

Universitätsklinikum Ulm
Institut für Pathologie
Institutsleiter: Prof. Dr. med. Peter Möller

**Gezielte Resequenzierung von
therapeutisch relevanten Mutationen im
primär mediastinalen B-Zell Lymphom**

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

von
Philipp Daniel Nagel
geboren in Stuttgart, Deutschland

2015

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Möller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Lars Bullinger

Tag der Promotion: 13.01.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1. Material.....	3
2.1.1. Reagenzien und Laborausstattung.....	3
2.1.2. Oligonukleotide	4
2.1.3. Zelllinien.....	5
2.2. Methoden.....	5
2.2.1. Auswahl der Kandidatengene für eine gezielte Resequenzierung	5
2.2.2. Auswahl der Patienten.....	6
2.2.3. DNA-Extraktion aus Gewebelysaten	6
2.2.4. Genotypisierung.....	7
2.2.5. Statistische Auswertung	11
3. Ergebnisse	12
3.1. Die Gene <i>BRAF</i> , <i>KRAS</i> und <i>KIT</i> sind Kandidaten für eine gezielte Resequenzierung in PMBL	12
3.2. Identifikation von <i>KIT</i> -Hotspot-Mutationen in 4 von 30 PMBL-Patienten.....	13
3.3. <i>BRAF</i> - und <i>KRAS</i> -Hotspot-Mutationen sind in PMBL nicht vorhanden.....	15
3.4. Die Mutationsfrequenz von <i>BRAF</i> - und <i>KRAS</i> -Hotspot-Mutationen in DLBCL ist geringer als erwartet.....	16
4. Diskussion	18
4.1. Der Stellenwert der Gene <i>BRAF</i> , <i>KRAS</i> und <i>KIT</i> als Biomarker	18

4.2. PMBL-Zelllinien zeigen ebenfalls <i>KIT</i> -Hotspot-Mutationen	20
4.3. Vor- und Nachteile gezielter Resequenzierung	21
5. Zusammenfassung	25
6. Literaturverzeichnis.....	26
6.1. Software und Online-Datenbanken	33
6.2. Copyright und Verlagsrecht	34
Danksagung	36
Curriculum Vitae	37

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ATP	Adenosin-Triphosphat
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
Karpas1106	Karpas 1106 primär mediastinale B-Zell Lymphom Zelllinie
KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
M	Molar
mA	Milliampere
MedB-1	MedB-1 primär mediastinale B-Zell Lymphom Zelllinie
Min./Max.	Minimal / Maximal
min	Minute
Mut.	Mutiert
NaCl	Natriumchlorid
N, n	Anzahl
N/V	Nicht verfügbar
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMBL	Primär mediastinales B-Zell Lymphom
pmol	Pikomol
PPi	Pyrophosphat
Sec	Sekunde
TAE	Pufferlösung aus Tris, Acetat, Ethylendiamintetraacetat
TEN	Pufferlösung aus Tris, Ethylendiamintetraacetat, Natriumchlorid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
U-2940	U-2940 primär mediastinale B-Zell Lymphom Zelllinie
µg	Mikrogramm

Abkürzung	Erklärung
μl	Mikroliter
WGS	Genomweite Sequenzierung
WT	Wildtyp
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

1. Einleitung

Non-Hodgkin-Lymphome sind maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems. Die beschriebene Inzidenz liegt etwa bei 5 Prozent aller neu diagnostizierten, bösartigen Tumoren und somit noch höher als die der Leukämien (Siegel et al., 2015).

Innerhalb der Non-Hodgkin-Lymphome stellt das primär mediastinale B-Zell Lymphom (PMBL) einen Subtyp des diffus großzelligen B-Zell Lymphoms (DLBCL) dar. PMBL ist ein hochaggressiver Tumor, der vor allem bei jungen Frauen auftritt und durch sein invasives, intrathorakales Wachstum zu Symptomen wie Schmerzen, Einflusstauungen und lebensbedrohlicher Dyspnoe führen kann (Barth et al., 2002; Möller et al., 1986). Die momentan etablierte Immuno-Chemotherapie führt zwar bei einem großen Teil der betroffenen Patienten zu einer Remission (Pfreundschuh et al., 2008), aber dennoch versagt die Erstlinien-Therapie bei bis zu 20% der PMBL-Patienten (Rieger et al., 2011). Andere DLBCL-Subtypen haben eine noch schlechtere Prognose (Pfreundschuh et al., 2008). Für diese Patienten sind bessere Therapieansätze nötig. Deshalb sind effektivere Therapiestrategien momentan Gegenstand der Forschung, um die Heilungsraten von PMBL- oder DLBCL-Patienten zu verbessern (Dunleavy et al., 2013; Roschewski et al., 2012).

Im letzten Jahrzehnt haben Medikamente, die gezielt mit pathologisch veränderten Signalwegen eines Tumors interferieren, die Behandlungsstrategien in der Krebstherapie revolutioniert. Voraussetzung für diese sogenannte *targeted therapy* ist unter anderem die Entdeckung von genetischen Varianten, die Hinweise auf veränderte, unterliegende Signalwege bieten, und somit einen Angriffspunkt für potentielle Therapien darstellen. Aus diesem Grund ist die Erfassung von pathologischen Veränderungen auf genetisch-molekularer Ebene zu einem Schlüsselement in der Erforschung von neuen, erfolgversprechenden Therapieansätzen geworden. Es gibt eine Vielzahl an Tumorerkrankungen, bei denen sich diese Strategie einer zielgerichteten Therapie erfolgreich bewährt hat: Die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (Druker et al., 2001), des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Shaw et al., 2011), oder des metastasierten Melanoms (Davies et al., 2002), seien hier exemplarisch als Beispiele genannt.

Für DLBCL- und PMBL-Patienten gibt es allerdings, trotz zunehmender *in-vivo*-Daten, noch keine etablierten zielgerichteten Therapiestrategien (Roschewski et al., 2014).

Ein möglicher Grund hierfür sind die genetischen Unterschiede zwischen den DLBCL-Subtypen und zusätzlich die genetische Heterogenität zwischen DLBCL-Patienten. Beides erschwert die Identifikation molekularer Veränderungen, die als Angriffspunkte für eine zielgerichtete Therapie dienen können. Allerdings bietet hier der rasante Fortschritt im Bereich der Gensequenzierung mittlerweile neue Möglichkeiten: Mehrere Studien gestatten nun einen detaillierten, exom- oder genomweiten Einblick in das Mutationsspektrum von DLBCL (Gunawardana et al., 2014; Lohr et al., 2012; Morin et al., 2013; Pasqualucci et al., 2011; Zhang et al., 2013). Diese aufwändigen Studien konnten nun in der Tat wiederkehrende genetische Varianten aufzeigen, die für eine zielgerichtete Therapie Angriffspunkte darstellen könnten. So wurden beispielsweise in DLBCL-Patienten Mutationen in den klassischen Onkogenen *BRAF* und *KRAS* entdeckt (Lohr et al., 2012). Andere Studien mit Fokus auf den PMBL-Subtyp beschrieben ebenfalls interessante, genetische Veränderungen mit potentiell therapeutischem Nutzen (Gunawardana et al., 2014; Hanna et al., 2014).

Die Analyse molekularer Zielstrukturen auf genomweiter Ebene öffnet deshalb neue Wege und Perspektiven für zukünftige Therapieverfahren. Für erkrankte Patienten wäre es deshalb erstrebenswert, gezielt und effizient die Prävalenz solcher eventuell therapierbarer Mutationen zu erfassen. Bisher ist jedoch der Mutationsstatus vieler relevanter Protoonkogene, darunter auch *BRAF* und *KRAS*, in PMBL unbekannt.

Mit dieser Arbeit soll deshalb geprüft werden, ob durch gezielte Resequenzierungsverfahren wiederkehrende Mutationen in PMBL nachzuweisen sind, die als mögliche Angriffspunkte für neue zielgerichtete Therapien dienen könnten. Dazu werden die Mutationsfrequenzen in ausgewählten, klinisch relevanten Genen in PMBL- / DLBCL-Patienten und PMBL- / DLBCL-Zelllinien bestimmt, und die detektierten Varianten molekulargenetisch analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien und Laborausstattung

Tabelle 1: Chemikalien

Agarose High Resolution	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure (100%)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol (100%)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Etidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Apotheke Universitätsklinikum Ulm, Deutschland

Tabelle 2: Laborkits und Pufferlösungen

GenomeLab DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
PCR-Reagenzien	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
rTaq DNA Polymerase	
DNA Polymerisation Mix dNTP	
PeqGOLD Gel Extraction Kit	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
PerfectBind DNA Columns	
Binding Buffer	
CG Wash Buffer	
Elution Buffer	
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PyroMark Q24 System	Quiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Binding Buffer	
PyroMark Annealing Buffer	
PyroMark Gold Q24 Reagents	
PyroMark Q24 Cartridge	
Denaturation Solution	
QIAamp DNA Mini Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Buffer AE / AW1 / AW2 / AL	
QIAamp Mini Spin Columns	
Proteinase K	
Streptavidin Sepharose Beads	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
TAE-Pufferlösung	(96,8g Tris, 22,8ml Essigsäure, 7,44g EDTA)
TEN-Pufferlösung	(1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 0,1M NaCl)

Tabelle 3: Laborausstattung

Elektrophoresekammer		AGS Gmbh, Heidelberg, Deutschland
Glaskolben		VWR, Radnor, PA, USA
Handschuhe	Sempercare	Sempermed, Wien, Österreich
Heizblock	Typ 2099	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Kapillar-Sequenzierer	GenomeLab GeXp	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Kühlkombination	Liebherr Premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikrowelle	M1719N	Samsung Electronics, Seoul, Südkorea
PCR-Thermocycler	Primus 96 Plus	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pyrosequenzierer	PyroMark Q24	Quiagen, Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäße		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Skalpelli-Klingen		Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Spannungsgeber	EPS 301	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Spektrometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
UV-Kammer	Alphaimager EP	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Vortexer	VTX 3000L Uzusio	LMS, Tokio, Japan
Waage	EMB 1200-1	Kern, Balingen, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2. Oligonukleotide

Tabelle 4: Primer

<i>BRAF</i>	
Primer (vorwärts)	5'-biotin-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3'
Primer (rückwärts)	5'-AGCATCTCAGGGCCAAAAAT-3'
Sequenzier-Primer	5'-GACCCACTCCATCGAG-3'
<i>KRAS</i>	
Primer (vorwärts)	5'-CACATTTTCATTATTTTTATTATAAGGCCTG-3'
Primer (rückwärts)	5'-biotin-GAATTAGCTGTATCGTCAAGGCACTC-3'
Sequenzier-Primer	5'-TGTGGTAGTTGGAGCT-3'
<i>KIT</i>	
Primer (vorwärts)	5'-CGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGT-TGGTGTACTGAATACTTTAAACAAAAG-3'
Primer (rückwärts)	5'-TGCAGGACTGTCAAGCAGAG-3'
Sequenzier-Primer 1	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'
Sequenzier-Primer 2	5'-TGCAGGACTGTCAAGCAGAG-3'

Alle verwendeten Primer (Biomers.net, Ulm, Deutschland) wurden auf eine Konzentration von 100pmol/µl eingestellt und als Stammlösungen bei -20°C gelagert.

2.1.3. Zelllinien

Die Auswahl an Zelllinien umfasste alle drei verfügbaren PMBL-Zelllinien, Karpas1106, MedB-1 und U-2940 (Möller et al., 2001; Nacheva et al., 1994; Sambade et al., 2006), sowie folgende 13 DLBCL-Zelllinien: HBL1, OCI-Ly3/Ly10, CTB1, RI-1, SU-DHL-4/-5/-6/-8, DOHH-2, Pfeiffer, RCK8 und Karpas422. Die Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Eine Ausnahme stellte die Zelllinie MedB-1 dar, die am Institut für Pathologie der Universität Ulm etabliert wurde (Möller et al., 2001). Die Zelllinien wurden als Zellpellets gemäß etablierten Standards bei -80°C gelagert.

2.2. Methoden

2.2.1. Auswahl der Kandidatengene für eine gezielte Resequenzierung

Die Auswahl geeigneter Kandidatengene für eine gezielte Resequenzierung basierte auf einer Durchsicht mehrerer online-Plattformen. Das Angebot des Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) (<http://cancer.sanger.ac.uk>) ermöglichte es, Gene mit wiederkehrenden Mutationen in DLBCL zu erfassen. Mittels der Suchfunktion „Cancer Browser“ und der Liste der „top 20 genes“ konnten die verfügbaren Mutationsfrequenzen pro Gen abgerufen werden. Zusätzlich wurde eine Literaturrecherche in PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) durchgeführt, um weitere, wiederkehrende Genvarianten zu überprüfen und ebenfalls deren Mutationsfrequenz zu erfassen. Mögliche therapeutische Ansätze für bestimmte Genmutationen lieferten Suchanfragen (Name des Gens + „Inhibitor“) im Verzeichnis von ClinicalTrials (<http://clinicaltrials.gov>). Berücksichtigt wurden klinische Studien in Phase III oder IV und bereits etablierte Therapieoptionen.

2.2.2. Auswahl der Patienten

An DLBCL oder an PMBL erkrankte Patienten wurden mittels ICD-O-Code oder durch Schlagwortsuche im Informatiksystem des Universitätsklinikums Ulm identifiziert (1984-2013). Einschlusskriterien für Patienten waren: (1) Eine nach der Richtlinie der World Health Organization (Gaulard et al., 2008) gesicherte Diagnose und (2) die Verfügbarkeit von Tumormaterial für nachfolgende genetische Analysen. Individuelle und klinische Parameter (Geschlecht, Alter bei Diagnosestellung, Stadium der Erkrankung bei Erstmanifestation und Therapieverlauf) wurden, falls vorhanden, aus den Krankenakten übernommen oder über die Datenbank des Comprehensive Cancer Center Ulm bezogen.

2.2.3. DNA-Extraktion aus Gewebelysaten

Nach histologischer Bestätigung der angegebenen Diagnose wurden die Tumoreale anhand von Hämatoxylin & Eosin gefärbten Schnitten identifiziert und markiert. Nachfolgend wurden aus formalin-fixiertem, paraffiniertem Patientenmaterial die entsprechenden Tumoreale mikrodissiziert. Die Entparaffinierung erfolgte jeweils durch dreimaliges Waschen in Xylol und anschließendem zweimaligen Waschen in Ethanol. Nach vollständiger Entparaffinierung wurden die Gewebestandteile in 180µl TEN-Pufferlösung und 20µl Proteinase K (20µg/ml) gelöst und bei 56°C über Nacht lysiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 90°C (10min) zur Denaturierung der Proteinase K. Zellpellets wurden direkt in 200µl PBS und 20µl Proteinase K resuspendiert. Es erfolgte ebenfalls eine Inkubation bei 56°C (10min).

Die anschließende DNA-Extraktion folgte dem QIAamp DNA mini Kit Protokoll (Quiagen, Hilden, Deutschland). Alle folgenden Schritte wurden nun für Gewebelysate und Zelllysate gleichermaßen angewandt:

Die Lysate wurden nach Zugabe von je 200µl des Puffers AL und 200µl Ethanol kurz gemischt und in QIAamp Mini spin columns überführt, um anschließend bei 8.000Upm (1min) zentrifugiert zu werden. Die Membran der QIAamp Mini spin column bindet dabei die DNA. Zur Aufreinigung folgten zwei Waschschriffe durch Zugabe von je 500µl Waschpuffer AW1 und AW2 und anschließender Zentrifugation bei 8.000Upm (1min).

Um Rückstände der Waschpuffer vollständig zu entfernen, erfolgte die Trocknung der Membran durch eine weitere Zentrifugation bei 14.000Upm (3min). Danach wurde die QIAamp Mini spin column in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß platziert und 200µl des Puffers AE auf die getrocknete Membran gegeben. Durch abschließende Zentrifugation bei 8.000Upm (1min) wurde die DNA eluiert. Aufbereitete DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.4. Genotypisierung

Die verwendeten Methoden zur Genotypisierung basierten auf bereits etablierten oder in der klinischen Routinediagnostik eingesetzten Verfahren (Lennerz et al., 2012). Die im Folgenden beschriebenen Techniken folgten den Standardarbeitsanweisungen des Instituts für Pathologie der Universität Ulm.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik dient der Amplifikation spezifischer Abschnitte der DNA. Dieses Verfahren basiert auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten: Denaturierung doppelsträngiger DNA, Anlagerung von Primern und nachfolgender Elongation. Da im nächsten Zyklus die neu synthetisierten Produkte ebenfalls wieder als Matrizen zur Verfügung stehen, ergibt sich eine Kettenreaktion mit exponentieller Vermehrung des auserwählten DNA-Abschnittes.

Die hierfür benötigten Reagenzien (Tabelle 5) wurden auf Eis vorbereitet. Der Vorlage von 51,5µl Mastermix wurden jeweils 3µl DNA (oder Lysat) zugegeben. Anschließend wurden die Proben in der auf 95°C vorgeheizten PCR-Maschine platziert und das PCR-Programm (Tabelle 6) gestartet.

Tabelle 5: PCR-Reagenzien und Mischungsverhältnisse

Reagenz	Menge (µl)
Mastermix	51,5
Aqua	45
10-fach PCR-Puffer	5
Primer vorwärts (100pmol/µl)	0,25
Primer rückwärts (100pmol/µl)	0,25
Polymerisation Mix dNTP	0,5
rTaq Polymerase	0,5
DNA	3

Tabelle 6: Protokoll des verwendeten PCR-Programms

Zyklen (n)	Eigenschaft der Zyklen
Start	[95°C 5 min]
2x	[95°C 30 sec; 62°C 30 sec; 72°C 30 sec]
2x	[95°C 30 sec; 60°C 30 sec; 72°C 30 sec]
2x	[95°C 30 sec; 58°C 30 sec; 72°C 30 sec]
35x	[95°C 30 sec; 58°C 30 sec; 72°C 30 sec]
1x	[72°C 10 min]
Ende	[10°C, ∞]

Von den resultierenden PCR-Produkten wurden je 15µl *BRAS*- / *KRAS*-Aliquote, und 54,5µl der *KIT*-Produkte auf 1,5%-Agarosegel (100ml Aqua, 1,5g Agarose, 10ml TAE-Pufferlösung, 2 Tropfen Etidiumbromid) aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (130Volt, 400mA, 40min). Mittels UV-Licht konnten die Amplifikate als Banden dargestellt werden, um den Erfolg der PCR zu kontrollieren. Die Banden amplifizierter *KIT*-PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des peqGOLD Microspin Gel Extraktions Kit (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) aufgereinigt: Hierzu wurden die DNA-enhaltenden Agarosestücke in gleichem Volumenanteil Bindepuffer gelöst, bei 56°C inkubiert (7min), und danach mittels PerfectBind DNA Columns und definierten Waschschritten (2x 750µl CG Waschpuffer, 8.000Upm, 1min) von Agaroseresten befreit. Abschließend erfolgte die DNA-Elution mittels 50µl Elutionspuffer bei 6.000Upm (1min).

Pyrosequenzierung

Pyrosequenzierung basiert auf dem sequenziellen Einbau von Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs) in einzelsträngige DNA-Matrizen. Dabei werden durch äquimolar freiwerdende Mengen an Pyrophosphat (PPi) Lichtsignale generiert, die optisch erfasst werden, und in Form von Pyrogrammen aufgezeichnet werden.

Für die Pyrosequenzierung der Gene *BRAF* und *KRAS* wurde hier das vollautomatisierte PyroMark Q24 System (Quiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Vor Beginn der Pyrosequenzierung mussten die PCR-Produkte gereinigt und als Einzelstrang-DNA aufgearbeitet werden. Einer der beiden PCR-Primer besitzt deshalb am 5'-Ende eine Biotinylierung, die wiederum eine Anbindung der PCR-Produkte an Streptavidin-beschichtete Sepharose-Partikel zur Fixierung ermöglicht. Durch mehrere Waschschriffe mittels Ethanol und einer

Lösung zur Denaturierung doppelsträngiger DNA werden PCR-Reagenzien und nicht-biotinylierte DNA-Einzelstränge eliminiert. Zu der so aufbereiteten DNA werden die Sequenzierungsprimer hinzugefügt und das Gemisch kurzzeitig auf 80°C erwärmt, sodass während der Abkühlung auf Raumtemperatur die Primer hybridisieren können. Nach Zugabe der Enzyme DNA-Polymerase, Adenosin-Triphosphat-(ATP)-Sulfurylase, Apyrase, Luziferase und den Substraten Adenosin-5'-Phosphosulfat und Luziferin, kann der eigentliche Sequenzierungsschritt erfolgen. Hierzu werden nacheinander in definierter Abfolge je eine Art der 4 dNTPs hinzugefügt. Wenn eine komplementäre Base in der Matrize den Einbau des aktuell verfügbaren dNTPs durch die Polymerase ermöglicht, wird PPI in äquimolarer Menge freigesetzt. Das Enzym ATP-Sulfurylase konvertiert dann in Anwesenheit von Adenosin-5'-Phosphosulfat das Substrat PPI zu ATP. Dieser Energiespeicher dient nachfolgend wiederum der Umwandlung von Luziferin zu Oxyluziferin mittels des Enzyms Luziferase. Diese Reaktion erzeugt Licht in proportionaler Menge zu der ehemals vorhanden Menge an PPI und spiegelt somit quantitativ den Einbau des aktuellen dNTP wider. Die erzeugte Lichtmenge wird automatisch mittels einer Kamera erfasst und in Form eines Pyrogramm-Schaubildes aufgezeichnet. Überschüssiges ATP oder nicht eingebaute dNTPs werden durch Apyrase enzymatisch degradiert. Somit kann im nächsten Zyklus verhindert werden, dass zwei verschiedene Arten dNTPs gleichzeitig im Reaktionsgefäß vorliegen.

Die hier verwendete Abfolge der dNTPs war optimiert für die Bestimmung der Basensequenz an Mutationshotspots der Onkogene *BRAF* (c.1798-c.1802 / p.V600-p.K601) und *KRAS* (c.34-c.48 / p.G12-p.G16).

Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung des *KIT*-Gens (Exon 17) erfolgte mittels des traditionellen Verfahrens nach Sanger. Diese Technik basiert ebenfalls auf dem Prinzip der PCR und determiniert die Basenabfolge eines Genabschnittes durch den Einbau von Didesoxynukleosid-Triphosphaten (ddNTPs), die zum Kettenabbruch führen. Durch den Kettenabbruch resultieren Fragmente unterschiedlicher Länge, die anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Aufgrund der durch Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlich markierten ddNTPs enthält jedes Fragment ein optisches Signal, welches die Art des zuletzt eingebauten Nukleotids codiert. In

aufsteigender Größe der Fragmente ergeben die optischen Signale somit die komplementäre Sequenz des untersuchten DNA-Abschnittes. Zur hier erfolgten Sequenzierung wurden jeweils 1 µl der aufgereinigten *KIT*-Amplifikate verwendet. Diese wurden zusammen mit weiteren Reagenzien (Tabelle 7) gemischt und zur Synthese der Sequenzierungsprodukte in der vorgewärmten PCR-Maschine platziert. Nach Ablauf des Sequenzierprogrammes (Tabelle 8) erfolgte die vollautomatisierte Auftrennung und das Auslesen der Nukleotidabfolge mittels eines GenomeLab GeXP Kapillar-Sequenzierers (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Tabelle 7: Reagenzien für die Sequenzierung nach Sanger

Reagenz	Menge (µl)
GenomeLab DTCS Quick Start Kit	4
Aqua	4
Sequenzierprimer (5pmol/µl)	1
Amplifikat	1

Tabelle 8: Protokoll des PCR-Programms zur Sequenzierung

Zyklen (n)	Eigenschaft der Zyklen
Start	[95°C 5 min]
30x	[96°C 20 sec; 50°C 20 sec; 60°C 4 min]
Ende	[8°C, ∞]

Sequenzanalyse

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden die Rohdaten auf genetische Varianten untersucht. Die Analyse der Sequenzierungsergebnisse nach Sanger erfolgte mittels der Software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA). Zum Basenabgleich der resultierenden Sequenzen wurde die aktuelle humane Genom-Referenzsequenz verwendet (human genome reference sequence build; GRCh38). Für die Detektion von Basenvarianten wurde die automatische Suchfunktion des Programms verwendet. Mutierte und Wildtyp-Proben wurden manuell überprüft. Basenvarianten mit einer Allelfrequenz von >10% (Sanger-Verfahren) wurden dann mit der COSMIC Datenbank (<http://cancer.sanger.ac.uk>) verglichen. Mit Hilfe der Histogramm-Funktion konnte bestimmt werden, ob an der Position der detektierten Variante bereits Mutationen in anderen Tumorarten vorbeschrieben waren.

Für die Auswertung der Pyrosequenzierungsergebnisse wurden die resultierenden Pyrogramme manuell auf Mutationen überprüft und von mindestens einer weiteren Person als korrekt bestätigt. Lichtsignale mit einer relativen Intensität $\leq 5\%$ wurden als Wildtyp gewertet.

2.2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Programms Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) und der online frei verfügbaren Version von GraphPad QuickCalcs (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>). Für Vergleiche zwischen zwei Kohorten wurde der *t*-Test (Verhältnis zweier Mediane) und der exakte Fisher-Test (kategorische, dichotome Daten) angewandt. Außerdem fand der Chi-Quadrat-Test in der Analyse von kategorischen Daten mit mehr als 2 Ausprägungen (Ann-Arbor-Stadien) Verwendung. Als statistisch signifikant wurden *p*-Werte $\leq 0,05$ angesehen. 95%-Konfidenzintervalle (CI) für Prozentangaben wurden mittels GraphPad QuickCalcs unter Verwendung der Methode nach Clopper und Pearson ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Die Gene *BRAF*, *KRAS* und *KIT* sind Kandidaten für eine gezielte Resequenzierung in PMBL

Drei Gene konnten als Kandidaten für eine gezielte Resequenzierung in PMBL identifiziert werden: Die Protoonkogene *BRAF*, *KRAS* und *KIT*. Mehrere wichtige Eigenschaften kennzeichnen diese drei Kandidaten. Einerseits zeigen diese Gene fast ausschließlich Mutationen an einer bestimmten Aminosäureposition, deren Veränderung onkogen wirkt (*mutational hotspot*). Solch ein bekannter Mutationshotspot eignet sich hervorragend zur gezielten Resequenzierung, da er nur einen kurzen, definierten Genabschnitt bietet, der sequenziert und analysiert werden muss. Des Weiteren ergab die Analyse der Datenbank „ClinicalTrials“ (<https://clinicaltrials.gov/>), dass für alle drei Kandidaten gezielte pharmakologische Behandlungsoptionen in späten klinischen Studien getestet werden oder schon verfügbar sind. Für die Gene *BRAF* und *KIT* gibt es mehrere, klinisch etablierte Tyrosinkinaseinhibitoren (beispielsweise Vemurafenib oder Dasatinib), die bereits bei anderen Krebsarten erfolgreich eingesetzt werden. Auch für *KRAS*-mutierte Krebsarten fanden sich Inhibitoren, die unterliegende Signalwege selektiv über *mitogen-activated-protein*-Kinasen hemmen können. Drittens ist bei allen drei Kandidaten der Mutationsstatus in PMBL bisher ungeklärt, obwohl *BRAF*- und *KRAS*-Mutationen in kürzlich erschienenen Publikationen als mögliche onkogene Veränderungen im Genom von DLBCL-Patienten beschrieben wurden. Online-Recherchen in der COSMIC Datenbank (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) bestätigten das *KIT*-Gen als möglichen Kandidat für eine gezielte Resequenzierung: Zum Zeitpunkt der Recherche wurde das *KIT*-Gen mit einer Mutationsfrequenz von 7% unter den 20 am häufigsten mutierten Genen in DLBCL gelistet („top 20 genes“-Statistik der COSMIC Datenbank, Stand: November 2013), während für den Subtyp PMBL keine Prävalenzen verfügbar waren. Im Verlaufe der Ausarbeitung dieser Arbeit ist die Mutationsrate für das *KIT*-Gen in DLBCL auf 5% gesunken, für PMBL gibt es jedoch immer noch keine verfügbaren Mutationsfrequenzen in COSMIC (Stand: Mai 2015).

Die online-Recherche argumentierte somit für die gezielte Resequenzierung der Gene *KIT*, *BRAF* und *KRAS* in PMBL- und DLBCL-Patienten.

3.2. Identifikation von *KIT*-Hotspot-Mutationen in 4 von 30 PMBL-Patienten

Insgesamt entsprachen 84 Patienten den Einschlusskriterien für eine gezielte Resequenzierung. Die Kohorte gliederte sich in 49 PMBL-Patienten und 35 Patienten, die an anderen DLBCL-Subtypen erkrankt waren (Tabelle 9).

Betrachtet man die Merkmale der Patienten, fallen wichtige klinische Unterschiede zwischen PMBL und DLBCL auf: PMBL-Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung signifikant jünger als die DLBCL-Patienten ($p \leq 0,001$). Frauen waren im Vergleich zu Männern häufiger betroffen, allerdings zeigte die Geschlechterverteilung hier keinen signifikanten Unterschied zwischen DLBCL und PMBL ($p=0,825$).

Tabelle 9: Patientenmerkmale und Ergebnisse der gezielten Resequenzierung

Abkürzungen: *BRAF*, *KRAS*, *KIT*, Namen der resequenzierten Gene; DLBCL, diffus großzelliges B-Zell Lymphom; max., maximal; min., minimal; mut, mutiert; N/V, nicht verfügbar; n, Anzahl der Patienten; PMBL, primär mediastinales B-Zell Lymphom; vs., versus; WT, Wildtyp. ^{A)}(Nagel et al., 2014a) ^{B)}(Nagel et al., 2014b)

	PMBL	DLBCL
Patienten (n)	49	35
Alter (Jahre)		
Median (min./max.)	41 (21-73)	66 (35-88)
Geschlecht (n (%))		
Weiblich	27 (55)	18 (51)
Männlich	22 (45)	17 (49)
Ann-Arbor-Stadium (n (%))		
I	4 (8)	9 (26)
II	21 (43)	12 (34)
III	3 (6)	3 (9)
IV	16 (33)	11 (31)
N/V	5 (10)	0 (0)
Follow up (Monate)		
Median (min./max.)	14 (1-167)	10 (1-69)
Tod (n)	3	13
Ergebnis der Resequenzierung	WT vs. mut.	WT vs. mut.
<i>BRAF</i> ^{A)} V600 / K601	49 vs. 0	35 vs. 0
<i>KRAS</i> ^{A)} G12 - K16	49 vs. 0	35 vs. 0
<i>KIT</i> ^{B)} Exon 17	26 vs. 4	-

Die Mehrzahl aller Patienten wies bei Diagnosestellung ein Ann-Arbor-Stadium II auf und mehr als ein Fünftel der PMBL-Patienten präsentierte eine große Tumormasse (*bulky mass*; $n=10/49$) mit einem Durchmesser von mehr als 10cm vor Therapiebeginn.

Die Pyrosequenzierung der Gene *BRAF* und *KRAS* aus der DNA aller Patienten ergab ausnahmslos Wildtyp-Status (PMBL: $n=0/49$, DLBCL: $n=0/35$). Die Beurteilung des *KIT*-Mutationsstatus mittels Resequenzierung nach Sanger war beschränkt auf 30 der 49 PMBL-Patienten. Grund hierfür war das spärliche Biopsiematerial und/oder der Qualitätsverlust der DNA in älteren Gewebeproben. Die klinischen Daten der Patienten, die auf *KIT*-Mutationen getestet werden konnten ($n=30$), unterschieden sich nicht signifikant zu der gesamten PMBL-Kohorte ($n=49$) ($p=0,46-1,00$). Trotz der Beschränkung auf nur 30 PMBL-Patienten, konnten insgesamt 4 *KIT*-Mutationen entdeckt werden (Abbildung 1). Dies entspricht einer Mutationsfrequenz von 13,3% ($n=4/30$, 95% Konfidenzintervall [CI]: 4 - 31%).

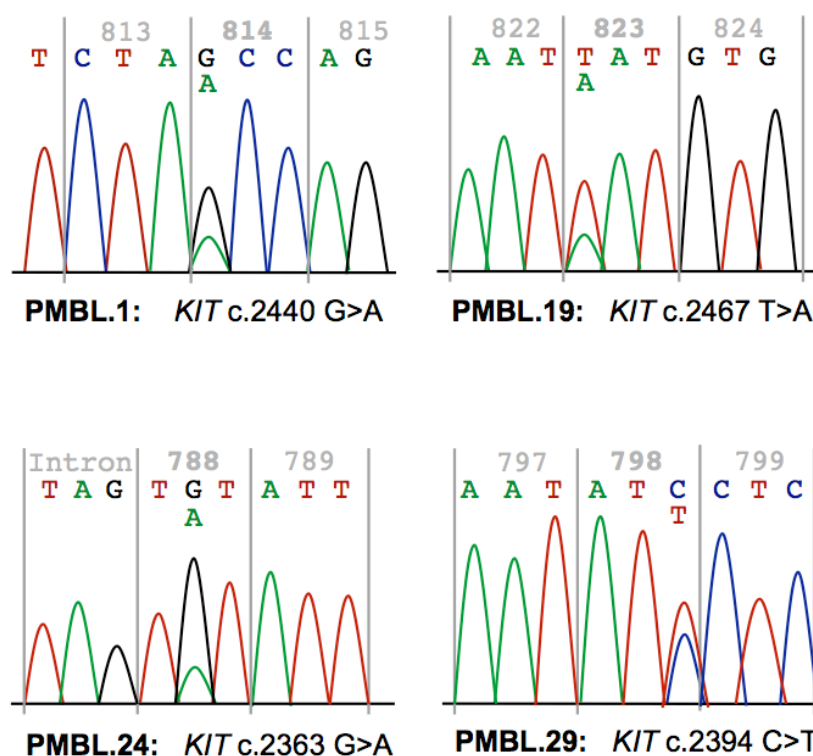


Abbildung 1: Ergebnisse der Sequenzierung nach Sanger

Dargestellt sind Ausschnitte der Gensequenzen aller vier *KIT*-mutierten Patientenproben (PMBL.1, PMBL.19, PMBL.24 und PMBL.29). *Abkürzungen:* A, Adenin; C, Cytosin; c., Basenposition; G, Guanin; PMBL, primär mediastinales B-Zell Lymphom; T, Thymin. (Nagel et al., 2014b)

Die detektierten *KIT*-Mutationen in PMBL-Patienten wurden nachfolgend auf ihre genetischen Eigenschaften untersucht (Tabelle 10).

Tabelle 10: *KIT*-Mutationen in PMBL-Patienten

Abkürzungen: c., Basenposition; m, männlich; p., Aminosäureposition; PMBL., primär mediastinales B-Zell Lymphom (Patientennummer); w, weiblich. (Nagel et al., 2014b)

Patient	PMBL.1	PMBL.19	PMBL.24	PMBL.29
Geschlecht	m	w	m	m
Alter (Jahre)	28	43	28	27
Stadium	III	II	III	II
Nukleotid-substitution	c.2440G>A	c.2467T>A	c.2363G>A	c.2394C>T
Aminosäure-substitution	p.A814T	p.Y823N	p.C788Y	p.I798I
Typ	nicht-synonym	nicht-synonym	nicht-synonym	synonym
Exon	17	17	17	17

Die Auswertung der 4 detektierten Varianten lieferte 3 nicht-synonyme und eine synonyme Mutation (PMBL.29: c.2394C>T, p.I798I), die alle die Tyrosinkinasedomäne (p.L598-p.I924) des *KIT*-Gens betreffen. Die 3 nicht-synonymen Basensubstitutionen befinden sich in unmittelbarer Nähe zu einer Position, die als *KIT*-Mutations-Hotspot (p.D816) bekannt ist. COSMIC verzeichnet an diesem Hotspot des *KIT*-Gens (p.D816) einen Spitzenwert von über 1800 annotierte Mutationen (Stand: Mai 2015).

3.3. *BRAF*- und *KRAS*-Hotspot-Mutationen sind in PMBL nicht vorhanden

Zusätzlich zu den getesteten 84 Patienten wurden auch insgesamt 3 PMBL-Zelllinien und 13 DLBCL-Zelllinien mittels Pyrosequenzierung an der *BRAF*-/*KRAS*-Hotspots-Region genotypisiert. Alle getesteten Zelllinien wiesen ebenfalls Wildtyp in beiden Kandidatengenen auf (Tabelle 11).

Tabelle 11: Ergebnisse der Genotypisierung von PMBL- und DLBCL-Zelllinien

Abkürzungen: DLBCL, diffus großzelliges B-Zell Lymphom; mut., mutiert; n, Anzahl; PMBL, primär mediastinales B-Zell Lymphom; vs., versus; WT, Wildtyp. (Nagel et al., 2014a)

	PMBL	DLBCL
Anzahl (n)	3	13
Namen der Zelllinien	MedB-1 Karpas1106 U-2940	HBL1, OCI-LY3, -10, CTB1, RI-1 SU-DHL-4, -5, -6, -8 DOHH-2, Pfeiffer, RCK8, Karpas-422
Ergebnis der Resequenzierung	WT vs. mut.	WT vs. mut.
<i>BRAF</i> V600 / K601	3 vs. 0	13 vs. 0
<i>KRAS</i> G12 - K16	3 vs. 0	13 vs. 0

Die gezielte Resequenzierung der Gene *BRAF* und *KRAS* ergab in allen getesteten PMBL-Zelllinien Wildtyp. Addiert man diese 3 Zelllinien-Proben zu den 49 PMBL-Patienten hinzu, persistiert die *BRAF*- und *KRAS*-Mutationsfrequenz in PMBL bei 0% ($n=0/52$, CI: 0 - 6,8%).

3.4. Die Mutationsfrequenz von *BRAF*- und *KRAS*-Hotspot-Mutationen in DLBCL ist geringer als erwartet

In der Zusammenschau der Sequenzierungsergebnisse überraschte, dass in keiner der getesteten 100 Proben (84 Patienten, 3 PMBL-Zelllinien, 13 DLBCL-Zelllinien) weder eine *BRAF*-, noch eine *KRAS*-Mutation nachgewiesen werden konnte. Dies führte zu einer Reevaluation der bisher veröffentlichten Daten zu *BRAF* und *KRAS* in DLBCL. Diese Analyse (Abbildung 2) beinhaltete drei Komponenten: (1) Eine Literaturrecherche, (2) eine Auflistung der in COSMIC annotierten *BRAF* / *KRAS*-Mutationen für DLBCL und (3) die hier vorliegenden Sequenzierungsergebnisse. Zum Zeitpunkt der Literaturrecherche (27. November 2013) fanden sich mehrere sehr ausführliche Sequenzierungsstudien, die das genetische Mutationsspektrum in DLBCL untersucht hatten und dabei die Mutationsfrequenzen von *BRAF* und *KRAS* beschrieben hatten. Die in COSMIC annotierten DLBCL-Fälle zeigten insgesamt 11 *BRAF*-Mutationen ($n=11/333$, 3,3%) und fünf *KRAS*-Mutationen ($n=5/237$, 2,2%).

Summiert man nun alle Daten aus den hier vorliegenden Sequenzierungsergebnissen, der Literaturrecherche und der COSMIC-Datenbank, so resultiert eine *BRAF*-Mutationsfrequenz von 2,5% (CI: 1,3 - 4,2%), beziehungsweise eine *KRAS*-Mutationsfrequenz von 1,6% (CI: 0,7 - 3,3%) (Abbildung 2).

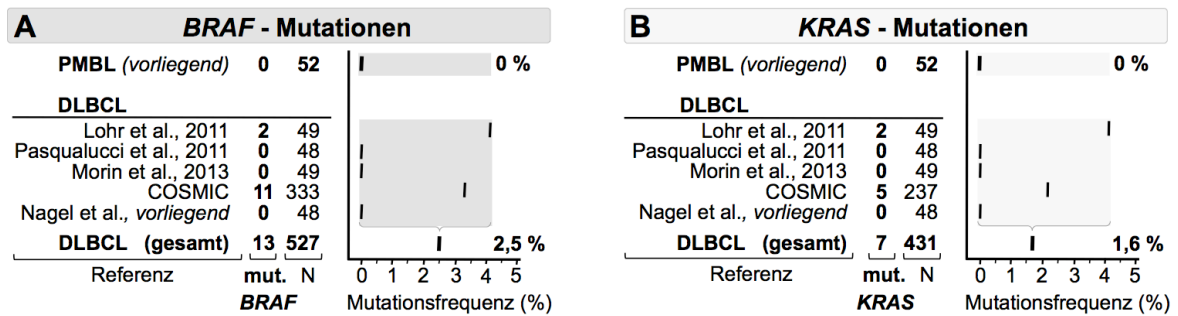


Abbildung 2: Zusammenfassung der Mutationsfrequenzen

(A) *BRAF*-Mutationsfrequenz (B) *KRAS*-Mutationsfrequenz. *Abkürzungen:* COSMIC, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer; mut., mutiert; n, Anzahl getesteter Proben. (Nagel et al., 2014a)

Im Verlauf der Erstellung dieser Doktorarbeit und seit Publikation der Daten sind die Mutationsraten in COSMIC sowohl für *BRAF* auf 2,5% ($n=11/439$), als auch für *KRAS* auf 1,5% ($n=5/323$) in DLBCL weiter gesunken (Stand: Mai 2015). Interessanterweise betrafen nur 38% ($n=5/13$) der hier aufgelisteten *BRAF*-Mutationen in COSMIC und den bisher publizierten Studien den klassischen Mutationshotspot (p.V600-p.K601), der mit dem hier verwendeten Pyrosequenzierungsansatz abgegriffen wurde. Im Gegensatz dazu lagen alle annotierten *KRAS*-Mutationen im Bereich des Hotspots (p.G12-p.K16). Die *KRAS*-Varianten wären somit ausnahmslos durch das hier angewandte Verfahren zur gezielten Resequenzierung nachweisbar. Wenn man nun die Lokalisation der Mutationen und die aktuellen Daten der COSMIC-Datenbank berücksichtigt, so sinkt die spezifische *BRAF*-Hotspot-Mutationsfrequenz in DLBCL auf unter 1% ($n=5/633$, CI: 0,3 - 1,8%), und die *KRAS*-Hotspot-Mutationsfrequenz auf 1,3% ($n=7/517$, CI: 0,6 - 2,8%).

4. Diskussion

Der hier verwendete Ansatz zur gezielten Resequenzierung detektierte bisher nicht beschriebene *KIT*-Mutationen in PMBL-Patienten mit einer Mutationsfrequenz von 13,3% ($n=4/30$). Zusätzlich konnte die Abwesenheit von *BRAF*- und *KRAS*-Hotspot-Mutationen in PMBL gezeigt werden. Die Sequenzierungsergebnisse sprachen in Zusammenschau mit online verfügbaren Daten für eine insgesamt niedrige *BRAF*- / *KRAS*-Hotspot-Mutationsfrequenz in DLBCL.

4.1. Der Stellenwert der Gene *BRAF*, *KRAS* und *KIT* als Biomarker

Die Gene der *RAF-RAS*-Signalkaskade gehören zu den bekanntesten Onkogenen überhaupt. Ihre Erstbeschreibung liegt nun schon über 30 Jahre zurück (Parada et al., 1982). Mutationen in den Genen *BRAF* und *KRAS* können sowohl das Tumorwachstum, als auch die Invasion von Krebszellen verstärken. Seit der Entdeckung von Medikamenten, die gezielt in *BRAF*- / *KRAS*-Signalwege eingreifen, gilt der Mutationsstatus beider Gene nicht nur als prognostischer, sondern auch als prädiktiver Biomarker für bestimmte Tumorarten, wie beispielsweise in der Therapie des malignen Melanoms (Davies et al., 2002).

Die hier detektierte Abwesenheit von *BRAF*- und *KRAS*-Hotspot-Mutationen wurde für PMBL erstmalig beschrieben. Auch wenn die Obergrenze des 95% CI (6,8%) noch im Bereich der Mutationsfrequenz von *BRAF* und *KRAS* in ausgewählten DLBCL-Studien liegt (4,2%) (Lohr et al., 2012), kann die Abwesenheit dieser Mutationen in PMBL ein weiteres genetisches Unterscheidungsmerkmal zwischen den verschiedenen Subtypen von DLBCL darstellen. Obwohl in DLBCL durchaus *BRAF* und *KRAS* Mutationen beschrieben wurden, sprechen aber die insgesamt niedrigen Mutationsfrequenzen gegen einen Einsatz beider Gene als diagnostische Biomarker zur Unterscheidung von DLBCL-Subtypen. Des Weiteren ist die hier ermittelte Hotspot-Mutationsfrequenz bei beiden Genen mit $\leq 1,3\%$ sehr gering und spricht somit gegen eine gezielte Resequenzierung im Rahmen der klinischen Routinediagnostik von DLBCL-Patienten. Dies schließt aber nicht aus, dass unter Verwendung aufwändigerer Sequenzierungsmethoden für die gesamte *BRAF*- / *KRAS*-Gensequenz, eventuell klinisch relevante Mutationen (z.B. *BRAF* c.1781A>G, p.D594G) (Lohr et al., 2012) außerhalb des untersuchten Hotspots

entdeckt werden könnten. Somit eignet sich die Genotypisierung von *BRAF*- und *KRAS*-Hotspots zumindest momentan noch nicht als Biomarker in PMBL oder DLBCL.

Das *KIT*-Gen codiert für eine Typ-III-Rezeptor-Tyrosinkinase, die auch unter dem Synonym CD117 bekannt ist (Yarden et al., 1987). Die Stimulierung dieser Rezeptor-Tyrosinkinase durch die Bindung des zugehörigen Liganden, Stammzell-Faktor, führt zu einer Dimerisierung und Aktivierung weiterer, nachgeschalteter Kinasen. Diese anschließenden Signalwege spielen eine elementare Rolle im Überleben der Zelle, in der Zelldifferenzierung, im Wachstum und in der Angiogenese (Liang et al., 2013). *KIT*-Mutationen können diese Signalwege konstitutiv aktivieren und bieten somit unabhängig der Stimulation durch mögliche Liganden einen klaren Überlebensvorteil für Tumorzellen. Onkogene *KIT*-Mutationen wurden erstmals in einer humanen Mastzell-Leukämie-Zelllinie und in an Mastozytose erkrankten Patienten beschrieben (Furitsu et al., 1993; Longley et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die Varianten zu einem konstitutiv aktivierten Signalweg führen, die im Bereich der Hotspot-Region p.D816 des Exon 17 liegen (Furitsu et al., 1993; Kim et al., 2013). Auch in Formen der akuten myeloischen Leukämie wurden aktivierende *KIT*-Mutationen detektiert. Genetische Aberrationen in Exon 8 oder Exon 17 des *KIT*-Gens sind dabei mit einem schlechteren Überleben und einer höheren Rückfallquote nach Therapieende assoziiert, und dienen somit als prognostische Biomarker (Paschka et al., 2006). Für gastrointestinale Stromatumoren sind sowohl die Expression, als auch der Mutationsstatus des *KIT*-Gens, diagnostisch und prognostisch relevant (Demetri et al., 2002; Hirota et al., 1998; Taniguchi et al., 1999). Zusätzlich haben unterschiedliche *KIT*-Mutationen eine Auswirkung auf die Effizienz bestimmter Tyrosinkinaseinhibitoren. Diese reicht je nach Mutationstyp und Lokalisation von einer hohen Sensitivität, bis hin zur Resistenz gegenüber den verfügbaren Inhibitoren (Growney et al., 2005). Somit spielt die Genotypisierung dieses Kandidatengens in Tumorarten mit rekurrierenden *KIT*-Mutationen auch prädiktiv eine wichtige Rolle. Der Mutationsstatus des *KIT*-Protoonkogens ist somit als relevanter Biomarker in bestimmten Krebsarten bereits etabliert.

4.2. PMBL-Zelllinien zeigen ebenfalls *KIT*-Hotspot-Mutationen

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Heidelberg, Deutschland, wurden zusätzlich alle drei verfügbaren PMBL-Zelllinien (MedB-1, Karpas1106 und U-2940) auf Mutationen in Schlüsselgenen der Tumorgenese untersucht (Nagel et al., 2014b). Hierzu wurde ein bereits etabliertes *Next-Generation-Sequenzierungsverfahren* (Endris et al., 2013) verwendet. In Kombination mit einem kommerziell erhältlichen Genpanel (Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) konnten so je PMBL-Zelllinie gezielt 207 Exons in 50 ausgewählten Genen typisiert werden. Dieses Genpanel schloss die Kandidatengene *BRAF*, *KRAS* und *KIT* mit ein.

Die Untersuchung konnte den in der vorliegenden Arbeit detektierten Wildtyp-Status der Gene *BRAF* und *KRAS* in allen drei PMBL-Zelllinien bestätigen. Wesentlich bedeutsamer war allerdings der Befund, dass zwei der drei PMBL-Zelllinien (MedB-1 und U-2940) ebenfalls nicht-synonyme *KIT*-Mutationen innerhalb der Hotspot-Region im Exon 17 aufweisen. Somit konnten erstmalig *KIT*-Hotspot-Mutationen in PMBL-Zelllinien und Patienten nachgewiesen werden (Nagel et al., 2014b).

Interessanterweise präsentieren sowohl MedB-1, als auch die Patientenprobe PMBL.1 dieselbe *KIT*-Mutation (c.2440G>A, p.A814T). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Zelllinie MedB-1 von der Patientenprobe PMBL.1 abstammt. Somit lag diese Genvariante bereits *in vivo* vor und ist nicht erst durch Permutation während der Kultur der Zelllinie entstanden. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit ergibt sich nun eine neue Mutationsfrequenz für *KIT* in PMBL: Zählt man die Zelllinie MedB-1 und deren Ursprungstumor (PMBL.1) als eine Probe, und addiert die Ergebnisse des Zelllinienscreenings ($n=2/3$) und der Patientenproben ($n=4/30$) zusammen, so erhält man eine Mutationsfrequenz von 15,6% ($n=5/32$, 5 - 33%). Nach Ausschluss der synonymen Mutation (PMBL.29) erhält man, trotz dieser strengen Betrachtung, immer noch eine *KIT*-Mutationsfrequenz von 12,5% in PMBL ($n=4/32$, CI: 4 - 29%) (Nagel et al., 2014b).

Die Auswirkung der detektierten, nicht-synonymen *KIT*-Mutationen auf die Proteinstruktur wurde in Kollaboration mit dem Institut für Humangenetik der Universität Ulm, Deutschland, digital analysiert. Zwei online-verfügbare

Softwareprogramme klassifizierten vier der fünf nicht-synonymen *KIT*-Mutationen in PMBL-Patienten und PMBL-Zelllinien als potentiell schädigend (Nagel et al., 2014b). Die Auswirkung auf die Proteinstruktur und die Lokalisation der Mutationen in der Nähe des bekannten Hotspots (p.D816) erhärten den Verdacht, dass genetische Aberrationen im *KIT*-Signalweg eine Rolle in der Pathogenese von PMBL spielen. Der Nachweis einer Frequenz von über 10% *KIT*-Hotspot-Mutationen impliziert einen möglichen diagnostischen, prognostischen oder therapeutischen Nutzen des *KIT*-Genstatus in PMBL (Nagel et al., 2014b).

Durch die Entdeckung von zwei *KIT*-mutierten PMBL-Zelllinien stehen nun Modelle für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung. So könnten diese Zelllinien verwendet werden, um den Aktivierungsstatus der *KIT*-abhängigen Signalwege zu erforschen. Darüber hinaus bieten diese Zellmodelle die Möglichkeit, neue oder bereits zugelassene *KIT*-Inhibitoren *in vitro* zu testen.

4.3. Vor- und Nachteile gezielter Resequenzierung

Der hier verwendete Ansatz der gezielten Resequenzierung unterscheidet sich vom Großteil der verwendeten Sequenzierungsmethoden in den momentan publizierten DLBCL- und PMBL-Studien. Häufig werden in diesen Studien das gesamte Exom oder - noch aufwändiger - das gesamte Genom (whole-genome sequencing, WGS) mit mehr als 20.000 Genen analysiert. Im Kontrast dazu beschränkt sich die hier verwendete Methode der gezielten Resequenzierung auf wenige, auserwählte Gene und bietet dadurch folgende vier Vorteile (Meldrum et al., 2011; Simon & Roychowdhury, 2013):

Erstens überzeugt die gezielte Resequenzierung durch ihren ökonomischen Vorteil. Der Fokus auf bestimmte, klinisch-onkologisch relevante Gene reduziert den bioinformatischen Aufwand drastisch: Mutationen in Genen mit unklarer klinischer Relevanz werden dadurch schon vor dem Sequenzierungsverfahren von der Detektion ausgeschlossen. Die Reduktion der zu analysierenden Daten benötigt weniger Speicherplatz und weniger Arbeitsaufwand. Dies führt zu geringeren Kosten.

Zweitens liefert dieser Sequenzierungsansatz eine zuverlässige und sensitive Genotypisierung bei geringem Bedarf an Ausgangsmaterial. Die durchschnittliche Abdeckung der Sequenz (coverage) kann bei der gezielten Sequenzierung höher

sein als bei Sequenzierungsverfahren, die das gesamte Genom analysieren (Rehm et al., 2013).

Drittens ist die Etablierung gezielter Resequenzierungsverfahren im Rahmen der klinischen Routinediagnostik einfacher als für entsprechende Techniken mit WGS. Bisher sind mehrere Genpanels (wie unter 4.2. beschrieben), inklusiv zugehöriger Hard- und Software, kommerziell erhältlich und bereit für den klinischen Einsatz. Viertens ermöglicht die geringere Datenmenge im Vergleich zu WGS die schnellere Auswertung der Sequenzierungsergebnisse. Dieser Zeitfaktor spielt im klinischen Alltag für Arzt und Patient in Anbetracht einer potentiellen Indikation einer zusätzlichen Therapiestrategie eine zentrale Rolle.

Der Hauptnachteil der gezielten Resequenzierung ist der selektive Blick des Verfahrens selbst. Durch die Vorauswahl bestimmter Gene oder Genabschnitte wird der Großteil des gesamten Genoms außer Acht gelassen. Dieser limitierte Einblick in das Spektrum möglicher Mutationen führt zwangsweise zum Verlust von gegebenenfalls relevanter Information. So können genetische Veränderungen in Genabschnitten, die nicht im Genpanel enthalten sind, auch nicht erfasst werden. Vergleicht man hierzu beispielsweise die Daten der Metaanalyse (Abbildung 2) ergibt sich folgendes Bild: Durch Pyrosequenzierung wären 8 der 13 annotierten *BRAF* Mutationen nicht erfasst worden, da sie außerhalb des analysierten genetischen Hotspots lagen (p.V600-p.K601). Allerdings unterschied sich in diesem Fall die Detektionsrate zwischen der theoretischen Erfassung der gesamten Sequenz des *BRAF*-Gens versus der Hotspot-Pyrosequenzierung nicht signifikant ($p=0,09$). Hierdurch wird deutlich, dass die gezielte Resequenzierung per definitionem immer beschränkt ist auf einen kleinen Teil des Genoms – und dadurch auch weniger sensitiv sein kann, als die Analyse mittels WGS. WGS erfasst hingegen in einer Probe alle vorhandenen Mutationen, aber eben auch jene mit noch unklarer Relevanz.

Allerdings haben aktuelle Untersuchungen gezeigt, dass zwar auf individueller Ebene (pro Patient) die Bandbreite an Mutationen sicher erfasst werden kann, es für eine spezifische Tumorart jedoch sehr aufwändig ist, das gesamte Spektrum klinisch relevanter Mutationen zu definieren: Mit zunehmender Größe einer Kohorte nimmt auch die Wahrscheinlichkeit zu, neue klinisch relevante Mutationen zu erfassen. Laut Vorhersage benötigt man für die sichere Erfassung aller

genetischer Varianten mit geringer Frequenz ($\leq 5\%$) innerhalb einer Krebsart sehr große Kohorten ($n > 500$) (Lawrence et al., 2014). Vor kurzer Zeit wurde eine WGS-Studie präsentiert, die das Mutationsspektrum in PMBL offenlegte (Gunawardana et al., 2014). Diese exzellent durchgeführte genomweite Studie erfüllt sehr hohe Maßstäbe und die Ergebnisse sind ein herausragender Einblick in das Genom von PMBL, aber dennoch konnte die hohe Mutationsfrequenz von $> 10\%$ *KIT*-Mutationen nicht erfasst werden. Der Ansatz dieser Forschungsgruppe war, zuerst das gesamte Genom zweier Indexpatienten und das Transkriptom weiterer 8 PMBL-Patienten zu analysieren. Alle nachfolgenden Untersuchungen, unter anderem ebenfalls gezielte Resequenzierungen bestimmter Gene, basierten jedoch auf den Ergebnissen der Sequenzierung dieser Indexpatienten. Trotz den klaren Vorteilen von WGS und den korrekt als *KIT*-Wildtyp getesteten PMBL-Indexpatienten, verhinderte möglicherweise dieser Proben-Bias die Detektion von wiederkehrenden *KIT*-Mutationen in PMBL. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit unterstützen somit die Annahme, dass relevante Mutationen mit niedriger Frequenz auch in Tumorarten vorkommen können, die bisher korrekt als negativ getestet wurden (Lawrence et al., 2014; Rao & Gu, 2001; Rehm et al., 2013).

Die stete Weiterentwicklung der immer leistungsfähigeren Sequenzierungstechnologien stellt eine große Herausforderung im Umgang mit den resultierenden Daten dar. In Zukunft werden online verfügbare Datenbanken, die Ergebnisse von verschiedenen Sequenzierungsstudien integrieren, eine zentrale Rolle in der Krebsforschung spielen. Die hier verwendete Datenbank COSMIC oder das Projekt „Cancer Genomics Hub“ (<https://cghub.ucsc.edu/index.html>) ermöglichen den Zugang zu den Genomen verschiedenster Tumorarten. Durch die Expansion und Förderung solcher Datenbanken könnten zukünftig auch für seltene Tumorarten sehr große Kohorten erstellt werden. Dadurch kann nicht nur ein Probenbias verhindert werden, sondern darüber hinaus kann auch die interindividuelle Heterogenität eines bestimmten Tumors besser berücksichtigt und analysiert werden. Die Integration der Daten ist schon jetzt ein Schritt hin zu einer effektiveren, personalisierten Krebstherapie.

Zusammenfassend erweist sich das hier verwendete Verfahren zur gezielten Resequenzierung als eine effiziente und ökonomische Technik. Dieser Ansatz

kann komplementär zu anderen Sequenzierungsverfahren im Rahmen der Tumor-Genotypisierung eingesetzt werden und stellt bis zur Implementierung von WGS in der klinischen Diagnostik eine sinnvolle Brückentechnologie dar. Durch gezielte Resequenzierung konnten hier erstmalig *KIT*-Hotspot Mutationen in PMBL nachgewiesen werden, die einen möglichen Angriffspunkt für neue Therapieoptionen bieten könnten. Außerdem wurde durch dieses Verfahren die Abwesenheit von klinisch relevanten *BRAF*- und *KRAS*-Hotspot-Mutationen in PMBL dokumentiert.

5. Zusammenfassung

Mehrere Sequenzierungsstudien haben bisher das Mutationsspektrum des häufigsten Non-Hodgkin-Lymphoms, des diffus großzelligen B-Zell Lymphoms (DLBCL) und dessen Subtyp primär mediastinales B-Zell Lymphom (PMBL) untersucht. Allerdings blieb dabei der Mutationsstatus vieler therapeutisch relevanter Gene im Subtyp PMBL unklar. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, wiederkehrende Mutationen in PMBL zu erfassen, die eine potentielle Relevanz für zielgerichtete Therapieansätze bieten.

Die Auswahl der Kandidatengene für eine gezielte Resequenzierung basierte auf einer Online-Recherche in den Datenbanken „ClinicalTrials“ und „Catalogue of Somatic Mutations in Cancer“. Der Mutationsstatus der ausgewählten Gene wurde an insgesamt 84 PMBL- und DLBCL-Patienten, sowie weiteren 16 Zelllinien mittels Pyrosequenzierung oder durch traditionelle Sequenzierung nach Sanger erfasst.

Durch die Online-Recherche konnten die drei Onkogene *KIT*, *BRAF* und *KRAS* als geeignete Kandidaten zur gezielten Resequenzierung in PMBL identifiziert werden. Die Genotypisierung der PMBL-Patienten erfasste *KIT*-Mutationen in 13,3% ($n=4/30$). Die Analyse der *KIT*-Varianten ergab insgesamt 3 nicht-synonyme Mutationen, die in unmittelbarer Nähe zum genetischen Hotspot des *KIT*-Gens liegen. Die Kandidatengene *BRAF* und *KRAS* präsentierten ausschließlich Wildtyp in allen getesteten PMBL- und DLBCL-Proben ($n=0/100$). Durch die Integration verfügbarer Sequenzierungsergebnisse von Online-Datenbanken, aktueller Literatur und von den hier erzielten Ergebnissen der gezielten Resequenzierung, konnte eine spezifische *BRAF*- und *KRAS*-Hotspot-Mutationsrate von $\leq 1,3\%$ in DLBCL festgelegt werden.

Zusammenfassend stellen diese Ergebnisse eine Erweiterung des genetischen Profils von PMBL dar. Der Nachweis bisher unbekannter *KIT*-Hotspot-Mutationen in PMBL unterstreicht den Stellenwert einer gezielten Resequenzierung zur ökonomischen Detektion wiederkehrender Genvarianten für zukünftige, genotyp-basierte Therapiestrategien.

6. Literaturverzeichnis

1. Barth T F E, Leithauser F, Joos S, Bentz M, Möller P: Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? *Lancet Oncol* 3: 229-234. (2002)
2. Davies H, Bignell G R, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett M J, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson B A, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins G J, Bigner D D, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho J W, Leung S Y, Yuen S T, Weber B L, Seigler H F, Darrow T L, Paterson H, Marais R, Marshall C J, Wooster R, Stratton M R, Futreal P A: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954. (2002)
3. Demetri G D, von Mehren M, Blanke C D, Van den Abbeele A D, Eisenberg B, Roberts P J, Heinrich M C, Tuveson D A, Singer S, Janicek M, Fletcher J A, Silverman S G, Silberman S L, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker B J, Corless C, Fletcher C D, Joensuu H: Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347: 472-480. (2002)
4. Druker B J, Talpaz M, Resta D J, Peng B, Buchdunger E, Ford J M, Lydon N B, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers C L: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344: 1031-1037. (2001)
5. Dunleavy K, Pittaluga S, Maeda L S, Advani R, Chen C C, Hessler J, Steinberg S M, Grant C, Wright G, Varma G, Staudt L M, Jaffe E S, Wilson W H: Dose-adjusted EPOCH-rituximab therapy in primary mediastinal B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 368: 1408-1416. (2013)
6. Endris V, Penzel R, Warth A, Muckenhuber A, Schirmacher P, Stenzinger A, Weichert W: Molecular diagnostic profiling of lung cancer specimens with a semiconductor-based massive parallel sequencing approach: feasibility,

- costs, and performance compared with conventional sequencing. *J Mol Diagn* 15: 765-775. (2013)
7. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugahara H, Butterfield J H, Ashman L K, Kanayama Y: Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 92: 1736-1744. (1993)
 8. Gaulard P, Stein H, Harris N L, Pileri S A, Kovrigina A M, Jaffe E S, Kutok J L, Möller P: Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma. In: Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, Jaffe E S, Pileri S A, Stein H, Thiele J & Vardiman J W: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue 4th edition, IARC Press, p. 250-251 (2008)
 9. Gowney J D, Clark J J, Adelsperger J, Stone R, Fabbro D, Griffin J D, Gilliland D G: Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood* 106: 721-724. (2005)
 10. Gunawardana J, Chan F C, Telenius A, Woolcock B, Kridel R, Tan K L, Ben-Neriah S, Mottok A, Lim R S, Boyle M, Rogic S, Rimsza L M, Guiter C, Leroy K, Gaulard P, Haioun C, Marra M A, Savage K J, Connors J M, Shah S P, Gascoyne R D, Steidl C: Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Nat Genet* 46: 329-335. (2014)
 11. Hanna D M, Fellowes A, Vedururu R, Mechinaud F, Hansford J R: A unique case of refractory primary mediastinal B cell lymphoma with JAK3 mutation and the role for targeted therapy. *Haematologica* 99: 156-158. (2014)
 12. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279: 577-580. (1998)

13. Kim H J, Ahn H K, Jung C W, Moon J H, Park C H, Lee K O, Kim S H, Kim Y K, Kim H J, Sohn S K, Kim S H, Lee W S, Kim K H, Mun Y C, Kim H, Park J, Min W S, Kim H J, Kim D H, L/Mds working party K S o H: KIT D816 mutation associates with adverse outcomes in core binding factor acute myeloid leukemia, especially in the subgroup with RUNX1/RUNX1T1 rearrangement. *Ann Hematol* 92: 163-171. (2013)
14. Lawrence M S, Stojanov P, Mermel C H, Robinson J T, Garraway L A, Golub T R, Meyerson M, Gabriel S B, Lander E S, Getz G: Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505: 495-501. (2014)
15. Lennerz J K, Klaus B M, Marienfeld R B, Möller P: Pyrosequencing of BRAF V600E in routine samples of hairy cell leukaemia identifies CD5+ variant hairy cell leukaemia that lacks V600E. *Br J Haematol* 157: 267-269. (2012)
16. Liang J, Wu Y L, Chen B J, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H: The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int J Biol Sci* 9: 435-443. (2013)
17. Lohr J G, Stojanov P, Lawrence M S, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, Cruz-Gordillo P, Knoechel B, Asmann Y W, Slager S L, Novak A J, Dogan A, Ansell S M, Link B K, Zou L, Gould J, Saksena G, Stransky N, Rangel-Escareno C, Fernandez-Lopez J C, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Hernandez-Lemus E, Schwarz-Cruz y Celis A, Imaz-Rosshandler I, Ojesina A I, Jung J, Pedamallu C S, Lander E S, Habermann T M, Cerhan J R, Shipp M A, Getz G, Golub T R: Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3879-3884. (2012)
18. Longley B J, Tyrrell L, Lu S Z, Ma Y S, Langley K, Ding T G, Duffy T, Jacobs P, Tang L H, Modlin I: Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. *Nat Genet* 12: 312-314. (1996)
19. Meldrum C, Doyle M A, Tothill R W: Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev* 32: 177-195. (2011)

20. Möller P, Brüderlein S, Strater J, Leithauser F, Hasel C, Bataille F, Moldenhauer G, Pawlita M, Barth T F E: MedB-1, a human tumor cell line derived from a primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Int J Cancer* 92: 348-353. (2001)
21. Möller P, Lammler B, Eberlein-Gonska M, Feichter G E, Hofmann W J, Schmitteckert H, Otto H F: Primary mediastinal clear cell lymphoma of B-cell type. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 409: 79-92. (1986)
22. Morin R D, Mungall K, Pleasance E, Mungall A J, Goya R, Huff R D, Scott D W, Ding J, Roth A, Chiu R, Corbett R D, Chan F C, Mendez-Lago M, Trinh D L, Bolger-Munro M, Taylor G, Hadj Khodabakhshi A, Ben-Neriah S, Pon J, Meissner B, Woolcock B, Farnoud N, Rogic S, Lim E L, Johnson N A, Shah S, Jones S, Steidl C, Holt R, Birol I, Moore R, Connors J M, Gascoyne R D, Marra M A: Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood* 122: 1256-1265. (2013)
23. Nacheva E, Dyer M J, Metivier C, Jadayel D, Stranks G, Morilla R, Heward J M, Holloway T, O'Connor S, Bevan P C: B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 1106) with complex translocation involving 18q21.3 but lacking BCL2 rearrangement and expression. *Blood* 84: 3422-3428. (1994)
24. Nagel P D, Feld F M, Weissinger S E, Stenzinger A, Möller P, Lennerz J K: Absence of BRAF and KRAS hotspot mutations in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 55: 2389-2390. (2014a)
25. Nagel P D, Stenzinger A, Feld F M, Herrmann M D, Brüderlein S, Barth T F E, Marienfeld R B, Endris V, Weichert W, Debatin K-M, Westhoff M-A, Lessel D, Möller P, Lennerz J K: KIT mutations in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Blood Cancer J* 4: e241. (2014b)
26. Parada L F, Tabin C J, Shih C, Weinberg R A: Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297: 474-478. (1982)
27. Paschka P, Marcucci G, Ruppert A S, Mrozek K, Chen H, Kittles R A, Vukosavljevic T, Perrotti D, Vardiman J W, Carroll A J, Kolitz J E, Larson R

- A, Bloomfield C D, Cancer, Leukemia Group B: Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 24: 3904-3911. (2006)
28. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, Wells V A, Grunn A, Messina M, Elliot O, Chan J, Bhagat G, Chadburn A, Gaidano G, Mullighan C G, Rabadan R, Dalla-Favera R: Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* 43: 830-837. (2011)
29. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, Reiser M, Nickenig C, Clemens M, Peter N, Bokemeyer C, Eimermacher H, Ho A, Hoffmann M, Mertelsmann R, Trumper L, Balleisen L, Liersch R, Metzner B, Hartmann F, Glass B, Poeschel V, Schmitz N, Ruebe C, Feller A C, Loeffler M, German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group: Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* 9: 105-116. (2008)
30. Rao D C, Gu C: False positives and false negatives in genome scans. *Adv Genet* 42: 487-498. (2001)
31. Rehm H L, Bale S J, Bayrak-Toydemir P, Berg J S, Brown K K, Deignan J L, Friez M J, Funke B H, Hegde M R, Lyon E, Working Group of the American College of Medical G, Genomics Laboratory Quality Assurance C: ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* 15: 733-747. (2013)
32. Rieger M, Osterborg A, Pettengell R, White D, Gill D, Walewski J, Kuhnt E, Loeffler M, Pfreundschuh M, Ho A D, MabThera International Trial G: Primary mediastinal B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: results of the Mabthera International Trial Group study. *Ann Oncol* 22: 664-670. (2011)
33. Roschewski M, Dunleavy K, Wilson W H: Diffuse large B cell lymphoma: molecular targeted therapy. *Int J Hematol* 96: 552-561. (2012)

34. Roschewski M, Staudt L M, Wilson W H: Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol* 11: 12-23. (2014)
35. Sambade C, Berglund M, Lagercrantz S, Sallstrom J, Reis R M, Enblad G, Glimelius B, Sundstrom C: U-2940, a human B-cell line derived from a diffuse large cell lymphoma sequential to Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 118: 555-563. (2006)
36. Shaw A T, Yeap B Y, Solomon B J, Riely G J, Gainor J, Engelman J A, Shapiro G I, Costa D B, Ou S H, Butaney M, Salgia R, Maki R G, Varella-Garcia M, Doebele R C, Bang Y J, Kulig K, Selaru P, Tang Y, Wilner K D, Kwak E L, Clark J W, Iafrate A J, Camidge D R: Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 12: 1004-1012. (2011)
37. Siegel R L, Miller K D, Jemal A: Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65: 5-29. (2015)
38. Simon R, Roychowdhury S: Implementing personalized cancer genomics in clinical trials. *Nat Rev Drug Discov* 12: 358-369. (2013)
39. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, Kitamura Y: Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 59: 4297-4300. (1999)
40. Yarden Y, Kuang W J, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull T J, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A: Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6: 3341-3351. (1987)
41. Zhang J, Grubor V, Love C L, Banerjee A, Richards K L, Mieczkowski P A, Dunphy C, Choi W, Au W Y, Srivastava G, Lugar P L, Rizzieri D A, Lagoo A S, Bernal-Mizrachi L, Mann K P, Flowers C, Naresh K, Evens A, Gordon L I, Czader M, Gill J I, Hsi E D, Liu Q, Fan A, Walsh K, Jima D, Smith L L, Johnson A J, Byrd J C, Luftig M A, Ni T, Zhu J, Chadburn A, Levy S, Dunson

D, Dave S S: Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 1398-1403. (2013)

6.1. Software und Online-Datenbanken

42. Cancer Genomics Hub, Datenbank des Cancer Genome Atlas (TCGA) Consortium und weiteren Projekten, <https://cghub.ucsc.edu/index.html>, zuletzt besucht im Mai 2015
43. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>, zuletzt benutzt im Mai 2015
44. ClinicalTrials.gov, Datenbank für klinische Studien, <https://clinicaltrials.gov>, zuletzt benutzt im Mai 2015
45. CodonCode Aligner, Version 5.0, CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA, <http://www.codoncode.com/>, Freeware, Download im Oktober 2013
46. Graphpad QuickCalcs, <http://www.graphpad.com/quickcalcs/>, zuletzt benutzt im Mai 2015

6.2. Copyright und Verlagsrecht

Die im Ergebnisteil veröffentlichten Tabellen und Schaubilder sind genehmigte Inhalte oder Übersetzungen der Abbildungen oder Tabellen folgender Publikationen (I+II):

I. Absence of *BRAF* and *KRAS* Hotspot Mutations in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma

Nagel P D, Feld F M, Weissinger S E, Stenzinger A, Möller P and Lennerz J K.

Leukemia & Lymphoma (2014)

INFORMA HEALTHCARE LICENSE

License Number: 3618700493177

II. *KIT* Mutations in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma

Nagel P D, Stenzinger A, Feld F M, Herrmann M D, Brüderlein S, Barth T F E,
Marienfeld R B, Endris V, Weichert W, Debatin K-M, Westhoff M-A, Lessel D,
Möller P and Lennerz J K.

Blood Cancer Journal (2014)

Der Artikel wurde unter der Lizenz CC BY-NC-ND 4.0 veröffentlicht

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Möller, Leiter des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Ulm, möchte ich ganz herzlich danken. Er gab mir die einzigartige Möglichkeit zu promovieren und unterstützte mich stets hervorragend. Weiterhin danke ich meinem Supervisor PD Dr. Jochen K. Lennerz für seine exzellente Betreuung, kreativen Ideen und seine großartigen Ratschläge für die Arbeit und für das Leben als Arzt.

Herzlichen Dank an das Team von Dr. Albrecht Stenzinger, Dr. Volker Endris und Prof. Dr. Wilko Weichert am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Heidelberg für die Zusammenarbeit im Rahmen der Next-Generation-Sequenzierung. Danken möchte ich ebenfalls Dr. Markus D. Herrmann, Dr. Mike-Andrew Westhoff und Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Ulm für die kontinuierliche Unterstützung. Vielen Dank auch an Dr. Davor Lessel vom Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Ulm und am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für konstruktive Ideen, Diskussionen, Verifikation von Sequenzierungsergebnissen und Simulation von Proteinstrukturen. Ein großes Dankeschön an Iwona Nerbas, Elena Kelsch, Karola Dorsch, Michaela Buck, Julia Kiedaisch, Dr. Ulrike Kostezka, Dr. Silke Brüderlein, Prof. Dr. Ralf B. Marienfeld und Prof. Dr. Thomas F.E. Barth am Institut für Pathologie, Universität Ulm, für Diskussionen, Unterstützung und die Ausbildung im Labor. Mein herzlicher Dank geht auch an Dr. Uwe Gerstenmaier und Dr. Anette Arndt für ihre Hilfe bei der Genotypisierung der Patienten und an M. sc. Peter Kuhn und Dipl. math. Claudia Welke vom Comprehensive Cancer Center Ulm für die bioinformatische Unterstützung. Besten Dank an meine Co-Doktorandinnen und sehr guten Freunde cand. med. Fenja M. Feld und cand. med. Stephanie E. Weissinger.

Ich bin sehr dankbar für die finanzielle Unterstützung durch die International Graduate School in Molecular Medicine Ulm und das Promotionsprogramm Experimentelle Medizin.

Last but not least, danke an meine wunderbare Familie.

Curriculum Vitae

Philipp Daniel Nagel

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

(Seite 1)

Curriculum Vitae

Philipp Daniel Nagel

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

(Seite 2)