MYC-Expression

Um neue Erkenntnisse zu den durch PTEN regulierten molekularen Mechanismen zu gewinnen, wurde bei der GCB DLBCL Zelllinie HT eine genomweite Genexpressionsanalyse nach PTEN-Expression durchgeführt. Dazu wurden die Veränderungen der Genexpression an vier verschiedenen Zeitpunkten nach PTEN-Expression bestimmt (6h, 12h, 18h, 24h) und mit der Genexpression von Leervektor-transduzierten Zellen verglichen.

### 2.4.1 Effekte von PTEN auf die Genexpression bei GCB DLBCL

Insgesamt wurde eine größere Anzahl von Genen durch PTEN-Expression hochreguliert (546 Gene,  $P = 0,01$ ; gepaarter *t*-Test) als herunterreguliert (279 Gene,  $P = 0,01$ ; gepaarter *t*-Test). Für die biologische Interpretation der Veränderungen der Genexpression wurden jedoch stringenter Grenzwerte angewendet und eine durch PTEN regulierte Genexpressionssignatur aus 72 zu allen vier Messzeitpunkten signifikant herunterregulierten Genen ( $P = 0,00025$ ; gepaarter *t*-Test) sowie 82 signifikant hochregulierten Genen ( $P = 0,00025$ ; gepaarter *t*-Test) definiert (Abbildung 21; Anhang: Tabelle 10). PTEN-Expression führte zur Deregulation zahlreicher Gene, die bei unterschiedlichen zellulären Prozessen wie der Regulation des Zellzyklus (*CCNG2*,

*CDKN1B* und *CDKN2C*) oder der Zellproliferation (*ACTN4*, *RASAL1* und *FBXO32*) sowie der B- und T-Zell-Rezeptor-Signalkaskade (*FYN*, *PAG1* und *ADA*) eine zentrale Rolle spielen.



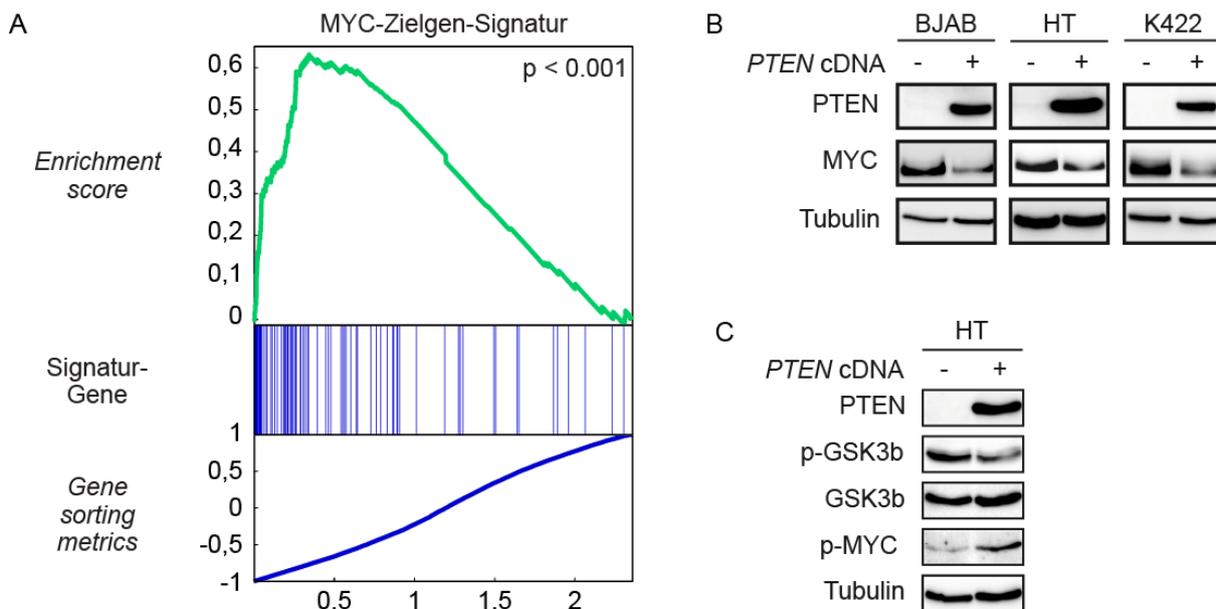
**Abbildung 21:** PTEN-Expression veränderte das Genexpressionsprofil der GCB DLBCL Zelllinie HT. Veränderungen der Genexpression wurden an 4 Zeitpunkten im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle gemessen. Hochsignifikant wurden nach PTEN-Expression 72 Gene herunter- und 82 Gene hochreguliert ( $P = 0,00025$ ).

Um ein besseres Verständnis der biologischen Veränderungen zu erreichen wurde eine sogenannte *Gene Set Enrichment-Analyse* (GSEA) durchgeführt und identifizierte, deregulierte Gene genomweit mit einer Sammlung bereits definierter Gensignaturen verglichen<sup>179,180</sup>. Interessanterweise war die am stärksten herunterregulierte Signatur eine Zielgen-Signatur des Transkriptionsfaktors MYC (Abbildung 22A,  $P \leq 0,001$ ; FDR = 0,001). Zusätzlich war eine weitere, unabhängige MYC-Zielgen-Signatur mit herunterregulierten Genen der PTEN-Signatur angereichert (Anhang Tabelle 11;  $P \leq 0,002$ ; FDR = 0,008). Diese Ergebnisse implizierten, dass die Expression von MYC durch PTEN-Expression herunterreguliert wurde.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde ein Immuno-Blot durchgeführt und es zeigte sich ein deutlicher Rückgang der MYC-Expression nach retroviraler *PTEN*-Transduktion bei den GCB DLBCL Zelllinien BJAB, HT und K422 (Abbildung 22B). Der Rückgang der MYC-Expression nach Inaktivierung von AKT durch exogenes PTEN war am

ehesten auf die Interaktion von AKT mit der Kinase GSK3 $\beta$  zurück zu führen (siehe Abschnitt 1.6.2). Aktives AKT phosphoryliert und inhibiert GSK3 $\beta$ <sup>145</sup>. Durch die Inaktivierung von AKT kommt es zum Rückgang der Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  und dadurch zu einer gesteigerten Kinase-Aktivität. Aktives GSK3 $\beta$  (p-GSK3 $\beta$ ) phosphoryliert MYC an Position T58, was dessen proteolytische Degradation durch das Proteasom einleitet<sup>181</sup>.

Dementsprechend konnte ein Rückgang von p-GSK3 $\beta$  und eine Zunahme von T58-phosphoryliertem MYC bei der Zelllinie HT nach Transduktion der *PTEN* cDNA mittels Immuno-Blot detektiert werden, was auf eine gesteigerte proteasomale Degradation von MYC hinwies (Abbildung 22C).

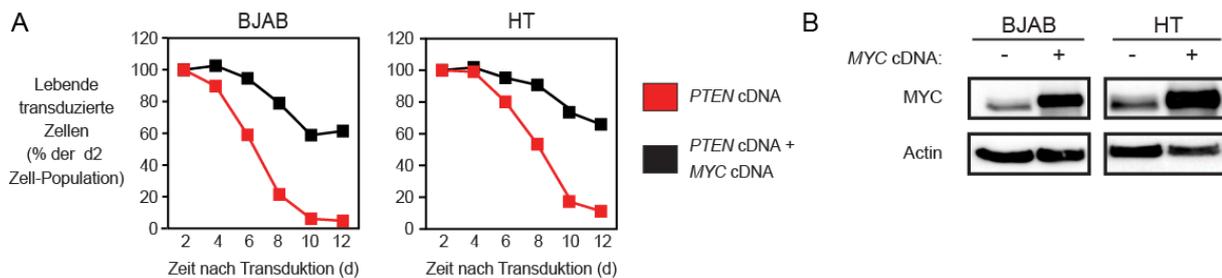


**Abbildung 22:** PTEN-Expression deregulierte die Expression des Transkriptionsfaktors MYC. **A)** Die GSEA (*Gene Set Enrichment-Analyse*) verdeutlichte, dass das Genexpressionsprofil der Zelllinie HT nach exogener *PTEN*-Expression mit herunterregulierten MYC-Zielgenen angereichert war (FDR=0,008). **B)** Der Rückgang der MYC-Expression infolge von *PTEN*-Expression war auf Proteinebene nach 48h mittels Immuno-Blot detektierbar. **C)** Die Herunterregulation von MYC erfolgte bei HT durch Aktivierung der Kinase GSK3 $\beta$ , die MYC phosphorylierte (T58) und somit destabilisierte. Der Rückgang der inaktivierenden GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung und die Zunahme der MYC-Phosphorylierung infolge der *PTEN*-Expression wurden mittels Immuno-Blot nachgewiesen.

## 2.4.2 Herunterregulation von MYC trägt zu PTEN-induzierter Zytotoxizität bei

Um zu überprüfen welchen Anteil die Deregulation von MYC an der *PTEN*-induzierten Zytotoxizität bei GCB DLBCL Zelllinien hatte, wurden parallel eine *MYC* und eine

*PTEN* cDNA bei den GCB DLBCL Zelllinien BJAB und HT retroviral transduziert (Abbildung 23B). Die Ko-Expression von *MYC* kompensierte die *PTEN*-induzierte Toxizität deutlich (Abbildung 23A). Diese Resultate deuteten darauf hin, dass die Herunterregulation von *MYC* einen entscheidenden Anteil an der *PTEN*-induzierten Zytotoxizität bei *PTEN*-defizienten GCB DLBCL hatte.



**Abbildung 23:** *MYC* kompensiert die *PTEN*-induzierte Zytotoxizität. **A)** Die Ko-Expression einer *PTEN* und einer *MYC* cDNA reduzierte die *PTEN*-induzierte Zytotoxizität bei den *PTEN*-defizienten GCB DLBCL Zelllinien BJAB und HT. Alleinige *PTEN* cDNA-Expression induzierte starke Zytotoxizität. **B)** Die Expression der exogenen *MYC* cDNA wurde mittels Immuno-Blot bei den Zelllinien BJAB und HT nachgewiesen.

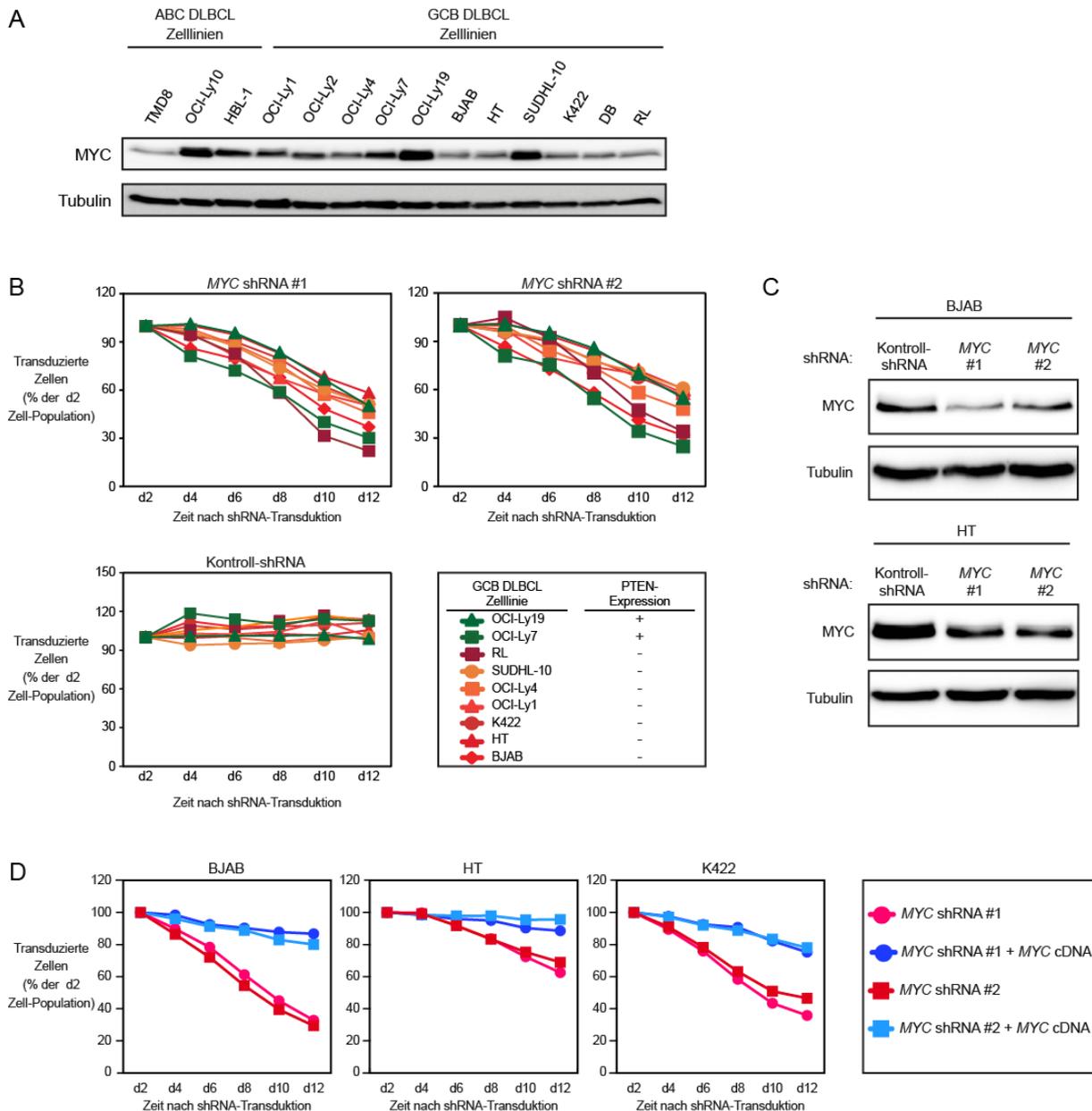
### 2.4.3 *MYC* ist essentiell für das Überleben von GCB DLBCL Zelllinien

Um zu bestätigen, dass DLBCL von der Funktion des Transkriptionsfaktors *MYC* abhängig waren, wurde die Expression von *MYC* innerhalb der Gruppe von 14 DLBCL Zelllinien mittels Immuno-Blot untersucht.

Bei allen DLBCL Zelllinien konnte unabhängig von deren molekularem DLBCL Subtyp und des *PTEN*-Status eine vergleichbare Expression des Transkriptionsfaktors *MYC* nachgewiesen werden (Abbildung 24A). Um die funktionelle Bedeutung von *MYC* bei *PTEN*-defizienten GCB DLBCL Zelllinien zu analysieren, wurde *MYC* durch zwei unabhängige *small hairpin* RNAs (*shRNAs*) *via* RNA-Interferenz herunterreguliert. Als Kontrollen wurden *PTEN*-positive GCB DLBCL Zelllinien mitgeführt. Mittels Immuno-Blot konnte der Rückgang von *MYC* nach *shRNA*-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 24C).

*MYC*-Herunterregulation durch *shRNAs* induzierte bei allen untersuchten GCB DLBCL Modellen Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu führte die Expression einer bereits publi-

zierten Kontroll-shRNA gegen *MSMO1* (*methylsterol monooxygenase 1*) zu keiner Induktion von Toxizität (Abbildung 24 B)<sup>63,69,71</sup>. Die Induktion der Zytotoxizität war unabhängig vom PTEN-Status der einzelnen Zelllinien.

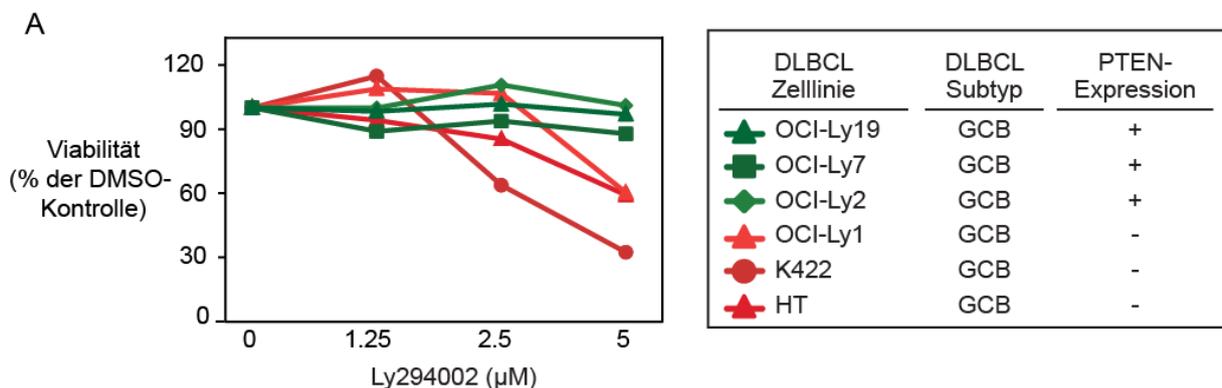


**Abbildung 24:** GCB DLBCL Zelllinien waren abhängig von MYC. **A)** Alle untersuchten DLBCL Zelllinien exprimierten vergleichbare Mengen an MYC, hier nachgewiesen mittels Immuno-Blot. **B)** Die Herunterregulation der *MYC*-Genexpression durch spezifische shRNAs induzierte Zytotoxizität bei GCB DLBCL Zelllinien, unabhängig von deren PTEN-Status. Im Gegensatz dazu induzierte die Expression einer Kontroll-shRNA keine Toxizität. **C)** Beide *MYC* shRNAs führten bei BJAB und HT im Vergleich zur Kontroll-shRNA nach 96h zu deutlich reduzierter *MYC*-Expression, nachgewiesen mittels Immuno-Blot. **D)** Die gleichzeitige Expression einer *MYC* shRNA und einer *MYC* cDNA bei den GCB DLBCL Zelllinien BJAB, HT und K422 reduzierte die shRNA-induzierte Zytotoxizität nahezu komplett.

Um die Spezifität der verwendeten *MYC* shRNAs zu bestätigen, wurde parallel zu den einzelnen shRNAs eine exogene *MYC* cDNA exprimiert. Da beide *MYC* shRNAs gegen die 3'UTR des endogenen *MYC*-Transkriptes gerichtet waren, blieb die Expression der exogenen *MYC* cDNA von der RNA-Interferenz unbeeinflusst. Die exogene *MYC*-Expression reduzierte die durch *MYC*-Deregulation hervorgerufene Zytotoxizität (Abbildung 24D). Diese Ergebnisse implizierten, dass die beobachtete shRNA-vermittelte Toxizität spezifisch durch das Ausschalten der endogenen *MYC*-Expression hervorgerufen wurde.

## 2.5 PI3K als molekulare Zielstruktur bei PTEN-defizienten GCB DLBCL Linien

Abschließend wurde die Frage gestellt, ob der PI3K/AKT-Signalweg als therapierrelevante Zielstruktur bei DLBCL nutzbar war. Dazu wurden sowohl PTEN-defiziente (HT, K422, OCI-Ly1) als auch PTEN-positive GCB DLBCL Zelllinien (OCI-Ly2, OCI-Ly7, OCI-Ly19) mit dem pan-PI3K-Inhibitor Ly294002 behandelt und nach vier Tagen Inkubation die Viabilität der behandelten Zellen gemessen.



**Abbildung 25:** PI3K-Inhibition bei GCB DLBCL Zelllinien. **A)** Die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen des pan-PI3K-Inhibitors Ly294002 reduzierte die Viabilität PTEN-defizienter GCB DLBCL Zelllinien im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Viabilität PTEN-positiver Zelllinien blieb durch Behandlung mit Ly294002 unbeeinflusst.

Nach Inhibition von PI3K reduzierte sich die Viabilität nur bei PTEN-defizienten GCB DLBCL Zelllinien. Im Gegensatz dazu blieb die Viabilität PTEN-positiver GCB DLBCL

Linien durch eine Ly294002 Behandlung unbeeinflusst (Abbildung 25). Im Konsens mit diesen und vorangegangenen Beobachtungen konnte ein Rückgang der MYC-Expression nach PI3K-Inhibition mittels Immuno-Blot gezeigt werden (Anhang: Abbildung 30). Diese Ergebnisse legten nahe, dass PI3K-Inhibition ein vielversprechender therapeutischer Ansatz bei PTEN-defizienten GCB DLBCL Patienten darstellen könnte.

### 3 DISKUSSION

#### 3.1 Molekularbiologische Untersuchungen der PTEN-Expression bei DLBCL

Die funktionellen Untersuchungen der molekularen Konsequenzen des Verlustes des Tumorsuppressors *PTEN* erfolgten in dieser Arbeit überwiegend anhand von *in vitro* Zelllinien-Modellen. Diese Zelllinien wurden aus Biopsien von humanen DLBCL Patienten isoliert und unterschiedliche Untersuchungen zeigten, dass diese Linien sehr ähnliche Genexpressions- sowie Mutationsprofile wie primäre DLBCL Patientenproben aufweisen<sup>58,65,66,69</sup>. Diese Daten legen nahe, dass Erkenntnisse die an diesen Linien gewonnen werden, die *in vivo* Situation von primären Patientenproben widerspiegeln können. Trotzdem fehlen *in vitro* Zelllinien wichtige physiologische Eigenschaften der DLBCL, wie die Interaktionen mit der extrazellulären Matrix oder dem Immunsystem. Deshalb ist es kritisch *in vitro* Beobachtungen *in vivo* zu validieren.

In dieser Arbeit erfolgte die Validierung *in vivo* anhand primärer Patientenbiopsien. Durch die Untersuchung der Expression von PTEN sowie den funktionellen Analysen ließen sich zwei interessante Phänomene feststellen:

1. PTEN-Verlust trat überwiegend bei GCB DLBCL auf
2. PTEN-Verlust korrelierte invers mit einer konstitutiven Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges bei GCB DLBCL

Beide Erkenntnisse sind von zentraler Bedeutung für das Verständnis der molekularen Pathogenese von DLBCL. Da diese Ergebnisse auch bei den DLBCL Zelllinien bestätigt werden konnten, stellten diese adäquate Modellsysteme für funktionelle Untersuchungen dar.

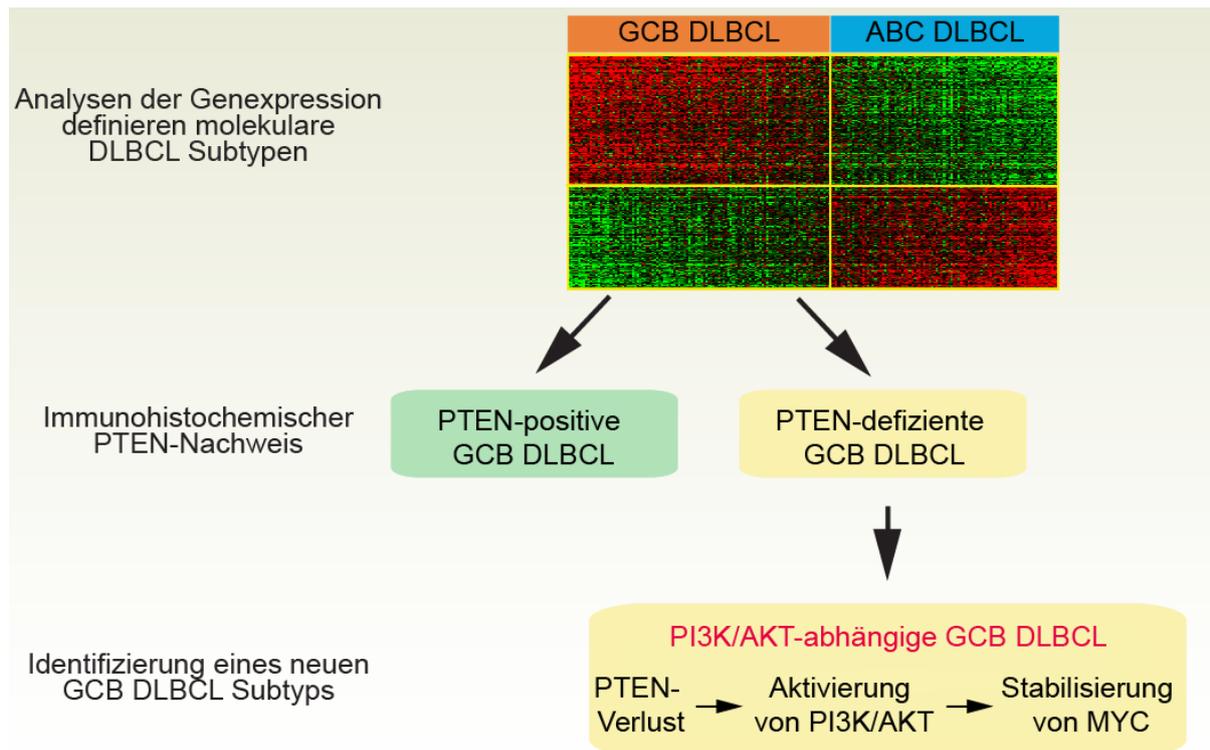
### 3.2 Definition eines neuen GCB DLBCL Subtyp

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand zweier unabhängiger Patienten-Kohorten gezeigt werden, dass der Tumorsuppressor PTEN differentiell bei DLBCL Subtypen exprimiert war (Abbildung 8).

Bei der molekularen Pathogenese der ABC DLBCL (bzw. Nicht-GCB DLBCL) scheint der Verlust von PTEN nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. So wurde bei ABC DLBCL Patientenmaterial nur bei 12% der Biopsien ein Verlust der PTEN-Expression nachgewiesen (bzw. 14% bei nicht-GCB DLBCL; siehe 2.1.2). Interessanterweise konnte bei ABC DLBCL Zelllinien eine konstitutive Aktivierung der PI3K/AKT-Signalkaskade trotz PTEN-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 9). Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate von *Kloo et al.*<sup>91</sup>. Entsprechend unterscheiden sich die molekularen Ursachen der konstitutiven Aktivierung der PI3K-Signalkaskade bei ABC und GCB DLBCL. So scheint bei einem Teil der ABC DLBCL Fälle eine konstitutive PI3K/AKT-Aktivität durch chronische BCR-Aktivierung<sup>69</sup> infolge von *CD79B*-Mutationen hervorgerufen zu werden<sup>91</sup>.

55% der GCB DLBCL wiesen einen kompletten PTEN-Verlust auf (Abbildung 8). Diese Lymphome zeigten eine konstitutive Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges. Im Gegensatz dazu war konstitutiv-aktives AKT nur sehr selten bei PTEN-positiven GCB DLBCL nachweisbar (Abbildung 9, Abbildung 13). Diese Daten suggerieren, dass Verlust von PTEN der prädominante molekulare Mechanismus einer konstitutiven AKT-Aktivierung bei GCB DLBCL darstellt. Die funktionellen Daten dieser Arbeit weisen daraufhin, dass das Überleben PTEN-negativer GCB DLBCL von der Aktivität der PI3K/AKT-Kaskade abhängig ist. Re-Expression von PTEN induzierte Zytotoxizität und führte zur Inaktivierung von AKT bei PTEN-negativen GCB DLBCL (Abbildung 14). Im Gegensatz dazu führte die Expression von Phosphatase-defizienten PTEN-Mutanten zu keiner Toxizität und auch nicht zu einer Inaktivierung von AKT (Abbildung 19). Diese funktionellen Erkenntnisse wurden zusätzlich durch das pharmakologische Ausschalten der PI3K-Signalkaskade mittels spezifischer Inhibition bestätigt. PI3K-Inhibition verringerte die zelluläre Viabilität bei PTEN-negativen GCB Lymphomen und verdeutlichte so deren Abhängigkeit von konstitutiver PI3K/AKT-Aktivität (Abbildung 25).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse daraufhin, dass PTEN-defiziente GCB DLBCL von konstitutiv-aktiven PI3K/AKT-Signalen abhängig sind. Insofern spielt der PTEN-Verlust aller Wahrscheinlichkeit nach eine zentrale Rolle bei der molekularen Pathogenese. Aus diesem Grund definiert der PTEN-Verlust einen neuen PI3K-abhängigen GCB DLBCL Subtyp (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Definition eines neuen GCB DLBCL Subtyps. Anhand von Genexpressionsanalysen lassen sich DLBCL Patientenproben in zwei vorherrschende molekulare Subtypen einteilen, ABC und GCB DLBCL, deren Genexpressionsprofile sich signifikant voneinander unterscheiden. GCB DLBCL lassen sich weiterhin je nach Expression in zwei große Gruppen unterteilen, PTEN-positive und PTEN-negative GCB DLBCL. PTEN-negative GCB DLBCL weisen eine Abhängigkeit von konstitutiver PI3K/AKT-Aktivierung und daraus resultierend von einer erhöhten MYC-Expression auf. Dahingehend wurden die PTEN-defizienten, PI3K/AKT-abhängigen GCB DLBCL definiert (Abbildung modifiziert nach Pfeifer und Lenz, 2013)<sup>54</sup>.

### 3.3 Molekulare Ursachen der PTEN-Defizienz bei GCB DLBCL

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zwei molekulare Mechanismen identifiziert werden, die zum Verlust der PTEN-Expression beitragen. Einerseits können chromosomale Deletionen und andererseits somatische Mutationen zur Inaktivierung von *PTEN* und zum Verlust der PTEN-Expression bei GCB DLBCL führen. Durch aCGH-

Analysen sowie genomische PCR wurden heterozygote *PTEN*-Verluste bei den GCB DLBCL Zelllinien DB, K422, OCI-Ly1 und SUDHL-10 detektiert (Abbildung 11; Abbildung 12). Bei der Zelllinie OCI-Ly1 konnte zudem eine partielle Deletion des zweiten *PTEN*-Allels identifiziert werden. Der Prozentsatz chromosomaler *PTEN*-Deletionen bei den in dieser Arbeit untersuchten GCB DLBCL Patientenproben spiegelte mit 16% (3/18) die Resultate einer früheren Studie bei GCB DLBCL (ca. 15% *PTEN*-Verluste) wider<sup>48</sup>.

Zusätzlich zu chromosomalen Aberrationen wurden bei den GCB DLBCL Zelllinien K422, OCI-Ly4, SUDHL-10 und RL *PTEN*-Mutationen detektiert (Abbildung 10; Anhang: Abbildung 29). Die Inzidenz von *PTEN*-Mutationen bei DLBCL Patientenproben war mit ca. 6% (2/34) sehr niedrig, was die Ergebnisse früherer Studien bestätigte<sup>171-173</sup>. Die funktionellen Untersuchungen legen eine destabilisierende Wirkung der *PTEN*-Mutationen bei DLBCL nahe. So konnte der Verlust der Expression mutierter *PTEN*-Varianten sowohl bei Zelllinien als auch bei primären Patientenproben beobachtet werden (Abbildung 17 B, C).

Zusammengefasst wurde eine komplette, biallelische *PTEN*-Inaktivierung bei den Zelllinien K422, OCI-Ly1 und SUDHL-10 detektiert (Tabelle 2). Innerhalb der Patientenkohorte 1 war eine biallelische *PTEN*-Inaktivierung nur bei einer GCB DLBCL Biopsie nachweisbar (DLBCL\_028; Anhang: Tabelle 8). Heterozygote, chromosomale *PTEN*-Deletionen konnten sowohl bei GCB als auch ABC Lymphomen detektiert werden.

Bei der Mehrheit der GCB DLBCL konnte die Ursache für den kompletten Verlust der *PTEN*-Expression nicht identifiziert werden. Insofern ist davon auszugehen, dass andere molekulare Mechanismen dazu beitragen, dass *PTEN* nicht exprimiert wird. Es gibt eine Vielzahl von Regulationsmechanismen, die die *PTEN*-Expression kontrollieren (Abbildung 4). So konnten bisher zahlreiche miRs identifiziert werden, die die *PTEN*-Translation inhibieren<sup>110</sup>. Bei GCB DLBCL ist beispielsweise der *miR17~92*-Lokus amplifiziert<sup>48</sup>. Ein potentieller Einfluss dieses Lokus auf die *PTEN*-Expression wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Das gezielte Ausschalten der *miR17~92* könnte hier einen möglichen Zusammenhang mit dem Verlust von *PTEN* offenbaren. Weitere Mechanismen, die bei anderen Tumorentitäten beschrieben wurden und die die *PTEN*-Expression verringern können, sind beispielsweise die Überexpression der E3-Ubiquitinligase NEDD4-1<sup>130</sup> oder der Verlust des *PTEN*-Pseudogens *PTENP1* (Abbildung 4)<sup>124</sup>.

In zukünftigen Untersuchungen könnte aus diesem Grund überprüft werden, ob Aberrationen des *PTENP1*-Lokus bei GCB DLBCL nachweisbar sind und ob die exogene *PTENP1*-Expression ähnliche phänotypische Effekte wie die *PTEN*-Expression hervorruft.

### 3.4 PTEN-induzierte Seneszenz und Lymphomgenese

In dieser Arbeit wurde der komplette Verlust der PTEN-Expression bei der Mehrzahl der GCB DLBCL festgestellt. Diese Ergebnisse sind überraschend, da bereits eine leicht verminderte PTEN-Expression im Mausmodell die Tumorsuszeptibilität signifikant erhöht<sup>95,101</sup>. So induzierte eine Verringerung der PTEN-Expression um lediglich 20% bei *Pten*<sup>hy/+</sup> Mäusen bereits Mammakarzinome, während die Reduktion der PTEN-Expression um 50% bei *Pten*<sup>+/-</sup> Mäusen zu einem gehäuften Auftreten verschiedener Tumoren, unter anderem von Prostatakarzinomen, führte<sup>100,182</sup>.

Im Gegensatz dazu implizieren *in vivo* Mausdaten, dass ein kompletter Verlust von PTEN die Induktion von Seneszenz zur Folge hat<sup>101</sup>. Diese PTEN-induzierte Seneszenz ist ein tumorsuppressiver Schutzmechanismus und stellt physiologisch einen sehr stabilen Zellzyklus- und somit Proliferationsarrest dar<sup>95,102</sup>. In der Regel verhindert ein solcher Arrest die Entwicklung von Tumoren. Dementsprechend zeigten Arbeiten an murinen Modellen zur Entstehung von Prostatakarzinomen, dass akuter, Prostata-spezifischer PTEN-Verlust bei konditionalen *Pten*<sup>pc/-</sup> Mäusen deren Überleben im Vergleich zu WT Mäusen nur in geringem Maße verringerte<sup>101</sup>. Keine der PTEN-defizienten *Pten*<sup>pc/-</sup> Mäuse starb im Untersuchungszeitraum von 10 Monaten an Prostatakarzinomen. Diese Studie zeigte auch, dass für eine Initiation PTEN-induzierter, tumorsuppressiver Seneszenz die Expression und Aktivität von p53 essentiell war<sup>101</sup>. So starben alle untersuchten *Pten*<sup>pc/-</sup>, *Trp53*<sup>pc/-</sup> Mäuse, die eine akute, Prostata-spezifische Inaktivierung von *PTEN* und *p53* aufwiesen, innerhalb von nur sieben Monaten. Das gleichzeitige Ausschalten von PTEN und p53 führte bei diesen Mäusen zu letalen Prostatakarzinomen mit schnellem Tumorwachstum<sup>101</sup>. Demzufolge wurde postuliert, dass es in frühen Stadien prostatistischer Neoplasien zu einer Verringerung der PTEN-Expression kommt, während ein kompletter Verlust von p53 und PTEN in fortgeschrittenen Stadien die Aggressivität von Prostatakarzinomen steigert. Untersuchungen an

humanen Prostatakarzinomen konnten diese Ergebnisse bestätigen. So wird ein monoallelischer *PTEN*-Verlust bei Karzinomen im Frühstadium detektiert<sup>183-186</sup>, während es zu *p53*-Inaktivierung und -Expressionsverlust in der Regel in fortgeschrittenen Stadien kommt<sup>187,188</sup>.

### 3.5 Diagnostischer Nutzen der *PTEN*-Defizienz bei DLBCL

Standardmäßig erfolgt zurzeit in der täglichen, diagnostischen Routine weder die Einteilung der DLBCL in ABC oder GCB Lymphome noch wird deren *PTEN*-Status bestimmt. Die *WHO*-Klassifizierung von 2008 verzichtet sogar explizit darauf, standardmäßige Genexpressionsstudien in der DLBCL-Diagnostik einzusetzen<sup>21</sup>. Der Grund hierfür ist insbesondere die Komplexität der Methodik, die auf Ebene der Routinelaboratorien immer noch relativ schwer zu etablieren ist. Mittlerweile wurden jedoch immunhistochemische Färbe-Algorithmen entwickelt, die eine Differenzierung hinsichtlich der molekularen DLBCL Subtypen im direkten Vergleich zu Genexpressionsprofilen mit relativ hoher Genauigkeit ermöglichen<sup>170,189-191</sup>. Jedoch konnten diese Algorithmen in verschiedenen Studien nicht validiert werden<sup>192,193</sup>. Daher ist es essentiell neue Biomarker zu identifizieren, um eine präzise Einteilung der DLBCL bezüglich der molekularen Subtypen zu ermöglichen.

Der Verlust von *PTEN* ist charakteristisch für GCB DLBCL und könnte potentiell als molekularer Biomarker zur Diagnostik eingesetzt werden (Abbildung 8, Abbildung 9). Insbesondere im Rahmen von klinischen Studien, welche die Wirksamkeit von PI3K-Inhibitoren untersuchen, könnte der immunhistochemische *PTEN*-Nachweis einen vielversprechenden prädiktiven Marker zur Voraussage des Therapieansprechens darstellen.

### 3.6 Die Rolle der *MYC*-Expression bei der Pathogenese von DLBCL

Die Rolle von MYC in der Pathogenese PTEN-defizienter GCB DLBCL, die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, ist von zentraler Bedeutung. MYC ist ein vielseitiger Verstärker der Genexpression und induziert expressionsabhängig Proliferation, Wachstum, Proteinbiosynthese, RNA-Prozessierung und metabolische Aktivität. Dementsprechend trägt MYC wesentlich zur Pathogenese zahlreicher Tumoren bei<sup>163</sup>.

Sämtliche getesteten DLBCL Zelllinien exprimierten MYC und für das Überleben der GCB Lymphome war MYC-Expression essentiell, da deren spezifische Herunterregulation zur Induktion von Zytotoxizität führte (Abbildung 24). Bei PTEN-defizienten GCB DLBCL wird MYC durch die konstitutive Aktivierung von AKT und die daraus resultierende Inaktivierung von GSK3 $\beta$  post-translational stabilisiert. Re-Expression von PTEN und der Rückgang der AKT-Aktivierung führten zur Deregulation von MYC auf Proteinebene und zur Herunterregulation typischer MYC-Zielgene (Abbildung 22).

Die post-translational Stabilisierung von MYC durch die PI3K/AKT-Signalkaskade ist ein neuartiger Mechanismus bei GCB DLBCL. Im Gegensatz dazu wird MYC bei Burkitt Lymphomen in der Regel durch die Translokation t(8; 14) konstitutiv exprimiert<sup>22</sup>. Im Gegensatz zu den Burkitt Lymphomen treten MYC-Translokationen nur bei etwa 8-10% der DLBCL Patientenproben auf<sup>194-196</sup>. Da aber deutlich mehr Fälle MYC-Expression aufweisen (ca. 30 %) <sup>194</sup>, sind hierfür weitere molekulare Mechanismen verantwortlich. Einen solchen Mechanismus könnte die AKT-vermittelte, post-translational Stabilisierung von MYC bei GCB DLBCL darstellen. Die Bedeutung von MYC-Expression bei GCB DLBCL ist von klinischer Relevanz, da mehrere Studien belegen konnten, dass Expression von MYC mit einer signifikant schlechteren Prognose bei DLBCL Patienten nach R-CHOP-Behandlung assoziiert ist<sup>194,195</sup>. Somit könnte der gemeinsame, immunhistochemische Nachweis von PTEN, MYC, p-AKT und p-GSK3 $\beta$  bei DLBCL Biopsien zukünftig weitere wichtige Erkenntnisse liefern.

Sollte sich in klinischen Studien ein direkter Zusammenhang zwischen MYC-Stabilisierung und der Prognose betroffener GCB DLBCL Patienten offenbaren, könnte dies klinische Implikationen haben, da momentan an der Entwicklung effizienter MYC-Inhibitoren gearbeitet wird<sup>197,198</sup>.

### **3.7 PI3K als Zielstruktur zur Behandlung von GCB DLBCL**

Bereits in klinischer Anwendung befinden sich PI3K-Inhibitoren deren Wirksamkeit bereits im Rahmen von Phase II Studien untersucht wird. Beispiele hierfür sind XL147 (Fa. Excelixis/Sanofi), BKM120 (Novartis) oder die dualen Inhibitoren von PI3K und mTOR BEZ235 (Novartis) und GDC-0980 (Genentech/Roche) <sup>186,187</sup>. Des Weiteren werden viele Verbindungen, welche auf die Inhibition der PI3K-AKT-mTORc1-Achse bei Tumoren abzielen, momentan hinsichtlich ihrer klinischen Eignung untersucht<sup>199,200</sup>.

Mehr als die Hälfte der GCB DLBCL Patientenproben hatten die Expression des Hauptantagonisten der PI3K-Kaskade, PTEN, verloren (Abbildung 8), wodurch es zu einer onkogenen Aktivierung von AKT kam (Abbildung 9, Abbildung 13). Die pharmakologische PI3K-Inhibition bei PTEN-negativen GCB DLBCL Zelllinien verringerte deren zelluläre Viabilität (Abbildung 25). Aus diesem Grund implizieren diese Ergebnisse, dass PI3K-Inhibitoren unter Umständen eine vielversprechende Therapieoption für Patienten mit PTEN-defizienten GCB DLBCL darstellen könnten.

### 3.8 Zukunftsperspektive

Die Resultate der vorliegenden Arbeit veranschaulichten die zentrale Rolle von PTEN bei der molekularen Pathogenese von DLBCL.

So konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der PTEN-Expression ein wesentliches Merkmal der Mehrzahl der GCB DLBCL darstellte. Die molekularen Mechanismen die zu einem PTEN-Verlust bei GCB DLBCL führten, konnten nur zu einem geringen Teil aufgeklärt werden.

Der Verlust von PTEN bei GCB DLBCL war funktionell mit einer konstitutiven Aktivierung der onkogenen PI3K/AKT-Signalkaskade assoziiert, welche für deren Überleben essentiell war. Somit erfolgte die Definition eines PTEN-defizienten, PI3K-abhängigen GCB DLBCL Subtyps. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit eine bei DLBCL neue, funktionelle Interaktion zwischen dem PI3K/AKT-Signalweg und dem Transkriptionsfaktor MYC gezeigt werden.

Beruhend auf diesen Erkenntnissen könnten insofern PI3K und MYC als neue Zielstrukturen für die zukünftige Therapie von Patienten mit GCB Lymphomen in Betracht gezogen werden. Hierzu stehen bereits eine Vielzahl verschiedener PI3K- und MYC-Inhibitoren für präklinische und klinische Untersuchungen bereit.

Abschließend erscheint es möglich, dass die Bestimmung der PTEN Expression zukünftig in der klinischen Routine einsetzbar ist, um Patienten mit DLBCL zu identifizieren, die von einer zielgerichteten Therapie mit PI3K-Inhibitoren profitieren könnten.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

Produkt	Hersteller
Actin-Antikörper (A2066)	Sigma-Aldrich
Adhesive PCR Foil Seal	Thermo Scientific
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Amplification Kit	Ventana/Roche
APS	Carl Roth
<i>Bam</i> HI	NEB
BD FACS Clean Solution	BD Biosciences
BD FACS Rinse Solution	BD Biosciences
BD FACSTFlow Sheath Fluid	BD Biosciences
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
<i>Bgl</i> II	NEB
Bluing Reagent	Ventana/Roche
Bromphenolblau	Carl Roth
Cell Conditioning 1	Ventana/Roche
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche
Chromatography Paper 3mm	Whatman
Cleaved Caspase-3 (Asp175)-Antikörper, #9664	Cell Signaling
Cleaved Caspase-9 (Asp330)-Antikörper, #9501	Cell Signaling
cOmplete Protease Cocktail Tablets	Roche
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Discardit II Spritzen	BD Biosciences
DMEM, high glucose	life technologies
DMSO	Merck
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN
dNTPs 10mM	Applied Biosystems
Doxycyclin	Sigma-Aldrich
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Scientific
DYKDDDDK (Flag-Epitop)-Antikörper, F1804	Sigma-Aldrich
<i>Eco</i> RI	NEB
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth
Eisessig	Carl Roth
Ethanol 95%, 1% MEK	Carl Roth
Ethanol, 99,5%	Carl Roth
Ethidiumbromid-Lösung 1%	Carl Roth
FCS, fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich
Filtropur S 0,45	Sarstedt
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
GeneRuler 1 kb	Thermo Scientific
GeneRuler 100 bp	Thermo Scientific
Gestopfte Pipettenspitzen 10 $\mu$ l	Sarstedt
Gestopfte Pipettenspitzen 1000 $\mu$ l	Sarstedt
Gestopfte Pipettenspitzen 20 $\mu$ l	Sarstedt
Gestopfte Pipettenspitzen 200 $\mu$ l	Sarstedt
Glycerin 99,5%; wasserfrei	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
GSK3b-Antikörper, #9832	Cell Signaling
Hematoxylin	Ventana/Roche
Hexadimethrinbromid	Sigma-Aldrich

**Produkt**

**Hersteller**

<i>HindIII</i>	NEB
<i>HpaI</i>	NEB
Humanes Plasma	DRK
HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit	Illumina
IMDM, + L-Glutamin, +25mM Hepes	life technologies
Immobilon-P Transfer Membrane PVDF; 0,45µm	Merck Millipore
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Ladepuffer 6 x (Loading Dye)	Thermo Scientific
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth
LE Agarose	Biozym
Lipofectamine 2000	life technologies
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche
Ly294002	Cayman Chemicals
Magermilchpulver	Sucofin
Methanol, 99,5%	Carl Roth
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	life technologies
Goat anti-Mouse IgG, HRP-linked	Southern Biotec
MYC-Antikörper (1472-1)	Epitomics
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumazid	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS) - Pellets	Carl Roth
NucleoSpin® RNA Kit	Macherey Nagel
OPTI-MEM® I reduced Serum	life technologies
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
pan AKT-Antikörper, #4685	Cell Signaling
PBS pH 7,4	life technologies
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit	BD Pharmingen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Petrischale 92 x 16 mm mit Nocken	Sarstedt
phospho GSK3β-Antikörper, #9322	Cell Signaling
phospho MYC (T58)-Antikörper, #ab85380	abcam
phospho p70S6K (T389)-Antikörper, #9234	Cell Signaling
phospho-AKT (S473)-Antikörper, #4058	Cell Signaling
Phosphosafe Extraction Reagent	Millipore
Phusion High-Fidelity-Polymerase	Thermo Scientific
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Polystyrene Round-Bottom Tube, 5 ml	BD Falcon
Propidiumiodid-Lösung	Sigma-Aldrich
PTEN (138G6)-Antikörper	Cell Signaling
PTEN (A2B1)-Antikörper	Santa Cruz
Puromycin, Dihydrochlorid, Zellkultur getestet	Sigma-Aldrich
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Rabbit IgG, HRP-linked-Antikörper	Southern Biotec
Reagent Reservoir PS 50 ml	COSTAR
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß 2,0 ml	Eppendorf
Röhrchen 15 ml	Falcon
Röhrchen 50 ml	Falcon
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth
RPMI 1640 Medium, +GlutaMAX	life technologies
SDS Pellets	Carl Roth
Serologische Pipetten 1 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 10 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 2 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 25 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 5 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 50 ml	Sarstedt
SNARF®-1-Carboxylsäure, Acetat, N-Succinimidyl-Esther	life technologies

**Produkt**

T4 DNA Ligase  
 TaqMan® Copy Number Assay *PTEN*  
 TaqMan® Copy Number Reference Assay, human, RNase P  
 TaqMan® Genotyping Master Mix  
 TEMED  
 TOPO XL PCR Cloning Kit  
 TotalPrep RNA Amplification Kit  
 TRIS  
 Trypsin-EDTA 0,05%  
 Tubulin-Antikörper (DM1A)  
 Tween 20  
 Ultraview Universal DAB Detection Kit  
*Xho*I  
 Zellkulturflaschen 25 cm  
 Zellkulturflaschen 75 cm  
 Zellkulturplatten, 24-well  
 Zellkulturplatten, 6-well  
 Zellkulturplatten, 96-well, flacher Boden  
 Zellkulturplatten, 12-well

**Hersteller**

NEB  
 life technologies  
 life technologies  
 life technologies  
 Carl Roth  
 life technologies  
 Illumina  
 Carl Roth  
 life technologies  
 Sigma-Aldrich  
 United States Biological  
 Ventana/Roche  
 NEB  
 Falcon  
 Falcon  
 Falcon  
 Falcon  
 Falcon  
 Falcon

**4.2 Geräte**

**Gerät**

Alpha Imager EC  
 Blockthermostat ThermoServe 24  
 Centrifuge Rotanta 460R  
 CO2 Brutschrank Serie CB  
 Consort EV265  
 Eppendorfpipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl  
 FACS Calibur  
 Flachsüttler Polymax1040  
 Gefrierschrank -80°C Forma 905, 490l  
 Gelkammer AGT-3  
 Heraeus Functionline Inkubator  
 Heraeus Pico17 Centrifuge  
 ImageQuant LAS 4000  
 Invertoskop, Phasenkontrast AE20 Series  
 KS 4000 i control Schüttler  
 Kühlschranks Liebherr Profiline 421l  
 Magnetrührer IKAMAG RET  
 Mikrowelle  
 Mini-Protean Tetra Cell  
 MJ-Mini Personal Thermo Cycler  
 NanoDrop 2000  
 Pipettierhilfen  
 Präzisionswaage OT3002S Ohaus  
 Rollenmischer SRT-9  
 StepOnePlus Real-time-PCR System  
 Sterilbench MSC Advantage  
 Tiefkühlschrank -20°C  
 Victor 3X 1420 Multilabel counter  
 Vortex Genie 2  
 Wasserbad 4l Julabo TW8  
 Zentrifuge 5424 R mit Kühlung

**Hersteller**

Biozym  
 biotech service blu  
 Hettich  
 Binder  
 Hofer  
 Eppendorf  
 Becton Dickinson  
 Heidolph  
 Thermo Scientific  
 VWR  
 Thermo Scientific  
 Thermo Scientific  
 GE Healthcare  
 Motic  
 IKA  
 Liebherr  
 IKA  
 VWR Severin  
 Bio-Rad  
 Bio-Rad  
 Peqlab  
 Integra  
 VWR  
 VWR  
 Applied Biosystems  
 Thermo Scientific  
 Siemens  
 Perkin Elmer  
 Scientific Industries  
 VWR  
 Eppendorf

### 4.3 Puffer

#### Blotting-Puffer

3,03 g TRIS  
14,41 g Glycin  
200 ml Ethanol (95%, 1% MEK)  
Ad H<sub>2</sub>O 1000 ml

#### Läemli-Puffer

1,5 ml β-Mercaptoethanol  
1,5 g SDS  
0,015 g Bromphenolblau  
5,75 ml 87%iges Glycerin  
Ad Sammelgel-Puffer 10 ml

#### Trenngel-Puffer

90,9 g Tris  
20 ml 10%iges SDS  
Ad H<sub>2</sub>O 500 ml, pH 8,8

#### TAE-Lauf-Puffer

4,84 g Tris  
5,72 ml Eisessig  
2 ml 0,5M EDTA  
Ad H<sub>2</sub>O 1000 ml

#### Sammelgel-Puffer

30,3 g Tris  
20 ml 10%iges SDS  
Ad H<sub>2</sub>O 500 ml, pH 6,8

#### PBS-T

1000 ml PBS  
5 ml Tween-20

#### SDS-Lauf-Puffer

3,02 g Tris  
14,4 g Glycin  
1 g SDS  
Ad H<sub>2</sub>O 1000 ml

### 4.4 Amplifikation von Plasmid-DNA und Transformation

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden verschiedene *Escherichia coli* Bakterienstämme genutzt. Die Amplifikation retroviraler Expressionsvektoren (pMSCV, pRetro, pRSMX) sowie der Helferplasmide als auch des TOPO-XL-Klonierungsvektors erfolgte in *E.coli* One Shot® TOP10 (Life Technologies). Durch gerichtete Mutagenese veränderte Konstrukte wurden einmalig in *E.coli* XL1-Blue (Agilent Technologies) transformiert und amplifiziert. Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E.coli* erfolgte für 30 min auf Eis, gefolgt von einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C und einer fünfminütigen Regenerationsphase auf Eis. Daraufhin wurde die Bakterien suspension in LB-Medium ohne Selektionsdruck bei 37°C und 220 rpm für 1h inkubiert. Danach erfolgte das Ausplattieren der Bakterien suspension auf LB-Agar (10 µg/ml Ampicillin).

## 4.5 Eukaryotische Zelllinien und Kulturmedien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene eukaryotische Zelllinien genutzt. Zur Produktion retroviraler Virionen wurden 293TCeB Zellen<sup>68,201,202</sup> in DMEM mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und Penicillin (100 U/ml) sowie Streptomycin (100 mg/ml) kultiviert. Alle genutzten DLBCL Zelllinien waren im Vorfeld der Arbeit einem molekularen DLBCL Subtyp zugeordnet worden (Tabelle 3). Für eine effiziente, retrovirale Transduktion wurden alle DLBCL Zelllinien im Vorfeld der Arbeit gentechnisch so verändert, dass ein ekotroper muriner Rezeptor exprimiert wurde<sup>68,203</sup>. Zur gezielten Induktion der Expression transduzierter Expressionsvektoren wurde ein bakterieller Tetracyclin-Repressor (TR) durch die genetisch veränderten Zelllinien konstitutiv exprimiert<sup>68</sup>. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Kulturmedien wurden mit Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 mg/ml) sowie humanem Plasma (HP) bzw. FCS supplementiert, wie in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3:** DLBCL Zelllinien, deren molekularer Subtyp sowie Kulturmedien.

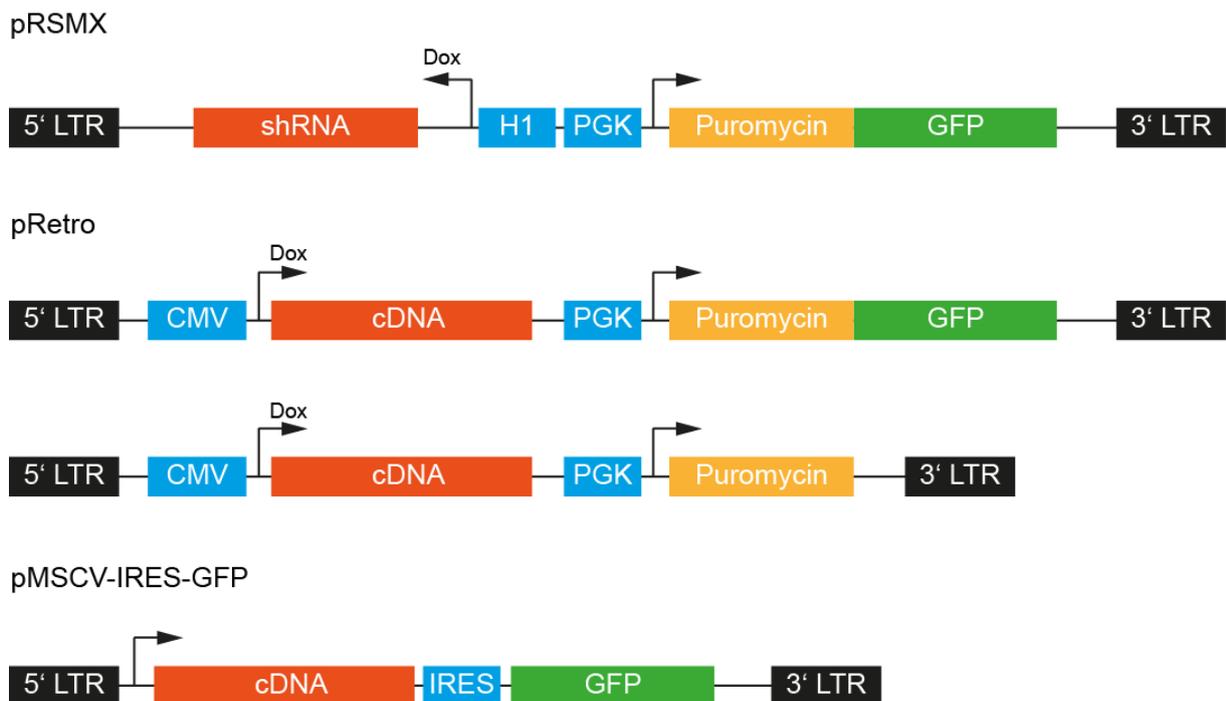
DLBCL Zelllinie	Molekularer DLBCL Subtyp	Kulturmedium	Referenz
HBL-1	ABC	RPMI + 10% FCS	<i>Lam et al., 2008</i> <sup>204</sup>
OCI-Ly10	ABC	IMDM + 20% HP	<i>Lam et al., 2008</i> <sup>204</sup>
TMD-8	ABC	IMDM + 20% HP	<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>49</sup>
BJAB	GCB	RPMI + 10% FCS	<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>49</sup>
DB	GCB	RPMI + 10% FCS	<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>49</sup>
HT	GCB	RPMI + 10% FCS	<i>Lam et al., 2008</i> <sup>204</sup>
K422	GCB	RPMI + 10% FCS	<i>Walsh et al., 2013</i> <sup>205</sup>
OCI-Ly1	GCB	IMDM + 10% FCS	<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>49</sup>
OCI-Ly2	GCB	IMDM + 10% FCS	<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>49</sup>
OCI-Ly4	GCB	IMDM + 10% FCS	<i>Lenz et al., 2008</i> <sup>49</sup>
OCI-Ly7	GCB	IMDM + 10% FCS	<i>Lam et al., 2008</i> <sup>204</sup>
OCI-Ly19	GCB	IMDM + 10% FCS	<i>Lam et al., 2008</i> <sup>204</sup>
SUDHL-10	GCB	RPMI + 10% FCS	<i>Lam et al., 2008</i> <sup>204</sup>
RL	GCB	RPMI + 10% FCS	<i>Walsh et al., 2013</i> <sup>205</sup>

## 4.6 Retrovirale Vektoren

Die *in vitro* Erkenntnisse dieser Arbeit beruhen im Wesentlichen auf einer effektiven retroviralen Transduktion genetisch modifizierter DLBCL Zelllinien. Für eine optimale

retrovirale Transduktion waren verschiedene Helferplasmide und für die effektive Expression von cDNAs und shRNAs retrovirale Expressionssysteme notwendig. Als Helferplasmide wurden in dieser Arbeit pHIT/EA6x3 und pHIT60 genutzt. pHIT/EA6x3 kodiert für das EA6 chimäre, ekotrope *Envelope*-Protein<sup>203,206</sup>. Das Plasmid pHIT60 kodiert für die Virionen-Untereinheiten *Gag/Pol*<sup>198</sup>.

Der pMSCV-IRES-GFP-Vektor stellt ein konstitutiv-aktives System zur Expression von cDNAs unter Kontrolle des 5'-LTR assoziierten Promotors dar, bei dem eine Ko-Transkription und somit Expression von GFP, reguliert durch IRES, erfolgt. Die Integration des pMSCV-IRES-GFP-Provirus erfolgt über die retroviralen 5'- und 3'-LTRs (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Retrovirale Expressionsvektoren für cDNAs und shRNAs. Die Expression der shRNAs bzw. cDNAs durch pRSMX und pRetro ist durch den *tet*-Operator im H1- bzw. CMV-Promotor abhängig von der Zugabe von Doxycyclin (Dox). Die PGK-Promotoren sowohl von pRSMX und pRetro als auch der 5'-LTR assoziierte Promotor von pMSCV-IRES-GFP zeigen konstitutive Expressionsaktivität. Die stabile Integration der Proviren in das Genom der Zielzellen wird durch die 5'- und 3'-LTRs vermittelt.

Das zur induzierten Expression von cDNAs genutzte pRetro-System leitet sich von einer modifizierten Variante des pRetroSuper mit dualen Promotor ab<sup>65</sup>. Die Expression von cDNAs unterliegt der Kontrolle des CMV-Promotors und eines *tet*-Operators<sup>65</sup>

an den der TR bindet. Somit erfolgt die Genexpression nur durch Zugabe von Doxycyclin, was zum Verlust der reprimierenden Aktivität des TR führt. Zusätzlich besitzt das pRetro-System einen PGK-Promotor der die Expression einer Puromycin-Resistenz-Kassette (pRetro-Puro) bzw. einer Puromycin-Resistenz-GFP-Kassette (pRetro-Puro-GFP) konstitutiv aktiviert. Die Integration des Provirus erfolgt wie beim pMSCV-IRES-GFP über retrovirale 5'- und 3'-LTRs (Abbildung 27).

Der pRSMX-Vektor zur induzierten Expression von shRNAs ist von dem retroviralen pSUPER-Vektor<sup>207</sup> abgeleitet, in den ein induzierbarer H1-Promotor mit *tet*-Operator<sup>208</sup> eingebracht wurde. Auch die Induktion der shRNA-Expression erfolgt durch Zugabe von Doxycyclin. Zusätzlich enthält der Vektor eine Puromycin-Resistenz-GFP-Kassette unter Kontrolle des konstitutiv aktiven PGK-Promotors<sup>68</sup>. Die Integration des Provirus erfolgt über retrovirale 5'- und 3'-LTRs (Abbildung 27).

## 4.7 Patientenproben

Die Tumorbiopsien wurden Patienten mit *de novo* DLBCL vor der Behandlung entnommen. Die Lagerung und Bereitstellung von Probenmaterial wurden durch Professor Dr. Michael Hummel und Professor Dr. Alexandar Tzankov gewährleistet.

### 4.7.1 Molekulare Charakterisierung der Kohorte 1

Die molekulare Charakterisierung der 34 Patientenbiopsien aus Kohorte 1 erfolgte durch Genexpressionsstudien mittels GeneChip Human Exon 1.0 ST v2 Mikroarrays (Affymetrix) in enger Kooperation mit Professor Dr. Michael Hummel, Professor Dr. Peter Lenz und Michael Grau. Die Arrays wurden durch *robust multiarray average*-Hintergrund-Subtraktion<sup>209</sup> sowie Quantil-Normalisierung präprozessiert. Die Auswertung erfolgte auf Einzel-Gen-Ebene, basierend auf der v14.1 Entrez Gen-Annotierung (CDF, *custom gene definition files*) für Affymetrix GeneChip Human Exon 1.0 ST v2 Mikroarrays. Die Biopsien wurden nach dem Algorithmus von *Wright et al.* in ABC,

GCB und unklassifizierbare DLBCL eingeteilt<sup>53</sup>. Als Referenzen wurden 2 Biopsien einer bereits in vorhergehenden Studien untersuchten Kohorte genutzt<sup>210</sup>. Die Rohdaten wurden in der GEO-Datenbank hinterlegt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/GSE45495>).

#### 4.7.2 Molekulare Charakterisierung der Kohorte 2

Die Patientenkohorte 2 bestand aus 249 Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten DLBCL Biopsien, die von der Arbeitsgruppe um Professor Dr. Alexandar Tzankov nach dem Tally-Algorithmus in GCB und nicht-GCB DLBCL immunhistochemisch eingeteilt worden waren<sup>170,190</sup>.

### 4.8 Immunhistochemischer Nachweis von PTEN

Der immunhistochemische Nachweis von PTEN erfolgte mittels des monoklonalen PTEN-Antikörpers 138G6 (Verdünnung: 1:100) in den Laboratorien von Professor Dr. Alexandar Tzankov am Universitätsspital Basel. Die TMA wurden, wie von *Nagel et al.* beschrieben, erstellt<sup>211</sup>. Die immunhistochemische PTEN-Färbung wurde mit Hilfe der vollautomatischen BenchMark-Plattform (Ventana/Roche) durchgeführt. Die Antikörperinkubation erfolgte für 32 min und direkt im Anschluss die Signalamplifikation mittels des Amplification Kit sowie die Visualisierung der Antikörperbindung mittels des Ultraview Universal DAB Detection Kit. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Hematoxylin und Bluing Reagent gefärbt. Die Etablierung der PTEN-Färbung erfolgte durch zwei erfahrene Hämatopathologen (Professor Dr. Alexandar Tzankov und Professor Dr. Stephan Dirnhofer; Universitätsspital Basel)<sup>169</sup>.

## **4.9 Methoden zur Modifikation und Analyse von Nukleinsäuren**

### **4.9.1 Extraktion von Plasmid-DNA**

Zur Gewinnung amplifizierter Plasmid-DNA wurden transformierte *E.coli* in LB-Medium mit 10 µg/ml Ampicillin ÜN bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Die Extraktion der Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen erfolgte mittels des GeneJET Plasmid Miniprep Kit gemäß des Protokolls des Herstellers.

### **4.9.2 Extraktion von genomischer DNA**

Die Extraktion von genomischer DNA bei DLBCL Zelllinien erfolgte mittels des DNeasy Blood & Tissue Kit gemäß des Protokolls des Herstellers.

### **4.9.3 Extraktion von RNA**

DLBCL Zelllinien wurden durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Die Extraktion der RNA bei DLBCL Zelllinien erfolgte mittels des NucleoSpin® RNA Kit gemäß des Protokolls des Herstellers. RNA Präparate wurden konsequent auf Eis gehalten und bei -80°C gelagert.

### **4.9.4 Bestimmung des RNA- und DNA-Gehaltes**

Die Bestimmung des RNA- und DNA-Gehaltes der Präparationen erfolgte durch photometrische Messung mittels NanoDrop 2000.

#### 4.9.5 Analyse der *PTEN*-Kopienzahl mittels quantitativer genomischer PCR

Die Bestimmung der *PTEN*-Kopienzahl bei DLBCL Zelllinien und primären Patientenproben mittels quantitativer genomischer PCR erfolgte mit Hilfe des TaqMan® Copy Number Assays im StepOnePlus Real-time-PCR System im 96-well-Format. Einzelne Messungen wurden gemäß des Protokolls des Herstellers durchgeführt. Die Ergebnisse der *PTEN*-Kopienzahlbestimmung mittels spezifischer TaqMan®-Sonde (Hs05211474\_cn) wurden durch die CopyCaller™ Software auf humane RNaseP (*H1RNA*) als interne genomische Referenz normalisiert.

#### 4.9.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die größenspezifische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Gelelektrophorese in 1%igen bzw. 2%igen Agarosegelen. Dazu wurden 1,5 bzw. 3 g Agarose in 150 ml TAE-Laufpuffer erhitzt und gelöst. Vor dem Gießen des Agarose-Gels erfolgte die Zugabe von 6 µl Ethidiumbromid-Lösung (1%ig). Zum Beladen des Gels wurden die DNA-Proben entsprechend ihrer Volumina mit 6 x Ladepuffer gemischt und aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V in TAE-Laufpuffer durchgeführt. Zur Überprüfung der Größe der DNA-Fragmente wurden 10 µl des 100 bp bzw. 1 kb GeneRuler-Größenstandards mitgeführt. Die Dokumentation erfolgte mittels des Alpha Imager EC.

#### 4.9.7 Amplifikation von cDNAs mittels PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die cDNAs von *PTEN*, *caAKT* und *MYC* im Vorfeld der Klonierung in retrovirale Expressionsvektoren mittels PCR amplifiziert. Die spezifischen Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt. Als Grundlage für die Amplifikationen diente im Fall von *PTEN* eine kommerziell erworbene cDNA der Firma Origene (RC202627), im Fall von *caAKT* ein cDNA-Konstrukt aus dem Labor von Dr. Kira Gritsman<sup>178</sup> im Fall von *MYC* ein cDNA-Konstrukt aus der Addgene-Kollektion (Plasmid #18770; www.addgene.org). Die Amplifikation erfolgte mit der Phusion High-

Fidelity Polymerase gemäß den Vorgaben des Herstellers. Es wurden 15 Amplifikationszyklen mit einer Hybridisierungstemperatur von 58°C auf der Grundlage 50 ng eingesetzter Plasmid-DNA durchgeführt. Alle cDNAs wurden durch ein FLAG-Epitop markiert.

**Tabelle 4:** Oligonukleotide zur Amplifikation eukaryotischer cDNAs.

cDNA	Oligonukleotide	Sequenzen der Oligonukleotide
<i>PTEN</i>	PTEN_cDNA_f	5'-GATCGAATTCGGATCCTTAAACCTTATCGTCGCA-3'
<i>PTEN</i>	PTEN_cDNA_r	5'-GATCGTTAACGAAGCTTCCACCATGACAGCCATCA-3'
<i>caAKT</i>	caAKT_cDNA_f	5'-GATCGTTTTAAACGCCACCATGGGGTCT-3'
<i>caAKT</i>	caAKT_cDNA_r	5'-GATCCTCGAGTCAGGCCGTGCCGCT-3'
<i>MYC</i>	MYC_cDNA_f	5'-GATCGTTAACGAAGCTTCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGTGGT- CCCCTGGATTTTTTCGGGTAGT-3'
<i>MYC</i>	MYC_cDNA_r	5'-GATCGAATTCGGATCCTTACGCACAAGAGTTCCG-3'

#### 4.9.8 Amplifikation chromosomaler DNA mittels PCR

Die Amplifikation genomischer DNA-Abschnitte erfolgte zur Sequenzierung der kodierenden Bereiche von *PTEN*. Dazu wurden 50 ng genomische DNA von Zelllinien oder primären Patientenproben pro PCR-Ansatz eingesetzt um spezifisch kodierende Bereiche von *PTEN* durch die Dreamtaq-DNA-Polymerase zu amplifizieren. Den Angaben des Herstellerprotokolls wurde bei jeder Amplifikation gefolgt. Die neun *PTEN*-Exone wurden mit unterschiedlichen Oligonukleotiden bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen amplifiziert, die jeweils in Tabelle 5 aufgelistet sind.

Für die PCR-Reaktionen wurde der MJ-Mini Personal Thermo Cycler und folgendes standardisiertes Programm verwendet:

1. Initiale Denaturierung	95°C,	3min
2. Denaturierung	95°C,	30s
3. Hybridisierung	siehe Tabelle 5,	30s
4. Polymerisierung	72°C	45s
5. 34 Zyklen 2.- 4.		
6. Finale Polymerisierung	72°C	10min.

**Tabelle 5:** Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation kodierender *PTEN*-Bereiche und Hybridisierungstemperaturen.

<i>PTEN</i> -Exon	Oligo-nukleotide	Sequenzen der Oligonukleotide	Hybridisierungstemperatur
Exon 1	PTEN_1_f	5'-TTTCCATCCTGCAGAAGAAG-3'	56°C
	PTEN_1_r	5'-CATTTTCGCATCCGTCTACT-3'	56°C
Exon 2	PTEN_2_f	5'-CTCCAGCTATAGTGGGAAAACCTTC-3'	60°C
	PTEN_2_r	5'-CCCCTGAAGTCCATTAGGTACGG-3'	60°C
Exon 3	PTEN_3_f	5'-ATATTCTCTGAAAAGCTCTGG-3'	52°C
	PTEN_3_r	5'-TTAATCGGTTTAGGAATACAA-3'	52°C
Exon 4	PTEN_4_f	5'-TTGAAAAGGTGATCGTTGG-3'	58°C
	PTEN_4_r	5'-ATTGTTATGACAGTAAGATACAGTCTATCG-3'	58°C
Exon 5	PTEN_5_f	5'-GACCTATGCTACCAGTCCGTA-3'	58°C
	PTEN_5_r	5'-CACCTCAATAAACTGAAGGAAAAA-3'	58°C
Exon 6	PTEN_6_f	5'-AATGTATATATGTTCTTAAATGGCTACGA-3'	60°C
	PTEN_6_r	5'-GCTTCAGAAATATAGTCTCCTGCAT-3'	60°C
Exon 7	PTEN_7_f	5'-CAGATACAGAATCCATATTTCTGTG-3'	62°C
	PTEN_7_r	5'-AAGCAAAACACCTGCAGATCTAATA-3'	62°C
Exon 8	PTEN_8_f	5'-AAATGCAACAGATAACTCAGATTG-3'	53°C
	PTEN_8_r	5'-AGCAAGTCTTCATCAGCTGTA-3'	53°C
Exon 9	PTEN_9_f	5'-GTTTAAGATGAGTCATATTTG-3'	54°C
	PTEN_9_r	5'-TGGTGTTTTATCCCTCTTGAT-3'	54°C

#### 4.9.9 Aufreinigung von amplifizierter DNA

Zur Aufreinigung von PCR-amplifizierter DNA Fragmente wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen erfolgte die Extraktion von DNA-Fragmenten nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus 1-2%igen Agarosegelen. Die gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die direkte Aufreinigung von PCR Produkten erfolgte mittels des GeneJET PCR Purification Kit gemäß des Protokolls des Herstellers.

#### 4.9.10 Klonierung von cDNAs

Die Klonierung amplifizierter cDNAs erfolgte in verschiedene retrovirale Expressionsvektoren. Die *PTEN* cDNA wurde nach endonukleolytischem *HpaI/EcoRI* Verdau in den retroviralen Expressionsvektor pMSCV-IRES-GFP kloniert, die Klonierung in den pRetro-Vektor erfolgte nach endonukleolytischem *BamHI/HindIII*-Verdau. Sowohl die *caAKT* als auch die *MYC* cDNA wurden nach endonukleolytischem *BamHI/HindIII*-Verdau in den Vektor pRetro-Puro kloniert. Die Fragmente wurden durch die T4 DNA Ligase für 1h bei RT ligiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation. Alle Klonierungen wurden mittels Sanger-Sequenzierung (Eurofins) überprüft. Die für Sequenzierungen von cDNAs genutzten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6:** Oligonukleotide zur Sequenzierung klonierter cDNAs.

cDNA	Oligonukleotide	Sequenzen der Oligonukleotide
<i>caAKT</i>	caAKT_CDS_13_f	5'-GCTATTGTGAAGGAGGGTTG-3'
	caAKT_CDS_643_f	5'-TACTCTTTCCAGACCCACG-3'
	caAKT_CDS_1129_f	5'-AAGTCCTTGCTTTTCAGGGCTGCTC-3'
	caAKT_CDS_409_r	5'-ACACCTCCATCTCTTCAGC-3'
<i>MYC</i>	MYC_CDS_1_f	5'-CTGGATTTTTTTCGGGTAGT-3'
	MYC_CDS_500_f	5'-ACCAGGCTGCGCGCAAAGAC-3'
	MYC_CDS_1000_f	5'-TATCCTGCTGCCAAGAGGGTC-3'
	MYC_CDS_200_r	5'-TTCTTCCAGATATCCTCGCTG-3'
<i>PTEN</i>	PTEN_CDS_1249_f	5'- GAAAGACATTATGACACCGC -3'
	PTEN_CDS_1357_r	5'- TCTTCACTTAGCCATTGGTC -3'
	PTEN_CDS_1640_f	5'- TTCCAATGTTTCAGTGGCG -3'
	PTEN_CDS_1869_r	5'- TTCCTCTGGTCTGCTGATG -3'
	PTEN_CDS_2029_f	5'- GCCAACCGATACTTTTCTCC -3'
	PTEN_CDS_2092_r	5'- TAGCCTCTGGATTGACGG -3'

#### 4.9.11 Klonierung von shRNAs

Die Klonierung von shRNAs erfolgte in den retroviralen Expressionsvektor pRSMX. Dazu wurde der Leervektor endonukleolytisch mit *BglII* und *XhoI* linearisiert. Hybridisierte shRNA-Oligonukleotide konnten direkt in den linearisierten Leervektor ligiert werden. Die Hybridisierung der shRNA-Oligonukleotide erfolgte im MJ-Mini Personal Thermo Cycler mit folgendem Programm:

1. 95°C 2min
2. 85°C 9min
3. 75°C 9min
4. 65°C 9min
5. 55°C 9min
6. 45°C 9min
7. 35°C 9min
8. 25°C 10min

Im Anschluss erfolgte die Ligation von linearisiertem pRSMX-Leervektor und hybridisierten shRNAs, katalysiert durch die T4 DNA Ligase 1h bei RT. Danach erfolgte die Transformation. Alle klonierten shRNAs wurden durch Sanger-Sequenzierung überprüft. Die Zielsequenzen der *MYC* shRNA #1 bzw. #2 waren CGATTCCTTCTAACAGAAATG bzw. CCTATGAACTTGTTTCAAATG. Die Kontroll-shRNA mit der Zielsequenz CTCTCAACCCTTTAAATCTGA richtete sich gegen das *MSMO1*-Transkript und wurde als Negativ-Kontrolle bereits in mehreren Studien eingesetzt<sup>63,69,71</sup>.

#### 4.9.12 Klonierung von großen Abschnitte chromosomaler DNA

Zur Klonierung großer DNA-Amplifikate wurde das TOPO XL PCR Cloning Kit verwendet. Die *PTEN* Exone 3 – 5 der Zelllinie SUDHL-10 wurden mittels des Dreamtaq-DNA-Polymerase-System amplifiziert, im Agarose-Gel aufgetrennt und aufgereinigt. Daraufhin erfolgte die Klonierung in den TOPO XL-Vektor nach Angaben des Herstellerprotokolls.

#### 4.9.13 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Erzeugung von Mutationen in der *PTEN* cDNA im pMSCV-IRES-GFP-Vektor erfolgte unter Verwendung des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit gemäß der Angaben des Herstellers. Die dafür genutzten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgeführt. Alle generierten *PTEN* Mutanten wurden durch Sequenzierung überprüft und in den pMSCV-IRES-GFP-Leervektor subkloniert.

**Tabelle 7:** Oligonukleotide zur Mutagenese der *PTEN* cDNA.

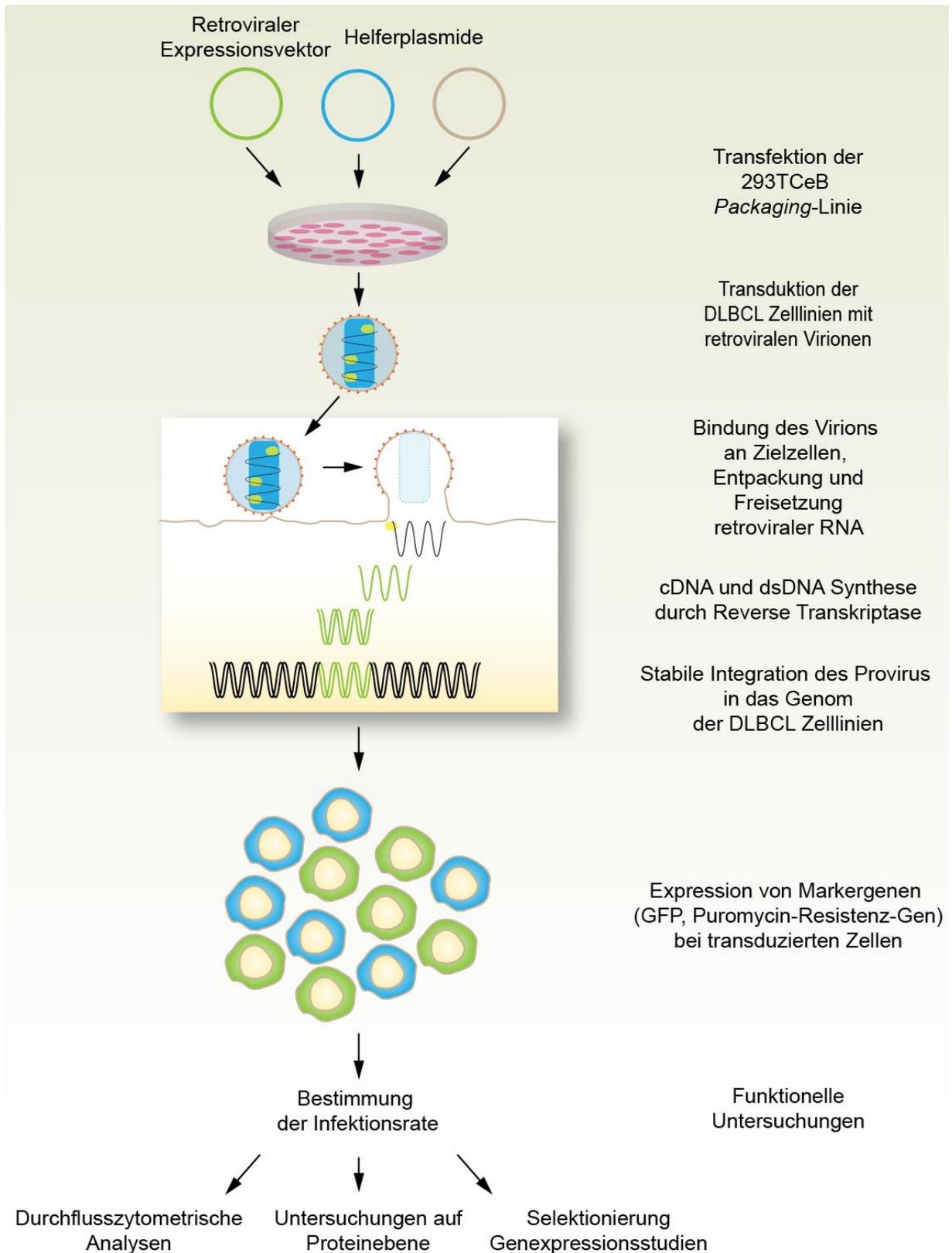
PTEN-Mutante	Oligonukleotide	Sequenzen der Oligonukleotide
G129E	PTEN_G129E_f	5'-GTAAAGCTGGAAAGGAACGAACCTGGTG-3'
	PTEN_G129E_r	5'-CACCAGTTCGTTCCCTTTCCAGCTTTAC-3'
C124S	PTEN_C124S_f	5'-GCAGCAATTCACCTAAAGCTGGAAAGG-3'
	PTEN_C124S_r	5'-CCTTTCCAGCTTTAGAGTGAATTGCTGC-3'
Y68H	PTEN_Y68H_f	5'-CCATTACAAGATACACAATCTTTGTGC-3'
	PTEN_Y68H_r	5'-GCACAAAGATTGTGTATCTTGAATGG-3'
D162H	PTEN_D162H_f	5'-GGAAGTAAGGACCAGACACAAAAAGGGAG-3'
	PTEN_D162H_r	5'-CTCCCTTTTGTGTCTGGCTTACTTCC-3'
$\Delta$ Y177	PTEN_Y177del_f	5'-GGCGCTATGTGTATTATAGCTACCTGTTAAAGAATCATCTGG-3'
	PTEN_Y177del_r	5'-CCAGATGATTCTTTAACAGGTAGCTATAATACACATAGCGCC-3'
N276S/T277A	PTEN_N276S/T277A_f	5'-GTTTCACTTTTGGGTAAGTGCATTCTTCATACCAGGACC-3'
	PTEN_N276S/T277A_r	5'-GGTCCTGGTATGAAGAATGCACTTACCCAAAAGTGAAC-3'

## 4.10 Retrovirale Transduktion

Die Transduktion retroviraler Expressionsvektoren bei DLBCL Zelllinien erfolgte in einem mehrstufigen Vorgang, welcher in den folgenden Abschnitten erläutert wird. Zuerst erfolgte die Transfektion der Expressionsvektoren und Helferplasmide transient in die *Packaging*-Zelllinie, die daraufhin Virionen mit verpackter proviraler Ziel-Nukleinsäure segregierte. Diese Virionen im Mediumüberstand wurden genutzt, um DLBCL Zelllinien stabil zu transduzieren (Abbildung 28)<sup>68,203</sup>.

### 4.10.1 Transfektion eukaryotischer 293TCeB Zellen

Die eukaryotischen, adhärenenten 293TCeB *Packaging*-Linie wurden mit PBS gewaschen, durch Trypsin-EDTA-Verdau gelöst und in OPTI-MEM® resuspendiert. 7000 ng retroviralen Expressionsplasmids, jeweils 3000 ng der Helferplasmide pHIT/EA6x3 und pHIT60, 10  $\mu$ l Lipofectamine® 2000 sowie 1 x 10<sup>6</sup> 293TCeB Zellen wurden in 3 ml OPTI-MEM® aufgenommen und 3 – 5h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von 3 ml DMEM. Jeweils nach 48h und 72h Kultivierung wurde der Überstand mit Virionen zur retroviralen Transduktion gewonnen (modifiziert nach Ngo *et al.*, 2013)<sup>203</sup>.



**Abbildung 28:** Schematischer Ablauf der retroviralen Transduktion. Initial erfolgte die Transfektion von 293TCeB Zellen zur Produktion von Virionen. Mit diesen Virionen wurden DLBCL Zelllinien infiziert, woraufhin der retrovirale Expressionsvektor als Provirus stabil in die DNA der DLBCL Zielzelle integriert wurde. Infizierte DLBCL Zellen ließen sich anhand von Markern identifizieren und selektionieren. Transduzierte DLBCL Zelllinien dienen als Grundlage für die funktionellen *in vitro* Studien der vorliegenden Arbeit.

#### **4.10.2 Retrovirale Transduktion von DLBCL Zelllinien**

24h vor der Transduktion wurden die DLBCL Zelllinien gesplittet, um einen möglichst proliferativen Zustand zu garantieren. Der virionenhaltige Überstand der transfizierten 293TCeB Zellen (siehe 4.10.1) wurde durch Filtropur S 0,45 Filtereinheiten steril filtriert und mit 1 µg/ml Hexadimethrinbromid supplementiert. Zu mindestens 1 ml Virionen-Überstand wurden 0,4-0,6 ml Zellsuspension gegeben. Die Infektion der Zielzellen erfolgte bei 90-minütiger Zentrifugation bei 2500 rpm und RT. Nach der Transduktion wurde 1 ml der entsprechenden Kulturmedien zu den transduzierten Zellen gegeben. In der Regel nach 48h Inkubation erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Infektionsraten.

#### **4.10.3 Selektionierung transduzierter DLBCL Zellen**

Die retroviralen Expressionsvektoren pRSMX und pRetro ermöglichten durch Ko-Transduktion eines Puromycin-Resistenz-Gens die Selektionierung transduzierter Zellen durch Zugabe von 3 µg/ml des Antibiotikums Puromycin für 72h. Danach erfolgten die erneute Kontrolle der Infektionsraten und die weitere Kultivierung selektionierter Zellen.

#### **4.10.4 Expression von shRNAs**

Die Expression von shRNAs wurde durch Zugabe von Doxycyclin aktiviert. Unter Normalbedingungen reprimierte der TR die Expression der shRNA. Durch die Zugabe von 40 µg/ml Doxycyclin wurde die Repression durch den TR unterbunden und die shRNA exprimiert und prozessiert. Die Zugabe von Doxycyclin und frischem Medium erfolgte alle 48h parallel zur durchflusszytometrischen Analyse.

#### 4.10.5 Expression von cDNAs

Die Expression exogener cDNAs war je nach genutztem Vektor unterschiedlich. Aufgrund der Aktivität des Promotors des pMSCV-IRES-GFP wurden cDNAs in diesem Vektor konstitutiv exprimiert. Die Infektionsraten der transduzierten Populationen wurde alle 48h durchflusszytometrisch überprüft und frisches Medium zu den Zellen gegeben.

Die Expression von cDNAs in pRetro-Vektoren wurde durch Zugabe von Doxycyclin induziert. Die Zugabe von 40 µg/ml Doxycyclin und frischem Medium erfolgte alle 48h parallel zur durchflusszytometrischen Analyse.

#### 4.10.6 Ko-Expressionsexperimente

Für cDNA Ko-Expressionsexperimente bei DLBCL Zelllinien mussten zwei Transduktionen, wie unter Abschnitt 4.10.2 beschrieben, durchgeführt werden. Im ersten Schritt wurden die DLBCL Linien mit *MYC* bzw. *caAKT* cDNA im pRetro-Puro-Expressionssystem ohne GFP-Marker transduziert. Zur Kontrolle der Experimente erfolgte die Transduktion des Leervektors. Daraufhin wurde eine Puromycin-Selektionierung wie unter Punkt 4.10.3 durchgeführt.

Im zweiten Schritt wurden die selektionierten Zellen mit *PTEN* cDNA im pMSCV-IRES-GFP-System bzw. mit dem Leervektor transduziert. Dadurch wurde auch GFP transduziert, so dass die Entwicklung der transduzierten Populationen, mit zwei transduzierten cDNAs, durchflusszytometrisch beobachtet werden konnte.

Die Ko-Expression von *MYC* cDNA und shRNAs erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Zuerst erfolgte die Transduktion der *MYC* cDNA im pRetro-Puro und die Selektionierung wie oben beschrieben. Im zweiten Schritt wurden die selektionierten Zellen mit den *MYC* shRNA-Konstrukten bzw. der Kontroll-shRNA transduziert. Durch den shRNA-Expressionsvektor pRSMX wurde auch GFP transduziert, so dass die Entwicklung der transduzierten Populationen durchflusszytometrisch bestimmt werden konnte.

## 4.11 Durchflusszytometrische Analysen

Durchflusszytometrische Analysen erfolgten am FACS Calibur und zur Auswertung wurde die CellQuest Pro Software (BD Bioscience) benutzt.

### 4.11.1 Durchflusszytometrische Analyse transduzierter Zellen

Durchflusszytometrische Analysen zur Überprüfung der Infektionsraten nach retroviraler Transduktion und zur Überwachung der Entwicklung transduzierter Populationen erfolgten alle 48h. Transduzierte Zellen wurden in PBS aufgenommen und Propidiumiodid-Lösung (PI) in einer Verdünnung von 1:10000 hinzugefügt. Im Vorwärts (FSC) bzw. Seitwärtsstreulicht (SSC) wurde die vitale Zellpopulation selektiert. Die GFP-Fluoreszenz (FL1-Kanal) sowie die PI-Fluoreszenz (FL2-Kanal) der vitalen Zellpopulation wurden bei mindestens 15.000 Zellen gemessen. Daraus ergaben sich Verhältnisse von GFP<sup>+</sup> zu GFP<sup>-</sup> Zellen, die normalisiert auf die Leervektor-Kontrolle, die Entwicklung transduzierter Populationen beschrieben.

### 4.11.2 Durchflusszytometrische Analyse der Zellteilung

Die durchflusszytometrischen Analysen zur Überwachung der Zellteilung erfolgten durch SNARF1-Färbung und gleichzeitige Transduktion der *PTEN* cDNA im pMSCV-IRES-GFP-Expressionssystem. Initial erfolgte die irreversible Färbung der DLBCL Zelllinien mit SNARF-1. Dazu wurden die DLBCL Zelllinien einmalig mit PBS gewaschen und mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^6$  in 1 ml PBS resuspendiert. Danach wurden 5  $\mu$ l einer 1 mM SNARF-1-Lösung zugegeben (gelöst in DMSO) und 20min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Schließlich erfolgte die Zugabe von 1 ml FCS und das zweimalige waschen mit RPMI. Daraufhin wurde eine Transduktion der gefärbten Zellen mit *PTEN* cDNA bzw. Leervektor nach Abschnitt 4.10.2 durchgeführt. Die Abnahme der SNARF-1-Intensität (FL3-Kanal) und somit die Zellteilung der *PTEN*-transduzierten Populationen (FL1-Kanal) wurde alle 48h durchflusszytometrisch gemessen.

### 4.11.3 Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose

Die durchflusszytometrischen Analysen zur Induktion von Apoptose wurden mit der Transduktion der *PTEN* cDNA im pMSCV-IRES-GFP Vektorsystem begonnen. Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurde das PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I gemäß den Angaben des Herstellers genutzt. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden erst die transduzierten, GFP<sup>+</sup> Zellen (FL1-Kanal) ausgewählt und auf Annexin-Färbung (FL2-Kanal) sowie 7-AAD-Färbung (FL3-Kanal) untersucht.

## 4.12 Komparative genomische Hybridisierung

Die arraybasierte komparative Genomhybridisierung der GCB DLBCL Zelllinien wurde mit extrahierter genomischer DNA durch die Firma Imagenes, Berlin auf der Basis der Human CGH 3x720K Whole-Genome Tiling v3.0 Array- Plattform (NimbleGen) durchgeführt. Die Rohdaten für DB und RL wurden in der GEO-Datenbank hinterlegt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; GSE45495). Die Datensätze der restlichen Zelllinien (BJAB, HBL-1, HT, K422, OCI-Ly1, OCI-Ly2, OCI-Ly7, OCI-Ly10, SUDHL-10, TMD-8) waren im Vorfeld publiziert worden<sup>71</sup> und wurden der GEO-Datenbank (GSE43272) entnommen. Die bioinformatische Analyse<sup>48</sup> der Daten erfolgte in enger Kooperation mit Michael Grau. Alle Aberrationen wurden relativ zu einer männlichen Kontrollprobe bestimmt, deren individuelle Kopienzahl-Aberrationen relativ zu einem DNA-Pool bestimmt und ausgeschlossen wurden.

## 4.13 Genomweite Genexpressionsanalysen

Zur Untersuchung der Veränderungen des Genexpressionsprofils wurde die DLBCL Zelllinie HT mit der *PTEN* cDNA im selektier- und induzierbaren Expressionsvektor pRetro-PURO-GFP nach Abschnitt 4.10.1 transduziert. Es folgten die Überprüfung der Infektionsrate und die Selektionierung nach Abschnitt 4.11.1 und 4.10.3. Die Induktion der *PTEN*-Expression erfolgte nach Abschnitt 4.10.5. Jeweils 6h, 12h, 18h und 24h

nach Doxycyclinzugabe wurden Proben zur RNA-Gewinnung nach Abschnitt 4.9.3 gewonnen.

#### 4.13.1 Illumina HT-12 v4 Mikroarrays

Die Genexpressionsstudien wurden mit dem HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit durchgeführt. Es wurden die Veränderungen im Genexpressionsprofil bei *PTEN*-transduzierten Zellen im Vergleich zu Leervektor-transduzierten Zellen ermittelt. Die *PTEN*-induzierten Veränderungen der Genexpression wurden zweimalig bei unabhängigen biologischen Replikaten ermittelt. Die RNA Proben wurden mit dem TotalPrep RNA Amplification Kit gemäß den Angaben des Herstellers transkribiert und biotinyliert. Die Hybridisierung der Proben sowie die Signaldetektion wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Die bioinformatischen Analysen wurden zusammen mit Michael Grau durchgeführt<sup>169</sup>. Die Genexpressionen wurden nach 6h, 12h, 18h und 24h *PTEN*-Expression in jeweils zwei Replikaten gemessen. Signifikant über alle Zeitpunkte und Replikate regulierte Gene wurden via gepaarter t-Tests ermittelt. Zu  $P = 0,00025$  erhält man die in dieser Arbeit definierte *PTEN*-Signatur aus höchst-signifikant deregulierten Genen (Anhang: Tabelle 10)

Weiterhin wurde mittels *Gene Set Enrichment*-Analyse nach der Methode von *Subramian et al.*<sup>180</sup> in einer Datenbank von Genexpressionssignaturen<sup>179,180</sup> nach bekannten Signaturen gesucht, die mit hochregulierten bzw. herunterregulierten Genen infolge *PTEN*-Überexpression signifikant angereichert waren. Die FDRs der Signaturen wurden relativ zur jeweiligen Signaturfamilie berechnet wie in der Ergebnistabelle (Anhang: Tabelle 11) angegeben.

## 4.14 Nachweis von Proteinen mittels Immuno-Blot

### 4.14.1 Extraktion von Proteinen

DLBCL Zellen wurden pelletiert und einmal mit PBS (4°C) gewaschen. Daraufhin wurden die Pellets in Phosphosafe Extraction Reagent (mit 1x cOmplete Protease Inhibitor Cocktail) lysiert. Zur Extraktion von Proteinen aus Patientenbiopsien wurden Kryoschnitte in Phosphosafe Extraction Reagent (mit 1x cOmplete Protease Inhibitor Cocktail) lysiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben.

### 4.14.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Herstellung 12%iger SDS-Gele erfolgte nach folgendem Protokoll:

Trenngel:

- 2,64 ml H<sub>2</sub>O
- 1,8 ml Rotiphorese Gel 40
- 1,5 ml Trenngel-Puffer
- 0,002 ml TEMED
- 0,06 ml 10%iges APS

Sammelgel:

- 1,46 ml H<sub>2</sub>O
- 0,25 ml Rotiphorese Gel 40
- 0,273 ml Sammelgel-Puffer
- 0,002 ml TEMED
- 0,02 ml 10%iges APS

Proteinlysate wurden nach der Methode von *Lämmli* denaturiert und durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt<sup>212</sup>. Dazu wurden bis zu 100 µg Protein in 5 x Ladepuffer aufgenommen und 5min bei 98°C denaturiert. Daraufhin erfolgten die Beladung 12%iger SDS-PAGE-Gele und die elektrophoretische Auftrennung der denaturierten Proteine bei 15 mA pro Gel in SDS-Laufpuffer. Als Größenmarker wurde bei jedem Gel Page Ruler Prestained Protein Ladder mitgeführt.

#### **4.14.3 Immuno-Blot**

Um einen spezifischen, immunologischen Nachweis von Proteinen zu ermöglichen wurden aufgetrennte Proteine aus SDS-PAGE-Gelen auf PVDF-Membranen transferiert. Die Membranen wurden in Methanol aktiviert und in Blotting-Puffer equilibriert. Der Zusammenbau des Blotting-Sandwichs erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers des Mini-Protean Tetra Systems. Der Transfer erfolgte in Blotting-Puffer bei 100 V und max. 300 mA für 1,5h. Danach wurde die Membran in PBS-T mit 5% Milchpulver geblockt.

#### **4.14.4 Detektion von Proteinen**

Geblockte Membranen wurden mit spezifischen, kommerziellen Antikörpern 1:1000 verdünnt in PBS-T + 5% Magermilchpulver bei 4°C ÜN auf einem Rollenschüttler inkubiert. Die Membran wurde dreimal 5 min in PBS-T auf einem Schüttler gewaschen und mit HRP-konjugierten sekundären Antikörpern (1:10000 in PBS-T + 5% Magermilchpulver) 1h bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgten drei Waschschrte für 5min mit PBS-T. Im Anschluss erfolgte die Detektion mittels Lumi-Light Western Blotting Substrate nach Herstellerangaben. Die Detektion der enzymatischen Nachweisreaktion erfolgte am ImageQuant LAS 4000.

## 4.15 Viabilitätsmessungen

Viabilitätsmessungen wurden mittels des Cell Proliferation Kit II (XTT) nach Herstellerangaben durchgeführt. 100 µl DLBCL Zellliniensuspension ( $5 \times 10^4$  Zellen pro ml) wurden in 96-well-Platten pipettiert und für 96h bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C mit verschiedenen Konzentrationen des pan-PI3K-Inhibitors Ly294002 (10 mM, gelöst in DMSO) inkubiert. Die Inkubation mit XTT-Reagenzien erfolgte für 6h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, kolorimetrische Signale wurden am Victor 3X 1420 Multilabel Counter detektiert. Alle Proben wurden auf die höchste eingesetzte DMSO-Konzentration ohne Inhibitor als Kontrolle normalisiert.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) repräsentieren den häufigsten Subtyp maligner Lymphome. Sie stellen bezüglich ihrer Morphologie, Biologie, und ihres klinischen Verlaufes eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen dar. Durch genomweite Genexpressionsstudien konnten zwei vorherrschende DLBCL Subtypen identifiziert werden. Um das Verständnis der Pathogenese dieser Subtypen zu verbessern, wurde die Expression des Tumorsuppressors PTEN (phosphatase tensin homolog) bei 248 DLBCL Patientenproben analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass PTEN-Verlust bei 55 % der DLBCL Biopsien des Keimzentrums-B-Zell Subtyps (GCB DLBCL) auftrat. Im Gegensatz dazu traten diese Veränderungen nur bei 14 % der nicht-GCB DLBCL auf. Der Verlust von PTEN war bei GCB DLBCL mit der Aktivierung der PI3K/Proteinkinase B (AKT)-Signalkaskade assoziiert. Re-Expression von PTEN verminderte die AKT-Aktivität und induzierte Zytotoxizität bei PTEN-defizienten DLBCL Zelllinienmodellen. Diese Ergebnisse implizieren eine Abhängigkeit PTEN-defizienter GCB DLBCL von onkogener PI3K/AKT-Aktivität. Die Hemmung der PI3K/AKT-Kaskade führte zur Herunterregulation des Transkriptionsfaktors MYC, wodurch eine neuartige Regulation der MYC Expression bei DLBCL identifiziert werden konnte. So konnte eine Abhängigkeit der GCB DLBCL von MYC dargestellt und die PTEN-induzierte Zytotoxizität durch Expression von MYC kompensiert werden. Zuletzt reduzierte die pharmakologische Inhibition der PI3K mittels spezifischer Inhibition die zelluläre Viabilität selektiv bei PTEN-defizienten GCB DLBCL Zelllinien. PI3K stellt dementsprechend eine vielversprechende, therapeutische Zielstruktur für die zukünftige Behandlung dieser Lymphom-Entität dar. Zusammenfassend definieren die Ergebnisse dieser Arbeit einen neuen, PTEN-defizienten und von konstitutiv-aktiven PI3K/AKT-Signalen und MYC abhängigen DLBCL Subtyp.

## 6 SUMMARY

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) represents the most frequent lymphoma subtype in adults. DLBCL is a heterogeneous diagnostic category with respect to biology, morphology and clinical outcome. Two predominant molecular DLBCL subtypes have been identified by gene expression profiling. However, within these subtypes heterogeneity prevails. To obtain further insights into the molecular pathogenesis of this entity the expression of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) was determined in 248 DLBCL biopsies. These analyses revealed that PTEN loss was observed in 55 % of germinal center B-cell-like (GCB) DLBCL in contrast to only 14 % of non-GCB DLBCL patient samples. In GCB DLBCL, loss of PTEN was inversely correlated with activation of the oncogenic PI3K/ protein kinase B (AKT) signaling cascade in both DLBCL cell lines and patient samples. Re-expression of PTEN induced cytotoxicity selectively in PTEN-deficient GCB DLBCL cell line models by impairing PI3K/AKT signals. These findings imply an addiction to this pathway in a subgroup of GCB DLBCLs. The inhibition of PI3K/AKT signals triggered the down-regulation of the transcription factor MYC. In line, MYC overexpression compensated PTEN-induced toxicity in GCB DLBCL cells, highlighting a novel regulatory mechanism of MYC in DLBCL. Finally, pharmacological inhibition of PI3K decreased viability selectively in PTEN-deficient GCB DLBCL cell lines. These results indicate that loss of PTEN expression in subsets of GCB DLBCL defines a new PI3K/AKT and MYC addicted subtype for which PI3K represents a promising target for future therapies.

## 7 REFERENZEN

- 1 Murphy, K. P., Janeway, C. A., Travers, P. & Walport, M. *Janeway's immunobiology*. 8. edn, (Garland Science, 2012).
- 2 Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M. L. & Rajewsky, K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *The New England journal of medicine* **341**, 1520-1529, doi:10.1056/NEJM199911113412007 (1999).
- 3 Lenz, G. & Staudt, L. M. Aggressive lymphomas. *The New England journal of medicine* **362**, 1417-1429, doi:10.1056/NEJMra0807082 (2010).
- 4 Weigert, O. & Weinstock, D. M. The evolving contribution of hematopoietic progenitor cells to lymphomagenesis. *Blood* **120**, 2553-2561, doi:10.1182/blood-2012-05-414995 (2012).
- 5 Ferlay, J. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **127**, 2893-2917, doi:10.1002/ijc.25516 (2010).
- 6 Greaves, M. & Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306-313, doi:10.1038/nature10762 (2012).
- 7 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 8 Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-28 (1976).
- 9 Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J. & Maley, C. C. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews. Cancer* **6**, 924-935, doi:10.1038/nrc2013 (2006).
- 10 Navin, N. *et al.* Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* **472**, 90-94, doi:10.1038/nature09807 (2011).
- 11 Anderson, K. *et al.* Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* **469**, 356-361, doi:10.1038/nature09650 (2011).
- 12 Zhang, J. *et al.* Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 1398-1403, doi:10.1073/pnas.1205299110 (2013).
- 13 Bea, S. *et al.* Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 18250-18255, doi:10.1073/pnas.1314608110 (2013).
- 14 Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Medico-chirurgical transactions* **17**, 68-114 (1832).
- 15 Gall, E. A. & Mallory, T. B. Malignant Lymphoma: A Clinico-Pathologic Survey of 618 Cases. *The American journal of pathology* **18**, 381-429 (1942).
- 16 Lennert, K. Morphology and classification of malignant lymphomas and so-called reticuloses. *Acta neuropathologica. Supplementum Suppl* **6**, 1-16 (1975).
- 17 Hicks, E. B., Rappaport, H. & Winter, W. J. Follicular lymphoma; a re-evaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. *Cancer* **9**, 792-821 (1956).
- 18 Aisenberg, A. C. Historical review of lymphomas. *British journal of haematology* **109**, 466-476 (2000).
- 19 Harris, N. L. *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361-1392 (1994).
- 20 Jaffe, E. S. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 523-531, doi:10.1182/asheducation-2009.1.523 (2009).
- 21 Campo, E. *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* **117**, 5019-5032, doi:10.1182/blood-2011-01-293050 (2011).
- 22 Jaffe, E. S. & Pittaluga, S. Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2011**, 506-514, doi:10.1182/asheducation-2011.1.506 (2011).
- 23 Ramirez, J., Lukin, K. & Hagman, J. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Current opinion in immunology* **22**, 177-184, doi:10.1016/j.coi.2010.02.003 (2010).

- 24 LeBien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570-1580, doi:10.1182/blood-2008-02-078071 (2008).
- 25 Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751-758, doi:10.1038/381751a0 (1996).
- 26 Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. & Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* **248**, 1517-1523 (1990).
- 27 Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. & Alt, F. W. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annual review of immunology* **24**, 541-570, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115830 (2006).
- 28 Muramatsu, M. *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-563 (2000).
- 29 Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U. Intracloal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* **354**, 389-392, doi:10.1038/354389a0 (1991).
- 30 Klein, U. & Dalla-Favera, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature reviews. Immunology* **8**, 22-33, doi:10.1038/nri2217 (2008).
- 31 Nieuwenhuis, P. & Opstelten, D. Functional anatomy of germinal centers. *The American journal of anatomy* **170**, 421-435, doi:10.1002/aja.1001700315 (1984).
- 32 Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. Germinal centers. *Annual review of immunology* **30**, 429-457, doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075032 (2012).
- 33 Muramatsu, M. *et al.* Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *The Journal of biological chemistry* **274**, 18470-18476 (1999).
- 34 Martin, A. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature* **415**, 802-806, doi:10.1038/nature714 (2002).
- 35 MacLennan, I. C. Germinal centers. *Annual review of immunology* **12**, 117-139, doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001001 (1994).
- 36 Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D. & Staudt, L. M. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* **276**, 589-592 (1997).
- 37 Ye, B. H. *et al.* The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nature genetics* **16**, 161-170, doi:10.1038/ng0697-161 (1997).
- 38 Basso, K. & Dalla-Favera, R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Advances in immunology* **105**, 193-210, doi:10.1016/S0065-2776(10)05007-8 (2010).
- 39 Lee, C. H. *et al.* Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. *The Journal of experimental medicine* **203**, 63-72, doi:10.1084/jem.20051450 (2006).
- 40 Reljic, R., Wagner, S. D., Peakman, L. J. & Fearon, D. T. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *The Journal of experimental medicine* **192**, 1841-1848 (2000).
- 41 Shaffer, A. L. *et al.* BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* **13**, 199-212 (2000).
- 42 Shaffer, A. L. *et al.* Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17**, 51-62 (2002).
- 43 Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K. I. & Calame, K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol* **165**, 5462-5471 (2000).
- 44 A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* **89**, 3909-3918 (1997).
- 45 World Health Organization, Swerdlow, S. H. & International Agency for Research on Cancer. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues : [... reflects the views of a working group that convened for an Editorial and Consensus Conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, October 25 - 27, 2007]*. 4. edn, (Internat. Agency for Research on Cancer, 2008).
- 46 Nogai, H., Dorken, B. & Lenz, G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 1803-1811, doi:10.1200/JCO.2010.33.3252 (2011).
- 47 Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-511, doi:10.1038/35000501 (2000).
- 48 Lenz, G. *et al.* Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 13520-13525, doi:10.1073/pnas.0804295105 (2008).

- 49 Lenz, G. *et al.* Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *The New England journal of medicine* **359**, 2313-2323, doi:10.1056/NEJMoa0802885 (2008).
- 50 Pfreundschuh, M. *et al.* CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *The lancet oncology* **7**, 379-391, doi:10.1016/S1470-2045(06)70664-7 (2006).
- 51 Coiffier, B. *et al.* 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**, 2040-2045, doi:10.1182/blood-2010-03-276246 (2010).
- 52 Coiffier, B. *et al.* CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* **346**, 235-242, doi:10.1056/NEJMoa011795 (2002).
- 53 Wright, G. *et al.* A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 9991-9996, doi:10.1073/pnas.1732008100 (2003).
- 54 Pfeifer, M. & Lenz, G. PI3K/AKT addiction in subsets of diffuse large B-cell lymphoma. *Cell Cycle* **12**, 3347-3348, doi:10.4161/cc.26575 (2013).
- 55 Lenz, G. *et al.* Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of experimental medicine* **204**, 633-643, doi:10.1084/jem.20062041 (2007).
- 56 Cattoretti, G. *et al.* Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* **107**, 3967-3975, doi:10.1182/blood-2005-10-4170 (2006).
- 57 Tam, W. *et al.* Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **107**, 4090-4100, doi:10.1182/blood-2005-09-3778 (2006).
- 58 Pasqualucci, L. *et al.* Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of experimental medicine* **203**, 311-317, doi:10.1084/jem.20052204 (2006).
- 59 Iqbal, J. *et al.* Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **21**, 2332-2343, doi:10.1038/sj.leu.2404856 (2007).
- 60 Saito, M. *et al.* A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer cell* **12**, 280-292, doi:10.1016/j.ccr.2007.08.011 (2007).
- 61 Schmidlin, H. *et al.* Spi-B inhibits human plasma cell differentiation by repressing BLIMP1 and XBP-1 expression. *Blood* **112**, 1804-1812, doi:10.1182/blood-2008-01-136440 (2008).
- 62 Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U. & Staudt, L. M. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *The Journal of experimental medicine* **194**, 1861-1874 (2001).
- 63 Nogai, H. *et al.* IkappaB-zeta controls the constitutive NF-kappaB target gene network and survival of ABC DLBCL. *Blood*, doi:10.1182/blood-2013-06-508028 (2013).
- 64 Compagno, M. *et al.* Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **459**, 717-721, doi:10.1038/nature07968 (2009).
- 65 Lenz, G. *et al.* Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* **319**, 1676-1679, doi:10.1126/science.1153629 (2008).
- 66 Ngo, V. N. *et al.* Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* **470**, 115-119, doi:10.1038/nature09671 (2011).
- 67 Thome, M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nature reviews. Immunology* **4**, 348-359, doi:10.1038/nri1352 (2004).
- 68 Ngo, V. N. *et al.* A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* **441**, 106-110, doi:10.1038/nature04687 (2006).
- 69 Davis, R. E. *et al.* Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **463**, 88-92, doi:10.1038/nature08638 (2010).
- 70 Iqbal, J. *et al.* BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *The American journal of pathology* **165**, 159-166 (2004).
- 71 Wenzel, S. S. *et al.* MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **27**, 1381-1390, doi:10.1038/leu.2012.367 (2013).
- 72 Zainuddin, N. *et al.* TP53 mutations predict for poor survival in de novo diffuse large B-cell lymphoma of germinal center subtype. *Leukemia research* **33**, 60-66, doi:10.1016/j.leukres.2008.06.022 (2009).

- 73 Young, K. H. *et al.* Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood* **112**, 3088-3098, doi:10.1182/blood-2008-01-129783 (2008).
- 74 Morin, R. D. *et al.* Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature genetics* **42**, 181-185, doi:10.1038/ng.518 (2010).
- 75 Pasqualucci, L. *et al.* Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* **471**, 189-195, doi:10.1038/nature09730 (2011).
- 76 Pasqualucci, L. *et al.* Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nature genetics* **43**, 830-837, doi:10.1038/ng.892 (2011).
- 77 Honma, K. *et al.* TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **114**, 2467-2475, doi:10.1182/blood-2008-12-194852 (2009).
- 78 Natkunam, Y. *et al.* The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. *Blood* **109**, 1636-1642, doi:10.1182/blood-2006-08-039024 (2007).
- 79 Rosenwald, A. *et al.* The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* **346**, 1937-1947, doi:10.1056/NEJMoa012914 (2002).
- 80 Bereshchenko, O. R., Gu, W. & Dalla-Favera, R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nature genetics* **32**, 606-613, doi:10.1038/ng1018 (2002).
- 81 Ci, W. *et al.* The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* **113**, 5536-5548, doi:10.1182/blood-2008-12-193037 (2009).
- 82 Saito, M. *et al.* BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 11294-11299, doi:10.1073/pnas.0903854106 (2009).
- 83 Bakhshi, A. *et al.* 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**, 899-906 (1985).
- 84 Yang, J. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132 (1997).
- 85 Phan, R. T. & Dalla-Favera, R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* **432**, 635-639, doi:10.1038/nature03147 (2004).
- 86 Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. & Levine, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-1245 (1992).
- 87 Kruse, J. P. & Gu, W. Modes of p53 regulation. *Cell* **137**, 609-622, doi:10.1016/j.cell.2009.04.050 (2009).
- 88 Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233, doi:10.1016/j.cell.2009.01.002 (2009).
- 89 Xiao, C. *et al.* Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nature immunology* **9**, 405-414, doi:10.1038/ni1575 (2008).
- 90 Uddin, S. *et al.* Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* **108**, 4178-4186, doi:10.1182/blood-2006-04-016907 (2006).
- 91 Kloo, B. *et al.* Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 272-277, doi:10.1073/pnas.1008969108 (2011).
- 92 Bigner, S. H., Mark, J., Mahaley, M. S. & Bigner, D. D. Patterns of the early, gross chromosomal changes in malignant human gliomas. *Hereditas* **101**, 103-113 (1984).
- 93 Li, J. *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947 (1997).
- 94 Steck, P. A. *et al.* Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature genetics* **15**, 356-362, doi:10.1038/ng0497-356 (1997).
- 95 Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P. P. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nature genetics* **19**, 348-355 (1998).
- 96 Suzuki, A. *et al.* High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Current Biology* **8**, 1169-1178, doi:Doi 10.1016/S0960-9822(07)00488-5 (1998).
- 97 Podsypanina, K. *et al.* Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1563-1568 (1999).

- 98 Suzuki, A. *et al.* Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of experimental medicine* **197**, 657-667 (2003).
- 99 Berger, A. H., Knudson, A. G. & Pandolfi, P. P. A continuum model for tumour suppression. *Nature* **476**, 163-169, doi:10.1038/nature10275 (2011).
- 100 Alimonti, A. *et al.* Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nature genetics* **42**, 454-458, doi:10.1038/ng.556 (2010).
- 101 Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-730, doi:10.1038/nature03918 (2005).
- 102 Braig, M. & Schmitt, C. A. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer research* **66**, 2881-2884, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4006 (2006).
- 103 Alimonti, A. *et al.* A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation* **120**, 681-693, doi:10.1172/JCI40535 (2010).
- 104 Maehama, T. & Dixon, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* **273**, 13375-13378 (1998).
- 105 Myers, M. P. *et al.* P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9052-9057 (1997).
- 106 Lee, J. O. *et al.* Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323-334 (1999).
- 107 Stambolic, V. *et al.* Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29-39 (1998).
- 108 Das, S., Dixon, J. E. & Cho, W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 7491-7496, doi:10.1073/pnas.0932835100 (2003).
- 109 Zhang, S. & Yu, D. PI(3)king apart PTEN's role in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **16**, 4325-4330, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2990 (2010).
- 110 Song, M. S., Salmena, L. & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 283-296, doi:10.1038/nrm3330 (2012).
- 111 Maehama, T. & Dixon, J. E. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends in cell biology* **9**, 125-128 (1999).
- 112 Shen, W. H. *et al.* Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* **128**, 157-170, doi:DOI 10.1016/j.cell.2006.11.042 (2007).
- 113 Smiraldi, P. G., Gruver, A. M., Osborn, J. C. & Pittman, D. L. Extensive chromosomal instability in Rad51d-deficient mouse cells. *Cancer research* **65**, 2089-2096, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2079 (2005).
- 114 Song, M. S. *et al.* Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* **144**, 187-199, doi:10.1016/j.cell.2010.12.020 (2011).
- 115 Liu, X. S. *et al.* Polo-like kinase 1 facilitates loss of Pten tumor suppressor-induced prostate cancer formation. *The Journal of biological chemistry* **286**, 35795-35800, doi:10.1074/jbc.C111.269050 (2011).
- 116 Gimm, O., Attie-Bitach, T., Lees, J. A., Vekemans, M. & Eng, C. Expression of the PTEN tumour suppressor protein during human development. *Human molecular genetics* **9**, 1633-1639 (2000).
- 117 Gimm, O. *et al.* Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *The American journal of pathology* **156**, 1693-1700, doi:10.1016/S0002-9440(10)65040-7 (2000).
- 118 Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333-339, doi:10.1038/nature12634 (2013).
- 119 Beroukhi, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899-905, doi:10.1038/nature08822 (2010).
- 120 Alvarez-Nunez, F. *et al.* PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* **16**, 17-23, doi:10.1089/thy.2006.16.17 (2006).
- 121 Lahtz, C., Stranzenbach, R., Fiedler, E., Helmbold, P. & Dammann, R. H. Methylation of PTEN as a prognostic factor in malignant melanoma of the skin. *The Journal of investigative dermatology* **130**, 620-622, doi:10.1038/jid.2009.226 (2010).

- 122 Escriva, M. *et al.* Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology* **28**, 1528-1540, doi:10.1128/MCB.02061-07 (2008).
- 123 Lee, J. Y. *et al.* Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27(Kip1) phosphorylation through PTEN inhibition. *Oncogene* **28**, 824-831, doi:10.1038/onc.2008.451 (2009).
- 124 Poliseno, L. *et al.* A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* **465**, 1033-1038, doi:10.1038/nature09144 (2010).
- 125 Vazquez, F. *et al.* Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *The Journal of biological chemistry* **276**, 48627-48630, doi:10.1074/jbc.C100556200 (2001).
- 126 Liang, K. *et al.* Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation. *Cancer cell* **18**, 423-435, doi:10.1016/j.ccr.2010.10.025 (2010).
- 127 Yim, E. K. *et al.* Rak functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and function. *Cancer cell* **15**, 304-314, doi:10.1016/j.ccr.2009.02.012 (2009).
- 128 Okumura, K. *et al.* PCAF modulates PTEN activity. *The Journal of biological chemistry* **281**, 26562-26568, doi:10.1074/jbc.M605391200 (2006).
- 129 Lee, S. R. *et al.* Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *The Journal of biological chemistry* **277**, 20336-20342, doi:10.1074/jbc.M111899200 (2002).
- 130 Wang, X. *et al.* NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell* **128**, 129-139, doi:10.1016/j.cell.2006.11.039 (2007).
- 131 Bunney, T. D. & Katan, M. Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nature reviews. Cancer* **10**, 342-352, doi:10.1038/nrc2842 (2010).
- 132 Vanhaesebroeck, B., Stephens, L. & Hawkins, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 195-203, doi:10.1038/nrm3290 (2012).
- 133 Limon, J. J. & Fruman, D. A. B cell receptor signaling: picky about PI3Ks. *Science signaling* **3**, pe25, doi:10.1126/scisignal.3134pe25 (2010).
- 134 Whitman, M., Downes, C. P., Keeler, M., Keller, T. & Cantley, L. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* **332**, 644-646, doi:10.1038/332644a0 (1988).
- 135 Alessi, D. R. *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO journal* **15**, 6541-6551 (1996).
- 136 Alessi, D. R. *et al.* 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Current biology : CB* **7**, 776-789 (1997).
- 137 Stephens, L. *et al.* Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**, 710-714 (1998).
- 138 Alessi, D. R. *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph $\alpha$ . *Current biology : CB* **7**, 261-269 (1997).
- 139 Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101, doi:10.1126/science.1106148 (2005).
- 140 Bellacosa, A., Kumar, C. C., Di Cristofano, A. & Testa, J. R. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in cancer research* **94**, 29-86, doi:10.1016/S0065-230X(05)94002-5 (2005).
- 141 Wu, H., Goel, V. & Haluska, F. G. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* **22**, 3113-3122, doi:10.1038/sj.onc.1206451 (2003).
- 142 Verhaak, R. G. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* **17**, 98-110, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020 (2010).
- 143 Forgacs, E. *et al.* Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer. *Oncogene* **17**, 1557-1565, doi:10.1038/sj.onc.1202070 (1998).
- 144 Dahia, P. L. *et al.* PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Human molecular genetics* **8**, 185-193 (1999).
- 145 Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274, doi:10.1016/j.cell.2007.06.009 (2007).
- 146 Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241 (1997).

- 147 del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. & Nunez, G. Interleukin-3-induced  
phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687-689 (1997).
- 148 Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K. L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and  
suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* **4**, 648-657, doi:10.1038/ncb839 (2002).
- 149 Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J. & Cantley, L. C. Identification of the  
tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the  
phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell* **10**, 151-162 (2002).
- 150 Potter, C. J., Pedraza, L. G. & Xu, T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2.  
*Nature cell biology* **4**, 658-665, doi:10.1038/ncb840 (2002).
- 151 Tee, A. R., Manning, B. D., Roux, P. P., Cantley, L. C. & Blenis, J. Tuberous sclerosis complex  
gene products, Tuberlin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating  
protein complex toward Rheb. *Current biology : CB* **13**, 1259-1268 (2003).
- 152 Gingras, A. C. *et al.* Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism.  
*Genes & development* **13**, 1422-1437 (1999).
- 153 Porstmann, T. *et al.* SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent  
cell growth. *Cell metabolism* **8**, 224-236, doi:10.1016/j.cmet.2008.07.007 (2008).
- 154 Hudson, C. C. *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by  
the mammalian target of rapamycin. *Molecular and cellular biology* **22**, 7004-7014 (2002).
- 155 Ma, X. M. & Blenis, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature  
reviews. Molecular cell biology* **10**, 307-318, doi:10.1038/nrm2672 (2009).
- 156 Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* **149**, 274-  
293, doi:10.1016/j.cell.2012.03.017 (2012).
- 157 Liang, J. *et al.* PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-  
mediated G1 arrest. *Nature medicine* **8**, 1153-1160, doi:10.1038/nm761 (2002).
- 158 Shin, I. *et al.* PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at  
threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nature medicine* **8**, 1145-1152,  
doi:10.1038/nm759 (2002).
- 159 Viglietto, G. *et al.* Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase  
inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature medicine* **8**,  
1136-1144, doi:10.1038/nm762 (2002).
- 160 Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen  
synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789,  
doi:10.1038/378785a0 (1995).
- 161 Sears, R. *et al.* Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability.  
*Genes & development* **14**, 2501-2514 (2000).
- 162 Yeh, E. *et al.* A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic  
transformation of human cells. *Nature cell biology* **6**, 308-318, doi:10.1038/ncb1110 (2004).
- 163 Nie, Z. *et al.* c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic  
stem cells. *Cell* **151**, 68-79, doi:10.1016/j.cell.2012.08.033 (2012).
- 164 Abubaker, J. *et al.* PIK3CA mutations are mutually exclusive with PTEN loss in diffuse large B-  
cell lymphoma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia  
Research Fund, U.K* **21**, 2368-2370, doi:10.1038/sj.leu.2404873 (2007).
- 165 Liu, Y. Y. *et al.* PTEN tumor suppressor plays less prognostic role than P53 tumor suppressor  
in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* **51**, 1692-1698,  
doi:10.3109/10428194.2010.502584 (2010).
- 166 Naylor, T. L. *et al.* Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79  
mutant diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer research* **71**, 2643-2653, doi:10.1158/0008-  
5472.CAN-10-2525 (2011).
- 167 Hernandez-Ilizaliturri, F. J. *et al.* Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse  
large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like  
phenotype. *Cancer* **117**, 5058-5066, doi:10.1002/cncr.26135 (2011).
- 168 Dunleavy, K. *et al.* Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular  
subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **113**, 6069-6076, doi:10.1182/blood-2009-01-  
199679 (2009).
- 169 Pfeifer, M. *et al.* PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of  
diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United  
States of America* **110**, 12420-12425, doi:10.1073/pnas.1305656110 (2013).
- 170 Meyer, P. N. *et al.* Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in  
patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Journal of clinical oncology :  
official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 200-207,  
doi:10.1200/JCO.2010.30.0368 (2011).

- 171 Sakai, A., Thieblemont, C., Wellmann, A., Jaffe, E. S. & Raffeld, M. PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood* **92**, 3410-3415 (1998).
- 172 Gronbaek, K., Zeuthen, J., Guldberg, P., Ralfkiaer, E. & Hou-Jensen, K. Alterations of the MMAC1/PTEN gene in lymphoid malignancies. *Blood* **91**, 4388-4390 (1998).
- 173 Butler, M. P., Wang, S. I., Chaganti, R. S., Parsons, R. & Dalla-Favera, R. Analysis of PTEN mutations and deletions in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Genes, chromosomes & cancer* **24**, 322-327 (1999).
- 174 MacFarlane, M., Cain, K., Sun, X. M., Alnemri, E. S. & Cohen, G. M. Processing/activation of at least four interleukin-1beta converting enzyme-like proteases occurs during the execution phase of apoptosis in human monocytic tumor cells. *The Journal of cell biology* **137**, 469-479 (1997).
- 175 Ferrari, S., Bannwarth, W., Morley, S. J., Totty, N. F. & Thomas, G. Activation of p70s6k is associated with phosphorylation of four clustered sites displaying Ser/Thr-Pro motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7282-7286 (1992).
- 176 Myers, M. P. *et al.* The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13513-13518 (1998).
- 177 Zhao, J. J. *et al.* Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer cell* **3**, 483-495 (2003).
- 178 Kharas, M. G. *et al.* Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood* **115**, 1406-1415, doi:10.1182/blood-2009-06-229443 (2010).
- 179 Shaffer, A. L. *et al.* A library of gene expression signatures to illuminate normal and pathological lymphoid biology. *Immunological reviews* **210**, 67-85, doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00373.x (2006).
- 180 Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15545-15550, doi:10.1073/pnas.0506580102 (2005).
- 181 Gregory, M. A., Qi, Y. & Hann, S. R. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *The Journal of biological chemistry* **278**, 51606-51612, doi:10.1074/jbc.M310722200 (2003).
- 182 Trotman, L. C. *et al.* Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS biology* **1**, E59, doi:10.1371/journal.pbio.0000059 (2003).
- 183 Gray, I. C. *et al.* Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer research* **55**, 4800-4803 (1995).
- 184 Suzuki, H. *et al.* Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer research* **58**, 204-209 (1998).
- 185 Feilotter, H. E., Nagai, M. A., Boag, A. H., Eng, C. & Mulligan, L. M. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. *Oncogene* **16**, 1743-1748, doi:10.1038/sj.onc.1200205 (1998).
- 186 Hermans, K. G. *et al.* Loss of a small region around the PTEN locus is a major chromosome 10 alteration in prostate cancer xenografts and cell lines. *Genes, chromosomes & cancer* **39**, 171-184, doi:10.1002/gcc.10311 (2004).
- 187 Qian, J. *et al.* Loss of p53 and c-myc overrepresentation in stage T(2-3)N(1-3)M(0) prostate cancer are potential markers for cancer progression. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **15**, 35-44, doi:10.1038/modpathol.3880487 (2002).
- 188 Navone, N. M. *et al.* p53 mutations in prostate cancer bone metastases suggest that selected p53 mutants in the primary site define foci with metastatic potential. *The Journal of urology* **161**, 304-308 (1999).
- 189 Visco, C. *et al.* Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **26**, 2103-2113, doi:10.1038/leu.2012.83 (2012).
- 190 Gutierrez-Garcia, G. *et al.* Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* **117**, 4836-4843, doi:10.1182/blood-2010-12-322362 (2011).

- 191 Natkunam, Y. *et al.* LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 447-454, doi:10.1200/JCO.2007.13.0690 (2008).
- 192 Culpin, R. E. *et al.* Prognostic significance of immunohistochemistry-based markers and algorithms in immunochemotherapy-treated diffuse large B cell lymphoma patients. *Histopathology* **63**, 788-801, doi:10.1111/his.12223 (2013).
- 193 de Jong, D. *et al.* 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 805-812, doi:10.1200/JCO.2006.09.4490 (2007).
- 194 Horn, H. *et al.* MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **121**, 2253-2263, doi:10.1182/blood-2012-06-435842 (2013).
- 195 Johnson, N. A. *et al.* Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **30**, 3452-3459, doi:10.1200/JCO.2011.41.0985 (2012).
- 196 Tzankov, A. *et al.* Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, doi:10.1038/modpathol.2013.214 (2013).
- 197 Prochownik, E. V. & Vogt, P. K. Therapeutic Targeting of Myc. *Genes & cancer* **1**, 650-659, doi:10.1177/1947601910377494 (2010).
- 198 Delmore, J. E. *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* **146**, 904-917, doi:10.1016/j.cell.2011.08.017 (2011).
- 199 Foster, J. G., Blunt, M. D., Carter, E. & Ward, S. G. Inhibition of PI3K signaling spurs new therapeutic opportunities in inflammatory/autoimmune diseases and hematological malignancies. *Pharmacological reviews* **64**, 1027-1054, doi:10.1124/pr.110.004051 (2012).
- 200 Rodon, J., Dienstmann, R., Serra, V. & Tabernero, J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nature reviews. Clinical oncology* **10**, 143-153, doi:10.1038/nrclinonc.2013.10 (2013).
- 201 Cosset, F. L., Takeuchi, Y., Battini, J. L., Weiss, R. A. & Collins, M. K. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *Journal of virology* **69**, 7430-7436 (1995).
- 202 Bupp, K. & Roth, M. J. Altering retroviral tropism using a random-display envelope library. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **5**, 329-335, doi:10.1006/mthe.2002.0546 (2002).
- 203 Ngo, V. N. Identification of pathogenetically relevant genes in lymphomagenesis by shRNA library screens. *Methods Mol Biol* **971**, 245-263, doi:10.1007/978-1-62703-269-8\_14 (2013).
- 204 Lam, L. T. *et al.* Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- $\kappa$ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **111**, 3701-3713, doi:10.1182/blood-2007-09-111948 (2008).
- 205 Walsh, K. *et al.* PAK1 mediates resistance to PI3K inhibition in lymphomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 1106-1115, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1060 (2013).
- 206 O'Reilly, L. & Roth, M. J. G541R within the 4070A TM protein regulates fusion in murine leukemia viruses. *Journal of virology* **77**, 12011-12021 (2003).
- 207 Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553, doi:10.1126/science.1068999 (2002).
- 208 van de Wetering, M. *et al.* Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO reports* **4**, 609-615, doi:10.1038/sj.embor.embor865 (2003).
- 209 Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264, doi:10.1093/biostatistics/4.2.249 (2003).
- 210 Hummel, M. *et al.* A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *The New England journal of medicine* **354**, 2419-2430, doi:10.1056/NEJMoa055351 (2006).

- 211 Nagel, S., Hirschmann, P., Dirnhofer, S., Gunthert, U. & Tzankov, A. 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. *Experimental hematology* **38**, 38-45, doi:10.1016/j.exphem.2009.10.010 (2010).
- 212 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).

## 8 PUBLIKATIONEN

**M. Pfeifer**, G. Lenz, PI3K/AKT addiction in subsets of diffuse large B-cell lymphoma. *Cell Cycle* 12, 3347-3348 (2013).

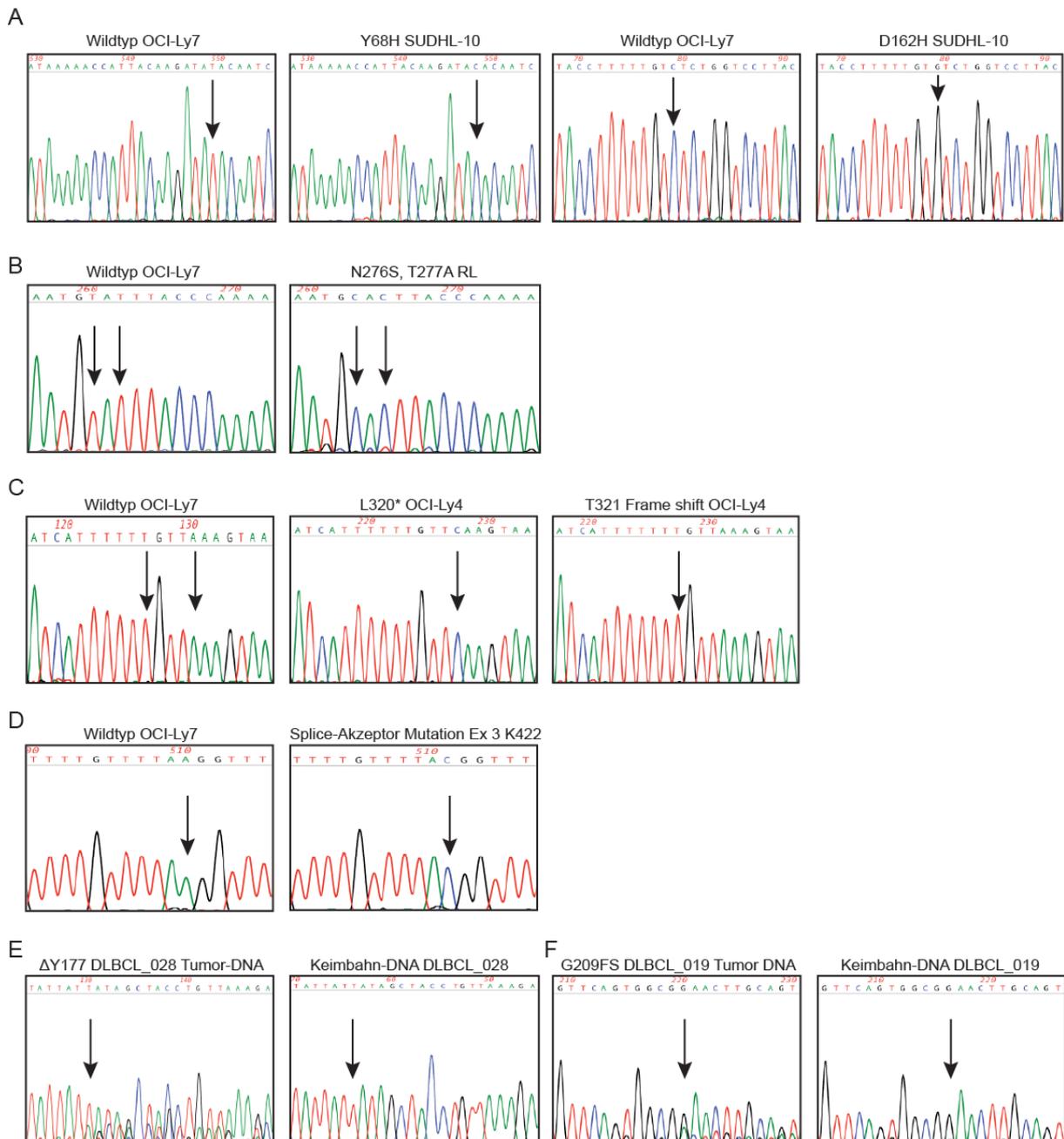
**M. Pfeifer**, M. Grau, D. Lenze, S. S. Wenzel, A. Wolf, B. Wollert-Wulf, K. Dietze, H. Nogai, B. Storek, H. Madle, B. Dorken, M. Janz, S. Dirnhofer, P. Lenz, M. Hummel, A. Tzankov, G. Lenz, PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 12420-12425 (2013).

H. Nogai, S. S. Wenzel, S. Hailfinger, M. Grau, E. Kaergel, V. Seitz, B. Wollert-Wulf, **M. Pfeifer**, A. Wolf, M. Frick, K. Dietze, H. Madle, A. Tzankov, M. Hummel, B. Dorken, C. Scheidereit, M. Janz, P. Lenz, M. Thome, G. Lenz, I $\kappa$ B-zeta controls the constitutive NF- $\kappa$ B target gene network and survival of ABC DLBCL. *Blood*, (2013).

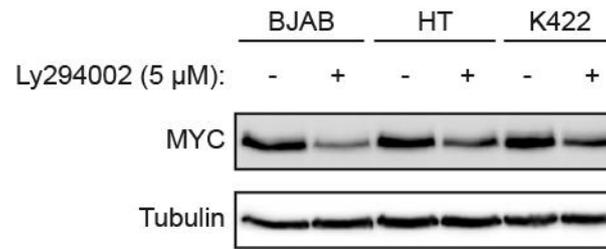
M. Grigat, Y. Jaschke, F. Kliewe, **M. Pfeifer**, S. Walz, H. J. Schuller, Multiple histone deacetylases are recruited by corepressor Sin3 and contribute to gene repression mediated by Opi1 regulator of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular genetics and genomics* : MGG 287, 461-472 (2012).

B. Kloo, D. Nagel, **M. Pfeifer**, M. Grau, M. Duwel, M. Vincendeau, B. Dorken, P. Lenz, G. Lenz, D. Krappmann, Critical role of PI3K signaling for NF- $\kappa$ B-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 272-277 (2011).

## 9 ANHANG



**Abbildung 29:** Chromatogramme der identifizierten *PTEN*-Mutationen bei DLBCL. **A)** Die *PTEN*-Mutationen Y68H und D162H wurden bei der GCB DLBCL Zelllinie SUDHL-10 identifiziert. Im Vergleich ist das Chromatogramm der entsprechenden Wildtyp-Sequenz bei OCI-Ly7 dargestellt. **B)** Die *PTEN*-Mutationen N276S und T277A wurden bei der GCB DLBCL Zelllinie RL identifiziert. Im Vergleich dargestellt das Chromatogramm der entsprechenden Wildtyp-Sequenz bei OCI-Ly7. **C)** Die *PTEN*-Mutationen L320\* und T321FS wurden bei der GCB DLBCL Zelllinie OCI-Ly4 identifiziert. Im Vergleich ist das Chromatogramm der entsprechenden Wildtyp-Sequenz bei OCI-Ly7 dargestellt. **D)** Die *PTEN*-Mutation der Splice-Akzeptor-Stelle in Exon 3 wurde bei der GCB DLBCL Zelllinie K422 identifiziert. Im Vergleich ist das Chromatogramm der entsprechenden Wildtyp-Sequenz bei OCI-Ly7 dargestellt. **E)** Eine *PTEN*-Mutation konnte bei der Patientenbiopsie DLBCL\_028 identifiziert werden. Deletiert waren 3 Basenpaare und somit eine Aminosäure. Die Mutation war somatisch und tumorspezifisch, da sich in der Keimbahn-DNA des Patienten keine Aberration nachweisen lies. **F)** Eine *PTEN*-Mutation konnte bei Patientenbiopsie DLBCL\_019 identifiziert werden. Es handelte sich um eine Verschiebung des Leserasters. Die Mutation war somatisch und tumorspezifisch, da sich in der Keimbahn-DNA des Patienten keine Aberration nachweisen lies. (Basenannotierung: rot – Thymidin, schwarz – Guanosin, grün – Adenosin, blau – Cytidin)



**Abbildung 30:** Herunterregulation von MYC durch PI3K-Inhibition. Mittels Immuno-Blot konnte infolge der Behandlung mit 5 $\mu$ M Ly294002 (24h) ein deutlicher Rückgang von MYC bei den Zelllinien BJAB, HT und K422 detektiert werden.

Tabelle 8: Untersuchungen der DLBCL Kohorte 1.

Patienten- Nummer	DLBCL Subtyp	PTEN- Mutationen	PTEN- Kopienanz- ahl	PTEN- Inaktivierungsmuster	PTEN- Ex- pression	p-AKT- Status
DLBCL_017	ABC	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_019	ABC	G209FS	2	Monoallelische Inaktivierung	+	n.a.
DLBCL_041	ABC	Wildtyp	1	Monoallelische Inaktivierung	-	n.a.
DLBCL_050	ABC	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_069	ABC	Wildtyp	3	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_073	ABC	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_092	ABC	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_111	ABC	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_016	GCB	Wildtyp	3	Keine Aberration	+	-
DLBCL_021	GCB	Wildtyp	3	Keine Aberration	-	+
DLBCL_025	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_028	GCB	$\Delta Y177$	1	Biallelische Inaktivierung	-	+
DLBCL_034	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	-
DLBCL_037	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_054	GCB	Wildtyp	1	Monoallelische Inaktivierung	+	-
DLBCL_058	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	-
DLBCL_059	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	+
DLBCL_061	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	-	+
DLBCL_071	GCB	Wildtyp	1	Monoallelische Inaktivierung	-	+
DLBCL_076	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	-	+
DLBCL_079	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	-	+
DLBCL_085	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	-	+
DLBCL_090	GCB	Wildtyp	3	Keine Aberration	+	+
DLBCL_104	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	-	+
DLBCL_114	GCB	Wildtyp	2	Keine Aberration	-	+
DLBCL_099	GCB	Wildtyp	3	Keine Aberration	+	-
DLBCL_006	Unklassifiziert	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_013	Unklassifiziert	Wildtyp	1	Monoallelische Inaktivierung	+	n.a.
DLBCL_040	Unklassifiziert	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_042	Unklassifiziert	Wildtyp	1	Monoallelische Inaktivierung	+	n.a.
DLBCL_057	Unklassifiziert	Wildtyp	2	Keine Aberration	-	n.a.
DLBCL_063	Unklassifiziert	Wildtyp	1	Monoallelische Inaktivierung	-	n.a.
DLBCL_081	Unklassifiziert	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.
DLBCL_107	Unklassifiziert	Wildtyp	2	Keine Aberration	+	n.a.

n.a. Daten nicht verfügbar  
 - keine nachweisbare Proteinexpression bzw. Phosphorylierung  
 + nachweisbare Proteinexpression bzw. Phosphorylierung

**Tabelle 9:** Annotierung der Patientenproben aus Abbildung 13.

Probennummer Immuno-Blot	Patienten-Nummer	PTEN-Status nach IHC	DLBCL Subtyp
1	DLBCL_8862	-	GCB
2	DLBCL_10483	-	GCB
3	DLBCL_5332	-	GCB
4	DLBCL_085	-	GCB
5	DLBCL_104	-	GCB
6	DLBCL_028	-	GCB
7	DLBCL_061	-	GCB
8	DLBCL_71	-	GCB
9	DLBCL_76	-	GCB
10	DLBCL_114	-	GCB
11	DLBCL_021	-	GCB
12	DLBCL_079	-	GCB
13	DLBCL_18143	+	GCB
14	DLBCL_090	+	GCB
15	DLBCL_054	+	GCB
16	DLBCL_058	+	GCB
17	DLBCL_059	+	GCB
18	DLBCL_016	+	GCB
19	DLBCL_034	+	GCB
20	DLBCL_099	+	GCB

IHC    Immunhistochemische Analyse  
 -      keine PTEN Expression  
 +      PTEN Expression

**Tabelle 10:** Deregulierte Gene nach PTEN-Expression bei der GCB DLBCL Zelllinie HT ( $P = 0,00025$ ).

Signatur	Gen-Symbol	Sonden-Annotation	Gen ID	Genbezeichnung
Herunterreguliertes Gen	AATF	ILMN_1703743	26574	apoptosis antagonizing transcription factor
Herunterreguliertes Gen	ACTL8	ILMN_1704078	81569	actin-like 8
Herunterreguliertes Gen	ACTN4	ILMN_1725534	81	actinin, alpha 4
Herunterreguliertes Gen	APOL3	ILMN_1756862	80833	apolipoprotein L, 3
Herunterreguliertes Gen	BRMS1	ILMN_2398432	25855	breast cancer metastasis suppressor 1
Herunterreguliertes Gen	CACTIN	1) ILMN_2350421, 2) ILMN_2262462	58509	cactin, spliceosome C complex subunit
Herunterreguliertes Gen	CASP1	1) ILMN_2326509, 2) ILMN_2326512	834	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
Herunterreguliertes Gen	CD48	ILMN_2061043	962	CD48 molecule
Herunterreguliertes Gen	CDC42P2	ILMN_3282321	643336	cell division cycle 42 pseudogene 2
Herunterreguliertes Gen	CDK18	ILMN_2284222	5129	cyclin-dependent kinase 18
Herunterreguliertes Gen	CEACAM1	1) ILMN_2371724, 2) ILMN_1716815, 3) ILMN_1664330	634	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)
Herunterreguliertes Gen	CENPN	ILMN_1720526	55839	centromere protein N
Herunterreguliertes Gen	CHN1	1) ILMN_1679638, 2) ILMN_1678493	1123	chimerin (chimaerin) 1
Herunterreguliertes Gen	COL5A1	ILMN_1706505	1289	collagen, type V, alpha 1
Herunterreguliertes Gen	CORO1C	ILMN_1745954	23603	coronin, actin binding protein, 1C
Herunterreguliertes Gen	DHX37	1) ILMN_2192683, 2) ILMN_1805742	57647	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 37
Herunterreguliertes Gen	EPSTI1	ILMN_2388547	94240	epithelial stromal interaction 1 (breast)
Herunterreguliertes Gen	FAM136BP	ILMN_3241756	387071	family with sequence similarity 136, member B, pseudogene
Herunterreguliertes Gen	FAM153C	ILMN_1765002	653316	family with sequence similarity 153, member C, pseudogene
Herunterreguliertes Gen	FAM203B	ILMN_3243302	728071	family with sequence similarity 203, member B
Herunterreguliertes Gen	FAM207BP	ILMN_3306019	729535	family with sequence similarity 207, member B, pseudogene
Herunterreguliertes Gen	FAM53B	1) ILMN_2053490, 2) ILMN_1704571	9679	family with sequence similarity 53, member B
Herunterreguliertes Gen	FOXD4	ILMN_2173524	2298	forkhead box D4
Herunterreguliertes Gen	FYN	ILMN_1781207	2534	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES
Herunterreguliertes Gen	GCFC1	1) ILMN_1682896, 2) ILMN_2331197, 3) ILMN_1712936	94104	GC-rich sequence DNA-binding factor 1
Herunterreguliertes Gen	GEMIN4	ILMN_1770206	50628	gem (nuclear organelle) associated protein 4
Herunterreguliertes Gen	GPR97	ILMN_1765941	222487	G protein-coupled receptor 97
Herunterreguliertes Gen	GUSBP3	ILMN_1763628	653188	glucuronidase, beta pseudogene 3
Herunterreguliertes Gen	HLA-DRA	1) ILMN_2157441, 2) ILMN_1689655	3122	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
Herunterreguliertes Gen	HOXC13	ILMN_1759676	3229	homeobox C13
Herunterreguliertes Gen	HTR3A	ILMN_2371079	3359	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic
Herunterreguliertes Gen	IFI44	ILMN_1760062	10561	interferon-induced protein 44
Signatur	Gen-Symbol	Sonden-Annotation	Gen ID	Genbeschreibung

Herunterreguliertes Gen	KRT8P44	ILMN_3182942	1001299 58	keratin 8 pseudogene 44
Herunterreguliertes Gen	LAPTM5	ILMN_1772359	7805	lysosomal protein transmembrane 5
Herunterreguliertes Gen	LOC723805	1) ILMN_3293173, 2) ILMN_3205404	723805	interleukin-like
Herunterreguliertes Gen	LOC90499	ILMN_3223843	90499	uncharacterized LOC90499
Herunterreguliertes Gen	MCM7	1) ILMN_1663195, 2) ILMN_1704702	4176	minichromosome maintenance complex component 7
Herunterreguliertes Gen	METTL12	ILMN_3239525	751071	methyltransferase like 12
Herunterreguliertes Gen	MGC27345	ILMN_1660412	157247	uncharacterized protein MGC27345
Herunterreguliertes Gen	MT1IP	ILMN_2136089	644314	metallothionein 1I, pseudogene
Herunterreguliertes Gen	MT2A	ILMN_1686664	4502	metallothionein 2A
Herunterreguliertes Gen	MYBPC2	ILMN_1799743	4606	myosin binding protein C, fast type
Herunterreguliertes Gen	NQO1	ILMN_1720282	1728	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
Herunterreguliertes Gen	NXPH4	1) ILMN_2237211, 2) ILMN_1696333, 3) ILMN_1695893	11247	neurexophilin 4
Herunterreguliertes Gen	OR2T11	ILMN_1760065	127077	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 11
Herunterreguliertes Gen	OSBPL9	ILMN_2313856	114883	oxysterol binding protein-like 9
Herunterreguliertes Gen	PAG1	1) ILMN_2055156, 2) ILMN_1736806, 3) ILMN_1673640	55824	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
Herunterreguliertes Gen	PCDHGC3	ILMN_1675428	5098	protocadherin gamma subfamily C, 3
Herunterreguliertes Gen	PIM3	1) ILMN_1789781, 2) ILMN_1707748	415116	pim-3 oncogene
Herunterreguliertes Gen	PLD6	1) ILMN_3240586, 2) ILMN_1731518	201164	phospholipase D family, member 6
Herunterreguliertes Gen	POLR2J3	ILMN_1661516	548644	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J3
Herunterreguliertes Gen	POLR3A	ILMN_1681837	11128	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide A, 155kDa
Herunterreguliertes Gen	PTAFR	ILMN_1746836	5724	platelet-activating factor receptor
Herunterreguliertes Gen	RGS16	ILMN_1808226	6004	regulator of G-protein signaling 16
Herunterreguliertes Gen	RGS8	ILMN_1808215	85397	regulator of G-protein signaling 8
Herunterreguliertes Gen	RNF112	ILMN_1744676	7732	ring finger protein 112
Herunterreguliertes Gen	S100A4	1) ILMN_1684306, 2) ILMN_1688780	6275	S100 calcium binding protein A4
Herunterreguliertes Gen	SCARB1	ILMN_2183409	949	scavenger receptor class B, member 1
Herunterreguliertes Gen	SLC25A3	ILMN_1720703	5250	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3
Herunterreguliertes Gen	SNORD12C	ILMN_3249286	26765	small nucleolar RNA, C/D box 12C
Herunterreguliertes Gen	SNRPD3	ILMN_1794599	6634	small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide 18kDa
Herunterreguliertes Gen	TAGLN2	ILMN_1691892	8407	transgelin 2
Herunterreguliertes Gen	TMEM202	ILMN_2245523	338949	transmembrane protein 202
Herunterreguliertes Gen	TMEM38A	ILMN_1765584	79041	transmembrane protein 38A
Herunterreguliertes Gen	TNF	ILMN_1728106	7124	tumor necrosis factor
<b>Signatur</b>	<b>Gen-Symbol</b>	<b>Sonden-Annotation</b>	<b>Gen ID</b>	<b>Genbeschreibung</b>

Herunterreguliertes Gen	TPM3P9	ILMN_1761801	147804	tropomyosin 3 pseudogene 9
Herunterreguliertes Gen	TSR1	ILMN_2092232	55720	TSR1, 20S rRNA accumulation, homolog (S. cerevisiae)
Herunterreguliertes Gen	UNC45A	ILMN_1709860	55898	unc-45 homolog A (C. elegans)
Herunterreguliertes Gen	ZNF3	ILMN_2390739	7551	zinc finger protein 3
Herunterreguliertes Gen	ZNF624	ILMN_1670122	57547	zinc finger protein 624
Herunterreguliertes Gen	ZNF655	1) ILMN_2396292, 2) ILMN_1728528	79027	zinc finger protein 655
Herunterreguliertes Gen	ZRANB2	ILMN_1662383	9406	zinc finger, RAN-binding domain containing 2
Hochreguliertes Gen	ABTB1	1) ILMN_2367165, 2) ILMN_1802096	80325	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1
Hochreguliertes Gen	ADA	ILMN_1803686	100	adenosine deaminase
Hochreguliertes Gen	AFF3	ILMN_1775235	3899	AF4/FMR2 family, member 3
Hochreguliertes Gen	BACH2	1) ILMN_2058468, 2) ILMN_1670695	60468	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2
Hochreguliertes Gen	C15orf52	ILMN_1775330	388115	chromosome 15 open reading frame 52
Hochreguliertes Gen	C17orf58	1) ILMN_2398926, 2) ILMN_1700515, 3) ILMN_1712985	284018	chromosome 17 open reading frame 58
Hochreguliertes Gen	C7orf41	ILMN_1672605	222166	chromosome 7 open reading frame 41
Hochreguliertes Gen	CAB39L	1) ILMN_1783598, 2) ILMN_1660815	81617	calcium binding protein 39-like
Hochreguliertes Gen	CARD10	ILMN_1743714	29775	caspase recruitment domain family, member 10
Hochreguliertes Gen	CBLN3	ILMN_2053829	643866	cerebellin 3 precursor
Hochreguliertes Gen	CCDC41	ILMN_1799113	51134	coiled-coil domain containing 41
Hochreguliertes Gen	CCNG2	1) ILMN_1747244, 2) ILMN_2228732	901	cyclin G2
Hochreguliertes Gen	CD40	1) ILMN_1779257, 2) ILMN_2367818	958	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
Hochreguliertes Gen	CDKN1B	1) ILMN_2196347, 2) ILMN_1722811	1027	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
Hochreguliertes Gen	CDKN2C	ILMN_1656415	1031	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
Hochreguliertes Gen	CORO2A	ILMN_1813746	7464	coronin, actin binding protein, 2A
Hochreguliertes Gen	CTDSP2	ILMN_1692962	10106	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2
Hochreguliertes Gen	FAM53A	ILMN_1658452	152877	family with sequence similarity 53, member A
Hochreguliertes Gen	FBXO32	ILMN_1703955	114907	F-box protein 32
Hochreguliertes Gen	FCRL2	ILMN_1791329	79368	Fc receptor-like 2
Hochreguliertes Gen	FCRL3	ILMN_1691693	115352	Fc receptor-like 3
Hochreguliertes Gen	FZD7	ILMN_1804351	8324	frizzled family receptor 7
Hochreguliertes Gen	GCET2	ILMN_1667449	257144	germinal center expressed transcript 2
Hochreguliertes Gen	HBP1	1) ILMN_1685415, 2) ILMN_2160764	26959	HMG-box transcription factor 1
Hochreguliertes Gen	HCG27	ILMN_1746436	253018	HLA complex group 27 (non-protein coding)
Hochreguliertes Gen	HES6	ILMN_1694268	55502	hairy and enhancer of split 6 (Drosophila)
<b>Signatur</b>	<b>Gen-Symbol</b>	<b>Sonden-Annotation</b>	<b>Gen ID</b>	<b>Genbeschreibung</b>

Hochreguliertes Gen	HIST1H2BD	ILMN_1651496	3017	histone cluster 1, H2bd
Hochreguliertes Gen	HLA-DOB	ILMN_1700428	3112	major histocompatibility complex, class II, DO beta
Hochreguliertes Gen	HOMER2	ILMN_1671486	9455	homer homolog 2 (Drosophila)
Hochreguliertes Gen	HPCAL1	ILMN_1764850	3241	hippocalcin-like 1
Hochreguliertes Gen	ID3	ILMN_1732296	3399	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein
Hochreguliertes Gen	IFI16	ILMN_1710937	3428	interferon, gamma-inducible protein 16
Hochreguliertes Gen	IL4R	ILMN_1652185	3566	interleukin 4 receptor
Hochreguliertes Gen	IRAK2	ILMN_1745964	3656	interleukin-1 receptor-associated kinase 2
Hochreguliertes Gen	ISG20	ILMN_1659913	3669	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
Hochreguliertes Gen	KIAA0125	1) ILMN_1707491, 2) ILMN_3187535	9834	KIAA0125
Hochreguliertes Gen	KLHL24	ILMN_1678671	54800	kelch-like 24 (Drosophila)
Hochreguliertes Gen	KREMEN2	ILMN_2382290	79412	kringle containing transmembrane protein 2
Hochreguliertes Gen	LAMP3	1) ILMN_2170813, 2) ILMN_2170814	27074	lysosomal-associated membrane protein 3
Hochreguliertes Gen	LHFPL2	ILMN_1747744	10184	lipoma HMGIC fusion partner-like 2
Hochreguliertes Gen	LINC00324	ILMN_1681252	284029	long intergenic non-protein coding RNA 324
Hochreguliertes Gen	LMTK3	ILMN_1668194	114783	lemur tyrosine kinase 3
Hochreguliertes Gen	LOC339352	ILMN_3289745	339352	cytosolic thioridylase subunit 1 homolog (S. pombe) pseudogene
Hochreguliertes Gen	LOC730101	1) ILMN_3305735, 2) ILMN_3229424	730101	uncharacterized LOC730101
Hochreguliertes Gen	LTB	1) ILMN_2376205, 2) ILMN_2376204	4050	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
Hochreguliertes Gen	MAP1LC3A	ILMN_1776188	84557	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha
Hochreguliertes Gen	METTL7A	ILMN_1656285	25840	methyltransferase like 7A
Hochreguliertes Gen	MIAT	ILMN_1864900	440823	myocardial infarction associated transcript (non-protein coding)
Hochreguliertes Gen	MID1IP1	1) ILMN_2165473, 2) ILMN_1668960	58526	MID1 interacting protein 1
Hochreguliertes Gen	MST1	ILMN_1707464	4485	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)
Hochreguliertes Gen	MST1P9	ILMN_2099259	11223	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like) pseudogene 9
Hochreguliertes Gen	MYL2	1) ILMN_1688417, 2) ILMN_2113807	4633	myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow
Hochreguliertes Gen	N4BP2L1	1) ILMN_2344650, 2) ILMN_1799487	90634	NEDD4 binding protein 2-like 1
Hochreguliertes Gen	NINJ1	ILMN_1815086	4814	ninjurin 1
Hochreguliertes Gen	NLRP7	1) ILMN_1658632, 2) ILMN_1798063, 3) ILMN_1652366	199713	NLR family, pyrin domain containing 7
Hochreguliertes Gen	OAS1	1) ILMN_1672606, 2) ILMN_2410826, 3) ILMN_1675640	4938	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
Hochreguliertes Gen	OPRL1	ILMN_2400922	4987	opiate receptor-like 1
Hochreguliertes Gen	PHYH	ILMN_1773073	5264	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase
Hochreguliertes Gen	PIM2	ILMN_1748283	11040	pim-2 oncogene
<b>Signatur</b>	<b>Gen-Symbol</b>	<b>Sonden-Annotation</b>	<b>Gen ID</b>	<b>Genbeschreibung</b>

Hochreguliertes Gen	PLTP	ILMN_1773389	5360	phospholipid transfer protein
Hochreguliertes Gen	PNPLA8	1) ILMN_1680223, 2) ILMN_2180582	50640	patatin-like phospholipase domain containing 8
Hochreguliertes Gen	PRR15L	ILMN_1748970	79170	proline rich 15-like
Hochreguliertes Gen	RAB26	ILMN_1790317	25837	RAB26, member RAS oncogene family
Hochreguliertes Gen	RASAL1	ILMN_1793517	8437	RAS protein activator like 1 (GAP1 like)
Hochreguliertes Gen	RGL4	ILMN_1663422	266747	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 4
Hochreguliertes Gen	RHBDD1	1) ILMN_1681543, 2) ILMN_2209766	84236	rhomboid domain containing 1
Hochreguliertes Gen	SEC14L1	1) ILMN_1732575, 2) ILMN_2391912, 3) ILMN_2285802	6397	SEC14-like 1 (S. cerevisiae)
Hochreguliertes Gen	SLC25A29	1) ILMN_2350801, 2) ILMN_1697544	123096	solute carrier family 25 (mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier), member 29
Hochreguliertes Gen	SLC44A2	ILMN_1771987	57153	solute carrier family 44, member 2
Hochreguliertes Gen	SLC44A3	ILMN_1658498	126969	solute carrier family 44, member 3
Hochreguliertes Gen	SLC6A16	ILMN_1723287	28968	solute carrier family 6, member 16
Hochreguliertes Gen	SNTA1	ILMN_1753241	6640	syntrophin, alpha 1
Hochreguliertes Gen	SPOCK2	ILMN_1656287	9806	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2
Hochreguliertes Gen	STMN3	ILMN_3244117	50861	stathmin-like 3
Hochreguliertes Gen	SUSD3	ILMN_1785570	203328	sushi domain containing 3
Hochreguliertes Gen	TCL1A	ILMN_1788841	8115	T-cell leukemia/lymphoma 1A
Hochreguliertes Gen	TMEM156	ILMN_2095660	80008	transmembrane protein 156
Hochreguliertes Gen	TRAM2	ILMN_1788783	9697	translocation associated membrane protein 2
Hochreguliertes Gen	TXNIP	ILMN_1697448	10628	thioredoxin interacting protein
Hochreguliertes Gen	XPNPEP2	ILMN_1743357	7512	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound
Hochreguliertes Gen	YPEL3	ILMN_1791147	83719	yippee-like 3 (Drosophila)
Hochreguliertes Gen	ZNF627	1) ILMN_1708787, 2) ILMN_2197519	199692	zinc finger protein 627

**Tabelle 11:** Differenziell regulierte Gensignaturen nach PTEN-Expression bei HT.

Herunterregulierte Signaturen	Physiologische Kategorie	Definierte Gene in der Signatur	Enrichment score	p-Wert (GSEA)	FDR (GSEA)
<i>Myc_overexpression_1.5x_up</i>	Signal-Kaskade	88	0,632	0,0010	0,0010
<i>HIF1alpha_2x_down</i>	Transkriptionsfaktor	41	0,595	0,0013	0,0088
<i>Tcell_cytokine_induced_IL2_IL7_IL15only</i>	Signal-Kaskade	24	0,563	0,0259	0,0470
<i>Myc_overexpression_2x_up</i>	Signal-Kaskade	36	0,560	0,0020	0,0183
<i>Notch_T-ALL_up_Palomero</i>	Signal-Kaskade	47	0,546	0,0021	0,0147
<i>HIF1alpha_1.5x_down</i>	Transkriptionsfaktor	215	0,545	0,0013	0,0012
<i>Myc_RNAi_OCILy3</i>	Transkriptionsfaktor	54	0,539	0,0012	0,0084
<i>Notch_T-ALL_up_Sharma</i>	Signal-Kaskade	37	0,536	0,0109	0,0360
<i>Leucine_starve_down</i>	Physiologischer Prozess	178	0,535	0,0010	0,0010
<i>Myeloid_Node1536</i>	Zelluläre Differenzierung	19	0,507	0,1021	1,0000
<i>Tcell_cytokine_induced_prolif</i>	Signal-Kaskade	27	0,504	0,0457	0,0637
<i>Glutamine_starve_down</i>	Physiologischer Prozess	313	0,501	0,0010	0,0010

Hochregulierte Signaturen	Physiologische Kategorie	Definierte Gene in der Signatur	Enrichment score	p-Wert (GSEA)	FDR (GSEA)
<i>Blood_Module-3.5_Undetermined</i>	Zelluläre Differenzierung	13	-0,626	0,0168	0,0474
<i>p53_up_Xray</i>	Transkriptionsfaktor	17	-0,620	0,0229	0,2123
<i>Blood_Module-1,3_B_cells</i>	Zelluläre Differenzierung	55	-0,591	0,0011	0,0023
<i>GC_B_cell_BLhigh_DLBCLlow</i>	Zelluläre Differenzierung	36	-0,583	0,0012	0,0211
<i>BCL6_repressed</i>	Transkriptionsfaktor	19	-0,554	0,0438	0,1555
<i>Myeloma_PR_subgroup_down</i>	Tumor spezifisch	50	-0,553	0,0010	0,0411
<i>CNSonly_Node1460</i>	Zelluläre Differenzierung	18	-0,542	0,0602	0,1571
<i>B_cell_up_energ</i>	Physiologischer Prozess	17	-0,542	0,0728	0,1464
<i>Thymic_DP_Tcell_gt_Thymic_progenitor_Tcell</i>	Zelluläre Differenzierung	65	-0,541	0,0012	0,0234
<i>NFkB_ChIPCHIP_Young_5factors</i>	Transkriptionsfaktor	15	-0,525	0,0881	0,1238
<i>GC_T_helper_up_Chtanova_and_Kim</i>	Zelluläre Differenzierung	19	-0,523	0,0986	0,1881
<i>Pan_B_U133plus</i>	Zelluläre Differenzierung	86	-0,514	0,0012	0,0217
<i>CLL_unmutated_gt_CLL_mutated</i>	Tumor spezifisch	25	-0,509	0,0507	0,2735
<i>Muscle_Node1645</i>	Zelluläre Differenzierung	24	-0,503	0,0503	0,1265
<i>Regulatory_Tcell_FOXP3+_4x_gt_CD4+Tcell</i>	Zelluläre Differenzierung	11	-0,501	0,2168	0,2046

GSEA Gene set enrichment-Analyse  
 FDR false discovery rate

