

Aus der Klinik für Innere Medizin

Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie

Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Andreas Neubauer

des Fachbereichs Medizin der Universität Marburg

IRF8-Mutationsanalyse in hämatologischen Neoplasien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von Stefan Chifudov aus Sofia, Bulgarien

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am: 13.12.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Andreas Burchert

1. Korreferent: PD Dr. W. Meißner

An Mama Deni

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	3
Summary.....	5
1. Einleitung.....	7
1.1 Beschreibung von IRF8.....	7
1.2 Physiologische Rolle von IRF8.....	8
1.3 Rolle eines IRF8-Funktionsverlustes bei Immundefekten	10
1.4 Rolle von IRF8 bei hämatologischen Neoplasien.....	11
1.5 Bedeutung von Genmutationen in der Onkologie	17
1.6 Zusammenfassung und Fragestellung	19
2. Material.....	20
2.1 Analytierte Proben.....	20
2.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.3 Chemikalien und Reagenzien	22
2.4 Kit-Systeme.....	22
2.5 Laborgeräte.....	22
2.6 PCR-Primer.....	23
3. Methoden	24
3.1 Isolierung der mononukläeren Zellen	25
3.2 RNA-Isolierung.....	25
3.3 Reverse Transkription	26
3.4 Polymerase-Kettenreaktion.....	26
3.5 Gelelektrophorese.....	29
3.6 Vorbereitung zur Sequenzierung.....	30

3.7 Sequenzierung.....	30
3.8 Auswertung der Sequenzierung.....	30
3.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	32
3.10 Statistische Auswertung.....	33
4. Ergebnisse	35
4.1 Sequenzierungen.....	35
4.2 Übersicht über die gefundenen Mutationen	35
4.3 <i>IRF8</i> -Mutationen bei der ALL.....	37
4.4 <i>IRF8</i> -Mutationen bei der CLL.....	40
4.5 <i>IRF8</i> -Mutationen bei anderen hämatologischen Neoplasien.....	42
4.6 Zusammenfassung der gefundenen Mutationen.....	43
4.7 Expression von <i>IRF8</i>	44
5. Diskussion.....	48
6. Literaturverzeichnis	53
7. Abkürzungsverzeichnis	59
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	61
Danksagung.....	63
Ehrenwörtliche Erklärung	64
Tabellarischer Lebenslauf	65

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8) ist an mehreren physiologischen Prozessen des hämatopoetischen bzw. des Immunsystems beim Menschen beteiligt. Dazu gehören unter anderem die Reifung myeloischer und lymphatischer Vorläuferzellen im Knochenmark sowie die späteren Stadien der lymphatischen Differenzierung in den sekundären lymphatischen Organen.

In enger Verbindung zu diesen Aufgaben von IRF8 stehen Hinweise auf die Bedeutung einer Fehlfunktion dieses Transkriptionsfaktors bei der Entstehung hämatologischer und immunologischer Erkrankungen, insbesondere einiger hämatologischer Neoplasien und Immundefektkrankheiten. Die verringerte Expression von *IRF8* in den malignen Zellen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) spricht zusammen mit dem gezeigten Antagonismus zwischen IRF8 und dem zentralen onkogenen Protein bei der CML – BCR-ABL – für eine tumor-suppressive Rolle von IRF8 bei dieser Erkrankung. Da zudem IRF8-Null-Mäuse und BXH-2-Mäuse, die eine zufällig erworbene IRF8-Mutation (p.R294C) aufweisen, eine CML-ähnliche Myeloproliferation entwickeln, hat sich *IRF8* als Tumorsuppressorgen bei der CML etabliert.

Die tumorsuppressive Rolle von IRF8 bei der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) ist nicht so klar gezeigt. Im Rahmen von Genomsequenzierungen wurden allerdings bei einigen pädiatrischen ALL-Fällen auch IRF8-Mutationen beobachtet. Im Unterschied dazu sind bei der Erwachsenen-ALL, die auch häufiger das *BCR-ABL*-Onkogen exprimiert, keine *IRF8*-Mutationen beschrieben worden.

Bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) sind Polymorphismen im Bereich des *IRF8*-Genlokus vermutlich mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert. Eine gezielte Sequenzierung des Gens in den CLL-Zellen zur Suche nach Mutationen ist jedoch bisher nicht beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher primär in ALL- und CLL-Zellen nach *IRF8*-Mutationen gesucht. Die *IRF8*-Transkripte wurden bei insgesamt 136 Patienten mit ALL, CLL oder selten auch anderen hämatologischen Neoplasien und bei neun humanen Zelllinien sequenziert. Proben mit vorhandenen Mutationen wurden ggf. auf eine Änderung der *IRF8*-mRNA-Expression untersucht.

IRF8-Veränderungen wurden bei insgesamt 39% der untersuchten Proben gefunden, meist in der Form bereits bekannter synonyme Polymorphismen. Drei missense-Mutationen konnten identifiziert werden (zwei bei der ALL, eine beim Mantelzelllymphom), wobei zwei dieser Mutationen als Polymorphismen bekannt sind. Die Mutation p.R296H in einer ALL-Probe der pro-B-ALL-Subgruppe stellt hingegen keinen bekannten Polymorphismus dar. Diese Mutation betrifft beim Menschen die gleiche Aminosäure wie die *IRF8*-Mutation bei der bereits erwähnten BXH-2-Maus. Außerdem wurde eine Überexpression des mutierten *IRF8*-Transkripts in der gleichen Patientenprobe beobachtet. Andererseits fanden wir bei der CLL eine Deletion von 19 Basenpaaren (c.1158_1176del) nahe am 3'-Ende des kodierenden *IRF8*-mRNA-Abschnittes, die mit einer niedrigen Expression des *IRF8*-Transkriptes einhergeht.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit bei je einer Erwachsenen-pro-B-ALL- und CLL-Probe erstmalig *IRF8*-Mutationen demonstriert werden, die keine Polymorphismen darstellen. Bei der pro-B-ALL ist eine Aminosäure von *IRF8* betroffen, die interessanterweise der mutierten Aminosäure bei der BXH-2-Leukämie-Maus entspricht. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die funktionelle Auswirkung der gefundenen Mutationen besser zu charakterisieren.

Summary

Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8) is a transcription factor involved in various physiological processes of the hematopoietic and immune systems. Among these are the early maturation of myeloid cells and B lymphocyte progenitors in the bone marrow, but also some later stages of lymphatic differentiation in the secondary lymphoid organs.

Closely connected to this regulatory role of IRF8 are indications that a dysfunction of the protein contributes to the pathogenesis of several hematological and immunological diseases, including hematological tumors. For example, loss of *IRF8* expression has been shown in chronic myeloid leukemia (CML) cells. Further, IRF8 antagonizes BCR-ABL, the central oncogenic kinase in CML. Interestingly, *IRF8* null mice and the 'BXH-2' mice strain, which harbors the IRF8 mutation p.R294C, both develop a CML-like myeloproliferative disease. Thus, IRF8 is an established tumor suppressor in CML.

Less is documented for IRF8 mutations in acute lymphoblastic leukemia (ALL). Few pediatric ALL cases are shown to harbor *IRF8* mutations. In adult ALL, where *BCR-ABL* oncogene expression is more common, no *IRF8* mutations have been reported.

Polymorphisms around the *IRF8* gene locus are associated with an increased risk of chronic lymphocytic leukemia (CLL). However, so far there has been no systematic sequencing analysis of *IRF8* in CLL.

The current study represents a search for *IRF8* mutations in various hematological neoplasia. The *IRF8* transcripts from 136 patient samples, mostly adult-ALL and CLL, and nine human cell-lines were sequenced. Some of the samples with mutated *IRF8* were then examined with regard to *IRF8* expression.

Altogether, 39% of the samples demonstrated variations of the *IRF8* wild-type sequence of any kind, mostly in the form of synonymous ('silent') polymorphisms. Three missense mutations were found (two in ALL, one in mantle cell lymphoma) and two of these mutations represent known *IRF8* polymorphisms. The mutation p.R296H in one pro-B-ALL sample is not a known polymorphism. It also affects the same amino acid which is mutated in the BXH-2 mouse. Furthermore, the p.R296H mutation was associated with an overexpression of *IRF8*. In one CLL sample, we found the deletion of 19 nucleotide bases c.1158_1176 near the 3' coding end of *IRF8*. This sample demonstrated a lower expression of *IRF8* compared to *IRF8* wild-type samples.

In conclusion, in the current study we found previously unreported non-polymorphism *IRF8* mutations in one case of adult ALL and one case of CLL. In pro-B ALL, the same *IRF8* amino acid as the one affected in the BXH-2 mouse is mutated. The altered expression of the two *IRF8* transcripts carrying non-polymorphism missense mutations suggests a functional role of the mutations. Further studies addressing this are warranted.

1. Einleitung

1.1 Beschreibung von IRF8

Interferon Regulatory Factor 8 (IRF8), auch Interferon Consensus Sequence Binding Protein (ICSBP) genannt, ist ein Transkriptionsfaktor aus der IRF-Familie, die aus neun Proteinen besteht (IRF1-IRF9)⁶². Allen IRFs ist ihre regulatorische Rolle bei verschiedenen Vorgängen des Immunsystems gemeinsam, darunter auch ihre Verbindung zu den von Interferon (IFN) 1 und 2 beeinflussten Signalwegen⁶². IRF8 wurde im Jahr 1990 beschrieben und gleichzeitig konnte als erster funktioneller Hinweis seine Induzierbarkeit durch IFN- γ gezeigt werden¹². In den folgenden Jahren wurde die Bedeutung dieses Proteins für die Hämatopoese bzw. für das Immunsystem, aber auch in der Entstehung von neoplastischen hämatologischen Erkrankungen erkannt. Bevor auf diese Aspekte näher eingegangen wird (Abschnitte 1.2-1.4), soll hier kurz auf die Struktur und Funktionsweise von IRF8 eingegangen werden.

IRF8 ist beim Menschen ein 426 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 48,2 kDa^{12,74}. Es enthält die funktionell wichtigen DNA-Bindedomäne (DBD) und IRF-Assoziierungsdomäne (IAD)⁴⁴ (s. Abb. 1.1).



Abbildung 1.1: Struktur von IRF8. Dargestellt ist die Struktur des IRF8-Proteins. Die Nummer bezeichnen die jeweilige Aminosäure, beginnend ab dem N-Terminus. DBD = DNA-Bindedomäne, IAD = IRF-Assoziierungsdomäne. Modifiziert nach³¹.

Die DBD ist bei allen IRF-Mitgliedern konserviert und für die Bindung des Transkriptionsfaktors an DNA verantwortlich⁶². Die IAD hingegen ist zwischen den Faktoren IRF 3-9 konserviert und für die Komplexbildung mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. PU.1, E47 oder IRF1/2/4 zuständig²⁰. Diese

Interaktion ist für die Funktion von IRF8 von großer Bedeutung, da IRF8 nur in der Form eines Heterodimers, d.h. im Komplex mit einem anderen Molekül, an DNA binden kann²⁰. Es ist dabei vom Bindepartner abhängig, ob die entsprechenden Zielgene aktiviert oder supprimiert werden²⁰. Die Mutation von zwei Aminosäuren in der IAD von IRF8 (p.L331P + p.G351E) führt *in vitro* zu einer mangelnden Interaktion zwischen IRF8 und den synergistischen Transkriptionsfaktoren E47 und PU.1, was sich auch in einer stark herabgesetzten Transkriptionsaktivierung entsprechender Zielgene durch diese Heterokomplexe widerspiegelt³⁷. (Die hier benutzte Mutationsnomenklatur wird im Abschnitt 3.8 erklärt.)

1.2 Physiologische Rolle von IRF8

Die Expression von IRF8 ist fast ausschließlich auf Zellen des hämatopoetischen Systems beschränkt und IRF8 spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung dieser Zellen⁶². IRF8 wirkt generell hemmend auf die Proliferation myeloider Progenitorzellen und fördert ihre Differenzierung zu Makrophagen bzw. Monozyten (s. Abb. 1.2, Seite 9); gleichzeitig hemmt IRF8 die Ausreifung dieser Progenitorzellen zu Granulozyten⁶⁰. Zusätzlich übt IRF8 eine zentrale Wirkung bei der Differenzierung dendritischer Zellen myeloiden und lymphatischen Ursprungs aus^{52,59,64}.

Neben der Entwicklung myeloischer bzw. dendritischer Zellen ist auch die Lymphopoese, insbesondere die Entwicklung der B-Lymphozyten, ein Teil des Wirkungsspektrums von IRF8. Die physiologische Reifung der B-Zellen beginnt im Knochenmark und setzt sich peripher in den sekundären lymphatischen Organen fort⁴³. Dabei reguliert IRF8 die lymphatische Differenzierung durch ein komplexes Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren, die für die Entwicklung der B-Zellen von großer Bedeutung sind⁶⁸. Zu diesen gehören u.a. PU.1, E2A bzw. E47, Ikaros, EBF und PAX5⁶⁸.

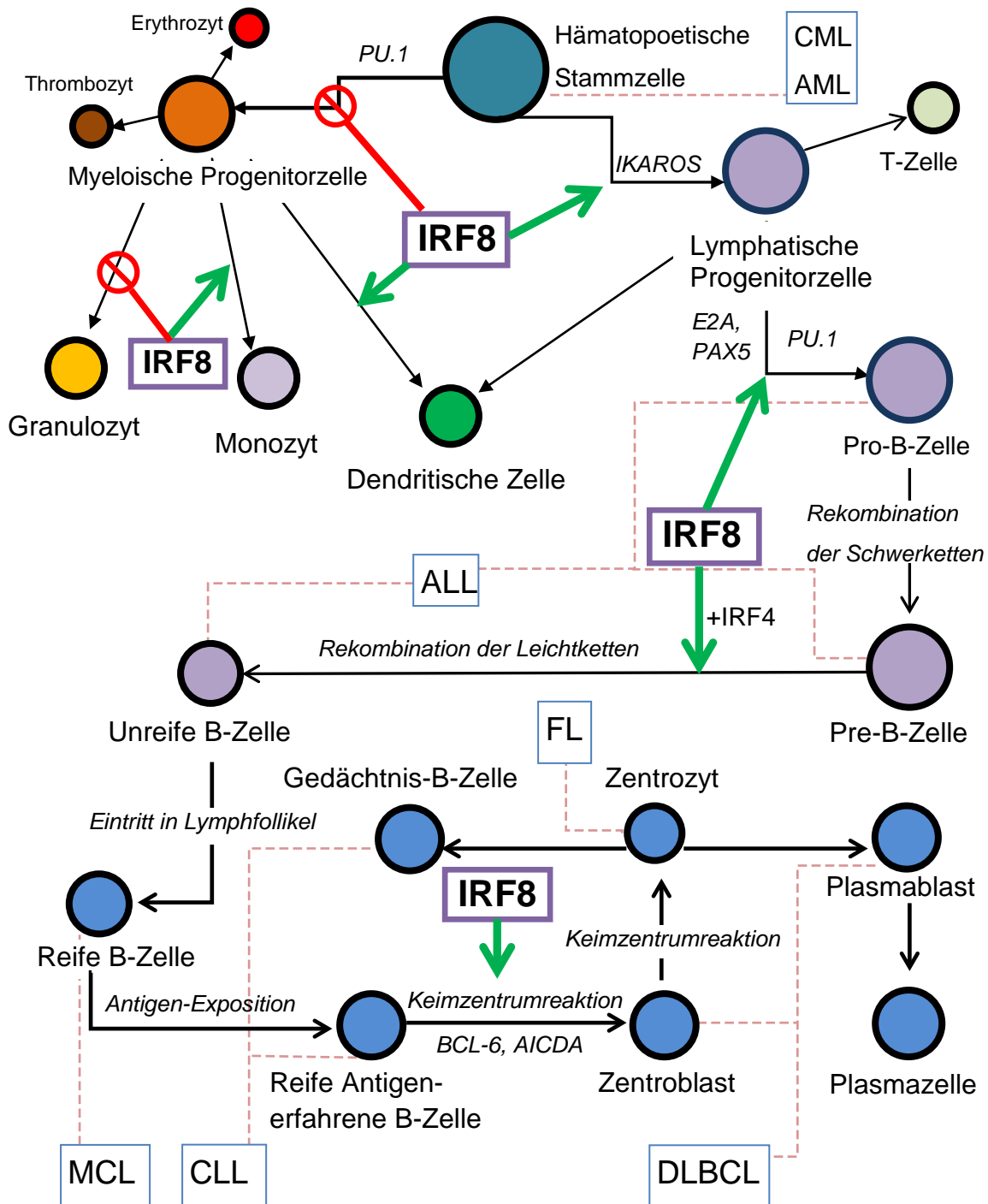


Abbildung 1.2: Regulatorische Rolle von IRF8 in der Hämatopoese. Dargestellt ist eine vereinfachte Übersicht über die Hämatopoese unter besonderer Berücksichtigung der Lymphopoese im Knochenmark und peripher. Aus Übersichtsgründen sind mehrere Zwischenschritte nicht abgebildet. Gezeigt sind auch durch gestrichelte rote Linien die mutmaßlichen Ausgangszellen relevanter Neoplasien. \otimes bezeichnet Hemmung, \rightarrow bezeichnet Stimulierung des jeweiligen Differenzierungsweges durch IRF8. Abbildung modifiziert nach^{30,43,68}, für andere relevante Referenzen s. Text. ALL =

akute lymphoblastische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CLL = chronische lymphozytische Leukämie, CML = chronische myeloische Leukämie, DLBCL = diffuses großzelluläres B-Zelllymphom, FL = follikuläres Lymphom, MCL = Mantelzelllymphom.

Abbildung 1.2 fasst die Differenzierungsfunktion von IRF8 bei der Hämatopoese zusammen und stellt die Ursprungszellen einiger hämatologischen Neoplasien dar, die für die vorliegende Arbeit relevant sind.

Die physiologische Reifung der lymphatischen Vorläufer im Knochenmark (über die Stadien der gemeinsamen lymphatische Vorläuferzelle, pro-B-Zelle und prä-B-Zelle, s. Abb. 1.2) ist abhängig von IRF8⁶⁷. *IRF8*-Knockout-Mäuse weisen eine stark reduzierte Anzahl lymphatischer Progenitorzellen auf⁶⁷. Außerdem findet man bei Mäusen mit einem Doppel-Knockout von IRF8 und IRF4 außerhalb vom Knochenmark keine reifen Lymphozyten, da ihre Entwicklung ab dem Stadium der prä-B-Zelle aufgrund einer Störung der Leichtkettenrekombination blockiert ist³⁴. Diese Differenzierungsblockade geht mit einer vermehrten Proliferation des pro-B-Zellpools einher³⁴. Auch die Keimzentrumreaktion der B-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen wird von IRF8 reguliert. Hier spielt vor allem die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie BCL6 und AICDA eine wichtige Rolle²⁹.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Transkriptionsfaktor IRF8 eine wichtige Rolle für die physiologische Funktion und die Differenzierung myeloider und lymphatischer Zellen spielt. Änderungen der IRF8-Funktion sind daher unmittelbar krankheitsrelevant. Dies soll in den folgenden Abschnitten kurz dargestellt werden.

1.3 Rolle eines IRF8-Funktionsverlustes bei Immundefekten

Passend zur skizzierten physiologischen Bedeutung von IRF8 in der Hämatopoese sind Erkenntnisse, die zeigen, dass eine Fehlfunktion des Proteins ursächlich für Immundefekte sein kann. An Mausmodellen konnte z.B.

gezeigt werden, dass die Ausschaltung von *IRF8* auf beiden Allelen (*IRF8*-„Knockout“) eine mangelhafte Immunantwort gegen Viren, Protozoen und Bakterien bzw. Mykobakterien verursacht^{22,50}.

In Analogie zu den Studien an Mäusen zeigen auch drei Patienten aufgrund von einzelnen angeborenen Keimbahnmutationen (p.K108E oder p.T80A) in der DNA-Bindedomäne von IRF8 eine ausgeprägte Anfälligkeit für mykobakterielle Infektionen¹⁷. Außer dieser Infektanfälligkeit ist die p.K108E-Mutation in der zitierten Studie auch mit einem myeloproliferativen Phänotyp und mit einer Abwesenheit von Monozyten im peripheren Blut assoziiert¹⁷, was wiederum im Einklang mit der physiologischen Funktion von IRF8 bei der Monozytenreifung steht (Abbildung 1.2).

Ferner haben genomweite Assoziationsstudien einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im *IRF8*-Locus und der Entstehung der Autoimmunerkrankungen systemischer Lupus erythematosus und der multiplen Sklerose gezeigt⁶.

1.4 Rolle von IRF8 bei hämatologischen Neoplasien

1.4.1 IRF8-Verlust bei der chronischen myeloischen Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine myeloproliferative Erkrankung, die von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle ausgeht³⁵ und durch die Translokation t(9;22)(q34;q11) ausgelöst wird¹³. Das Produkt der Translokation ist das 210 kD schwere BCR-ABL-Fusionsprotein (p210^{BCR-ABL}) – eine onkogene, kontinuierlich aktivierte Tyrosinkinase, die proliferative und apoptose-hemmende Signalwege aktiviert¹³.

Interessanterweise entwickeln die bereits erwähnten *IRF8*-Knockout-Mäuse neben einer Immunsuppression auch ein CML-ähnliches Krankheitsbild, das durch Hepatosplenomegalie und Myeloproliferation charakterisiert ist²². Ein Mausstamm namens BXH-2 zeigt einen sehr ähnlichen Phänotyp, der auf die homozygote *IRF8*-Mutation p.R294C zurückzuführen ist⁶⁵. Bei diesen Mäusen

entstand die Mutation wahrscheinlich durch Zufall während der Inzucht^{56,65}. Die Mutation p.R294C führt bei der BXH-2-Maus zu einem Funktionsverlust von IRF8, so dass die Bildung von Interleukin-12 und IFN- γ unter Stimulation mit LPS, was eine zentrale physiologische Funktion von IRF8 darstellt, ausfällt⁶⁵.

Abgesehen von den beschriebenen Mausmodellen mit Keimbahn-*IRF8*-Defekten gibt es noch weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Fehlfunktion von IRF8 und der Entwicklung der menschlichen CML. Maus- und *in vitro* Versuche zeigen, dass IRF8 die onkogene Wirkung von BCR-ABL antagonisiert^{1,19,61} und eine lang-andauernde, T-Zell-vermittelte, Immunität gegen BCR-ABL-transformierte Zellen hervorruft¹⁰. Weiterhin weisen die neoplastischen Zellen der meisten CML-Patienten eine sehr niedrige bzw. keine Expression von *IRF8* auf⁵³. Dieser Expressionsverlust ist wahrscheinlich auf die suppressive Wirkung von BCR-ABL über den Transkriptionsfaktor STAT5 auf die *IRF8*-Expression zurückzuführen⁶⁶. Zusammenfassend ist *IRF8* ein bereits gut etabliertes Tumorsuppressor-Gen bei der CML.

1.4.2 Rolle von IRF8 bei der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die wahrscheinlich von einer entarteten myeloiden Progenitor- bzw. pre-leukämischen hämatopoetischen Stammzelle ausgeht⁵⁵. Passend zu der schon erwähnten Tumorsuppressorfunktion von IRF8 in der malignen Myelopoese der CML weisen 66% der AML-Proben in einer Studie eine niedrige bzw. keine Expression dieses Transkriptionsfaktors auf⁵³. Eine *IRF8*-Promotormethylierung könnte in ca. 25% der Fälle der zugrundeliegende Mechanismus für diesen Expressionsverlust sein⁴⁷. Auf der anderen Seite ist eine Überexpression von *IRF8* bei AML-Proben monozytärer Differenzierung zu beobachten (AML M4/M5 nach der FAB-Klassifikation)^{48,53}, was pathophysiologisch ebenfalls mit der Bedeutung von IRF8 bei der Monozyten-/Makrophagendifferenzierung vereinbar ist (s. Abschnitt 1.2). Ferner kooperiert ein *IRF8*-Verlust mit dem anerkannten AML-Onkogen *AML1-ETO* bei der Stammzelltransformation *in vivo*⁵⁴. Bedeutend für die vorliegende Arbeit ist die

Beobachtung, dass auf DNA-Ebene die DBD- und IAD-kodierenden Exone von *IRF8* in den leukämischen Zellen von insgesamt 34 AML-Patienten keine somatischen Mutationen aufwiesen^{47,48}.

1.4.3 Rolle von IRF8 bei der akuten lymphoblastischen Leukämie

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter und geht meistens von einer unreifen B-Zelle (B-ALL) aus^{49,63}. Bei Erwachsenen ist die ALL seltener, jedoch mit einer deutlich schlechteren Prognose vergesellschaftet⁴⁹. Bei der B-ALL können immunophänotypisch verschiedene Subtypen in Abhängigkeit von der Reife der entarteten B-Zelle abgegrenzt werden – pro-B-, common-B-, prä-B- und reife B-ALL³³.

Die bereits beschriebene Translokation t(9;22)(q34;q11) in der CML mit dem resultierenden BCR-ABL Onkogen wird bei 2-5% der Kinder-ALL- und 20-40% der Erwachsenen-ALL-Fälle beobachtet¹⁴. Andere genetische Veränderungen bei der ALL betreffen unter anderem Proteine, die bei der Differenzierung der B-Zellen eine Rolle spielen. Dazu zählen die schon erwähnten Transkriptionsfaktoren IKAROS, PAX5 und EBF^{40,41}, die mit IRF8 bei der B-Zell-Entwicklung kooperieren (s. Abschnitt 1.2).

Diese Erkenntnisse und der Antagonismus zwischen IRF8 und BCR-ABL (s. Abschnitt 1.4.1) lassen die Vermutung zu, dass *IRF8*-Veränderungen (z.B. Punktmutationen des kodierenden Abschnittes) auch an der ALL-Entstehung mitbeteiligt sein können. Interessanterweise fanden sich in einer Untersuchung von 187 ALL-Proben von pädiatrischen Patienten zwei *IRF8*-Mutationen in der Assoziierungsdomäne (p.E261K und p.G308S)⁷². Diese Untersuchung beschränkte sich jedoch auf Kinder mit einem erhöhten Risiko, auf die durchzuführende Therapie nicht adäquat anzusprechen (high-risk ALL) und schließt mehrere Patientengruppen, darunter auch Kinder mit BCR-ABL-positiver ALL, nicht mit ein.

Bei Erwachsenen ist im Vergleich zu pädiatrischen Patienten der genetische Hintergrund der ALL weniger extensiv untersucht^{23,42}. Für diese

Patientenpopulation finden sich auch keine Daten über *IRF8*-Mutationen, die jedoch eine Rolle bei der Erkrankungsentstehung spielen bzw. eine prognostische Relevanz haben könnten. Daher erscheint die gezielte Suche nach *IRF8*-Mutationen bei der Erwachsenen-ALL sinnvoll.

1.4.4 *IRF8*-Mutationen bei Lymphomerkrankungen

Die malignen Lymphome stellen eine nach klinischen und pathologischen Aspekten heterogene Erkrankungsgruppe dar, deren Inzidenz seit Mitte des 20. Jahrhunderts zunimmt³⁹. Die beiden häufigsten Non-Hodgkin Lymphome (NHLs), das diffuse großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) und das follikuläre Lymphom (FL), gehen von entarteten reifen B-Zellen aus, die sich entweder in der Keimzentrumreaktion befinden oder diese schon durchlaufen haben³⁰. Andererseits führt die Entartung einer reifen, aber Antigen-naiven B-Zelle (d.h. vor der Keimzentrumreaktion) zur Entstehung des Mantelzelllymphoms³⁰, (s. Abb. 1.2). Auf der Suche nach Genmutationen, die zur Krankheitsentstehung beitragen, wurden bei den NHLs Sequenzierungsstudien des ganzen Genoms bzw. Exoms durchgeführt. Hier zeigten sich unter anderem auch Mutationen im *IRF8*-Gen bei den Entitäten DLBCL und FL^{31,38,73}. Es wurden in diesen drei Studien 16 *IRF8*-Mutationen in insgesamt 317 untersuchten Lymphomproben gefunden, die zu einem Aminosäurenwechsel (missense-Mutationen) oder zu einer Verschiebung des RNA-Leserasters (frameshift-Mutationen) führen. Dabei sind Mutationen in 3,7% der DLBCL- und in 7,8% der FL-Proben zu finden (Zusammenfassung der Ergebnisse von^{31,38,73}). Die gefundenen Mutationen wurden funktionell nicht untersucht, es wird beim FL jedoch eine funktionshemmende Wirkung dieser Mutationen beim mutmaßlichen Tumor-Suppressor IRF8 vermutet³¹.

Eine Zusammenfassung der bisher publizierten Mutationen innerhalb des kodierenden Teils des *IRF8*-Gens (=mRNA) in Lymphomen und anderen Erkrankungen findet sich in Abb. 1.3. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Mehrzahl dieser Veränderungen im Rahmen von genomweiten

Sequenzierungsstudien entdeckt und bezüglich ihrer pathogenetischen Rolle bei der Krankheitsentstehung nicht weiter untersucht wurden.

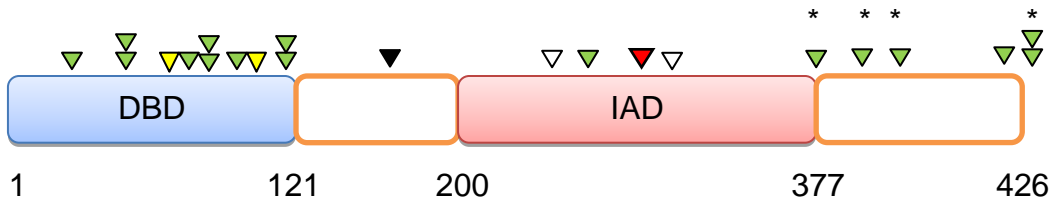


Abbildung 1.3: Beschriebene IRF8-Mutationen. Dargestellt ist die Struktur des IRF8-Proteins. Die Nummer bezeichnen die jeweilige Aminosäure, Grünes Dreieck = Mutationen in Lymphomen^{31,38,73}. Gelbes Dreieck = Mutationen bei Patienten mit Anfälligkeit für mykobakterielle Infektionen¹⁷. Rotes Dreieck = Mutation bei der BXH-2 Maus⁶⁵, schwarzes Dreieck = Mutation beim multiplen Myelom³, weißes Dreieck = Mutationen bei pädiatrischer ALL⁷². *bezeichnet Mutationen, die zu einer Leserasterverschiebung oder zu einem vorzeitigen Stopp-Kodon führen. Grundabbildung modifiziert nach³¹. DBD = DNA-Bindedomäne, IAD = IRF-Assoziierungs-domäne.

1.4.5 Rolle von IRF8 bei der chronischen lymphozytischen Leukämie

Die chronische lymphozytische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämieform des Erwachsenenalters¹⁵. In den meisten Fällen geht die Erkrankung wahrscheinlich von einer reifen, aktivierten B-Zelle bzw. von einer Gedächtnis-B-Zelle aus^{5,30}, s. auch Abb. 1.2. Bei der CLL ist, noch ausgeprägter als bei anderen hämatologischen Neoplasien, eine bedeutende genetische Komponente zu erkennen, d.h. hier spielt die erbliche Veranlagung eine große Rolle, so dass Familienangehörige betroffener Patienten häufiger an lymphoproliferativen Erkrankungen, inklusive der CLL, leiden¹⁵. Genomweite Assoziierungsstudien zeigten identifizierten unter anderem Polymorphismen im *IRF8*-Genlocus als mögliche Mitverursacher einer Veranlagung zur CLL-Entstehung^{8,57}.

Die CLL weist verschiedene molekulargenetische Veränderungen auf, darunter auch die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 in 95% der Fälle¹⁸. Die Variabilität dieser Überexpression lässt sich alleine durch die beobachtete Hypomethylierung des kodierenden Gens nicht erklären¹⁸. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass IRF8 die *BCL*-

2-Expression hemmt¹, so dass auch aus diesem Grund eine mögliche Bedeutung von *IRF8*-Veränderungen bei der CLL-Entstehung denkbar wäre.

Die Sequenzierung des ganzen Transkriptoms (=alle mRNAs) bzw. des Genoms bei 91 Patienten mit CLL zur Aufdeckung unbekannter mutierten Genen konnte keine *IRF8*-Mutationen identifizieren⁶⁹. Das Auftreten von *IRF8*-Mutationen bei einem großen Anteil der CLL-Proben scheint daher unwahrscheinlich; trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein in einem kleineren Anteil der Erkrankungen mutiert ist. So konnten z.B. in der zitierten Studie *IRF4*-Mutationen bei CLL-Patienten nicht aufgedeckt werden, hingegen schon durch die gezielte Sequenzierung des Gens (bei 1,5% der Patienten)²¹.

Bei 94 CLL-Patienten wurde die Keimbahn-Sequenzierung der *IRF8*-Exone in nicht-leukämischen Zellen zur Suche nach Polymorphismen mit entsprechenden Risikoassoziationen für die Entwicklung einer CLL durchgeführt⁵⁸. Dagegen gibt es in der Literatur bisher keine Beschreibung einer gezielten Sequenzierung des Gens bzw. des Transkripts von *IRF8* bei malignen CLL-Zellen, im Sinne von einer Suche nach somatischen, d.h. vom Malignom erworbenen Mutationen. Im Gegensatz zu vielen AML-Proben und zur CML wird *IRF8* in CLL-Zellen normal bzw. stark überexprimiert^{36,53}. Dies legt die Möglichkeit einer pathophysiologischen Rolle von *IRF8*-Mutationen bei einem kleinen Anteil der CLL-Fälle nahe.

Tabelle 1.1 auf Seite 17 fasst die bisherigen Kenntnisse zur Expression von *IRF8* in einigen wichtigen hämatologischen Neoplasien zusammen und stellt auch die mutmaßliche pathogenetische Bedeutung von *IRF8*-Funktionsveränderungen in diesen Erkrankungen dar.

Tabelle 1.1: Expression und Rolle von *IRF8* bei einigen hämatologischen Neoplasien.

Erkrankung	Expression	Bekannte/mögliche Bedeutung von <i>IRF8</i> -Mutationen
CML	-	IRF8 antagonisiert BCR-ABL. <i>IRF8</i> ist etabliertes Tumorsuppressor-Gen bei der CML
AML	- / (+)*	Keine Mutationen nach Suche gefunden.
ALL	(+)**	Häufig Mutationen anderer B-Zell-Differenzierungsfaktoren. BCR-ABL, das von IRF8 gehemmt wird, spielt bei einem Teil der Erkrankungen eine Rolle. Zwei Mutationen bei pädiatrischen Patienten berichtet. Keine Untersuchung auf <i>IRF8</i> -Mutationen bei Erwachsenen.
NHLs	variabel ³⁶	Mutationen bei DLBCL und FL beschrieben.
CLL	++	Assoziiert mit <i>IRF8</i> – Polymorphismen. IRF8 hemmt BCL-2, was bei der CLL in den meisten Fällen supprimiert ist. Keine Sequenzierung von <i>IRF8</i> aus CLL-Zellen.

*monozytär differenzierte AML-Proben weisen ggf. eine höhere *IRF8*-Expression auf⁴⁸.
**4 von 11 common-ALL Patientenproben zeigten in einer Untersuchung eine niedrige *IRF8* Expression⁵³. Minus-Zeichen = wird nicht/kaum exprimiert, Plus-Zeichen = wird exprimiert, Doppelpiuszeichen = wird stark exprimiert. Für eine Abkürzungserläuterung s. Text bzw. das Abkürzungsverzeichnis.

1.5 Bedeutung von Genmutationen in der Onkologie

In der onkologischen Wissenschaft und Praxis spielen genetische Mutationen heutzutage eine zunehmende Rolle. Die Aufdeckung solcher Veränderungen in Tumorzellen hat einerseits zum Verständnis der Pathogenese vieler onkologischer Erkrankungen beigetragen, kann andererseits aber auch von direkter klinischer Relevanz sein, z.B. bei Therapieentscheidungen oder bei der Prognosevorhersage. Anhand einiger Beispiele wird dies hier erläutert, um den Hintergrund der Suche nach *IRF8*-Mutationen besser verständlich zu machen.

So wurde zum Beispiel im Jahr 2002 durch die Sequenzierung des kodierenden Teils vom *BRAF*-Gen bei verschiedenen Tumoren gezeigt, dass die Kinase BRAF in mehr als der Hälfte der malignen Melanome beim Menschen durch eine missense-Mutation (p.V599E) eine onkogene Wirkung erlangt⁹. Dadurch wurde die Wichtigkeit des Ras-Signalweges unterhalb der BRAF-Signaltransduktion bei der Melanomentstehung deutlich. In den nächsten Jahren wurde gezeigt, dass ein BRAF-Inhibitor - Vemurafenib - das Wachstum von Melanomzellen mit mutiertem, nicht aber von solchen mit Wildtyp-*BRAF* hemmt⁷¹. Schließlich wurde im Jahr 2011 in einer klinischen Studie deutlich, dass Vemurafenib bei Patienten mit metastasiertem Melanom und mutiertem *BRAF* der Standardchemotherapie überlegen ist⁴.

Neben den BRAF-Mutationen beim malignen Melanom existieren zahlreiche andere Beispiele aus der Klinik, in denen die Aufdeckung von Mutationen ein tieferes Verständnis onkologischer Erkrankungen und eine bessere Patientenversorgung ermöglicht. Als Beispiele dafür sind die Neoplasien CLL und AML zu nennen. Bei der CLL sind missense-Mutationen von *TP53*, einem wichtigen Tumorsuppressor-Gen, mit einem schlechteren Therapieansprechen und mit einer schlechteren Prognose assoziiert⁷, während frameshift-Mutationen in *NPM1* bei der AML mit einer günstigeren Prognose einhergehen¹¹.

Unter Berücksichtigung dieser potentiell großen Bedeutung von neu gefundenen Mutationen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob *IRF8*-Mutationen auch in anderen als in den bereits bekannten hämatologischen Neoplasien zu finden sind.

1.6 Zusammenfassung und Fragestellung

IRF8 reguliert die Hämatopoese. Veränderungen der physiologischen IRF8-Funktion sind mit Leukämien assoziiert. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit sind einige Punkte wichtig: (1) *IRF8* ist ein bereits etabliertes Tumorsuppressor-Gen bei der CML und möglicherweise bei der AML. (2) Die gezielte *IRF8*-Sequenzierung zeigte keine Mutationen bei der AML. (3) Genomweite Sequenzierungsstudien demonstrierten *IRF8*-Mutationen beim FL und DLBCL. Daher erscheint eine Suche nach *IRF8*-Mutationen bei diesen Entitäten (AML, CML, FL, DLBCL) nicht sinnvoll. Im Unterschied dazu gibt es keine Daten über *IRF8*-Mutationen bei der Erwachsenen ALL und bei der CLL. Aufgrund der biologischen Funktion von IRF8 und einigen klinischen Beobachtungen wären bei diesen Entitäten *IRF8*-Mutationen jedoch denkbar.

Daher setzt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage auseinander, ob der hämatopoetische Transkriptionsfaktor IRF8 in hämatologischen Neoplasien, insbesondere in der Erwachsenen ALL und in der CLL, mutiert ist. Zusätzlich wurde untersucht, ob vorhandene Mutationen mit einer Änderung der Expression von *IRF8* einhergehen.

2. Material

2.1 Analyisierte Proben

Tabelle 2.1 stellt die Patientenproben dar, die nach *IRF8*-Mutationen untersucht wurden.

Tabelle 2.1: Analyisierte Patientenproben.

Entität	Anzahl	
B-ALL*	pro-B-ALL	15
	prä-B-ALL	10
	common-ALL	42
Chronische lymphozytische Leukämie	52	
Myeloproliferatives Syndrom	4	
Akute myeloische Leukämie	4	
Chronische myelomonozytäre Leukämie	2	
Mantelzelllymphom	2	
T-ALL	1	
Folikuläres Lymphom	1	
Diffuses großzelluläres B-Zelllymphom	1	
Haarzelleukämie	1	
Chronische myeloische Leukämie	1	

*von den ALL-Proben exprimieren insgesamt 15 das BCR-ABL-Onkoprotein, alle 15 gehören der common-ALL Variante.

ALL = akute lymphoblastische Leukämie

Es wurden 52 CLL- und 67 ALL- cDNA- bzw. RNA-Erstdiagnoseproben analysiert. Die CLL-Proben wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Stilgenbauer aus der CLL-Studienzentrale der Universitätsklinik in Ulm, die meisten ALL-Proben von PD Dr. Burmeister aus der ALL-GMALL-Studienzentrale der Universitätsklinik in Berlin zur Verfügung gestellt. 15 anonymisierte cDNA-Proben diverser hämatologischer Neoplasien stammen aus der hämatologischen Probensammlung des Uniklinikums Marburg. Zwei Vollblutproben (1x Mantelzelllymphom, 1x Haarzelleukämie) wurden im

Rahmen von diagnostischen Venenpunktionen entnommen und für diese liegt eine Einwilligung zur Verwendung des Blutes für wissenschaftliche Zwecke vor.

Zusammen mit Christian Michel wurden zusätzlich zu den beschriebenen Patientenproben die *IRF8*-Transkripte bei neun humanen Zelllinien sequenziert (Tab. 2.2).

Tabelle 2.2: Analyierte Zelllinien.

Zelllinie	Erkrankung
U-2932	Diffuses großzelluläres B-Zelllymphom
SU-DHL-4	Diffuses großzelluläres B-Zelllymphom
SU-DHL-6	Diffuses großzelluläres B-Zelllymphom
EHEB	Chronische lymphozytische Leukämie
L1236	Morbus Hodgkin
82261	Multiples Myelom
Kapas p12*	Follikuläres Lymphom
SS12/U1*	B-Zell Lymphom
U937	Histiozytäres Lymphom

*Zellliniename in dieser Form übernommen, Zelllinie konnte jedoch in Katalogen im Internet nicht verifiziert werden.

Im Folgenden werden in tabellarischer Form die benutzten Labormaterialien mit entsprechender Herstellerfirma aufgelistet.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Falcon PP 50 ml	Cellstar
Handschuhe	VWR
Pipette Serological 25 ml	Sarstedt
Pipette Transfer 3.5 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen (10-1000 µl)	Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Biozym
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt
Skalpell	Braun
qPCR-Platte 96-Well	Sarstedt

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	Roth
DNA-Farbstoff SYBR Green	Qiagen
DNA-Polymerase GoTaq	Promega
dNTPs für PCR	Invitrogen
Ethanol 70%	Fischar
Ficoll-Paque Plus	GE-Healthcare
Lysepuffer	Sarstedt
PBS	Gibco
Primer für PCR	Eurofins MWG Operon
Primer für qPCR	Thermo Scientific
RLT-Puffer	Qiagen, Machery-Nagel
RNase-freies H ₂ O	Roth
RNase-Inhibitor	Promega
Puffer 5x für PCR	Promega

2.4 Kit-Systeme

Nucleospin®-Gel&PCR-Clean Up	Macherey-Nagel
Nucleospin®-RNA-Kit	Macherey-Nagel
Omniscrypt® Reverse Transcription Kit	Qiagen

2.5 Laborgeräte

Eiswürfelbereiter (2x)	Manitowoc, Ziegra
Erlenmeyerkolben	Merck
Gelkammer	Peqlab, Life Technologies
Mikrowelle	Sharp
PCR-Cycler	Eppendorf
Pipetten	Gilson Pipetman
Pipettierhelfer Accujet-Pro	Brand
qPCR-Cycler	Eppendorf
Spannungsgerät Elektrophorese	Th. Karow GmbH Berlin
Spektrophotometer	Peqlab Nanodrop 1000
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer Comfort
Tischwaage	Kern
UV-Kamera	Peqlab
UV-Tisch UVT 2035	Herolab
Wasserbad	Unitherm
Zentrifuge für Ficoll	Eppendorf Centrifuge 5810
Zentrifuge für qPCR	Eppendorf Centrifuge 5804
Zentrifuge für RNA-Isolierung und cDNA-Isolierung vom Gel	Eppendorf Centrifuge 5417

2.6 PCR-Primer

Die Sequenzen der Primer für die Sequenzierung der *IRF8*-cDNA sind:

Bezeichnung	Sequenz
Primer 1 forward	5'-GCAGCAAGCGTGGGAAC-3'
Primer 1 reverse	5'-CCAGTCTGGAAGGAGCTGAC-3'
Primer 2 forward	5'-GCTGATCAAGGAGCCTTCTG-3'
Primer 2 reverse	5'-GACCTGGACCACCTCATCAC-3'
Primer 3 forward a*	5'-GTGTTTCGTCAAGCGGCTGT-3'
Primer 3 reverse a*	5'-CCAGACAGAGGGATCCACAT-3'
Primer 3 reverse b*	5'-CGCACTTAGACGGTGATCTG-3'
Primer 3 forward c*	5'-CTGTTTCGGGCACCTGGAG-3'
Primer 3 reverse c*	5'-CAGGGAGATGGATGCAGGAC-3'

*für eine Erklärung, warum mit verschiedenen Primer 3 – Sequenzen gearbeitet wurde s. Abschnitt 3.4 PCR.

Die Sequenzen der Primer für die quantitative PCR (qPCR) sind:

Primer	Sequenz
IRF8 forward	5'-GTCCCAACTGGACATTTCCG-3'
IRF8 reverse	5'-CATTACGCAGCCAGCAG-3'
GAPDH forward	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'
GAPDH reverse	5'-CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT-3'

3. Methoden

Abbildung 3.1 zeigt eine Übersicht über den angewandten Prozess der Sequenzierung der *IRF8*-cDNA bei den untersuchten hämatologischen Neoplasien. Kurz zusammengefasst – falls Vollblut vorlag, wurden die mononukleären Zellen isoliert (sie stellen üblicherweise zum allergrößten Teil maligne Zellen dar). Schließlich wurde die gesamte Zell-RNA isoliert und hieraus die entsprechende cDNA synthetisiert. In den meisten Fällen (in 134 von 136 Patientenproben und für alle Zelllinien außer U937) stand RNA oder cDNA direkt zur Verfügung. Der kodierende Teil der *IRF8*-cDNA wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit drei Primerpaaren multipliziert. Jedes Produkt (also drei Produkte pro Sequenzierungsprobe) wurde durch Gelelektrophorese dargestellt und isoliert. Nach entsprechender Vorbereitung wurden die Proben auswärtig nach der Sanger-Methode sequenziert. Danach wurde die erhaltene Sequenz mit der Original *IRF8*-Sequenz verglichen und damit wurden ggf. vorhandene Mutationen erfasst.

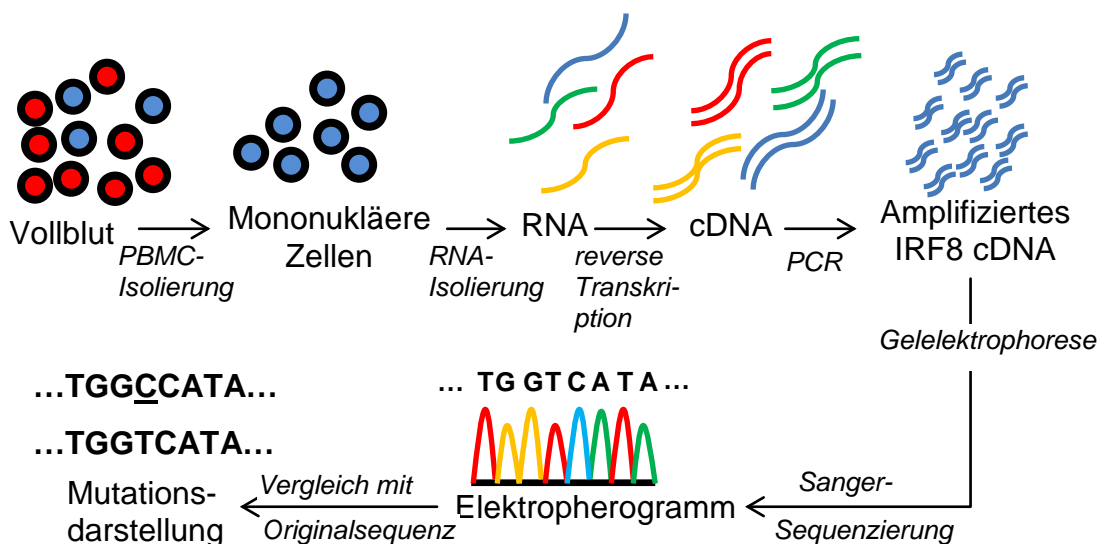


Abbildung 3.1: Vereinfachte Darstellung der Mutationssuchmethodik. Dargestellt ist eine Übersicht der zur Mutationsfindung angewandten Methoden bzw. Verfahren. PBMC = Periphere mononukleäre Zellen, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

Im Folgenden werden die einzelnen Methoden näher erläutert.

3.1 Isolierung der mononukläeren Zellen

Bei zwei Vollblutproben wurden die mononukläeren Zellen mit Hilfe der Reagenz Ficoll von den anderen zellulären Blutbestandteilen getrennt. Das Blut (8-15 ml in 1-2 EDTA- oder Heparin-Röhrchen) wurde mit 15 ml PBS-Puffer vermischt. Anschließend wurden vorsichtig 15 ml Ficoll-Lösung zugegeben. Nach einer 20-minutigen Zentrifugation bei 800 rcf/g ohne Bremsung wurde der Ring zwischen den zwei gebildeten Phasen, der die mononukläeren Zellen enthält, entnommen und mit 30-40 ml PBS-Puffer vermischt. Schließlich wurde fünf Minuten bei 300 rcf/g zentrifugiert. Falls eine rötliche Färbung vorhanden war (was eine Kontamination mit Erythrozyten anzeigt) wurde das am Boden haftende Zell-Pellet mit 3 ml Lysepuffer für drei Minuten behandelt und nach PBS-Zugabe wieder für 5 Minuten bei 300 rcf/g zentrifugiert. Nach Entfernung des flüssigen Anteils wurde das Pellet mit 350 µl RLT-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt und entweder bei -80°C eingefroren oder gleich weiter verarbeitet (s. Abschnitt.3.2).

3.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der gesamten zellulären RNA erfolgte mittels des Nucleospin®-RNA-Kits nach dem vorhandenen Protokoll. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit beträgt bei allen Schritten 11 000 rcf (g). Durch Filtration und Zentrifugation für 1 min wurde die Viskosität der in RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol gelösten Zellen verringert, dann wurde nach Zugabe von 350 µl 70%igem Ethanol und Zentrifugation für 30 s die RNA an die im Kit enthaltene Säule gebunden. Vorhandene Salze wurden durch Zugabe von 350 µl MBD-Puffer und Zentrifugation für 1 min entfernt. 10 µl rDNase wurden mit 90 µl Puffer für rDNase vermischt und davon 95 µl pro Probe für die Degradierung zellulärer DNA benutzt. Nach dem Waschen mit 200 µl Puffer RAW2 wurde die an der Säule gebundene DNA zweimalig mit 600- bzw. 250 µl RA3 Puffer gewaschen. Schließlich erfolgte die Eluierung der RNA mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser. Die Konzentration der isolierten RNA wurde spektrophotometisch mit dem Nanodrop-Gerät bestimmt.

3.3 Reverse Transkription

Um die entsprechende cDNA (c steht complementary) aus RNA zu synthetisieren, wurde nach der Konzentrationsbestimmung die Flüssigkeitsmenge, die 1 µg RNA enthält, entnommen und mit Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Diese 12 µl wurden mit einem Gemisch aus je 2 µl 10xRT-Puffer, 2 µl dNTPs (5 mM), 2 µl Hexamer-Primer (10 µM), 1 µl RNase-Inhibitor (10 U/µl) und 1 µl Omniscript-Reverse Transkriptase versetzt. Die entstandenen 20 µl Lösung für jede Probe wurden für eine Stunde im 37°C Wasserbad inkubiert - in dieser Zeit fand die reverse Transkription statt. Schließlich erfolgte im Thermomixer bei 95°C für 5 min die Inaktivierung der Enzyme für die reverse Transkription. Die cDNA wurde dann bei -20°C gelagert.

3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Durch die bereits beschriebenen Schritte wurde die *IRF8*-cDNA (doppelsträngig) aus der *IRF8*-mRNA (einzelnsträngig) synthetisiert, so dass jetzt eine Amplifikation dieser mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) möglich ist. Mit dieser Methode kann man einen definierten genomischen Abschnitt in mehreren Zyklen exponentiell vervielfachen, was dann weitere Analysen/Verarbeitungen ermöglicht. In jedem Zyklus werden zuerst bei hoher Temperatur die beiden Stränge der DNA voneinander getrennt (Denaturierung). Dann können nach Temperaturerniedrigung spezifisch ausgewählte synthetische Primer an die einzelsträngige DNA binden (Hybridisierung). Die Auswahl dieser Primer bestimmt, welche Sequenz amplifiziert wird. Schließlich erfolgt die DNA-Synthese (Elongation) mittels der hitzestabilen Taq-Polymerase, die an den Komplex zwischen Primer und DNA bindet. Nach der Beendigung mehrerer solcher Zyklen (Termination) ist die gewünschte Sequenz um das Vielfache amplifiziert (Beschreibung modifiziert nach⁵¹).

Zur Mutationssuche bei *IRF8* wurde die PCR-Reaktion mit drei Primerpaaren durchgeführt, deren Sequenzen in Abschnitt 2.6 und deren Bindestellen in der *IRF8* – cDNA in Abb. 3.2 (Seite 27) veranschaulicht sind. Es wurde mit drei Primerpaaren amplifiziert (d.h. 3x PCR pro Sequenzierung von *IRF8* in einer

Probe), da mit einem bzw. zwei Primerpaaren keine ausreichende Qualität des Sequenzierungsergebnisses des gesamten kodierenden Teils von *IRF8* (1281 Basenpaare) erreicht werden konnte. Die ursprünglichen Primerpaare wurden freundlicherweise von Christian Michel zur Verfügung gestellt. Aus technischen Gründen (wiederholtes Amplifizierungsversagen im Verlauf der Versuchsdurchführung) musste das Primerpaar 3 zwei Mal modifiziert werden (s. Abb. 3.2). Zunächst wurde im Internetportal Pubmed⁷⁵ eine andere Primer 3 reverse-Sequenz erstellt (Primer 3 reverse b, blau in Abb. 3.2), die teilweise an den kodierenden Teil der cDNA bindet (letzte 16 Basenpaare, 1,3% der Sequenz).

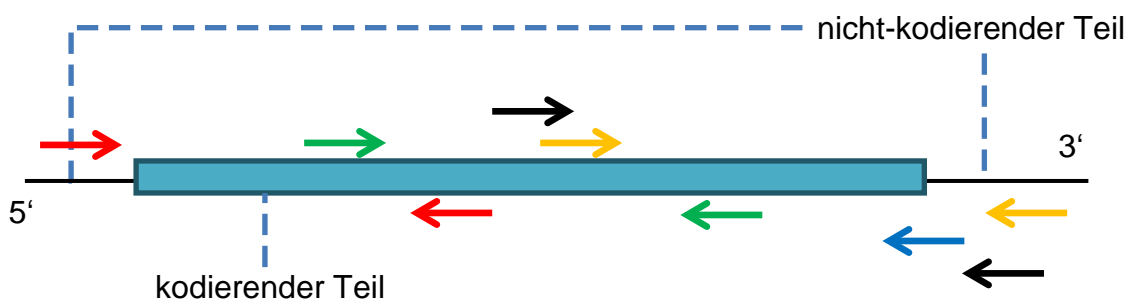


Abbildung 3.2: *IRF8*-cDNA und Primerbindestellen. Dargestellt ist die mRNA bzw. cDNA von *IRF8* mit kodierenden (=translatierten) und nicht-kodierenden (=nicht translatierten) Bereichen, wobei das Verhältnis zwischen beiden aus Übersichtsgründen nicht den wahren Proportionen entspricht. Primerpaar 1 ist rot, 2 grün und das ursprüngliche Primerpaar 3a gelb dargestellt. Blau stellt den Primer 3 reverse b und schwarz das Primerpaar 3c dar.

Dadurch konnte die Qualität der PCR-Reaktion erheblich verbessert werden, es musste jedoch der Verlust der 1,3% des sicher sequenzierten Teils von *IRF8* in Kauf genommen werden, da die letzten 16 bp des Sequenzierungsergebnisses nun die Primer 3 rev b- und nicht die Originalsequenz darstellen. Aus diesem Grund sind bei den hier sequenzierten Entitäten (mit Ausnahme der CLL-Proben und der Zelllinien) eventuelle Mutationen um das 3'-Ende der *IRF8*-Sequenz (wie z.B. die vom folliculären Lymphom bekannte Mutation p.X427K) ggf. nicht erfasst worden. Im Laufe der Arbeit wurde daher für die CLL-Proben

ein komplett neues Primer 3 - Paar erstellt (Primer 3c, schwarz in Abb. 3.2), was schließlich die lückenfreie Sequenzierung ermöglichte. Tabelle 3.1 stellt zur Übersicht die Proben dar, die mit dem entsprechendem Primerpaar 3 amplifiziert und sequenziert wurden. Die Primerpaare 1 und 2 wurden konsequent eingesetzt und nicht verändert.

Tabelle 3.1: Primer 3–Varianten mit Entitätenzuordnung.

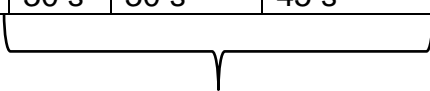
Primer 3 - Variante	Entitäten/Probenart
Primer 3 forward und reverse a	Zelllinien (s. Tab. 2.2)
Primer 3 forward a und Primer 3 reverse b*	ALL-Proben, restliche Neoplasien außer CLL (s. Tab. 2.1)
Primer 3 forward und reverse c	CLL-Proben

Für Erläuterung und Abkürzungserklärung s.Text.

*letzte 1,3% des Sequenzierungsergebnisses bei diesen Proben unzuverlässig.

Im Folgenden sind schematisch die einzelnen PCR-Schritte von jedem Zyklus dargestellt:

Schritt	Denaturierung		Hybridisierung	Elongation		Termination
Temperatur	95°C	95°C	61°C	72°C	72°C	4°C
Dauer	4 min	30 s	30 s	45 s	7 min	Bis Abnahme



35-42x

Pro PCR-Reaktion wurden 15,75 µl RNase-freies oder destilliertes Wasser, 5 µl 5x-Puffer, je 1,25 µl Primer forward/reverse, 0,5 µl dNTPs (10 mM) und 0,25 µl GoTaq-Polymerase mit 1 µl cDNA versetzt (insgesamt 25 µl). Für jeden PCR-Lauf wurde eine Kontrolle mit 1 µl H₂O statt cDNA eingesetzt, um eine Kontamination auszuschließen. Gelegentlich fand sich in der Wasserkontrolle eine schwache IRF8-Bande. Die Sequenzierungsergebnisse wurden trotzdem als gültig betrachtet, da eine Analyse bzw. ein Vergleich der Chromatogramme diesbezüglich ein fehlerhaftes Ergebnis aufgrund der Kontamination ausschloss. In den meisten Fällen wurden für jede Probe zwei PCR-Reaktionen mit jedem Primerpaar durchgeführt, um eine größere Menge an amplifizierter

IRF8-cDNA zu gewinnen und damit auch die Sequenzierungsqualität zu verbessern.

3.5 Gelelektrophorese

Pro Gel wurden 100 ml TAE-Puffer (1x) mit 2 g Agarose vermischt, ca. 3 min in der Mikrowelle gekocht und nach Abkühlung mit 2-3 μ l Ethidiumbromid versetzt. Schließlich wurde das Gel für ca. 45 min bei Raumtemperatur bis zur Verhärtung inkubiert. Die Inhalte von meistens je zwei PCR-Tubes pro Probe und Primerpaar (insgesamt 50 μ l) wurden dann in die einzelnen Gelkammlöcher pipettiert. Ein 123 bp Marker („Leiter“) wurde als Fragmentgrößenbezug angewandt. Nach einer entsprechenden Laufzeit (ca.30 min) wurde jedes Gel bei UV-Licht fotografiert. Ein repräsentatives Beispiel der Gelelektrophorese ist in Abb. 3.3 dargestellt.

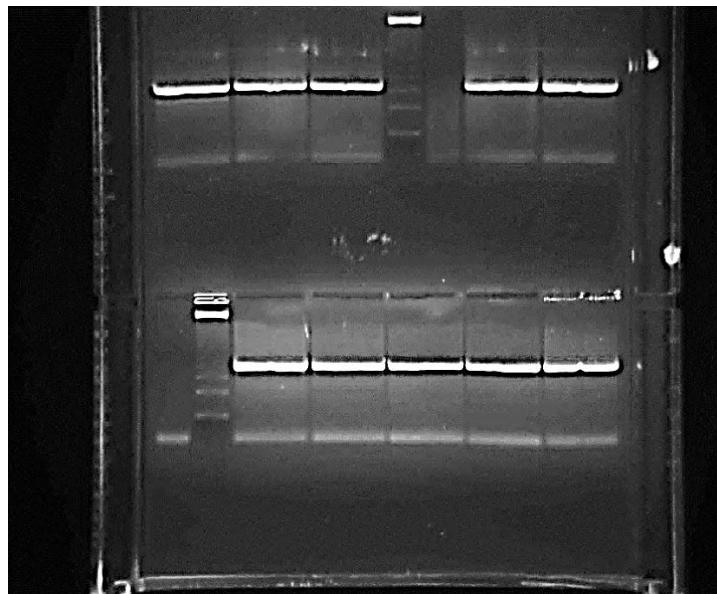


Abbildung 3.3: Gelelektrophoretische Darstellung der *IRF8*-cDNA. Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten *IRF8*-cDNA von je fünf akute lymphoblastische Leukämie (ALL)-Proben mit Primer 2 und Primer 3 (s. Abschnitt. 3.4). Auf dem Bild sind auch die negativen Wasser-Kontrollen (oben 3. von rechts, unten 1. von links) und die 123 bp-Marker (oben 4. von rechts, unten 2. von links) zu erkennen.

3.6 Vorbereitung zur Sequenzierung

Die *IRF8*-Elektrophoresebanden wurden über UV-Licht herausgeschnitten und schließlich wurde die cDNA mittels des Nucleospin®-Gel&PCR-Clean up – Kits isoliert. Dafür wurden die Gelteilchen mit NT1-Puffer versetzt (200 µl pro 100 mg) und für 5-10 min bei 50°C inkubiert. Dann wurde die cDNA an eine Membran durch Zentrifugation bei 11 000 rcf/g für 30 sec gebunden. Es wurde zweimal mit NT3-Puffer gewaschen und zentrifugiert, schließlich wurde die Membran mit der cDNA durch Zentrifugation bei 11 000 rcf/g für 2 min getrocknet. Die cDNA wurde durch Zugabe von 16 µl NE-Puffer mit anschließlicher Zentrifugation eluiert. Die Konzentration der cDNA wurde spektrophotometrisch (in ng/µl) ermittelt. Für jede Probe wurden 150 ng cDNA mit Wasser auf 5 µl aufgefüllt und zu 2 µl vom entsprechenden forward Primer dazugegeben.

3.7 Sequenzierung

Zur Sequenzierung nach der Sanger-Methode wurden die Proben zum Sequenzierungslaboratorium SeqLab nach Göttingen verschickt.

3.8 Auswertung der Sequenzierung

Das Sequenzierungsergebnis wurde als Basensequenz und in der Form einer Elektropherogramm (auch Chromatogramm genannt) geliefert. Die erhaltene *IRF8*-Sequenz wurde für jedes Primerpaar (drei pro Probe) mittels der „BLAST“-Funktion vom Internetportal Pubmed mit der *IRF8*-Originalsequenz verglichen und schließlich wurde für jede Probe auch das Elektropherogramm beurteilt. Neu entdeckte nicht-synonyme Mutationen wurden durch erneute Sequenzierung der Proben bestätigt, ggf. auch mit dem reversen Primer. Die Nomenklatur der gefundenen Mutationen erfolgte nach den anerkannten Prinzipien der Human Genome Variation Society⁴⁵. Die *kursive Schrift* bezieht sich auf das jeweilige Gen oder auf mRNA/cDNA, die senkrechte Schrift auf das entsprechende Protein. In den Tabellen 3.2 und 3.3 auf S. 31 werden die für die

vorliegende Arbeit relevanten Aminosäuren- bzw. Sequenz- und Mutationsnomenklaturen erläutert.

Die Funktion vom Internetportal Pubmed „db SNP“ und ein öffentlicher Polymorphismenserver (www.evs.gs.washington.edu) wurden benutzt, um der Frage nachzugehen, ob gefundene Mutationen nicht schon bekannte Polymorphismen von *IRF8* sind, die auch bei hämatologisch-gesunden Menschen vorkommen.

Tabelle 3.2: Erläuterung der Aminosäuren- und Sequenznomenklatur.

Abkürzung	Bedeutung
C = Cys	Cystein
F = Phe	Phenylalanin
H = His	Histidin
R = Arg	Arginin
V = Val	Valin
Y = Tyr	Tyrosin
c.414C>T	Substitution der 414. Base (Cytosin) ab dem Startcodon durch Thymin
p.R296H	Substitution der 296. Aminosäure im Protein – hier Arginin – durch Histidin

Tabelle 3.3: Erläuterung der Mutationsnomenklatur.

Bezeichnung	Synonym	Auswirkung	Beispiel
synonym	silent	Gleiche Aminosäure	c.TGC→Cystein ↓ c.TGT→Cystein
missense	nicht-synonym	Aminosäuren-austausch	c.CGC→Arginin ↓ c.CAC→Histidin
frameshift	Leserasterverschiebung	Komplett neue Aminosäuresequenz ab Mutation	c.TGCCGCT...→p.CysArg.... ↓ c.TCCGCT...→p.SerAla

Cys = Cystein, Arg = Arginin, Ser = Serin, Ala = Alanin

Im Internetportal Uniprot (www.uniprot.org) wurde nachgeschaut, ob gefundene Mutationen eine zwischen fünf verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Ratte, Haushuhn und Kuh) konservierte Aminosäure betreffen oder nicht.

3.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Um zu überprüfen, ob mutierte *IRF8*-mRNA exprimiert wird und auch um einen Eindruck über die *IRF8*-Expression in den untersuchten Proben zu bekommen, wurde bei bestimmten Proben mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) die *IRF8*-Expression gemessen. Bei dieser Methode wird die schon beschriebene PCR durchgeführt, jedoch mit dem Unterschied, dass sich ein DNA-Farbstoff (SYBR-Green) während der Amplifikation in die gebildete DNA einlagert und messbare Fluoreszenzsignale abgibt, die in jedem Zyklus neu gemessen werden (daher auch das Synonym von qPCR: Real-Time PCR). Die Intensität dieser Signale korreliert mit der Expression der untersuchten Gene; die Signalstärke der amplifizierten cDNA von Genen mit geringer Expressionsvariabilität (z.B. *GAPDH*) wird dabei als Referenzwert für jede Probe benutzt. Um eine Signalabgabe durch unspezifisch-entstandene PCR-Produkte auszuschließen, wird im letzten Schritt der qPCR eine sog. Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Beschreibung nach⁵¹). Die Ergebnisse der automatisch durchgeführten qPCR-Analyse wurden als Ct-Werte (Ct=cycle threshold) angegeben, d.h. die Anzahl an PCR-Zyklen die nötig waren, um eine bestimmte Signalschwelle zu erreichen.

Die Amplifikation fand unter folgenden Bedingungen statt:

Schritt	Denaturierung		Hybr	Elon- gation	Denat	Hybr	SKA	
Temperatur	95°C	94°C	58°C	70°C	95°C	58°C	58-95°C	95°C
Dauer	15 min	15 s	15 s	30 s	15 s	15 s	20 min	15 s

45x

Denat = Denaturierung, Hybr = Hybridisierung, SKA = Schmelzkurvenanalyse

Für jede Reaktion wurden 9 µl H₂O mit 12,5 µl SYBR-Green PCR-Mastermix und je 1,25 µl humane *IRF8* bzw. *GAPDH* qPCR-Primer (für die Sequenzen s.

Abschnitt 2.6) versetzt. Es wurde 1 µl cDNA hinzugefügt. Jede Probe wurde, falls nicht anders angegeben, in zwei Wells je für *IRF8* und *GAPDH* amplifiziert (technische Duplikate). In zwei oder drei Wells wurde Wasser als negative Kontrolle für *GAPDH* und *IRF8* verwendet. Schließlich wurde vor dem Amplifikationsbeginn für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert.

Das Programm Realpex 2.2 lieferte die erhaltenen Ct-Werte. Die weitere Analyse erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel: Die Differenz der Mittelwerte der Ct-Werte für *IRF8* und *GAPDH* wurde für jede Probe ermittelt (Δ Ct). Der Expressionsunterschied von *IRF8* in verschiedenen Proben wurde über einen Vergleich der errechneten $2^{-\Delta\Delta$ Ct-Werte dargestellt. Falls nicht anders angegeben, führte ein Ct-Wert-Unterschied von mehr als 0,5 Zyklen zwischen den beiden technischen Duplikaten für *IRF8* oder *GAPDH* zum Ausschluss der jeweiligen Probe aus der Analyse. Die graphische Darstellung der qPCR-Ergebnisse wurde mit dem Programm Graphpad Prism gestaltet. Mit diesem Programm wurden auch die Standardabweichungen der relativen Expression von *IRF8* in den verschiedenen Proben erchnet. Bei der Untersuchung der relativen *IRF8*-Expression der pro-B-ALL-Patientenprobe mit der p.R296H- und der CLL-Probe mit der c.1158_1176del-Mutation wurde jeweils eine Probe mit Wildtyp-*IRF8* als Referenz benutzt, um die Wildtyp-*IRF8*-Expression und die relative Expression der mutierten *IRF8*-mRNA zu berechnen. Schließlich wurden beide Werte (mutiert und Wildtyp) mit einer Zahl multipliziert, so dass zur besseren Veranschaulichung der Mittelwert der relativen Expression der Wildtyp-Proben die Zahl Eins ergibt.

3.10 Statistische Auswertung.

Zum statistischen Vergleich der Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Mutationen in verschiedenen Proben wurde der doppelseitige exakte Test nach Fisher benutzt. Die Berechnung erfolgte mit einem online-Programm (zu finden auf <http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>). Als signifikant wurden Werte mit $p < 0.05$ bezeichnet. Der Anteil mutierter Proben wurde in Prozent (%) der

sequenzierten Proben angegeben und dabei wurde auf ganze Prozentzahlen gerundet.

4. Ergebnisse

4.1 Sequenzierungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die *IRF8*-Transkripte von insgesamt 145 cDNA-Proben (136 Patientenproben, 9 Zelllinien) verschiedener hämatologischer Neoplasien nach der Sanger-Methode sequenziert. Dabei wurden für jede PCR-Reaktion und für jeden Sequenzierungsvorgang drei Primerpaare benutzt (1,2 und 3 von 5'→3' der cDNA, s. Abschnitt 2.6 und 3.4). Bei sieben Proben (zwei Zelllinien, drei ALL- und zwei CLL-Patientenproben) konnte die Sequenzierung aus labortechnischen Gründen (z.B. nicht genügend Material vorhanden) nur mit zwei der drei Primerpaaren durchgeführt werden. Proben, bei denen *IRF8*-cDNA nur mit einem Primerpaar sequenziert werden konnte, sind hier nicht dargestellt und nicht Teil der 145 Proben. Wie bereits in Abschnitt 3.4 erwähnt, konnte bei insgesamt 84 Proben (67 ALL, 16 andere Hämoblastosen, s. Tab. 2.1) aufgrund der Primerauswahl (Primer 3 rev b) eine Sequenzierung von 98,7% der kodierenden *IRF8*-cDNA-Abschnitte gewährleistet werden, während die *IRF8*-Transkripte der restlichen Proben (CLL und Zelllinien) in ihrer ganzen Länge sequenziert wurden.

4.2 Übersicht über die gefundenen Mutationen

Tabelle 4.1 auf S. 35 stellt eine Übersicht über die gefundenen *IRF8*-Sequenzvarianten dar und charakterisiert diese. Es wurden insgesamt zehn verschiedene Veränderungen im Vergleich zur *IRF8*-Originalsequenz gefunden. Die meisten davon stellen heterozygote synonyme Punktmutationen dar, bei denen zwar ein Nukleotidbasenaustausch stattfindet, dieser führt aber im Unterschied zu den missense Mutationen nicht zu einem Aminosäurenwechsel. Neben den synonymen *IRF8*-Polymorphismen wurden drei missense Mutationen und eine Deletion von 19 Basenpaaren beobachtet.

Tabelle 4.1: Übersicht über die gefundenen *IRF8*-Veränderungen. Dargestellt sind die Mutationsstelle, der Effekt der Mutation bei der Transkription und die Anzahl an Proben in Nummer und in Prozent, die die entsprechende Veränderung aufweisen. Die letzte Spalte gibt Auskunft danach, ob eine Mutation als Polymorphismus (SNP) bereits bekannt ist. Die Prozentzahlen beziehen sich auf alle 145 cDNA-Proben, bei denen *IRF8* sequenziert wurde.

Mutation	Effekt	Anzahl/(% aller Proben)	bekannter Polymorphismus
c.414C>Thet	synonym	26 (18%)	ja
c.414C>Thomo	synonym	4 (3%)	ja
c.432C>Thet	synonym	6 (4%)	ja
c.573G>Ahet	synonym	14 (10%)	ja
c.724T>Chet	p.Y242H	1 (<1%)	ja
c.741G>Thet	synonym	1 (<1%)	nein
c.813C>Thet	synonym	1 (<1%)	ja
c.887G>Ahet	p.R296H	1 (<1%)	nein
c.894C>Thet	synonym	1 (<1%)	ja
c.982T>Ghet	p.F328V	1 (<1%)	ja
c.1158_1176del het	Deletion + fs	1 (<1%)	nein

fs = frameshift, het = heterozygot, homo = homozygot

Die am häufigsten gefundene *IRF8*-Veränderung, der Polymorphismus c.414 C>T, ist als Beispiel für die Darstellung einer heterozygoten Einzelnukleotid-Mutation in Abbildung 4.1 aufgeführt.

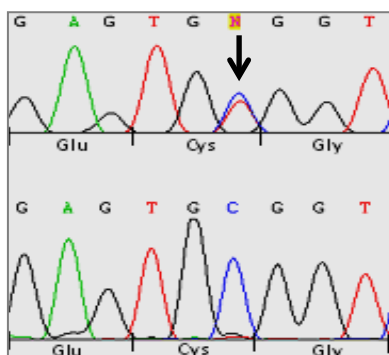


Abbildung 4.1: Chromatogramm der *IRF8*-Mutation c.414C>Thet. Dargestellt ist exemplarisch das Chromatogramm des heterozygot aufgetretenen Polymorphismus c.414C>T (Pfeil) im Vergleich zur *IRF8*-Originalsequenz (unterer Teil). Gezeigt sind auch die Abkürzungen der jeweiligen Aminosäuren für jedes Codon.

Im Folgenden werden ausführlicher die *IRF8*-Mutationen bei den einzelnen Entitäten dargestellt.

4.3 *IRF8*-Mutationen bei der ALL

Fünf verschiedene Veränderungen wurden durch die Sequenzierung von *IRF8*-cDNA bei 67 ALL-Patientenproben entdeckt. Drei davon stellen synonyme („stille“) Mutationen dar, die als Polymorphismen bereits bekannt sind (c.414C>T, c.432C>T, c.573G>A). Zwei sind missense Mutationen: c.887G>A (p.R296H) und c.982T>G (p.F328V). In Tabelle 4.2 sind die Mutationen mit ihrer Häufigkeit in jeder ALL-Subgruppe ausführlicher dargestellt.

Tabelle 4.2: *IRF8*-Mutationen in ALL-Patientenproben. Angegeben ist die Anzahl und der Anteil (in %) der Proben in jeder ALL-Subgruppe mit entsprechenden Abweichungen im Vergleich zur *IRF8*-Originalsequenz. Eine Charakterisierung jeder Mutation findet sich in Tab. 4.1.

Entität (Anzahl sequenziert)	c.414C>T*	c.432C>T het	c.573G>A het	c.887G>A het	c.982T>G het
Pro-B-ALL (15)	6 (40%)	-	2 (13%)	1 (7%)	-
Prä-B-ALL (10)	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	-	1 (10%)
C-ALL, BCR- ABL- neg.(27)	9 (33%)	2 (7%)	2 (7%)	-	-
C-ALL, BCR- ABL- pos.(15)	1 (7%)	1 (7%)	1 (7%)	-	-
Alle Sub- gruppen (67)	17 (25%)	4 (6%)	6 (9%)	1 (1%)	1 (1%)

*vier der c.414C>T Veränderungen (eine in pro-B-ALL, drei in BCR-ABL-neg c-ALL) waren homozygot.

c = common, het = heterozygot

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Frage, ob die Häufigkeit der drei in mehreren Proben zu findenden Mutationen bzw. Polymorphismen (c. 414C>T, c.432C>T, c.573 G>A) signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen ALL-Subgruppen aufweist. Der Polymorphismus c.414C>T kam signifikant häufiger in BCR-ABL-positiver im Vergleich zur BCR-ABL-negativen common-ALL vor (p=0,0148). Dieses Ergebnis und dessen Bedeutung sind jedoch mit großer Vorsicht zu betrachten, da hier eine nicht vorher definierte (post-hoc) Subgruppenanalyse stattfindet, die mit gewisser statistischer Unsicherheit

einhergeht⁷⁰. Andere signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen ALL-Subgruppen fanden sich nicht.

Im Folgenden findet eine genauere Beschreibung der zwei *IRF8* missense Mutationen statt, da sie im Vergleich zu den synonymen Mutationen potentiell bedeutendere Veränderungen der IRF8-Struktur und Funktion hervorrufen.

Die Substitution G>A der 887. kodierenden Base (c.887G>A) führt zu einem Aminosäurenwechsel an der Stelle 296 von IRF8, bei dem Arginin durch Histidin ersetzt wird (p.R296H). Beide Aminosäuren sind basisch, unterscheiden sich jedoch in ihrer Struktur insofern als bei Histidin die Guanidingruppe des Arginins fehlt und stattdessen ein davor nicht vorhandener Imidazolring hinzukommt (s. Abb. 4.2 auf Seite 38).

Wichtig ist auch die Tatsache, dass die Aminosäure p.R296 beim Menschen der Aminosäure p.R294 bei der Maus entspricht (da bei der Maus zwei Aminosäuren – p.238-9 – am Anfang des IAD-Abschnittes fehlen). Genau diese Aminosäure (p.R294) ist bei der schon erwähnten BXH-2 Maus mutiert (s. Abschnitt 1.4.1). Das Chromatogramm der Mutation p.R296H (Abb. 4.2) deutet darauf hin, dass es sich hier um eine heterozygote Veränderung handelt. Eine homozygote Mutation in den Leukämiezellen, die von einem kleineren Peak von mitsequenzierten Wildtyp-Zellen begleitet wird, kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Dies ist aber unwahrscheinlich, da die Patientenprobe aus einer Knochenmarkpunktion stammt, wobei bei der erkrankten Person das Knochenmark zu 90% durch lymphatische Blasten infiltriert war. Demzufolge wären nur ca. 10% der Zellen im Knochenmark bei Erstdiagnose nicht-leukämisch. Das fiel unterhalb der Sensitivitätsgrenze der Sanger-Sequenzierung für eine Mosaizismusedektion, die bei ca. 15-20% liegt²⁵.

Interessanterweise berichtete eine andere Gruppe von einer angeborenen *ATM*-Mutation⁴⁶ bei der gleichen Patientin, bei der sich die IRF8-Mutation p.R296H fand. Die beschriebene *ATM*-Mutation führt vermutlich zu einer Erhöhung der Radiotherapie-Toxizität⁴⁶.

Die IRF8 missense Mutation p.F328V (c.982T>G) fand sich in einer prä-B-ALL-Probe. Hier wird die hydrophobe Aminosäure Phenylalanin von der ebenfalls hydrophoben Aminosäure Valin ersetzt, bei der jedoch die Benzylseitenkette von Phenylalanin fehlt (s. Abb. 4.2, rechts).

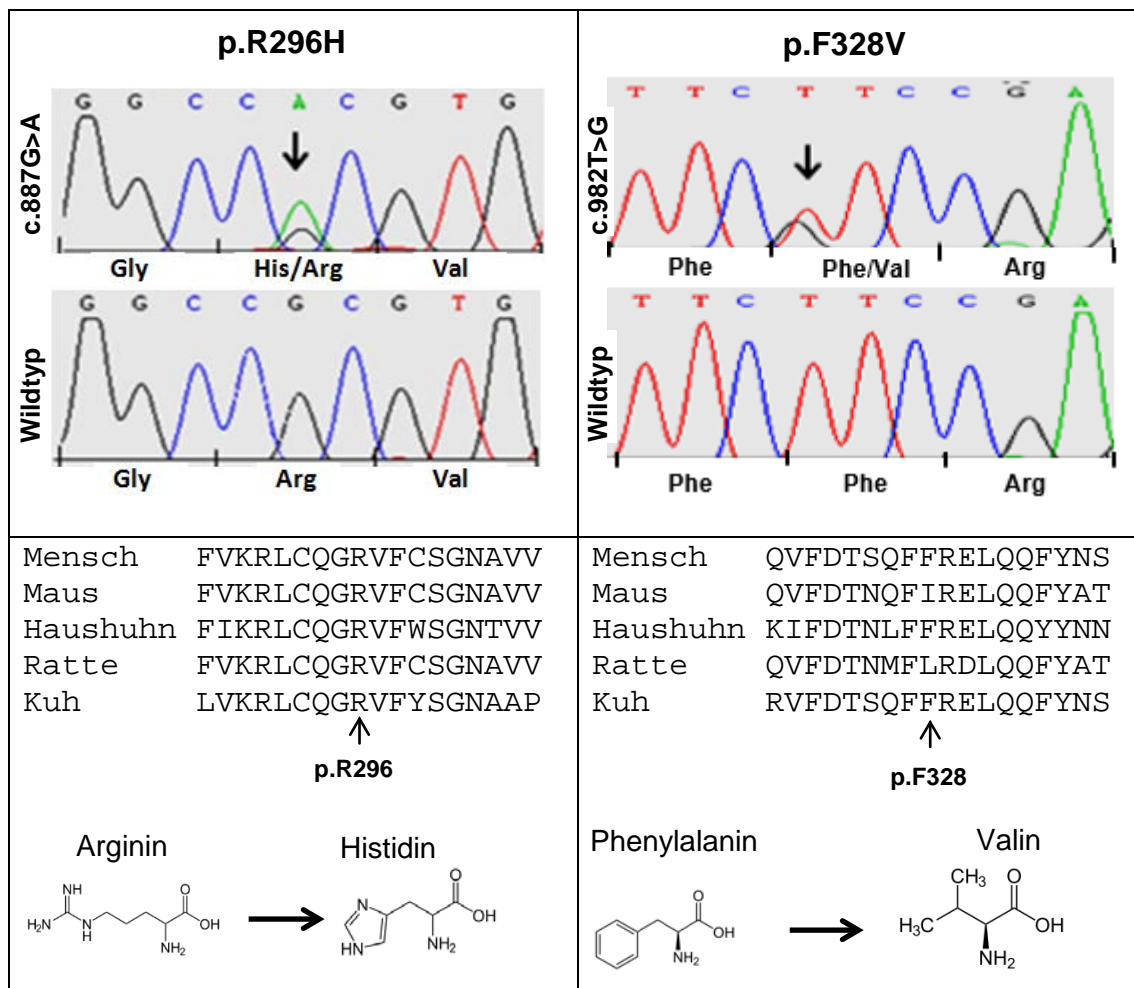


Abbildung 4.2: Die IRF8 p.R296H- und p.F328V-Mutationen bei der ALL. In den oberen Feldern sind die Chromatogramme der zwei missense Mutationen (Pfeile) dargestellt. Die unteren Felder zeigen den Grad der Konservierung der betroffenen Aminosäuren unter fünf verschiedenen Spezies (oberer Teil), sowie die Struktur der Wildtyp- bzw. der mutierten Aminosäuren (unterer Teil). (Aminosäurenbilder übernommen von⁷⁶⁾

F = Phenylalanin, H = Histidin, R = Arginin, V = Valin

Die zwei beschriebenen missense Mutationen betreffen Aminosäuren in der IAD von IRF8. Während die Veränderung c.982T>G bereits als Polymorphismus bekannt ist und eine nicht konservierte Aminosäure betrifft, ist c.887G>A kein Polymorphismus und betrifft eine konservierte Aminosäure (beides in Abb. 4.2 dargestellt).

4.4 IRF8-Mutationen bei der CLL

Bei den 52 untersuchten CLL-Patientenproben fanden sich, ähnlich dem ALL-Sequenzierungsergebnis, meistens Veränderungen in der Form von synonymen Mutationen, die gleichzeitig auch bekannte IRF8-Polymorphismen sind. Für die Charakterisierung der einzelnen Mutationen s. Tab. 4.1; die Zusammenfassung der Ergebnisse der IRF8-Mutationssuche bei der CLL findet sich in Tab. 4.3.

Tabelle 4.3: IRF8-Mutationen in CLL-Patientenproben. Dargestellt sind die jeweiligen Mutationen und die Anzahl der CLL-Proben, bei denen diese gefunden wurden.

Mutation*	c.414 C>T	c.432 C>T	c.573 G>A	c.741 G>T	c.894 C>T	c.1158_1176 del
Anzahl (% aller)	9 (17%)	2 (4%)	6 (12%)	1 (2%)	1 (2%)	1 (2%)

*alle gefundenen Mutationen bei den CLL-Proben sind heterozygot.

Die statistische Auswertung setzte sich hier mit der Frage auseinander, ob signifikante Häufigkeitsunterschiede von Mutationen bzw. Polymorphismen zu finden sind, die in ALL (alle ALL-Subgruppen) und CLL vorkommen (c. 414 C>T, c.432 C>T, c.573 G>A). Bei keiner dieser Veränderungen war das der Fall (z.B. p=0,37 für einen Häufigkeitsunterschied des Polymorphismus c.414C>T bei ALL und CLL).

Die einzige in der vorliegenden Arbeit gefundene nicht-synonyme IRF8-Veränderung bei der CLL ist die heterozygote Deletion von 19 Basenpaaren c.1158_1176del (s. Abb. 4.3, S. 40). Die Lokalisation der Deletion wurde durch die genaue Untersuchung des mutierten Chromatogramms ermittelt. Keine andere Veränderung würde zu diesem Sequenzierungsergebnis führen, außer

IRF8 c.1157_1175del (d.h. Verschiebung der 19 deletierten Basenpaare um eine Base in 5'-Richtung). Diese hätte jedoch die gleichen funktionellen Folgen für *IRF8*. Die Deletion führt durch eine Unterbrechung der originalen Reihenfolge der Basentriplets zu einer Leserasterverschiebung (s. Abb. 4.3). Demnach sind die folgenden Wildtyp-*IRF8*-Aminosäuren durch eine andere Aminosäuresequenz ersetzt.

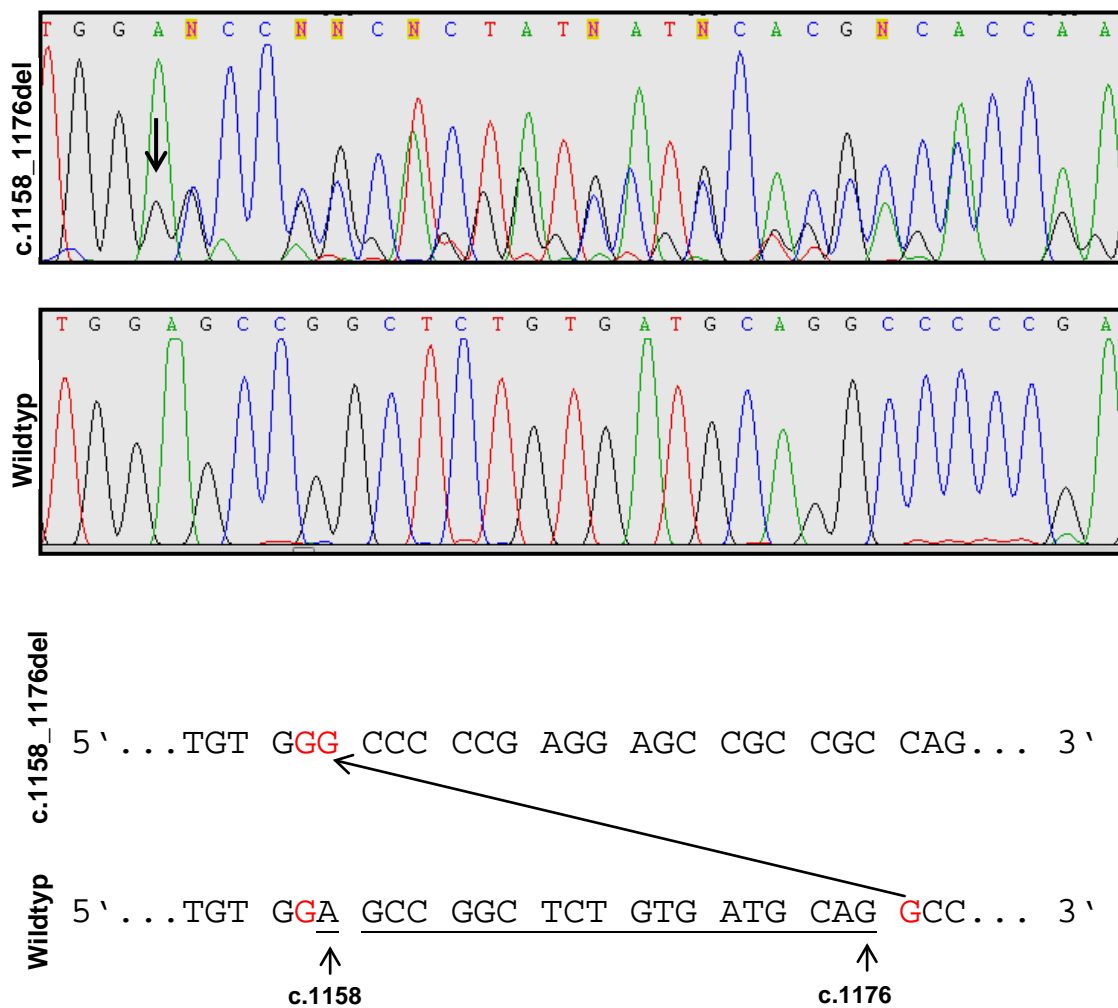


Abbildung 4.3: Die *IRF8*-Mutation c.1158_1176del bei der CLL. Im oberen Teil der Abbildung sind die Chromatogramme der mutierten und der Wildtyp-Sequenz dargestellt. Der Pfeil im oberen Chromatogramm markiert den Anfang der Überlappung der Wildtyp- und der mutierten Sequenz. Im unteren Teil ist eine Veranschaulichung der stattgefundenen Deletion abgebildet. Die DNA-Basen sind in Tripletts-Form gezeigt, so dass die Leserasterverschiebung (frameshift) in der mutierten Probe deutlich wird. Die Deletionsstelle in der Wildtyp-Sequenz ist unterstrichen und die ihr angrenzenden Basen (c.G1157 und c.G1176) sind rot abgebildet.

Das errechnete Stopcodon (durch TAA an der Stelle c.1355T-c.1357A) für die mutierte mRNA befindet sich 60 Basentriplets nach dem Deletionsbeginn, so dass das mutierte Protein nach diesem Model eine komplett neue Sequenz von 59 Aminosäuren enthält und damit auch länger ist als das Wildtyp-Protein.

4.5 *IRF8*-Mutationen bei anderen hämatologischen Neoplasien

Die restlichen 26 untersuchten hämatologischen Neoplasien bestehen aus Zelllinien (neun) und Patientenproben (17) und beinhalten verschiedene Entitäten (s. Tab. 2.1 und 2.2). Von neun gefundenen Mutationen stellen auch hier die meisten (acht) synonyme (stille) Polymorphismen dar. Tabelle 4.4 fasst die in dieser Probengruppe gefundenen Mutationen zusammen.

Tabelle 4.4: *IRF8*-Mutationen in anderen Neoplasien.

Mutation*	c.414C>T	c.573G>A	c.724T>C	c.813C>T
Anzahl	5	2	1	1

*alle hier genannten Mutationen sind heterozygot

Eine von zwei sequenzierten Mantelzelllymphomproben wies die Mutation c.724T>C auf, bei der die 242. Aminosäure von *IRF8* - das polare Tyrosin - durch das basische Histidin ersetzt wird (p.Y242H). Die Aminosäure p.Y242 ist konserviert und die gefundene missense Mutation p.Y242H ist ein bekannter *IRF8*-Polymorphismus beim Menschen. Abbildung 4.4 (Seite 42) stellt die Mutation p.Y242H dar.

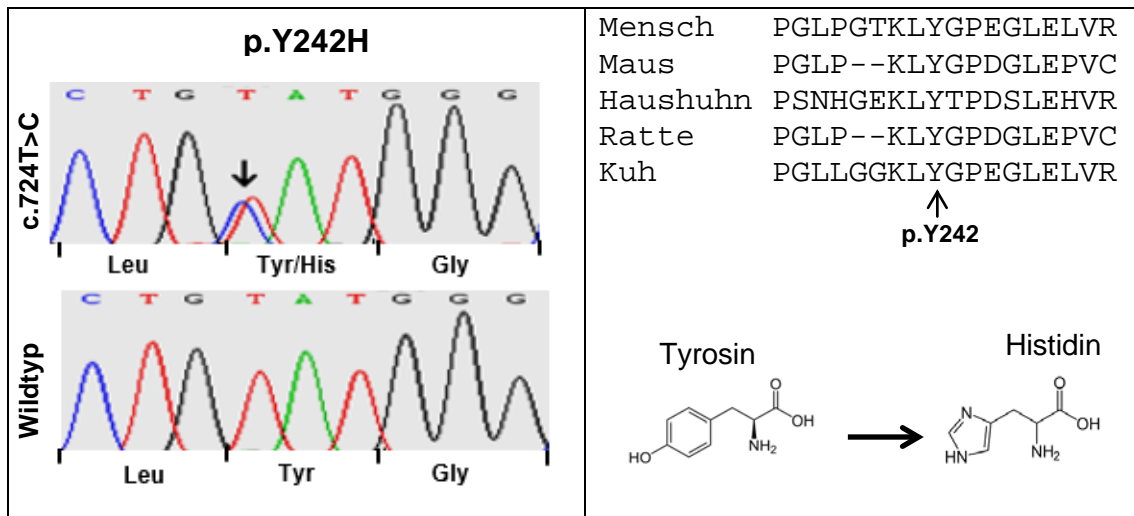


Abbildung 4.4: Die IRF8 Mutation p.Y242H beim Mantelzelllymphom. Links sind die Chromatogramme der mutierten (oben, Pfeil) und der Originalsequenz (unten) dargestellt. Rechts oben die Konservierung von der mutierten Aminosäure bei fünf Spezies, rechts unten die Struktur der Wildtyp und der mutierten Aminosäure. (Aminosäurebilder übernommen von⁷⁶)
H = Histidin, Y = Tyrosin

4.6 Zusammenfassung der gefundenen Mutationen

Die meisten in dieser Arbeit gefundenen Veränderungen der *IRF8*-cDNA-Sequenz waren bekannte Polymorphismen. Im Unterschied dazu wurden vier missense Mutationen gefunden, die die Aminosäurezusammensetzung von *IRF8* verändern - p.Y242H beim Mantelzelllymphom, p.R296H und p.F328V bei der ALL und c.1158_1176del bei der CLL. Von diesen vier Mutationen sind nur p.R296H und c.1158_1176del nicht als Polymorphismen bekannt. Die missense Mutationen sind in Abb. 4.5 im Zusammenhang der *IRF8*-Struktur dargestellt.

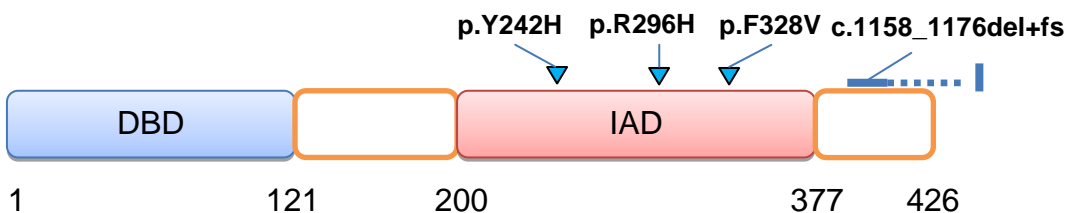


Abbildung 4.5: Nicht-synonyme IRF8-Mutationen in hämatologischen Neoplasien. Dargestellt sind die in der vorliegenden Arbeit gefundenen nicht-synonymen Mutationen p.Y242H, p.R296H, p.F328V und c.1158_1176del+fs in der *IRF8*-Struktur.

synonymen IRF8-Mutationen. Grundabbildung modifiziert nach³¹. DBD = DNA-Bindedomäne, IAD = IRF-Assoziierungsdomäne.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Expressionsuntersuchung von IRF8 dargestellt, insbesondere bei den Proben mit den Mutationen p.R296H und c.1158_1176del.

4.7 Expression von IRF8

Zunächst wurde die Expression der *IRF8*-mRNA ohne missense Mutationen in den peripheren mononukleären Zellen einer gesunden Person mit der in BCR-ABL-positiven common-ALL-Zellen und auch mit der in pro-B-ALL- und CLL-Zellen verglichen (Abb. 4.5, Seite 44), um eine Vorstellung über die IRF8-Expression in den zu untersuchenden Proben zu bekommen. Es ist wichtig zu bemerken, dass die *IRF8*-Expression bei der gesunden Person, bei zwei der BCR-ABL-positiven ALL- und bei einer CLL-Probe keine Mittelwerte technischer Duplikate darstellt, sondern einzelne qPCR-Messungen widerspiegelt. Ebenfalls weist eine BCR-ABL-positive ALL-Probe den synonymen Polymorphismus *IRF8* c.432C>T auf, sowie eine Pro-B-ALL Probe die Veränderung c.414C>T.

Die beobachtete hohe relative *IRF8*-Expression bei der CLL konnte auch in anderen CLL-Proben bestätigt werden (hier nicht aufgeführt) und steht im Einklang mit publizierten Untersuchungen^{36,53}. Im Unterschied dazu ist bei den hier dargestellten ALL-Proben das *IRF8*-Gen geringer exprimiert, wobei dies bei der BCR-ABL-positiven common-ALL noch deutlicher ist als bei der pro-B-ALL; diese Beobachtung wurde jedoch nicht weiter untersucht. Zu beachten ist eine gewisse Varianz der *IRF8*-Expression bei Gesunden⁵³, da hier nur eine Probe einer gesunden Person als Kontrolle benutzt wurde.

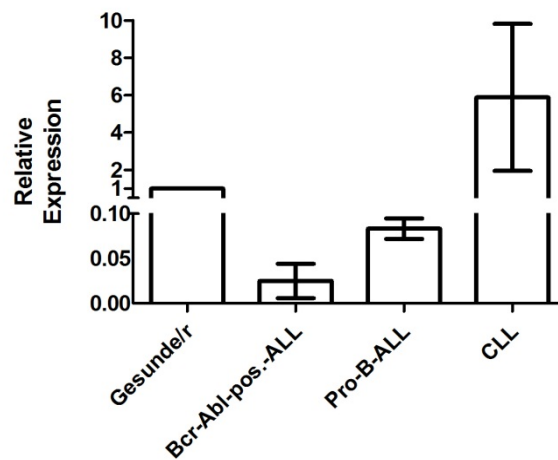


Abbildung 4.5: *IRF8*-Expression im Vergleich zwischen einigen Entitäten
Dargestellt ist die relative *IRF8*-mRNA-Menge in den malignen Zellen von neun verschiedenen Patientenproben (vier BCR-ABL-positive ALL-, drei pro-B-ALL- und zwei CLL-Proben) im Vergleich zu der in den peripheren mononukleären Zellen von einer hämatologisch-gesunden Person. Für die Patientenproben sind auch die jeweiligen Standardabweichungen angegeben.

Bei zwei der vier Patientenproben mit nicht-synonymen *IRF8*-Mutationen wurde die *IRF8*-Expression untersucht – bei der pro-B-ALL-Probe mit der Mutation p.R296H und bei der CLL-Probe mit der Deletion *IRF8* c.1158_1176del. Bei den restlichen zwei Proben – das Mantelzelllymphom mit der *IRF8*-Mutation p.Y242H und die prä-B-ALL-Probe mit der Mutation p.V328F (beides bekannte Polymorphismen) wurden keine qPCR-Analysen durchgeführt, weil nicht genug Restmaterial und auch keine Proben zum Vergleich vorhanden waren.

In Abb. 4.6 sind die Ergebnisse von zwei qPCR-Versuchen dargestellt, die sich mit der Frage auseinandersetzen, ob die pro-B-ALL-Probe mit der missense *IRF8*-Mutation p.R296H eine andere *IRF8*-Expression aufweist im Vergleich zu Patientenproben ohne missense Mutationen.

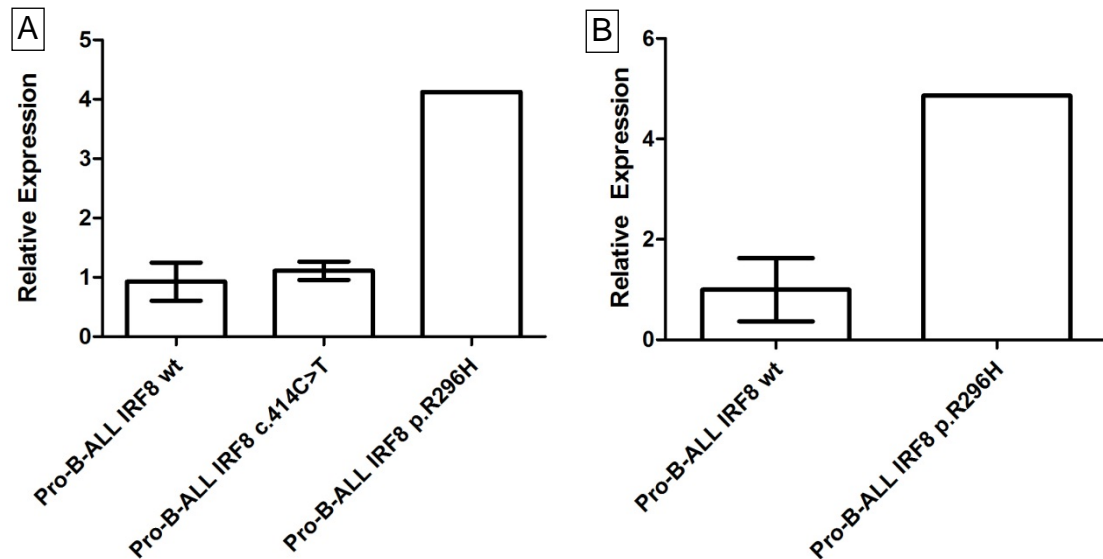


Abbildung 4.6: Relative Expression von *IRF8*-p.R296H. Abgebildet sind zwei qPCR-Ergebnisse. (A) zeigt die Expression von *IRF8* in drei pro-B-ALL-Patientenproben ohne *IRF8*-Veränderungen (linke Säule), in zwei pro-B-ALL-Patientenproben mit dem *IRF8*-Polymorphismus c.414C>T (mittlere Säule) und in der *IRF8* p.R296H-mutierten pro-B-ALL-Probe. In (B) sind die Ergebnisse eines zweiten qPCR-Versuches mit der p.R296H mutierten Probe und fünf Proben ohne missense Mutationen abgebildet. Die linke Säule in (B) enthält zwei der in (A) gezeigten *IRF8*-wt-Proben, die der Überprüfung der Konsistenz der Daten dienen. Ebenfalls weisen zwei der ‚Wildtyp‘-*IRF8*-Proben in (B) den Polymorphismus c.414C>T auf.

Eine höhere Expression in der Mutante im Vergleich zu insgesamt acht Wildtyp-Proben konnte beobachtet werden (Abb. 4.6 A und B). Zu beachten ist, dass die mutierte Patientenprobe auch den synonymen Polymorphismus c.414C>T enthält, was auch eine Auswirkung auf die Expression von *IRF8* haben könnte; dies ist aber unwahrscheinlich, da je zwei weitere Proben in Abb. 4.6A und 4.6B den gleichen Polymorphismus aufweisen, ohne die *IRF8*-Expression wesentlich zu beeinflussen (s. mittlere Säule in Abb. 4.6 A).

Anders als bei der pro-B-ALL-Probe mit der p.R296H-Mutation wurde bei der CLL-Probe mit der Mutation *IRF8* c.1158_1176del eine niedrigere *IRF8*-mRNA-Expression beobachtet (Abb. 4.7).

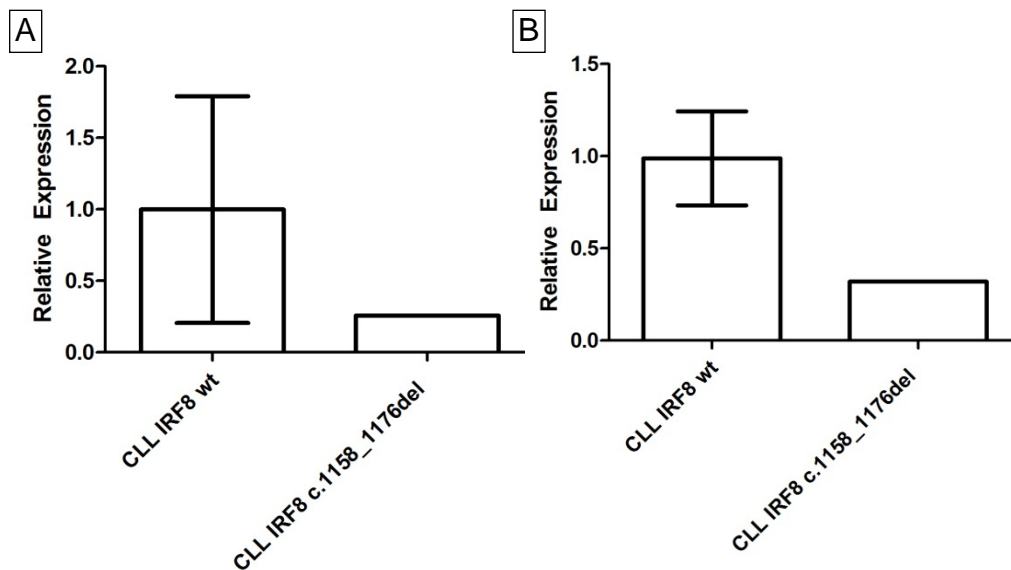


Abb. 4.7: Relative Expression von *IRF8*-c.1158_1176del. Abgebildet sind zwei qPCR-Ergebnisse. In (A) wurden vier, in (B) sechs Wildtyp-*IRF8*-Proben (hier ist unter Wildtyp eine Probe ohne missense Mutationen gemeint) mit der Mutante bezüglich der *IRF8*-Expression verglichen, wobei drei der Wildtyp-Proben in (A) und (B) identisch sind. Die mutierte Probe in (A) und (B) wies einen Ct-Wert-Unterschied zwischen den Duplikaten von 0,61 bzw. 0,68 auf. Bei einer Wildtyp-Probe im Versuch B betrug dieser Unterschied 1,18. Die Probe wurde trotzdem aus der Analyse nicht ausgeschlossen, da die Übernahme von jedem der beiden Ct-Werte das Ergebnis nicht wesentlich beeinflusst hätte.

An dieser Stelle muss berücksichtigt werden, dass auch die *IRF8* c.1158_1176del-CLL-Probe den Polymorphismus c.414C>T aufweist, sowie eine Probe in der Wildtyp-Gruppe, die in 4.7A und B vorkommt. Diese Veränderung beeinflusst jedoch die Expression von *IRF8* wahrscheinlich nicht wesentlich (s. Abb. 4.6A).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die *IRF8*-Transkripte in verschiedenen hämatologischen Neoplasien, hauptsächlich ALL und CLL, sequenziert. Dabei entdeckten wir mehrere Abweichungen von der *IRF8*-Wildtyp-Sequenz.

Die meisten Veränderungen waren synonyme Mutationen, bei denen kein Aminosäurenwechsel stattfindet. Auch wenn eine funktionelle Bedeutung einer synonymen Mutation prinzipiell möglich ist²⁶, wäre dies für *IRF8* hier nicht sicher abzuleiten. Das Vorkommen von keiner der stillen Mutationen zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen ALL und CLL. Die synonyme *IRF8* Mutation c.414C>T ist nicht mit einem Expressionsunterschied assoziiert, auch wenn dies lediglich anhand weniger Proben untersucht wurde. Signifikante Subgruppenunterschiede in der ALL bezüglich des Vorkommens des c. 414C>T Polymorphismus sind festzustellen, diese sind jedoch mit Vorsicht zu interpretieren, da es sich hierbei um eine post-hoc Subgruppenanalyse handelt⁷⁰.

Neben den synonymen Mutationen fanden sich vier nicht-synonyme *IRF8*-Mutationen – drei missense Mutationen und eine Deletion von 19 Basenpaaren.

Die Mutationen p.Y242H beim Mantelzelllymphom und p.F328V bei der ALL führen zwar zu dem Ersatz einer Aminosäure durch eine andere mit verschiedener Konfiguration bzw. Polarität (s. Abschnitte 4.3 u. 4.5), sind jedoch als Polymorphismen beim Menschen bekannt. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob diese trotzdem eine mögliche funktionelle Bedeutung haben, z.B. durch eine Erhöhung des Erkrankungsrisikos im Sinne einer genetischen Veranlagung. Diese Frage konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden, da keine funktionellen Versuche (z.B. Mutagenese) durchgeführt wurden.

Eine Rolle bekannter Polymorphismen bei der Leukämieentstehung kann jedoch prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, da die potentiell pathogene

Rolle von Polymorphismen, d.h. auch bei Gesunden vorkommenden genetischen Veränderungen, in der Onkologie bekannt ist^{2,16}. So findet sich z.B. ein Polymorphismus des Tumor-Suppressors ARLTS1 häufiger bei Patienten mit familiären Krebserkrankungen als bei Gesunden und dieser spielt dabei auch eine kausale Rolle². Interessanterweise geht in Experimenten mit Mauszellen die IRF8-Mutation p.L331P (p.L331 entspricht p.L333 beim Menschen), die eng zur p.F328V Mutation bei der ALL benachbart ist, mit einer herabgesetzten Fähigkeit zur Heterokomplexbildung von IRF8 mit anderen Proteinen einher³⁷, was die Möglichkeit einer funktionellen Bedeutung dieser Mutation bei der ALL andeutet, auch wenn sie ‚nur‘ einen Polymorphismus darstellt.

Der andere gefundene missense-Polymorphismus - p.Y242H - betrifft eine konservierte Aminosäure in der IAD von IRF8 und wurde in einer von zwei Mantelzelllymphomproben gefunden. Aufgrund der geringen Anzahl untersuchten Proben wären weitere Untersuchungen erforderlich, um zu zeigen, ob diese Mutation nicht häufiger bei der Erkrankung vorkommt. In einer Sequenzierungsstudie wurden die Transkriptome von 20 Mantelzelllymphomproben sequenziert²⁷. Diese Studie konnte den *IRF8* missense Polymorphismus p.Y242H jedoch nicht aufdecken, da bekannte Polymorphismen aus der Datenanalyse ausgeschlossen wurden²⁷.

Im Allgemeinen sollte bei der Diskussion der missense Polymorphismen berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Untersuchung zwei bekannte *IRF8* missense Polymorphismen in insgesamt 145 menschlichen Proben verschiedener hämatologischer Neoplasien gefunden wurden. Ein öffentlich zugänglicher Polymorphismen-Server, der Genvariationen bei Hämatologisch-Gesunden mit ihrer Häufigkeit darstellt (<http://evs.gs.washington.edu>), demonstriert das Vorhandensein von jeglichen missense *IRF8*-Mutationen bei insgesamt 189/ca.13 000 (=ca. 0,015) der untersuchten hämatologisch-gesunden Personen. In der vorliegenden Arbeit waren dies 2/145 (=ca. 0,014); dies spricht dafür, dass die Entdeckung der zwei missense Polymorphismen der

statistischen Erwartung entspricht und diese nicht zwangsläufig eine pathobiologische Bedeutung haben.

Im Gegensatz dazu sprechen bei der Mutation p.R296H in der pro-B-ALL einige Überlegungen für eine pathogene Rolle dieser Veränderung. Sie betrifft eine konservierte Aminosäure und stellt keinen bekannten *IRF8*-Polymorphismus dar (Abschnitt 4.3). Die benachbarte *IRF8* Mutation p.R289E der Maus (entspricht p.R291E beim Menschen) innerhalb der gleichen konservierten Region der IAD verhindert in murinen dendritischen und myeloischen Zellen die Komplexbildung mit anderen Molekülen (z.B. IRF2 und PU.1)^{24,64}. Dadurch beeinträchtigt sie stark die *IRF8*-Funktion^{24,64}. Außerdem ist angesichts der wichtigen Rolle von *IRF8* bei der frühen B-Zell-Differenzierung⁶⁷ die pathogene Rolle einer Mutation des Transkriptionsfaktors bei der pro-B-ALL vorstellbar.

Was die p.R296H Mutation besonders interessant macht, ist die Tatsache, dass bei der bereits beschriebenen BXH-2 Maus eine *IRF8*-Mutation der gleichen Aminosäure - entsprechend p.R294C - für einen myeloproliferativen Phänotyp und für eine Anfälligkeit für mykobakterielle Infektionen verantwortlich ist⁶⁵ (s. auch Abschnitte 1.4.1 und 4.3).

Die Mutation p.R296H, die wir in pro-B-ALL-Zellen fanden, ist heterozygot. Mäuse mit einer heterozygoten p.R294C-Mutation sind aber asymptomatisch⁶⁵. Sicherlich ist die Auswirkung der Veränderung kontextabhängig. Unterschiede zwischen der menschlichen und murinen Hämatopoese könnten diesen Widerspruch erklären.

Leider konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, ob die p.R296H-Mutation somatisch ist, d.h. nur in den Leukämiezellen anzutreffen, da nicht-leukämische Zellen für uns nicht zugänglich waren.

Angesichts der regulatorischen Rolle von *IRF8* bei der Lymphopoese der B-Zellen im Knochenmark und der Beeinträchtigung der Funktion des Proteins bei der BXH-2 Maus ist eine pathogene Rolle der p.R296H Mutation bei der pro-B-ALL wahrscheinlich. Für eine funktionelle Bedeutung der Veränderung spricht

ebenfalls die Überexpression des mutierten Transkriptes im Vergleich zu acht *IRF8*-Wildtyp pro-B-ALL-Proben. Inaktivierende *IRF8*-Mutationen gehen in einem *in vitro*-Versuch mit einer höheren *IRF8*-Expression einher⁶⁰. Eine dominant-negative Wirkung der *IRF8*-Mutation p.R296H ist denkbar. Dies haben wir in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bewiesen.

Bei der BCR-ABL positiven common-ALL wurden keine missense *IRF8*-Mutationen gefunden. Gerade bei dieser Entität hätten wir *IRF8*-Veränderungen erwartet, weil IRF8 ein bekannter Antagonist von BCR-ABL ist (s. Einleitung). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die beobachtete niedrige Expression des Transkriptionsfaktors den genetischen Druck für eine zusätzliche Genmutation nimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die cDNA von 52 CLL-Proben bei der Suche nach *IRF8*-Mutationen sequenziert, obwohl eine große Sequenzierungsstudie des ganzen Genoms keine Mutationen demonstrierte⁶⁹. Die Rationale dafür war die durch verschiedene Studien angedeutete Rolle von *IRF8*-Polymorphismen für das CLL-Erkrankungsrisiko^{8,57}.

Wir fanden die Deletion von 19 Basenpaaren (*IRF8* c.1158_1176del) in einer der 52 CLL-Patientenproben, die zu einer Leserasterverschiebung ab Aminosäure p.G386 führt. Zwei Arbeiten demonstrierten eine erhaltene Funktion von IRF8 mit einer Deletion ab der 390. Aminosäure (entspricht p.Q392 beim Menschen) bzw. ab der 377. Aminosäure, da die Heterokomplexbildung mit PU.1 bzw. IRF2 unbeeinträchtigt blieb^{37,60}. Eine andere Arbeit zeigte hingegen eine herabgesetzte Fähigkeit der Produktion von IFN- β , einem der Zielgene von IRF8, durch eine *IRF8*-Mutante mit Deletion der letzten Aminosäuren ab p.Q390 (entspricht p.Q392 beim Menschen)³². Die funktionelle Auswirkung der Deletion c.1158_1176del bei der CLL sowie der Grund für die niedrigere Expression der mutierten *IRF8*-mRNA (s. Abschnitt 4.7) bleiben unklar.

Die insgesamt niedrige *IRF8*-Mutationsrate bei der CLL ist im Einklang mit einer neuen Untersuchung des ganzen CLL-Exoms, die nach der Versuchsdurchführung für die vorliegende Arbeit veröffentlicht wurde²⁸. Dort fand sich eine missense *IRF8*-Mutation (p.T80A) in einer von 538 CLL-Patientenproben.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit neben zwei missense *IRF8*-Polymorphismen bei der ALL und beim Mantelzelllymphom zwei weitere möglicherweise bedeutende Mutationen gefunden. Die Mutation p.R296H in der pro-B-ALL betrifft die gleiche Aminosäure wie die *IRF8*-Mutation bei den BXH-2-Mäusen und geht mit einer Überexpression des Gens einher. Die Deletion c.1158_1176del bei der CLL führt wahrscheinlich zu einer Leserasterverschiebung und ist mit einer Unterexpression der *IRF8*-mRNA assoziiert. Weitere Untersuchungen wären erforderlich, um die möglichen biologischen Auswirkungen der gefundenen *IRF8*-Mutationen zu verstehen.

6. Literaturverzeichnis

1. Burchert A, Cai D, Hofbauer LC, et al. Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP; IRF-8) antagonizes BCR/ABL and down-regulates bcl-2. *Blood* 2004;103:3480–9.
2. Calin GA, Trapasso F, Shimizu M, et al. Familial cancer associated with a polymorphism in ARLTS1. *N. Engl. J. Med.* 2005;352:1667–76.
3. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 2011;471:467–72.
4. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* 2011;364:2507–16.
5. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2005;352:804–15.
6. Chrabot BS, Kariuki SN, Zervou MI, et al. Genetic variation near IRF8 is associated with serologic and cytokine profiles in systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. *Genes. Immun.* 2013;14:471–8.
7. Cordone I, Masi S, Mauro FR, et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998;91:4342–9.
8. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Di Bernardo MC, et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat. Genet.* 2010;42:132–6.
9. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54.
10. Deng M, Daley GQ. Expression of interferon consensus sequence binding protein induces potent immunity against BCR/ABL-induced leukemia. *Blood* 2001;97:3491–7.
11. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005;106:3740–6.
12. Driggers PH, Ennist DL, Gleason SL, et al. An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon-inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990;87:3743–7.
13. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1999;341:164–72.
14. Gleissner B, Gökbuget N, Bartram CR, et al. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a

prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* 2002;99:1536–43.

15. Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X, Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood* 2004;104:1850–4.

16. Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, et al. Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. *Nat. Genet.* 2009;41:1122–6.

17. Hambleton S, Salem S, Bustamante J, et al. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 2011;365:127–38.

18. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;82:1820–8.

19. Hao SX, Ren R. Expression of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) is downregulated in Bcr-Abl-induced murine chronic myelogenous leukemia-like disease, and forced coexpression of ICSBP inhibits Bcr-Abl-induced myeloproliferative disorder. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:1149–61.

20. Hashmueli S, Gleit-Kielmanowicz M, Meraro D, Azriel A, Melamed D, Levi BZ. A truncated IFN-regulatory factor-8/IFN consensus sequence-binding protein acts as dominant-negative, interferes with endogenous protein-protein interactions and leads to apoptosis of immune cells. *Int. Immunol.* 2003;15:807–15.

21. Havelange V, Pekarsky Y, Nakamura T, et al. IRF4 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118:2827–9.

22. Holtschke T, Löhler J, Kanno Y, et al. Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* 1996;87:307–17.

23. Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood* 2015;125:3977–87.

24. Jaiswal H, Kaushik M, Sougrat R, et al. Batf3 and Id2 Have a Synergistic Effect on Irf8-Directed Classical CD8 + Dendritic Cell Development. *J. Immunol.* 2013;191:5993–6001.

25. Jamuar SS, Lam AN, Kircher M, et al. Somatic Mutations in Cerebral Cortical Malformations. *N. Engl. J. Med.* 2014;371:733–43.

26. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim I, et al. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science* 2007;315:525–8.

27. Kridel R, Meissner B, Rogic S, et al. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood* 2012;119:1963–71.

28. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015;526:525–30.

29. Lee CH, Melchers M, Wang H, et al. Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. *J. Exp. Med.* 2006;203:63–72.
30. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2010;362:1417–29.
31. Li H, Kaminski MS, Li Y, et al. Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* 2014;123:1487–98.
32. Li P, Wong JJ, Sum C, et al. IRF8 and IRF3 cooperatively regulate rapid interferon- induction in human blood monocytes. *Blood* 2011;117:2847–54.
33. Ludwig WD, Rieder H, Bartram CR, et al. Immunophenotypic and genotypic features, clinical characteristics, and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukemia: results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. *Blood* 1998;92:1898–909.
34. Lu R. IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes & Development* 2003;17:1703–8.
35. Maguer-Satta V, Petzer AL, Eaves AC, Eaves CJ. BCR-ABL expression in different subpopulations of functionally characterized Ph⁺ CD34⁺ cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1996;88:1796–804.
36. Martinez A, Pittaluga S, Rudelius M, et al. Expression of the interferon regulatory factor 8/ICSBP-1 in human reactive lymphoid tissues and B-cell lymphomas: a novel germinal center marker. *Am. J. Surg. Pathol.* 2008;32:1190–200.
37. Meraro D, Hashmueli S, Koren B, et al. Protein-protein and DNA-protein interactions affect the activity of lymphoid-specific IFN regulatory factors. *J. Immunol.* 1999;163:6468–78.
38. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011;476:298–303.
39. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 2006;107:265–76.
40. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446:758–64.
41. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008;453:110–4.
42. Mullighan CG. Genome sequencing of lymphoid malignancies. *Blood* 2013;122:3899–907.
43. Murphy KP, Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 8th ed. New York: Garland Science, 2012. xix, 868. ISBN: 978-0-8153-4243-4.

44. Nguyen H, Hiscott J, Pitha PM. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8:293–312.
45. Ogino S, Gulley ML, den Dunnen JT, Wilson RB. Standard Mutation Nomenclature in Molecular Diagnostics. *J. Mol. Diagn.* 2007;9:1–6.
46. Ostendorf BN, Terwey TH, Hemmati PG, Böhmer D, Pleyer U, Arnold R. Severe radiotoxicity in an allogeneic transplant recipient with a heterozygous ATM mutation. *Eur. J. Haematol.* 2015;95:90–2.
47. Otto N, Manukjan G, Göhring G, et al. ICSBP promoter methylation in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 2011;25:1202–7.
48. Pogosova-Agadjanyan EL, Kopecky KJ, Ostronoff F, et al. The Prognostic Significance of IRF8 Transcripts in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE* 2013;8:e70812.
49. Pui C, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006;354:166–78.
50. Raetz M, Kibardin A, Sturge CR, et al. Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-Dependent IL-12 Response to *Toxoplasma gondii* Profilin. *J. Immunol.* 2013;191:4818–27.
51. Renneberg R. Bioanalytik für Einsteiger, [Diabetes, Drogen und DNA]. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl., 2009, c 2009. XIX, 276 S. (Bioanalytik für Einsteiger; vol. Buch). ISBN: 978-3-8274-1831-9.
52. Schiavoni G, Mattei F, Sestili P, et al. ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2002;196:1415–25.
53. Schmidt M, Nagel S, Proba J, et al. Lack of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) transcripts in human myeloid leukemias. *Blood* 1998;91:22–9.
54. Schwieger M, Lohler J, Friel J, Scheller M, Horak I, Stocking C. AML1-ETO Inhibits Maturation of Multiple Lymphohematopoietic Lineages and Induces Myeloblast Transformation in Synergy with ICSBP Deficiency. *J. Exp. Med.* 2002;196:1227–40.
55. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 2014;506:328–33.
56. Skamene E, Gros P, Forget A, Kongshavn PA, St Charles C, Taylor BA. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* 1982;297:506–9.
57. Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, et al. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood* 2011;117:1911–6.
58. Slager SL, Achenbach SJ, Asmann YW, et al. Mapping of the IRF8 Gene Identifies a 3'UTR Variant Associated with Risk of Chronic Lymphocytic Leukemia

- but not Other Common Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2013;22:461–6.
59. Tailor P, Tamura T, Morse HC, Ozato K. The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse. *Blood* 2008;111:1942–5.
60. Tamura T, Nagamura-Inoue T, Shmeltzer Z, Kuwata T, Ozato K. ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* 2000;13:155–65.
61. Tamura T. ICSBP/IRF-8 inhibits mitogenic activity of p210 Bcr/Abl in differentiating myeloid progenitor cells. *Blood* 2003;102:4547–54.
62. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 2008;26:535–84.
63. Teitell MA, Pandolfi PP. Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2009;4:175–98.
64. Tsujimura H, Tamura T, Ozato K. Cutting Edge: IFN Consensus Sequence Binding Protein/IFN Regulatory Factor 8 Drives the Development of Type I IFN-Producing Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Immunol.* 2003;170:1131–5.
65. Turcotte K, Gauthier S, Tuite A, Mullick A, Malo D, Gros P. A mutation in the *Icsbp1* gene causes susceptibility to infection and a chronic myeloid leukemia-like syndrome in BXH-2 mice. *J. Exp. Med.* 2005;201:881–90.
66. Waight JD, Banik D, Griffiths EA, Nemeth MJ, Abrams SI. Regulation of the interferon regulatory factor-8 (IRF-8) tumor suppressor gene by the signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) transcription factor in chronic myeloid leukemia. *J. Biol. Chem.* 2014;289:15642–52.
67. Wang H, Lee CH, Qi C, et al. IRF8 regulates B-cell lineage specification, commitment, and differentiation. *Blood* 2008;112:4028–38.
68. Wang H, Morse HC. IRF8 regulates myeloid and B lymphoid lineage diversification. *Immunol. Res.* 2009;43:109–17.
69. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2011;365:2497–506.
70. Wang R, Lagakos SW, Ware JH, Hunter DJ, Drazen JM. Statistics in medicine--reporting of subgroup analyses in clinical trials. *N. Engl. J. Med.* 2007;357:2189–94.
71. Yang H, Higgins B, Kolinsky K, et al. RG7204 (PLX4032), a Selective BRAFV600E Inhibitor, Displays Potent Antitumor Activity in Preclinical Melanoma Models. *Cancer Res.* 2010;70:5518–27.
72. Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, et al. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2011;118:3080–7.

73. Zhang J, Grubor V, Love CL, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013;110:1398–403.

Quellen aus dem Internet*:

74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_002154.1 : zur Eruiierung der IRF8-Länge und Sequenz.

75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> : zur Primererstellung

76. [http://en.wikipedia.org/wiki/\(Name der Aminosäure auf Englisch\)](http://en.wikipedia.org/wiki/(Name_der_Aminosäure_auf_Englisch)) : für die Aminosäurenabbildungen

*die Internetquellen wurden zuletzt im Juni 2016 aufgerufen und nach ihrer Gültigkeit überprüft.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung
AML = Akute myeloische Leukämie
ALL = Akute lymphoblastische Leukämie
B-NHL = B-Zell-Non-Hodgkin Lymphom
BLAST = Basic Local Alignment Search Tool
bp = Basenpaare
bzw. = beziehungsweise
ca. = circa
cDNA = Complementary DNA, komplementäre DNA
CLL = Chronische lymphozytische Leukämie
CML = Chronische myeloische Leukämie
Ct-Wert = Cycle Threshold-Wert, Zyklenschwellenwert
DBD = DNA-Bindedomäne
DLBCL = Diffuse large b-cell lymphoma, diffuses großzelliges B-Zelllymphom
DNA = Desoxyribonucleotid acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTPs = Desoxynukleotidtriphosphate
E = Glutamat
FL = Follikuläres Lymphom
fs = frameshift
G = Glyzin
GAPDH = Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
ggf. = gegebenenfalls
het = heterozygot
homo = homozygot
IAD = IRF-Assoziierungsdomäne
ICSBP = Interferon Consensus Sequence Binding Protein
IFN = Interferon
IRF = Interferon Regulatory Factor
L = Leucin
LPS = Lipopolysacharid
LBL = Lymphoblastisches Lymphom
M. = Morbus
mg = Milligramm
min = Minute(n)
ml = Milliliter
mM = Millimolar
µl = Mikroliter
MPS = Myeloproliferatives Syndrom
ng = Nanogramm
NHLs = Non-Hodgkin Lymphome
P = Prolin
PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, periphere mononukleäre Zellen
PCR = Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion

qPCR = Quantitativs PCR

RNA = Ribonucleotid acid, Ribonukleinsäure

rev = reverse, rückwärts

rpm = revolution per minute, Drehung pro Minute

RT = Reverse Transkription

S. = Seite

s. = siehe

s.o. = siehe oben

s = Sekunden

SNP = Single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus

Tab. = Tabelle

TF = Transkriptionsfaktor

u.a. = unter anderem

UV = ultraviolett

z.B. = zum Beispiel

°C = Grad Celsius

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur von IRF8	7
Abbildung 1.2: Regulatorische Rolle von IRF8 bei der Hämatopoese.....	9
Abbildung 1.3: Beschriebene IRF8-Mutationen	15
Abbildung 3.1: Vereinfachte Darstellung der Mutationssuchemethodik.....	24
Abbildung 3.2: IRF8-cDNA und Primerbindestellen.....	27
Abbildung 3.3: Gelelektrophoretische Auftrennung der IRF8-cDNA.....	29
Abbildung 4.1: Chromatogramm der c.414C>Thet-Mutation.....	36
Abbildung 4.2: Die p.R296H- und p.F328V-Mutationen bei der ALL	39
Abbildung 4.3: Die IRF8-Mutation c.1158_1176del bei der CLL.....	41
Abbildung 4.4: Die Mutation p.Y242H beim Mantelzelllymphom.	43
Abbildung 4.5: IRF8-Expression im Vergleich zwischen einigen Entitäten.....	45
Abbildung 4.6: Relative Expression der IRF8 p.R296H-mRNA.. ..	46
Abbildung 4.7: Relative Expression der IRF8 c.1158_1176del-mRNA.....	47
Tabelle 1.1: Expression und Rolle von IRF8 bei einigen hämatologischen Neoplasien.	17
Tabelle 2.1: Analysierte Patientenproben.....	20
Tabelle 2.2: Analysierte Zelllinien.....	21
Tabelle 3.1: Primer 3-Varianten mit Entitätenzuordnung.....	28
Tabelle 3.2: Aminosäuren- und Sequenznomenklatur.....	31
Tabelle 3.3: Mutationsnomenklatur	31
Tabelle 4.1: Übersicht über die gefundenen IRF8-Veränderungen.	36
Tabelle 4.2: IRF8-Mutationen in ALL-Patientenproben	37
Tabelle 4.3: IRF8-Mutationen bei der CLL.	40
Tabelle 4.4: IRF8-Mutationen in anderen Neoplasien.	42

Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer in Marburg waren unter anderen folgende:

Aigner, Bartsch, Becker, Bette, Bohlander, Böhm, Brehm, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Dodel, Donner-Banzhoff, Exner, Fendrich, Feuser, Green, Gress, Grundmann, Hertl, Hofmann, Hoyer, Jacobsohn, Jaques, Josephs, Kann, Kill, Klose, Knorrenschild, König, Koolman, Lill, Maisch, Meier, Moll, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Renz, Richter, Roelcke, Schäfer, Schmidt, Schneider, Seifart, Seitz, Sekundo, Steiniger, Stiewe, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann (2x), Wrocklage, Wulf.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Andreas Burchert für die Anleitung während der Versuche, für die zahlreichen Besprechungen, in denen auch ich über das weitere Vorgehen der Experimente mitentscheiden konnte. Auch dafür, dass er einerseits offen für neue Fragestellungen war, die sich im Laufe der Sequenzierungen ergaben, aber es auch andererseits richtig erkennen konnte, dass manche meiner Versuchsvorschläge wissenschaftlich nicht sinnvoll und ergiebig wären.

Danke auch an Prof. Andreas Neubauer und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter für die Gestaltung der Forschungseinheiten in der Hämatologie in Marburg, was erst meine experimentelle Forschungsarbeit hier ermöglichte. Danke an PD Dr. Thomas Burmeister und Prof. Stillgenbauer für die zur Verfügung gestellten Patientenproben, deren Sequenzierung den Hauptteil meiner Arbeit ausmacht.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Laborfreunden, da mit ihnen die Arbeit im Labor Spaß gemacht hat und auch weil ich mich bei Fragen oder Schwierigkeiten immer an sie wenden konnte. Es handelt sich nämlich um (alphabetisch): Andreas Schütte, Christian Michel, Christin Schütz, Lisa Eisner, Maria Solovey, Michaela Pali, Sabrina Inselmann, Sonja Tajstra, Stephan Metzelder, Ying Wang. Christian Michel und Sonja Tajstra haben mich besonders bei meinen ersten Schritten des experimentellen Arbeitens begleitet und das schätze ich sehr.

Danke auch an meinen guten Freund Stefan Grüner, dass er sich meine Arbeit durchgelesen hat und mir sehr wertvolle sprachliche und inhaltliche Tipps gegeben hat.

Ohne die Unterstützung meiner Familie, finanziell und vor allem moralisch, hätte ich es nicht geschafft, die Arbeit im Labor zu leisten und diesen Text zu verfassen.

Danke

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel ‚IRF8-Mutationssuche in hämatologischen Neoplasien‘ in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie an der Universität Marburg unter Leitung von Prof. Andreas Burchert ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen, die Angebote der Philipps-Universität zur Plagiatserkennung (Plagiatsoftware zu beziehen über das Hochschulrechenzentrum) sind mir bekannt.

Ort, Datum, Unterschrift Betreuer

Tabellarischer Lebenslauf

Beruf

Dezember 2016 – Disputation Arzt in Weiterbildung für Innere Medizin am Kreiskrankenhaus Frankenberg

Juni-November 2016 Arzt in Weiterbildung in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie an der Uniklinik Marburg

Studium

Oktober 2008 – Dezember 2015 Medizinstudium an der Universität Marburg

November 2015 Ablegung mündlicher 3. Staatsexamen

November 2014- Oktober 2015 Praktisches Jahr in den Krankenhäusern in Frankenberg (Chirurgie), Kloster-Grafschaft (Innere Medizin) und Marburg (Psychiatrie)

März 2012- Juni 2016 Durchführung der Versuche und Verfassung des Textes der medizinischen Doktorarbeit in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie in Marburg.

Schulbildung

September 2003 – Juni 2008 Deutsches Gymnasium ‚K.Galabov‘, Sofia

September 1996 – Juni 2003 Allgemeinbildende Schule ‚Vasil Aprilov‘, Sofia

Sonstige Informationen zur Person

Sprachkenntnisse Bulgarisch, Deutsch und Englisch fließend in Wort und Schrift

Staatsangehörigkeit Bulgarien

Familienstand ledig

Hobbys Lesen von Büchern und Zeitschriften, Ausgehen mit Freundinnen und Freunden, Sport (Ultimate Frisbee und Fahrradfahren), Reisen usw.