

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

Die Integration des Epstein-Barr-Virus: Zytogenetische Lokalisation viraler Integrationsloki in EBV- positiven Zelllinien des Burkitt-Lymphoms

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Juliane Elisabeth Hinke
aus Berlin

Hamburg 2012

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 18.12.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dierlamm

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Fiedler

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. Algenstaedt

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Das Epstein-Barr-Virus, Epidemiologie und assoziierte Krankheitsbilder	6
1.2 Das Burkitt-Lymphom	6
1.2.1 Molekulare Charakteristika des Burkitt-Lymphoms.....	7
1.2.2 Klinische Varianten des Burkitt-Lymphoms.....	7
1.2.3 Therapie des Burkitt-Lymphoms	8
1.3 Aktuelle Konzepte der Burkitt-Lymphomagenese.....	9
1.3.1 Die reziproke Translokation des MYC-Gens	9
1.3.2 Die Rolle des Epstein-Barr-Virus.....	10
1.3.2.1 Latente EBV-Genprodukte	11
1.3.2.2 Die Integration des EBV-Genoms	12
1.3.2.2.1 Zytogenetische Lokalisation integrierter EBV-DNA	13
1.3.2.2.2 Pathogene Signifikanz der EBV-Integration	14
1.4 Fragestellung.....	16
2 Materialien	17
2.1 Burkitt-Lymphom-Zelllinien	17
2.2 Chemikalien / Lösungen / Reagenzien.....	19
2.2.1 Bezugsquellen	19
2.2.2 FISH.....	19
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	22
2.2.4 Gelelektrophorese	22
2.2.5 Markierung der Sonden-DNA	23
2.2.6 Zusätzlich verwendete DNA-Sonden/BAC-Klone.....	23
2.2.7 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	23
2.3 Geräte	23
2.4 Sonstige Materialien.....	25
3 Methoden	26
3.1 DNA-Isolierung aus Zellkulturmaterial.....	26
3.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit.....	26

3.3 Polymerase-Kettenreaktion	26
3.3.1 Das Prinzip der Methode	27
3.3.2 Nachweis der EBV-Positivität der BL-ZL	28
3.3.3 Herstellung der Sonden-DNA	29
3.4 Gelelektrophorese	29
3.5 Reinigung der PCR-Produkte	30
3.6 Sequenzierung	30
3.7 Markierung der DNA-Sonden	30
3.8 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	31
3.8.1 Das Prinzip der Methode	31
3.8.2 FISH der BL-ZL-Präparate	32
3.8.3 Analyse der FISH-Daten	36
4 Ergebnisse	37
4.1 Präparation der genomischen DNA der BL-ZL	37
4.2 Bestätigung des EBV-Status der BL-ZL mittels LD-PCR	37
4.3. Herstellung der EBV-spezifischen FISH-Sonde	39
4.3.1 LD-PCR und Sequenzierung	39
4.3.2 Nick-Translation	39
4.3.3 Überprüfung der Sondenqualität	39
4.4 Visualisierung der EBV-Integration in BL-ZL mittels Metaphase-FISH	41
4.4.1 Hybridisierungsmuster einzelner BL-ZL	41
4.4.1.1 BL-ZL der Gruppe 1: Existenz von ein bis zwei EBV-IL	42
4.4.1.2 BL-ZL der Gruppe 2: Existenz multipler EBV-IL	44
4.4.1.3 BL-ZL der Gruppe 3: Existenz nicht-rekurrierender DS	47
4.5 Distribution der EBV-Integration im ZL-Kollektiv	47
4.5.1 Chromosomale Verteilung der EBV-Integration	47
4.5.2 Verteilung der EBV-Integration auf Bandenniveau	49
4.6 Kolokalisation von EBV-IL und Common Fragile Sites	51
5 Diskussion	52
6 Zusammenfassung	68

7 Abkürzungsverzeichnis	69
8 Bibliografie	72
9 Danksagung	86
10 Lebenslauf	87
11 Eidesstattliche Versicherung	88

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr-Virus, Epidemiologie und assoziierte Krankheitsbilder

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein humanpathogenes Gammaherpesvirus der Gattung *Lymphocryptoviridae*. Weltweit sind mehr als 90% der Bevölkerung mit dem Erreger infiziert (Henle *et al.*, 1979; Rickinson und Kieff, 2001). Die zumeist während der Kindheit erworbene Primärinfektion verläuft in der Regel asymptomatisch, seltener symptomatisch in Form der Infektiösen Mononukleose, einer selbst-limitierenden, lymphoproliferativen Erkrankung (Henle *et al.*, 1968; Niederman, 1968).

Nach Ablauf der Primärinfektion persistiert das EBV im Zellkern latent infizierter B-Lymphozyten (Henle *et al.*, 1979). Ein subklinischer Verlauf der Infektion beziehungsweise (bzw.) ein asymptomatischer EBV-Trägerstatus des Infizierten ist, trotz wiederkehrender Replikationsphasen des Virus, die Regel. Dies wird gewährleistet über das EBV-spezifische immunologische Gedächtnis (Klein *et al.*, 2010). Verschiedene genetische Faktoren, eine immunsuppressive Medikation oder infektiöse Erkrankungen können jedoch, *via* Immundefizienz, zur Reaktivierung und Proliferation EBV-infizierter Zellen führen und die Entwicklung eines EBV-assoziierten Malignoms begünstigen (Übersicht in Kutok und Wang, 2006; McLaughlin-Drubin und Munger, 2008). Entsprechend des Gewebetropismus des EBV für B- und Epithelzellen sind diese zumeist lymphoiden oder epithelialen Zell-Ursprungs. Hodgkin-Lymphome (Henle und Henle, 1973; Weiss *et al.*, 1989), Nasopharynxkarzinome (Gunven *et al.*, 1970) und Burkitt-Lymphome sind hierbei zu einem besonders hohen Prozentsatz mit einer EBV-Infektion assoziiert (Epstein *et al.*, 1964; Henle und Henle, 1966).

1.2 Das Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist ein Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) der B-Zellreihe, dessen klinisches Bild erstmals 1958 durch Dennis Burkitt be-

schrieben wurde (Burkitt, 1958). Ein Zusammenhang zwischen der Genese des hochmalignen Lymphoms und einer Infektion mit dem EBV wird seit mehr als 50 Jahren postuliert (Epstein *et al.*, 1964). Inwiefern das EBV zur Entstehung des BL beiträgt, bleibt hingegen bis dato unklar (Cader *et al.*, 2010).

1.2.1 Molekulare Charakteristika des Burkitt-Lymphoms

Mit einer Verdopplungszeit von 24 bis 48 Stunden zählt das BL zu den am schnellsten wachsenden Neoplasien des Menschen (Iversen *et al.*, 1972). Die hohe Proliferationsrate des Tumors bedingt den „Sternenhimmel-artigen“ Aspekt des histologischen Bildes: Ein Zellrasen dicht liegender, monomorpher B-Lymphozyten wird durchzogen von zahlreichen Apoptosen und Kerntrümmer-Makrophagen. Die Lymphomzellen exprimieren Immunglobulin (Ig)M, B-Zell-assoziierte Antigene [zum Beispiel (z.B.) CD19, CD20 und CD22] und, analog der vermuteten Ursprungszelle des BL, Marker des Keimzentrum-Zentroblasten (z.B. CD10, BCL6) (Brady *et al.*, 2007). Als weiteres Charakteristikum der BL-Zellen gilt eine Translokation des *MYC*-Gens. Sie ist in nahezu 100% der Fälle nachweisbar und betrifft die für das Protoonkogen *MYC* kodierende Bande 8q24 sowie eines von drei Ig-Genen auf Chromosom 2, 14 oder 22 (Manolov und Manolova, 1972; Dalla-Favera *et al.*, 1982; Taub *et al.*, 1982). Die reziproke Translokation von *MYC* resultiert in einer deregulativen Expression des Transkriptionsfaktors und gilt als entscheidender Faktor für die Ausprägung des malignen Phänotyps (siehe Punkt 1.3.1) (Klein, 1983; Polack *et al.*, 1996).

1.2.2 Klinische Varianten des Burkitt-Lymphoms

Anhand klinischer und biologischer Charakteristika lassen sich drei Varianten des BL differenzieren: das endemische (eBL), das sporadische (sBL) und das HIV (*human immunodeficiency virus*)-assoziierte BL (HIV-BL) (Tabelle 1.1).

Die endemische Variante weist hierbei eine besonders hohe Assoziation mit dem EBV auf. Über 90% der Fälle sind EBV-positiv (Blum *et al.*, 2004). Das eBL manifestiert sich primär zwischen dem vierten und siebten Lebensjahr und tritt in den hyperendemischen Malaria-Gebieten Äquatorialafrikas und Papua

Neuguineas mit einer hohen Inzidenz auf (Blum *et al.*, 2004; Ferry, 2006). Im sogenannten *lymphoma belt* Äquatorialafrikas erkranken rund fünf bis zehn von 100.000 Kindern pro Jahr. Vor der Verbreitung von AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*), stellte das BL den häufigsten Tumor des Kindesalters in dieser Region dar und auch heute noch ist es für rund 74% der hier vorkommenden, kindlichen Malignome verantwortlich. Hierbei befällt es bevorzugt die Kiefer- und Gesichtsknochen, kann aber auch abdominal und gonadal auftreten (Blum *et al.*, 2004; Mwanda, 2004; Ferry, 2006).

Das sBL hingegen ist in nur fünf bis zehn% der Fälle EBV-positiv (Blum *et al.*, 2004). Es ist vor allem im abdominalen Bereich lokalisiert und betrifft neben Kindern häufiger junge Erwachsene (Blum *et al.*, 2004). Bei einer weltweiten Verbreitung macht es rund ein bis zwei% der Lymphome adulter Patienten sowie 30 bis 50% der Lymphome des Kindesalters in den USA und Westeuropa aus (de Jong und Balagué Ponz, 2011). Unter HIV-Patienten sind rund ein Drittel der BL mit einer EBV-Infektion assoziiert. HIV-assoziierte BL betreffen bevorzugt die Lymphknoten sowie das Knochenmark und zählen zu den AIDS definierenden Erkrankungen (Powles *et al.*, 2000).

Tabelle 1.1 Subtypen des Burkitt-Lymphoms.

	Endemisches BL	Sporadisches BL	HIV-assoziiertes BL
Distribution	Äquatorial Afrika, Papua Neu Guinea	Weltweit	Weltweit
Erkrankungsalter	Kinder >> Erwachsene	Kinder > Erwachsene	Erwachsene
EBV-Assoziation	> 90 %	5-10 %	30-40%
weitere Kofaktoren	Malaria-Infektion	-	HIV-Infektion
Bevorzugte Lokalisation	Kiefer > Abdomen, Nieren, Gonaden	Abdomen > Nieren, Knochenmark, Gonaden	Lymphknoten, Abdomen, Knochenmark, ZNS

(modifiziert nach Brady *et al.*, 2007).

1.2.3 Therapie des Burkitt-Lymphoms

Aufgrund der hohen Proliferationsrate des Tumors ist bei allen Varianten eine rasche therapeutische Intervention anzustreben. Mit Heilungsraten über 90% in

anfänglichen und 60 bis 80% in fortgeschrittenen Stadien ist die Prognose der Patienten im Allgemeinen gut, wobei Kinder meist einen günstigeren Krankheitsverlauf zeigen als Erwachsene (de Jong und Balagué Ponz, 2011). Die Therapie erfolgt mittels hochdosierter Chemo- bzw. kombinierter Chemoimmuntherapie (Evens und Gordon, 2002; Aldoss *et al.*, 2008; Oriol *et al.*, 2008). Ein großes Problem stellt die hohe Toxizität der intensiven Chemotherapie dar (God und Haque, 2010). Sie betrifft insbesondere HIV-positive und ältere Patienten, die zudem schlechtere Ansprechraten auf die Medikation zeigen. Bei einer Koinfektion mit HIV wird die per se schon schlechte Immunlage durch die Chemotherapie oft derart beeinträchtigt, dass gravierende toxische Schäden auftreten. Auch der Einsatz von Immuntherapeutika ist, aufgrund deren suppressiven Effekts auf das körpereigene Immunsystem, bei HIV-positiven Patienten kritisch zu bewerten (Oriol *et al.*, 2008).

1.3 Aktuelle Konzepte der Burkitt-Lymphomagenese

Derzeit werden verschiedene Konzepte der Tumorentstehung unter Beteiligung einer EBV-Infektion, Koinfektionen mit dem HIV und parasitären Malariaerregern (Plasmodien) sowie der *MYC*-Translokation diskutiert (Brady *et al.*, 2007; Thorley-Lawson und Allday 2008; Cader *et al.*, 2010).

1.3.1 Die reziproke Translokation des *MYC*-Gens

Die Translokation von *MYC* gilt als Schlüsselevent der Lymphomagenese. Sie geht vermutlich aus einem Fehler der im Keimzentrum ablaufenden Prozesse hervor (Küppers und Dalla-Favera, 2001). 80% der BL zeigen eine Translokation $t(8;14)(q24;q32)$, welche auch als Burkitt-Translokation bezeichnet wird. Das *MYC*-Gen gerät hierbei unter die regulatorische Kontrolle des Ig-Schwerkettengens (*IGH*) auf Chromosom 14. Variante Translokationen, $t(2;8)(p12;q24)$ und $t(8;22)(q24;q11)$, betreffen das kappa oder lambda Ig-Leichtketten-Gen (*IgL*) auf 2p bzw. 22q (Brady *et al.*, 2007). Unter dem Einfluss der Ig-Gene kommt es zu einer deregulativen Expression des Protoonkogens

MYC (Klein, 1983), welches die Transkription von rund 15% der menschlichen Gene steuert (Dang *et al.*, 2006). Hohe Expressionslevel von *MYC* begünstigen die maligne Entartung der Zelle, resultieren jedoch gleichzeitig in einer Stimulation pro-apoptotischer Signalwege (Packham und Cleveland, 1995; Dang *et al.*, 2005). Der Erwerb weiterer genetischer Veränderungen ist daher notwendig, um die *MYC*-induzierte Apoptoseeinleitung zu umgehen (Brady *et al.*, 2007). 60 bis 90% der BL zeigen sekundäre genetischen Veränderungen, 30 bis 50% der Tumoren besitzen komplexe Karyotypen (Murga Penas *et al.*, Manuskript eingereicht). Aktuelle Modelle gehen davon aus, dass darüber hinaus auch das EBV in den Prozess der Apoptose-Umgehung involviert ist (Thorley-Lawson und Allday, 2008).

1.3.2 Die Rolle des Epstein-Barr-Virus

Erste Hinweise auf eine ätiologische Assoziation zwischen dem EBV und der Burkitt-Lymphomagenese gehen auf das Jahr 1964 zurück. Damals gelang Epstein *et al.* die elektronenmikroskopische Darstellung EB-viraler Partikel in einer vom BL etablierten Zelllinie (BL-ZL) (Epstein *et al.*, 1964). Es folgte die Veranlassung zahlreicher Studien, welche eine vermutete Involvierung des EBV schließlich verifizieren konnten (Abbildung 1.1).

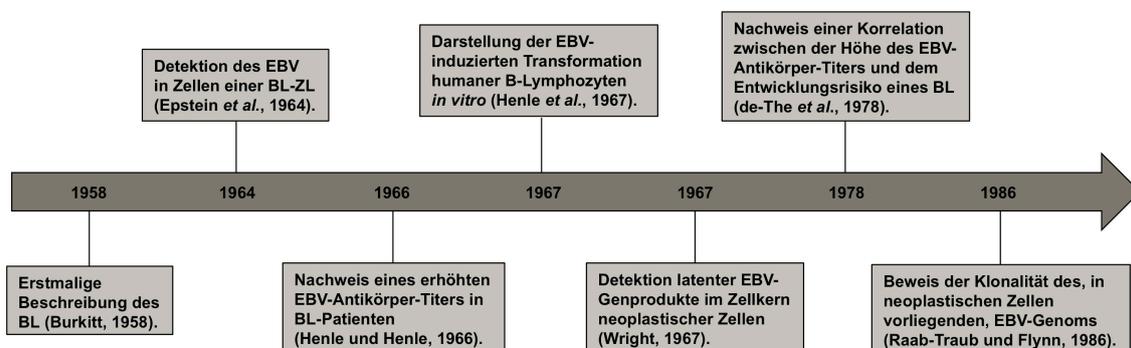


Abbildung 1.1 Nachweis einer Involvierung des EBV in die Genese des Burkitt-Lymphoms (modifiziert nach Moore und Chang, 2010).

Das EBV scheint hierbei vornehmlich in Kombination mit weiteren Faktoren, welche die Reaktivierung EBV-infizierter B-Zellen begünstigen, für die Lymphomagenese von Relevanz zu sein. Hierzu zählen Koinfektionen mit dem HIV oder Plasmodien (Rochford *et al.*, 2005; Cader *et al.*, 2010). Ferner wird davon ausgegangen, dass das EBV über verschiedene Mechanismen und in Abhängigkeit der individuellen Entwicklung eines Tumors zur malignen Entartung der B-Zellen beiträgt (Thorley-Lawson und Allday, 2008). Diesbezüglich wird, neben latenten EBV-Genprodukten (Punkt 1.3.2.1), auch der Integration des EBV-Genoms in die DNA der Wirtszelle ein onkogenes Potential zugeschrieben (Punkt 1.3.2.2).

1.3.2.1 Latente EBV-Genprodukte

Von entscheidender Bedeutung für die Pathogenität des EBV gilt seine Eigenschaft B-Zellen zu immortalisieren. Dies wird über die Expression latenter EBV-Genprodukte gewährleistet. Latent infizierte B-Zellen synthetisieren bis zu sechs Kernproteine (*EBV-encoded nuclear antigen*: EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP), drei Membranproteine (*latent membrane protein*: LMP-1, LMP-2A, LMP-2B) und kleine, nicht polyadenilierte RNAs (*EBV-encoded small RNA*: EBER1, EBER2) (Bornkamm und Hammerschmidt 2001).

Während der Primärinfektion von B-Zellen *in vivo* und der Infektion ruhender B-Zellen *in vitro*, welche zur Ausbildung sogenannter lymphoblastoider Zelllinien (LCL) führt (Kuppers, 2003), werden alle latenten Genprodukte exprimiert (Latenzprogramm 3). Biopsien vom BL und davon etablierte BL-ZL zeigen hingegen ein sehr limitiertes Genexpressionsprofil: EBNA-1 wird als einziges virales Protein regelhaft detektiert (Latenzprogramm 1) (Hatzubai *et al.*, 1987; Gregory *et al.*, 1990). In anderen EBV-assoziierten Tumoren sind außerdem LMP-1 und LMP-2 nachweisbar (Latenzprogramm 2) (Brooks *et al.*, 1992; Deacon *et al.*, 1993).

Initial schrieb man den transformierenden EBV-Genprodukte eine direkte Rolle im Wachstum EBV-positiver BL zu. Heute weist die aktuelle Studienlage hingegen zunehmend auf eine Relevanz des EBNA-1 hin. Diesem scheint eine Funktion in der Apoptose-Inhibition (Komano *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2006) und der Erhöhung der genetischen Instabilität von Tumor-

zellen zuzukommen (Gruhne *et al.*, 2009). Auch die viralen Proteine EBNA-2 (Pan *et al.*, 2009), EBNA-3C (Choudhuri *et al.*, 2007) und LMP-1 (Kulwichtit *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2004) sind womöglich in den Entstehungsprozess EBV-assoziiierter Neoplasien involviert, werden in BL-Zellen allerdings nicht regelhaft exprimiert (Young und Murray, 2003).

1.3.2.2 Die Integration des EBV-Genoms

Das EBV-Genom liegt im Nukleokapsid als doppelsträngige (ds) DNA, in Zellen des BL und BL-ZL als episomales (Lindahl *et al.*, 1976) und/oder als linear in das Wirtsgenom integriertes Molekül vor (Abbildung 1.2) (Adams *et al.*, 1973; Andersson-Anvret und Lindahl, 1978).

Es wird durch vier interne Tandemrepetitionen (*Internal Repeats*, IR1-4) in fünf singuläre Sequenzen (*Unique Regions*, U1-5) unterteilt, wobei der IR1-Abschnitt sechs bis zwölf Wiederholungen eines 3,2 kilobasenpaaren (kbp) großen Sequenzabschnitts umfasst (Given und Kieff, 1979). An den Genomenden liegen zwei sich wiederholende Bereiche (*Terminal Repeats*, TR), welche die Persistenz des Virus als intrazelluläres, zirkularisiertes Molekül ermöglichen (Kintner und Sudgen, 1979).

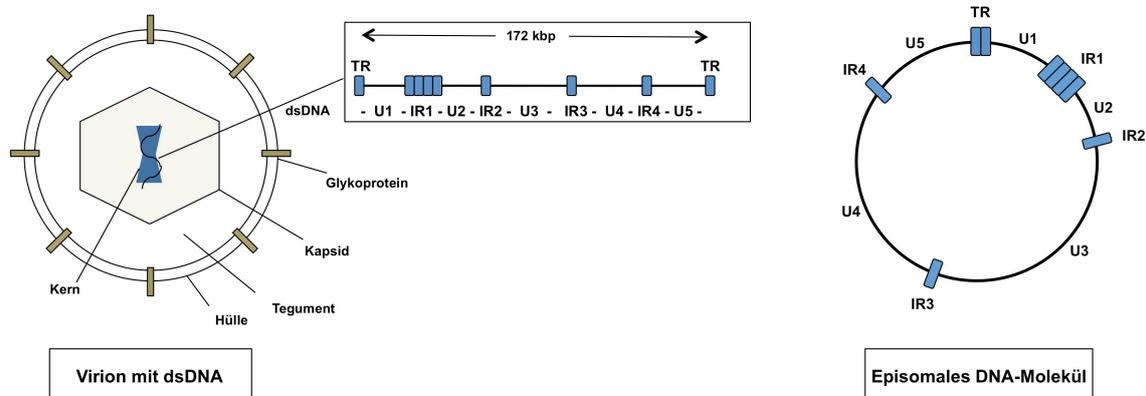


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des EBV-Genoms. Links: die lineare Form des EBV-Genoms (im Virion), rechts: die zirkuläre Form des EBV-Genoms (episomales Molekül) (modifiziert Matsuo *et al.*, 1984).

1.3.2.2.1 Zytogenetische Lokalisation integrierter EBV-DNA

Über eine Integration des EBV-Genoms in die DNA humaner Zellen wurde erstmals in den 70er Jahren berichtet (Adams *et al.*, 1973; Kaschka-Dierich *et al.*, 1977; Andersson-Anvret und Lindahl, 1978). Die Visualisierung und zytogenetische Lokalisierung integrierter EBV-DNA folgte 1983. Mittels *in-situ*-Hybridisierung demonstrierten Henderson *et al.* die EBV-Integration auf 1p35 in Zellen der BL-ZL Namalwa (Henderson *et al.*, 1983). Einige technische Faktoren, wie die Größe des EBV-Genoms und ein hoher Methylierungsgrad der Wirts-DNA, erschweren seither die Identifikation weiterer Integrationsloki (IL) in BL-ZL und LCL (Luo *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2006). Tabelle 1.2 demonstriert die bisher identifizierten EBV-IL.

Tabelle 1.2 Lokalisation der EBV-Integration in BL-ZL und LCL.

BL-ZL / LCL	Chromosomale Lokalisation	Quelle
BL-36	11p15*	Delecluse <i>et al.</i> , 1993
BL-60	t(11;19)	Delecluse <i>et al.</i> , 1993 Wolf <i>et al.</i> , 1993 Jox <i>et al.</i> , 1997
BL-137	1p34*	Delecluse <i>et al.</i> , 1993
NAB-2	2p13	Luo <i>et al.</i> , 2004
Namalwa	1p35	Henderson <i>et al.</i> , 1983 Matsuo <i>et al.</i> , 1984 Lawrence <i>et al.</i> , 1988
Jijoye	3p, 3q, 4p, 4q, 5p, 6p, 6q, 7q, 8q, 11p, 13q, 18q, 21q	Trescol-Biémont <i>et al.</i> , 1987
Raji	1p, 1q, 2q, 3p, 3q, 4q, 5q, 6q, 7p, 7q, 9q, 11p, 14q, 15q	Gao <i>et al.</i> , 2006
EB-2	1p, 1q, 3p, 3q, 4p, 4q, 5p, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 11q, 12q, 13q, 14q, 19p, 10q, 21p	Lestou <i>et al.</i> , 1993
LCL (IB-4)	4q25	Henderson <i>et al.</i> , 1983 Takakuwa <i>et al.</i> , 2005
LCL (P3HR-1)	1q31, 5q2, 13q2, 21q1	Trescol-Biémont <i>et al.</i> , 1987
LCLs (n=3)	1p31, 1q31, 2q32, 3q13, 6q24, 7q31**	Wuu <i>et al.</i> , 1996
LCLs (n=14)	1p31, 1q43, 2p22, 3q28, 4q13, 5p14, 5q12, 11p15**	Lestou <i>et al.</i> , 1993

*Angabe weiterer IL ohne genaue Lokalisation; ** Angabe gehäuft auffindbarer IL; n: Anzahl

Die Daten zeigen, dass die EBV-Integration einen Großteil der Chromosomen und eine Vielzahl unterschiedlicher chromosomaler Loci betrifft (Trescol-Biémont *et al.*, 1987; Lestou *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2006). Die zytogenetische

Lokalisation integrierter EBV-DNA scheint hierbei, ebenso wie die Anzahl der EBV-IL, zwischen den untersuchten BL-ZL und LCL zu differieren. Ob die Integration des Virus eine nicht-randomisierte Verteilung aufweist und bestimmte Chromosomen bzw. chromosomale Abschnitte vermehrt von einer Integration des EBV-Genoms betroffen sind, bleibt aufgrund der geringen Zahl bisher identifizierter IL strittig (Morissette und Flamand, 2010). Ferner bleibt unklar, ob eine präferenzielle Integration des EBV in fragile Stellen des humanen Genoms, die sogenannten *Common Fragile Sites* (CFS) stattfindet. CFS stellen Orte erhöhter chromosomaler Instabilität dar, existent in jedem Individuum (Smith *et al.*, 2005; Lukusa und Fryns, 2008; Debacker und Kooy, 2007). In Neoplasien sind sie oft Ort genomischer Alteration, zudem gelten sie als bevorzugte Integrationsorte humaner Tumoviren (Popescu, 2003). Eine Neigung zur Integration in CFS konnte insbesondere für onkogene Subtypen des humanen Papillomavirus (HPV) (Thorland *et al.*, 2003; Wentzensen *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005) sowie das Hepatitis-B-Virus (HBV) belegt werden (Bonilla Guerrero und Roberts, 2005; Feitelson und Lee, 2007). Bezüglich des EBV wurde die Integration des viralen Genoms in eine CFS bisher lediglich anhand einer BL-ZL gezeigt. In der BL-ZL NAB-2 integrierte das Virus in die FRA2E auf 2p13 des Wirtsgenoms (Popescu *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 2004).

1.3.2.2.2 Pathogene Signifikanz der EBV-Integration

Die Integration des viralen Genoms in die DNA der Wirtszelle stellt bekannterweise einen onkogenen Aspekt humaner Tumoviren dar (zur Hausen, 1991; Flaitz und Hicks, 1998; McLaughlin-Drubin und Munger, 2008; Moore und Chang, 2010). Über die Integration des EBV-Genoms in die DNA von BL-Zellen ist jedoch vergleichsweise wenig bekannt, nicht zuletzt aufgrund der geringen Zahl bisher identifizierter IL (Morissette und Flamand, 2010). Als mögliche Konsequenzen einer EBV-Integration für die Wirtszelle wird zum einen die Änderung der zellulären Genexpression (Luo *et al.*, 2004; Takakuwa *et al.*, 2004), zum anderen die Alteration der genomischen Stabilität diskutiert (Henderson *et al.*, 1983; Popescu *et al.*, 1993; Wolf *et al.*, 1993; Razzouk *et al.*, 1996; Jox *et al.*, 1997).

Eine deregulative Expression der am EBV-Integrationsort gelegenen zellulären

Gene, konnte in zwei Studien belegt werden. Betroffen waren das *BACH2*-Gen in Raji-Zellen (Takakuwa *et al.*, 2004) sowie das *REL*-Gen in der BL-ZL NAB-2 (Luo *et al.*, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass die Expressionsänderung dieser Gene womöglich zur Lymphomagenese der jeweiligen BL-ZL beigetragen hat (Luo *et al.*, 2004; Takakuwa *et al.*, 2004).

Als Indiz für die Beeinflussung der genomischen Stabilität durch integrierte EBV-DNA wird die Größe des EBV-Genoms aufgeführt (Wolf *et al.*, 1993). Mit rund 172 kbp dsDNA stellt dieses das größte, bisher bekannte DNA-Tumorvirus-Genom dar. Das Genom des HPV umfasst beispielsweise nur acht kbp dsDNA (McLaughlin-Drubin und Munger, 2008). Oftmals integrieren zudem mehrere, sequentiell geschaltete Kopien des EBV-Genoms an einem einzigen chromosomalen Lokus des Wirtsgenoms (Popescu *et al.*, 1993; Wolf *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 2004). Eine achromatische Färbung, Läsion oder Einschnürung des EBV-IL wurde in verschiedenen Studien beobachtet und als mögliches Zeichen einer chromosomalen Instabilität gedeutet (Henderson *et al.*, 1983; Popescu *et al.*, 1993; Jox *et al.*, 1997). Über eine Erhöhung der genomischen Instabilität der Wirtszelle könnte das EBV in genomische Umstrukturierungsvorgänge involviert sein und zu sekundären genetischen Veränderungen in BL-Zellen beitragen (Wolf *et al.*, 1993; Jox *et al.*, 1997). Eine rekurrente, chromosomale Abnormalität, die mit der Integration des EBV einhergeht, konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden (Gao *et al.*, 2006). Da über den Verlust integrierter EBV- und angrenzender zellulärer DNA *in vitro* (Wolf *et al.*, 1995; Jox *et al.*, 1997) und *in vivo* (Debiec-Rychter *et al.*, 2003) berichtet wurde, wird zudem ein Aggieren des EBV im Sinne des sogenannten *hit-and-run* Mechanismus diskutiert (Razzouk *et al.*, 1996; Jox *et al.*, 1997; Debiec-Rychter *et al.*, 2003). Dieses Modell besagt, dass ein virales Agens durch einen nur temporär vorhandenen, onkogenen Effekt zur Genese eines Malignoms beiträgt, sein Einfluss in späteren Tumorstadien jedoch nicht mehr nachweisbar ist. Basierend auf dieser These wurde postuliert, die Integration des EBV und ein darauf folgender Verlust zellulärer und viraler DNA könnte einen initiierenden Vorgang in der Genese EBV-negativer BL darstellen. In diesem Fall wäre das EBV, über die Integration des viralen Genoms, auch an der Entstehung sporadischer BL in größerem Maße als bisher vermutet beteiligt (Razzouk *et al.*, 1996; Jox *et al.*, 1997).

1.4 Fragestellung

Um die biologische Signifikanz einer Integration des EBV-Genoms besser verstehen zu können, ist es notwendig die zytogenetische Lokalisation weiterer EBV-IL zu explorieren. Dies stellt die Basis dar, um die Folgen der EBV-Integration für die Wirtszelle und deren Bedeutung im Entstehungsprozess des BL eruieren zu können.

So bedarf es in etwa der genauen Lokalisation viraler Integrationsstellen, um in einem nächsten Schritt die möglicherweise durch eine EBV-Integration alterierten, zellulären Gene identifizieren zu können. Die chromosomale Verteilung der EBV-IL könnte hierbei einerseits auf einer präferenziellen Integration des EBV in fragile Stellen des Genoms basieren, andererseits auf wichtige, in die Genese des BL besonders frequent involvierte, Gene hinweisen. Aus der Identifizierung dieser Gene könnten sich zukünftig Möglichkeiten der gezielten, therapeutischen Intervention ergeben und die hohe Therapie-Aggressivität, ein entscheidendes Problem heutiger Konzepte, womöglich vermindert werden. Die Verknüpfung eines in die Lymphomagenese involvierten Gens zu einem spezifischen Schritt des Tumorgeneseprozesses kann zudem klinisch wichtige Marker der Tumorprogression aufdecken und zu einer verbesserten Betreuung von Patienten beitragen.

Ziel dieser Arbeit ist daher die zytogenetische Kartierung der EBV-Integration in 20 EBV-positiven BL-ZL. Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und eigens hergestellter DNA-Sonden sollen EBV-IL identifiziert, die chromosomale Distribution dieser analysiert sowie eine mögliche Bedeutung der IL im Entstehungsprozess des BL diskutiert werden.

2 Materialien

2.1 Burkitt-Lymphom-Zelllinien

Das Gesamtkollektiv verwendeter BL-ZL umfasste 21 EBV-positive sowie zwei EBV-negative BL-ZL. Die BL-ZL AG876, Akuba, BL16, BL18, BL60, CW698, Daudi, JBL2, JI, Jijoye, LY-47, LY-67, LY-91, Maku, Naliaka, PA-682, Rael, Seraphine, Solubo, Silfere, Salim Mwalim und Switzer waren eine freundliche Donation von Professor G. Klein (Department of Microbiology & Tumor Biology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden). Von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany) stammen die BL-ZL CA-46, EB-1, Namalwa und Raji. Alle verwendeten BL-ZL sind mit ihren Charakteristika in Tabelle 2.1 gelistet.

Tabelle 2.1 Übersicht über verwendete BL-ZL.

BL-ZL	Typ / Ethnie	Alter / Geschlecht	EBV	publizierter Karyotyp	Quelle
AG876	BL/afrikanisch	M/8	+		Pizzo <i>et al.</i> , 1978
Akuba	BL/afrikanisch		+		Klein <i>et al.</i> , 1972
BL16	BL/afrikanisch	W/5	+	46,XX,t(8;14)	Bernheim <i>et al.</i> , 1983 Lenoir <i>et al.</i> , 1985
BL18	BL/nord-afrikanisch	M/3	+	46,XY,t(8;14)	Bernheim <i>et al.</i> , 1983 Lenoir <i>et al.</i> , 1985
BL60	BL/nord-afrikanisch	W/4	+	42~48,XX,-X,add(3)(q27),t(8;22)(q24;q11.2),dic(15;21)(p13;p13),der(16)t(13;16)(q12;24),der(17)add(17)(p11.2)add(17)(q11.2),del(17)(p11.2),-19,add(19)(p13.3),del(20)(q11.2q13.1)	Lenoir <i>et al.</i> , 1985 Karpova <i>et al.</i> , 2005
CA-46	BL/amerikanisch		-	46(45~48)<2n>X/XY,dup(1)(q21q32),dup(7)(q12q22),t(8;14)(q24;q32)	Magrath <i>et al.</i> , 1980 Drexler <i>et al.</i> , 2001
CW698	BL/amerikanisch		-		Taub <i>et al.</i> , 1982
EB-1	BL/afrikanisch	W/9	+	47(44~48)<2n>XX/XXX,+7,t(8;14)(q24;q32),der(11)t(11;?)(q22;?),der(19)t(19;?)(q13;?)	Epstein und Barr, 1964 Drexler <i>et al.</i> , 2001

BL-ZL	Typ / Ethnie	Alter / Geschlecht	EBV	publizierter Karyotyp	Quelle
JBL2	BL/japanisch	M/29	+	46,XY,t(2;8)(p12;q24)	Miyoshi <i>et al.</i> , 1979
JI	BL/kaukasisch	W/34	+	46;XX, t(2;8)(p11;q24)	Bornkamm <i>et al.</i> , 1980
LY-47	BL/afrikanisch	M	+	46,XY,t(8;22)(q24;q11)	Bernheim <i>et al.</i> , 1981 Favrot <i>et al.</i> , 1984
LY-67	BL/afrikanisch	M/8	+	46,XY,t(8;22)(q24;q11),der(4)(4pter→4q22::5q13→5qter),del(11)(q24)	Bernheim <i>et al.</i> , 1981 Favrot <i>et al.</i> , 1984 Cohen <i>et al.</i> , 1987
LY-91	BL/afrikanisch	W/7	+	46,XX,t(2;8)(p12;q24)46,XX,t(2;8)(p11.2;q24.2)/46,XX,idem,der(13)t(1;13)(q32.1;p12)	Bernheim <i>et al.</i> , 1981 Favrot <i>et al.</i> , 1984 Cohen <i>et al.</i> , 1987
Maku	BL/afrikanisch	M	+	46,t(8;22),i(3q)46,XY,t(8;22),t(3;13)(p14;p11),t(10;17)(p13;q23),i(3q)	Yata und Klein, 1969 Berger und Bernheim, 1985 Cohen <i>et al.</i> , 1987
Naliaka	BL/afrikanisch		+		Klein <i>et al.</i> , 1972
Namalwa	BL/afrikanisch	W/3	+	48,X,+7,+7,+18,1q+,3q+,del(3)(p11),del(4)q21,inv(10),del(15)(q21→q24)/46,X,t(8;14),+7,+18,-21,dup(1)(q22→q25),dup(3)(q13→q24), Variationen 44(43~46)<2n>X,-Y,-5,-6,+7,-10,-13,-21,+3mar,ins(1;?)(p11;?),ins(3)(q11q29),der(5)t(1;5)(q25;q35),del(8)(p22),der(14)t(14;?)(p11;?)	Klein <i>et al.</i> , 1972 Berger und Bernheim, 1985 Drexler <i>et al.</i> , 2001
PA-682	BL/kaukasisch	M/30	+	46,XY,dup(1)(q21q32),t(8;22)(q24;q11-12)	Magrath <i>et al.</i> , 1983
Rael	BL/afrikanisch		+		Klein <i>et al.</i> , 1972
Raji	BL/afrikanisch	M/12	+	46~48,XY,t(8;14),+20,+21,4q+,del(7)(q22),+mar89(80~91)<4n>XXYY,-4,-9,-12,-16,-18,-21,+3mar,add(4)(q35),add(6)(q27)x2,t(8;14)(q24;q32),der(8)t(8;14)(q24;q32)add(8)(?)	Berger und Bernheim, 1985 Drexler <i>et al.</i> , 2001 Pulvertaft, 1964
Salim Mwalim	BL/afrikanisch		+		Jondal und Klein, 1973
Seraphine	BL/afrikanisch	W/7	+	46,XX,t(8;14)(q24;q32),der(16)t(1;16)(q41;q24)	Klein <i>et al.</i> , 1972 Bernheim <i>et al.</i> , 1981 Cohen <i>et al.</i> , 1987
Silfere	BL/afrikanisch	W/6	+	48,XX,t(8;14)(q24;q32'),+3,+7/47,XX,der(8)t(8;13)(q24;q11),der(14)t(8;14)(q24;q32),+7	Nadkarni <i>et al.</i> , 1969 Bernheim <i>et al.</i> , 1981
Solubo	BL/afrikanisch		+		Klein <i>et al.</i> , 1972

BL-ZL	Typ / Ethnie	Alter / Geschlecht	EBV	publizierter Karyotyp	Quelle
Switzer	BL/amerikanisch	M/16	+	46,XY,t(8;14)(q24;q32)	Epstein <i>et al.</i> , 1976 Kaiser-McCaw <i>et al.</i> , 1977

M: männlich; W: Weiblich

2.2 Chemikalien / Lösungen / Reagenzien

2.2.1 Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

1. Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
2. Merck, Darmstadt, Deutschland
3. Serva, Heidelberg, Deutschland
4. Promega, Madison, USA
5. Sigma-Aldrich, München, Deutschland
6. Roche, Mannheim, Deutschland
7. Baker, Deventer, Netherlands

2.2.2 FISH

Alle Lösungen wurden in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

* 20x SSC (1L)

- 88,2g Tri-Natrium Citrat Dihydrat [C₆H₅Na₃O₇ x 2H₂O]
- 175,3g NaCl
- aufgefüllt mit ddH₂O auf 1L
- 4x SSC + Tween-20 (0,05%)
- 2x SSC
- 0,1x SSC

* 10x PBS (1L)

Lösung I:

- 16,02g Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 73,84g NaCl

- 900ml ddH₂O

Lösung II:

- 2,76g NaH₂PO₄ x 2H₂O
- 16,36g NaCl
- 200ml ddH₂O

Arbeitslösung:

- Lösung 1 + Lösung 2 bis pH-Wert 7

• 1x PBS

* 10x TNT (1L)

- 121,4g Tris-base
- 87,4g NaCl
- aufgefüllt mit ddH₂O auf 1L
- pH-Einstellung mit 5M HCl auf pH-Wert 7,5

• 1x TNT

* 50% Formamid (1L)

- 500ml 99% Formamid
- 100ml 20x SSC
- 400ml ddH₂O
- pH-Einstellung mit 5M HCl auf pH-Wert 7,5

* 70% Formamid (100ml)

- 70ml pures Formamid
- 10ml 20xSSC
- 20ml ddH₂O
- pH-Einstellung mit 5M HCl auf pH-Wert 7,5

* Formaldehydlösung (Fixativ)

- 68,3ml 1x PBS
- 3,7ml 1M MgCl₂
- 2ml 37% Formaldehyd

* Bio-Blocking-Reagenz

- 0,5g Blocking reagent
- 100ml 4x SSC

* Dig-Blocking-Reagenz

- 0,5g Blocking reagent
- 100ml 1x TNT

- * Hybridisierungs-Lösung (10/10) (40ml)
 - 10ml 99% Formamid
 - 2ml 20x SSC
 - 4ml Dextran Sulfate 50%
 - 4ml ddH₂O
 - pH-Einstellung mit 1M HCl auf pH-Wert 7
- * DAPI (4'6-Diamidine-2-Phenylindole Dihydrochloride)
 - Lösung I (10mg/ml):
 - 10mg DAPI
 - 1ml ddH₂O
 - Lösung II (1mg/ml):
 - 2µl Lösung I zu
 - 18µl ddH₂O
 - Arbeits-Lösung:
 - 0,5µl Lösung II
 - 1ml Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- * 1M MgCl₂ (100ml)
 - 20,33g MgCl₂ x 6H₂O
- * RNase-Lösung
 - 100µg/ml RNase A (10mg/ml)
 - 900 ml 2xSSC
- * Carnoy's-Fixativ(1:3):
 - 2ml Eisessig
 - 6ml Methanol
- * Avidin-FITC (Fluoresceinisothiocyanat)=Fluorescein Avidin D (5mg/ml) (Vector Laboratories)
- * Anti-Avidin=*biotinylated* Anti-Avidin D (0,5mg/ml) (Vector Laboratories)
- * Anti-Digoxigenin-Rhodamin (0,2mg/ml)
- * Texas Red = Texas Red *conjugated donkey anti sheep Ig* (1,25mg/ml) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)
- * 37% HCl
- * 0,1M HCl
- * 1M HCl
- * 5M HCl

- * Pepsin (100mg/ml)
- * Human COT-1 DNA (1mg/ml)
- * 37% Formamid
- * Ethanol

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

- * DMSO (Dimethylsulfoxid)
- * Formamid
- * AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase
- * 10x AccuPrime™ reaction mix
- * *Primer*: Die *Primer* EBV1 und EBV2 wurden durch die Firma MWG-Biotech GmbH bezogen (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Übersicht über verwendete *Primer*.

<i>Primer</i>	Nukleotidsequenz (5'-3')	Größe (bp)	Nukleotidnummer*
EBV1	<i>For</i> : 5'-CTTCTCTCTGTCCCCCTGCTCCTCT-3' <i>Rev</i> : 5'-CTAGGGTCCCTTCTGGGGGACATCCT-3'	2958	13232-13256 16189-16164
EBV2	<i>For</i> : 5'-TTCGTCTTGCTCTATTCACCCTTAC-3' <i>Rev</i> : 5'-CACTGTAATGAAGACGTTGGAACAG-3'	3267	5-29 3271-3247

*Die angegebenen Nukleotidnummern entsprechen dem EBV-Genom Stamm B95-8 (Gao *et al.*, 2006).

2.2.4 Gelelektrophorese

- * UltraPure™ Agarose
- * 50xTAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer
 - 242g Trisbase
 - 57,1ml Eisessig
 - 100ml 0,5M EDTA
 - aufgefüllt mit ddH₂O auf 1L
- * SYBR Safe™ DNA Gel Stain (10,000 x Konzentrat in DMSO)
- * 6x Ladepuffer
 - 0,25% Bromophenolblau

- 40% (g/v) Sukrose
- * Größenmarker: λ -DNA, HindIII gespalten

2.2.5 Markierung der Sonden-DNA

- * dNTP-Mix
- * Biotin-16-dUTP 50nM
- * DNA-Polymerase I 10x *Reaction Buffer*
- * DNase I (1mg/ml)
- * DNA-Polymerase I (9,0U/ μ l)
- * Digoxigenin-11-dUTP 125nM

2.2.6 Zusätzlich verwendete DNA-Sonden/BAC-Klone

- * Zentromer-22 Sonde p22/1:2:1
- * Der BAC (*bacterial artificial chromosome*) Klon 440P5, welcher das auf 2p16 lokalisierte *BCL11A*-Gen beinhaltet, wurde von der RPCI-11 Library bezogen (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY). Ausgewählt wurde der Klon anhand zuvor archivierter Informationen der NCBI-GenBank (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; April 2005)

2.2.7 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

- * QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- * QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- * MicroSpin™ G-50 Columns (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)

2.3 Geräte

- * Autoklav 2540 EL (Systec GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- * Gefrierschrank (Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland)
- * Eismaschinen:
 - AF-80 (Scotsman, Vernon Hills, USA)

- FM-120 DE (Hoshizaki, Willich-Münchheide, Deutschland)
- Sicherheitswerkbank Typ KS 12 (Thermo Electron GmbH, Oberhausen, Deutschland)
- CO₂-Inkubator Model MCO-20AIC (Sanyo Electric Co.)
- Wärme-/Trockenschrank B26 (Mettler GmbH, Schwabach, Deutschland)
- Heizplatte (Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland)
- DNA Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifugen:
 - Hetovac Vakuumzentrifuge Typ VR-1 (Heto High Technology of Scandinavia, Birkerød, Dänemark)
 - Kühlzentrifuge 5415R (Eppendorf)
 - Multifuge 3s Zentrifuge (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
 - Zentrifuge 5415 (Eppendorf)
- Wasserbäder (Mettler GmbH)
- Schüttler KM-2 (Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland)
- Magnetrührer RCT Basic (IKA Labortechnik Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland)
- Vortexer REAX 2000 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
- pH-Meter CG 811 (Schott Geräte GmbH, Hotheim, Deutschland)
- Analysenwaage PB300 (Mettler Toledo, München, Deutschland)
- Pipetus-Akku (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland)
- Serological Pipett Falcon ® 2,5 - 10 - 25 ml (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
- Laborpipetten 2-20-100-1000 µl; Pipettenspitzen (Gilson, Middleton, USA)
- Geldokumentationssystem Eagle-eye 2™ (Stratagene, La Jolla, USA)
- BioPhotometer 6131 und Thermal printer (Eppendorf)
- Horizontalgelelektrophorese, -Kammern, -Schlitten, -Kämme (Gibco BRL, Gathersburg, USA)
- Electrophoresis Power supply PS 304 (Gibco BRL)
- Mikrowelle R-2V26 (Sharp Electronics Europe GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Vakuumpumpe CT60E (Heto)
- Lichtmikroskop 473012-9902 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland)
- Mikroskop-System für die FISH-Analyse:
 - Phasenkontrastmikroskop (Carl Zeiss GmbH)

- CCD-Kamera SenSys™ (Photometrics GmbH, München, Deutschland)
- Monitor DELL (ViewSonic, Walnut, USA)
- Vorschaltgerät HBO 100 W Zeiss, (Carl Zeiss GmbH)
- Software: Quips™ FISH (Vysis GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)

2.4 Sonstige Materialien

- Deckgläser 24x60 und 18x18 mm (Marienfeld laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Fixogum Rubber-Cement (Marabu GmbH, Tamm, Deutschland)
- Objektträger Superfrost /Plus Assistent® (Hecht, Sondheim, Deutschland)
- PCR-Tubes: 0,2 ml Kette (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland)
- Gewebe-Kulturflaschen (Falcon, Heidelberg, Deutschland)
- Einweg Kuvetten uvette® 220 - 1600 nm (Eppendorf)
- Immersionsöl Immersol 518 F (Carl Zeiss GmbH)

3 Methoden

3.1 DNA-Isolierung aus Zellkulturmaterial

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturmaterial wurde der QIAamp DNA Mini Kit verwendet. Die DNA wurde nach Angaben des Herstellers präpariert, eluiert und Konzentration und Reinheit anschließend photometrisch überprüft. Bis zur Weiterverwertung erfolgte die Lagerung bei -20°C .

3.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Absorption einer Verdünnung der isolierten DNA wurde photometrisch gemessen. Hierbei wurde ein Absorptionsspektrum im Bereich zwischen 230 nm und 320 nm aufgenommen. Die zu messende DNA wurde im Verhältnis 1:50 mit ddH₂O verdünnt und in eine Einmalküvette gefüllt. Als Nullabgleich wurde die entsprechende Menge *Aquadest* verwendet. Gelöste dsDNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, das von Proteine hingegen liegt bei 280 nm. Das Verhältnis der Extinktionen bei den Wellenlängen 260 und 280 nm (E_{260}/E_{280}) ermöglicht somit eine Einschätzung der Reinheit der Nukleinsäure. Der Quotient reiner DNA sollte größer 1,8 sein (1,8-2,2). Niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts *in vitro* und wurde zum Nachweis EBV-spezifischer Sequenzen in der genomischen DNA der BL-ZL sowie zur Herstellung der Sonden-DNA eingesetzt.

3.3.1 Das Prinzip der Methode

Eine PCR besteht aus drei Schritten, welche unter bestimmten thermischen Bedingungen zyklisch wiederholt werden:

- Denaturierung
- *Primer*hybridisierung
- Synthese / Elongation

Denaturierung

Die dsDNA (Matrize) wird zunächst durch Erhöhung der Temperatur denaturiert. Die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basenpaaren, sowie die Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts bestimmen die hierfür benötigte Temperatur. Das Vorliegen als Einzelstrang ermöglicht es den zugefügten Oligonukleotiden, sich in einem nächsten Schritt an die DNA anzulagern.

Primerhybridisierung

Eingesetzt werden zwei synthetische Oligonukleotide, *sense* und *antisense*, welche zu den 3' Enden des entsprechenden DNA Segments komplementär sind. Sie grenzen die zu amplifizierende Sequenz ab und dienen später der Polymerase als *Primer* für die Synthese eines komplementären DNA-Strangs. Damit sie mit den komplementären Sequenzen der eingesetzten DNA hybridisieren, werden sie im Überschuss hinzugegeben und die Temperatur gesenkt. Die zur Hybridisierung benötigte Temperatur wird als *Annealing*-Temperatur bezeichnet und liegt etwa 2-5°C unter dem Schmelzpunkt der verwendeten *Primer*. Sie ist wichtig um eine spezifische Anlagerung an die DNA zu gewährleisten. Zu hohe Temperaturen verhindern eine effektive Hybridbildung, zu niedrige Temperaturen führen zu Hybriden in nicht vollständig komplementären DNA Abschnitten und somit zu ungewollten Nebenprodukten.

Synthese

Ausgehend von den *Primer*-DNA-Hybriden beginnt die hitzeresistente DNA-Polymerase schließlich mit der Verknüpfung der hinzugesetzten, freien Deoxynukleotide. Es entsteht eine komplementäre Abschrift der DNA. Die in

diesem Schritt verwendete Temperatur hängt von der verwendeten Polymerase ab, die benötigte Zeit von Polymerase und Größe des DNA-Fragments. Wiederholte Zyklen von Denaturierung und Synthese führen schließlich zu einer exponentiellen Amplifikation des PCR-Produkts.

3.3.2 Nachweis der EBV-Positivität der BL-ZL

Zum Nachweis der EBV-Positivität wurde eine *Long-Distance* PCR (LD-PCR) mit den *Primern* EBV1 und EBV2 und je 1,5 µg der genomischen DNA der BL-ZL durchgeführt. Dieses PCR-Verfahren ist besonders geeignet zur Amplifikation großer DNA-Fragmente (bis zu 12 kbp). Durch die 3'-5' *Proofreading*-Aktivität der verwendeten Polymerase wird die korrekte Herstellung des PCR-Produktes garantiert und insbesondere in großen PCR-Fragmenten werden weniger Fehler generiert. Die *Primer* wurden durch die Firma MWG-Biotech GmbH bezogen. Für genaue Sequenzen siehe Punkt 2.2.3. Die *Annealing*-Temperatur des jeweiligen *Primers* wurde zuvor mittels einer Gradient-PCR bestimmt.

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma Eppendorf unter Verwendung des folgenden Reaktionsansatzes:

AccuPrime Pfx Polymerase	0,4µl
10xBuffer Pfx	5µl
EBV1/EBV2 <i>Primer</i> paar <i>For</i> und <i>Rev</i> (10pm/µl) je	1,5µl
DMSO (5%)	1,25µl

DMSO wurde verwendet, um das Aufbrechen der Sekundärstruktur zu erleichtern. Der Reaktionsansatz wurde mit mit ddH₂O auf 50µl aufgefüllt, in beschriftete PCR-Tubes transferiert und die PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiation	95°C	4 Minuten
40 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	1 Minuten
Hybridisierung	EBV1: 63°C EBV2: 59°C	1 Minuten
Verlängerung	68°C	4 Minuten
Endverlängerung	68°C	10 Minuten
∞ 4°C		

3.3.3 Herstellung der Sonden-DNA

Zur Amplifizierung der Sonden-DNA wurde der *Primer* EBV1 eingesetzt und an 1,5µg der genomischen DNA der BL-ZL Raji verwendet. Reaktionsansatz und PCR-Protokoll entsprachen dem oben angegebenen Protokoll für den Nachweis der EBV-DNA. Nach Abschluss der PCR erfolgte die Lagerung aller Produkte bei 4°C. Zur Auswertung der Amplifikationsprodukte wurden je 5µl der PCR-Produkte auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels des Qiagen®-Protokolls aufgereinigt (Punkt 3.5). Anschließend wurden der Nukleinsäuregehalt und die Reinheit der Proben photometrisch überprüft, bevor diese sequenziert wurden (Punkt 3.2 und 3.6).

3.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei konstanter Spannung (80-100 Volt) in einem Horizontal-Gelapparat. Zur Herstellung der Trägersubstanz, wurde 1% Agarose in 1x TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst. Vor dem Polymerisieren der Agarose wurde für den optischen Nachweis der Fragmente SYBRsafe hinzugegeben. Dieses lagert sich in die DNA ein und emittiert nach Anregung mit ultraviolettem (UV) Licht sichtbares Licht. Je 5µl der PCR-Proben wurden mit 2µl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die PCR-Produkte wanderten in Abhängigkeit von ihrer Größe, Ladung und Struktur zur Anode des elektrischen Feldes. Das Mitlaufen eines entsprechenden Molekulargewichtsmarker (HindIII gespaltene λ-DNA) in einer weiteren Geltasche diente der Abschätzung der Fragmentgröße der Proben. Nach etwa 40 Minuten erfolgte die Darstellung der DNA mittels eines computergestützten

Geldokumentationssysteme.

3.5 Reinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels des QIAquick PCR Purification Kits. Dieses eignet sich für die Reinigung ein- oder doppelsträngiger PCR-Produkte mit einer Größe von 100bp bis 10kbp. DNA ab einer Größe von 100bp bindet unter hoher Salzkonzentration und optimalem pH an die Silikatmembran der Säule. *Primer*-Dimere sowie ungebundene *Primer* und nicht inkorporierte dNTP binden nicht, oder werden in folgenden Waschschrritten unter Zentrifugation eliminiert. Die gereinigte DNA wurde anschließend unter niedriger Salzkonzentration von der Matrix gelöst und in 30µl ddH₂O eluiert.

3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte durch die MWG-Biotech GmbH. Hierzu wurden jeweils 240 ng der luftgetrockneten Probe und 2pm/µl der *Primer*paare, gelöst in 15µl ddH₂O, eingesendet.

3.7 Markierung der DNA-Sonden

Die mittels LD-PCR vervielfältigte, EBV- spezifische DNA-Sequenz, wurde nach dem Prinzip der Nick-Translation indirekt markiert. Bei der Nick-Translation handelt es sich um ein 1977 von Rigby *et al.* entwickeltes Prinzip (Rigby *et al.*, 1977). Das Enzym DNase I erzeugt zunächst Einzelstrangbrüche in der Sonden-DNA, an denen die DNA-Polymerase I anschließend die eingesetzten Markermoleküle, Biotin- bzw. Digoxigenin markierte dUTP, enzymatisch inkorporiert.

Zur Herstellung EBV-spezifischer Sonden wurde 1µg dsEBV-DNA eingesetzt und folgendes Reaktionsgemisch verwendet:

dNTP-Mix	1µl
50nM Biotin-16-dUTP	1µl
DNA-Polymerase I Puffer	5µl
DNase I	9µl
DNA-Polymerase I	1µl

Nach Zugabe aller Komponenten wurde das Reaktionsgemisch mit ddH₂O auf 50µl aufgefüllt und die Reaktion bei 16°C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde sie durch Erhitzen im 75°C Wasserbad abgestoppt (7 Minuten). Danach wurden die Sonden für mindestens eine Minute auf Eis gelagert. Die Aufreinigung der DNA-Sonden fand unter Gebrauch von MicroSpin G-50 Säulen statt. Die in den Säulen enthaltene Matrix (*Sephadex resin*) ermöglicht eine Auftrennung nach dem Prinzip der Gelfiltration und reinigt somit von nicht eingebauten Nukleotiden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Sonden bei -20°C gelagert. Zur Verifizierung schwer identifizierbarer, Hybridisierungssignale tragender Chromosomen, wurde bei einigen Präparaten eine zusätzliche Sonde eingesetzt (siehe Punkt 2.2.6). Zur Herstellung wurde oben angegebenes Protokoll und Digoxigenin verwendet.

3.8 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

3.8.1 Das Prinzip der Methode

Die FISH ist eine zytogenetische Methode, welche die Lokalisation spezifischer DNA-Sequenzen auf Einzelzellniveau ermöglicht. Hierzu werden definierte DNA-Sequenzen (sogenannte Sonden) markiert (Punkt 3.7), mit den zu untersuchenden Zellen hybridisiert und anschließend über ein System Fluoreszenzmarkierter Antikörper (AK) sichtbar gemacht. In der Hämatonkologie wird dieses Verfahren unter anderem zum Nachweis numerischer und struktureller chromosomaler Aberrationen in komplexen Tumorgenomen sowie zum Nachweis integrierter Virus-DNA eingesetzt. Das Muster der

Hybridisierungssignale ermöglicht hierbei Rückschlüsse auf die virale Verweilform im untersuchten Material (Punkt 3.8.3).

Im Detail umfasst der Prozess folgende Schritte:

- Denaturierung (von Ziel- und Sonden-DNA)
- Hybridisierung
- Detektion und Amplifikation der Signale

Jene Sequenzen, die in der genomischen DNA des Untersuchungs-materials detektiert werden sollen, werden markiert und als Sonden eingesetzt. Die Markierung der Sonden-DNA erfolgt entweder direkt durch Fluoreszenz-Farbstoffe oder indirekt, durch den Einbau von Biotin- oder Digoxigenin-konjugierten Nukleotiden. Sowohl Sonden- als auch Ziel-DNA werden zunächst denaturiert, so dass sie anschließend als Einzelstrangmoleküle vorliegen. Dies ermöglicht die Hybridisierung von Sonden-DNA mit dem Untersuchungsmaterial. Die Sonden lagern sich an komplementäre DNA-Abschnitte der zu untersuchenden Zellen an und werden in einem nächsten Schritt sichtbar gemacht. Bei indirekt markierten Sonden erfolgt dies über ein System fluoreszenzmarkierter AK, welche nach UV-Anregung Licht spezifischer Wellenlänge emittieren. Eine Kaskade von AK-Antigen-Reaktionen resultiert in einer Verstärkung des Signals. Eingesetzte Sonden können fluoreszenzmikroskopisch auf Interphasezellkernen oder Metaphasechromosomen detektiert werden. Letzteres erlaubt eine genaue zytogenetische Lokalisation der Sonden.

3.8.2 FISH der BL-ZL-Präparate

Vorbereitung und Fixierung der Zellen auf dem Objektträger

Die Aufbewahrung des Probenmaterials erfolgte als Fixativ-Zellsuspension bei -20°C. Zur Herstellung von FISH-Präparaten wurden die benötigten 15 ml Röhren bei 1000rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe frischen Fixativs wurde schließlich eine neue Zellsuspension

hergestellt.

Die Zellen wurden gleichmäßig auf zuvor mit 100% Ethanol und *Aquadest* gereinigte Objektträger pipettiert. Die Objektträger wurden unter Raumtemperatur getrocknet und die Qualität der Metaphasen im Lichtmikroskop überprüft. Bis zum weiteren Gebrauch erfolgte die Lagerung der Objektträger bei -20°C.

Vorbehandlung und Denaturierung der Ziel-DNA

Die Objektträger wurden zunächst kurz mit 2x SSC bei Raumtemperatur befeuchtet. Im Anschluss daran wurden 100µl frische RNase-Lösung (10%) auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckglas versehen für 1 Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde eine Lösung 0.01M HCl auf 37°C vorgewärmt. Nach der RNase-Behandlung folgten Waschvorgänge in 2x SSC und 1x PBS für jeweils 5 Minuten. Der Verdau der verbliebenen Proteinanteile erfolgte mit 130µl Pepsin in der vorgewärmten HCl-Lösung bei 37°C für 2,5 Minuten. Es folgte ein Waschvorgang in 1x PBS für 5 Minuten. Schließlich wurden die Präparate in Formaldehydlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur nachfixiert und jeweils 5 Minuten in 1x PBS und 2x SSC gewaschen. Darauf folgte der Denaturierungsvorgang in 70%iger Formamidlösung im 75°C -Wasserbad. Je nach Empfindlichkeit der verwendeten Zellen verblieben die Objektträger 1-2,5 Minuten in der Lösung. Formamid schwächt durch seine starke Polarität die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Einzelsträngen und bewirkt so eine Erniedrigung des DNA-Schmelzpunktes von 90°C auf 70-75°C. Auf diese Weise wird eine thermische Zerstörung der Chromosomenstruktur verhindert. Um den Denaturierungsvorgang zu stoppen, verblieben die Objektträger anschließend für 3 Minuten in eiskalter 2x SSC-Lösung. Darauf folgte die Denaturierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 70%, 80% und 100% für jeweils 3 Minuten und die Trocknung der Präparate an der Luft.

Sonden-DNA

DNA-Sonden können hoch- und mittelrepetitive Sequenzen enthalten, welche unspezifisch mit der Ziel-DNA hybridisieren. Um dies zu verhindern wurde eine Vorhybridisierung der Sonden mit Human COT-1 DNA durchgeführt. Die aus

menschlicher Plazenta gewonnene Human COT-1 DNA beinhaltet repetitive Sequenzen der Kpn-Familie [*long interspersed nuclear elements (LINE)*] und der Alu-Familie [*short interspersed nuclear elements (SINE)*], die sich an komplementäre Sequenzen der Sonden-DNA anlagern. Repetitive, unspezifische Sequenzen werden so durch die unmarkierte „Konkurrenz“-DNA abgesättigt. Es wurden jeweils 8µl Sonde mit 10µl COT-1 gemischt und die Lösung in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die getrockneten Proben wurden anschließend in 10µl Hybridisierungspuffer gelöst und die Sonden-DNA im Wasserbad bei 37°C unter mehrmaligem Vortexen gelöst. Die anschließende Hitzedenaturierung erfolgte im 75°C-Wasserbad für 5 Minuten. Eine einminütige Abkühlung auf Eis verhinderte die erneute Zusammenlagerung der nun einzelsträngigen DNA. Es folgte die Vorhybridisierung im Wasserbad bei 37°C für 60 Minuten.

Hybridisierung

Nach Lufttrocknung des Objektträgers wurden 10µl der Sonden-DNA aufgetragen, der Objektträger mit einem Deckglas versehen und die Ränder mit Fixogum luftdicht abgeschlossen. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer.

Detektion und Signal-Amplifikation

Nach dem Hybridisierungsprozess wurden die Deckgläschen vorsichtig gelöst und die Objektträger jeweils dreimal 5 Minuten in 50%igem Formamid und 2x SSC bei 43°C, sowie dreimal 5 Minuten in 0,1x SSC bei 60°C gewaschen. Zwecks Eliminierung ungebundener bzw. unspezifisch gebundener DNA-Sequenzen schloss sich ein erneuter Waschvorgang in 4x SSC + Tween-20 (0,05%) für 5 Minuten an. Anschließend wurden jeweils 100µl Bio-Blocking-Reagenz auf die Objektträger pipettiert und diese für 25 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Deckgläschen wurden entfernt und die Objektträger kurz in 4x SSC + Tween-20 (0,05%) gewaschen.

Die Biotin-Detektion wird über einen dreistufigen Prozess aus Antigen-AK-Reaktionen erzeugt. Ab hier wird im Dunkeln gearbeitet. Zunächst lagert sich FITC-konjugiertes Avidin als passender AK an die Biotin-Moleküle an. Hierzu wurden 1000µl Bio-Blocking-Reagenz mit 1µl Avidin-FITC gemischt und bei 4°C

und 13000 rpm für 30 Minuten in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Je 100µl dieser Lösung wurde auf die Objektträger aufgetragen und diese für 35 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgten Waschvorgänge in 4x SSC+Tween-20 (0,05%) und 1x TNT für jeweils zweimal fünf Minuten. Anschließend wurden biotinylierte Anti-Avidin-AK eingesetzt. Diese binden an das Biotin-gebundene Avidin-FITC, was zu einer Amplifizierung der Signale führt.

Zwecks Detektion der mit Digoxigenin markierten Sonden wurden mit 5(6)-Carboxyrhodamin-101-N-hydroxysuccinimidester konjugierte Anti-Digoxigenin-AK vom Schaf verwendet. 1000µl Dig-Blocking-Reagenz wurden mit 10µl Anti-Avidin und 10µl Anti-Digoxigenin-Rhodamin vermischt und unter vorherigen Bedingungen zentrifugiert. Jeweils 100µl dieser Lösung wurden auf die Objektträger aufgetragen und diese 35 Minuten bei 37°C inkubiert. Erneut wurde vier mal in 1x TNT für jeweils 5 Minuten gewaschen. In einem dritten Schritt erfolgte nun die Amplifikation der Signale. Analog zum ersten Schritt wurde hierfür Avidin-FITC verwendet, welches sich an die nun mit Biotin konjugierten Anti-Avidin-AK anlagerte. Zur Signalverstärkung der mit Digoxigenin markierten Sonden wurde Texas Red eingesetzt. Texas Red ist ein fluorochrommarkierter AK vom Esel, der gegen die schwere Kette von IgG-AK des Schafes gerichtet ist und an das vorher verwendeten Anti-Digoxigenin-Rhodamin bindet. 1000µl Bio-Blocking-Reagenz wurden mit 1µl Avidin-FITC und 10µl Texas-Red vermischt, zentrifugiert und anschließend jeweils 100µl der Lösung auf die Objektträger pipettiert. Nach einer 35-minütigen Inkubation bei 37°C, wurde viermal in 1x TNT für jeweils 5 Minuten und einmal in 1x PBS für 3 Minuten gewaschen. Schließlich wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 70%igem, 80%igem und 100%igem Ethanol denaturiert und unter dem Abzug getrocknet. Zur Sichtbarmachung der Chromosomen wurde mit jeweils 29µl DAPI gegengefärbt und die Objektträger mit einem Deckglas abgedeckt. Bis zur Auswertung der Präparate wurden sie kühl und dunkel gelagert. Die Analyse erfolgte fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung eines speziellen Mikroskopsystems.

3.8.3 Analyse der FISH-Daten

Die Analyse der Präparate erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Hierbei lässt die Anordnung der Hybridisierungssignale Rückschlüsse auf die vorliegende Form der EBV-DNA zu. Im Falle einer Integration befindet sich auf homologen Loci beider Schwesterchromatiden eines Chromosoms ein Signal (Trescol-Biémont *et al.*, 1987; Hurley *et al.*, 1991). Ein solches Doppelsignal (DS) identifiziert das entsprechende Chromosom als Integrationsort. Einzelne Hybridisierungssignale schwächerer Intensität stellen die episomale Verweilform des Virus dar (Hurley *et al.*, 1991).

Eine DAPI-Färbung der Metaphasen ermöglichte die Identifizierung der Chromosomen. Die Identifikation der chromosomalen Banden erfolgte auf einem Niveau von 150-300 Banden.

Die Metaphasen einer jeden BL-ZL wurden hinsichtlich der Lokalisation viraler Integration, sowie der Anzahl und Rekurrenz der EBV-IL analysiert. Die für jede BL-ZL separat erhobenen Daten wurden anschließend gebündelt, um die chromosomale Verteilung der EBV-Integration im Kollektiv zu bewerten. Hierbei wurden zunächst alle DS gebündelt und die absolute Anzahl der auf einem jeweiligen Chromosomen bzw. dessen p/q-Arm visualisierten DS ermittelt. Es folgte eine Analyse der EBV-Integration auf dem Niveau spezifischer chromosomaler Banden. Hierbei wurde wiederum analysiert welche Banden am häufigsten von einer Integration betroffen waren, sprich die meisten DS sammelten. Zudem wurde analysiert welche Banden in mehreren BL-ZL von einer Integration des EBV betroffen waren.

Um zu erörtern, inwiefern die Integration des EBV in BL-ZL vermehrt in CFS stattfindet, erfolgte schließlich eine Analyse detektierter DS hinsichtlich deren Überlappung mit einer CFS.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die zytogenetische Kartierung der EBV-Integration, die an einem Kollektiv von 20 EBV-positiven BL-ZL mittels Metaphase-FISH und eigens hergestellter DNA-Sonden sichtbar gemacht werden sollte.

In einem ersten Schritt erfolgte die Verifizierung der EBV-Positivität aller untersuchten BL-ZL. Hierzu wurden LD-PCR mit EBV-spezifischen *Primern* (EBV1 und EBV2) und der, zuvor isolierten, genomischen DNA der BL-ZL durchgeführt.

Es folgte die Herstellung der, in der FISH verwendeten, EBV-spezifischen DNA-Sonde. Diese wurde unter Einsatz des *Primers* EBV1 im Verfahren der LD-PCR amplifiziert und nach indirekter Markierung mit Biotin-16-dUTP auf ihre Qualität hin überprüft.

Schließlich wurde sie in der FISH an Metaphase-Präparaten der 20 EBV-positiven BL-ZL verwendet. Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der Chromosomenpräparate ermöglichte die Darstellung und Lokalisation integrierter EBV-DNA. Die für jede BL-ZL separat erhobenen Daten wurden anschließend gebündelt und die EBV-Integration im Kollektiv bewertet. Hierbei wurde die chromosomale Distribution detektierter EBV-IL sowie eine Überlappung dieser mit publizierten CFS analysiert.

4.1 Präparation der genomischen DNA der BL-ZL

Die Isolierung der genomischen DNA aller verwendeten BL-ZL erfolgte wie in Punkt 3.1 beschrieben. Reinheit und Konzentration der gewonnenen DNA wurden anschließend photometrisch überprüft. Sämtliche Werte lagen im zufriedenstellenden Bereich.

4.2 Bestätigung des EBV-Status der BL-ZL mittels LD-PCR

Um die Präsenz des EBV-Genoms in den verwendeten, EBV-positiven BL-ZL

zu bestätigen, wurden LD-PCRs mit dem *Primer* EBV2 und der genomischen DNA der BL-ZL durchgeführt. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden wie beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ausgenommen der BL-ZL Akuba, BL16 und BL60 zeigten die PCR-Produkte aller EBV-positiven BL-ZL eine Bande im erwarteten Größenbereich von rund 3300 bp. Sowohl die EBV-negativen BL-ZL als auch die Wasserkontrolle zeigten keine Banden im korrespondierenden Größenbereich. Im Fall der BL-ZL Akuba, BL16 und BL60 wurden weiterführende LD-PCRs mit dem *Primer* EBV1 durchgeführt. Die Amplifikation eines ca. 3000 bp großen PCR-Fragments konnte in der Gelelektrophorese dargestellt werden und bestätigte das Vorhandensein der EBV-DNA in den genannten BL-ZL. Abbildung 4.1 demonstriert die gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA-Abschnitte am Beispiel der BL-ZL Nalmalwa.

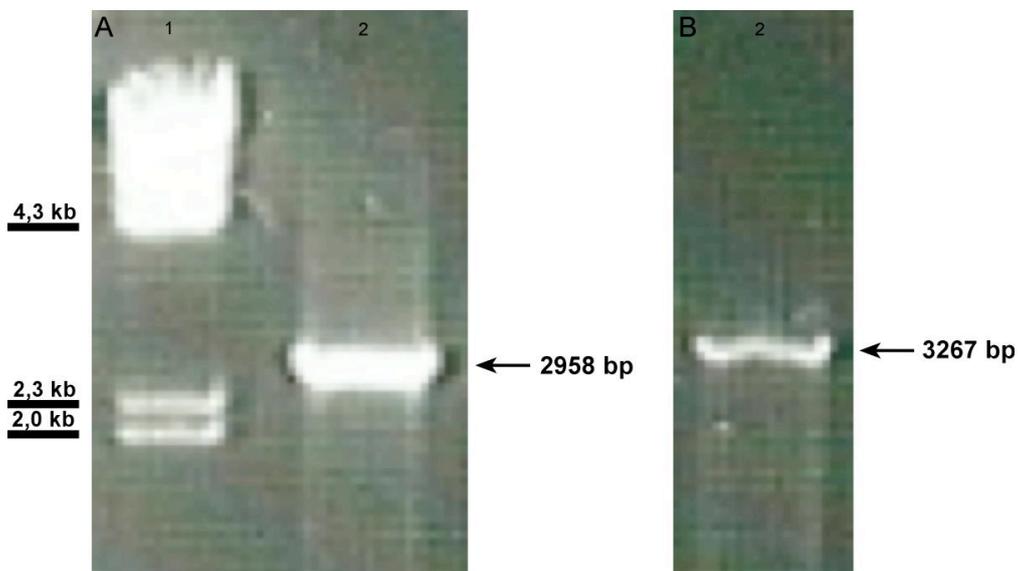


Abbildung 4.1 1% Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte des *Primers* EBV1 (A) und EBV2 (B) der BL-ZL Namalwa. Bahn 1: Lambda DNA Hind III marker (2µl), Bahn 2: Probe (5µl). Der durch die *Primerpaare* amplifizierte DNA-Abschnitt zeigt sich im erwarteten Größenbereich bei etwa 3000 bp (A) bzw. 3300 bp (B).

4.3. Herstellung der EBV-spezifischen FISH-Sonde

4.3.1 LD-PCR und Sequenzierung

Die Herstellung der Sonden-DNA erfolgte mittels LD-PCR unter Verwendung des *Primers* EBV1 an 1,5 µg der genomischen DNA der BL-ZL Raji. Die durch den *Primer* amplifizierte Region entspricht der in Repetition vorhandenen IR1-Region des EBV Genoms (siehe Kapitel 1, Punkt 1.3.2.2.1) und ist somit besonders geeignet zur Herstellung einer Sonde mit kräftigen Hybridisierungssignalen. Nach einer Reinigung der PCR-Produkte erfolgte die Überprüfung von DNA-Konzentration und Reinheit sowie eine Sequenzierung durch die Firma MWG-Biotech GmbH. Diese bestätigte, dass es sich bei dem amplifizierten PCR-Produkt um die Nukleotide 59-2938 der IR1-Region des EBV-Genoms handelt (NCBI-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/M15973.1>, Stand: 2012).

4.3.2 Nick-Translation

Es folgte die indirekte Markierung des PCR-Produkts mit Biotin-16-dUTP nach dem Prinzip der Nick-Translation sowie eine anschließende Aufreinigung der Sonde zur Elimination nicht inkorporierter Biotin-Moleküle. Nach zufriedenstellender Qualitätsprüfung (Punkt 4.3.3) wurde die Sonde zur FISH an Metaphasepräparaten der BL-ZL verwendet (Punkt 4.4).

4.3.3 Überprüfung der Sondenqualität

Zur Bestätigung der Sondenqualität wurde zunächst FISH an der BL-ZL Namalwa durchgeführt. Diese BL-ZL wurde gewählt, da zahlreiche Publikationen Status und Lokalisation der EBV-Integration bestätigen. In Namalwa-Zellen zeigt sich die Integration des EBV-Genoms an einem einzigen chromosomalen Locus auf 1p35 (Henderson *et al.*, 1983; Matsuo *et al.*, 1984; Lawrence *et al.*, 1988). Als Negativkontrollen wurden die EBV-negativen BL-ZL CA-46 und CW698 verwendet.

Die EBV-negativen BL-ZL zeigten wie erwartet keine Hybridisierung der Sonde (Abbildung 4.2 A+B), wohingegen Metaphasen der BL-ZL Namalwa eine Integration des EBV auf 1p35 demonstrierten (Abbildung 4.3 A+B).

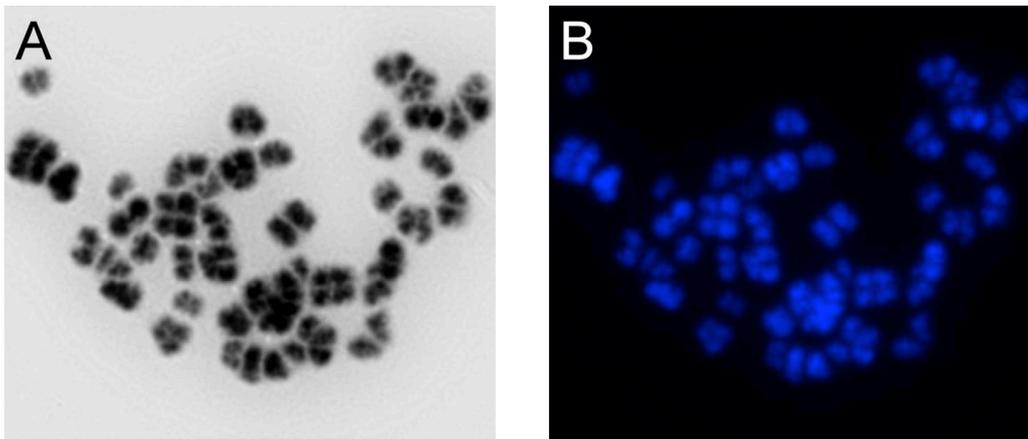


Abbildung 4.2 Überprüfung der hergestellten DNA-Sonde mittels FISH an einer Metaphase der EBV-negativen BL-ZL CA-46 (A+B). Die EBV-negative BL-ZL CA-46 zeigt wie erwartet keine Hybridisierung der EBV-DNA-Sonde (B).

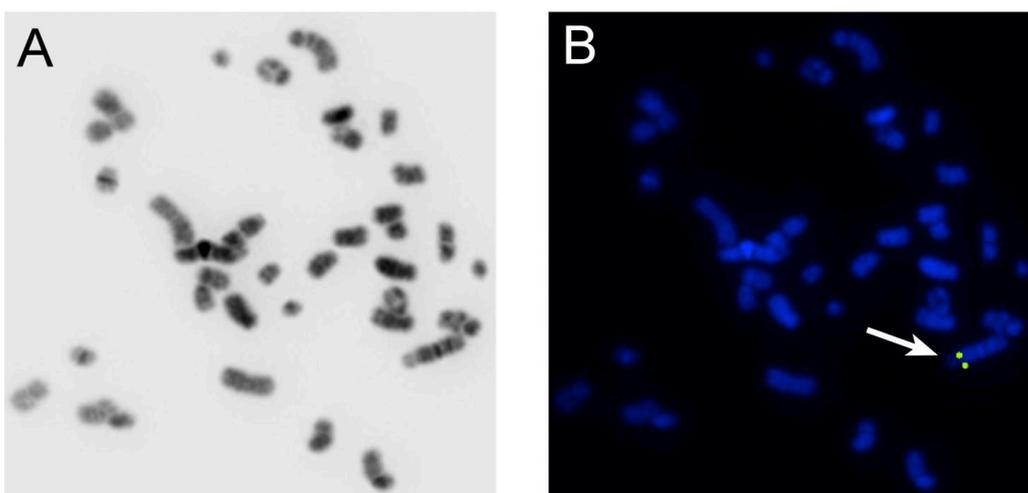


Abbildung 4.3 Überprüfung der hergestellten DNA-Sonde mittels FISH an einer Metaphase der der EBV-positiven BL-ZL Namalwa (A+B). Wie erwartet zeigt sich eine Hybridisierung der EBV-Sonde auf 1p35. Die symmetrisch angeordneten Hybridisierungssignale indizieren den Ort viraler Integration (Pfeil, B).

4.4 Visualisierung der EBV-Integration in BL-ZL mittels Metaphase-FISH

Es folgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der viralen Integration in 20 EBV-positiven BL-ZL. Die Anordnung der Hybridisierungssignale lässt hierbei Rückschlüsse auf die vorliegende Form der EBV-DNA zu (siehe Kapitel 3, Punkt 3.8.3). Eine DAPI-Färbung derselben Metaphase ermöglicht die Identifizierung der Chromosomen. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet präferenziell an AT-Regionen der dsDNA. Das hierdurch entstehende Bandenmuster ähnelt dem der GTG-Bänderung: AT-reiche Bereiche stellen sich als dunkle Banden dar. Die Identifikation der chromosomalen Banden erfolgte auf einem Niveau von 150-300 Banden.

Pro BL-ZL wurden bis zu 15 gut konservierte und komplette Metaphasen analysiert. Die Gesamtzahl analysierter Metaphasen belief sich auf rund 300 Metaphasen. Neben DS, indikativ für den Ort viraler Integration, zeigte sich eine variable Anzahl nicht-symmetrischer Einzelsignale, welche auf die episodale Form viraler DNA hindeuten.

4.4.1 Hybridisierungsmuster einzelner BL-ZL

Die Anzahl und Lokalisation der symmetrisch angeordneten Hybridisierungssignale differierte innerhalb des ZL-Kollektivs deutlich. Anhand des hieraus resultierenden Musters liessen sich drei verschiedene Gruppen von BL-ZL differenzieren. Vier BL-ZL zeigten einen einzigen bzw. zwei distinkte EBV-IL (Gruppe 1), wohingegen 13 BL-ZL mehrere IL aufwiesen (Gruppe 2). Innerhalb der Gruppe 2 fiel zudem eine sehr ungleiche Rekurrenz der EBV-IL auf. Vier BL-ZL demonstrierten hoch-rekurrierende EBV-IL, auffindbar in über 50% der analysierten Metaphasen (Gruppe 2a). In den übrigen neun BL-ZL der Gruppe 2 waren hingegen keine hoch-rekurrierenden EBV-IL detektierbar (Gruppe 2b). Die BL-ZL EB-1, Salim Mwalim und LY-47 wiesen ausschließlich nicht-rekurrierende DS, sowie in rund 50% der jeweiligen Metaphasen keinerlei DS auf (Gruppe 3). Die Kriterien für eine Integration des EBV wurden in diesen BL-ZL als nicht ausreichend erfüllt angesehen (siehe Kapitel 5). Die detektierten DS wurden daher in die weitere Datenanalyse nicht miteinbezogen.

4.4.1.1 BL-ZL der Gruppe 1: Existenz von ein bis zwei EBV-IL

Die BL-ZL BL60, PA-682 und Seraphine zeigten jeweils einen solitären IL, detektierbar in allen analysierten Metaphasen. Die BL-ZL Naliaka demonstrierte zwei distinkte IL des EBV. Diese BL-ZL wurden als Gruppe 1 subsumiert (Tabelle 4.1, Abbildung 4.4). Die virale DNA visualisierte auf homologe Chromatiden von 2p23 (Seraphine), 22q12 (PA-682), 7q11 und 17q25 (Naliaka) sowie nahe dem Bruchpunkt eines Translokationsderivativs der(19)t(17;19) (BL60). Aufgrund des sehr ähnlichen Bandenmusters von 19p und 19q war es in diesem Fall nicht möglich zu differenzieren, ob es sich bei der translozierten Komponente des Chromosoms 19 um dessen p- oder q-Arm handelt (Abbildung 4.4 A+B).

Tabelle 4.1 EBV-positive BL-ZL der Gruppe 1 und detektierte EBV-IL.

BL-ZL	Anzahl der analysierten Metaphasen	Rekurrierende IL (in % der analysierten Metaphasen)	Nicht-rekurrierende IL
BL60	15	der(19)t(17,19) (?;p oder q13) auf 19p13 oder 19q13 (100%)	Keine
Naliaka	8	7q11 (75%) 17q25 (100%)	Keine
PA-682	15	22q12 (100%)	Keine
Seraphine	15	2p23 (100%)	Keine

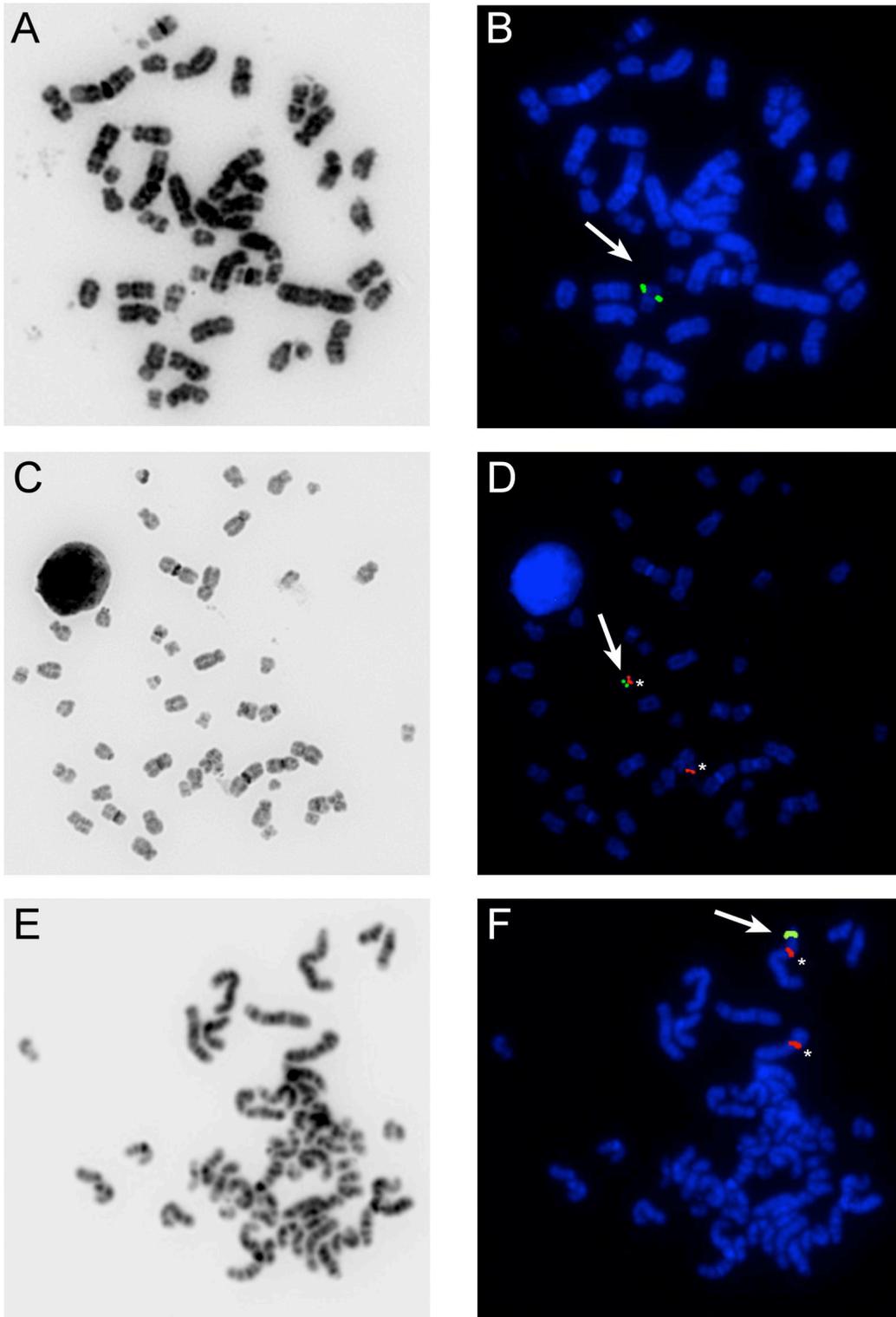


Abbildung 4.4 Visualisierung der EBV-Integration mittels FISH an Metaphasen der BL-ZL BL60 (A+B), PA-682 (C+D) und Seraphine (E+F). In der BL-ZL BL60 hybridisiert die EBV-Sonde nahe dem Bruchpunkt des $der(19)t(17;19)(?;p \text{ oder } q13)$ (A+B). In der BL-ZL PA-682 zeigt sich eine Integration des EBV auf 22q12 (C+D), in der BL-ZL Seraphine auf 2p23 (E+F). Hierbei erfolgte eine Kohybridisierung der EBV-spezifischen Biotin-Sonde mit Digoxigenin-markierten Sonden (*). Zum Einsatz kam eine Sonde des Zentromer 22 (D) bzw. des auf 2p16 lokalisierten *BCL11A*-Gens (F).

4.4.1.2 BL-ZL der Gruppe 2: Existenz multipler EBV-IL

Untergruppe 2a

Die BL-ZL AG876, LY-67 und Switzer wiesen eine unterschiedliche Anzahl distinkter EBV-IL auf (Gruppe 2a, Tabelle 4.2). Ein bis zwei dieser IL waren in hoher Rekurrenz auffindbar (> 50% der Metaphasen). Sie betrafen die chromosomalen Banden 2q21 (Switzer), 7p22 (AG876), 7q21 (LY-67), 13q21 (AG876, LY-67) sowie das Translokationsderivativ der(13)t(3;13)(p21;p11)ins(3;13)(p21;q31.1q33) in der BL-ZL Maku. Der letztgenannte IL lag nahe dem Translokationsbruchpunkt auf 13p11 und stellte sich als achromatischer Bereich dar (Abbildung 4.5 A+B). In allen BL-ZL dieser Gruppe bestanden zudem nicht-rekurrierende EBV-IL. Die BL-ZL LY-67 und Switzer zeigten weitere EBV-IL von Rekurrenz. Abbildung 4.5 demonstriert das gefundene Muster viraler Integration dieser ZL-Gruppe an Hand von Metaphasen der BL-ZL Maku (A+B), AG876 (C+D) und LY-67 (E+F).

Tabelle 4.2 EBV-positive BL-ZL der Gruppe 2a und detektierte EBV-IL.

BL-ZL	Anzahl der analysierten Metaphasen	Rekurrierende IL (in % der analysierten Metaphasen)	Nicht-rekurrierende IL
AG876	15	7p22 (80%) 13q21 (53%)	1q12, 3q12-13, 3q24, 3q28, 4qter(33-35), 5q13, 7q31, 8q11, 10p11, 10q23, 10q26, 13q14, 16p11
Maku	15	der(13)t(3;13)(p21;p11)ins(3;13) (p21;q31.1q33) auf 13p11(100%)	2q31, 3p25, 3q24, 4p12, 4q31, 5p14, 8q21
LY-67	15	13q21 (80%) 7q21 (67%) 12q21 (20%) 3q26 (13%)	1q43, 3p, 3q13, 4p13, 4q21, 5q13, 5q21, 6q26, 10q21, 15p
Switzer	15	2q21 (67%) 2q31 (33%) 1q31 (27%) 3q26 (27%) 4q31-34 (20%) 1p32 (13%) 13q21-31 (13%)	2p12, 2q36, 4q12, 5q14-23, 5q34, 7p13, 7q11, 7q34, 8q21, 15q21, 18p11.2

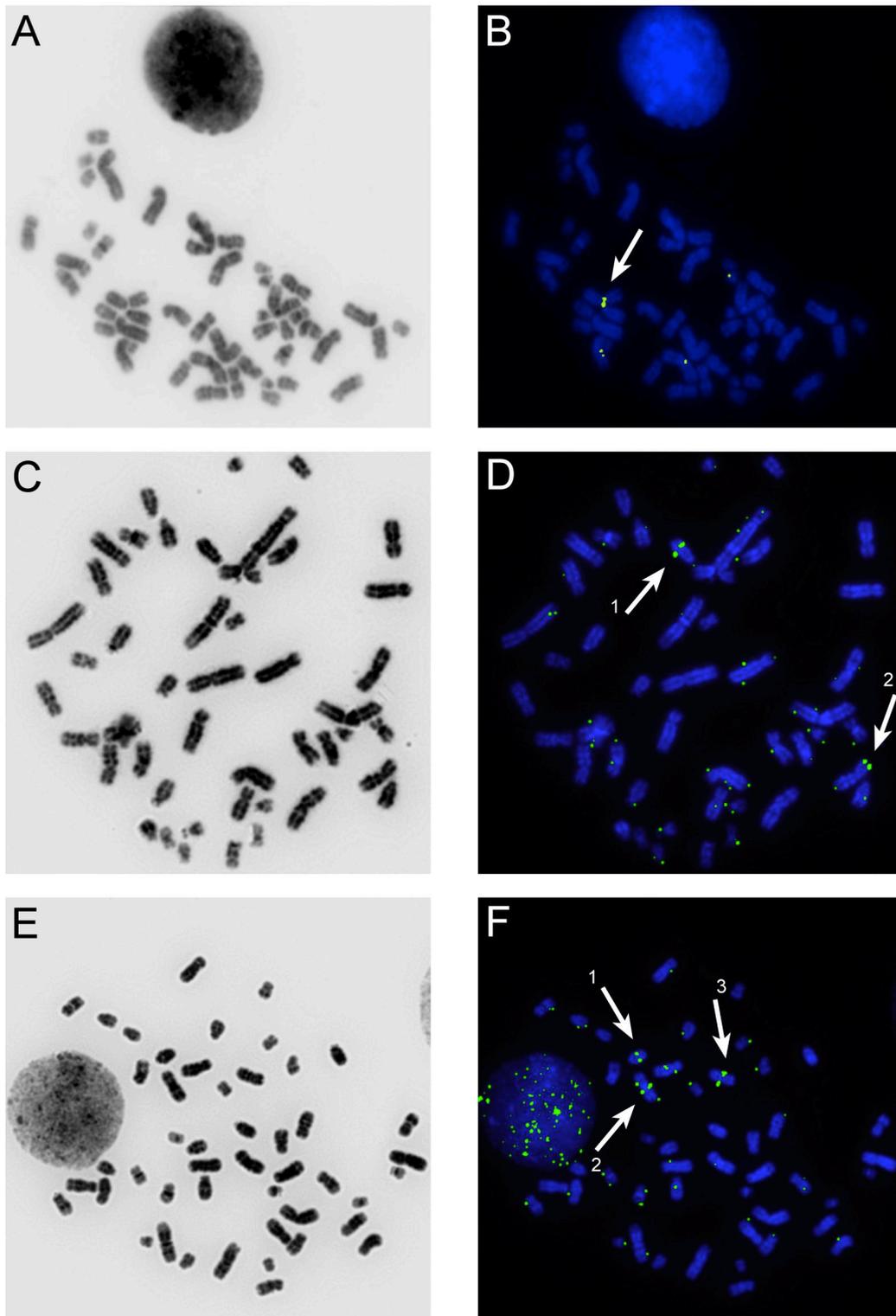


Abbildung 4.5 Visualisierung der EBV-Integration mittels FISH an Metaphasen der BL-ZL Maku (A+B), AG876 (C+D) und LY-67 (E+F). Abgebildet werden DS, indikativ für die EBV-Integration (Pfeile) sowie episodale Einzelsignale. Die EBV-Integration visualisiert in der BL-ZL Maku nahe dem Bruchpunkt des Translokationsderivativs $der(13)t(3;13)(p21;p11)ins(3;13)(p21;q31.1q33)$ (A+B). Der IL stellt sich hierbei als achromatischer Bereich dar (A). In der BL-ZL AG876 sind die Banden 13q21 (Pfeil 1D) und 7p22 (Pfeil 2D) von einer EBV-Integration betroffen. Die BL-ZL LY-67 zeigt hoch-rekurrierende EBV-IL auf 13q21 (Pfeil 1F) und 7q21 (Pfeil 3F). Zudem demonstriert die gezeigte Metaphase einen IL auf 3q13 (Pfeil 2F).

Untergruppe 2b

Eine Koexistenz mehrerer EBV-IL unterschiedlicher Rekurrenz ohne das Vorkommen hoch-rekurrierender IL zeigte sich in den BL-ZL Akuba, BL16, BL18, JBL-2, JI, LY-91, Rael, Silfere und Solubo (Gruppe 2b). Kein EBV-IL war in mehr als sieben der jeweils 15 analysierten Metaphasen einer BL-ZL betroffen. Zudem bestanden nicht-rekurrierende IL (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3 EBV-positive BL-ZL der Gruppe 2b und detektierte EBV-IL.

BL-ZL	Anzahl der analysierten Metaphasen	Rekurrierende IL (in % der analysierten Metaphasen)	Nicht-rekurrierende IL
BL16	15	4q21 (40%) 4q32 (33%) 3q28 (20%) 10q11-21 (20%) 1p11 (13%) 2p22 (13%) 2q12 (13%) 3q24-26 (13%) 7q31 (13%) 15q21 (13%) 16q11 (13%)	2q21, 2q31, 3p25, 3q21, 4p15, 4q12, 4q26, 5q21, 5q34, 9q13, 9q22, 9q33, 10p12, 12q21, 14q11, 15q11, 16p11, 18q23
JBL-2	15	15q13-15 (33%) 13q21-31 (20%) 1q31 (13%) der(8)t(2;8)(p11;q24) auf 8q24 (13%) 11p14 (13%) 17p12 (13%)	Yq12, 1qter, 4p15, 4q26, 5q12, 5q13, 6q23, 7p12, 7q21, der(8) auf 8q21, 8q23, 11p11, 12p12, 12q21, 13q13, 15q25
Akuba	15	4p11-12 (27%) 13q21 (20%) 8q21 (13%) 1q32 (13%) 4q12 (13%) 15q13-14 (13%)	Xq21, 1p31, 2q22, 3q21, 3q24, 3q26, 4q21, 5p13, 6p21, 6q12, 6q21, 7q21, 12p13, 12q24, 16p11/12
BL18	15	2q24-32 (13%) 3p13-21 (13%)	Xp10, Xq10, 1p31, 1q31, 2q36, 3q24-26, 4q21, 6q25, 7q21, 8q21, 10q23-25, 22q12
JI	15	15q11-14 (27%) 2q21-31 (13%) 12p12-13 (13%) 12q24 (13%)	der(6q)t(1;6)(q12;q13) auf 1q13, 3q25, 4q25, 5q21-23, der6 (6p24), 7p21, 8qter, 12pter, 12q21, 15qter, 17p13, 21q22
LY-91	15	5q21 (13%) 7p21-22 (13%) 13q21-31 (13%) 15p (13%)	1q32, 2p24-25, 2q12, 3p12, 3q13, 3q26-27, 4q28, 4q32-35, 5p14, 9p, 12p, 18q12
Rael	15	4q32-34 (33%) 2p11-12 (20%) 4q21-24 (20%) 4q26-28 (20%) 4p12 (13%)	Xq10-11, 1p32-34, 2q22-24, 2q31, 5q13, 6q21, 6q24, 7pter, 12q13, 13q14, 14q22-23, 16q10-11, 18q21

BL-ZL	Anzahl der analysierten Metaphasen	Rekurrierende IL (in % der analysierten Metaphasen)	Nicht-rekurrierende IL
Silfere	15	2q31-33 (20%) 17q22-25 (20%) 3q21-26 (13%)	1p13, 1p21-31, 3p21, 4q28, 5q14, 5q21, 5q34, 7q31, 10q21, 12p11, 12q21, 16q24, 18q21, 20p12, 21qter
Solubo	15	13q14-22 (20%) 4q34 (13%) 7p11-13(13%)	1p21-31, 2pter, 2q21, 2q33, 5p15, 9q21

4.4.1.3 BL-ZL der Gruppe 3: Existenz nicht-rekurrierender DS

Die BL-ZL EB-1, Salim Mwalim und LY-47 wiesen ausschließlich nicht-rekurrierende DS, sowie in rund 50% der jeweiligen Metaphasen keinerlei DS auf. Sie wurden als BL-ZL der Gruppe 3 zusammengefasst (Tabelle 4.4). Da zudem jeweils 50% der analysierten Metaphasen keine DS aufwiesen, wurden die Kriterien für eine Integration des EBV als nicht ausreichend erfüllt angesehen (siehe Kapitel 5). Die detektierten DS wurden daher in die weitere Datenanalyse nicht miteinbezogen.

Tabelle 4.4 EBV-positive BL-ZL der Gruppe 3 und detektierte DS.

BL-ZL	Anzahl der analysierten Metaphasen	Rekurrierende IL (in % der analysierten Metaphasen)	Nicht-rekurrierende DS
EB-1	15	Keine	2q34-36, 3qter, 4q28, 5p13, 12q21, 16qter, 19qter
LY-47	15	Keine	1p13, 3p13, 3q25, 4p15, 11q22, 15p11, 18q12
Salim Mwalim	15	Keine	Xp21, 1q31, 4q31, 8q21, dup(7)(q11q22) auf 7p

4.5 Distribution der EBV-Integration im ZL-Kollektiv

4.5.1 Chromosomale Verteilung der EBV-Integration

Um zu bewerten, ob und wie oft ein Chromosom Lokus viraler Integration war, wurden DS der BL-ZL Gruppe 1 und 2a+b gebündelt und die absolute Anzahl

der auf einem jeweiligen Chromosom bzw. dessen p/q-Arm visualisierten DS ermittelt (Abbildung 4.6). Insgesamt konnten rund 424 DS identifiziert werden. DS fanden sich auf allen Chromosomen. Große Chromosomen waren *summa summarum* häufiger betroffen als kleine Chromosomen. Eine Ausnahme stellten die Chromosomen 7 und 13 dar. Die am häufigsten betroffenen Chromosomen waren: Chromosom 2 (59 DS), Chromosom 13 (50 DS), Chromosom 4 (48 DS), Chromosom 7 (45 DS), Chromosom 3 (33 DS) und Chromosom 1 (24 DS). 259 der identifizierten DS befanden sich auf diesen Chromosomen (61%).

Insgesamt selten betroffen waren die Chromosomen 9, 11, 14, 20 und 21 sowie die Geschlechtschromosomen. Sie wiesen fünf oder weniger DS auf.

Die am häufigsten betroffenen chromosomalen Arme waren 2q (36 DS), 4q (38 DS) und 13q (35 DS). Nicht betroffen waren die chromosomalen Arme Yp, 8p, 11q, 14p, 19p*, 20q, 21p und 22p. Alle weiteren chromosomalen Arme zeigten jeweils weniger als 30 DS.

Abbildung 4.6 zeigt die chromosomale Distribution summierter DS, Abbildung 4.7 demonstriert die jeweils betroffenen BL-ZL.

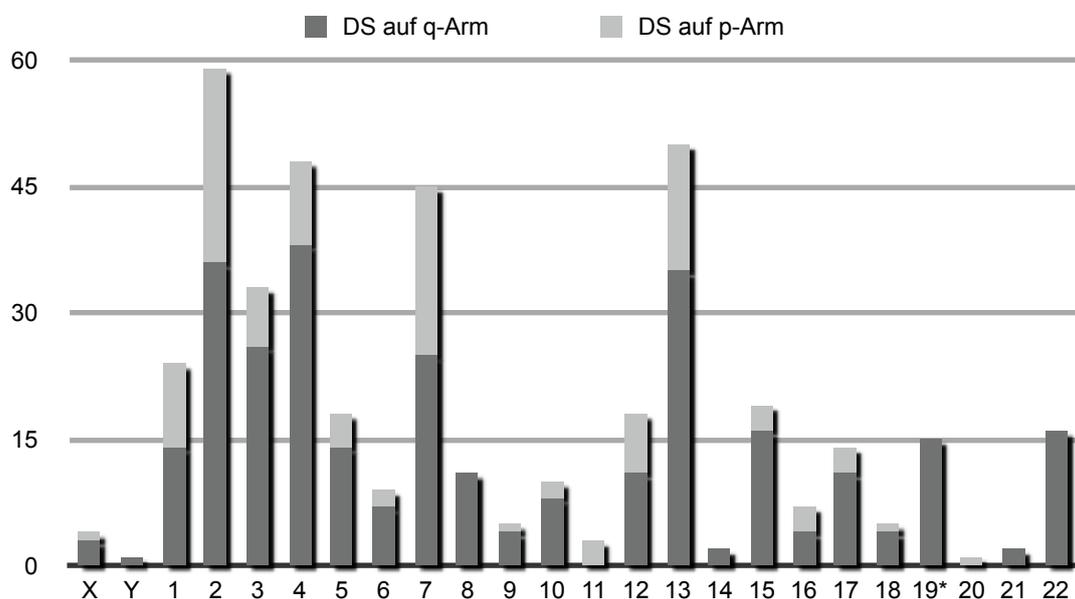


Abbildung 4.6 Chromosomale Verteilung aller 424 detektierten DS in absoluten Zahlen.

Es zeigt sich eine hohe Zahl an DS auf den Chromosomen der Gruppe A und B sowie den Chromosomen 7 und 13. Insbesondere häufig betroffen sind die chromosomalen Arme 4q, 2q, 13q und 7q.

(*Im Fall der BL-ZL BL60 wurden die DS 19q zugeschrieben, siehe Punkt 4.4.1.1).

	X	Y	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
AG876																								
Akuba																								
BL16																								
BL18																								
BL60																								
JBL-2																								
JI																								
LY-67																								
LY-91																								
Maku																								
Naliaka																								
PA-682																								
Rael																								
Seraphine																								
Silfere																								
Solubo																								
Switzer																								
DS(absolut)	4	1	24	59	33	48	18	9	45	11	5	10	3	18	50	2	19	7	14	5	15	1	2	16

Abbildung 4.7 Darstellung der chromosomale Verteilung der DS unter den BL-ZL des Kollektivs.

Schwarz markierte Kästchen entsprechen detektierten DS auf den jeweiligen Chromosomen. Sichtbar wird hierdurch zum einen die Häufung viraler Integration im Bereich der Chromosomen der Gruppe A und B (1-5). Zum anderen veranschaulicht die Abbildung das unterschiedliche Muster der EBV-Integration. In ZL der Gruppe 2 ist eine Vielzahl an Chromosomen von einer Integration betroffen, in ZL der Gruppe 1 hingegen nur ein einziges bzw. zwei Chromosomen. Die Abbildung abschließend, finden sich die im Text erläuterten Summen detektierter DS pro Chromosom. Werte über 40 sind hervorgehoben. Die absolute Zahl detektierter DS ist am größten auf den Chromosomen 2, 4, 7 und 13.

4.5.2 Verteilung der EBV-Integration auf Bandenniveau

Es folgte eine Analyse der EBV-Integration auf dem Niveau spezifischer chromosomaler Banden.

In Abhängigkeit der Rekurrenz detektierter EBV-IL waren die chromosomalen Banden 2q31 (10 DS); 7p22 und 2q21 (12 DS); 7q21 (13 DS); 2p23, 13p11 und 19p/q13 (15 DS); 22q12 (16 DS) sowie 13q21 (27 DS) am häufigsten von einer EBV-Integration betroffen. Sie wiesen 10 oder mehr DS auf und stimmen mit der Lokalisation hoch-rekurrierender IL der BL-ZL Gruppe 1 und 2a überein (siehe Punkt 4.4.1).

Unabhängig von der Rekurrenz detektierter IL konnten die Banden 12q21, 2q31

und 8q21 (betroffen in jeweils 5 BL-ZL) sowie 3q25, 4q21, 5q13, 5q21, 7q21 und 13q21 (betroffen in jeweils 4 BL-ZL) am häufigsten als Ort der EBV-Integration identifiziert werden.

Abbildung 4.8 zeigt die von einer Integration betroffenen Banden in Abhängigkeit der Rekurrenz detektierter IL. Die Größe der Hybridisierungssignale und ein hoher Kondensationsgrad der Metaphasen erschwerte hierbei zuweilen die Zuordnung eines DS zu einer spezifischen chromosomalen Bande. Ein roter Kreis markiert die entsprechenden DS, die lediglich einem Intervall zuzuordnen waren. Nicht gezeigt werden DS, die ausschließlich einem chromosomalen Arm zugeordnet werden konnten [9p, 12p (LY-91); 3p, 15p (LY-67)] sowie DS der BL-ZL der Gruppe 3.

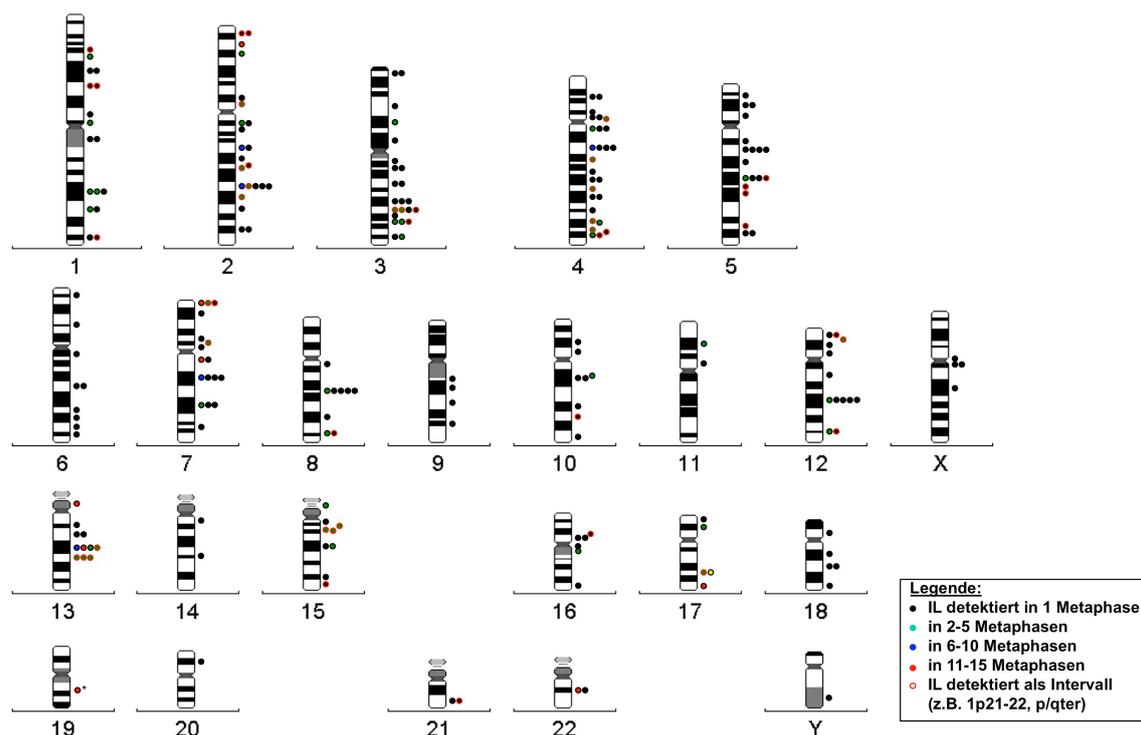


Abbildung 4.8 Chromosomale Verteilung der EBV-Integration auf dem Niveau spezifischer, chromosomaler Banden.

Detektierte EBV-IL sind durch Punkte auf der rechten Seite der Chromosomen markiert. Unterschiedliche Farben indizieren die Rekurrenz der EBV-IL innerhalb einer BL-ZL (siehe Legende). Deutlich wird die Akkumulation der IL auf den Chromosomen der Gruppe A und B sowie den Chromosomen 7 und 13. Zudem zeigt sich, dass einige chromosomale Banden in besonders vielen BL-ZL des Kollektivs von einer Integration des EBV betroffen waren. Dies betrifft insbesondere die Banden 2q31, 3q25, 8q21 und 12q21. (*Im Fall der BL-ZL BL60 wurden die DS 19q13 zugeschrieben).

4.6 Kolokalisation von EBV-IL und Common Fragile Sites

CFS gelten als präferenzielle Orte viraler Integration (Popescu, 2003). Um zu analysieren, inwiefern dies auf die Integration des EBV in BL-ZL zutrifft, erfolgte eine Analyse detektierter DS hinsichtlich deren Überlappung mit einer CFS. Die Zahl bisher identifizierter CFS des menschlichen Genoms beläuft sich auf rund 88 (Überblick in Lukusa und Fryns, 2008). Insgesamt konnten 116 spezifische Banden als Integrationsort identifiziert werden. Eine Überlappung mit einer bekannten CFS zeigte sich im Fall von 39 chromosomalen Banden bzw. EBV-IL (Abbildung 4.9), das heißt in 33,6% der Fälle. Hierbei überlappten 18 der mehrfach von einer Integration betroffenen Banden mit einer CFS (47,3%). Unter Banden, die in mindestens drei BL-ZL von einer Integration betroffen waren, überlappten neun von 13 mit einer bekannten CFS (69,2%).

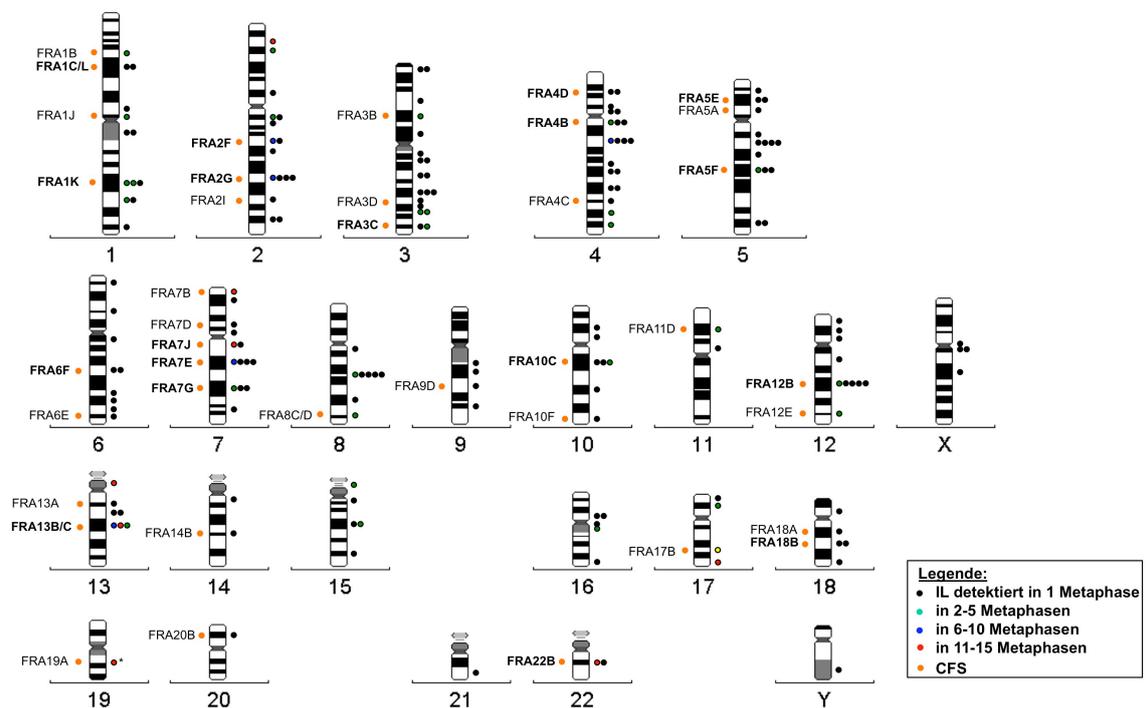


Abbildung 4.9 Kolokalisation von detektierten EBV-IL und CFS.

Detektierte EBV-IL sind durch Punkte auf der rechten Seite der Chromosomen markiert. Unterschiedliche Farben indizieren die Rekurrenz der EBV-IL innerhalb einer BL-ZL (siehe Legende). CFS werden auf der linken Seite der Chromosomen aufgeführt (Lukusa und Fryns; 2008). Mehrfach betroffene CFS sind fett markiert.

39 der detektierten EBV-IL überlappen mit bekannten CFS (33,6%). Die im ZL-Kollektiv am häufigsten betroffenen Banden überlappen in 69,2% der Fälle mit einer CFS.

(*Im Fall der BL-ZL BL60 wurden die DS 19q13 zugeschrieben).

5 Diskussion

Obgleich ein kausaler Zusammenhang zwischen der Genese des BL und einer Infektion mit dem EBV bereits 1964 postuliert wurde (Epstein *et al.*, 1964), bleibt die präzise Involvierung des Virus bis heute unklar (Cader *et al.*, 2010). Der Integration des viralen Genoms in die DNA der Wirtszelle wird hierbei eine pathogene Signifikanz zugeschrieben (Moore und Chang, 2010). Zahlreiche Studien demonstrierten die Integration des EBV in BL-Biopsien, daraus etablierte BL-ZL und LCL (Henderson *et al.*, 1983; Matsuo *et al.*, 1984; Trescol-Biémont *et al.*, 1987; Hurley *et al.*, 1991; Gulley *et al.*, 1992; Delecluse *et al.*, 1993; Lestou *et al.*, 1993; Popescu *et al.*, 1993; Wolf *et al.*, 1993; Wolf *et al.*, 1995; Jox *et al.*, 1997; Ohshima *et al.*, 1998; Takakuwa *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2004; Takakuwa *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2006; Reisinger *et al.*, 2006). Die zytogenetische Kartierung viraler Integrationsstellen erfolgte indes lediglich anhand acht EBV-positiver BL-ZL sowie einiger LCL (siehe Kapitel 1, Tabelle 1.2). Eine Ausweitung der diesbezüglichen Datenlage ist notwendig, um die pathogenen Folgen der EBV-Integration und deren Bedeutung im Entstehungsprozess des BL besser verstehen zu können und stellte das Ziel der hier vorgelegten Arbeit dar.

Mittels FISH und eigens hergestellter EBV-spezifischer Sonden wurde die Integration in 20 EBV-positive BL-ZL untersucht. 17 der analysierten BL-ZL konnten die Kriterien für eine Integration des EBV-Genoms zufriedenstellend erfüllen. Sie demonstrierten eine Vielzahl unterschiedlicher EBV-IL sowie ein distinktes Muster viraler Integration. Vier BL-ZL des Kollektivs wiesen hierbei eine einzige oder zwei distinkte EBV-IL auf, wohingegen die übrigen 13 BL-ZL eine Vielzahl unterschiedlicher IL zeigten. Eine ungleiche Distribution der EBV-IL im Kollektiv führte zu einer Akkumulation der Integration auf den Chromosomen 1 bis 4 sowie 7 und 13. Als präferenzielle Orte viraler Integration konnten die Regionen 2q, 4q und 13q identifiziert werden. Insbesondere die rekurrent von einer Integration des EBV betroffenen Banden zeigten hierbei eine Überlappung mit fragilen Stellen des humanen Genoms, den CFS.

Nachweis und mögliche Signifikanz der EBV-Integration

Eine Integration des EBV-Genoms in die DNA der Lymphom-Zellen ließ sich in 17 der insgesamt 20 untersuchten BL-ZL zufriedenstellend demonstrieren. Lediglich drei ZL des Kollektivs (EB-1, Salim Mwalim und LY-47) erfüllten die Kriterien für eine Integration nicht ausreichend. Sie zeigten ausschließlich nicht-rekurrierende DS, welches eine sichere Distinktion zwischen integrierter EBV-DNA und zufällig symmetrisch angeordneten Episomen erschwert (Reisinger *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass zudem etwa 50% der jeweiligen Metaphasen keinen Anhalt für eine Integration des EBV lieferten, stützt die Annahme eines negativen Integrationsstatus.

Ungeachtet dessen unterstreicht die sichere Identifizierung integrierter EBV-DNA in 17 der 20 untersuchten BL-ZL deutlich, dass die Integration des EBV-Genoms in BL-ZL ein frequentes Ereignis darstellt (Hurley *et al.*, 1991). Die Hypothese einer pathogenen Rolle der EBV-Integration in der Genese des BL wird hierdurch bekräftigt.

In Konkordanz zu bisher publizierten Studien, lieferten die hier erhobenen Daten keinen Hinweis auf eine singuläre, chromosomale Lokalisation integrierter EBV-DNA. Vielmehr zeigte sich erneut, dass die Integration des EBV einen Großteil der Chromosomen und eine Vielzahl unterschiedlicher chromosomaler Loci betrifft (Trescol-Biémont *et al.*, 1987; Lestou *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass eine spezifische Sequenz der Wirts-DNA kein obligates Kriterium der EBV-Integration darstellt. Sie implizieren indes nicht, dass es sich bei der Integration des EBV-Genoms um ein akzidentelles Ereignis ohne biologische Signifikanz handelt. So zeigen auch andere Onkoviren, deren Integration weitaus umfangreicher untersucht ist, eine große Bandbreite an viralen IL. Entsprechendes gilt etwa für das HBV (Bonilla Guerrero und Roberts, 2005). Eine chronische Infektion mit dem partiell dsDNA Virus stellt einen der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) dar (Szmuness, 1978; Beasley *et al.*, 1981). In über 80% der HBV-assoziierten HCC kommt es zu einer Integration des viralen Genoms (Brechtot *et al.*, 1981; Shafritz *et al.*, 1981). Die Integration des HBV erfolgt an verschiedenen Loci des Wirtsgenoms und hat genetische Alterationen viraler und/oder zellulärer Sequenzen zur Folge (Idilman *et al.*,

1998; Robinson, 1994). Interessanterweise wird hierbei von einer unterschiedlichen Signifikanz der Integrationsereignisse bzw. IL ausgegangen. So sollen einige dieser zur malignen Entartung der Zelle beitragen, andere hingegen als „Nebeneffekt“ der chronischen Infektion auftreten und ohne eine Konsequenz für die Wirtszelle bleiben (Bonilla Guerrero und Roberts, 2005).

Angesichts der Quantität der in dieser Arbeit detektierten EBV-IL, scheint auch im Fall der EBV-Integration bzw. der Burkitt-Lymphomagenese eine divergente Bedeutung verschiedener EBV-Integrationsereignisse denkbar. Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der onkogenen Aspekte einer EBV-Infektion und der Integration des viralen Genoms stützen diese These. So konnte in zwei Studien eine deregulative Expression der am EBV-IL gelegenen, zellulären Gene nachgewiesen werden. Betroffen waren das *BACH2*-Gen in Raji-Zellen (Takakuwa *et al.*, 2004) sowie das *REL*-Gen in der BL-ZL NAB-2 (Luo *et al.*, 2004). Eine möglicherweise bestehende Involvierung dieser Gene in die Lymphomagenese der jeweiligen BL-ZL wurde von den Autoren postuliert. Andererseits zeigte die Klonierung viraler IL auch, dass zuweilen nicht-kodierende Abschnitte des Wirtsgenoms von einer EBV-Integration betroffen sind (Takakuwa *et al.*, 2005). Ferner konnte eine Integration des EBV in nicht-malignem, chronisch infiziertem Gewebe nachgewiesen werden (Ohshima *et al.*, 1998). Auch gilt zu beachten, dass die onkogene Kapazität latenter EBV-Genprodukte in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 1, Punkt 1.3.2.1). Die Onkogenität des EBV beruht somit keineswegs ausschließlich auf der Integration des viralen Genoms. Vielmehr gehen aktuelle Konzepte bezüglich der Entstehung des BL davon aus, dass das EBV über verschiedene Mechanismen und in Abhängigkeit der individuellen Entwicklung eines Tumors zur malignen Entartung der Zellen beiträgt (Thorley-Lawson und Allday, 2008). Eine divergente Bedeutung verschiedener EBV-Integrationsereignisse scheint folglich denkbar, eine unterschiedliche Signifikanz der in dieser Arbeit identifizierten EBV-IL nicht ausgeschlossen. Einige dieser EBV-IL könnten direkt in die Lymphomagenese einer BL-ZL involviert gewesen sein, während andere ohne einen onkogenen Effekt blieben. Im Rahmen eines mehrstufigen Tumorgenese-Prozesses ist, bei Koexistenz mehrerer IL, auch möglich, dass erst die Akkumulation der Effekte einzelner EBV-IL zur Lymphomagenese beigetragen hat.

Muster der EBV-Integration: die Existenz exklusiver IL in BL-ZL

Das Muster der EBV-Integration differierte innerhalb des ZL-Kollektivs deutlich. Während die Mehrheit der BL-ZL eine Vielzahl unterschiedlicher IL demonstrierte, wiesen vier ZL des Kollektivs nur einen einzigen bzw. zwei distinkte EBV-IL auf (BL-ZL der Gruppe 1). Das Vorhandensein einer unterschiedlichen Zahl an EBV-IL in BL-ZL wird durch bisherige Studien bestätigt (Henderson *et al.*, 1983; Matsuo *et al.*, 1984; Trescol-Biémont *et al.*, 1987; Lestou *et al.*, 1993; Popescu *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 2004; Takakuwa *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2006).

Es scheint denkbar, dass das alleinige Bestehen eines spezifischen EBV-IL hierbei auf eine besondere Signifikanz des Integrationsereignisses hinweist. So muss ein mutmaßlich onkogener Beitrag der EBV-Integration definitiv *via* dieses Integrationsereignisses erfolgt sein. Wie bereits erläutert scheint bei mehreren, koexistierenden EBV-IL hingegen nicht ausgeschlossen, dass ein Nebeneinander, für die Lymphomagenese relevanter und irrelevanter IL besteht und/oder erst die Summe mehrerer Integrationsereignisse zur Lymphomagenese beigetragen hat.

Die in dieser Studie auffindbaren, unikalen EBV-IL betrafen die Banden 2p23 (Seraphine), 22q12 (PA-682) sowie das der(17)t(17;19)(?:p13 or q13) (BL60). Die BL-ZL Naliaka zeigte zwei exklusive EBV-IL auf 7q11 und 17q25. Aus der Literatur geht hervor, dass auch die BL-ZL Namalwa und NAB-2 über einen einzigen EBV-IL verfügen. Dieser betrifft die chromosomale Bande 1p35 in Namalwa und 2p13 in NAB-2 (Henderson *et al.*, 1983; Matsuo *et al.*, 1984; Popescu *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 2004). Es wird ersichtlich, dass der Ort viraler Integration trotz des konkordanten Integrationsmusters der BL-ZL differiert. Eine Übereinstimmung der EBV-IL zweier BL-ZL wurde bisher nicht detektiert. Somit entsteht das Bild eines für die jeweilige BL-ZL charakteristischen EBV-IL.

Wie bereits erwähnt demonstrierten Luo *et al.*, dass die EBV-Integration in Zellen der BL-ZL NAB-2 in einer deregulativen Expression des Protoonkogens *REL* resultierte. Eine *REL*-Überexpression könnte zur Lymphomagenese in NAB-2 Zellen beigetragen haben, obgleich er kein obligates bzw. gängiges Ereignis der BL-Genese darstellt (Luo *et al.*, 2004).

Entsprechendes könnte auch für die EBV-Integration in die ZL der Gruppe 1 gelten. Eine individuelle, „ZL-spezifische“ Bedeutung der entsprechenden EBV-

IL ist vorstellbar. Einige dieser EBV-IL überlappen mit Genen, deren Expressionsänderung bekannter Weise in die Genese humaner Lymphome involviert ist, oder/und liefern erneut Indizien für eine erhöhte chromosomale Instabilität, verursacht durch integrierte EBV-DNA. Sie werden im folgenden dargestellt.

Integration in die BL-ZL Seraphine und Naliaka: Alteration der zellulären Genexpression?

Eine Expressionsänderung der, am EBV-Integrationsort befindlichen, zellulären Gene konnte in Studien belegt werden (Takakuwa *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2004). Bezüglich der in dieser Arbeit identifizierten EBV-IL wäre dies insbesondere dann von Bedeutung, wenn hieraus eine Veränderung von Zellwachstum und -differenzierung oder deren Kontrolle (Zellzykluskontrolle, Apoptose) resultieren würde.

Ein in diese Zellprozesse involviertes Gen stellt das auf 2p23.7 liegende *ALK*-Gen dar (OMIM-Datenbank: <http://omim.org/entry/105590>, Stand: 2012). Seine Lokalisation überlappt mit dem Ort viraler Integration in der BL-ZL Seraphine. Das *ALK*-Gen kodiert für die Anaplastische Lymphoma Kinase, eine Rezeptor-Tyrosinkinase vom Typ des Insulinrezeptors (Morris *et al.*, 1997). Sie ist an der Regulation diverser zellulärer Prozesse wie der Zellzyklusprogression, der Zellmigration und dem Überleben von Zellen beteiligt (Überblick in Chiarle *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine aberrante *ALK*-Expression zur Zelltransformation *in vitro* und *in vivo* führt und in die Genese verschiedener, lymphoproliferativer und nicht-haematologischer Neoplasien involviert ist (Chiarle *et al.*, 2008). Hierzu zählen unter anderem das Anaplastische großzellige Lymphom (ALCL), ein NHL der T-Zell-Reihe (Morris *et al.*, 1994; Morris *et al.*, 1997), sowie Varianten des Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLCL), ein NHL der B-Zell-Reihe (Delsol *et al.*, 1997). Die pathogene Signifikanz des *ALK*-Gens in der Genese dieser NHL unterstreicht eine möglicherweise bestehende Bedeutung des EBV-IL auf 2p23 in der BL-ZL Seraphine. Ob eine deregulative *ALK*-Expression in Seraphine-Zellen vorliegt und inwiefern die EBV-Integration hiermit in kausalem Zusammenhang steht, müssen weiterführende Studien zeigen.

In der BL-ZL Naliaka zeigten sich zwei divergente EBV-IL. Integrierte EBV-DNA war auf 7q11 und 17q25 des Wirtsgenoms detektierbar. Den Informationen der NCBI GenBank zufolge, überlappt der Locus viraler Integration auf 7q11 unter anderem mit der Lage des *BCL7B*-Gens, einem Mitglied der *BCL7*-Gen-Familie (OMIM-Datenbank: <http://omim.org/entry/605846>, Stand: 2012). Diese umfasst neben *BCL7B* die Gene *BCL7A* und *BCL7C*. Die *BCL7*-Gen-Familie wurde durch die Involvierung des *BCL7A*-Gens in eine komplexe Translokation einer BL-ZL entdeckt (Zani *et al.*, 1996). Eine veränderte Expression von *BCL7A* sowie eine hiermit korrelierende Verschlechterung des klinischen Outcomes, konnte für T-Zell-Lymphome und das DLBCL gezeigt werden (Morton *et al.*, 2009). Die Funktion des Gens bleibt bisher unklar. Inwiefern eine Involvierung des auf 7q11.23 gelegenen *BCL7B*-Gens in chromosomale Translokationen lymphoider Malignome oder eine Deregulation anderer Form in humanen Neoplasien stattfindet, bleibt zu eruieren (Morton *et al.*, 2009). Da es der *BCL7*-Gen-Familie angehört, scheint dennoch erwähnenswert, dass die EBV-Integration in der BL-ZL Naliaka zu einer Überschneidung des Locus viraler Integration mit dem *BCL7B*-Gen-Lokus geführt hat.

Die Integration auf 17q25, dem zweiten Locus viraler Integration, zeigte sich in allen analysierten Metaphasen der BL-ZL Naliaka. Interessanterweise liegt auf 17q25.3 das Protoonkogen *Sept9* (OMIM-Datenbank: <http://omim.org/entry/60406>, Stand: 2012). *Sept9* ist ein Mitglied der *Septin*-Gen-Familie, die im menschlichen Genom mindestens 13 Gene umfasst (Hall *et al.*, 2005). Die durch sie kodierten, Guanosintriphosphat-bindenden Proteine, interagieren mit Zytoskelettfilamenten und sind in wichtige Zellvorgänge wie Zytokinese und Apoptose involviert (Russel und Hall, 2005). Zahlreiche Studien belegen eine Verbindung zwischen *Sept9* und der Entwicklung hämatoonkologischer und solider Malignome des Menschen (Osaka *et al.*, 1999; Burrows *et al.*, 2003; Montagna *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2005). Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass der murine *Sept9* Locus eine Integrationsstelle des Retrovirus SL3-3 darstellt (Sørensen *et al.*, 2000). Die virale Integration in die sogenannte *SL3-3 integration site 1* führt, in zwei von drei Fällen, zu einer Überexpression des hier lokalisierten *Sint1*-Gens. Dies scheint eine Rolle in der Tumorentstehung und/oder Progression muriner T-Zell-Lymphome zu spielen (Sørensen *et al.*, 2000). Neben der Funktion des humanen *Sept9*-Gens

unterstreicht somit auch die Tatsache, dass eine virale Integration im Mausmodell mit der Entwicklung von T-Zell-Lymphomen assoziiert ist, eine mögliche Importanz des EBV-IL in der BL-ZL Naliaka.

Integration in die BL-ZL Maku und BL60: Erhöhung der chromosomalen Instabilität?

Die Beeinflussung der genomischen Stabilität humaner B-Zellen, wird als biologische Folge einer EBV-Infektion diskutiert. Zum einen sollen latente EBV-Genprodukte (Gruhne *et al.*, 2009), zum anderen die Integration des EBV-Genoms zu einer Erhöhung der genomischen Instabilität der Wirtszelle beitragen (Henderson *et al.*, 1983; Popescu *et al.*, 1993; Wolf *et al.*, 1995; Jox *et al.*, 1997). Über diesen Mechanismus könnte das EBV in genomische Umstrukturierungsvorgänge involviert sein und zu sekundären genetischen Veränderungen in BL-Zellen beitragen (Wolf *et al.*, 1993; Jox *et al.*, 1997). Ergebnisse zur EBV-Integration in die BL-ZL Maku sowie die BL-ZL BL60 liefern in zweierlei Hinsicht Anhalt für eine Signifikanz der EBV-Integration in diesem Sinne. Zum einen visualisierte die EBV-DNA in beiden Fällen nahe dem Bruchpunkt eines Translokationschromosomens, zum anderen imponierte der EBV-IL in der BL-ZL Maku als achromatische, lückenähnliche Läsion. Die BL-ZL Maku gehört hierbei *per definitionem* nicht zur Gruppe 1 der BL-ZL. Da alle weiteren IL jedoch keine Rekurrenz zeigten, und der erwähnte EBV-IL in allen analysierten Metaphasen der ZL auffindbar war, soll er dennoch an dieser Stelle in die Diskussion mit einbezogen werden.

Die Analyse der Präparate beider BL-ZL zeigte die Integration von EBV-DNA auf Translokationschromosomen. Basierend auf Ergebnissen kürzlich durchgeführter molekularzytogenetischer Analysen, konnten die beteiligten Derivative als der(13)t(3;13)(p21;p11)ins(3;13)(p12;q31.1q33) in der BL-ZL Maku sowie der(19)t(17;19)(?;p13 or q13) in der BL-ZL BL60 identifiziert werden (Murga Penas *et al.*, Manuskript eingereicht). Im Fall der BL-ZL BL60 bestätigen bereits publizierte Studien die Integration des EBV an einem unikalen Lokus des Wirtsgenoms. Die Anwendung konventioneller Techniken führte hierbei zu der Annahme, dass es sich bei dem EBV-Integrationsort um ein der(19)t(11;19) handelt (Wolf *et al.*, 1993; Jox *et al.*, 1997). Das in unserem Labor angewandte M-FISH (*multicolor-FISH*) Verfahren stellt jedoch eine neuartige Technik hoher

Reliabilität dar, welche die Identifikation komplexer chromosomaler *rearrangements* und kryptischer Translokationen zuverlässig ermöglicht (Speicher und Carter, 2005).

Sowohl in der BL-ZL BL60 als auch in der BL-ZL Maku visualisierte die virale DNA-Sonde in unmittelbarer Nähe zum Translokationsbruchpunkt. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, inwiefern die Virusintegration möglicherweise in den Bruch- bzw. Translokationsvorgang involviert gewesen ist. Zwei distinkte Abläufe scheinen denkbar: Zum einen könnte der Bruch des Chromosoms einer Integration des EBV vorausgegangen sein, zum anderen könnte die virale Integration vorab stattgefunden haben, sprich dem Bruch des Chromosoms vorausgegangen sein (Wolf *et al.*, 1993; Jox *et al.*, 1997). Im Fall des Ersteren, könnte das EBV möglicherweise vom Bruch profitiert haben, ohne in den Vorgang direkt involviert gewesen zu sein. Läge der Integrationszeitpunkt jedoch vor dem Bruch des Chromosoms, so könnte der Integrationsvorgang oder die integrierte EBV-DNA an sich den chromosomalen Bruch verursacht oder vereinfacht haben. Entsprechendes wird von verschiedenen Autoren diskutiert (Wolf *et al.*, 1993; Jox *et al.*, 1997). Basierend auf dieser These, wäre ein kausaler Zusammenhang zwischen der Integration des EBV-Genoms und der Entstehung sekundärer genetischer *rearrangements* in BL-Zellen vorstellbar. Translokationen stellen den Prototyp solcher sekundären Veränderungen dar (Mitelman *et al.*, 1997). Sie führen oftmals zu einer deregulativen Expression zellullärer Gene oder der Generierung eines Fusionsproteins (Futreal *et al.*, 2004). Im Fall der BL-ZL BL60 könnte ein hiervon betroffenes Gen z.B. das auf 19q13.3 -13.4 liegende *BAX*-Gen sein (OMIM-Datenbank: <http://omim.org/entry/600040>, Stand: 2012). Es gehört der *BCL-2* Familie an und ist in die *P53*-vermittelte Apoptose-Induktion involviert, einem entscheidenden Signalweg humaner Neoplasien (Oltvai *et al.*, 1993). Wäre die Integration des EBV im vorliegenden Fall in den Translokationsvorgang involviert gewesen, so könnte sie indirekt zu einer veränderten Expression des *BAX*-Gens geführt haben. Aufgrund dessen Funktion könnte dies zur Lymphomagenese der BL-ZL BL60 beigetragen haben.

In der BL-ZL Maku visualisierte die integrierte EBV-DNA auf 13p11 nahe dem Bruchpunkt des Translokationsderivativs $der(13)t(3;13)(p21;p11)ins(3;13)$

(p12;q31.1q33). Der Ort viraler Integration, detektierbar in allen analysierten Metaphasen, stellte sich als achromatischer Bereich dar (siehe Kapitel 4, Abbildung 4.5 A+B). Eine Veränderung des chromosomalen Aussehens, korrespondierend zum Lokus der EBV-Integration, wurde zuvor beschrieben. Entsprechende chromosomale Abschnitte wurden auch als lückenähnliche Läsion oder Einschnürung bezeichnet (Henderson *et al.*, 1983; Popescu *et al.*, 1993; Jox *et al.*, 1997). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der EBV-Integration und der am Integrationsort lokalisierten Läsion wurde postuliert (Henderson *et al.*, 1983; Popescu *et al.*, 1993; Jox *et al.*, 1997). Interessanterweise zeigte eine *in vitro* Studie mit Hybridzellen der BL-ZL BL60-P7 und ihrer autologen LCL (BL60-P7 x IARC 277) den Bruch einer entsprechenden Region. Die Autoren postulierten daraufhin eine aus der Integration des EBV resultierende Instabilität des chromosomalen Lokus habe zum Bruch des Chromosoms geführt (Jox *et al.*, 1997). Basierend auf dieser These könnte die EBV-Integration am besprochenen IL der BL-ZL Maku eine erhöhte Instabilität des Lokus zur Folge haben. Da der Ort der EBV-Integration hierbei direkt mit dem Translokationsbruchpunkt des Derivativs zu überlappen scheint, ist vorstellbar, dass die Integration des EBV den Bruch des Chromosoms bedingt hat (siehe oben).

Auch die bereits erwähnten CFS werden unter der Applikation von Stress als achromatische Bereiche sichtbar und imponieren in der Metaphase mitunter als Lücke, Einschnürung oder Bruch des chromosomalen Abschnitts. CFS gelten als Orte erhöhter chromosomaler Instabilität und sind in malignen Neoplasien vielfach alteriert (Smith *et al.*, 2006; Debacker und Kooy, 2007; Lukusa und Fryns, 2008). Die BL-ZL NAB-2 zeigt eine Integration des EBV in eine solche CFS, die FRA2E auf 2p13 (Luo *et al.*, 2004). Auch in diesem Fall wurde der Integrationsort als achromatischer Bereich beschrieben (Popescu *et al.*, 1993). Bei einer solchen Überlappung von viralem IL und CFS bleibt unklar, welcher der Faktoren ursächlich für die beobachtete, achromatische Erscheinung ist. Das EBV könnte in diesem Fall nicht nur Auslöser einer chromosomalen Instabilität sein, sondern auch von dieser profitieren. So wird für verschiedene Tumoviren die präferenzielle Integration in CFS, vermutlich aufgrund einer vereinfachten Zugänglichkeit, postuliert (Popescu, 2003; Lukusa und Fryns, 2008). Da der hier erörterte EBV-IL der BL-ZL Maku jedoch mit keiner heute

bekanntem CFS übereinstimmt, ist die achromatische Erscheinung des EBV-IL nicht auf die Präsenz einer CFS zurückzuführen. Somit konnte erneut ein Hinweis dafür geliefert werden, dass die Integration von EBV-DNA womöglich in einer vermehrten Instabilität des korrespondierenden, chromosomalen Lokus resultiert.

Chromosomale Distribution der EBV-Integrationsloki

Die geringe Zahl identifizierter EBV-IL erschwerte bisher eine Stellungnahme bezüglich der, von einigen Autoren postulierten, nicht-randomisierten Verteilung der EBV-IL in BL-ZL und LCL (Trescol-Biémont *et al.*, 1987; Lestou *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2006; Morissette und Flamand, 2010). Da die chromosomale Distribution der IL jedoch auf wichtige in die Genese des BL besonders frequent involvierte Regionen hinweisen könnte, ist sie von besonderer Relevanz. Mit der hier vorgelegten Arbeit konnten wichtige Daten zur Erläuterung dieser Fragestellung gewonnen werden. Es zeigte sich eine Akkumulation der Integration auf den Chromosomen 1 bis 4 sowie den Chromosomen 7 und 13. 61% der identifizierten DS, indikativ für eine Integration des EBV, befanden sich auf diesen Chromosomen. Zu einem gewissen Grad kongruiert dies mit Ergebnisse einer Studie aus dem Jahr 1993, welche die EBV-Integration in einem Kollektiv von 14 LCL analysierte. Hier zeigte sich, dass das Chromosom 13, neben den Chromosomen 4 und 10, überproportional viele Hybridisierungssignale aufwies (Lestou *et al.*, 1993).

Auch Ergebnisse anderer Studien zeigten eine ähnliche Verteilung der EBV-IL in spezifischen BL-ZL. So wurden 3q, 4q, 7q und 13q als bevorzugte Orte viraler Integration in der BL-ZL Jijoye identifiziert (Trescol-Biémont *et al.*, 1987). In der BL-ZL Raji entfielen 64% aller Signale auf die chromosomalen Regionen 1q, 2q, 4q und 7q (Gao *et al.*, 2006). 2q, 4q und 13q waren gleichfalls in der hier vorgelegten Arbeit am häufigsten von einer EBV-Integration betroffen. Obgleich nicht gelang, alle detektierten EBV-IL einer spezifischen chromosomalen Bande zuzuordnen, die Größe der Hybridisierungssignale und ein hoher Kondensationsgrad der Metaphasen erschwerten dies zuweilen, konnten die Banden 2q31, 3q25, 4q21, 5q13, 5q21, 7q21, 8q21, 12q21 sowie 13q21 als meist frequentierte Integrationsorte des EBV identifiziert werden. Lestou *et al.* lieferten 1993 einen Rückblick bisheriger Erkenntnisse zur Integration des EBV

in verschiedenen Typen von Zelllinien. Die Ergebnisse dieser Studie überlappen zum Teil mit den hier identifizierten chromosomalen Banden und bestätigen eine präferenzielle Integration des EBV in 4q2, 5q und 13q21 (Lestou *et al.*, 1993).

Die Akkumulation der EBV-IL könnte auf einer bevorzugten Integration des Virus in spezifische Abschnitte des Wirtsgenoms basieren. Diesbezüglich wurde zunächst davon ausgegangen, dass eine vorliegende Homologie viraler und zellulärer DNA-Sequenzen den Integrationsort des EBV bestimmt (Henderson *et al.*, 1983; Trescol-Biémont *et al.*, 1987). Folgende Studien konnten diesen Tatbestand jedoch nicht belegen (Matsuo *et al.*, 1984; Luo *et al.*, 2004; Takakuwa *et al.*, 2004). Heute werden fragile Stellen des Genoms, die CFS, als präferenzielle Orte viraler Integration gehandelt (Popescu, 2003; Lukusa und Fryns, 2008). Eine Neigung zur Integration in CFS konnte unter anderem für die onkogene Subtypen HPV- 16 und -18 belegt werden (Thorland *et al.*, 2003; Wentzensen *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005). Es zeigte sich, dass rund 38% der IL dieser HPV-Subtypen in CFS liegen (Wentzensen *et al.*, 2004). Diese sind maßgeblich an der Entstehung des invasiven Zervixkarzinoms beteiligt (Walboomers *et al.*, 1999). Neben der Expression onkogener Proteine (E6 und E7) (Munger *et al.*, 1992), wird der Integration des HPV-Genoms hierbei eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Sie vermag in einer Änderung der zellulären und viralen Genexpression zu resultieren und trägt zu chromosomalen *rearrangements* in zervikalen Epithelzellen bei (Popescu, 2003).

Ob auch die EBV-Integration bevorzugt in CFS des Wirtsgenoms stattfindet, wurde bisher nicht erörtert. In der hier vorgelegten Arbeit zeigte sich, dass 39 von 116 EBV-IL (33,6%) mit publizierten CFS überlappen. Interessanterweise kolokalisierten vor allem die frequent von einer Integration betroffene Banden mit einer CFS (siehe Kapitel 4, Abbildung 4.9). Von den 13 im Kollektiv der BL-ZL am häufigsten detektierbaren EBV-IL überlappten neun mit einer bekannten CFS (69,2%). Dies könnte daraufhin weisen, dass auch eine Integration des EBV vermehrt CFS betrifft. Eine Ausweitung der Studienlage und Sequenzanalysen der Integrationsstellen sollten erfolgen, um diese These zu bestätigen.

Neben einer Neigung zur Integration in CFS könnte die Akkumulation der EBV-IL auch auf einer Selektion spezifischer IL in der Tumorgenese gründen.

Entsprechendes wird wiederum hinsichtlich der Integration des HPV postuliert (Yu *et al.*, 2005). Ähnlich der hier vorgelegten Daten zur EBV-Integration konnten trotz einer Vielzahl an HPV-IL einige chromosomale Banden als bevorzugte Ziele viraler Integration identifiziert werden (Übersicht in Wentzensen *et al.*, 2004). Viele dieser IL überlappen, wie bereits erwähnt, mit einer CFS. Yu *et al.* postulierten in diesem Zusammenhang, dass die Akkumulation jedoch nicht ausschließlich auf einer Kolo-kalisation mit CFS gründet, sondern dass es im Rahmen der Tumorgenese zu einer Selektion einiger HPV-IL kommt. Jene IL, die zur malignen Transformation einer zervikalen Epithelzelle beitragen, seien als Resultat der Selektion vermehrt in Tumorproben auffindbar (Yu *et al.*, 2005). Dies soll etwa für die HPV-IL in der Region des Protoonkogens *MYC* (8q24.2) gelten. Es zeigte sich, dass diese Region 25% der HPV18-IL beinhaltet (Ferber *et al.*, 2003). Die HPV-Integration auf 8q24 ist oft mit einer Überexpression von *MYC* vergesellschaftet (Lazo *et al.*, 1989), welche als prognostischer Indikator der Invasivität eines Zervixkarzinoms gilt (Riou *et al.*, 1992).

In Anlehnung an dieses Konzept, könnte die EBV-Integration in spezifische Loci des Wirtsgenoms zur Lymphomagenese der Zelle beigetragen haben, welches wiederum die vermehrte Detektion integrierter EBV-DNA in diesen Regionen bedingt. Entsprechendes könnte etwa für die Anreicherung der Integrations-signale auf 13q gelten. Hierfür spricht, dass auch zytogenetische Analysen und klinischen Studien auf eine mögliche Signifikanz der Region 13q in der Genese des BL hinweisen. Dies soll im folgenden erläutert werden.

Akkumulation der Integration auf 13q: Selektion viraler IL in der Tumorgenese?

Sowohl Ergebnisse unserer als auch vorheriger Studien liefern Hinweise auf eine Akkumulation der EBV-Integration auf 13q (Trescol-Biémont *et al.*, 1987; Lestou *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2006). Interessanterweise fiel diese Region auch in einer Reihe zytogenetischer Untersuchungen von BL-Patienten und BL-ZL auf (Lones *et al.*, 2004; Onciu *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2010; Murga Penas *et al.*, Manuskript eingereicht). Chromosomale Aberrationen struktureller und numerischer Natur sind in Tumorgenomen regelhaft präsent. Etwa 60 bis 90% der BL zeigen sekundäre genetischen Veränderungen, 30 bis 50% der Tumoren besitzen komplexe Karyotypen. Hierbei sind, neben der für

das BL charakteristischen *MYC*-Translokation, einige spezifische Chromosomenalterationen vermehrt auffindbar (Lai *et al.*, 1989; Kornblau *et al.*, 1991; Barth *et al.*, 2004; Lones *et al.*, 2004; Onciu *et al.*, 2006; Toujani *et al.*, 2009, Scholtysik *et al.*, 2010). Unter anderem betrifft dies Veränderungen von 13q, welche zudem von klinischer Relevanz zu sein scheinen. Eine Korrelation von 13q-Alterationen und verschlechterter klinischer Prognose konnte in mehreren, von einander unabhängigen Studien demonstriert werden (Lones *et al.*, 2004; Onciu *et al.*, 2006; Poirel *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2010).

Im Kontext der hier vorgelegten Ergebnisse scheint ferner eine offensichtlich bestehende Assoziation von 13q-Veränderungen und einem negativen EBV-Status interessant. Erst kürzlich konnte demonstriert werden, dass das Auftreten einer Deletion-13q in BL-ZL unter EBV-negativen Varianten statistisch signifikant erhöht ist (Murga Penas *et al.*, Manuskript eingereicht). Auch vorherige Studien wiesen auf eine Verknüpfung von EBV-Negativität und dem Auftreten chromosomaler Veränderungen hin (Berger und Bernheim, 1984; Berger und Bernheim, 1985; Barth *et al.*, 2004). Berger und Bernheim vermuteten in diesem Zusammenhang, dass die Akquisition zusätzlicher chromosomaler Abnormalitäten in einem der EBV-Infektion vergleichbaren, onkogenen Effekt mündet und die additiven, chromosomalen Abnormalitäten in EBV-negativen BL sowie das Virus in EBV-positiven BL womöglich eine komparable Rolle in der Lymphomagenese übernehmen (Berger und Bernheim, 1984). Bisher gelang jedoch nicht, eine entsprechende Relation zu verifizieren.

Basierend auf Ergebnissen der hier vorgelegten Arbeit scheint denkbar, dass die Integration des EBV auf 13q bzw. eine hieraus resultierende Expressionsänderung zellulärer Gene die bisher unbekannte Komponente in dieser Gleichung darstellt.

So wurde zuvor postuliert, dass das auf 13q32-q34 liegende Tumorsuppressorgen *BAFF* womöglich von der vermehrt auffindbaren Deletion-13q betroffen sein könnte (Nelson *et al.*, 2010). *BAFF* ist als Ligand der Tumornekrosefaktor-Familie in die Regulation von B-Zellentwicklung und Differenzierung involviert (Tangye *et al.*, 2006). Es zeigte sich, dass eine aberrante Expression assoziiert ist mit Immundefizienz, autoimmunen Erkrankungen sowie hämatologischen Erkrankungen der B-Zellreihe (He *et al.*, 2004, Tangye *et al.*, 2006). Eine aus der EBV-Integration in dieser Region

resultierende, verminderte bzw. fehlende Expression des *BAFF*-Gens würde in Kongruenz zu oben genannter These von Berger und Bernheim einen komparablen Effekt zur Deletion des Gens durch eine zytogenetische Veränderung darstellen. Die zuvor postulierte Relation zwischen dem EBV-Status und chromosomalen Abberationen wäre offengelegt.

Die Integration des EBV-Genoms könnte auch in einer aberranten Expression auf 13q lokalisierter microRNAs (miRNAs) resultieren. Diese repräsentieren eine Gruppe kleiner, nicht-kodierender RNAs, die auf post-transkriptionaler Ebene die Expression zahlreicher Gene modifizieren, indem sie Stabilität und Translation spezifischer mRNAs beeinflussen (Lee und Ambros 2001). Eine Bindung der miRNAs an die 3' untranslatierte Region der spezifischen mRNA führt dabei, in Abhängigkeit der Komplementarität der Sequenzen, zu einer Translationshemmung bzw. Degradation der mRNA und somit zur Inhibition der Proteinsynthese (Wienholds und Plasterk, 2005). Es wird davon ausgegangen, dass miRNAs über diesen Mechanismus in die Pathogenese zahlreicher solider und lymphoproliferativer Neoplasien involviert sind (Übersicht in Calin und Croce, 2006). Je nach Ziel-mRNA fungieren sie hierbei als Tumorsuppressormoleküle (z.B. *miR-15a* und *miR-16-1*) oder nehmen eine onkogene Funktion ein (z.B. *miR-155* und *miR-17-92*) (Übersicht in Zhang *et al.*, 2007).

In der hier vorgelegten Arbeit zeigte sich, dass die Region 13q21-31 mehrfach von einer Integration des EBV betroffen war. Interessanterweise liegt auf 13q31 das miRNA-Cluster *miR-17-92* (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene; Gen-ID: 407975), welchem eine onkogene Rolle in der Tumorgenese verschiedener Neoplasien zugeschrieben wird (Übersicht in Olive *et al.*, 2009). Anders als im Fall eines klassischen, Protein-kodierenden Onkogens (ein Transkript - ein Protein), kodiert das *mir-17-92* für ein polycistronisches Primärtranskript (pri-miRNA), welches sechs individuelle, reife miRNAs hervorbringt (*miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-20a*, *miR-19b-1*, und *miR-92*) (He *et al.*, 2005). Bisher konnten rund 30 verschiedene Ziel-mRNAs der einzelnen Komponenten des Clusters experimentell bestätigt werden. Einige von ihnen, wie *TGFBR2*, *BCL2L11* (*BIM*) und *PTEN* sind an der Regulation fundamentaler Zellprozesse beteiligt und werden der Klasse der Tumorsuppressorgene zugeordnet (Übersicht in Grillari *et al.*, 2010). Eine deregulative Expression des *mir-17-92* in hämatopoetischen Malignomen konnte gezeigt werden und scheint insbesondere für die Genese

von B-Zell-Lymphomen einschließlich des BL von Bedeutung (Übersicht in Olive *et al.*, 2009). Hierbei scheint einer Überexpression von *mir-17-92* und *MYC* ein synergistischer Effekt bezüglich der Aggressivität der Tumorentwicklung zuzukommen. Dies zeigte sich in humanen BL (Tagawa *et al.*, 2007) und im murinen Modell. Mäuse mit hohen Expressionsleveln des *mir-17-92* Clusters wiesen bei gleichzeitiger *MYC*-Überexpression eine verminderte Apoptoserate und eine beschleunigte B-Zell-Lymphomagenese auf (He *et al.*, 2005). In diesem Kontext wurde vermutet, dass die Überexpression der miRNAs eine Umgehung der *MYC*-induzierten Apoptose-Induktion ermöglicht (He *et al.*, 2005; Scholtysik *et al.*, 2010). Wie bereits in Punkt 1.3.1 der Einleitung erwähnt, führt die Überexpression von *MYC* in normalen Zellen zu einer Stimulation pro-apoptotischer Signalwege (Packham und Cleveland, 1995; Dang *et al.*, 2005). Die Inaktivierung der Apoptose-Einleitung ist unabkömmlich, um von dem Wachstumsfördernden Effekt der *MYC*-Überexpression zu profitieren und spielt eine zentrale Rolle in der Genese des BL (Thorley Lawson und Allday, 2008; Cader *et al.*, 2010). Das EBV scheint, über die Expression des anti-apoptotischen EBNA-1 womöglich in diesen Schritt involviert zu sein (Komano *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2006). Dass ein entsprechender Beitrag zudem möglicherweise über die Integration des EBV-Genoms erfolgt, ist denkbar. Die demonstrierte Akkumulation viraler Integration auf 13q, könnte die Expression des *mir-17-92* Clusters beeinflussen und somit zur Umgehung der Apoptose beitragen. In diesem Fall wäre eine direkte Verknüpfung von EBV-Integration und einem der Schüsselpunkte der Burkitt-Lymphomagenese dargelegt.

Fazit

Mit der hier vorgelegten Arbeit gelang die erstmalige Identifikation bisher nicht bekannter EBV-IL in 17 EBV-positiven BL-ZL sowie die Bestätigung bereits publizierter EBV-IL in 3 weiteren BL-ZL. Es zeigte sich, dass die EBV-Integration zum einen einen „ZL-spezifischen Charakter“ aufweist, zum anderen in bestimmten Regionen bzw. Banden akkumuliert. Möglicherweise resultiert die Integration des EBV nicht immer in einem onkogenen Effekt, ist in spezifischen Fällen jedoch direkt in die Lymphomagenese involviert. Die solitäre Existenz eines IL sowie die Häufung der viralen Integration könnte in diesem Fall für eine

besondere Signifikanz von Integrationsereignissen sprechen. Interessant scheint hierbei insbesondere die vermehrte Integration auf 13q. Sekundäre genetische Alteration von 13q stellen nicht nur ein frequentes Ereignis im BL dar, sondern scheinen auch mit dem EBV-Status und einer verschlechterten klinischen Prognose zu korrelieren. Das hier gelegene miRNA-Cluster *mir 17-92* steht im direkten Zusammenhang mit dem *MYC*-Signalweg, dem zentralen Signalweg der Burkitt-Lymphomagenese. Über eine veränderte Expression von *mir 17-92* oder anderer in dieser Arbeit aufgeführter Gene, könnte eine Integration des EBV in direktem Zusammenhang mit der Genese des BL stehen (Abbildung 5.1). Ob eine deregulative Expression entsprechender Gene vorliegt und inwiefern die EBV-Integration hiermit in kausalem Zusammenhang steht, bleibt zu klären.

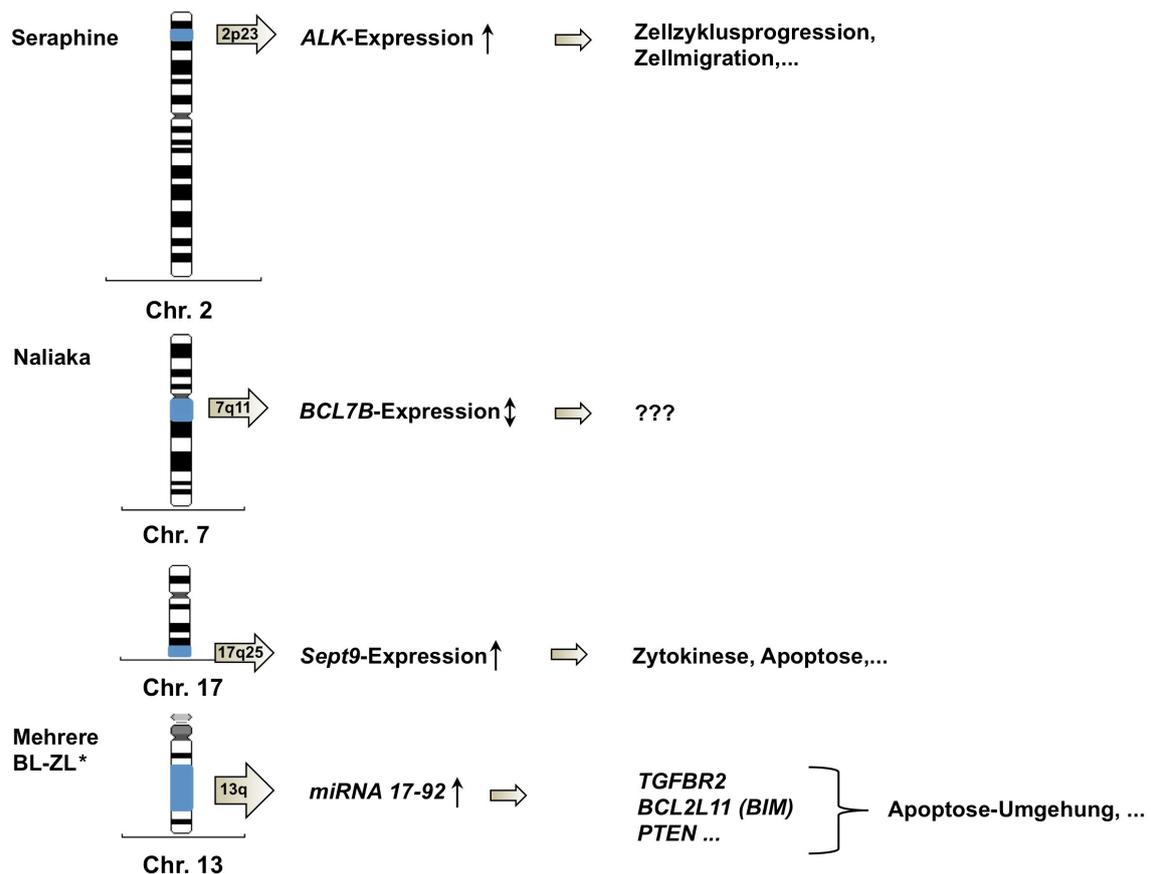


Abbildung 5 Überlappung ausgewählter Gene und spezifischer EBV-Integrationsloki. Eine Integration des EBV-Genoms (blau) in die hier demonstrierten chromosomalen Loci könnte zu einer Expressionsänderung der hier gelegenen, zellulären Gene (*kursiv*) geführt haben. Aufgrund der durch sie kodierten Proteinfunktion könnte dies über den jeweilig demonstrierten Weg zur Lymphomagenese der BL-ZL (links des Chromosoms aufgeführt) beigetragen haben.

(*Die BL-ZL AG876, Akuba, JBL-2, LY-67, LY-91, Solubo und Switer zeigten eine Integration des EBV im Bereich 13q21-31).

6 Zusammenfassung

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist ein hochmalignes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom monoklonalen Ursprungs. Eine Involvierung des Epstein-Barr-Virus (EBV) in die Genese des Lymphoms wurde bereits 1964 postuliert und gilt heute als gesichert. Dennoch bleibt bisher unklar, wie genau das EBV zur malignen Entartung von BL-Zellen beiträgt. Ein Großteil diesbezüglich angestrebter Studien befasste sich mit der onkogenen Kapazität latenter EBV-Genprodukte. Die Integration der viralen-DNA in das Wirtsgenom, ein wichtiger pathogener Aspekt humaner Tumoviren, war hingegen Fokus einer deutlich geringeren Anzahl an Studien. Eine Integration des EBV-Genoms konnte anhand von Biopsien des BL, hieraus etablierten BL-Zelllinien (BL-ZL) und lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) gezeigt werden. Daten über die genaue zytogenetische Lokalisation integrierter EBV-DNA sind jedoch rar. Bisher bleibt unklar, ob die Integration des EBV-Genoms eine nicht-randomisierte Verteilung aufweist und in welchem Umfang sie an der Entwicklung EBV-positiver BL beteiligt ist. Die hier vorgelegte Arbeit repräsentiert die größte, bisher durchgeführte Untersuchung bezüglich der Integration des Virus in EBV-positive BL-ZL. Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und eigens hergestellter DNA-Sonden gelang die Identifizierung zuvor nicht bekannter EBV-Integrationsloki (EBV-IL) in 17 BL-ZL sowie die Bestätigung bereits publizierter EBV-IL in 3 weiteren BL-ZL. Es zeigte sich eine nicht-randomisierte Verteilung der EBV-IL im Kollektiv sowie ein charakteristisches Muster viraler Integration in den einzelnen BL-ZL. Hierbei demonstrierten vier BL-ZL einen einzigen oder zwei distinkte EBV-IL, wohingegen die restlichen ZL eine Vielzahl unterschiedlicher IL aufwiesen. Als präferenzielle Orte der EBV-Integration konnten 2q, 4q und 13q identifiziert werden. Basierend auf der These, die Akkumulation viraler IL in diesen Regionen könnte, ebenso wie die Existenz eines singulären IL in einer BL-ZL, für eine besondere Signifikanz der Integrationsereignisse sprechen, konnte eine Überlappung entsprechender EBV-IL mit möglicherweise in die Genese des BL involvierten Genen gezeigt werden. Inwiefern die EBV-Integration die Expression dieser Gene beeinträchtigt hat oder über andere Mechanismen, wie etwa eine Erhöhung der Instabilität des Wirtsgenoms, zur Entwicklung der BL beigetragen hat, bleibt zu klären.

7 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
ALCL	Anaplastisches großzelliges Lymphom
AT-reich	Adenin/Thymin-reich
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCL6	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
Bio	Biotin
BL	Burkitt-Lymphom
BL-ZL	Burkitt-Lymphom Zelllinie
bp	basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad in Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFS	<i>Common Fragile site</i>
d	desoxy
DAPI	4'6-Diamidine-2-Phenylindole Dihydrochloride
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
del	Deletion
der	Derivativ
Dig	Digoxigenin
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngige
DS	Doppelsignal
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dUTP	2'-deoxyuridin-5'-triphosphat
EBER	<i>Epstein-Barr-Virus-encoded small RNA</i>
EBNA	<i>Epstein-Barr-Virus-encoded nuclear antigen</i>
eBL	Endemisches Burkitt-Lymphom

EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
For	<i>forward</i>
g	Gramm
g/v	Gramm/Volumen
GTG	<i>G-bands by trypsin using giemsa</i>
H ₂ O	Wasser
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCL	Salzsäure
HIV	humanes Immunschwäche-Virus
HIV-BL	HIV-assoziiertes Burkitt-Lymphom
HPV	Humanes Papillomavirus
Ig	Immunglobulin
IL	Integrationsloкус/-i
IR	<i>Internal Repeat</i>
kbp	kilobasen(paare)
L	Liter
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LD-PCR	<i>Long-Distance</i> PCR
LMP	<i>latent membrane protein</i>
M	Mol(ar)
M-FISH	multicolor-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
ng	nanogramm
nm	nanometer

nt	Nukleotide
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pm	pikomol??
Pri-miRNA	<i>primary miRNA transcripts</i>
Rev	<i>Reverse</i>
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
sBL	Sporadisches Burkitt-Lymphom
SSC	Standard-Saline-Citrate
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TR	<i>Terminal Repeat</i>
U	Enzym-Einheit/ <i>Units</i>
U	<i>Unique Region</i>
µlMikroliter	
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
USA	<i>United States of America</i>
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v.a.	vor allem
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Bibliografie

- Adams A, Lindahl T, Klein G. (1973). Linear association between cellular DNA and Epstein-Barr virus DNA in a human lymphoblastoid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**,2888-92.
- Aldoss IT, Weisenburger DD, Fu K, Chan WC, Vose JM, Bierman PJ, Bociak RG, Armitage JO. (2008). Adult Burkitt lymphoma: advances in diagnosis and treatment. *Oncology (Williston Park)* **22**,1508-17.
- Andersson-Anvret M, Lindahl T. (1978). Integrated viral DNA sequences in Epstein-Barr virus-converted human lymphoma lines. *J Virol* **25**,710-8.
- Barth TF, Muller S, Pawlita M, Siebert R, Rother JU, Mechtersheimer G, Kitinya J, Bentz M, Moller P. (2004). Homogeneous immunophenotype and paucity of secondary genomic aberrations are distinctive features of endemic but not of sporadic Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with MYC rearrangement. *J Pathol* **203**,940-5.
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* **2**,1129-33.
- Berger R, Bernheim A. (1984). [Is there a functional equivalence between abnormalities of the long arm of chromosome 1 and the presence of Epstein-Barr virus in continuous lines of Burkitt's lymphoma?]. *C R Acad Sci III* **298**,143-5.
- Berger R, Bernheim A. (1985). Cytogenetics of Burkitt's lymphoma-leukaemia: a review. *IARC Sci Publ*,65-80.
- Bernheim A, Berger R, Lenoir G. (1981). Cytogenetic studies on African Burkitt's lymphoma cell lines: t(8;14), t(2;8) and t(8;22) translocations. *Cancer Genet Cytogenet* **3**,307-15.
- Bernheim A, Berger R, Lenoir G. (1983). Cytogenetic studies on Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* **8**,223-9.
- Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. (2004). Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* **104**,3009-20.
- Bonilla Guerrero R, Roberts LR. (2005). The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* **42**,760-77.
- Bornkamm GW, Hammerschmidt W. (2001). Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**,437-59.

- Bornkamm GW, Kaduk B, Kachel G, Schneider U, Fresen KO, Schwanitz G, Hermanek P. (1980). Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma in a German woman during pregnancy. *Blut* **40**,167-77.
- Brady G, MacArthur GJ, Farrell PJ. (2007). Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol* **60**,1397-402.
- Brechot C, Pourcel C, Louise A, Rain B, Tiollais P. (1980). Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* **286**,533-5.
- Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, Young LS. (1992). Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol* **66**,2689-97.
- Burkitt D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* **46**,218-23.
- Burrows JF, Chanduloy S, McIlhatton MA, Nagar H, Yeates K, Donaghy P, Price J, Godwin AK, Johnston PG, Russell SE. (2003). Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. *J Pathol* **201**,581-8.
- Cader FZ, Kearns P, Young L, Murray P, Vockerodt M. (2010). The contribution of the Epstein-Barr virus to the pathogenesis of childhood lymphomas. *Cancer Treat Rev* **36**,348-53.
- Calin GA, Croce CM. (2006). MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* **66**,7390-4.
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**,11-23.
- Choudhuri T, Verma SC, Lan K, Murakami M, Robertson ES. (2007). The ATM/ATR signaling effector Chk2 is targeted by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C to release the G2/M cell cycle block. *J Virol* **81**,6718-30.
- Cohen JH, Revillard JP, Magaud JP, Lenoir G, Vuillaume M, Manel AM, Vincent C, Bryon PA. (1987). B-cell maturation stages of Burkitt's lymphoma cell lines according to Epstein-Barr virus status and type of chromosome translocation. *J Natl Cancer Inst* **78**,235-42.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**,7824-7.
- Dang CV, O'Donnell K A, Juopperi T. (2005). The great MYC escape in tumorigenesis. *Cancer Cell* **8**,177-8.
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. (2006). The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* **16**,253-64.

- de Jong D, Balague Ponz O. (2011). The molecular background of aggressive B cell lymphomas as a basis for targeted therapy. *J Pathol* **223**,274-82.
- de-The G, Geser A, Day NE, Tukei PM, Williams EH, Beri DP, Smith PG, Dean AG, Bronkamm GW, Feorino P and others. (1978). Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* **274**,756-61.
- Deacon EM, Pallesen G, Niedobitek G, Crocker J, Brooks L, Rickinson AB, Young LS. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* **177**,339-49.
- Debacker K, Kooy RF. (2007). Fragile sites and human disease. *Hum Mol Genet* **16 Spec No. 2**,R150-8.
- Debiec-Rychter M, Croes R, De Vos R, Marynen P, Roskams T, Hagemeyer A, Lombaerts R, Sciort R. (2003). Complex genomic rearrangement of ALK loci associated with integrated human Epstein-Barr virus in a post-transplant myogenic liver tumor. *Am J Pathol* **163**,913-22.
- Delecluse HJ, Bartnizke S, Hammerschmidt W, Bullerdiek J, Bornkamm GW. (1993). Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol* **67**,1292-9.
- Delsol G, Lamant L, Mariame B, Pulford K, Dastugue N, Brousset P, Rigal-Huguet F, al Saati T, Cerretti DP, Morris SW and others. (1997). A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation. *Blood* **89**,1483-90.
- Drexler HG, Dirks W, MacLeod RAF, Quentmeier H, Steube KG and Uphoff CC (eds) (2001). *Catalogue of Human and Animal Cell Lines*. DSMZ, Braunschweig.
- Epstein AL, Henle W, Henle G, Hewetson JF, Kaplan HS. (1976). Surface marker characteristics and Epstein-Barr virus studies of two established North American Burkitt's lymphoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**,228-32.
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**,702-3.
- Epstein MA, Barr YM. (1964). Cultivation in Vitro of Human Lymphoblasts from Burkitt's Malignant Lymphoma. *Lancet* **1**,252-3.
- Evens AM, Gordon LI. (2002). Burkitt's and Burkitt-like lymphoma. *Curr Treat Options Oncol* **3**,291-305.
- Favrot MC, Philip I, Philip T, Portoukalian J, Dore JF, Lenoir GM. (1984). Distinct reactivity of Burkitt's lymphoma cell lines with eight monoclonal antibodies correlated with the ethnic origin. *J Natl Cancer Inst* **73**,841-7.

- Feitelson MA, Lee J. (2007). Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* **252**,157-70.
- Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, Gostout BS, Cheung TH, Chung TK, Fu WY and others. (2003). Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* **22**,7233-42.
- Ferry JA. (2006). Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis. *Oncologist* **11**,375-83.
- Flaitz CM, Hicks MJ. (1998). Molecular piracy: the viral link to carcinogenesis. *Oral Oncol* **34**,448-53.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. (2004). A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* **4**,177-83.
- Gao J, Luo X, Tang K, Li X, Li G. (2006). Epstein-Barr virus integrates frequently into chromosome 4q, 2q, 1q and 7q of Burkitt's lymphoma cell line (Raji). *J Virol Methods* **136**,193-9.
- Given D, Kieff E. (1979). DNA of Epstein-Barr virus. VI. Mapping of the internal tandem reiteration. *J Virol* **31**,315-24.
- God JM, Haque A. (2010). Burkitt lymphoma: pathogenesis and immune evasion. *J Oncol* **2010**.
- Gregory CD, Rowe M, Rickinson AB. (1990). Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Gen Virol* **71 (Pt 7)**,1481-95.
- Grillari J, Hackl M, Grillari-Voglauer R. (2010). miR-17-92 cluster: ups and downs in cancer and aging. *Biogerontology* **11**,501-6.
- Gruhne B, Sompallae R, Masucci MG. (2009). Three Epstein-Barr virus latency proteins independently promote genomic instability by inducing DNA damage, inhibiting DNA repair and inactivating cell cycle checkpoints. *Oncogene* **28**,3997-4008.
- Gulley ML, Raphael M, Lutz CT, Ross DW, Raab-Traub N. (1992). Epstein-Barr virus integration in human lymphomas and lymphoid cell lines. *Cancer* **70**,185-91.
- Gunven P, Klein G, Henle G, Henle W, Clifford P. (1970). Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. Antibodies to EBV associated membrane and viral capsid antigens in Burkitt lymphoma patients. *Nature* **228**,1053-6.
- Hall PA, Jung K, Hillan KJ, Russell SE. (2005). Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol* **206**,269-78.

- Hatzubai A, Anafi M, Masucci MG, Dillner J, Lerner RA, Klein G, Sulitzeanu D. (1987). Down-regulation of the EBV-encoded membrane protein (LMP) in Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* **40**,358-64.
- He B, Chadburn A, Jou E, Schattner EJ, Knowles DM, Cerutti A. (2004). Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J Immunol* **172**,3268-79.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ and others. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**,828-33.
- Henderson A, Ripley S, Heller M, Kieff E. (1983). Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**,1987-91.
- Henle G, Henle W. (1966). Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* **91**,1248-56.
- Henle G, Henle W, Diehl V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**,94-101.
- Henle W, Diehl V, Kohn G, Zur Hausen H, Henle G. (1967). Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* **157**,1064-5.
- Henle W, Henle G. (1973). Epstein-Barr virus-related serology in Hodgkin's disease. *Natl Cancer Inst Monogr* **36**,79-84.
- Henle W, Henle G, Lennette ET. (1979). The Epstein-Barr virus. *Sci Am* **241**,48-59.
- Hurley EA, Agger S, McNeil JA, Lawrence JB, Calendar A, Lenoir G, Thorley-Lawson DA. (1991). When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates. *J Virol* **65**,1245-54.
- Hurley EA, Klamann LD, Agger S, Lawrence JB, Thorley-Lawson DA. (1991). The prototypical Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell line IB4 is an unusual variant containing integrated but no episomal viral DNA. *J Virol* **65**,3958-63.
- Idilman R, De Maria N, Colantoni A, Van Thiel DH. (1998). Pathogenesis of hepatitis B and C-induced hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* **5**,285-99.
- Iversen U, Iversen OH, Bluming AZ, Ziegler JL, Kyalwasi S. (1972). Cell kinetics of African cases of Burkitt lymphoma. A preliminary report. *Eur J Cancer* **8**,305-8.

- Jondal M, Klein G. (1973). Surface markers on human B and T lymphocytes. II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B lymphocytes. *J Exp Med* **138**,1365-78.
- Jox A, Rohen C, Belge G, Bartnitzke S, Pawlita M, Diehl V, Bullerdiek J, Wolf J. (1997). Integration of Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma cells leads to a region of enhanced chromosome instability. *Ann Oncol* **8 Suppl 2**,131-5.
- Kaiser-McCaw B, Epstein AL, Kaplan HS, Hecht F. (1977). Chromosome 14 translocation in African and North American Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* **19**,482-6.
- Karpova MB, Schoumans J, Ernberg I, Henter JI, Nordenskjold M, Fadeel B. (2005). Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line. *Leukemia* **19**,159-61.
- Kaschka-Dierich C, Lawrence F, Bjursell G, Adams A and Lindahl T. (1977). Human lymphoblastoid cell lines derived from individuals without lymphoproliferative disease contain the same latent forms of Epstein-Barr virus DNA as those found in tumor cells. *Int J Cancer* **20**,173-180.
- Kelly GL, Milner AE, Baldwin GS, Bell AI, Rickinson AB. (2006). Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**,14935-40.
- Kennedy G, Komano J, Sugden B. (2003). Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**,14269-74.
- Kintner CR, Sugden B. (1979). The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. *Cell* **17**,661-71.
- Klein G. (1983). Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. *Cell* **32**,311-5.
- Klein G, Dombos L, Gothoskar B. (1972). Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to superinfection with EB-virus. *Int J Cancer* **10**,44-57.
- Klein G, Klein E, Kashuba E. (2010). Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **396**,67-73.
- Komano J, Sugiura M, Takada K. (1998). Epstein-Barr virus contributes to the malignant phenotype and to apoptosis resistance in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* **72**,9150-6.
- Kornblau SM, Goodacre A, Cabanillas F. (1991). Chromosomal abnormalities in adult non-endemic Burkitt's lymphoma and leukemia: 22 new reports and a review of 148 cases from the literature. *Hematol Oncol* **9**,63-78.

- Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N. (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**,11963-8.
- Kuppers R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* **3**,801-12.
- Kuppers R, Dalla-Favera R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* **20**,5580-94.
- Kutok JL, Wang F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* **1**,375-404.
- Lai JL, Fenaux P, Zandecki M, Nelken B, Huart JJ, Deminatti M. (1989). Cytogenetic studies in 30 patients with Burkitt's lymphoma or L3 acute lymphoblastic leukemia with special reference to additional chromosome abnormalities. *Ann Genet* **32**,26-32.
- Lawrence JB, Villnave CA, Singer RH. (1988). Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* **52**,51-61.
- Lazo PA, DiPaolo JA, Popescu NC. (1989). Amplification of the integrated viral transforming genes of human papillomavirus 18 and its 5'-flanking cellular sequence located near the myc protooncogene in HeLa cells. *Cancer Res* **49**,4305-10.
- Lee RC, Ambros V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**,862-4.
- Lenoir GM, Vuillaume M, Bonnardel C. (1985). The use of lymphomatous and lymphoblastoid cell lines in the study of Burkitt's lymphoma. *IARC Sci Publ*,309-18.
- Lestou VS, De Braekeleer M, Strehl S, Ott G, Gardner H, Ambros PF. (1993). Non-random integration of Epstein-Barr virus in lymphoblastoid cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* **8**,38-48.
- Lindahl T, Adams A, Bjursell G, Bornkamm GW, Kaschka-Dierich C, Jehn U. (1976). Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol* **102**,511-30.
- Liu MT, Chen YR, Chen SC, Hu CY, Lin CS, Chang YT, Wang WB, Chen JY. (2004). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces micronucleus formation, represses DNA repair and enhances sensitivity to DNA-damaging agents in human epithelial cells. *Oncogene* **23**,2531-9.
- Lones MA, Sanger WG, Le Beau MM, Heerema NA, Sposto R, Perkins SL, Buckley J, Kadin ME, Kjeldsberg CR, Meadows A and others. (2004). Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt-like lymphomas of children and adolescents: a report from

- Children's Cancer Group Study CCG-E08. *J Pediatr Hematol Oncol* **26**,169-78.
- Lukusa T, Fryns JP. (2008). Human chromosome fragility. *Biochim Biophys Acta* **1779**,3-16.
- Luo WJ, Takakuwa T, Ham MF, Wada N, Liu A, Fujita S, Sakane-Ishikawa E, Aozasa K. (2004). Epstein-Barr virus is integrated between REL and BCL-11A in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2). *Lab Invest* **84**,1193-9.
- Magrath IT, Pizzo PA, Whang-Peng J, Douglass EC, Alabaster O, Gerber P, Freeman CB, Novikovs L. (1980). Characterization of lymphoma-derived cell lines: comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen. I. Physical, cytogenetic, and growth characteristics. *J Natl Cancer Inst* **64**,465-76.
- Magrath I, Erikson J., Whan-Peng J, Sieverts H, Armstrong G, Benjamin D, *et al.* (1983). Synthesis of kappa light chains by cell lines containing an 8;22 chromosomal translocation derived from a male homosexual with Burkitt's lymphoma. *Science* **222**:1094-1098.
- Manolov G, Manolova Y. (1972). Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. *Nature* **237**,33-4.
- Matsuo T, Heller M, Petti L, O'Shiro E, Kieff E. (1984). Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science* **226**,1322-5.
- McLaughlin-Drubin ME, Munger K. (2008). Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* **1782**,127-50.
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B. (1997). A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* **15 Spec No**,417-74.
- Miyoshi I, Hiraki S, Kimura I, Miyamoto K, Sato J. (1979). 2/8 translocation in a Japanese Burkitt's lymphoma. *Experientia* **35**,742-3.
- Montagna C, Lyu MS, Hunter K, Lukes L, Lowther W, Reppert T, Hissong B, Weaver Z, Ried T. (2003). The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. *Cancer Res* **63**,2179-87.
- Moore PS, Chang Y. (2010). Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer* **10**,878-89.
- Morissette G, Flamand L. (2010). Herpesviruses and chromosomal integration. *J Virol* **84**,12100-9.

- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* **263**,1281-4.
- Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X, Witte DP. (1997). ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* **14**,2175-88.
- Morton LM, Purdue MP, Zheng T, Wang SS, Armstrong B, Zhang Y, Menashe I, Chatterjee N, Davis S, Lan Q and others. (2009). Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with germline variation in genes that regulate the cell cycle, apoptosis, and lymphocyte development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**,1259-70.
- Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. (1992). Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv* **12**,197-217.
- Murga Penas EM, Schilling G, Behrmann P, Klokow M, Vettorazzi E, Bokemeyer C, and Dierlamm J (Manuskript eingereicht 2011). Comprehensive molecular cytogenetic analysis of 44 Burkitt's lymphoma cell lines by multicolor-FISH: detailed characterization of secondary chromosomal changes, karyotypic evolution, and comparison to patients's cytogenetic data.
- Mwanda OW. (2004). Clinical characteristics of Burkitt's lymphoma seen in Kenyan patients. *East Afr Med J*,S78-89.
- Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Clifford P, Manolov G, Fenyo EM, Klein E. (1969). Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas. *Cancer* **23**,64-79.
- Nelson M, Perkins SL, Dave BJ, Coccia PF, Bridge JA, Lyden ER, Heerema NA, Lones MA, Harrison L, Cairo MS and others. (2010). An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence in situ hybridization and its impact on survival in children and adolescents with Burkitt lymphoma: results from the Children's Oncology Group study CCG-5961. *Br J Haematol* **148**,600-10.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). [Online im Internet.] URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M15973.1> [Stand:05.05.2012,13:00].
- Niederman JC, McCollum RW, Henle G, Henle W. (1968). Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA* **203**,205-9.

- Ohshima K, Suzumiya J, Kanda M, Kato A, Kikuchi M. (1998). Integrated and episomal forms of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV associated disease. *Cancer Lett* **122**,43-50.
- Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, He L. (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev* **23**,2839-49.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**,609-19.
- Onciu M, Schlette E, Zhou Y, Raimondi SC, Giles FJ, Kantarjian HM, Medeiros LJ, Ribeiro RC, Pui CH, Sandlund JT. (2006). Secondary chromosomal abnormalities predict outcome in pediatric and adult high-stage Burkitt lymphoma. *Cancer* **107**,1084-92.
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). [Online im Internet.]
URL: <http://omim.org/entry/105590>; <http://omim.org/entry/604061>;
<http://omim.org/entry/605846>; <http://omim.org/entry/600040>
[Stand:05.05.2012, 13:00].
- Oriol A, Ribera JM, Bergua J, Gimenez Mesa E, Grande C, Esteve J, Brunet S, Moreno MJ, Escoda L, Hernandez-Rivas JM and others. (2008). High-dose chemotherapy and immunotherapy in adult Burkitt lymphoma: comparison of results in human immunodeficiency virus-infected and noninfected patients. *Cancer* **113**,117-25.
- Osaka M, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. (1999). MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**,6428-33.
- Packham G, Cleveland JL. (1995). c-Myc and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1242**,11-28.
- Pan SH, Tai CC, Lin CS, Hsu WB, Chou SF, Lai CC, Chen JY, Tien HF, Lee FY, Wang WB. (2009). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 disrupts mitotic checkpoint and causes chromosomal instability. *Carcinogenesis* **30**,366-75.
- Pizzo PA, Magrath IT, Chattopadhyay SK, Biggar RJ, Gerber P. (1978). A new tumour-derived transforming strain of Epstein-Barr virus. *Nature* **272**,629-31.
- Poirel HA, Cairo MS, Heerema NA, Swansbury J, Auperin A, Launay E, Sanger WG, Talley P, Perkins SL, Raphael M and others. (2009). Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Leukemia* **23**,323-31.

- Polack A, Hortnagel K, Pajic A, Christoph B, Baier B, Falk M, Mautner J, Geltinger C, Bornkamm GW, Kempkes B. (1996). c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**,10411-6.
- Popescu NC. (2003). Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Lett* **192**,1-17.
- Popescu NC, Chen MC, Simpson S, Solinas S, DiPaolo JA. (1993). A Burkitt lymphoma cell line with integrated Epstein-Barr virus at a stable chromosome modification site. *Virology* **195**,248-51.
- Powles T, Matthews G, Bower M. (2000). AIDS related systemic non-Hodgkin's lymphoma. *Sex Transm Infect* **76**,335-41.
- Pulvertaft JV. (1964). Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* **1**,238-40.
- Raab-Traub N, Flynn K. (1986). The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* **47**,883-9.
- Razzouk BI, Srinivas S, Sample CE, Singh V, Sixbey JW. (1996). Epstein-Barr Virus DNA recombination and loss in sporadic Burkitt's lymphoma. *J Infect Dis* **173**,529-35.
- Reisinger J, Rumpler S, Lion T, Ambros PF. (2006). Visualization of episomal and integrated Epstein-Barr virus DNA by fiber fluorescence in situ hybridization. *Int J Cancer* **118**,1603-8.
- Rickinson AB, Kieff E. (2001). Epstein-Barr virus: In: Knipe DM & Howley PM (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott/Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp.2575-2627.
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* **113**,237-51.
- Riou G, Le MG, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Orth G. (1992). Human papillomavirus-negative status and c-myc gene overexpression: independent prognostic indicators of distant metastasis for early-stage invasive cervical cancers. *J Natl Cancer Inst* **84**,1525-6.
- Robinson WS. (1994). Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma. *Annu Rev Med* **45**,297-323.
- Rochford R, Cannon MJ, Moormann AM. (2005). Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? *Nat Rev Microbiol* **3**,182-7.
- Russell SE, Hall PA. (2005). Do septins have a role in cancer? *Br J Cancer* **93**,499-503.

- Scholtysik R, Kreuz M, Klapper W, Burkhardt B, Feller AC, Hummel M, Loeffler M, Rosolowski M, Schwaenen C, Spang R and others. (2010). Detection of genomic aberrations in molecularly defined Burkitt's lymphoma by array-based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis. *Haematologica* **95**,2047-55.
- Scott M, Hyland PL, McGregor G, Hillan KJ, Russell SE, Hall PA. (2005). Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours. *Oncogene* **24**,4688-700.
- Shafritz DA, Shouval D, Sherman HI, Hadziyannis SJ, Kew MC. (1981). Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Studies in percutaneous liver biopsies and post-mortem tissue specimens. *N Engl J Med* **305**,1067-73.
- Smith DI, Zhu Y, McAvoy S, Kuhn R. (2006). Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. *Cancer Lett* **232**,48-57.
- Sorensen AB, Lund AH, Ethelberg S, Copeland NG, Jenkins NA, Pedersen FS. (2000). Sint1, a common integration site in SL3-3-induced T-cell lymphomas, harbors a putative proto-oncogene with homology to the septin gene family. *J Virol* **74**,2161-8.
- Speicher MR, Carter NP. (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* **6**,782-92.
- Szmuness W. (1978). Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog Med Virol* **24**,40-69.
- Tagawa H, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M. (2007). Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci* **98**,1482-90.
- Takakuwa T, Luo WJ, Ham MF, Sakane-Ishikawa F, Wada N, Aozasa K. (2004). Integration of Epstein-Barr virus into chromosome 6q15 of Burkitt lymphoma cell line (Raji) induces loss of BACH2 expression. *Am J Pathol* **164**,967-74.
- Takakuwa T, Luo WJ, Ham MF, Wada N, Aozasa K. (2005). Identification of Epstein-Barr virus integrated sites in lymphoblastoid cell line (IB4). *Virus Res* **108**,133-8.
- Tangye SG, Bryant VL, Cuss AK, Good KL. (2006). BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Semin Immunol* **18**,305-17.
- Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**,7837-41.

- Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. (2003). Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* **22**,1225-37.
- Thorley-Lawson DA, Allday MJ. (2008). The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* **6**,913-24.
- Toujani S, Dessen P, Ithzar N, Danglot G, Richon C, Vassetzky Y, Robert T, Lazar V, Bosq J, Da Costa L and others. (2009). High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *PLoS One* **4**,e7089.
- Trescol-Biemont MC, Biemont C, Daillie J. (1987). Localization polymorphism of EBV DNA genomes in the chromosomes of Burkitt lymphoma cell lines. *Chromosoma* **95**,144-7.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**,12-9.
- Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. (1989). Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* **320**,502-6.
- Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. (2004). Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* **64**,3878-84.
- Wienholds E, Plasterk RH. (2005). MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* **579**,5911-22.
- Wolf J, Jox A, Skarbek H, Pukrop T, Bartnitzke S, Pawlita M, Diehl V, Bullerdiek J. (1995). Selective loss of integrated Epstein-Barr virus genomes after long-term cultivation of Burkitt's lymphoma x B-lymphoblastoid cell hybrids due to chromatin instability at the integration site. *Virology* **212**,179-85.
- Wolf J, Pawlita M, Jox A, Kohls S, Bartnitzke S, Diehl V, Bullerdiek J. (1993). Integration of Epstein Barr virus near the breakpoint of a translocation 11;19 in a Burkitt's lymphoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* **67**,90-4.
- Wright DH. (1967). The epidemiology of Burkitt's tumor. *Cancer Res* **27**,2424-38.
- Wuu KD, Chen YJ, Wu SW. (1996). Frequency and distribution of chromosomal integration sites of the Epstein-Barr virus genome. *J Formos Med Assoc* **95**,911-6.

- Yata J, Klein G. (1969). Some factors affecting membrane immunofluorescence reactivity of Burkitt lymphoma tissue culture cell lines. *Int J Cancer* **4**,767-75.
- Young LS, Murray PG. (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* **22**,5108-21.
- Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI. (2005). The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **158**,27-34.
- Zani VJ, Asou N, Jadayel D, Heward JM, Shipley J, Nacheva E, Takasaki K, Catovsky D, Dyer MJ. (1996). Molecular cloning of complex chromosomal translocation t(8;14;12)(q24.1;q32.3;q24.1) in a Burkitt lymphoma cell line defines a new gene (BCL7A) with homology to caldesmon. *Blood* **87**,3124-34.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* **302**,1-12.
- zur Hausen H. (1991). Viruses in human cancers. *Science* **254**,1167-73.

9 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. med. J. Dierlamm und Herrn Prof. Dr. med. C. Bokemeyer für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Murga Penas danke ich für die umfassende Anleitung und Betreuung der Promotion.

Ich danke allen Beteiligten der Arbeitsgruppe Experimentelle Zytogenetik, für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und deren Hilfsbereitschaft. Besonders danke ich Marianne Klokow und Petra Behrmann für die umfangreiche Unterstützung und Hilfe.

Zusätzlich möchte ich mich bei meinem Freund Nickolas für Rückhalt und Aufmunterungen sowie die vielen guten Anregungen bedanken.

Auch allen anderen nicht namentlich erwähnten Personen die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, sei gedankt.

10 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: