

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und
Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin
am Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

**Molekulare Charakterisierung der varianten Translokation t(2;8)
beim Burkitt-Lymphom**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hannes Kroenlein

aus Tübingen

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. T. Burmeister
2. Prof. Dr. med. H. Rieder
3. Priv.-Doz. Dr. med. C. Haferlach

Datum der Promotion: 09.09.2011

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	6
1.1	Geschichte und Klassifikation des Burkitt-Lymphoms	6
1.2	Epidemiologie.....	6
1.3	Klinik	7
1.4	Labordiagnostik.....	8
1.4.1	Histologie und Zytomorphologie.....	8
1.4.2	Immunphäotypisierung.....	9
1.4.3	Zytogenetik, FISH und Molekulargenetik.....	9
1.5	Therapie und Differentialdiagnose.....	9
1.6	Zur Molekulargenetik des Burkitt-Lymphoms.....	11
1.6.1	<i>MYC</i>	11
1.6.2	Pathogenesemodelle des Burkitt-Lymphoms.....	11
1.6.2.1	V(D)J-Rekombination und somatische Hypermutation.....	12
1.6.3	Molekulargenetik der Translokation t(8;14)(q24;q32).....	14
1.6.4	Molekulargenetik der varianten Translokation t(2;8)(p11;q24).....	15
2.	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT.....	17
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1	Material.....	18
3.1.1	Zelllinien.....	18
3.1.2	Patientenproben.....	18
3.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	18
3.1.4	Geräte.....	19
3.2	Methoden.....	20
3.2.1	Puregene Isolation.....	20
3.2.2	Restriktionsenzymverdau.....	20
3.2.3	Ligation.....	21
3.2.4	Inverse Long Distance PCR.....	21
3.2.4.1	Primer.....	21
3.2.4.2	PCR-Reaktion.....	22
3.2.5	Agarose-Gel.....	23
3.2.6	Geextraktion.....	23
3.2.7	Sequenzierung.....	23
3.2.8	Hot Star PCR.....	24

3.2.8.1 Reziproke Primer.....	24
3.2.8.2 Durchführung.....	24
3.2.9 Software.....	25
3.2.10 Primer.....	26
4. ERGEBNISSE.....	27
4.1 Zur Theorie der Methodik.....	27
4.1.1 Restriktionsenzymverdau.....	27
4.1.2 Autoligation.....	29
4.1.3 Inverse Long Distance PCR.....	29
4.1.4 Charakterisierung reziproker Bruchpunkte.....	30
4.1.5 Etablierung der Methodik und Negativkontrolle.....	31
4.1.6 Verifizierung der Methodik an den t(2;8)-Zelllinien BL21, BL64, JBL2 und Ci-1....	31
4.1.7 Auswahl der Proben und Durchführung.....	32
4.2 Lokalisation der Bruchpunkte auf 2p11.....	35
4.3 Lokalisation der Bruchpunkte auf 8q24.....	36
4.4 Charakterisierung der Bruchregionen.....	37
4.4.1 t(2;8)-Zelllinien.....	37
4.4.1.1 BL21.....	37
4.4.1.2 BL64.....	38
4.4.2 Positivproben.....	39
4.4.2.1 Probe Nr.232.....	39
4.4.2.2 Probe Nr.268.....	40
4.4.2.3 Probe Nr.319.....	41
4.4.2.4 Probe P15.....	42
4.4.2.5 Probe P33.....	44
4.4.2.6 Probe P37.....	45
4.4.2.7 Probe P47.....	47
4.5 Legende zur Sequenzanalyse.....	48
5. DISKUSSION.....	49
5.1 Diskussion der Methode der inversen Long-Distance-PCR	49
5.1.2 Diskussion der Methode zur Detektion reziproker Bruchpunkte.....	50
5.1.3 Limitationen der verwendeten Methode und Ideen zur Verbesserung.....	50
5.1.4 Fazit zur Methode.....	51
5.2 Lokalisation der Bruchpunkte der Positivproben und Immunmarkerprofil.....	52

1. EINLEITUNG

1.1 GESCHICHTE UND KLASSIFIKATION DES BURKITT-LYMPHOMS

Das Burkitt-Lymphom ist ein hoch aggressives B-Zell-Non Hodgkin Lymphom (B-NHL).

Es wurde erstmals von dem Chirurgen Denis Burkitt in Kampala, Zentralafrika in der Mitte des letzten Jahrhunderts beschrieben (1). Anfangs als Sarkom verstanden beschrieb Burkitt einen bei Kindern dieser Region häufig vorkommenden, rasant wachsenden Tumor mit Lokalisation vor allem im Gesicht und im Abdominalbereich. Aufgrund der regionalen Häufung des Tumors in einer Malariaregion wurde früh eine Assoziation mit *Malaria tropica* postuliert. Anfang der sechziger Jahre gelang es den Pathologen Epstein, Barr und Achong das nach ihnen benannte Epstein Barr-Virus (EBV, Humanes Herpesvirus 4) in Burkitt-Lymphomzellen zu isolieren.

Heute sind in der WHO-Klassifikation drei Formen des Burkitt-Lymphoms definiert:

Das endemische Burkitt-Lymphom (eBL) ist ein vor allem in Äquatorialafrika und Papua Neuguinea auftretender vornehmlich pädiatrischer Tumor. Diese Form ist in über 90% mit EBV assoziiert (2-4).

Seltene, weltweit auch bei adulten Patienten außerhalb des „Lymphoma-Belt“ auftretende Fälle fallen unter die Bezeichnung sporadisches Burkitt-Lymphom (sBL). Sie sind je nach Quelle bis zu 20% EBV-assoziert (2-4).

Mit Aufkommen der HIV-Epidemie wurden gehäuft Burkitt-Lymphome bei AIDS-Patienten diagnostiziert. Dies führte zur Abgrenzung der dritten Form, des HIV-assozierten Burkitt-Lymphoms.

In den meisten Fällen liegt eine Chromosomentranslokation vor, durch die der Transkriptionsfaktor *MYC* unter die Kontrolle von Immunglobulinenhancern gerät (2-4).

Allerdings ist bei bis zu zehn Prozent aller Burkitt-Lymphome keine *MYC*-Translokation durch Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) nachweisbar (5).

1.2 EPIDEMIOLOGIE

In Äquatorialafrika stellt das endemische Burkitt-Lymphom einen der häufigsten Tumore im Kindesalter dar. Die Inzidenz ist mit bis zu 20 Fällen pro 100.000 Kinder im Alter von vier bis sieben Jahren anzugeben (4). Jungen erkranken doppelt so häufig wie Mädchen.

Außerhalb Afrikas tritt das sporadische Burkitt-Lymphom als sehr seltene Erkrankung in Erscheinung. Etwa 1-2% aller diagnostizierten NHL sind sBL (3). In den USA liegt die Inzidenz bei ungefähr 1200 diagnostizierten Neuerkrankungen pro Jahr (3). Einer Studie des National Cancer Institute Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) aus dem Jahre 2007 zufolge sind 59% der Patienten bei Diagnose älter als vierzig Jahre (3). Bei HIV-Patienten macht das Burkitt-Lymphom 30-40% aller diagnostizierten NHL aus (2-6).

1.3 KLINIK

Die klinische Stadieneinteilung erfolgt anhand zweier Klassifikationsschemata nach St.Jude/Murphy und Ann Arbor (siehe Tab. 1.1 und 1.2). Neben Tumorlokalisation und Ausbreitung werden besonders der Befall des Knochenmarks und des ZNS als entscheidende prognostische Parameter berücksichtigt.

In etwa 30% der Fälle wird die Diagnose in einem frühen, lokalisierten Stadium I oder II gestellt. In 70% erfolgt die Diagnose in einem fortgeschrittenen Stadium III oder IV.

13 bis 17% der Patienten zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose einen Befall des ZNS, 30 bis 38% eine Beteiligung des Knochenmarks (2). Bei einem Knochenmarkbefall von über 20% wird die Diagnose einer L3 ALL im Rahmen der French-American-British (FAB)-Klassifikation gestellt (3), (6).

Tab. 1.1 Stadieneinteilung nach Ann Arbor (7)

Stadium I	▪ Befall einer einzelnen Lymphknotenregion oder eines einzelnen extralymphatischen Organs
Stadium II	▪ Befall von 2 oder mehr nodalen Regionen auf einer Seite des Zwerchfells oder lokalisierter Befall extralymphatischer Organe und einer oder mehreren LK-Regionen auf derselben Seite des Zwerchfells
Stadium III	▪ Nodaler Befall auf beiden Seiten des Zwerchfells ohne oder mit extralymphatischen Manifestationen
Stadium IV	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Disseminierter Befall von Lymphknoten und einem oder mehreren extralymphatischen Organen ▪ A: Fehlen von Allgemeinsymptomen ▪ B: Gewichtsverlust von >10% u./o. Fieber unklarer Genese u./o. Nachtschweiß

Tab. 1.2 Stadieneinteilung nach St. Jude (Murphy) (7)

Stadium I	<ul style="list-style-type: none">▪ Eine einzelne nodale oder extranodale Tumormanifestation ohne lokale Ausbreitung▪ Nicht: mediastinale, abdominale oder epidurale Lokalisationen
Stadium II	<ul style="list-style-type: none">▪ Mehrere nodale u./o. extranodale Manifestationen auf derselben Seite des Zwerchfells mit oder ohne lokale Ausbreitung▪ Nicht: mediastinale, epidurale oder ausgedehnte nicht resektable abdominale Lokalisationen
Stadium III	<ul style="list-style-type: none">▪ Lokalisationen auf beiden Seiten des Zwerchfells▪ alle thorakalen Manifestationen (Mediastinum, Thymus, Pleura, Lunge)▪ alle ausgedehnten nichtresektablen abdominalen Manifestationen▪ Epiduralbefall▪ Multilokulärer Knochenbefall
Stadium IV	<ul style="list-style-type: none">▪ Befall des Knochenmarks und/oder des ZNS

1.4 LABORDIAGNOSTIK

Die Diagnostik des Burkitt-Lymphoms erfolgt durch Histologie, Zytomorphologie, Immunphänotypisierung/Immunhistochemie, Zytogenetik, FISH und Molekulargenetik.

1.4.1 Histologie und Zytomorphologie

Burkitt-Lymphom-Zellen sind mittlerer Größe (ca 12µm Durchmesser) mit einem ovalen bis runden Zellkern und basophilen Nukleoli. Die Kern-Plasma-Relation ist zu Gunsten des Kerns verschoben, das Zytoplasma ist stark basophil und enthält häufig prominente Vakuolen. Die homogen diffus infiltrierenden Lymphomzellen lassen viele Mitosefiguren erkennen und sind von Makrophagen umgeben. Hierdurch entsteht das typische histologische Bild eines „Sternenhimmels“ (2), (6), (8).

1.4.2 Immunphänotypisierung

Das Immunmarkerprofil von Burkitt-Zellen zeigt klassischerweise Differenzierungsantigene reifer B-Zellen (CD19, CD20, CD22 und CD79a) sowie keimzentrumsassoziiertes Antigen (CD10, Bcl-6). Typisch ist die Expression von Oberflächenimmunglobulin (sIg) bei Negativität für TdT, CD5 sowie CD23. Der Proliferationsmarker Ki67 ist bei einer Verdopplungszeit des Tumors von 24 bis 48 Stunden zu nahezu 100% exprimiert (6), (9).

1.4.3 Zytogenetik, FISH und Molekulargenetik

Auf DNA-Ebene liegt eine Translokation des Transkriptionsfaktors *MYC* in den Einflussbereich von Immunglobulinenhancern vor.

Bei der häufigsten Form $t(8;14)(q24;q32)$ wird *MYC* in den Bereich des Immunglobulin-Schwerkettenlokus (IgH) transloziert. Diese Translokation macht etwa 80% der Fälle aus. Bei den restlichen 20% liegt entweder eine Variante $t(8;22)(q24;q11)$ mit Beteiligung des Lambda- (IgL) oder eine Variante $t(2;8)(p11;q24)$ mit Beteiligung des Kappa-Locus (IgK) der leichten Ketten der Immunglobulingene vor (2-6).

Bei der $t(8;14)$ zeigten sich konventionelle Zytogenetik und FISH der Long-Distance-PCR zum Nachweis einer Translokation unterlegen (10).

Für den Nachweis einer varianten Translokation auf molekularer Ebene existieren bisher keine standardisierten Methoden

1.5 THERAPIE UND DIFFERENTIALDIAGNOSTIK

Für die Therapie des Burkitt-Lymphoms stehen mehrere Protokolle zur Verfügung:

Magrath und Mitarbeiter etablierten 1996 am National Cancer Institute das CODOX-M/IVAC-Schema (Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, hochdosiertes Methotrexat, alternierend mit Ifosfamid, Etoposid, hochdosiertem Cytarabin, zusätzlich Methotrexat und Cytarabin intrathekal). Studienergebnisse zeigten Heilungsraten bis zu 90% bei einem Altersmedian von 24 Jahren und Einschluss Burkitt-ähnlicher Lymphome (11).

Unter Einschluss älterer Patienten wurden Heilungsraten von 64%, beziehungsweise 50% bei einem Altersmedian von 47 Jahren erreicht (12-14). Hoelzer und Mitarbeiter therapierten erwachsene L3-ALL-Patienten mit einem pädiatrischen NHL-Regime und erzielten bei einem Altersmedian von 36 Jahren 2-Jahres-Überlebensraten von 71% (15).

Die HOVON-Gruppe zeigte mit einem Hochdosis BEAM-Protokoll (Carmustin, Etoposid, Cytarabin und Melphalan) und anschließender autologer Stammzelltransplantation bei einem Altersmedian von 36 Jahren eine ereignisfreie 5-Jahres-Überlebensrate von 73% (16).

Am MD Anderson Cancer Center wurden mit HyperCVAD (Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason) und dem CD20-Antikörper Rituximab in einer Studie mit einem Anteil von 29% über 60 jähriger Patienten ereignisfreie 3-Jahres-Überlebensraten von 89% erzielt (17).

Ein Problem zu Beginn einer Therapie ist das durch den hohen Zellzerfall drohende Tumor-Lyse-Syndrom. Diesem wird mit Bicarbonat-Hydrierung, Allopurinol und Rasburicase begegnet (18).

Eine differentialdiagnostische Herausforderung stellt zum Beispiel die schwierige Abgrenzung atypischer sporadischer Burkitt-Lymphome gegenüber diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) vom zentroblastischen Typ dar. DLBCLs haben im Vergleich zu Burkitt-Lymphomen häufig einen komplexeren Karyotyp. Es können auch *MYC*-Rearrangements vorliegen: Eine Translokation in Immunglobulinloci schließt die Diagnose DLBCL nicht aus. Die Abgrenzung beider Entitäten voneinander ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung und Diskussion. (19), (20).

Eine diagnostische Differenzierung ist für die Therapie durchaus relevant: Ein fehlerhaft als DLBCL diagnostiziertes Burkitt-Lymphom würde mit dem Schema CHOP-R (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon und Rituximab) eher untertherapiert werden, was die Gefahr eines Rezidivs erhöhen würde. Ein als Burkitt-Lymphom fehlinterpretiertes und in Konsequenz übertherapiertes DLBCL wäre hingegen nicht nur für geriatrische Patienten problematisch (19-21).

Die zitierten Studien zeigen, dass ein früh und richtig diagnostiziertes Burkitt-Lymphom eine gute Prognose hat. Zum besseren Verständnis der Erkrankung, zur Verbesserung der Differenzialdiagnostik einzelner Krankheitsentitäten und zur Optimierung der Therapie ist es jedoch notwendig vor allem die molekularen Grundlagen weiter zu erforschen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der molekulargenetischen Charakterisierung der seltenen varianten Translokation t(2;8) beim Burkitt-Lymphom. In den folgenden Absätzen der Einleitung werden die auf molekularer Ebene an der Pathogenese beteiligten Elemente und Mechanismen dieser Erkrankung beschrieben:

1.6 ZUR MOLEKULARGENETIK DES BURKITT-LYMPHOMS

1.6.1 *MYC*

Beim Menschen ist *MYC* ein in drei Exons auf Chromosom 8q24 angelegter Transkriptionsfaktor. Das Gen erstreckt sich über insgesamt 5,3 kb.

Exon 1 ist nicht codierend. Es enthält die Promotoren P1 und P2. Unter physiologischen Bedingungen kontrolliert P2 zu 80-90% die *MYC*-Expression (22).

Exon 2 und Exon 3 codieren für das *MYC*-Protein, die Translation beginnt bei Nukleotid 16 des Exon 2. *MYC* ist als ubiquitär agierender Transkriptionsfaktor an der direkten und indirekten Regulation und Beeinflussung von bis zu 15% aller Gene beteiligt (23).

Die Summe seiner vielseitigen Funktionen ist vor allem die Begünstigung der Proliferation früher, undifferenzierter Zellen; diese exprimieren typischerweise hohe Mengen *MYC*.

Als Transkriptionsfaktor fördert und initiiert *MYC* den Eintritt der Zelle in die S-Phase.

Neben der Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus nimmt es außerdem Einfluss auf die Ribosomenbiosynthese, den Zellmetabolismus, sowie auf die Expression von Zytoskelett- und Zelladhäsionselementen (22-24).

MYC ist in einer Vielzahl hochmaligner Tumore und Lymphome pathologisch überexprimiert beziehungsweise dereguliert. *MYC*-Deregulationen finden sich in Fällen von folliculären Lymphomen, Mantelzell-Lymphomen, sowie Plasmazell-Lymphomen und in Burkitt-Lymphomen (25-29).

1.6.2 Pathogenesemodelle des Burkitt-Lymphoms

Als Pathomechanismen für die verschiedenen Chromosomentranslokationen beim Burkitt-Lymphom werden folgende drei Mechanismen diskutiert: Neben fehlerhafter (sekundärer) V(D)J- Rekombination der variablen Domänen der Immunglobuline werden der Prozess der somatischen Hypermutation sowie Fehler beim Antikörper-Klassenwechsel als mögliche Ursachen angesehen (30-32). Gemeinsam ist allen Mechanismen die lymphozytäre Spezifität sowie eine Assoziation mit DNA-Doppelstrangbrüchen.

Die Deregulation von *MYC* beim Burkitt-Lymphom geschieht durch eine Translokation des Protoonkogens an Enhancer der Immunglobulingene. Die Mechanismen der Deregulation sind vielseitig und nur teilweise verstanden (30-32).

Im Folgenden wird vor allem der Mechanismus der V(D)J-Rekombination beschrieben.

Die Mechanismen der somatischen Hypermutation sind komplex und unvollständig verstanden. Der Prozess des Antikörperklassenwechsels spielt bei der Pathogenese der varianten t(2;8) keine Rolle, da er in der Switch-Region der schweren Ketten der Immunglobuline auf Lokus 14q32 stattfindet. Er wird mit der Pathogenese der t(8;14) in Zusammenhang gebracht (10), (31).

1.6.2.1 V(D)J-Rekombination und somatische Hypermutation

Das V(D)J-Rearrangement ist ein auf Lymphozyten beschränkter Mechanismus der genetischen Rekombination, dessen Ziel die Schaffung einer möglichst großen immunologischen Diversität der Antikörper ist (33).

Zu Beginn erfolgt die Umlagerung der schweren Ketten der variablen Domänen der Immunglobuline auf 14q32. Im pro-B-Zellstadium wird ein D-Segment an ein J-Segment angelagert und danach ein V-Segment an das bereits kombinierte DJ angefügt (33a).

Nach erfolgter Rekombination der schweren Ketten findet in der Prä-B-Zelle die Rekombination der variablen leichten Ketten auf dem Kappa- (2p11) beziehungsweise Lambda-Lokus (22q11) statt (33b).

Die codierenden V, D und J-Segmente sind von hoch konservierten Rekombinationssignalsequenzen (RSS) flankiert: eine Heptamersequenz (CACAGTG) befindet sich 5' unmittelbar an das Segment grenzend. Nach Platzhaltersequenzen von 12 bp beziehungsweise 23 bp Länge, so genannten Spacern, folgt eine ebenfalls hoch konservierte Nonamersequenz (ACAAAACC). Eine physiologische Rekombination passiert nur zwischen RSS mit einem 12 bp und einem 23 bp Spacer: Dies ist die so genannte 12/23-Regel (33-35).

Diese Regel verhindert eine Rekombination zweier gleichartiger Gensegmente und gewährleistet dadurch die Bildung eines funktionierenden Antikörpermoleküls, das alle notwendigen Gensegmente enthält.

Zur Erkennung und Spaltung der DNA binden lymphozytenspezifische *Recombination Activating Genes* (RAG1 und RAG2) unter Rekrutierung von *High Mobility Group Proteins* (HMG1 und HMG2) an die RSS. Die Spaltung der DNA erfolgt zwischen der Heptamersequenz und dem codierenden Segment: Die RAG-Proteine bilden einen heterodimeren Komplex, der an die RSS bindet und zwischen dem codierenden Segment und dem zugehörigen Heptamer spaltet. Die zwischen den zu fusionierenden Abschnitten

gelegene Sequenz wird über Heptamer-Heptamer-Fusion zu einem extrachromosomal gelagerten Ring geschlossen (31), (33a).

Die Verknüpfung der entstandenen Haarnadelstruktur am Ende der codierenden Elemente erfolgt durch *Non Homologous End Joining* (NHEJ). Beteiligt sind hieran Ku70, Ku80, DNA-PK, XRCC4, DNA-Ligase IV und Artemis (31).

Durch terminale Desoxynukleotidtransferase (TdT) werden N- und P-Nukleotide zwischen die rekombinierten codierenden Segmente addiert, sowie über Endonukleaseaktivität auch Nukleotide deletiert (31) (33a).

Durch einen asymmetrischen endonukleolytischen Schnitt an den kodierenden Enden (coding ends) entstehen kurze komplementäre DNA-Überhänge, die dann in die Verbindungsstelle inkorporiert werden können. Die Rekombination und die an ihr beteiligten Mechanismen dienen der Diversifizierung der Antikörper zu einem möglichst breiten immunologischen Spektrum (31), (33a), (33b).

Nach Antigenkontakt der Lymphozyten erfolgt im Keimzentrum der Prozess der somatischen Hypermutation mit dem Ziel der weiteren Affinitätssteigerung des Antikörpers zu seinem Antigen. Hierfür werden die rearrangierten V(D)J-Segmente auf DNA-Ebene durch Mutationen, Deletionen und Insertionen verändert (33), (36), (37). Während der somatischen Hypermutation werden Doppelstrangbrüche durch *Activation induced Cytidine Deaminase* (AID) induziert (4).

Beide Prozesse, die V(D)J-Rekombination und die somatische Hypermutation werden in Zusammenhang mit der Entstehung der Chromosomentranslokation bei der varianten t(2;8) gesehen.

1.6.3 Molekulargenetik der Translokation t(8;14)(q24;q32)

Die in etwa 80% aller Burkitt-Lymphome vorliegende Translokation t(8;14) ist bereits ausführlich erforscht und es existiert eine Vielzahl publizierter Daten. Im Folgenden wird der aktuelle Wissensstand knapp zusammengefasst:

Bei der t(8,14) liegt der Bruchpunkt auf 8q24 entweder in 5´Richtung von *MYC* oder innerhalb des nicht codierenden Exon 1 beziehungsweise des ersten Introns (39).

Nach Boxer existieren drei Klassen von Bruchpunkten: Klasse I Bruchpunkte befinden sich innerhalb des *MYC*-Gens, vor allem am 3´Ende von Exon 1 und in der 3´daran angrenzenden Intronsequenz. Klasse II Bruchpunkte sind unmittelbar 5´von *MYC* lokalisiert.

Klasse III Bruchpunkte liegen bis zu 100 Kilobasen 5´von *MYC* (22), (siehe Abb. 1.1).

MYC gerät in 5´Richtung unter den Einfluss der Schwerketten-Enhancer auf 14q+.

Endemische Burkitt Lymphome mit einer t(8;14) haben überwiegend einen Klasse II- oder III-Bruchpunkt und translozieren in die VDJ-Region des Schwerkettenlokus; sporadische Burkitt Lymphome weisen meist einen Klasse-I- Bruchpunkt innerhalb Exon1 oder am Beginn des ersten Introns auf und translozieren in die Switchregion (22).

Allerdings sind auch sBL beschrieben die in die VDJ-Region der schweren Ketten transloziert sind (10).

Bei der t(8;14) sind eine Vielzahl sequenzieller Alterationen des *MYC*-Gens beschrieben.

Bei Klasse-I-Bruchpunkten wird die Promotorregion in Exon 1 durch die Translokation strukturell gestört oder von den codierenden Anteilen des Gens separiert. Bei Klasse II- und III-Bruchpunkten geraten alle drei *MYC*-Exons in toto in den Einflussbereich der Enhancer der schweren Ketten auf 14q+. Verschiedene Mutationen, Deletionen und Insertionen innerhalb des translozierten *MYC*-Allels sind beschrieben. Hier wird unter anderem somatische Hypermutation als Ursache diskutiert. Die Mutationen stabilisieren teilweise das pathologische Transkriptionsprodukt oder wirken einer Transkriptionsunterdrückung entgegen (22), (33), (38), (39).

Allen Fällen gemeinsam ist ein Wechsel der verwendeten *MYC*-Promotoren mit dann überwiegend aktivem P1 gegenüber dem physiologisch dominierenden P2 (13), (22).

1.6.4 Molekulargenetik der varianten Translokation t(2;8)(p11;q24)

Die seltenen varianten Translokationen des Burkitt-Lymphoms sind weitaus weniger erforscht und weniger gut verstanden. Im Folgenden wird der derzeitige Wissensstand dargestellt:

Bei den varianten Translokationen t(2;8) und t(8;22) liegt der Bruchpunkt auf 8q24 3' von *MYC* (siehe Abb. 1.1). Der(8) enthält *MYC* und weiter distal in 3'Richtung Elemente des Kappa- respektive Lambdalokus (40). Obligatorisch liegt dabei die konstante Kappa- oder Lambda-Region 3' von *MYC*. Je nach Lokalisation des Bruchpunktes auf dem jeweiligen Leichtkettenlocus befinden sich auch Anteile von V- und J-Segmenten auf der(8).

Die Bruchpunkte auf 8q24 sind über einen großen Bereich verstreut. In der Literatur finden sich Angaben über Bruchpunkte mit einer Entfernung von 2 kb bis zu mehr als 300 kb 3' von *MYC* (40).

Bei der t(2;8) befinden sich die Bruchpunkte auf 2p11 überwiegend innerhalb der J-Segmente, 5' der konstanten Region. Die Translokation führt zu einer Assoziation von *MYC* mit den Kappa-Enhancern *kEi*, *kMAR* und *kE3'* (41), (46).

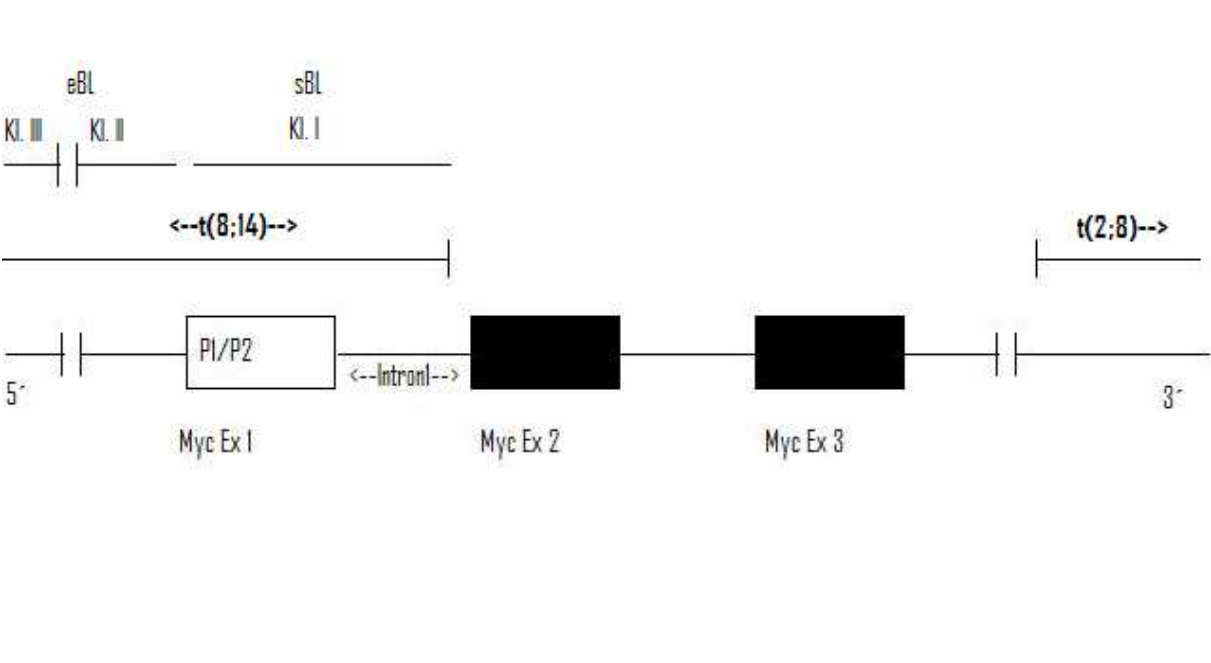
Bisherige Untersuchungen zur varianten Translokation t(2;8) wurden vor allem an folgenden Zelllinien durchgeführt:

J11, BL64, BL21, LY91, KOBK101, JBL2, LY66 (40-47).

Die Pathogenese der t(2;8) und der Zeitpunkt ihres Entstehens in der Zelle sind nicht gut verstanden. Bei allen bisher beschriebenen Translokationen t(2;8) lag die konstante Region des Kappalokus 3' von *MYC*. Die Deregulation von *MYC* ist Gegenstand kontroverser Diskussion: Unklar sind nach wie vor die genauen Mechanismen der Deregulation, vor allem in Hinblick auf die zum Teil erheblichen Distanzen der Bruchpunkte (und damit der Kappa-Immunglobulin-Enhancer) zu *MYC* (40-47).

In dieser Arbeit wurden aus Beständen der B-ALL/NHL-Studie 2002 sowie der B-NHL 90 Studie (Studienleiter Prof. Dr. Hoelzer, Frankfurt am Main) mit der Technik der inversen Long Distance PCR insgesamt sieben neue Fälle einer varianten Translokation t(2;8) detektiert und auf molekularer Ebene charakterisiert. Die Ergebnisse ergänzen die wenigen bisher bekannten und in der Literatur diskutierten Daten.

Abb. 1.1: Bruchpunktlokalisierung MYC-Region t(8;14)/ t(2;8)



2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Insgesamt existieren nur wenige publizierte Forschungsergebnisse zur varianten Translokation t(2;8) des Burkitt-Lymphoms. Ein Großteil davon stammt aus den achtziger Jahren. Nur ein Teil wurde auf molekularer Ebene charakterisiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Detektion und molekularen Charakterisierung der Bruchregionen der t(2;8). Verwendet wurde in diesem Zusammenhang die Technik der inversen Long Distance PCR. Mit dieser Methode sollte eine größere Zahl an Patientenproben mit reifer B-ALL auf das Vorliegen einer t(2;8) untersucht werden. Es sollte eine ausführliche Analyse und molekulare Beschreibung der gefundenen Translokationen erfolgen. Die Ergebnisse der Arbeit sollen neben der Ergänzung der bisherigen Erkenntnisse zur varianten t(2;8) als Grundlage für weitere Forschung und Diskussion ihrer pathophysiologischen Ursachen sowie der mit ihr einhergehenden Deregulation von *MYC* dienen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Zelllinien CI-1 (DSMZ Acc. No. 570) und K-562 (DSMZ Acc. No. 10) gearbeitet. Beide wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen.

Des Weiteren wurde bereits isolierte DNA der Burkitt-Zelllinien BL21, BL64 und JBL2 verwendet. Diese Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Professor Bornkamm am Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Patientenproben

Die Patientenproben wurden im Rahmen der zentralen Diagnostik der B-ALL/ NHL-Studie 2002, sowie der B-NHL 90 Studie (Studienleiter Prof. Dr. Hoelzer, Frankfurt an Main) gewonnen. Die Proben wurden zu diagnostischen Zwecken eingesandt, übrig gebliebenes Material wurde in Flüssigstickstoff archiviert.

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

a) Puregene Isolations-Kit Firma Qiagen Sciences, Maryland, USA.

b) Restriktionsenzymverdau:

Folgende Restriktionsenzyme der Firma Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland, vom Typ Fast Digest, wurden verwendet:

-HindIII: 5´A/AGCTT3´ (FD0504), 1FDU/µl

-EcoRI: 5´G/AATTC3´ (FD0274), 1FDU/µl

-BamHI: 5´GGATC/C3´ (FD0054), 1FDU/µl

-XbaI: 5´T/CTAGA3´ (FD0684), 1FDU/µl

c) Ligation

Die Ligation erfolgte mit T4 DNA Ligase, Firma USB, Cleveland, Ohio, USA.

d) Long Distance PCR: Expand Long Template PCR System, Firma Roche, Mannheim, Deutschland.

e) AgaroseGel (0,5%):

-TAE-Puffer 50x Genaxxon BioScience GmbH, Biberach

-Ultra Pure Agarose, Invitrogen, Paisley, Schottland

-Ethidiumbromid 1%, Merck, Darmstadt, Deutschland

-DNA-Loadingbuffer (0,25 % Bromphenolblau (=0,125 g), 0,25 % Xylene Cynaol (=0,125 g), 25 % Ficoll (Type 400) in Wasser (=12,5 g), 1M Tris pH 7,5 (= 0,5 ml)→ auf 50 ml Wasser).

-Längenstandard: Hyperladder, Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland

f) Gelextraktionskit: GeneJET Gel Extraction Kit, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

g) Hot-Star-PCR : HotStarTaq Mastermix; Qiagen Sciences, Maryland, USA

3.1.4 Geräte

-Zentrifuge: Eppendorf Modell: 5415 D

-Kühlzentrifuge: Eppendorf Modell : 5415 R

-Wasserbad: bio-med Thermocycler 60

-Cycler für Ligation: Applied Biosystems GeneAmp PCR-System 9600

-Cycler für PCR: Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler; GeneAmp PCR System 2400

-Gelkammer: Life Technologies Horizon 58 GIBCO BRL Gel Electrophoresis Apparatus

-Spannungsgeber: Life Technologies GIBCO BRL Electrophoresis Power Supply

-Spectrophotometer: Nanodrop ND1000 Spectrophotometer

3.2 METHODEN

3.2.1 Puregene Isolation

Um die genomische DNA zu isolieren wurde die Puregene-Methode verwendet:

Eine Probe mit 3-5 Millionen Zellen wurde für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das dadurch entstandene Zellpellet wurde in 600 µl Lysis-Solution gelöst und über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Precipitation-Buffer wurde die Probe für mindestens 5 Minuten auf Eis gestellt und danach bei 13200 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol gemischt. Die Proben wurden 50 Mal gekippt, der durch Ausfällung sichtbar gewordene DNA-Faden bei 13200 rpm für eine Minute zum Pellet zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden 800 µl 70% Ethanol zur weiteren Reinigung zugegeben und noch einmal bei 13200 rpm für eine Minute zentrifugiert. Nach dem Trockenpipettieren wurde das Pellet in Hydration-Buffer in einer Konzentration zwischen 100 und 200 ng/µl gelöst.

3.2.2 Restriktionsenzymverdau

Es wurde mit nicht-methylierungssensitiven Fermentas FastDigest Enzymen gearbeitet:

Jeweils 1 µg genomische DNA wurde mit 2 µl Enzym HindIII (A/AGCTT), EcoRI (G/AATTC), BamHI (GGATC/C) und XbaI (T/CTAGA) für 60 Minuten (EcoRI für 30 Minuten) bei 37 °C im Wasserbad in einem „bio-med Thermocycler 60“ inkubiert.

Die verdauten Proben wurden in MaXtract High Density Geltubes mit 50 µl Phenol:Chloroform:Isoamyl (25:24:1) für 5 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde in 125 µl 100% Ethanol, 5 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 µl Glycogen über Nacht bei -20 Grad inkubiert, danach für 15 Minuten bei 4 °C und 10800 rpm zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Überstandes wurde das DNA-Pellet in 200 µl 70% Ethanol noch mal zur weiteren Aufreinigung bei 10800 rpm für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, danach trocken pipettiert und in 35 µl Wasser gelöst. Anschließend wurde die Probe gemessen.

3.2.3 Ligation

Die fragmentierte DNA wurde mit 5 µl T4 DNA Ligase und 5 µl reaction buffer für 17 Stunden bei 16 °C in einem Applied Biosystems GeneAmp PCR-System 9600-Thermocycler inkubiert.

Die Aufreinigung erfolgte wie die des Verdaus mit Phenol:Chloroform:Isoamyl und Ethanol unter denselben Bedingungen. Die DNA wurde in 30 µl Wasser gelöst und ihre Konzentration bestimmt.

3.2.4 Inverse Long Distance PCR

Pro Reaktionsansatz wurden zwischen 100 und 300 ng DNA eingesetzt.

3.2.4.1 Primer

Um die zu einem Ring autoligierten Fragmente standardisiert zu amplifizieren und zu sequenzieren wurden die in 3.2.10 aufgeführten Primer verwendet.

Die Sequenzierung des BamHI-Fragments in 5'→3'-Richtung erfolgte mit dem Primer BamHIseq.

3.2.4.2 PCR-Reaktion

a) Reaktionsansatz:

34,25 µl Wasser

5,00 µl Buffer2

1,00 µl dNTP (25 µM)

0,75 µl Enzym

2,00 µl IgKJ5F1 (10 µM)

2,00 µl R-Primer (10 µM)

5,00 µl DNA (100-300ng)

50,00 µl pro Tube für PCR

b) Cyclerebedingungen

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen in einem Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler oder einem GeneAmp PCR System 2400-Cycler durchgeführt:

Initial 95 °C für 2 Minuten, dann in 15 Zyklen jeweils bei 94 °C Denaturierung der DNA für 30 Sekunden, bei 66 °C für 30 Sekunden Annealing der Primer an ihre Sequenzen und dann bei 68 °C acht Minuten Amplifikation.

Dann 20 weitere Zyklen bei 94 °C für 30 Sekunden, 66 °C für 30 Sekunden, 68 °C für acht Minuten (+20 Sekunden Extension). Nach 10 min bei 68 °C kühlte der Cycler auf 4 °C und verblieb bei dieser Temperatur.

3.2.5 Agarose-Gel

Das PCR-Produkt wurde auf ein 0,5 % Agarose-Gel aufgetragen:

0,15 g Agarose wurden mit 30 ml TAE-Puffer 50X (verdünnt in 20 ml auf 1 l Wasser) aufgekocht, mit 3 µl Ethidiumbromid versetzt und in eine GibCo BRL Horizon 58 Gelkammer gegeben. 8 µl des PCR-Produktes wurden mit 3 µl DNA-Load angefärbt, in die Geltaschen gegeben und bei 100 V und 150 mA für 45 Minuten mit einem Längenstandard laufen gelassen. Anschließend wurden die Banden im Gel durch das interkalierende Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar.

Die interessierenden Banden wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und isoliert.

3.2.6 Gelextraktion

Die amplifizierte DNA wurde mit GeneJET Gel Extraction Kit der Firma Fermentas aus dem Gel aufgereinigt:

Die aus dem Gel ausgeschnittenen Banden wurden gewogen. Auf jeweils 100 mg Gel wurden 100 µl Bindepuffer gegeben, das Gemisch für 10 min bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Material in eine Purification Column gegeben und eine Minute bei 13200 rpm zentrifugiert. Das integrierte Filtersystem hielt die DNA im oberen Anteil der Säule, das Filtrat im unteren Anteil wurde verworfen. Dann erfolgte die erneute Zugabe von 100 µl Bindepuffer und eine Minute Zentrifugation bei 13200 rpm, danach die Zugabe von 700 µl Waschpuffer und Zentrifugation für eine Minute bei 13200 rpm. Dann wurde das Filtersystem herausgenommen und in ein Standardtube eingesetzt. Die DNA wurde mit 30 µl Wasser bei 10000 rpm eine weitere Minute zentrifugiert und in dem Tube in gelöster Form aufgefangen und die Konzentration bestimmt.

3.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben geschah unter standardisierten Bedingungen am Max Planck Institut für Molekulare Genetik in Berlin mit den verwendeten PCR-Primern sowie durch Primer-Walking.

3.2.8 Hot Star PCR

3.2.8.1 Reziproke Primer

Die für die Detektion der reziproken Bruchpunkte verwendeten Primer sind tabellarisch unter 3.2.10 aufgelistet.

C2R-Primer annealen 5' des Bruchpunktes auf Chromosom 2, C8F-Primer 3' des Bruchpunktes auf Chromosom 8.

3.2.8.2 Durchführung

a) Reaktionsansatz

H ₂ O	20 µl
HotstarTaq	25 µl
C2R-Primer	2 µl (10 µM)
C8F-Primer	2 µl (10 µM)
Genom. DNA	1 µl (50-100 ng)

b) Cyclorbedingungen

Der Reaktionsansatz wurde unter folgenden Bedingungen in einem Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler inkubiert: Initial 95 °C für fünfzehn Minuten. Dann in insgesamt 35 Zyklen 94 °C für eine Minute um zu Denaturieren. Danach dreißig Sekunden bei 63 °C Annealing, dann neunzig Sekunden Elongation bei 72 °C. Danach wurde auf 4 °C gekühlt.

Mit den Hot-Star-PCR-Produkten wurde wie oben bereits nach der Long PCR beschrieben verfahren: Sie wurden unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten, isoliert und am MPI sequenziert.

3.2.9 Software

Es wurden die folgenden Computerprogramme und Internetadressen verwendet:

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> : Sequenzabgleich und Lokalisation
- http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview> : Sequenzlokalisierung
- <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>: Primer-Design
- http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg: Analyse V-Region
- <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>: Restriktionsenzymverdau
- Alpha Easer : Fotodokumentation Agarosegele
- Chromas 2.23: Analyse von Sequenzierchromatogrammen
- Microsoft Word
- Microsoft Paint

3.2.10 Primer

HPLC gereinigt, bezogen über Firma Metabion, 82152 Martinsried, Deutschland

Primer Sequenz

Inverse Long PCR und Primerwalking:

>F-Primer

-IgKJ5F1: 5'AGC CTC TAA AAG TCA ATA CTG GCC ATC AGA CCC 3'
-IgKJ5F1seqneu 5'TTT GGT CCC AGG GCC GAA AGT GAA TCA CAG 3'
-P37ecor-seq-neu 5'ACT CCA ACA TCC TCA GCC TCC ACC CG
-23240IgKJ1F: 5'CAC GTT TGA TTT CCA CCT TGG TCC CTT GG 3'

>R-Primer

-HinR: 5'GGG CGC TGA GCT GGG AAA ACC AGG GAG AAG 3'
-EcoR: 5'GCT GTC GTT TAC CCC AGC TGA TCT CAA AAG TGA 3'
-BamR: 5'GCA CCT TGC CCT TCT GCC TCT TGA GAA TGT 3'
-BamHIseq: 5'CTT TGC TAC TTT CTG TGA ATC TAT AAT TAT TTC C 3'
-XbaR: 5'TGT TGC AAA GGT TCT ATA AAG CTG AGA GAC AAA TA 3'
-23240seqR2: 5'TGT CCA AGC CAC CTC TCA GAC GAC GGT AGG AAT 3'
-23240seqR3: 5'TGA TTG GTA TTG CGT GTA TGT CTG CAG AG 3'

Reziproke Primer

Mit folgenden Primern konnten reziproke Bruchpunkte amplifiziert bzw charakterisiert werden:

-23240C2R1: 5'CGA GAA TGC TAA TAG GCA ATG TCA GAG T 3'
-23240C8F1: 5'CCC ATA GCC AAG CTC CAC ATC CCT AAA G 3'
-31971C2R1: 5'TTG TAC ATA ACT TTG CAC TTC TCT CAC TAT TTC AGG 3
-31971C8F1: 5'CTC TAT TCG TGG TAC TGC CTT TTT GGT TTA TCT TGG 3'
-BL64C2R1: 5'AGA TCC CTC ACT GTG GCT CAC TTT CGG CGG A 3'
-BL64C8F1: 5'TCA ATT AGG GTG ACA CTT ATA GAG CAG GCC ATG TGA 3'
-P37C2R1: 5'AGC TCT AAC CCT TAC CTT GAC TGA TCA GGA CTC CTC 3'
-P37C8F1: 5'TGC CAC TTA ATA ACA CAT CAC AAT CAT CTT TTC ATA 3'
-P15C2R1: 5'AAG ATT TTC TCT GCA TCG GTC AGG TTA GTG ATA TTA 3'
-P15C8F1: 5'GTG TCG GGC AGT GTA TTA GCT GCT GAA AAT GTG 3'
-P15rezC8R1: 5'CTC CCT GTG AGA CAC TCC TGT AGC ACC CTG 3'
-P15rezC8Fmin1 5'CTC CCA CCG CGT CCC TCC CAT GAC ACA T 3'

4. ERGEBNISSE

4.1 ZUR THEORIE DER METHODIK

Für den molekularen Nachweis einer Translokation t(8;14)(q24;q32) existieren standardisierte PCR-Bedingungen und publizierte Primersequenzen (10), (48), (49).

Eine Methode zum molekularen Nachweis oder Ausschluss einer varianten Translokation t(2;8)(p11;q24) wurde bisher nicht etabliert.

In allen bisherigen Publikationen zur t(2;8) lagen die Bruchpunkte auf dem Kappalokus 5´ der konstanten Region, innerhalb der teilweise rearrangierten J-Segmente (40), (43), (45).

Die Bruchpunkte auf 8q24 lagen allesamt 3´ von *MYC*. Die jeweilige Entfernung zu *MYC* war sehr unterschiedlich: Die Bruchpunkte lagen in einem Abstand von 2 kb bis über 300 kb 3´ von *MYC* (40).

Die unterschiedliche Lokalisation der Bruchpunkte in der *MYC*-Region schließt eine Detektion durch konventionelle Long-Distance-PCR wie bei der t(8;14) aus.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der inversen Long-Distance-PCR zum molekularen Nachweis einer t(2;8) genutzt, wie im Folgenden erläutert.

4.1.1 Restriktionsenzymverdau

In dieser Arbeit wurden insgesamt vier verschiedene Restriktionsenzyme verwendet:

HindIII (5´A/AGCTT3´), EcoRI (5´G/AATTC3´), BamHI (5´GGATC/C3´) und XbaI (5´T/CTAGA3´). Jedes Enzym hatte mindestens zwei Schnittstellen auf 2p11, dem humanen nicht rearrangierten Kappalokus: Eine (proximale) Schnittstelle lag 5´ von J1, eine (distale) Schnittstelle 3´ der konstanten Region. Auf diese Weise enthielt ein Fragment alle 5 J-Segmente und die konstante Region (siehe Abb. 4.1). Insgesamt wurden vier Fragmente des Kappalokus definiert; die Größen der amplifizierten PCR-Produkte waren wie folgt: HindIII: 4.298 bp, EcoRI: 7.555 bp, BamHI: 5.745 bp und XbaI: 5.681 bp. (Die zwischen den 5´Enden der voneinander fort orientierten Primer gelegenen, nicht amplifizierten Sequenzen wurden bei den Fragmentgrößenangaben berücksichtigt (siehe Abb. 4.1 und 4.4)).

Auf 8q24 waren die Schnittstellen der verwendeten Enzyme in regelmäßigen Abständen in hoher Dichte in der Region 3´ von *MYC* lokalisiert (siehe Tab. 4.1 und Abb. 4.2).

Durch eine t(2;8) veränderten sich die Schneideabstände der Enzyme auf dem in die Translokation involvierten Kappalokus auf der(8). Es entstanden unterschiedliche Fragmentgrößen im Sinne eines Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP).

Abb. 4.1: Lokalisation Restriktionsschnittstellen 2p11 (dargestellter Bereich umfasst ca 17 kb)

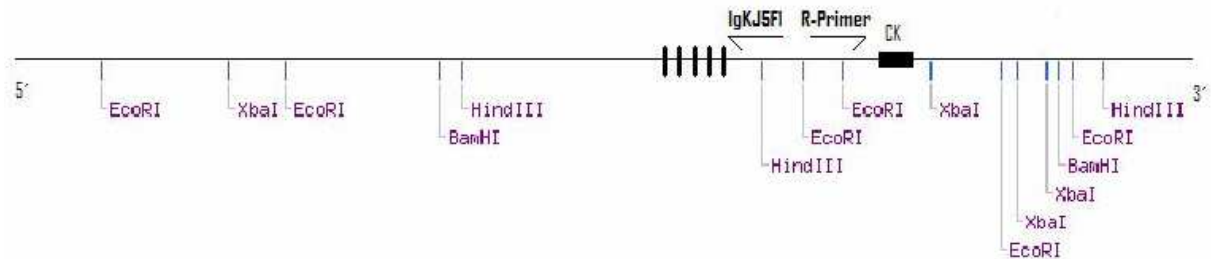
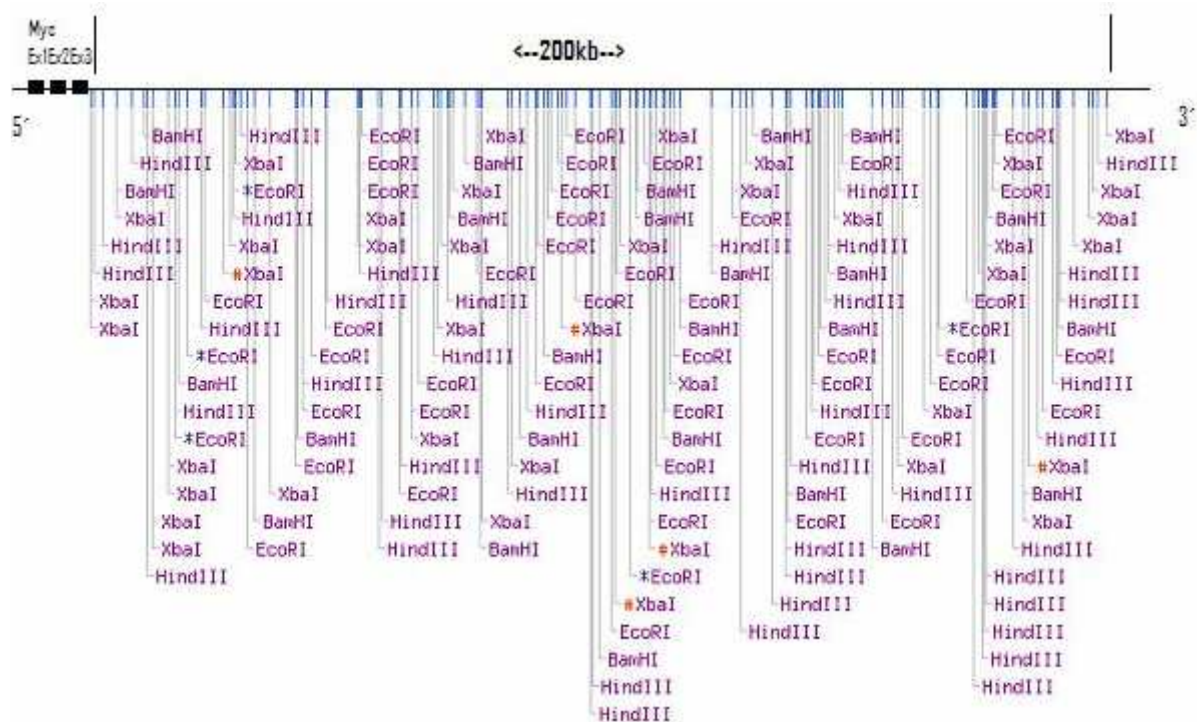


Abb. 4.2: Lokalisation Restriktionsschnittstellen HindIII, EcoRI, BamHI, XbaI 8q24: 200 kb 3' von MYC

(Die Dichte der Schnittstellen ist repräsentativ für eine Region von 550 kb 3' von MYC)



Tab. 4.1: (Die Angaben beziehen sich auf eine Region von 550 kb 3' von MYC Exon 3)

Restriktionsenzym	Erste Schnittstelle 3' von MYC Exon 3	Durchschnittlicher Schneideabstand	Größter Schneideabstand
HindIII	3.338 bp	4.051 bp	15.389 bp
EcoRI	391 bp	4.035 bp	18.486 bp
BamHI	7.622 bp	7.156 bp	31.252 bp
XbaI	2.604 bp	4.667 bp	23.285 bp

4.1.2 Autoligation

Durch Autoligation mit T4 DNA-Ligase wurden das 5' Ende und das 3' Ende eines Fragments miteinander verbunden; ein ringförmiges Molekül entstand.

Durch das auf beiden Strängen asymmetrische Schneideverhalten der Restriktionsenzyme erhielten die Fragmente überstehende einsträngige Nukleotide, so genannte Sticky Ends. Diese zueinander komplementären, einander überlappenden Basen erleichterten die Fusion der Fragmentenden beim Ringschluss.

4.1.3 Inverse Long Distance PCR

Durch Restriktionsenzymverdau mit den verwendeten Enzymen entstand eine Vielzahl an Fragmenten pro angesetztem Verdau. Da die Enzyme sowohl auf dem Kappalokus als auch in der *MYC*-Region schnitten, beinhaltete im Falle einer Translokation eines der Fragmente die unmittelbar den Bruchpunkt flankierenden Sequenzen beider beteiligter Loci auf der(8).

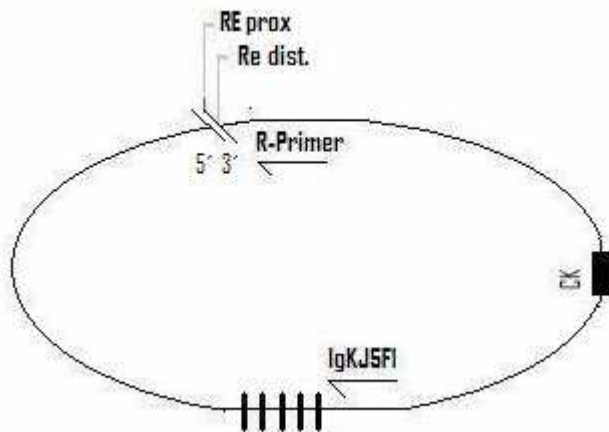
Durch Autoligation wurde das 5' Ende (also Anteil *MYC*-Region) mit dem 3' Ende des Fragments (wenige bp 3' der konstanten Region des Kappalokus) verbunden.

Für die durch die verwendeten Enzyme entstandenen Fragmente des Kappalokus wurden insgesamt fünf verschiedene Primer entworfen.

Für jedes Fragment wurde ein individueller R-Primer entworfen: HinR, EcoR, BamHR und XbaR. Dieser lag unmittelbar 5' der distalen Restriktionsenzymchnittstelle (siehe Abb. 4.1 und 4.4). Die R-Primer waren am Hauptstrang in Leserichtung orientiert. Mit ihnen wurden Sequenzen 3' der distalen Schnittstelle amplifiziert: bei einer t(2;8) waren dies nach Autoligation Sequenzen des *MYC*-Lokus die 5' des Bruchpunktes lagen. Die Primer liefen in 5'>3' Richtung auf den Bruchpunkt zu. Bei einem RFLP gestatteten sie eine Unterscheidung translozierter von VJ-rearrangierten Fragmenten. IgKJ5F1 war revers komplementär zur Leserichtung des Hauptstranges ausgerichtet. Er war unmittelbar 3' von J5 lokalisiert und lief in 3'>5' Richtung auf den Bruchpunkt zu (siehe Abb. 4.4).

In vier Fällen wurde der Bruchpunkt direkt mit IgKJ5F1 als Sequenzierprimer erreicht, in den restlichen Fällen geschah dies unter Verwendung weiter 5' ansetzender zusätzlicher F-Primer (Primerwalking). Die Auswertung der amplifizierten, sequenzierten PCR-Produkte geschah durch Abgleich mit Referenzsequenzen unter Verwendung von NCBI-Blast, NCBI Map-Viewer und IMGT-V-Quest. Alle Angaben beziehen sich auf die NCBI-Referenzsequenz GRCh37, ref NT_008046.16 (*MYC*-Region; Bruchpunktlage in Bezug zum 3' Ende von *MYC* Exon 3), sowie ref NT_022184.15 (Kapparegion).

Abb. 4.4: Prinzip Autoligation/ inverse Long Distance PCR (schematisch)



4.1.4 Charakterisierung reziproker Bruchpunkte

Nach Detektion des Bruchpunktes auf der(8) wurde versucht den jeweiligen reziproken Bruchpunkt auf 2p- zu identifizieren. Hierzu wurden für jede Positivprobe zwei an ihrem Bruchpunkt auf der(8) orientierte Primer entworfen:

Ein C2R-Primer und ein C8F-Primer.

C2R-Primer waren an der Wildtypsequenz des Kappalokus orientiert, sie waren circa 500 bis 1000 bp 5' des Bruchpunktes auf der(8) lokalisiert. Bei Vorliegen einer reziproken Translokation begrenzten diese Sequenzen den Bruchpunkt auf der(2) in 5' Richtung.

C2R-Primer liefen entsprechend der Leserichtung auf dem Hauptstrang in 5'>3' Richtung auf den reziproken Bruchpunkt zu.

Analog wurde für das Design der C8F-Primer verfahren: Sie wurden in Orientierung an der Sequenz des *MYC*-Lokus in einem Abstand von 500 bis 1000 bp 3' des Bruchpunktes auf der(8) designed. Diese Sequenzen von 8q24 begrenzten im Falle einer reziproken Translokation den Bruchpunkt auf der(2) in 3' Richtung. Durch ihre zum Hauptstrang revers komplementäre Ausrichtung liefen die C8F-Primer in 3'>5' Richtung auf den reziproken Bruchpunkt zu.

Wurde kein Produkt amplifiziert, wurde durch Primerwalking mit weiter vom der(8) Bruchpunkt entfernt lokalisierten Primern versucht einen reziproken Bruchpunkt zu detektieren. Pro Probe wurden maximal sechs Primer mit einer jeweiligen Maximalentfernung von 1,5 kb zum der(8) Bruchpunkt untersucht. Mit der beschriebenen Methode konnte bei fünf von neun Translokationen zusätzlich der reziproke Bruchpunkt charakterisiert werden.

4.1.5 Etablierung der Methodik und Negativkontrolle

Zu Beginn der Arbeit musste eine zuverlässige und reproduzierbare Darstellung des nicht VJ-rearrangierten humanen IgK-Locus erfolgen. Hierzu wurden mehrere Primerkombinationen unter unterschiedlichen PCR-Bedingungen an der Zelllinie K-562 getestet. Bei K-562 handelt es sich um eine bcr-abl positive CML-Zelllinie im Zustand der Blastenkrise (50).

Bei K-562, einer Zelllinie die aus einer CML-Blastenkrise gewonnen wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass keine Kappagenumlagerung stattgefunden hatte und somit die amplifizierten Kappalokusfragmente alle 5 J-Segmente sowie die konstante Region enthielten. In diesem Prozess wurden die Versuchsbedingungen zur Darstellung eines nicht rearrangierten und nicht translozierten Kappalokus optimiert. Es entstanden die oben bereits erwähnten PCR-Produkte.

4.1.6 Verifizierung der Methodik an den t(2;8)-Zelllinien BL21, BL64, JBL2 und Ci-1

Um die an der Zelllinie K-562 etablierten PCR-Bedingungen zur Darstellung des Kappalokus auf ihr Funktionieren in Zusammenhang mit der Erfassung einer Translokation t(2;8) zu prüfen wurden sie an den t(2;8)-positiven Zelllinien BL21, BL64 und JBL2 getestet. Die Bruchregionen der Zelllinien BL21 und BL64 waren bekannt (42), (43).

Bei Funktionieren der Methodik musste bei mindestens einem Restriktionsenzymverdau ein RFLP des Kappalokus mit der Translokation entstehen.

Durch Sequenzierung der entstandenen Gelbanden konnte für BL21 ein knapp 4 kb BamHI-Fragment und für BL64 ein 3 kb BamHI-Fragment als Translokationsprodukt identifiziert werden (siehe Abb 4.5). Die anderen in ihrer Größe abweichenden Produkte waren Amplifikate des rearrangierten Kappa-Allels. Bei den Zelllinien JBL2 und CI-1 gelang mit der verwendeten Methode keine Darstellung eines Translokationsproduktes.

4.1.7 Auswahl der Proben und Durchführung

Untersucht wurden insgesamt n=51 Proben; das Material wurde in 14 Fällen aus peripherem Blut, in 37 Fällen aus Knochenmarkaspirat gewonnen. Alle Proben waren im Rahmen der erwähnten GMALL-Studien archiviert worden. Drei Proben waren durch konventionelle Zytogenetik oder FISH bereits als t(2;8) transloziert diagnostiziert (Nr.232, Nr.268, Nr.319). Bei ihnen gelang in allen Fällen die Darstellung des Bruchpunktes auf molekularer Ebene mit der Technik der inversen Long-Distance-PCR.

Die restlichen untersuchten Proben waren entweder aufgrund ihrer Morphologie als reifzellige B-ALL (FAB L3-ALL) klassifiziert oder wurden aufgrund ihres Immunmarkerprofils ausgewählt: Die Kriterien für eine Auswahl anhand des Immunmarkerprofils war die Expression keimzentrumsassoziierter Antigene und das Vorhandensein von Differenzierungsantigenen reifer B-Zellen: Positivität für CD10, CD19, CD20 und CD22 (jeweils >20%) sowie fehlende Expression von CD5, TdT und CD23 (jeweils <20%). Ferner war der über eine Long-PCR molekulargenetisch gesicherte Ausschluss einer t(8;14) Voraussetzung.

Die morphologische Klassifikation sowie die Immunphänotypisierung wurden im Immunologischen Zellmarkerlabor, die t(8;14)-PCR-Diagnostik im Labor für Molekulargenetik der Medizinischen Klinik III, Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Die in Frage kommenden Proben wurden in vier Durchläufen auf das Vorliegen einer varianten Translokation t(2;8) untersucht. Im ersten Durchlauf wurde HindIII, im zweiten EcoRI, im dritten BamHI und im vierten XbaI verwendet. Nach jedem Durchgang wurden die in Frage kommenden Banden isoliert und am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin sequenziert. Alle Proben bei denen die Sequenzierung einen rearrangierten Kappalokus zeigte, wurden im nächsten Durchgang weiter untersucht. Insgesamt wurden auf diese Weise in vier Zyklen aus 51 getesteten Proben sieben t(2;8)-Translokationen detektiert.

Abb. 4.5: Gelbild BL21 und BL64

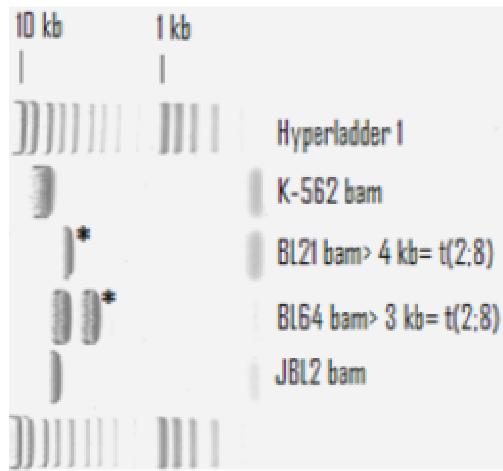


Abb. 4.6: Gelbild Nr.268bam, Nr.319bam

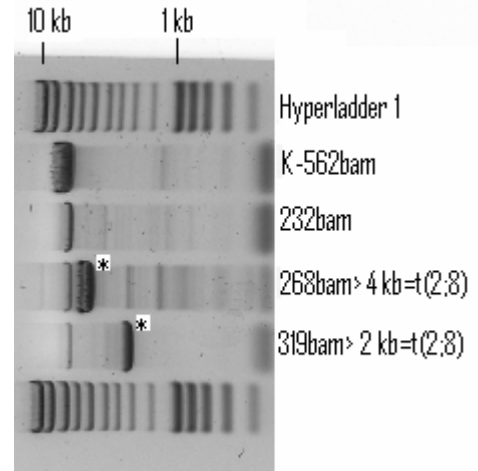


Abb. 4.7: Gelbild Nr.232ecor

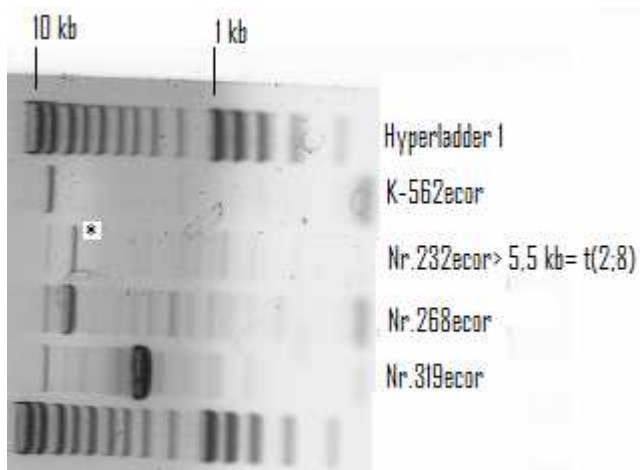


Abb. 4.8: Gelbild P15bam

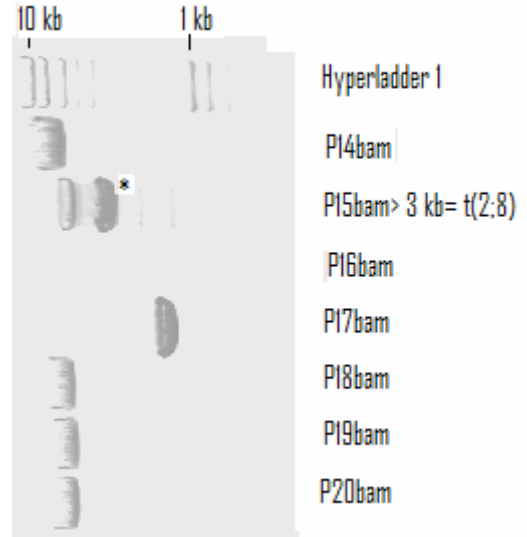


Abb. 4.9: Gelbild P33ecor, P37ecor

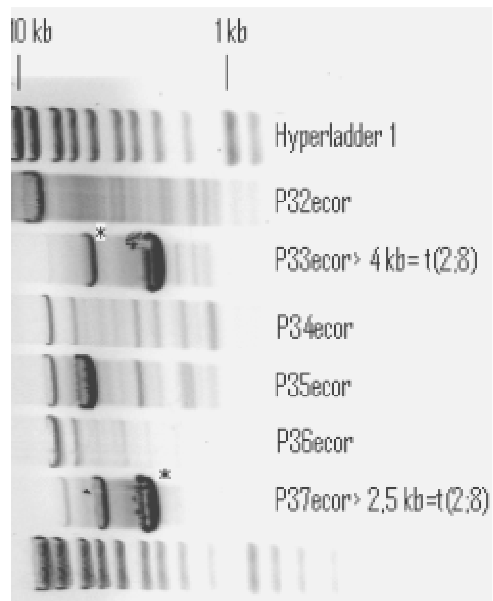
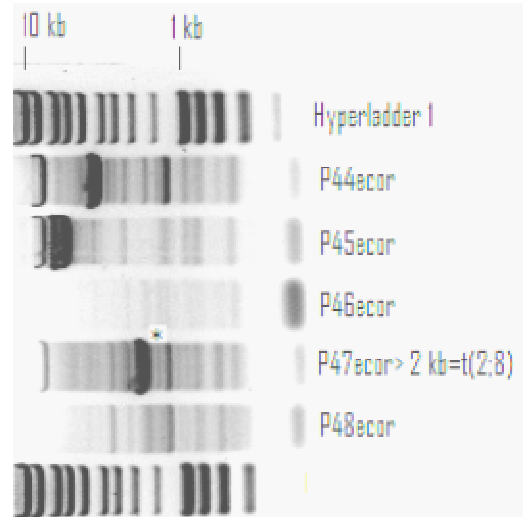


Abb.4.10: Gelbild P47ecor



4.2 LOKALISATION DER BRUCHPUNKTE AUF 2p11

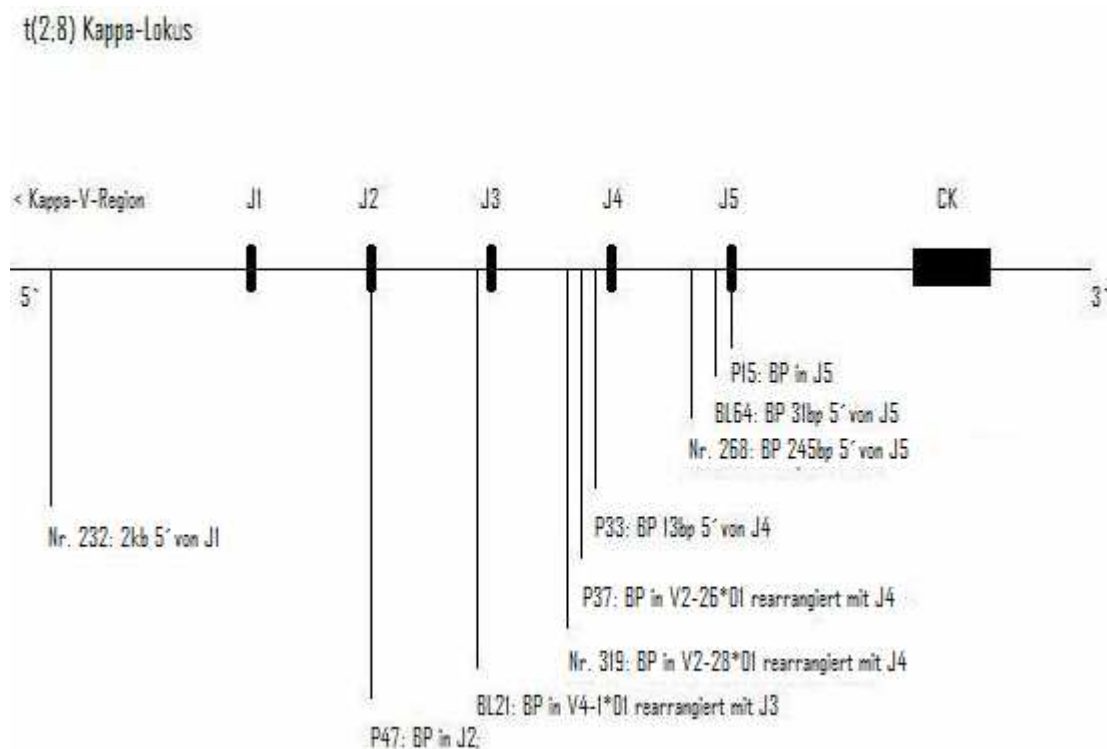
Die mit den Zelllinien BL21 und BL64 insgesamt neun gefundenen Bruchpunkte waren auf dem Kappalokus wie folgt verteilt:

2,1 kb 5' von J1 lag der Bruchpunkt der Probe Nr. 232. Innerhalb von J2 lag der Bruchpunkt der Probe P47. Die Zelllinie BL21 zeigte ein Rearrangement zwischen J3 und V4-1. Der Bruchpunkt lag innerhalb des V-Segments.

Nr. 319 zeigte ein abgeschlossenes Rearrangement zwischen J4 und V2-28 mit dem Bruchpunkt innerhalb des V-Segments.

Die Probe P37 war an J4 mit V2-26 rearrangiert, ebenfalls mit dem Bruchpunkt innerhalb des V-Segments. 13 bp 5' von J4 lag der Bruchpunkt der Probe P33, die Probe Nr. 268 war 245 bp 5' von J5 gebrochen. Die Zelllinie BL64 hatte ihren Bruchpunkt in einer Distanz von 31 bp in 5' Richtung von J5, die Probe P15 war innerhalb von J5 gebrochen.

Abb. 4.11: Lokalisation Bruchpunkte 2p11



4.3 LOKALISATION DER BRUCHPUNKTE AUF 8q24

Die Bruchpunkte auf 8q24 waren allesamt 3' von *MYC* gelegen. Ihre Aufzählung erfolgt in 5'>3'-Richtung.

Die Angaben der Entfernung zu *MYC* beziehen sich auf das 3' Ende von Exon 3 der Referenzsequenz GRCh37 ref NT_008046.16.

Mit einem Abstand von 1.315 bp 3' von *MYC* war der Bruchpunkt von P47 der *MYC* am nächsten gelegene. Die Probe Nr.232 war 1.839 bp 3' von *MYC* gebrochen. Darauf folgte mit einem Abstand von 10.199 bp der Bruchpunkt von Nr.268. Der Bruchpunkt von P37 lag in einer Entfernung von 45.558 bp 3' zu *MYC*.

Die beiden Zelllinien hatten ihre Bruchpunkte etwas mehr als 100 kb 3' von *MYC*:

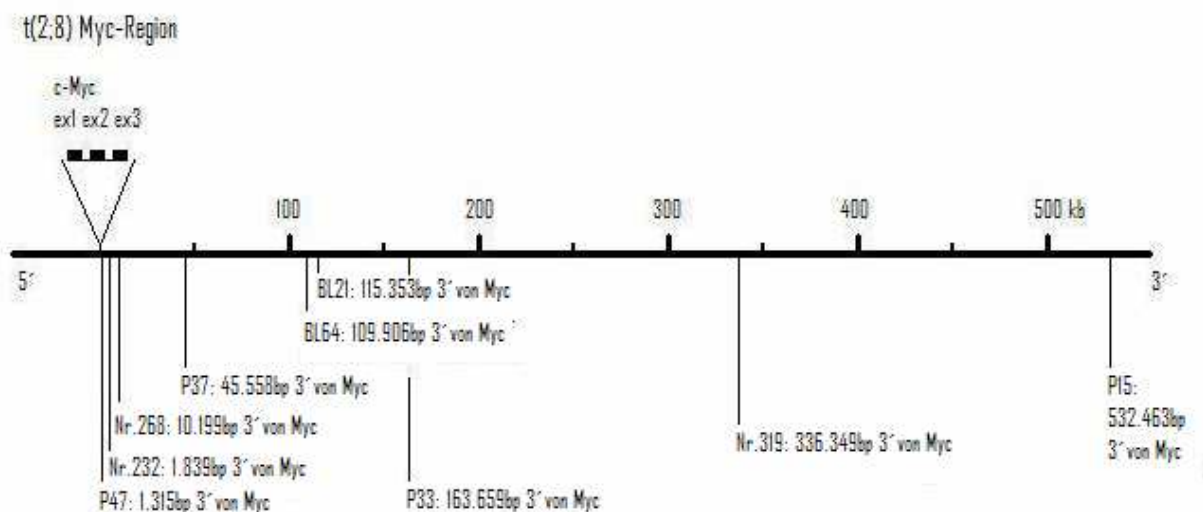
BL64 in einer Distanz von 109.906 bp, BL21 115.353 bp 3' von *MYC*.

In einem Abstand von 163.659 bp wurde der Bruchpunkt der Probe P33 lokalisiert.

Der Bruchpunkt der Probe Nr. 319 lag 336.349 bp 3' von *MYC*.

P15 war mit einer Distanz von 532.463 bp am weitesten 3' von *MYC* gebrochen.

Abb. 4.12: Lokalisation Bruchpunkte 8q24



4.4 CHARAKTERISIERUNG DER BRUCHREGIONEN

(siehe auch 4.5 LEGENDE ZUR SEQUENZANALYSE)

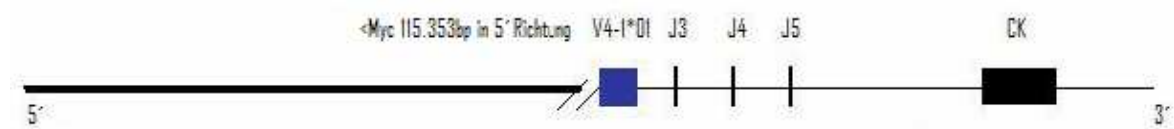
4.4.1 t(2;8)-Zelllinien

4.4.1.1 BL21

Der Bruchpunkt der Zelllinie BL21 auf der(8) lag innerhalb des von mit J3 rearrangierten V-Segments. Das V-Segment stimmte zu 95,95% mit IgkV4-1*01 überein. Die Analyse über IMGT/V-QUEST ergab ein unproduktives Kappa-Rearrangement durch die V-J-Junktion. Der Bruchpunkt auf 2p11 lag 359 bp 5' des 5'-Endes von J3. Die Distanz des Bruchpunktes zum 3' Ende von MYC-Exon 3 betrug 115.353 bp.

Das translozierte Fragment kam in einer knapp 4 kb großen BamHI-Bande zur Darstellung. Der Bruchpunkt wurde mit dem Primer IgKJ5F1 nicht erreicht. Unter Verwendung eines weiteren (in 3'>5'-Richtung laufenden, an J3 annealenden) F-Primers (IgKJ5F1seqneu) konnte der Bruchpunkt sequenziert werden.

Abb. 4.13: Bruchregion BL21 (Legende 4.5)



```
5'
CAATGTGTAGACGAAAGGATGAGTGTCCTTTTGGTGTGTGGAGAGCTTTGATGGGGCATGTGATGTGTAG
GGCTTAGGGGGTATGCTGGGGTGGCTGGGAAAGGTGGTTGGGTGCTCTGGGAAGGCTTTTATAGACACT
GCGTGGCAGGCCTAG<8MYCRegion/2IgK>TCCAACAATAAGA ACTACCTAGCTTAATACCAGCAGA
AACCAGGACAGCCTCCTAAGTTGCTCATTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACC
GATTCAGTGGCAGCGGGTCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCagCAGCCTGCAGGCTGagGATGTG
GCAATTTATTACTGTCAGCCATGTTATAGTACTCCCTTTTTTTCAGAGGAGGGGAtATTGTTCCACAG
GACaCTAGCTTGTGGCTAATTTTTAAGATTTCTAAATCagAATAACTTCATTGGGGGAAAGAGGCTT
GCTGAGCTTTCAGGGAGGTTTTTGTAAAGGGAAAAGTTAAGACGAATCAATGTGATTCACTTTCGG
CCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAAC
3'
```

4.4.1.2 BL64

Der Bruchpunkt der Zelllinie BL64 auf der(8) konnte 31 bp in 5'-Richtung von J5, innerhalb der zugehörigen Nonamersequenz detektiert werden, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hartl und Lipp 1987 (43). Der Abstand zu *MYC* betrug 109.906 bp. Da der Bruchpunkt relativ nahe an J5 lag, konnte er in einem 3 kb BamHI-Fragment mit IgKJ5F1 sequenziert werden. In einem Bereich von 355 bp 5' des Bruchpunktes innerhalb der *MYC*-Region befanden sich drei heptamerähnliche Sequenzen, ebenso 449 bp und 733 bp 3' des Bruchpunktes in der Wildtypsequenz von 8q24. In einem Bereich von knapp 1 kb um den Bruchpunkt fanden sich also insgesamt fünf Pseudo-Heptamere in der *MYC*-Region.

Ferner konnte 62 bp 5' des Bruchpunktes eine Sequenz von 10 bp Länge identifiziert werden, die sich innerhalb des Kappalokus auf der(8) wiederholte: die letzten sieben Basenpaare von J5 sowie die ersten drei Basenpaare des angrenzenden Heptamers.

Der reziproke Bruchpunkt kam mit den Primern BL64C2R1 und BL64C8F1 in einem 1 kb großen Amplifikat zur Darstellung. Die ersten 17 bp, die auf der(8) 3'an den Bruchpunkt grenzten, also das 5' Ende des Anteils des Kappalokus definierten, lagen als Duplikation auf der(2) vor. Sie grenzten 5'an den Bruchpunkt, grenzten also auch hier den Kappalokus gegenüber der *MYC*-Region ab. Zwischen den Bruchpunkten auf der(8) und der(2) in 8q24 waren 9 bp des ursprünglichen *MYC*-Lokus verloren gegangen.

Abb. 4.14: Bruchregion BL64 (Legende 4.5)



der(8)

5' **CACAGTG** GTTTGTATAGTAAGA **CACAGTG** ATGGTGTGGACCCATGCACAGCCAGCTTTGCAGATGTAAA
 GAATAGCGACTTTGCCTGACATAATTGGTGTCTGCACATGGGATTAACAAGTAAGATTGATGTGAATTTA
 TTCTTTCATTTTATGTAGACTCACTGATTGGGTAAGTGTGGAAATAATGT **CACAGTG** CCTTTTTAAGTTAA
 GAACATGTAGTTGTGATCAGGAGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCAGTTTGGGAGGCTGAAGTGG
GTGGATCACT GAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGGCAAAAACCCGCTCTACTAAAAA
 TA<8MYCRegion/2IgK> **TAAGGGGAAAGTAATT** AAGTTAA **CACTGTG** **GATCACC** aTCGGCCAAGG
 GACACGACTGGAGATTAA 3'

der(2)

5'CGGTCAGGTTAGTGATATTAACAGCGAAAAGAGATTTTTGTTAAGGGGAAACTAATT<2IgK/8MYCRegion>GGTGGGCGCCTGTAATCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCCAG
3'

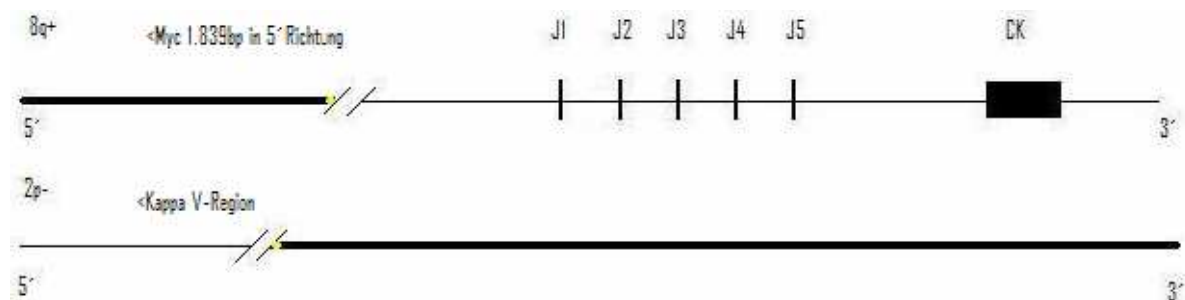
4.4.2 Positivproben

4.4.2.1 Probe Nr. 232

Bei der Probe Nr. 232 war bereits zytogenetisch eine t(2;8) diagnostiziert. Sie zeigte folgendes Immunmarkerprofil: Positivität für CD10 (69%), CD19 (83%), CD20 (83%) und CD22 (54%), bei Negativität für CD5 (11%), CD23 (4%) und TdT (0%); ferner war die Expression von Oberflächenimmunglobulin mit Kappa-Leichtkettenrestriktion nachgewiesen. Der Bruchpunkt auf der(8) wurde in einem 5,5 kb EcoRI-Fragment mit dem Primer 23240seqR2 sequenziert. Aufgrund seiner Lage 2.121 bp 5' des 5'Endes von J1 erfolgte die Darstellung innerhalb des autoligierten Fragmentes mit einem R-Primer. Die Region 3' des Bruchpunktes war unverändert und entsprach der Kappa-Wildtypsequenz. Der Abstand des Bruchpunktes zum 3'Ende von MYC-Exon 3 auf der(8) betrug 1.839 bp. Der reziproke Bruchpunkt auf der(2) wurde mit dem Primer 23240C2R1 in einem 1 kb Amplifikat sequenziert. Die Bruchpunkte innerhalb der Kappaloki auf der(8) und der(2) lagen in einer Distanz von 429 bp (der(8) 2.121 bp 5' von J1, der(2) 2550 bp 5' von J1). Die reziproken Bruchpunkte innerhalb der MYC-Region grenzten mit einer 14 bp-Duplikation direkt aneinander beziehungsweise überlappten sich.

In Bruchpunktnähe innerhalb der MYC-Region wurden keine RSS-ähnlichen Sequenzen gefunden.

Abb. 4.15: Bruchregion Nr. 232 (Legende 4.5)



der(8)

5'CATGTGTATTAATTATAAGCCTCTGAAAACCTATGGCCCAA<8MYCRegion/2IgK>ACGCTTGTTGCTTC
CGTTGAGTGACTTTACTCCTGGAGTATAATCTGCATATAGTTCA 3'

der(2)

5'CAATTAGTACAGTTTTATTATTTCTAAAACTATAAAATGAA<2IgK/8MYCRegion>AACCTATGGC
CCAAAGCAGAAATGATGTTGAATATATAGGTAAATGAAGGATGCTATTGCTGTTCTAATTACCTCATTGTCT
CAGTCTCAAAGTAGGTCTTCAGCTCCCTGTACTTTG 3'

4.4.2.2 Probe Nr. 268

Bei Nr. 268 war zytogenetisch eine t(2;8) gesichert. Das Immunmarkerprofil zeigte folgendes Expressionsmuster: Positiv für CD10 (30%), CD19 (83%), CD20 (96%) und CD22 (69%).

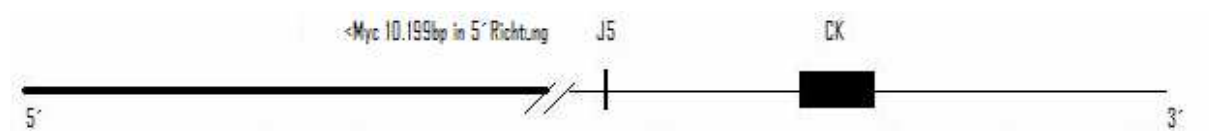
Es war negativ für CD5 (1%), CD23 (11%) und TdT (0%), bei kappa-restringierter Leichtkettenexpression membranständiger Immunglobuline.

Der Bruchpunkt auf der(8) konnte durch Sequenzierung eines 4 kb großen BamHI-Fragmentes mit dem Primer IgKJ5F1 245 bp in 5'-Richtung von J5 lokalisiert werden. Der Bruchpunkt auf 8q24 lag 10.199 bp 3' von MYC.

Eine CACTGTG-Sequenz lag unmittelbar 5' des Bruchpunktes, eine zweite 593 bp weiter in 5'-Richtung in der MYC-Region der Wildtypsequenz. Ein Hexamer am 5' Ende von J5 fand sich 28 bp 5' des Bruchpunktes als Sequenzhomologie auf 8q24 wieder.

Die 245 bp zwischen J5 und dem Bruchpunkt wurden über NCBI-BLAST mit 83,3% Übereinstimmung der Region 5' von IgKJ5 zugeordnet. Ein V-Segment konnte über IMGT/V-QUEST nicht zugeordnet werden.

Abb. 4.16: Bruchregion Nr. 268 (Legende 4.5)



5'CCCTACCTGATCTCTACTTTCTGGTCCCCTTATCCATGGTTATCTTGATCACAAATAGCCAGCAATCGTT
AACCACTGTG<8MYCRegion/2IgK>ATTTAAATTTGGAGACAAACTGTTTGTGAGGTAAAAAGTCTG
GGCAATTCCAAAGAGTTCAGGTGTTTCAAAAAGTCACATGAGTAAGGGGTAGAAAGTGAGATC
ATCGTAAGGAATAGGCAAGTACCAGTTACTTAAGGGGGGCATCTCACCTTCAAGATTTTCGCTGCA
TCGGTCAGGTGAGTGATTTGAACAGCGAAAAGAGATTTTGTTAAGGGTCAAGTTAGTAAATTTAA
AGTGTGGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGcCTGGAGATTTAAAC 3'

Rot: identische 6bp-Sequenz (auch bei P15 und BL64 ist diese Sequenz am 5' Ende von J5 involviert)

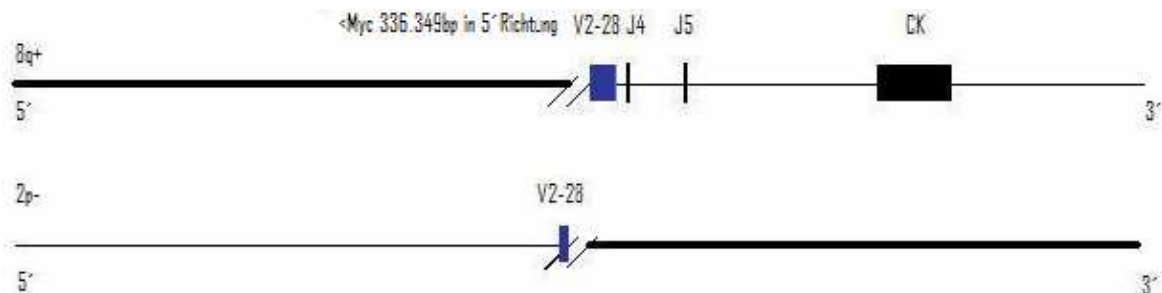
4.4.2.3 Probe Nr. 319

Die Probe Nr.319 war zytogenetisch als t(2,8) diagnostiziert. Das Immunmarkerprofil war positiv für CD10 (56%), CD19 (67%), CD20 (72%) und CD22 (39%), bei Negativität für CD5 (11%), CD23 (7%) und TdT (2%), sowie Expression membranständiger Immunglobuline mit Lambda-Leichtkettenrestriktion. Die Sequenzierung eines 3 kb BamHI-Fragmentes mit IgKJ5F1 zeigte ein mit J4 rearrangiertes V-Segment: V2-28. Dieses war exakt am 5'Ende von J4, der ursprünglichen Position der Heptamersequenz angefügt. V2-28 wies eine Deletion von 6 Nukleotiden in Codon 53 und eine Deletion von 16 Nukleotiden innerhalb von Codon 94 auf. Letztere führte zu einer Verschiebung des Leserahmens.

Der Bruchpunkt lag 147 bp 5' des 5'Endes des rearrangierten J4 innerhalb Codon 45 von V2-28. Die Entfernung des Bruchpunktes zu *MYC* betrug 336.349 bp.

Mit dem Primer 319C8F1 konnte in einem 1 kb-Amplifikat der reziproke Bruchpunkt auf der(2) sequenziert werden. Die Sequenzen von der(8) und der(2) grenzten direkt aneinander.

Abb. 4.17: Bruchregion Nr. 319 (Legende 4.5)



der(8)

5' CAGAACTTTGTTTTTGCCCC**TACTGTG**AGTTTCTGTTCTGAACACCCCTTAGTTAAGTGTTCCTGGT
 GA<8MYCRegion/2IgK>**AGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCC**(6bp)**ATTTGGGTTCTAATCGGGCCT**
CCGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTGCACTGAAAATCAGC
AGAG(16bp)**TGGGGTTTACTGTCATGGAAGTTCTAGAAACTCCGCTCACTTTCGGCGGAGG**
GACCAAGGTGGAGATCAAACGTAAGTGCACCTTTCCTAATGCTTTTTCTTATAAGGTTTTAAATTTG
 G 3'

der(2)

5' **ACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGT**
CTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACTAATTTGGATTGGTACCTGCAGA<2IgK/
8MYCRegion>**AGCAGGTTTCTACCAAAGGAGACCAAAGCTCAGTGCTTTCCGCTGCTGAGCTCGCTGGG**
GTAGGTGACTAACCCTCTCCTAGCATCTGCTTCTAACCTGCTTGGGCTTCAGGGGGTGAATGAGATTCT
GCAATAGGTGCTCAATCCACATTTCTTTTATTTCCCTTTTCTGTTTTATATGAAAAAAACTCATAATTTA
TAAGCACTGAATCTATAACTGAGCTTCCAAAAACCCACCTGGGCATTTAC 3'

4.4.2.4 Probe P15

Das Immunmarkerprofil der Probe P15 zeigte folgenden Befund: Positivität für CD19 (95%), CD20 (98%) und CD22 (62%) bei Negativität für CD10 (12%), CD5 (5%), CD23 (2%) und TdT (2%). Die Zellen zeigten membranständiges Immunglobulin mit Lambda-Leichtkettenrestriktion. Morphologisch entsprach der Befund einer B-ALL, die fehlende Expression von CD10 war hierfür allerdings untypisch. Durch die molekulargenetische Untersuchung mit der inversen Long Distance PCR wurde eine t(2;8) in einem 3 kb großen BamHI-Fragment identifiziert. Auf der(8) lag der Bruchpunkt im Kappalokus innerhalb von J5. Innerhalb der letzten 11 bp am 5'Ende von J5 waren unter Berücksichtigung einer Deletion von zwei Nukleotiden 8 bp sequenzhomolog zu der den Bruchpunkt am 3'Ende begrenzenden Sequenz der *MYC*-Region.

Der Bruchpunkt innerhalb der *MYC*-Region auf der(8) befand sich 532.463 bp 3' von *MYC*.

Der reziproke Bruchpunkt auf der(2) wurde mit den Primern P15C2R1 und P15C8F1 innerhalb des Kappalokus 20 bp 5' des 5'Endes von J5 ausgemacht. Zwischen den reziproken Bruchpunkten auf dem Kappalokus waren 28 bp abhanden gekommen.

Der *MYC*-Anteil der amplifizierten reziproken Bruchregion auf der(2) war folgendermaßen verändert: ein 150 bp- Abschnitt (gelb unterlegt) war im Vergleich zur Wildtypsequenz 607 bp in 5'-Richtung verschoben und begrenzte mit seinem 5'Ende den Bruchpunkt. Das 3'Ende der verschobenen Sequenz war durch eine AAA-Sequenz markiert.

Abb. 4.18: Bruchregion P15 (Legende 4.5)



der(8)

5' GAATCTATAATTATTTCCAAATAATTTTTTAAACTTTTTTTTTATGCTGGATCCCCTTCAGCTTTATTAAC
 CCTCATAGTCCATTTCAATTCCTTGAACATGCCAGGACCTCTCACCTCTGGGCTTTGGCACAAACCACCTG
 CAAAATTTTATCTCATAACTTCTGCTAAACCTAGCTAACTTCTGCTAAACTTT **CACACGT** CTTTTTTGGGGA
 GGATGTGTTCTCTGAAACTCCAGACCTATAGGTCTCTAAGTGTAGTTCGCTGGACCAGCAACTTCAGCATCA
CCCG <8MYCLokus/2IgK>GCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACA TaTAtGTAATTTTTTC 3'

Ad J5-WT >**GATCACCTTCGG**CCAAAGGGACACGACTGGAGATTA AAC
 P15-BP >**CATCACCTTCGG**CCAAAGGGACACGACTGGAGATTA AAC

der(2)

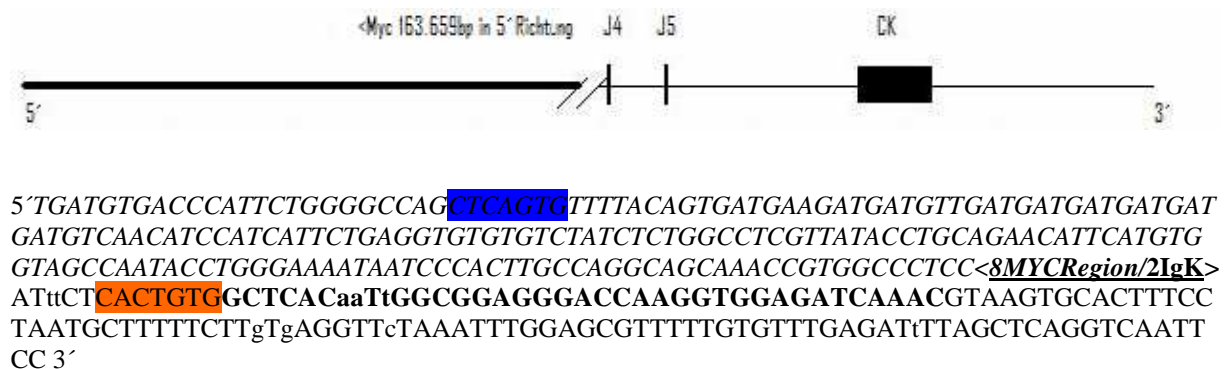
5'
 GCGAAAAGAGATTTTTGTTAAGGGGAAAATA <2IgK/8MYCRegion> **ATGAGTCAGGAATTGGGGCTGG
 AGTGGGATCCCAGGCAAA CAGGATCCATGAGATGCTTCCCAATTTGAGGGCAAGTGTCTTCTTCAGAAC
 TCTAGGGACAGAGGGGCTATTGCATCTCTAGCTGGATTGGACCTACATCACTTCTTTTAAATTCACAGGCC
 CCACCTGGACCTTCTGAACCAGAACTCTGGGTATGTGGCCAGCTCTCCAGGTGATTCTTTGCCTG
 GTTAAGTTTGAAGTTTACCAGGGT 3'**

4.4.2.5 Probe P33

P33 zeigte folgendes Immunmarkerprofil: CD10 (9%), CD19 (55%), CD20 (13%), CD22 (0%), CD5 (7%) und TdT (3%); CD23 war nicht bestimmt worden. Die untersuchten Zellen waren überwiegend B-Lymphozyten mit membranständiger Immunglobulinexpression bei Kappa-Leichtkettenrestriktion und intrazytoplasmatischer IgM-Expression. Trotz des Fehlens, beziehungsweise der geringen Expression Burkitt-Lymphom-typischer Antigene war die Probe immunzytologisch und klinisch als reifzelliges B-NHL, beziehungsweise als ein das Knochenmark infiltrierendes Burkitt-Lymphom gewertet worden und wurde deshalb mit untersucht.

Molekulargenetisch zeigte sich eine t(2;8), die mit IgKJ5F1 in einem 4 kb großen EcoRI-Fragment sequenziert wurde. Der Bruchpunkt wurde 13 bp in 5'-Richtung des 5' Endes von J4, 6 bp 5' der erhaltenen Heptamersequenz lokalisiert. Der Abstand des Bruchpunktes zu *MYC* auf 8q24 betrug 163.659 bp. Eine heptamerähnliche Sequenz konnte 166 bp 5' des Bruchpunktes in der *MYC*-Region identifiziert werden. Der Kappalokus war nicht rearrangiert, zeigte aber sequentielle Abweichungen in Abgleich mit der Referenzsequenz.

Abb. 4.19: Bruchregion P33 (Legende 4.5)



4.4.2.6 Probe P37

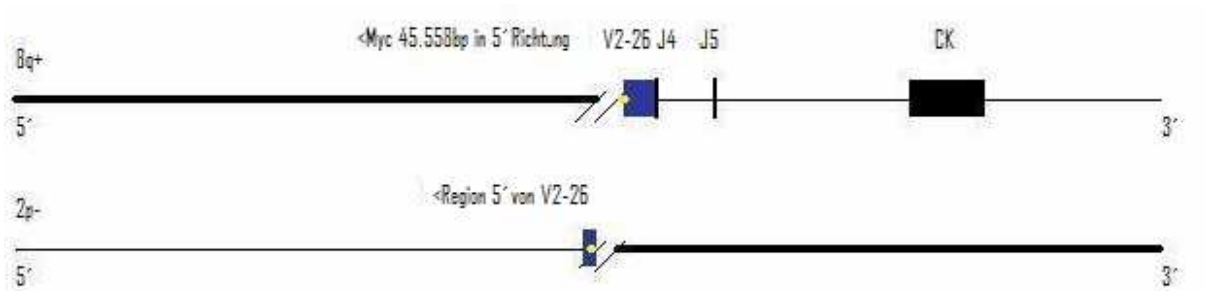
P37 wies ein für reifzellige B-NHL typisches Immunmarkerprofil auf: Bei Nachweis einer Kappa-Leichtkettenrestriktion der Immunglobuline waren CD10 (92%), CD19 (93%), CD20 (93%) und CD22 (64%) positiv, während CD5 (7%), CD23 (2%) und TdT (7%) nur gering exprimiert waren und damit als negativ gewertet wurden.

Der Bruchpunkt von P37 fand sich in einem 2,5 kb großen, VJ-rearrangierten EcoRI-Fragment. Nach Verwendung von IgKJ5F1 wurde er mit einem zweiten, weiter 5' annealenden, für die Probe individuell entworfenem Primer (P37ecorseqneu) sequenziert. Die Sequenzierung zeigte ein Rearrangement zwischen J4 und V2-26. Im codierenden Anteil von V2-26 wurden zwei Insertionen detektiert: G-Insertion in Codon 52 und C-Insertion in Codon 83. Dies führte zu einer Verschiebung des Leserahmens.

Die Probe war auf der(8) innerhalb des Kappalokus 165 bp 5' des codierenden Anteils von V2-26 gebrochen. Die Distanz des Bruchpunktes auf der(8) zu *MYC* betrug 45.558 bp.

Bei P37 gelang die Sequenzierung des reziproken Bruchpunktes auf der(2) mit den Primern P37C2R1 und P37C8F1. Die Analyse der Bruchregionen beider beteiligter Chromosomen zeigte eine 48 bp-Duplikation, die beide reziproken Bruchpunkte innerhalb des Kappalokus begrenzte. Die Bruchpunkte innerhalb der *MYC*-Region auf der(8) und der(2) grenzten bis auf die Deletion einer Base (im Vergleich zur Referenzsequenz) direkt aneinander. In der *MYC*-Region auf der(8) fand sich eine Nonamer-ähnliche Sequenz 71 bp 5' des Bruchpunktes. Darüber hinaus fand sich eine Sequenzhomologie von 9 bp, die sich 40 bp 3' des Bruchpunktes, innerhalb der duplizierten Sequenz des Kappa-Anteils wiederholte (rot und unterstrichen).

Abb. 4.20: Bruchregion P37 (Legende 4.5)



der(8)

5'AGGAGCATCAATCAAAGCATGCCCTATAGCAGGTAAATGTGATCACAAAGACAAATAATGACTTTCTGAAT
 AATAAAACCATAGGAATAAATAACAAATTAATGACTGGTGAATATGAGTTTATTGACATTAAAGCAAATTTA
 TAAAACC<8MYCRegion/2IgK>TAGAATCCCCTTTGCGGCTTGCAAATTTGGAATATGTTTAGaaTATAA
 A(ta)CACAAACAACAAAAAATTATATAGCCTGAAATAAAAAATGAAAATTTATGATAAATGACACA
 TGATATTTGTACATATCCTTCCACTTCTTTCTATTTATTTaAGGATCCAGTGCACAGACTCCtCTCTC
 CTTGTCTATCACCCCTGGAGAGCAGGCCTCCATGTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGC
 ATAGTGATGGATACACCTATTTGTATTGGTTTCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCACAgTC
 CTGATCTATGAAGTTTCCAACCGTTTCTCTGGAGTGCCAGATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTC
 AGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTAcTACT
 GCATGCAAGATGCACAAGATCaCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC3'

der(2)

5'
 CAAAAAGAAGCAAGGACCTGTGTGATGTGGTGAAGATTGTCACACAGAGAAAAGGGAGGTGCTGTA
 GGTGATTTCTAGAATCCCCTTTGCGGCTTGCAAATTTGGAATATGTTTAGaaTATAAT<2IgK/
 8MYCRegion>_CTCATAAACAAAAGGAAAAGGCAAATAAGACATCAGGGATATATTTTGGCAATTTACATGG
 CAAATAAAGTGTTAATATCTCATAAGTCACTTCTAAAAATTCACCTTAAGGAAATCATTAAAGGTCATATGCAA
 TGATTTA
 3'

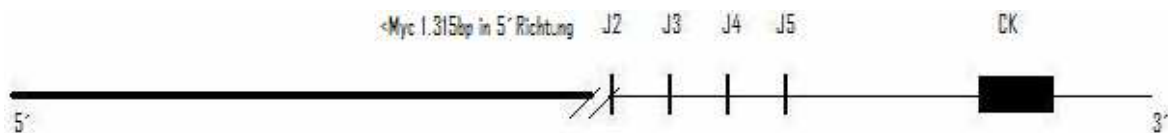
4.4.2.7 Probe P47

Die Probe P47 zeigte folgendes Immunmarkerprofil: Positivität für CD10 (83%), CD19 (77%), CD20 (89%) und CD22 (70%) sowie Negativität für CD5 (17%) und TdT (1%). CD23 war nicht bestimmt worden. Es wurde eine Lambda-Leichtkettenrestriktion nachgewiesen.

Die Translokation fand sich in einem 2 kb großen EcoRI-Fragment. Um den Bruchpunkt zu sequenzieren wurde nach IgKJ5F1 ein an J3 annealender zweiter Primer mit 3'>5'-Laufrichtung eingesetzt: IgKJ5F1sequen.

Der Bruchpunkt auf 2p11 lag innerhalb der letzten 7 bp am 5'Ende von J2. Die Entfernung zu *MYC* betrug 1.315 bp. P47 war mit dieser Entfernung die am nächsten von *MYC* gebrochene Probe; auf der(8) konnte kein VJ-Rearrangement festgestellt werden. In Bruchpunktnähe innerhalb des *MYC*-Lokus konnte keine Rekombinationssignal-ähnliche Sequenz ausfindig gemacht werden. Es bestand eine Homologie innerhalb der ersten sieben, die Translokation auf 8q24 in 3'-Richtung begrenzenden Basenpaare zur Wildtypsequenz des abhanden gekommenen 5'Endes von J2. Der reziproke Bruchpunkt wurde nicht detektiert.

Abb. 4.21: Bruchregion P47 (Legende 4.5)



5' TTTTATCCCTAACTCTACATCAACCCCATGAAGGAGATACTGTTGATTTCCCATATTAGAAGTAGAGAGG
 GAAGCTGAGG**CACAC**<8MYCRegion/2IgK>TTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTAA
 GTACTTTTTTCCACTGATTCTTCACTGTGCTAATTAGTTTACTTTGTGTTCCTTTGTGTGGATTTTCA
 TTAGTCGGATGCCAGGGATCTAACAACTTCATTCCCAGGTTAGGTACAGAGGAGGGGAAATTGTT
 CCACAGGACGCTAGCTTGTGGCTAATTTTAAAGATTTCTAAATCAAATAAATTTCATTGGGGGAAA
 GAGGCTTGCTGAGCTTTCAGGGA**GGTTTTGT**AAAGGGAAAAGTTAAGACGAAT**CACTGTGATTCA**
CTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTAAGT 3'

J2-Wildtyp: **TGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT**
 Bruchregion P47: **GGCACAC**<>**TTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGAT**

4.5 LEGENDE ZUR SEQUENZANALYSE

Normal: Anteil Chromosom 2

Kursiv: Anteil Chromosom 8

Fett schwarz: codierende J-Segmente

Fett blau: codierende V-Segmente

Rote Schrift: Sequenzhomologien

Orange unterlegt: Heptamersequenzen Kappalokus

Blau unterlegt: Heptamer- bzw Heptamerähnliche Sequenz *MYC*-Region

Grau unterlegt: Nonamersequenzen

Gelb unterlegt: Duplikationen

Klein: Nukleotidabweichungen zur Referenzsequenz (DD: Punktmutation, sequenzierbedingt, Polymorphismus)

In Klammern: Deletionen

Unterstrichen: Primersequenzen; einzelne Basen: Insertion

5. DISKUSSION

5.1 DISKUSSION DER METHODE DER INVERSEN LONG-DISTANCE-PCR

In dieser Arbeit konnten durch eine Kombination aus Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse und inverser Long-Distance-PCR insgesamt sieben t(2;8) translozierte Proben aus einer Population von n=51 B-ALLs identifiziert und molekular charakterisiert werden.

Die Verwendung einer konventionellen Long-Distance-PCR hierzu wäre in Hinblick auf bisher ermittelte Bruchpunkte auf 8q24 unökonomisch gewesen (40):

Das Screening der Region, in welcher in der vorliegenden Arbeit Bruchpunkte gefunden wurden, hätte mit konventioneller PCR nur unter Verwendung einer Vielzahl an Primern funktioniert. Ausgehend von IgKJ5F1 hätten pro Probe und Ansatz über fünfzig die *MYC*-Region abdeckende R-Primer verwendet werden müssen (s. Abb. 4.12).

Die Schnittstellen der in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme lagen auf 8q24, in der Region 3' von *MYC* in hoher Dichte.

Auf diese Weise entstand pro Verdau eine Vielzahl von Fragmenten der distalen *MYC*-Region (siehe 4.1.1).

Die Bruchpunktsituation auf dem Kappalokus machte die Verwendung der inversen Long-Distance-PCR sinnvoll: Bisher beschriebene Bruchpunkte lagen alle in einem Bereich 5' der konstanten Region, innerhalb der J-Segmente, beziehungsweise wenige Kilobasen 5' von J1 (40), (42).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme hatten auf dem Kappalokus eine Schnittstelle 3' der konstanten Region und eine Schnittstelle 5' von J1.

Mit der Methode wurden Bruchpunkte erfasst, die zwischen der distalen und der proximalen Restriktionsschnittstelle auf dem Kappalokus lagen: Eine Translokation t(2;8) bewirkte eine Veränderung des Restriktionsschnittmusters im Sinne eines RFLP.

Die verwendeten Primer wurden knapp vor den Schnittstellen auf dem Kappalokus gewählt (s. Abb. 4.1). Sie wurden voneinander fort laufend orientiert. Durch Autoligation erfolgte die Orientierung aufeinander zu (s. Abb. 4.4). Je nach Ligationsprodukt entstanden unterschiedliche PCR-Produkte.

Durch die so entwickelte Methode war es möglich, die Region 3' wärts von *MYC* mit insgesamt fünf Primern auf das Vorliegen einer t(2;8) zu untersuchen.

5.1.2 Diskussion der Methode zur Detektion reziproker Bruchpunkte

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Suche nach reziproken Translokationsprodukten ermöglichte die Darstellung der Bruchpunkte auf der(2) bei Vorliegen einer reziproken Translokation (siehe 4.1.4). Durch für jede positiv getestete Probe individuell entworfene, an den Bruchpunkten auf der(8) orientierte Primer konnten in vier von sieben t(2;8) translozierten Proben (mit BL64 in fünf von neun Fällen) auch die reziproken Bruchpunkte molekular charakterisiert werden. In den Fällen, in denen kein reziproker Bruchpunkt amplifiziert wurde könnte die Ursache eine nicht vollständig reziproke Translokation sein. Auch Sequenzabweichungen vom Wildtyp auf der(2) oder Duplikationen wie zum Beispiel bei BL64, P37 und auch von Denny et al bei der t(8;22)-Zelllinie KK124 beschrieben (51), sind ein möglicher Grund für eine ausgebliebene Amplifikation reziproker Bruchpunkte.

5.1.3 Limitationen der verwendeten Methode und mögliche Ansatzpunkte zur Verbesserung

Die Grundannahme zur Methode war eine Lokalisation der Bruchpunkte auf dem Kappalokus 5' der konstanten Region bis unweit des 5'Endes von J1. Der Maximalabstand der gewählten Restriktionsenzyme zum 5'Ende von J1 betrug 6.805 bp (XbaI) (Hind III: 2.748 bp, BamHI: 3.129 bp, EcoRI: 5.836 bp).

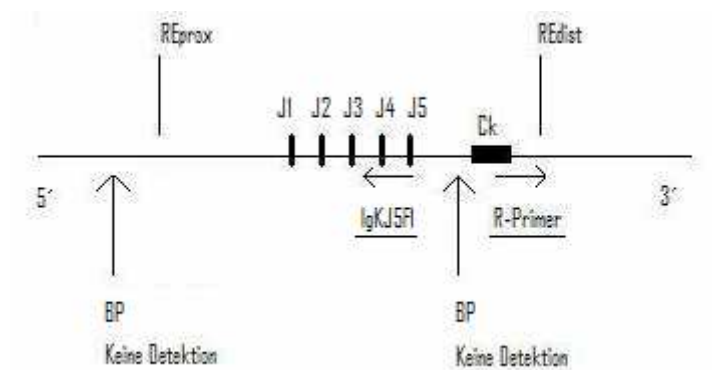
Weiter 5'gelegene Bruchpunkte wurden nicht erfasst (s. Abb. 5.1). Dies könnte ein Grund für das Ausbleiben der Detektion der Translokation bei den Zelllinien JBL2 und Ci-1 sein.

Der Bruchpunkt von JBL2 auf 2p11 wurde bisher nur als 5' der J-Segmente beschrieben (45). Bruchpunkte zwischen J5 und der IgKC-Region konnten ebenfalls nicht detektiert werden (s. Abb. 5.1).

Auch eine unregelmäßige Verteilung der Restriktionsschnittstellen auf 8q24, beziehungsweise zu große Schneideabstände in dieser Region sind mögliche Ursachen für die Nicht-Detektion einer Translokation. Durch die Wahl der verwendeten vier Restriktionsenzyme wurde versucht, diesen Faktor zu minimieren (s. Tab. 4.1, Abb. 4.2).

Eine weitere Limitation stellt die technische Aufwändigkeit der Methode dar; insbesondere die Autoligation mehrerer Kilobasen großer Fragmente.

Abb. 5.1: zu Limitationen der Methode (Kappalokus)



Eine Möglichkeit, die Sensitivität zu steigern stellt die Verwendung zusätzlicher in 3'>5'-Richtung laufender F-Primer, die näher am IgKC-Lokus annealen, dar. So könnten auch weiter 3' von J5 gelegene Bruchpunkte erfasst werden. Auch die Verwendung weiter 5' von J5 annealender F-Primer könnte die Amplifikation großer autoligierter Fragmente verbessern.

Durch Verwendung von Restriktionsenzymen mit komplexeren Schnittsequenzen und selteneren Schnittstellen im Genom könnten größere Fragmente des Kappalokus erzeugt werden. Auf diese Weise könnten auch weiter 5' gelegene Bruchpunkte erfasst werden. Allerdings hätten solche Enzyme auch größere Schneideabstände in der MYC-Region, was die Wahrscheinlichkeit einer Bruchpunktdetektion mindert.

5.1.4 Fazit zur Methode

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dass die Methode der inversen Long Distance PCR in Kombination mit konventioneller Sequenzierung zur molekularen Charakterisierung der varianten Translokation t(2;8) geeignet ist. Gegenüber anderen zur Detektion einer Translokation verwendeten Methoden wie konventionelle Zytogenetik oder FISH ermöglicht diese Methode eine detaillierte Darstellung der Bruchregionen auf molekularer Ebene. Dieser Aspekt ist Voraussetzung für eine sinnvolle Diskussion zur Ätiopathogenese und entscheidend für die weitere Erforschung und das Verstehen des Zustandekommens der Translokation.

5.2 LOKALISATION DER BRUCHPUNKTE DER POSITIVPROBEN UND IMMUNMARKERPROFIL

In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt sieben neue Fälle einer varianten Translokation t(2;8) beschrieben werden. Alle gefundenen Bruchpunkte waren 3´ von *MYC* gelegen.

Die Abstände der Bruchpunkte zueinander variierten stark (siehe 4.3/ Abb. 4.12):

Der am nächsten 3´ von *MYC* gelegene Bruchpunkt lag in einer Distanz von 1.315 bp (P47).

Der am weitesten von *MYC* entfernte Bruchpunkt lag 532.463 bp in 3´ Richtung (P15).

Das bisher bekannte Spektrum der Bruchpunktlokalisierung konnte damit um mehr als 200 kb in 3´ Richtung erweitert werden (40), (42).

Von den sieben gefunden varianten Translokationen t(2;8) waren zwei innerhalb eines rearrangierten V-Segmentes gebrochen: Nr.319 in V2-28 und P37 in V2-26.

In fünf von sieben Fällen wurde der Bruchpunkt in der J-Region des Kappalokus gefunden (siehe 4.2/ Abb. 4.11):

Zwei Bruchpunkte lagen direkt innerhalb codierender J-Segmente: P15 innerhalb von J5 und P47 innerhalb von J2. Am weitesten 5´ auf dem Kappalokus lag der Bruchpunkt der Probe Nr. 232: 2 kb 5´ von J1, 3.715 bp 3´ der proximalen Schnittstelle von EcoRI.

Die Lokalisation der Bruchpunkte innerhalb der J-Region schließt ein bereits stattgefundenes V-J-Rearrangement nicht aus. Die Zelllinien KOBK101 und LY91 beispielsweise haben ihren Bruchpunkt zwischen J4 und J5 beziehungsweise 3´ von J5, während J4 auf der(2) mit einem V-Segment rearrangiert ist (52).

Ein VJ-Rearrangement weiter in 5´ Richtung der Bruchpunkte auf der(2) wurde bei den hier beschriebenen Translokationen nicht ausgeschlossen.

Tab. 5.1: Immunmarkerprofile (Antigenexpression in %)

Probe	VJrearr.	CD10	CD19	CD20	CD22	CD5	TdT	CD23
Nr. 232	?	69	83	83	54	11	0	4
Nr. 268	?	30	83	96	69	1	0	11
Nr. 319	+	56	67	72	39	11	2	7
P15	?	12	95	98	62	5	2	2
P33	?	9	55	13	0	7	3	k.A.
P37	+	92	93	93	64	7	7	2
P47	?	83	77	89	70	17	1	k.A.

Die Analyse der Immunmarkerprofile aller t(2;8) translozierten Zellen zeigte in sechs von sieben Fällen starke Positivität für CD20. CD10 war in fünf Fällen positiv (30-92%)

und einmal negativ (13%). CD5, TdT sowie CD23 waren durchgehend negativ (<20%).

Das Immunmarkerprofil der beiden VJ-rearrangierten Proben entsprach dem reifer Keimzentrumslymphozyten: Positivität für CD10, CD19, CD20 und CD22 bei Negativität für CD5, CD23 sowie TdT (2), (33).

Die Proben bei denen kein VJ-Rearrangement festgestellt wurde zeigten ein heterogenes Immunmarkerprofil: Auffällig waren vor Allem Negativität für CD10 bei P15, sowie Negativität für CD10, CD20 und CD22 bei P33.

Dies zeigt, dass eine t(2;8) auch in Zellen mit Burkitt-untypischem Immunphänotyp vorliegen kann.

5.2.1 Bruchpunkte von BL21 und BL64 auf 8q24 in Hinblick auf bisherige Publikationen

In dieser Arbeit wurden die Bruchpunkte der beiden Zelllinien BL21 und BL64 auf 8q24 knapp 115 kb (BL21) beziehungsweise 110 kb (BL64) 3' von *MYC* lokalisiert. Henglein et al lokalisierten die Bruchpunkte dieser beiden Zelllinien 1989 durch Chromosomenwalking mit Hybridsonden und Pulsed Gel Field Electrophorese (PGFE) in einer Entfernung von etwa 130 kb 3' von *MYC* (42).

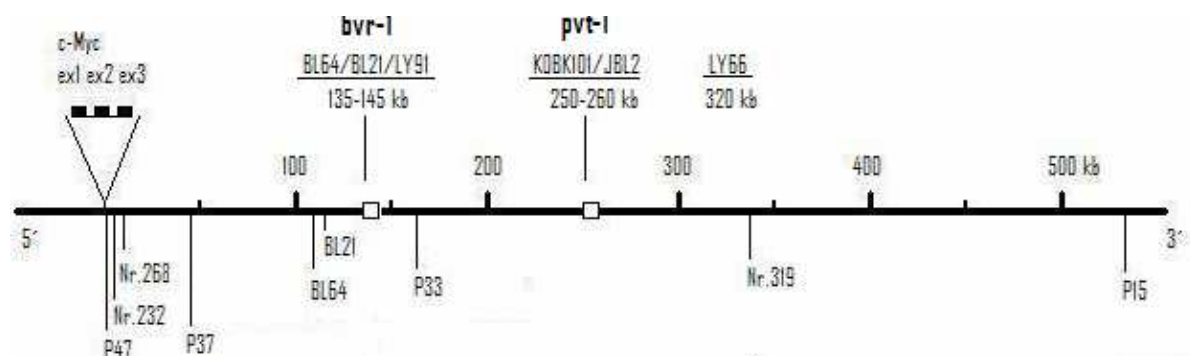
Sie definierten für die Lokalisation dieser Bruchpunkte und des Bruchpunktes der Zelllinie LY91 eine ungefähr 11 kb umfassende Region in einer von ihnen angenommenen Entfernung von 140 kb 3' von *MYC*: Burkitt's variant rearranging region-1 (bvr-1) (42), (s. Abb. 5.2).

In dieser Region fand sich ebenso das proximale Ende einer Deletion bei der T-Zell-Leukämie-Linie MT-1, ferner das distale Ende eines *MYC*-Amplikons in der Colon-Carcinom-Zelllinie COLO320-HSR (42), (53).

Die in dieser Arbeit verwendete Methode gestattete eine Charakterisierung der Bruchpunkte von BL21 und BL64 auf dem Kappalokus wie folgt: der Bruchpunkt von BL21 wurde innerhalb eines mit J3 rearrangierten V-Segmentes 5' von J3 gefunden. Der Bruchpunkt der Probe BL64 konnte 5' von J5 in der J-Region des Kappalokus ausgemacht werden. Diese Ergebnisse und auch die Nukleotidsequenz der die Bruchpunkte flankierenden Basen sowohl auf dem Kappalokus als auch in der *MYC*-Region stimmten exakt mit bereits zu den Zelllinien publizierten Ergebnissen überein (42), (43).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Bruchpunkte der Zelllinien BL21 und BL64 exakt 115.353 bp und 109.906 bp 3' von *MYC* lokalisiert werden. Damit liegt die Region bvr-1 etwa 30 kb weiter 3' auf 8q24 als von Henglein et al 1989 beschrieben (s. Abb. 5.2).

Abb. 5.2 (oben: publizierte Daten (42), (43); unten: Ergebnisse dieser Arbeit)



5.3 MYC-DEREGULATION BEIM BURKITT-LYMPHOM

Für alle drei bekannten Translokationsvarianten des Burkitt-Lymphoms t(8;14), t(8;22) und t(2;8) wurden folgende Gemeinsamkeiten bei der Deregulation von *MYC* beschrieben:

- 1) Bei allen Formen wird das translozierte Allel sehr viel stärker als das normale Allel exprimiert (54).
- 2) Es lässt sich ein Wechsel der transkriptionsinitiierenden Promotoren von *MYC* auf dem translozierten Allel nachweisen: der unter physiologischen Bedingungen aktive Promotor P2 wird unterdrückt und der Promotor P1 dominiert (54).
- 3) Häufig weist das translozierte *MYC*-Gen Mutationen an der Grenze von Exon 1 zu Intron 1 auf (54). Strukturelle Alterationen des translozierten *MYC*-Allels bei der t(2;8) wurden bisher für die Zelllinien BL64 und JBL2 nachgewiesen: Bei BL64 liegt eine konstitutionelle Duplikation der codierenden Region vor. Bei JBL2 eine 2,5 kb-Duplikation der Promotorregion (44), (45).
- 4) Ein aufgehobener Block der Transkriptionselongation an der Grenze von Exon 1 zu Intron 1 ist beschrieben (54) und
- 5) Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expression des translozierten Allels, im Gegensatz zu der des normalen Allels, durch Natrium-Butyrat unterdrücken lässt (54), (55).

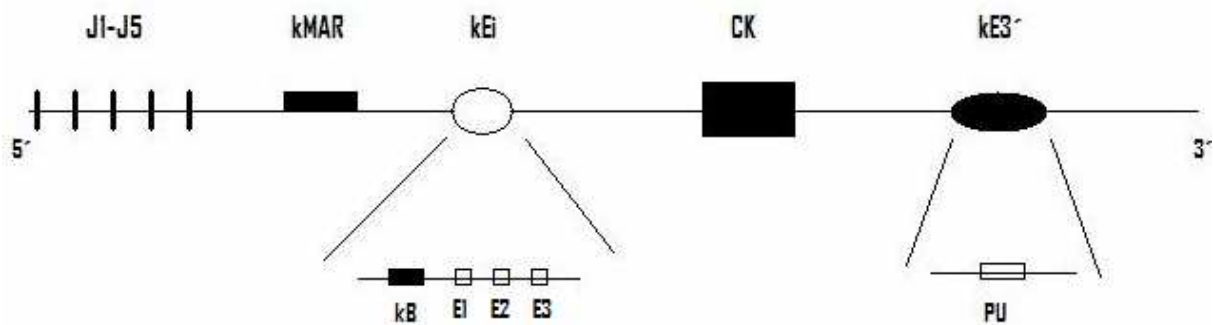
5.3.1 Die translokative Deregulation von *MYC* geschieht durch Enhancer der Immunglobuline

Für die variante Translokation t(2;8) wurden drei an der Deregulation von *MYC* beteiligte Elemente beschrieben: Die Kappa Matrix Attachment Region (kMAR), der Kappa-Intron-Enhancer (kEi), und der Kappa 3' Enhancer (kE3') (46), (55), (56) (s. Abb. 5.3).

kMAR ist 3' von J5, zwischen den J-Segmenten und der konstanten Region des Kappa-Lokus gelegen (46). Weiter 3' ebenfalls zwischen J5 und der konstanten Region ist kEi lokalisiert; kEi beinhaltet eine Bindedomäne für NfKB am 5' Ende sowie drei E-Box-Elemente (46). kE3' befindet sich 3' der konstanten Region und beinhaltet eine PU-Bindedomäne (46).

Alle in dieser Arbeit gefundenen Bruchpunkte lagen 5' der Kappa-Enhancer und führten so zu einer Translokation aller drei beschriebenen Enhancerelemente in die *MYC*-Region.

Abb. 5.3: Kappaenhancer (modifiziert nach (46))



Wittekind et al. veröffentlichten 2000 eine differenzierte Analyse zur Funktion der Kappa-Enhancerelemente bei der Deregulation von *MYC* (46): Durch Transfektion der Enhancer mit den *MYC*-Promotoren und gezielten Deletionen innerhalb der Enhancerelemente konnten sie eine Hierarchie der verschiedenen Untereinheiten bei der Promotorbeeinflussung nachweisen: Bei einer Assoziation aller Enhancer mit den Promotoren und einer P1 Aktivität von 100% führten Mutationen in der PU-Bindedomäne von kE3' zu einer Reduktion der P1-Aktivität auf 64%. Eine mutierte Bindestelle für NfKB in kEi bedingte eine Abnahme der P1-Aktivität auf 17%. Mutationen beider Domänen führten zu einer kompletten Unterdrückung des Enhancements von P1 und P2. Dagegen gingen Mutationen der E-Box-Elemente in kEi mit einer Steigerung der P1-Aktivität einher (46).

Auch für die t(8;14) konnte eine Beteiligung von NfKB an der Expression des translozierten *MYC*-Allels nachgewiesen werden (57).

Die verschiedenen Enhancer-Elemente scheinen mit individuellen Zielsequenzen innerhalb der Promotorregion von *MYC* zu interagieren: Eine Aktivierung des *MYC*-Promotors P1 durch NfKB geschieht über eine Sp1-Bindedomäne innerhalb des Promotors (Sp1 interagiert als ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor funktionell mit NfKB (46)). Eine TATA-Box innerhalb von P1 steht in Zusammenhang mit der vermehrten Expression des translozierten Allels. E-Box-Elemente innerhalb von kEi (vor allem E2) sind mit einer funktionellen Suppression von P2 assoziiert (46).

Die genauen Mechanismen der Deregulation sind bisher nicht verstanden. Fraglich bleibt nach wie vor unter Anderem wie die zum Teil erheblichen Distanzen zwischen den Enhancern und Promotoren überwunden werden.

5.3.2 Möglichkeit der räumlichen Assoziation der Kappa-Enhancer mit *MYC*-Promotoren: Die Loop-Hypothese

Eine Möglichkeit der Annäherung von Enhancern und Promotoren zur Überbrückung der teils erheblichen linearen Distanzen stellt die räumliche Umorganisation des Chromatins dar. Der „Loop-Hypothese“ nach werden die interagierenden Enhancer und Promotoren unter Ausbildung einer Schleife der dazwischen liegenden DNA aneinander gelegt (46), (54).

In diesem Zusammenhang könnte vor Allem die Funktion von kMAR von Bedeutung sein. Matrix-Attachment-Regions sind an der Regulation der Genexpression durch Änderung der chromosomalen Struktur beteiligt (58).

Rätsch et al. gelang es 2002 anhand von Halo-Präparaten der t(2;8)-Zelllinie LY66 eine räumliche Annäherung der Kappa-Enhancer und der *MYC*-Region unter Ausbildung einer Schleife der dazwischen gelegenen DNA im Sinne der Loop-Hypothese nachzuweisen (59). Die lineare Entfernung der Kappa-Enhancer zu den *MYC*-Promotoren bei LY66 beträgt 325 kb (59).

Rätsch et al. konnten auf dem translozierten Allel von LY66 eine Kumulation der transkriptionellen Aktivität in einer Region 30 bis 50 kb 3´ von *MYC* nachweisen (59).

Die transkriptionelle Aktivität auf dem nicht-translozierten Allel war in einem Bereich von 80 kb gleichmäßig um *MYC* verteilt (59). Sie postulierten eine durch die Translokation induzierte Relevanz der beschriebenen Region bei der Transkription des translozierten *MYC*-Allels (59).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Bruchpunkte der Proben P47 und Nr. 232 lagen in einer Entfernung von weniger als 2 kb 3´ von *MYC*. Folglich enthielten sie die von Rätsch et al für LY66 beschriebenen transkriptionell aktiven Regionen der *MYC*-Region nicht auf der(8).

Auch bei der Probe Nr.268, die ihren Bruchpunkt 10 kb 3´ von *MYC* hatte, fehlte die erwähnte Region auf der(8). Es müssen bei den genannten Proben also zumindest teilweise andere Mechanismen beziehungsweise Sequenzen an der Deregulation von *MYC* beteiligt sein.

Fraglich ist, ob sich die deregulierenden Prozesse nach der Lokalisation des Bruchpunktes sowie der Reife der Zelle, also dem zellulären Millieu, unterscheiden.

5.3.3 Zelluläres Milieu und lineare Distanz zwischen Kappa-Enhancern und *MYC*-Promotoren: Weitere Einflussfaktoren auf die Deregulation von *MYC*?

Spencer et al. gelang es 1990 durch Transfektion translozierter *MYC*-Allele aus Burkitt-Zelllinien in murine prä-B-Zellen und *Xenopus* Oozyten einen Wechsel der Promotoraktivität von P1 nach P2 sowie einen Block der Transkriptionselongation an der Grenze von Exon 1 zu Intron 1 zu induzieren (60). Sie hoben damit eine Burkitt-typische Deregulation von *MYC* durch Wechsel des zellulären Milieus bei Persistenz der Translokation auf.

Einen Hinweis auf die Relevanz der Lokalisation des Bruchpunktes bei der Deregulation von *MYC* lieferten Eick und Bornkamm 1989: Sowohl in varianten Translokationen, als auch in einem Fall einer t(8;14) mit einem Klasse III Bruchpunkt (Entfernung des Bruchpunktes über 100 kb 5' von *MYC* (22)) ließ sich die Transkription des translozierten *MYC*-Allels auf der(8) nicht durch eine Kombination aus dem Phorbol-Ester TPA und Cyclohexidin unterdrücken. In Fällen von t(8;14) mit einem Klasse I oder Klasse II Bruchpunkt hingegen schon (61).

Für eine Beteiligung weiterer Elemente und Mechanismen an der onkogenen Deregulation von *MYC* neben der Translokation in den Einflussbereich von Enhancern der Immunglobuline sprechen ferner auch die Beschreibung von *MYC*/IgH-Arrangements in B-Lymphozyten gesunder Mäuse, sowie die 1995 von Müller et al. beschriebene Prävalenz von 2 % solcher Translokationen in B-Lymphozyten bei insgesamt 99 untersuchten gesunden Menschen (62), (63).

5.4 MECHANISMEN DER MOLEKULAREN PATHOGENESE DER TRANSLOKATION BEIM BURKITT-LYMPHOM

Im nun folgenden Teil der Arbeit sollen die Ursachen und der Zeitpunkt des Entstehens der beschriebenen Translokationen diskutiert werden:

Vor Allem drei lymphozytenspezifische Mechanismen spielen bei der Entstehung der Chromosomentranslokationen beim Burkitt-Lymphom eine Rolle:

- 1) Fehler beim Antikörperklassenwechsel
- 2) Fehler bei der somatischen Rekombination der V(D)J-Segmente sowie
- 3) Fehler beim Prozess der somatischen Hypermutation.

5.4.1 Der Antikörperklassenwechsel

Der Prozess des Antikörper-Klassenwechsels besitzt keine Relevanz für das Entstehen einer varianten Translokation t(2;8). Der Wechsel der konstanten schweren Ketten geschieht in den Switchregionen des Immunglobulin-Schwerkettenlokus auf 14q32 und wird in Zusammenhang mit der Pathogenese der t(8;14) gesehen (10), (52).

5.4.2 Die V(D)J-Rekombination

Der Prozess der VDJ-Rekombination wird in Verbindung mit der Entstehung von Chromosomentranslokationen bei verschiedenen Entitäten diskutiert:

Neben den Translokationsvarianten des Burkitt-Lymphoms wird er auch mit der t(11;14) *CCND1/IgH* beim Mantelzelllymphom, der t(14;18) *BCL2/IgH* beim folliculären Lymphom und der t(1;14) *BCL10/IgH* bei MALT-Lymphomen in Zusammenhang gebracht (52), (64-66).

Die Rekombination der variablen Domänen der Immunglobuline findet in Vorläufer-B-Zellen im Knochenmark zuerst auf dem Schwerkettenlokus IgH unter Beteiligung von RAG1, RAG2 sowie HMG1 und HMG2 statt. Die Zusammenfügung der Elemente erfolgt nach dem Mechanismus des *Non Homologous End Joining* (NHEJ) (siehe 1.6.2.1), (31), (67).

Initial erfolgt die Assoziation von einem D- mit einem J-Segment (frühe Pro-B-Zelle), danach die Assoziation mit einem V-Segment (späte Pro-B-Zelle) (33b).

Nach Rekombination der schweren Ketten werden in der Prä-B-Zelle die variablen leichten Ketten auf dem Kappa- beziehungsweise Lambdalokus somatisch rekombiniert (33b).

Bei Translokationen, deren Entstehung auf fehlerhafte V(D)J-Rekombination zurück geführt wird ist der Bruchpunkt auf dem immunologisch codierenden Chromosom in der Nähe von RSS beziehungsweise von V, D oder J-Segmenten gelegen (43), (52), (67).

An die Bruchpunkte ergänzte N-Nukleotide, Deletionen und Sequenzduplikationen zwischen den reziproken Bruchpunkten sind charakteristisch für eine Beteiligung von TdT (52), (67).

Wie und warum DNA-Brüche auf dem nicht-immunologisch codierenden Chromosom induziert werden ist nicht klar. Neben Pseudo- oder kryptischen RSS (sequentiell ähnliche Heptamer- oder Nonamersequenzen mit geringerer Affinität zu Rekombinasekomplexen) werden Chi-Sequenzen (ursprünglich detektiert als Hot Spot-Rekombinationssequenzen in *E. coli*) als Targets des V(D)J-Rekombinase-Komplexes diskutiert (31), (52), (67).

Auch simple Desorientierung der Rekombinationsenzyme an mikrohomologen Sequenzen beziehungsweise deren *single-strand annealing* (SSA) nach Doppelstrangbruch-Induktion werden als Ursachen diskutiert (67).

Die V(D)J-Rekombination findet in unreifen B-Zellen des Knochenmarks statt (33b).

Burkitt-Lymphomzellen imponieren immunphänotypisch meist als reife keimzentrumsassoziierte Zellen (6), (9).

Aufgrund dessen scheint fraglich ob die V(D)J-Rekombination überhaupt für die Entstehung von Translokationen beim Burkitt-Lymphom in Frage kommt.

Han et al. gelang es 1996 die Expression von RAG1 und RAG2 in B-Lymphozyten mit Keimzentrumsphänotyp nachzuweisen (68). 1997 konnten sie nachweisen dass periphere Keimzentrumslymphozyten unter RAG-Expression aktiv ihre Leichtketten rearrangierten: sekundäre V(D)J-Rekombination beziehungsweise Rezeptor-Revision (69). Auch Wilson et al. gelang 2000 der Nachweis einer gleichzeitig stattfindenden somatischen Hypermutation und Rezeptor-Revision in humanen tonsillären B-Lymphozyten mit Keimzentrumsphänotyp (70).

Eine Beteiligung des V(D)J-Rekombinase-Multienzymkomplexes bei der Entstehung von Translokationen, auch bei schon abgeschlossenem V(D)J-Rearrangement in Zellen mit einem reifen Keimzentrumsphänotyp, ist also nicht ausgeschlossen.

Eine andere Möglichkeit stellt die Entstehung der Translokation in einer Vorläufer-B-Zelle mit anschließender Reifung zum Keimzentrumslymphozyt dar.

5.4.3 Die somatische Hypermutation

Die somatische Hypermutation geschieht in reifen Lymphozyten des Keimzentrums mit abgeschlossener somatischer Rekombination nach Antigenkontakt. Ihr Zweck ist die weitere Affinitätssteigerung des Antigenrezeptors zu seinem Substrat (33a).

Dies wird vor Allem durch Nukleotidsubstitutionen in rearrangierten variablen Loci nach dem Zufallsprinzip erreicht. Deletionen und Duplikationen machen etwa fünf Prozent der Ereignisse aus (36), (37).

Der molekulare Mechanismus der somatischen Hypermutation sowie die an ihm beteiligten Elemente sind nur teilweise bekannt. Es besteht eine Abhängigkeit des Prozesses von der Präsenz von Immunglobulinenhancern (71). Während der somatischen Hypermutation entstehende DNA-Doppelstrangbrüche werden durch *Activation-induced Cytidine Deaminase* (AID) induziert (4), (72).

Beim Burkitt-Lymphom werden vor Allem Translokationen mit Bruchpunkten innerhalb bereits rekombinierter V-Segmente ohne nachvollziehbare räumliche Assoziation zu (kryptischen) RSS ätiopathogenetisch mit somatischer Hypermutation in Zusammenhang gebracht (52).

5.5 ANALYSE DER POSITIVPROBEN IN MOLEKULARPATHOGENETISCHER HINSICHT

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Transloaktionen kommen dem heutigen Wissensstand nach pathogenetisch die drei oben beschriebenen Mechanismen in Frage.

Für die jeweilige Zuordnung einer Translokation zu einem der Mechanismen wurden hier folgende Kriterien berücksichtigt:

- Immunphänotyp
- nachgewiesenes VJ-Rearrangement
- Zeichen stattgehabter Hypermutation
- Assoziation der Bruchregion mit potentiellen (Pseudo)RSS
- Präsenz von Sequenzhomologien
- den Bruchpunkt flankierende Sequenzduplikationen (als Hinweis auf V(D)J-Rekombinase-Komplex-Beteiligung: durch eine nach endonukleolytischer Spaltung erfolgte komplementäre Ergänzung einzelsträngig überlappender DNA).

5.5.1 BL21 (siehe auch 4.4.1.1):

Die Zelllinie BL21 zeigte ein abgeschlossenes VJ-Rearrangement zwischen J3 und V4-1.

Der Kappalokus auf der(8) wies sequenzielle Abweichungen vom Wildtyp auf. V4-1 lag 146 bp 5´ von J3, die Heptamersequenz war erhalten und wies eine Punktmutation auf (CAATGTG). 147 bp 5´ des Bruchpunktes auf der(8) in der *MYC*-Region konnte ein mögliches Pseudo-RSS (CAATGTG) identifiziert werden.

Die Lage des Bruchpunktes innerhalb eines (unproduktiv) mit J3 rearrangierten V-Segments spricht für ein Entstehen der Translokation nach erfolgter VJ-Rekombination.

Die Translokation bei BL21 könnte demnach durch somatische Hypermutation oder durch Rezeptor-Revision entstanden sein.

5.5.2 BL64 (siehe auch 4.4.1.2):

Der Bruchpunkt der Zelllinie BL64 befand sich 31 bp 5' von J5, innerhalb der zu J5 gehörenden Nonamersequenz. Eine 17 bp-Sequenz begrenzte den Bruchpunkt des Kappaanteils auf der(8). Das letzte Nukleotid der 17bp-Sequenz am 5'Ende entsprach dem 3'Ende der Nonamersequenz, innerhalb der der Bruchpunkt auf der(8) lag.

der(8): 5'<8MYCRegion/2IgK>**TTAAGGGGAAAGTAATT**3'

Die 17 bp-Sequenz begrenzte als Duplikation den Bruchpunkt am 3'Ende des Kappalokus auf

der(2): 5'**GATTTTGT****TAAGGGGAAACTAATT**<2IgK/8MYCRegion>3'

(Duplikation gelb, Nonamersequenz grau)

Folgende Sequenzhomologie auf der(8) konnte identifiziert werden: eine 10 bp-Sequenz die Teil des 5'Endes von J5 und der Heptamersequenz war, fand sich in einem Abstand von 62 bp 5'des Bruchpunktes in der MYC-Region wieder.

Ferner konnte eine Akkumulation dreier Heptamersequenzen in einem Bereich von 355 bp 5'des Bruchpunktes auf der(8) in der MYC-Region festgestellt werden.

Die Lokalisation des Bruchpunktes innerhalb einer Nonamersequenz, sowie das Vorhandensein mehrerer Heptamersequenzen in der MYC-Region in Bruchpunktnähe sind Indizien für eine Beteiligung von RSS am Zustandekommen der Translokation. Ferner könnte die 10 bp-Sequenzhomologie zwischen 2p11 und 8q24 als Rekombinationssubstrat vom V(D)J-Rekombinasekomplex fehlinterpretiert worden sein.

Die die Bruchpunkte begrenzende Duplikation könnte nach endonukleolytischer Spaltung durch komplementäre Ergänzung einzelsträngig überlappender DNA bei der Translokation entstanden sein.

Die beschriebenen Aspekte sprechen für eine Assoziation der Translokationsentstehung mit RAG-Proteinen beziehungsweise mit dem V(D)J-Rekombinasekomplex, am ehesten im Rahmen fehlerhafter V(D)J-Rekombination. Auch Hartl und Lipp diskutierten 1987 bei dieser Zelllinie eine fehlerhafte V(D)J-Rekombination als wahrscheinlichste Ursache (43).

5.5.3 Nr. 232 (siehe auch 4.4.2.1):

Der Immunphänotyp dieser Probe entsprach dem reifer Keimzentrumslymphozyten.

Der Bruchpunkt lag über 2,1 kb 5´ von J1. Die J-Region 3´ des Bruchpunktes war nicht rearrangiert und wies keine Anzeichen stattgehabter Hypermutation auf. In der Umgebung des Bruchpunktes in der *MYC*-Region konnten keine Pseudo-RSS oder kryptische RSS ausgemacht werden (am nächsten gelegen waren CACAGTG in einer Entfernung von 4,3 kb 3´ sowie CACTGTG etwas mehr als 8 kb 3´ des Bruchpunktes). Sequenzhomologien zwischen den Translokationspartnern konnten nicht identifiziert werden.

Zwischen den reziproken Bruchpunkten innerhalb der Kappaloki auf der(8) und der(2) war eine Sequenz von 429 bp Länge deletiert. Zwischen den reziproken Bruchpunkten der *MYC*-Region lag eine 14 bp-Duplikation.

Die Translokation der Probe Nr. 232 weist keine typischen Charakteristika für einen der oben genannten Mechanismen auf:

Gegen eine Assoziation mit dem Prozess des V(J)-Rearrangements spricht, dass der Bruchpunkt weder in der Nähe eines J-Segmentes gelegen, noch nachvollziehbar mit einem RSS, oder mit Sequenzhomologien assoziiert war. Der Immunphänotyp der Probe entsprach dem eines reifen, keimzentrumsassoziierten Lymphozyten; untypisch waren allerdings fehlende Anzeichen eines stattgehabten Leichtkettenrearrangements, zumindest auf der(8).

5.5.4 Nr. 268 (siehe auch 4.4.2.2):

Der Immunphänotyp der Probe war wegen der relativ geringen Expression von CD10 (30%) untypisch für einen Keimzentrumslymphozyten.

Der Bruchpunkt der Probe lag 245 bp 5´ von J5 in einem nicht VJ-rearrangierten Kappalokus. Die 245 bp zwischen J5 und dem Bruchpunkt stimmten zu 83,3% mit der Wildtypsequenz des Kappalokus überein. Die an J5 grenzende Heptamersequenz war deletiert.

Eine potentielle Pseudo-RSS grenzte mit nur einem Nukleotid Abstand direkt 5´ an den Bruchpunkt (CACTGTG). Eine 6 bp-Sequenzhomologie bestand zwischen dem 5´Ende von J5 und der translozierten *MYC*-Region (28 bp 5´ des Bruchpunktes). Auch bei BL64 waren diese Nukleotide Teil der Sequenzhomologie (bei Nr. 268 die letzten 6 bp, bei BL64 die letzten 7 bp und zusätzlich 3 bp des angrenzenden Heptamers).

Das Vorliegen eines nicht VJ-rearrangierten Kappalokus, die Lage eines Pseudo-RSS in unmittelbarer Bruchpunktnähe, sowie eine J-assoziierte Sequenzhomologie in der *MYC*-

Region sind Indizien die für eine ursächliche Beteiligung des Prozesses der somatischen Rekombination an der Translokationsentstehung sprechen.

5.5.5 Nr. 319 (siehe auch 4.4.2.3):

Die Probe Nr. 319 wies immunphänotypisch Charakteristika reifer Keimzentrumslymphozyten auf und zeigte ein abgeschlossenes VJ-Rearrangement zwischen J4 und V2-28. Die VJ-Fusion erfolgte exakt am 5´Ende von J4 an der ursprünglichen Position des Heptamers. V2-28 wies zwei Deletionen auf: eine 16 bp-Deletion 111 bp 3´des Bruchpunktes sowie eine 6 bp-Deletion 24 bp 3´des Bruchpunktes. Die Bruchpunkte auf der(8) und der(2) grenzten sowohl innerhalb von V2-28 als auch innerhalb der *MYC*-Region direkt aneinander.

Das abgeschlossene VJ-Rearrangement mit Zeichen bereits stattgehabter Hypermuation (zwei Deletionen), das Fehlen einer Assoziation mit RSS sowie der Keimzentrumphänotyp der Probe sind Argumente für somatische Hypermuation als Translokationsursache bei dieser Probe. Ein plausibles Szenario wäre eine missglückte weitere Deletion als Ursache eines Doppelstrangbruches mit Verlust des physiologischen Ligationspartners und konsekutiver Translokation.

5.5.6 P15 (siehe auch 4.4.2.4):

Das Immunprofil der Probe P15 war mit Negativität von CD10 untypisch für einen reifen Keimzentrumsphänotyp. Der Bruchpunkt lag innerhalb von J5, in einem auf der(8) nicht VJ-rearrangierten Kappalokus. Eine mögliche Pseudo-RSS fand sich 88 bp 5´ des Bruchpunktes in der *MYC*-Region. Die unmittelbar in die Translokation involvierten Sequenzen beider Loci auf der(8) waren sequenzhomolog:

Die letzten 11 bp des 5´ Endes der Wildtypsequenz von J5 entsprachen unter Berücksichtigung einer 2 bp-Deletion exakt den ersten 8 bp des 3´ Endes der an sie translozierten Sequenz der *MYC*-Region:

J5-Wildtyp: **GATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGA**

P15-Bruchregion: **CATCACC_CG <>GCCAAGGGACACGACTGGAGA**

Der reziproke Bruchpunkt auf der(2) lag 28 bp weiter 5´auf dem Kappalokus.

In der *MYC*-Region auf der(2) wurde der Bruchpunkt am 5'Ende von einer 150 bp-Sequenz begrenzt. Diese 150 bp-Sequenz befand sich 607 bp 3' ihrer ursprünglichen Position auf dem *MYC*-Wildtyploкус.

Der Mechanismus der Entstehung dieser Transposition bleibt unklar. Theoretisch könnte es sich auch um einen Polymorphismus handeln.

Die Sequenzhomologie der Bruchpunktumgebung auf der(8) und die negative Expression des Keimzentrumsantigens CD10 sind Argumente die am ehesten für fehlerhafte somatische Rekombination als Translokationsursache sprechen.

5.5.7 P33 (siehe auch 4.4.2.5):

Untypisch für ein reifzelliges B-NHL war hier die niedrige Expression der keimzentrumsassoziierten Antigene CD10 (9%) und CD20 (13%). Der Bruchpunkt der Probe auf der(8) lag in einem (soweit nachvollzogen) nicht rearrangierten Kappalokus, 13 bp 5' von J4. Sequenzalterationen fanden sich 5' von J4, innerhalb von J4 und 3' von J4. Die Heptamersequenz am 5'Ende von J4 war vorhanden und sequentiell unverändert. 166 bp 5' des Bruchpunktes in der *MYC*-Region konnte eine Pseudo-RSS im Sinne einer heptamerähnlichen Sequenz ausgemacht werden (CTCAGTG). Hinweise auf Sequenzhomologien zwischen den Translokationspartnern fanden sich nicht.

Die Lokalisation des Bruchpunktes nahe von J4, eine Pseudo-RSS 5' des Bruches in der *MYC*-Region sowie der unreife Immunphänotyp der Probe sprechen für fehlerhafte V(D)J-Rekombination als Ursache der Translokation. Die veränderte Sequenz in und um J4 könnte während der Translokation durch TdT über Deletionen sowie P- und N-Nukleotid-Substitutionen zustande gekommen sein.

Auf der anderen Seite könnten die Abweichungen von der Wildtypsequenz Ursache somatischer Hypermutation sein. Ein bereits stattgefundenes VJ-Rearrangement 5' des Bruchpunktes auf dem Kappalokus (also auf der(2)) wurde nicht ausgeschlossen.

Die Translokation könnte also auch während somatischer Hypermutation eines V-J1/J2/J3-rearrangierten Kappalokus entstanden sein. Ein durch somatische Hypermutation veränderter reziproker Bruchpartner wäre auch eine Erklärung für den nicht gelungenen Nachweis des reziproken Bruchpunktes auf der(2). Gegen ein solches Szenario spricht allerdings der unreife, keimzentrumsuntypische Phänotyp der Probe.

5.5.8 P37 (siehe auch 4.4.2.6):

Der Immunphänotyp von P37 war typisch für den reifer Keimzentrumslymphozyten.

Die Probe zeigte ein abgeschlossenes VJ-Rearrangement zwischen J4 und V2-26. Der Bruchpunkt lag 165 bp 5' der codierenden Sequenz für V2-26, beziehungsweise 452 bp 5' des 5' Endes von J4. In V2-26 fanden sich Anzeichen für abgelaufene Hypermutation: zwei Nukleotidinsertionen, eine 2 bp-Deletion sowie weitere sieben Nukleotidabweichungen von der Wildtypsequenz.

Zwischen den Translokationspartnern auf der(8) fand sich eine Sequenzhomologie von 9 bp Länge in unmittelbarer Bruchpunktumgebung. Diese war in der *MYC*-Region Bestandteil einer Nonamer-ähnlichen Sequenz: **GAATATAAA**AACC. (Rot: Sequenzhomologie, grau unterlegt: Pseudo-RSS).

Auf dem Kappalokus von der(8) bildete die Sequenzhomologie das 3' Ende einer die reziproken Bruchpunkte flankierenden Duplikation von 48 bp Länge.

der(8):

5'<8*MYCRegion*/2IgK>**TAGAATCCCCTTTGCGGCTTGCAAATTTGGAATATGTTTAGa**
aTATAAA3'

der(2):

5'**TAGAATCCCCTTTGCGGCTTGCAAATTTGGAATATGTTTAGaaTATAAT**<2IgK/
8MYCRegion>3'

Bei dieser Probe stellt aufgrund der aufgeführten Charakteristika (Keimzentrumsphänotyp, stattgehabtes VJ-Rearrangement mit Zeichen abgelaufener Hypermutation sowie Pseudo-RSS-Assoziation, Sequenzhomologie und Duplikation) der Mechanismus der Rezeptorrevision nach abgeschlossenem VJ-Rearrangement eine wahrscheinliche Ursache für die Entstehung der Translokation dar.

5.5.9 P47 (siehe auch 4.4.2.7)

Der Immunphänotyp der Probe P47 war keimzentrumstypisch. Der Bruchpunkt auf der(8) lag am 5´ Ende von J2, in einem nicht VJ-rearrangierten Kappalokus. Die J-Region des Kappalokus zeigte keine Abweichung von der Referenzsequenz. (Pseudo-)RSS konnten nicht als an der Translokation beteiligt ermittelt werden.

Eine Sequenzhomologie bestand zwischen dem 5´ Ende der Wildtypsequenz von J2 und der den Bruchpunkt demarkierenden Sequenz der *MYC*-Region: Am 5´ Ende von J2 waren fünf von sieben Nukleotiden identisch zu der an sie translozierten *MYC*-Sequenz (rot).

J2-Wildtyp: **TGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG**

P47 Bruchregion: **GGCACAC<>TTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAG**

Untypisch für den Prozess des V(D)J-Rearrangements wäre ein Schnitt innerhalb eines zu rearrangierenden J-Segments und nicht an seinem 5´ Ende zwischen Heptamer und J-Exon. Andererseits könnte der Bruchpunkt auch direkt am 5´ Ende von J2, zwischen codierendem J-Exon und zugehörigem Heptamer gelegen sein und die beiden abweichenden Nukleotide (T>G, T>C) im Rahmen der Doppelstrangbruchreparatur oder durch TdT als N-Nukleotide nach der Translokation substituiert worden sein.

Auch bei dieser Probe konnte ein bereits stattgehabtes VJ-Rearrangement zwischen J1 und einem V-Segment 3´ des Bruchpunktes auf der(2) nicht ausgeschlossen werden, da kein reziproker Bruchpunkt detektiert wurde.

5.6 FAZIT ZUR MOLEKULAREN CHARAKTERISIERUNG UND AUSBLICK

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Einblick in bisher wenig erforschte molekulare Strukturen. Zur gleichen Zeit werfen sie neue Fragen auf:

Die gefundenen Bruchpunkte variierten stark in ihrer Entfernung zu *MYC*.

Diese Tatsache macht ein allen t(2;8) zugrunde liegendes identisches Zusammenspiel an Mechanismen der Deregulation unwahrscheinlich. Zum Beispiel ist fragwürdig ob eine räumliche Umorganisation im Sinne des Loop-Mechanismus bei geringen Entfernungen der Kappa-Enhancer zu *MYC* (wie bei P47, Nr. 232 und Nr. 268) eine Rolle spielt.

Ferner wäre zu klären ob bei größeren Entfernungen (wie bei der Probe P15) noch weitere Mechanismen zur räumlichen Annäherung der Strukturen beziehungsweise Distanzüberbrückung beitragen.

Durch die Technik der inversen Long Distance PCR gelang eine Beschreibung der Bruchregionen auf molekularer Ebene. Es wurde ein stattgehabtes, abgeschlossenes Ereignis dargestellt. Rückschlüsse auf individuell zugrunde liegende Mechanismen der Pathogenese und den Zeitpunkt der Translokationsentstehung sind somit hypothetisch.

Für die Proben schienen durch Abgleich der identifizierten Sequenzen mit erhobenen, publizierten Daten und Hypothesen unterschiedliche Pathomechanismen plausibel:

Demnach sind die Proben BL64, Nr. 268 und P15 möglicherweise im Rahmen der VJ-Rekombination transloziert. Ein Szenario für die Translokationsentstehung bei der Probe Nr. 319 stellt die somatische Hypermutation dar. Bei der Probe P37 könnte fehlerhafte Rezeptorrevision Ursache der Translokation sein.

Bei den Proben BL21, Nr. 232, P33 und P47 konnte anhand der in 5.5 aufgeführten Kriterien keiner der genannten Mechanismen als wahrscheinlichste Ursache der Translokation gewertet werden.

Die hier praktizierte Methode der inversen Long Distance PCR könnte bei der Charakterisierung weiterer, den Kappalokus betreffender Chromosomentranslokationen Anwendung finden. Eine Voraussetzung hierfür wäre eine Bruchpunktlokalisierung in der Nähe der J-Segmente.

Ein auf diese Weise isolierter Chromosomenbruchpunkt könnte dann zum Beispiel auch als klonaler Marker für die Diagnostik Minimaler Resterkrankung (MRD) genutzt werden.

Insgesamt stellen die hier gewonnenen Daten nur einen kleinen Ausschnitt der komplexen Pathologie der varianten Translokation t(2;8) beim Burkitt-Lymphom dar.

Für ein umfassendes Verständnis ihrer Entstehung, der Deregulation von *MYC* und letztendlich der Erkrankung ist weitere Forschung notwendig, nicht zuletzt um möglicherweise den Grundstein für die Entwicklung differenzierterer Therapieoptionen zu legen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die seltene variante Translokation $t(2;8)(p11;q24)$ beim Burkitt-Lymphom ist nur wenig erforscht und molekular unvollständig verstanden. Den wenigen bisher bekannten Fällen gemeinsam ist die Translokation der Immunglobulinenhancer des Kappalokus in die *MYC*-Region auf 8q24. Dies führt zur Deregulation und Überexpression von *MYC*. In allen beschriebenen Fällen liegt der Bruchpunkt in unterschiedlicher Entfernung 3' von *MYC*.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der inversen Long Distance PCR auf ihre Eignung zur Detektion und Charakterisierung der $t(2;8)$ auf molekularer Ebene verwendet.

Nach Erprobung der Methode an den $t(2;8)$ Zelllinien BL21 und BL64 wurde eine Population von $n=51$ $t(8;14)$ -negativen B-ALL-Proben untersucht.

Insgesamt konnten mit der Methode sieben neue Fälle einer $t(2;8)$ detektiert und charakterisiert werden.

Innerhalb der *MYC*-Region lagen alle dargestellten Bruchpunkte 3' von *MYC*.

Die jeweiligen Abstände variierten stark: der am nächsten von *MYC* gelegene Bruchpunkt lag in einer Entfernung von 1.315 bp, der am weitesten entfernte lag über 530 kb in 3' Richtung.

Auf dem Kappalokus lagen die gefundenen Bruchpunkte in einer Probe innerhalb eines rearrangierten V-Segments. In den restlichen Fällen lag der Bruchpunkt innerhalb der J-Region des Kappalokus.

Bei vier von sieben Proben konnte zusätzlich die reziproke Bruchregion auf der(2) dargestellt werden.

Die mit der Translokation einhergehende Deregulation des Transkriptionsfaktors *MYC* als ein entscheidender Mechanismus der malignen Transformation der Zelle ist Gegenstand intensiver Forschung. Die Einheitlichkeit der deregulierenden Mechanismen erscheint vor dem Hintergrund der vorliegenden Arbeit fragwürdig, besonders in Hinblick auf die ermittelten teils erheblichen Distanzen zwischen dem Bruchpunkt (und damit den Kappaenhancern) und *MYC*.

Ferner herrscht über den Zeitpunkt und die Mechanismen der Translokationsentstehung in der Zelle Unklarheit: diskutiert werden Fehler beim VJ-Rearrangement des Kappalokus, Fehler bei der somatischen Hypermutation sowie bei der Rezeptorrevision nach somatischer Hypermutation.

Die in dieser Arbeit dargestellten molekularen Strukturen der Bruchregionen der Proben gestatteten in vier Fällen eine pathogenetische Zuordnung zu einem der Mechanismen. In den restlichen Fällen war keine eindeutige Zuordnung möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden dass die Methode der inversen Long Distance PCR zur Detektion und Darstellung der varianten t(2;8) auf molekularer Ebene geeignet ist. Die wenigen bekannten Daten zur varianten t(2;8) konnten um sieben neue Fälle ergänzt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Einblick in die Strukturen der Translokation auf DNA-Ebene und ermöglichen Rückschlüsse und Überlegungen zu ihrer molekularen Pathogenese. Gleichzeitig werfen die Ergebnisse neue Fragen auf und zeigen dass zum besseren Verständnis des komplexen Zusammenspiels der vielseitigen pathogenetischen Mechanismen weiterführende Forschung notwendig ist.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Burkitt DP. The Discovery of Burkitt's Lymphoma. *Cancer* 1983; 51: 1777-1786
- (2) Ferry J. Burkitt's Lymphoma: Clinicopathologic Features and Differential Diagnosis. *The Oncologist* 2006; 11: 375-383
- (3) Perkins AS, Friedberg JW. Burkitt Lymphoma in Adults. *Hematology* 2008; 341-348
- (4) Thorley-Lawson DA, Allday M. The curious case of the tumor virus: 50 years of Burkitt's Lymphoma. *Nature Reviews/ Microbiology* 2008; 6: 913-924
- (5) Leoncini L, Raphael M, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues pp 262-264. IARC Publications Lyon 2008
- (6) WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics: Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. S.181ff. IARC Press Lyon 2001
- (7) Reiter A, Burkhardt B, Wachowski O et al. NHL-BFM: Non-Hodgkin-Lymphome und B-ALL im Kindes- und Jugendalter. Leitfaden zur Diagnostik, Klassifizierung, Staging und Stratifizierung in Therapiegruppen. Empfehlungen zu Notfallsituationen und Vorgehen beim akuten Zellerfallsyndrom. Version I Februar 2005
- (8) Riede, Werner, Schäfer. Allgemeine und spezielle Pathologie. S.564ff. 5. komplett überarbeitete Auflage, Thieme 2004
- (9) McClure RF, Remstein ED, Macon WR, et al. Adult B-Cell-Lymphomas with Burkitt-like morphology are phenotypically and genotypically heterogeneous with aggressive clinical behaviour. *American J Surg Pathol* 2005; 29: 1652-1660
- (10) Burmeister T, Schwartz S, Horst H-A, et al. Molecular heterogeneity of sporadic adult Burkitt-type leukemia/lymphoma as revealed by PCR and cytogenetics: correlation with morphology, immunology and clinical features. *Leukemia* 2005; 19: 1319-1398
- (11) Magrath IT, Haddy TB, Adde MA. Treatment of patients with high grade non-Hodgkin's lymphomas and central nervous system involvement: is radiation a central component of therapy?. *Leuk Lymphoma* 1996; 21: 99-105
- (12) Lacasce A, Howard O, Lib S, et al. Modified Magrath regimens for adults with Burkitt and Burkitt-like lymphomas: preserved efficacy with decreased toxicity. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 761-767

- (13) Mead GM, Sydes MR, Walewski J, et al. An international evaluation of CODOX-M and CODOX-M alternating with IVAC in adult Burkitt's lymphoma: results of United Kingdom Lymphoma Group LY06 study. *Ann Oncol.* 2002; 13: 1264-1274
- (14) Rizzieri DA, Johnson JL, Niedzwicki D, et al. Intensive chemotherapy with and without cranial radiation for Burkitt leukemia and lymphoma: final results of Cancer and Leukemia Group B Study 9251. *Cancer* 2004; 100: 1438-1448
- (15) Hoelzer D, Ludwig WD, Thiel E, et al. Improved outcome in adult B-Cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 87: 495-508
- (16) van Imhoff GW, van der Holt B, MacKenzie MA, et al. Short intensive sequential therapy followed by autologous stem cell transplantation in adult Burkitt, Burkitt-like and lymphoblastic lymphoma. *Leukemia* 2005; 19: 945-952
- (17) Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2006; 106: 1569-1580
- (18) Goldman SC, Holcenberg JS, Finkelstein JZ, et al. A randomized comparison between rasburicase and allopurinol in children with lymphoma or leukemia at high risk for tumor lysis. *Blood* 2001; 97: 2998-3003
- (19) Hummel M, Bentink S, Berger H, et al. A Biologic Definition of Burkitt's Lymphoma from Transcriptional and Genomic Profiling. *New England Journal of Medicine* 2006; 354: 2419-2430
- (20) Nakamura N, Nakamine H, Tamaru J, et al. The distinction between Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with c-myc rearrangement. *Mod Pathology* 2002; 15: 771-776
- (21) Gong JZ, Stenzel TT, Bennett ER, et al. Burkitt lymphoma arising in organ transplant recipients: a clinicopathologic study of five cases. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 818-827
- (22) Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001; 20: 5595-5610
- (23) Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, et al. Review: The c-myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology* 2006; 16: 253-264
- (24) Löffler, Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*. S.1162ff. 7. überarbeitete Auflage, Springer 2003

- (25) Macpherson N, Lesack D, Klasa R, et al. Small noncleaved, non-Burkitt's (Burkitt-Like) lymphoma: cytogenetics predict outcome and reflect clinical presentations. *J Clin. Oncol* 1999; 17: 1558-1567
- (26) Au WY, Horsman DE, Gascoyne RD, et al. The spectrum of lymphoma with 8q24 aberrations: a clinical, pathological and cytogenetic study of 87 consecutive cases. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 519-528
- (27) Mukhopadhyay S, Reading J, Cotter PD, et al. Transformation of follicular lymphoma to Burkitt-like lymphoma within a single lymph node. *Hum Pathology* 2005; 36: 571-575
- (28) Tomita N, Nakamura N, Kanamori H, et al. Atypical Burkitt lymphoma arising from follicular lymphoma: demonstration by polymerase chain reaction following laser capture microdissection and by fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 121-124
- (29) Voorhees PM, Carder KA, Smith SV, et al. Follicular lymphoma with a Burkitt translocation- predictor of an aggressive clinical course: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 210-213
- (30) Zhang M, Swanson PC. V(D)J Recombinase Binding and Cleavage of Cryptic Recombination Signal Sequences Identified from Lymphoid Malignancies. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 6717-6727
- (31) Davila M, Foster S, Kelsoe G, et al. A Role of Secondary V(D)J Recombination in Oncogenic Chromosomal Translocations?. *Cancer Research* 2001; 81: 61-92
- (32) Haluska FG, Finver S, Tsujimoto Y, et al. The t(8;14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-J joining. *Nature* 1986; 324: 158-160
- (33a) Janeway, Travers, Walport. *Immunologie*. S.131ff 5. überarbeitete Auflage, Spektrum Gustav Fischer 2002
- (33b) Janeway, Travers, Walport. *Immunologie*. S.246ff 5. überarbeitete Auflage, Spektrum Gustav Fischer 2002
- (34) Early P, Huang H, Davis M, et al. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 1980; 19: 981-992

- (35) Sakano H, Maki R, Kurosawa Y, et al. Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 1980; 286: 676-683
- (36) Goossens T, Klein U, Küppers R, et al. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: Implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 2463-2468
- (37) Neuberger MS, Ehrenstein MR, Rada C, et al. Memory in the B-Cell compartment: antibody affinity maturation. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 7: 248-254
- (38) Taub R, Moulding C, Battey J, et al. Activation and Somatic Mutation of the Translocated c-myc Gene in Burkitt Lymphoma Cells. *Cell* 1984; 36: 339-348
- (39) Dalla Favera R, Lombardi L, Pelicci PG, et al. Mechanism of Activation and Biological Role of the c-myc Oncogene in B-cell Lymphomagenesis. *Annals NY Academy of Sciences*: 207-218
- (40) Cario G, zur Stadt U, Reiter A, et al. Variant translocations in sporadic Burkitt's lymphoma detected in fresh tumor material: analysis of three cases. *British Journal of Haematology* 2000; 110: 537-546
- (41) Klobeck HG, Combriato G, Zachau HG. N segment insertion and region-directed somatic hypermutation in a Kappa gene of a t(2;8) chromosomal translocation. *Nucleic Acid Research* 1987; 15: 4877-4888
- (42) Henglein B, Synovzik H, Groitl P, et al. Three Breakpoints of Variant t(2;8) Translocations in Burkitt's Lymphoma Cells Fall within a Region 140 Kilobases Distal from c-Myc. *Molecular and Cellular Biology* 1989; 9: 2105-2113
- (43) Hartl P, Lipp M. Generation of variant t(2;8) Translocation of Burkitt's Lymphoma by Site-Specific Recombination via the Kappa Light-Chain Joining Signals. *Molecular and Cellular Biology* 1987; 7: 2037-2045
- (44) Henglein B, Lipp M, Hartl P, et al. *Current Topics in Mikrobiologie und Immunologie*. 1988; 141: 165-170
- (45) Taub R, Kelly K, Battey J, et al. A Novel Alteration in the Structure of an Activated c-myc Gene in a variant t(2;8) Burkitt Lymphoma. *Cell* 1984; 37: 511-520
- (46) Wittekind NE, Hörtnagel K, Geltinger C, et al. Activation of c-myc-Promoter P1 by immunoglobulin kappa gene enhancers in Burkitt lymphoma: functional characterization of the

intron enhancer motifs kappaB, E box 1 and E box 2, and of the 3' enhancer motif PU. *Nucleic Acid Research* 2000; 28: 800-808

(47) Emanuel BS, Selden JR, Chaganti RSK, et al. The 2p-breakpoint of a 2;8 translocation in Burkitt lymphoma interrupts the V-kappa-Lokus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 2444-2446

(48) Alaska T, Muramatsu M, Ohno H, et al. Application of Long Distance Polymerase Chain Reaction to Detection of junctional Sequences created by chromosomal Translocations in mature B-Cell Neoplasms. *Blood* 1996; 88: 985-994

(49) Basso K, Frascella E, Zanesco L, et al. Improved Long Distance Polymerase Chain Reaction for the Detection of t(8;14)(q24;q32) in Burkitt's Lymphoma. *Am J Pathol* 1999; 155: 1479-1485

(50) Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG, et al. K562 - A human erythroleukemic cell line. *International Journal of Cancer* 1979; 23 (2): 143-147

(51) Denny CT, Hollis GF, Magrath IT, et al. Burkitt Lymphoma Cell Line Carrying a Variant Translocation Creates New DNA at the Breakpoint and Violates the Hierachy of Immunoglobulin Gene Rearrangement. *Molecular and Cellular Biology* 1985; 5: 3199-3207

(52) Küppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 2001; 20: 5580-5594

(53) Mengle-Gaw L, Rabbitts TH. A human Chromosome 8 region with abnormalities in B-cell, HTLV-1+ T-cell and c-Myc amplified Tumors. *EMBO J* 1987; 6: 1959-1965

(54) Gerbitz A, Mautner J, Geltinger C, et al. Deregulation of the Proto-oncogene c-Myc through t(8;22) translocation in Burkitt's Lymphoma. *Oncogene* 1999; 18: 1745-1753

(55) Polack A, Feederle R, Klobeck G, et al. Regulatory Elements in the Immunoglobulin Kappa Locus induce c-Myc Activation and the Promotor Shift in Burkitt's Lymphoma Cells. *EMBO J* 1993; 12: 3913-3920

(56) Hortnagel K, Mautner J, Strobl L, et al. The role of immunoglobulin kappa elements in c-myc activation. *Oncogene* 1995; 10: 1393-1401

(57) Kanda K, Hu HM, Zhang L, et al. NF-κB Activity Is Required for the Deregulation of c-myc Expression by the Immunoglobulin Heavy Chain Enhancer. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 32338-32346

- (58) Klehr D, Maass K, Bode J, et al. Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry* 1991; 30: 1264-1270
- (59) Rättsch A, Joos S, Kioschis P, et al. Topological organization of the Myc/IgK Locus in Burkitt's Lymphoma Cells Assessed by Nuclear Halo Preparations. *Exp. Cell Research* 2002; 273: 12-20
- (60) Spencer CA, LeStrang RC, Novak U, et al. The block to transcription elongation is promotor dependent in normal and Burkitt's lymphoma c-myc alleles. *Genes and development* 1990; 4: 75-88
- (61) Eick D, Bornkamm GW. Expression of c-Myc alleles in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* 1989; 8 (7): 1965-1972
- (62) Roschke V, Kopantzev E, Dertzbaugh M, et al. Chromosomal translocations deregulating c-Myc are associated with normal immune responses. *Oncogene* 1997; 14: 3011-3016
- (63) Muller JR, Janz S, Goedert JJ, et al. Persistence of immunoglobulin heavy chain/c-myc recombination-positive lymphocyte clones in the blood of human immunodeficiency virus-infected homosexual men. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 6577-6581
- (64) Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, et al. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229: 1390-1393
- (65) Tsujimoto Y, Louie E, Bashir MM, et al. The reciprocal partners of both the t (14;18) and t (11;14), translocations involved in B-cell neoplasms are rearranged by the same mechanism. *Oncogene* 1988; 2: 347-351
- (66) Zhang Q, Siebert R, Yan M, et al. Inactivating mutation and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* 1999; 22: 63-68
- (67) Lieber MR, Yu K, Raghavan SC. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair* 2006; 5: 1234-1245
- (68) Han S, Zheng B, Schatz DG et al. Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science* 1996; 274: 2094-2097.
- (69) Han S, Dillon SR, Zheng B, et al. V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science* 1997; 278: 301-305.

- (70) Wilson PC, Wilson K, Liu YJ, et al. Receptor Revision of Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes in Normal Human B Lymphocytes. *JEM* 2000; 191: 1881-1894
- (71) Betz AG, Milstein C, Gonzalez-Fernandez A, et al. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin κ gene: Critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* 1994; 77: 239-248
- (72) Bross L, Fukita Y, McBlane F, et al. DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity* 2000, 13: 589-597

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AID	<i>Activation induced Cytidine Deaminase</i>
ALL	<i>Akute Lymphatische Leukämie</i>
bvr-1	<i>Burkitt's variant rearranging region-1</i>
CML	<i>Chronisch myeloische Leukämie</i>
eBL	<i>endemisches Burkitt-Lymphom</i>
EBV	<i>Epstein Barr-Virus</i>
FAB-Klassifikation	<i>French-American-British</i>
FISH	<i>Fluoreszenz In Situ Hybridisierung</i>
GMALL	<i>German Multicenter ALL</i>
HMG	<i>High Mobility Group Proteins</i>
IgH	<i>Immunglobulin-Schwerkettenloкус</i>
IgK	<i>Immunglobulin-Leichtkettenloкус Kappa</i>
IgL	<i>Immunglobulin-Leichtkettenloкус Lambda</i>
kE3'	<i>Kappa 3' Enhancer</i>
kEi	<i>Kappa-Intron-Enhancer</i>
kMAR	<i>Kappa Matrix Attachment Region</i>
NHEJ	<i>Non Homologous End Joining</i>
NHL	<i>Non Hodgkin Lymphom</i>
RAG	<i>Recombination Activating Genes</i>
RFLP	<i>Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus</i>
RSS	<i>Rekombinationssignalsequenzen</i>
sBL	<i>sporadisches Burkitt-Lymphom</i>
sIg	<i>Oberflächenimmunglobulin</i>
SSA	<i>single-strand annealing</i>
TdT	<i>terminale Desoxynukleotidtransferase</i>

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem geschätzten Doktorvater und Betreuer

PD. Dr. med Dr. rer. nat. Thomas Burmeister. Ohne dessen Klugheit, geduldige, anregende, stetige und zuverlässige Begleitung wäre die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gebührt ferner allen Mitarbeitern des Labors für Molekulargenetik der Medizinischen Klinik III, Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin: Daniela Gröger, Mara Molkentin, Anette Sindram, Petra Havemann und Claudia Seide.

Ihre Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und Kompetenz ermöglichten ein überaus produktives und angenehmes Arbeiten und ließen mich immer gerne ins Labor kommen.

Desweiteren danke ich meiner Familie, allen voran meinen Eltern Werner und Bärbel Kroenlein und meiner Großtante Emilie Falk, sowie meinen Freunden für ihre Unterstützung, ihren Rat und ihr Interesse.

ERKLÄRUNG

Ich, Hannes Kroenlein, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Molekulare Charakterisierung der varianten Translokation t(2;8) beim Burkitt-Lymphom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

CURRICULUM VITAE

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen
Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht**

