

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der Universität Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie

Nachweis der MYD88-Mutation p.L265P
bei diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wlokka, Ulrike Maria
2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Falko Fend
2. Berichterstatter Professor Alexander Weber

Tag der Disputation: 27.06.2017

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	I
2	Abkürzungsverzeichnis:	V
3	Einleitung:.....	1
3.1	Lymphome	1
3.2	Klassifikation der Lymphome	1
3.3	B-Zellreifung	2
3.4	Pathogenese des DLBCL, NOS	4
3.5	DLBCL: Epidemiologie und Klinik	5
3.6	Morphologie des DLBCL	6
3.7	Diagnostik des DLBCL und immunhistochemische Aspekte.....	7
3.8	Therapeutische Aspekte des DLBCL	8
3.9	Signalwege im DLBCL.....	9
3.10	Funktion und onkogenetische Wirkungen von MYD88.....	10
3.11	Ziel dieser Studie	14
4	Material und Methoden	16
4.1	Patienten:	16
4.2	Reagenzien	16
4.3	Geräte:.....	20
4.4	Software	20
4.5	Immunhistochemische Färbungen	20
4.6	Histopathologische Einteilung und Überprüfung der Fälle	22
4.7	Entparaffinisierung der Proben für die DNA-Isolation	23
4.8	DNA- Extraktion mit dem MagNA Pure LC 2.0:	24
4.9	DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform- Aufreinigung:.....	25
4.10	Polymerase-Ketten Reaktion (PCR):	25
4.11	Gelelektrophorese der PCR Produkte	27
4.12	Schmelzpunktanalyse der Proben:.....	27
4.13	Anfertigen eines Tissue Micro Arrays.....	31
4.14	Statistische Auswertung	32
5	Ergebnisse.....	33
5.1	Erstellung des Studienkollektivs	33
5.2	Immunhistochemie.....	34
5.3	Tissue Array	35
5.4	Nachweis der MYD88-Mutation mittels Schmelzkurvenanalyse	37
5.5	Allgemeine patientenbezogene Daten des Studienkollektivs:.....	38

Inhaltsverzeichnis

5.5.1	Morphologie	40
5.6	Expression der Marker des Hans-Algorithmus innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs.....	40
5.6.1	CD10	40
5.6.2	MUM1.....	40
5.6.3	BCL6	41
5.7	Vergleich immunhistochemischer Marker des ABC- und GCB-Kollektivs	42
5.7.1	BCL2	42
5.7.2	CD3	42
5.7.3	Ki67	43
5.7.4	c-MYC.....	44
5.8	MYD88-Status innerhalb des Studienkollektivs	45
5.9	Allgemein patientenbezogene Daten der MYD88 ^{L265P} -Gruppe	45
5.9.1	Morphologie	47
5.9.2	Immunhistochemische Eigenschaften der MYD88 ^{L265P} -Gruppe im Vergleich mit der MYD88 ^{WT} -Gruppe	47
5.9.3	MUM1.....	47
5.9.4	BCL6	48
5.9.5	BCL2	49
5.9.6	CD3	49
5.9.7	Ki67	50
5.9.8	c-MYC.....	51
6	Diskussion.....	52
6.1	Vergleich der Kenndaten des ABC- mit dem GCB- Kollektiv	53
6.2	Expression der Marker des Hans-Algorithmus innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs.....	54
6.2.1	MUM1.....	54
6.2.2	BCL6	54
6.3	Expression weiterer immunhistochemischer Marker des ABC- und GCB-Kollektivs	55
6.3.1	BCL2	55
6.3.2	Proliferationsrate	55
6.3.3	CD3 oder T-Zellzahl.....	56
6.3.4	C-MYC	57
6.4	MYD88-Mutation innerhalb des Studienkollektivs	57
6.5	Klinische und morphologische Unterschiede durch die MYD88 p.L265P Mutation innerhalb des ABC-Kollektivs	58
6.6	Expression immunhistochemischer Marker innerhalb der MYD88 ^{L265P} -Gruppe	60
6.6.1	MUM1.....	60
6.6.2	BCL6	60

Inhaltsverzeichnis

6.6.3	BCL2	61
6.6.4	Proliferationsrate	61
6.6.5	CD3 oder T-Zellzahl.....	62
6.6.6	C-MYC	62
6.7	Schlussfolgerung und Ausblick	63
7	Zusammenfassung.....	66
8	Literaturverzeichnis.....	68
9	Tabellenverzeichnis	75
10	Abbildungsverzeichnis	76

2 Abkürzungsverzeichnis:

ABC	Activated B-cell
AID	Activation induced Deaminase
BCL	B-cell lymphoma
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
CBCL	Cutaneous DLBCL (leg type)
CD	Cluster of differentiation
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
c-MYC	myelocytomatosis oncogene
DLBCL	Diffuse large B-Cell lymphoma
E2A,	Transcription factor E2-alpha
FDC	Folliculäre dendritische Zelle
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GCB	Germinal center B-cell
IL	Interleukin
IRAK	IL-Receptor activated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
JAK	Janus activated kinase
LNA	Locked nucleid Acid
LPL	Lymphoplasmacytic Lymphoma
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue
MAP	mitogen-activated protein
MGUS	Monoclonal Gammopathy of unknown Significance
MUM	Multiple myeloma oncogene
MZL	Marginalzonenlymphom
NF- κB	Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin Lymphome
NOS	Not otherwise specified
PAX5	Paired Box 5
PCNSL	Primary central nervous lymphoma
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD1	Programmed death Receptor 1
PD-L1	Programmed death Receptor ligand
PU.1	Purine-rich box1
REAL	Revised European-American Lymphoma
SHM	Somatische Hypermutation
SMZL	Marginalzonenlymphom der Milz
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor Domäne
TMA	Tissue Micro Array
TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated factor
Vgl.	vergleiche

Abkürzungsverzeichnis

WHO	World Health Organisation
WM	Waldenström's Makroglobulinämie

3 Einleitung:

3.1 Lymphome

Lymphome sind maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems, die sich in Lymphknoten, anderen Organen oder als Leukämie manifestieren. Sie stammen von T- oder häufiger von B-Lymphozyten ab. Die maligne Entartung kann auf nahezu allen Entwicklungsstufen der Lymphozyten stattfinden, was eine entsprechende Bandbreite unterschiedlicher Entitäten ergibt [1]. Dabei werden zunächst Hodgkin- von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) unterschieden, wobei letztere weiter in T- und B-Zelllymphome unterteilt werden.

3.2 Klassifikation der Lymphome

Bis heute wurden viele Klassifikationen für die Lymphome entwickelt, um ihrer Heterogenität gerecht zu werden. Dabei soll eine Klassifikation helfen, Lymphome verschiedenen Subpopulationen mit unterschiedlicher Prognose und therapeutischem Ansprechen zuzuordnen.

Ein wichtiger Meilenstein der Klassifikation der Lymphomentitäten, stellt die Kiel-Klassifikation Karl Lennerts dar. Diese orientiert sich an der Entwicklungs- und Differenzierungsstufe, aus der sich das jeweilige Lymphom entwickelt [2]. Eine Weiterentwicklung seiner Konzepte war die „Revised European-American Lymphoma“ (REAL)-Klassifikation, die die Basis für die derzeit gültige „World Health Organisation“ (WHO)-Klassifikation darstellt. Sie beruht auf der Einteilung nach klinischen, morphologischen, immunhistochemischen, molekularen und genetischen Faktoren und besitzt dadurch therapeutische und prognostische Implikationen [3].

Die WHO-Klassifikation unterscheidet beim diffus großzelligem B-Zelllymphom (Diffuse large b-cell Lymphoma =DLBCL) molekulare und immunphänotypische Subtypen [4]. DLBCL, welche keine weiteren spezifischen oder pathologischen Kriterien, außer großen lymphatischen Zellen [4], aufweisen, werden der Gruppe der „not otherwise specified (NOS)“ DLBCL zugeteilt. Diese wird aufgrund genetischer Analysen weiter in zwei molekulare Subtypen unterteilt: den Keimzentrums- (GCB) und den aktivierten Subtyp (ABC) [4]. Andere Subtypen des DLBCL NOS, wie das primäre DLBCL des zentralen Nervensystems oder

das Epstein-Barr-Virus positive DLBCL des Älteren, werden durch ihre Lokalisation, immunhistochemische oder phänotypische Eigenschaften von den DLBCL NOS unterschieden.

3.3 B-Zellreifung

Die Reifung der B-Zellen beginnt mit pluripotenten Stammzellen innerhalb des Knochenmarkes, die zu Vorläuferzellen für T- oder B-Lymphozyten heranreifen [5]. Kontrolliert wird der Reifungsprozess durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie Transcription factor E2-alpha (E2A), Purine-rich box1 (PU.1), Paired Box 5 (PAX5) [6-9]. Die Zellen beginnen ihren individuellen B-Zellrezeptor zu exprimieren, der durch Umlagerungsprozesse spezifischer Gensegmente entstand. Dieser Rezeptor dient der Erkennung des Antigens gegen welches die B-Zelle Antikörper produzieren wird. Der Rezeptor ist nahezu identisch mit dem später gebildeten Antikörper. Die Antikörper bestehen aus einem variablen Teil, zur Antigenerkennung, und einem konstanten Teil, der bei jedem Antikörpertyp identisch ist. Die B-Zell-spezifische Zusammenstellung der Abschnitte des variablen Teils erfolgt durch Rekombinationsprozesse verschiedener Gensegmente, die für die leichten und schweren Immunglobulinketten codieren [10, 11].

Danach wandern die B-Lymphozyten, jetzt als naiv bezeichnet, in sekundäre lymphatische Organe, wie Milz und Lymphknoten, um dort durch Antigenkontakt zu einer B-Gedächtniszelle, Plasmazelle, oder B-Zelle, mit Produktion niedrig affiner Antikörper zu differenzieren. Diese Prozesse sind nur mit Hilfe der T-Helferzellen, folliculären dendritischen Zellen (FDC) und verschiedenen Chemokinen möglich [12].

Die naiven B-Zellen halten sich überwiegend in den Lymphfollikeln der sekundären lymphatischen Organe auf, während die T-Lymphozyten in der T-Zellzone zu finden sind. Die B-Zellen können im Grenzbereich zwischen beiden Zonen mit T-Helferzellen kommunizieren [13, 14]. Durch diese Interaktion werden Signalkaskaden ausgelöst, die die Formierung eines Keimzentrums initiieren [14, 15]. Ebenfalls werden Differenzierungsprozesse innerhalb der B-Lymphozyten ausgelöst [16, 17]. Das Keimzentrum stellt einen Teil des Lymphfollikels der sekundären lymphatischen Organe dar, in dem aktivierte B-Lymphozyten zu

Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen differenzieren. Während der Differenzierung durchlaufen die B-Zellen die somatische Hypermutation (SHM) und den Klassenwechsel des Antigens. Dies ermöglicht die Bildung hochaffiner Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen.

Innerhalb des Keimzentrums finden sich proximal der T-Zellzone vermehrt stark proliferierende Centroblasten und distal der T-Zellzone vermehrt Centrozyten mit geringer Proliferationsrate. Beides sind unterschiedliche Formen aktivierter B-Lymphozyten [17, 18]. Centroblasten exprimieren verstärkt den Transkriptionsfaktor BCL6, der für die Bildung und den Bestand des Keimzentrums essentiell ist [19]. Dies ist ein Repressor der Genexpression jener Gene, die die Zellzyklusprogression vorantreiben und die Apoptose und die DNA-Reparatur kontrollieren. Dadurch wird einerseits die SHM, der Klassenwechsel des Antigens sowie ein Arrest der Zelle auf der Stufe des Centroblasten ermöglicht. Andererseits wird die weitere Differenzierung zur Plasmazelle blockiert (vgl. Abbildung 1 und [Übersicht in 20]).

Die Expression des Faktors BCL6 und der activation induced Deaminase (AID) [21] wird durch Transkriptionsfaktoren unterhalten, die während der Keimzentrumsreaktion hochreguliert sind (vgl. Abbildung 2; Überblick in [20]). Die AID ist für die SHM und des Klassenwechsels des Antikörpers der B-Lymphozyten wichtig [22]. Diese beiden Prozesse dienen der Verbesserung der Affinität des Antikörpers zum Antigen. Allerdings werden auch Mutationen in anderen Genen dadurch gefördert [23, 24].

Die veränderten B-Zellrezeptoren werden an FDCs und T-Helferzellen auf ihre Affinität überprüft. Bei niedriger Affinität wird die Apoptose oder bei hoher die weitere Differenzierung zum Plasmablasten induziert [25]. Bei Bindung der T-Helferzelle an einen hochaffinen B-Zellrezeptor wird nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) in den Centozyten hochreguliert. Dies führt zur Expression von Interferon regulatory factor (IRF)-4 oder Multiple myeloma oncogene (MUM)1 [26]. Dieser Faktor hemmt BCL6 und sorgt für Expression der Transkriptionsfaktoren, welche die Differenzierung zur Plasmazelle ermöglichen [27]. Die Keimzentrumsreaktion wird beendet, die

Einleitung

Differenzierung zu Plasmazellen abgeschlossen und hochaffine Antikörper werden gebildet.

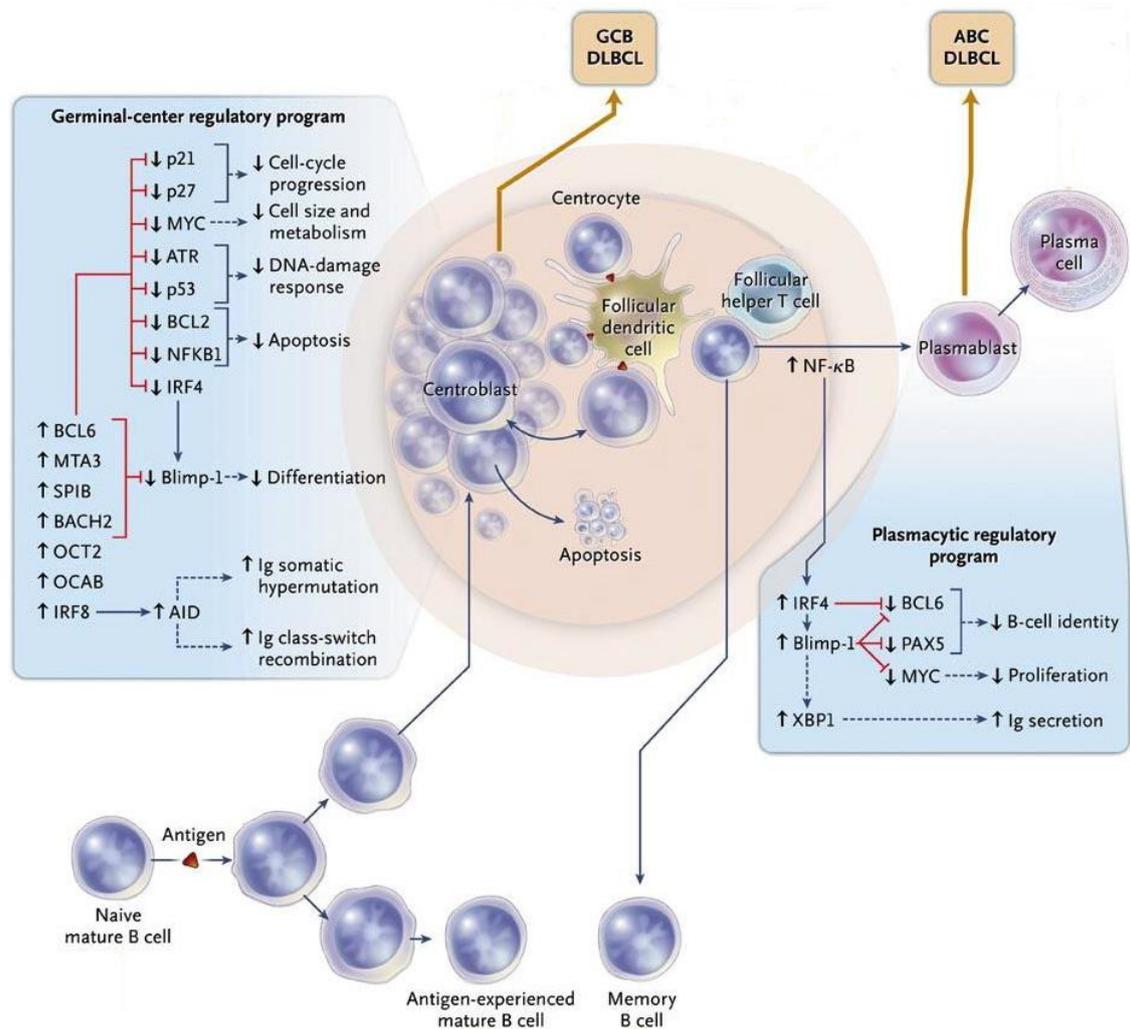


Abbildung 1: Darstellung der Keimzentrumsreaktion mit der jeweiligen „Ursprungszelle“ des DLBCL., modifiziert nach [20], Rote Linien symbolisieren eine Hemmung, Blaue Linien symbolisieren eine Stimulation; MYC=myelomatosis oncogene, ATR= ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, BCL=B-cell Lymphoma, NFKB=nuclear factor kappa-light-chain-enhancer, IRF= Interferon regulatory factor, Blimp-1= B lymphocyte-induced maturation protein-1, MTA= Metastasis-associated protein, SPIB= Spi-B transcription factor, BACH= BTB and CNC homology, OCT= ornithine carbamoyltransferase, AID= activation induced Deaminase, XBP= X-box binding protein, Ig =Immunglobulin. GCB=germinal centre B-Cell, ABC=Activated B-Cell;

3.4 Pathogenese des DLBCL, NOS

Mittels Vergleich der Genexpressionsprofile konnte das DLBCL NOS in weitere Subtypen, GCB- und den ABC-Subtyp, eingeteilt werden [28]. Der GCB-Subtyp exprimiert vermehrt Gene, welche im Keimzentrum eines Lymphfollikels von normalen heranreifenden B-Lymphozyten exprimiert werden. Im Gegensatz dazu zeigen die Tumorzellen des ABC-Subtyps vermehrt eine Genexpression entsprechend aktivierter B-Zellen, die das Keimzentrum bereits durchlaufen

haben. Dies lässt den Schluss zu, dass die beiden Subtypen aus unterschiedlichen Stadien der B-Zellreifung hervorgehen [28]. Der Keimzentrumstyp stammt vermutlich von einem Centroblasten ab [29], während der aktivierte Subtyp das Genexpressionsprofil einer späten Postkeimzentrumszelle aufweist und auf die konstante Aktivierung des NF- κ B-Signalweges für sein Zellüberleben angewiesen ist [30].

Im Laufe der B-Zellreifung und Keimzentrumsreaktion kommt es zu Mutationen, die zwar mehrheitlich die Gene der variablen Region des Antikörpers betreffen, allerdings auch andere Gene, betreffen können [Übersicht in 31]. Onkogene, die die Tumorentstehung begünstigen, können so aktiviert werden. Häufig inhibieren sie die Apoptose oder fördern die Proliferation [32], was zu erhöhter genetischer Instabilität, vermehrter Expression oder fehlerhafter Funktion mehrerer Transkriptions- und Regulationsfaktoren [33] führt. Dadurch erhöht sich das Risiko der malignen Entartung der B-Lymphozyten [33-36]. In DLBCL-Zelllinien wurde gezeigt, dass beispielsweise *BCL6* oder *MYC*-Gene von der SHM betroffen sind [23, 24].

Es wird angenommen, dass einige B-Zellen ineffektive bzw. defekte Reparaturmechanismen besitzen, wodurch die DNA-Veränderungen durch die SHM außerhalb der Antikörperrezeptorgene nicht regelhaft repariert werden können [37].

Allerdings wird der Übergang normaler Zellen zu Lymphomzellen häufig durch mehrere Mutationen hervorgerufen und kann nur selten auf eine einzelne Mutation zurückgeführt werden [32].

3.5 DLBCL: Epidemiologie und Klinik

Das DLBCL stellt eine histologisch wie klinisch heterogene Tumorform der B-Zelllymphome dar. Es ist das am häufigsten diagnostizierte Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) der westlichen Welt, wobei sein Anteil an der Gesamtzahl der NHLs ca. 30-40% ausmacht [38]. Es zählt zu den aggressiven oder hochmalignen B-Zelllymphomen, wobei es ebenfalls einen hohen Anteil der Neuerkrankungen in dieser Gruppe ausmacht [38]. Außerdem tritt dieses Lymphom bevorzugt bei Menschen über 65 Jahren auf [38]. Ein DLBCL kann auf

zwei Wegen entstehen: de novo und sekundär aus einem niedrig-gradigen Lymphom, wie einem follikulärem Lymphom oder einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL). Haben sich bei einem niedrig-gradigen Lymphom genug Mutationen angesammelt, kann es in eine aggressivere Form mit entsprechender Morphologie und Immunhistochemie eines DLBCL übergehen. Dieser Prozess wird durch andere Mutationen hervorgerufen als die de novo Entstehung des DLBCLs [Übersicht in 39].

In 60-75% der Fälle kann eine Lymphadenopathie beobachtet werden [4], die für den Befall des Lymphknotens mit Lymphomzellen spricht. Bei Organbefall kann es zu Schwellungen des betroffenen Organs kommen, wie Spleno- oder Hepatomegalie [40]. Am häufigsten sind der Magen bzw. andere gastrointestinale Organe befallen [4]. Eine B—Symptomatik, wie Fieber, Nachtschweiß und ungewollter Gewichtsverlust, sowie Abgeschlagenheit und Leistungsminderung sind mögliche Symptome der Erkrankten. In ca. 10-25% der Fälle ist zusätzlich eine Knochenmarkinfiltration mit Lymphomzellen nachweisbar [4].

3.6 Morphologie des DLBCL

Morphologisch werden die Tumorzellen als große lymphozytäre Zellen beschrieben. Der Nukleus ist ungefähr doppelt so groß als der eines kleinen Lymphozyten und größer als Nuklei der Makrophagen. Es zeigt sich ein prominenter Nukleolus, basophiles Zytoplasma und eine moderate bis hohe Proliferationsrate. Außerdem wird zwischen centroblastisch, immunoblastisch und anaplastisch erscheinenden Zellen unterschieden [4]. Zusätzlich kann eine unterschiedlich ausgeprägte Infiltration des Lymphoms durch Histiozyten und T-Zellen gefunden werden [4].

Vorwiegend kann eine centroblastische Morphologie bei DLBCLs nachgewiesen werden [4]. Centroblasten stellen mittelgroße bis große Lymphozyten dar, die einen runden, vesikulären Nukleus aufweisen. Diese Variante kann zwei bis vier Nucleoli aufweisen, die an die Kernmembran gebunden sind. Das Zytoplasma ist nur spärlich erkennbar. Ist das Lymphom monomorph centroblastisch, besteht es zu mehr als 90% auf Centroblasten. Bei einem polymorph centroblastischen

Lymphom sind weniger als 90% Centroblasten zu sehen. Zusätzlich können Immunoblasten erkannt werden [4].

Bei der immunoblastischen Morphologie werden laut WHO-Definition mehr als 90% Immunoblasten in einem Tumor nachgewiesen. Immunoblasten besitzen einen einzigen, „zentral lokalisierten Nukleolus und eine nennenswerte Menge Zytoplasma“ [4].

Die anaplastische Morphologie lässt sich diagnostizieren, wenn sich große bis sehr große, runde, ovale oder polygonal geformte Zellen zeigen. Diese haben bizarre pleomorphe Nuclei, die zum Teil an Hodgkin- oder Sternberg-Reed-Zellen erinnern können [4].

3.7 Diagnostik des DLBCL und immunhistochemische Aspekte

Die Verdachtsdiagnose eines DLBCL wird mittels Anamnese, klinischer Untersuchung und gegebenenfalls bildgebenden Verfahren gestellt. Durch Exstirpation eines befallenen Lymphknotens oder Biopsie eines Organs, muss die Diagnose histologisch gesichert werden. Dazu wird zunächst die Morphologie und anschließend die Expression verschiedener Marker mittels immunhistochemischer Färbungen betrachtet. Zur Unterscheidung der molekulargenetischen Subtypen des DLBCL NOS wurden unterschiedliche immunhistochemische Algorithmen, wie Hans, Choi oder Tally, entwickelt [41-43]. Die Marker sind dabei entweder spezifisch für B-Zellen des Keimzentrums, wie CD10 oder BCL6, oder für späte B-Zellen, die das Keimzentrum bereits durchlaufen haben, wie MUM1 [42]. Einer dieser Algorithmen ist der Hans-Algorithmus, der auf den Markern CD10, MUM1 und BCL6 basiert [42]. Der B-Zellspezifische Oberflächenmarker CD20 dient des Nachweises eines möglichen B-Zellursprunges eines Lymphoms. CD20 ist der gängigste Marker für B-Zellen. Es wird auf der Zelloberfläche naiver, reifer und teilweise Vorläuferzellen der B-Lymphozyten exprimiert. Ebenso kann es auf den meisten B-Zelllymphomen nachgewiesen werden [44] Da die DLBCLs aus Entwicklungsstufen zu Plasmazellen hervorgehen, sind sie CD20 positiv [45].

MUM1 oder IRF-4 wird durch NF-κB aktiviert und ist für die weitere Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen wichtig. Als Transkriptionsfaktor kann MUM1 im Zellkern der Zellen nachgewiesen werden.

CD10 ist eine Zink-Metallopeptidase, welche durch ihre breite Substratspezifität verschiedene Proteine inaktiviert [46]. Durch ihre Lokalisation auf der Zellmembran vermindert sie die Konzentration verschiedener Signalmoleküle außerhalb der Zelle und beendet deren Signaltransduktion [47, 48].

BCL6 ist ein Transkriptionsfaktor, der von B-Zellen exprimiert wird, um die Bildung des Keimzentrums zu initiieren und die Keimzentrumsreaktion zu erhalten [Übersicht in 20]. Dieser Marker findet sich nukleär.

Der Hans-Algorithmus definiert einen dieser Marker als positiv, sobald ihn mehr als 30% der Zellen exprimieren. Der Algorithmus folgt den in Abbildung 2 gezeigten Entscheidungswegen. Ist CD10 positiv wird der Fall der GCB-Gruppe zugeordnet. Ist er negativ wird BCL6 betrachtet. Ist er negativ gehört der Fall in die ABC-Gruppe. Ist er positiv, wird die MUM1-Expression betrachtet. Ist MUM1 positiv, ist der Fall dem ABC-Typ zuzuordnen. Kann keine MUM1-Expression nachgewiesen werden, wird der Fall dem GCB-Subtyp zugeordnet [42].

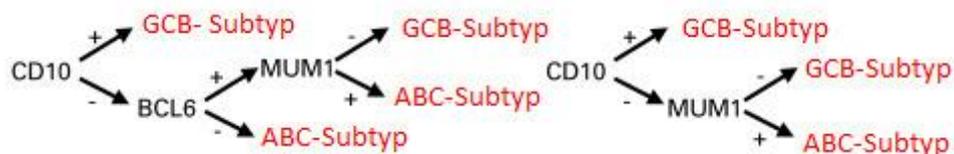


Abbildung 2: Hans-Algorithmus modifiziert nach [42] und [43]

3.8 Therapeutische Aspekte des DLBCL

Die Einteilung des DLBCL in Stadien erfolgt nach der Ann-Arbor Klassifikation. Diese berücksichtigt die Anzahl der befallenen Lymphknotenregionen auf einer oder beider Seiten des Zwerchfells. Eventueller Organ- und Knochenmarkbefall geht ebenfalls in die Klassifikation mit ein. Durch das Stadium ergeben sich prognostische und therapeutische Implikationen.

Die Therapie des DLBCL besteht überwiegend in einer Chemotherapie die folgende Wirkstoffe kombiniert: Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin,

Prednisolon und den CD20-Antikörper Rituximab, abgekürzt R-CHOP [49]. Durch die Therapie kann eine Heilungsrate von 60-70% erreicht werden [50, 51].

Um die Prognose des DLBCL besser einschätzen zu können, wurde der internationale prognostische Index (IPI) entwickelt. Dieser beinhaltet die Faktoren Alter, Allgemeinzustand, das Ann-Arbor-Stadium, Befall extranodaler Organe und die Höhe der Laktat-Dehydrogenase [52]. Ein weiterer -negativer- prognostischer Faktor stellt der Knochenmarkbefall dar [53].

3.9 Signalwege im DLBCL

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, welcher an die DNA binden kann und verschiedene Gene aktiviert [54]. Dadurch kommt es zu verstärktem Wachstum und vermehrter Proliferation der Zelle. Gleichzeitig wird das Protein I κ B α induziert. Dieses bindet NF- κ B im Zytoplasma, verhindert damit die Migration des NF- κ Bs in den Zellkern und dessen Bindung an die DNA [18].

Aktiviert wird NF- κ B durch unterschiedliche Signalkaskaden in B-Zellen [54]. Nachdem die B-Zelle ein Aktivierungssignal erhalten hat, wird ein CBM-Komplex aus mehreren Faktoren gebildet. Dieser ist in der Lage die I κ B-Kinase zu aktivieren, welche I κ B α phosphoryliert [55]. Dieser Faktor wird dann inaktiviert und ist nicht mehr in der Lage NF- κ B zu inaktivieren. Das freigewordene NF- κ B wandert in den Zellkern und führt zu vermehrter Produktion verschiedener Proteine [54], wie IRF-4 [26, 30]. Es werden ebenfalls Gene aktiviert, die für das Überleben der ABC- DLBCL-Zellen wichtig sind [56].

Verschiedene Mutationen im *MYD88-Gen* oder anderen Genen sorgen im ABC-DLBCL für eine vermehrte NF- κ B-Aktivierung. Dadurch wird die Plasmazelldifferenzierung eingeleitet, allerdings blockieren weitere Mutationen die endgültige Differenzierung der Lymphozyten [57, 58]. Dies erklärt die Ähnlichkeit des ABC-DLBCL zu aktivierten oder Postkeimzentrums-B-Zellen [56].

Im GCB-DLBCL finden sich andere Mutationen als im ABC-DLBCL. Dabei scheint die Ursprungszelle eine Keimzentrums-B-Zelle mit fortlaufenden Ig-Mutationen zu sein. In ca. 30 % der Fälle findet sich die Translokation t(14; 18), die das anti-apoptotische Protein BCL2 betrifft [59]. Dadurch wird das antiapoptotisch wirkende *BCL2-Gen* mit dem *IGH Gen* fusioniert. Das Resultat

ist eine verstärkte BCL2 Expression mit Inhibierung der Apoptose, wodurch die Zellen quasi unsterblich werden. [Übersicht in 54].

Bestimmte Mutationen der regulatorischen Abschnitte des *BCL6* Gens werden häufig im GCB-DLBCL gefunden. Diese Mutation betrifft die autoregulatorische Funktion des Proteins BCL6. Dadurch wird es in seiner Fähigkeit gehemmt seine eigene Expression zu inhibieren [60, 61]. Da das negative Feedback fehlt, kommt es zu einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors innerhalb des GCB-Subtyps [62, 63]. Andere Gene können ebenfalls in der Pathogenese des GCB-Typs eine wichtige Rolle spielen [64].

3.10 Funktion und onkogenetische Wirkungen von MYD88

MYD88 ist ein wichtiges Protein innerhalb der angeborenen Immunabwehr. Es besteht unter anderem aus einer Toll-like/IL-1-Rezeptor Domäne (TIR) und einer Todesdomäne [18]. Toll-like- und IL-1-Rezeptoren aktivieren MYD88 über die TIR-Domäne woraufhin zwei MYD88-Moleküle homodimerisieren [65, 66]. Dieses Dimer rekrutiert IL-Rezeptor activated kinases (IRAK) 4 und 1 innerhalb der Zelle. Die Proteine interagieren dabei über die Todesdomänen miteinander [67] und bilden einen Komplex [68]. Durch diese Stimulation werden IRAK4, und IRAK1 phosphoryliert. Letztere sorgt für die Phosphorylierung der I κ B-Kinase, wodurch NF- κ B-aktiviert wird ([69] vgl. Abbildung 3). Außerdem stimuliert IRAK-1 die Sekretion von IL-6 und IL-10, die über autokrine Stimulation den JAK-STAT3-Signalweg aktivieren. Dadurch wird das Zellüberleben gefördert [70]. IRAK1 kann ebenfalls einen Transkriptionsfaktor der Familie der tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF), TRAF6, aktivieren. Dieser induziert die

Komplexbildung und Aktivierung anderer Faktoren, die schlussendlich NF- κ B und MAP-Kinasen aktivieren (s. Abb.3, [68]).

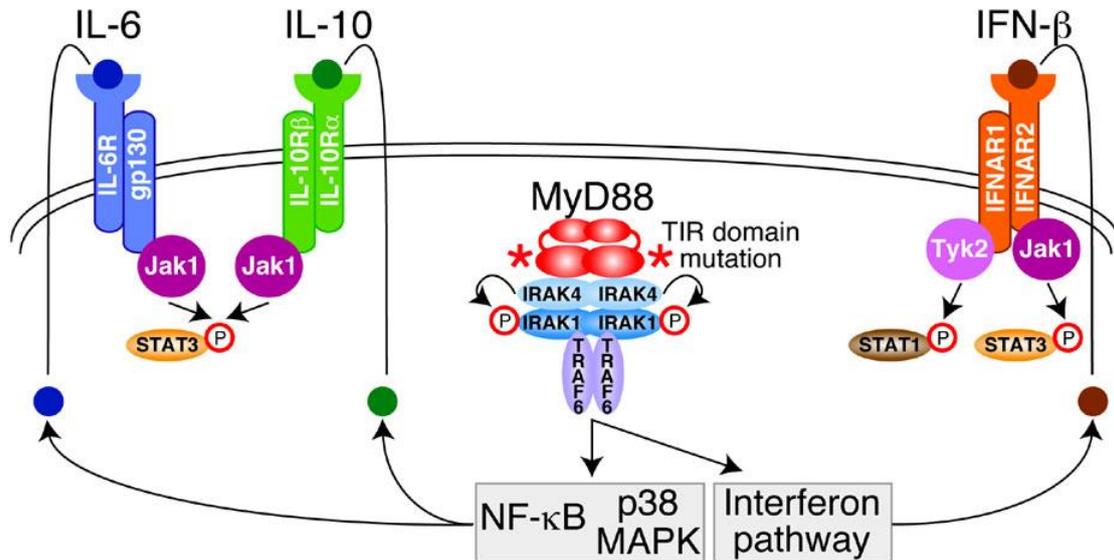


Abbildung 3: MYD88-Signalweg nach [75]; MyD88 aktiviert IRAK 4, welches dann IRAK1 phosphoryliert. Dadurch werden Interferone der p38 MAP-Kinase- und NF- κ B-Signalweg aktiviert, Insgesamt führt dies wiederum zu einer autokrinen Sekretion der Interleukine 6 und 10 und Interferon- β .

Dies ermöglicht in Zusammenspiel mit anderen Mechanismen eine adäquate Immunantwort. Knock-out-Mäuse, denen MYD88 fehlt, zeigen eine verminderte Toll-like-Rezeptor und IL1/IL18 Antwort, sowie eine fehlerhafte T-Zellproliferation und Th1 Antwort [71]. Ebenfalls war eine reduzierte Fähigkeit von Makrophagen, proinflammatorische Zytokine zu produzieren, nachweisbar [72].

Kommt es zu Mutationen innerhalb des *MYD88-Gens*, kann es eine tumorfördernde Wirkung entwickeln. Solche Mutationen können in ca. 39% der Fälle des ABC-Subtyps gefunden werden [70]. Dabei werden fast alle Mutationen innerhalb der TIR-Region detektiert und sorgen für eine unkontrollierte Bildung des MYD88-IRAK4 Komplexes. Dies führt zur verstärkten Phosphorylierung von IRAK1 und als Folge zu einer erhöhten NF- κ B-Aktivität [70]. In DLBCL Zelllinien, die zum aktivierten Zelltyp gehören, kann ein mutiertes MYD88-Molekül die Zelle vor dem Zelltod bewahren [70]. Mutationen der TIR-Domäne innerhalb des *MYD88-Gens* können zwar die Proliferation anstoßen und erhöhen, allerdings werden weitere Mutationen in anderen Genen benötigt, um die Proliferation über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten [73].

Die häufigste Mutation ist eine Punktmutation innerhalb des *MYD88-Gens*, durch die die Aminosäure Lysin gegen Prolin an Stelle 265 des Proteins MYD88 ausgetauscht wird [70]. Sie ist in 29% der DLBCL-Fälle mit ABC-Subtyp nachweisbar [70].

Die p.L265P-*MYD88*-Mutation wird ebenfalls in anderen Unterformen des DLBCL, wie dem „Leg type“ [74] gefunden, sowie in primären ZNS Lymphomen [75, 76], und dem Lymphoplasmozytischen Lymphom/Makroglobulinämie Waldenström(WM). Seltener wird die Mutation in Fällen monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz mit Nachweis des IgM-Immunglobulins (IgM-MGUS) und Marginalzonenlymphomen (MZL) nachgewiesen. Eine Übersicht über Lymphome, in denen *MYD88*-Mutationen nachgewiesen werden konnten, gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Häufigkeit der somatischen MYD88 Mutationen in B-Zellneoplasien nach [77];

Abkürzungen: CBCL: kutanes DLBCL (leg type), CLL: chronisch lymphatische Leukämie, LPL: lymphoplasmacytisches Lymphom (Waldenström'S Makroglobulinämie); MZL: Marginalzonenlymphom, PCNSL: primäres Lymphom des Zentralnervensystems, VRL: Vitreoretinal diffuse large B-cell lymphoma, SMZL: Marginalzonenlymphom der Milz

Erkrankung	<i>p.L265P-MYD88 Mutation</i>	Häufigkeit (Fall/ Fallzahl)	Referenz
ABC DLBCL	p.L265P	29% (51/174)	[70]
ABC DLBCL	Andere	10% (18/174)	[70]
CBCL	p.L265P	69% (11/16)	[74]
CLL	p.L265P	2,9% (9/310)	[78]
IgM MGUS	p.L265P	10% (2/21)	[79]
LPL	p.L265P	91% (49/54)	[79]
MALT	p.L265P	3,8% (2/53)	[80]
MZL	p.L265P	6,5% (3/46)	[81]
PCNSL	p.L265P	38% (11/29)	[75]
PCNSL	p.L265P	71% (5/7)	[76]
PCNSL	P.L265P	75% (15/20)	[82]
VRL	p.L265P	65% (19/29)	[83]
SMZL	p.L265P	5,1% (6/117)	[84]

„Im Gegensatz dazu werden im Burkitt-Lymphom oder GCB-DLBCL keine oder wenige Fälle mit *p.L265P-MYD88 Mutationen* gefunden“ [70].

Die Mutationsanalyse des MYD88-Proteins wird inzwischen auch diagnostisch zur Unterscheidung des WMs von MZLs, IgM-sezernierenden Myelomen oder der chronisch lymphatischen Leukämie mit plasmazytischer Differenzierung eingesetzt [85]. Die *p.L265P-MYD88 Mutation* ist in ca. 90% der WM-Fälle vorhanden [86, 87], während sie in den anderen genannten Lymphomformen nicht nachweisbar ist [87].

Neben diagnostischem Nutzen ist der Nachweis der Mutation von prognostischem Nutzen. Bei DLBCL-Patienten, die die *p.L265P-MYD88 Mutation* tragen, ist ein vermindertes Gesamtüberleben nachweisbar [88].

Durch die hohe Prävalenz der *MYD88-Mutation* in verschiedenen Lymphomentitäten, bietet sie sich als Ziel einer Pharmakotherapie an.

3.11 Ziel dieser Studie

Es wurden verschiedene immunhistochemische Algorithmen entwickelt, um ohne eine molekulargenetische Analyse eine Unterteilung in ABC und GCB-Subtyp vorzunehmen. [41, 42]. Der Hans-Algorithmus greift auf die unterschiedliche Expression der drei Proteine MUM1, CD10 und BCL6 innerhalb beider Subtypen zurück [42]. Ebenfalls existiert eine Abwandlung des Hans-Algorithmus der lediglich CD10 und MUM1 betrachtet. Hierunter werden ähnliche Ergebnisse erzielt wie bei Einbeziehung des Markers BCL6 [43]. Da BCL6 in abgewandelten Versionen des Hans-Algorithmus nicht für die Unterteilung in beide Subtypen Verwendung findet, stellt sich die Frage wie hoch die Co-Expressionsrate von MUM1 und BCL6 innerhalb des ABC-Kollektivs ist und in welchem Ausmaß dieser Marker von den beiden Subtypen exprimiert wird. Gleiches gilt für die MUM1-Expression innerhalb des GCB-Subtyps. Ebenso sollte untersucht werden ob und wie sich die Expression anderer immunhistochemischer Marker in beiden Subtypen unterscheidet.

Innerhalb des aktivierten Subtyps des DLBCL wurde *MYD88* als häufig mutiertes Gen beschrieben [70]. Diese Mutation resultiert in einer höheren MYD88-Aktivität. Hierbei soll untersucht werden ob die Mutationsfrequenz von 29% unter Verwendung eines einfachen immunhistochemischen Algorithmus zur Einteilung des DLBCL NOS in die ABC- und GCB-Subtypen ebenfalls nachweisbar ist. Die Mutationsfrequenz innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs wurde mittels einer Schmelzpunktanalyse ermittelt und beide Gruppen auf Unterschiede hin untersucht.

Weiterhin stellt sich die Frage, in wie fern sich die Mutation auf den Tumor auswirkt und sich vom DLBCL mit dem Wildtyp-Gen unterscheidet. Einige Unterschiede beider Subtypen und Besonderheiten der MYD88-Mutation, wie die schlechtere Prognose oder ein etwas höheres Alter in dieser Gruppe, sind bereits bekannt [89, 90]. Die Ursachen dieser Unterschiede sind noch nicht bekannt und eine weitere Analyse immunhistochemischer Marker könnte hier Aufschluss geben. Als weitere Vergleichsparameter wurde folgende Proteine ausgewählt: BCL2, BCL2 E17, Ki67, CD3 und c-MYC. Durch Vergleich der Expression dieser Transkriptionsfaktoren und Marker sollen weitere Unterschiede, die durch die

Ziel dieser Studie

p.L265P-MYD88-Mutation bedingt sein könnten, aufgedeckt werden. Ebenfalls wurden die Morphologie und patientenbezogene Daten, wie Alter oder das Auftreten eines Rezidivs berücksichtigt und verglichen. So können Ergebnisse anderer Gruppen einer Validierung unterzogen werden und neue Kenntnisse über das Patientenkollektiv, das die *p.L265P-MYD88-Mutation* trägt, gewonnen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Patienten:

Für die vorliegende Arbeit wurde Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes (FFPE) Gewebe verwendet. Alle Paraffinblöcke stammen aus dem Archiv der Pathologie und Neuropathologie Tübingen. Es wurden Fälle der Jahre 2004 bis Anfang 2013 verwendet. Diese wurden mit Hilfe der digitalen Material- sowie Fallerfassungs- und Befundungssoftware „Nexus PAS/Net“ (NEXUS AG, 60314 Frankfurt am Main / Deutschland) innerhalb der Fallsammlung des Instituts für Pathologie und Neuropathologie Tübingen ermittelt. Dabei wurden alle Fälle berücksichtigt, die die Diagnose eines primären oder de novo DLBCLs aufwiesen und bei denen eine ausreichende Materialmenge vorhanden war. Durch die Erhebung dieser Daten reduzierte sich die Fallzahl auf 87 Fälle. Von jedem Patienten wurde, sofern möglich, Tumorgewebe der Primärdiagnose verwendet.

Als nächstes wurden die angefertigten HE- und immunhistochemischen Schnitte zusammengestellt, die Diagnose überprüft und die Einteilung in den GCB- und ABC-Subtyp vorgenommen. Dazu wurde die Expression der Marker MUM1, CD10 und BCL6 (vgl. 3.2) herangezogen. Des Weiteren wurden Proliferationsaktivität, T-Zellzahl, c-MYC-Expression und BCL2-Expression mittels immunhistochemischer Befundung untersucht. Fehlende Daten wurden anhand eines Tissue Arrays bzw. durch neu angefertigte Schnitte ergänzt.

4.2 Reagenzien

Antikörper	Firma; Klon und Verdünnung
MUM1	DAKO; Hamburg, Deutschland; #M7259, Clone: MUM1p Verdünnung 1:100
CD10	Novocastra; Berlin Deutschland; #NCLCD10270-CE, Clone:56C6 Verdünnung 1:30
BCL6	Zytomed, Berlin, Deutschland, #MSK073-05 Clone GJ191E/A8 Verdünnung: 1:25

Material und Methoden

CD20	DAKO, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:500
BCL2	DCS; Hamburg Deutschland #B1601C01 Clone:100/D5, Verdünnung 1:20
BCL2	Zytomed, Berlin, Deutschland, #RBK016 Clone: E17 Verdünnung: 1:50
Ki67	DAKO, Hamburg, Deutschland, #M7240, Clone MIB1 Verdünnung 1:200
c-MYC	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich #ab32072 Clone: y-60 Verdünnung 1:200
CD3	DCS, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:100
Immunostainer BenchMarkXT Verbrauchsmaterial	Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA

DNA-Extraktion							
Xylol	VWR, Darmstadt, Deutschland						
Ethanol in verschiedenen Verdünnungen	Merck, Darmstadt, Deutschland						
SDS-Lysepuffer	Herstellung des 1xSDS-Lysepuffers <table border="1" data-bbox="815 1581 1353 1816"> <tr> <td>TRIS</td> <td>50 mM</td> </tr> <tr> <td>EDTA</td> <td>0,1 mM</td> </tr> <tr> <td>+2%SDS</td> <td></td> </tr> </table>	TRIS	50 mM	EDTA	0,1 mM	+2%SDS	
TRIS	50 mM						
EDTA	0,1 mM						
+2%SDS							
Proteinase K	Carl Roth, GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland						

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue):	Roche Diagnostics Deutschland GmbH Mannheim, Deutschland
MagNa-Pure Verbrauchsmaterial	Roche Diagnostics Deutschland GmbH Mannheim, Deutschland

PCR und DNA-Aufreinigung							
AmpliAq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA						
dNTP-Mix 10 mM	Fermentas, Burlington, Canada; St. Leon-Rot, Deutschland						
LE Agarose	Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Österreich						
TBE-Puffer	Herstellung von 10x TBE-Puffer: <table border="1" data-bbox="769 1061 1353 1294"> <tr> <td>TRIS</td> <td>0,89 M</td> </tr> <tr> <td>Borsäure</td> <td>0,89 M</td> </tr> <tr> <td>EDTA-Na₂</td> <td>0,02 M</td> </tr> </table>	TRIS	0,89 M	Borsäure	0,89 M	EDTA-Na ₂	0,02 M
TRIS	0,89 M						
Borsäure	0,89 M						
EDTA-Na ₂	0,02 M						
Gel-Red™ Nucleic Acid Stain	Biotium, Hayward, CA, USA						
Loading Dye	Fermentas, Burlington, Canada						
GeneRuler™, 1kb DNA-ladder, ready to use	Fermentas, Burlington, Canada						
GeneRuler™, 100bp DNA-ladder	Fermentas, Burlington, Canada						
50bp DNA -ladder	New England Biolabs®,						

Primer	
Primer-Mix für die Analyse der DNA-Amplifizierbarkeit AF4/3 U/L in 0,2 µM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA AF4/X3U GGAGCAGCATTCCATCCAGC AF4/X3L CATCCATGGGCCGGACATAA

PLZF/X 1U/1L in 0,1 µM	AF4/X11U CCGCAGCAAGCAACGCAACC
RAG 1/X2 U/L in 0,1 µM	AF4/X11L GCTTTCCTCTGGCGGCTCC
TBXAS1/X9 U/L in 0,1µM	PLZF/X1U TGCGATGTGGTCATCATGGTG PLZF/X1L CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC
	RAG1/X2U TGTTGACTCGATCCACCCCA RAG1/X2L TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA
	TBXAS1/X9U GCCCGACATTCTGCAAGTCC TBXAS1/X9L GGTGTTGCCGGGAAGGGTT
Sequenzen der Primer und Sonden der Schmelzkurvenanalyse	
5 µM PCR Primer F (Forward)	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland TGCAGGGGTTGGTGTAGT
5 µM PCR Primer A (Reverse)	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland gTTgTTAACCCCTggggTTg
4 µM HybProbe Probe L265P mut	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland CAgAAgCgACCgATCCCC--FL
4 µM HybProbe Probe L265P Anc	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland LC640- CAAgtACAaggCAATgAAgAAAgAgTTCCC--PH
Locked nucleid Acid (LNA)-Oligomer 0,1 µM	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland AAGCGACTGATCCC—NH2

Schmelzkurvenanalyse	
25 mM MgCl₂	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
Master HybProbe 10x conc.	Roche Applied Science, Mannheim , Deutschland
Locked nucleid Acid (LNA)- Oligomer 0,1 µM	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
LightCycler 480 Verbrauchsmaterial	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland

4.3 Geräte:

Gerät/System	Hersteller
LightCycler 480	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
Thermocycler ABI 9700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Nano Drop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MagNa-Pure LC 2.0	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
Minizentrifuge	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Vortex-2 Genie	Scientific Industries, Inc. Bohemia, NY, USA
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Köln/Wesseling, Deutschland
MTA1	Estigen, Tartu, Estland (Beecher Instruments)
Immunostainer BenchMark XT	Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA

4.4 Software

Nexus/PAS-NET	NEXUS AG, Frankfurt am Main, Deutschland
JMP-Statistik-Software	SAS Institute GmbH, Böblingen, Deutschland
LightCycler 480 Software	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland

4.5 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbemethoden werden verwendet, eine Diagnose abzusichern bzw. verschiedene Entitäten einer Erkrankung voneinander abzugrenzen. Dies ist häufig am Hämalaun-Eosin (HE)-Schnitt allein nicht sicher möglich.

Für die immunhistochemischen Färbungen der formalinfixierten Gewebeproben wurden monoklonale Antikörper, die mit bestimmten Enzymen gekoppelt sind, verwendet. Über eine Oxidationsreaktion des verwendeten Enzyms mit einem zugegebenen Substrat, kommt es zu einer Färbereaktion. Häufig verwendete Enzyme stellen die Meerrettichperoxidase und die alkalische Phosphatase dar. Eine braune Färbungsreaktion tritt auf, wenn als Substrat für die Meerrettichperoxidase Diaminobenzidine vorliegt. [18]. Da die Antikörper spezifisch an Antigene oder Proteine binden, die im Zellkern (nukleär) vorhanden beziehungsweise an der Zellmembran gebunden sind, kommt es dort zu der beschriebenen Farbreaktion. Die dabei gebildeten Substrate fallen aus und lösen sich nicht mehr. Dies ermöglicht den quantitativen Nachweis der Expression des gesuchten Proteins.

Die Färbungen wurden mit 0,4 µm dicken Gewebeschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden nach Protokoll des Herstellers des jeweiligen Antikörpers unter Verwendung eines Immunfärbeautomaten, Immunostainer, BenchMark XT, angefärbt.

Zu den in dieser Arbeit verwendeten membranständigen Antigenen zählen CD10, CD20, CD3 und Ki67, zu den nukleären Antikörpern MUM1, BCL2, BCL6, und c-MYC. Die Antikörper wurden in den oben genannten Verdünnungen verwendet. Für BCL2 wurden zwei Antikörper verwendet, die an unterschiedliche Strukturen innerhalb des Proteins binden. Bei den Antikörpern handelt es sich um den B1601C01 Clone:100/D5 und RBK016 Clone: E17 der Firma DCS; Hamburg Deutschland. Die Färbungen wurden nach Herstellerangaben im Immunfärbeautomat, Immunostainer BenchMark XT, durchgeführt. Durch Verwendung beider Antikörper ist es möglich das Molekül BCL2 in Fällen nachzuweisen, die sich bei Verwendung des herkömmlichen Antikörpers BCL2-Klon 100/D5 negativ darstellten. Es wird vermutet, dass dies durch Mutationen innerhalb des BCL2-Gens hervorgerufen wird, die eine Bindung des BCL2-Klons 100/D5 verhindern [91].

4.6 Histopathologische Einteilung und Überprüfung der Fälle

Für die Einteilung und Überprüfung der Fälle wurden HE-Schnitte und mittels immunhistochemischer Methoden angefärbte Schnitte verwendet. Diese wurden wie oben beschrieben angefertigt und mittels eines Mikroskops begutachtet. Dabei wurde bestimmt, welcher Anteil der Zellen das immunhistochemisch nachweisbare Protein exprimierte. Wiesen mehr als 20% der Tumorzellen eine Expression des jeweils betrachteten Markers auf, wurde er als positiv gewertet. Dabei sprechen eine Positivität für CD10 und/oder BCL6 für einen GCB-Typ und eine Positivität für MUM1 für einen ABC-Typ. Im Falle einer Negativität aller Marker in einem Fall wurde er als unklassifizierbar eingestuft (vgl. Abbildung 4).

Für die Marker Ki67, BCL2 und CD3 wurde der gleiche Schwellenwert für Positivität gewählt. Die Expression des Proteins c-MYC wurde als positiv gewertet, wenn bei mehr als 40% der Zellen eine Färbereaktion für dieses Protein auftrat. Die Stärke der Färbereaktion, sowie der Anteil der Tumorzellen, die das betrachtete Protein exprimierten, wurde untersucht (vgl. Tabelle 2). Über die Expression des Markers Ki67 kann auf die Proliferationsrate der Tumorzellen zurückgeschlossen werden. MIB1 ist der IgG1 Antikörper mit dem Ki67 in formalinfixierten Gewebeschnitten angefärbt wird. Mittels der Expression des Markers CD3 konnte auf die Anzahl der T-Zellen innerhalb des Tumors zurückgeschlossen werden (vgl. Einleitung 1.6).

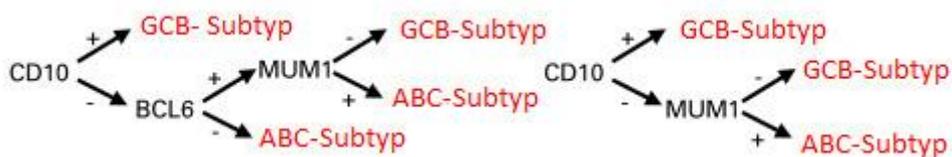


Abbildung 4: Hans-Algorithmus modifiziert nach [42] und [43]

Tabelle 2: Einteilung der Expression der verschiedenen Immunhistochemischen Marker

Immunhistochemischer Marker	Einteilung
MUM1	<ul style="list-style-type: none"> • Weniger als 20% • Expression in 20-50% der Tumorzellen • Expression in 50-80% der Tumorzellen

	<ul style="list-style-type: none"> • Expression in über 80% der Tumorzellen
BCL6	<ul style="list-style-type: none"> • Weniger als 20% • Expression in 20-50% der Tumorzellen • Expression in 50-80% der Tumorzellen • Expression in über 80% der Tumorzellen
Ki67/MIB1	<ul style="list-style-type: none"> • Weniger als 20% • Expression in 20-50% der Tumorzellen • Expression in 50-80% der Tumorzellen • Expression in über 80% der Tumorzellen
BCL2	<ul style="list-style-type: none"> • Keine/kaum Expression = 0 • Geringe Expression = + • Mittlere Expression = ++ • Starke Expression = +++
CD3	<ul style="list-style-type: none"> • Keine/kaum Expression = 0 • Geringe Expression = + • Mittlere Expression = ++ • Starke Expression = +++
C-MYC	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Expression • Geringe Expression <40% • Mittlere Expression: >40% • Hohe Expression: >80%

4.7 Entparaffinisierung der Proben für die DNA-Isolation

Für die DNA-Analysen wurden 3-5 je 5 µm dicke Paraffinschnitte von jedem Fall angefertigt und entparaffiniert. Die Anzahl hing von der Menge des Materials im Block ab. Je weniger Gewebe im Block, umso mehr Schnitte mussten für ausreichend Material angefertigt werden. Für die Entparaffinisierung wurden die Schnitte zunächst mit je 1 ml Xylol in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Dadurch löste sich das Paraffin. Für ein optimales Ergebnis, wurden die Proben mit dem Vortexer gemischt und für fünf Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. So bildete sich ein Gewebepellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Im nächsten

Schritt wurde das Xylol abgenommen und die Gewebeproben erneut mit je 1 ml Xylol bedeckt. Die oben genannten Schritte wurden wiederholt. Als nächstes wurde 1 ml Ethanol in das Reaktionsgefäß gegeben. Dies diente zur Lösung des restlichen Xylols. Daraufhin wurden die Proben im Vortex-2 Genie geschüttelt, fünf Minuten lang bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Ethanol wieder abgenommen. Dieser Vorgang wurde ebenfalls wiederholt. Dann trockneten die Proben bei 37°C in einem Thermoschüttler.

Diese Vorgehensweise ist bei den verwendeten Methoden zur DNA-Aufreinigung identisch. Durch laborinterne Gegebenheiten, war es notwendig zwei unterschiedliche Methoden für die Aufreinigung der DNA zu verwenden. Bei diesen handelte es sich um die Phenol-Chloroform-Aufreinigung und die Aufreinigung mittels des MagNA-Pure LC 2.0 (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland).

4.8 DNA- Extraktion mit dem MagNA Pure LC 2.0:

Für diese Methode wurden 5 µm dicke Schnitte in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und wie oben beschrieben, für die DNA-Aufreinigung vorbereitet.

Nach dem Trocknen der entparaffinierten Gewebeproben wurden sie mit 300 µl MagNA-Pure Lysispuffer (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) und Proteinase k56 versetzt und bei 56°C und 356 rpm über 48 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden wurden nochmals 10 µl Proteinase k56 dazugegeben, um ein vollständiges Auflösen der Proteine des Gewebes zu gewährleisten.

Danach wurde die DNA mit Hilfe des MagNA-Pure (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) aufgereinigt. Die Bedienung des Geräts und das Procedere erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration der DNA wurde mittels NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt, wobei auch der Grad der Verunreinigung durch Proteine ermittelt werden konnte. Im Anschluss wurde mittels einer PCR die Amplifizierbarkeit der DNA überprüft.

4.9 DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform- Aufreinigung:

Nach dem Trocknen der Gewebeproben wurden 300 µl SDS-Lysispuffer und 20 µl Protease K in die Reaktionsgefäße gegeben. Die Proben wurden dann 48 Stunden bei 56°C und 350 rpm im Thermoschüttler inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden 300 µl Phenol auf die Proben gegeben. Dadurch entstand ein Eins-zu-Eins-Gemisch des Phenols zu SDS-Lysispuffer. Die Reaktionsgefäße wurden danach für wenige Sekunden im Vortex-2 Genie geschüttelt. Dadurch löste sich die DNA in der oben liegenden Phenolphase. Diese mischte sich nicht mit dem SDS-Lysispuffer und konnte abgenommen werden. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

Dieser Überstand wurde zwei weitere Male mit Phenol versetzt. Der jeweilige Überstand wurde dabei immer in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Dabei war zu beachten, dass möglichst wenig Material aus der mittleren Phase pipettiert wird. Dies würde zu Verunreinigungen der Proben führen, was die Qualität der DNA und damit die weiteren Analysen negativ beeinflussen würde.

In einem letzten Schritt wurde Chloroform auf den Überstand gegeben und die Reaktionsgefäße für wenige Sekunden Vortex-2 Genie geschüttelt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit Lithiumchlorid gegeben. Zum Fällen der DNA wurde 1 ml 100 % Ethanol hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Proben mindestens 30 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und 200 µl 70 % Ethanol zugegeben. Nach kurzer Zentrifugation für fünf Minuten bei 4°C und 13.000 rpm wurde der Überstand erneut abgenommen und das Pellet im Thermoschüttler bei 37°C getrocknet. Zu den getrockneten Pellets wurde 50 µl destilliertes Wasser gegeben, wodurch die Pellets aus DNA eluiert wurden. Abschließend konnte die DNA-Konzentration und der Grad der DNA-Reinheit mit dem Nano-Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt werden.

4.10 Polymerase-Ketten Reaktion (PCR):

Die PCR diente bei dieser Studie zur Analyse der DNA-Amplifizierbarkeit, um die Fragmentierung der DNA, nach Fixierung mittels Paraffin und Aufreinigung,

abschätzen zu können. Die Länge der DNA-Sequenzen kann durch die Fixierung des Gewebes negativ beeinflusst worden sein. Bei zu kurzen DNA-Sequenzen ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass auch die gesuchte Mutation von der Fragmentierung betroffen ist. Dadurch sind die verwendeten Methoden möglicherweise nicht mehr sensitiv genug sind, um zwischen der *p.L265P-MYD88 Mutationssequenz* und Wildtypsequenz zu unterscheiden. An die Vervielfältigung der DNA schloss sich eine Gelelektrophorese an. Für die PCR wurde eine DNA-Konzentration von 50 µl pro Probe verwendet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Reagenzien für die PCR zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA, Endkonzentration 25 µl, Primer-Mix: 4F/4X3 2,5µM, alle anderen 1,25µM

Reagenz	Volumen 1x	Endkonz. in PCR
ddH ₂ O	15,8 µl	
10x PCR-Puffer (Life Technologies)	2,5 µl	1x
25 mM MgCl₂ (Life Technologies)	2,0 µl	2 mM
Primer-Mix	2,0 µl	Primer: AF4/3 U/L 0,2 µM andere 0,1 µM
10 mM dNTPs (Fermentas, Burlington)	0,4 µl	0,16 mM
Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Life Technologies)	0,3 µl	1,7 U
DNA (50ng/µl) oder ddH₂O (Negativkontrolle)	2,0 µl	100 ng
Gesamtvolumen	25 µl	

Jede Probe enthielt 25 µl Volumen wovon 2 µl DNA bzw. Wasser für die Negativprobe ausmachten. Nachdem die Proben in PCR-Reaktionsgefäße überführt wurden, wurde die PCR mittels des Thermocycler ABI 9700 (Applied Biosystems, Foser City, CA, USA) nach folgendem Schema durchgeführt:

Tabelle 4: Schema für den Ablauf der PCR

Zeit	Temperatur
7 Minuten	95C
45Sekunden	95°C
45Sekunden	60C
90 Sekunden	72C

} Wiederholung
über 35 Zyklen

10 Minuten	72°C
Hold	12°C

4.11 Gelelektrophorese der PCR Produkte

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese in einem 2 % Agarosegel durchgeführt. Das Agarosegel wurde durch aufkochen von 2 g LE-Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer hergestellt und mit 10 µl GelRed™ Nucleic Acid Stain versetzt. Das noch flüssige Agarosegel wurde zum Aushärten für ca. einen Tag in eine Vorrichtung gegossen. Danach wurde es in die Elektrophoresekammer platziert. Die mit Ladepuffer versetzten PCR-Produkte wurden in die Geldaschen überführt. Die erste Tasche wurde jeweils mit einem Basenpaar-Größenstandard versetzt, dessen kürzestes DNA-Stück mindestens 50 oder 100 Basenpaare lang war. Danach erfolgte die elektrische Auftrennung der Proben bei 140Volt über 45 Minuten.

Unter UV-Licht wurde die gelelektrophoretische Auftrennung sichtbar gemacht und mittels eines Geldokumentationssystems (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) fotografiert. Durch den Vergleich mit dem Größenstandard konnte auf die Länge der Proben zurück geschlossen werden.

4.12 Schmelzpunktanalyse der Proben:

Bei dieser Schmelzpunktanalyse werden zur Detektion der Mutation, die zum Phänotyp p.L265P des MYD88-Moleküls führen, fluoreszenzmarkierte Hybridisierungs sonden (Hybridisation Probes), kurz HybProbes, verwendet. Die Sonde HybProbe Probe mut ist komplementär zur Mutationssequenz des *MYD88-Gens*, die zum Aminosäureaustausch L265P innerhalb des MYD88 Proteins führt. Die Bindung der Sonde an den DNA-Abschnitt, der die Mutation trägt ist dadurch stabiler, als die Bindung an den entsprechenden DNA-Abschnitt des Wildtyps. Bei Erhöhung der Temperatur dissoziiert die Sonde bei einer geringeren Temperatur vom Wildtyp-DNA-Abschnitt, als vom Mutations-DNA-Abschnitt. Dadurch lässt sich die Mutation vom Wildtyp eindeutig unterscheiden.

Die fluoreszenzmarkierten HybProbes bestehen aus zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden, die während der Anlagerungsphase der Primer innerhalb der PCR an die jeweiligen *Wildtyp- oder p.L265P.MYD88-Mutations-DNA-Abschnitte*

der bereits amplifizierten DNA binden (vgl. Abbildung 5). Die HybProbe Anc Sonde trägt an ihrem 5'-Ende einen Fluorophor. Die HybProbe mut Sonde trägt an ihrem 3'-Ende eine Fluoreszenz-Markierung in Form eines Fluoresceins. Fluorescein wurde durch die Licht-emittierende Diode (LED) des LightCyclers angeregt. Die aufgenommene Energie wurde auf den Fluorophorrest der HybProbe Anc Sonde übertragen. Die dabei emittierte Fluoreszenz der HybProbe Anc Sonde wurde gemessen. Erst wenn beide Sonden in einem Maximalabstand von fünf Basenpaaren an die Zielsequenz banden, kam es zu einem Energietransfer zwischen den beiden Sonden (vgl. Abbildung 5). Diese Energieübertragung wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet. Die FRET wird bei der Schmelzpunktanalyse durch Dissoziation der Sonden von der DNA beendet. Anhand der Temperatur bei der das Fluoreszenzsignal nicht mehr nachweisbar war, konnte auf den jeweiligen Genotyp zurück geschlossen werden. Durch die Verwendung der FRET wird die Sensitivität der Methode erhöht. Der Zeitpunkt der Messung befand sich jeweils am Ende der Anlagerungsphase der PCR beziehungsweise während des Ablaufs der Schmelzpunktanalyse. Zu diesen Zeitpunkten war das Maximum der Fluoreszenz-Intensität zu erwarten, da die Sonden dann fast vollständig an die DNA-Amplifikate hybridisierten. Um genügend DNA-Amplifikate für eine exakte Messung zu erhalten, wird im Vorfeld der Schmelzpunktanalyse eine PCR durchgeführt. Durch die zunehmende Menge an DNA, nimmt das Fluoreszenzsignal bei jedem PCR-Zyklus zu.

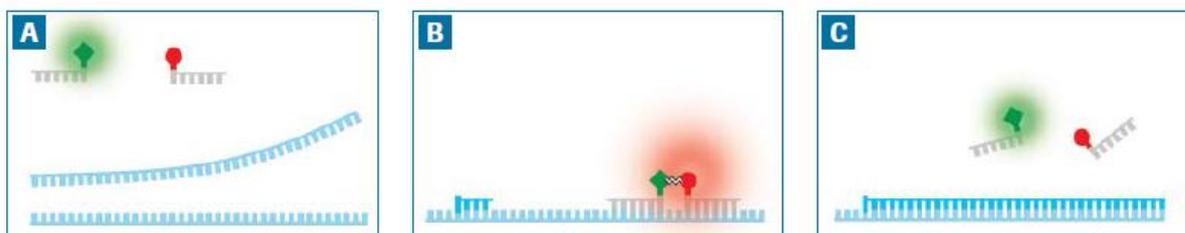


Abbildung 5: FRET Schema aus Roche Real Time PCR Application Manual: A: Denaturierung der DNA-Doppelstränge; B: Anlagerungsphase: Anlagerung der Primer sowie der HybProbe Sonden mit FRET und Fluoreszenzsignal, C: Elongation der DNA mit Ablösung der Fluoreszenzsonden

Der Reaktionsansatz für den LightCycler 480 wurde in drei unterschiedlichen Zusammensetzungen angefertigt:

Tabelle 5: Reagenzien für die Schmelzkurvenanalyse, konz.=Konzentration

Reagenz	Volumen ohne LNA	End-konz.	Volumen mit LNA 0,1 µM	End-konz.	Volumen mit LNA 0,05 µM	End-konz.
ddH₂O	9 µl		7 µl		8 µl	
25 mM MgCl₂	1 µl	2,25 mM	1 µl	2,25 mM	1 µl	2,25 mM
5 µM PCR Primer F (Forward)	2 µl	0,5 mM	2 µl	0,5 mM	2 µl	0,5 mM
5 µM PCR Primer A (Reverse)	2 µl	0,5 mM	2 µl	0,5 mM	2 µl	0,5 mM
4 µM HybProbe Probe L265P mut	1 µl	0,2 mM	1 µl	0,2 mM	1 µl	0,2 mM
4 µM HybProbe Probe L265P Anc	1 µl	0,2 mM	1 µl	0,2 mM	1 µl	0,2 mM
Master HybProbe 10x conc.	2 µl	1x conc.	2 µl	1x conc.	2 µl	1x conc.
LNA-Sonde 0,1 µM	0 µl		2 µl	0,01 mM	1 µl	0,005 mM
DNA (50 ng/µl) oder	2 µl	100 ng	2 µl	100 ng	2 µl	100 ng

ddH₂O (Negativkontrolle)						
Gesamtvolumen	20 µl		20 µl		20 µl	

Als letzter Schritt wurde in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte 18 µl des Mastermixes mit je 2 µl 50 ng/µl DNA der Proben, 2 µl Wasser als Negativkontrolle und 2 µl DNA eines für die *p.L265P- MYD88-Mutation* positiven Falls gegeben. In einem zweiten Ansatz wurde zusätzlich ein LNA-Oligomer gegeben. Dieses besteht aus veränderten Ribosemolekülen und bildet stärkere Wasserstoffbrückenbindungen mit der Wildtyp-DNA. Dadurch dissoziierte das Oligomer erst bei höheren Temperaturen von der Wildtyp-DNA ab. Die Sonde konkurrierte mit den PCR-Primern um die Bindung an die Wildtyp-DNA-Sequenz. Dadurch wurde die Amplifikation der Wildtyp-DNA vermindert. Die LNA-Sonde wurde so konzipiert, dass sie für die *p.L265P-MYD88-Mutationssequenz* eine niedrigere Affinität besitzt und deren Amplifikation nicht hemmt. Sollten in einer Probe Wildtyp und Mutationssequenz vorhanden sein, banden die PCR Primer wahrscheinlicher an die *p.L265P- MYD88-Mutationssequenz* und diese wurde zunächst stärker amplifiziert. Dadurch erhöhte sich das Mutationssignal in der anschließenden Schmelzkurvenanalyse. Es wurden zwei Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen der LNA-Sonde verwendet, die beiden ein äquivalentes Ergebnis erbrachten. Die Proben wurden bei 2000 bis 3000 rpm für einige Sekunden zentrifugiert und mittels des LightCyclers 480 die PCR und Schmelzpunktanalyse folgendermaßen durchgeführt:

Tabelle 6. Inkubationszeiten und Temperaturen für die PCR, Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse des LightCyclers 480 (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland)

Vorgang	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vorinkubation	1	95°C	10min
		95°C	15 sec
Amplifikation der DNA	50	50°C	30 sec
		72°C	30 sec
		95°C	1 min

Schmelzpunktanalyse	1	40°C	2 min
		95°C Ramp Rate = 0,11°C/sec	---
Abkühlen	1	40°C	30 sec

4.13 Anfertigen eines Tissue Micro Arrays

Ein Tissue Micro Array (TMA) wurde angefertigt, um kosten- und zeitsparend weitere bzw. ergänzende immunhistochemische Färbungen durchzuführen. Mittels des TMAs konnten mehrere Gewebeproben in einem Block transferiert werden. Dies erleichterte die nachfolgenden immunhistochemischen Färbungen, da nur noch ein Schnitt angefertigt werden musste, um mehrere Proben bzw. Fälle anzufärben.

Zur Herstellung eines TMAs wurde das Patientenkollektiv zunächst auf dafür geeignete Blöcke hin untersucht. Als Ausschlusskriterien diente eine unzureichende Blockdicke und zu geringe Materialmenge. Danach wurde auf angefertigten HE-Schnitten das zu stanzende Tumorareal markiert. Diese Blöcke werden auch Spenderblöcke genannt.

Für die Anfertigung des TMAs benötigte es einen Empfängerblock. Dafür dienten Paraffinblöcke ohne Gewebe.

Zur Anfertigung des TMAs wurde eine Stanzmaschine (MTA1, Estigen) verwendet. Diese besitzt eine Basisplatte, je einen Halter für Spender- und Empfängerblock und zwei Stanzen, eine Donor- und eine Empfänger-Stanze. Der Durchmesser der Stanzen beträgt 1,0 mm.

Vor dem Stanzen wurde der Spenderblock auf ca. 37°C erwärmt. Dadurch erweichte das Paraffin, wodurch das Stanzen erleichtert wurde. Dem Empfängerblock wurde mit der Donorstanze ein Paraffinzylinder entnommen. Mittels der Empfängerstanze wurde ein Gewebezylinder aus dem zuvor markierten Areal entnommen und in die entsprechende Stelle des Empfängerblockes übertragen. Dieser Vorgang wurde für alle Spenderblöcke wiederholt. Die Stanzen wurden dabei in einem Abstand von 1,5mm in den Empfängerblock gesetzt.

Nachdem der Empfängerblock alle Gewebezyylinder erhalten hatte, wurde er zwei Mal für ca. zehn Minuten auf ca. 58°C erwärmt. Da das Paraffin bei dieser Temperatur leicht schmilzt, verbindet es sich besser mit den Gewebezyindern. Dies verbesserte die spätere Weiterbearbeitung des TMA-Blocks.

Anschließend wurden mehrere Schnitte mittels eines Mikrotoms vom TMA-Block angefertigt, die wie unter 5.2.1 beschrieben immunhistochemisch angefärbt.

4.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Statistikprogramms JMP erstellt. Für die einzelnen Auswertungen wurden, je nach Gegebenheiten des betrachteten Zusammenhangs, verschiedene Tests angewendet. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurden bei stetigen Daten, wie dem Alter, angewendet. Ebenso kam ein Chi²-Test für die restlichen Gruppenvergleiche zur Anwendung. Die nicht parametrischen Tests wurden ausgewählt, da bei den Untergruppen, durch eine geringe Stichprobenanzahl, von keiner Normalverteilung ausgehen konnte. Ebenfalls wurde der Chi²-Test für die Gruppen verwendet, die nach einer ordinalen Rangskala geordnet waren. Als signifikant unterschiedlich wurde jeweils ein p-Wert kleiner 0,05 angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Erstellung des Studienkollektivs

Die primäre Recherche innerhalb der Datenbank des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Tübingen ergab eine Fallzahl mit 167 Patienten aus den Jahren 2004 bis Anfang 2013. Primäre Auswahlkriterien zur Erstellung des Patientenkollektivs stellten de novo entstandene DLBCLs und die dokumentierten Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen CD10, MUM1 und BCL6 dar. De novo entstandene DLBCLs wurden mit Hilfe der genannten Marker nach dem Hans-Algorithmus eingeteilt. Dadurch entstand zunächst ein Patientenkollektiv aus 32 GCB- und 135 ABC Fällen.

Nach Abschluss dieser Vorauswahl wurde das Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen mikroskopisch validiert und Fälle, die zu wenig Material für weitere Analysen aufwiesen ausgeschlossen. Somit bildete sich ein Gesamtkollektiv aus 87 Fällen heraus, bestehend aus 22 GCB-, 64 ABC-Fällen und einem unklassifizierbaren Fall (s. Abbildung 6). Der unklassifizierbare Fall wurde von den statistischen Analysen ausgeschlossen.

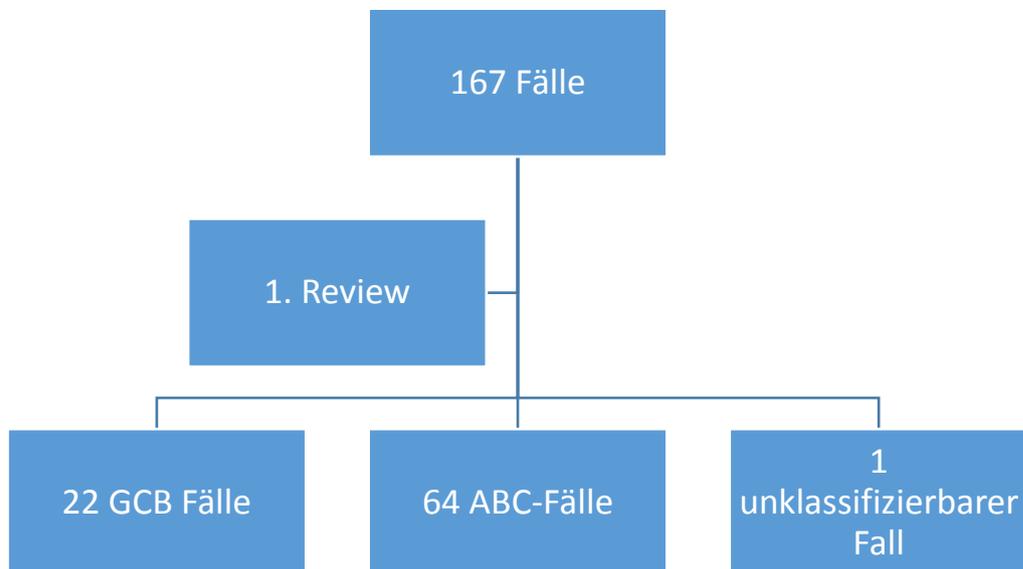


Abbildung 6: Fallauswahl Übersicht

5.2 Immunhistochemie

Das Studienkollektiv wurde immunhistochemisch auf die Expression der Marker MUM1, CD10 und BCL6 untersucht. Zeigte sich in mehr als 20% der Zellen eine Färbereaktion, wurde die Expression des Markers als positiv gewertet (vgl. Abbildungen 7 bis 9). Entsprechend des Hans-Algorithmus wurden die Fälle in GCB- und ABC-Subtyp eingeteilt. Ebenfalls wurde der Anteil der Tumorzellen bestimmt, der den entsprechenden Marker exprimierte.

Im Zuge der immunhistochemischen Begutachtung wurden weitere immunhistochemische Marker (CD3, BCL2, Mib1, c-MYC) mikroskopisch beurteilt und das Ausmaß der Expression des jeweiligen Proteins bestimmt.

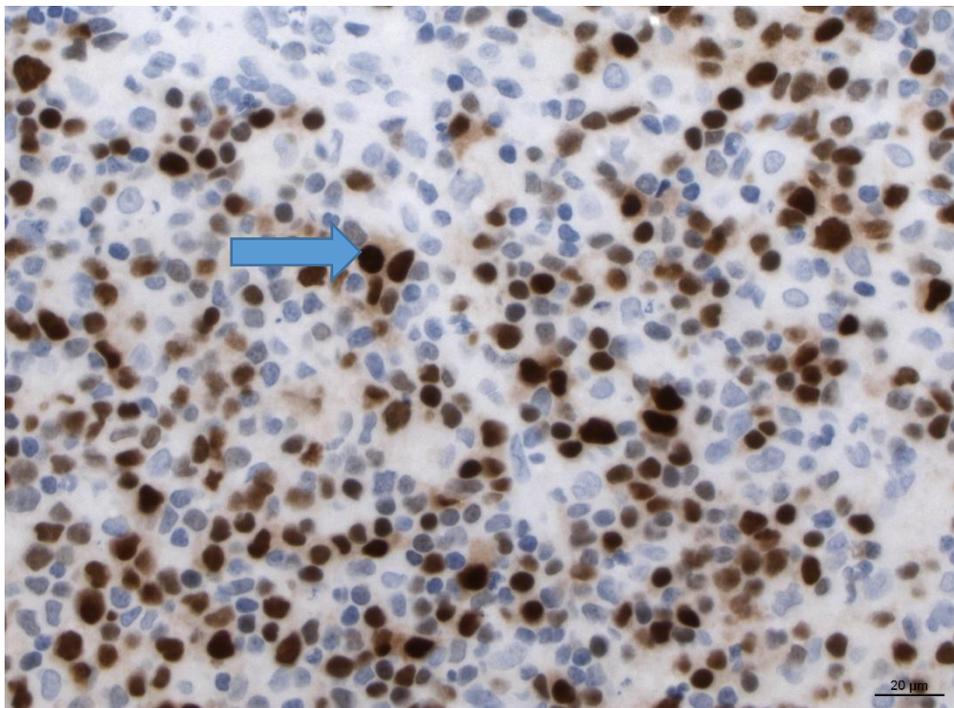


Abbildung 7: Beispiel für MUM1 Positivität; erkennbar sind die in starker Intensität angefärbten großen Tumorzellen (Pfeil); Vergrößerung 40-fach.

Ergebnisse

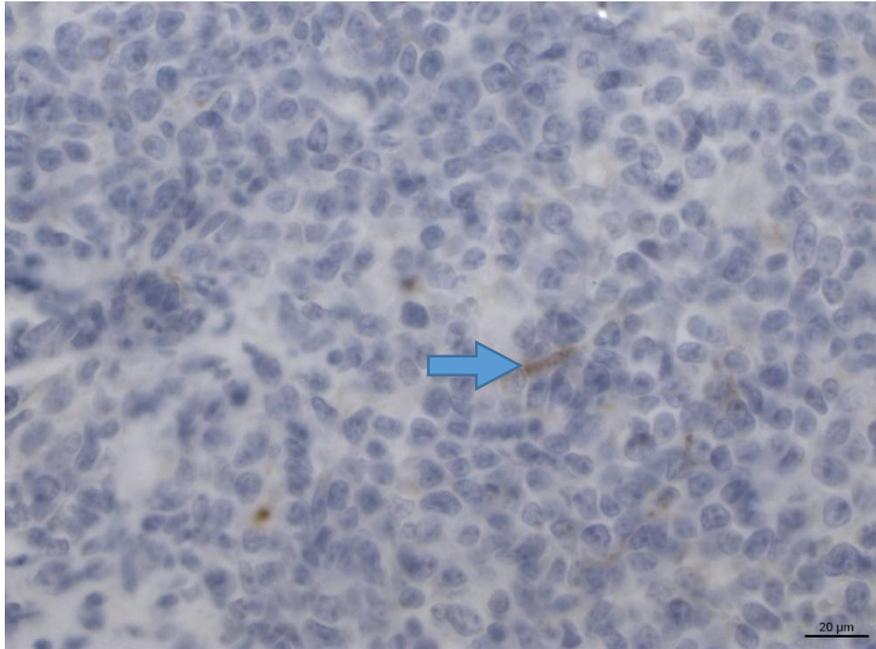


Abbildung 8: Beispiel für CD10-Negativität; Die Tumorzellen färben sich nicht an, die positiv gefärbten Zellen stellen Fibroblasten dar (Pfeil), Vergrößerung 40-fach..

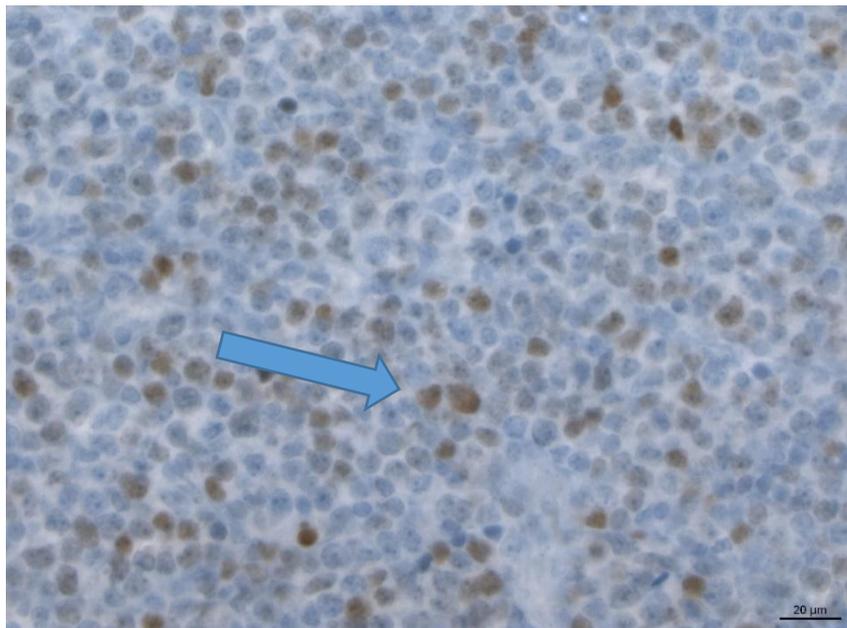


Abbildung 9: Beispielbild für BCL6 Positivität; die Intensität der Färbung ist in diesem Fall mäßig, erkennbar sind die angefärbten großen Tumorzellen, der Pfeil deutet auf eine Zelle mit BCL6-Expression Vergrößerung 40-fach.

5.3 Tissue Array

Ein TMA wird verwendet um möglichst viele Fälle mit wenig Material- und Zeitaufwand anzufärben und begutachten zu können. Aus dem Gesamtkollektiv konnten 56 Fälle für die Erstellung eines TMAs herangezogen werden. Es wurden immunhistochemische Schnitte für die Marker MUM1, CD-10, BCL6,

Ergebnisse

BCL2, BCL2 E17, CD3, Ki67 und c-MYC angefärbt. Dadurch konnten fehlende immunhistochemische Daten ergänzt werden, was jedoch nicht bei allen Fällen möglich war. Die Marker wurden in gleicher Art und Weise wie die Gesamtschnitte beurteilt (s. 6.2).

Exemplarische TMA-Immunhistochemische Färbungen geben die Abbildungen zehn bis zwölf.

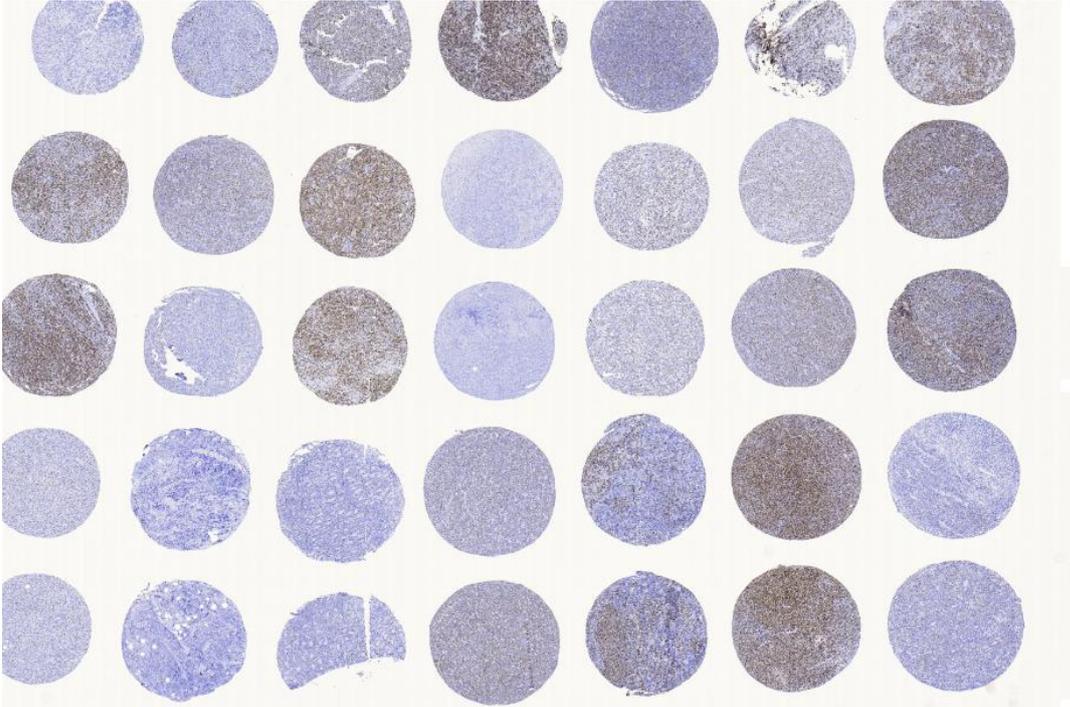


Abbildung 10: Teilansicht des TMAs, immunhistochemische Färbung des Proteins MUM1, Vergrößerung 1-fach

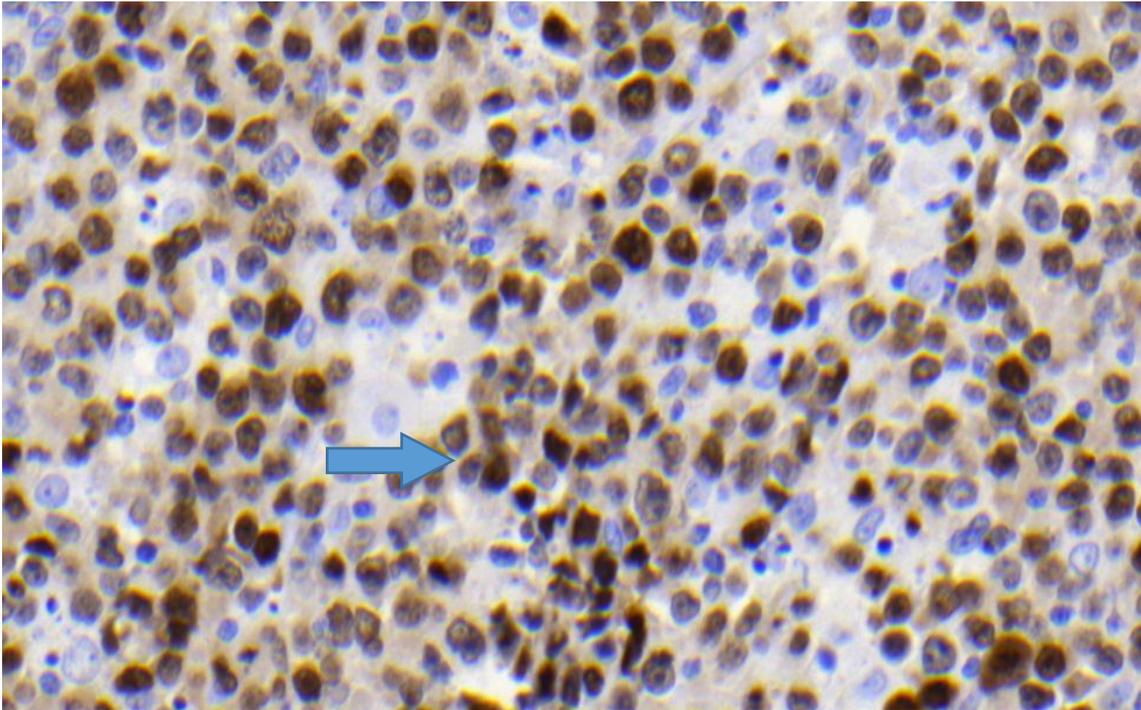


Abbildung 11: TMA Immunhistochemische Färbung des Transkriptionsfaktors MUM1, positive Stanze der Pfeil deutet auf eine Tumorzelle mit positiver Färbereaktion, Vergrößerung 40-fach

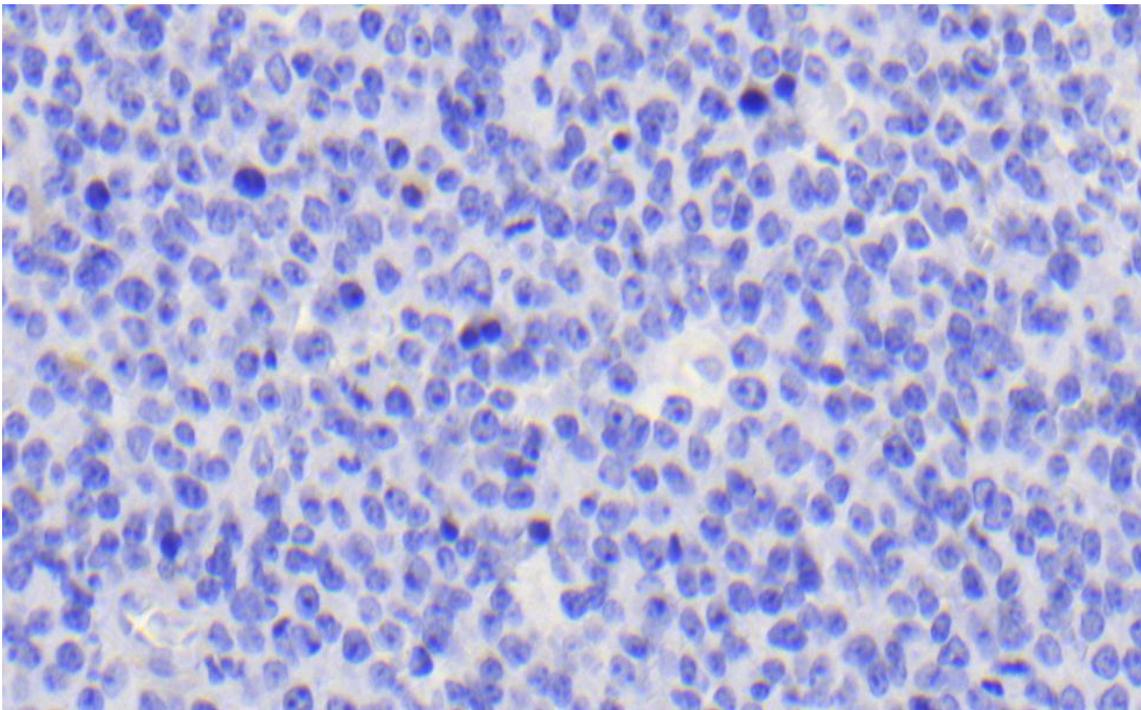


Abbildung 12: TMA-Stanze, immunhistochemische Färbung des Proteins CD10, negative Stanze, Vergrößerung 40-fach

5.4 Nachweis der MYD88-Mutation mittels Schmelzkurvenanalyse
Zur Detektion der Mutation innerhalb des *MYD88-Gens*, die den p.L265P Phänotyp verursacht, wurden alle Fälle einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen.

Ergebnisse

Die Mutation lässt sich anhand eines Peaks der Schmelzkurve bei ca. 64°C erkennen. Die HybProbe-Sonden dissoziieren bei niedrigerer Temperatur von der DNA mit Wildtypsequenz des *MYD88-Gens* als von der DNA mit Mutationsfrequenz, was zu einem Peak der Schmelzkurve bei ungefähr 55°C führt. Durch Betrachtung des entsprechenden Temperaturbereichs der Schmelzkurve, konnte das Vorliegen einer Mutation oder des Wildtyps innerhalb des *MYD88-Gens* evaluiert werden. Bei Auswertung der Schmelzkurven zeigte sich die *p.L265P-MYD88-Mutation* in 19 von 87 Fällen. Beispielhaft sind die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse für einen p.L265P-Mutationsfall und einen Fall mit Wildtypstatus in der Abbildung 13 dargestellt.

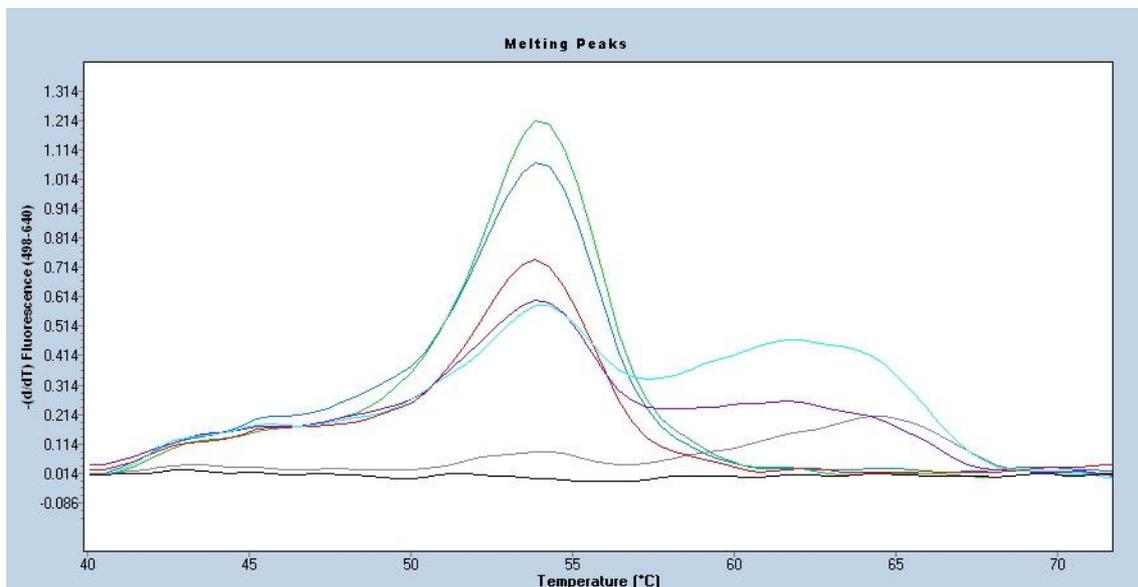


Abbildung 13: Beispiel des Nachweises einer Wildtyp- und Mutationssequenz mittels Schmelzkurvenanalyse. Sichtbar ist eine Schmelztemperatur der Proben bei 54°C. Eine weitere Schmelztemperatur der grauen Probe ist bei 64°C zu erkennen. Hier handelt es sich um eine Mutationssequenz, die unter Verwendung des LNA-Oligomers erkennbar wird.. Grün= Wildtyp, Ansatz ohne LNA-Oligomer; Hellblau= Ansatz mit LNA-Oligomer, Rot = Mutationssequenz ohne LNA-Oligomer, Grau= Mutationssequenz mit LNA-Oligomer Dunkelblau= Positivkontrolle ohne LNA-Oligomer, Türkis= Positivkontrolle mit LNA-Oligomer, Schwarz = Negativkontrolle heterozygot; 3= Negativkontrolle;

5.5 Allgemeine patientenbezogene Daten des Studienkollektivs:

Das Studienkollektiv wies eine Gesamtfallzahl von 87 Fällen auf. Davon waren 46 (52,87%) männlich und 41 (47,12%) weiblich. Das mediane Alter betrug 70 Jahre, wobei die Altersspanne von sechs bis 89 Jahren reichte. Das Durchschnittsalter lag bei 66 Jahren. Insgesamt trat bei 15 Fällen (17,24%) ein Rezidiv auf (vgl. Tabelle 7).

Das ABC-Kollektiv bestand zu 51,56% (33/64) aus Männern und zu 48,43% (12/22) aus Frauen und das GCB-Kollektiv aus 54,5% Männern und 45,5% Frauen. Beide Kollektive zeigten damit eine eins zu eins Verteilung was das Geschlecht betrifft (vgl. Tabelle 7).

Das mediane Alter betrug 71 Jahre innerhalb des ABC-Kollektivs, wobei die Altersverteilung von sechs bis 89 Jahren reichte. Das Durchschnittsalter betrug 67 Jahre. Das mediane Alter innerhalb des GCB-Kollektivs betrug 66,5 Jahre. Das Durchschnittsalter betrug circa 64 Jahre. Die Altersspanne reichte von 28 bis 85 Jahren. Ein Vergleich des Durchschnittsalters beider Gruppen zeigte einen signifikanten Unterschied (p-Wert = 0,046). Es fiel auf, dass innerhalb des ABC-Kollektivs die Frauen signifikant älter waren als die Männer. Der Altersunterschied betrug acht Jahre (p-Wert = 0,0091). Dies konnte innerhalb des GCB-Kollektivs nicht nachgewiesen werden.

Die Rezidivrate betrug im ABC-Kollektiv 20,31% (15/87), während sie im GCB-Kollektiv bei 9,1% (2/20) lag. Bei einem Vergleich der Werte zeigte sich ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,0018; vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Studienkollektiv Kenndaten - Übersicht

	Studienkollektiv	ABC-Kollektiv	GCB-Kollektiv
Fallzahl	87 (100%)	64 (100%)	22 (100%)
Männlich	52,87% (46)	51,56% (33)	54,5% (12)
Weiblich	47,12% (41)	48,43% (31)	45,5% (10)
Medianes Alter	70,5	71	66,5
Altersspanne	6-89	6-89	28-85
Durchschnittsalter	66,3	67	64,5
Durchschnittsalter Frauen	69,9	71	65,7
Durchschnittsalter Männer	63,2	63	63,4
Kein Rezidiv	82,75% (72)	79,69% (51)	90,9% (20)
Rezidiv	17,24% (15)	20,31% (13)	9,1% (2)
Vergleich des Durchschnittsalters beider Kollektive p=0,0045			
Vergleich der Rezidivrate beider Kollektive p=0,0018			

5.5.1 Morphologie

Innerhalb des ABC-Kollektivs zeigten mit 85,48% (52/62) die meisten Fälle eine centroblastische Morphologie. Als immunoblastisch konnten 12,9% (8/62) der Fälle und 3,23% (2/62) als anaplastisch der Fälle eingeteilt werden. Über 90% der Fälle des GCB-Kollektivs wiesen eine centroblastische Morphologie auf. Nur ein Fall entsprach dem Bild eines immunoblastischen Phänotyps. Dies entspricht 4,8% (1/21) der Gruppe. Es fand sich kein Fall, der die Kriterien für eine anaplastische Morphologie erfüllte. Ein Vergleich beider Kollektive zeigte einen signifikanten Unterschied (p-Wert $\leq 0,0001$; vgl. Tabelle 8). Umgekehrt betrachtet entfallen 89% (8/9) der Fälle mit immunoblastischer Morphologie auf den ABC-Subtyp, während nur 11% (1/9) der Fälle, entsprechend einem Fall, dem GCB-Subtyp zuzuordnen waren.

Tabelle 8: Verteilung der morphologischen Gruppen des ABC- und des GCB-Kollektivs

	ABC-Kollektiv	GCB-Kollektiv
Centroblastisch	85,48% (52)	95,2% (20)
Immunoblastisch	12,90% (8)	4,8% (1)
anaplastisch	3,23% (2)	0
Gesamt	62	21
p-Wert des Vergleichs der Verteilung der Häufigkeiten beider Kollektive: $p \leq 0,0001$		

5.6 Expression der Marker des Hans-Algorithmus innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs

5.6.1 CD10

Das gesamte ABC-Kollektiv ist negativ für CD10. Innerhalb des GCB-Kollektivs befinden sich drei Fälle die keine CD10-Expression aufweisen. Diese Fälle sind gleichzeitig negativ für MUM1 und positiv für BCL6, wodurch sie dem GCB-Kollektiv zugeordnet wurden.

5.6.2 MUM1

Der Plasmazellmarker MUM1 war in unterschiedlichem Ausmaß innerhalb des ABC-Kollektivs positiv. Dabei exprimierten über die Hälfte der Fälle MUM1 in einem mittleren Ausmaß. Eine hohe Expression zeigten 24,2% (15/62) der Fälle und 25,8% (16/62) eine niedrige. Entsprechend der Einteilung nach dem Hans-Algorithmus existiert kein Fall bei dem MUM1 als negativ zu werten ist (vgl.

Tabelle 9). Innerhalb des GCB-Kollektivs ließ sich bei 11,7% (2/17) der Fälle, die eine geringe MUM1-Expression nachweisen. Gleichzeitig zeigten sie eine CD10-Expression, was sie als GCB-Typ kennzeichnet.

Tabelle 9: Verteilung der Expression des Transkriptionsfaktors MUM1 innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs

Kategorie	Häufigkeiten des ABC-Kollektivs	Prozent	Häufigkeiten des GCB-Kollektivs	Prozent
80+	15	24,19	0	0
50-80	31	50,00	0	0
20-50	16	25,81	2	11,77
20-	0	0	15	88,24
Summe	62	100	17	100

5.6.3 BCL6

Innerhalb des ABC-Kollektivs finden sich Fälle, die BCL6 und MUM1 exprimieren. Dabei konnten vor allem Fälle nachgewiesen werden, die BCL6 gering oder mäßig exprimierten. Eine hohe Expression ließ sich bei 8,3% (5/60) der Fälle nachweisen. Negativ für BCL6 waren 26,6% (16/60) der Fälle (vgl. Tabelle 10). Innerhalb des GCB-Kollektivs wurde BCL6 stark exprimiert. Eine sehr hohe Expression konnte in 40% (9/22) der Fälle und eine mäßige Expression in über 50% (12/22) der Fälle nachgewiesen werden. Kein Fall zeigte eine niedrige Expression und ein Fall wurde als negativ gewertet. Dieser Fall war gleichzeitig positiv für CD10 und negativ für MUM1. Der Vergleich des GCB-Kollektivs mit dem ABC-Kollektiv ergab einen signifikanten Unterschied (p -Wert $\leq 0,0001$; vgl. Tabelle 10)

Tabelle 10: Verteilung der Expression des Transkriptionsfaktors BCL6 innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs

Kategorie	Häufigkeiten des ABC-Kollektivs	Prozent	Häufigkeiten des GCB-Kollektivs	Prozent
20-	16	26,67	1	4,54
20-50	17	28,33	0	0
50-80	22	36,67	12	54,54
80+	5	8,33	9	40,91
Summe	60	100	22	100
p-Wert des Vergleichs der Verteilung der Häufigkeiten beider Kollektive: $p \leq 0,0001$				

5.7 Vergleich immunhistochemischer Marker des ABC- und GCB-Kollektivs

5.7.1 BCL2

Es fand sich ein heterogenes Muster der Expression des antiapoptotischen Proteins BCL2 innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs. Es konnte keine BCL2-Expression in 19,36% (12/62) der Fälle nachgewiesen werden und in 12,90% (8/62) der Fälle wurde eine schwach ausgeprägte Expression innerhalb des ABC-Kollektivs nachgewiesen. Eine mäßige bis starke Expression des Proteins war in über 67% (42/62) der Fälle des ABC-Kollektivs nachweisbar. In unterschiedlichem Ausmaß wurde BCL2 durch das GCB-Kollektiv exprimiert. Ähnlich wie innerhalb des ABC-Kollektivs konnte in 19% (4/21) der Fälle keine Expression dieses Proteins nachgewiesen werden. Diese Fälle waren als negativ zu werten. Eine geringe Expression wiesen knapp 5% (1/21) der Fälle, eine mäßige Expression 14% (3/21) der Fälle und eine hohe Expression über 60% (13/21) der Fälle auf (Vgl. Tabelle 12). Der Vergleich der Verteilung der Expression des Proteins BCL2 des GCB-Kollektivs mit dem ABC-Kollektiv ergab einen signifikanten Unterschied (p -Wert= $<0,0001$; vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: Verteilung der Expression des Transkriptionsfaktors BCL2 innerhalb des GCB- und ABC-Kollektivs

Kategorie	Häufigkeiten des ABC-Kollektivs	Prozent	Häufigkeiten des GCB-Kollektivs	Prozent
-	12	19,36	4	19,05
+	8	12,90	1	4,76
++	22	35,48	3	14,29
+++	20	32,26	13	61,91
Summe	62	100	21	100
p-Wert des Vergleichs der Verteilung der Häufigkeiten beider Kollektive: $p=<0,0001$				

Es ließ sich kein Unterschied in der BCL2-Expression bei Verwendung der unterschiedlichen Antikörper nachweisen.

5.7.2 CD3

Die Anzahl der CD3 positiven Zellen sollte als ein Korrelat für die T-Zellanzahl innerhalb eines Gewebes bzw. Tumors dienen. Innerhalb des ABC-Kollektivs ließen sich fast immer T-Zellen nachweisen nur bei 3% (2/62) der Fälle war der Tumor negativ für T-Zellen. Gering bis mäßig waren T-Zellen in 34% (21/62)

bzw. 40% (25/62) der Fälle nachweisbar. In ca. 22,6% (14/62) der Fälle waren T-Zellen in hoher Zahl vorhanden (vgl. Tabelle 13). Das GCB-Kollektiv zeigte eine Tendenz zu geringeren T-Zellzahlen innerhalb des Tumors. Eine geringe oder mäßige T-Zellzahl war in ca. 90% (18/20) der Fälle nachgewiesen werden. Lediglich 10% (2/20) der Fälle zeigten eine hohe Anzahl T-Zellen. Das GCB-Kollektiv wies keinen Fall auf, bei dem keine T-Zellen innerhalb des Tumors nachweisbar waren (vgl. Tabelle 12).

Es konnte ein signifikanter Unterschied des GCB-Kollektiv im Vergleich zum ABC-Kollektiv festgestellt werden (p-Wert = <0,0001; vgl. Tabelle 12).

Tabelle 12: Verteilung der T-Zellzahl innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs

T-Zellzahl in Kategorien	Häufigkeiten des ABC-Kollektivs	Prozent	Häufigkeiten des GCB-Kollektivs	Prozent
+	21	33,87	8	40,00
++	25	40,32	10	50,00
+++	14	22,58	2	10,00
0	2	3,23	0	0
Summe	62	100	20	100
p-Wert des Vergleichs der Verteilung der Häufigkeiten beider Kollektive: p=<0,0001				

5.7.3 Ki67

Bei der Proliferationsrate ließ sich insgesamt eine deutliche Tendenz zu sehr hohen Raten erkennen. Insgesamt proliferierten bei 62% (38/61) der Fälle des ABC-Kollektivs über 80% der Zellen. Bei knapp 40% (23/61) der Fälle zeigte sich eine mittlere bis mäßige Proliferationsrate. In keinem Fall wurde eine Proliferationsrate unter 20% gesehen (vgl. Tabelle 13). Innerhalb des GCB-Kollektivs konnten über 50% (13/22) der Fälle der Kategorie 50-80% zugeteilt werden. Eine sehr hohe Proliferationsrate mit über 80% wiesen 36% (8/22) der GCB-Fälle auf. Bei lediglich 4% (1/22) der GCB-Fälle konnte eine geringere Zellteilungsrate als 50% ausgemacht werden (vgl. Tabelle 13). Der Vergleich beider Kollektive ergab einen signifikanten Unterschied (p-Wert = <0,0001; vgl. Tabelle 13).

Tabelle 13: Verteilung der Proliferationsrate in Kategorien innerhalb des GCB- und ABC-Kollektivs

Proliferationsrate in Kategorien	Häufigkeiten des ABC-Kollektivs	Prozent	Häufigkeiten des GCB-Kollektivs	Prozent
20-50	2	3,28	1	4,55
50-80	21	34,43	13	59,09
80+	38	62,29	8	36,36
Summe	61	100	22	100
p-Wert des Vergleichs der Verteilung der Häufigkeiten beider Kollektive: p=<0,0001				

5.7.4 c-MYC

Fast 30% (11/38) der Fälle waren komplett negativ für dieses Protein. Bei knapp 58% der Fälle war die immunhistochemische Färbung gering positiv für dieses Protein, allerdings zeigten sich weniger als 40% der Zellen positiv. Lediglich bei 13% (4/38) der Fälle war innerhalb des ABC-Kollektivs eine Expression in über 40% der Zellen nachweisbar (vgl. Tabelle 15). Innerhalb des GCB-Kollektivs wiesen nur knapp 31% (5/16) der Fälle überhaupt eine Expression des Proteins c-MYC auf. Nur bei 12,5% (2/16) der Fälle zeigte sich eine Expression in über 40% der Zellen. In diesen Fällen war sie sogar höher als 80%. Bei diesen Fällen fand sich gleichzeitig eine hohe Expression des Proteins BCL2. Bei 68,75% (11/16) der Fälle konnte keine c-MYC-Expression nachgewiesen werden. (vgl. Tabelle 15). Bei einem Vergleich des GCB- mit dem ABC-Kollektiv, zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Innerhalb des ABC-Kollektivs war die c-MYC-Expression, wenn auch auf sehr niedrigem Niveau, signifikant höher (p-Wert: 0,0015, vgl. Tabelle 15).

Tabelle 14: Verteilung des Transkriptionsfaktor c-MYC in Kategorien innerhalb des GCB- und ABC-Kollektivs

c-MYC in Kategorien	Häufigkeiten des ABC-Kollektivs	Prozent	Häufigkeiten des GCB-Kollektivs	Prozent
10-	11	28,95	11	68,75
10-40	22	57,90	3	18,75
40+	4	10,53	0	0,00
80+	1	2,63	2	12,50
Summe	38	100	16	100
p-Wert des Vergleichs der Verteilung der Häufigkeiten beider Kollektive: p=0,0015				

5.8 MYD88-Status innerhalb des Studienkollektivs

Es konnte bei insgesamt 19 Fällen eine p.L265P Mutation nachgewiesen werden. 18 dieser Fälle fanden sich innerhalb des ABC-Kollektivs. Sie machen 28% der gesamten ABC-Gruppe aus. Wird der unklassifizierbare Fall zum GCB-Kollektiv gerechnet, befand sich im Gesamtkollektiv ein Fall der GCB-Gruppe, der positiv für die p.L265P-Mutation ist. Dies entsprach 4,3% der Fälle. Dieser Fall war sowohl stark MUM1, als auch CD10 positiv und wurde als nicht klassifizierbar gewertet. Es konnte ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der p.L265P-Mutationsfrequenz in beiden Gruppen festgestellt werden (p-Wert <0,0001).

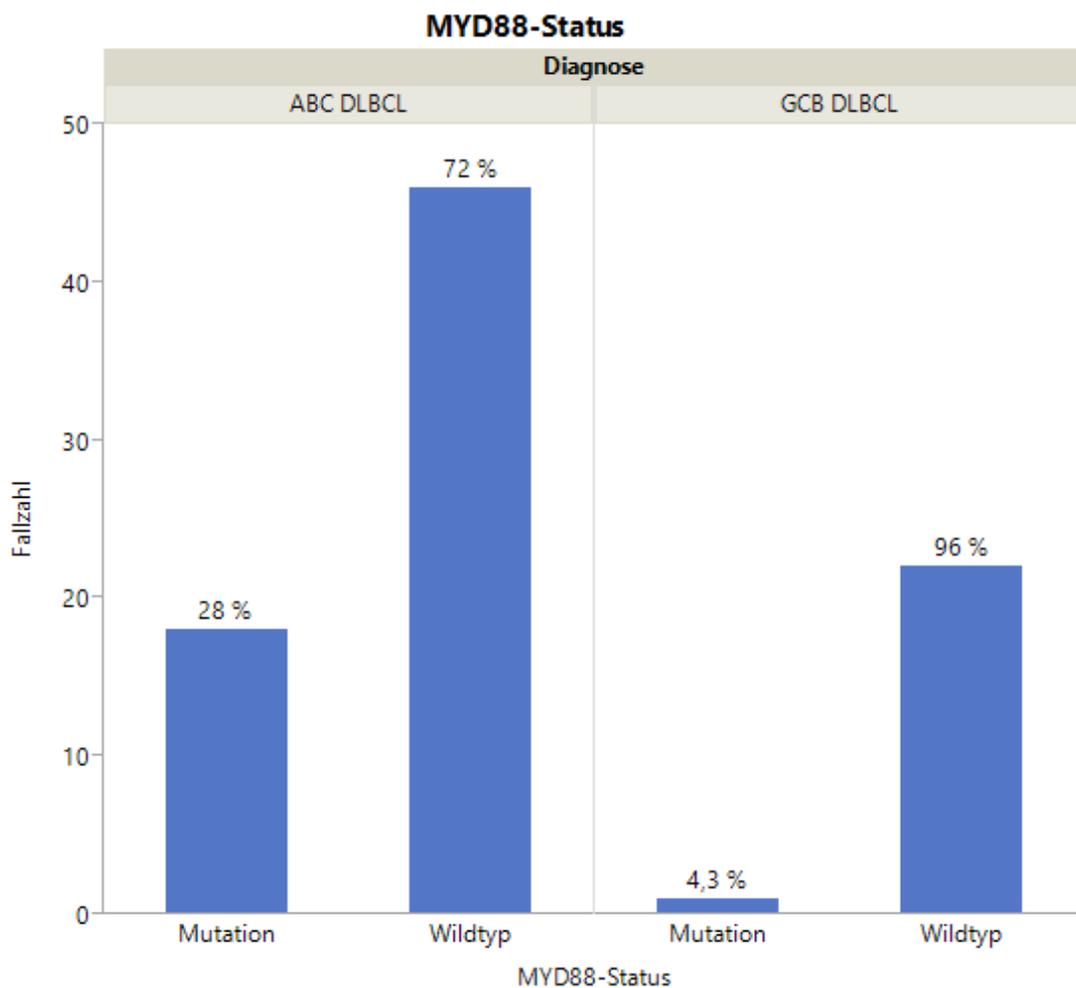


Abbildung 14: Verteilung der p.L265P-MYD88 Mutation (N=19) innerhalb des ABC- und des GCB-Kollektivs, Angaben in Prozent, Höhe des Balkens entspricht der Fallzahl

5.9 Allgemein patientenbezogene Daten der MYD88^{L265P}-Gruppe

Anhand des Mutationsstatus wurde das ABC-Kollektiv in MYD88^{WT}-Gruppe und MYD88^{L265P}-Gruppe aufgeteilt. Die MYD88^{L265P}-Gruppe wies 55,55% (10/18)

Männer und 44,44% Frauen (8/18) auf. Die MYD88^{WT}-Gruppe enthielt 50% Männer (23/46) und 50% Frauen (23/46). Das mediane Alter betrug 73,5 Jahre innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe, bei einer Altersverteilung von 55 bis 88 Jahren. Die MYD88^{WT}-Gruppe wies ein medianes Alter von 71 Jahren bei einer Spannweite von sechs bis 89 Jahren auf (vgl. Tabelle 15). Der Vergleich des Durchschnittalters beider Untergruppen, ergab einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,0038 (vgl. Tabelle 15). Innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe betrug die Rezidivrate 17,39%, (8/46) während sie in der MYD88^{L265P}-Gruppe mit 27,78% (5/18) etwas höher lag.

Tabelle 15: Kenndaten des ABC-Kollektivs aufgeteilt nach MYD88^{WT} und MYD88^{L265P}

	MYD88^{WT}	MYD88^{L265P}
Fallzahl	46 (71,875%)	18 (28,125%)
Männlich	50% (23)	55,56% (10)
Weiblich	50% (23)	44,44% (8)
Medianes Alter	64,87	72,44
Altersspanne	6-89	55-88
Durchschnittsalter	64,87	72,44
Durchschnittsalter Männer	60	70
Durchschnittsalter Frauen	69,70	75,5
Kein Rezidiv	82,61% (38)	72,22% (13)
Rezidiv	17,39% (8)	27,78% (5)
p-Wert		
Vergleich des Durchschnittsalters beider Gruppen		0,0038*

Innerhalb der MYD^{L265P}-Gruppe waren die Frauen fünf Jahre älter als die Männer. Dieser Unterschied des Durchschnittsalters fiel innerhalb der MYD^{WT}-Gruppe mit fast zehn Jahren noch größer aus. Dieser hohe Altersunterschied war signifikant (p-Wert: 0,0324 vgl. Tabelle 16) Innerhalb der MYD^{L265P}-Gruppe war der Unterschied knapp nicht signifikant (p-Wert: 0,0527). Allerdings muss eine starke Tendenz zu einem Geschlechterunterschied festgehalten werden (vgl. Tabelle 16).

Tabelle 16: Durchschnittsalter der Frauen und Männer der MYD88^{WT}- und MYD88^{L265P}-Gruppe mit zugehörigen p-Werten

	MYD88^{WT}	MYD88^{L265P}
Durchschnittsalter Männer	60	70
Durchschnittsalter Frauen	69,70	75,5

p-Werte	
Vergleich des Alters der Geschlechter innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe	0,0527
Vergleich des Alters der Geschlechter innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe	0,0324

5.9.1 Morphologie

Bei Betrachtung der MYD88^{L265P}- und der MYD88^{WT}-Gruppe, wies die MYD88^{L265P}-Gruppe mehr Fälle mit einer centroblastischen Morphologie auf. Ihr Anteil lag bei 88,89% (16/18) in dieser Gruppe, während der Anteil der Fälle mit centroblastischer Morphologie innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe bei 82,22% (37/45) lag. Eine immunoblastische Morphologie fand sich innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe seltener als in der MYD88^{WT}-Gruppe. Diese Morphologie machte hier nur 5,56% (1/18) der Fälle aus, während es innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe 15,91% (7/45) waren (vgl. Tabelle 17). Ein signifikanter Unterschied ergab sich beim Vergleich der Verteilung der einzelnen morphologischen Typen innerhalb beider Gruppen (p-Wert 0,01). Innerhalb des immunoblastischen Subtyps, zeigte sich, dass 87,5% (7/8) der Fälle der MYD88^{WT}-Gruppe zuzuordnen waren.

Tabelle 17: Morphologie innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe und MYD88^{L265P}-Gruppe

	MYD88^{WT}	MYD88^{L265P}
centroblastisch	82,22% (37)	88,89% (16)
Immunoblastisch	15,56% (7)	5,56% (1)
anaplastisch	2,22% (1)	5,56% (1)
p-Wert des Vergleichs der Häufigkeitsverteilung beider Gruppen: p= 0,01		

5.9.2 Immunhistochemische Eigenschaften der MYD88^{L265P}-Gruppe im Vergleich mit der MYD88^{WT}-Gruppe

5.9.3 MUM1

Bei Unterteilung des ABC-Kollektivs nach dem MYD88-Status, konnte in der MYD88^{L265P}-Gruppe kein Fall mit einer hohen Expression des Plasmazellmarkers MUM1 gefunden werden. Über 75% der Fälle (13/17) zeigten eine Expression des Transkriptionsfaktors im Bereich von 50-80%. Die MYD88^{WT}-Gruppe wies mit 33,33% (15/45) vermehrt Fälle auf, die eine sehr hohe Expression des

Faktors MUM1 zeigten. Ein Gruppenvergleich zeigt einen signifikanten Unterschied (p-Wert unter 0,0001 vgl. Tabelle 19)

Tabelle 18: Verteilung der Expression des Markers MUM1 aufgeteilt in Kategorien innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe und MYD88^{L265P}-Gruppe

MUM1 in Kategorien	Häufigkeiten MYD88 ^{WT}	Prozent	Häufigkeiten MYD88 ^{L265P}	Prozent
20-50	12	26,67	4	23,5
50-80	18	40,00	13	76,5
80+	15	33,33	0	0
Summe	45	100	17	100
p-Wert des Vergleichs der Verteilung der Häufigkeiten beider Kollektive: p=<0,0001				

5.9.4 BCL6

Die Untergruppen zeigten eine leicht unterschiedliche Verteilung. Eine geringe Anzahl der Fälle wies eine hohe Expression des BCL6 auf. Die Häufigkeit der hohen Expression war in der MYD88^{WT}-Gruppe mit 9,5% (4/42) fast doppelt so hoch wie in der MYD88^{L265P}-Gruppe. Innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe exprimierten 42,9% (18/42) der Fälle BCL6 in 50-80% der Zellen, während nur 22,2% (4/18) der Fälle der MYD88^{L265P}-Gruppe in diese Kategorie fielen. Dafür exprimierte die Hälfte der Fälle in der MYD88^{L265P}-Gruppe BCL6 schwach. Dies war nur bei 19% (8/42) der Fälle der MYD88^{WT}-Gruppe zu finden. In beiden Gruppen exprimierten 22,2% (4/18) und 28,6% (12/42) der Fälle BCL6 in weniger als 20% der Zellen und waren negativ für diesen Marker zu werten (vgl. Tabelle 21). Der Vergleich beider Untergruppen ergab einen signifikanten Unterschied (p-Wert: 0,04; vgl. Tabelle 20).

Tabelle 19: Verteilung der Expression des Transkriptionsfaktors BCL6 in Kategorien innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe und MYD88^{L265P}-Gruppe

BCL6 in Kategorien	Häufigkeiten MYD88 ^{WT}	Prozent	Häufigkeiten MYD88 ^{L265P}	Prozent
20-	4	22,2	12	28,57
20-50	9	50,0	8	19,05
50-80	4	22,2	18	42,86
80+	1	5,6	4	9,52
Summe	18	100	42	100
p-Wert des Vergleichs der Verteilung der Häufigkeiten beider Kollektive: p=0,0004				

5.9.5 BCL2

Die Untergruppen des ABC-Kollektivs zeigten sich einige Unterschiede. Innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe exprimierten 29% (5/17) der Fälle BCL2 nicht und 11% (2/17) der Fälle in geringem Ausmaß. Innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe konnte bei 15% (7/45) der Fälle keine BCL2-Expression nachgewiesen werden. In dieser Gruppe zeigte sich bei je über 35% (16/45) der Fälle eine mittlere oder hohe BCL2-Expression. Die MYD88^{L265P}-Gruppe wies in 23% (4/17) der Fälle eine hohe BCL2-Expression auf (vgl. Tabelle 21).

Tabelle 20: Verteilung der Expression des Transkriptionsfaktors BCL2 in Kategorien innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe und MYD88^{L265P}-Gruppe

BCL2 Kategorie	Häufigkeiten MYD88^{L265P}	Prozent	Häufigkeiten MYD88^{WT}	Prozent
-	5	29,41	7	15,56
+	2	11,77	6	13,33
++	6	35,29	16	35,56
+++	4	23,52	16	35,56
Summe	17	100	45	100

BCL2 wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern angefärbt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Expression dieses Transkriptionsfaktors innerhalb der MYD88-Gruppen.

5.9.6 CD3

Innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe fanden sich mit 5,9% (1/17) häufiger keine T-Zellen innerhalb des Tumors als in der MYD88^{WT}-Gruppe. Ebenfalls konnten Unterschiede in der Anzahl der tumorinfiltrierenden T-Zellen gefunden werden. Über die Hälfte der Fälle (9/17) innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe wiesen mäßig viele T-Zellen auf, während nur knapp 12% (2/17) der Fälle eine hohe T-Zellanzahl zeigte. In 29% (5/17) der Fälle der MYD88^{L265P}-Gruppe war eine niedrige T-Zellanzahl nachweisbar. Eine geringe Zahl tumorinfiltrierender Zellen war häufiger mit 35% (16/45) in der MYD88^{WT}-Gruppe nachzuweisen. In der MYD88^{WT}-Gruppe fand sich bei 35% (16/45) der Fälle eine mäßige und bei 26% (12/45) der Fälle eine hohe T-Zellanzahl (vgl. Tabelle 23). Es ergab sich bei einem Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied (p-Wert = 0,054; vgl. Tabelle 22)

Tabelle 21: Verteilung der T-Zellanzahl innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe und MYD88^{L265P}-Gruppe

T-Zellzahl in Kategorien	Häufigkeiten MYD88 ^{L265P}	Prozent	Häufigkeiten MYD88 ^{WT}	Prozent
+	5	29,41	16	35,56
++	9	52,94	16	35,35
+++	2	11,77	12	26,67
0	1	5,88	1	2,22
Summe	17	100	45	100
p-Wert des Vergleichs der Verteilung der Häufigkeiten beider Kollektive: p=0,0054				

5.9.7 Ki67

Bei Betrachtung der beiden MYD88-Gruppen zeigten sich in beiden Gruppen sehr hohe Proliferationsraten. In über 90% der Fälle beider Gruppen proliferierten mehr als 50% der Zellen. Die MYD88^{L265P}-Gruppe enthielt keinen Fall bei dem weniger als 50% der Zellen proliferierten. In der MYD88^{WT}-Gruppe hingegen proliferierten in 4% (2/43) der Fälle weniger als 50% der Zellen (vgl. Tabelle 23).

Tabelle 22: Verteilung der Proliferationsrate in Kategorien innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe und MYD88^{L265P}-Gruppe

Proliferationsrate in Kategorien	Häufigkeiten MYD88 ^{L265P}	Prozent	Häufigkeiten MYD88 ^{WT}	Prozent
20-50	0	0	2	4,65
50-80	6	33,33	15	34,84
80+	12	66,67	26	60,47
Summe	18	100	43	100

Bei Aufteilung dieser beiden Gruppen nach Geschlecht, ergaben sich signifikante Unterschiede innerhalb der jeweiligen Gruppen. Die Männer der MYD88^{L265P}-Gruppe wiesen in 9 von 10 Fällen (=90%) eine Proliferationsrate der Tumorzellen von über 80% auf. Bei den Frauen war dies nur bei 3 von 8 Fällen (=37,5%) zu finden. Der Vergleich dieser Werte mit denen der MYD88^{WT}-Gruppe zeigte deutliche Unterschiede. Innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe proliferierten bei 61% der Tumoren der Männer über 80% der Zellen. Die Tumoren der Frauen der MYD88^{WT}-Gruppe proliferierten ähnlich stark wie die der Männer (vgl. Tabelle 24). Der Gruppenvergleich zeigte hierbei einen signifikanten Unterschied (p-Wert: <0,0001, vgl. Tabelle 24).

Ergebnisse

Tabelle 23: Übersicht über die Proliferationsrate aufgeteilt nach Geschlecht innerhalb der MYD88^{WT}- und MYD88^{L265P}-Gruppe, In Klammern Häufigkeit innerhalb der Untergruppe

Proliferationsrate in Prozent	MYD88 ^{WT} ,		MYD88 ^{L265P}	
	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
20-50	4,76% (1)	4,54% (1)	0% (0)	0% (0)
50-80	33,33% (7)	36,36% (8)	10% (1)	62,5% (5)
80+	61,91% (13)	59,09% (13)	90% (9)	37,5% (3)
Summe	100% (21)	100% (22)	100% (10)	100% (8)
p-Werte				
Vergleich der Proliferationsrate der Männer beider Gruppen	<0,0001*			

5.9.8 c-MYC

Die Untergruppen wiesen Unterschiede in der c-MYC-Expression auf. Es zeigten 16% (2/12) der Fälle der MYD88^{L265P}-Gruppe bzw. 10% (3/26) der Fälle der MYD88^{WT}-Gruppe eine Expression des c-MYCs in über 40% der Tumorzellen. Allerdings waren 50% (6/12) der Fälle innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe als komplett negativ zu werten. Dahingegen konnten knapp 20% (5/26) der Fälle der MYD88^{WT}-Gruppe als komplett negativ für c-MYC gewertet werden. Fast 70% (18/26) der Fälle innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe exprimierten in mehr als 10%, aber weniger als 40% der Tumorzellen c-MYC. Dies war in lediglich einem Drittel der Fälle der MYD88^{L265P}-Gruppe vorzufinden (vgl. Tabelle 34). Insgesamt konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (p-Wert = 0,0140 vgl. Tabelle 25).

Tabelle 24: Verteilung des Transkriptionsfaktors c-MYC in Kategorien innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe und MYD88^{L265P}-Gruppe

C-MYC Kategorien	Häufigkeiten MYD88 ^{L265P}	Prozent	Häufigkeiten MYD88 ^{WT}	Prozent
10-	6	50,00	5	19,23
10-40	4	33,33	18	69,23
40+	2	16,67	2	7,69
80+	0	0	1	3,85
Summe	12	100	26	100
p-Wert des Vergleichs der Verteilung der Häufigkeiten beider Kollektive: p=0,0140				

6 Diskussion

Der Hans-Algorithmus wurde in dieser Studie verwendet, um das Studienkollektiv in GCB- und ABC-Subtyp einzuteilen. Es wurde untersucht in wie weit sich die Expression der Marker BCL6 und MUM1 innerhalb beider Kollektive unterscheidet. Weiterhin stellt sich die Frage, ob und wie sich beide Kollektive in einigen klinischen und immunhistochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Ebenfalls wurden beide Kollektive auf das Vorhandensein der p.L265P-Mutation des *MYD88*-Gens untersucht. Hierbei stellt sich die Frage in wie fern der Hans-Algorithmus die von Ngo et al. [70] nachgewiesene Mutationsfrequenz der *p.L265P-MYD88*-Mutation innerhalb der Subtypen des DLBCL wiedergibt. Weiterhin waren die Auswirkungen der *p.L265P-Mutation* auf immunhistochemisch, mikroskopisch und klinisch bestimmbare Marker und Eigenschaften Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Bei der Auswertung und Diskussion der Daten müssen einige Einschränkungen und mögliche Fehlerquellen genannt werden. Einerseits beeinflusst die Gruppengröße alle Ergebnisse. Das GCB-Kollektiv sowie die *MYD88^{L265P}*-Gruppe sind mit 22 bzw. 18 Fällen relativ klein, was signifikante Ergebnisse vortäuschen oder verschleiern könnte. Ebenfalls war es nicht möglich für jeden Fall alle immunhistochemischen Färbungen zu ergänzen, was die Gruppengröße und damit die Signifikanz der Ergebnisse weiter einschränkt. Genauso gilt diese Einschränkung bei Unterteilung der Kollektive und Gruppen dieser Studie nach dem Geschlecht. Ebenfalls ist es möglich, dass bei Erhebung der Daten nicht alle Rezidive erfasst wurden. Ein Rezidiv könnte erst nach Beendigung der Datenerhebung aufgetreten sein oder der betreffende Patient führte seine onkologische Nachsorge nicht in Tübingen durch. Dadurch wäre eine Verzerrung der Daten zur Rezidivhäufigkeit möglich. Weiterhin ist es möglich, dass durch die Selektion der Fälle nach Materialmenge ein unvollständiges Gesamtbild des DLBCL entstand und Signifikanzen vorgetäuscht wurden.

6.1 Vergleich der Kenndaten des ABC- mit dem GCB- Kollektiv

In dieser Studie wurde das ABC-Kollektiv dem GCB-Kollektiv gegenübergestellt. Dabei wurden Unterschiede auf klinischer, mikroskopischer und immunhistochemischer Ebene gefunden.

In der Literatur wird für den ABC-Subtyp des DLBCL eine Rezidivrate von circa 25% angegeben [92]. Die Rezidivrate innerhalb des GCB-Kollektivs signifikant niedriger als die des ABC-Kollektivs. Dies kann möglicherweise auf das bessere Therapieansprechen des GCB-Subtyps zurückgeführt werden [59, 93]. Der GCB-Subtyp könnte sensibler auf die Chemotherapie reagieren, sodass nahezu alle Lymphomzellen durch die Therapie eliminiert werden. Die wenigen verbleibenden Zellen würden länger benötigen, um erneut eine messbare Tumormasse auszubilden oder könnten durch das eigene Immunsystem vernichtet werden [94].

Das mediane Alter sowie des Durchschnittsalter des GCB-Kollektivs unter dem des ABC-Kollektivs. Dieser eher geringe Altersunterschied kann die bessere Prognose des GCB-Subtyps im Vergleich zum ABC-Subtyp nicht erklären. Es wäre aber möglich, dass sich das biologische Alter der Patienten stärker unterscheidet, was wiederum einen Einfluss auf die Verträglichkeit und Wirkung einer Chemotherapie auswirken kann [95, 96].

Ein möglicher Erklärungsansatz für das höhere Alter der Frauen des ABC-Kollektivs wäre die protektive Wirkung weiblicher Hormone wie Östrogen [97]. Es stellt sich allerdings die Frage, warum nur beim ABC-Subtyp ein protektiver hormoneller Einfluss bestehen sollte.

Die geringere Ausprägung der immunoblastischen sowie anaplastischen Morphologie innerhalb des GCB-Kollektivs, könnte als prognostisch günstiger Faktor betrachtet werden, da der immunoblastische Phänotyp ist mit einer schlechteren Prognose verbunden [98, 99]. Im Umkehrschluss kann die höhere Prävalenz des immunoblastischen Phänotyps innerhalb des ABC-Kollektivs die schlechtere Prognose dieses Subtyps teilweise erklären [93]. Es bedarf weiterer Studien, um diese Hypothese zu testen.

6.2 Expression der Marker des Hans-Algorithmus innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs

Das DLBCL stellt eine heterogene Erkrankung dar. In dieser Studie wurde diese Entität mittels immunhistochemischer Marker in die beiden Subtypen GCB- und ABC eingeteilt. Der verwendete Hans-Algorithmus gewichtet die CD10-Expression stärker als eine MUM1-Expression und die MUM1-Expression stärker als eine BCL6-Expression. Somit existieren innerhalb des ABC-Kollektivs ebenfalls Fälle, die sowohl MUM1 als auch BCL6 positiv sind.

6.2.1 MUM1

Unter Verwendung des Hans-Algorithmus zur Einteilung der Fälle in die beiden Subtypen, war eine niedrige Expression des Plasmazellmarkers MUM1 innerhalb des GCB-Kollektivs zu erwarten. Da der Hans-Algorithmus eine MUM1-Expression als Bedingung für einen ABC-Subtyp voraussetzt, verwundert es nicht, dass sich kein Fall ohne MUM1-Expression innerhalb dieser Gruppe findet. Dennoch zeigen die meisten Fälle des ABC-Subtyps eine stark erhöhte MUM1-Expression, was anhand des Ursprunges aus Zellen, die das Keimzentrum bereits durchlaufen haben [56], erklärt werden kann. Ebenfalls kann die erhöhte NF- κ B-Aktivität die innerhalb des ABC-Subtyps vorhanden ist, die erhöhte MUM1-Expression induzieren [100].

6.2.2 BCL6

Durch Verwendung des Hans-Algorithmus finden sich in beiden Subtypen Fälle, die BCL6 exprimieren. Diese Konstellation ist bei ca. 70% der ABC-Fälle zu finden. Dieser Wert ist leicht höher als die von der WHO angegebene Co-Expressionsrate von 50% [4]. Insgesamt stellt sich die Frage in wie weit BCL6 als Einteilungskriterium für den ABC- und GCB- Subtyp angewendet werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass der Hans-Algorithmus auch bei alleiniger Betrachtung der Expression der Proteine MUM1 und CD10 eine äquivalente Unterscheidung zwischen GCB- und ABC-Subtyp ermöglicht, als bei zusätzlicher Betrachtung der BCL6 Expression [43]. Insgesamt könnte hierdurch Bedeutung der BCL6-Expression zur Einteilung der DLBCL in ABC- und GCB-Subtyp in Frage gestellt werden.

6.3 Expression weiterer immunhistochemischer Marker des ABC- und GCB-Kollektivs

6.3.1 BCL2

BCL2 stellt ein Protein dar, welches die Zelle vor der Apoptose schützt [101]. In unphosphoryliertem Zustand, hemmt es andere Faktoren, die die Apoptose fördern. Eine Überexpression dieses Proteins führt somit zu einer längeren Lebensdauer der Zellen, weshalb das codierende Gen zu den Protoonkogenen gezählt wird. Innerhalb der DLBCLs, vor allem innerhalb des GCB-Subtyps, kommt es häufig zu Translokationen dieses Gens [Übersicht in 102].

Die hohe BCL 2 Expression innerhalb des GCB-Subtyps ist durch die Bedeutung dieses Faktors in dessen Pathogenese zu erklären [103]. Es wäre ebenfalls möglich, dass sich unter den Fällen mit besonders ausgeprägter BCL2-Expression, Fälle befinden, die eine Translokation des *BCL2-Gens* aufweisen. In diesem Zusammenhang wäre auch ein Double-Hit-Lymphom mit *BCL2/c-MYC-Translokationen* oder ein Triple-Hit-Lymphom mit *BCL2/BCL6/c-MYC-Translokationen* möglich [102], da dadurch die Expression dieser Proteine stark erhöht wäre. Die signifikant höhere Expression des Proteins BCL2 innerhalb des GCB-Subtyps könnte auf eine höhere Inzidenz der Double-Hit Lymphome hindeuten. Um dies festzustellen, müssten noch weitere Untersuchungen wie eine Fluoreszenz in situ Hybridization (FISH) folgen.

6.3.2 Proliferationsrate

Ki67 ist ein nicht-Histon-Protein, welches in der G1, S, G2 und M-Phase des Zellzyklus produziert wird. Es wird nicht in der frühen G1- und G0-Phase exprimiert, wodurch es sich als Marker für Zellen eignet, die den Zellzyklus durchlaufen und sich teilen. Anhand der Anzahl der positiven Zellen, lässt sich die Proliferationsrate innerhalb einer Zellpopulation abschätzen [104]. Innerhalb des DLBCL ist eine erhöhte Proliferationsrate von ungefähr 60-70% der Tumorzellen bekannt [105].

In beiden Studienkollektiven war eine sehr hohe Proliferationsrate nachweisbar. Innerhalb des ABC-Kollektivs finden sich häufiger Fälle mit einer Proliferationsrate von über 80%. Dies könnte Ausdruck der höheren Aggressivität dieses Subtyps sein, da eine hohe Teilungsrate ein schnelles Tumorwachstum

suggeriert. Im Umkehrschluss wäre die durchschnittlich niedrigere Proliferationsrate des GCB-Subtyps als Zeichen geringerer Aggressivität zu werten. Dies könnte sich insofern positiv auf die Prognose des GCB-Subtyps auswirken, da sich die Tumormasse durch die niedrigere Zellteilungsrate nicht ganz so schnell vergrößert, wie die des ABC-Subtyps.

6.3.3 CD3 oder T-Zellzahl

CD3 beschreibt einen Proteinkomplex aus fünf Untereinheiten, welcher einen Co-Rezeptor des T-Zellrezeptors auf der Zelloberfläche der T-Lymphozyten darstellt [106]. Er ist an der Signalübertragung bei Aktivierung der T-Zelle durch den T-Zell-Rezeptor beteiligt [107]. Da sich dieser Marker hauptsächlich auf T-Zellen befindet, können T-Lymphozyten mittels eines Antikörpers gegen ihn spezifisch nachgewiesen werden. Dadurch kann der Anteil eventuell vorhandenen T-Lymphozyten gegenüber Tumorzellen abgegrenzt werden [108]. In dieser Studie wurde so die T-Zellzahl innerhalb des DLBCLs bestimmt.

Generell lässt sich festhalten, dass die Fälle des ABC-Kollektivs innerhalb des Tumors fast immer T-Zellen enthalten. Dies kann durch die Immunantwort des Körpers gegen das DLBCL bedingt sein. Bei der Anzahl der T-Lymphozyten innerhalb des Tumors zeigt das GCB-Kollektiv eine signifikant geringere Anzahl als das ABC-Kollektiv. Dennoch lassen sich in allen Fällen des GCB-Subtyps T-Zellen innerhalb des Tumors nachweisen.

Es bleibt die Frage, wie sich T-Zellen auf den Tumor auswirken. Ist es eine Abwehrreaktion des Körpers gegen das DLBCL, wäre eine hohe T-Zellanzahl ein Indikator für eine starke Immunreaktion. In diesem Fall würde der Körper auf den GCB-Subtyp signifikant geringer reagieren als auf den ABC-Subtyp. Bei hoher T-Zellzahl innerhalb wäre eine mögliche weitere Therapieoption für das DLBCL eine Immunmodulation. Es könnte versucht werden, die Immunantwort gegen das Lymphom mittels Immunaktivatoren zu verstärken. Es gibt Studien, die den Zusammenhang der T-Zellaktivität und der Expression des programmed cell death receptors (PDCL1/PD-1) und dessen Liganden (PD-L1) innerhalb des DLBCL untersuchen [109]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression des PD-L1 innerhalb des Tumors erhöht ist [110]. PD-1 ist ein Repressor der T-

Zellaktivität [109, 110] und eine erhöhte Expression des PD-L1s innerhalb der Tumorzellen, kann die T-Zellantwort auf den Tumor unterdrücken. Dies ist eine Möglichkeit des DLBCLs sich der Immunantwort des Körpers zu entziehen [109, 110]. Es sollte weiter untersucht werden, welche Rezeptoren auf den Subtypen des DLBCLs und den tumorinfiltrierenden Zellen exprimiert werden, da sich die Expression des PD-1s und seines Liganden auf tumorinfiltrierenden Zellen auf die Prognose auswirken kann [111]. Ebenfalls könnte eventuell eine unterschiedlich starke Expression des PD-L1-Rezeptors vorhanden sein, was eine unterschiedlich ausgeprägte Repression der T-Zellaktivität innerhalb der beiden Subtypen suggerieren würde.

6.3.4 C-MYC

MYC ist Transkriptionsfaktor, der Stoffwechselfvorgänge wie die Proteinbiosynthese, die Zellproliferation, das Wachstum oder die DNA-Replikation kontrolliert [112, 113]. Veränderungen in diesem Gen finden sich in 5-14% der Fälle innerhalb des DLBCLs. Häufig werden diese Mutationen von Translokationen in den Genen für BCL6 und/oder BCL2 begleitet [112].

Zwar ist die c-MYC-Expression innerhalb des ABC-Kollektivs nur gering ausgeprägt, dennoch wäre es möglich, dass diese Expression proliferationsfördernde Wirkung besitzt [112]

Bei den Fällen, die eine hohe Expression des Transkriptionsfaktors c-MYC aufweisen, könnte Translokation des c-MYC-Gens vorliegen. Dies müsste durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

6.4 MYD88-Mutation innerhalb des Studienkollektivs

Diese Studie zeigt, dass sich innerhalb des ABC-Kollektivs eine p.L265P-Mutationsfrequenz von ca. 28% nachweisen lässt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Ngo [70]. Eine mit ca. 20% etwas geringere *p.L265P-MYD88-Mutationshäufigkeit* innerhalb des ABC-Subtyps wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie nachgewiesen [90]. Andere Studien fanden allerdings eine niedrigere *p.L265P-MYD88-Mutationsfrequenz* mit 6,5% und 19,3% in koreanischen Populationen [89, 114]. Diese niedrigere Frequenz im

Vergleich mit westlichen Studien, könnte an der ethnischen Herkunft der Proben liegen [115, 116]. Es könnte im Zuge unterschiedlicher genetischer Herkunft und Umwelteinflüssen zu einer Differenz in der Mutationsfrequenz kommen oder generell unterschiedliche Mutationen als pathologische Ursache der Lymphomentstehung vorliegen. Die Testung dieser Hypothese wäre Gegenstand weiterer Studien.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich der Hans-Algorithmus eine immunhistochemische Möglichkeit darstellt, um eine Einteilung primärer DLBCLs NOS in GCB- und ABC-Kollektiv durchzuführen und die *p.L265P-MYD88-Mutation* vorwiegend innerhalb des ABC-Kollektivs vorzufinden. Da kein Vergleich mit anderen Algorithmen, wie dem Choi-Algorithmus [41], stattgefunden hat, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob ein anderer Algorithmus ein ähnliches Ergebnis erbracht hätte oder die *p.L265P-MYD88-Mutationsfrequenz* besser oder schlechter wiedergegeben hätte.

Dennoch belegt diese Studie die von Ngo et al gefunden Ergebnisse, was im klinischen Alltag eine Vorselektion des Patientenkollektivs anhand weniger immunhistochemischer Marker ermöglichen würde. Dadurch müsste keine Testung aller DLBCL-Fälle auf die *p.L265P-MYD88-Mutation* erfolgen, da sich nur sehr wenige Fälle, die eine Mutation tragen, innerhalb des GCB-Subtyps nachweisen ließen.

6.5 Klinische und morphologische Unterschiede durch die *MYD88 p.L265P* Mutation innerhalb des ABC-Kollektivs

Die meisten Mutationsfälle wurden innerhalb des ABC-Kollektivs gefunden. Daher wurden dieses Kollektiv abhängig vom Mutationsstatus in eine *MYD88^{WT}*- und eine *MYD88^{L265P}*-Gruppe eingeteilt. Der Vergleich dieser Gruppen zeigt einige Unterschiede, denen die *MYD88-Mutation* als Ursache zu Grunde liegen könnte.

Der Vergleich der Rezidivraten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Weitere Analysen werden benötigt, um diese Tendenz zu bestätigen oder zu widerlegen. Jedoch wäre eine höhere Rezidivrate ein Hinweis auf eine höhere Aggressivität der *MYD88^{L265P}*-Gruppe.

Hieraus könnten sich prognostische sowie therapeutische Implikationen ergeben. Rezidive sind häufig schwerer zu behandeln, da Tumorzellen eventuell nicht mehr auf die Erstlinientherapie ansprechen [117]. Es kann daher notwendig sein, Rezidive mit Therapien, die im Rahmen von Studien durchgeführt werden, zu behandeln [50, 117, 118]. Diese sind unter Umständen schlechter verträglich als die Erstlinientherapie, was einen Therapieabbruch bedingen kann. Ebenfalls wiesen rezidierte DLBCLs, die auf das R-CHOP-Schema nicht mehr ansprechen, ein schlechteres Gesamtüberleben und Therapieansprechen auf andere Chemotherapien auf [117]. Dieser Umstand könnte das Gesamtüberleben der MYD88^{L265P}-Gruppe bei höherer Rezidivrate negativ beeinflussen.

Der häufigste morphologische Subtyp stellt in beiden Untergruppen der centroblastische dar. Dies deckt sich mit den Literaturangaben [4]. Der immunoblastische Subtyp ist mit einer schlechteren Prognose verbunden [98, 119]. Ebenso konnte die p.L265P-MYD88-Mutation mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gebracht werden [89, 120]. Da sich bei immunoblastischer Morphologie häufig keine *p.L265P-MYD88-Mutation* der Tumoren findet, kann die schlechtere Prognose der MYD88^{L265P}-Gruppe nicht durch die Morphologie der Tumorzellen erklärt werden.

Die Daten des medianen Alters beider Gruppen decken sich mit den Literaturangaben [4]. Andere Studien bestätigen diese Altersverteilung [89]. Das leicht höhere Alter der MYD88^{L265P}-Gruppe könnte Einfluss auf das Therapieansprechen, das Gesamtüberleben und damit auf die Prognose haben. Ein höheres Alter geht meist mit höherer Morbidität einher. Dies beeinflusst, genau wie das Alter an sich, die Therapiemöglichkeiten, da höheres Alter mit einer geringeren Nieren- und Leberfunktion einhergeht. Dies schränkt die Elimination einer Chemotherapie ein und erhöht die Gefahr einer Überdosierung und deren Toxizität [95]. Insgesamt können sich Einschränkungen in der Dosis und Verträglichkeit der Chemotherapie ergeben [95, 96]. Die dadurch benötigten Therapieanpassungen können das Therapieansprechen negativ beeinflussen.

Außerdem muss beachtet werden, dass ein höheres Alter per se immer auch ein höheres Mortalitätsrisiko mit sich bringt. Daher könnte das verminderte Gesamtüberleben der MYD88^{L265P}-Gruppe [120] seinen Ursprung zum Teil in einem höheren medianen Alter dieser Gruppe haben.

Innerhalb der Untergruppen liegen die Durchschnittswerte des Alters der Frauen signifikant höherer als der Männer. Ein Grund für diesen Geschlechterunterschied könnten hormonelle Einflüsse darstellen [121]. Es stellt sich jedoch die Frage, ob dieser Altersunterschied Einfluss auf die Prognose der Patienten hat. In diesem Zusammenhang sollte der Einfluss des Geschlechts auf das Therapieansprechen untersucht werden.

6.6 Expression immunhistochemischer Marker innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe

6.6.1 MUM1

Innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe zeigen die meisten Fälle eine mäßige MUM1-Expression. Es ist unklar, warum sich innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe kein Fall mit hoher Expression findet. Es wäre zu erwarten, dass die Expression des Faktors MUM1 durch die aktivierende Mutation des Proteins MYD88 erhöht wird [70], da die durch MYD88 erhöhte NF-κB-Aktivität ebenfalls MUM1-Expression verstärken würde [100]. Es wäre möglich, dass es unbekannte reprimierende Faktoren innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe gibt, die die MUM1-Expression hemmen. Zur Überprüfung dieser Hypothese müssten weitere Untersuchungen erfolgen.

6.6.2 BCL6

Die geringere Expression von BCL6 innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe könnte mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB durch MYD88 zusammenhängen. NF-κB sorgt innerhalb der Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen für eine Repression der Expression des Faktors BCL6 [20]. Bei höherer MYD88-Aktivität, die durch die *p.L265P-MYD88-Mutation* bedingt ist [70], wäre eine Repression des Transkriptionsfaktor BCL6 sowie eine stärkere NF-κB-Aktivierung anzunehmen.

6.6.3 BCL2

Es wäre möglich, dass in der MYD88^{L265P}-Gruppe eine Translokation des *BCL2*-Gens oder andere aktivierende Mutationen in geringerer Häufung als bei der Wildtyp-Variante des *MYD88*-Gens auftritt. Es sollten weitere Untersuchungen auf mögliche Translokation des *BCL2*-Gens innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe erhoben werden. Es könnte sein, dass in der MYD88^{L265P}-Gruppe Double-Hit-Lymphome in geringerer Ausprägung vorhanden sind. Dies könnte sich günstig auf die auf das Therapieansprechen auswirken [102, 122]. Zu beachten ist hier die fehlende Signifikanz des Gruppenvergleichs. Es ist lediglich eine Tendenz feststellbar, die durch weitere Analysen bestätigt oder widerlegt werden müsste.

6.6.4 Proliferationsrate

Innerhalb der DLBCLs ist eine erhöhte proliferative Aktivität der Zellen bekannt [4]. Der Gruppenvergleich zeigt, dass die MYD88^{L265P}-Gruppe eine noch größere Tendenz zu hohen Proliferationsraten zeigt als die MYD88^{WT}-Gruppe. Diese Tendenz ist statistisch nicht signifikant und müsste durch eine größere Fallzahl, die eine *p.L265P-MYD88-Mutation* tragen, bestätigt oder widerlegt werden. Dennoch könnte diese Tendenz auf eine höhere Aggressivität der MYD88^{L265P}-Gruppe hinweisen.

Auffällig ist, dass bei einem Geschlechtervergleich der Proliferationsrate beider Gruppen, ein signifikanter Unterschied nachweisbar war. Die stark ausgeprägte Diskrepanz der Proliferationsrate zwischen den Männern und Frauen innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe, lässt sich durch die *p.L265P-MYD88-Mutation* allein nicht erklären. Zwar erhöht eine Mutation innerhalb des *MYD88*-Gens die proliferative Aktivität der Zellen [73], aber jeder Fall innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe trägt die *p.L265P*-Mutation im *MYD88*-Gen. Es muss noch andere Einflüsse oder Auswirkungen auf die Proliferationsrate geben, die mit der Mutation und dem Geschlecht zusammenhängen, da sich innerhalb der MYD88^{WT}-Gruppe keine solche Diskrepanz zeigt.

Es stellt sich die Frage, ob diese Verteilung innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe eine Auswirkung auf das Therapieansprechen hat. Genauso muss hinterfragt werden, ob dieser Unterschied eine Relevanz für das Überleben der Patienten hat.

6.6.5 CD3 oder T-Zellzahl

Es konnten Unterschiede innerhalb der Untergruppen des ABC-Kollektivs in der T-Zellzahl innerhalb des Tumors nachgewiesen werden. Die MYD88^{L265P}-Gruppe zeigt vermehrt mäßig viele T-Zellen innerhalb des Tumors. Es wäre möglich, dass die MYD88^{L265P}-Gruppe in stärkerem Ausmaß eine lokale Hemmung des Immunsystems verursacht als die MYD88^{WT}-Gruppe. Dadurch würden die Tumorzellen der MYD88^{L265P}-Gruppe in geringerem Ausmaß durch das Immunsystem erkannt und abgetötet. In diesem Zusammenhang muss die Expression des PD-1 und PD-L1 innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe untersucht werden. Bei einer hohen Expression des Rezeptors PD-1 und dessen Liganden, könnte von einer Hemmung des Immunsystems ausgegangen werden [109, 110]. Ebenfalls muss untersucht werden, wie sich die Expression beider Proteine innerhalb der infiltrierenden T-Zellen verhält. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer hohen Expression des Proteins PD-1 auf tumorinfiltrierenden Zellen eine günstigere Prognose haben [111, 123]. Dadurch könnte die Prognose der Patienten innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe differenzierter erfasst werden. Weiter könnte eine Therapie mit PD-1-Inhibitoren die Prognose der Patienten eventuell verbessern, da dadurch eine Blockade des Immunsystems aufgehoben und eine effektivere Immunantwort gegen die Lymphomzellen eingeleitet werden könnte.

6.6.6 C-MYC

Innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe zeigen nur wenige Fälle eine c-MYC-Expression. Dies spricht für eine reprimierende Wirkung der auf die c-MYC-Expression innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe, möglicherweise ausgelöst durch die *p.L265P-MYD88-Mutation*. Ebenfalls spricht eine geringe c-MYC-Expression gegen eine Translokation des entsprechenden Gens. Es sollte untersucht werden wie häufig sich Translokationen des c-MYC-Gens innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe finden. Bei geringerer Translokationsinzidenz wäre ebenfalls eine geringe Häufigkeit der Double-Hit-Lymphome innerhalb dieser Gruppe zu erwarten.

6.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend können einige Unterschiede zwischen den beiden molekulargenetischen Subtypen ausgemacht werden. Bei Betrachtung der Marker des Hans-Algorithmus, fällt die hohe Zahl BCL6-positiver Fälle innerhalb des ABC-Kollektivs auf. Die Expression ist zwar signifikant geringer als innerhalb des GCB-Kollektivs, dennoch stellt sich die Frage wie gut sich BCL6 als Marker für Zellen des Keimzentrumsursprungs eignet. Auch andere immunhistochemisch nachweisbare Proteine wurden in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. BCL2 wurde innerhalb des GCB-Subtyps signifikant höher exprimiert als innerhalb des ABC-Kollektivs, was durch die Bedeutung dieses antiapoptotischen Proteins in der Pathogenese des GCB-Subtyps erklärt werden kann [103]. Weiterhin könnten Untersuchungen auf Double-Hit-Lymphome in beiden Kollektiven durchgeführt werden. Andere Studien haben Double-Hit Lymphome vorwiegend innerhalb des GCB-Subtyps gefunden [124], was sich in einer hohen BCL2 Expression wieder spiegeln würde. Die T-Zellzahl innerhalb des Tumors unterscheidet sich ebenfalls innerhalb beider Subtypen. Dies könnte Ausdruck einer immunologischen Reaktion auf das Lymphom sein, was als Ansatz für eine immunmodulatorische Therapie genutzt werden könnte [125, 126]. Weiterhin ist die Proliferationsrate innerhalb des ABC-Kollektivs signifikant höher als innerhalb des GCB-Kollektivs. Dies könnte auf eine höhere Aggressivität des ABC-Kollektivs hinweisen.

Die patientenbezogenen Daten ergaben einige prognostisch günstige Eigenschaften des GCB-Kollektivs. Das GCB-Kollektiv ist etwas jünger als das ABC-Kollektiv, was die günstigere Prognose dieses Subtyps mit begründen könnte. Ebenfalls ergibt sich beim Alter innerhalb des ABC-Kollektivs ein Geschlechterunterschied, der beim GCB-Kollektiv so nicht zu finden ist. Hier könnten hormonelle Einflüsse protektiv wirken [121]. Warum dieser Effekt beim GCB-Kollektiv nicht eintritt bleibt unklar. Auch die morphologischen Eigenschaften unterscheiden sich signifikant. Der GCB-Subtyp wies häufiger eine centroblastische Morphologie auf, was prognostisch günstig sein kann [98, 99]. Letztlich war die Rezidivrate innerhalb des GCB-Kollektivs geringer, was sich positiv auf die Prognose auswirken kann.

Es konnte gezeigt werden, dass sich der Hans-Algorithmus eignet um die *p.L265P-MYD88-Mutation* innerhalb des ABC-Kollektivs mit einer hohen Frequenz nachweisen. Dennoch bleibt jeder Algorithmus nur eine gewisse Annäherung an den molekulargenetischen Nachweis. Es bleibt offen, ob ein anderer Algorithmus ein vergleichbares Ergebnis erbringen würde. In diesem Zusammenhang muss die unterschiedliche Übereinstimmung der Algorithmen bei der Einteilung in die Subtypen im Vergleich mit einer molekulargenetischen Untersuchung mit einbezogen werden [127]. Das Studienkollektiv könnte mittels anderer Algorithmen nochmals in die Kollektive unterteilt werden und die Mutationsfrequenz verglichen werden.

Nichtsdestotrotz bleibt festzuhalten, dass mit dieser Studie die von Ngo et al [70] gefundene Mutationsfrequenz innerhalb des ABC-Subtyps bestätigt wird. Da in dieser Studie keine weitere *MYD88-Mutation* untersucht wurde, wäre es möglich, dass andere *MYD88-Mutationen* innerhalb des Kollektivs mit anderen Frequenzen als beschrieben vorhanden sind [70].

Weiterhin zeigen sich innerhalb der $MYD88^{L265P}$ -Gruppe Unterschiede im Vergleich zur $MYD88^{WT}$ -Gruppe. Das höhere Alter innerhalb der $MYD88^{L265P}$ -Gruppe könnte zu der beschriebenen negativeren Prognose durch die Mutation beitragen. Dabei ist auffällig, dass innerhalb der $MYD88^{L265P}$ -Gruppe die Geschlechter ebenfalls einen Altersunterschied aufwiesen, was auf hormonelle Einflüsse zurückzuführen sein könnte [121]. Ein weiterer Unterschied zeigte sich in der etwas höheren Rezidivrate, die ein Korrelat der negativeren Prognose sein könnte. Es muss weiter untersucht werden, in wie weit dies therapeutische Konsequenzen mit sich bringt

Hervorzuheben ist der Geschlechterunterschied bei Betrachtung der Proliferationsrate. Die DLBCL der Männer der $MYD88^{L265P}$ -Gruppe proliferierten beinahe ausschließlich mit einer Rate von über 80%. Ebenso sollte die tumorinfiltrierende T-Zellzahl betrachtet werden. In der $MYD88^{L265P}$ -Gruppe finden sich in geringerer Menge T-Zellen innerhalb des Tumors. Dennoch sind bei über 90% der Fälle Tumorinfiltrierende T-Zellen nachweisbar. Es wäre möglich, dass die vorhandenen T-Zellen durch eine Immunmodulation

therapeutisch genutzt werden könnten. Es muss weiter untersucht werden, welche Rezeptoren auf den Tumor- und T-Zellen innerhalb der MYD88^{L265P}-Gruppe exprimiert werden. So könnten sich therapeutische und prognostische Implikationen ergeben [110, 111].

Diese Studie zeigt, dass die MYD88-Gruppe einige Unterschiede in der Proteinexpression, dem Patientenalter, der T-Zellzahl sowie einige Geschlechterunterschiede aufweist. Zwar konnte diese Gruppe genauer beschrieben werden, die Ursachen für diese Unterschiede und therapeutische Auswirkungen bleiben häufig unklar. Dies kann Gegenstand weiterer experimenteller und klinischer Studien sein.

7 Zusammenfassung

Das DLCL ist mit einem Anteil von 30-40% der Non-Hodgkin-Lymphome, das häufigste B-Zelllymphom der westlichen Welt [4]. Dabei handelt es sich um eine klinisch, morphologisch und immunhistochemisch heterogene Erkrankung, die nochmals in unterschiedliche Subtypen eingeteilt werden kann. Diese Studie untersucht DLCL NOS, wobei molekulargenetisch der GCB- und ABC-Subtyp unterschieden werden können [4]. Zur Einteilung in die Subtypen wurden verschiedene immunhistochemische Algorithmen entwickelt. In dieser Studie wurde der Hans-Algorithmus verwendet, der auf dem Plasmazellmarker MUM1 und den Keimzentrumsmarkern CD10 und BCL6 beruht [42]. Daten zu immunhistochemischen Eigenschaften und Unterschieden sind nur in unzureichendem Ausmaß vorhanden. Molekulargenetisch zeigt der GCB-Subtyp vermehrt Translokationen des Transkriptionsfaktors BCL2 mit Immunglobulingenen [20]. Der ABC-Subtyp hingegen ist auf die konstitutionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B angewiesen [20]. Verschiedene Mutationen können für diese Aktivierung verantwortlich sein. Eine in bis zu 29% der ABC-Subtypen häufig vorkommende Mutation innerhalb des ABC-Subtyps führt zum Austausch der Aminosäure Lysin gegen Prolin an Stelle 265 innerhalb des MYD88-Proteins [70]. Diese Mutation sorgt für eine verstärkte Aktivierung des NF- κ B-Signalweges [70] und hat negative Auswirkungen auf die Prognose der Patienten [120]. Unklar ist jedoch welche Auswirkung diese Mutation auf immunhistochemische und morphologische Eigenschaften hat. Diese Studie untersucht die Häufigkeit der *p.L265P-MYD88-Mutation* innerhalb des GCB- und ABC-Kollektivs unter Verwendung des Hans-Algorithmus. Ebenfalls wurden immunhistochemische Eigenschaften beider DLCL-Subtypen miteinander verglichen. Weiterhin wurde untersucht wie sich die *p.L265P-MYD88-Mutation* auf verschiedene Tumoreigenschaften, die immunhistochemisch nachweisbar waren, auswirkt.

In dieser Studie wurden 87 Fälle mittels einer Schmelzkurvenanalyse auf das Vorhandensein der *p.L265P-MYD88-Mutation* untersucht. Diese Fälle wurden mittels des Hans-Algorithmus in 22 GCB- und 64 ABC-Fälle eingeteilt. Eine *p.L265P-MYD88-Mutation* war in 19 der 87 Fälle nachweisbar. Mittels

immunhistochemischer Färbungen und eines TMAs wurden Werte für die Proliferationsrate, die T-Zellzahl innerhalb des Tumors, die Expression der Transkriptionsfaktoren BCL2, BCL6 und c-MYC erhoben und das ABC- und GCB-Kollektiv und innerhalb des ABC-Kollektivs, die MYD88^{L265P}-Gruppe und die MYD88^{WT}-Gruppe verglichen.

Es zeigte sich, dass innerhalb des ABC-Kollektivs BCL6 häufig exprimiert wurde. Dadurch stellt sich die Frage inwieweit sich bei einer molekulargenetischen Untersuchung die Einteilung durch den Hans-Algorithmus bestätigt und wie gut sich BCL6 eignet beide Subtypen voneinander zu differenzieren. Weiterhin konnte bei der BCL2-Expression ein signifikanter Unterschied im Vergleich des ABC- mit dem GCB-Kollektiv gefunden werden. Dies ist durch die hohe Bedeutsamkeit des Transkriptionsfaktors BCL2 in der Pathogenese des GCB-Subtyps zu erklären [103]. Weiterhin konnte beim ABC-Kollektiv eine höhere T-Zellzahl nachgewiesen werden. Dies könnte neue therapeutische Optionen durch Immunmodulation beim ABC-Subtyp ermöglichen.

Die Analyse der Daten ergab eine Mutationsfrequenz von 28% innerhalb des ABC-Kollektivs, was sich mit den Ergebnissen von Ngo et al deckt [70]. Es ist folglich möglich, mittels des Hans-Algorithmus ein DLBCL-Kollektiv so einzuteilen, dass die Mutation vorwiegend innerhalb des ABC-Kollektivs gefunden wird. Andere Studien hingegen wiesen ähnliche oder niedrigere Mutationsfrequenzen nach [89, 90, 114]. Dies könnte durch die unterschiedliche ethnische Herkunft der Kollektive oder Selektionseffekte verursacht worden sein.

Der Vergleich immunhistochemisch nachweisbarer Tumoreigenschaften zeigte eine relativ hohe Infiltration des Tumors durch T-Zellen. Dies ermöglicht eventuell neue therapeutische Ansätze, wie eine Immunmodulation. Die signifikant geringere Expression des Transkriptionsfaktors BCL6 in der MYD88^{L265P}-Gruppe könnte durch die Aktivierung des Faktors NF-κB durch MYD88 hervorgerufen worden sein [70].

Die in dieser Studie gefundenen Unterschiede zwischen der MYD88^{L265P}-Gruppe und MYD88^{WT}-Gruppe innerhalb des ABC-Kollektivs müssen in weiteren Studien auf die therapeutische und prognostische Relevanz untersucht werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Longo, D.L., *Malignancies of Lymphoid Cells*, in *Harrison's Principles of Internal Medicine*.
2. Lennert K, Feller, and A. C., *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphoma (according to the up-dated Kiel classification)*. Vol. 2. 1992: Springer-Verlag, Berlin. 256.
3. Campo, E., et al., *The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications*. *Blood*, 2011. **117**(19): p. 5019-5032.
4. Swerdlow, S.H., et al., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Forth Edition*. Vol. 2. 2008: WHO. 439.
5. Kondo M., Weissman I. L., and Akashi K., *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. *Cell*, 1997. **91**(5): p. 661-672.
6. Zhuang Y, Cheng P., and W. H., *B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(6): p. 2898-2905.
7. Eisenbeis CF, Singh H, and S. U., *PU.1 is a component of a multiprotein complex which binds an essential site in the murine immunoglobulin lambda 2-4 enhancer*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(10): p. 6452-6461.
8. Barberis A, et al., *A novel B-cell lineagespecific transcription factor present at early but not late stages of differentiation*. *Genes Dev.*, 1990. **4**: p. 849-859.
9. Jacobs Y, et al., *Pan/E2A expression precedes immunoglobulin heavy-chain expression during B lymphopoiesis in nontransformed cells, and Pan/E2A proteins are not detected in myeloid cells*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(6): p. 4087-4096.
10. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. **131**(4): p. 959-971.
11. Rajewsky, K., *Clonal selection and learning in the antibody system*. *Nature*, 1996. **381**(6585): p. 751-758.
12. Cerutti, A., I. Puga, and M. Cols, *New helping friends for B cells*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(8): p. 1956-1968.
13. Kerfoot, S.M., et al., *Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone*. *Immunity*, 2011. **34**(6): p. 947-960.
14. Garside, P., et al., *Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node*. *Science*, 1998. **281**(5373): p. 96-99.
15. Ferguson, S.E., et al., *CD28 is required for germinal center formation*. *J Immunol*, 1996. **156**(12): p. 4576-4581.
16. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 515-548.
17. Zotos, D. and D.M. Tarlinton, *Determining germinal centre B cell fate*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(6): p. 281-288.
18. Murphy, K., *Janeway's Immunobiology*. Vol. 8. 2008: Taylor & Francis Ltd. 868.
19. Dent, A.L., et al., *Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6*. *Science*, 1997. **276**(5312): p. 589-592.
20. Lenz, G. and L.M. Staudt, *Mechanisms of Disease: Aggressive Lymphomas*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(15): p. 1417-1429.
21. Lee, C.H., et al., *Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein*. *J Exp Med*, 2006. **203**(1): p. 63-72.

22. Muramatsu, M., et al., *Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme*. Cell, 2000. **102**(5): p. 553-563.
23. Shen, H.M., et al., *Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes*. Science, 1998. **280**(5370): p. 1750-1752.
24. Pasqualucci, L., et al., *Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 341-346.
25. Kepler, T.B. and A.S. Perelson, *Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation*. Immunol Today, 1993. **14**(8): p. 412-415.
26. Saito, M., et al., *A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma*. Cancer Cell, 2007. **12**(3): p. 280-292.
27. Klein, U., et al., *Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination*. Nat Immunol, 2006. **7**(7): p. 773-782.
28. Ash A. Alizadeh, et al., *Distinct types of DLBCL identified by gene expression profiling*. Nature, 2000. **403**(6769): p. 503-511.
29. Lossos IS, et al., *Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 4.
30. Davis, R.E., et al., *Constitutive Nuclear Factor κ B Activity Is Required for Survival of Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1861-1874.
31. Maul, R.W. and P.J. Gearhart, *AID and Somatic Hypermutation*. 2010. **105**: p. 159-191.
32. Carlo M. Croce, M.D., *Oncogenes and Cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**: p. 502-511.
33. Robbiani, D.F., et al., *Activation Induced Deaminase is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations*. Cell 2008. **135**(6): p. 1028-1038.
34. Klein I, et al., *Translocation capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes*. Cell, 2011. **147**(1): p. 95-106.
35. Hakim, O., et al., *DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes*. Nature, 2012. **484**(7392): p. 69-74.
36. Nussenzweig, A. and M.C. Nussenzweig, *Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer*. Cell, 2010. **141**(1): p. 27-38.
37. Liu, M., et al., *Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation*. Nature, 2008. **451**(7180): p. 841-845.
38. UK, Cancer.Research., *Cancer Statistics Report*. 2013.
39. Rossi, D., *XIII. Molecular pathogenesis of transformed lymphomas*. Hematol Oncol, 2015. **33 Suppl 1**: p. 70-74.
40. Herold, *Innere Medizin 2014*. 2014, Dr. Gerd Herold: Köln. p. 990.
41. Choi, W.W., et al., *A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(17): p. 5494-5502.
42. Hans, C.P., et al., *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray*. Blood, 2004. **103**(1): p. 275-282.
43. Meyer, P.N., et al., *Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab*. J Clin Oncol, 2011. **29**(2): p. 200-207.
44. Nadler, L.M., et al., *A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin*. J Clin Invest, 1981. **67**(1): p. 134-140.

45. James A. E., et al., *Isolation and Characterization of the B-Cell Marker CD20*. *Biochemistry*, 2005. **44**(46): p. 15150-15158.
46. Salles, G., et al., *CD10/NEP Is Expressed on Thy-110W B220+ Murine B-Cell Progenitors and Functions to Regulate Stromal Cell-Dependent Lymphopoiesis*. *Blood* 1992. **80**(8): p. 2021-2029.
47. G Salles, et al., *Inhibition of CD10/neutral endopeptidase 24.11 promotes B-cell reconstitution and maturation in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(16): p. 7618-7622.
48. Siepmann, M., et al., *Casein kinase 2 dependent phosphorylation of neprilysin regulates receptor tyrosine kinase signaling to Akt*. *PLoS One*, 2010. **5**(10).
49. Coiffier, B., et al., *Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte*. *Blood* 2010. **116**: p. 2040-2045.
50. Friedberg, J.W., *Relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011. **2011**: p. 498-505.
51. Sehn, L.H., et al., *Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(22): p. 5027-33.
52. Project, T.I.N.-H.s.L.P.F., *a predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(14): p. 987-994.
53. Sehn L.H., et al., *Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(11): p. 1452-1457.
54. Shaffer, A.L., 3rd, R.M. Young, and L.M. Staudt, *Pathogenesis of human B cell lymphomas*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 565-610.
55. Rawlings, D.J., K. Sommer, and M.E. Moreno-Garcia, *The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(11): p. 799-812.
56. Lenz, G., et al., *Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(36): p. 13520-13525.
57. Shaffer, A.L., et al., *BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control*. *Immunity*, 2000. **13**(2): p. 199-212.
58. Pasqualucci, L., et al., *Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma*. *J Exp Med*, 2006. **203**(2): p. 311-317.
59. Bea, S., et al., *Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction*. *Blood* 2005. **106**(9): p. 3183-3190.
60. Pasqualucci, L., et al., *Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma*. *Blood*, 2003. **101**(8): p. 2914-2923.
61. Iqbal J, et al., *Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma*. *Leukemia*, 2007. **21**(11): p. 2332-2343.
62. Saito, M., et al., *BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(27): p. 11294-11299.
63. Ci W, et al., *The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL*. *Blood* 2009. **113**(22): p. 5536-5548.

64. Varettoni, M., et al., *Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms*. Blood, 2013. **121**(13): p. 2522-2528.
65. Wesche, H., et al., *MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 837-847.
66. Medzhitov, R., et al., *MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 253-258.
67. Lin, S.C., Y.C. Lo, and H. Wu, *Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling*. Nature, 2010. **465**(7300): p. 885-891.
68. Takeda, K. and S. Akira, *TLR signaling pathways*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 3-9.
69. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-295.
70. Ngo, V.N., et al., *Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma*. Nature, 2011. **470**(7332): p. 115-121.
71. Adachi, O., et al., *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 143-150.
72. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-122.
73. Wang, J.Q., et al., *Consequences of the recurrent MYD88(L265P) somatic mutation for B cell tolerance*. J Exp Med, 2014. **211**(3): p. 413-426.
74. Pham-Ledard, A., et al., *MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(8): p. 2118-2120.
75. Gonzalez-Aguilar, A., et al., *Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(19): p. 5203-5211.
76. Montesinos-Rongen, M., et al., *Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma*. Acta Neuropathol, 2011. **122**(6): p. 791-792.
77. Jeelall, Y., Wang, and Horikawa, *Emerging targets in human lymphoma: targeting the MYD88 mutation*. Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy, 2013: p. 53-61.
78. Puente, X.S., et al., *Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. Nature, 2011. **475**(7354): p. 101-105.
79. Treon, S.P., et al., *MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia*. N Engl J Med, 2012. **367**(9): p. 826-833.
80. Li, Z.M., et al., *MYD88 somatic mutations in MALT lymphomas*. Br J Haematol, 2012. **158**(5): p. 662-664.
81. Gachard, N., et al., *IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas*. Leukemia, 2013. **27**(1): p. 183-189.
82. Kraan, W., et al., *High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites*. Blood Cancer J, 2013. **3**: p. e139.
83. Bonzheim, I., et al., *High frequency of MYD88 mutations in vitreoretinal B-cell lymphoma: a valuable tool to improve diagnostic yield of vitreous aspirates*. Blood 2015. **126**: p. 76-79.
84. Rossi, D., et al., *The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development*. J Exp Med, 2012. **209**(9): p. 1537-1551.

85. Landgren, O. and N. Tajeja, *MYD88 and beyond: novel opportunities for diagnosis, prognosis and treatment in Waldenstrom's Macroglobulinemia*. *Leukemia*, 2014. **28**(9): p. 1799-1803.
86. Xu, L., et al., *Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenstrom's Macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance*. *Leukemia*, 2014. **28**(8): p. 1698-1704.
87. Jimenez, C., et al., *MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenstrom's macroglobulinemia*. *Leukemia*, 2013. **27**(8): p. 1722-1728.
88. Bellas, C., et al., *Immunohistochemical and molecular characteristics with prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e98169.
89. Choi, J.W., et al., *MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma*. *Hum Pathol*, 2013. **44**(7): p. 1375-1381.
90. Rovira J., et al., *MYD88 L265P mutations, but no other variants, identify a subpopulation of DLBCL patients of activated B-cell origin, extranodal involvement and poor outcome*. *Clin Cancer Res*, 2016.
91. Schraders M, et al., *Lack of Bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the BCL2 gene or by absence of the t(14;18) translocation*. *J Pathol*, 2005. **205**(3): p. 329-335.
92. Larouche, J.F., et al., *Lymphoma recurrence 5 years or later following diffuse large B-cell lymphoma: clinical characteristics and outcome*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(12): p. 2094-2100.
93. Barrans, S.L., et al., *Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma*. *Blood*, 2002. **99**(4): p. 1136-1143.
94. Janeway, C.A.J., P. Travers, and M. Walport, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Vol. 5th edition. 2001, New York: Garland Science.
95. Hurria, A. and S.M. Lichtman, *Pharmacokinetics of chemotherapy in the older patient*. *Cancer Control*, 2007. **14**(1): p. 32-43.
96. Sekine, I., et al., *Cancer chemotherapy in the elderly*. *Jpn J Clin Oncol*, 1998. **28**(8): p. 463-473.
97. Roemer, K. and M. Pfreundschuh, *How do estrogens control lymphoma?* *Blood*, 2014. **123**(13): p. 1980-1981.
98. Ott G, et al., *Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL*. *Blood* 2010. **116**(23): p. 4916-4925.
99. Trajkova, S., et al., *Immunoblastic morphology as a possible prognostic indicator for the outcome of the patients with diffuse large B cell lymphoma in era of the rituximab based treatment: single centre experience*. *Int J Res Med Sci.*, 2013. **1**(2): p. 47-52.
100. Lossos, I., *The endless complexity of lymphocyte differentiation and lymphomagenesis: IRF-4 downregulates BCL6 expression*. *Cancer Cell*, 2007. **12**(3): p. 189-191.
101. Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family: regulators of cell death*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 395-419.
102. Aukema, S.M., et al., *Double-hit B-cell lymphomas*. *Blood*, 2011. **117**(8): p. 2319-2331.
103. Dunleavy, K. and W.H. Wilson, *Differential role of BCL2 in molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(24): p. 7505-7507.
104. Scholzen T. and G. J., *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol.*, 2000. **182**(3): p. 311-322.
105. Chabot-Richards, D.S., et al., *Quantitative image analysis in the assessment of diffuse large B-cell lymphoma*. *Mod Pathol*, 2011. **24**(12): p. 1598-605.

106. Müller, C.H., B.A. Imhof, and G.A. Holländer, *Pathologie*, in *Pathologie*. 2008, Elsevier Verlag. p. 1392.
107. Huang, J., C. Meyer, and C. Zhu, *T cell antigen recognition at the cell membrane*. *Mol Immunol.*, 2012. **52**(3-4): p. 155-164.
108. Broome, H.E., et al., *Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal*. *J Immunol*, 1995. **155**(5): p. 2311-2317.
109. Quan, L., et al., *PD-1 Blockade Can Restore Functions of T-Cells in Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma In Vitro*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0136476.
110. Li Zhanga, et al., *Prognostic value of PD-1 and TIM-3 on CD3+ T cells from diffuse large B-cell lymphoma*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2015. **75**: p. 83-87.
111. Kiyasu, J., et al., *Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma*. *Blood*, 2015. **126**(19): p. 2193-2201.
112. Ott, G., A. Rosenwald, and E. Campo, *Understanding MYC driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification*. *Blood*, 2013. **122**(24): p. 3884-3891.
113. Dang, C.V., et al., *The c-Myc target gene network*. *Semin Cancer Biol*, 2006. **16**(4): p. 253-264.
114. Kim, Y., et al., *CD79B and MYD88 mutations in diffuse large B-cell lymphoma*. *Hum Pathol*, 2014. **45**(3): p. 556-564.
115. Wang, M., et al., *Ethnic variations in diagnosis, treatment, socioeconomic status, and survival in a large population-based cohort of elderly patients with non-Hodgkin lymphoma*. *Cancer*, 2008. **113**(11): p. 3231-41.
116. Shenoy, P.J., et al., *Racial differences in the presentation and outcomes of diffuse large B-cell lymphoma in the United States*. *Cancer*, 2011. **117**(11): p. 2530-40.
117. Hitz, F., et al., *Outcome of patients with primary refractory diffuse large B cell lymphoma after R-CHOP treatment*. *Ann Hematol*, 2015. **94**(11): p. 1839-1843.
118. Raut, L.S. and P.P. Chakrabarti, *Management of relapsed-refractory diffuse large B cell lymphoma*. *South Asian J Cancer*, 2014. **3**(1): p. 66-70.
119. Engelhard, M., et al., *Classification: Distinction of Centroblastic and Immunoblastic Lymphomas Subclassification of Diffuse Large B-Cell Lymphomas According to the Kiel Is a Significant Prognostic Risk Factor*. *Blood* 1997. **89**(7): p. 2291-2297.
120. Fernandez-Rodriguez, C., et al., *MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma*. *Leukemia*, 2014. **28**(10): p. 2104-2106.
121. Kane, E.V., et al., *Postmenopausal hormone therapy and non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis of InterLymph case-control studies*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(2): p. 433-441.
122. Anderson, M.A., et al., *Current challenges and novel treatment strategies in double hit lymphomas*. *Ther Adv Hematol*, 2016. **7**(1): p. 52-64.
123. Kwon, D., et al., *Clinicopathological analysis of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1 expression in the tumour microenvironments of diffuse large B cell lymphomas*. *Histopathology*, 2016. **68**(7): p. 1079-1089.
124. Sehn, L.H. and R.D. Gascoyne, *Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity*. *Blood*, 2015. **125**(1): p. 22-32.
125. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 252-64.
126. Armand, P., et al., *Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(33): p. 4199-206.

Literaturverzeichnis

127. Coutinho R, et al., *Poor Concordance among Nine Immunohistochemistry Classifiers of Cell-of-Origin for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Implications for Therapeutic Strategies*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(24): p. 6686-6695.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit der somatischen MYD88 Mutationen in B-Zellneoplasien nach [77]; Abkürzungen: CBCL: kutanes DLBCL (leg type), CLL: chronisch lymphatische Leukämie, LPL: lymphoplasmacytisches Lymphom (Waldenström's Makroglobulinämie); MZL: Marginalzonenlymphom, PCNSL: primäres Lymphom des Zentralnervensystems, VRL: Vitreoretinal diffuse large B-cell lymphoma, SMZL: Marginalzonenlymphom der Milz	12
Tabelle 2: Einteilung der Expression der verschiedenen Immunhistochemischen Marker	22
Tabelle 3: Reagenzien für die PCR zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA, Endkonzentration 25 µl, Primer-Mix: 4F/4X3 2,5µM, alle anderen 1,25µM	26
Tabelle 4: Schema für den Ablauf der PCR	26
Tabelle 5: Reagenzien für die Schmelzkurvenanalyse, konz.=Konzentration	29
Tabelle 6. Inkubationszeiten und Temperaturen für die PCR, Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse des LightCyclers 480 (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland)	30
Tabelle 7: Studienkollektiv Kenndaten - Übersicht	39
Tabelle 8: Verteilung der morphologischen Gruppen des ABC- und des GCB-Kollektivs	40
Tabelle 9: Verteilung der Expression des Transkriptionsfaktors MUM1 innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs	41
Tabelle 10: Verteilung der Expression des Transkriptionsfaktors BCL6 innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs	41
Tabelle 11: Verteilung der Expression des Transkriptionsfaktors BCL2 innerhalb des GCB- und ABC-Kollektivs	42
Tabelle 12: Verteilung der T-Zellzahl innerhalb des ABC- und GCB-Kollektivs	43
Tabelle 13: Verteilung der Proliferationsrate in Kategorien innerhalb des GCB- und ABC- Kollektivs	44
Tabelle 14: Verteilung des Transkriptionsfaktor c-MYC in Kategorien innerhalb des GCB- und ABC-Kollektivs	44
Tabelle 15: Kenndaten des ABC-Kollektivs aufgeteilt nach MYD88 ^{WT} und MYD88 ^{L265P}	46
Tabelle 16: Durchschnittsalter der Frauen und Männer der MYD88 ^{WT} - und MYD88 ^{L265P} -Gruppe mit zugehörigen p-Werten	46
Tabelle 17: Morphologie innerhalb derMYD88 ^{WT} -Gruppe und MYD88 ^{L265P} -Gruppe	47
Tabelle 18: Verteilung der Expression des Markers MUM1 aufgeteilt in Kategorien innerhalb derMYD88 ^{WT} -Gruppe und MYD88 ^{L265P} -Gruppe	48
Tabelle 19: Verteilung des Expression des Transkriptionsfaktors BCL6 in Kategorien innerhalb derMYD88 ^{WT} -Gruppe und MYD88 ^{L265P} -Gruppe	48
Tabelle 20: Verteilung des Expression des Transkriptionsfaktors BCL2 in Kategorien innerhalb der MYD88 ^{WT} -Gruppe und MYD88 ^{L265P} -Gruppe	49
Tabelle 21: Verteilung der T-Zellanzahl innerhalb der MYD88 ^{WT} -Gruppe und MYD88 ^{L265P} -Gruppe	50
Tabelle 22: Verteilung der Proliferationsrate in Kategorien innerhalb der MYD88 ^{WT} -Gruppe und MYD88 ^{L265P} -Gruppe	50
Tabelle 23: Übersicht über die Proliferationsrate aufgeteilt nach Geschlecht innerhalb der MYD88 ^{WT} - und MYD88 ^{L265P} -Gruppe, In Klammern Häufigkeit innerhalb der Untergruppe	51
Tabelle 24: Verteilung des Transkriptionsfaktors c-MYC in Kategorien innerhalb der MYD88 ^{WT} - Gruppe und MYD88 ^{L265P} -Gruppe	51

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Keimzentrumsreaktion mit der jeweiligen „Ursprungszelle“ des DLBCL., modifiziert nach [20], Rote Linien symbolisieren eine Hemmung, Blaue Linien symbolisieren eine Stimulation; MYC=myelomatosis oncogene, ATR= ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, BCL=B-cell Lymphoma, NFkB=nuclear factor kappa-light-chain-enhancer, IRF= Interferon regulatory factor, Blimp-1= B lymphocyte-induced maturation protein-1, MTA= Metastasis-associated protein, SPIB= Spi-B transcription factor, BACH= BTB and CNC homology, OCT= ornithine carbamoyltransferase, AID= activation induced Deaminase, XBP= X-box binding protein, Ig =Immunoglobulin. GCB=germinal centre B-Cell, ABC=Activated B-Cell;.....	4
Abbildung 2: Hans-Algorithmus modifiziert nach [42] und [43]	8
Abbildung 3: MYD88-Signalweg nach [75]; MyD88 aktiviert IRAK 4, welches dann IRAK1 phosphoryliert. Dadurch werden Interferone der p38 MAP-Kinase- und NF-κB-Signalweg aktiviert, Insgesamt führt dies wiederum zu einer autokrinen Sekretion der Interleukine 6 und 10 und Interferon-β.....	11
Abbildung 4: Hans-Algorithmus modifiziert nach [42] und [43]	22
Abbildung 5: FRET Schema aus Roche Real Time PCR Application Manual: A: Denaturierung der DNA-Doppelstränge; B: Anlagerungsphase: Anlagerung der Primer sowie der HypProbe Probe Sonden mit FRET und Fluoreszenzsignal, C: Elongation der DNA mit Ablösung der Fluoreszenzsonden.....	28
Abbildung 6: Fallauswahl Übersicht	33
Abbildung 7: Beispiel für MUM1 Positivität; erkennbar sind die in starker Intensität angefärbten großen Tumorzellen (Pfeil); Vergrößerung 40-fach.	34
Abbildung 8: Beispiel für CD10-Negativität; Die Tumorzellen färben sich nicht an, die positiv gefärbten Zellen stellen Fibroblasten dar (Pfeil), Vergrößerung 40-fach..	35
Abbildung 9: Beispielbild für BCL6 Positivität; die Intensität der Färbung ist in diesem Fall mäßig, erkennbar sind die angefärbten großen Tumorzellen, der Pfeil deutet auf eine Zelle mit BCL6-Expression Vergrößerung 40-fach.....	35
Abbildung 10: Teilansicht des TMAs, immunhistochemische Färbung des Proteins MUM1, Vergrößerung 1-fach	36
Abbildung 11: TMA Immunhistochemische Färbung des Transkriptionsfaktors MUM1, positive Stanze der Pfeil deutet auf eine Tumorzelle mit positiver Färbereaktion, Vergrößerung 40-fach	37
Abbildung 12: TMA-Stanze, immunhistochemische Färbung des Proteins CD10, negative Stanze, Vergrößerung 40-fach	37
Abbildung 13: Beispiel des Nachweises einer Wildtyp- und Mutationssequenz mittels Schmelzkurvenanalyse. Sichtbar ist eine Schmelztemperatur der Proben bei 54°C. Eine weitere Schmelztemperatur der grauen Probe ist bei 64°C zu erkennen. Hier handelt es sich um eine Mutationssequenz, die unter Verwendung des LNA-Oligomers erkennbar wird.. Grün= Wildtyp, Ansatz ohne LNA-Oligomer; Hellblau= Ansatz mit LNA-Oligomer, Rot = Mutationssequenz ohne LNA-Oligomer, Grau= Mutationssequenz mit LNA-Oligomer Dunkelblau= Positivkontrolle ohne LNA-Oligomer, Türkis= Positivkontrolle mit LNA-Oligomer, Schwarz = Negativkontrolle heterozygot; 3= Negativkontrolle;	38
Abbildung 14: Verteilung der p.L265P-MYD88 Mutation (N=19) innerhalb des ABC- und des GCB-Kollektivs, Angaben in Prozent, Höhe des Balkens entspricht der Fallzahl.....	45

Erklärung zum Eigenanteil:

Ulrike Maria Wlokka

geb.am 02.09.1989

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation „Nachweis der MYD88-Mutation p.L265P bei diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen“

Sehr geehrte Damen und Herren,

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst habe und keine weiteren, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Wörtliche oder inhaltliche Stellen, die anderen Quellen entstammen, wurden als solche gekennzeichnet.

Der Tissue micro Array wurde von Frau Beschorner, einer MTA des Instituts für Pathologie erstellt. Die histologischen und immunhistochemischen Schnitte und Färbungen wurden durch die Labore des Instituts für Pathologie mit den im Material und Methoden Teil genannten Verfahren angefertigt. Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte und des TMAs erfolgte in Zusammenarbeit mit Falko Fend und Birgit Federmann.

Die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wurden gemäß der Promotionsordnung der Eberhard-Karls-Universität Tübingen uneingeschränkt eingehalten.

Ich versichere, dass Dritte keinerlei Geldwerte von mir bekommen haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde in keinem anderen, weder im Inland noch im Ausland, als diesem Promotionsverfahren eingereicht.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pathologie Tübingen, die mich bei der Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Irina Bonzheim und Birgit Federmann, ohne die diese Studie nicht fertiggestellt worden wäre.

Lebenslauf

Geburtsdatum und –ort: 02.09.1989 in Magdeburg

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung: 2000-2009 Gymnasium am Rosenberg in Oberndorf,
Abitur (Note 1,0)

Studium: 10/2009-05/2016 Studium der Medizin, Universität
Tübingen, Gesamtnote 1,66
Approbation: 31.05.2016

Famulaturen: 1.3.2012-31.3.2012 Famulatur Plastische Chirurgie,
München Klinikum Bogenhausen
27.8.2012- 16.9.2012 Famulatur Anästhesie,
Diako-Krankenhaus Bremen
17.09.2012-13.10.2012 Famulatur Gynäkologie,
Klinikum Bremen Nord
01.03.2013 – 05.04.2013 Famulatur Radiologie
Universitätsklinik Tübingen
02.08.2013- 16.08.2013 Famulatur Pathologie
Institut für Pathologie Tübingen
03.03.2014-16.03.2014 Famulatur Oncology,
Beatson West of Scotland Cancer Centre. Glasgow
31.03.2014-03.08.2015 Famulaturen in
- Infectious diseases, Gastroenterology, Neurology,
Nephrology, Dermatology, Princess Alexandra
Hospital, Brisbane, Australien

Praktisches Jahr

1. Terial Chirurgie – Universitätsklinikum Tübingen
2. Terial Dermatologie – Universitätsklinikum Tübingen
3. Terial Innere Medizin – Universitätsklinikum Tübingen

Bisherige Stellen: Assistenzärztin, Universitätsklinik Bonn

Doktorarbeit: Nachweis der MYD88-Mutation p.L265P in diffus
großzelligen B-Zell-Lymphomen;
Disputation 27.06.17, Institut für Pathologie Tübingen