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

Analyse von *CARD9* in der Richter Syndrom Zelllinie U-RT1 und in einem Kollektiv von aggressiven Lymphomen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Julia Maier
Geboren in Sindelfingen
2021

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med Thomas Barth

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Stegelmann

Tag der Promotion: 12.01.2023

Teile dieser Dissertation sind erschienen in:

Maier J, Lechel A, Marienfeld R, Barth TFE, Möller P, Mellert K. CARD9 Forms an Alternative CBM Complex in Richter Syndrome. Cancers (Basel). 2022:531.

Schmid T*, Maier J*, Martin M, Tasdogan A, Tausch E, Barth TFE, Stilgenbauer S, Bloehdorn J, Moller P, Mellert K. U-RT1 - A new model for Richter transformation. Neoplasia. 2021;23(1):140-8.

INHALTVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VI

1. EINLEITUNG 1

1.1. ENTWICKLUNG VON B-LYMPHOZYTEN UND LYMPHOMAGENESE 1

1.2. CHRONISCH LYMPHATISCHE LEUKÄMIE 4

1.3. DIFFUS GROßZELLIGE B-ZELL-LYMPHOME 6

1.4. RICHTER SYNDROM 9

1.5. DER NF-κB SIGNALWEG 12

1.5.1. NF-κB in Zellen der erworbenen Immunantwort 12

1.5.2. NF-κB in ABC DLBCL 14

1.5.3. NF-kB in Zellen der angeborenen Immunantwort 15

1.6. RICHTER SYNDROM ZELLLINIE U-RT1 16

1.7. ZIELSETZUNG DER ARBEIT 17

2. MATERIAL UND METHODEN 18

2.1. MATERIAL 18

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien 18

2.1.2. Chemikalien, Enzyme, Kits und Puffer 21

2.1.3. Oligonukleotide: Primer und siRNA 28

2.1.4. Antikörper 29

2.1.5. Zelllinien 32

2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 33

2.2.1. DNA Isolation 33

2.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 33

2.2.3. Agarose Gelelektrophorese 36

2.2.4. Next-Generation Sequencing (NGS) *CARD9, CARD11* und *TNFAIP3* 37

2.2.5. Array Comparative Genomic Hybridisation (aCGH) 37

2.2.6. RNA-Isolation und Reverse Transkription 38

2.2.7. Real Time Quantitative PCR (RT-qPCR) 38

2.2.8. Mikroarray Genexpressionsanalyse 40

2.3. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN 41

2.3.1. Kultivierung von humanen Lymphomzelllinien 41

2.3.2. MTT-Assay 42

2.3.3. NF-κB Inhibition mit BAY11-7082 43
2.3.4. siRNA Knockdown von *CARD9* 43
2.3.5. Durchflusszytometrie 44
2.4. PROTEINBIOCHEMIE 45
2.4.1. Proteinisolation, SDS-PAGE und Western Blot 45
2.4.2. Co-Immunopräzipitation (Co-IP) 47
2.4.3. Immunhistochemie/Immunzytologie/Immunfluoreszenz 49
2.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG 51
2.6. GEWEBEBANK 52
3. ERGEBNISSE 53
3.1. MIKROARRAY GENEXPRESSIONSANALYSE IN U-RT1 53
3.2. RT-QPCR EXPRESSIONSANALYSE VON *CARD9*, *CARD11*, *MALT1* UND *BCL10* 54
3.3. IMMUNZYTOLOGIE VON CARD9 IN U-RT1, HBL-1 UND SUHDL4 56
3.4. CBM-KOMPLEX ANALYSE MITTELS WESTERN BLOT UND IMMUNPRÄZIPITATION 56
3.5. UNTERSUCHUNG DER NF-κB AKTIVITÄT IN U-RT1 59
3.6. SIRNA-KNOCKDOWN VON *CARD9* IN U-RT1 61
3.7. *CARD9* EXPRESSION IM GEWEBE 66
3.7.1. CARD9 Immunhistochemie in gesundem Gewebe 66
3.7.2. *CARD9* Expression im Ursprungsgewebe der U-RT1 67
3.7.3. *CARD9* Expression in einem Kollektiv von 15 Fällen mit RS 68
3.7.4. *CARD9* Expression in einem Kollektiv von DLBCL, cHL und CLL Fällen ... 74
3.8. UNTERSUCHUNG DER ZELLLINIE U-RT1 AUF GENOMISCHER EBENE 77
3.8.1. Untersuchung von chromosomalen Aberrationen in U-RT1 78
3.8.2. Mutationsanalyse in U-RT1 80
4. DISKUSSION 82
5. ZUSAMMENFASSUNG 90
6. LITERATURVERZEICHNIS 92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC DLBCL	Activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma
aCGH	Array comparative genomic hybridisation
AK	Antikörper
BCR	B-cell receptor
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
cHL	Classical Hodgkin lymphoma
CLL	Chronic lymphocytic leukemia
CBM	CARD11-BCL10-MALT1
CMV	Cytomegalovirus
CSR	Class switch recombination
DEL	Deletion
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FFPE	Formalin fixed paraffine embedded
FL	Follicular lymphoma
FSC	Forward Scatter
GC	Germinal Center
GCB DLBCL	Germinal Center B-Cell-like diffuse large B-cell lymphoma
GFP	Green fluorescent protein
GOF	Gain of function

GOI	Gene of interest
HK	Housekeeper
Ig	Immunoglobulin
IHC	Immunhistochemie
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
LOF	Loss of function
LPL	Lymphoplasmacytic lymphoma
MCL	Mantle cell lymphoma
mRNA	Messenger RNA
NGS	Next generation sequencing
NHL	Non-Hodgkin Lymphoma
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Rounds per minute
RNA	Ribonucleic acid
RS	Richter Syndrome
RT	Raumtemperatur
SHM	Somatic Hypermutation
SSC	Side Scatter
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering RNA
ÜN	Über Nacht
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

Lymphome sind Neoplasien des lymphatischen Systems. Davon betroffen sind insbesondere die primären lymphatischen Organe (Knochenmark und Thymus) und die sekundären lymphatischen Organe (Tonsillen, Milz und Lymphknoten). Lymphome treten auch extranodal auf und sind dann sehr häufig im Gastrointestinaltrakt lokalisiert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit werden Lymphome der B-Zell Reihe behandelt. Diese entstehen durch die maligne Transformation von B-Zellen unterschiedlicher Reifungs- und Differenzierungsstufen. Infolgedessen kommt es zu unkontrollierter Zellteilung und monoklonalem Tumorwachstum.

Es ist heute allgemein akzeptiert, dass B-Zell Lymphome die unterschiedlichen Stadien der B-Zell Entwicklung reflektieren. Folglich können die Neoplasien der unreifen B-Zellen (Vorläufer B-Zell Neoplasien) von reifen B-Zell Neoplasien abgeleitet werden. Die reifen B-Zell Neoplasien werden wiederum in Prä-Keimzentrums-Neoplasien (z.B. Mantelzell-Lymphom), Neoplasien aus B-Lymphozyten des Keimzentrums (z.B. follikuläres Lymphom (FL) oder diffus großzelliges B-Zell Lymphom vom Keimzentrumstyp (GCB DLBCL)) und Post-Keimzentrums Neoplasien (z.B. diffus großzelliges B-Zell Lymphom vom aktivierten Typ (ABC DLBCL)) unterschieden. Die genannten B-Zell Lymphome bilden so die allermeisten B-Zell Non-Hodgkin Lymphome (NHL) ab, welche von den Hodgkin Lymphomen abgegrenzt werden [8, 129]. Ausnahmen sind sogenannte Komposit Lymphome, welche sowohl Charakteristika der B-NHL als auch der Hodgkin Lymphome zeigen. Im Folgenden soll die Reifung der B-Zelle im Zusammenhang mit der Lymphomagenese erläutert werden.

1.1. ENTWICKLUNG VON B-LYMPHOZYTEN UND LYMPHOMAGENESE

B-Lymphozyten sind entscheidend an den Funktionen der adaptiven Immunantwort beteiligt. Sie können spezifisch Antigene erkennen und daraufhin zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen differenzieren und damit zur humoralen

Immunantwort beitragen. Außerdem sind sie durch Aktivierung von T-Zellen an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt.

Die B-Zell Entwicklung

Für die Erkennung spezifischer Antigenepitope besitzen B-Lymphozyten den B-Zell Rezeptor (BCR) aus membranständigem Oberflächenimmunglobulin (mIgM oder mIgD) und den akzessorischen Proteinen CD79A und CD79B, welche der Signalweiterleitung dienen. Die Aktivierung des BCR führt schließlich zu multiplen Effekten, von denen insbesondere die Aktivierung der Signalwege AKT, MAPK und NF-κB eine wesentliche Rolle für die Differenzierung und Proliferation der B-Zelle spielen [29, 51].

Um eine große Vielfalt an Antigenen erkennen zu können, entstehen durch das Prinzip der VDJ-Rekombination eine Vielzahl unterschiedlicher BCR (siehe Abbildung 1). Immunglobuline bestehen aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten, welche jeweils aus einer Kombination verschiedener Gensegmente (Variable (V), Diversity (D), Joining (J)) kodiert und kovalent durch Disulfid-Brücken miteinander verknüpft werden [136]. Durch die somatische Rekombination der Segmente der variablen Regionen während der B-Zell Reifung im Knochenmark entsteht eine hohe Vielfalt von Antikörpern, die so die vielgestaltige Umwelt der Antigene widerspiegelt.

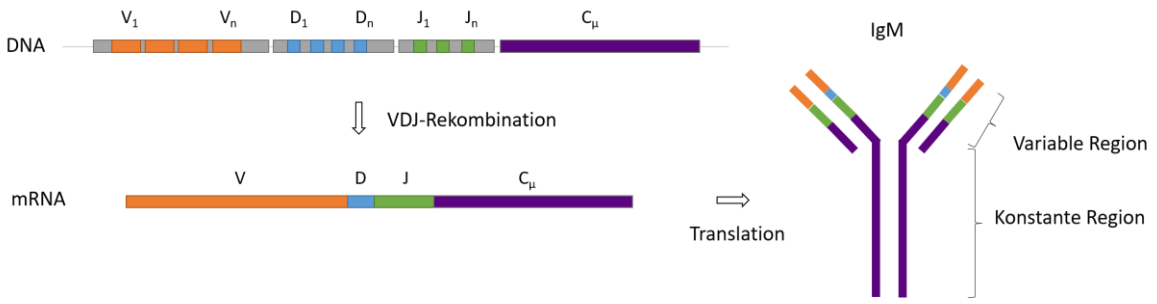

Abbildung 1: Darstellung der Entstehung eines Immunglobulins vom Typ IgM aus schweren und leichten Ketten mit konstanten (C) und variablen (V) Segmenten durch VDJ Rekombination. Die variablen Regionen werden durch somatische Rekombination aus Variable (V), Diversity (D), und Joining (J) Segmenten zusammengefügt, die DNA anschließend in mRNA transkribiert und translatiert.

Weitere Modifikationen des *BCR*-Lokus finden nach Auswanderung der Lymphozyten als reife, naive B-Zellen aus dem Knochenmark in den sekundären lymphatischen Organen statt.

Dort werden sie zunächst durch Antigene aktiviert und durchlaufen in den Keimzentren (Germinal Center (GC)) zwei weitere Differenzierungsprozesse: die durch das Enzym AID (aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase) katalysierte somatische Hypermutation (somatic hypermutation (SHM)) und die Klassenwechsel-Rekombination (class switch recombination (CSR)) [87]. Bei der SHM werden Deletionen, Mutationen und Insertionen in die variable Kette eingeführt, welche nach einem anschließenden Selektionsprozess zu einer gesteigerten Rezeptoraffinität für das aktivierende Antigen führen. Die hoch affinen B-Lymphozyten expandieren dabei stärker als jene B-Zellen mit niedrig affinen Rezeptoren. Bei der CSR wird die schwere Kette am 5‘-Ende des konstanten Immunglobulinabschnitts so verändert, dass Antikörper verschiedener Klassen (IgG, IgA, IgE) gebildet werden können [80]. Dies erhöht die funktionelle Diversität, jedoch nicht die Spezifität des Antikörpers.

Lymphomentstehung

Maligne Lymphome entstehen häufig durch die Akquirierung von Aberrationen während des Prozesses der B-Zell Reifung (Abbildung 2). Aus den im Zuge der VDJ-Rekombination eingeführten Doppelstrangbrüchen können durch chromosomale Translokationen Fusionen der Immunglobulingene (Chromosomen 2, 14 und 22) mit Onkogenen entstehen. Ein Beispiel hierfür ist die in den meisten follikulären Lymphomen sowie auch in 20% bis 30% der DLBCL vorkommende Translokation t(14;18) (q32;q21), welche das Proto-Onkogen *BCL2* unter den Einfluss des IgH Promotors stellt [56, 114]. Diese Translokation ist auch in 2% der Fälle von chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) zu beobachten, wobei es sich hierbei überwiegend um Tumoren mit hypermutiertem *IGHV* handelt, in welchen der neoplastische Zellklon die SHM schon durchlaufen hat [26, 47]. Weitere Rearrangements, die häufig in DLBCL zu finden sind, betreffen das Gen *BCL6* (3p27), welches mit 30% der am häufigsten betroffene Genlokus ist [2, 12, 57] und den *C-MYC*-Lokus (8q24) [93].

Durch die starke Expression der *AID* im Zuge der SHM und des CSR kann es außerdem zu einer erhöhten Rate an Mutationen und Translokationen kommen. Im Zusammenhang mit Lymphomentstehung sind hier vor allem die Gene C-*MYC, CD79, LYN, GNA13, TNFAIP3, SOCS1, BCL2* und *PAX5* zu nennen [6, 30, 98].

Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten B-Zell Neoplasien CLL, DLBCL und das Richter Syndrom (RS) detaillierter beschrieben.

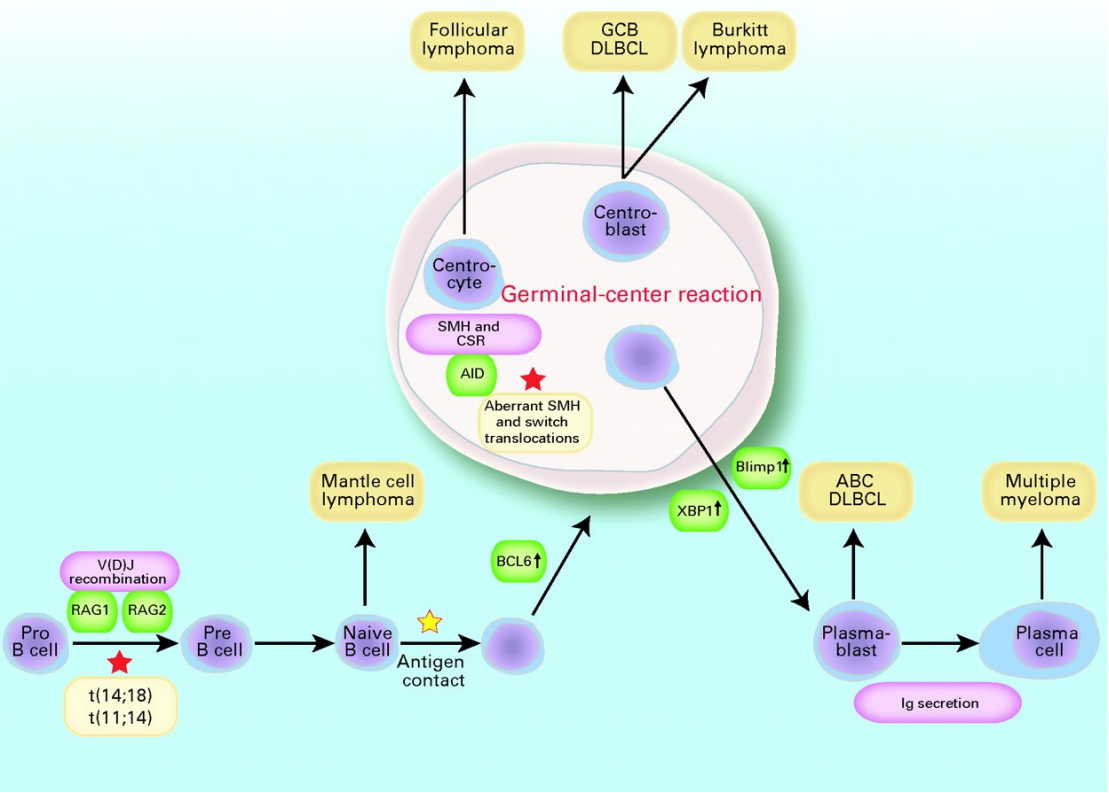

Abbildung 2: Verschiedene Stadien der B-Zell Reifung und die daraus entstehenden Neoplasien. Bei der VDJ-Rekombination können t(14;18) und t(11;14)-Translokationen zur Lymphomagenese beitragen. Nach Antigenkontakt und Expression von *BCL6* kommt es im Keimzentrum zu den AID-abhängigen Reaktionen CSR und SHM, welche onkogene Veränderungen nach sich ziehen können. Die im Keimzentrum aktivierten B-Zellen differenzieren anschließend, reguliert durch XBP1 und Blimp1 zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen (Abbildung übernommen aus [90]).

1.2. Chronisch lymphatische Leukämie

Einige B-Zell Neoplasien verlaufen leukämisch, die meisten imponieren als Lymphome durch klinisch detektierbare Tumormasse in den Lymphknoten. Die CLL ist ein solches Beispiel einer indolenten Neoplasie reifer B-Zellen, welche sowohl tumoröse Lymphknotenschwellungen als auch eine leukämische Ausschwemmung zeigen kann. Fehlt die Ausbreitung in das periphere Blut, handelt es sich formal um ein kleinzelliges

lymphozytisches Lymphom (small lymphocytic lymphoma (SLL)) [46, 128]. Die CLL ist eine häufige Erkrankung und die Inzidenz steigt mit dem Alter [116]. Häufig fällt bei Routineuntersuchungen eine Lymphozytose von über 5000 monoklonalen B-Zellen pro µl Blut auf, im peripheren Blutausstrich ist das Auftreten von Gumprechtschen-Kernschatten diagnoseweisend [46]. Dabei handelt es sich um Kernmaterial von Lymphomzellen, welches aufgrund der immanenten Fragilität der Zellen während des Ausstreichens mechanisch bedingt entstehen können. Klinisch verläuft die CLL häufig über lange Zeit unauffällig, kann jedoch auch mit B-Symptomatik, neu aufgetretener Lymphadenopathie, erhöhter Infektneigung und Abgeschlagenheit einhergehen. Die Stadieneinteilung erfolgt nach Rai und Binet, hier fließen die Lymphozytenzahl, der Hämoglobinwert, die Thrombozytenzahl, die Anzahl der tumorbefallenen Körperregionen (Binet) sowie das Vorliegen von Hepatomegalie, Splenomegalie oder Lymphadenopathie (Rai) ein. In 72% der Fälle besteht eine Knochenmarkinfiltration [72]. Morphologisch zeichnet sich die CLL durch eine Population von kleinzelligen, monomorphen, reifen B-Lymphozyten aus, welche sich in Pseudofollikeln zu Proliferationszentren organisieren und eine niedrige Proliferationsrate aufweisen [128]. Diese malignen B-Zellen exprimieren charakteristischerweise *CD5*, *CD20* und *CD23*, wodurch sie immunhistochemisch von anderen B-Zell Neoplasien abzugrenzen sind. Der *IGHV* Lokus der Tumorzellen kann sowohl unmutiert vorliegen als auch die SHM schon durchlaufen haben. Ein unmutierter *IGHV* Lokus ist mit einer schlechteren Prognose und einem erhöhten Risiko einer Progression im Sinne eines RS assoziiert [124] (s. Kapitel 1.4). Auch die Expression von *CD38* und *ZAP-70* deuten auf einen ungünstigeren Verlauf hin [34, 38, 107] .

In zytogenetischen Untersuchungen konnte für die CLL kein spezifischer genetischer Marker identifiziert werden, jedoch können in 80% bis 90% der Fälle chromosomale Aberrationen beobachtet werden [31]. Am häufigsten treten eine Deletion in der chromosomalen Bande 13q14.3 oder eine Trisomie 12 auf. Mit einer schlechteren Prognose behaftet sind die Deletion in den Banden 11q2 (*ATM*) und die komplette oder partielle Deletion des kurzen Arms von Chromosom 17, welches den Tumorsuppressor *TP53* enthält. Patienten mit einer *TP53*-Deletion, welche bei unmutiertem *IGHV* Status häufiger beobachtet wird, können häufig mit Resistenzen gegenüber Fludarabin-haltigen Chemotherapieregimes vergesellschaftet sein [31, 76, 96, 126].

Während symptomfreie Patienten in niedrigen Stadien zunächst beobachtet werden können, besteht bei Patienten in höheren Stadien oder mit Knochenmarkinsuffizienz meist ein Behandlungsdruck. Die Erstlinien-Therapie beinhaltet in Abhängigkeit von Komorbiditäten, *IGHV* Status und *TP53* Status häufig das Alkylanz Cyclophosphamid zusammen mit dem Purinanalogon Fludarabin, und dem CD20-Antikörper Rituximab (FCR) oder das Alkylanz Bendamustin allein oder in Kombination mit einem CD20 Antikörper z.B. Rituximab. Beim Vorhandensein eines unmutierten *IGHV* bzw. einer *TP53* Deletion oder Mutation werden die Substanzen Ibrutinib (BTK-Inhibitor) und Idealisib (PI3K-Inhibitor), welche lange Zeit auf die Rezidivtherapie beschränkt waren, inzwischen auch als Erstlinientherapie eingesetzt [63, 101]. Der BCL2 Inhibitor ABT-199/Venetoclax kann bei rezidivierter oder refraktärer CLL bzw. bei Unverträglichkeit von Ibrutinib/Idealisib eingesetzt werden [95, 123, 125].

Generell ist die CLL eine indolente, aber in der Regel unheilbare Erkrankung mit einem langsamen Krankheitsverlauf. Die allogene Knochenmarktransplantation stellt einen potenziell kurativen Ansatz dar, ist jedoch mit einer hohen therapieassoziierten Mortalität behaftet [72]. Ein großes Problem im Verlauf der CLL stellt der Progress der CLL bzw. die Transformation in ein aggressives B-Zell Lymphom dar. Dabei werden die Entwicklung einer „akzelerierten“ CLL mit Expansion der Proliferationszentren (KI67 > 40% in Proliferationszentren), sowie die prolymphozytäre Transformation von der Transformation in ein DLBCL oder cHL mit histologischen Veränderungen im Sinne eines RS abgegrenzt [41]. Immer häufiger wird unter einer Therapie von Ibrutinib die Entwicklung von aggressiven Klonen beobachtet, welche Mutationen in den Genen *BTK* oder *PLCG2* tragen [137]. Gegenstand dieser Doktorarbeit ist die Pathogenese der Richter Transformation einer CLL in ein DLBCL. In den folgenden Kapiteln werden daher das DLBCL und das RS näher beschrieben.

1.3. DIFFUS GROßZELLIGE B-ZELL-LYMPHOME

Bei den aggressiven B-Zell Lymphomen wird das cHL von der Gruppe der NHL abgegrenzt. Die größte Gruppe der NHL stellen mit ca. 30% der Fälle die DLBCL dar [1, 7]. DLBCL können *de novo* oder sekundär aus niedrig malignen Lymphomen wie z.B. der CLL oder dem FL entstehen. Das DLBCL kann nodal oder extranodal auftreten und zeigt eine

Parenchymzerstörung durch eine diffuse Infiltration der mittelgroßen bis großen Lymphomzellen [128]. Zu den großzelligen B-Zell Lymphomen gehört sowohl die große Gruppe der DLBCL NOS, als auch definierte Subtypen wie das primär mediastinale B-Zell Lymphom (PMBL), das primäre DLBCL des ZNS oder das EBV-assoziierte DLBCL. Eine relativ neue Gruppe bilden die High-Grade B-Zell Lymphome, welche sich durch *MYC* und *BCL2*- bzw. *BCL6*- Rearrangements auszeichnen (Double Hit/Triple Hit) und mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind [70].

Das DLBCL NOS lässt sich anhand seiner Morphologie, seines Genexpressionsmusters [3] und immunhistochemischer [48] Parameter unterteilen. Morphologische Varianten sind das am häufigsten vorkommende zentroblastische DLBCL, das immunoblastische DLBCL und das seltenere anaplastische DLBCL [33]. Beim zentroblastischen Typ ähneln die Lymphomzellen Zentroblasten, also Zellen, welche auf der Entwicklungstufe der blastären Keimzentrumszelle arretiert scheinen. Sie zeigen häufig mehrere Nucleoli und sehr wenig Zytoplasma. Mischformen mit der immunoblastischen Variante sind möglich; die Immunoblasten besitzen einen zentralen, prominenten Nucleolus und einen breiteren Zytoplasmasaum, wobei angenommen wird, dass dieser Typ von postfollikulären B-Zellen abstammt.

Durch Genexpressionsanalysen konnten zwei molekulare Subgruppen der DLBCL unterschieden werden, welche mit Unterschieden in der Prognose und Therapierbarkeit assoziiert wurden [3]. Die Zellen des GCB DLBCL zeigen ein überlappendes Expressionsprofil von B-Lymphozyten im Keimzentrum, während das DLBCL vom ABC DLBCL aktivierten B-Zellen ähneln. Tatsächlich zeigen GCB DLBCL eher eine zentroblastische Morphologie, wohingegen ABC DLBCL häufiger immunoblastisch imponieren. Während GCB DLBCL meistens die Keimzentrumsmarker *CD10* bzw. *BCL6* exprimieren, zeigen Non-GCB DLBCL eine Expression von *IRF4/MUM1*, bleiben jedoch negativ für *CD10* und können so immunhistochemisch nach dem Hans-Algorithmus in die jeweilige Gruppe eingeordnet werden [48]. Während Patienten mit GCB DLBCL heute durch eine Kombinationstherapie aus Rituximab und Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison (CHOP) eine gute bis sehr gute Überlebenswahrscheinlichkeit haben, scheinen Patienten mit ABC DLBCL bei gleicher Behandlung mit einer deutlich

schlechteren Prognose assoziiert zu sein [3, 66, 67]. Abbildung 3 zeigt einen Überblick über die verschiedenen Mutationen und zytogenetischen Aberrationen der beiden Subtypen.

Aberrationen in GCB DLBCL

Während in GCB DLBCL in 40% der Fälle die in 1.1 beschriebene t(14;18) Translokation auftritt, ist diese bei ABC DLBCL sehr selten [11]. In 20% bis 25% der GCB DLBCL treten Mutationen der Histonmethyltransferase *EZH2* [85, 86] und der G-Protein Untereinheit *GNA13* auf [92]. Durch die Deletion von *PTEN* oder die Amplifikation des Genlokus der Micro-RNA *miR-17-92,* welche die Expression von *PTEN* supprimiert, kommt es häufig zur Deregulation des PI3K/AKT Signalwegs [138] und zur unkontrollierten Proliferation der Zellen.

Aberrationen in ABC DLBCL

Es konnte gezeigt werden, dass ABC DLBCL ein anderes Aberrationsprofil als GCB DLBCL zeigen. Neben Amplifikationen des Chromosom 18q inklusive des *BCL2*-Lokus, des Chromosom 19q mit dem *SPIB*-Lokus und Deletionen der chromosomalen Bande Chromosom 9p21 mit dem *CDKN2A*-Lokus [67], spielt die konstitutive Aktivierung des anti-apoptotischen NF-κB Signalweges die wohl größte Bedeutung für die Pathogenese der ABC DLBCL [28, 29] (näheres dazu in Kapitel 1.5.2).

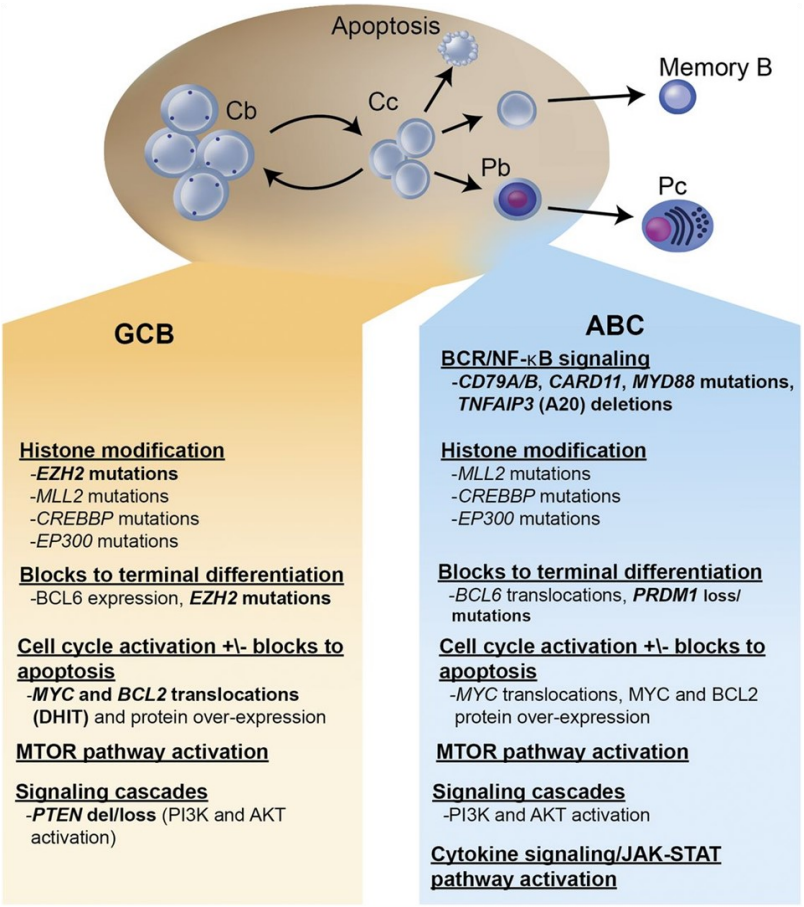

Abbildung 3: Onkogene Signalwege in den beiden molekularen Subtypen GCB DLBCL und ABC DLBCL. GCB DLBCL, welche sich meist von Zentroblasten ableiten, zeigen andere onkogene Veränderungen als die von aktivierten B-Zellen abstammenden ABC DLBCL. Fett gedruckt sind jene Veränderungen, welche bevorzugt in einem der beiden Subtypen vorkommen. Cb: centroblast; Cc: centrocyte; Pb: plasma blast, Pc: plasma cell; DHIT: double-hit lymphoma (Abbildung übernommen aus [118]).

1.4. Richter Syndrom

Die Entstehung eines aggressiven B-Zell Lymphoms aus einer CLL wird als Richter Syndrom bezeichnet und wurde erstmals 1928 von Maurice Richter beschrieben [103]. Der B-Zell-Ursprung des RS konnte 1974 beschrieben werden [122]. Unter dem Begriff RS wird sowohl die weitaus häufigere Transformation der CLL in ein DLBCL als auch die Transformation in ein Hodgkin Lymphom zusammengefasst. Daneben sind auch seltene Varianten wie die Transformation in ein plasmablastisches Lymphom oder ein aggressives

T-Zell Lymphom beschrieben [19, 52, 53, 82, 91]. Im Folgenden ist mit RS die Transformation einer CLL in ein DLBCL gemeint, da im Rahmen dieser Arbeit vorwiegend die DLBCL Variante des RS behandelt wird. Die Entwicklung aggressiver B-Zell Lymphome aus anderen niedrig malignen Lymphomen, z.B. dem follikulären Lymphom, fällt jedoch nicht unter den Begriff des RS. Von der RS muss außerdem eine „akzelerierte“ CLL ohne histologische Transformation, welche durch die Expansion der Proliferationszentren gekennzeichnet ist [41] sowie die prolymphozytäre Transformation abgegrenzt werden. Außerdem wurde seit der Einführung neuer Immuntherapien, insbesondere des CD52-Antikörpers Alemtuzumab, die Entwicklung EBV-positiver, mit der CLL klonal nicht verwandter aggressiver Lymphome beobachtet. Auch diese Fälle werden nicht als RS gewertet, sondern als Zweitneoplasien welche aufgrund der durch Alemtuzumab bedingten T-Zell-Depletion und der daraus folgende Immunsuppression zu entstehen scheinen [109].

Das RS wird bei ca. 2% bis 8% der CLL Patienten beschrieben [133] und tritt im Durchschnitt zwei Jahre nach Diagnosestellung der CLL auf [109]. Klinisch fallen die Patienten meist durch rapide Verschlechterung des Allgemeinzustandes, Entwicklung einer B Symptomatik und rasch progredienter Lymphadenopathie auf. Häufig zeigt sich laborchemisch eine erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH) bzw. eine Hyperkalzämie [35]. Trotz intensiver Therapie ist das RS im Durchschnitt mit einem Überleben von unter einem Jahr assoziiert [5, 37, 100, 108, 133]. Das Standardtherapieregime des RS ähnelt der von *de novo* DLBCL [97], bestehend aus CHOP, meist in Kombination mit Rituximab [25] (R-CHOP).

In ca. 80% der Fälle ist eine klonale Verwandtschaft zwischen RS und der zugrundeliegenden CLL nachweisbar, wobei das nicht klonal verwandte RS prognostisch den *de novo* DLBCL zuzuordnen ist [81, 112, 113]. Immunhistologisch sind durch das RS entstandene DLBCL durch einen Verlust von CD5 und CD23 charakterisiert und unterscheiden sich dadurch von der zugrundeliegenden CLL [81]. 90% bis 95% dieser DLBLC gehören nach dem Hans-Algorithmus der Gruppe der ABC DLBCL an und zeigen neben einem Verlust der CD10 Expression eine Positivität für MUM1 und eine variable Expression von *BCL6* [108, 109].

Klinische Risikofaktoren für die Entwicklung eines RS sind insbesondere ein fortgeschrittenes CLL-Stadium und eine große Tumormasse, außerdem scheint u.a. das Ausmaß des Knochenmarkbefalls eine Rolle zu spielen. Ob die Anzahl und Art der vorangegangen CLL-Behandlungen einen Beitrag zu der Entwicklung einer Richter Transformation spielt wird kontrovers diskutiert [97]. Parikh et al. beschrieb 2013 eine dreifache Risikoerhöhung für die Entwicklung eines RS durch die Behandlung mit Purinanaloga oder Alkylanzien [96]. Nach Behandlung von Patienten mit refraktärer oder rezidivierter CLL mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib trat in 1% bis 8% der Fälle ein RS auf. Als Ursache hierfür wird jedoch die meist intensive Vortherapie bzw. die durch die Therapie stattfindende Selektion aggressiver Klone angesehen und weniger ein kausaler Zusammenhang der Ibrutinib-Behandlung mit der klonalen Evolution des RS [109].

Als biologische Risikofaktoren der CLL für die Entwicklung eines RS wurde das Vorhandensein von mutiertem *NOTCH1* (insbesondere c.7544_7545delCT in Exon 34) beschrieben, was mit einer 45%igen Wahrscheinlichkeit eines RS einhergeht im Vergleich zu einer 4%igen Wahrscheinlichkeit bei CLL mit *NOTCH1* Wildtyp [109-111]. Laut Literatur ist ein während der VDJ Rekombination auf bestimmte Art und Weise umgelagertes *BCR*-Gen (sog. „Subset 8“) mit einer bis zu17-fache Risikoerhöhung assoziiert [112]. Weitere, prognostisch ungünstige Faktoren sind eine Expression von *CD38*, *ZAP70*, das Fehlen einer del13q14 und unmutierte Schwerkettengene [34, 38, 107]. Wie schon in Kapitel 1.2 beschrieben ist eine Inaktivierung von *TP53* sowohl mit einem hohen Risiko einer CLL Progression als auch mit einem erhöhten Risiko für eine Transformation behaftet [54, 96, 97, 107].

Während die Pathogenese von *de novo* DLBCL häufig auf der Deregulation spezifischer Signalwege beruht, konnte für die Richter Transformation bis dato kein definierender Transformationsmechanismus identifiziert werden und einzelne RS Fälle unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihres Aberrationsprofils [113]. Überlappende Veränderungen konnten in 90% der RS hinsichtlich Aberrationen in den Genen *TP53*, *NOTCH1*, *MYC* oder *CDKN2A* gefunden werden, welche eine Deregulation von Apoptose und Proliferation bewirken [24, 36]. Kürzlich konnte eine Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) über den Notch1 Signalweg als ein Induktor der CLL Transformation in einem CLL Mausmodell gezeigt werden [61]. Die in Kapitel 1.3 beschriebenen, für *de novo* DLBCL charakteristischen

Läsionen wie *EZH2* oder *PTEN* Mutationen oder Veränderungen des BCR-Signalwegs scheinen bei RS eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, was die Hypothese unterstützt, dass es sich bei dem RS und den *de novo* DLBCL um eigene Entitäten mit unterschiedlicher Pathogenese handelt [36, 113].

1.5. Der NF-κB Signalweg

Die Aktivierung von Immunzellen erfolgt über die Stimulation membranständiger oder zytosolischer Rezeptoren, welche mit verschiedenen Signalwegen assoziiert sind und abhängig von der Art der Aktivierung und des Rezeptors die entsprechende Zielgenexpression auslösen. Einer dieser Signalwege ist der anti-apoptotische NF-κB Signalweg, welcher sowohl für die Aktivierung als auch für die Proliferation von lymphoiden Zellen der erworbenen Immunantwort sowie myeloiden Zellen der angeborenen Immunantwort eine zentrale Rolle spielt. In ruhenden Zellen wird die Familie der NF-κB Transkriptionsfaktoren (RelA/p65, c-Rel, RelB, NF-κB1/p50 und NF-κB2/p52) durch Bindung an Inhibitoren (IκB, p100, p105) an der Translokation in den Kern gehindert. Durch Aktivierung des Signalwegs wird diese Inhibition beendet und die Translokation der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern führt zur Expression der NF-κB Zielgene [71].

1.5.1. NF-κB in Zellen der erworbenen Immunantwort

In Lymphozyten ist eine NF-κB Aktivierung über verschiedene Gruppen von Rezeptoren möglich, dazu zählen u.a. Antigenrezeptoren, TNF-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren [60]. Beschrieben sind zwei Aktiverungswege, der kanonische NF-κB Signalweg und der nicht-kanonische, alternative Signalweg. Während der alternative Signalweg u.a. über TNF-Rezeptoren wie CD40 aktiviert wird, geht der kanonische Weg häufig mit Aktivierung des B-Zell- und T-Zell-Rezeptors einher und soll im Folgenden für B-Lymphozyten näher beschrieben werden (Abbildung 4) [127].

Nach Bindung eines Antigens durch den BCR werden Tyrosinreste an den zytoplasmatischen ITAM-Domänen von CD79A/B phosphoryliert und die Bildung des so

genannten Signalosoms eingeleitet. Dieses beinhaltet verschiedene Kinasen und Adaptorproteine, sowie kostimulatorische Rezeptoren wie CD19 [51, 59, 102]. Teil der Aktivierung des Signalosoms ist die Rekrutierung der Kinase SYK an die phosphorylierten ITAM-Domänen, was wiederum zu einer Autoaktivierung der Kinase führt. Über weitere Signalkaskaden (PI3K, PLCγ2) kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase C beta (PKCβ), welche das Adaptorprotein CARD11 an seiner MAGUK (Membran-assoziierte Guanylat Kinase)-Domäne phosphoryliert und dadurch aktiviert [39, 132]. In ruhenden Lymphozyten befindet sich CARD11 (auch als CARMA1 bezeichnet) in einem autoinhibitorischen Zustand. Durch Phosphorylierung durch die PKCβ kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins, welche eine Oligomerisierung über die Coiled-Coiled-Domäne begünstigt [88, 120, 130]. Dies bewirkt eine Anlagerung von Filamenten bestehend aus multiplen BCL10 Molekülen und nachfolgender Rekrutierung der Paracaspase MALT1 in diesen Komplex, welcher schließlich als CBM-Komplex bezeichnet wird (CARD11-BCL10-MALT1) [27, 73, 74]. An den CBM Komplex wird nachfolgend durch aktives MALT1 die Ubiquitin-Ligase TRAF6 angelagert, es kommt zu einer Polyubiquitinylierung der beteiligten Proteine (MALT1, BCL10, TRAF6) und nachfolgender Anlagerung und Phosphorylierung des IKK-Komplexes, ein Komplex aus verschiedenen Isoformen der IKK (IκB-Kinase) [94]. Phosphorylierte IKK ist aktiv und kann wiederum das inhibitorische Molekül IκB (Inhibitor of NF-κB) phosphorylieren, welches infolgedessen dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Dadurch werden die Transkriptionsfaktoren RelA und p50 frei, können in den Kern translozieren und dort die Zielgenexpression induzieren [28]. Das Vorhandensein von phosphorylierter IKK und phosphosphoryliertem IκB ist somit ein Indikator für einen aktiven kanonischen NF-κB Signalweg [4, 22, 23, 40] in Lymphozyten.

Es wurde gezeigt, dass die Bildung des CBM-Komplexes unerlässlich für die Aktivierung von Lymphozyten als Folge einer BCR-Aktivierung ist [17, 45, 132]. Die Paracaspase MALT1 dient hierbei nicht nur als Scaffold-Protein für die Rekrutierung von TRAF6 sondern trägt auch durch seine Protease-Aktivität zur Signalaugmentation bei, z.B. durch proteolytische Inaktivierung des NF-κB Inhibitors A20 oder Cylindromatosis (CYLD) [58, 79, 121, 131]. Außerdem konnte RelB als Substrat von MALT1 identifiziert werden [45].

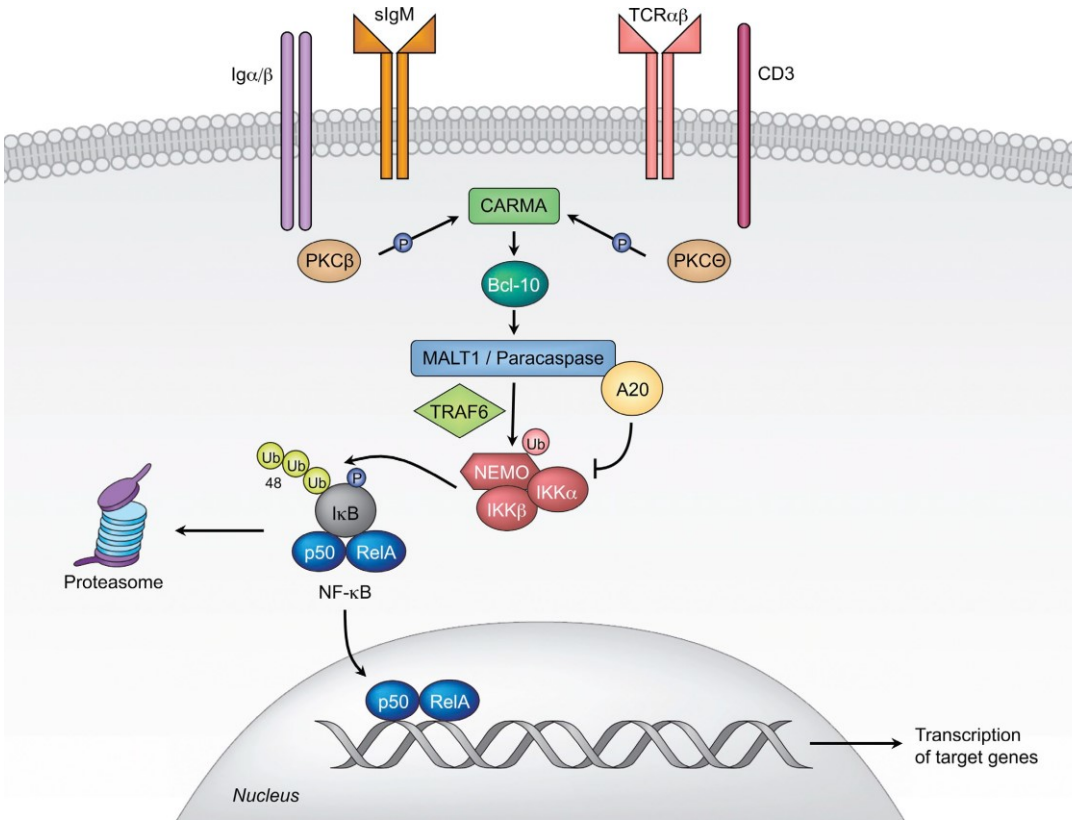

Abbildung 4: NF-κB Signalweg in durch Antigenrezeptor stimulierten Lymphozyten. Die Aktivierung des Antigenrezeptors führt über Isoformen der Proteinkinase C zur Assemblierung und Aktivierung des CBM Komplexes (CARMA, BCL10, MALT1) und zur Rekrutierung von TRAF6 und NEMO. In der Folge kommt es zu einer Ubiquitinylierung und nachfolgendem Abbau des NF-κB Inhibitors IκB, worauf p50 und RelA frei werden, in den Zellkern translozieren und die Zielgenexpression induzieren (Abbildung übernommen aus [134]).

1.5.2. NF-κB IN ABC DLBCL

In einer Vielzahl lymphoider Malignome wurden genetische Läsionen, welche eine aberrante Aktivierung des NF-κB Signalwegs nach sich ziehen, als onkogene Treibermutationen identifiziert [10, 28]. Konstitutive NF-κB Aktivierung ist eine zentrale Eigenschaft der DLBCL vom ABC-Subtyp [28]. Es wurden aktivierende Mutationen in den Genen *CD79A/B*, *CARD11*, *MYD88* (alternativer NF-κB Signalweg) [89], sowie inaktivierende Mutationen in dem Gen für das inhibitorischen Protein A20 gefunden. *CARD11* Mutationen konnten in ca. 10% der ABC DLBLC detektiert werden [29, 65]. CARD11 gehört zur Gruppe der CARD-(Caspase recruitment domain-containing) Proteine,

welche aus CARD9, CARD10, CARD11 und CARD14 besteht. Alle CARD-Proteine besitzen homologe CARD- und Coiled-Coiled-Domänen, welche der Oligomerisierung im Rahmen der Aktivierung des CBM Komplexes dienen. Zudem besitzen alle CARD-Proteine außer CARD9 eine sog. MAGUK-Domäne bestehend aus PDZ-, SRC Homologie 3 (SH3)- und einer Guanylat-Kinase like (GUK)-Domäne), weshalb diese Untergruppe auch CARMA-Proteine (CARD und MAGUK) genannt werden [15]. Phosphorylierungsstellen für die aktivierende Phosphorylierung durch PKCβ in B-Lymphozyten und PKCθ in T-Lymphozyten finden sich bei CARD11 innerhalb der Linker-Region zwischen der Coiled-Coiled-Domäne und der MAGUK-Domäne [83, 115, 120].

In vitro Experimente mit ABC DLBCL Zelllinien haben gezeigt, dass die Aktivierung des CBM Komplexes eine zentrale Rolle in der Pathogenese der ABC DLBCL spielt, da die Inaktivierung der einzelnen Komponenten des CBM Komplexes sich als toxisch für die Zellen erwiesen hat [62, 65].

1.5.3. NF-κB in Zellen der angeborenen Immunantwort

In myeloischen Zellen spielt der NF-κB Signalweg eine zentrale Rolle für die angeborene Immunantwort, z.B. in der anti-mikrobiellen Abwehr. Die Aktivierung findet hier über SYK-gekoppelte CLR (C-type lectin receptors) wie z.B. Dectin-1 [44, 135], Dectin-2 [106] und Mincle [119], ITAM-enthaltende Rezeptoren wie FcγRIII, MAIR-II oder OSCAR [49] und zytosolische Rezeptoren wie z.B. RIG-1 [99] statt. Diese werden als Reaktion auf extrazelluläre PAMPS (pathogen-associated molecular patterns) oder endogene DAMPS (danger-associated molecular patterns) [43, 105] aktiviert und tragen durch die Aktivierung des NF-κB Signalwegs zur Einleitung der Immunantwort bei.

Im Gegensatz zu lymphoiden Zellen, enthält der CBM-Komplex in myeloischen Zellen des angeborenen Immunsystems wie z.B. dentritischen Zellen und Makrophagen CARD9 anstelle von CARD11 [14, 44, 50]. Wie schon in Kapitel 1.5.2 beschrieben, besitzen CARD9 und CARD11 homologe CARD- und coiled-coiled-Domänen, jedoch ist CARD9 trunkiert und enthält keine MAGUK Domäne. Daher ist die Phosphorylierung durch die Isoformen PKCβ und PKCθ nicht möglich, stattdessen wird CARD9 innerhalb der Coiled-Coiled-Domäne an der Aminosäure Tyr231 durch die Isoform PKCΔ phosphoryliert [55, 78]. Dies

hebt die autoinhibitorische Konformation des Proteins auf, sodass die CARD-Domäne von CARD9 für die Bindung durch BCL10 freigelegt wird [55] und die Assemblierung des CBM-Signalosoms voranschreiten kann und nachfolgend die NF-κB Zielgenexpression induziert wird.

1.6. RICHTER SYNDROM ZELLLINIE U-RT1

Am Institut für Pathologie der Universität Ulm konnte aus einem zervikalen Lymphknoten eines Patienten mit Richter Transformation die erste stabile Zelllinie einer Richter Transformation U-RT1 etabliert werden. Die Zelllinie ist, wie auch schon das RS DLBCL im Lymphknoten klonal verwandt mit der zugrundeliegenden CLL des Patienten und zeigt sowohl morphologisch als auch immunphänotypisch die Eigenschaften eines DLBCL vom ABC Subtyp. Die Linie besitzt einen komplexen Karyotyp mit einer Deletion in 17p13 und nachfolgendem Verlust von *TP53* sowie eine Deletion in 9p21, welches den Genlokus von *CDKN2A* betrifft. Die Linie kann anhand dieser und weiterer untersuchter Eigenschaften als ein geeignetes Modellsystem für die Richter Transformation angesehen werden [117].

1.7. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Vor dem Hintergrund der schlechten Prognose von Patienten mit RS ist die weitere Erforschung der mechanistischen Hintergründe der Transformation essenziell. Trotz der unterschiedlichen Tumorbiologie werden aktuell die meisten Patienten mit RS anhand ähnlicher Therapieregimes behandelt wie Patienten mit *de novo* DLBCL. Funktionelle Analysen zur Identifizierung von Proliferationstreibern und möglichen Ansatzpunkten für gezielte Therapien der RS sind notwendig. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird die erste RS Zelllinie U-RT1 als Modellsystem verwendet um die Pathogenese des RS zu analysieren. Dabei soll die U-RT1 zunächst auf genomischer und transkriptioneller Ebene mit *de novo* DLBCL und cHL verglichen werden um im Anschluss weiterführende funktionelle Untersuchungen durchzuführen. Die daraus gewonnenen Ergebnisse sollen an einem Kollektiv aus RS, CLL, *de novo* DLBCL und cHL Lymphomfällen sowie an einem Kollektiv aus anderen indolenten Lymphomen transformierter DLBCL hinsichtlich der *in vitro* erzielten Erkenntnisse überprüft werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Gerät	**Bezeichnung**	**Hersteller**
Brutschrank	Water Jacket Series II	Thermo Scientific
Dampfgarer	Steamer Vitacuisine	Tefal
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton&Dickinson
Deckgläser	24x40 mm Menzel SPEZIAL	VWR
Einfrierröhrchen	CryoPure Röhrchen 1.9 ml	Sarstedt
Einfrierbehälter	CryoFreezing Container	Nalgene
Elektrophorese Stromversorger	Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech
Elektroporator	Amaxa	Lonza
Fluoreszenzmikroskop	Axioscope	Zeiss
Filter (Steril)	FiltropurS 0.45 µm und 0.2 µm	Sarstedt
Filterpapier (Western Blot)	Whatman Filterpapier	VWR
Geldokumentation	AlphaImager®EP	Alpha Innotech
Gelkammern (Agarose)	Easy Cast Electrophoresis System #2	Owl Scientific

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Gelkammer (SDS PAGE)	Xcell II Blot Module	Novex
Heizblock	TS-100	PeqLab
Kühlschrank	4 °C und -20 °C	Liebherr
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Zeiss
Microarray Scanner	SureScan Microarray Scanner	Agilent
Mikrowelle		Bosch
Multipipette	Eppendorf Multipipette Plus	Eppendorf
Nanodrop	Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Nitrocellulose Membran	Amersham Protran 0,2 µm NC	GE Healthcare
Objektträger	Menzel-Gläser Superfrost	Thermo Fisher Scientific
Pipetten		Eppendorf und HTL
Pasteurpipetten	7 ml Glas	Brand
Pipetten (serologisch)	Pipetten (serologisch)	Sarstedt
Pipettenspitzen	Biosphere	Sarstedt
Pipettierhelfer Pipetboy	Accu-Jet Pro	Brand
Reaktionsgefäß 0.5 ml	Multiply-Pro 0.5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 1.5 ml	SafeSeal 1.5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 2 ml	SafeSeal 2 ml	Sarstedt
qPCR Reaktionsgefäß 0.1 ml	Strip Tubes and Caps 0.1 ml	Qiagen
Rotator für 1.5 ml Gefäße	Test Tube Rotator	Snijders

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Schüttler	Rocking Platform	VWR International
Sequenzierer	GenomeLab GeXP	Beckman
Spektrophotometer	Epoch Microplate	BioTek
Sterilbank	Laminar-Flow Safe 2020	Thermo-Scientific
Thermocycler RT-PCR	ROTOR-Gene Q	Qiagen
Thermocycler	SensoQuest Lab Cycler	BioBudget
Vortexer	Vortex-Schüttler	VWR
Waage	EMB 1200	Kern
Western Blot Gerät	SemidryBlotter	H.Hölzel
Western Blot Scanner	C-DiGitBlot Scanner	LI-COR Biosciences
Zählkammer	Neubauer Improved	LO Labor Optik
Zellkulturflaschen	TC Flasche T25, Suspension	Sarstedt
Zellkulturgefäße	15 ml / 50 ml Gefäße	Sarstedt und Nerbe
Zellkulturplatte 96 well	96 well plate round bottom	Thermo Fischer Scientific
Zellkulturplatte 96 well	96 well plate flat bottom	
Zellkulturplatten	6 well – 24 well plate	Sarstedt
Zentrifuge (Zellkultur)	Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge (Zellkultur)	Megafuge 16R	Thermo Scientific
Zentrifuge	Centrifuge 5417C	Eppendorf
Zentrifuge (Kühlzentrifuge)	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge (Tisch)	MiniStar	VWR

2.1.2. CHEMIKALIEN, ENZYME, KITS UND PUFFER

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme sind in Tabelle 2 aufgelistet. Kits sind in Tabelle 3 aufgelistet. In Tabelle 4 sind die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 2: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien und Enzyme.

Bezeichnung	**Hersteller**
ACE Puffer 10x	AMRESCO
AllStars negative control siRNA	Qiagen
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Life Technologies
Agarose High Resolution	Carl Roth
Antibody Diluent	Zytomed Systems
Aqua ad iniectabilia (Ampuwa)	Fresenius Kabi
Aquatex	Merck
BAY11-7082	Selleckchem
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth
Bromphenolblau	Applichem
Color Protein Standard Broad Range	NEB
Citronensäure ($C_6H_6O_{7)}$	Carl Roth
4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
dNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Eisessig ($C_2H_4O_2$)	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh
Ethanol 100% unvergällt (C_2H_5OH)	Sigma-Aldrich

Bezeichnung	**Hersteller**
Ethidiumbromid	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom
Fluorophor Steptavidin Alexa-488	Thermo Fisher
Fixogum	Marabu
Formalin (CH_2O)	Carl Roth
Formamid (CH_3NO)	Life technologies
First Strand Buffer	Invitrogen
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher
L-Glutamin	Lonza
Glycin ($C_2H_5NO_2$)	Sigma-Aldrich
Glycerin ($C_3H_8O_{3)}$	Sigma-Aldrich
GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix	Promega
Hämatoxylin	DAKO
Salzsäure (HCl)	Roth
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)/RPMI 1640 (4:1)	Lonza
Kaliumdiyhdrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Mercaptoethanol (β-ME, C_2H_6OS)	Applichem
Magermilchpulver	Sigma Aldrich
Methanol (CH_3OH)	Merck
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Applichem
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT)	Sigma-Aldrich

Bezeichnung	**Hersteller**
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich
Natriumnitrit ($NaNO_2$)	Sigma-Aldrich
Natronlauge (NaOH)	Sigma-Aldrich
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2\ H_2O$)	Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
NuPage Loading Dye 4X	Thermo Fisher
NuPage 4-12% Bis-Tris Protein Gels	Thermo Fisher
OneTaq Quick-Load MM with GC Buffer	NEB
Pararosanilin	Merck
PAP-Pen “DAKO PEN”	DAKO
Penicillin	Lonza
Phosphate buffered saline (PBS)	Lonza
Propidiumiodid (PI)	Fluka
Phosphatase Inhibitor (PhosSTOP Easy)	Roche
Pronase	DAKO
Protease Inhibitor	Roche
Proteinase K	Roth
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare Bio-Sciences AB
QuantiNova SYBR Green PCR Kit	Qiagen
QuickLoad 100 bp ladder	NEB
Reverse TranskriptaseSuperscript II	Invitrogen
Rnase free Dnase SET	Qiagen

Bezeichnung	Hersteller
Random Hexamers	Invitrogen
Streptomycin	Lonza
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth
SurePrint G3 Human CGH Array 8x60K	Agilent
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma
Tween 20	AppliChem
Vectashield	Vector Laboratories
WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substance	LI-COR
Xylol 100%	Merck

Tabelle 3: Bezeichnung und Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Qiamp DNA Mini Kit	Qiagen
Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza Cologne AG
Qiagen RNeasy Kit	Qiagen
GeneRead DNAseq Custom Panel V2	Qiagen
Human 4x44K Whole Genome Microarray	Agilent
QuantiNova SYBR Green PCR Kit	Qiagen
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher
DAKO REAL Detection System AP/RED	DAKO
Genome Lab Human STR Primer SET Kit	Beckman Coulter

Tabelle 4: Zusammensetzungen der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen.

Molekularbiologie Puffer	
Ladepuffer	80 ml TAE Puffer
	20 ml Glycerin
	0.4 g Bromphenolblau
TAE Puffer 50x	242 g TRIS-Base [2M]
	57.1 ml Eisessig [1M]
	50 mM EDTA
	Ad 1000 ml ddH_2O, pH 8.0
Proteinbiochemie Puffer	
TNT Puffer	20 mM TRIS, pH 8.0
	200 mM NaCl
	1% Triton-X100
TNT++ Puffer	TNT Puffer
	1 mM DTT
	Protease + Phosphataseinhibitoren 1:100
Transferpuffer 10x	58 g TRIS, pH 8.0
	29 g Glycin
	18.5 ml 20% SDS
	ad 1000 ml ddH_2O
Transferpuffer 1x	100 ml Transferpuffer 10x
	100 ml Methanol
	ad 1000 ml ddH_2O

Proteinbiochemie Puffer	
SDS Gel Ladepuffer	4x Nu-Page-Ladepuffer
	5% β-Mercaptoethanol
MOPS Puffer 20x	104.6 g MOPS
	60.6 g Tris
	10 g SDS
	3 g EDTA
	ad 500 ml ddH_2O, pH 7.7
MOPS Puffer 1x	50 ml MOPS Puffer 20x
	ad 1000 ml ddH_2O
TBS 20x	48.46 g Tris (0.4 M)
	105.2 g NaCl (1.8 M)
	ad 1000 ml ddH_2O
	pH 7.6
TBS-T	TBS 1x
	500 µl Tween-20
Immunhistochemie Puffer	
Citratpuffer, 10 mM	1.92 g Citronensäure
	Ad 1000 ml ddH_2O
	pH 6
DAPI-Gebrauchslösung	70 ml SSC 20x
	DAPI-Stammlösung 0.03 ml
DAPI-Stammlösung	0.005 g DAPI
	Ad 25 ml ddH_2O

Immunhistochemie	
EDTA Puffer, 1 mM	0.37 g EDTA
	Ad 1000 ml ddH_2O
SSC 20x	175.3 g NaCl
	88.2 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
	6 Tropfen 25% HCl
	Ad 1000 ml ddH_2O
PBS 20x	29.25 g Di-Natriumhydrogenphosphat
	4.9 g Kaliumdihydrogenphosphat
	160 g NaCl
	ad 1000 ml ddH_2O, pH 6.8-7
Zellbiologie Puffer	
FACS-Puffer	1x PBS
	0.5% BSA
	0.05% Sodium Azid (NaN_3)
MTT-Lösung, 12 mM	20.1 ml PBS
	0.1 g MTT
	Sterilfiltriert mit 0.2 µm Filter
Zellkulturmedium	IMDM/RPMI (4:1)
	10% FCS
	1% L-Glutamin
	1% Pen/Strep

2.1.3. OLIGONUKLEOTIDE: PRIMER UND SIRNA

Tabelle 5 listet die in dieser Arbeit verwendeten Primer auf. In Tabelle 6 sind die verwendeten siRNA Oligonukleotide angegeben.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide mit der im Text verwendeten Bezeichnung, der Sequenz (5‘ nach 3‘), der Länge des Amplikons und die verwendete Schmelztemperatur (T_M).

Bezeichnung	**Sequenz**	**Amplikon**	**T_M**
BCL10 fw	AGGTCTGGACACCCTTGTTG	148 bp	60 °C
BCL10 rev	TGGAAAAGGTTCACAACTGCT		
CARD9 fw	GGAGCTGCAGCAGGAGAA	100 bp	60 °C
CARD9 rev	CTGGATGTAGGGGCTGCTC		
CARD11 fw	TACTTCCTGCCCTACCATCC	100 bp	60 °C
CARD11 rev	AAATCTGATGTTCGCTTCAGG		
CD79 Exon5 fw	GGGCTGGGGGACACTAACACTC	162 bp	58 °C
CD79 Exon5 rev	TGGGTGCTCACCTACAGACCAC		
CD79 Exon6 fw	TATCTGCTGGTGTGGTTGGG	249 bp	58 °C
CD79 Exon6 rev	GTCCAGGAAAGGGGTTGGG		
MALT1 fw	GGACATCCTTTTGTTCAATATCAGT	130 bp	59 °C
MALT1 rev	TGTTATTAACTCGACAGACATAAAAGC		
MYD88 fw	ACCCCTTGGCTTGCAGGT	146 bp	58 °C
MYD88 rev	AGGCGAGTCCAGAACCAAGATT		
B-ACTIN fw	TGTGGCATCCACGAAACTAC	182 bp	51 °C
B-ACTIN rev	GGAGCAATGATCTTGATCTTCA		
MYCO fw	CRCCTGRGTAGTAHRHWCGC	500 bp	50 °C
MYCO rev	GCGGTGTGTACAARMCCCGA		

Tabelle 6: Angegeben sind die in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Oligonukleotide mit der im Text verwendeten Bezeichnung, dem Hersteller und der Sequenz (5‘ nach 3‘).

Gen	Hersteller	Bezeichnung	Sequenz
CARD9	Qiagen (Flexitube Gene solution)	Hs_CARD9_8 Hs_CARD9_7 Hs_CARD9_5 Hs_CARD9_3	CTCCAAAGATGACTTCATCAA CTGTTCTGTTTCACCATGTAA ACGTAAGGACTCCAAGATGTA CTGGTCATCCGCAAACGGAAA
CARD9	Qiagen	Hs_CARD9_3 _Alexa-Fluor488	CTGGTCATCCGCAAACGGAAA

2.1.4. ANTIKÖRPER

In Tabelle 7 sind alle in dieser Arbeit für Western Blot Analysen verwendeten Primärantikörper aufgelistet. Tabelle 8 listet alle in dieser Arbeit für Immunzytochemie, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendeten Primärantikörper. Tabelle 9 und Tabelle 10 zeigen die verwendeten Sekundärantikörper.

Tabelle 7: Primärantikörper für Western Blot Analysen und Co-IP mit Angabe des Herstellers, des Klons, der Ursprungsspezies und der in dieser Arbeit verwendeten jeweiligen Verdünnung und Lösungsmittel.

Zielprotein	Hersteller	Klon	Herkunft	Verd.	Lösungsmittel
A20	Cell Signaling	D13H3	Kaninchen	1:500	5% w/v BSA in TBS-T
ß-Aktin	Sigma	AC-74	Maus	1:10000	TBS-T
BCL10 (Co-IP)	Santa Cruz	C17	Ziege	1 µg	TBS-T
BCL10	Santa Cruz	331.3	Maus	1:1000	TBS-T

Zielprotein	Hersteller	Klon	Herkunft	Verd.	Lösungsmittel
CARD9	Santa Cruz	H-90	Kaninchen	1:1000	TBS-T
CARD9	Sigma	C7862	Kaninchen	1:1000	TBS-T
CARD11	Santa Cruz	A-4	Kaninchen	1:1000	TBS-T
CYLD	Santa Cruz	E-10	Maus	1:500	TBS-T
MALT1	Santa Cruz	H-300	Kaninchen	1:1000	TBS-T
p65	Santa Cruz	F-6	Maus	1:1000	TBS-T
p65 (Co-IP)	Activ Motif	AB2793231	Rabbit	1 µg	TBS-T
pIκB-α	Santa Cruz	B-9	Maus	1:500	TBS-T
pIKKα/β (Ser176/180)	Cell Signaling	16A6	Kaninchen	1:1000	5% w/v BSA in TBS-T
RelB	Cell Signaling	C1E4	Kaninchen	1:500	5% Milch in TBS-T

Tabelle 8: Primärantikörper für Immunfärbungen mit Angabe des Herstellers, des Klons, der Ursprungsspezies, verwendeter Verdünnung und Vorbehandlung.

Zielprotein	Hersteller	Klon	Herkunft	Verd.	Vorbehandlung
BCL6	Dako	PG-B6P	Maus	1:20	Schnellkochtopf
CARD9	Sigma	C7862	Kaninchen	1:100	Dampfgarer EDTA, pH 9.0
CARD9	Santa Cruz	A8	Kaninchen	1:50	Dampfgarer EDTA, pH 9.0
CD10	Zytomed	56C6	Maus	1:50	Mikrowelle
CD20	Dako	L26	Maus	1:500	Dampfgarer TRS pH 6,1
MUM1	Dako	MUM1	Maus	1:100	Mikrowelle
Pax-5	BD	24	Maus	1:20	Mikrowelle

Zielprotein	Hersteller	Klon	Herkunft	Verd.	Vorbehandlung
ZAP-70	Menarini	L453R	Maus	1:150	Schnellkochtopf
KI67	Dako	MIB-1	Maus	1:200	Schnellkochtopf

Tabelle 9: Sekundärantikörper für Immunfärbungen mit Angabe des Herstellers, der Herkunftsspezies des Antikörpers, verwendeter Verdünnung und Konjugation.

Zielspezies	Hersteller	Herkunft	Verd.	Konjugation
Rabbit	DAKO	Schwein	1:200	Biotinyliert
Rabbit	Jackson ImmunoResearch	Ziege	1:800	Cy3
Maus	Jackson ImmunoResearch	Ziege	1:400	Biotinyliert
Maus	Jackson ImmunoResearch	Ziege	1:400	Cy3

Tabelle 10: Sekundärantikörper für Western Blot Analysen mit Angabe des Herstellers, der Herkunftsspezies des Antikörpers, verwendeter Verdünnung und Konjugation.

Zielspezies	Hersteller	Herkunft	Verd.	Konjugation
Maus	Invitrogen	Ziege	1:1000	HRP
Maus-α-Aktin	Invitrogen	Ziege	1:20000	HRP
Rabbit	Sigma-Aldrich	Ziege	1:1000	HRP

2.1.5. ZELLLINIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien sind in Tabelle 11 aufgelistet. Alle Zelllinien wurden aus dem Bestand des Instituts für Pathologie bezogen.

Tabelle 11: Bezeichnung und Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	**Entität**	**Abkürzung in Abbildungen**
HBL-1	ABC DLBCL	HBL1
L428	Hodgkin Lymphom	
OCI-Ly1	GCB DLBCL	Ly1
OCI-Ly3	ABC DLBCL	Ly3
OCI-Ly7	GCB DLBCL	Ly7
OCI-Ly10	ABC DLBCL	Ly10
SUDHL10	GCB DLBCL	S10
SUDHL4	GCB DLBCL	S4
SUDHL6	GCB DLBCL	S6
U-RT1	RS	

2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1. DNA ISOLATION

Die DNA Isolation wurde mit dem DNeasy Kit von Qiagen durchgeführt. Dazu wurden ca. 5 ml Zellkultur für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und in 200 µl PBS resuspendiert. Das anschließende Protokoll wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der DNA spektrophotometrisch bestimmt und die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.2. POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte wodurch auch sehr kleine Mengen von DNA nachgewiesen und analysiert werden können. In dieser Arbeit wurde die PCR für folgende Fragestellungen verwendet:

- Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur verschiedener Primerpaare für nachfolgende RT-qPCR Experimente (OneTaq Protokoll).
- Testung von Zellkultursuspensionen auf Mycoplasma spec. (OneTaq Protokoll).
- Short Tandem Repeat (STR)-Analyse zur Verifizierung der verwendeten Zelllinien (AmpliTaq Gold Protokoll).
- Sequenzierung bestimmter Genabschnitte (*MYD88*, *CD79*) zur Mutationsanalyse (GoTaq Protokoll).

Mycoplasmen-Test

Die in Kultur gehaltenen Zellkultursuspensionen wurden regelmäßig auf eine Infektion durch Mycoplasma spec. getestet. Dafür wurde, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, aus der zu untersuchenden Zellkultursuspension DNA isoliert. Mit dieser DNA wurde mit dem Mycoplasmen-Primer-Mix von Biomers eine PCR mit der OneTaq Polymerase durchgeführt und das Produkt mittels Agarose Gelelektrophorese dargestellt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und das PCR Reaktionsschema finden sich in Tabelle 12 und Tabelle 13.

Short Tandem Repeat (STR)-Analyse

Zur sicheren Zuordnung wurde von allen verwendeten Zelllinien eine STR-Analyse durchgeführt und das erhaltene Fragmentlängenprofil mit dem publizierten Profil der Zelllinie abgeglichen (ATCC STR Datenbank [9], Cellosaurus Datenbank [18] und DSMZ STR Datenbank [32]). Bei der STR-Analyse wird eine Multiplex-PCR mit einem definierten Panel aus fluoreszenz-markierten Primern durchgeführt und die Fragmentlängen der Produkte anschließend mithilfe eines Kapillarelektrophorese-Sequenzierers bestimmt. Es wurde das Primerkit von GenomeLab verwendet, welches insgesamt 12 verschiedene STR Loci umfasst.

Zur Durchführung der STR-Analyse wurde aus der zu testenden Zelllinie zunächst DNA isoliert und auf eine Konzentration von 10 µg/µl eingestellt. Der PCR-Ansatz mit der Polymerase AmpliTaq Gold wurde wie in Tabelle 12 beschrieben verwendet, das PCR-Programm im Thermocycler ist in Tabelle 13 aufgeführt. Die Messung erfolgte durch das Routinelabor des Instituts auf dem CEQ GeXP Kapillarelektrophoresesystem von Beckman Coulter, die Auswertung der Rohdaten mit der Software GeneMarker der Firma Softgenetics.

Mutationsanalyse *MYD88* und *CD79*

Um das Exon 3 des Gens *MYD88* und die Exone 5 und 6 des Gens *CD79* auf Mutationen zu überprüfen, wurde DNA aus der zu untersuchenden Zellkultur isoliert und mittels PCR mit den in Tabelle 5 beschriebenen Primern für *MYD88*, *CD79* Exon 5 und *CD79* Exon 6 die entsprechenden Genabschnitte amplifiziert. Für die PCR wurde die Polymerase GoTaq verwendet. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das Reaktionsschema finden sich in Tabelle 12 und Tabelle 14. Die darauffolgenden Sequenzierungen wurden durch das Routinelabor des Instituts für Pathologie Ulm durchgeführt. Die Chromatogramme wurden mit dem Programm Chromas ausgewertet und mithilfe der Nukleotid-Blastfunktion von NCBI auf Sequenzabweichungen überprüft [16].

Tabelle 12: Zusammensetzung des Reaktionsgemische für die verschiedenen PCR-Reaktionen mittels OneTaq Polymerase, AmpliTaq Gold und GoTaq.

	Menge		
Reagenz	**OneTaq Polymerase**	**AmpliTaq Gold**	**GoTaq**
OneTaq Quick Load 2x	12.5 µl		
AmpliTaq Gold Master Mix		1,85 µl	
GoTaq Master Mix			25 µl
Primer FW	1 µl (5 pmol/µl)	5 µl (5 pmol/µl)	0.25 µl (100 pmol/µl)
Primer RW	1 µl (5 pmol/µl)		0.25 µl (100 pmol/µl)
ddH_2O	9.5 µl	2,15 µl	21.5 µl
Template	1 µl	1 µl	3 µl

Tabelle 13: PCR Reaktionsschema von OneTaq und AmpliTaq Gold. Die Annealing Temperatur wurde bei der OneTaq Polymerase 2 K unterhalb der Schmelztemperatur (T_M) des jeweiligen Primerpaars gewählt.

Reaktionsschritt	**OneTaq Polymerase**			**AmpliTaq Gold**		
Primäre Denaturierung	95 °C	10 min		95 °C 96 °C	11 min 2 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	40x	94 °C	1 min	27x
Annealing	T_M-2K	30 s		60 °C	1 min	
Elongation	68 °C	30 s		70 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min		60 °C	30 min	
Wartezustand	4 °C	∞		4 °C	∞	

Tabelle 14: PCR Reaktionsschema der GoTaq Polymerase.

Reaktionsschritt	**GoTaq-Polymerase**		
Primäre Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	je 2x
Annealing	62 °C/60 °C/58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	30 s	35x
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Wartezustand	4 °C	∞	

2.2.3. AGAROSE GELELEKTROPHORESE

Für die Darstellung von DNA-Produkten wurden 1-2 %ige Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die Agarose in TAE Puffer durch Aufkochen gelöst, die Suspension mit ein bis zwei Tropfen Ethidiumbromid versetzt und in einer Gelkammer auspolymerisiert. Das zu untersuchende Reaktionsgemisch wurde mit Ladepuffer versetzt und in die Ladekammern pipettiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde zudem ein entsprechender Größenmarker aufgetragen. Durch das Anlegen einer Spannung von 90 V bis 120 V über 30 bis 60 Minuten wurden die Fragmente nach ihrer Größe separiert. Aufgrund der Interkalation von Ethidiumbromid in DNA-Doppelstränge konnten die Fragmente schließlich unter UV-Licht visualisiert werden.

2.2.4. NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS) *CARD9, CARD11* UND *TNFAIP3*

Für die Sequenzierung aller Exone von *CARD9*, *CARD11* und *TNFAIP3* wurde zunächst aus der zu untersuchenden Zellsuspension DNA isoliert und zur Sequenzierung ein custom-made GeneRead V2 Sequenzierpanel von Qiagen verwendet. Anreicherung von Zielregionen, Amplikon Prozessierung und Library Generierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und den etablierten Standards durch das Routinelabor des Instituts für Pathologie. Die Sequenzierung erfolgte mittels MiSeq-Sequencer (Illumina, San Diego, USA, cat. #: Y-410-1003).

2.2.5. ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDISATION (ACGH)

Bei der aCGH wird das Genom einer Probe bzw. einer Zelllinie hinsichtlich der Veränderung der Kopienzahl von Genabschnitten untersucht. Dabei werden sowohl die zu untersuchende DNA-Probe als auch die DNA einer Referenzprobe mit Fluorophoren gekoppelt, denaturiert und anschließend auf einen mit vielen Oligonukleotiden versehenen Träger-Chip co-hybridisiert. Auf diesem Chip ist jede Region des Genoms mehrfach repräsentiert. Über die Intensität der Probenfluoreszenz im Vergleich zu der Fluoreszenz der Referenzprobe kann nun auf den Verlust (Deletion) oder Hinzugewinn (Duplikation/Amplifikation) von Genmaterial geschlossen werden.

Die aCGH wurde am Zentrum für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Ulm in der Arbeitsgruppe von Dr. Lechel durchgeführt. Aus der zu untersuchenden Zelllinie wurde zunächst mit dem DNeasy Kit von Qiagen DNA isoliert und die Qualität der DNA mittels NanoDrop überprüft. Es wurde der SurePrint G3 Human CGH Array 8x60K von Agilent verwendet und pro Probe 500 ng DNA eingesetzt. Die Markierung und Hybridisierung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers. Gemessen wurde im SureScan Microarray Scanner von Agilent.

2.2.6. RNA-Isolation und Reverse Transkription

Die RNA Isolation wurde mit dem RNeasy Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Konzentration der RNA spektrophotometrisch bestimmt und die Proben bei -80 °C gelagert.

Für die Reverse Transkription wurde das SuperScript II First-Strand Synthesis System von Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet. Dafür wurde 1 µg RNA eingesetzt, mit 1 µl random hexamers (50 ng/µl), 1 µl dNTP Mix (10 mM) und mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl eingestellt. Nach 5 Minuten Inkubation bei 65 °C im Thermocycler wurden die Proben auf Eis gestellt, 4 µl des 5x Erststrangpuffers, 2 µl 0.1 M DTT zugegeben und im Anschluss im Thermocycler für 2 Minuten bei 25 °C inkubiert. Schließlich wurde 1 µl Superscript II Reverse Transkripase zu dem Ansatz hinzugefügt. Die Reverse Transkription wurde anschließend im Thermocycler für 10 Minuten bei 25 °C und im Anschluss für 50 Minuten bei 42 °C durchgeführt und durch 15 Minuten bei 70 °C beendet. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.7. Real Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

Für die quantitative PCR zur Bestimmung der relativen mRNA Expression eines Gens von Interesse (gene of interest (GOI)) wurde das QuantiNova SYBR Green PCR Kit und der ROTOR Gene Q Thermocycler von Qiagen verwendet. Die zu untersuchende RNA wurde zunächst mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels RT-qPCR quantifiziert. Bei SYBR Green handelt es sich um einen Fluoreszenz-Farbstoff, welcher an doppelsträngige DNA gebunden stärker fluoresziert als im ungebundenen Zustand. Er kann daher zur Quantifizierung der PCR-Amplifikation verwendet werden. Bei der Amplifikation handelt es sich um eine exponentielle Reaktion. Gemessen wird der C_T-Wert (Cycle threshold), welcher die Anzahl an PCR-Zyklen ausdrückt, nach der zum ersten Mal ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals über eine definierte Grundlinie erfasst wird, also das Signal die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Zur Bestimmung der Effizienz der Reaktion wurde für jedes Primerpaar anhand eines cDNA-Verdünnungsansatzes zunächst

eine Standardkurve erstellt und über die Steigung (m) der linearen Regressionsgeraden die Effizienz der Reaktion nachfolgender Formel berechnet:

$$E = 10^{-\frac{1}{m}}$$

Bei einer theoretischen Effizienz von 100% würde man eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus beobachten. Dies ist jedoch nur ein theoretischer Wert. Der Wert jeder gemessenen Probe muss deshalb anhand der über den Verdünnungsansatz gemessenen empirischen Reaktionseffizienz angepasst werden. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$2^x = E^y$ x = gemessener C_T-Wert

y = anhand der Primereffizienz korrigierter C_T-Wert

daraus ergibt sich: $y = x * \frac{log2}{logE}$

Pro Ansatz wurden 5 µl des SYBR Green PCR MasterMix, je 1 µl Primer fw und rev (5 pmol/µl) und 1 µl template DNA (≈100 ng) mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl eingestellt. Das verwendete Reaktionsschema ist in Tabelle 15 nachzulesen.

Tabelle 15: Reaktionsschema der RT-qPCR mit SYBR-Green. Die Annealing Temperatur wurde 2 K unterhalb der Schmelztemperatur (T_M) des jeweiligen Primerpaars gewählt.

Reaktionsschritt	**SYBR-Green**		
Aktivierung	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	10 s	45x
Annealing/Elongation	T_M-2K	20 s	
Schmelzkurvenanalyse	60-95 °C	5 s/ °C	
Wartezustand	4 °C	∞	

Zur Bestimmung der Spezifität der PCR-Produkte (SYBR Green bindet unspezifisch an jede doppelsträngige DNA) wurde für jeden Ansatz eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt

(60 °C bis 95 °C) und zusätzlich die Produkte nach Ablauf der qPCR mittels Agarose Gelelektrophorese dargestellt.

Von jeder Probe wurden Triplikate gemessen. Außerdem wurde für jede Sonde eine *non-template* Kontrolle mitgeführt, in der Wasser statt DNA vorlag. Die Quantifizierung der Probe (GOI) erfolgte relativ zu der mRNA-Menge des Housekeepingproteins (HK) β-Actin, auf das die ermittelte Menge der Zielsequenz bezogen wurde.

$\Delta C_T = C_T\,(GOI) - C_T\,(HK)$

Um die mRNA Expression eines GOI zweier Proben zu vergleichen, wurde schließlich der $\Delta\Delta C_T$ Wert gebildet:

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T\,(\text{Probe 1}) - \Delta C_T\,(\text{Probe 2})$

Aus dem so ermittelten Wert konnte über folgende Formel die relative mRNA Expression berechnet werden:

$$2^{\Delta\Delta CT} = \text{relativer Unterschied zweier Proben}$$

2.2.8. MIKROARRAY GENEXPRESSIONSANALYSE

Die Microarray Genexpressionsanalyse wurde am Zentrum für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Ulm in der Arbeitsgruppe von Dr. Lechel durchgeführt. Es wurde der Genexpressions-Chip Human 4x44K Whole Genome Microarray von Agilent verwendet. Die RNA-Isolation erfolgte wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben. Die Qualität der RNA wurde mittels Nanodrop überprüft. Es wurden biologische Triplikate gemessen, die RNA wurde aus drei unterschiedlichen Zellkultursuspensionen isoliert welche für mindestens zwei Passagen voneinander getrennt kultiviert worden waren. Die Fluoreszenzmarkierung und die Hybridisierung wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt, die Messung erfolgte im SureScan Microarray Scanner. Die Software Genespring von Agilent diente zur Auswertung der Daten. Die gewonnenen Expressionsdaten der Zelllinie U-RT1 wurden mit publizierten Expressionsdaten der DLBCL-Zelllinien HBL-1, OCI-Ly3, OCI-Ly7 und

SUDHL6 verglichen (ArrayExpress Nummer E-MTAB-973 und GEO Nummer GSM466597).

Die gewonnen Array-Daten sind unter der GEO Nummer GSE171481 zu finden.

2.3. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.3.1. KULTIVIERUNG VON HUMANEN LYMPHOMZELLLINIEN

Für die Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden verschiedene humane DLBCL-Zelllinien, die Hodgkin Lymphom Zelllinie L428 und die Richter Syndrom Zelllinie U-RT1 verwendet (s. Tabelle 11). Alle Zellen wurden in IMDM/RPMI im Verhältnis 4:1 mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO_2 in einer feuchten Atmosphäre kultiviert und alle 2 bis 3 Tage passagiert.

Bestimmung der Zellzahl

Von einer Zellsuspension, deren Zellzahl bestimmt werden sollte, wurden 20 µl im Verhältnis 1:1 mit 4 %iger Trypanblau-Lösung verdünnt und 10 µl dieses Gemisches in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Jedes Kleinquadrat einer Neubauer Zählkammer fasst ein Volumen von 0.1 µl. Es wurden alle vier Kleinquadrate ausgezählt, der Mittelwert gebildet und mit 10^4 sowie dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension multipliziert. Der daraus entstandene Wert entspricht der Zellzahl pro ml Zellkultur.

Zellen auftauen und einfrieren

Die Lagerung von vitalen Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Vermeidung von Eiskristallbildung wurden die Zellen (ca. $1x10^5$) nach Zentrifugation (1000 rpm, 5 Minuten) in 1 ml Vollmedium aufgenommen, mit 1 ml DMSO-haltigem Einfriermedium bestehend aus 2 Anteilen Vollmedium, 2 Anteilen FCS und 1 Anteil DMSO vermischt, in ein CryoPure-Röhrchen überführt, in einem Isopropanol-isoliertem Einfrierbehälter über 24 Stunden bei -80 °C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Beim Auftauen von Zellen aus flüssigem Stickstoff wurden die Zellen zunächst kurz auf Eis vorerwärmt und anschließend im 25°C warmen Wasserbad aufgetaut. Sobald die Suspension flüssig war, wurde in einem festgelegten Schema über einen Zeitraum von 10 Minuten langsam ein Gesamtvolumen von 9 ml Vollmedium hinzu pipettiert. Anschließend wurde die Suspension bei 1000 rpm und RT für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 5 ml frisches Vollmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

Herstellung eines Zellblocks

Die Zellen wurden pelletiert (1000 rpm, 5 Minuten, RT), der ÜS bis auf 100 bis 200 µl abgesaugt und je nach Größe des Pellets einige Tropfen FCS zugegebenen. Die Suspension wurde in 100% Ethanol aufgelöst und erneut zentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten, RT). Der Überstand wurde erneut bis auf 1 ml abgesaugt, die Zellen resuspendiert und mit ein bis zwei Tropfen Hämalaun angefärbt. Nach Überführung in ein 1.5 ml Eppendorf Gefäß wurde das Gefäß mit einem Filterpapier verschlossen und das Gefäß auf den Kopf gestellt, sodass die überschüssige Flüssigkeit durch das Filterpapier ablaufen konnte, die Zellen jedoch im Filterpapier aufgefangen werden. Die Zellen wurden im Filterpapier schließlich in einer Einbettkassette in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

2.3.2. MTT-ASSAY

Zur Bestimmung der Proliferation der Zellen wurde ein Cell Viability Assay mittels MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid) Reagenz durchgeführt. Dafür wurde von der zu untersuchenden Zellkultur $1x10^5$ Zellen in 100 µl pro well in einer 96 well flat bottom Platte ausgesät und nach entsprechender Inkubationszeit mit 10 µl 12 mM MTT Reagenz pro well versetzt. In stoffwechselaktiven Zellen wird das gelbe Tetrazoliumsalz zum blau-violetten Formazan reduziert. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die wasserunlöslichen Formazan-Kristalle durch Zugabe von 100 µl 10%iger SDS-Lösung in 0.01 M HCl und weitere einstündiger Inkubation bei 37 °C aufgelöst und die Absorption des Farbstoffs mittels Spektrophotometer gemessen. Alle Messungen wurden entweder in Triplikaten oder Quintuplikaten durchgeführt.

2.3.3. NF-κB INHIBITION MIT BAY11-7082

Für die Inhibition des NF-κB Signalwegs wurden je $5x10^5$ Zellen pro 96-Well Platte ausgesät und für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors BAY11-7082 behandelt. Der Inhibitor wurde zuvor in DMSO gelöst (maximaler DMSO-Anteil im Zellkulturansatz 0,02 %), als Kontrolle diente die entsprechende Menge an DMSO ohne Zugabe von Bay11-7082. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen dem MTT Assay wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben zugeführt. Alle Messungen wurden in technischen Quintuplikaten, sowie jede dieser Versuchsreihen wiederum in unabhängigen Triplikaten durchgeführt.

2.3.4. SIRNA KNOCKDOWN VON *CARD9*

Für den transienten Knockdown von *CARD9* mittels siRNA wurde das Amaxa Nucleofection System von Lonza nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Die Zellen wurden einen Tag vor Transfektion passagiert. Für die Transfektion wurde eine Zellzahl von $1x10^6$ Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei 1000 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert, in 100 µl frisch angesetzter Transfektionslösung resuspendiert und zusammen mit 1 µl bis 10 µl des zu transfizierenden Agens in die Amaxa-Küvette überführt. Für die Elektroporation von Lymphomzellen wurde das Programm X-001 verwendet und die Zellen anschließend in 3 ml vorgewärmtes Medium in 6-well Platten ausgesät. Als Positiv-Kontrolle wurde das im Kit enthaltene pmaxGFP-Plasmid von Amaxa verwendet (2 µg pro Ansatz). Die Transfektionseffizienz wurde außerdem anhand einer Alexa488-gekoppelten siRNA im FACS bestimmt. Als Negativkontrolle diente eine scrambled siRNA von Qiagen.

Die mit *CARD9* siRNA transfizierten Zellen wurden einem MTT Proliferations-Test zugeführt, zusätzlich wurde nach 24h eine Proteinextraktion durchgeführt um das Ausmaß des Knockdowns auf Proteinebene zu kontrollieren. Für den MTT Test wurden die Zellen 6 Stunden nach Transfektion erneut ausgezählt und je $1x10^5$ Zellen in einem Volumen von 100 µl pro well in 96 well flat bottom Platten überführt und der Proliferationstest 24 Stunden nach Transfektion durch Zugabe von MTT gestartet.

2.3.5. DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Für die Analyse im Fluorescence activated cell sorting (FACS) wurde 1 ml der zu analysierenden Zellkultur für 5 Minuten bei 1000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 500 µl PBS gewaschen und schließlich in 200 bis 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer FACS-Calibur analysiert. Zur Auswertung der Daten wurde die Flowing Software von Cell Imaging Core verwendet.

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen über den Forward Scatter (FSC) und den Side Scatter (SSC) zunächst fluoreszenzunabhängig nach Größe und Granularität sortiert. Dadurch können vitale Zellen von toten Zellen und Zelltrümmern unterschieden werden (Abbildung 5). Aus der auf diese Weise eingegrenzten vitalen Zellpopulation wurden schließlich pro Probe $1x10^5$ Zellen analysiert und im entsprechenden Fluoreszenzkanal vermessen.

Für die Messung der Transfektionsrate von siRNA mittels Alexa488-markierter siRNA wurden die Zellen im Grün-Kanal FL1 gemessen und die Fluoreszenzintensität im Histogramm dargestellt.

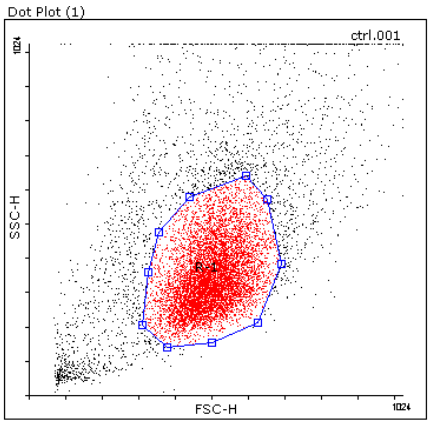

Abbildung 5: Beispiel aus einer FACS-Analyse. Abgrenzung der intakten Zellen von Zelltrümmern mittels FSC und SSC im Zelldichte-Plot. In blau beispielhaft gesetztes Gate um die vitale Beispielpopulation R-1 in rot.

2.4. PROTEINBIOCHEMIE

2.4.1. PROTEINISOLATION, SDS-PAGE UND WESTERN BLOT

Proteinisolation

Die Suspensionszellen wurden pelletiert (1000 rpm, 5 Minuten RT), in 1000 µl kaltem PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten, 4 °C). Das Pellet wurde je nach Größe in 25 bis 50 µl TNT^{++} Puffer aufgenommen und für 3 Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde die Suspension 7 bis 10 Minuten bei RT aufgetaut, erneut zentrifugiert (14000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) und der proteinhaltige Überstand abgenommen. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -80 °C, die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher nach Angaben des Herstellers. Die Messung erfolgte mittels Spektrophotometer bei 562 nm, die Proteinkonzentration wurde schließlich anhand einer Albumin-Standardreihe berechnet.

SDS-PAGE und Western Blot

Die Vorbereitung der Lysate erfolgte durch Zugabe einer dem Gesamtladevolumen angepassten Menge des 4x Ladepuffer und Aufkochen der Proben für 5 Minuten bei 95 °C. Es wurde eine Proteinmenge von 10-20 µg pro Probe verwendet. Der verwendete Ladepuffer enthält Lithium Dodecyl Sulfat (LDS), wodurch die Eigenladung der Proteine maskiert wird. Der Ladepuffer wird außerdem vor Verwendung mit β-Mercaptoethanol versetzt, welches Disulfidbrücken zwischen Cysteinen spaltet und so die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Dadurch wird eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine ausschließlich nach ihrer Größe gewährleistet.

Für die SDS-PAGE wurden vorgefertigte Acrylamidgele von Invitrogen mit einem Konzentrationsgradienten von 4% bis 12% Acrylamidanteil verwendet. Diese haben im Vergleich zu Gelen mit einheitlicher Acrylamid-Konzentration einen vergleichsweise hohen Auftrennungsbereich. Nach Entfernen des Gelkamms wurden die Proben in die Taschen pipettiert und für 60 bis 90 Minuten eine Spannung von 150 V angelegt.

Die Überführung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von dem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte nach dem Semi-Dry-Prinzip. Die Nitrocellulosemembran wurde zunächst kurz in ddH_2O aktiviert und anschließend wie auch die verwendeten Whatmanpapiere in Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte für 1:15 Stunden bei 60 mAmp (ein Gel) oder 120 mAmp (zwei Gele) von der Anode (Acrylamidgel) zur Kathode (Nitrozellulosemembran).

Anschließend wurde die Membran nach folgendem Schema weiter behandelt:

a. 2x10 Minuten waschen mit TBS bei Raumtemperatur (RT)
b. 1 Stunde blocken in 3 % BSA in TBS-T (RT)
c. 2x10 Minuten waschen mit TBS-T (RT)
d. 1x10 Minuten mit TBS (RT)
e. **Primärantikörper**: Über Nacht bei 4 °C schütteln (Konzentration und Lösungsmittel siehe Kapitel 2.1.4)
f. 2x10 Minuten waschen mit TBS-T (RT)
g. 1x10 Minuten waschen TBS (RT)
h. 30 Minuten blocken mit 10 % Magermilch in TBS-T (RT)
i. 3x10 Minuten waschen mit TBS-T (RT)
j. **Sekundärantikörper**: Inkubation für 1 Stunde (RT; Konzentration und Lösungsmittel siehe Kapitel 2.1.4)
k. 4x10 Minuten waschen mit TBS-T (RT)

Für die Detektion der Proteine wurde die LI-COR Entwicklerlösung nach Angaben des Herstellers 1:1 vermischt und die Membran darin unter Schütteln für 5 Minuten inkubiert (ca. 10 µl/cm²). Anschließend erfolgte die Detektion im LI-COR Western Blot Scanner.

Um die Membran wieder von gebundenen Antikörpern zu befreien („Stripping“), wurde sie für 20 Minuten in TBS-T gewaschen, 5 Minuten mit 200 mM NaOH inkubiert, 5 Minuten mit ddH_2O und anschließend erneut 20 Minuten mit TBS-T gewaschen. Danach konnte die Membran erneut wie oben beschrieben mit BSA geblockt, gewaschen und mit Primärantikörper versehen werden.

2.4.2. Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Die Co-IP wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt, um die Komplexbildung der Proteine BCL10, MALT1 und CARD9 zu überprüfen. Es wurde zunächst mit einem entsprechenden Primärantikörper das zu untersuchende Antigen gebunden und anschließend der Komplex aus Protein und Bindungspartnern (Co-Präzipitate) über den Fc-Teil des Primärantikörpers an Protein-A/G-gekoppelten Agarose-Beads gebunden.

Zunächst wurde wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben Gesamtprotein aus der zu untersuchenden Zellsuspension isoliert und 500 µg Protein auf ein Gesamtvolumen von 300 µl mit TNT^{++}-Puffer eingestellt. Von dieser Lösung wurden 10 µl als Kontrollprobe „Prä-IP“ separiert. Der Rest der Suspension wurde mit insgesamt 1 µg Primär-Antikörper versetzt und über Nacht bei 4 °C und 10 rpm inkubiert (Test Tube Rotator, Snijders).

Bevor diese Suspension mit Agarose-Beads versetzt werden konnte, mussten die Agarose-Beads durch dreimaliges Waschen mit TNT^{++}-Puffer vorbereitet werden. Insgesamt wurde pro Probe 10 µl der Agarose-Bead-Lösung mit 500 µl TNT^{++}-Puffer gewaschen, anschließend mit TNT^{++}-Puffer auf 100 µl eingestellt und zu dem Ansatz aus Proteinen und Primärantikörper zugegeben. Diese Mischung wurde für 40 Minuten bei 4 °C und 10 rpm inkubiert; in dieser Zeit kann das an Agarose gekoppelte Protein A/G an den Primärantikörper binden. Anschließend wurde für 10 Sekunden bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, bis auf 20 µl für spätere Kontrollzwecke („Prä-Wash-Kontrolle“), verworfen. Es folgten zwei Waschschritte mit jeweils 500 µl TNT^{++}-Puffer, wobei vom ersten Überstand wiederum ein Kontrollaliquot von 20 µl („1.-Wash Kontrolle“) asserviert wurde. Anschließend folgten zwei Waschschritte mit 500 µl TBS. Alle Waschschritte erfolgten für 10 Sekunden bei 14000 rpm und 4 °C. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet mit 10 µl Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Die Probe wurde nun für 30 Sekunden bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Das weitere Prozedere erfolgte nach demselben Prinzip wie die in Kapitel 2.4.1 beschriebene Immunodetektion.

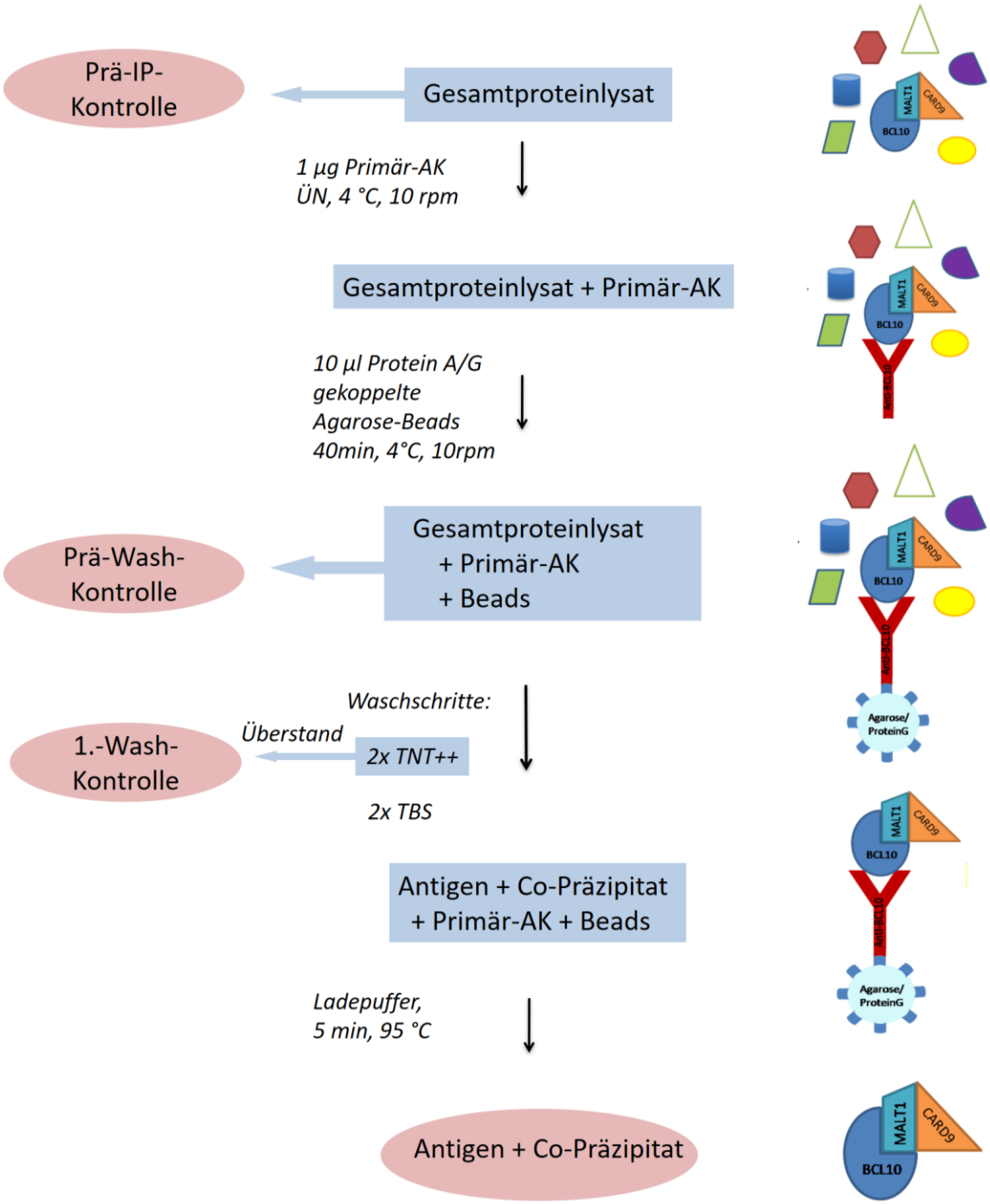

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Co-Immunopräzipitation. Das Gesamtproteinlysat wurde zunächst mit dem Primär-Antikörper gegen BCL10 inkubiert und in einem weiteren Schritt die Agarose-Beads an den Primär-Antikörper gebunden. In mehreren Waschschritten wurden alle Bestandteile des Lysats welche nicht über Protein-Protein-Bindungen an dem Primärantikörper binden abgewaschen. Anschließend wurde die Antikörperbindung an den Proteinkomplex durch Aufkochen in Ladepuffer aufgehoben und das Präzipitat mittels Immunoblot untersucht. Als Verfahrenskontrolle wurde neben dem Präzipitat auch eine Prä-IP-Kontrolle, eine Prä-Wash-Kontrolle und eine 1.-Wash-Kontrolle im Immunoblot überprüft. AK: Antikörper: ÜN: über Nacht.

2.4.3. IMMUNHISTOCHEMIE/IMMUNZYTOLOGIE/IMMUNFLUORESZENZ

Immunhistochemie/Immunzytologie

Um selektiv die Expression und subzelluläre Verteilung verschiedener Antigene in FFPE-Gewebe und Zellblöcken zu untersuchen, wurde der zu untersuchende Paraffinschnitt zunächst wie unten beschrieben entparaffiniert. Für immunhistologische Färbungen wurde zunächst durch eine Vorbehandlung die durch die Fixierung veränderte Immunreaktivität des Gewebes bzw. der Zellen wiederhergestellt (Antigendemaskierung). Schließlich wurden die Schnitte mit Primärantikörper inkubiert und dieser über ein System aus biotinyliertem Sekundärantikörper, Alkalische Phosphatase gekoppeltem Streptavidin und RED-Chromogen dargestellt.

Färbeprotokoll:

Entparaffinierung:

a. 3x Xylol 5 Minuten
b. 100% Ethanol kurz spülen
c. 100% Ethanol 5 Minuten
d. 90% Ethanol 5 Minuten
e. 70% Ethanol 5 Minuten
f. Aqua dest. kurz spülen

Antigendemaskierung: Die jeweils beste Methode wurde für jeden Primärantikörper zunächst ausgetestet. Die letztendlich verwendete Methode ist in Tabelle 8 für jeden Primärantikörper angegeben.

Dampfgarer: Die Schnitte wurden im vorgeheizten Puffer (Tris pH 6.0 oder EDTA pH 9.0) für 20 Minuten im Dampfgarer inkubiert, für 10 Minuten in Eiswasser abgekühlt und anschließend in ddH_2O gespült.

Mikrowelle: Die Schnitte wurden in 10 mM Citratpuffer pH 6 für 20 Minuten gekocht. Aufgrund der Verdunstung von

Flüssigkeit wurde die Küvette in regelmäßigen Abständen mit ddH_2O aufgefüllt.

Schnellkochtopf: Die Schnitte wurden in 10 mM Citratpuffer pH 6.0 für 20 Minuten bei 150 °C im geschlossenen Kochtopf gekocht und anschließend für 20 Minuten abgekühlt und schließlich mit destilliertem Wasser gespült.

Antigenbindung: 30 Minuten Primär-AK (50 bis 200 µl pro Schnitt, Konzentration siehe Tabelle 8).

Nachweisreaktion: Der Bindung des Primärantikörpers erfolgte durch 30 Minuten Inkubation mit einem entsprechenden biotinylierten Sekundär-Antikörper. Nach kurzem Spülen in PBS wurde 30 Minuten mit Streptavidin inkubiert, welches mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Nach erneutem Spülen in PBS wurde schließlich ein Substrat der Alkalischen Phosphatase, das RED-Chromogen Neufuchsin von DAKO in handelsüblicher Zusammensetzung für 16 Minuten zugegeben. Die Alkalische Phosphatase spaltet Neufuchsin zu einem rot-violetten Endprodukt.

Als Kernfärbung wurden die Schnitte jeweils für 5 Minuten mit Hämalaun inkubiert und anschließend mit leicht alkalischem Leitungswasser gespült, was zu einem Farbumschlag des Hämatoxylins nach blau bewirkt („bläuen“). Die Objektträger wurden schließlich mit Aquatex eingedeckelt.

Doppelimmunfluoreszenz an FFPE-Gewebe

Die Doppelimmunfluoreszenz zur Untersuchung von Kolokalisation zwischen CARD9 und CD20 erfolgte weitgehend nach demselben Prinzip wie die oben beschriebene Immunhistochemie/Immunzytologie. Nach Entparaffinierung und Antigendemaskierung erfolgte die Inkubation zunächst mit dem ersten Primärantikörper für 30 Minuten. Als Sekundärantikörper wurden sowohl Antikörper verwendet, welche direkt an ein Fluorophor (Cy3, rot) gekoppelt sind als auch biotinylierte Sekundärantikörper. Diese wurden im

Anschluss an die Bindung des Primärantikörpers für 30 Minuten mit einem Streptavidin-gekoppelten Fluorophor (Alexa488, Konzentration 1:1600) inkubiert.

Nach der Färbung des ersten Antigens wurde der Prozess für das zweite Antigen mit den entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern wiederholt. Bei der Austestung dieser Färbungen wurden verschiedene Reihenfolgen und Farbstoffkombinationen getestet, sowie Einfach- und Doppeltnegativkontrollen angefertigt, um die Spezifität der Bindungen zu überprüfen. Für die Doppelfluoreszenz CARD9/CD20 wurden Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies und gegen die jeweils andere Spezies adsorbierte Sekundär-Antikörper verwendet, wodurch das Auftreten von Kreuzreaktionen auf ein Minimum reduziert werden konnte.

Bei der Immunfluoreszenz wurden generell alle Reaktionsschritte ab der ersten Verwendung eines Fluorophors im Dunkeln bei Rotlicht durchgeführt. Am Ende des Färbeprotokolls wurde als Kernfärbung der DNA-bindende blaue Farbstoff DAPI verwendet. Dafür wurden die Schnitte für 30 Sekunden in DAPI-Gebrauchslösung inkubiert. Das Eindeckeln der Schnitte erfolgte mit Vectashield-Endeckmedium, die Lagerung der Fluoreszenzfärbungen im Dunkeln bei 4 °C.

2.5. Statistische Auswertung

Alle p-Werte für Gruppenvergleiche basieren auf zweiseitigen t-Tests mit einem Signifikanzniveau von 5 %. Statistische Signifikanz wird in Abbildungen und Beschriftungen ab einem p-Wert < 0.05 mit „*“, hohe statistische Signifikanz ab einem p-Wert < 0.01 mit „**“ und höchst statistisch signifikante Unterschiede ab einem p-Wert < 0.001 mit „***“ gekennzeichnet.

Bei den Werten der MTT Proliferationsexperimente wurde der gepaarte t-Test durchgeführt. Für jede Stichprobe wurden die Werte auf die individuellen Mittelwerte der Kontrollgruppe normalisiert, um Vergleiche über alle Proben zur gleichen Zeit durchführen zu können.

Bei allen Werten aus RT-qPCR Experimenten wurde der ungepaarte t-Test auf die Mittelwerte der ΔCT Werte angewandt, welche zuvor auf den HK (β-Actin) normalisiert wurden.

Die EC50 Werte der Inhibition mit BAY11-7082 wurden mithilfe des Emax Models berechnet. Dafür wurde die Funktion stan_emax des R Pakets rstanemax verwendet.

Alle Grafiken außer den Abbildungen basierend auf Genexpressionsanalysen wurden mit der R Version 4.0.4 generiert (The R Foundation). Ergebnisse aus Genexpressionsanalysen wurden mit dem Programm Genespring von Agilent ausgewertet und dargestellt. Array CGH Daten wurden mit dem Programm Agilent Genomic Workbench Version 7.0 von Agilent ausgewertet. FACS Daten wurden mit der Flowing Software Version 2.5.1 (Turku Centre for Biotechnology, Universität Turku) analysiert.

2.6. GEWEBEBANK

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden FFPE Proben von Patienten mit RS (n=15), Patienten mit *de novo* DLBCL (n=10), klassischem Hodgkin Lymhom (n=25), CLL (n=20) und DLBCL welche aus indolenten Lymphomen transformiert sind (n=17) untersucht. Alle mit diesem Material durchgeführten Experimente wurden entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die lokale Ethikprüfung der Universität Ulm akzeptiert (Ethikkomitee Ulm, 371/17). Von allen Patienten liegt eine schriftliche Einverständniserklärung für die Verwendung ihre Tumorproben für wissenschaftliche Zwecke vor.

3. ERGEBNISSE

3.1. MIKROARRAY GENEXPRESSIONSANALYSE IN U-RT1

Mittels Mikroarray Genexpressionsanalyse kann die Gesamtheit der Gene einer Zelllinie hinsichtlich des Levels an transkribierter mRNA untersucht werden. Verglichen wurde die Richter-Transformation Zelllinie U-RT1 mit vier DLBCL Zelllinien (HBL-1, OCI-Ly3, OCI-Ly7 und SUDHL6). Es zeigt sich eine Vielzahl differenziell exprimierter Gene, insgesamt wurden zwischen den beiden Vergleichsgruppen 2231 Gene detektiert, deren mRNA Expressionslevel sich um mindestens das 10-fache unterscheidet ($p<0.01$). Mithilfe von Gene Ontology Analysen wurden auch jene Gene herausgefiltert, welche die Zelldifferenzierung, die Zellproliferation und den programmierten Zelltod (Apoptose) beeinflussen. Auch hier zeigen sich Expressionsunterschiede zwischen U-RT1 und den DLBCL-Zelllinien.

Die oben erwähnten, 2231 signifikant differenziell exprimierten Gene zwischen U-RT1 und den *de novo* DLBCL Zelllinien wurden in der Folge nach Bedeutung und Relevanz analysiert. Dabei fiel eine hohe Expression des Gens *CARD9* in U-RT1 auf, wohingegen das eigentlich in lymphoiden Zellen vorkommende *CARD11* vergleichsweise gering exprimiert wird. Abbildung 7 zeigt die relative mRNA Expression (MicroArray) der beiden Gene in den getesteten Gruppen.

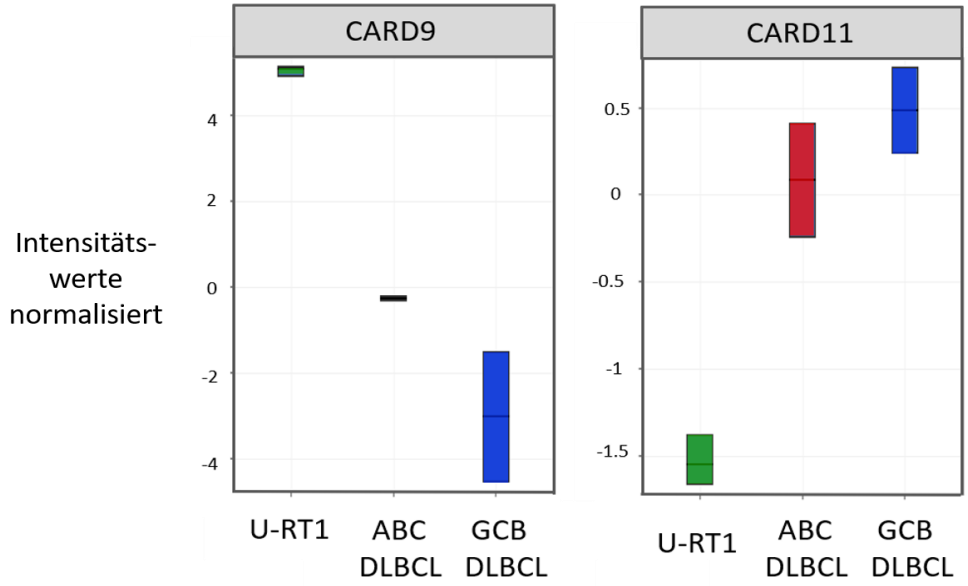

Abbildung 7: Microarray mRNA Expressions Analyse von *CARD9* (A) und *CARD11* (B) in der Zelllinie U-RT1 verglichen mit publizierten Expressionsdaten der Zelllinien HBL-1 und OCI-Ly3 (ABC DLBCL), OCI Ly7 und SUDHL4 (GCB DLBCL). Veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

3.2. RT-qPCR Expressionsanalyse von *CARD9*, *CARD11*, *MALT1* und *BCL10*

Um die im Microarray erhaltenen Ergebnisse zu validieren, wurden RT-qPCR Analysen durchgeführt. Getestet wurde die RS Zelllinie U-RT1, die ABC DLBCL Zelllinien HBL-1, OCI-Ly3, OCI-Ly10 und die GCB DLBCL Zelllinien SUDHL4, SUDHL6. Untersucht wurden u.a. die mRNA-Expression von *CARD9* und die der Proteine des CBM-Komplexes, bestehend aus *BCL10*, *CARD11* und *MALT1* (Abbildung 8). Dargestellt ist die relative mRNA Expression verglichen mit den Expressionsmittelwerten des jeweiligen Gens aller getesteten Zelllinien.

Die Zelllinie U-RT1 zeigt in der RT-qPCR eine signifikante und im Schnitt 4-fach höhere Expression von *CARD9* als in allen anderen getesteten Zelllinien. Von *CARD11* hingegen wird in den DLBCL Zelllinien im Mittel etwa 5-fach so viel mRNA exprimiert wie in U-RT1. Mittels RT-qPCR untersucht wurde auch die Genexpression der beiden CBM-Komplex Proteine *BCL10* und *MALT1*. Es zeigt sich sowohl für MALT1 als auch für

BCL10 eine signifikant stärkere Expression auf mRNA Ebene in der Linie U-RT1 als in den restlichen Zelllinien. Beide Gene werden in U-RT1 im Schnitt 3.5-fach (*MALT1*) und 3.6-fach (*BCL10*) so stark exprimiert wie in den DLBCL Zelllinien.

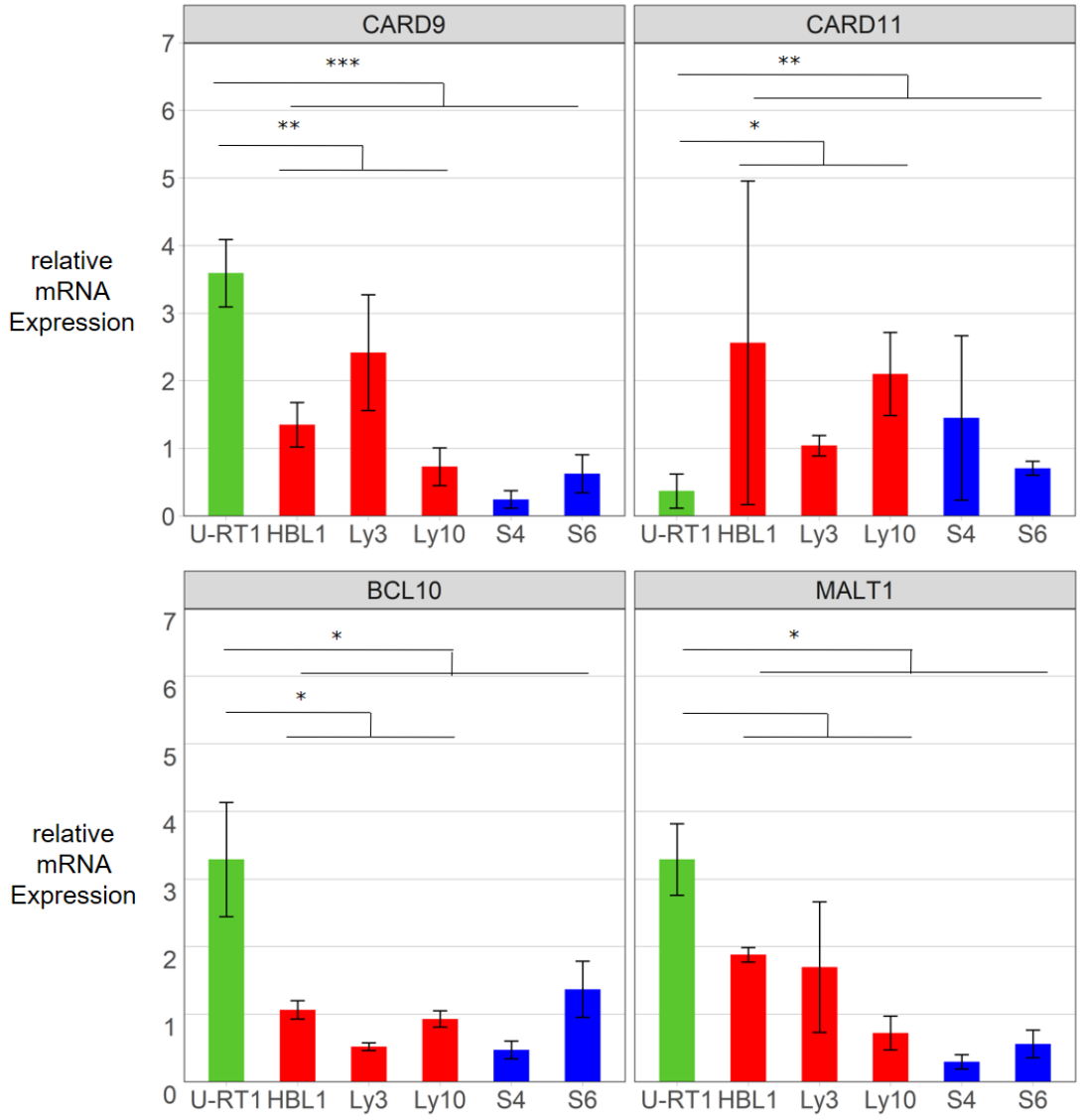

Abbildung 8: RT-qPCR von *CARD9*, *CARD11*, *BCL10* und *MALT1* in verschiedenen Lymphom-Zelllinien. ABC DLBCL sind in rot dargestellt, GCB DLBCL in blau. Dargestellt ist die relative mRNA Expression verglichen mit den Expressionsmittelwerten des jeweiligen Gens aller getesteten Zelllinien. Alle ΔCT-Werte wurden zuvor die mRNA Level von β-Actin normalisiert. Jede Probe wurde in technischen und biologischen Triplikaten gemessen, schwarze Balken zeigen die jeweilige Standardabweichung. ***: $p<0.005$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.05$. Veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

3.3. IMMUNZYTOLOGIE VON CARD9 IN U-RT1, HBL-1 UND SUHDL4

Um die auf mRNA-Ebene gemessene Expression von *CARD9* auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurden Paraffinschnitte von Zellblöcken der Zelllinien U-RT1, HBL-1 und SUDHL4 immunzyotologisch mit einem CARD9 Antikörper angefärbt. Hier zeigt sich eine deutliche zytoplasmatische Anfärbung in der Richter Transformation Zelllinie U-RT1, während die Lymphomzellen der ABC DLBCL Zelllinie HBL-1 und der GCB DLBCL Zelllinie SUDHL4 negativ für CARD9 bleiben (Abbildung 9).

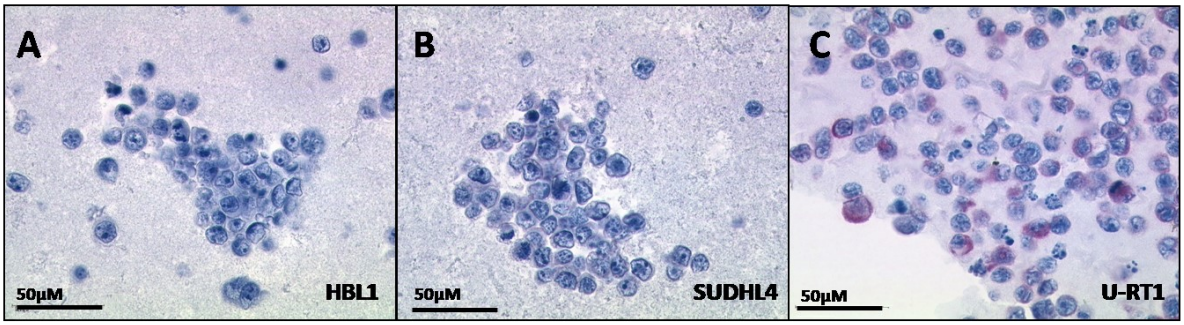

Abbildung 9: Immunzytologie der Zelllinien HBL-1 (A), SUDHL4 (B) und U-RT1 (C) mit dem Antikörper CARD9 zeigt eine deutliche zytoplasmatische Anfärbung in den Zellen von U-RT1, jedoch keine Anfärbung bei HBL-1 und SUDHL4. Veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

3.4. CBM-KOMPLEX ANALYSE MITTELS WESTERN BLOT UND IMMUNPRÄZIPITATION

Western Blot der CBM Komplex Proteine in U-RT1, *de novo* DLBCL und L428

Eine weitere Möglichkeit, die Expression von *CARD9* in der Zelllinie U-RT1 zu untersuchen stellt der Immunoblot dar. Es wurden sowohl die Proteinlevel von CARD9 also auch die der CBM-Komplex Proteine MALT1 und BCL10 in verschiedenen Zelllinien mittels Western Blot untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 zu sehen. Bei der Detektion von CARD9 zeigt sich in der U-RT1 eine deutliche Bande, alle anderen getesteten Zelllinien bleiben negativ. Die beiden Proteine MALT1 und BCL10, welche in lymphoiden Zellen mit CARD11 einen funktionellen Komplex bilden, können in allen getesteten Linien detektiert werden. Bei MALT1 zeigt sich in der U-RT1 eine starke Bande, entsprechend der in der Microarray Genexpressionsanalyse und in der RT-qPCR gemessenen hohen mRNA-

Expression. Die schwächste *MALT1* Expression zeigen die beiden Linien OCI-Ly10 und SUDHL4. Auch dieses Ergebnis entspricht weitgehend den RT-qPCR Ergebnissen. Die Banden von BCL10 sind in allen Lymphom-Zelllinien weitgehend gleich stark vorhanden und sprechen für eine ähnlich starke Genexpression.

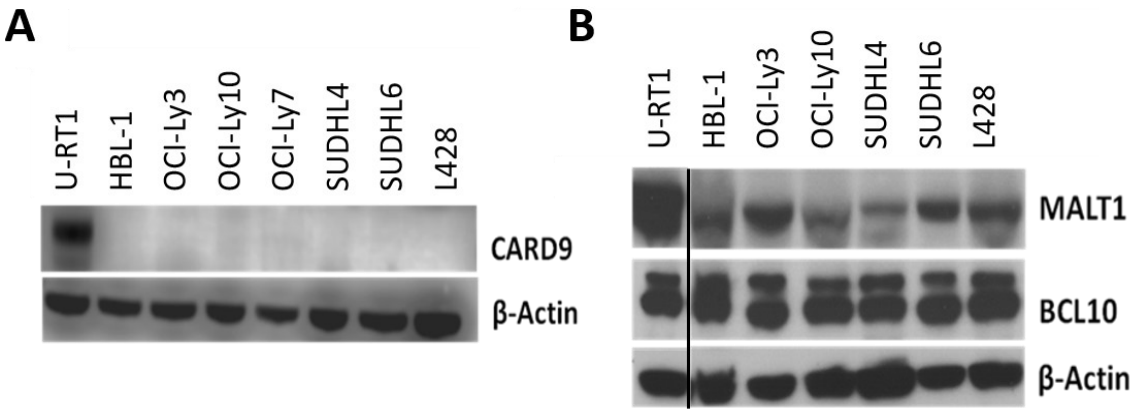

Abbildung 10: Western Blot Analyse des Proteins CARD9 (A), MALT1 und BCL10 (B) in den angegeben Zelllinien. U-RT1 zeigt hohe CARD9 Proteinlevel, alle anderen Zelllinien zeigen keine Banden. MALT1 zeigt in U-RT1 eine kräftigere Bande als in den anderen Zelllinien. BCL10 ist in allen Linien vorhanden. Als Ladekontrolle diente β-Actin. Veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Co-IP von BCL10 in U-RT1 und HBL-1

In lymphoiden Zellen wird bei Aktivierung des NF-κB Signalwegs ein CBM-Komplex aus den Proteinen CARD11, BCL10 und MALT1 gebildet. Um herauszufinden, ob in der Zelllinie U-RT1 ein alternativer CBM-Komplex aus CARD9, BCL10 und MALT1 gebildet wird, wurde eine Co-IP mittels Fällung mit einem anti-BCL10 Antikörper durchgeführt und das Präzipitat im Western Blot auf das Vorhandensein der Proteine CARD9, BCL10 und MALT1 untersucht. Es wurde außerdem parallel eine Fällung mit einem anti-p65 Antikörper durchgeführt, um zu zeigen, dass es sich bei den bei der BCL10-Fällung detektierten Proteinen nicht um unspezifische Proteinbindungen an Protein A/G der verwendeten Agarosebeads handelt. Der genaue Ablauf der Co-IP und die Erklärung der Herkunft der einzelnen Probenanteile im Versuchsablauf („Prä-IP“, „Prä-Wash“, „1.-Wash“, und „Co-IP“) findet sich in Kapitel 2.4.2.

Die Co-IP mit BCL10-Antikörper wurde mit den Linien U-RT1 und HBL-1 parallel durchgeführt. Es zeigt sich in den beiden prä-IP Proben „Prä-IP“ und „Prä-Wash“ in beiden Linien eine Expression von MALT1 und BCL10, in U-RT1 außerdem eine Bande bei CARD9 (Abbildung 11), was dem Bild des Western Blots mit Gesamtproteinlysat entspricht. Der Überstand des Waschvorgangs (1.Wash) ist in beiden Linien frei von diesen Proteinen. Das eigentliche Präzipitat zeigt in der Zelllinie U-RT1 auf der Höhe von MALT1, BCL10 und CARD9 eine Bande, bei HBL-1 sind lediglich die Proteine MALT1 und BCL10 im Präzipitat enthalten. In der Co-IP mit p65-Antikörper sind in den Proben „Prä-IP“ und „Prä-Wash“ die Proteine MALT1, BCL10 und p65 enthalten. Der Waschüberstand bleibt auch hier frei von Protein, im Präzipitat ist lediglich auf der Höhe von p65 eine Bande zu detektieren. Dies bestätigt, dass die in der Co-IP mit BCL10-Antikörper detektierten Banden bei 92kDa und 32kDa spezifische Bindungen an die Proteine MALT1 und BCL10 darstellen.

Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass in U-RT1 die Proteine CARD9, BCL10 und MALT1 einen Komplex bilden, in HBL-1 jedoch CARD9 an der Komplexbildung nicht beteiligt ist bzw. nicht exprimiert wird.

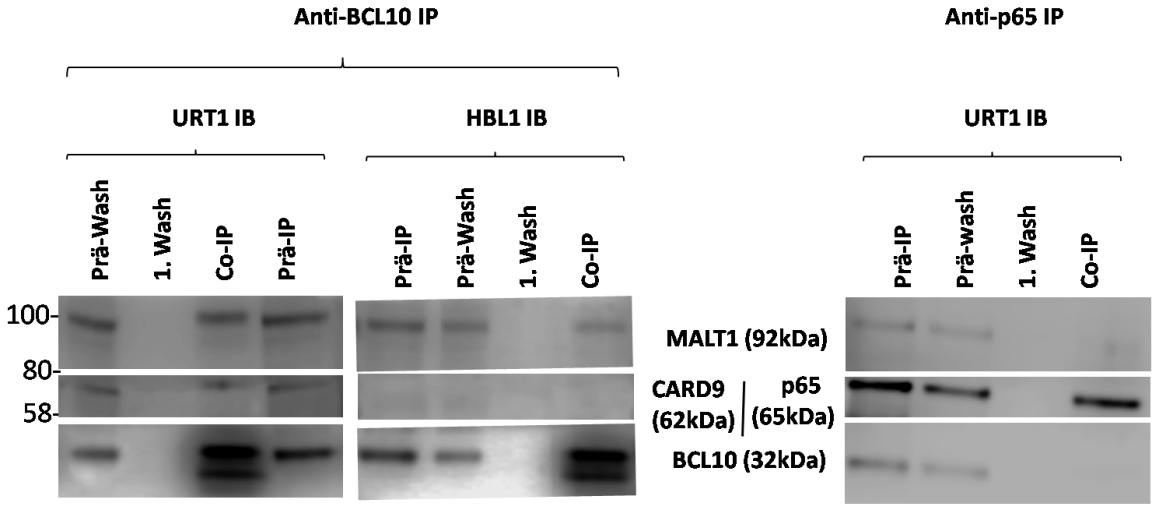

Abbildung 11: Co-Immunopräzipitation (IP) mittels BCL10 Antikörper (links: U-RT1 und HBL-1) und p65-Antikörper (rechts, U-RT1). Immunodetektion (Immunoblot, IB) der Proteine MALT1, CARD9 (links), p65 (rechts) und BCL10 zeigen eine Kopurifikation von MALT1, BCL10 und CARD9 in U-RT1 und eine Kopurifikation von MALT1 und BCL10 in HBL-1 (links). Keine Kopurifikation von MALT1 oder BCL10 mit p65 (rechts). Adaptiert nach [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

3.5. UNTERSUCHUNG DER NF-κB AKTIVITÄT IN U-RT1

Western Blot Analyse von phospho-IκB und phospho-IKK

Als Indikator für einen aktiven NF-κB Signalweg einer Zelle kann die Menge an aktiver, phosphorylierter IKK und phosphoryliertem IκB herangezogen werden. Im Western Blot für phospho-IKK zeigt sich in der U-RT1 und in den ABC DLBCL Zelllinien HBL-1, OCI-Ly3 und OCI-Ly10 eine Bande, wohingegen bei den GCB DLBCL Zelllinien SUDHL4 und SUDHL6 keine oder nur eine sehr schwache Bande zu detektieren ist. Betrachtet man das Substrat von IKK, IκB, zeigt sich das gleiche Bild. U-RT1, HBL-1, OCI-Ly3 und OCI-Ly10 weisen phosphorylierten IκB auf, bei den GCB DLBCL Zelllinien OCI-Ly7, SUDHL4 und SUDHL6 fehlt diese Bande (Abbildung 12). Daraus folgt, dass die U-RT1 und die ABC DLBCL Zelllinien über einen konstitutiv aktiven NF-κB Signalweg verfügen, die getesteten GCB DLBCL Zelllinien hingegen nicht oder nur sehr schwach.

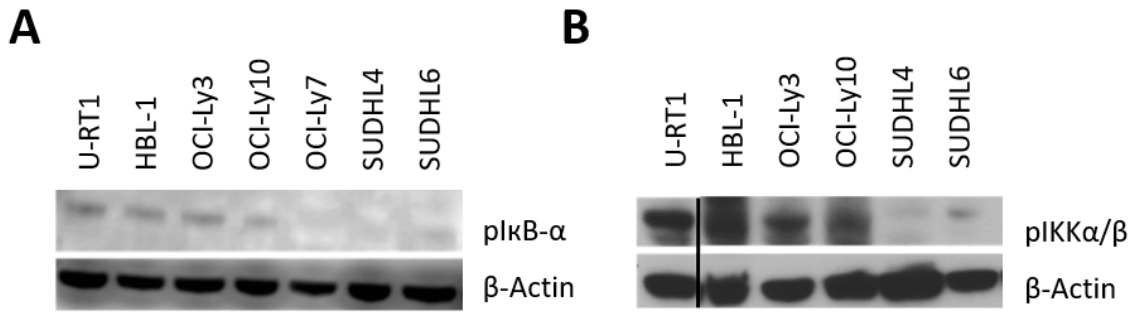

Abbildung 12: Western Blot Analyse von phosphorylierter IKK (A) und phosphoryliertem IκB (B) in den angegeben Zelllinien. U-RT1 sowie die ABC DLBCL Zelllinien HBL-1, OCI-Ly3 und OCI-Ly10 zeigen sowohl phosphorylierte IKK als auch phosphorylierten IκB, wohingegen die GCB DLBCL Zelllinien SUDHL4 und SUDHL6 nur schwache Banden bei pospho-IKK und keine Banden bei phospho-IκB zeigen. Als Ladekontrolle diente β-Actin. Veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

<u>Behandlung mit dem NFκB Inhibitor BAY11-7082</u>

Um Rückschlüsse auf einen aktiven NF-κB Signalweg zu ziehen, wurden Zellen von U-RT1, HBL-1 und SUDHL4 für 24h mit Bay11-7082 behandelt und anschließend die Zellviabilität mittels MTT Assay bestimmt. Alle drei Zelllininen zeigen ein Rückgang der Zellviabilität

nach 24h NF-κB Inhibition, wobei die Zellen von U-RT1 am vulnerabelsten waren (EC50=0.550 µM). Die GCB DLBCL Zelllinie SUDHL4 war gegenüber der Inhibition am resistentesten (EC50=1.284 µM) (Abbildung 13).

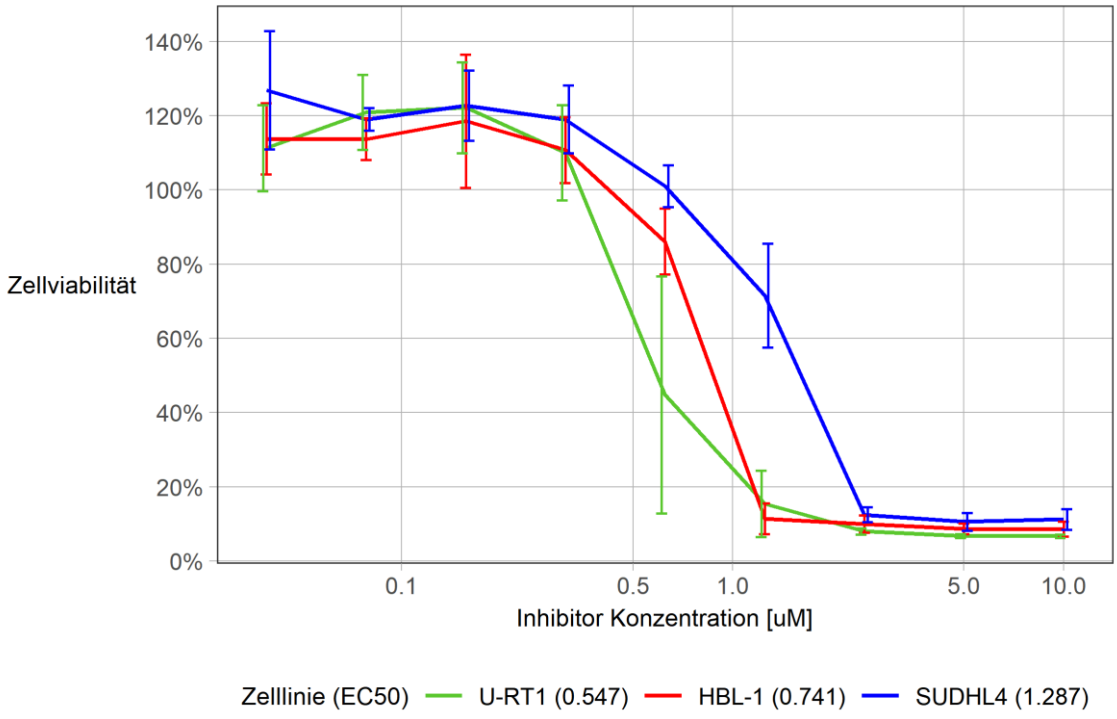

Abbildung 13: MTT Assay nach 24h NF-κB Inhibition mittels BAY11-7082 der Zelllinien U-RT1 (RS), HBL-1 (ABC DLBCL) und SUDHL4 (GCB DLBLCL). Dargestellt sind Mittelwerte der Viabilität aus drei unabhängigen Versuchen aufgetragen gegen ansteigende Inhibitorkonzentrationen mit Angabe des Standardfehlers, sowie in Klammern hinter die Zelllinien-Bezeichnung der aus den zugrundeliegenden Daten ermittelte EC50-Wert. Veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

3.6. siRNA-Knockdown von *CARD9* in U-RT1

Bestimmung der Transfektionseffizienz von siRNA in U-RT1

Um die Effizienz der Transfektion mittels Elektroporation zu bestimmen wurde eine siRNA verwendet, welche mit einem Alexa488-Fluorophor gekoppelt ist. Die Transfektion wurde wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben durchgeführt und die Zellen 24 Stunden später durchflusszytometrisch analysiert.

Abbildung 14 zeigt die so gewonnen Daten, ausgewertet mittels Flowing Software. Es wurde jeweils ein Gate um die vitalen Zellen gesetzt (Bilder A bis C). Hier ist zu erkennen, dass die gänzlich unbehandelte Kontrolle deutlich weniger tote Zellen und Zellfragmente beinhaltet als die elektroporierten Zellen. Die mit MOCK siRNA behandelten Zellen unterscheiden sich im FSC und SSC nicht von den mit CARD9 siRNA transfizierten Zellen. Im Kanal FL1 (Bilder D bis F), in welchem Alexa488 detektiert wird, zeigt sich im Histogramm H-2 eine Verschiebung in der Intensität zwischen den beiden Gruppen. Während es sich bei dem FL1-Peak der MOCK-Kontrolle fast ausschließlich um Autofluoreszenz handelt, stellen die Zellen innerhalb des Gates H-2 im Bild E jene Zellen dar, welche erfolgreich mit Alexa488-siRNA transfiziert wurden. Das Overlay-Histogramm von D und E (Bild F) veranschaulicht die Verschiebung nach rechts auf der X-Achse. Der Anteil der erfolgreich transfizierten Zellen, gemessen an der Gesamtheit der transfizierten lebenden Zellen pro Probe beträgt nach dieser Messung knapp 35%. Betrachtet man ausschließlich die im Gate H-2 ausgewählten fluoreszierenden Zellen erneut im FSC/SSC (Bilder G und H), so ist zu sehen, dass es sich bei der MOCK-Kontrolle (Bild G) bei den wenigen grün-positiven Zellen am ehesten um tote Zellen und Zellfragmente handelt, wohingegen in Bild H der Anteil H-2 aus E eine vitale Zellpopulation enthält.

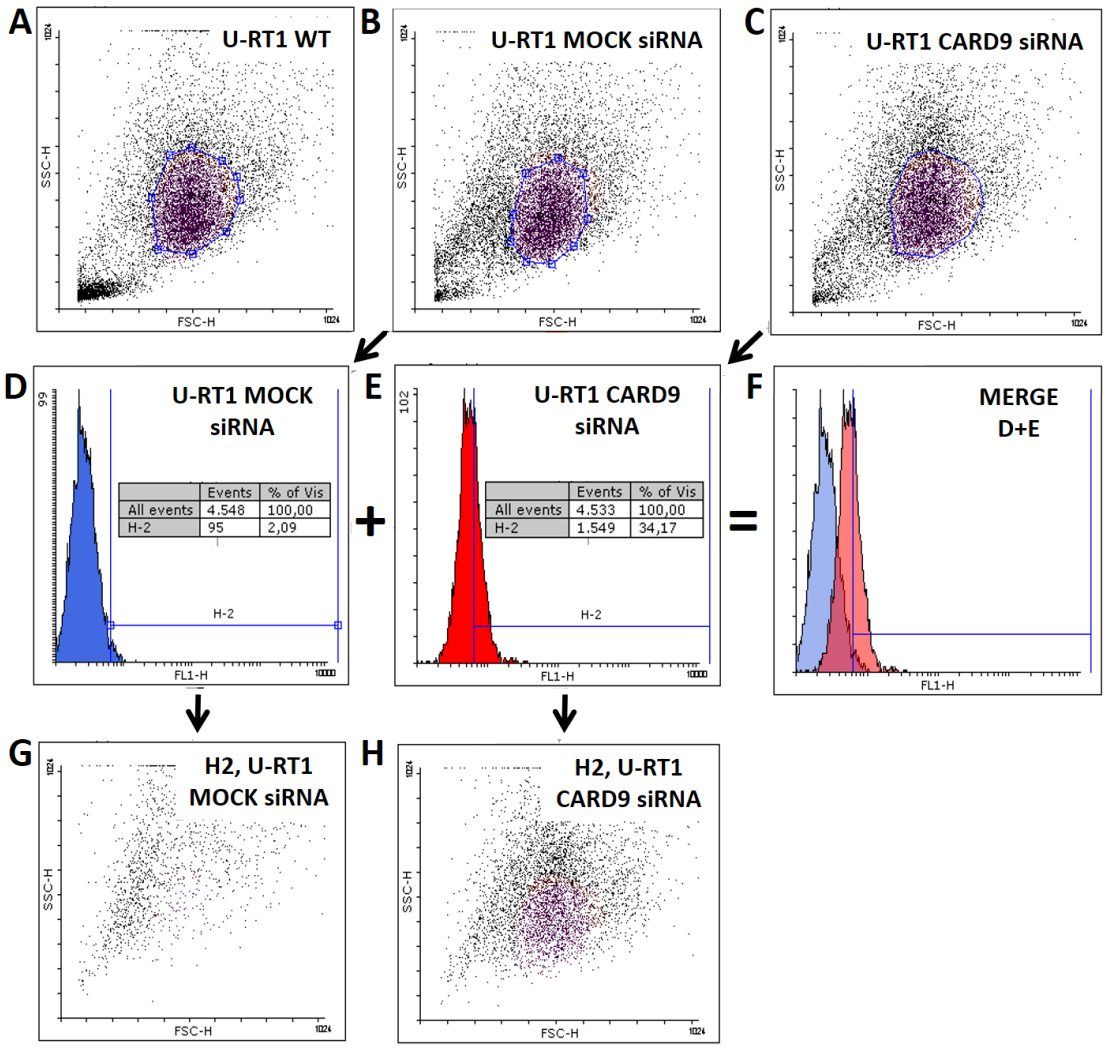

Abbildung 14: Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Alexa488-gekoppelter siRNA. (A) unbehandelte Zellen der U-RT1 (U-RT1 WT) im FSC/SSC. (B) MOCK siRNA behandelte Zellen im FSC/SSC. (C) mit Alexa488 gekoppelter CARD9 siRNA im FSC/SSC. (D) FL1-Kanal der vitalen Zellen aus B im Histogramm. E FL1-Kanal der vitalen Zellen aus C im Histogramm. (F) Overlay-Histogramm der Histogramme D und E. (F) FSC/SSC der Zellen aus Gate H-2 aus C. (G) FSC/SSC der Zellen aus Gate H-2 aus D. Pro Probe wurden $1x10^5$ Zellen ausgezählt.

Auswirkung des Knockdowns von CARD9 auf die Proliferationsaktivität von U-RT1

Um zu überprüfen ob die Expression von *CARD9* in der Zelllinie U-RT1 zur Proliferationsaktivität beiträgt wurde ein Knockdown von *CARD9* mittels Elektroporation von siRNA durchgeführt und die so behandelten Zellen anschließend einem MTT Proliferationstest zugeführt. Um parallel das Ausmaß des Knockdowns zu ermitteln, wurde

aus derselben Zellsuspension Gesamtprotein isoliert und ein CARD9 Immunoblot angefertigt. In Vorversuchen wurden zuvor die optimalen Bedingungen bezüglich siRNA-Konzentration und Inkubationszeit ermittelt. Der stärkste Knockdown ergab sich bei einer siRNA Konzentration von 50 nM (5 pmol in 100 µl Transfektionsansatz) und einer Inkubationszeit von 24 Stunden nach Transfektion. Abbildung 15A zeigt einen repräsentativen Western Blot mit und ohne CARD9 siRNA Behandlung. Dieser Versuch wurde 4fach durchgeführt, die Banden densitometrisch ausgewertet und die Werte von CARD9 auf β-Actin normalisiert. Im Mittel ergab sich in den mit CARD9 siRNA transfizierten Zellen ein Protein-Knockdown auf 72% verglichen mit den MOCK si-RNA transfizierten Zellen.

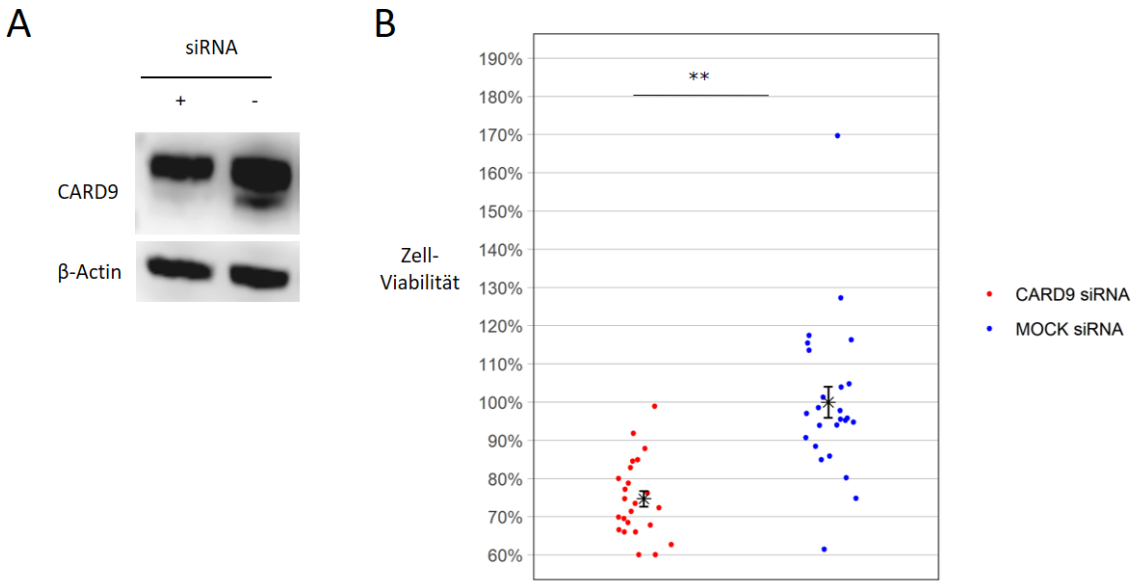

Abbildung 15: (A) Western Blot Analyse von CARD9 24h nach Transfektion mit 5 pmol *CARD9* siRNA bzw. scrambled siRNA (MOCK). Als Ladekontrolle diente β-Actin. (B) Viabilitätsmessung mittels MTT Assay mit der Zelllinie U-RT1 24h nach Transfektion von *CARD9* siRNA (rot) und MOCK siRNA (Negativkontrolle, blau). Jeder Punkt stellt eine Einzelmessung dar, Mittelwert und Standardfehler sind in schwarz dargestellt. Die Werte wurden auf den Mittelwert der Kontrollgruppe normalisiert. Der p-Wert wurde mit dem gepaarten t-Test berechnet. **: $p<0.01$. Veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

In Abbildung 15B sind die Ergebnisse aller MTT Einzelversuche mit und ohne *CARD9* siRNA Knockdown zusammengefasst dargestellt. Die Werte wurden auf den Mittelwert der Kontrollgruppe normalisiert. Es zeigt sich ein signifikanter Rückgang der Proliferation der

Zelllinie U-RT1 24 Stunden nach *CARD9* knockdown (gepaarter t-Test: p=0.0019). Der Mittelwert der Unterschiede beider Vergleichsgruppen beträgt -24.9% (Konfidenz-intervall [-34.4%; -15.5%]), d.h. eine Reduktion der Proteinmengen von CARD9 auf ca. 72% in U-RT1 führt zu einem Proliferationsrückgang auf ca. 75% verglichen mit der Kontrollgruppe.

MALT1 Aktivität im Western Blot nach *CARD9* Knockdown

Eine aktive MALT1 Paracaspase spaltet CYLD in zwei Fragmente, ein C-terminales 70 kDa großes Fragment (CYLD-CT) und ein N-terminales 40 kDa großes Fragment. Diese Fragmente können im Western Blot detektiert und anhand der Bandenstärke auf den Grad der MALT1 Aktivität geschlossen werden. Um herauszufinden, ob in U-RT1 die MALT1-Aktivität von CARD9 abhängig ist, wurde 24 Stunden nach *CARD9* siRNA Knockdown Gesamtprotein isoliert und mittels Western Blot Analyse die Menge an CARD9, CYLD und CYLD-CT bestimmt. Dabei zeigen sich in den Knockdown-Zellen bei einem leichten Rückgang des CARD9 Proteinlevels ein signifikanter Rückgang des C-terminalen Spaltprodukts von CYLD (p=0.017, N=4). Die Basisexpression des ungespaltenen CYLD hingehen bleibt in beiden Vergleichsgruppen gleich (Abbildung 16A)

Ein weiteres Substrat von MALT1 ist A20 (*TNFaip3*). Dieses wird durch MALT1 an mehreren Stellen in verschieden große Fragmente gespalten. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper bindet A20 am N-terminalen Ende, insofern können damit auch nur Fragmente detektiert werden, welche dieses Ende nicht verloren haben. Dies sind je ein Fragment mit 50 kDa, 55 kDa und 75 kDa Länge. In Abbildung 16B ist der A20 Western Blot mit und ohne siRNA Knockdown von *CARD9* abgebildet. Auf der Höhe der jeweils zu erwartenden Proteingewichte der Spaltprodukte finden sich bei 75 kDa eine schwache Bande, sowie um 50kDa zwei Banden. Insgesamt sind die Banden sehr schwach ausgebildet, sodass eine Beurteilung hinsichtlich Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nicht gelingt.

Neben CYLD und A20 wird auch RelB durch MALT1 gespalten. Hierbei entsteht ein nur leicht verkürztes Protein, welches im Western Blot knapp unter dem ungespaltenen RelB detektierbar ist. Abbildung 17 zeigt alle drei Western Blot Ergebnisse für RelB mit und ohne CARD9 Knockdown. In der ersten durchgeführten Wiederholung n#1 erscheint das RelB Spaltprodukt nach *CARD9* knockdown leicht reduziert gegenüber der Kontrolle, in n#2 zeigt

sich ein ähnliches Bild mit insgesamt schwächeren Banden, in einem dritten Versuch n#3 ist die Bande des RelB Spaltprodukts jedoch in den MOCK-transfizierten Zellen etwas stärker. Insofern ist anhand dieser Ergebnisse keine Aussage hinsichtlich Unterschiede im Ausmaß der RelB Spaltung mit oder ohne *CARD9* Knockdown zu machen.

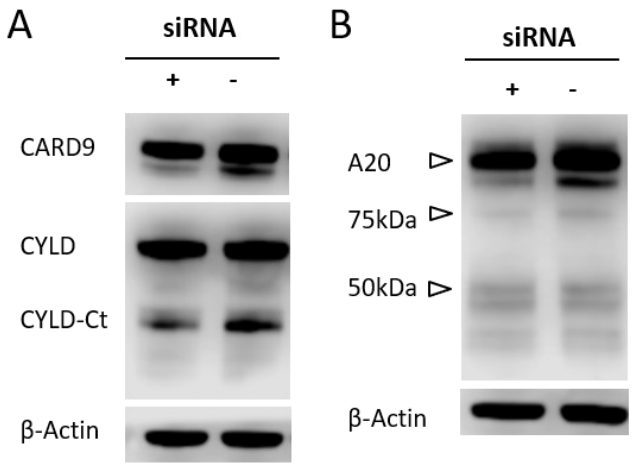

Abbildung 16: Western Blot von CARD9, CYLD und CYLD CT Spaltprodukt (A), A20 (B) und CARD9 nach Transfektion mit CARD9 siRNA (+) bzw. scrambled siRNA (-). Als Ladekontrolle diente β-Actin. Es zeigt sich eine signifikante Herunterregulation von Ct-CYLD Spaltprodukt nach Behandlung mit CARD9 siRNA (N=4). Die verschiedenen A20 Spaltprodukte zeigen nur sehr schwache Banden (B). (A) veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

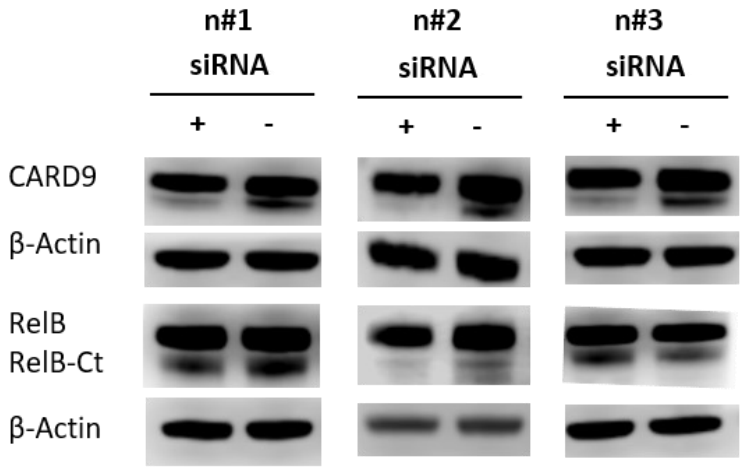

Abbildung 17: Drei Wiederholungen (n#1, n#2, n#3) eines Western Blots von CARD9 und RelB mit und ohne siRNA knockdown von CARD9. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Gezeigt sind alle drei durchgeführten Wiederholungen, da sich ein differentes Bild hinsichtlich des Ausmaßes an RelB-Ct Spaltprodukt ergibt. In

n#1 und n#2 erscheint das RelB-Ct leicht verringert in den CARD9 knockdown Zellen, in n#3 erscheint es jedoch gesteigert.

3.7. *CARD9* EXPRESSION IM GEWEBE

Um mehr über die Expression von *CARD9* im Gewebe herauszufinden, wurden immunhistochemische Färbungen sowohl an gesundem Gewebe, am Ursprungsgewebe der Zelllinie U-RT1 als auch an Kollektiven von RS, DLBCL, cHL und CLL durchgeführt.

3.7.1. CARD9 IMMUNHISTOCHEMIE IN GESUNDEM GEWEBE

Die Expression von *CARD9* ist in myeloischen Zellen der angeborenen Immunantwort beschrieben, z.B. in dendritischen Zellen und Makrophagen. In der Haut werden Langerhans-Zellen angefärbt, in lymphatischem Gewebe u.a. interdigitierende dendritische Zellen und Keimzentrumsmakrophagen. Abbildung 18A zeigt eine Färbung von CARD9 in gesunder Haut. Es sind CARD9 positive Langerhans-Zellen in der Epidermis sowie dermale dendritische Zellen mit den typischen fingerförmigen Zytoplasma-Fortsätzen zu erkennen.

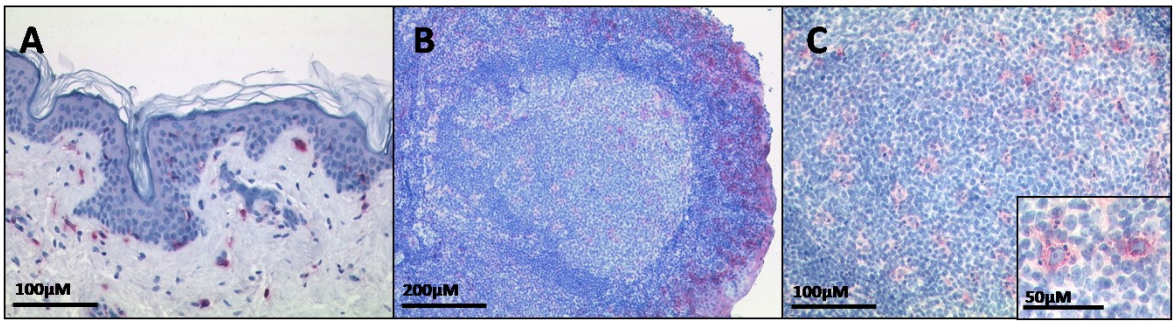

Abbildung 18: Immunuhistologie mit CARD9 Antikörper in Haut und Tonsille. Es zeigen sich CARD9 positive dermale dendritische Zellen (A), Dendriten der Mantelzone und T-Zone (B), sowie Keimzentrumsmakrophagen (B und C). Die lymphoiden Zellen zeigen keine Anfärbung. Veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Abbildung 18B und C zeigt dieselbe Färbung an einem reaktiven Follikel. Sowohl dendritische Zellen in der Mantelzone und T-Zone als auch Keimzentrumsmakrophagen

werden durch den CARD9 Antikörper zytoplasmatisch angefärbt. Die lymphoiden Zellen im Keimzentrum zeigen keine CARD9 Positivität.

Die durchgeführten immunhistochemischen Färbungen bestätigen das in der Literatur beschriebene Expressionsmuster von *CARD9* im gesunden Gewebe.

3.7.2. *CARD9* Expression im Ursprungsgewebe der U-RT1

Um zu überprüfen, ob es sich bei der in der Zelllinie U-RT1 gezeigten ungewöhnlich hohen Expression von *CARD9* um ein Artefakt der Zelllinie handeln könnte, wurde das Ursprungsgewebe der Linie immunhistologisch untersucht. Dabei handelt es sich um einen Lymphknoten mit der Manifestation eines RS. In Abbildung 19 (A und B) sind Ausschnitte aus der HE Färbung und der KI67 Färbung dieses Lymphknotens zu sehen. Die Lymphomzellen sind positiv für CD20 (nicht gezeigt) und nehmen fast den gesamten Lymphknoten ein und haben eine hohe Proliferationsrate. Insgesamt ist der Lymphknoten jedoch stark nekrotisch.

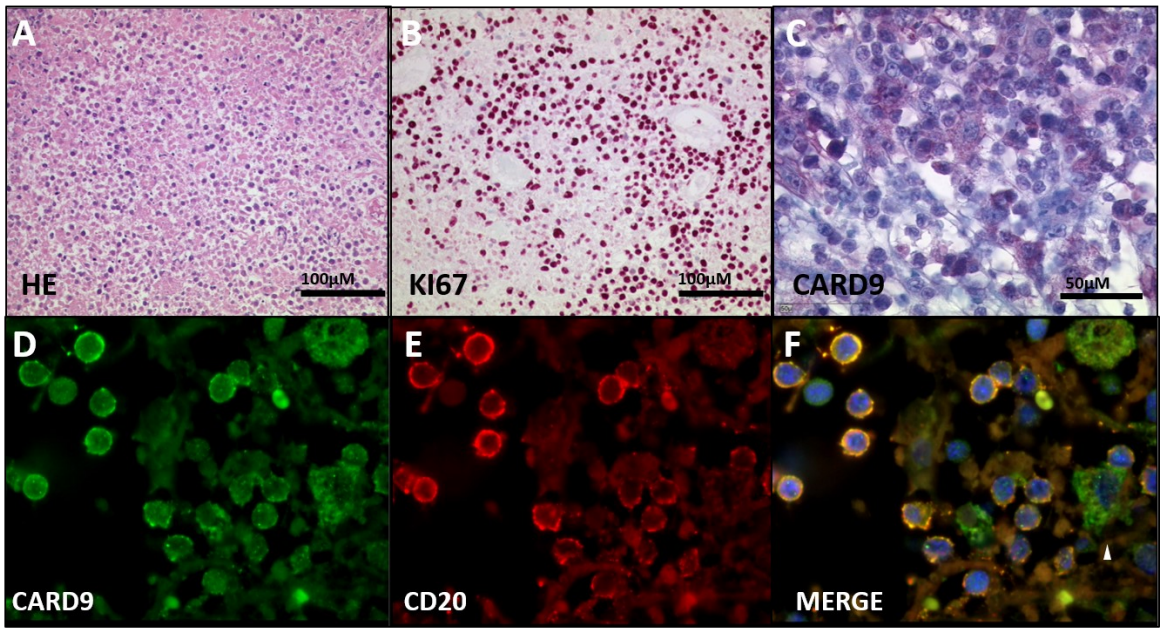

Abbildung 19: Ursprungslymphom der U-RT1. (A) Die HE-Färbung zeigt ausgedehnt nekrotisches Tumorgewebe, welches den Lymphknoten fast vollständig durchsetzt. (B) Die KI67-Färbung deutet auf eine hohe Proliferationsrate des Lymphoms hin. (C) Die vitalen Lymhphomzellen sind überwiegend positiv für

CARD9. (D bis F) zeigt eine Doppelfluoreszenzfärbung dieses Lymphknotens. (D) CARD9 positive (grüne) Zellen sind detektierbar, (E) welche zum Teil auch CD20 exprimieren. (F) In der Überlagerung beider Aufnahmen wird deutlich, dass es sich bei den Zellen mit CARD9/CD20 Kolokalisation um Lymphomzellen und bei den CARD9+/CD20- Zellen um Makrophagen (weiße Pfeilspitze) handelt. (C-F) veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Abbildung 19C zeigt die Färbung mit einem CARD9 Antikörper. Der größte Teil der Zellen erscheint positiv, dennoch ist es aufgrund der schlechten Qualität des Gewebes schwer zu beurteilen, ob es sich bei den angefärbten Zellen tatsächlich um maligne B-Zellen oder um ein myeloisches Begleitinfiltrat handelt. Es wurde deshalb eine Doppelimmunfluoreszenz von demselben Gewebe angefertigt. In Abbildung 19D bis E sind die Kanäle rot und grün einzeln, sowie die Überlagerung inklusive DAPI-Kernfärbung dargestellt. Es sind einige große Zellen erkennbar, welche zwar *CARD9* exprimieren, jedoch kein CD20 (weiße Pfeilspitze). Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Makrophagen. Die meisten anderen Zellen zeigen hingegen eine Kolokalisation von CARD9 und CD20. Aufgrund des geringen Zytoplasmaanteils der blastären B-Zellen sind die zytoplasmatische Färbung von CARD9 und die Oberflächenfärbung von CD20 örtlich kaum voneinander zu trennen. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass im Ursprungsgewebe der U-RT1 die Lymphomzellen *CARD9* exprimieren.

3.7.3. *CARD9* Expression in einem Kollektiv von 15 Fällen mit RS

Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universtität Ulm wurde ein FFPE-Kollektiv aus 15 Fällen mit RS erstellt. Es wurde darauf geachtet, dass von allen eingeschlossenen Fällen ausreichend und gut beurteilbares Material vorhanden war. Alle Proben stammen aus Patienten, bei denen nach der Erstdiagnose einer CLL zusätzlich ein DLBCL entstanden war und nach WHO-Kriterien eine Richter Transformation vorliegt. Von allen Fällen wurden eine HE-Färbung und immunhistologische Färbungen von CD20 und CARD9 angefertigt. In den Abbildung 20 bis Abbildung 22 sind repräsentative Färbungen aus dem Kollektiv abgebildet. Abbildung 20 zeigt Ausschnitte einer Knochenmarkbiopsie. In dieser Knochenmarkbiopsie ist sowohl die CLL als auch das aus der CLL entstandene DLBCL vorhanden. In den HE-Schnitten (A und G) ist die typische großzellige, blastäre Morphologie des RS erkennbar, wohingegen die CLL aus kleinzelligen, monomorphen

Zellen besteht. Die CD20-Färbungen (B und H) bestätigen, dass es sich um eine B-Zell-Neoplasie handelt, in der KI67 Färbung (D und J) zeigt die CLL eine niedrige und das RS eine hohe Proliferationsrate. Die Zellen des RS sind positiv für CARD9 (K und L), in der höheren Vergrößerung ist ein feingranuläres, zytoplasmatisches Expressionsmuster erkennbar. Die Zellen der CLL in demselben Biopsat bleiben für CARD9 negativ (E und F). In der Chloracetatesterasefärbung (CAE) markiert sich die ortsständige Population der myloischen Zellen im Knochenmark.

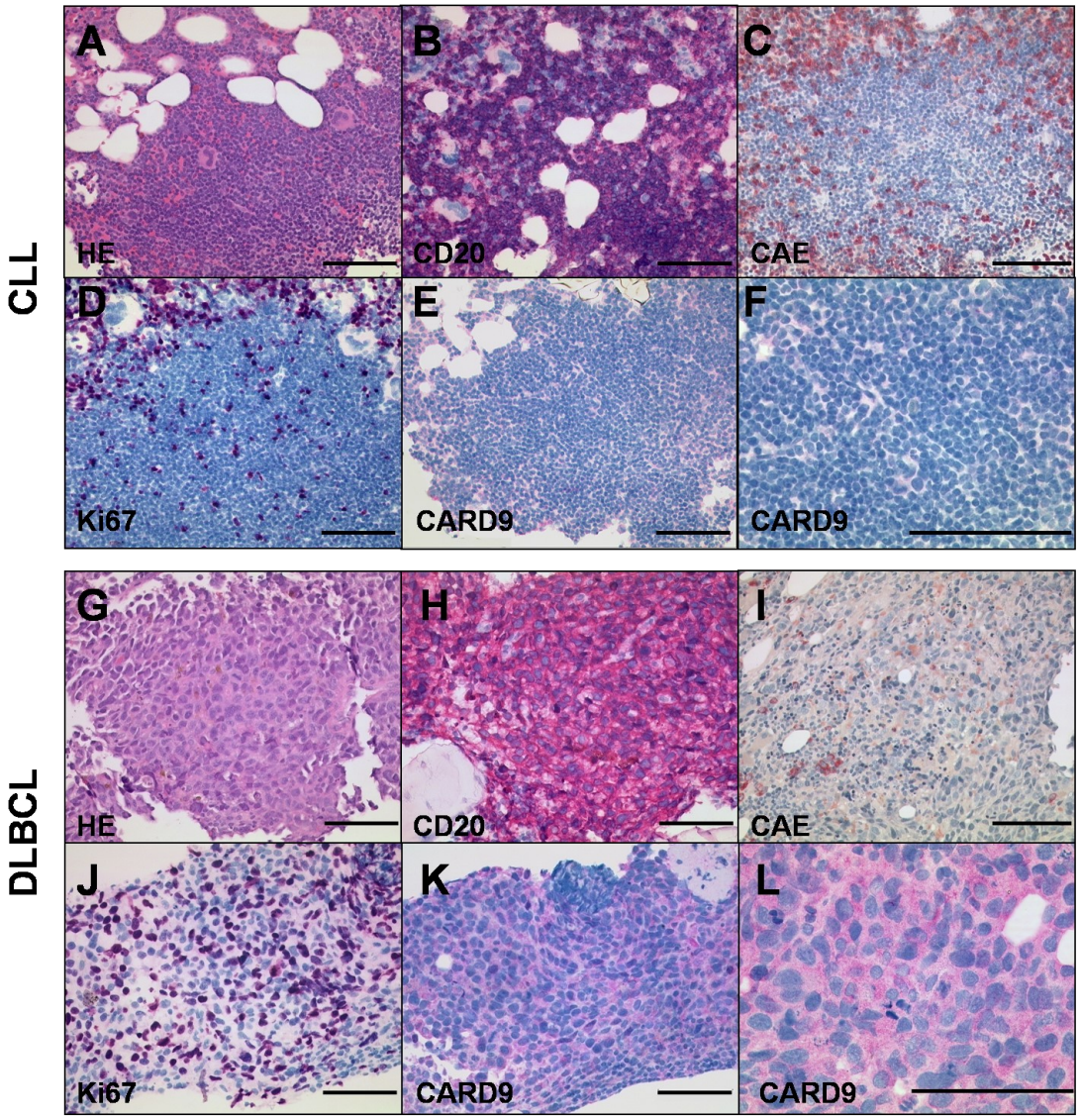

Abbildung 20: Knochenmarkbiopsie eines Patienten mit CLL (A bis F) und Richter Syndrom (G bis L) in demselben Biopsat. Gezeigt sind HE Färbungen von CLL und RS (A und G), in der CD20 Färbung markiert sich jeweils die neoplastische Population (B, H). Die CLL zeigt im Vergleich zu dem RS eine niedrige Proliferationsrate (KI67; D, J). In der Chloracetatfärbung (CAE) markieren sich die ortsständigen myeloischen

Zellen des Knochenmarks. In der CARD9 Färbung (E und F, K und L) bleibt die CLL negativ, während die Zellen des RS eine zytoplasmatische Expression aufweisen. Der Größenbalken misst eine Länge von 100µm. Adaptiert nach [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Abbildung 21 zeigt Färbungen eines Hals-Lymphknotens mit einem RS. Die HE und die CD20 Färbung zeigen eine typische DLBCL Morphologie. Die CARD9 Färbung zeigt auch hier eindeutig positive, maligne B-Zellen.

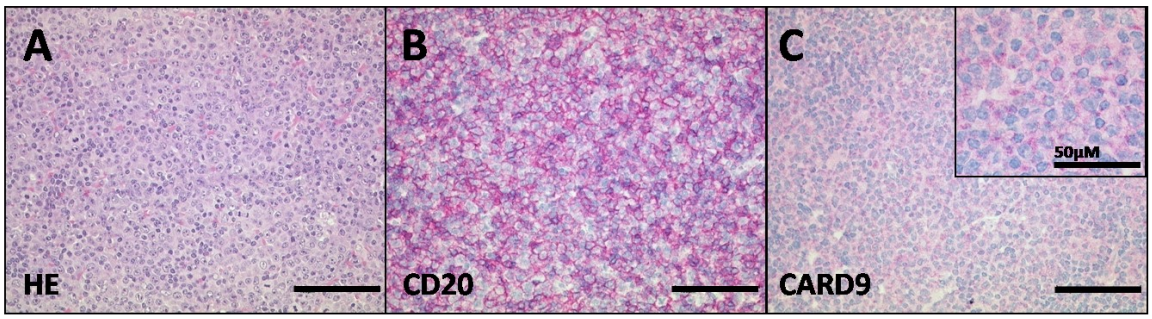

Abbildung 21: Halslymphknoten mit RS. HE und CD20 zeigen CD20 positive, großzellige, neoplastische B-Zellen, welche in der CARD9 Färbung (zwei verschiedene Vergrößerungen) überwiegend positiv sind. Der Größenbalken misst eine Länge von 100µm (Ausnahme C Vergrößerung). Veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Ein weiterer Fall des Kollektivs ist in Abbildung 22 dargestellt. Von diesem Patienten des Kollektivs liegen sowohl ein Knochenmarkbiopsat der CLL zwei Jahre vor der Diagnose des RS vor, als auch jener Lymphknoten mit DLBCL, welcher zu der Diagnosestellung des RS führte. Bei dieser CLL lagen zwei Jahre vor Entwicklung des DLBCL schon kleine blastäre Quellherde vor, die Kriterien eines Richter Syndroms waren jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfüllt. In Abbildung 22A und B sind die HE-Färbung und die CD20 Färbung eines CLL Areals mit blastären Quellherden abgebildet, C zeigt die Färbung der CLL mit dem CARD9 Antikörper. Hier sind vereinzelt CARD9-positive Zellen zu sehen, bei denen es sich um blastäre Tumorzellen handeln könnte. In D bis F sind analog dazu die Färbungen des Lymphknotens mit dem aus dieser CLL entstandenen RS dargestellt. Die CARD9-Färbung fällt hier positiv aus.

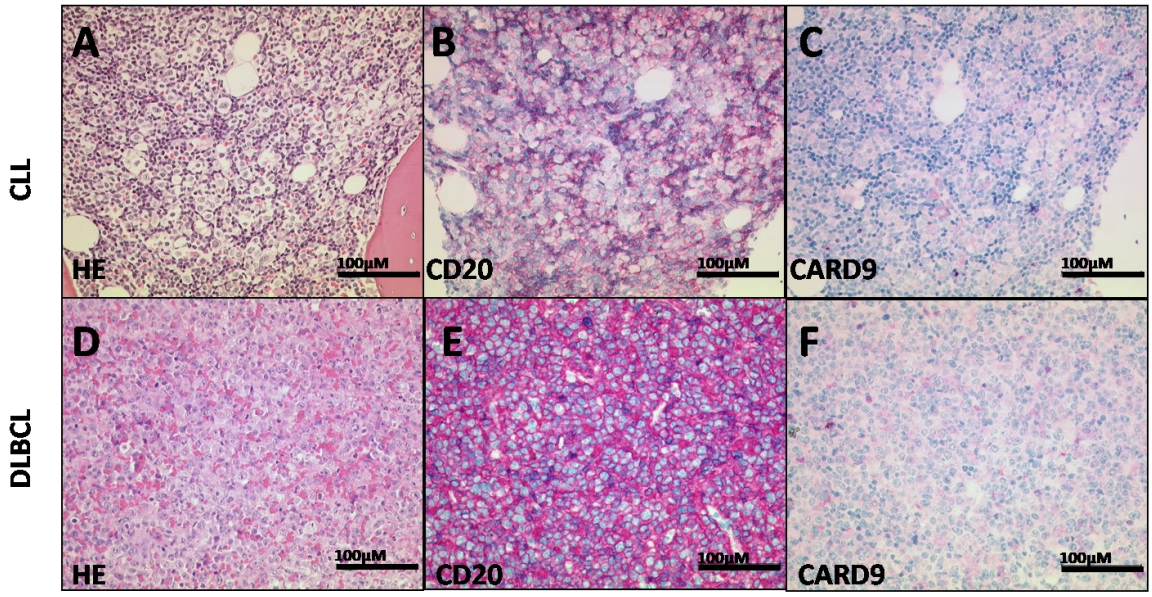

Abbildung 22: Färbungen aus zwei unterschiedlichen Gewebeproben eines Patienten mit CLL (Knochenmarkbiopsie, oben) und DLBCL (Lymphknoten, unten). (A) HE-Färbung eines blastären Quellherdes in der CLL; (B+C) CD20- und CARD9 Färbung desselben Areals. (D) HE-Färbung des Lymphknotens mit RS, (E+F) CD20- und CARD9 Färbung desselben Lymphknotens.

CARD9 Expression im Kontext mit klinisch-biologischen Parameter im RS Kollektiv

Aus der SAP-Klinikdatenbank ist zu entnehmen, dass bei den meisten der untersuchten RS Patienten mindestens eine CLL im Stadium B nach Binet vorlag, keine der getesteten CLL mutierte *IGHV* zeigte und in vier von fünf Fällen mit vorliegenden Informationen über den genetischen Hintergrund der CLL mit einer 17p13 Deletion eine Hochrisiko-Konstellation vorlag. Alle RS DLBCL sind bis auf eine Ausnahme vom prognostisch ungünstigeren ABC DLBCL Subtyp. Diese aufgelisteten Eigenschaften sprechen dafür, dass die im Kollektiv eingeschlossenen Fälle das klassische Bild des RS sehr gut repräsentieren.

Tabelle 16 zeigt eine Zusammenfassung einiger der erhobenen Parameter innerhalb des RS-Kollektivs. Von den 15 untersuchten Fällen zeigen acht Fälle eine *CARD9*-Expression. Bei drei dieser Fälle konnte auch die dazugehörige CLL getestet werden, wobei alle drei CLL Fälle keine Expression von *CARD9* aufwiesen. Ausgenommen sind hier die schon beschriebenen, blastären Quellherde der CLL aus Abbildung 22. Auch von zwei der CARD9 negativen Fällen lag Material der dazugehörigen CLL vor, diese waren auch negativ für CARD9.

Vergleicht man die Gruppe der CARD9 positiven Fälle mit der Gruppe der CARD9 negativen Fälle, fällt eine im Durschnitt längere Latenz von Diagnosestellung der CLL bis zur Diagnose RS auf. Im Mittel 11.5 Jahre bis zum Transformationsereignis bei CARD9 positiven RS Fällen, die CARD9 negativen RS traten im Schnitt schon knapp 5 Jahre nach CLL Diagnosestellung auf. Um zu untersuchen, inwieweit die Art der CLL-Behandlung für die *CARD9* Expression eine Rolle spielt wurde untersucht, wie vielen Chemotherapie Behandlungszyklen sich die Patienten vor RS schon unterzogen hatten und ob mit neuen Wirkstoffen wie den Kinaseinhibitoren Ibrutinib oder Idealisib oder dem BCL2-Inhibitor ABT-199 behandelt wurde. Dabei zeigt sich, dass fast alle Fälle des Kollektivs von welchen klinischen Daten bezüglich des Behandlungsschemas vorlagen mit mehreren verschiedenen Zyklen und Wirkstoffkombinationen behandelt wurden. Betrachtet man die beiden Vergleichsgruppen (CARD9+/-) bezüglich der Behandlung mit neuen Therapien, so zeigt sich bei den Fällen mit vorhandenen klinischen Daten, dass allen vier RS Fällen mit vorliegender Patientenhistorie mit CARD9 Positivität entweder eine Behandlung mit Ibrutinib oder ABT-199 vorausging. Bei den CARD9 negativen Fällen beträgt dieser Anteil nur 50% (drei von sechs Fällen). Betrachtet man die Überlebenszeit nach RS Diagnosestellung, zeigt sich bei den CARD9 positiven RS ein medianes Überleben von 3.96 Monaten, bei den RS negativen RS ein medianes Überleben von 3.55 Monaten. Dies lässt vermuten, dass die Expression von *CARD9* in RS nicht mit der Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert. Abbildung 23 zeigt Überlebenswahrscheinlich-keiten mit RS in Abhängigkeit der *CARD9* Expression als Kaplan-Meier Kurve. Da hier jedoch aufgrund fehlender klinischer Daten nur elf Fälle ausgewertet werden konnten, sind diese Ergebnisse nur sehr eingeschränkt aussagekräftig.

Tabelle 16: Erhobene Daten innerhalb des RS Kollektivs bezüglich CARD9 Expression, Art der Behandlung, zeitlichem Verlauf der Erkrankung und immunhistochemischen Eigenschaften der Lymphome. n.a.: not assessed/nicht erhoben; * markieren zensierte Beobachtungen zum Zeitpunkt des letzten Patientenkontakts. Nach [77].

Patient	CARD9	Alter bei CLL Diagnose	Alter bei RS Diagnose	Überlebenszeit nach RS Diagnose	Binet Stadium	Ibrutinib Behandlung	ABT-199 Behandlung	Behandlungszykken	DLBCL Subtyp
RS1	positiv	59	77	17.08*	C	ja	n.a.	n.a.	ABC DLBCL
RS2		n.a.	n.a.	20.07*	n.a.	n.a.	n.a.	>1	ABC DLBCL
RS3		58	71	3,96	B	ja	n.a.	n.a.	ABC DLBCL
RS4		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	>1	n.a.
RS5		54	63	1.28	B	nein	ja	n.a.	n.a.
RS6		60	66	0.85	B	nein	ja	n.a.	ABC DLBCL
RS7		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	>1	n.a.
RS8		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
RS9	negativ	61	65	4.76	B	nein	ja	n.a.	GCB DLBCL
RS10		67	73	0.96	n.a.	ja	ja	>1	n.a.
RS11		52	58	2.07	n.a.	nein	n.a.	n.a.	ABC DLBCL
RS12		69	73	2.33	A	nein	n.a.	>1	ABC DLBCL
RS13		84	84	28.29	n.a.	nein	n.a.	>1	n.a.
RS14		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	>1	n.a.
RS15		63	65	9.07*	C	ja	ja	>1	ABC DLBCL

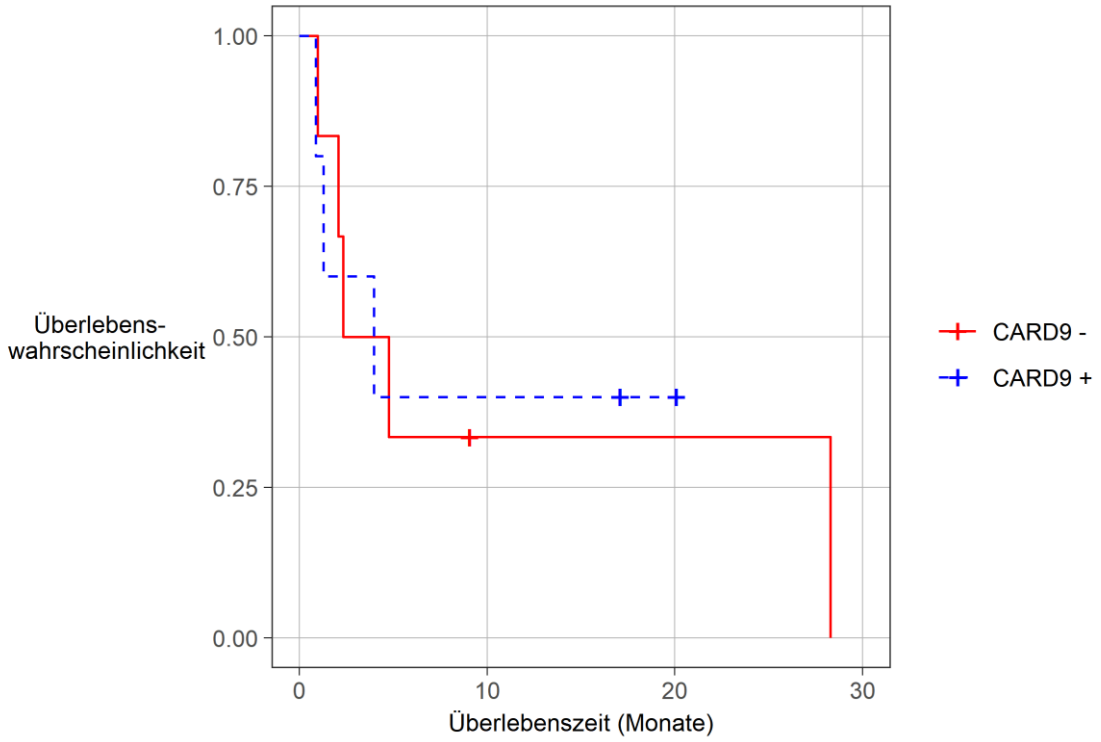

Abbildung 23: Kaplan-Meier Kurve von elf RS Fällen, stratifiziert nach *CARD9* Expression zeigt im untersuchten RS Kollektiv keinen Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit hinsichtlich der Expression von *CARD9*. Symbole (+) markieren zensierte Beobachtungen zum Zeitpunkt des letzten Patientenkontakts.

3.7.4. *CARD9* Expression in einem Kollektiv von DLBCL, cHL und CLL Fällen

Neben dem Kollektiv von RS Fällen wurde ein Kollektiv aus zehn *de novo* DLBCL sowie ein Kollektiv aus 17 Fällen mit DLBCL, welche aus anderen B-Zell Neoplasien als der CLL transformiert waren, untersucht. Darunter waren elf DLBCL aus follikulären Lymphomen entstanden, fünf DLBCL aus lymphoplasmazytischen Lymphomen und ein DLBCL aus einem Mantelzelllymphom.

Da das RS auch solche Fälle einschließt, bei denen aus einer CLL ein klassisches Hodgkin Lymphom entsteht, wurden auch 26 klassische Hodgkin Lymphom Fälle hinsichtlich ihres CARD9 Status untersucht. Eine Übersicht über das gesamte Kollektiv der aggressiven Lymphome inklusive dem RS Kollektiv gibt Abbildung 26.

CARD9 in *de novo* DLBCL

Von den 10 untersuchten *de novo* DLBCL zeigte lediglich ein Lymphom eine fokal schwache zytoplasmatische Anfärbung für CARD9. Alle anderen Fälle waren CARD9 negativ. In Abbildung 24 ist die CARD9 Färbung eines CARD9 negativen DLBCL dargestellt. Bei den CARD9 positiven Zellen handelt es sich hier um ein myeloisches Begleit-Infiltrat, welche in höhere Vergrößerung morphologisch von den Tumorzellen abzugrenzen ist. Es handelt sich am ehesten um dendritische Zellen. Die Gruppe der getesteten *de novo* DLBCL bestand aus fünf ABC DLBCL, vier GCB DLBCL und einem Fall, welcher nicht nach dem Hans-Algorithmus klassifiziert wurde.

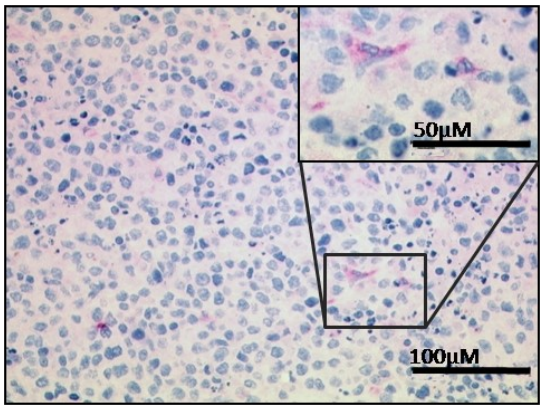

Abbildung 24: CARD9 Färbung eines Lymphknotens mit einem *de novo* DLBCL. Die blastären Tumorzellen sind negativ, während das dendritische Begleitinfiltrat angefärbt wird.

CARD9 in cHL

Es wurden 26 cHL Fälle untersucht, darunter sechs Fälle vom lymphozyten-reichen Subtyp, zwei Fälle vom lymphozyten-depletierten Subtyp, acht Fälle vom Mischtyp und zehn Fälle mit nodulärer Sklerose. Sechs der 26 Fälle waren Rezidive. Unter allen getesteten Fällen findet sich ein Fall eines cHL vom Mischtyp mit CARD9 positiven Reed-Sternberg-Zellen, alle anderen cHL Fälle sind CARD9 negativ.

CARD9 in transformierten DLBCL

Von den 17 untersuchten DLBCL welche aus anderen lymphoiden Neoplasien als der CLL transformiert waren, waren elf aus FL entstanden, fünf aus lymphoplasmazytischen

Lymphomen (LPL) und eines der DLBCL war klonal verwandt mit einem vorausgegangenen Mantelzelllymphom (mantle cell lymphoma (MCL)). Darunter zeigten zwei Fälle eine Positivität für CARD9, dabei handelt es sich in beiden Fällen um ein DLBCL welches aus einem FL hervorgegangen war (Abbildung 25). Alle anderen Fälle zeigen keine Anfärbung für CARD9.

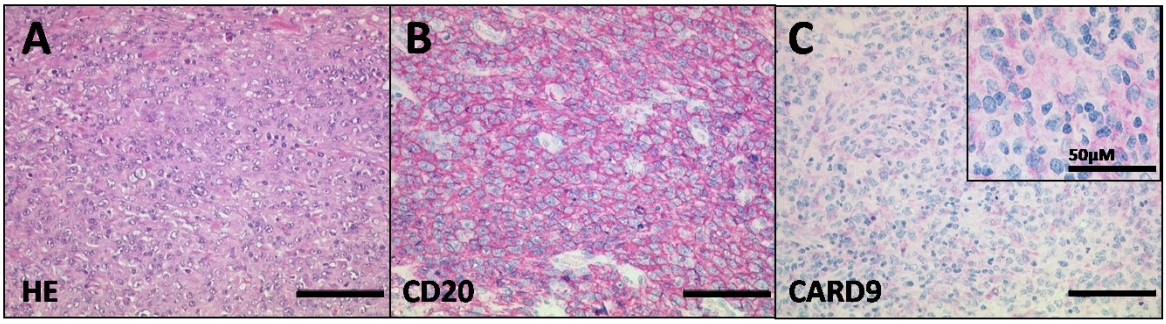

Abbildung 25: Färbungen eines CARD9 positiven DLBCL, welches aus einem FL transformiert ist. (A) HE Färbung. (B) CD20 Färbung. (C) CARD9 Färbung. Größenbalken stehen für eine Länge von 100µm (Ausnahme C, Vergrößerung).

CARD9 in CLL

Neben den schon beschriebenen 5 CLL mit korrespondierenden RS wurden 20 weitere CLL Fälle ohne nachfolgende RS hinsichtlich der Expression von *CARD9* überprüft. Keine dieser CLL zeigte eine Anfärbung für CARD9.

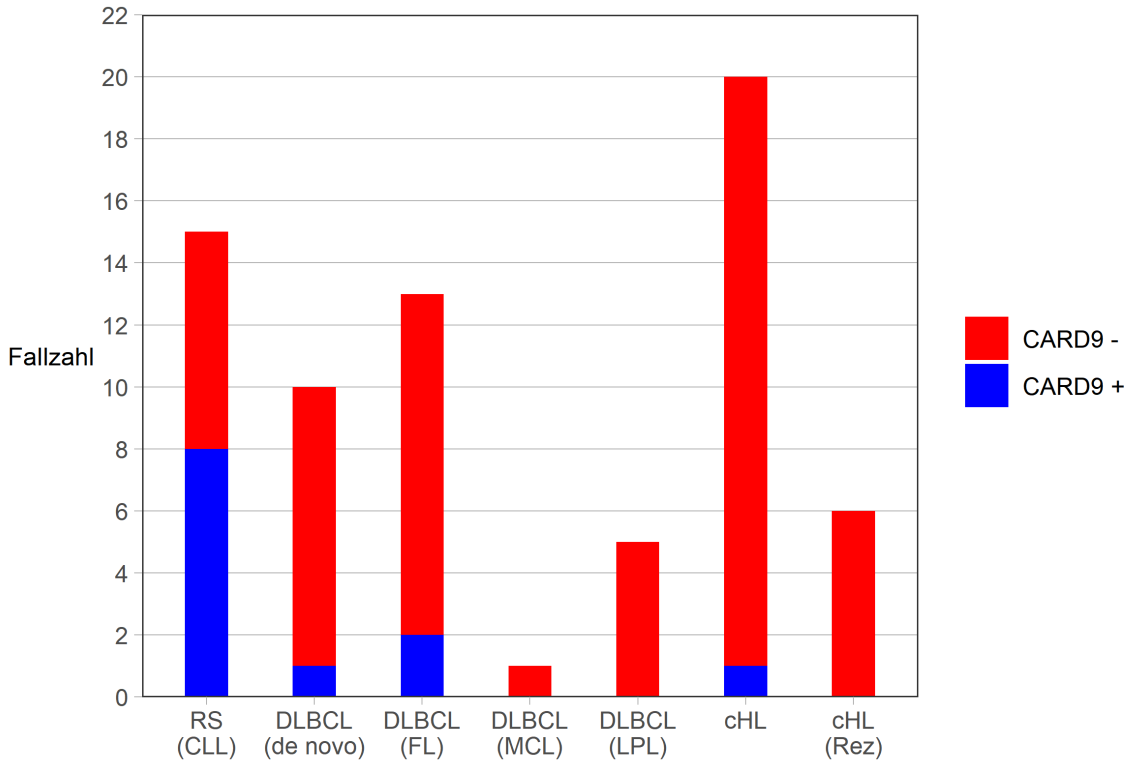

Abbildung 26: Darstellung der Ergebnisse verschiedener Lymphom-Entitäten bezüglich ihrer *CARD9* Expression. 53% der RS Fälle zeigen eine Expression von *CARD9*, wohingegen nur 10% der *de novo* DLBCL, 12% der alternativ transformierten DLBCL und nur 4% der cHL Fälle CARD9 positive Zellen aufweisen. Bei den transformierten DLBCL findet sich in Klammern aufgelistet die vor der Transformation vorhandene Lymphom-Entität. Rez: Rezidiv. Veröffentlicht in [77], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

3.8. Untersuchung der Zelllinie U-RT1 auf genomischer Ebene

Um die Zelllinie U-RT1 auf genomischer Ebene zu charakterisieren und Hinweise auf mögliche Ursachen der starken Expression von *CARD9* zu erhalten wurde sowohl eine Array CGH durchgeführt als auch die Gene *CARD9*, *CARD11, CD79, MYD88* und *TNFaip3* auf Mutationen überprüft.

3.8.1. UNTERSUCHUNG VON CHROMOSOMALEN ABERRATIONEN IN U-RT1

In der aCGH zeigt sich in der U-RT1 ein komplexes Aberrationsmuster. Abbildung 27 gibt einen Überblick über die chromosomalen Veränderungen. Von Aberrationen am Stärksten betroffen zeigen sich die Chromosomen 1p, 5, 8, 9, 15q, 20, 21, X und Y. Insgesamt weicht dieses Muster deutlich von denen in ABC DLBCL beschriebenen häufigen Aberrationen, wie z.B. Amplifikation von Chromosomen 3, 18q oder 19q oder Verluste in den Chromosomen 6q und 9p.

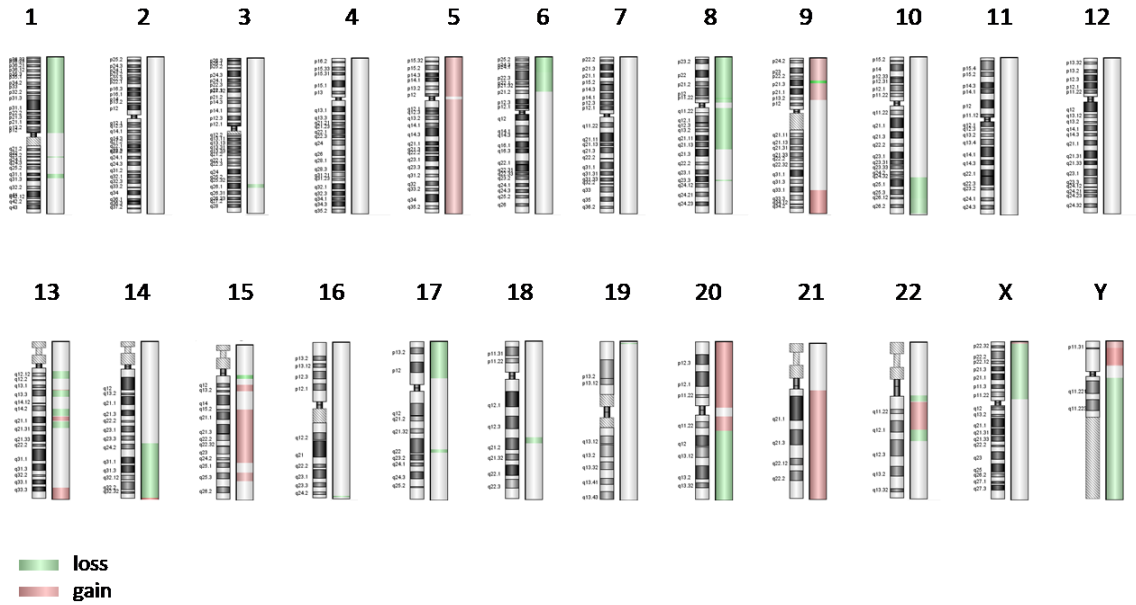

Abbildung 27: Übersicht der chromosomalen Aberrationen der U-RT1 ermittelt durch aCGH. Grün markierte Bereiche stellen den Verlust, rot markierte Bereiche einen Zugewinn an Genmaterial des jeweiligen Chromosomenabschnitts dar. Für die Ermittlung der Aberrationen wurde der Algorithmus ADM-2 in der Software Agilent Genomic Workbench angewandt. Loss: Verlust an Genmaterial; gain: Zugewinn an Genmaterial. Veröffentlicht in [117], Lizenz unter CC BY 4.0, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

In Tabelle 17 sind einige im Zusammenhang mit ABC DLBCL, RS und CBM-Komplex beschriebene Gene mit dem Aberrationsstatus der U-RT1 aufgelistet. Die in ABC DLBCL häufig zu findenden Amplifikationen der Gene *SBIP* (Chromosom 19q13) und *BCL2* (Chromosom 18q21) sind in der U-RT1 nicht vorhanden. Die U-RT1 zeigt durch eine Deletion im Chromosom 9p21 einen Verlust des Gens *CDKN2A*, was sowohl in RS als auch in 30% der ABC DLBCL beobachtet wird (siehe Kapitel 1.3). Weitere Aberrationen, welche

häufig bei RS beobachtet werden, sind eine Deletion oder eine Mutation von *TP53* und eine Überexpression oder eine Gain of function Mutation (GOF) von *NOTCH1* bzw *MYC* (siehe Kapitel 1.4). Auch in der U-RT1 zeigt sich bei *TP53* ein Verlust an Genmaterial und bei *NOTCH1* ein Zugewinn an Genkopien. *MYC* hingegen ist in der U-RT1 nicht von einer Aberration betroffen.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine starke Expression von *CARD9* auf mRNA und Proteinebene sowie die Bildung eines alternativen CBM-Komplexes gezeigt werden. In der Folge wurden die Genloci der am CBM-Komplex beteiligten Proteine auf chromosomaler Ebene untersucht. Es zeigt sich in keinem der Gene des konventionellen CBM-Komplexes (*CARD11*, *MALT1* und *BCL10*) eine Auffälligkeit. *CARD9* jedoch liegt auf Chromosom 9q34, hier ist ein Zugewinn an Genmaterial detektierbar.

Tabelle 17: Auflistung einiger im Zusammenhang mit RS, DLBCL und CBM Komplex beschriebener Gene mit Genort und in der aCGH detektierter Aberration in der Zelllinie U-RT1. LOF: loss of function; GOF: gain of function.

Gen	**Chromosom**	**Aberration in U-RT1**	**Bemerkung**
BCL2	18q21	-	Häufig Amplifikation in ABC DLBCL
SPIB	19q13	-	
CDKN2A	9p21	loss	Häufig LOF oder Deletion in RS und ABC DLBCL
TP53	17p13	loss	Häufig LOF oder Deletion in RS
Notch1	9q33	gain	Häufig GOF oder Überexpression in RS
MYC	8q24	-	
BCL10	1p22	-	CBM-Komplex Gene
MALT1	18q21	-	
CARD11	7p22	-	
CARD9	9q34	gain	

3.8.2. MUTATIONSANALYSE IN U-RT1

In ABC DLBCL sind häufig Mutationen in den Genen *MYD88* (L265P in Exon5), *CD79A/B* (ITAM Motiv, Exon 5 und Exon 6) und *CARD11* (Exone der coiled-coiled Domäne) für die konstitutive Aktivierung des NF-κB Signalwegs verantwortlich (siehe Kapitel 1.5.2). Um zu überprüfen, ob auch in der U-RT1 diese beschriebenen Mutationen vorliegen, wurden die entsprechenden Exone von *MYD88* und *CD79*, sowie alle Exone von *CARD11* sequenziert und mittels NCBI-Blast mit der Wildtyp-Sequenz verglichen. Weder das Exon 3 von *MYD88* noch die Exone 5 und 6 von *CD79* zeigen in U-RT1 eine Abweichung vom Wildtyp. Bei *CARD11* zeigt sich zwar keine der im Zusammenhang mit ABC DLBCL bekannten aktivierenden Mutationen, jedoch eine bisher unbeschriebene Mutation in Exon 16. Es handelt sich um eine Punktmutation von Cytosin nach Guanin an Stelle 2344 der codierenden Sequenz (c.2344C>G), welche zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz von Leucin nach Valin an der Stelle 782 führt (p.L782V). Dieser Aminosäureaustausch betrifft die SH3 Domäne von CARD11, die Variantenfrequenz dieser Mutation beträgt 0.69.

Um den Effekt dieses Aminosäureaustausches auf die Funktionalität des Proteins zu beurteilen, wurden zehn verschiedene gängige in silico Vorhersagetools verwendet. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 18 dargestellt. In sechs der Vorhersagetools wird die Mutation als für die Funktionalität des Proteins als störend berechnet. Bei den restlichen vier verwendeten Algorithmen zeigt die Veränderung keinen Effekt.

Tabelle 18: Ergebnisse der für die c.2334C>G Mutation in CARD11 angewandten Vorhersagetools bezüglich Funktionalität des Proteins.

Prediktionsalgorithmus	**Ergebnis**
FATHMM-MKL	damaging
LRT	damaging
Mutation Taster	damaging
Mutation Assessor	functional
Panther	functional

Prediktionsalgorithmus	**Ergebnis**
PhD SNP	functional
Polyphen	damaging
Provean	functional
SIFT	damaging
SNAP	damaging

Neben den beschriebenen Sequenzierungen von *MYD88*, *CD79* und *CARD11* wurden außerdem noch alle Exone von *CARD9* und *TNFaip3* in der U-RT1 sequenziert. Hier zeigen sich keinerlei Abweichungen von der Wildtyp-Sequenz.

4. DISKUSSION

CARD9 Expression

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expression von *CARD9* in der RS Zelllinie U-RT1 mittels Microarray Genexpressionsanalyse und RT-qPCR auf mRNA Ebene sowie mittels Western Blot Analysen, Co-Immunopräzipitation und Immunzytologie auf Proteinebene gezeigt werden. Mit der immunhistologischen Darstellung CARD9 positiver Zellen und anschließendem Nachweis einer Co-Expression von CD20 und CARD9 mittels Doppelimmunfluoreszenz konnte CARD9 auch im Ursprungslymphom der U-RT1 gezeigt werden und somit ein Zelllinienartefakt ausgeschlossen werden. CARD9 ist bekannt für seine aktivierende Rolle in myeloiden Zellen der angeborenen Immunabwehr [14, 44, 50, 115], bislang fehlt es jedoch an Daten bezüglich einer Expression von *CARD9* in nicht-neoplastischen B-Zellen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen von Gaumentonsillen zeigen keine CARD9 positiven B-Zellen innerhalb der Lymphfollikel, was die Vermutung nahelegt, dass CARD9 für die B-Zell Differenzierung keine existenzielle Rolle spielt. Eine Aussage zur Expression von *CARD9* in B-Zellen anderer Lokalisationen, z.B. im MALT des Darms oder in tertiären lymphoiden Strukturen im Rahmen von chronischen Entzündungen oder Autoimmunreaktionen kann jedoch anhand dieser Ergebnisse nicht getroffen werden. Dies zu untersuchen wäre insofern interessant, da die Expression von *CARD9* zumindest in myeloischen Zellen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von inflammatorischen Darmerkrankungen wie Colitis Ulcerosa zu spielen scheint [75].

Im neoplastischen Kontext konnte CARD9 bereits durch Nakamura et al. in MALT-Lymphomen des Magens nachgewiesen werden. Hier wird ein möglicher Zusammenhang einer *CARD9* Überexpression mit Krankheitsprogress und Resistenzentwicklung gegenüber einer Helicobacter Pylori Eradikation diskutiert [88]. Eine weitere Arbeit beschreibt ebenfalls in einem Kollektiv von MALT Lymphomen einen Zugewinn an Genmaterial auf Chromosom 9q34, welches den Genlokus von *CARD9* betrifft [139]. Die Erkenntnisse, dass CARD9 einen möglichen Treiber für Progress und Resistenzentwicklung von MALT-Lymphomen darstellen könnte, legen vor dem Hintergrund der innerhalb dieser Arbeit

gezeigten Ergebnisse die Hypothese nahe, dass CARD9 auch im Krankheitsverlauf der CLL eine Rolle spielen könnte, insbesondere im Hinblick auf die Transformation in ein DLBCL.

Eine mögliche Erklärung für die in U-RT1 gefundenen hohen CARD9 Level wäre, wie es schon in MALT Lymphomen beschrieben wurde [88, 139], das Vorliegen einer Genamplifikation. Mittels Array CGH konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Zugewinn an Kopienzahlen des *CARD9* Genlokus in der U-RT1 gezeigt werden. Alternativ könnten epigenetische Regulationsmechanismen zu einer verstärkten Genexpression führen. Eine Promotormethylierungsanalyse des *CARD9* Genlokus in U-RT1 und in einem Patientenkollektiv wäre eine Möglichkeit eine solche Regulation zu verifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine bislang unbeschriebene Missense-Mutation im *CARD11* Gen der U-RT1 detektiert werden. Diese Mutation wurde in sechs von zehn angewandten Prädiktionsalgorithmen mit einem potentiellen Funktionsverlust des Proteins assoziiert. Da die CARD11 Aktivierung eine wichtige Rolle für die Proliferation der ABC DLBCL spielt, wäre denkbar, dass bei einem Funktionsverlust von CARD11 in U-RT1 eine epigenetische Hochregulation der *CARD9* Expression als Ersatz für CARD11 dient, um trotz des mutationsbedingten Ausfalls von CARD11 eine anti-apoptotische konstitutive NF-κB Aktivität in der Zelle zu erhalten. Um diese Hypothese zu untersuchen, wäre die Testung eines Kollektivs auf diese *CARD11* Mutation und anschließender Korrelation mit der *CARD9* Expression ein geeigneter Ansatz. Zu diskutieren ist hingegen, inwieweit die Mutation von *CARD11* für die Zelllinie U-RT1 überhaupt Relevanz besitzt, da die innerhalb der U-RT1 gezeigte mRNA Expression von *CARD11* nur sehr niedrig ist. Denkbar wäre auch, dass dysfunktionales CARD11 Protein vermehrt dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Um diese Hypothese zu stützen müssten allerdings zunächst die *CARD11* Expression zusätzlich auf Proteinebene überprüft werden.

CBM-Komplex und NF-κB Signalweg

Die hohe Expression der CBM-Komplex Gene *MALT1* und *BCL10* in U-RT1 auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene deutet auf einen aktiven NF-κB Signalweg hin. Ein ähnliches Bild zeigte sich in den ABC DLBCL Zelllinien HBL-1, OCI-Ly3 und OCI-Ly10, welche sich durch einen konstitutiv aktiven kanonischen NF-κB Signalweg auszeichnen. Die durchgeführten Western Blot Analysen für phospho-IκB und phospho-IKK bestätigen die Vermutung, dass die U-RT1 einen aktiven NF-κB Weg besitzt, ähnlich der *de novo*

ABC DLBCL Zelllinien. Die getesteten GCB DLBCL Zelllinien zeigen hingegen keine oder nur sehr geringe Level an phospho-IκB und phospho-IKK, was dadurch zu erklären ist, dass GCB DLBCL andere onkogene Signalwege benutzten als den NF-κB Signalweg ([11], [28], [29], [66], [85]). Bay11-7082 ist ein potenter Inhibitor des NF-κB Signalwegs und induziert Apoptose in einer Vielzahl von Tumorzelllinien [21, 64, 84]. Inhibitionsversuche mit BAY11-7082 haben gezeigt, dass U-RT1 auf die Behandlung mit BAY11-7082 vulnerabler reagiert als HBL-1 und SUDHL4. Auch das deutet darauf hin, dass der NF-κB Signalweg eine onkogene Rolle in U-RT1 darstellt. Einschränkend ist zu bemerken, dass auch die GCB DLBCL Zelllinie SUDHL4 durch die Behandlung mit BAY11-7082 abstirbt; diskutiert werden kann an dieser Stelle, ob BAY11-8072 nicht nur den NF-κB Signalweg hemmt, sondern auch unspezifische Inhibitionseffekte zu einem Viabilitätsrückgang aller drei Zelllinien führen könnte. Um die NF-κB Abhängigkeit der U-RT1 zu untermauern wären nicht-pharmakologische Ansätze zur Unterdrückung des Signalwegs hilfereich, z.B. mittels der Überexpression eines dominanten nicht-funktionellen IKK-Konstrukts.

Um zu prüfen, ob *CARD9* in U-RT1 lediglich zufällig überexprimiert wird oder funktionelle Bedeutung für die Zelllinie hat, wurde eine Immunpräzipitation mittels BCL10-Antikörper durchgeführt. Hier zeigte sich eine Komplexbildung von BCL10, MALT1 und CARD9 in U-RT1, wohingegen in HBL-1 lediglich MALT1 mit BCL10 kopräzipitiert. Dies ist nicht überraschend, denn schon in den vorangegangenen Western Blot Analysen des Gesamtproteins zeigte HBL-1 keine Bande bei der Anfärbung durch CARD9 Antikörper. Als Kontrollversuch diente eine Präzipitation mittels p65 Antikörper. Hier zeigte sich keine Co-Präzipitation mit BCL10 oder MALT1 in U-RT1, insofern bestätigt dieser Versuch die Spezifität der Banden für MALT1 und BCL10 in der Co-IP mittels BCL10 Antikörper. Zusammenfassend spricht dieser Versuch dafür, dass in U-RT1 ein alternativer CBM Komplex gebildet wird, bestehend aus CARD9, MALT1 und BCL10 wird, während in ABC DLBCL Zelllinien bekanntermaßen CARD11 für die Assemblierung des CBM Komplex verantwortlich ist. Unklar bleibt anhand dieser Versuche, ob U-RT1 nicht zusätzlich zu diesem alternativen CBM-Komplex einen CBM Komplex mit CARD11 bildet. Dies müsste in weiteren Co-IP Experimenten überprüft werden. Allerdings lässt die niedrige *CARD11* Expression auf mRNA Ebene daran zweifeln, dass in U-RT1 ausreichend Translation von *CARD11* mRNA stattfindet, um eine funktionelle Rolle für die NF-κB-Aktivierung via CBM Komplex Bildung spielen zu können.

Um die Hypothese der alternativen CBM-Komplex Bildung in RS weiter zu stützen, wäre zudem der Nachweis dieses CBM Komplexes *in situ* hilfreich, z.B. mittels eines Proximity Ligation Ansatzes. Damit könnte innerhalb von Kollektiv Fällen gezeigt werden, ob CARD9, BCL10 und MALT1 auch *in situ* in örtlich unmittelbarer Nähe zueinander vorliegen, was suggestiv für das Vorhandensein eines alternativen CBM-Komplexes wäre.

CARD9 Knockdown in U-RT1

Zentrales Element dieser Arbeit ist der Knockdown von *CARD9* mittels siRNA in U-RT1. Hier zeigt sich trotz einer nur eine moderaten Herunterregulation von CARD9 auf Proteinebene ein signifikanter Rückgang der Viabilität der U-RT1 Zellen, ermittelt durch den MTT Assay. Diese Ergebnisse lassen eine essenzielle Bedeutung von CARD9 für U-RT1 vermuten. Womöglich würde ein effizienterer Knockdown bzw. ein Knockout von *CARD9* einen entsprechend stärkeren negativen Effekt der Proliferationsaktivität nach sich ziehen. Die gefundenen Daten werfen die Frage auf, ob eine CARD9 Knockout Variante von U-RT1 überhaupt lebensfähig wäre. Die nur geringe Herunterregulation von *CARD9* lässt sich durch eine geringe siRNA Transfektionseffizienz von ca. 35% erklären. Ein stabiler Knockdown mittels shRNA mit der Möglichkeit einer Selektion bzw. einer Induktion wäre eine Möglichkeit, sowohl die Knockdown Effizienz zu steigern also auch die nachfolgenden Effekte besser kontrollieren zu können. Sinnvoll wären vergleichende Microarray Genexpressionsanalysen sowie z.B. eine NF-κB Reporteranalyse um eine direkte Verknüpfung zwischen CARD9 und NF-κB Signalweg untersuchen zu können.

Ein weiterer Ansatz, die funktionellen Auswirkungen eines *CARD9* Knockdowns auf den NF-κB Signalweg zu untersuchen, ist die Bestimmung der Aktivität der Paracaspase MALT1 als zentrales Element des NF-κB Signalwegs. Es wurden mittels Western Blot Analysen die Proteinlevel der Gesamtproteine sowie der Spaltprodukte der MALT1-Substrate CYLD, A20 und RelB mit und ohne siRNA Knockdown von *CARD9* untersucht. Das Spaltprodukt von CYLD zeigt dabei einen signifikanten Rückgang nach *CARD9* Knockdown, wohingegen über das Verhalten von A20 und RelB keine definitive Aussage möglich ist, da die Banden insgesamt sehr schwach und die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nur sehr gering ausfallen. Die durchgeführten Versuche bezüglich der Spaltung von CYLD geben jedoch erste Hinweise darauf, dass die Aktivität von MALT1 durch den Knockdown von CARD9 sinkt. Da die MALT1 Aktivität einen zentralen Faktor

eines aktiven NF-κB Signalwegs darstellt spricht ein Rückgang der MALT1 Spaltprodukte für eine niedrigere NF-κB Aktivität nach CARD9 Knockdown und somit für eine funktionelle Bedeutung von CARD9 für die Aktivierung des Signalwegs.

CARD9 Aktivierung

Während CARD11 in lymphoiden Zellen durch die Phosphorylierung seiner MAGUK Sequenz durch PKCβ and PKCθ Isoformen [83, 115, 120] aktiviert wird, wird CARD9 in myeloischen Zellen durch die Isoform PKCΔ aktiviert [44, 78, 115]. Ein gemeinsamer Startpunkt der NF-κB Signalwege in lymphoiden und myeloischen Zellen ist die Kinase SYK, welche sowohl über BCR/TCR Signale in Lymphozyten weiterleitet als auch über SYK-gekoppelte CLRs in myeloischen Zellen den NF-κB Signalweg aktiviert [44, 78, 115].

Auffällig ist, dass die Aktivierung von PKCΔ durch SYK nicht nur in myeloischen Zellen, sondern auch als ein anti-apoptotischer Faktor in der CLL identifiziert wurde [13, 42]. Aktives SYK konnte zudem in verschiedenen weiteren B-Zell Neoplasien wie *de novo* DLBCL [20], FL [68] und MCL [104] detektiert werden. Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass eine durch SYK aktivierte PKCΔ möglicherweise auch in U-RT1 CARD9 phosphorylieren und dadurch aktivieren könnte. Um diese Hypothese zu testen wären Expressions- und Phosphorylierungsanalysen der verschiedenen PKC Isoformen in U-RT1 sowie die Behandlung der U-RT1 mit spezifischen Inhibitoren der PKCΔ-Isoform und anschließender NF-κB Reporteranalyse denkbar.

Kollektiv

Anhand der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen an Kollektiven verschiedener Lymphom-Entitäten wird deutlich, dass es sich bei der *CARD9* Expression in der U-RT1 und dem dazugehörigen Ursprungslymphom nicht um einen Einzelfall handelt. In 53% der untersuchten Patientenfälle mit RS zeigte sich eine CARD9 Positivität. Mittels HE- und CD20-Färbungen konnten neoplastische, CARD9 positive B-Zellen von den myeloischen Begleitinfiltraten unterschieden und die CARD9 positiven Zellen eindeutig den neoplastischen B-Zellen zugeordnet werden.

Vergleicht man die CARD9-positiven mit den CARD9-negativen RS Kollektiv-Fällen, zeigen sich keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich abgefragter klinischer und

biologischer Charakteristika. Allerdings ist die Fallzahl sehr begrenzt und nur für einen Teil der Fälle lagen entsprechende klinische bzw. biologische Informationen vor. Insofern erscheinen anhand dieser Daten Hypothesen bezüglich der klinischen Relevanz von CARD9 verfrüht; die Testung größerer Kollektive sind notwendig, um belastbare Aussagen treffen zu können.

Von den untersuchten RS Fällen lag bei fünf Fällen Material der zuvor diagnostizierten CLL vor. In keiner dieser Proben konnte innerhalb der neoplastischen B-Zellen eine Expression von *CARD9* gezeigt werden. Eine Ausnahme stellt ein Fall dar, in dem innerhalb der CLL blastäre Quellherde zu sehen sind, welche sowohl eine Anfärbung für CD20 als auch eine fokal schwache *CARD9* Expression zeigen. Da das später aus dieser CLL entstandene DLBCL auch eine Expression von *CARD9* zeigt, liegt die Hypothese nahe, dass es sich bei den beschriebenen Zellen um CARD9 positive Blasten der CLL handelt und dass eben diese Zellen den Ursprung des späteren CARD9 positiven Richter Syndroms darstellen könnten.

Um zu untersuchen, ob CARD9 auch in anderen Lymphom-Entitäten als RS zu finden ist, wurden Patientenkollektive mit *de novo* DLBCL, CLL, cHL und anderweitig transformierten DLBCL auf die Expression von *CARD9* untersucht. Hier zeigt sich, dass eine *CARD9* Expression weder eine häufige Eigenschaft von *de novo* DLBCL zu sein scheint noch eine generelle Rolle in der Transformation eines indolenten Lymphoms in ein aggressives Lymphom spielt, sondern vielmehr als ein spezifisches Phänomen des RS einzustufen ist. Einschränkend sei hier erneut auf die relativ kleinen Fallzahlen der verwendeten Kollektive hingewiesen. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit nur eine begrenzte Anzahl an verschiedenen Lymphom Entitäten untersucht. Eine Untersuchung sowohl einer größeren Anzahl an CLL Fällen, darunter auch akzelerierte CLL oder prolymphozytär transformierte CLL sowie die Untersuchung anderer aggressiver Lymphom-Entitäten wie Burkitt Lymphome, Mantelzell-Lymphome oder weiterer DLBCL Subtypen wie z.B. primär mediastinale B-Zell Lymphome wäre sinnvoll, um eine umfassendere Aussage über die Bedeutung von CARD9 in Lymphomen im Allgemeinen treffen zu können.

RS und *de novo* DLBCL

Im Verlauf der Arbeit wurde immer wieder das RS dem *de novo* DLBCL gegenübergestellt. In den durchgeführten Array CGH Untersuchungen fanden sich in der U-RT1 nicht die für *de novo* DLBCL typischen Aberrationen, sondern RS-typische Veränderungen wie z.B. ein *TP53*-Verlust [117]. Mittels Microarray Genexpressionsanalyse konnte die mRNA Expression von U-RT1 mit verschiedenen *de novo* DLBCL Zelllinien verglichen und deutlich unterschiedliche Genexpressionssignaturen gezeigt werden. Insofern bestätigen die erhobenen Daten die Angaben der Literatur, dass es sich bei dem RS im Allgemeinen und bei der U-RT1 im Speziellen um eine von *de novo* DLBCL distinkte Entität mit eigener Pathogenese handelt ([36], [113]). Passend hierzu zeigen die Experimente dieser Arbeit eine Expression von *CARD9* in der U-RT1 und in Teilen des RS Kollektivs, jedoch in keiner der getesteten *de novo* DLBCL Zelllinien und nur in einem von zehn untersuchten *de novo* DLBCL Kollektiv-Fällen. Das RS scheint also auch in diesem Aspekt eine eigene Krankheitsentität darzustellen.

Die durchgeführten *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass die Zelllinie U-RT1, möglicherweise ausgelöst durch die Überexpression von *CARD9* einen aktiven kanonischen NF-κB Signalweg besitzt, welcher die Proliferation der Zelllinie begünstigt. Die bekannten Mutationen in den Genen *CARD11*, *CD79* und *MYD88*, welche in ABC DLBCL einen konstitutiv aktiven NF-κB Signalweg bewirken, waren in der U-RT1 jedoch nicht nachweisbar. Die U-RT1 scheint folglich zwar entsprechend den ABC DLBCL einen konstitutiv aktiven NF-κB Signalweg zu besitzen, die Aktivierung dessen hingegen erfolgt über andere, bisher unbekannte Mechanismen, möglicherweise über die Aktivierung von CARD9.

Einen Schwachpunkt der funktionellen Ergebnisse stellt sicherlich die Tatsache dar, dass es sich bei der U-RT1 um die bis dato einzige verfügbare Zelllinie eines RS handelt. Die Etablierung weiterer Zelllinien und erneute Gegenüberstellung mit *de novo* DLBCL Zelllinien ist erforderlich, um die hier erhobenen Daten zu bestätigen und weitere Erkenntnisse bezüglich Unterschiede und Gemeinsamkeiten von RS und *de novo* DLBCL zu erhalten, insbesondere hinsichtlich der Bedeutung von CARD9 und der Bildung eines alternativen CBM Komplexes.

Ausblick

Obwohl es sich bei RS und *de novo* DLBCL um verschiedene Krankheitsentitäten handelt, werden die meisten RS Patienten bislang mit ähnlichen Therapieregimen behandelt wie Patienten mit *de novo* DLBCL. In Anbetracht der schlechteren Prognose von RS Patienten trotz intensiver Therapie ist die Entwicklung neuer, gezielter Therapieansätze dringend notwendig. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte eine aberrante Expression von *CARD9* im RS Kollektiv sowie in der Zelllinie U-RT1 mit onkogenen Eigenschaften erstmalig gezeigt werden.

Im Jahr 2017 testeten Leshchiner et al. verschiedene direkte Inhibitoren von CARD9 im Kontext von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Dabei zielten sie auf die Hemmung der Interaktion zwischen CARD9 und TRIM62 ab, was die proinflammatorische Aktivierung des NF-κB Signalwegs in myeloischen Immunzellen attenuierte [69].

Weitere Untersuchungen zu CARD9 in RS sind dringend notwendig um die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse zu bestätigen und die Rolle von CARD9 auch in neoplastischen B-Zellen mechanistisch besser zu verstehen. Mit fortschreitender Aufklärung der Aktivierungsmechanismen und Interaktionspartner von CARD9 in RS könnte dann, ähnlich wie von Leshchiner et al. bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, eventuell auch in RS CARD9 inhibiert werden und somit gezielte Therapieoptionen für Patienten mit CARD9 positivem RS entwickelt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Richter Syndrom (RS) ist definiert als Transformation einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) in ein aggressives Lymphom, meist ein diffus großzelliges B Zell Lymphom (DLBCL). Trotz intensiver Therapie ist die Prognose des RS sehr ungünstig, die meisten Patienten versterben innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung. Die detaillierte Pathobiologie des RS ist noch in weiten Teilen unzureichend verstanden, es wurde jedoch gezeigt, dass es sich beim RS um eine gegenüber dem *de novo* DLBCL separate Krankheitsentität mit differentem genetischen Aberrationsmuster handelt. Es ist daher naheliegend, auch hinsichtlich neuer therapeutischer Optionen die Unterschiede der beiden Entitäten genauer zu untersuchen.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die im Institut für Pathologie etablierte, erste RS Zelllinie U-RT1 als Modellsystem verwendet und mit *de novo* DLBCL Zelllinien verglichen. Anhand Microarray Genexpressionsanalysen konnte eine Vielzahl differentiell exprimierter Gene identifiziert werden. Auffallend waren dabei hohe Expressionslevel von *CARD9* in U-RT1, welche anschließend durch RT-qPCR, Immunzytologie und Western Blot Experimente bestätigt werden konnten. Weder die getesteten *de novo* DLBCL Zelllinien (HBL-1, OCI-Ly3, OCI-Ly7, OCI-Ly10, SUHDL4, SUDHL6) noch die Hodgkin Lymphom Zelllinie L428 zeigte eine Expression von *CARD9*. Mittels Co-Immunpräzipitation konnte die Assemblierung eines alternativen CBM Komplexes mit CARD9 anstelle von CARD11 in U-RT1 gezeigt werden.

CARD9 ist ein wichtiger Aktivator des NF-κB Signalwegs in myeloischen Zellen, wohingegen in lymphatischen Zellen die Aktivierung durch einen aktiven CBM Komplex aus CARD11, BCL10 und MALT1 erfolgt. In Western Blot Untersuchungen konnte in der U-RT1 phosphoryliertes IκB und IKK nachgewiesen werden, was auf einen aktiven NF-κB Signalweg hindeutet. In Inhibitionsversuchen waren U-RT1 Zellen zudem vulnerabler gegenüber einer Behandlung mit dem NF-κB Inhibitor BAY11-7082 als die ABC DLBCL Zelllinie HBL-1. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der U-RT1 eine konstitutive Aktivierung des kanonischen NF-κB Signalwegs zu Zellviabilität und Proliferation beiträgt.

Mittels siRNA Transfektion gelang in U-RT1 Zellen eine moderate Herunterregulation von *CARD9*. Dies wurde anhand von Western Blot Analysen auf Proteinebene gezeigt. In nachfolgenden MTT Versuchen konnte ein signifikanter Rückgang der Zellviabilität der U-RT1 nach CARD9 Knockdown beobachtet werden. Western Blot Bestimmungen von CYLD zeigten außerdem einen signifikanten Rückgang an CYLD Spaltprodukt nach CARD9 siRNA Knockdown in U-RT1. Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese, dass CARD9 eine funktionelle Rolle in der U-RT1 spielt und über die Bildung eines CBM Komplexes und die Aktivierung von MALT1 zur Proliferation der Zelllinie beiträgt.

Um die gewonnenen *in vitro* Ergebnisse weiter zu stützen, wurde die *CARD9* Expression sowohl immunhistochemisch als auch mittels Doppelimmunfluoreszenz an jenem Lymphknoten bestätigt, welcher das Ursprungslymphom der U-RT1 beinhaltet. Nicht-neoplastische B-Zellen in reaktiven Keimzentren von Tonsillen zeigten hingegen keine Positivität für CARD9. Anschließend wurde ein Kollektiv verschiedener aggressiver Lymphome untersucht. Dabei zeigten 53% der untersuchten RS Fälle eine *CARD9* Expression, wohingegen die untersuchten *de novo* DLBCL, cHL und aus anderen indolenten Lymphomen transformierten DLBCL nur in Einzelfällen eine *CARD9* Expression aufwiesen. Auch in CLL Fällen fand sich keine Expression von *CARD9*. Obwohl die untersuchten Kohorten nicht sehr groß sind, legen die Ergebnisse die Vermutung nahe, dass die Expression von *CARD9* weder ein Phänomen von *de novo* DLBCL im Allgemeinen ist, noch einen generellen Mechanismus einer Transformation eines indolenten Lymphoms in ein aggressives Lymphom darstellt. Die aberrante Expression von *CARD9* scheint vielmehr eine Eigenschaft des Richter Syndroms zu sein, als möglicher Aktivator des NF-κB Signalwegs und damit der Zellproliferation. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigte aberrante *CARD9* Expression in RS ist der erste Nachweis von CARD9 in einem aggressiven Lymphom.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. No authors listed. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Blood. 1997:3909-18.

2. Akasaka T, Ueda C, Kurata M, Akasaka H, Yamabe H, Uchiyama T, Ohno H. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. Blood. 2000:2907-9.

3. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000:503-11.

4. Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995:10599-603.

5. Allan JN, Furman RR. Current trends in the management of Richter's syndrome. Int J Hematol Oncol. 2018:IJH09.

6. Alvarez-Prado AF, Perez-Duran P, Perez-Garcia A, Benguria A, Torroja C, de Yebenes VG, Ramiro AR. A broad atlas of somatic hypermutation allows prediction of activation-induced deaminase targets. J Exp Med. 2018:761-71.

7. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Ann Oncol. 1998:717-20.

8. Armitage JO, Dick FR, Corder MP. Diffuse histiocytic lymphoma complicating chronic lymphocytic leukemia. Cancer. 1978:422-7.

9. ATCC. https://www.lgcstandards-atcc.org/, 05.04.2021.

10. Bargou RC, Leng C, Krappmann D, Emmerich F, Mapara MY, Bommert K, Royer HD, Scheidereit C, Dorken B. High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. Blood. 1996:4340-7.

11. Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Kendall SJ, Owen RG, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. Clin Cancer Res. 2003:2133-9.

12. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. Br J Haematol. 2002:322-32.

13. Baudot AD, Jeandel PY, Mouska X, Maurer U, Tartare-Deckert S, Raynaud SD, Cassuto JP, Ticchioni M, Deckert M. The tyrosine kinase Syk regulates the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells through PKCdelta and proteasome-dependent regulation of Mcl-1 expression. Oncogene. 2009:3261-73.

14. Bertin J, Guo Y, Wang L, Srinivasula SM, Jacobson MD, Poyet JL, Merriam S, Du MQ, Dyer MJ, Robison KE, DiStefano PS, Alnemri ES. CARD9 is a novel caspase recruitment domain-containing protein that interacts with BCL10/CLAP and activates NF-kappa B. J Biol Chem. 2000:41082-6.

15. Bertin J, Wang L, Guo Y, Jacobson MD, Poyet JL, Srinivasula SM, Merriam S, DiStefano PS, Alnemri ES. CARD11 and CARD14 are novel caspase recruitment domain (CARD)/membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family members that interact with BCL10 and activate NF-kappa B. J Biol Chem. 2001:11877-82.

16. Blast N. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi; 05.04.2021.

17. Blonska M, Lin X. NF-kappaB signaling pathways regulated by CARMA family of scaffold proteins. Cell Res. 2011:55-70.

18. Cellosaurus. https://web.expasy.org/cgi-bin/cellosaurus/; 05.04.2021.

19. Chan KL, Blombery P, Jones K, Lade S, Carney D, Tran H, Seymour JF, Tam CS. Plasmablastic Richter transformation as a resistance mechanism for chronic lymphocytic leukaemia treated with BCR signalling inhibitors. Br J Haematol. 2017:324-8.

20. Chen L, Monti S, Juszczynski P, Daley J, Chen W, Witzig TE, Habermann TM, Kutok JL, Shipp MA. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2008:2230-7.

21. Chen L, Ruan Y, Wang X, Min L, Shen Z, Sun Y, Qin X. BAY 11-7082, a nuclear factor-kappaB inhibitor, induces apoptosis and S phase arrest in gastric cancer cells. J Gastroenterol. 2014:864-74.

22. Cheong R, Bergmann A, Werner SL, Regal J, Hoffmann A, Levchenko A. Transient IkappaB kinase activity mediates temporal NF-kappaB dynamics in response to a wide range of tumor necrosis factor-alpha doses. J Biol Chem. 2006:2945-50.

23. Cheong R, Hoffmann A, Levchenko A. Understanding NF-kappaB signaling via mathematical modeling. Mol Syst Biol. 2008:192.

24. Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I, Rossi D, Rancoita PM, Strefford JC, Oscier D, Stamatopoulos K, Papadaki T, Berger F, Young KH, Murray F, Rosenquist R, Greiner TC, Chan WC, Orlandi EM, Lucioni M, Marasca R, Inghirami G, Ladetto M, Forconi F, Cogliatti S, Votavova H, Swerdlow SH, Stilgenbauer S, Piris MA, Matolcsy A, Spagnolo D, Nikitin E, Zamo A, Gattei V, Bhagat G, Ott G, Zucca E, Gaidano G, Bertoni F. Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. Blood. 2013:2673-82.

25. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2002:235-42.

26. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1999:1840-7.

27. David L, Li Y, Ma J, Garner E, Zhang X, Wu H. Assembly mechanism of the CARMA1-BCL10-MALT1-TRAF6 signalosome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018:1499-504.

28. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. J Exp Med. 2001:1861-74.

29. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang JK, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Johnson NA, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Wilson WH, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. Nature. 2010:88-92.

30. Dobashi A. Molecular Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. J Clin Exp Hematop. 2016:71-8.

31. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2000:1910-6.

32. DSMZ. https://www.dsmz.de/fp/cgi-bin/str.html; 05.04.2021.

33. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, Gerhartz HH, Meusers P, Siegert W, Thiel E, Wilmanns W, Aydemir U, Bierwolf S, Griesser H, Tiemann M, Lennert K. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. Blood. 1997:2291-7.

34. Eyre TA, Clifford R, Roberts C, Boyle L, Francis A, Schuh A, Dutton SJ. Single arm NCRI phase II study of CHOP in combination with Ofatumumab in induction and maintenance for patients with newly diagnosed Richter's syndrome. BMC Cancer. 2015:52.

35. Eyre TA, Schuh A. An update for Richter syndrome - new directions and developments. Br J Haematol. 2017:508-20.

36. Fabbri G, Khiabanian H, Holmes AB, Wang J, Messina M, Mullighan CG, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. J Exp Med. 2013:2273-88.

37. Fan L, Wang L, Zhang R, Fang C, Zhu DX, Wang YH, Zou ZJ, Li JY, Xu W. Richter transformation in 16 of 149 Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 2012:1749-56.

38. Fangazio M, De Paoli L, Rossi D, Gaidano G. Predictive markers and driving factors behind Richter syndrome development. Expert Rev Anticancer Ther. 2011:433-42.

39. Fu C, Turck CW, Kurosaki T, Chan AC. BLNK: a central linker protein in B cell activation. Immunity. 1998:93-103.

40. Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. Nature. 1990:678-82.

41. Gine E, Martinez A, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Camos M, Martinez D, Esteve J, Calvo X, Muntanola A, Abrisqueta P, Rozman M, Rozman C, Bosch F, Campo E, Montserrat E. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. Haematologica. 2010:1526-33.

42. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Carsetti L, Berno V, Sica S, Leone G, Efremov DG. Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. Leukemia. 2009:686-97.

43. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. Nat Rev Immunol. 2020:95-112.

44. Gross O, Gewies A, Finger K, Schafer M, Sparwasser T, Peschel C, Forster I, Ruland J. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. Nature. 2006:651-6.

45. Hailfinger S, Nogai H, Pelzer C, Jaworski M, Cabalzar K, Charton JE, Guzzardi M, Decaillet C, Grau M, Dorken B, Lenz P, Lenz G, Thome M. Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF-kappaB activation in lymphocytes and lymphoma cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011:14596-601.

46. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ, International Workshop on Chronic Lymphocytic L. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic

Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood. 2008:5446-56.

47. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1999:1848-54.

48. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Muller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood. 2004:275-82.

49. Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, Imanishi T, Xue L, Morris SW, Inui M, Takai T, Shibuya A, Saijo S, Iwakura Y, Ohno N, Koseki H, Yoshida H, Penninger JM, Saito T. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. Nat Immunol. 2007:619-29.

50. Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, Xue L, Morris SW, Penninger JM, Yoshida H, Saito T. Cell type-specific regulation of ITAM-mediated NF-kappaB activation by the adaptors, CARMA1 and CARD9. J Immunol. 2008:918-30.

51. Harwood NE, Batista FD. Early events in B cell activation. Annu Rev Immunol. 2010:185-210.

52. Hatzimichael E, Papathanasiou K, Zerdes I, Flindris S, Papoudou-Bai A, Kapsali E. Plasmablastic Lymphoma with Coexistence of Chronic Lymphocytic Leukemia in an Immunocompetent Patient: A Case Report and Mini-Review. Case Rep Hematol. 2017:2861596.

53. Hayes C, Ma Y, Delioukina M, Alkan S, Huang Q. Bone marrow manifestation of plasmablastic transformation of chronic lymphocytic leukemia: a case report. Journal of Hematopathology. 2014:189-93.

54. Hleuhel MH, Ben-Dali Y, Da Cunha-Bang C, Brieghel C, Clasen-Linde E, Niemann CU, Andersen MA. Risk factors associated with Richter's transformation in patients with chronic lymphocytic leukaemia: protocol for a retrospective population-based cohort study. BMJ Open. 2019:e023566.

55. Holliday MJ, Witt A, Rodriguez Gama A, Walters BT, Arthur CP, Halfmann R, Rohou A, Dueber EC, Fairbrother WJ. Structures of autoinhibited and polymerized forms of CARD9 reveal mechanisms of CARD9 and CARD11 activation. Nat Commun. 2019:3070.

56. Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. Am J Clin Pathol. 1995:472-8.

57. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, Dave BJ, Smith L, Ji J, Wright G, Sanger WG, Pickering DL, Jain S, Horsman DE, Shen Y, Fu K, Weisenburger DD, Hans CP, Campo E, Gascoyne RD, Rosenwald A, Jaffe ES, Delabie J, Rimsza L, Ott G, Muller-Hermelink HK, Connors JM, Vose JM, McKeithan T, Staudt LM, Chan WC, Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling P. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. Leukemia. 2007:2332-43.

58. Jaworski M, Thome M. The paracaspase MALT1: biological function and potential for therapeutic inhibition. Cell Mol Life Sci. 2016:459-73.

59. Johnson SA, Pleiman CM, Pao L, Schneringer J, Hippen K, Cambier JC. Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases. J Immunol. 1995:4596-603.

60. Kaileh M, Sen R. NF-kappaB function in B lymphocytes. Immunol Rev. 2012:254-71.

61. Kohlhaas V, Blakemore SJ, Al-Maarri M, Nickel N, Pal M, Roth A, Hovelmeyer N, Schafer SC, Knittel G, Lohneis P, Nikolic M, Wiederstein JL, Franitza M, Georgomonolis T, Reinart N, Herling M, Herling

C, Hartmann EM, Rosenwald A, Klapper W, Buttner R, Moia R, Rossi D, Boldorini R, Gaidano G, Frenzel LP, Reinhardt HC, Bruning JC, Hallek M, Kruger M, Peifer M, Pallasch CP, Wunderlich FT. Active Akt signaling triggers CLL toward Richter transformation via overactivation of Notch1. Blood. 2021:646-60.

62. Lam LT, Davis RE, Pierce J, Hepperle M, Xu Y, Hottelet M, Nong Y, Wen D, Adams J, Dang L, Staudt LM. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. Clin Cancer Res. 2005:28-40.

63. Lamar Z, Kennedy L, Kennedy B, Lynch M, Goad A, Hurd D, McIver Z. Ibrutinib and rituximab induced rapid response in refractory Richter syndrome. Clin Case Rep. 2015:615-7.

64. Lee J, Rhee MH, Kim E, Cho JY. BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets. Mediators Inflamm. 2012:416036.

65. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, Dave SS, Zhao H, Xu W, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Chan WC, Staudt LM. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. Science. 2008:1676-9.

66. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle A, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E, Braziel RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Wrench D, Lister TA, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM, Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling P. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. N Engl J Med. 2008:2313-23.

67. Lenz G, Wright GW, Emre NC, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, Carty S, Lam LT, Shaffer AL, Xiao W, Powell J, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Rimsza LM, Fisher RI, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008:13520-5.

68. Leseux L, Hamdi SM, Al Saati T, Capilla F, Recher C, Laurent G, Bezombes C. Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells. Blood. 2006:4156-62.

69. Leshchiner ES, Rush JS, Durney MA, Cao Z, Dancik V, Chittick B, Wu H, Petrone A, Bittker JA, Phillips A, Perez JR, Shamji AF, Kaushik VK, Daly MJ, Graham DB, Schreiber SL, Xavier RJ. Small-molecule inhibitors directly target CARD9 and mimic its protective variant in inflammatory bowel disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017:11392-7.

70. Li S, Desai P, Lin P, Yin CC, Tang G, Wang XJ, Konoplev SN, Khoury JD, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ. MYC/BCL6 double-hit lymphoma (DHL): a tumour associated with an aggressive clinical course and poor prognosis. Histopathology. 2016:1090-8.

71. Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM. IKK biology. Immunol Rev. 2012:239-53.

72. Longo DL. Harrisons's Hematology and Oncology. McGraw-Hill Education.

73. Lucas PC, McAllister-Lucas LM, Nunez G. NF-kappaB signaling in lymphocytes: a new cast of characters. J Cell Sci. 2004:31-9.

74. Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N, McAllister-Lucas LM, Abazeed ME, Chen FF, Yamaoka S, Seto M, Nunez G. Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. J Biol Chem. 2001:19012-9.

75. Luo P, Yang Z, Chen B, Zhong X. The multifaceted role of CARD9 in inflammatory bowel disease. J Cell Mol Med. 2020:34-9.

76. Maddocks KJ, Ruppert AS, Lozanski G, Heerema NA, Zhao W, Abruzzo L, Lozanski A, Davis M, Gordon A, Smith LL, Mantel R, Jones JA, Flynn JM, Jaglowski SM, Andritsos LA, Awan F, Blum KA, Grever MR, Johnson AJ, Byrd JC, Woyach JA. Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. JAMA Oncol. 2015:80-7.

77. Maier J, Lechel A, Marienfeld R, Barth TFE, Moller P, Mellert K. CARD9 Forms an Alternative CBM Complex in Richter Syndrome. Cancers (Basel). 2022:531.

78. Malik A, Sharma D, Malireddi RKS, Guy CS, Chang TC, Olsen SR, Neale G, Vogel P, Kanneganti TD. SYK-CARD9 Signaling Axis Promotes Gut Fungi-Mediated Inflammasome Activation to Restrict Colitis and Colon Cancer. Immunity. 2018:515-30 e5.

79. Malinverni C, Unterreiner A, Staal J, Demeyer A, Galaup M, Luyten M, Beyaert R, Bornancin F. Cleavage by MALT1 induces cytosolic release of A20. Biochem Biophys Res Commun. 2010:543-7.

80. Manis JP, Tian M, Alt FW. Mechanism and control of class-switch recombination. Trends Immunol. 2002:31-9.

81. Mao Z, Quintanilla-Martinez L, Raffeld M, Richter M, Krugmann J, Burek C, Hartmann E, Rudiger T, Jaffe ES, Muller-Hermelink HK, Ott G, Fend F, Rosenwald A. IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution. Am J Surg Pathol. 2007:1605-14.

82. Martinez D, Valera A, Perez NS, Sua Villegas LF, Gonzalez-Farre B, Sole C, Gine E, Lopez-Guillermo A, Roue G, Martinez S, Sant F, Warzocha K, Robak T, Czader M, Villamor N, Colomo L, Campo E, Martinez A. Plasmablastic transformation of low-grade B-cell lymphomas: report on 6 cases. Am J Surg Pathol. 2013:272-81.

83. Matsumoto R, Wang D, Blonska M, Li H, Kobayashi M, Pappu B, Chen Y, Wang D, Lin X. Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF-kappaB activation. Immunity. 2005:575-85.

84. Mori N, Yamada Y, Ikeda S, Yamasaki Y, Tsukasaki K, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N, Fujii M. Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. Blood. 2002:1828-34.

85. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, Yap D, Humphries RK, Griffith OL, Shah S, Zhu H, Kimbara M, Shashkin P, Charlot JF, Tcherpakov M, Corbett R, Tam A, Varhol R, Smailus D, Moksa M, Zhao Y, Delaney A, Qian H, Birol I, Schein J, Moore R, Holt R, Horsman DE, Connors JM, Jones S, Aparicio S, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nat Genet. 2010:181-5.

86. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, Johnson NA, Severson TM, Chiu R, Field M, Jackman S, Krzywinski M, Scott DW, Trinh DL, Tamura-Wells J, Li S, Firme MR, Rogic S, Griffith M, Chan S, Yakovenko O, Meyer IM, Zhao EY, Smailus D, Moksa M, Chittaranjan S, Rimsza L, Brooks-Wilson A, Spinelli JJ, Ben-Neriah S, Meissner B, Woolcock B, Boyle M, McDonald H, Tam A, Zhao Y, Delaney A, Zeng T, Tse K, Butterfield Y, Birol I, Holt R, Schein J, Horsman DE, Moore R, Jones SJ, Connors JM, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. Nature. 2011:298-303.

87. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell. 2000:553-63.

88. Nakamura S, Nakamura S, Matsumoto T, Yada S, Hirahashi M, Suekane H, Yao T, Goda K, Iida M. Overexpression of caspase recruitment domain (CARD) membrane-associated guanylate kinase 1 (CARMA1) and CARD9 in primary gastric B-cell lymphoma. Cancer. 2005:1885-93.

89. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H, Shaffer AL, Romesser P, Wright G, Powell J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. Nature. 2011:115-9.

90. Nogai H, Dorken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2011:1803-11.

91. Novogrudsky A, Amorosi EL, Gottesman SR. High-grade T-cell lymphoma complicating B-cell chronic lymphocytic leukemia: an unusual manifestation of "Richter's syndrome". Am J Hematol. 2001:203-6.

92. O'Hayre M, Inoue A, Kufareva I, Wang Z, Mikelis CM, Drummond RA, Avino S, Finkel K, Kalim KW, DiPasquale G, Guo F, Aoki J, Zheng Y, Lionakis MS, Molinolo AA, Gutkind JS. Inactivating mutations in GNA13 and RHOA in Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: a tumor suppressor function for the Galpha13/RhoA axis in B cells. Oncogene. 2016:3771-80.

93. Obermann EC, Csato M, Dirnhofer S, Tzankov A. Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. J Clin Pathol. 2009:754-6.

94. Oeckinghaus A, Wegener E, Welteke V, Ferch U, Arslan SC, Ruland J, Scheidereit C, Krappmann D. Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation. EMBO J. 2007:4634-45.

95. Onkopedia-CLL. https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@@guideline/html/index.html: 05.04.2021.

96. Parikh SA, Rabe KG, Call TG, Zent CS, Habermann TM, Ding W, Leis JF, Schwager SM, Hanson CA, Macon WR, Kay NE, Slager SL, Shanafelt TD. Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. Br J Haematol. 2013:774-82.

97. Parikh SA, Shanafelt TD. Risk factors for Richter syndrome in chronic lymphocytic leukemia. Curr Hematol Malig Rep. 2014:294-9.

98. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Kuppers R, Dalla-Favera R. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. Nature. 2001:341-6.

99. Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M, Hannesschlager N, Schlee M, Rothenfusser S, Barchet W, Kato H, Akira S, Inoue S, Endres S, Peschel C, Hartmann G, Hornung V, Ruland J. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. Nat Immunol. 2010:63-9.

100. Pula B, Salomon-Perzynski A, Prochorec-Sobieszek M, Jamroziak K. Immunochemotherapy for Richter syndrome: current insights. Immunotargets Ther. 2019:1-14.

101. Reiff SD, Mantel R, Smith LL, Greene JT, Muhowski EM, Fabian CA, Goettl VM, Tran M, Harrington BK, Rogers KA, Awan FT, Maddocks K, Andritsos L, Lehman AM, Sampath D, Lapalombella R, Eathiraj S, Abbadessa G, Schwartz B, Johnson AJ, Byrd JC, Woyach JA. The BTK Inhibitor ARQ 531 Targets Ibrutinib-Resistant CLL and Richter Transformation. Cancer Discov. 2018:1300-15.

102. Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes. Annu Rev Immunol. 1992:97-121.

103. Richter MN. Generalized Reticular Cell Sarcoma of Lymph Nodes Associated with Lymphatic Leukemia. Am J Pathol. 1928:285-92 7.

104. Rinaldi A, Kwee I, Taborelli M, Largo C, Uccella S, Martin V, Poretti G, Gaidano G, Calabrese G, Martinelli G, Baldini L, Pruneri G, Capella C, Zucca E, Cotter FE, Cigudosa JC, Catapano CV, Tibiletti MG, Bertoni F. Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. Br J Haematol. 2006:303-16.

105. Rivera A, Siracusa MC, Yap GS, Gause WC. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. Nat Immunol. 2016:356-63.

106. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, Verbeek JS, Ruland J, Tybulewicz V, Brown GD, Moita LF, Taylor PR, Reis e Sousa C. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. J Exp Med. 2009:2037-51.

107. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, De Paoli L, Cresta S, Rasi S, Spina V, Franceschetti S, Lunghi M, Vendramin C, Bomben R, Ramponi A, Monga G, Conconi A, Magnani C, Gattei V, Gaidano G. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. Br J Haematol. 2008:202-15.

108. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. Hematol Oncol. 2009:1-10.

109. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: pathogenesis and management. Semin Oncol. 2016:311-9.

110. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, Marasca R, Laurenti L, Bruscaggin A, Cerri M, Monti S, Cresta S, Fama R, De Paoli L, Bulian P, Gattei V, Guarini A, Deaglio S, Capello D, Rabadan R, Pasqualucci L, Dalla-Favera R, Foa R, Gaidano G. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2012:521-9.

111. Rossi D, Rasi S, Spina V, Fangazio M, Monti S, Greco M, Ciardullo C, Fama R, Cresta S, Bruscaggin A, Laurenti L, Martini M, Musto P, Forconi F, Marasca R, Larocca LM, Foa R, Gaidano G. Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. Br J Haematol. 2012:426-9.

112. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, Laurenti L, Maffei R, Forconi F, Bertoni F, Zucca E, Agostinelli C, Cabras A, Lucioni M, Martini M, Magni M, Deaglio S, Ladetto M, Nomdedeu JF, Besson C, Ramponi A, Canzonieri V, Paulli M, Marasca R, Larocca LM, Carbone A, Pileri SA, Gattei V, Gaidano G. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. Clin Cancer Res. 2009:4415-22.

113. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, Rasi S, Laurenti L, Stamatopoulos K, Arcaini L, Lucioni M, Rocque GB, Xu-Monette ZY, Visco C, Chang J, Chigrinova E, Forconi F, Marasca R, Besson C, Papadaki T, Paulli M, Larocca LM, Pileri SA, Gattei V, Bertoni F, Foa R, Young KH, Gaidano G. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. Blood. 2011:3391-401.

114. Rowley JD. Chromosome studies in the non-Hodgkin's lymphomas: the role of the 14;18 translocation. J Clin Oncol. 1988:919-25.

115. Ruland J, Hartjes L. CARD-BCL-10-MALT1 signalling in protective and pathological immunity. Nat Rev Immunol. 2019:118-34.

116. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, Maynadie M, Simonetti A, Lutz JM, Berrino F, Group HW. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. Blood. 2010:3724-34.

117. Schmid T, Maier J, Martin M, Tasdogan A, Tausch E, Barth TFE, Stilgenbauer S, Bloehdorn J, Moller P, Mellert K. U-RT1 - A new model for Richter transformation. Neoplasia. 2021:140-8.

118. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. Blood. 2015:22-32.

119. Shenderov K, Barber DL, Mayer-Barber KD, Gurcha SS, Jankovic D, Feng CG, Oland S, Hieny S, Caspar P, Yamasaki S, Lin X, Ting JP, Trinchieri G, Besra GS, Cerundolo V, Sher A. Cord factor and peptidoglycan recapitulate the Th17-promoting adjuvant activity of mycobacteria through mincle/CARD9 signaling and the inflammasome. J Immunol. 2013:5722-30.

120. Sommer K, Guo B, Pomerantz JL, Bandaranayake AD, Moreno-Garcia ME, Ovechkina YL, Rawlings DJ. Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. Immunity. 2005:561-74.

121. Staal J, Driege Y, Bekaert T, Demeyer A, Muyllaert D, Van Damme P, Gevaert K, Beyaert R. T-cell receptor-induced JNK activation requires proteolytic inactivation of CYLD by MALT1. EMBO J. 2011:1742-52.

122. Stein H, Kaiserling E, Lennert K. Evidence for B-cell origin of reticulum cell sarcoma. Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 1974:51-67.

123. Stilgenbauer S. Prognostic markers and standard management of chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2015:368-77.

124. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Dohner H, German CLLSGCll. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. Leukemia. 2002:993-1007.

125. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, Puvvada SD, Wendtner CM, Roberts AW, Jurczak W, Mulligan SP, Bottcher S, Mobasher M, Zhu M, Desai M, Chyla B, Verdugo M, Enschede SH, Cerri E, Humerickhouse R, Gordon G, Hallek M, Wierda WG. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. Lancet Oncol. 2016:768-78.

126. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, Buhler A, Bottcher S, Ritgen M, Kneba M, Winkler D, Tausch E, Hoth P, Edelmann J, Mertens D, Bullinger L, Bergmann M, Kless S, Mack S, Jager U, Patten N, Wu L, Wenger MK, Fingerle-Rowson G, Lichter P, Cazzola M, Wendtner CM, Fink AM, Fischer K, Busch R, Hallek M, Dohner H. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. Blood. 2014:3247-54.

127. Sun SC. The noncanonical NF-kappaB pathway. Immunol Rev. 2012:125-40.

128. Swerdlow S CE, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Arber D, Hasserjian R, Le Beau M, Orazi A, Siebert R. WHO Classification of Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 2017:CLL: S. 216-21 und DLBCL: S. 91-97.

129. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016:2375-90.

130. Tanner MJ, Hanel W, Gaffen SL, Lin X. CARMA1 coiled-coil domain is involved in the oligomerization and subcellular localization of CARMA1 and is required for T cell receptor-induced NF-kappaB activation. J Biol Chem. 2007:17141-7.

131. Thome M. Multifunctional roles for MALT1 in T-cell activation. Nat Rev Immunol. 2008:495-500.

132. Thome M, Charton JE, Pelzer C, Hailfinger S. Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010:a003004.

133. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. Cancer. 2005:216-28.

134. Vucic D, Dixit VM. Masking MALT1: the paracaspase's potential for cancer therapy. J Exp Med. 2009:2309-12.

135. Wagener M, Hoving JC, Ndlovu H, Marakalala MJ. Dectin-1-Syk-CARD9 Signaling Pathway in TB Immunity. Front Immunol. 2018:225.

136. Weinstein JA, Jiang N, White RA, 3rd, Fisher DS, Quake SR. High-throughput sequencing of the zebrafish antibody repertoire. Science. 2009:807-10.

137. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, Xue L, Li DH, Steggerda SM, Versele M, Dave SS, Zhang J, Yilmaz AS, Jaglowski SM, Blum KA, Lozanski A, Lozanski G, James DF, Barrientos JC, Lichter P, Stilgenbauer S, Buggy JJ, Chang BY, Johnson AJ, Byrd JC. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. N Engl J Med. 2014:2286-94.

138. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, Henderson JM, Kutok JL, Rajewsky K. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. Nat Immunol. 2008:405-14.

139. Zhou Y, Ye H, Martin-Subero JI, Hamoudi R, Lu YJ, Wang R, Siebert R, Shipley J, Isaacson PG, Dogan A, Du MQ. Distinct comparative genomic hybridisation profiles in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with and without t(11;18)(q21;q21). Br J Haematol. 2006:35-42.