

---

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie  
(Prof. Dr. med. L. Trümper)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Analyse von**  
**Interleukin-10-Genvariationen bei**  
**diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Julia Stächele**  
aus  
Oberkirch

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. Dieter Kube

Ko-Referent: Prof. Dr. Tim Beißbarth

Datum der mündlichen Prüfung: 22. September 2016

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Analyse von Interleukin-10-Genvariationen bei diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 11. Dezember 2015

Julia Stächele

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Maligne Lymphome .....	2
1.1.1 Non-Hodgkin-Lymphome.....	2
1.2 Das Zytokin Interleukin-10.....	4
1.2.1 Genvariationen bei Zytokinen .....	6
1.3 Zielstellung der Dissertation .....	8
<b>2 Material</b> .....	<b>10</b>
2.1 Biologisches Material.....	10
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	12
2.3 Medien und Puffer .....	13
2.4 Häufig verwendete Geräte.....	13
2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme .....	14
2.6 Oligonukleotide.....	15
<b>3 Methoden</b> .....	<b>16</b>
3.1 Übersicht.....	16
3.2 Methoden der Zellkultur.....	17
3.2.1 Auftauen und Kryokonservierung der Zellen.....	17
3.2.2 Kultivierung der Zellen.....	17
3.2.3 Bestimmung der Zellzahl .....	17
3.2.4 Gewinnung von Überständen für ELISA .....	18
3.2.5 Vorbereitung der Zellen für die Isolation von RNA .....	18
3.3 Molekularbiologische Methoden .....	18
3.3.1 Isolation von genomischer DNA .....	18
3.3.2 Isolation von RNA und reverse Transkription.....	19
3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	19
3.3.4 Genotypisierungsanalysen .....	19
3.3.5 Analyse der IL-10-Genexpression .....	23
3.4 Immunologische Methoden .....	25
3.4.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	25

---

3.5	Definitionen und statistische Analysen .....	25
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
4.1	Identifizierung distaler Genvariationen des IL-10-Genlokus.....	27
4.1.1	Ergebnisse der DNA-Sequenzierung.....	27
4.1.2	Etablierung eines <i>Multiplex Assays</i> zwecks Genotypisierung von IL-10-Genvariationen.....	27
4.2	Genvariationsanalysen des Zytokins IL-10 .....	29
4.2.1	Überblick über die durchgeführten Genvariationsanalysen.....	29
4.2.2	Analyse von IL-10-Genvariationen bei DLBCL-Patienten .....	29
4.2.3	Analyse von IL-10-Genvariationen bei gesunden Kontrollprobanden.....	33
4.2.4	Vergleich der Genotypenverteilung bei DLBCL-Patienten und gesunden Kontrollprobanden .....	34
4.3	Analyse der IL-10-Genexpression .....	35
4.3.1	Nachweis interindividueller Unterschiede bei der IL-10-Sekretion mittels ELISA.....	35
4.3.2	Nachweis interindividueller Unterschiede der IL-10-Transkriptmenge mittels <i>Real-Time PCR</i> .....	36
4.3.3	Bestimmung der IL-10-Transkriptmenge mittels Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen .....	37
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>62</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des IL-10-Genlokus .....	7
<b>Abbildung 2:</b> Versuchsabfolge .....	16
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der SNaPshot-Analyse.....	22
<b>Abbildung 4:</b> Elektropherogramm der Sequenzierungsreaktion eines Fragments der distalen 5'-untranslatierten Region des IL-10-Gens am Beispiel des SNPs IL-10 <sub>-11.668GA</sub> der LCL-Zelle 8/2 .....	27
<b>Abbildung 5:</b> Elektropherogramm eines <i>Multiplex Assays</i> mit simultaner Analyse mehrerer SNPs am Beispiel der LCL-Zelle 16 des internationalen HapMap-Projektes.....	28
<b>Abbildung 6:</b> Elektropherogramm eines <i>Multiplex Assays</i> mit simultaner Analyse mehrerer SNPs am Beispiel der LCL-Zelle 15 des internationalen HapMap-Projektes.....	29
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung der Position der Genvariation IL-10 <sub>+4.259AG</sub> sowie der Aufspaltungsmotive nach Restriktionsendonuklease-Verdau mit Fnu4HI .....	38
<b>Abbildung 8:</b> Restriktionsendonuklease-Verdau mit Fnu4HI .....	39
<b>Abbildung 9:</b> Elektropherogramm der Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen .....	40

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Klinische Charakteristika, Histologien und Therapieschemata von DLBCL-Patienten der NHL-B1-/B2-Studien.....	11
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Chemikalien .....	12
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Medien und Puffer .....	13
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Geräte .....	13
<b>Tabelle 5:</b> Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	14
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Oligonukleotide .....	15
<b>Tabelle 7:</b> Analysierte Genvariationen bei 594 DLBCL-Patienten, Verteilung der Genotypen sowie Hardy-Weinberg-Gleichgewicht .....	30
<b>Tabelle 8:</b> Univariate Analyse der IL-10-Genvariationen bezüglich des Gesamtüberlebens und ereignisfreien Überlebens von DLBCL-Patienten .....	31
<b>Tabelle 9:</b> Multivariate Analyse der IL-10-Genvariationen bezüglich des Gesamtüberlebens und ereignisfreien Überlebens von DLBCL-Patienten .....	31
<b>Tabelle 10:</b> Analysierte Genvariationen bei 135 gesunden Kontrollprobanden sowie Verteilung der Genotypen .....	33
<b>Tabelle 11:</b> Genotypenverteilung bei 594 DLBCL-Patienten und 135 gesunden Kontrollprobanden.....	34
<b>Tabelle 12:</b> IL-10-Sekretion von LCL-Zellen der eigenen Arbeitsgruppe .....	35
<b>Tabelle 13:</b> IL-10-Sekretion von LCL-Zellen des internationalen HapMap-Projektes...	36
<b>Tabelle 14:</b> Bestimmung der IL-10-Transkriptmenge mittels <i>Real-Time</i> PCR .....	36

## Abkürzungsverzeichnis

cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CHOEP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (= Doxorubicin), Oncovin® (= Vincristin), Etoposid, Prednison
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (= Doxorubicin), Oncovin® (= Vincristin), Prednison
CT	engl. <i>cycle threshold</i>
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DLBCL	engl. <i>diffuse large B-cell lymphoma</i>
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSHNHL	Deutsche Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	engl. <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EFS	engl. <i>event-free survival</i>
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMISE	Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (Medizinische Fakultät der Universität Leipzig)
IPI	engl. <i>International Prognostic Index</i>
KI	Konfidenzintervall
LCL	engl. <i>lymphoblastoid cell line</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
n. d.	engl. <i>no data</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OS	engl. <i>overall survival</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RR	relatives Risiko
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

# 1 Einleitung

Krebserkrankungen stehen in entwickelten Ländern nach kardiovaskulären Erkrankungen an zweiter Stelle der häufigsten Todesursachen. In Deutschland erkrankten im Jahr 2006 ca. 426.800 Menschen neu an Krebs. Für das Jahr 2010 wurden rund 450.000 Neuerkrankungen erwartet, womit in Deutschland derzeit etwa 1,5 Millionen Menschen von Krebs betroffen sind. Diese Angaben beruhen auf Schätzungen, welche die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert Koch-Institut im Februar 2010 veröffentlicht haben (Husmann et al. 2010). Die Zahl der Neuerkrankungen wächst stetig und lässt sich nicht zuletzt auf den demographischen Wandel zurückführen, da die Wahrscheinlichkeit für eine maligne Entartung von Zellen mit zunehmendem Alter steigt. Folglich treten die meisten Krebsarten bei älteren Menschen deutlich häufiger auf als bei jungen Menschen. So kommen auf einen Patienten unter 15 Jahre etwa 200 bis 300 Patienten über 80 Jahre (Husmann et al. 2010).

Im Jahr 2006 war etwa jeder vierte Todesfall in Deutschland auf Krebs zurückzuführen, woran insgesamt 210.930 Menschen verstarben. Männer sterben hierzulande am häufigsten an den Folgen eines Bronchialkarzinoms, wohingegen bei Frauen die krebsbedingte Todesursachenstatistik von den Mammakarzinomen angeführt wird. Platz 2 wird bei beiden Geschlechtern von den Kolonkarzinomen belegt (Husmann et al. 2010).

Unter Krebs versteht man die maligne Entartung von Zellen, welche sich durch destruktives und infiltratives Wachstum sowie die Fähigkeit zur Metastasierung auszeichnet. Bei der Tumorentstehung handelt es sich um einen multifaktoriellen und mehrstufigen Vorgang, der nach heutigem Kenntnisstand zu einer Modifikation grundlegender zellphysiologischer Funktionen führt (Hanahan et al. 2000). Grundlage für eine maligne Entartung ist die kontinuierliche Exposition der Körperzellen mit wachstumsfördernden Signalen. Dies kann die Folge von Mutationen in sogenannten Proto-Onkogenen sein. Proto-Onkogene sind an normalen Wachstums- und Differenzierungsprozessen beteiligt. Infolge einer Mutation kommt es meist zum Funktionsverlust, was in der Regel den programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose, nach sich zieht. Eine Mutation kann jedoch auch zu einer Förderung der Zellteilung führen und damit eine maligne Entartung unterstützen. Neben Mutationen in Proto-Onkogenen können auch Mutationen in Tumorsuppressorgenen zur stetigen Versorgung von Zellen mit wachstumsfördernden Signalen führen, da hierbei wachstumshemmende Faktoren ausgeschaltet werden. Hinzu kommt, dass

Tumorzellen häufig eine Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion aufweisen und aberrant proliferierende Zellen somit nicht vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden können. Als eine weitere Ursache für die oft geringe Immunogenität von Tumorzellen kann die niedrige Expression von Proteinen des humanen Leukozytenantigen-Systems betrachtet werden.

Die in der vorliegenden Dissertation betrachteten Non-Hodgkin-Lymphome (Abk. NHL) belegen in Deutschland bei Männern Platz 12, bei Frauen Platz 8 der krebsbedingten Todesursachenstatistik, was 2,4 bzw. 2,8 % aller krebsbedingten Todesfälle entspricht (Husmann et al. 2010). Trotz stetig verbesserter Therapiestrategien gibt es zahlreiche Patienten, welche keine komplette Remission erreichen bzw. nach initialem Therapieerfolg ein Rezidiv erleiden. Deshalb ist es unbedingt erforderlich, neue individuelle Risikofaktoren zu identifizieren und die bestehenden Therapiemöglichkeiten dementsprechend weiterzuentwickeln bzw. zu adaptieren.

## **1.1 Maligne Lymphome**

Maligne Lymphome entstehen aus Lymphozyten verschiedener Entwicklungsstadien und Herkunft. Die Einteilung erfolgt nach der im Jahre 2001 von der WHO (engl. *World Health Organization*) eingeführten Klassifikation, welche regelmäßig überarbeitet wird und deren Neuformulierung 2008 veröffentlicht wurde. Unterschieden wird hierbei zwischen Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen. Beide Tumorentitäten lassen sich wiederum in verschiedene Subtypen unterteilen, welche sowohl hinsichtlich ihrer Pathogenese als auch dem klinischem Verlauf unterschiedliche Merkmale aufweisen. So lassen sich die Non-Hodgkin-Lymphome beispielsweise in aggressive Lymphome mit hohem und indolente Lymphome mit niedrigem Malignitätsgrad gliedern. Auch werden Parameter wie Zellmorphologie, Teilungsrate sowie Oberflächenmerkmale berücksichtigt (Jaffe et al. 2001).

Im Jahr 2006 erkrankten in Deutschland 2.020 Menschen an Morbus Hodgkin sowie 12.760 Menschen an einem Non-Hodgkin-Lymphom. Letzteres belegt somit durchschnittlich Platz 10 aller Krebsneuerkrankungen (Platz 9 bei Männern, Platz 11 bei Frauen). Im gleichen Zeitraum verstarben 342 der Morbus Hodgkin-Patienten, wohingegen etwa 5.466 Patienten ihre Erkrankung an einem Non-Hodgkin-Lymphom nicht überlebten (Husmann et al. 2010).

### **1.1.1 Non-Hodgkin-Lymphome**

Als Non-Hodgkin-Lymphome werden maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems bezeichnet, bei denen im Gegensatz zum Morbus Hodgkin mikroskopisch

kein Nachweis von Sternberg-Reed-Zellen gelingt. Es handelt sich um eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, welche sich auch im klinischen Verlauf sehr unterscheiden. Non-Hodgkin-Lymphome sind überwiegend B- und nur selten T-Lymphozytären Ursprungs (Bräuninger et al. 2006).

Die in dieser Dissertation betrachteten diffus großzelligen B-Zell-Lymphome (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*, Abk. DLBCL) gehören zu den aggressiven Lymphomen und sind mit einem Anteil von etwa 30 % die am häufigsten auftretenden Non-Hodgkin-Lymphome. Diffus großzellige B-Zell-Lymphome werden in die Subentitäten zentroblastisches, immunoblastisches, großzellig-anaplastisches sowie T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom unterteilt.

Die Inzidenz des Non-Hodgkin-Lymphoms ist sechs Mal höher als die des Hodgkin-Lymphoms. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei rund 70 Jahren, für Männer bei rund 67 Jahren (Husmann et al. 2010). Für die Erkrankung an einem Non-Hodgkin-Lymphom existiert eine Vielzahl an Risikofaktoren. So kann eine Schwächung des Immunsystems, wie sie beispielsweise bei einer HIV-Infektion (engl. *Human Immunodeficiency Virus*) oder während einer immunsupprimierenden Therapie vorliegt, mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sein (Alexander et al. 2007; Grulich und Vajdic 2005). Auch konnte der Zusammenhang zwischen einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (Abk. EBV) sowie *Plasmodium falciparum* - dem Erreger der Malaria tropica - und dem überwiegend in Afrika vorkommenden sogenannten endemischen Burkitt-Lymphom nachgewiesen werden (Bellan et al. 2003). Weiterhin scheint eine chronische, auf dem Befall mit *Helicobacter pylori* beruhende Gastritis die Wahrscheinlichkeit, an einem MALT-Lymphom (engl. *mucosa associated lymphoid tissue*) zu erkranken, deutlich zu erhöhen (Fischbach et al. 1998). In den letzten Jahren werden außerdem zunehmend Genvariationen in Zytokinen als bedeutsam im Zusammenhang mit einer Erkrankung an einem Non-Hodgkin-Lymphom bzw. dem Erkrankungsverlauf diskutiert (Breen et al. 2002; Cunningham et al. 2003; Lech-Maranda et al. 2004 und 2006).

Neben der Bestimmung der Tumor-Subentität müssen weitere Risikofaktoren, die den klinischen Verlauf beeinflussen, identifiziert werden, um eine klare Risikoeinschätzung des Patienten zu ermöglichen und auf dieser Basis eine Entscheidung für eine niedrig oder hoch dosierte Chemotherapie treffen zu können. So richtet sich die Intensität der grundsätzlich kurativ ausgerichteten Behandlung aggressiver B- und T-Zell-Lymphome nach den Risikofaktoren des *International Prognostic Index* (Abk. IPI), welcher die Patienten in vier Risikogruppen einteilt. Der IPI berücksichtigt die Faktoren Alter, Krankheitsstadium nach Ann Arbor, Anzahl der Extranodalbefälle, Performance-Status

der *Eastern Cooperative Oncology Group* (Abk. ECOG) sowie Serum-LDH. Als weitere Risikofaktoren, welche vom IPI nicht berücksichtigt werden, gelten *bulky disease* sowie zyto- und molekulargenetische Merkmale des Lymphoms. Therapiert wird mithilfe eine Polychemotherapie gemäß CHOP- bzw. CHOEP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, ggf. Etoposid, Prednison) in Kombination mit dem humanisierten, monoklonalen Antikörper Rituximab, welcher an das Transmembran-Antigen CD20 (engl. *cluster of differentiation*) auf prä-B- und reifen B-Lymphozyten sowie den entsprechenden neoplastischen Zellen bindet, was eine Zellyse zur Folge hat (Preiß et al. 2008). Nachdem für die Raten von Inzidenz und Mortalität jahrelang ein Anstieg zu verzeichnen war, sind die Werte für beide Parameter seit der Jahrtausendwende wieder rückläufig. Die 5-Jahres-Überlebensrate wird je nach Publikation mit etwa 30 bis 80 % (abhängig von Alter, Geschlecht und Subtyp) angegeben und ist damit deutlich schlechter als beim Hodgkin-Lymphom (Husmann et al. 2010; Pfreundschuh et al. 2004 a und b).

## 1.2 Das Zytokin Interleukin-10

Als Zytokine bezeichnet man Glykoproteine, welche von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellarten gebildet sowie sezerniert werden und eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung von Homöostase und Modulation des Immunsystems einnehmen (Hofmann et al. 2002). Die Produktion der verschiedenen Zytokine wird in erster Linie durch Antigenkontakt induziert, erfolgt jedoch auch in Abhängigkeit von genetischen Komponenten, weshalb neben Unterschieden zwischen ethnischen Gruppen auch individuelle Unterschiede bestehen (Eskdale et al. 1998; Gibson et al. 2001; Turner et al. 1997). Die Höhe der Expression einzelner Zytokine wird durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren sowie eine Zelltyp-spezifische Chromatinstruktur reguliert (Holloway et al. 2002).

Zytokine werden im Wesentlichen in die drei Hauptgruppen Interferone (Abk. IFN), Interleukine (Abk. IL) und Tumornekrosefaktoren (Abk. TNF) unterteilt. Interleukine werden von Leukozyten sezerniert und weisen analog zu ihrer Vielzahl an Untergruppen zahlreiche Funktionen auf. So sind sie beispielsweise für die Regulation von Proliferation und Differenzierung von Zellen verantwortlich.

Bei dem Zytokin Interleukin-10 handelt es sich um eine Schlüsselkomponente in der Regulation der Immunantwort. IL-10 ist Teil eines balancierten Netzwerkes, welches sich aus zahlreichen unterschiedlichen Zytokinen zusammensetzt, und wird von einer Vielzahl gesunder als auch neoplastischer Zellen produziert, so beispielsweise von Makrophagen und Monozyten, aber auch von B-Lymphozyten oder Untergruppen von

T-Lymphozyten (Lalani et al. 1997; Moore et al. 1993). IL-10 weist ausgeprägte antiinflammatorische Eigenschaften auf, da dessen Anwesenheit zur konsekutiven Herabregulierung anderer Zytokine wie z. B. IL-1, IL-8, IFN- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$  führt (de Waal et al. 1991). Desweiteren werden durch IL-10 Makrophagen, natürliche Killerzellen sowie T-Lymphozyten inhibiert, welche im Rahmen inflammatorischer Reaktionen sowohl zur Elimination des Pathogens beitragen als auch Gewebeschäden verursachen können. Neben der Regulation entzündlicher Prozesse ist IL-10 an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten wie beispielsweise dem systemischen Lupus Erythematoses oder der rheumatoiden Arthritis sowie bei Komplikationen im Rahmen von Transplantationen beteiligt (Cavet et al. 1999; D'Alfonso et al. 2000; Eskdale et al. 1997; Hajeer et al. 1998; Tagore et al. 1999). Auch spielt IL-10 eine zentrale Rolle bei der Entstehung infektiöser Erkrankungen wie der Malaria tropica oder von EBV-assoziierten Tumoren (Beatty et al. 1997; Kurtzhals et al. 1998).

#### *IL-10 und Non-Hodgkin-Lymphome*

IL-10 fungiert als autokriner Wachstumsfaktor für humane B-Lymphozyten und ist in die Pathophysiologie von Non-Hodgkin-Lymphomen involviert (Benjamin et al. 1994; Blay et al. 1993). Eine deregulierte Immunantwort, für welche beispielsweise ein spezifisches Zytokin, das im Bereich eines Tumors eine akute oder chronische Entzündungsreaktion hervorruft, ursächlich sein kann, könnte sowohl mit dem Auftreten als auch dem klinischen Verlauf einer Lymphomerkrankung assoziiert sein (Lin et al. 2007). Einerseits ist IL-10 dazu in der Lage, neben der Tumorprogression die -dissemination zu fördern, da es beispielsweise durch eine Hemmung von regulatorischen T-Zellen immunsupprimierend wirkt - maligne Zellen somit nicht durch das Immunsystem eliminiert werden - sowie die Proliferation und Differenzierung von Zellen stimuliert (Moore et al. 2001). Andererseits kann die Gegenwart von IL-10 auch zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen, da es der Angiogenese im Mikromilieu des Tumors entgegenwirkt (Cervenak et al. 2000).

IL-10 konnte im Serum von akut erkrankten NHL-Patienten detektiert werden, wohingegen der Nachweis bei Patienten, die sich in teilweiser oder kompletter Remission befanden, nur selten, bei gesunden Kontrollprobanden hingegen überhaupt nicht gelang. Bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen in intermediären und späten Stadien war der Nachweis von IL-10 im Serum mit einer schlechten Prognose verbunden (Blay et al. 1993; Lech-Maranda et al. 2006).

### 1.2.1 Genvariationen bei Zytokinen

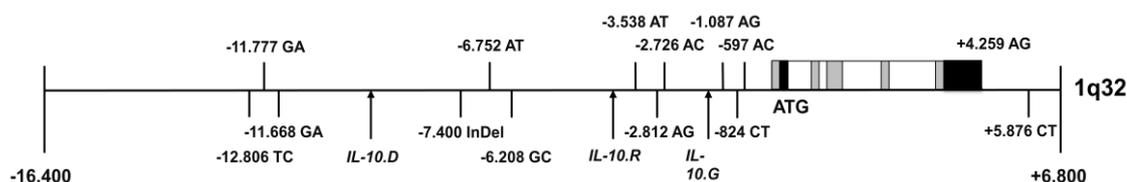
Genetische Varianten sind im Bereich des gesamten humanen Genoms zu finden und können mit einer Veränderung des Genprodukts - dem Protein - einhergehen. Der anteilig häufigste Mutationstyp ist die sogenannte Punktmutation. Hierbei ist es zum Austausch von lediglich einer Base gekommen. Wenn sich diese Punktmutation im Bereich einer kodierenden DNA-Sequenz (engl. *deoxyribonucleic acid*) befindet, spricht man von einem *single nucleotide polymorphism* (Abk. SNP). Man unterscheidet kodierende SNPs, die mit einem Aminosäureaustausch im Protein einhergehen, von den weitaus häufigeren regulatorischen SNPs, welche sich im Bereich von Intron-Sequenzen sowie 3'- und 5'-untranslatierten Regionen befinden. Bis heute wurden mehrere Millionen SNPs identifiziert und in einer öffentlichen Datenbank zugänglich gemacht (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Da die klinische Relevanz der überwiegenden Anzahl an SNPs jedoch noch nicht bekannt ist, versuchen Konsortien wie das *International HapMap Project*, Aussagen über eine mögliche Assoziation von SNPs mit diversen Krankheiten treffen zu können.

Zahlreiche Veröffentlichungen unterstützen die Hypothese, dass Polymorphismen innerhalb von Genen, die an immunologischen - respektive inflammatorischen - Reaktionen beteiligt sind, sowohl die Suszeptibilität für unterschiedliche Tumorarten beeinflussen als auch Auswirkungen auf den klinischen Verlauf hinsichtlich therapiebedingter Nebenwirkungen haben könnten (Hollegaard et al. 2006; Howell et al. 2002 und 2006; Lossos et al. 2006). Regulatorische Polymorphismen scheinen zumindest teilweise dafür verantwortlich zu sein, wie die Immunantwort bei verschiedenen Individuen ausfällt (Hill et al. 2001). Desweiteren wird angenommen, dass Polymorphismen in regulatorischen Regionen die Expressionshöhe von Zytokinen bestimmen könnten. So wurde nachgewiesen, dass Genpolymorphismen zu unterschiedlicher *In-vitro*-Expression pro- oder antiinflammatorischer Genprodukte führen sowie die Suszeptibilität für gutartige immunologisch vermittelte Erkrankungen und einige Darmerkrankungen beeinflussen (Howell et al. 2002).

#### *IL-10-Genvariationen und Non-Hodgkin-Lymphome*

Da IL-10 wie bereits aufgeführt erheblich zur Modulation der Immunantwort beiträgt, könnten Polymorphismen in regulatorischen Bereichen des IL-10-Gens - einhergehend mit einer unterschiedlich hohen Expression des Genprodukts - in die Pathophysiologie von Non-Hodgkin-Lymphomen involviert sein. Im Bereich der Promotorregion des IL-10-Gens wurden die proximalen Genvariationen IL-10-1.087AG, IL-10-824CT und IL-10-597AC am häufigsten analysiert. Von den distalen Polymorphismen wurden bisher

insbesondere IL-10-7400InDel, IL-10-6.752AT, IL-10-6.208GC und IL-10-3.538AT untersucht (Kube et al. 2001). In *Abbildung 1* ist der IL-10-Genlocus, lokalisiert auf Chromosom 1 zwischen q31 und q32, einschließlich der bisher beschriebenen Genvariationen, Mikrosatelliten und einer Insertion/Deletion schematisch dargestellt.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des IL-10-Genlocus.** Abgebildet sind der IL-10-Genlocus auf Chromosom 1q31/32 (-16.400 bp bis +6.800 bp) einschließlich SNPs und der Insertion/Deletion bei -7.400 bp, weiterhin die Mikrosatelliten IL-10.R und IL-10.G sowie die komplexe repetitive Sequenz IL-10.D (letztere drei jeweils kursiv). Zwischen den Genvariationen IL-10-597AC und IL-10+4.259AG befinden sich Exons (grau), Introns (weiß) sowie die UTR (engl. *untranslated region*, schwarz).

Mithilfe einer *In-vitro*-Stimulation von Leukozyten des peripheren Blutes mit Lipopolysaccharid (Abk. LPS) wurde nachgewiesen, dass die IL-10-Produktion großen interindividuellen Schwankungen unterliegt (Gibson et al. 2001; Mörmann et al. 2004; Rieth et al. 2004; Turner et al. 1997). Dabei kann die höchstmögliche IL-10-Sekretion das 20-fache der niedrigsten IL-10-Sekretion betragen (Mörmann et al. 2004). Je nach Arbeitsgruppe beruhen 50 bzw. bis zu 75 % dieser Unterschiede auf genetischen Faktoren (Reuss et al. 2002; Westendorp et al. 2001); beispielsweise besteht vermutlich ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen im Bereich der 5'-Region des IL-10-Gens sowie der Sekretionshöhe (Turner et al. 1997). Desweiteren lassen sich interindividuelle Unterschiede des IL-10-Spiegels möglicherweise auf der Transkriptionsebene erklären, da IL-10-Allele in Zellen heterozygoter Individuen unterschiedlich transkribiert werden und IL-10-Haplotypen ggf. die Produktion von IL-10 beeinflussen (Kurreeman et al. 2004). Die individuellen Unterschiede bei der Produktionshöhe von IL-10 haben laut Arbeitsgruppe von Mörmann verschieden ausgeprägte Reaktionen des Immunsystems zur Folge (Mörmann et al. 2004); so konnte nachgewiesen werden, dass hohe IL-10-Werte im Serum von Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom mit einer schlechten Prognose einhergehen (Blay et al. 1993; Lech-Maranda et al. 2006). Auch könnte der klinische Verlauf von DLBCL-Patienten mit bestimmten Promotorpolymorphismen des IL-10-Gens, welche eine niedrige IL-10-Produktion zur Folge haben, assoziiert sein (Cunningham et al. 2003). Weiterhin wurde beobachtet, dass der proximale Promotorpolymorphismus IL-10-1.087AG im Zusammenhang mit dem IL-10-Serumwert sowie dem klinischen Verlauf von

Patienten mit DLBCL steht (Lech-Maranda et al. 2004). Diese Ergebnisse konnten von einer skandinavischen Arbeitsgruppe jedoch nicht validiert werden, was unter anderem darauf zurückzuführen sein könnte, dass sich die analysierten Patientenkollektive erheblich bezüglich des durchschnittlichen Alters unterschieden und die Altersverteilung insgesamt eher untypisch für die Erkrankung an einem DLBCL war (Berglund et al. 2005). Eine andere Studie legte nahe, dass bei AIDS-Patienten (engl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) mit Genotypen, die mit einer hohen IL-10-Produktion korrelieren, das Risiko, an einem Lymphom zu erkranken, erhöht ist (Breen et al. 2003). Distale Promotorpolymorphismen scheinen in diesem Zusammenhang eine hohe biologische Signifikanz aufzuweisen (Gibson et al. 2001). So konnte die eigene Arbeitsgruppe nachweisen, dass der Genotyp IL-10<sub>-7.400DelDel</sub> (Deletion der Basenabfolge GGA) bei NHL-Patienten mit einem signifikant kürzeren kumulativen Gesamtüberleben assoziiert ist (Kube et al. 2008). Die 3-Jahres-Überlebensrate wurde mit 43,4 % angegeben, während sie bei Patienten mit den Genotypen IL-10<sub>-7.400InIn</sub> sowie IL-10<sub>-7.400InDel</sub> zusammengenommen 73,4 % betrug. Das relative Risiko für einen schlechten klinischen Verlauf für Patienten mit dem Genotyp IL-10<sub>-7.400DelDel</sub> ist mit 1,9 hingegen erhöht; der Genotyp IL-10<sub>-7.400DelDel</sub> tritt bei Kaukasiern jedoch nur selten auf (Kube et al. 2008). Eine signifikant verminderte Wahrscheinlichkeit für ereignisfreies Überleben war mit dem Haplotypen TCA der drei distalen Genvariationen IL-10<sub>-6.752TT</sub>, IL-10<sub>-6.208CC</sub> sowie IL-10<sub>-3.538AA</sub> assoziiert (Kube et al. 2008).

Bei Kenntnis der vorliegenden IL-10-Genvariationen könnte folglich der klinische Verlauf von Patienten mit aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen prädiktiert werden. Um diese Hypothese zu stärken, müssen jedoch weitere Polymorphismen und größere Patientenkollektive untersucht werden.

### 1.3 Zielstellung der Dissertation

Die in dieser Dissertation betrachteten Non-Hodgkin-Lymphome sind dank der aktuellen Therapiestrategien prinzipiell heilbar. Dennoch gibt es eine Vielzahl von Patienten, bei denen die Therapie nicht zur Remission führt oder mit einer hoher Toxizität assoziiert ist. Weiterhin kann das Risiko für das Auftreten eines Zweittumors erhöht sein. Um die Therapie dieser Patientengruppe langfristig mittels Steigerung der Effektivität bei simultaner Reduktion der Toxizität zu optimieren, erfolgte die Analyse von IL-10-Genvariationen bei diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen. Ziel war es, herauszufinden, ob bestimmte Genvariationen des IL-10-Genlokus bisher unentdeckte Risikofaktoren für einen schlechten klinischen Verlauf von DLBCL-Patienten darstellen könnten. Da eine Vorarbeit der Arbeitsgruppe nachweisen konnte, dass der Genotyp

IL-10<sup>-7.400DelDel</sup> mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist, dieser bei Kaukasiern jedoch nur selten auftritt, wurden in der vorliegenden Dissertation weitere distale IL-10-Genvariationen analysiert, von denen man sich eine höhere klinische Relevanz versprach (Kube et al. 2008). Weiterhin sollte untersucht werden, ob Genvariationen des IL-10-Genlokus die Expressionshöhe von IL-10 in B-Zellen beeinflussen können, welche mit dem klinischen Verlauf von Patienten mit aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen korrelieren könnte.

Mithilfe neuer klinisch relevanter und praktisch anwendbarer prognostischer Faktoren könnten die bestehenden Therapiemöglichkeiten dem individuellen Risikoprofil von jedem betroffenen Patienten entsprechend angepasst und somit optimiert werden.

## 2 Material

### 2.1 Biologisches Material

#### *Zelllinien*

In der vorliegenden Dissertation kamen 31 LCL-Zellen (engl. *lymphoblastoid cell line*, Bezeichnung bspw. 7/3 oder 9/1) zum Einsatz, welche zuvor von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender gewonnen und mittels Infektion mit EBV immortalisiert worden waren. Die DNA dieser Zellen wurde mittels SNaPshot analysiert und teilweise auch sequenziert.

Desweiteren wurden 25 LCL-Zellen des internationalen HapMap-Projektes verwendet, welche von Dr. Mladen Tzvetkov zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zellen wurden mittels ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) und SNaPshot analysiert sowie für die Bestimmung der IL-10-Genexpression mithilfe von *Real-Time* PCRs (engl. *polymerase chain reaction*) und Analysen von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen eingesetzt.

#### *DNA von Lymphompatienten*

Für die Analyse von IL-10-Genvariationen bei Lymphompatienten wurde DNA aus dem Kollektiv der NHL-B1-/B2-Studien der Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (Abk. DSHNHL) eingesetzt; ein positives Ethik-Votum liegt vor (Antragsnummer 4/11/01). Im Rahmen dieser Studien wurde untersucht, ob die Gabe von CHOP im Abstand von zwei Wochen anstelle der sonst üblichen drei Wochen sowie die zusätzliche Applikation von Etoposid die Therapieerfolge bei Patienten mit aggressivem Non-Hodgkin-Lymphom verbessern kann (Pfreundschuh et al. 2004 a und b). Aus dem Gesamtkollektiv (n = 1.697) wurde eine Kohorte von 594 Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom ausgewählt, welche als repräsentativ für alle an einem DLBCL erkrankten Personen innerhalb der NHL-B1-/B2-Studien betrachtet werden kann. *Tabelle 1* führt klinische Charakteristika, die histologische Verteilung der Subtypen sowie die unterschiedlichen Therapieschemata des untersuchten Patientenkollektivs sowie des Gesamtkollektivs der NHL-B1-/B2-Studien auf. Die mediane Beobachtungszeit des ausgewählten Patientenkollektivs betrug 56,3 Monate, die des Gesamtkollektivs 58,1 Monate.

**Tabelle 1: Klinische Charakteristika, Histologien und Therapieschemata von DLBCL-Patienten der NHL-B1-/B2-Studien**

	untersuchtes Patientenkollektiv (n = 594)	Gesamtkollektiv aller Patienten mit DLBCL (n = 913)
<b>Klinische Charakteristika</b>		
Geschlecht: männlich	319 (53,7 %)	507 (55,5 %)
weiblich	275 (46,3 %)	406 (44,5 %)
durchschnittliches Alter (min./max.)	62 (22/75)	61 (18/75)
Serum-LDH oberhalb des Referenzwertes	150 (25,3 %)	225 (24,6 %)
Alter > 60 Jahre	319 (53,7 %)	489 (53,6 %)
ECOG Performance-Status > 1	74 (12,5 %)	110 (12,1 %)
Ann Arbor Klassifikation > II	238 (40,1 %)	371 (40,6 %)
> 1 extranodale Manifestation	108 (18,2 %)	166 (18,2 %)
International Prognostic Index (IPI):		
low (0 Punkte, 1 Punkt)	343 (57,7 %)	531 (58,2 %)
low intermediate (2 Punkte)	111 (18,7 %)	164 (18,0 %)
high intermediate (3 Punkte)	85 (14,3 %)	131 (14,4 %)
high (4 oder 5 Punkte)	55 (9,3 %)	87 (9,5 %)
B-Symptome	164 (27,6 %)	247 (27,1 %)
<i>bulky disease</i>	199 (33,5 %)	296 (33,4 %)
Extranodalbefall	286 (48,2 %)	448 (49,1 %)
Knochenmarkbefall	51 (8,6 %)	72 (7,9 %)
<b>Histologien</b>		
diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	594 (100 %)	913 (100 %)
zentroblastisch	139 (23,4 %)	198 (21,7 %)
monomorph	54 (9,1 %)	83 (9,1 %)
multilobulär	31 (5,2 %)	57 (6,2 %)
polymorph	230 (38,7 %)	349 (38,2 %)
immunoblastisch	72 (12,1 %)	114 (12,5 %)
anaplastisch	20 (3,4 %)	28 (3,1 %)
T-Zell-reich	13 (2,2 %)	24 (2,6 %)
nicht spezifiziert	35 (5,9 %)	60 (6,6 %)
<b>Therapieschemata</b>		
CHOP-14	154 (25,9 %)	227 (24,9 %)
CHOEP-14	159 (26,8 %)	235 (25,7 %)
CHOP-21	135 (22,7 %)	219 (24,0 %)
CHOEP-21	146 (24,6 %)	232 (25,4 %)

Das vorliegende Patientenmaterial wurde mittels SNaPshot-Analysen in Hinblick auf vier unterschiedliche Polymorphismen des IL-10-Gens untersucht.

### *DNA von gesunden Spendern*

Für die Analyse von Genvariationen bei gesunden Kontrollprobanden kam DNA von insgesamt 91 nicht verwandten Spendern zum Einsatz, die zuvor von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe aus *Buffy coats* isoliert worden war (Bezeichnung: ‚Gö‘ plus Ziffernfolge, z. B. Gö299). Auch hier war das alleinige Ausschlusskriterium das Vorliegen einer chronischen Erkrankung. Diese Proben wurden mittels SNaPshot analysiert und teilweise auch sequenziert.

## 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche in *Tabelle 2* aufgeführten und verwendeten Chemikalien wiesen jeweils den höchsten Reinheitsgrad auf. Plastik-Einmalartikel und Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Zellkulturflaschen stammten von den Firmen Applied Biosystems (USA), Biozym (Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Gilson (Limburg), Greiner (Nürtingen), Nalgene Labware (Dänemark), Nunc (Wiesbaden) und Sarstedt (Nürnbrecht).

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
10x NEBuffer 4	New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland
10x PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
18S	Applied Biosystems, USA
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BSA	Serva, Heidelberg, Deutschland
BSA (Zellkultur-getestet)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, Mannheim, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	J.T.Baker, Niederlande
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Exonuclease 1 (10 U/ $\mu$ l)	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fnu4HI (5.000 U/ml)	New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland
Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
GeneScan™ 120 LIZ® Size Standard	Applied Biosystems, USA
GeneScan™ 400HD ROX™ Size Standard	Applied Biosystems, USA
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, USA
L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Niederlande
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Natriumazid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ROTI®GAROSE	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-1640 Zellkulturmedium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SAP (1 U/μl)	USB, United Kingdom
SAP 10x Reaction Buffer	USB, United Kingdom
Schwefelsäure	J.T. Baker, Niederlande
Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween® 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

## 2.3 Medien und Puffer

Die jeweiligen Zusammensetzungen regelmäßig verwendeter Medien und Puffer sind in *Tabelle 3* wiedergegeben.

**Tabelle 3: Verwendete Medien und Puffer**

<b>Zellkultur</b>	
Einfriermedium:	90 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO
Nährmedium:	RPMI-1640 10 % (v/v) FCS 200 U/ml Penicillin 200 μg/ml Streptomycin 4 mM L-Glutamin
<b>Gelelektrophorese</b>	
TBE-Puffer:	54 g Tris 27,5 g Borsäure 20 ml EDTA 0,5 M

## 2.4 Häufig verwendete Geräte

In *Tabelle 4* sind die bei dieser Dissertation häufig verwendeten Geräte aufgeführt.

**Tabelle 4: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, USA

7900 HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, USA
Brutschrank Cytoperm	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Electrophoresis Power Supply ST 304	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Biotec-Fischer, Reiskirchen, Deutschland
HERAfreeze® -80°C Kühleinheit	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
KS 260 Schüttler	IKA, Staufen, Deutschland
IKAMAG® RCT Heizplatte/Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland
Mastercycler 384	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Microflow Laminar Downflow Workstation	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Mikrokühlzentrifuge 1-15 K	Sigma, Osterode, Deutschland
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Stuttgart, Deutschland
MULTIFUGE 3 L-R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Premium Kühlschrank	Liebherr, Dortmund, Deutschland
PTC-100™ Programmable Thermal Controller	MJ Research, USA
Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
T3000 Thermocycler	Biometra, Jena, Deutschland
Telaval 31 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Thermocycler 60	Bio-med, Theres, Deutschland
Ultra Low -150°C Kühleinheit	Sanyo, Japan
UV-Transilluminator TI 3 und Videosystem	Biometra, Jena, Deutschland
Vortex-Genie 2®	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Hänigsen, Deutschland

## 2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

*Tabelle 5* listet sämtliche gebrauchsfertigen Reaktionssysteme auf, welche in dieser Dissertation zur Anwendung kamen.

***Tabelle 5: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme***

Bezeichnung	Hersteller
ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit	Applied Biosystems, USA
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1	Applied Biosystems, USA
DyeEx™ 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
IL-10 Eli-pair ELISA Kit	Diaclone, Gießen, Deutschland
QIAamp™ DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy™ Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems, USA

## 2.6 Oligonukleotide

In *Tabelle 6* sind die Sequenzen der in dieser Dissertation eingesetzten Oligonukleotide sowie deren Verwendungszweck aufgelistet. Die Nummerierung basiert auf der von der eigenen Arbeitsgruppe publizierten IL-10-Sequenz (Kube *et al.* 2001). Die Herstellung erfolgte überwiegend durch die Firma IBA (Göttingen); lediglich die für den *Multiplex Assay* eingesetzten Oligonukleotide stammen von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

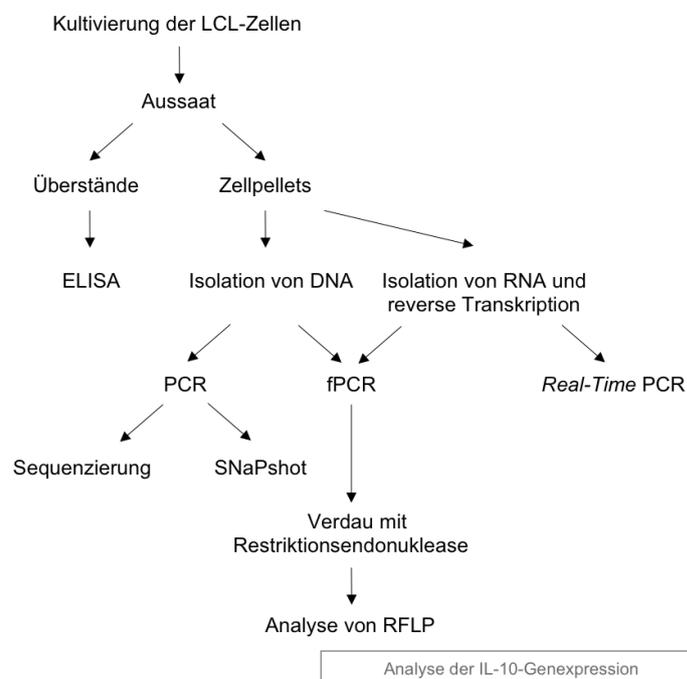
**Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide**

Name	Sequenz	Verwendung
6-FamIL10+4.259antisense	(6-FAM)AATAACAAGCTGGCCACAGC	PCR (IL-10-Genexpression)
6-FamIL10+4.259sense	(6-FAM)ACTGAGCTTCTCTGTGAACG	PCR (IL-10-Genexpression)
HexIL10+4.259antisense	(HEX)AATAACAAGCTGGCCACAGC	PCR (IL-10-Genexpression)
HexIL10+4.259sense	(HEX)ACTGAGCTTCTCTGTGAACG	PCR (IL-10-Genexpression)
IL10-11.668AG	5'GATCGATCGATCGATCGATCGATCA GCCTGAGCCAGTCAGTCTTTCTACT'3	Multiplex Assay
IL10-11.777AG	5'AGCCCTTGGATTATTGATGC'3	Multiplex Assay
IL10-12.806CT	5'GACTAGATCGATCGATCGATTATGT TTGTGTTCCATGGGT'3	Multiplex Assay
IL10+545Ex5	5'GATCCTGGTTTCTCTTCCTAAGAGTA TTTG'3	Multiplex Assay
IL10-12.800-rev	GTTTCACGAAAGCGGCTAAG	PCR
IL10+4.259antisense	AATAACAAGCTGGCCACAGC	PCR
IL10+4.259sense	ACTGAGCTTCTCTGTGAACG	PCR
IL10-12.800-fwd	CTGTCCCAGCTCACAGATCA	PCR, Sequenzierung
Random Hexamer Primer	NNNNNN	Reverse Transkription
IL10-11.250-rev	GCTCTGTCTTTGGGCTTGTC	Sequenzierung
IL10-12.000-fwd	ACAGGTGAACACACGCAAAA	Sequenzierung
IL10-12.500-rev	TGTACTTGGCTCCTGACGTG	Sequenzierung
qRT_IL-10_fwd	AAGACCCTCAGGCTGAGGCTAC	SYBR Green qRT-PCR
qRT_IL-10_rev	CCACGGCCTTGCTCTTGTT	SYBR Green qRT-PCR

## 3 Methoden

### 3.1 Übersicht

Um die Zielstellung dieser Dissertation verwirklichen zu können, wurde eine Vielzahl etablierter Methoden angewandt; parallel konnte die bereits bekannte SNaPshot-Analyse zu einem *Multiplex Assay* weiterentwickelt werden. Durch Kultivierung der LCL-Zellen wurden Überstände gewonnen, die mittels ELISA auf den Grad ihrer IL-10-Sekretion untersucht wurden. Außerdem wurde DNA isoliert, welche mithilfe verschiedener PCRs amplifiziert und daraufhin sowohl für Sequenzierungen, SNaPshot als auch die Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen eingesetzt wurde. Sequenzierungen und SNaPshot-Analysen dienen der Genotypisierung der vorliegenden Proben. Weiterhin erfolgte die Isolation von RNA (engl. *ribonucleic acid*) sowie die darauf folgende reverse Transkription zu cDNA (engl. *complementary DNA*), welche ebenfalls zur Fragmentlängenanalyse sowie für eine *Real-Time PCR* eingesetzt wurde. Letztere beiden Methoden wurden mit dem Ziel angewendet, die IL-10-Transkriptmengen zu quantifizieren. *Abbildung 2* informiert über die exakte Versuchsabfolge.



**Abbildung 2: Versuchsabfolge.** fPCR: fluoreszenzmarkierte PCR. RFLP: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen.

## 3.2 Methoden der Zellkultur

### 3.2.1 Auftauen und Kryokonservierung der Zellen

Die bei  $-150^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und zügig in jeweils 10 ml Nährmedium überführt. Nach Sedimentation für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 750 rpm wurde der Überstand vollständig abgenommen. Daraufhin erfolgte die Resuspension der Zellen mit jeweils 5 ml frischem Nährmedium und die Überführung in Zellkulturflaschen mit Belüftungskappe zur anschließenden Lagerung im Brutschrank.

Zwecks Kryokonservierung wurden der Zellkultur etwa  $1 \times 10^6$  Zellen entnommen und diese für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 750 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 0,5 ml Einfriermedium resuspendiert sowie in Kryoröhrchen überführt. Daraufhin erfolgte über Nacht die Lagerung in einer mit Isopropanol-gefüllten Einfrierbox bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , wodurch eine langsame und somit zellverträgliche Absenkung der Temperatur um  $1^{\circ}\text{C}$  pro Minute bis auf  $-80^{\circ}\text{C}$  möglich war. Am nächsten Tag wurden die Kryokulturen bei  $-150^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

### 3.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 90 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator. Je nach Proliferation wurde alle zwei bis drei Tage frisches, vorgewärmtes Nährmedium hinzugegeben. Abhängig vom Volumen der Zellsuspensionen wurden diese in  $25 \text{ cm}^2$  (5 bis 10 ml),  $75 \text{ cm}^2$  (30 bis 50 ml) oder  $175 \text{ cm}^2$  (50 bis 120 ml) Zellkulturflaschen inkubiert.

Im Falle eines nicht zufriedenstellenden Wachstums wurden die Zellen mit konditioniertem Nährmedium versetzt, welches aus steril gefiltertem Überstand gut wachsender LCL-Zellen hergestellt wurde.

### 3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels Verwendung einer Neubauer improved-Zählkammer bestimmt, indem die Zellen in einem definierten Volumen mithilfe eines Mikroskops gezählt wurden. Das Ergebnis ließ sich daraufhin in „Zellen pro ml“ umrechnen. Um tote von vitalen Zellen unterscheiden zu können, erfolgte zuvor die Anfärbung mit Trypanblaulösung (0,5 % (w/v) Trypanblau in *phosphate buffered saline* (Abk. PBS). Da nur bereits abgestorbene Zellen für den Farbstoff permeabel sind, waren diese folglich leicht zu erkennen.

### 3.2.4 Gewinnung von Überständen für ELISA

Um für die Messung der IL-10-Sekretion mittels ELISA standardisierte Bedingungen zu erreichen, wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Abstand von einer Woche Überstände der kultivierten Zellen gewonnen. Hierfür wurden die Zellsuspensionen an Tag 1 für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 750 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die verbleibenden Zellpellets in frischem Medium resuspendiert. Mithilfe der Neubauer improved-Zählkammer erfolgte die Einstellung auf  $5 \times 10^5$  Zellen/ml, woraufhin das Zielzellvolumen in Zellkulturflaschen überführt, mit Nährmedium versetzt und über Nacht im Brutschrank inkubiert wurde.

An Tag 2 wurden die Zellsuspensionen erneut für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 750 rpm zentrifugiert. Auch dieses Mal wurden die Überstände verworfen, die verbleibenden Zellpellets mit 10 ml PBS gewaschen sowie unter den soeben genannten Bedingungen nochmals sedimentiert. Nachdem die Überstände verworfen wurden, erfolgte die Zugabe von frischem Medium. Die Zellsuspensionen wurden wieder auf  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. An Tag 3 erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 4°C und 1.000 rpm, woraufhin pro Probe je zwei Mal 1 ml Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert wurde.

### 3.2.5 Vorbereitung der Zellen für die Isolation von RNA

Der nächste Schritt bestand in der Vorbereitung der verbliebenen Zellpellets für die RNA-Isolation. Hierfür wurden diese in je 1 ml PBS gelöst und für zehn Minuten bei 4°C und 2.300 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurden die Überstände verworfen, die Zellpellets mit 350 µl RLT-Puffer und 1 % β-Mercaptoethanol resuspendiert sowie bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

## 3.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 Isolation von genomischer DNA

Die Isolation von genomischer DNA aus kultivierten LCL-Zellen erfolgte mithilfe des QIAamp™ DNA Blood Mini Kits gemäß Protokoll. Für die Isolation wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die gewonnene DNA wurde in einem Volumen von 100 µl eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### 3.3.2 Isolation von RNA und reverse Transkription

Die Isolation von RNA aus den vorbereiteten Zellsuspensionen (siehe Punkt 3.2.5) erfolgte mithilfe des RNeasy™ Mini Kits nach Vorgaben des Herstellers. Die RNA wurde in einem Volumen von 40 µl eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

Unter Verwendung des Kits SuperScript™ II Reverse Transcriptase erfolgte die reverse Transkription der zuvor gewonnenen RNA zu Erststrang-cDNA. 2 µl Random Hexamer Primer (100 µM), 3 µg RNA sowie destilliertem Wasser (Abk. dH<sub>2</sub>O, ad 9 µl) wurden für zehn Minuten bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Daraufhin wurde der Reaktionsansatz mit 4 µl 5x Erststrang-Puffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl SuperScript™ II RT (200 U/µl), 1 µl Desoxyribonukleosid-Triphosphat-Mix (Abk. dNTP, je 10 mM) sowie 1 µl dH<sub>2</sub>O versetzt, kurz abzentrifugiert, für 60 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend 10 Minuten lang bei 65°C inaktiviert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die zu cDNA umgeschriebene RNA bei -20°C gelagert.

### 3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration isolierter DNA sowie RNA erfolgte mittels photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Verwendung des NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometers.

### 3.3.4 Genotypisierungsanalysen

#### *PCR-Analysen*

Mittels PCR wurden die bereits vorliegenden DNA-Proben amplifiziert. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 5 µl 10x PCR-Puffer, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 1 µl IL10+4.259antisense Primer (10 µM), 1 µl IL10+4.259sense Primer (10 µM) und 0,3 µl Taq Polymerase zusammen. Desweiteren wurden 100 ng DNA sowie doppelt destilliertem Wasser (Abk. ddH<sub>2</sub>O, ad 50 µl) hinzugefügt. Nachfolgend die exakten PCR-Konditionen:

(a)	Schritt 1	95°C	5 min	
	Schritt 2	60°C	3 min	
	Schritt 3	72°C	2 min	
	Schritt 4	95°C	30 sec	
	Schritt 5	60°C	30 sec	
	Schritt 6	72°C	30 sec	→ Schritte 4 bis 6: 40 Zyklen

---

Schritt 7	72°C	10 min	
-----------	------	--------	--

Desweiteren erfolgte die Amplifikation von DNA-Fragmenten, welche die distalen Genvariationen IL-10<sub>-12.806TC</sub> (rs17015865), IL-10<sub>-11.777GA</sub> (rs4072227) sowie IL-10<sub>-11.668GA</sub> (rs4072226) beinhalteten. Der Reaktionsansatz entsprach dem oben aufgeführten, als Primer wurden die Oligonukleotide IL10-12.800-fwd sowie IL10-12.800-rev (je 10 µM) eingesetzt. Nachfolgend die exakten PCR-Konditionen:

(b)	Schritt 1	95°C	240 sec	
	Schritt 2	94°C	45 sec	
	Schritt 3	63°C	60 sec	
	Schritt 4	72°C	300 sec	→ Schritte 2 bis 4: 10 Zyklen
	Schritt 5	94°C	45 sec	
	Schritt 6	57°C	60 sec	
	Schritt 7	72°C	150 sec	→ Schritte 5 bis 7: 25 Zyklen
	Schritt 8	72°C	1 h	

Außerdem wurden PCRs mit fluoreszenzmarkierten Primern durchgeführt. 1 ng DNA wurde mithilfe der Oligonukleotide HexIL10+4.259antisense und HexIL10+4.259sense (10 µM) amplifiziert, 500 ng zu cDNA umgeschriebene RNA mithilfe der Oligonukleotide 6-FamIL10+4.259antisense sowie 6-FamIL10+4.259sense. Auch hier entsprach ein Reaktionsansatz dem oben aufgeführten; die PCR-Konditionen sind bereits unter (b) wiedergegeben.

Der Erfolg der jeweiligen DNA-Amplifikationen wurde mithilfe eines 1%igen Agarose-Gels überprüft.

#### *DNA-Sequenzierung*

Zunächst wurden die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente mithilfe des QIAquick™ PCR Purification Kits gemäß Protokoll aufgereinigt. Daraufhin erfolgte die Analyse der Nukleotidsequenzen unter Verwendung des BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kits v1.1. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 0,5 µl Primer (10 pmol/µl, *forward* bzw. *reverse*), 1,5 µl Sequenzierungsmix und 1,25 µl 5x Sequenzierungspuffer zusammen. Diesem wurden 30 ng DNA sowie ddH<sub>2</sub>O (ad 10 µl) hinzugefügt. Die

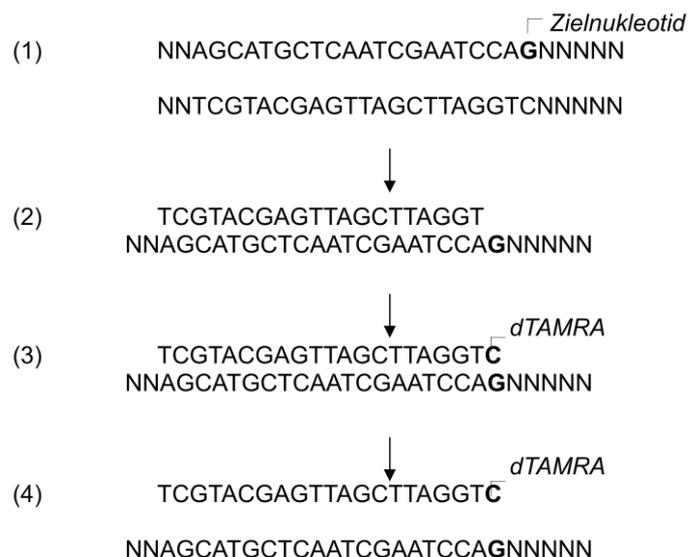
verwendeten Oligonukleotide sind *Tabelle 6* zu entnehmen. Nachfolgend die exakten Inkubationsbedingungen:

Schritt 1	96°C	30 sec	
Schritt 2	50°C	15 sec	
Schritt 3	60°C	240 sec	→ Schritte 1 bis 3: 25 Zyklen

Nachdem die PCR-Fragmente unter Verwendung des DyeEx™ 2.0 Spin Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt worden waren, wurden je 10 µl der Aufreinigungsprodukte mit 10 µl Hi-Di™ Formamide versetzt und mithilfe der Sequencing Analysis Software v5.2 im 3130 Genetic Analyzer sequenziert. Zwecks Durchführung der *Alignments* wurde die Software CLC Free Workbench v.3.2.2 eingesetzt.

#### *SNaPshot*

Zwecks simultaner Genotypisierung mehrerer SNPs wurde die SNaPshot-Analyse zu einem *Multiplex Assay* weiterentwickelt. Das SNaPshot-Verfahren beginnt wie eine PCR mit den Schritten Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Nach der Denaturierung der Doppelstränge zu Einzelsträngen erfolgt genau eine Base vor dem zu untersuchenden SNP die Anlagerung eines Extensionsprimers an das 3'-Ende des Einzelstrangs, was als Primerhybridisierung bezeichnet wird. Während der Elongationsphase bindet dann ein zur Base des SNPs komplementäres Didesoxyribonukleosid-Triphosphat (Abk. ddNTP) an den betreffenden SNP. Da das zum Einsatz kommende ddNTP bereits hydrolysiert ist, wird die Elongation unterbrochen. Weiterhin wurde jedes der vier ddNTPs spezifisch fluoreszenzmarkiert, so dass aufgrund von farblichen Signalen später ermittelt werden kann, welches Allel an der Stelle des SNPs exprimiert wird (A = grün, C = schwarz, G = blau, T = rot). Da gleichzeitig mehrere SNPs untersucht werden sollten, wurden die eingesetzten Primer so gewählt, dass aufgrund unterschiedlicher Sequenzlängen eine spätere Zuordnung zu den jeweiligen SNPs möglich war. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung bereits amplifizierter DNA-Fragmente, um nicht eingebaute ddNTPs sowie überschüssige Primer aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Das Prinzip der SNaPshot-Analyse wird nochmals in *Abbildung 3* dargestellt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der SNaPshot-Analyse.** Nach Denaturierung der Doppelstränge zu Einzelsträngen (1) und Primerhybridisierung (2) bindet ein zum Zielnukleotid komplementäres fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotid an den Primer (3). Der Aufreinigung folgt eine erneute Denaturierung (4). dTAMRA: Fluoreszenzfarbstoff.

Zwecks Aufreinigung wurden je 1,5 µl 10x SAP-Reaktionspuffer mit 3,3 µl SAP, 0,2 µl Exonuklease 1 sowie 10 µl der PCR-Produkte versetzt. Da es sich bei den SNaPshot-Analysen um einen *Multiplex Assay* handelte, mithilfe dessen vier verschiedene SNPs (IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub>, IL-10<sub>-11.668GA</sub>, IL-10<sub>+4.259AG</sub>) simultan untersucht werden sollten, setzten sich die 10 µl PCR-Produkt aus je 5 µl der mithilfe der Oligonukleotide IL10-12.800-fwd und IL10-12.800-rev (IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub>, IL-10<sub>-11.668GA</sub>) sowie IL10+4.259antisense und IL10+4.259sense (IL-10<sub>+4.259AG</sub>) amplifizierten DNA-Fragmente zusammen. Daraufhin erfolgten eine einstündige Inkubation bei 37°C sowie - zwecks Hitzeinaktivierung der Enzyme - ein 15-minütiges Intervall bei 80°C. Der nächste Schritt bestand in der eigentlichen SNaPshot-Reaktion, wobei das ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit zum Einsatz kam. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 0,64 µl SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix, 0,25 µl gepooltem Primer-Mix, 2,11 µl ddH<sub>2</sub>O und 2 µl des aufgereinigten PCR-Produkts zusammen. Der gepoolte Primer-Mix wurde aus den Oligonukleotiden IL10-12.806CT (3,5 µl), IL10-11.777AG (2 µl), IL10-11.668AG (1,5 µl) und IL10+545Ex5 (2 µl) sowie ddH<sub>2</sub>O (ad 100 µl) hergestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen jeweils 100 µM. Die Reaktionen wurden auf einer 384-Loch-Platte durchgeführt, welche nach kurzer Zentrifugation unter folgenden Bedingungen im PTC-100™ Programmable Thermal Controller inkubiert wurde: 96°C für 10 Sekunden, 50°C für 5 Sekunden sowie 60°C für

30 Sekunden bei einer Zyklenanzahl von 24. Im Anschluss erfolgte eine weitere Aufreinigung der Proben, wofür diesen jeweils 0,5 µl SAP sowie 0,5 µl 10x SAP-Reaktionspuffer hinzugegeben wurde. Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen nach dem ersten Aufreinigungsschritt: 37°C für eine Stunde, gefolgt von 80°C für 15 Minuten. Nun konnten die Proben für die endgültige Analyse im 3130 Genetic Analyzer, welche einer Kapillarelektrophorese entspricht, vorbereitet werden. Hierfür wurden je 9,85 µl Hi-Di™ Formamide, 0,15 µl GeneScan™ 120 LIZ® Size Standard sowie 1 µl Restriktionsprodukt (in einer Verdünnung von 1:10) auf einer 96-Loch-Platte bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der GeneScan® Analysis Software v3.1.

#### *Restriktionsendonuklease-Verdau*

Zwecks späterer Bestimmung der IL-10-Transkriptmenge mithilfe einer Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen durchliefen die - nach Durchführung einer PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern - bereits amplifizierte DNA- und zu cDNA umgeschriebenen RNA-Fragmente einen Restriktionsendonuklease-Verdau. Hierfür wurde das Restriktionsenzym Fnu4HI ausgewählt, welches die Schnittstellen 5'...GCNGC...3' sowie 3'...CGNCG...5' erkennt. Ein Reaktionsansatz (50 µl) setzte sich aus 0,5 µl Fnu4HI, 5 µl 10x NEBuffer 4, 19,5 µl ddH<sub>2</sub>O sowie 25 µl PCR-Produkt zusammen. Der Verdau erfolgte zunächst bei 37°C für zwei Stunden, gefolgt von einem 20-minütigen Intervall bei 65°C zwecks Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym. Später wurde dazu übergegangen, den Verdau über Nacht durchzuführen, da die Spaltung auf diese Art und Weise besser gelang. In diesem Falle wurden nur 0,2 µl Fnu4HI eingesetzt und die Proben bei 37°C für 16 Stunden inkubiert. Mithilfe eines 1,3%igen Agarose-Gels wurde überprüft, ob der Restriktionsendonuklease-Verdau erfolgreich war.

### **3.3.5 Analyse der IL-10-Genexpression**

Zwecks Bestimmung der IL-10-Transkriptmenge wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Zum einen erfolgte die Diskriminierung und Quantifizierung unterschiedlicher Transkriptmengen mittels Durchführung von *Real-Time* PCR-Analysen. Weiterhin wurde auf RNA-Ebene eine Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen vorgenommen. Untersucht wurde jeweils der Genpolymorphismus IL-10<sub>+4.259AG</sub>. Da sich dieser im kodierenden Bereich des IL-10-Gens befindet, war folglich auch ein Nachweis auf mRNA-Ebene (engl. *messenger RNA*) möglich.

### *Real-Time PCR-Analysen*

Quantitative *Real-Time* PCR-Analysen wurden mithilfe eines auf SYBR Green basierenden Systems durchgeführt. Bei SYBR Green handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher von doppelsträngiger DNA gebunden wird und bei einer Wellenlänge von 521 nm grünes Licht emittiert. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zu der Menge der PCR-Produkte zu. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 5 µl SYBR® Green Master Mix, 1 µl zuvor zu cDNA umgeschriebener RNA (5 ng), 0,25 µl qRT\_IL-10\_fwd (10 µM), 0,25 µl qRT\_IL-10\_rev (10 µM) und ddH<sub>2</sub>O (ad 10 µl) zusammen. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Als *Housekeeping*-Gen kam 18S zum Einsatz. Die Analysen erfolgten mittels 7900 HT Fast Real-Time PCR System. Nachfolgend die exakten PCR-Konditionen:

Schritt 1	50°C	2 min	
Schritt 2	95°C	10 min	
Schritt 3	95°C	15 sec	
Schritt 4	60°C	60 sec	→ Schritte 3 bis 4: 40 Zyklen

Daraufhin wurde eine Schmelzkurvenanalyse (95°C für 15 sec, 60°C für 15 sec, 95°C für 15 sec) durchgeführt, anhand derer die Fragmentlängen und damit die spezifische Amplifikation eines PCR-Produkts überprüft werden konnten.

### *Bestimmung der relativen Transkript-Menge*

Um einen Amplifikationsplot auswerten zu können, wurde der Schwellenwert in den exponentiellen Bereich der PCR gelegt, da sich hier einzelne Reaktionen untereinander vergleichen lassen. Der CT-Wert (engl. *cycle threshold*) für diese Reaktion entspricht dem Schnittpunkt einer Fluoreszenzkurve mit dem Schwellenwert und gibt Auskunft über den Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant über den Schwellenwert ansteigt. Je geringer der CT-Wert ausfällt, desto höher war die Transkript-Menge der Probe.

Um die relativen RNA-Mengen zu berechnen, wurde die Differenz aus den spezifischen CT-Werten sowie dem CT-Wert des *Housekeeping*-Gens 18S berechnet:

$$CT_{\text{spez.}} - CT_{18S} = \Delta CT$$

### *Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen*

Nach Durchführung des Restriktionsendonuklease-Verdau mit Fnu4H1 erfolgte die Vorbereitung der Proben für die endgültige Analyse im 3130 Genetic Analyzer. Hierfür wurden je 12 µl Hi-Di™ Formamide, 0,15 µl GeneScan™ 400HD ROX™ Size Standard sowie 2 µl Restriktionsprodukt (Zusammensetzung: 1 µl Restriktionsprodukt der zuvor amplifizierten und aufgereinigten DNA sowie 1 µl Restriktionsprodukt der bereits amplifizierten und aufgereinigten zu cDNA umgeschriebenen RNA, jeweils in einer Verdünnung von 1:10) auf einer 96-Loch-Platte bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der GeneScan® Analysis Software v3.1, die Bestimmung der IL-10-Transkriptmenge bei heterozygoten Trägern mittels Berechnung der Flächen unter den *Peaks*.

## **3.4 Immunologische Methoden**

### **3.4.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Die Höhe der IL-10-Sekretion wurde mittels ELISA unter Verwendung der zuvor - wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben - gewonnenen Überstände der kultivierten LCL-Zellen bestimmt. Hierfür wurde das IL-10 Eli-pair ELISA Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Absorption der Proben wurde mithilfe des Synergy HT Multi-Mode Microplate Readers bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert.

## **3.5 Definitionen und statistische Analysen**

In der vorliegenden Dissertation umfasst der Begriff Gesamtüberleben die Zeitspanne zwischen Therapiebeginn und Tod des Patienten aus jeglichen Gründen. Ereignisfreies Überleben definiert den Zeitraum zwischen Therapiebeginn und einer Vielzahl von Ereignissen wie Progression der Tumorerkrankung unter Therapie, ausbleibende komplette Remission, zusätzliche Anwendung weiterer Therapieschemata neben dem definiertem Therapieprotokoll, Rezidiv oder Tod des Patienten aus jeglichen Gründen.

Die erste Analyse der Daten erfolgte mithilfe der Software *Genepop* und beinhaltete Berechnungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts sowie allelischer und genotypischer Unterschiede zwischen DLBCL-Patienten sowie gesunden Kontrollprobanden.

Die Berechnung von Gesamtüberleben und ereignisfreiem Überleben erfolgte nach Kaplan-Meier. Beide Überlebenskurven wurden mithilfe des *log-rank* Tests verglichen.

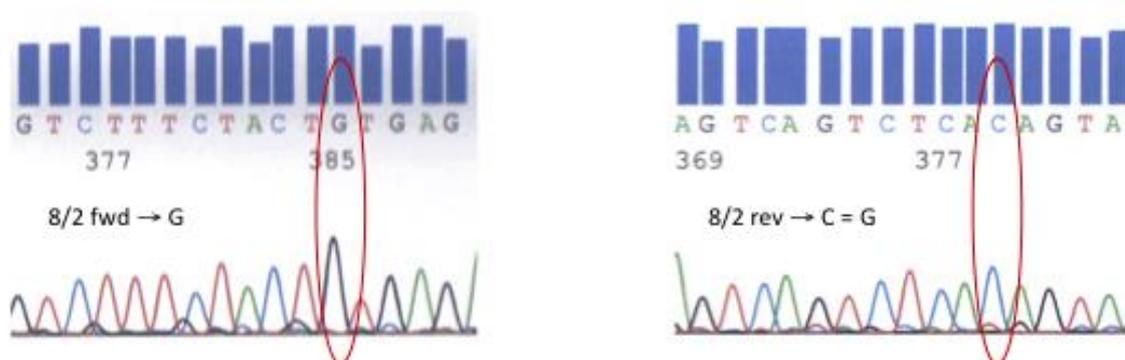
Die zusätzliche Anwendung des Cox-Regressionsmodells diente der multivariaten Analyse zwecks simultaner Betrachtung verschiedener prognostischer Faktoren. Die statistische Überlebenszeitanalyse wurde von Dipl.-Inf. Markus Kreuz vom Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (Abk. IMISE) der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung distaler Genvariationen des IL-10-Genlokus

#### 4.1.1 Ergebnisse der DNA-Sequenzierung

Mittels DNA-Sequenzierung wurde ein distaler Teilbereich des IL-10-Genlokus analysiert und die in der SNP-Datenbank bereits beschriebenen, aber noch nicht weiter charakterisierten Polymorphismen IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub> und IL-10<sub>-11.668GA</sub> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) identifiziert. Innerhalb des sequenzierten Bereichs konnten keine weiteren, bisher unbekanntenen Polymorphismen gefunden werden. Die Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen sind in *Anhang A* aufgeführt. *Abbildung 4* illustriert beispielhaft den Nachweis des Genotyps IL-10<sub>-11.668GG</sub> bei der LCL-Zelle 8/2.



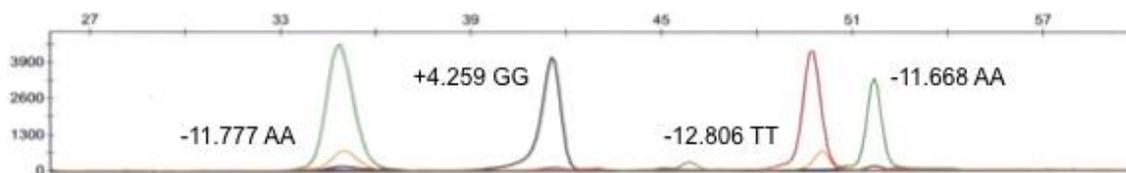
**Abbildung 4:** Elektropherogramm der Sequenzierungsreaktion eines Fragments der distalen 5'-untranslatierten Region des IL-10-Gens am Beispiel des SNPs IL-10<sub>-11.668GA</sub> der LCL-Zelle 8/2. Links ist die DNA-Sequenz dargestellt, die mithilfe des *forward* Primers gelesen werden konnte und den Nachweis der Base G erbrachte; rechts die Sequenz des komplementären Gegenstrangs nach Einsatz des *reverse* Primers mit Nachweis der Base C, womit die links dargestellte Sequenz bestätigt werden konnte (= Genotyp IL-10<sub>-11.668GG</sub>).

#### 4.1.2 Etablierung eines *Multiplex Assays* zwecks Genotypisierung von IL-10-Genvariationen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte das SNaPshot-Verfahren erfolgreich weiterentwickelt werden. Die SNaPshot-Analysen wurden mit dem Ziel durchgeführt, sowohl an einem DLBCL erkrankte Patienten als auch gesunde Kontrollprobanden bezüglich bestimmter Promotorpolymorphismen zu genotypisieren. Das bereits bekannte Verfahren der SNaPshot-Analyse wurde zu einem *Multiplex Assay* erweitert, mithilfe dessen simultan vier verschiedene Genvariationen (IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub>,

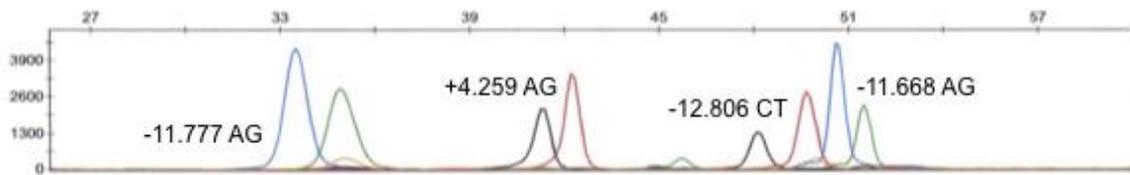
IL-10<sub>-11.668GA</sub>, IL-10<sub>+4.259AG</sub>) untersucht werden konnten. Die Etablierung dieser Methode war erfolgreich; die Ergebnisse sind in *Anhang B* und *C* aufgeführt.

Da spezifisch fluoreszenzmarkierte ddNTPs eingesetzt wurden, konnten die exprimierten Allele anhand von farblichen Signalen bestimmt werden. Grüne *Peaks* entsprachen dem Allel A, schwarze *Peaks* dem Allel G, blaue *Peaks* dem Allel G sowie rote *Peaks* dem Allel T. Bei homozygoten Trägern war jeweils nur ein *Peak* auszumachen, während sich heterozygote Träger durch das Vorhandensein von zwei verschiedenen *Peaks* auszeichneten. *Abbildung 5* zeigt exemplarisch die für die in dieser Dissertation vier untersuchten SNPs IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub>, IL-10<sub>-11.668GA</sub> sowie IL-10<sub>+4.259AG</sub> homozygote LCL-Zelle 16 des internationalen HapMap-Projektes.



**Abbildung 5: Elektropherogramm eines Multiplex Assays mit simultaner Analyse mehrerer SNPs am Beispiel der LCL-Zelle 16 des internationalen HapMap-Projektes.** Dargestellt sind die Größe der einzelnen Fragmente (x-Achse) bzw. die Fluoreszenzintensität (y-Achse). Da fluoreszenzmarkierte ddNTPs zum Einsatz kamen, konnte anhand der farblichen Signale ermittelt werden, welches Allel an der Stelle des jeweiligen SNPs exprimiert wird. Beispielsweise wurde bei 35 bp, wo sich der SNP IL-10<sub>-11.777GA</sub> darstellt, lediglich ein grün fluoreszierendes Fragment detektiert, welches dem Allel A entspricht, womit folglich der Genotyp IL-10<sub>-11.777AA</sub> nachgewiesen werden konnte. Die Genotypisierung hat ergeben, dass die vorliegende Zelle hinsichtlich der vier untersuchten SNPs IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub>, IL-10<sub>-11.668GA</sub> sowie IL-10<sub>+4.259AG</sub> jeweils homozygot ist.

*Abbildung 6* zeigt exemplarisch die für sämtliche hier analysierten Polymorphismen heterozygote LCL-Zelle 15 des internationalen HapMap-Projektes.



**Abbildung 6:** Elektropherogramm eines *Multiplex Assays* mit simultaner Analyse mehrerer SNPs am Beispiel der LCL-Zelle 15 des internationalen HapMap-Projektes. Dargestellt sind die Größe der einzelnen Fragmente (x-Achse) bzw. die Fluoreszenzintensität (y-Achse). Da fluoreszenzmarkierte ddNTPs zum Einsatz kamen, konnte anhand der farblichen Signale ermittelt werden, welches Allel an der Stelle des jeweiligen SNPs exprimiert wird. Beispielsweise wurden zwischen 33 und 36 bp, wo sich der SNP IL-10<sub>-11.777GA</sub> darstellt, ein blau sowie ein grün fluoreszierendes Fragment detektiert, welche den Allelen A bzw. G entsprechen, womit der Genotyp IL-10<sub>-11.777GA</sub> nachgewiesen werden konnte. Die Genotypisierung hat ergeben, dass die vorliegende LCL-Zelle hinsichtlich der vier untersuchten Genvariationen IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub>, IL-10<sub>-11.668GA</sub> sowie IL-10<sub>+4.259AG</sub> jeweils heterozygot ist.

Proben, die zu internen Kontrollzwecken sowohl sequenziert als auch mittels SNaPshot genotypisiert worden waren, wiesen bei beiden Verfahren jeweils identische Genotypen auf.

## 4.2 Genvariationsanalysen des Zytokins IL-10

### 4.2.1 Überblick über die durchgeführten Genvariationsanalysen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Genvariationen im Promotorbereich des IL-10-Gens analysiert. Hierfür wurde eine Kohorte von 594 Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom untersucht. Die Analyse wurde auf 135 gesunde Kontrollprobanden ausgeweitet, um auf diese Art und Weise Allelfrequenzen bei Erkrankten und gesunden Probanden vergleichen zu können; dies erfolgte jedoch nicht im Rahmen einer klassischen Fall-Kontroll-Studie.

Beide Kohorten wurden neben den distalen Genvariationen IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub> sowie IL-10<sub>-11.668GA</sub> auch hinsichtlich der Genvariation IL-10<sub>+4.259AG</sub> im Bereich der 3'UTR näher betrachtet.

Die Genotypisierung der Patienten wurde von Angela Lenz (MTA) unterstützt.

### 4.2.2 Analyse von IL-10-Genvariationen bei DLBCL-Patienten

Um ggf. einen Zusammenhang zwischen bestimmten IL-10-Genotypen sowie dem Gesamtüberleben und der ereignisfreien Überlebensrate von Patienten mit DLBCL herstellen zu können, wurde eine Kohorte von 594 Patienten analysiert. In *Tabelle 7* sind die Namen der SNPs, refSNP Ids, die mittels SNaPshot ermittelte Verteilung der Genotypen innerhalb des Patientenkollektivs sowie das jeweilige Hardy-Weinberg-

Gleichgewicht (Abk. HWG) aufgeführt. Bei diesem Patientenkollektiv befanden sich sämtliche analysierten Genvariationen im Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg und konnten somit für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

**Tabelle 7: Analytierte Genvariationen bei 594 DLBCL-Patienten, Verteilung der Genotypen sowie Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.** n. d.: engl. *no data*.

SNP	refSNP ID	Genotyp	Anzahl der Patienten	HWG ( $\chi^2$ )
IL-10 <sub>-12.806TC</sub>	rs17015865	CC	377 (63,5 %)	0,688
		CT	192 (32,3 %)	
		TT	22 (3,7 %)	
		n. d.	3 (0,5 %)	
IL-10 <sub>-11.777GA</sub>	rs4072227	AA	513 (86,4 %)	0,8511
		AG	74 (12,4 %)	
		GG	3 (0,5 %)	
		n. d.	4 (0,7 %)	
IL-10 <sub>-11.668GA</sub>	rs4072226	AA	92 (15,5 %)	0,0909
		AG	307 (51,7 %)	
		GG	192 (32,3 %)	
		n. d.	3 (0,5 %)	
IL-10 <sub>+4.259AG</sub>	rs3024498	AA	346 (58,2 %)	0,0599
		AG	222 (37,4 %)	
		GG	22 (3,7 %)	
		n. d.	4 (0,7 %)	

#### *Einfluss der IL-10-Genvariationen auf das Gesamtüberleben sowie ereignisfreie Überleben der DLBCL-Patienten*

Die Analyse von IL-10-Genvariationen bei DLBCL-Patienten erfolgte in einer Kooperation mit dem IMISE der Universität Leipzig, welches auf sämtliche klinischen Daten aller DSHNHL-Studien Zugriff hat.

Durchgeführt wurde neben einer univariaten Analyse (*log-rank* Test, *Tabelle 8*) eine multivariate, auf IPI-Faktoren adjustierte Untersuchung (Cox-Regressionsmodell, *Tabelle 9*) der Genvariationen - jeweils hinsichtlich des Gesamtüberlebens und ereignisfreien Überlebens von 594 an einem DLBCL erkrankten Patienten.

**Tabelle 8: Univariate Analyse der IL-10-Genvariationen bezüglich des Gesamtüberlebens und ereignisfreien Überlebens von DLBCL-Patienten.** OS: engl. *overall survival*. EFS: engl. *event-free survival*.

IL-10 <sub>-12.806TC</sub>	OS (p-Wert)	EFS (p-Wert)
Trend	0,989	0,466
IL-10 <sub>-12.806TT</sub> vs. IL-10 <sub>-12.806CT</sub>	0,256	0,883
IL-10 <sub>-12.806TT</sub> vs. IL-10 <sub>-12.806CC</sub>	0,449	0,759
IL-10 <sub>-12.806CT</sub> vs. IL-10 <sub>-12.806CC</sub>	0,584	0,484
IL-10 <sub>-12.806TT/CT</sub> vs. IL-10 <sub>-12.806CC</sub>	0,753	0,459
IL-10 <sub>-12.806TT</sub> vs. IL-10 <sub>-12.806CT/CC</sub>	0,366	0,795
IL-10 <sub>-11.777GA</sub>	OS (p-Wert)	EFS (p-Wert)
IL-10 <sub>-11.777AG</sub> vs. IL-10 <sub>-11.777AA</sub>	0,878	0,171
IL-10 <sub>-11.777GG/AG</sub> vs. IL-10 <sub>-11.777AA</sub>	0,854	0,136
IL-10 <sub>-11.668GA</sub>	OS (p-Wert)	EFS (p-Wert)
Trend	0,355	0,811
IL-10 <sub>-11.668AA</sub> vs. IL-10 <sub>-11.668AG</sub>	0,484	0,205
IL-10 <sub>-11.668AA</sub> vs. IL-10 <sub>-11.668GG</sub>	0,548	0,875
IL-10 <sub>-11.668AG</sub> vs. IL-10 <sub>-11.668GG</sub>	0,118	0,188
IL-10 <sub>-11.668AA/AG</sub> vs. IL-10 <sub>-11.668GG</sub>	0,146	0,306
IL-10 <sub>-11.668AA</sub> vs. IL-10 <sub>-11.668AG/GG</sub>	0,869	0,378
IL-10 <sub>+4.259AG</sub>	OS (p-Wert)	EFS (p-Wert)
Trend	0,705	0,399
IL-10 <sub>+4.259GG</sub> vs. IL-10 <sub>+4.259AG</sub>	0,568	0,459
IL-10 <sub>+4.259GG</sub> vs. IL-10 <sub>+4.259AA</sub>	0,581	0,418
IL-10 <sub>+4.259AG</sub> vs. IL-10 <sub>+4.259AA</sub>	0,922	0,609
IL-10 <sub>+4.259GG/AG</sub> vs. IL-10 <sub>+4.259AA</sub>	0,825	0,503
IL-10 <sub>+4.259GG</sub> vs. IL-10 <sub>+4.259AG/AA</sub>	0,571	0,429

Die univariate Analyse der oben aufgeführten Genvariationen zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens und ereignisfreien Überlebens der DLBCL-Patienten, was ggf. auf die niedrige Frequenz der Minor-Allele zurückzuführen sein könnte. Da lediglich 0,5 % des Patientenkollektivs als homozygote Merkmalsträger des Minor-Allels G der Genvariation IL-10<sub>-11.777GA</sub> identifiziert werden konnten, wurde diese bei der univariaten Analyse nicht gesondert betrachtet.

**Tabelle 9: Multivariate Analyse der IL-10-Genvariationen bezüglich des Gesamtüberlebens und ereignisfreien Überlebens von DLBCL-Patienten.** RR: Relatives Risiko. KI: Konfidenzintervall.

<b>IL-10-12.806TC</b>						
	<b>OS</b>			<b>EFS</b>		
<b>IPI-Faktoren</b>	<b>RR</b>	<b>95 % KI</b>	<b>p-Wert</b>	<b>RR</b>	<b>95 % KI</b>	<b>p-Wert</b>
Serum-LDH oberhalb des Referenzwertes	1,61	(1,13;2,30)	0,008	1,37	(1,00;1,88)	0,052
Alter > 60 Jahre	2,55	(1,71;3,81)	<0,001	1,75	(1,28;2,39)	<0,001
ECOG Performance-Status > 1	2,42	(1,69;3,47)	<0,001	2,01	(1,45;2,79)	<0,001
Ann Arbor Klassifikation > II	1,61	(1,17;2,22)	0,004	1,63	(1,24;2,13)	<0,001
> 1 extranodale Manifestation	1,21	(0,85;1,73)	0,298	1,25	(0,92;1,70)	0,147
IL-10-12.806CC vs. IL-10-12.806TT	1,13	(0,55;2,34)	0,736	0,97	(0,50;1,91)	0,938
IL-10-12.806CC vs. IL-10-12.806TC	0,96	(0,70;1,32)	0,809	1,12	(0,86;1,46)	0,389

<b>IL-10-11.777GA</b>						
	<b>OS</b>			<b>EFS</b>		
<b>IPI-Faktoren</b>	<b>RR</b>	<b>95 % KI</b>	<b>p-Wert</b>	<b>RR</b>	<b>95 % KI</b>	<b>p-Wert</b>
Serum-LDH oberhalb des Referenzwertes	1,64	(1,15;2,34)	0,006	1,39	(1,01;1,90)	0,067
Alter > 60 Jahre	2,62	(1,75;3,91)	<0,001	1,80	(1,32;2,46)	<0,001
ECOG Performance-Status > 1	2,54	(1,78;3,62)	<0,001	2,12	(1,54;2,92)	<0,001
Ann Arbor Klassifikation > II	1,63	(1,19;2,25)	0,003	1,66	(1,27;2,17)	<0,001
> 1 extranodale Manifestation	1,29	(0,91;1,84)	0,151	1,34	(0,99;1,81)	0,057
IL-10-11.777AA vs. IL-10-11.777GA	0,79	(0,50;1,25)	0,309	0,68	(0,45;1,03)	0,067

<b>IL-10-11.668GA</b>						
	<b>OS</b>			<b>EFS</b>		
<b>IPI-Faktoren</b>	<b>RR</b>	<b>95 % KI</b>	<b>p-Wert</b>	<b>RR</b>	<b>95 % KI</b>	<b>p-Wert</b>
Serum-LDH oberhalb des Referenzwertes	1,60	(1,12;2,29)	0,010	1,38	(1,00;1,90)	0,047
Alter > 60 Jahre	2,55	(1,71;3,80)	<0,001	1,71	(1,25;2,34)	<0,001
ECOG Performance-Status > 1	2,42	(1,69;3,48)	<0,001	2,03	(1,46;2,81)	<0,001
Ann Arbor Klassifikation > II	1,61	(1,17;2,22)	0,004	1,61	(1,23;2,11)	<0,001
> 1 extranodale Manifestation	1,21	(0,85;1,73)	0,291	1,26	(0,93;1,70)	0,143
IL-10-11.668GG vs. IL-10-11.668AA	0,86	(0,55;1,33)	0,498	1,02	(0,71;1,47)	0,899
IL-10-11.668GG vs. IL-10-11.668GA	0,83	(0,60;1,14)	0,243	0,88	(0,67;1,15)	0,342

<b>IL-10+4.259AG</b>						
	<b>OS</b>			<b>EFS</b>		
<b>IPI-Faktoren</b>	<b>RR</b>	<b>95 % KI</b>	<b>p-Wert</b>	<b>RR</b>	<b>95 % KI</b>	<b>p-Wert</b>
Serum-LDH oberhalb des Referenzwertes	1,61	(1,13;2,30)	0,08	1,38	(1,00;1,89)	0,049
Alter > 60 Jahre	2,56	(1,72;3,82)	<0,001	1,72	(1,26;2,35)	<0,001
ECOG Performance-Status > 1	2,41	(1,68;3,45)	<0,001	2,02	(1,46;2,81)	<0,001
Ann Arbor Klassifikation > II	1,60	(1,16;2,21)	0,004	1,62	(1,24;2,12)	<0,001
> 1 extranodale Manifestation	1,21	(0,85;1,72)	0,298	1,24	(0,92;1,69)	0,161
IL-10+4.259AA vs. IL-10+4.259GG	1,07	(0,52;2,19)	0,863	1,10	(0,59;2,03)	0,770
IL-10+4.259AA vs. IL-10+4.259AG	1,04	(0,77;1,41)	0,810	1,07	(0,82;1,38)	0,628

Bei der multivariaten Analyse der vier SNPs IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub>, IL-10<sub>-11.668GA</sub> und IL-10<sub>+4.259AG</sub> wurden homozygote Merkmalsträger des Major-Allels mit homozyten Merkmalsträgern des Minor-Allels bzw. heterozygoten Merkmalsträgern, bei der Genvariation IL-10<sub>-11.777GA</sub> aufgrund einer zu geringen Fallzahl an homozygoten Merkmalsträgern des Minor-Allels G hingegen lediglich homozygote Merkmalsträger des Major-Allels mit heterozygoten Merkmalsträgern verglichen. Die multivariate Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens sowie ereignisfreien Überlebens von DLBCL-Patienten. Bezüglich des ereignisfreien Überlebens lässt sich jedoch die Tendenz erkennen, dass homozygote Merkmalsträger des Major-Allels A der Genvariation IL-10<sub>-11.777GA</sub> gegenüber heterozygoten Merkmals-trägern im Vorteil sein könnten; laut p-Wert (= 0,067) besitzt dies dieselbe Aussagekraft wie der etablierte IPI-Faktor Serum-LDH. Von den 594 hier analysierten DLBCL-Patienten wurden ~ 87 % als homozygote Merkmalsträger des Major-Allels identifiziert.

Folglich konnten die im Rahmen dieser Dissertation analysierten Genvariationen nicht als bisher unentdeckte Risikofaktoren für einen schlechten klinischen Verlauf von DLBCL-Patienten identifiziert werden, weshalb deren Stratifizierung in Therapiegruppen weiterhin gemäß IPI erfolgen muss. Auf eine Darstellung beider Analysen nach Kaplan-Meier wird aufgrund der fehlenden Signifikanz verzichtet.

#### 4.2.3 Analyse von IL-10-Genvariationen bei gesunden Kontrollprobanden

Um Informationen über die Häufigkeiten der verschiedenen Genotypen in der Allgemeinbevölkerung zu erhalten, wurde die Analyse von IL-10-Genvariationen auf 135 gesunde Kontrollprobanden ausgeweitet. Von diesen Proben entfielen 23 auf LCL-Zellen des internationalen HapMap-Projektes, 28 auf LCL-Zellen, welche aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender gewonnen sowie 84 auf DNA-Proben, die aus *Buffy coats* isoliert worden waren. In *Tabelle 10* sind die Namen der SNPs, refSNP IDs, die mittels SNaPshot ermittelte Verteilung der Genotypen des Kollektivs sowie die jeweiligen p-Werte des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts aufgeführt.

**Tabelle 10: Analyierte Genvariationen bei 135 gesunden Kontrollprobanden sowie Verteilung der Genotypen**

SNP	refSNP ID	Genotyp	Anzahl der Kontrollprobanden	HWG (p-Wert)
-----	-----------	---------	------------------------------	--------------

IL-10 <sub>-12.806TC</sub>	rs17015865	CC	66 (48,9 %)	0,675
		CT	59 (43,7 %)	
		TT	10 (7,4 %)	
IL-10 <sub>-11.777GA</sub>	rs4072227	AA	113 (83,7 %)	0,599
		AG	22 (16,3 %)	
		GG	0 (0 %)	
IL-10 <sub>-11.668GA</sub>	rs4072226	AA	25 (18,5 %)	0,734
		AG	69 (51,1 %)	
		GG	41 (30,4 %)	
IL-10 <sub>+4.259AG</sub>	rs3024498	AA	65 (48,1 %)	0,417
		AG	54 (40,0 %)	
		GG	16 (11,9 %)	

#### 4.2.4 Vergleich der Genotypenverteilung bei DLBCL-Patienten und gesunden Kontrollprobanden

*Tabelle 11* führt die Genotypenverteilung bei den analysierten DLBCL-Patienten sowie gesunden Kontrollprobanden auf; die Bewertung erfolgte mithilfe des exakten Tests nach Fisher. Mittels zweiseitiger Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Genotypen der Genvariationen IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub> und IL-10<sub>-11.668GA</sub> in beiden Kohorten homogen verteilt sind. Bei den Patienten mit dem SNP IL-10<sub>+4.259AG</sub> fiel hingegen ein signifikant höherer Anteil an Trägern des Genotyps AA auf, womit dieser ggf. für eine Erkrankung an einem DLBCL prädisponieren könnte.

**Tabelle 11: Genotypenverteilung bei 594 DLBCL-Patienten und 135 gesunden Kontrollprobanden**

Genotyp	Anzahl der Patienten	Anzahl der Kontrollprobanden	p-Wert
IL-10 <sub>-12.806TC</sub>			0,07
CC	377 (63,5 %)	66 (48,9 %)	
CT	192 (32,3 %)	59 (43,7 %)	
TT	22 (3,7 %)	10 (7,4 %)	
n. d.	3 (0,5 %)	-	
IL-10 <sub>-11.777GA</sub>			0,502
AA	513 (86,4 %)	113 (83,7 %)	
AG	74 (12,4 %)	22 (16,3 %)	
GG	3 (0,5 %)	0 (0 %)	
n. d.	4 (0,7 %)	-	
IL-10 <sub>-11.668GA</sub>			0,813
AA	92 (15,5 %)	25 (18,5 %)	
AG	307 (51,7 %)	69 (51,1 %)	
GG	192 (32,3 %)	41 (30,4 %)	
n. d.	3 (0,5 %)	-	
IL-10 <sub>+4.259AG</sub>			0,02
AA	346 (58,2 %)	65 (48,1 %)	

AG	222 (37,4 %)	54 (40,0 %)
GG	22 (3,7 %)	16 (11,9 %)
n. d.	4 (0,7 %)	-

### 4.3 Analyse der IL-10-Genexpression

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Hypothese aufgestellt, dass ein Zusammenhang zwischen SNPs des IL-10-Gens und der IL-10-Expressionshöhe besteht. Mittels ELISA sollte überprüft werden, ob interindividuelle Unterschiede bei der IL-10-Produktion tatsächlich existieren; hierfür wurde die Sekretionshöhe von IL-10 in Zellkultur-Überständen von LCL-Zellen bestimmt. Zwecks Analyse der IL-10-Transkriptmenge wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Zunächst erfolgte die Diskriminierung und Quantifizierung unterschiedlicher Transkriptmengen mittels Durchführung von *Real-Time* PCR-Analysen. Weiterhin wurde eine Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen auf RNA-Ebene vorgenommen. Untersucht wurde jeweils die Genvariation IL-10<sub>+4.259AG</sub>.

#### 4.3.1 Nachweis interindividueller Unterschiede bei der IL-10-Sekretion mittels ELISA

Zwecks Bestimmung der IL-10-Sekretionshöhe wurden die Überstände zuvor kultivierter Zellen mittels ELISA untersucht. Die Analyse der Überstände von zehn zuvor von der Arbeitsgruppe gewonnenen LCL-Zellen sowie neun LCL-Zellen des internationalen HapMap-Projektes zeigte signifikante Unterschiede in der Höhe der Sekretion von IL-10. *Tabelle 12* und *13* geben die Resultate der Analyse wider; die Konzentrationen der z. T. verdünnt gemessenen Proben wurden zwecks Vergleichbarkeit mit den unverdünnt gemessenen Proben wieder mit dem Faktor 10 multipliziert. Sämtliche Werte für die optische Dichte befanden sich in einem linearen Messbereich und konnten folglich mittels Erstellung einer Standardkurve ausgewertet werden.

**Tabelle 12: IL-10-Sekretion von LCL-Zellen der eigenen Arbeitsgruppe.** Zellüberstände wurden mittels ELISA hinsichtlich ihrer IL-10-Sekretion untersucht, welche in [pg/ml] angegeben wird. Weiterhin sind die dazugehörigen Genotypen der Genvariation IL-10<sub>+4.259AG</sub> aufgeführt.

LCL	Genotyp	IL-10-Sekretion in [pg/ml]
7/3	GG	1.090
9/1	AA	240
31/1	AA	210
49/1	AA	470
59/3	GG	60
60/2	AA	400

102/2	AA	870
103/1	AG	1.360
103/2	AG	670
103/4	AG	320

**Tabelle 13: IL-10-Sekretion von LCL-Zellen des internationalen HapMap-Projektes.** Zellüberstände wurden mittels ELISA hinsichtlich ihrer IL-10-Sekretion untersucht, welche in [pg/ml] angegeben wird. Weiterhin sind die dazugehörigen Genotypen des SNPs IL-10<sub>+4.259AG</sub> aufgeführt.

LCL	Genotyp	IL-10-Sekretion in [pg/ml]
12	AG	17
13	AG	47
14	AG	27
15	AG	5
21	AA	0
22	AA	21
23	GG	108
24	AA	141
30	AG	7

Die analysierten LCL-Zellen lassen sich anhand ihrer IL-10-Sekretion in Gruppen mit niedriger (< 100 pg/ml), mittelhoher (zwischen 100 und 500 pg/ml) und hoher (> 500 pg/ml) Sekretion einteilen. Werte unter 5 pg/ml sind unterhalb der Nachweisgrenze und wurden als „0“ gewertet. Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich keine eindeutige Assoziation zwischen Genotyp und IL-10-Sekretionshöhe nachweisen.

#### 4.3.2 Nachweis interindividueller Unterschiede der IL-10-Transkriptmenge mittels *Real-Time* PCR

Mittels *Real-Time* PCR-Analysen konnten interindividuelle Unterschiede bezüglich der Transkriptmenge von IL-10 nachgewiesen werden. Untersucht wurden insgesamt 25 LCL-Zellen des internationalen HapMap-Projektes. Hierfür wurde zunächst RNA isoliert und diese nachfolgend zu cDNA umgeschrieben. Die Ergebnisse werden in *Tabelle 14* aufgeführt.

**Tabelle 14: Bestimmung der IL-10-Transkriptmenge mittels *Real-Time* PCR.** Hierfür wurde zu cDNA umgeschriebene RNA von 25 LCL-Zellen des internationalen HapMap-Projektes eingesetzt. Weiterhin sind die dazugehörigen Genotypen der Genvariation IL-10<sub>+4.259AG</sub> aufgeführt.

HapMap-LCL	Genotyp	<i>Real-Time</i> PCR $\Delta$ CT-Wert
------------	---------	---------------------------------------

1	GG	13
2	GG	19,59
3	AA	16,04
4	AA	15,95
5	AA	15,65
12	AG	15,38
13	AG	15,76
14	AG	15,62
15	AG	14,28
16	GG	12,7
20	AA	16,91
21	AA	23,54
22	AA	14,53
23	GG	14,77
24	AA	15,68
30	AG	16,05
31	AG	17,8
32	AG	13,76
33	AG	19,2
34	AA	21,6
40	AA	17,01
41	AA	15,41
50	AG	15,22
54	AA	14,87
60	GG	19,82

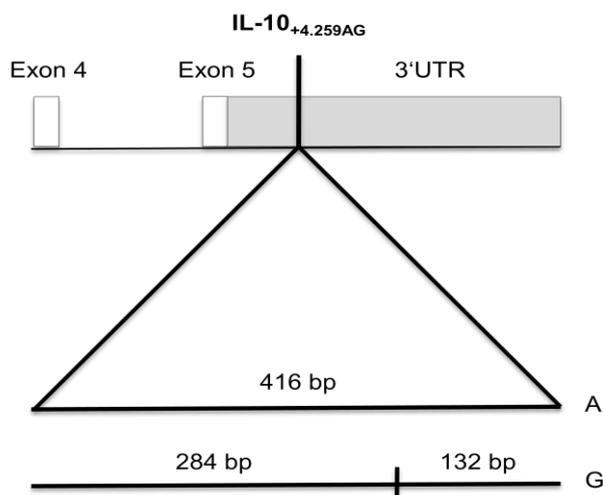
Im Gegensatz zu den ELISA-Analysen war keine Tendenz zu niedriger, mittelhoher bzw. hoher Expression von IL-10 zu erkennen.

#### 4.3.3 Bestimmung der IL-10-Transkriptmenge mittels Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen

Um die IL-10-Transkriptmenge mithilfe einer Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen bestimmen zu können, wurden die - nach Durchführung einer PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern - amplifizierten Fragmente einem Restriktionsendonuklease-Verdau unterworfen. Hierbei kamen sowohl DNA- als auch zu cDNA-umgeschriebene RNA-Fragmente zum Einsatz. In einem späteren Schritt wurden bei heterozygoten Trägern nach Analyse im 3130 Genetic Analyzer die Flächen unterhalb der *Peaks* berechnet; durch die Untersuchung von zu cDNA umgeschriebener RNA sollte folglich überprüft werden, welches Allel bevorzugt transkribiert wird.

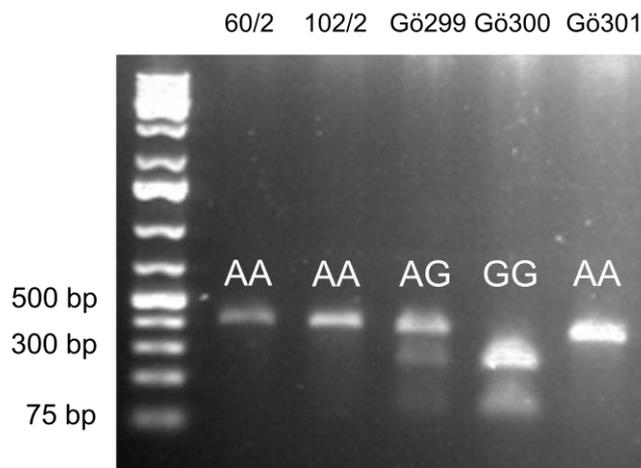
Das amplifizierte DNA-Fragment wies eine Größe von 416 bp auf. Homozygote Träger des Allels A konnten nach abgeschlossenem Restriktionsendonuklease-Verdau durch nur ein vorliegendes Fragment von 416 bp identifiziert werden. Homozygote Träger des Allels G wiesen zwei kleinere Fragmente von 132 sowie 284 bp auf. Bei heterozygoten Trägern waren Fragmente von 132, 284 sowie 416 bp Größe zu finden. Neben Sequenzierung und SNaPshot-Analyse handelt es sich bei diesem Verfahren folglich um eine weitere Methode der Genotypisierung.

Abbildung 7 zeigt schematisch die Position der Genvariation  $IL-10_{+4.259AG}$  im Bereich des IL-10-Gens sowie die Aufspaltungsmotive des amplifizierten DNA-Fragments nach Restriktionsendonuklease-Verdau mit Fnu4HI.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Position der Genvariation  $IL-10_{+4.259AG}$  sowie der Aufspaltungsmotive nach Restriktionsendonuklease-Verdau mit Fnu4HI. Bei homozygoten Trägern des Allels A wurde ein Fragment von 416 bp nachgewiesen, bei homozygoten Trägern des Allels G zwei Fragmente von 132 und 284 bp, bei heterozygoten Trägern drei Fragmente von 132, 284 und 416 bp.

Abbildung 8 illustriert beispielhaft die Aufspaltungsmotive von fünf Proben nach Restriktionsendonuklease-Verdau mit Fnu4HI. Beim Vergleich der Fragmente der Proben 60/2 und Gö301 fällt auf, dass sich diese in ihrer Dicke deutlich unterscheiden, obwohl für die PCR identische Mengen an genomischer DNA eingesetzt wurden.

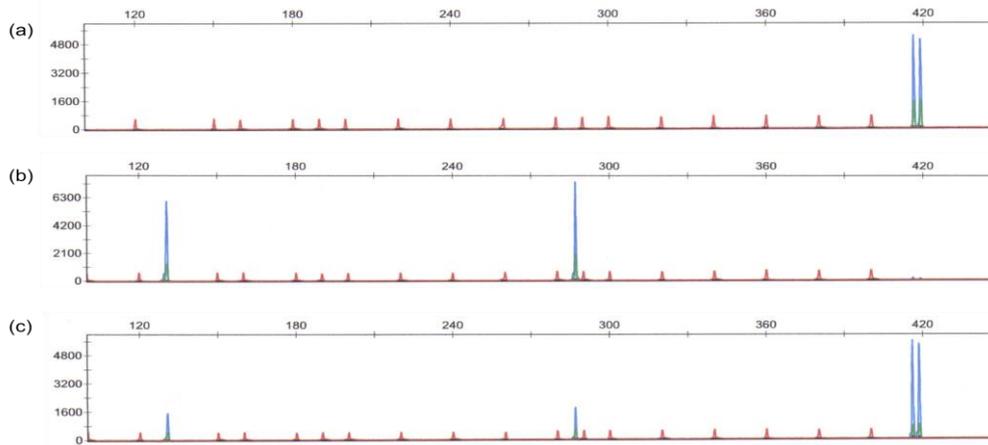


**Abbildung 8: Restriktionsendonuklease-Verdau mit Fnu4HI.** Dargestellt sind amplifizierte DNA-Fragmente gesunder Spender (60/2, 102/2, Gö299, Gö300 und Gö301) nach Restriktionsendonuklease-Verdau mit Fnu4HI, welche auf ein 1,3%iges Agarose-Gel aufgetragen wurden. Die Genotypen unterscheiden sich in der Anzahl der sichtbaren Banden. Homozygote Träger des Allels A zeichnen sich durch nur ein Fragment von 416 bp Größe aus, während bei homozygoten Trägern des Allels G zwei Banden von 132 und 284 bp Größe zu sehen sind. Bei heterozygoten Trägern findet man drei Spaltprodukte (132, 284 und 416 bp).

Der Restriktionsendonuklease-Verdau von zu cDNA umgeschriebener RNA zeigte die gleichen Aufspaltungsmotive wie auf DNA-Ebene (Genotyp AA: 416 bp; Genotyp AG: 132, 284 und 416 bp; Genotyp GG: 132 und 284 bp).

Im nächsten Schritt wurden die DNA- und RNA-Spaltprodukte mithilfe des 3130 Genetic Analyzers näher untersucht, wobei identische Genotypen wie bei der zuvor durchgeführten Gelelektrophorese ermittelt werden konnten. Homozygote Träger des Allels A wiesen ein *Peak* bei 416 bp auf, homozygote Träger des Allels G insgesamt zwei *Peaks* bei jeweils 132 und 284 bp, heterozygote Träger dementsprechend drei *Peaks* bei 132, 284 und 416 bp. Grüne *Peaks* entsprechen den Spaltprodukten von DNA, welche zuvor unter Verwendung eines mit dem fluoreszierenden Farbstoff Hex markierten Primers amplifiziert worden war, blaue *Peaks* den Spaltprodukten von zu cDNA umgeschriebener RNA, für deren Vervielfältigung ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fam markierter Primer zum Einsatz gekommen war.

*Abbildung 9* illustriert die Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen mithilfe des 3130 Genetic Analyzers. Aufgeführt wird jeweils ein Beispiel für einen homozygoten Träger des Allels A (HapMap-LCL 4), einen homozygoten Träger des Allels G (HapMap-LCL 1) sowie einen heterozygoten Träger (HapMap-LCL 15).



**Abbildung 9: Elektropherogramm der Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen.**

(a) HapMap-LCL 4 mit einem *Peak* bei 416 bp entsprechend dem Genotypen AA. (b) Hap-Map-LCL 1 mit insgesamt zwei *Peaks* bei jeweils 132 und 284 bp entsprechend dem Genotypen GG. (c) Hap-Map-LCL 15 mit insgesamt drei *Peaks* bei jeweils 132, 284 und 416 bp entsprechend dem Genotypen AG. Spaltprodukte von DNA stellen sich in grün dar, Spaltprodukte von zu cDNA umgeschriebener RNA in blau. Doppelpeaks bei 416 bp wurden als PCR-Artefakt gewertet. Auf der x-Achse lässt sich die Größe des Fragmentes ablesen, auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität.

Die auf diese Art und Weise ermittelten Genotypen stimmten mit den Ergebnissen der SNaPshot-Analysen überein. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der mittels Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen erhaltene Genotyp AA nicht lediglich auf einem unvollständigen Restriktionsendonuklease-Verdau beruhte.

#### *Bestimmung der IL-10-Transkriptmenge*

Desweiteren war die Bestimmung der Allel-spezifischen IL-10-Transkriptmenge geplant, indem bei heterozygoten Trägern nach Analyse der Spaltprodukte im 3130 Genetic Analyzer die Flächen unterhalb der *Peaks* für das Allel A (*Peak* bei 416 bp) bzw. G (*Peaks* bei 132 und 284 bp) berechnet und miteinander verglichen wurden. Dadurch sollte auf RNA-Ebene ermittelt werden, welches der beiden Allele bevorzugt transkribiert wurde. Untersucht wurden zunächst sieben der insgesamt 25 in dieser Dissertation bearbeiteten HapMap-LCL-Zellen, welche den Genotyp IL-10<sub>+4.259AG</sub> aufwiesen. Da auf DNA-Ebene ein AG-Verhältnis von 1 : 1 erwartet, dieses hingegen zwischen 1,3 : 1 und 2,6 : 1 bestimmt wurde, erschien das Vorhandensein eines methodischen Problems sehr wahrscheinlich, weshalb auf die Darstellung der Ergebnisse der AG-Verhältnisse auf RNA-Ebene verzichtet wird. Weitere Analysen wurden vorerst nicht durchgeführt.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Dissertation war es, herauszufinden, ob bestimmte IL-10-Genvariationen bisher unentdeckte Risikofaktoren für einen schlechten klinischen Verlauf von DLBCL-Patienten darstellen könnten. Die Identifizierung klinisch relevanter und praktisch anwendbarer prognostischer Faktoren soll langfristig zu einer Optimierung der bereits bestehenden Therapiemöglichkeiten führen.

Die Ergebnisse einiger bisher durchgeführter Studien lassen vermuten, dass neben dem Risiko, an einem Non-Hodgkin-Lymphom zu erkranken auch der klinische Verlauf im Falle einer Erkrankung in einem gewissen Maß durch das Zytokin IL-10 beeinflusst werden könnten (Breen et al. 2003; Cunningham et al. 2003; Lech-Maranda et al. 2004); hierbei scheinen insbesondere distale Promotorpolymorphismen eine hohe biologische Signifikanz aufzuweisen, da diese vermutlich zu einer vermehrten Expression von IL-10 führen (Gibson et al. 2001). Da Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe vermuten lassen, dass der Genotyp IL-10<sub>-7.400DelDel</sub> bei Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom mit einem signifikant kürzeren kumulativen Gesamtüberleben assoziiert sein könnte, dieser laut bisherigen Analysen jedoch eher selten auftritt, wurden in der vorliegenden Dissertation weitere distale IL-10-Genvariationen betrachtet, von denen man sich eine höhere klinische Relevanz versprach (Kube et al. 2008; Mörmann et al. 2004).

Obwohl Non-Hodgkin-Lymphome überwiegend B-lymphozytären Ursprungs sind und IL-10 beträchtlich in deren Pathophysiologie involviert ist, beschäftigte sich der Großteil sämtlicher bisher durchgeführten Untersuchungen mit T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen. Zwecks Analyse einer möglichen Assoziation von Gesamtüberleben und ereignisfreiem Überleben wurde eine große, repräsentative Kohorte von 594 DLBCL-Patienten aus dem Gesamtkollektiv der NHL-B1-/B2-Studien ausgewählt. Anhand dieser wurde untersucht, ob sich Therapieerfolge bei Patienten im Alter von 18 bis 60 Jahren mit guter Prognose (normwertige Serum-LDH) durch häufigere Gaben von CHOP sowie die zusätzliche Applikation von Etoposid optimieren lassen. Während nach Therapie mit CHOEP mehr Patienten eine Vollremission erreichen konnten sowie während des Beobachtungszeitraums von fünf Jahren seltener Rezidive erlitten, führte die Reduktion der Therapieintervalle von drei auf zwei Wochen zu einem verbesserten Gesamtüberleben (Pfreundschuh et al. 2004 a und b).

Die multivariate Analyse der vier Genvariationen IL-10<sub>-12.806TC</sub>, IL-10<sub>-11.777GA</sub>, IL-10<sub>-11.668GA</sub> und IL-10<sub>+4.259AG</sub> zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des ereignisfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens der untersuchten DLBCL-Patienten;

verglichen wurden jeweils homozygote Träger des Major-Allels mit homozygoten Trägern des Minor-Allels bzw. heterozygoten Merkmalsträgern. Folglich muss vermutet werden, dass die soeben genannten Genvariationen keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von DLBCL-Patienten haben und somit nicht dazu geeignet sind, letztere in Therapiegruppen zu stratifizieren. Zukünftige Studien sollten demnach die Analyse weiterer Genvariationen zum Inhalt haben, um langfristig eine dem genetischen Risiko entsprechend adaptierte, individualisierte Therapie anbieten zu können.

Die Arbeitsgruppe um Blay beobachtete bereits vor über zwanzig Jahren, dass IL-10 im Serum von Non-Hodgkin-Lymphom-Patienten sowohl in akuten als auch in intermediären oder späten Stadien detektiert werden konnte. Demgegenüber steht die Tatsache, dass der Nachweis bei Patienten, die sich in Teil- oder Vollremission befinden, nur selten, bei gesunden Kontrollprobanden hingegen überhaupt nicht gelang (Blay et al. 1993). Daraufhin wurde die Hypothese abgeleitet, dass hohe IL-10-Serumkonzentrationen mit einer schlechten Prognose korrelieren könnten; als ursächlich werden verschiedene Genvariationen diskutiert, welche laut Arbeitsgruppe um Mörmann zu einer unterschiedlich ausgeprägten *In-vitro*-Produktion von IL-10 führen (Mörmann et al. 2004). Die Arbeitsgruppen um Lech-Maranda und Gupta fanden im Rahmen neuerer Studien Hinweise dafür, dass erhöhte IL-10-Serumkonzentrationen bei DLBCL-Patienten mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert sein könnten (Gupta et al. 2012; Lech-Maranda et al. 2010). Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen hohem IL-10-Nachweis und höheren IPI-Scores beobachtet (Gupta et al. 2012). Erhöhte IL-10-Serumkonzentrationen könnten jedoch auch lediglich Resultat einer Entzündungsreaktion sein. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch große Tumormassen (*bulky disease*), welche als prognostisch ungünstig eingeschätzt werden, aufgrund der größeren Anzahl maligner Zellen mehr IL-10 produziert wird (Mocellin et al. 2005).

Rituximab, welches NHL-Patienten in Kombination mit dem CHOP- bzw. CHOEP-Schema appliziert wird, führt in der B-Zelllinie 2F7 infolge einer Herabregulierung von IL-10 zu einer verminderten Bildung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2, was letztendlich eine erhöhte Chemosensitivität maligne transformierter B-Zellen zur Folge hat (Alas et al. 2001). Die Wirksamkeit dieses monoklonalen Antikörpers könnte also u. a. auf den konsekutiv niedrigeren IL-10-Serumkonzentrationen beruhen. Dieser Zusammenhang wurde bisher allerdings noch nicht im Rahmen von Studien untersucht.

Andere Studien hingegen konnten keine Assoziation zwischen hohen IL-10-Serumkonzentrationen und einer größeren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs bzw. einer kürzeren Gesamtüberlebensdauer finden (Berglund et al. 2005; Cortes et al. 1995; Ozdemir et al. 2004). Während die Arbeitsgruppen um Cortes und Ozdemir lediglich kleine Patientenkollektive ( $n \sim 50$ ) untersuchten und bei Ozdemir weiterhin ein mit über 70 % deutlich höherer Prozentsatz der Patienten - verglichen mit der in der vorliegenden Dissertation untersuchten Kohorte - eine komplette Remission erreichte, war die Altersverteilung der Studie von Berglund und Kollegen eher untypisch für DLBCL-Patienten; die Repräsentativität der Ergebnisse darf folglich angezweifelt werden.

Bisher wurden keine Studien veröffentlicht, welche eine Assoziation zwischen hohen IL-10-Serumkonzentrationen und einer günstigen Prognose nachweisen konnten.

In der vorliegenden Dissertation wurden die bei DLBCL-Patienten analysierten Genvariationen nicht hinsichtlich ihrer IL-10-Expressionshöhe analysiert. Im Rahmen weiterer umfangreicher Studien sollte folglich geprüft werden, inwieweit erhöhte IL-10-Serumwerte vor Therapiebeginn tatsächlich mit einer ungünstigen Prognose der Tumorpatienten korrelieren, um daraus im Verlauf eine Optimierung der bisherigen Therapieoptionen ableiten zu können. Idealerweise sollten die Patienten parallel auf ggf. vorliegende Genvariationen untersucht werden, um zukünftig verlässlichere Aussagen über den bereits vermuteten Zusammenhang tätigen zu können. Simultan sollte selbstverständlich die Untersuchung von Kontrollgruppen erfolgen.

Bei der Diskussion um die Bedeutung der IL-10-Expressionshöhe in Bezug auf den klinischen Verlauf von NHL-Patienten könnte die Frage aufkommen, warum weiterhin nach ggf. zugrundeliegenden Genvariationen gesucht wird und nicht einfach die Serumkonzentrationen bei Patienten bestimmt werden. Da sich IL-10 im Serum im Gegensatz zu DNA sehr instabil verhält (van der Linden et al. 1998), erschien die Analyse letzterer als deutlich verlässlicher und reproduzierbarer. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Dissertation ist eine qualifizierte Abnahme von Serum vor Therapie-Beginn mit anschließender optimaler Lagerung der Genotypisierung möglicherweise dennoch vorzuziehen.

IL-10 ist als autokriner Wachstumsfaktor für humane (sowohl gesunde als auch neoplastisch transformierte) B-Lymphozyten in die Pathophysiologie von Non-Hodgkin-Lymphomen involviert (Benjamin et al. 1994; Blay et al. 1993); der genaue Wirkmechanismus ist bisher allerdings nur unzureichend bekannt. Dies könnte auf der pleiotropen biologischen Aktivität des Zytokins sowie der Vielzahl an bisher eingesetzten Tumormodellen beruhen. IL-10 inhibiert die Bildung proinflammatorischer

Zytokine wie bspw. IL-6 und TNF- $\alpha$ . Da chronische Entzündungszustände die Entstehung und/oder Progression eines Tumors begünstigen können, hätte IL-10 damit eine völlig konträre Wirkung (Lin und Karin 2007). Weiterhin hemmt IL-10 die Angiogenese im Mikromilieu von Tumoren, was ebenfalls eine Regression zur Folge haben könnte (Cervenak et al. 2000).

Da IL-10 mittels Hemmung von regulatorischen T-Zellen zu einer Immunsuppression führt (Moore et al. 2001), können Tumorzellen vom Immunsystem nicht als solche erkannt werden, womit deren Elimination ausbleibt (Mocellin et al. 2005). Folglich könnte die Entwicklung von IL-10-Antikörpern, welche die immunsupprimierende Wirkung des Zytokins aufheben, von klinischer Relevanz sein. Andererseits werden immunstimulierende Eigenschaften von IL-10 diskutiert, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch weitestgehend unbekannt sind (Lin und Karin 2007; Mocellin et al. 2005). Zusammenfassend konnte der tatsächliche Einfluss von IL-10 auf das Immunsystem bisher nicht eindeutig geklärt werden.

## 6 Zusammenfassung

Obwohl Non-Hodgkin-Lymphome aufgrund der gegenwärtigen Therapiestrategien grundsätzlich heilbar sind, kann nicht immer eine komplette Remission erreicht werden. Außerdem sind zahlreiche Patienten von einer ausgeprägten Therapie-assoziierten Toxizität betroffen. Bei der Suche nach neuen klinisch relevanten und praktisch anwendbaren prognostischen Faktoren werden zunehmend Genvariationen bei Zytokinen in Betracht gezogen, welche als ursächlich für eine Erkrankung diskutiert sowie mit dem klinischen Verlauf in Zusammenhang gebracht werden. Der Hauptaspekt der vorliegenden Dissertation bestand deshalb in der Analyse von drei distalen *single nucleotide polymorphisms* (IL-10<sup>-12.806TC</sup>, IL-10<sup>-11.777GA</sup> und IL-10<sup>-11.668GA</sup>) sowie einer Genvariation im Bereich der 3'UTR des IL-10-Gens (IL-10<sup>+4.259AG</sup>) bei 594 Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom. Desweiteren erfolgte eine Analyse der IL-10-Genexpression, da ein Zusammenhang zwischen bestimmten IL-10-Genvariationen sowie der IL-10-Expressionshöhe vermutet wird.

Im Rahmen der Genotypisierungen konnte das bereits bekannte Verfahren der SNaPshot-Analyse erfolgreich zu einem *Multiplex Assay* weiterentwickelt werden. Neben einer univariaten Analyse erfolgte eine multivariate, auf IPI-Faktoren adjustierte Untersuchung der Genvariationen. Hierbei wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gesamtüberlebens sowie ereignisfreien Überlebens der Patienten beobachtet. Auffällig war jedoch die Tendenz, dass DLBCL-Patienten mit dem Genotyp AA des SNPs IL-10<sup>-11.777GA</sup> gegenüber heterozygoten Merkmalsträgern einen Vorteil hinsichtlich des ereignisfreien Überlebens zu haben scheinen. Desweiteren könnte der Genotyp AA der Genvariation IL-10<sup>+4.259AG</sup> ggf. für eine Erkrankung an einem DLBCL prädisponieren, da bei den untersuchten Patienten (verglichen mit gesunden Kontrollprobanden) ein signifikant höherer Anteil dieser Merkmalsträger identifiziert werden konnte. Die Durchführung weiterer Untersuchungen erscheint folglich sinnvoll.

Der Nachweis interindividueller Unterschiede bezüglich der IL-10-Transkriptmenge gelang hingegen nur teilweise, weshalb auch hier weitere Analysen durchgeführt werden sollten.

## 7 Anhang

**Anhang A Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen.** Eingesetzt wurde DNA von 24 zuvor von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe gewonnenen LCL-Zellen (Bezeichnung bspw. 7/3) sowie 30 bereits vorliegende DNA gesunder Kontrollprobanden (Bezeichnung: ‚Gö‘ plus Ziffernfolge, z. B. Gö35).

Probe	IL-10-12.806TC	IL-10-11.777GA	IL-10-11.668GA
7/3	TT	AA	AA
8/2	CC	AA	GG
8/4	CC	AA	GG
9/1	CC	AA	AG
13/1	CC	AA	GG
13/3	CT	AA	AA
15/3	CC	AA	GG
16/3	CT	AA	AA
23/1	CT	AA	AA
23/2	CT	AA	AA
31/1	CC	AA	AG
33/2	CT	AA	AG
34/1	TT	AA	AA
44/2	TT	AA	AA
49/1	CC	AA	GG
58/1	CC	AA	AG
58/3	CT	AG	AG
59/3	TT	AA	AA
60/2	CC	AG	GG
102/2	CC	AA	GG
103/1	CC	AG	AG
103/2	CC	AA	GG
103/3	CT	AA	GG
103/4	CT	AA	AG
Gö35	CT	AG	AG
Gö36	CT	AA	AG
Gö37	CT	AA	AG
Gö40	CC	AA	GG
Gö41	CC	AA	GG
Gö42	CT	AA	AG
Gö48	CC	AG	GG
Gö49	CT	AA	AG
Gö50	CT	AA	AG
Gö51	CC	AA	GG
Gö52	CC	AA	GG
Gö53	TT	AA	AA
Gö54	CT	AA	AA
Gö55	CT	AA	AG
Gö56	CT	AG	AG
Gö57	CC	AG	GG
Gö58	CT	AG	AG
Gö59	CT	AA	AA

Gö60	CC	AG	AG
Gö61	CC	AA	AG
Gö62	CC	AA	AG
Gö63	CT	AA	AA
Gö306	CC	AA	GG
Gö307	CC	AG	GG
Gö308	CC	AG	GG
Gö309	CT	AA	AG
Gö310	CC	AA	GG
Gö311	CT	AA	AA
Gö312	CT	AA	AA
Gö313	CC	AA	AG

**Anhang B Ergebnisse der Multiplex Assays bei DLBCL-Patienten.** Analysiert wurde eine Kohorte von 594 Patienten, welche als repräsentativ für alle an einem DLBCL erkrankten Personen innerhalb der NHL-B1-/B2-Studien betrachtet werden kann.

Studien-Nr.	IL-10-12.806TC	IL-10-11.777GA	IL-10-11.668GA	IL-10-4.259AG
3	CC	AA	GG	AA
4	CC	AA	GG	AA
6	CC	AA	AG	AA
15	CC	AA	GG	AA
22	CT	AA	AA	AG
24	CT	AA	AA	AG
25	CC	AA	GG	AA
29	CT	AA	AG	AG
34	CT	AA	AG	AA
36	CC	AA	AG	AA
37	CC	GG	GG	AG
38	CT	AA	AG	AG
42	CC	AA	AA	AA
44	CC	AA	AG	AG
45	CC	AA	AG	AA
48	CC	AA	AG	AA
55	CT	AG	AG	AG
56	CT	AG	AG	AG
64	CC	AG	GG	AA
67	CC	AA	AG	AA
69	CC	AA	AG	AG
78	CC	AA	AG	AG
81	CC	AA	GG	AA
86	CC	AA	GG	AA
90	CT	AA	AA	AG
91	CC	AA	AG	AA
94	CC	AG	GG	AA
96	CT	AA	AG	AG
98	CT	AA	AG	AG
99	CC	AA	AG	AA
100	CC	AA	GG	AA
106	CT	AA	AG	AG
110	CC	AA	GG	AA

---

113	CC	AA	GG	AA
114	CC	AA	AA	AA
117	CC	AG	GG	AA
118	CT	AA	AA	AA
131	TT	AA	AA	GG
142	CT	AA	AA	AG
154	CT	AA	AG	AG
162	CC	AA	GG	AA
165	CC	AA	AG	AA
166	CC	AA	GG	AA
171	CC	AA	AG	AA
172	CC	AA	GG	AA
181	CC	AA	GG	AA
184	CC	AA	GG	AA
187	CC	AA	AG	AG
189	CC	AA	AG	AA
191	CT	AA	AG	AG
193	CC	AA	GG	AA
194	CC	AA	AG	AA
195	CC	AA	AG	AA
196	CT	AA	GG	AA
202	CC	AA	AG	AA
207	CC	AA	GG	AA
208	CC	AA	AG	AA
214	CC	AA	AG	AA
224	CT	AA	AG	AG
227	CC	AA	AG	AA
228	CC	AA	AG	AA
230	CC	AA	AG	AG
234	CC	AA	GG	AA
235	CC	AA	AG	AA
236	CT	AA	AG	AG
237	CC	AA	AG	AA
240	CC	AA	AG	AA
243	CT	AA	AA	AG
244	CC	AA	AA	AA
245	CT	AA	AG	AG
249	CC	AA	AG	AA
255	CC	AG	GG	AA
259	CC	AA	AG	AA
262	CC	AA	AA	GG
265	CC	AA	GG	AA
267	CC	AA	AG	AA
268	CC	AA	AA	AA
269	CC	AA	AA	AA
270	CC	AA	AG	AA
275	CT	AA	AG	AG
277	CC	AG	GG	AA
279	CC	AA	AG	AA
280	CC	AA	AG	AA
284	CC	AA	AG	AA

---

285	CT	AA	AA	GG
290	CC	AA	GG	AG
292	CC	AA	GG	AA
293	CC	AG	GG	AA
295	CT	AA	AG	AG
298	CT	AA	AG	AG
306	CC	AG	GG	AA
307	CT	AA	AG	AG
313	CC	AA	GG	AG
317	CT	AA	AG	AG
319	CT	AA	AG	AG
320	CC	AA	AA	AG
321	CT	AA	AG	AG
326	CT	AA	AG	AG
332	CC	AA	AG	AA
334	CT	AA	AG	AG
337	CC	AA	GG	AA
339	CC	AA	AG	AA
340	CC	AA	AG	AA
345	CC	AA	AG	AA
349	CT	AG	AG	AG
353	CT	AA	AG	AG
359	CC	AA	AG	AA
368	CC	AA	GG	AA
370	TT	AA	AA	GG
380	CT	AA	AA	AG
384	CC	AA	GG	AA
385	CC	AA	GG	AA
387	CC	AG	GG	AA
396	CC	AA	AG	AA
398	CC	AA	GG	AA
400	CT	AA	AA	AG
401	CC	AG	GG	AA
406	CC	AA	GG	AA
409	CC	AA	AG	AG
411	CC	AA	GG	AA
412	TT	AA	AA	GG
417	CC	AA	AA	AA
432	CC	AA	AA	AA
433	CT	AA	AG	AG
436	CC	AA	GG	AA
442	CT	AA	AG	AG
449	CC	AA	GG	AG
452	CC	AA	GG	AA
455	CT	AA	AG	AG
457	CC	AA	GG	AA
470	CC	AG	GG	AA
473	CC	AG	GG	AA
474	CC	AA	GG	AA
479	TT	AA	AA	GG
484	CC	AA	GG	AA

---

486	CC	AA	GG	AG
487	CT	AA	AG	AG
489	CT	AG	AG	AG
490	CC	AG	GG	AA
491	CC	AA	AG	AA
495	CT	AA	AG	AG
498	CC	AA	AG	AA
503	CT	AG	AG	AG
504	CT	AA	AA	AG
508	CT	AA	AG	AA
514	CT	AA	AG	AG
515	CC	AG	GG	AA
523	CT	AA	AG	AG
524	CT	AA	AG	AG
527	CT	AA	AG	AG
535	CC	AA	GG	AA
536	CC	AA	AA	GG
537	CT	AA	AA	AG
538	CC	AA	GG	AG
539	CC	AA	AG	AA
547	CC	AA	GG	AA
548	CT	AA	AG	AG
549	CC	AA	AG	AA
551	CC	AA	GG	AA
553	CC	AA	GG	AA
556	CT	AA	AG	AG
563	CT	AA	AG	AG
568	CT	AA	AA	AG
569	CT	AA	AA	AG
571	CT	AA	AG	AG
572	CC	AA	AG	AA
573	CT	AA	AG	AG
578	CC	AA	GG	AA
579	CC	AA	AG	AA
594	CC	AA	AG	AA
609	CT	AA	AG	AG
611	CT	AA	AA	AG
614	CT	AA	AG	AG
624	CC	AG	GG	AA
625	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
626	CC	AA	AG	AA
628	CC	AG	GG	AA
634	CT	AA	AG	AG
638	CT	AA	AG	AG
639	CT	AA	AG	AA
640	CT	AA	AA	GG
641	CC	AG	AG	AA
644	CC	AA	GG	AA
652	CC	AA	GG	AA
654	CC	AA	GG	AA
656	CT	AA	AG	AG

---

657	CT	AA	AG	AG
666	CT	AA	GG	AA
670	CC	AG	AG	AA
671	CC	AA	AG	n. d.
675	CT	AA	AG	AG
681	CC	AG	GG	AA
684	CT	AA	AG	AG
686	CC	AA	AA	AG
688	CC	AG	AG	AA
692	CC	AA	GG	AA
695	CC	AA	GG	AA
699	CC	AA	AG	AG
703	CT	AA	AG	AG
707	TT	AA	AA	GG
710	CC	AA	GG	AA
720	CT	AA	AG	AG
725	CC	AA	GG	AA
726	CC	AA	GG	AA
727	CT	AA	AG	AG
729	CT	AA	AG	AG
731	CC	AA	AG	AA
732	CC	AA	AA	AA
733	CC	AA	AG	AA
735	CC	AA	GG	AA
738	CC	AA	AG	AA
739	CC	AA	AG	AA
740	CT	AA	AG	AG
744	CT	AA	AA	AG
749	CC	AA	GG	AA
750	CC	AA	AA	AA
753	CC	AA	AG	AA
754	CT	AA	AG	AA
755	CC	AA	AG	AA
756	CC	AA	GG	AA
764	CC	AA	AG	AA
765	CC	AA	AG	AA
767	CC	AA	GG	AA
768	TT	AA	AA	AG
772	CT	AA	AG	AG
776	CT	AA	AG	AG
782	CT	AA	AG	AG
784	CT	AA	AG	AG
789	CT	AA	AG	AG
790	CT	AA	AA	AG
791	CC	AA	AG	AA
792	CT	AG	AG	AG
799	CC	AG	AG	AA
800	CC	AA	AA	AA
802	CC	AA	AG	AA
804	CT	AA	AG	AG
808	CC	AG	AG	AA

---

809	CC	AA	GG	AA
810	CT	AA	AG	AG
811	CC	AG	GG	AA
814	CT	AA	AA	AA
818	CT	AA	AG	AG
819	CC	AA	GG	AA
822	CC	AA	AG	AA
825	CT	AA	AA	AG
826	CC	AA	GG	AA
827	CC	AA	GG	AA
829	CC	AA	GG	AA
834	CC	GG	GG	AA
836	CC	AA	GG	AG
838	CT	AA	AG	AG
839	CC	AG	GG	AA
842	CT	AA	AG	AG
848	CT	AA	AG	AG
850	CT	AA	AG	AG
853	TT	AA	AA	AG
854	CT	AA	AG	AG
855	CC	AA	GG	AA
856	CC	AA	GG	AA
857	CC	AA	GG	AA
862	CC	AA	AG	AA
863	CC	AA	AG	AA
865	CC	AA	AG	AA
869	CC	AA	AG	AA
870	CC	AG	GG	AA
872	CC	AG	GG	AA
881	CC	AA	AG	AA
882	CC	AA	GG	AA
885	CC	AA	AG	AA
888	CT	AA	AG	AG
889	CC	AA	AG	AG
892	TT	AA	AA	GG
894	CT	AA	AA	AG
897	CT	AA	AG	AG
898	CC	AA	AG	AG
899	CT	AA	AG	AA
901	CT	AA	AG	AG
905	CT	AA	AG	AG
906	CC	AA	AG	AG
909	CC	AA	AG	AA
910	CC	AA	GG	AA
912	CC	AA	AG	AG
914	CC	AA	AA	AA
915	CC	AA	GG	AA
917	CT	AG	AG	AG
919	TT	AA	AA	AG
923	CC	AG	AG	AG
929	CC	AA	AG	AA

---

932	CT	AA	AG	AG
935	CC	AA	GG	AA
936	CT	AA	AG	AG
937	CT	AA	AA	AG
940	CC	AA	AG	AA
944	CC	AA	AG	AA
950	CC	AA	AA	AA
952	CT	AA	AG	AG
953	CT	AA	AG	AA
962	CC	AA	GG	AA
963	CC	AG	GG	AA
967	CC	AA	GG	AA
968	CC	AA	AA	AA
969	CC	AA	GG	AA
970	CC	AA	GG	AA
971	CC	AA	GG	AA
973	CC	AA	GG	AA
974	CC	AA	GG	AA
976	CT	AA	AA	AG
977	CC	AA	AG	AA
978	CC	AA	GG	AA
980	CT	AA	AA	AG
982	CT	AA	AG	AG
983	CC	AA	AG	AA
984	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
985	CC	AA	GG	AA
986	CC	AG	AG	AA
987	CC	AA	AG	AA
988	CT	AA	AG	AG
991	CT	AA	AG	AG
992	CT	AA	AG	AG
994	CC	AA	AA	AA
996	TT	AA	AA	GG
998	CT	AA	AG	AG
999	CC	AA	GG	AA
1000	CT	AA	AG	AG
1006	CC	AG	GG	AA
1007	CC	AA	GG	AA
1010	CC	AG	AG	AG
1011	CT	AA	AG	AG
1012	CC	AA	AG	AA
1013	CC	AA	AA	AA
1022	CT	AA	AA	AG
1024	CC	AA	AG	AG
1025	CC	AA	AG	AA
1029	CC	AA	GG	AA
1030	CC	AA	GG	AA
1031	CC	AA	GG	AA
1033	CT	AA	AG	AG
1038	CC	AA	AG	AA
1042	CC	AA	AG	AA

---

1046	CT	AA	AG	AA
1047	CC	AG	GG	AA
1048	CT	AG	AG	AG
1049	CC	AA	AA	AA
1053	CC	AA	GG	AA
1054	CT	AA	AG	AG
1055	CC	AA	AG	AG
1062	CC	AA	GG	AA
1065	CT	AA	AG	AG
1070	CT	AA	AG	AG
1072	CC	AA	AG	AA
1075	CC	AG	GG	AA
1076	CC	AA	GG	AA
1080	CT	AA	AG	AG
1081	CC	AA	AG	AA
1086	CC	AA	GG	AA
1087	CC	AA	AG	AA
1089	CC	AA	AG	AG
1090	CC	AA	GG	AA
1091	CC	AG	AG	AA
1092	CC	AA	AG	AG
1096	CT	AA	AG	AG
1100	CC	AA	AG	AA
1101	CC	AA	GG	AA
1102	CC	AA	GG	AG
1106	CC	AA	AG	AA
1107	CC	AA	AG	AG
1108	CC	AA	GG	AA
1112	CC	AA	AG	AA
1113	CT	AG	AG	AG
1116	CC	AA	AG	AA
1117	CC	AA	AG	AA
1120	CT	AG	AG	AG
1126	CC	AA	GG	AA
1128	CC	AA	AG	AA
1135	CT	AA	AG	AG
1136	CC	AA	GG	AA
1139	CT	AA	AG	AG
1144	CC	AA	GG	AA
1145	CT	AA	AA	AG
1146	CC	AG	GG	AA
1147	CC	AA	AG	AA
1148	CC	AG	GG	AA
1158	CC	AA	AG	AA
1160	CT	AA	AA	AG
1165	CC	AA	AG	AA
1166	CC	AA	AG	AA
1167	CC	AG	GG	AA
1170	CT	AA	AA	AG
1175	CT	AA	AG	AG
1176	CC	AG	GG	AA

---

1180	CC	AA	AA	AG
1181	CT	AA	AG	AG
1184	CT	AA	AG	AA
1188	CT	AA	AG	AG
1189	CC	AA	AG	AG
1194	CC	AA	GG	AA
1195	CC	AG	GG	AA
1199	CC	AA	GG	AA
1203	CT	AA	AA	GG
1207	CC	AA	AG	AA
1216	CC	AA	AG	AA
1217	CC	AA	GG	AA
1220	CT	AA	AG	AG
1221	CC	AA	GG	AA
1223	CC	AG	AG	AA
1225	CT	AA	AG	AG
1227	CC	AA	AG	AA
1233	CC	AA	GG	AA
1235	CC	AA	AG	AA
1238	CC	AA	AG	AA
1241	CC	AA	GG	AA
1244	CC	AA	AG	AA
1248	CC	AA	AG	AG
1249	CC	AA	AG	AA
1252	CT	AA	AG	AG
1256	CT	AA	AG	AG
1258	CC	AA	GG	AA
1259	CC	AA	AG	AA
1262	CC	AA	AG	AA
1264	CC	AG	GG	AA
1266	CT	AA	AG	AG
1267	TT	AA	AA	GG
1268	CC	AG	GG	AA
1269	CT	AA	AG	AA
1277	CC	AG	GG	AA
1279	CC	AA	GG	AA
1283	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
1284	CC	AA	GG	AA
1286	CC	AA	GG	AA
1287	CC	AA	AG	AA
1294	CT	AA	AG	AG
1298	CC	AA	GG	AA
1301	CT	AA	AG	AA
1302	CC	AA	AG	AA
1303	CT	AA	AG	AG
1304	CT	AA	AG	AG
1305	CT	AA	AA	AG
1310	CC	AG	AG	AG
1314	CC	AA	GG	AA
1315	TT	AA	AA	AA
1318	CC	AA	GG	AG

---

1319	TT	AA	AA	AG
1320	CT	AA	AA	AG
1322	CC	AA	GG	AA
1332	CC	AG	GG	AA
1333	TT	AA	AA	GG
1340	CC	AA	GG	AA
1341	CT	AA	AG	AG
1344	CC	AA	AG	AA
1345	CC	AA	GG	AA
1346	CT	AA	AA	AG
1348	CC	AA	AG	AG
1350	CC	AA	AG	AG
1353	CT	AA	AG	AG
1356	CC	AA	AG	AA
1357	CC	AG	GG	AG
1359	CC	GG	GG	AA
1360	CC	AG	GG	AG
1361	CC	AA	GG	AA
1362	CT	AA	AG	AG
1364	CC	AG	GG	AG
1370	CC	AG	GG	AA
1375	TT	AA	AA	AG
1376	CC	AA	GG	AA
1382	CC	AA	AG	AA
1388	CC	AA	AG	AG
1389	CC	AA	GG	AA
1391	CT	AA	AA	AA
1395	CT	AA	AA	AG
1396	CT	AA	AG	AG
1399	CC	AA	GG	AA
1402	CC	AG	AG	AA
1403	CC	AG	AG	AA
1404	CC	AA	AG	AA
1405	CC	AA	AG	AA
1407	CC	n. d.	AG	AA
1408	CC	AA	GG	AA
1409	CT	AA	AG	AA
1415	CC	AG	GG	AA
1418	CT	AA	AG	AG
1420	CT	AA	AA	AA
1423	CT	AA	AG	AG
1427	CT	AA	AG	AG
1428	CC	AA	AG	AA
1432	CT	AA	AG	AG
1433	CT	AA	AG	AG
1434	CC	AA	AG	AA
1435	CC	AG	AG	AA
1436	CC	AA	GG	AA
1437	CC	AG	AG	AA
1440	TT	AA	AA	GG
1441	CT	AA	AA	GG

---

1445	CT	AA	AG	AG
1453	CC	AG	GG	AA
1455	CC	AA	GG	AA
1458	CC	AA	AG	AA
1460	CC	AA	GG	AA
1461	CT	AA	AG	AG
1463	CC	AA	AA	AA
1466	CC	AA	GG	AA
1468	CC	AA	AG	AA
1469	CT	AA	AG	AG
1470	CC	AA	AG	AA
1474	CT	AA	AA	AG
1476	CC	AA	GG	AA
1477	CT	AA	AG	AG
1484	CT	AA	AA	AG
1485	CC	AA	GG	AA
1487	CC	AA	AG	AA
1488	CC	AA	AG	AG
1489	CT	AA	AG	AG
1491	CC	AA	AG	AA
1492	CT	AA	AA	AA
1498	CC	AA	AG	AG
1499	CC	AA	GG	AA
1500	CC	AG	GG	AA
1503	CC	AA	AA	AA
1504	CT	AA	AG	AG
1507	CC	AA	GG	AA
1510	CC	AA	GG	AA
1511	CT	AA	AG	AG
1516	TT	AA	AA	GG
1518	CC	AA	AG	AG
1520	CC	AA	AG	AA
1521	CT	AA	AA	AG
1522	TT	AA	AA	GG
1524	CC	AA	AA	AG
1527	CC	AA	GG	AA
1536	CT	AA	AG	AG
1540	CC	AG	GG	AA
1541	CC	AA	GG	AA
1544	CC	AA	GG	AA
1548	CC	AG	GG	AA
1549	CT	AA	AG	AG
1550	CC	AG	GG	AA
1553	CC	AA	AG	AG
1554	CC	AA	AG	AA
1555	CC	AA	AG	AG
1557	CC	AA	AG	AA
1558	CC	AA	GG	AG
1561	CT	AA	AA	AG
1563	CC	AA	GG	AA
1565	CT	AA	AG	AG

---

1569	CC	AA	AG	AG
1571	CT	AA	AG	AG
1573	CC	AA	GG	AA
1576	CC	AA	GG	AA
1577	CT	AA	AA	AG
1582	CC	AA	AA	AG
1587	TT	AA	AA	GG
1588	CT	AA	AG	AG
1595	CT	AA	AG	AG
1600	CT	AA	AA	AG
1601	CT	AA	AG	AA
1602	CC	AA	AA	AA
1605	CC	AA	AG	AA
1606	CC	AA	GG	AA
1608	CT	AA	AG	AA
1611	CT	AA	AA	AA
1613	CC	AA	AG	AA
1615	CC	AA	AG	AA
1617	CT	AA	AG	AG
1618	CC	AA	AG	AG
1619	CT	AA	AG	AG
1621	CC	AA	GG	AA
1630	CC	AA	GG	AA
1631	CC	AA	AG	AG
1633	CC	AA	AA	AG
1634	CC	AA	GG	AA
1637	CT	AA	AG	AG
1638	CC	AG	GG	AA
1640	CC	AA	GG	AA
1643	CT	AA	AG	AG
1646	CC	AG	GG	AA
1647	CC	AG	GG	AA
1658	CT	AA	AG	AG
1660	CT	AA	AG	AA
1664	CT	AA	AG	AA
1666	CC	AG	AG	AA
1668	CC	AA	GG	AA
1671	CC	AA	GG	AA
1674	CC	AA	AG	AA
1675	CC	AA	AG	AA
1678	CC	AA	GG	AA
1684	CC	AA	GG	AG
1685	CC	AA	GG	AA
1686	CT	AA	AG	AG
1688	CC	AA	GG	AA
1689	CC	AA	GG	AA
1690	CC	AG	GG	AA
1694	TT	AA	AA	GG
1695	TT	AG	AA	GG
1697	TT	AA	AA	GG
1699	CT	AA	AG	AG

**Anhang C Ergebnisse der Multiplex Assays bei gesunden Kontrollprobanden.** Von den 135 Proben entfielen 23 auf LCL-Zellen des internationalen HapMap-Projektes (Bezeichnung 1 bis 60), 24 auf LCL-Zellen, welche aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender gewonnen (Bezeichnung bspw. 7/3) sowie 84 auf DNA-Proben, die aus *Buffy coats* isoliert worden waren (Bezeichnung: ‚Gö‘ plus Ziffernfolge, z. B. Gö35).

Probe	IL-10 <sub>-12.806TC</sub>	IL-10 <sub>-11.777GA</sub>	IL-10 <sub>-11.668GA</sub>	IL-10 <sub>4.259AG</sub>
1	TT	AA	AA	GG
2	TT	AA	AA	GG
3	CC	AA	AA	AA
4	CC	AA	GG	AA
5	CC	AA	AG	AA
12	CC	AA	AG	AG
13	CT	AA	AG	AG
14	CT	AA	AG	AG
15	CT	AG	AG	AG
16	TT	AA	AA	GG
21	CC	AA	AG	AA
22	CC	AA	GG	AA
23	CT	AA	AG	GG
24	CC	AA	AG	AA
30	CT	AA	AG	AG
31	CT	AA	AG	AG
32	CC	AG	AG	AG
34	CC	AA	AG	AA
40	CC	AA	GG	AA
41	CC	AA	GG	AA
50	CT	AA	AG	AG
54	CC	AA	GG	AA
60	CT	AA	AG	GG
7/3	TT	AA	AA	GG
8/2	CC	AA	GG	AA
8/4	CC	AA	GG	AA
9/1	CC	AA	AG	AA
13/1	CC	AA	GG	AA
13/3	CT	AA	AA	AG
15/3	CC	AA	GG	AA
16/3	CT	AA	AA	GG
23/1	CT	AA	AA	AG
23/2	CT	AA	AA	AG
31/1	CC	AA	AG	AA
33/2	CT	AA	AG	AG
34/1	TT	AA	AA	GG
44/2	TT	AA	AA	GG
49/1	CC	AA	GG	AA
58/1	CC	AA	AG	AA
58/3	CT	AG	AG	AG
59/3	TT	AA	AA	GG
60/2	CC	AG	GG	AA
102/2	CC	AA	GG	AA
103/1	CC	AG	AG	AG

---

103/2	CC	AA	GG	AG
103/3	CT	AA	GG	AA
103/4	CT	AA	AG	AG
Gö35	CT	AG	AG	AG
Gö36	CT	AA	AG	AG
Gö37	CT	AA	AG	AG
Gö40	CC	AA	GG	AG
Gö41	CC	AA	GG	AA
Gö42	CT	AA	AG	AG
Gö48	CC	AG	GG	AA
Gö49	CT	AA	AG	GG
Gö50	CT	AA	AG	AG
Gö51	CC	AA	GG	AA
Gö52	CC	AA	GG	AA
Gö53	TT	AA	AA	GG
Gö54	CT	AA	AA	AG
Gö55	CT	AA	AG	AG
Gö56	CT	AG	AG	AG
Gö57	CC	AG	GG	AA
Gö58	CT	AG	AG	AG
Gö59	CT	AA	AA	AG
Gö60	CC	AG	AG	AA
Gö61	CC	AA	AG	AA
Gö62	CC	AA	AG	AA
Gö63	CT	AA	AA	AA
Gö65	CT	AA	AG	AA
Gö66	CC	AA	GG	AA
Gö67	CC	AA	GG	AA
Gö68	CC	AA	AG	AG
Gö69	CT	AA	AA	AG
Gö70	CT	AA	AA	AG
Gö71	CC	AA	AG	AA
Gö72	CT	AA	AG	AG
Gö73	CT	AA	AG	AG
Gö74	CC	AA	GG	AA
Gö75	CC	AA	GG	AA
Gö76	CC	AG	AG	AA
Gö78	CT	AA	AG	AG
Gö79	CC	AA	GG	AA
Gö80	CT	AA	AG	AG
Gö81	CC	AG	GG	AA
Gö82	CT	AG	AG	AG
Gö83	CT	AA	AG	AG
Gö84	CC	AA	AG	AA
Gö85	TT	AA	AA	GG
Gö86	CT	AA	AG	AG
Gö87	CT	AA	AG	AG
Gö90	CT	AA	GG	AG
Gö91	CC	AG	GG	AA
Gö92	CC	AG	GG	AA
Gö93	CC	AG	AG	AA

---

Gö96	CC	AA	AG	AA
Gö97	CC	AA	AG	AA
Gö99	CT	AA	AG	AA
Gö100	CT	AG	AG	AG
Gö101	CT	AA	AA	AG
Gö103	CC	AG	GG	AA
Gö104	CT	AA	AA	GG
Gö106	CC	AA	GG	AG
Gö107	CT	AA	AG	AG
Gö108	CC	AA	GG	AA
Gö110	CC	AA	AG	AA
Gö112	CT	AA	AG	AG
Gö113	CC	AA	GG	AA
Gö121	CC	AA	AG	AA
Gö122	CC	AA	AG	AA
Gö127	CT	AA	AG	AG
Gö128	TT	AA	AA	GG
Gö130	CC	AA	GG	AA
Gö131	CT	AA	AG	AA
Gö132	CC	AA	GG	AA
Gö133	CT	AA	AG	AG
Gö135	CT	AA	AA	AG
Gö136	CC	AA	AG	AA
Gö137	CT	AA	AG	AG
Gö139	CT	AA	AG	GG
Gö142	CC	AA	AG	AA
Gö143	CC	AA	AG	AA
Gö223	CC	AG	GG	AA
Gö306	CC	AA	GG	AA
Gö307	CC	AG	GG	AA
Gö308	CC	AG	GG	AA
Gö309	CT	AA	AG	AG
Gö310	CC	AA	GG	AA
Gö311	CT	AA	AA	AG
Gö312	CT	AA	AA	AA
Gö313	CC	AA	AG	AA

## 8 Literaturverzeichnis

- Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B (2001): Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res* 7(3), 709-23
- Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Chang ET, Cole P, Mandel JS, Trichopoulos D (2007): The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer* 120 Suppl 12, 1-39
- Beatty PR, Krams SM, Martinez OM (1997): Involvement of IL-10 in the autonomous growth of EBV-transformed B cell lines. *J Immunol* 158(9), 4045-51
- Bellan C, Lazzi S, De Falco G, Nyongo A, Giordano A, Leoncini L (2003): Burkitt's lymphoma: new insights into molecular pathogenesis. *J Clin Pathol* 56(3), 188-92
- Benjamin D, Park CD, Sharma V (1994): Human B cell interleukin 10. *Leuk Lymphoma* 12(3-4), 205-10
- Berglund M, Thunberg U, Roos G, Rosenquist R, Enblad G (2005): The interleukin-10 gene promoter polymorphism (-1082) does not correlate with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 105(12), 4894-5
- Blay JY, Burdin N, Rousset F, Lenoir G, Biron P, Philip T, Banchereau J, Favrot MC (1993): Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood* 82(7), 2169-74
- Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann ML, Küppers R (2006): Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 118(8), 1853-61
- Breen EC, Boscardin WJ, Detels R, Jacobson LP, Smith MW, O'Brien SJ, Chmiel JS, Rinaldo CR, Lai S, Martínez-Maza O (2003): Non-Hodgkin's B cell lymphoma in persons with acquired immunodeficiency syndrome is associated with increased serum levels of IL10, or the IL10 promotor -592 C/C genotype. *Clin Immunol* 109(2), 119-29
- Cavet J, Middleton PG, Segall M, Noreen H, Davies SM, Dickinson AM (1999): Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality

- and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplant. *Blood* 94(11), 3941-6
- Cervenak L, Morbidelli L, Donati D, Donnini S, Kambayashi T, Wilson JL, Axelson H, Castaños-Velez E, Ljunggren HG, Malefyt RD *et al.* (2000): Abolished angiogenicity and tumorigenicity of Burkitt lymphoma by interleukin-10. *Blood* 96(7), 2568-73
- Cortes JE, Talpaz M, Cabanillas F, Seymour JF, Kurzrock R (1995): Serum levels of interleukin-10 in patients with diffuse large cell lymphoma: lack of correlation with prognosis. *Blood* 85(9), 2516-20
- Cunningham LM, Chapman C, Dunstan R, Bell MC, Joske DJ (2003): Polymorphisms in the interleukin 10 gene promoter are associated with susceptibility to aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 44(2), 251-5
- D'Alfonso S, Rampi M, Bocchio D, Colombo G, Scorza-Smeraldi R, Momigliano-Richardi P (2000): Systemic lupus erythematosus candidate genes in the Italian population: evidence for a significant association with interleukin-10. *Arthritis Rheum* 43(1), 120-8
- de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991): Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174(5), 1209-20
- Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, Field M, Gallagher G (1997): Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 49(6), 635-9
- Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW (1998): Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16), 9465-70
- Fischbach W (1998): Current aspects of pathogenesis, diagnosis and therapy of primary MALT stomach lymphomas. *Z Gastroenterol* 36(4), 307-12
- Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP (2001): Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166(6), 3915-22

- 
- Grulich AE, Vajdic CM (2005): The epidemiology of non-Hodgkin lymphoma. *Pathology* 37(6), 409-19
- Gupta M, Han JJ, Stenson M, Maurer M, Wellik L, Hu G, Ziesmer S, Dogan A, Witzig TE (2012): Elevated serum IL-10 levels in diffuse large B-cell lymphoma: a mechanism of aberrant JAK2 activation. *Blood* 119(12), 2844-53
- Hajeer AH, Lazarus M, Turner D, Mageed RA, Vencovsky J, Sinnott P, Hutchinson IV, Ollier WE (1998): IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 27(2), 142-5
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1), 57-70
- Hill AV (2001): The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annu Rev Genomicx Hum Genet* 2, 373-400
- Hofmann SR, Ettinger R, Zhou YJ, Gadina M, Lipsky P, Siegel R, Candotti F, O'Shea JJ (2002): Cytokines and their role in lymphoid development, differentiation and homeostasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2(6), 495-506
- Hollegaard MV, Bidwell JL (2006): Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes Immun* 7(4), 269-76
- Holloway AF, Rao S, Shannon MF (2002): Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Mol Immunol* 38(8), 567-80
- Howell WM, Calder PC, Grimble RF (2002): Gene polymorphisms, inflammatory diseases and cancer. *Proc Nutr Soc* 61(4), 447-56
- Howell WM, Rose-Zerilli MJ (2006): Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis. *Fam Cancer* 5(2), 143-9
- Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe; Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin 2010

- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon 2001
- Kube D, Rieth H, Eskdale J, Kremser PG, Gallagher G (2001): Structural characterisation of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. *Genes Immun* 2(4), 181-90
- Kube D, Hua TD, von Bonin F, Schoof N, Zeynalova S, Klöss M, Gocht D, Potthoff B, Tzvetkov M, Brockmüller J *et al.* (2008): Effect of interleukin-10 gene polymorphisms on clinical outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: an exploratory study. *Clin Cancer Res* 14(12), 3777-84
- Kurreeman FA, Schonkeren JJ, Heijmans BT, Toes RE, Huizinga TW (2004): Transcription of the IL10 gene reveals allele-specific regulation at the mRNA level. *Hum Mol Genet* 13(16), 1755-62
- Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, Akanmori BD, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, Behr C, Hviid L (1998): Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 351(9118), 1768-72
- Lacki JK, Samborski W, Mackiewicz SH (1997): Interleukin-10 and interleukin-6 in lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, correlations with acute phase proteins. *Clin Rheumatol* 16(3), 275-8
- Lalani I, Bhol K, Ahmed AR (1997): Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79(6), 469-83
- Lech-Maranda E, Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C, Berger F, Rigal D, Warzocha K, Coiffier B, Salles G (2004): Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 103(9), 3529-34
- Lech-Maranda E, Bienvenu J, Michallet AS, Houot R, Robak T, Coiffier B, Salles G (2006): Elevated IL-10 plasma levels correlate with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Eur Cytokine Netw* 17(1), 60-6
- Lech-Maranda E, Bienvenu J, Broussais-Guillaumot F, Warzocha K, Michallet AS, Robak T, Coiffier B, Salles G (2010): Plasma TNF-alpha and IL-10 level-based prognostic model predicts outcome of patients with diffuse large B-Cell lymphoma in different risk groups defined by the International Prognostic Index. *Arch Immunol Ther Exp* 58(2), 131-41

- 
- Lin WW, Karin M (2007): A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 117(5), 1175-83
- Mocellin S, Marincola FM, Young HA (2005): Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol* 78(5), 1043-51
- Mörmann M, Rieth H, Hua TD, Assouhou C, Roupelieva M, Hu SL, Kreamsner PG, Luty AJ, Kube D (2004): Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Genes Immun* 5(4), 246-55
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR (1993): Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11, 165-90
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001): Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765
- Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Metzner B, Hasenclever D *et al.* (2004 a): Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood* 104(3), 626-33
- Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rube C, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Eimermacher H *et al.* (2004 b): Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood* 104(3), 634-41
- Preiß J, Dornoff W, Hagmann FG, Schmieder A: Taschenbuch Onkologie 2008/09. Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie. 14. Auflage; W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, Germering/München 2008
- Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Höhler T (2002): Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors - a twin study. *Genes Immun* 3(7), 407-13
- Rieth H, Mörmann M, Luty AJ, Assouhou-Luty CA, Roupelieva M, Kreamsner PG, Kube D (2004): A three base pair gene variation within the distal 5'-flanking region of the interleukin-10 (IL-10) gene is related to the in vitro IL-10 production capacity of lipopolysaccharide-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Eur Cytokine Netw* 15(2), 153-8

Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V, Hajeer AH, McMahon R, Whorwell PJ, Sinnott PJ, Hutchinson IV (1999): Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 54(4), 386-90

Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV (1997): An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 24(1), 1-8

van der Linden MW, Huizinga TW, Stoeken DJ, Sturk A, Westendorp RG (1998): Determination of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation. *J Immunol Methods* 218(1-2), 63-71

Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, Vandenbroucke JP (1997): Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 349(9046), 170-3

Internetquelle

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>; Zugriff am 24.11.2015

## Danksagung

Herzlichen Dank an

- Prof. Dr. med. Lorenz Trümper für die Möglichkeit, in seiner Abteilung promovieren zu können.
- meinen Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Dieter Kube für die Betreuung dieser Dissertation.
- Dr. rer. nat. Christina Stadler für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld bei jeder Fragestellung.
- Frederike von Bonin, Angela Lenz und Maike Schaffrinski für die Unterstützung bei einer Vielzahl von Versuchen.
- PD Dr. rer. nat. habil. Mladen Tzvetkov (Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen) für die Bereitstellung der HapMap-LCLs.
- Dr. rer. med. Markus Kreuz (Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig) für die Berechnung der statistischen Überlebenszeitanalysen.