

Aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck

Direktor: Professor Dr. med. A.C. Feller

**Einfluss von BCL6-Translokationen auf Phänotyp und
microRNA-Expressionsprofile von follikulären Lymphomen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Wiebke Gollub
aus Schwerin

Lübeck 2013

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christoph Thorns

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2013

Zum Druck genehmigt Lübeck, den: 01.07.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1. Einteilung und Epidemiologie.....	4
1.2. Graduierung follikulärer Lymphome.....	5
1.3. Molekulare Merkmale follikulärer Lymphome.....	5
1.4. BCL6	6
1.5. Klinische Aspekte follikulärer Lymphome.....	7
1.6. MicroRNAs.....	8
2. Fragestellung.....	10
3. Material und Methoden.....	11
3.1. Patientenproben.....	11
3.2. Charakteristika der Patienten/innen	11
3.3. Morphologie.....	12
3.4. Immunhistochemie.....	13
3.5. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	15
3.6. MicroRNA-Signaturen.....	16
3.7. Statistik.....	17
4. Ergebnisse.....	18
4.1. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	18
4.2. Charakteristika der Patienten mit BCL6 positiven follikulären Lymphomen.....	21
4.3. Morphologische Analysen BCL6 positiver follikulärer Lymphome.....	23
4.4. Immunhistochemische Analysen BCL6 positiver follikulärer Lymphome.....	28
4.5. MicroRNA-Signaturen.....	35
4.5.1. Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von typischen FL (REF) und BCL6- translozierten follikulären Lymphomen (BCL6+).....	36
4.5.2. Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Referenzlymphomen und BCL6- translozierten FL ohne Translokation t(14;18).....	37
4.5.3. MiRNA-Expressionsprofile BCL6 positiver follikulärer Lymphome mit und ohne Translokation t (14;18) im Vergleich.....	38
5. Diskussion.....	43
5.1. Morphologische und immunhistochemische Eigenschaften BCL6 positiver follikulärer Lymphome	44
5.2. MicroRNA-Expressionsprofile BCL6 positiver FL.....	45
6. Zusammenfassung	51
7. Abkürzungsverzeichnis.....	52
8. Literaturverzeichnis.....	54

9. Anhänge.....	71
10. Abbildungsverzeichnis.....	79
11. Tabellenverzeichnis.....	81
12. Danksagung.....	83
13. Lebenslauf.....	84
14. Publikation.....	85

1. Einleitung

1.1. Einteilung und Epidemiologie

Unter Lymphomen versteht man Neoplasien des lymphatischen Gewebes. Generell lassen sich Hodgkin- und Non-Hodgkin Lymphome unterscheiden. Lymphome werden derzeit nach der gültigen Klassifikation der World Health Organization (WHO) eingeteilt. Diese basiert auf den Grundlagen der „Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms“ (REAL-Klassifikation) der „International Lymphoma Study Group“ (ILSG) (Harris 1994) und berücksichtigt morphologische, immunhistochemische, genetische sowie klinische Charakteristika.

Non-Hodgkin Lymphome werden anhand ihrer Linienzugehörigkeit in B-Zelllymphome einerseits und T- bzw. NK-Zelllymphome andererseits unterteilt. Weiterhin wird zwischen Lymphomen differenziert, die von reifen und unreifen Ursprungszellen ausgehen. Bezüglich der B-Zelllymphome lassen sich somit Tumore unterscheiden, die von naiven, intragerminalen oder postgerminalen B-Zellen abstammen. Bei follikulären Lymphomen handelt es sich um eine Neoplasie von Keimzentrums-B-Zellen (Tosi 1984).

Maligne Lymphome sind bezogen auf alle Malignome eine relativ seltene Erkrankung. Insgesamt machen sie circa 4% aller diagnostizierten malignen Tumore aus. Die Zahl der B-Zelllymphome nimmt weltweit zu (Stewart 2003), dabei ist die Inzidenz der Non-Hodgkin Lymphome (NHL) im Gegensatz zu den Hodgkin Lymphomen ansteigend (Vose 2002). Die Inzidenz der NHL liegt derzeit bei etwa 10 bis 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr. Als Ursache für die steigende Inzidenz der Non-Hodgkin Lymphome kommen Umweltfaktoren, Immunsuppressiva oder Infektionen mit HIV in Betracht (Grulich 2005, Morton 2005, Besson 2006, Chiu 2006, deSanjosé 2006).

Unter den Non-Hodgkin Lymphomen sind die follikulären Lymphome (FL) mit einem Anteil von 22% nach den diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (31%) am zweithäufigsten (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997). FL machen circa 20% aller Lymphome aus (WHO 4. Auflage 2008) und sind in den westlichen europäischen Staaten und den USA häufiger als in Osteuropa, Asien und den Entwicklungsländern (Anderson 1998).

1.2. Graduierung folliculärer Lymphome

Nach der WHO werden folliculäre Lymphome in 3 Grade unterteilt, wobei sich weiterhin ein Grad 3a und ein Grad 3b differenzieren lassen. Ausschlaggebend für die Graduierung ist die Anzahl an Zentroblasten pro high power field (1 hpf = 0,159 mm²):

Grad 1: 0-5 Zentroblasten/hpf

Grad 2: 5-15 Zentroblasten/hpf

Grad3: >15 Zentroblasten/hpf

Grad 3a: Zentrozyten nachweisbar

Grad 3b: geschlossene Zentroblastenrasen

1.3. Molekulare Merkmale folliculärer Lymphome

Der typische genetische Defekt bei folliculären Lymphomen ist die Translokation t(14;18) (Yunis 1982), wobei die Bruchstellen hauptsächlich an 2 Orten auf Chromosom 18, der major break point region oder der minor cluster region, liegen (Cleary 1986a, Klefstrom 1994, Nambiar 2012). Angaben zu Häufigkeit der Translokation t(14;18) variieren in der Literatur und sind unter anderem abhängig von der Detektionsmethode und zeigen außerdem geographische Unterschiede. Die Translokation t(14;18) findet sich bei circa 70 - 90% der folliculären Lymphome (Yunis 1982, Cleary 1986b, Albinger-Hegyi 2002, Aster 2002, Leich 2011). Dadurch gelangt das BCL2-Protoonkogen auf Chromosom 18 unter die Kontrolle der Promotorsequenz des Immunglobulin-Schwerketten-Gens auf Chromosom 14 (Cleary 1985, Tsujimoto 1985). Daraus resultiert eine Überexpression des antiapoptotisch wirkenden bcl2-Proteins (Vaux 1988, Hockenbery 1990, McDonnell 1991). Jedoch kann die Translokation t(14;18) auch bei gesunden Menschen gefunden werden und ist allein zur Kanzerogenese bei folliculären Lymphomen nicht ausreichend (Limpens 1995, Schüler 2003, Bende 2007).

Auch dem Mikromilieu, bestehend aus Makrophagen, folliculären dendritischen Retikulumzellen, T-Zellen und anderen Stromazellen kommt zu Beginn eine große Bedeutung bei der Lymphomentwicklung zu (Küppers 2004, de Jong 2005, Park 2005). Sekundäre, proliferationsfördernde Aberrationen sind notwendig zur Entstehung eines folliculären Lymphoms (Horsman 2001, Viardot 2002, Bende 2007). Durchschnittlich sind sechs bis acht weitere Alterationen zu finden, dabei steigt mit zunehmender Zahl der Defekte auch der histologische Grad oder es kommt zur Transformation eines folliculären

Lymphoms (Yunis 1987, Horsman 2001, de Jong 2005). Bis zu 60% aller follikulären Lymphome transformieren im weiteren Krankheitsverlauf in ein diffuses großzelliger B-Zell Lymphome (DLBCL) (Wang 2011). Bei aggressiven Verläufen mit Transformation sind beispielsweise C-MYC Translokationen, TP53 Mutationen oder Translokationen des BCL6-Gens anzutreffen (Christie 2008, O'Shea 2008, Salaverria 2011, Slack 2011).

1.4. BCL6

Das BCL6-Gen liegt auf Chromosom 3q27 und kodiert für einen Transkriptionsrepressor, der die Funktion von Lymphozyten inklusive Keimzentrums-B-Zellen reguliert und in den B-Zellen des Keimzentrums hoch exprimiert wird (Kerckaert 1993, Otsuki 1995, Allman 1996, Staudt 1999, Gu 2009). Das bcl6-Protein bindet über seine C-terminale Zinkfingerdomäne an spezifische DNA-Sequenzen, die sich in der Promotorregion von Zielgenen befinden und an anderen Domänen, die zu einer Repression der Transkription führen (Chang 1996).

Rearrangements des BCL6-Gens sind bei Non-Hodgkin Lymphomen häufig und betreffen bis zu 40% aller DLBCL und 5-15% aller follikulären Lymphome (Bastard 1994, Cattoretti 1995, Otsuki 1995). Dabei wird das BCL6-Gen nicht ausschließlich in Regionen verlagert, die unter der Kontrolle des Immunglobulin-Promotors stehen, sondern auch auf andere Regionen und Chromosomen (Bastard 1994, Akasaka 2000). Bisher sind über zwanzig verschiedene Translokationspartner bekannt, wodurch das BCL6-Gen unter den Einfluss des Promotors des jeweiligen Partners gerät (Ye 1995, Ohno 1997). Die Struktur des bcl6-Proteins wird durch die Translokation nicht beeinträchtigt (Ye 1993). Beschriebene Bruchregionen des BCL6-Gens auf Chromosom 3 sind die major breakpoint region (MBR) und die alternative breakpoint region (ABR), wobei FL ohne gleichzeitige Translokation t(14;18) öfter ein Rearrangement am alternativen Bruchpunkt von BCL6 zeigen als Fälle bei denen Aberrationen am BCL2- und BCL6-Gen koexistieren (Gu 2009).

Im Tierexperiment kam es bei Mäusen mit einem fehlerhaften bcl6-Protein zu einer gestörten Proliferation follikulärer B-Zellen und einer mangelhaften Keimzentrumsformation (Ye 1997). Versuche an Mäusen, in denen eine BCL6-Translokation induziert wurde, haben eine onkogene Wirkung bestätigt (Jardin 2007). Phan et al. zeigten, dass bcl6 die Transkription des Tumorsuppressorgens TP53 hemmt und TP53 in Keimzentrums-B-Zellen, in denen eine hohe Expression von bcl6 vorliegt,

nicht exprimiert wird (Phan 2004). Guo et al. konnten dies 2007 durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bestätigen (Guo 2007). Die Beziehung zwischen einer Translokation des BCL6-Gens und der Expression des bcl6-Proteins ist jedoch noch nicht geklärt (Guo 2005). Die Funktionen des bcl6-Proteins in vivo sind nur teilweise bekannt. Das bcl6-Protein kann an über 4000 Promotorsequenzen binden. In Keimzentrums-B-Zellen wird jedoch nicht die Transkription all dieser Gene unterdrückt, sondern von 1207 Genen. Die Gene, deren Transkription das bcl6-Protein hemmt, spielen eine Rolle bei der T-Zell vermittelten B-Zell-Aktivierung, dem Zellüberleben und der Apoptose, der Antwort auf DNA-Schäden, den Interferon- und Zytokinsignalwegen, der Modulation der Signalwege von Toll-like Rezeptoren, dem Zellzyklusarrest und der Differenzierung (Basso 2010).

Die Bedeutung einer BCL6-Translokation für den klinischen Verlauf und die Prognose wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert. Jardin et al. haben zwar einen Subtyp von FL ohne t(14;18) und mit BCL6-Translokation mit morphologischen Besonderheiten beschrieben, diese hatten jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Jardin 2002). Akasaka et al. beschrieben im Jahr 2003, dass es bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose Rearrangements des BCL6-Gens aufwiesen, im Vergleich zu einem unselektionierten Kollektiv im beobachteten weiteren Krankheitsverlauf signifikant öfter zu Transformationen zum DLBCL kam (Akasaka 2003). Die Transformation follikulärer Lymphome zu aggressiveren Formen geht im Allgemeinen mit schlechten Therapieergebnissen und frühen Todesereignissen einher (Lossos 2011). Mehrere Studien legen nahe, dass es sich bei follikulären Lymphomen Grad 3 um eine heterogene Gruppe handelt und BCL6-Translokationen vorrangig mit höhergradigen Tumoren einhergehen. So sind follikuläre Lymphome Grad 3a hauptsächlich t(14;18) transloziert, während Grad 3b-Tumore selten BCL2 transloziert sind und vornehmlich BCL6-Rearrangements aufweisen (Ott 2002, Bosga-Bouwer 2003, Katzenberger 2004). Bastard et al. konnten jedoch keinen Einfluss einer BCL6-Aberration auf den klinischen Verlauf feststellen (Bastard 1994).

1.5. Klinische Aspekte follikulärer Lymphome

Betroffen sind vor allem ältere Patienten. Das mediane Patientenalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt bei 63 Jahren (Swenson 2005), die mediane Überlebenszeit ab Diagnose bei ungefähr 10 Jahren (Bachy 2010). Follikuläre Lymphome wachsen langsam und sind in der Regel indolent, wobei der klinische Verlauf variieren kann (Hitz 2011).

Auch ein Übergang in aggressivere Verlaufsformen ist möglich und prognostisch ungünstig (Salles 2007, Freedman 2005, Yuen 1995). Bei der Mehrheit der Patienten (80-85%) liegt bei Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium (Stadium Stadium III oder IV nach Ann-Arbor) vor (Hiddemann 2005). Die Therapie geht stadien- und symptomadaptiert von einer watch and wait Strategie über Radiatio bis zur Immunochemotherapie und hat sich insbesondere seit Einführung monoklonaler Antikörper gegen CD20 verbessert (Hiddemann 2005, Bonnet 2009, Bachy 2010, Giné 2010, Hitz 2011, Prochazka 2011, Vidal 2011, Forero-Torres 2012).

1.6. MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind sehr kleine, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von 19-25 Nukleotiden (Meng 2008). Die erste microRNA, *lin-4*, wurde 1993 von Lee et al. und Wightman et al. in *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Lee 1993, Wightman 1993). In diversen Organismen, darunter Pflanzen, Würmern, Fliegen und Viren, wurden tausende von microRNAs klassifiziert. Viele davon sind hoch konserviert (Griffiths-Jones 2006).

Derzeit (Stand November 2012) sind 1600 humane microRNAs bekannt und sequenziert (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa). Dabei kann eine micro-RNA hunderte von Genen beeinflussen und man geht davon aus, dass beim Menschen bis zu 30% aller Gene der Regulation durch microRNAs unterliegen (Lewis 2005). MicroRNAs regulieren die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene durch meist vollständig komplementäre Bindungssequenzen zur Ziel-mRNA (Enright 2003). Eine Bindung an die 3'UTR des Transkripts führt zur Hemmung der Translation der mRNA (Stark 2005). Dabei wird entweder die Initiation der Translation, die Elongation oder die Stabilität des Transkripts gestört (Pillai 2005, Wu 2006, Cowland 2007). MiRNAs kontrollieren so eine Reihe von Vorgängen wie Zelldifferenzierung und -proliferation, Hämatopoiese, Organentwicklung, Apoptose und Tumorentwicklung (Kim 2005).

Durch MicroRNA-Expressionsprofile können die Ursprungsgewebe vieler Tumore voneinander differenziert werden und außerdem können miRNAs dazu genutzt werden, verschiedene Entwicklungsstufen einer Zelllinie zu unterscheiden (Lu 2005). In einer Vielzahl von Gewebstypen ist festgestellt worden, dass sich Expressionslevel von microRNAs zwischen dem gesunden Gewebe und Tumorgewebe unterscheiden, beispielsweise bei Lymphomen, Mamma-, Prostata-, Lungen-, Pankreas- und kolorektalen

Karzinomen. Dabei können die microRNAs in den Tumorzellen verglichen mit dem jeweiligen normalen Gewebe sowohl hoch- als auch herunterreguliert sein, wobei eine Herabregulierung in den meisten Malignomen überwiegt (Calin 2006, Ling 2011). In den letzten Jahren gelangten microRNAs mehr und mehr in den Blickpunkt der Forschung und sind auch im Bereich der Hämatologie untersucht worden. So konnten veränderte microRNA-Expressionsmuster bereits bei mehreren B-Zell-Malignomen wie dem DLBCL, der B-CLL und dem Plasmozytom festgestellt werden (Calin 2005, Lawrie 2007, Lawrie 2009, Zhou 2010). Über MicroRNA-Profile bei follikulären Lymphomen ist bislang wenig erforscht. Bisher identifizierten Roehle et al. und Wang et al. microRNA-Signaturen bei follikulären Lymphomen (Roehle 2008, Wang 2012).

2. Fragestellung

In den westlichen Industrieländern steht das follikuläre Lymphom an Platz zwei der häufigsten Lymphomentitäten. Morphologische und genetische Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich bei follikulären Lymphomen um eine heterogene Entität handelt. Die charakteristische und häufigste Translokation bei follikulären Lymphomen ist die t(14;18), bei der das BCL2-Gen auf Chromosom 18q2 in die Nähe des IgH-Locus auf Chromosom 14q32 verlagert wird, und unter den Einfluss von Promotorsequenzen des IgH-Locus gerät. Dies führt zu einer Überexpression des antiapoptotischen bcl2-Proteins. Weitere Aberrationen können den BCL6-Genlocus auf Chromosom 3q27 betreffen. BCL6 ist ein Protoonkogen und kodiert für einen Transkriptionsrepressor. Ziel dieser Studie war es, Unterschiede zwischen BCL6-translozierten follikulären Lymphomen und einer Referenzgruppe aus typischen follikulären Lymphomen (BCL2+/BCL6-, Grad 1 oder 2 FL (low grade), Anteil mit diffusem Wachstumsmuster <30% der Gesamttumorfläche) auf microRNA-Ebene zu beschreiben. Außerdem sollte geprüft werden, ob mittels des microRNA-Status Rückschlüsse auf morphologische, immunhistochemische und molekulare Eigenschaften follikulärer Lymphome gezogen werden können. Als Grundlage für diese Untersuchung diene der bereits publizierte Datensatz zu 102 follikulären Lymphomen vor Beginn einer Therapie (Gollub 2009, Thorns 2009).

3. Material und Methoden

3.1. Patientenproben

Bei dieser Untersuchung handelte es sich um eine Subgruppenanalyse, in der die Fälle aller in 2005 und 2006 im Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck erstmalig diagnostizierten FL mit Bruchereignis im BCL6-Gen mit klassischen FL verglichen wurden. Die Grundlage hierfür bildete der publizierte Datensatz von 102 follikulären Lymphomen (Gollub 2009, Thorns 2009).

Die Gruppe der follikulären Lymphome mit Rearrangements am BCL6-Genlocus bestand aus insgesamt 15 Fällen (im Folgenden wird diese Gruppe auch als BCL6+ bezeichnet). Diese Fälle wurden mit einer Referenzgruppe (REF) von typischen FL hinsichtlich morphologischer und immunhistochemischer Merkmale sowie des microRNA-Expressionsprofils verglichen. Die Referenzgruppe beinhaltete alle 14 Fälle mit folgenden Eigenschaften:

- Durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bestätigte Translokation des BCL2-Gens ohne simultane BCL6-Translokation (BCL2+/BCL6-)
- Grad 1 oder 2 FL
- Flächenanteil mit diffusem Wachstumsmuster < 30% der Gesamttumorfläche

3.2. Charakteristika der Patienten/innen

Die Geschlechterverteilung der 102 Patienten/innen war mit 1:1,2 (m:w) ungefähr gleichmäßig. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug das mittlere Alter 58 Jahre (25 bis 86 Jahre). Bei 78 Fällen handelte es sich um Lymphknotenbiopsate, bei 10 Fällen um extranodale Exstirpate und 14 Fälle konnten nicht sicher einer Lokalisation zugeordnet werden. Die häufigsten Biopsate wurden cervical (n=29), inguinal (n=22) und axillär (n=13) entnommen. Klinische Angaben (wie z.B. Blutbild, B-Symptomatik, Hepatosplenomegalie) lagen zu keinem der Fälle vor. Eine Anzeige bei der Ethikkommission wurde eingereicht.

3.3. Morphologie

Die morphologischen Beurteilungen erfolgten anhand von Haematoxylin-Eosin-, Giemsa- und PAS-gefärbten Präparaten sowie Versilberungstechniken. Alle Färbungen wurden von Mitarbeitern/innen des Labors für hämatologische Diagnostik des Instituts für Pathologie in Lübeck angefertigt.

Folgende morphologische Parameter wurden von 3 Untersuchern (C.Thorns, B. Stassek, W. Gollub) erfasst und standardisiert dokumentiert (wie bereits beschrieben von Thorns 2009 und Gollub 2009) :

Morphologisches Merkmal	Auswertemodus	Kommentar
Grad	Grad 1	-Graduierung anhand der Kriterien der WHO-Klassifikation von 2001 -Falls unterschiedliche Grade nebeneinander vorlagen, wurden ein primärer (vorherrschender) und ein sekundärer Grad notiert
	Grad 2	
	Grad 3a	
	Grad 3b	
	t-FL	
Wachstumsmuster	Follikulär	-Angabe des Flächenanteils mit diffusem Wachstumsmuster prozentual bezogen auf die Gesamttumorfläche
	Diffus	
Sklerosierung	Geringe Ausprägung	
	Mittelstarke Ausprägung	
	Starke Ausprägung	
Lymphknotenkapsel-infiltration	Vorhanden	
	Nicht vorhanden	
Knochenmarksbefall	Herdförmig -peritrabekulär -interstitiell	-Angabe des Infiltrationsgrades bezogen auf: - die Fläche in % - die Gesamtzellularität in %
	Diffus	
	Herdförmig und diffus	
Marginalzonen-differenzierung	Vorhanden	
	Nicht vorhanden	

Tabelle 1: Untersuchte morphologische Eigenschaften und verwendete Auswertemodi bei der Analyse von 102 follikulären Lymphomen.

3.4. Immunhistochemie

Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden mit dem TechMate™-Automaten von DAKO (Dänemark) durchgeführt. Die Antigendemaskierung erfolgte mittels Hitzevorbehandlungen in der Mikrowelle, im Dampfgarer und im Dampftopf mit Puffern verschiedener pH-Werte (pH 6,1 und pH 9,5, Tab. 2). Außerdem diente Trypsin der enzymatischen Antigendemaskierung. Antikörper gegen folgende Epitope wurden angewendet: CD20, CD3, CD4, CD8, CD68, CD23, CD10, bcl2, bcl6, IgD, Ki-67, Kappa und Lambda (Tab. 2).

Antikörper	Firma	Klon	Verdünnung	Antigendemaskierung
CD20	Lab Vision ¹	L26	1:200	Dampftopf (pH 6,1)
CD3	Lab Vision ¹	SP7	1:200	Dampfgarer (pH 9,5)
CD4	Lab Vision ¹	4B12	1:50	Dampfgarer (pH 9,5)
CD8	Lab Vision ¹	BC/1A5	1:50	Dampfgarer (pH 9,5)
CD68	Lab Vision ¹	PGM-1	1:30	Dampftopf (pH 6,1)
CD23	Lab Vision ¹	SP23	1:100	Dampftopf (pH 6,1)
CD10	Menarini ²	56C6	1:30	Dampfgarer (pH 9,5)
bcl6	Lab Vision ¹	GI191/EA8	1:100	Mikrowelle (pH 6,1)
bcl2	Lab Vision ¹	100/D5	1:100	Dampftopf (pH 6,1)
IgD	Dako ³	Polyklonal	1:50	Enzymatisch
Ki-67	Dako ³	MIB-1	1:200	Dampftopf (pH 6,1)
Kappa	Dako ³	Polyklonal	1:20000	Dampfgarer (pH 9,5)
Lambda	Dako ³	Polyklonal	1:20000	Dampfgarer (pH 9,5)

Tabelle 2: Bei der Immunhistochemie eingesetzte Antikörper mit Verdünnung und Methoden der Antigendemaskierung; 1 Lab Vision, Thermo Fisher Scientific Inc., Fremont, CA, USA; 2 A. Menarini Diagnostics, Berlin, Deutschland; 3 Dako, Glostrup, Dänemark; Tabelle in abgewandelter Form übernommen aus Thorns 2009.

Die immunhistochemischen Reaktionen wurden nach einem standardisierten Schema ausgewertet, welches in ähnlicher Art schon in vorausgegangenen Studien benutzt wurde (deJong 2007, 2008, Thorns 2007, 2008). Der Auswertemodus (siehe Tab. 3) der immunhistochemischen Analysen entspricht den bereits publizierten Angaben von Thorns 2009 und Gollub 2009. Er wird dort ausführlich beschrieben.

Antikörper	Auswertemodus	Kommentar
CD20	Positiv	
	Negativ	
CD3, CD4, CD8, CD68	Anteil der positiven Zellen in 5% Schritten	
	Verteilungsmuster: diffus, perifollikulär oder intrafollikulär	
CD23	FDC-Netze: keine, wenig, mäßig, kräftig	Negativ: < 30% der Tumorzellen markiert Partiell positiv: > 30% der Tumorzellen markiert Positiv: > 70% der Tumorzellen markiert
	Tumorzellen: negativ, partiell positiv, positiv	
CD10, bcl6, bcl2	Negativ	
	Schwach positiv	
	Stark positiv	
IgD	Prozentsatz der Follikel mit erhaltener Mantelzone in 10% Schritten	Eine Mantelzone wurde als erhalten gewertet, wenn ein Saum aus IgD positiven Zellen mehr als 25% der Zirkumferenz umfasste
MiB1	Mittelwert positiver Zellen in 5% Schritten	
	Anteil positiver Zellen in dem Keimzentrum mit der höchsten Proliferationsrate in 10% Schritten („hot spot“)	
Immunglobulin-Leichtketten Kappa, Lambda	Negativ	
	Positiv	
	Sekretorische Differenzierung vorhanden/nicht vorhanden	

Tabelle 3: Verwendete Antikörper und jeweiliger Modus der Auswertung bei den Analysen von 102 follikulären Lymphomen.

3.5. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Hybridisierung beinhaltet folgende Schritte:

Hybridisierungsschritt	Vorgehensweise
Entparaaffinierung	Dreimalige Inkubation in Rotihistol (Roth 6640.1) für jeweils 5 Minuten. Spülen mit 100% Alkohol und absteigende Alkoholreihe (100%, 85%, 70%) für je 2 Minuten. Inkubation in destilliertem Wasser für 5 Minuten.
Antigendemaskierung I	Kochen im Dampftopf (Tefal Clipso) bei höchster Druckstufe für 1 min. in 1mM EDTA-Puffer (pH 8,0). Inkubation in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur für 2 min.
Antigendemaskierung II	Andauung der Präparate mittels Pepsin (15 mg Pepsin [Sigma P7012] + 1,5 ml 1 M HCl + 150 ml destilliertes Wasser) bei 37°C für 30 min.
Fixierung	Waschen in destilliertem Wasser für 2 min. Für 2 min. Fixierung in 100% Paraformaldehyd. Waschen der Präparate in destilliertem Wasser für 1 min. Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 85%, 100%) für jeweils 2 min. Lufttrocknung der Präparate vor dem Ventilator für 10 min.
Hybridisierung	Auftragen von 2 µl Sondenmix (1 µl Sonde, 2 µl steriles destilliertes Wasser, 7 µl Hybridisierungspuffer) auf das bereits markierte Areal. Versiegelung des Deckglases mit Fixogum. Denaturierung im Wasserbad bei 80°C für 30 min. Hybridisierung für 72 h bei 37°C.
Waschen	Waschen der Objektträger für 2 min. in Waschpuffer 1 (2ml 20x SSC, 300 µl Igepal [A-630 Sigma], 100 ml destilliertes Wasser) bei 73°C. Waschen der Präparate bei Raumtemperatur für 1 min. in Waschpuffer 2 (10 ml 20x SSC, 100 µl Igepal [A-630 Sigma], 100 ml destilliertes Wasser). Spülen in 2x SSC. Kerngegenfärbung mit DAPI für 7 min. Spülen mit 2x SSC. Eindeckung der Präparate mit Antifade (Vectashield mounting medium; Vektor H-1000).

Tabelle 4: Vorgehensweise bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

Alle verwendeten Sonden stammten von Abbott Molecular (Wiesbaden, Deutschland). Dabei handelte es sich um folgende Sonden:

- Dual color break apart 18q21
- LSI IGH 14q32 green, LSI BCL2 18q21 orange
- LSI BCL6 3q27
- Dual color break apart 8q24
- LSI IGH 14q32 green, MYC 8q24 orange, CEP-8 aqua

Der Aufbau der Sonden ist im Anhang in den Abbildungen 18 bis 21 dargestellt. Die Beurteilung der Hybridisierungen wurde durch drei Untersucher (C. Thorns, B. Stassek, W. Gollub) nach Dunkeladaptation an einem Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss (Axioskop) und Filtern der Firma Vysis vorgenommen. Für jeden Fall wurden pro Sonde 60 Zellkerne ausgezählt.

Die Bestimmung der Grenzwerte für die fünf Sonden, ab denen ein Biopsat als transloziert angesehen wurde, erfolgte über Testhybridisierungen an nicht-neoplastisch veränderten Tonsillengewebsproben. Diese wurden ausgewertet und der Grenzwert aus der Summe von Mittelwert und dreifacher Standardabweichung ermittelt (Ventura 2006). Dazu wurden fünf nicht-neoplastisch veränderte Fälle mit allen Sonden hybridisiert und durch die drei Untersucher unabhängig voneinander ausgewertet. Anhand oben beschriebener Methode ergaben sich folgende Grenzwerte: 10% Splitsignale für Split-Sonden und 15% Fusionssignale für Fusionssonden. Weiterhin wurden zur Detektion von Amplifikationen des BCL2- und des MYC-Gens die Normalverhältnisse von BCL2 zu IgH sowie von MYC zu CEP17 errechnet. Als Grenzwert, ab dem das BCL2- und das MYC-Gen als amplifiziert angesehen wurden, ergab sich jeweils ein Quotient von 1,2 (BCL2/IgH und MYC/CEP17).

3.6. MicroRNA-Signaturen

Für die Referenzgruppe (n=14) und die BCL6-translozierten follikulären Lymphome (n=15) wurden microRNA-Signaturen erstellt. Außerdem wurden die Daten der microRNA-Expressionsprofile von fünf nicht-neoplastisch veränderten Lymphknoten hinzugezogen. Die miRNA-Expressionssignaturen wurden wie folgt bestimmt:

Die Isolierung der gesamten RNA erfolgte aus 20 µm dicken formalinfixierten und in Paraffin gegossenen Schnittpräparaten mit dem RecoverAll Kit (Ambion, Austin, Texas, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Konzentrationen der RNA wurden mit dem NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA) gemessen. Mittels Reverser Transkriptase-Reaktion (RT) und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion konnte der miRNA-Gehalt der Proben quantifiziert werden. Aus der Gesamt-RNA wurde die cDNA mit miRNA-spezifischen „stem-loop“-Primern den Herstellerangaben (PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA) entsprechend synthetisiert. Jede RT-Reaktion enthielt 10 ng Gesamt-RNA, 3 µl „stem-loop“-Primer, 1,5 µl RT-Puffer (10fach), 0,15 µl dNTPs (100 mM), 1 µl MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/µl), 0,188 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl) (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, PE Applied Biosystems) und 4,162 µl nukleasefreies Wasser (Ambion, Austin, Texas, USA). Die Reaktion wurde mit einem T1-Thermocycler (Biometra, Göttingen) in einem 96er Plattenformat in folgender Weise inkubiert: 30 Minuten bei 16°C, 30 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 85°C, anschließend Kühlung auf 4°C. Die qPCR wurde wie folgt durchgeführt: 1,33 µl cDNA (1:15 verdünnt), 1x TaqMan Universal PCR Mastermix und 2 µl Primer- und Sondenmix nach dem TaqMan MicroRNA Assay-Protokoll (PE Applied Biosystems). Die Reaktion wurde mit dem LightCycler® 480 (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt.

3.7. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden der exakte Test nach Fischer sowie der Mann-Whitney-U-Test mit SPSS verwendet. Falls nicht anders angegeben, bezieht sich der jeweils angegebene p-Wert auf die 2-seitige Signifikanz des exakten Tests nach Fischer. Das Signifikanzniveau wurde auf einen Wert von $\alpha=5\%$ festgesetzt. Eine Beratung zur Auswahl der verwendeten statistischen Verfahren erfolgte durch Frau Silke Szymczak aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität Lübeck. Die Expressionsstärke einzelner miRNAs wurde anhand des Gesamtgehalts aller untersuchten miRNAs normalisiert. Es wurde keine α -Adjustierung nach Bonferroni (Bland 2005) durchgeführt, da es sich hier um eine Untersuchung mit stark explorativem Ansatz handelte. Die Clusteranalysen der microRNA-Signaturen wurden mit der Software Cluster 3.0 von Michael Eisen (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) angefertigt. Um die Expression der einzelnen miRNAs in BCL6-positiven und -negativen folliculären Lymphomen zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet.

4. Ergebnisse

Alle morphologischen und immunhistochemischen Parameter wurden in einem Konsensusverfahren von 3 Begutachtern (C. Thorns, B. Stassek, W. Gollub) bestimmt. Die Morphologie wurde anhand von Haematoxilin-Eosin und Giemsa gefärbten Präparaten sowie von Versilberungen zur Beurteilung des Wachstumsmusters analysiert.

Um die morphologischen und immunhistochemischen Besonderheiten von follikulären Lymphomen mit Translokation des BCL6-Genlocus ermitteln zu können, wurden nach Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zwei Gruppen gebildet. Dafür wurden aus den insgesamt 102 follikulären Lymphomen zunächst alle Fälle ausgewählt, bei denen durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ein Rearrangement des BCL6-Gens nachgewiesen werden konnte. Diese Gruppe wird im Weiteren auch als BCL6+ abgekürzt und beinhaltet 15 Fälle. Als Vergleichsgruppe dienten 14 Fälle von typischen follikulären Lymphomen, die folgende Voraussetzungen erfüllen mussten: BCL2+/BCL6-, Grad 1 oder 2 FL (low grade), Anteil mit diffusem Wachstumsmuster <30% der Gesamttumorfläche. Im Weiteren wird diese Gruppe auch als REF (Referenzgruppe) bezeichnet.

4.1. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von 102 follikulären Lymphomen wurden von drei Untersuchern (C. Thorns, B. Stassek, W. Gollub) begutachtet. Bei jedem Fall wurden 60 Zellkerne ausgezählt. Der Grenzwert für die Split-Sonden lag bei 10% an Splitsignalen. Ein Fall galt als fusioniert ab 15% Fusionssignalen. Jeder grenzwertige Fall sowie jeder Fall mit einem anderen Genotyp als nur der Translokation (14;18) wurde von einem zweiten Begutachter unabhängig nochmals ausgewertet.

Eine Translokation des BCL2-Gens auf Chromosom 18q21 ist ein häufiges Merkmal bei follikulären Lymphomen und konnte auch in diesem Kollektiv oft beobachtet werden. Die BCL2-Splitsonde lagert sich centromerseitig und telomerseitig des BCL2-Gens an und ist somit geeignet, um Bruchereignisse in diesem Genort sichtbar zu machen, ohne den Translokationspartner anzuzeigen. Die Fusionssonde besteht aus zwei unterschiedlich gefärbten fluoreszenzmarkierten Sonden, die am BCL2-Gen und am IgH-Genlocus auf Chromosom 14q32 binden. Der Nachweis von Fusionssignalen belegt somit die Translokation t(14;18)(q32;q21), durch die das BCL2-Gen unter die Kontrolle des

Promotors des IgH-Locus gerät, welches in einer Überexpression des BCL2-Gens resultiert. Mit Hilfe der Sonden können außerdem Genamplifikationen oder -deletionen nachgewiesen werden.

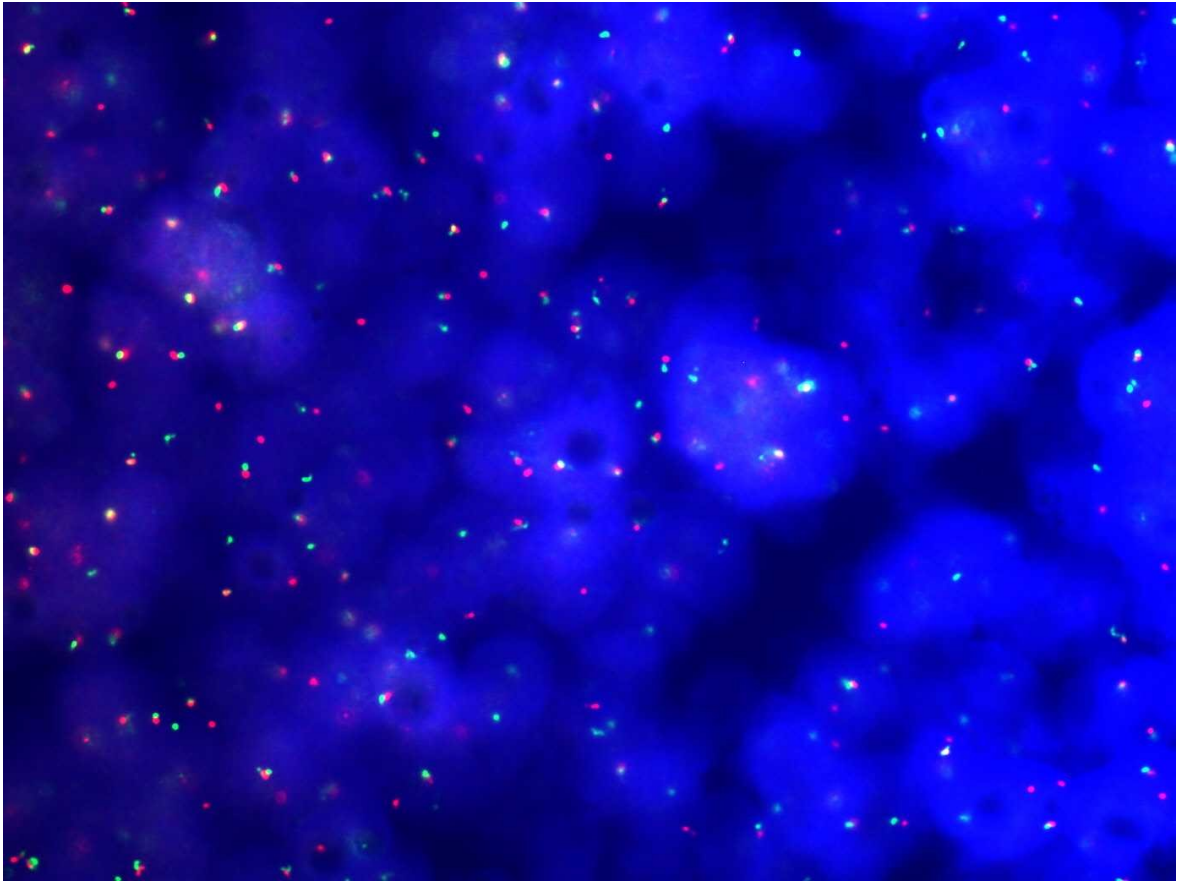


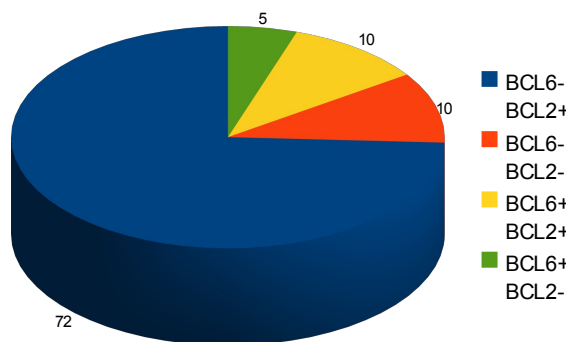
Abbildung 1: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer Bruchsonde für den BCL6-Genlocus auf Chromosom 3q27. Neben den physiologischen gelben Fusionssignalen zeigen sich vermehrt rote und grüne Einzelsignale (Splitsignale) als Ausdruck eines Bruchereignisses im BCL6-Gen.

Die Hybridisierungen der BCL2-Splitsonde waren in 97/102 Fällen auswertbar. 98 BCL2-Fusionssonden konnten beurteilt werden. Dabei gab es drei Fälle, bei denen weder zu der Splitsonde noch zu der Fusionssonde Angaben möglich waren, sodass bei insgesamt 99/102 Fällen eine Aussage über Bruchereignisse im BCL2-Genlocus möglich war. Bei den Splitsonden lag in 77/97 Fällen (79%) eine Akkumulation von atypischen Signalkonstellationen vor, welche auf ein Bruchereignis im BCL2-Gen schließen ließen. Die Fusionssonde zeigte bei 79/98 Fällen (81%) eine signifikante Anhäufung von Fusionssignalen als Ausdruck einer vorhandenen Translokation t(14;18)(q32;q21) IgH/BCL2.

Erstaunlicherweise lagen in zwei Fällen signifikant vermehrt Fusionssignale vor, ohne

dass die Splitsonden ein Bruchereignis im BCL2-Gen detektierten. In diesen Fällen war dementsprechend von einer alternativen Bruchstelle außerhalb des BCL2-Gens auszugehen. Ein Fall präsentierte sich mit signifikant vermehrten Splitsignalen ohne den Nachweis einer Translokation t(14;18) mittels der Fusionssonde. In diesem Fall war somit von einem non-IgH-Translokationspartner auszugehen. Weiterhin lagen in einem Fall signifikant vermehrt Splitsignale vor, bei dem die Fusionssonde nicht auswertbar war, wodurch der Translokationspartner nicht identifiziert werden konnte. In drei Fällen bestanden zwar regelrechte Signalanordnungen der BCL2-Splitsonde, aber es fanden sich numerische Aberrationen mit signifikant mehr BCL2- als IgH-Signalen als Hinweis auf Amplifikationen im BCL2-Locus. Im Folgenden werden alle diese Fälle als BCL2+ bezeichnet.

Insgesamt lagen zu 97 follikulären Lymphomen FISH-Daten bezüglich des molekularen BCL2- und des BCL6-Status vor. Dabei handelte es sich mehrheitlich um Fälle mit BCL2- Aberration ohne gleichzeitige Translokation des BCL6-Gens (BCL6- BCL2+, 72/97, 75%, siehe Abb.2). Auch Translokationen des BCL6-Gens waren relativ häufig. In zehn Fällen



lagen sowohl eine strukturelle oder numerische Aberration des BCL2-Gens als auch ein Bruchereignis von 3q27 vor (BCL6+ BCL2+, 10/97, 10%). Fünf BCL2- Fälle wiesen eine Translokation des BCL6-Locus auf (BCL6+ BCL2-, 5/97, 5%) während zehn Fälle weder eine BCL6- noch eine BCL2-Aberration zeigten (BCL6- BCL2-, 10/97, 10%).

Abbildung 2: Unterteilung von 97 follikulären Lymphomen, bei denen FISH-Daten zum BCL6- und zum BCL2- Genort vorlagen. Fälle bei, denen Daten zum BCL6- oder BCL2- Genlocus fehlten, wurden nicht berücksichtigt.

4.2. Charakteristika der Patienten mit BCL6 positiven follikulären Lymphomen

Bei BCL6 handelt es sich um ein Protooncogen, das für einen Transkriptionsrepressor kodiert (Ye 1997). BCL6 ist an der Ausbildung von Keimzentren beteiligt und wichtig für die Lymphozytendifferenzierung und -funktion. Das BCL6-Gen liegt auf dem Chromosom 3q27. Die in dieser Studie verwendeten Sonden binden centromer- und telomerseitig des BCL6-Gens und können so Brüche im 3q27-Genlokus sichtbar machen (siehe Abb. 21 im Anhang). Bei dieser Methode kann der Translokationspartner nicht detektiert werden.

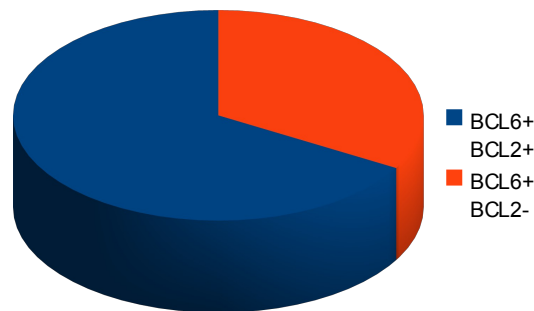


Abbildung 3: Unterteilung der BCL6 positiven follikulären Lymphome in Abhängigkeit vom BCL2-Status.

In 98/102 FL (96%) waren die Hybridisierungen der BCL6-Sonden auswertbar. Dabei wiesen insgesamt 15 Fälle ein Bruchereignis auf (BCL6+, 15%) und in 83 FL war keine Translokation des BCL6-Gens nachweisbar (BCL6-, 85%). 10 dieser BCL6-positiven Fälle (66,7%) wiesen gleichzeitig eine BCL2-Translokation auf (BCL6+/BCL2+) von denen in einem Fall gleichzeitig ein Zugewinn auf 18q21 bestand. Fünf Fälle zeigten keine Translokation t(14;18) (BCL6+/BCL2-; Abb.3). Tabelle 5 zeigt das mittlere Alter und den Anteil an Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung über 60 Jahre alt waren sowie die Relation von männlichen und weiblichen Patienten in der BCL6 positiven Gruppe und der Referenzgruppe.

Zum Vergleich sind außerdem die Daten des gesamten Studienkollektivs aufgeführt.

Parameter	BCL6+ n=15 (in%)	REF n=14 (in %)	Signifikanz* p-Wert	Gesamt- kollektiv n=102 (in %)
Alter >60 Jahre	47	43	n.s.	46
Alter (Mittelwert)	56,9	53,2	n.s. ¹	58
Geschlechterverhältnis (m:f)	1 : 1,1	1,8 : 1		1 : 1,2

*Tabelle 5: Patientenalter und Geschlechterverteilung in den Gruppen der BCL6-translozierten FL, der Referenzfälle (REF) und aller 102 untersuchten FL. ¹U-Test. *Signifikanz und p-Wert beziehen sich nur auf den Vergleich zwischen BCL6 positiven Fällen und der Referenzgruppe. n.s.: nicht signifikant ($p > 0,05$).*

Geschlechterverhältnis:

In der Referenzgruppe lag der Anteil an Männern mit 64,3% höher als bei den BCL6+ Patienten (46,7% männliche Patienten). Das Geschlechterverhältnis lag in der BCL6+ Gruppe bei 1:1,1 (m: f) und ähnelte darin sehr der Verteilung im gesamten Kollektiv (1:1,2 m:f). In der Referenzgruppe betrug das Geschlechterverhältnis 1,8: 1 (m:f).

Altersverteilung:

Die 15 BCL6+ FL waren in ihrer Altersverteilung den typischen FL der Referenzgruppe ähnlich. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug bei den BCL6+ Patienten 56,3 Jahre. Die Patienten, deren Lymphome in die Kategorie der typischen follikulären Lymphome gehörten, waren im Mittel 53,2 Jahre alt. Der prozentuale Anteil an Patienten, die bei Diagnosestellung älter als 60 Jahre alt waren, lag in der BCL6+ Gruppe bei 47% und in der Referenzgruppe bei 43%. Weder das durchschnittliche Alter noch der Prozentsatz an Patienten, die älter als 60 Jahre waren, unterschieden sich bei den zwei Gruppen signifikant und waren ebenfalls vergleichbar mit dem Gesamtkollektiv.

4.3. Morphologische Analysen BCL6 positiver follikulärer Lymphome

Eine Zusammenfassung der morphologischen Merkmale zeigt Tabelle 6.

Grad:

Die Graduierung aller FL erfolgte nach den Kriterien der WHO-Klassifikation von 2001: Grad 1 = 0-5 Zentroblasten/hpf, Grad 2 = 6-15 Zentroblasten/hpf, Grad 3a = > 15 Zentroblasten/hpf mit zwischengestreuten Zentrozyten, Grad 3b = Zentroblastenrasen. Ein high power field betrug laut WHO 0,159 mm² und pro Fall wurden jeweils 10 hpf ausgezählt. Wenn ein Fall mehrere Grade aufwies, wurden je ein primärer, dominierender und ein sekundärer Grad angegeben. Bezüglich aller weiteren Auswertungen wurde, soweit nicht anders angegeben, nur der höchste Grad berücksichtigt. Bei elf Fällen aus der Referenzgruppe (78,6%) war die Blastenzahl < 5/hpf und entsprachen somit Grad 1 FL. Drei Fällen (21,4%) konnte ein Grad 2 zugeordnet werden. Entsprechend den Selektionskriterien fanden sich in dieser Gruppe keine high grade Lymphome (Grad 3a, 3b oder t-FL). Sieben der 15 BCL6+ Fälle (46,7%) waren Grad 1 Tumore und in einem Fall (6,7%) war ein Grad 2 nachweisbar. Drei Fälle (20%) verfügten über mehr als 15 Zentroblasten/hpf mit zwischengelagerten Zentrozyten und entsprachen damit den Kriterien eines Grad 3a FL. Geschlossene Blastenrasen mit rein follikulärem Wachstumsmuster ohne Nachweis von Zentrozyten, entsprechend einem Grad 3b Tumor, wurden in zwei Fällen (13,3%) detektiert. In zwei weiteren Fällen fanden sich außerdem diffus verbreitete Blastenrasen und belegten somit eine Transformation in Richtung eines DLBCL. Dementsprechend gehörten 53,3% (8/15) zu den low grade Tumoren und 46,6% (7/15) zu den den high grade Lymphomen.

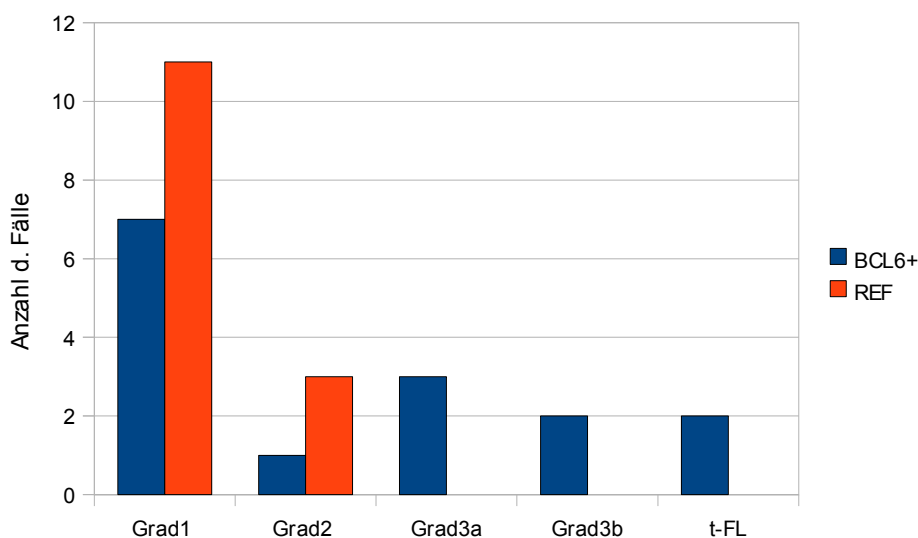


Abbildung 4: Verteilung der Grade bei BCL6+ und REF FL, es wurde jeweils nur der höchste Grad berücksichtigt.

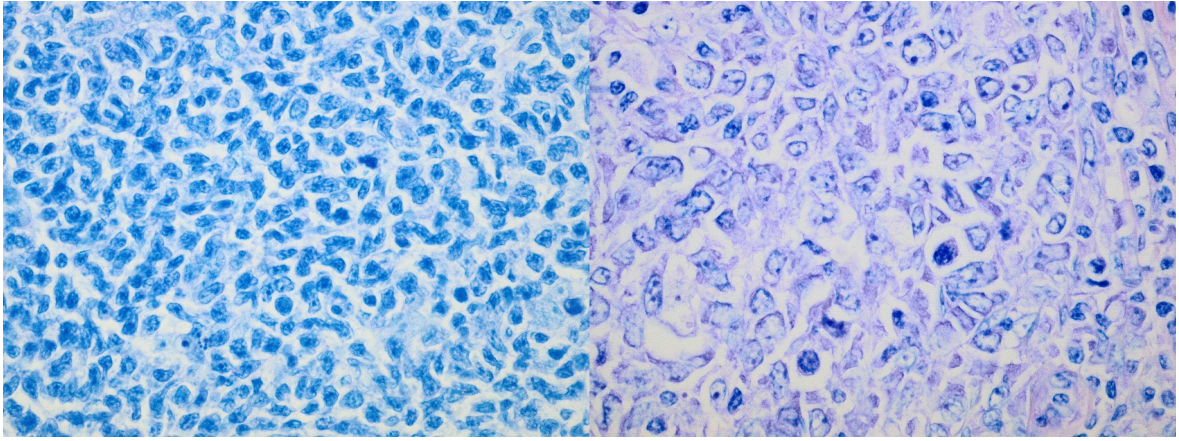


Abbildung 5: **Links:** FL Grad 1 mit überwiegend Zentrozyten und nur wenigen eingestreuten Zentroblasten. **Rechts:** FL Grad 3b mit Zentroblastenrasen. Giemsa-Färbung, Originalvergrößerung 400fach.

Tumorlokalisation:

Bei 12 von 15 BCL6 positiven Fällen (80%) war eine Kapsel nachweisbar, wodurch sie sicher als Lymphknotenbiopsien identifiziert werden konnten. In zwei Fällen handelte es sich um extranodale Biopsien und in einem Fall konnte die Lokalisation nicht zweifelsfrei zugeordnet werden. Bei dem überwiegenden Teil der Fälle in der REF handelte es sich um Lymphknotenexstirpate (12/14, 85,7%) wohingegen die Lokalisation der restlichen zwei Fälle unklar blieb.

Wachstumsmuster:

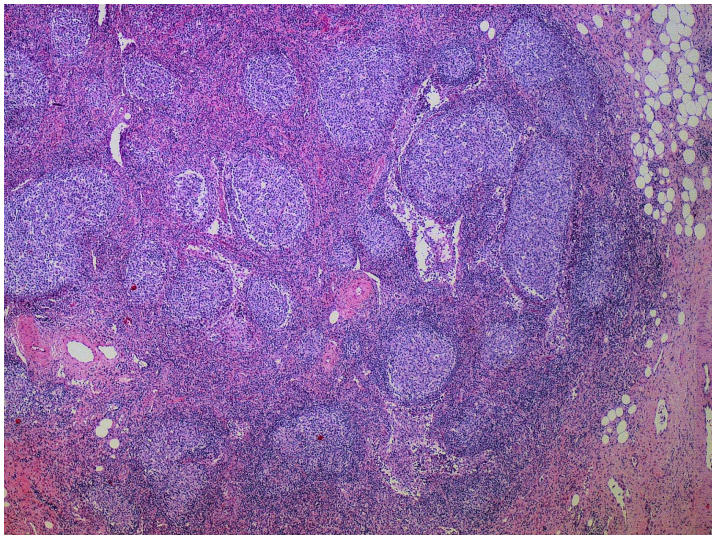


Abbildung 6: Follikuläres Wachstumsmuster. HE-Färbung, Originalvergrößerung 25fach.

Aufgrund der Selektionskriterien konnte es in der Referenzgruppe keine Fälle mit einem ausgeprägten diffusen Wachstumsmuster von über 30% der Gesamttumorfläche geben. Bei den BCL6+ Fällen war der Tumorflächenanteil mit diffusem Ausbreitungsmuster signifikant größer ($p=0,017$) und insgesamt sehr variabel. Er schwankte von 0% bis 95% mit einem mittleren diffusen Anteil

von 25,7%. Insgesamt verfügten fünf Fälle über ein diffuses Wachstum von über 30%.

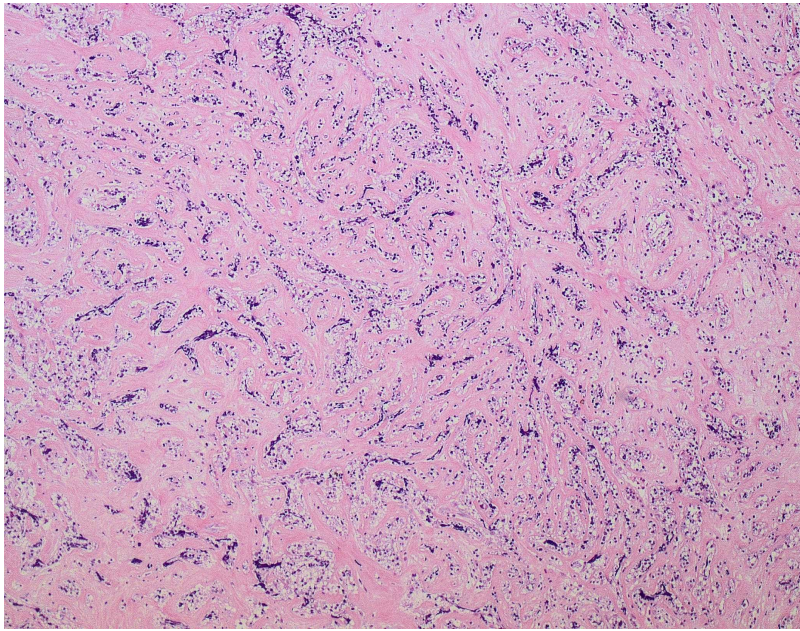


Abbildung 7: Ausgeprägte Sklerosierung innerhalb eines folliculären Lymphoms. HE-Färbung, Originalvergrößerung 25fach.

Sklerosierung:

Tumor-induziert und infolge entzündlicher Prozesse kann es im Lymphknoten zu Sklerosierungen kommen. Hinsichtlich des Vorkommens einer Sklerose fanden sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen. Eine Sklerose war mit 60% (9/15) bei den BCL6+ FL genauso so häufig wie

im gesamten Studienkollektiv. Bei den Referenzlymphomen war in 36% der Fälle (5/14) eine Sklerose nachweisbar. Dabei war die Sklerose in fünf Fällen der BCL6+ FL geringgradig und in zwei Fällen stark ausgeprägt. In der REF wiesen vier Fälle eine geringe und ein Fall eine starke Sklerose auf.

Kapselinfiltration:

In jeweils zwölf Fällen handelte es sich in beiden Gruppen um Lymphknotenbiopsien, bei denen sich ein Kapseldurchbruch beurteilen ließ. Die Häufigkeit einer tumorösen Lymphknoten-kapselinfiltration wich in beiden Gruppen nicht signifikant voneinander ab (58% (7/12) BCL6+ vs. 83% (10/12) REF). Alle sieben BCL6+ Lymphome mit Kapselinfiltration waren niedrig maligne (Grad 1 = 6, Grad 2 = 1).

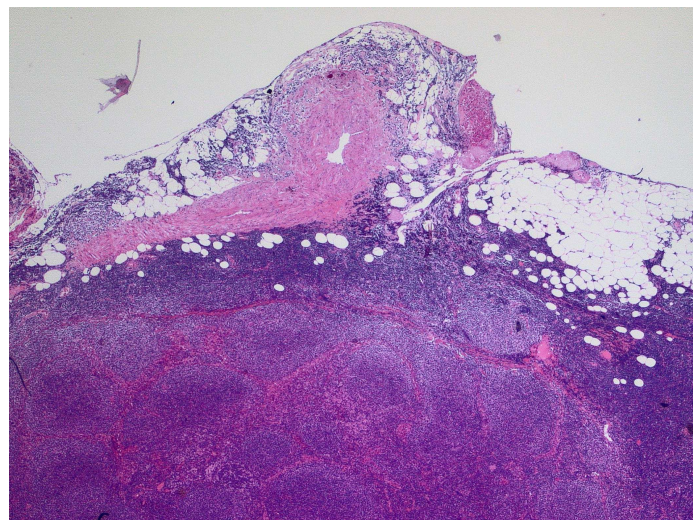


Abbildung 8: Tumoröse Infiltration der Lymphknotenkapsel. HE-Färbung, Originalvergrößerung 25fach.

Morphologisches Merkmal	BCL6+ n=15 (in%)	REF n=14 (in %)	Signifikanz* p-Wert	Gesamt- kollektiv n=102 (in %)
Gradverteilung				
Grad 1	7	11	k.A.	55
Grad 2	1	3	k.A.	22
Grad 3a	3	0	k.A.	11
Grad 3b	2	0	k.A.	9
t-FL	2	0	k.A.	5
Flächenanteil mit diffusem Wachstumsmuster (Mittelwert)	26	0	k.A.	20
Fälle mit diffusem Anteil >30% der Gesamttumorfläche	5	0	k.A.	24
Fälle mit Sklerose	60	36	n.s.	60
Kapselinfiltration	58	83	n.s.	85
Knochenmarksbefall	33	83	n.s.	47
Marginalzonen-differenzierung	0	0	n.s.	6

*Tabelle 6: Zusammenfassung der morphologischen Eigenschaften der BCL6-translozierten FL, der Referenzfälle (REF) und aller 102 untersuchten FL. ¹U-Test. *Signifikanz und p-Wert beziehen sich nur auf den Vergleich zwischen BCL6 positiven Fällen und der Referenzgruppe. n.s.: nicht signifikant ($p > 0,05$). k.A.: keine Angaben (Die Verteilung der Grade wurde nicht statistisch ausgewertet, da die Selektionskriterien der REF nur Grad 1 und Grad 2 FL einschlossen).*

Knochenmarksbefall:

Die typischen BCL2+ Fälle befielen zwar häufiger das Knochenmark (83% (9/14) vs. 33% (5/15) BCL6+), das Signifikanzniveau wurde hierbei jedoch nicht erreicht. Auch im Gesamtkollektiv war eine tumoröse Infiltration des Knochenmarks mit 47% etwas häufiger als bei der Gruppe der BCL6 positiven FL anzufinden. In der Gruppe der BCL6+ FL zeigten vor allem die niedrig malignen Lymphome eine Knochenmarksinvasion. Von den fünf Fällen mit Knochenmarksbeteiligung waren vier Grad 1 FL und ein Grad 3a FL. In einem dieser Fälle (20%) lag ein herdförmig peritrabekuläres Wachstumsmuster vor, zwei Fälle (40%) zeigten peritrabekulär und interstitiell angeordnete Infiltratherde und in zwei weiteren Fällen (40%) präsentierten sich diffuse und herdförmige Areale nebeneinander. In der Referenzgruppe lagen am häufigsten (5/9 = 56%) peritrabekulär angeordnete Herde vor. Bei zwei Fällen (22%) waren die Tumorherde sowohl interstitiell als auch peritrabekulär verteilt. Nur ein Fall (11%) zeigte rein interstitiell gelegene Herde, während

in einem weiteren Fall fokale mit diffusen Arealen vergesellschaftet waren. Ein rein diffuses Wachstumsmuster im Knochenmark konnte in keinem Fall beobachtet werden. Das Ausmaß der Knochenmarksinfiltration lag in der Referenzgruppe zwischen <5% und 15% (bezogen auf die Fläche) mit einem Mittelwert von 12,5%. Bezogen auf die Zellularität schwankte der Infiltrationsgrad zwischen 5% und 50% mit einem mittleren Anteil von 24,4%. Die tumorös infiltrierten Anteile BCL6+ FL lagen im Mittel mit 16% (bezogen auf die Fläche) und 27% (bezogen auf die Zellularität) nur geringfügig höher.

Marginalzonendifferenzierung:

Unter einer Marginalzonendifferenzierung versteht man die monozytoide oder plasmazytoide Ausdifferenzierung von perifollikulär um die neoplastischen Keimzentren angeordneten Tumorzellen. Weder einer der Fälle mit 3q27-Translokation, noch einer der Referenzfälle verfügte über diese morphologische Besonderheit, und auch im Gesamtkollektiv war eine Marginalzonendifferenzierung mit 6% der Fälle selten zu finden.

4.4. Immunhistochemische Analysen BCL6 positiver follikulärer Lymphome

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden alle in einem Konsensusverfahren von drei Begutachtern (C.Thorns, B. Stassek, W. Gollub) vorgenommen. Tabelle 7 enthält eine Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen.

Parameter	BCL6+ n=15 (in%)	REF n=14 (in %)	Signifikanz* p-Wert	Gesamt- kollektiv n=102 (in %)
Anteil CD 3 pos. T- Zellen	16,3	20	n.s. ¹	20,5
Anteil CD 4 pos. T- Zellen	13	15,7	n.s. ¹	15
Anteil CD 8 pos. T- Zellen	8,1	8,7	n.s. ¹	8
Verhältnis CD4/CD8	2,1	2,3	n.s. ¹	2,39
CD68	6	<5	n.s.	<5
CD23 FDC ²	47	100	0,002	88
CD23 pos. Tumorzellen >30%	27	7	n.s.	33
CD10 stark positiv	60	100	0,017	75
Bcl2 stark positiv	80	100	k.A.	73
Fälle mit IgD pos. Mantel	20	23	k.A.	32
MiB1 im Mittel (%)	33,2	12,3	0,016 ¹	19
MiB1 im „hot spot“	54,3	27,1	0,024 ¹	44
Monotypische Leichtketten	67	36	k.A.	37

*Tabelle 7: Zusammenfassung der immunhistochemischen Eigenschaften der BCL6-translozierten FL, der Referenzfälle (REF) und aller 102 untersuchten FL. ¹U-Test. *Signifikanz und p-Wert beziehen sich nur auf den Vergleich zwischen BCL6 positiven Fällen und der Referenzgruppe. n.s.: nicht signifikant ($p > 0,05$). ² Vergleich keine bzw. wenige FDC-Netzwerke mit mäßig bzw. stark ausgeprägten Netzwerken follikulärer dendritischer Retikulumzellen.*

CD20:

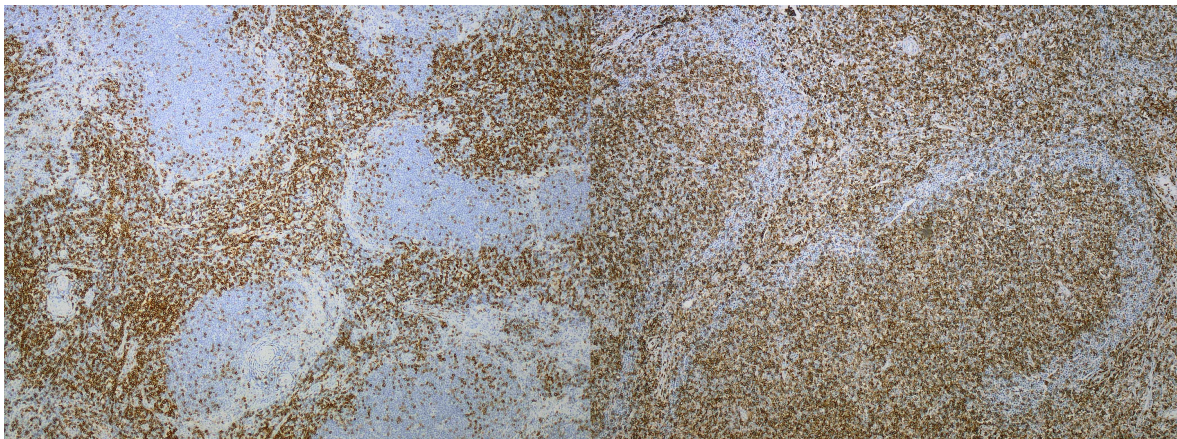
CD20 ist ein universeller B-Zellmarker und war in allen Fällen stark positiv.

CD 3, CD4, CD8, CD68:

Die neoplastisch veränderten B-Zellen werden bei follikulären Lymphomen von T-Zellen, follikulären dendritischen Zellen, Makrophagen und Histiozyten begleitet, die das Mikromilieu des Tumors beeinflussen. CD3 wird von allen T-Zellen exprimiert. Die

Reaktionen für CD4 und CD8 dienen der Typisierung verschiedener T-Zellsubpopulationen. Da häufig mehrere Muster parallel vorlagen, wurden ein primäres, im Vordergrund stehendes, und ein sekundäres Verteilungsbild dokumentiert. Es wurden folgende drei Muster unterschieden: intrafollikuläre Akzentuierung, perifollikuläre Anordnung und eine intrafollikuläre Ausbreitung markierter Zellen. Die Reaktionen für CD3, CD4 und CD8 waren in 100% der Fälle auswertbar.

Der Anteil CD3 positiver T-Zellen war in beiden Gruppen nicht signifikant verschieden (BCL6: 16%, REF: 20%). Am häufigsten lag ein vorwiegend diffuses Ausbreitungsmuster vor (BCL6: 67%, REF: 71%). Alle weiteren Fälle zeigten als primäres Muster in beiden Gruppen eine perifollikuläre Anordnung. In jeder Gruppe wies jeweils ein Fall eine weitere diffuse Komponente auf. Drei der BCL6+ Fälle (20%) zeigten ein sekundäres perifollikuläres Muster. Ein intragerminales Verteilungsmuster war sehr selten und wurde nur in einem Fall der Referenzgruppe als sekundäres Bild eines ansonsten perifollikulär dominierenden Musters beobachtet. Das Verteilungsbild CD4 positiver Zellen glich dem der CD3 positiven Lymphozyten. Die meisten Fälle beider Gruppen zeigten ein prädominant diffuses Verbreitungsmuster aller CD4 positiven Zellen. Bei den BCL6+ waren dies 87% der Fälle. Davon lag in 31% zusätzlich eine perifollikuläre Betonung vor und ein Fall (8%) zeigte zusätzlich intrafollikuläre Ansammlungen CD4 positiver T-Zellen. Ein signifikanter Unterschied des Anteils CD4 positiver Zellen war zwischen den zwei Gruppen nicht nachweisbar (BCL6+: 13%, REF: 16%).



*Abbildung 9: **Links:** Vorwiegend perifollikuläres Verteilungsmuster von T-Zellen, Immunhistochemische Reaktion für CD3. **Rechts:** Peri- und intrafollikuläre Ansammlungen CD4 positiver T-Zellen. Immunhistochemische Reaktion für CD4, Originalvergrößerung jeweils 100fach.*

CD8 positive Zellen waren in beiden Gruppen mit 8,1% (BCL6+) bzw. 8,7% (REF) ähnlich repräsentiert und insgesamt seltener als CD3- und CD4 positive Zellen. Hier zeigte sich ebenfalls am häufigsten eine diffuse Verteilung der Zellen (BCL6+: 87%, REF: 86%). In

der Referenzgruppe zeigten zwei (17%), in der BCL6+ Gruppe einer (8%) der Fälle mit primär diffus verbreitetem Erscheinungsbild der CD8 positiven T-Zellen, außerdem eine perifollikuläre Betonung. In einem Fall war eine intrafollikuläre Akkumulation CD8 positiver Zellen nachweisbar. Dabei handelte es sich um ein Lymphom mit Aberration des BCL6-Genlocus. Weiterhin verfügte dieser Fall über eine diffuse Wachstumskomponente. Das Verhältnis von CD4- und CD8 positiven Zellen war in beiden Gruppen sehr ähnlich (BCL6+: 2,1, REF: 2,3).

Makrophagen wurden mit Hilfe von CD68 markiert. Die immunhistochemischen Färbungen für CD68 ließen sich bei 14 von 15 BCL6+ FL und allen Fällen der Referenzgruppe auswerten. Bei dieser Studie wurde der Klon PGM1 verwendet, der im Gegensatz zu z.B. KP1 keine Granulozyten zusätzlich markiert. Der Makrophagenanteil lag in den Gruppen bei 6% (BCL6+) bzw. unter 5% (REF) und zeigte ein ausnahmslos diffuses Ausbreitungsmuster.

CD23:

Follikuläre dendritische Retikulumzellen (FDC) bilden intragerminale Netzwerke und stellen einen obligatorischen Teil der Follikelstruktur dar. FDC können immunhistochemisch mit CD21, CD23, CD35 und CNA42 markiert werden. Jedoch müssen FDC nicht alle Marker simultan exprimieren. Wahrscheinlich bilden sie das Korrelat verschiedener Differenzierungsgrade. CD23 wird nicht nur von FDC, sondern auch von Follikelmantelzellen exprimiert. Die FDC-Netzwerke wurden semiquantitativ als abwesend, gering, mäßig oder stark ausgeprägt gewertet. Eine weitere Charakterisierung des Netzwerkusters erfolgte nicht.

Die CD23 positiven Tumorzellen wurden als negativ (<30% der Zellen), partiell positiv (30-70% der Zellen) oder positiv (>70% der Zellen) erfasst. In der REF zeigten alle Fälle mäßig (3/14=21%) oder kräftig (11/14=79%) ausgebildete FDC-Netzwerke. Auch die BCL6+ Lymphome zeigten mehrheitlich zumindest gering ausgeprägte FDC-Netze. Diese Netze waren in 40% (6/15) spärlich, in 20% (3/15) mäßig und in 26,7% kräftig ausgebildet.

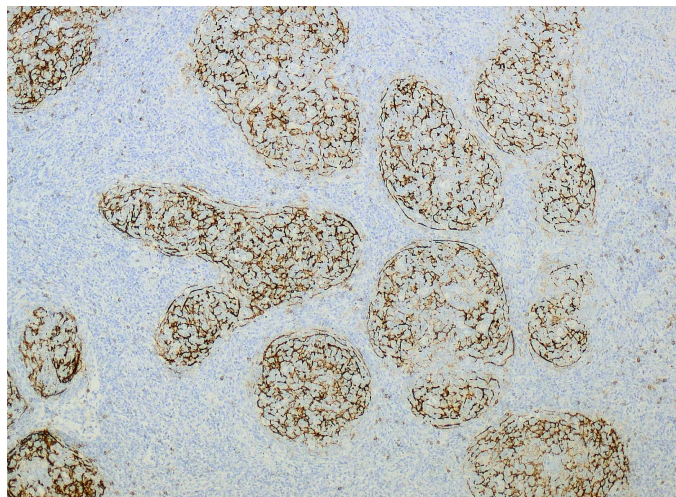


Abbildung 10: FL mit Netzwerken follikulärer dendritischer Retikulumzellen.

Immunhistochemische Reaktion für CD23, Originalvergrößerung 100fach.

Allerdings zeigten zwei der Fälle mit 3q27 Translokation (13%) keinerlei Netzwerke follikulärer dendritischer Zellen. Bei diesen beiden Fällen lag mit 95% bzw. 70% ein stark ausgeprägtes diffuses Wachstumsmuster vor. Wurde die Charakteristik der Netze lediglich als nicht bzw. gering vorhanden oder mäßig bzw. kräftig vorhanden gewertet, so ergaben sich signifikant stärker ausgebildete FDC-Netze bei den FL der Referenzgruppe ($p=0,002$). Der Gehalt an CD23 positiven Tumorzellen lag bei den BCL6+ Fällen mit 27% zwar höher als in der Referenzgruppe (7%), das Signifikanzniveau wurde jedoch verfehlt.

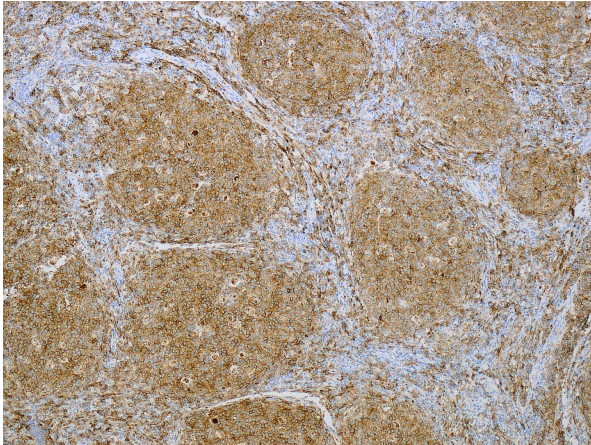


Abbildung 11: Kräftige Expression von CD10 in den Keimzentren. Immunhistochemische Reaktion für CD10, Originalvergrößerung 25fach.

CD10, bcl6:

CD10 und bcl6 sind Keimzentrumsmarker und die immunhistochemischen Färbungen für CD10 waren in allen Fällen auswertbar. Währenddessen lagen nur zu 11/29 Fällen Daten zu bcl6 vor. Die überwiegende Mehrzahl aller 102 Fälle war positiv für CD10. In der Referenzgruppe zeigten alle Fälle eine starke Expression. Drei BCL6+ (20%) waren CD10 negativ, weitere drei Fälle waren schwach reaktiv für CD10 und

in neun Fällen (60%) zeigte sich eine starke Anfärbbarkeit mit CD10. Verglich man das Vorhandensein einer starken CD10-Expression, so zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,017$).

Sechs der 14 Referenzlymphome waren für bcl6 auswertbar und ausnahmslos stark positiv. Zwei der insgesamt fünf auswertbaren BCL6+ Fälle waren schwach bcl6 positiv. Die restlichen drei Fälle verfügten über eine starke Reaktivität.

bcl2:

Im Allgemeinen zeigen follikuläre Lymphome eine aberrante bcl2-Expression auf neoplastisch veränderten B-Zellen des Keimzentrums. In dieser Untersuchung diente die Expression von bcl2 auf T-Zellen als Referenz zur Bestimmung der Expressionsstärke. Dabei wurde die Reaktivität der B-Zellen

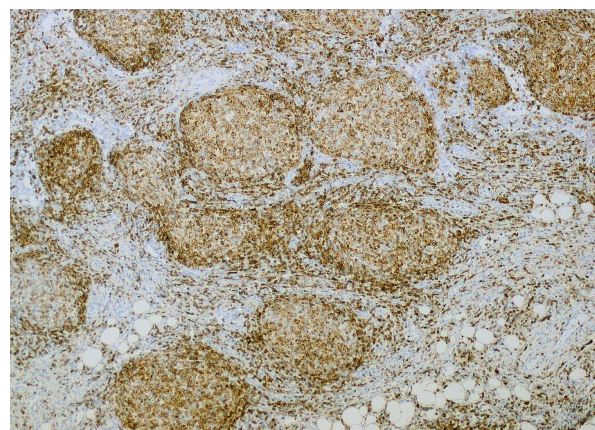


Abbildung 12: Starke Reaktivität für bcl2 in den Keimzentren. Immunhistochemische Reaktion für bcl2, Originalvergrößerung 25fach.

als stark gewertet, wenn sie mindestens gleich oder stärker ausgeprägt war als die Reaktivität der T-Zellen. Wurden die B-Zellen weniger stark markiert als die T-Zellen, so wurde die Expression als schwach dokumentiert. Die Reaktion für bcl2 war in allen Fällen auswertbar und bei allen Lymphomen der Referenzgruppe stark ausgeprägt. Zwölf BCL6+ Fälle (80%) verfügten ebenfalls über eine starke membranständige bcl2-Expression. Außerdem zeigten zwei BCL6+ Fälle (13%) eine schwache Expression auf den neoplastischen B-Zellen. In einem Fall (6,7%) war keine Reaktivität nachweisbar. Dieser Fall war außerdem BCL2 transloziert (BCL6+ BCL2+). Es gibt Daten, dass in solchen Fällen mit nachgewiesener t(14;18) Mutationen des BCL2-Gens die Bindung des bcl2 Antikörpers verhindern können (Bonzheim 2011).

IgD:

Immunglobulin D (IgD) wird wie CD13 von den Follikelmantelzellen exprimiert. Es ist jedoch nicht auf den neoplastischen B-Zellen nachweisbar und ist somit geeignet, um erhaltene nicht neoplastische Follikelmäntel darzustellen. Die Umrandung durch Mantelzellen war in beiden Gruppen sehr variabel ausgeprägt und reichte von 5% bis zu 90% der Zirkumferenz. In dieser Untersuchung wurde eine Mantelzone als erhalten gewertet, wenn ein Kranz aus IgD positiven Zellen mindestens ein Drittel der Follikelzirkumferenz umrahmte. Die Reaktion für IgD war nur bei einem Fall der Referenzgruppe nicht auswertbar. Der Anteil an Fällen mit erhaltener Mantelzone lag bei den BCL6+ Lymphomen bei 13% (2/15) und in der REF bei 15% (2/13).



Abbildung 13: Follikuläres Lymphom mit überwiegend erhaltenen Follikelmantelzonen. Immunhistochemische Reaktion für IgD, Originalvergrößerung 100fach.

MiB1:

MiB1 ist der Name eines Antikörpers, der das proliferationsassoziierte Ki-67-Antigen markiert. Dieses wurde erstmals von Gerdes beschrieben (Gerdes 1984). Der Mittelwert der proliferierenden Zellen in Relation zu den nicht proliferierenden Zellen wurde erstens als prozentualer Anteil an der gesamten Gewebeprobe dargestellt. Zweitens wurde der Mittelwert der markierten Zellen in dem Gesichtsfeld mit der höchsten Proliferationsrate („hot spot“, punctum maximum) bestimmt. Für die histologische Graduierung sind zwar die Blasten ausschlaggebend, doch auch Zentrozyten können in low grade FL hohe Proliferationsraten aufweisen.

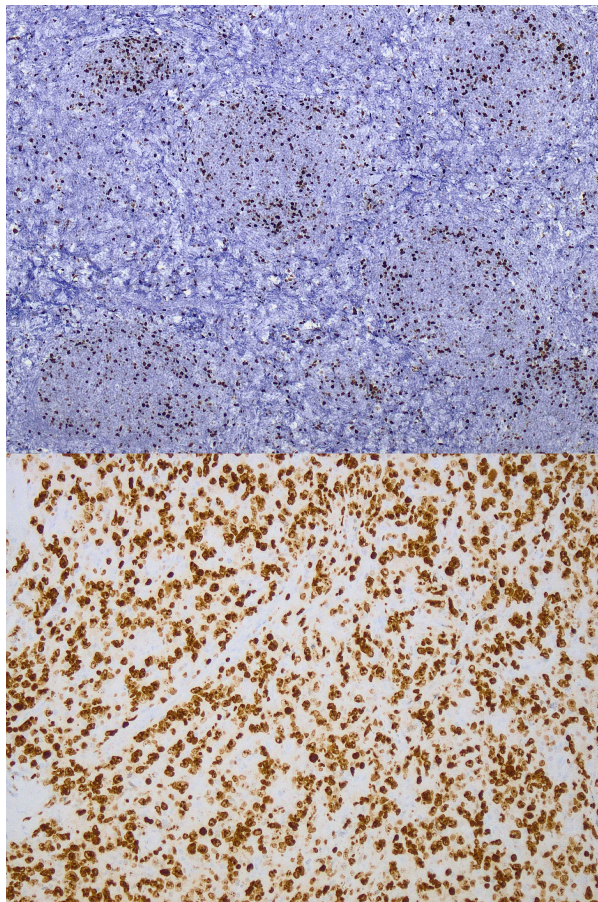


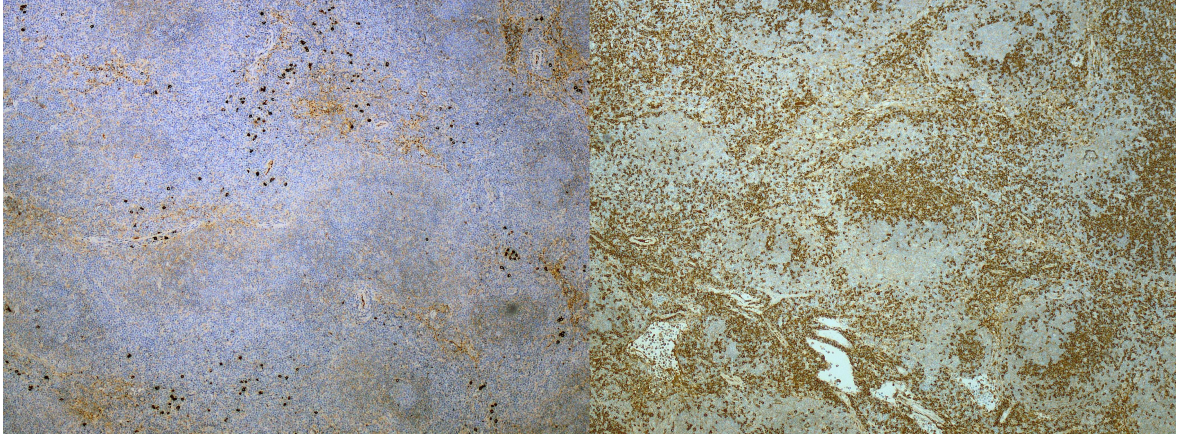
Abbildung 14: Oben: Geringe Proliferationsrate in einem follikulären Lymphom. **Unten:** Hohe Proliferationsaktivität in einem „hot spot“. Immunhistochemische Reaktion für MiB1, Originalvergrößerung 25fach und 100fach.

Im gesamten Kollektiv von 102 Lymphomen gab es trotzdem eine enge positive Korrelation zwischen dem histologischen Grad und der Proliferationsaktivität innerhalb der gesamten Biopsie sowie im „hot spot“ (Thorns 2009). Die Proliferationsaktivität war bei den BCL6+ FL dementsprechend erwartungsgemäß signifikant höher als bei der Referenzgruppe, da in die Referenzgruppe nur Grad 1 und 2 Tumoren eingeschlossen wurden. Im Mittel lag die Proliferationsrate der BCL6+ Fälle bei 33,2% bezogen auf das gesamte Biopsat. In der Referenzgruppe war der Mittelwert der proliferativen Aktivität mit 12,3% signifikant niedriger ($p=0,016$). Darüber hinaus proliferierten in der BCL6+ Gruppe die Zellen auch in dem Gesichtsfeld mit der höchsten Proliferationsrate eines jeden Präparats signifikant stärker als die BCL2+ niedrig malignen Referenzlymphome. Der Mittelwert der Proliferationsrate im „hot

spot“ der 3q27 translozierten Lymphome lag bei 54,3% und bei 27,1% in der Referenzgruppe ($p=0,024$).

Immunglobulin-Leichtketten (kappa und lambda):

Die immunhistochemischen Färbungen für die Immunglobulin-Leichtketten kappa und lambda wurden auf die Expression eines monotypischen Leichtkettenmusters untersucht. Alle Fälle waren auswertbar. Eine monotypische Leichtkettenexpression konnte bei 67% (10/15) BCL6+ Fällen nachgewiesen werden. Davon war kappa mit 70% (7/10) häufiger als lambda (30%) exprimiert. 36% (5/14) der Fälle in der Referenzgruppe zeigten eine monotypische Leichtkettenexpression, davon wurde in 60% (3/5) und in 40% (2/5) kappa exprimiert.



*Abbildung 15: FL mit monotypischer Leichtkettenexpression. **Links:** lambda. **Rechts:** kappa. Originalvergrößerung jeweils 25fach.*

4.5. MicroRNA-Signaturen

Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass miRNAs zur Einteilung von Tumorentitäten geeignet sein können (Lu 2005, Lee 2009, Ross 2010, Wang 2011, Zhou 2011, Sinkovics 2012). Deshalb wurden in dieser Studie die miRNA-Expressionsprofile von 29 follikulären Lymphomen mit unterschiedlichen morphologischen Charakteristika und molekularen BCL6- und BCL2-Konstellationen ermittelt. Weiterhin wurden die Daten aus fünf nicht neoplastisch veränderten Lymphknoten hinzugezogen, um einen Vergleich zum Normalgewebe ziehen zu können. Als miRNA-Signaturen oder miRNA-Expressionsprofile wurden die Ergebnisse aller untersuchten miRNAs bezeichnet.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurde eine Subgruppenanalyse von allen BCL6 positiven follikulären Lymphomen (im Weiteren auch als BCL6+ abgekürzt) vorgenommen. Um die molekularbiologischen Charakteristika BCL6 positiver follikulärer Lymphome ermitteln zu können, wurden diese mit einer Referenzgruppe aus 14 typischen follikulären Lymphomen sowie fünf nicht neoplastisch veränderten Lymphknoten auf ihr microRNA-Profil untersucht und verglichen. Näheres hierzu siehe 3.1. Patientenproben und 4.1. Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

Die miRNA-Signaturen der 29 FL und fünf benignen Lymphknoten wurden mittels der Expression von 376 miRNAs angefertigt. Die Expression der miRNAs wurde durch quantitative RT-PCR ermittelt. Dabei handelt es sich um eine Methode, die sehr genaue und reproduzierbare Ergebnisse ermöglicht, wodurch Vergleiche zwischen unterschiedlichen Fällen gezogen werden können. Die miRNA-Expressionsprofile wurden anhand des Gesamtgehalts aller untersuchten miRNAs normalisiert. Die Berechnung differentiell exprimierter miRNAs erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test wobei das Signifikanzniveau auf einen Wert von $\alpha=5\%$ festgelegt wurde. Auf eine alpha-Adjustierung nach Bonferroni (Bland 2005) wurde bewusst verzichtet, da es sich bei dieser Studie um eine Untersuchung mit stark explorativer Anlage handelte.

4.5.1. Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von typischen FL (REF) und BCL6-translozierten follikulären Lymphomen (BCL6+)

microRNA	Signifikanz p-Wert	Durchschnittlicher CT-Wert REF	Durchschnittlicher CT-Wert BCL6+	Δ CT
33	0,032	36,17	37,54	-1,38
34c	0,028	35,44	36,35	-0,91
135a	0,011	33,28	35,76	-2,48
138	0,004	32,18	34,13	-1,95
151	0,002	29,61	30,56	-0,95
153	0,022	37,69	39,03	-1,34
184	0,038	37,23	38,62	-1,39
186	0,042	28,82	29,21	-0,39
188	0,025	33,47	31,73	1,73
197	0,027	29,87	29,01	0,86
200a	0,020	33,95	35,60	-1,65
202	0,044	35,21	33,99	1,21
213	0,040	33,11	33,89	-0,78
224	0,045	33,13	34,28	-1,15
302a	0,032	38,40	38,73	-0,34
302c	0,030	38,97	37,27	1,69
346	0,028	31,81	31,66	0,15
373#	0,017	38,12	36,84	1,28
375	0,045	34,02	36,41	-2,39
381	0,006	36,62	35,51	1,11
433	0,005	35,30	33,89	1,41
452	0,030	36,88	36,40	0,49
501	0,024	35,71	34,68	1,03
517c	0,041	36,53	38,12	-1,58
526b	0,042	37,58	36,54	1,05
572	0,003	34,18	33,01	1,17
584	0,001	34,33	33,04	1,30
591	0,028	33,25	32,30	0,95
596	0,008	34,58	33,39	1,19
612	0,022	31,36	29,51	1,85

Tabelle 8: MicroRNAs, die bei den follikulären Lymphomen der Referenzgruppe und den BCL6 positiven FL (BCL6+ BCL2+ und BCL6+ BCL2-) differentiell exprimiert sind, bei einem nicht für multiples Testen adjustierten Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$. Δ CT= Differenz der durchschnittlichen CT-Werte. Δ CT-Werte > 1 grau unterlegt.

Der CT-Wert (abgekürzt für englisch: cycle threshold) bezeichnet die Zyklusnummer der PCR, bei der ein bestimmter Schwellenwert des Fluoreszenzsignals überschritten wird (Chen 2005). Das Δ CT der durchschnittlichen Expressionsprofile beider Gruppen reichte dabei von 0,15 bis 2,48. Im Vergleich der FL der Referenzgruppe mit allen Fällen mit einem Bruchereignis im BCL6-Gen waren 30 der 376 miRNAs (8%) differentiell exprimiert (siehe Tab.8). Bei den BCL6+ Fällen waren sechzehn miRNAs im Vergleich zur Referenzgruppe überexprimiert. Davon lag bei zwölf miRNAs ein Δ CT von >1 (entspricht mindestens 2facher Überexpression) vor. Dies waren miR188, miR202, miR381, miR433, miR501, miR572, miR584, miR596, miR612, miR302c, miR373# und miR526b. Verglichen mit der Referenzgruppe unterexprimierten die BCL6+ FL vierzehn miRNAs, wobei neun miRNAs ein Δ CT von >1 aufwiesen. Es handelte sich hierbei um miR33, miR138, miR153, miR184, miR224, miR375, miR135a, miR200a und miR517c. MiR135a war mit einem Δ CT von 2,48 in den Referenzlymphomen vergleichsweise am stärksten überexprimiert.

4.5.2. Vergleich der miRNA-Expressionsprofile von Referenzlymphomen und BCL6-translozierten FL ohne Translokation t(14;18)

Insgesamt waren 25 miRNAs (7%) zwischen den FL der Referenzgruppe und den FL, die nur über eine Translokation von 3q27 verfügten, unterschiedlich exprimiert (siehe Tab.9). Das Δ CT reichte dabei von 0,25 bis 5,76. Fünfzehn miRNAs zeigten bei den BCL6+ BCL2- Fällen eine Überexpression in Relation zur Referenzgruppe. Bei neun miRNAs lag eine Überexpression mit einem Δ CT von > 1 vor (miR21, miR197, miR205, miR432, miR612, miR193b, miR302b, miR519a, miR525#). MiR519a war dabei am deutlichsten hochreguliert (Δ CT=5,76, $p=0,044$). Bezogen auf die Referenzgruppe wurden bei den BCL6+ BCL2- Fällen zehn miRNAs unterexprimiert, wovon sechs miRNAs (miR28, miR153, miR184, miR597, miR302a, miR30a-3p) ein Δ CT von > 1 aufwiesen.

microRNA	Signifikanz p-Wert	Durchschnittlicher CT-Wert REF	Durchschnittlicher CT- Wert BCL6+ BCL2-	Δ CT
21	0,018	23,24	21,68	1,55
28	0,007	30,27	31,61	-1,34
30a-3p	0,035	32,27	33,47	-1,19
99a	0,049	28,39	27,42	0,97
153	0,004	37,51	39,90	-2,38
184	0,008	37,10	39,18	-2,08
186	0,041	28,83	29,40	-0,57
193b	0,025	32,67	31,20	1,47
197	0,049	29,94	28,45	1,49
205	0,025	38,72	36,50	2,22
213	0,043	33,02	33,69	-0,67
221	0,018	30,53	29,60	0,93
302a	0,036	38,27	39,37	-1,10
302b	0,036	38,47	36,20	2,28
302b#	0,006	39,85	39,36	0,49
374	0,033	30,04	30,65	-0,61
378	0,048	34,05	33,26	0,78
380-5p	0,028	39,98	39,41	0,57
432	0,036	38,24	36,70	1,54
519a	0,044	38,37	32,62	5,76
520e	0,044	38,90	39,15	-0,25
525#	0,040	38,37	36,06	2,31
526b	0,021	38,91	38,12	0,79
597	0,043	36,24	37,84	-1,60
612	0,043	31,59	28,84	2,76

Tabelle 9: MicroRNAs, die bei den folliculären Lymphomen der Referenzgruppe und den BCL6 positiven FL ohne t(14;18) (BCL6+ BCL2-) differentiell exprimiert sind, bei einem nicht für multiples Testen adjustierten Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$. Δ CT= Differenz der durchschnittlichen CT-Werte. Δ CT-Werte >1 grau unterlegt.

4.5.3. MiRNA-Expressionsprofile BCL6 positiver folliculärer Lymphome mit und ohne Translokation t (14;18) im Vergleich

Insgesamt waren 18 von 376 miRNAs (5%) zwischen den BCL6+ FL mit und ohne Bruchereignis im BCL2-Gen signifikant verschieden stark exprimiert, wobei mit einer

Ausnahme immer ein ΔCT von > 1 vorlag. Acht miRNAs (miR383, miR410, miR483, miR489, miR485-3p, miR493-3p, miR512-3p, miR520d) waren bei den Fällen mit einer zusätzlichen BCL2-Translokation verglichen mit den BCL2 negativen Fällen überexprimiert. Gemessen an den Fällen ohne BCL2-Aberration waren bei den BCL2 positiven FL neun miRNAs (miR100, miR127, miR205, miR368, miR18a#, miR193b, miR27b, miR519a, miR 99a) mit einem ΔCT von > 1 unterexprimiert. Insgesamt wies miR 519a zwischen den beiden Gruppen die größten Unterschiede in der Expressionsstärke auf ($\Delta CT=7,10$, $p=0,04$).

microRNA	Signifikanz p-Wert	Durchschnittlicher CT-Wert BCL6+ BCL2-	Durchschnittlicher CT- Wert BCL6+ BCL2+	ΔCT
18a#	0,040	32,15	33,67	-1,52
27b	0,028	29,69	31,71	-2,03
99a	0,025	27,42	29,49	-2,07
100	0,037	27,38	29,47	-2,09
127	0,036	31,98	34,44	-2,46
193b	0,004	31,20	33,40	-2,20
205	0,017	36,50	39,19	-2,68
368	0,019	37,90	39,69	-1,79
376a#	0,041	39,08	39,95	-0,87
383	0,038	36,31	35,02	1,29
410	0,040	38,70	36,85	1,84
483	0,044	33,04	31,83	1,21
485-3p	0,020	38,01	34,50	3,51
489	0,028	39,30	37,23	2,07
493-3p	0,008	38,25	34,94	3,31
512-3p	0,008	38,89	37,11	1,78
519a	0,040	32,62	39,71	-7,10
520d	0,025	37,69	36,27	1,42

Tabelle 10: MicroRNAs, die bei den BCL6 positiven FL ohne t(14;18) (BCL6+ BCL2-) und den doppelt positiven folliculären Lymphomen (BCL6+ BCL2+) differentiell exprimiert sind, bei einem nicht für multiples Testen adjustierten Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$. ΔCT = Differenz der durchschnittlichen CT-Werte. ΔCT -Werte >1 grau unterlegt .

Mit Hilfe des unüberwachten Gruppierens (unsupervised clustering) kann geprüft werden, ob sich Gruppen mit ähnlichen miRNA-Signaturen innerhalb der untersuchten 29 Lymphome und fünf Lymphknoten bilden lassen. Deshalb wurden die miRNA-Signaturen Mittelwert-zentriert und durch die „complete linkage“- Methode gruppiert. Die gesamten

Ergebnisse sind ausführlich als sogenannte „heat map“ im Anhang in Abb. 22 dargestellt. Dabei ergaben sich zwei Gruppen mit 15 FL in Gruppe 1 (grün gekennzeichnet) und 19 Fällen in Gruppe 2 (gelb gekennzeichnet). Die fünf nicht neoplastischen Lymphknoten waren dabei erwartungsgemäß in der gleichen Gruppe (Gruppe 2) zu finden (siehe Abb. 16) und zeigten somit ein ähnliches Expressionsniveau. Allerdings waren in Gruppe 1 und Gruppe 2 jeweils Fälle der Referenzgruppe, und der BCL6+ FL (Gruppe 1: 7 BCL6+ Fälle, 8 REF-Fälle; Gruppe 2: 8 BCL6+ Fälle, 6 REF-Fälle, 5 nicht neoplastische Lymphknoten) vertreten. Die Gruppierung anhand der miRNA-Expressionen korrelierte somit nicht einheitlich mit dem jeweiligen molekularbiologischen BCL6- und BCL2-Status.

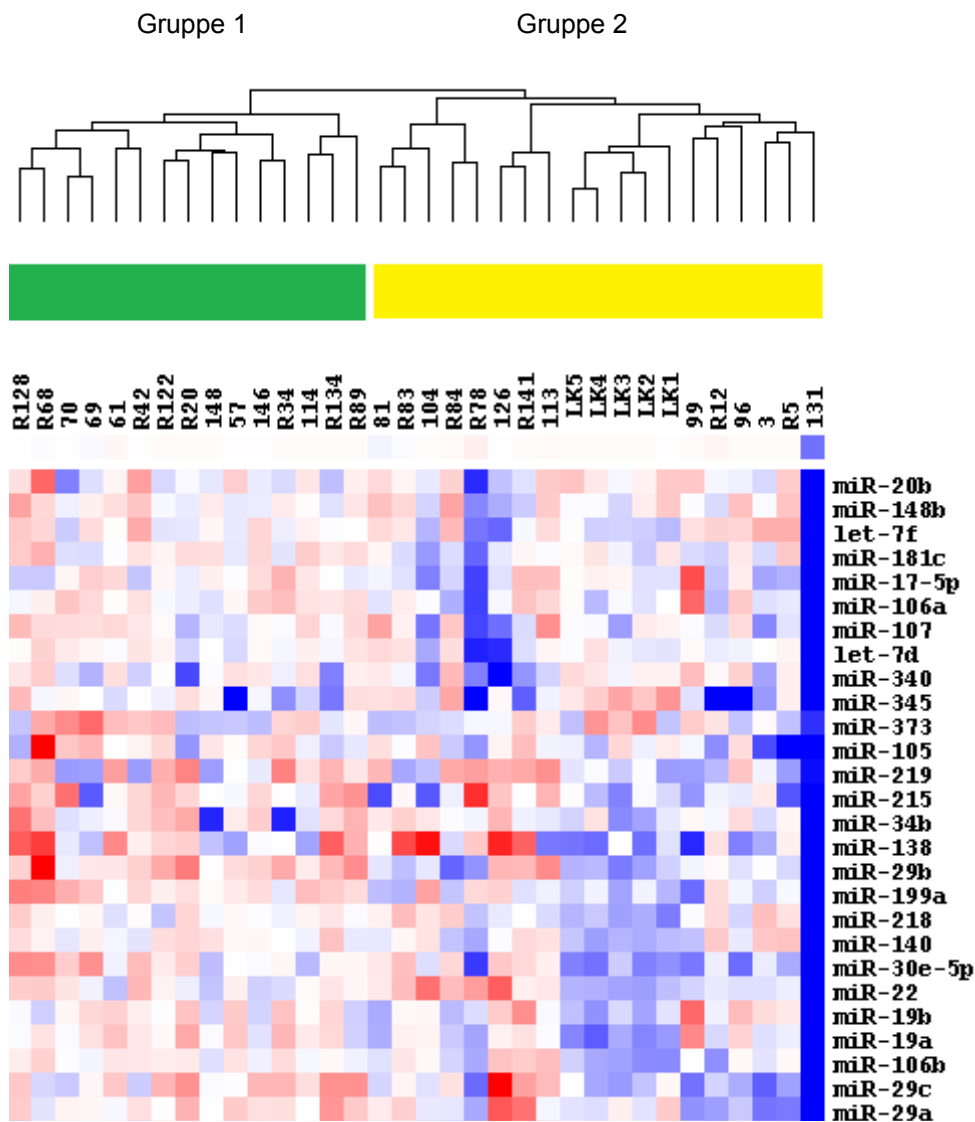


Abbildung 16: Ausschnitt aus der Gruppierung von 29 follikulären Lymphomen und fünf Lymphknoten mittels 376 miRNA-Expressionen. Die Gruppierung erfolgte anhand der "complete linkage" Methode nach Normalisierung am Gesamtgehalt an miRNAs und Mittelwertzentrierung. Starke Expression in rot, schwache Expression in blau. Horizontal aufgetragen die 29 Lymphome und 5 Lymphknoten. Vertikal aufgetragen ein Ausschnitt aus den untersuchten miRNAs (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). R=Referenzgruppenlymphom, LK=Lymphknoten.

Ein Vergleich der untersuchten morphologischen und immunhistochemischen Merkmale zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Da es sich bei den untersuchten nicht neoplastischen Lymphknoten um lymphomfreie Biopsate handelte, wurden sie bei der statistischen Auswertung der untersuchten morphologischen und immunhistochemischen Parameter (wie beispielsweise einer tumorösen Lymphknotenkapselinvasion) nicht weiter berücksichtigt. Das Verhältnis von CD4 positiven zu CD8 positiven Zellen war in Gruppe 1 mit 2,6 zwar tendenziell höher als die CD4/CD8-Ratio in Gruppe 2 (1,7), das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht ($p=0,14$). Ein weiterer Trend war zu beobachten hinsichtlich der tumorösen Infiltration der Lymphknotenkapsel. Die Lymphome in Gruppe 1 (10 von 12, 83%) wiesen dabei öfter einen Kapseldurchbruch auf als die Lymphome in Gruppe 2 (7 von 12, 58%, $p=0,19$).

Tan et al. haben 2009 die miRNA-Expressionssignaturen von naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen und postgerminalen B-Zellen in normalem lymphatischem Gewebe untersucht (Tan 2009) und dabei 16 keimzentrumsspezifische miRNAs identifiziert. In Abb.17 wurden die Expressionsprofile der 14 Referenzlymphome, der BCL6+ Lymphome sowie der nicht neoplastischen Lymphknoten dieser 16 miRNAs mit der „complete linkage“ Methode gruppiert und als „heatmap“ dargestellt. Die Fälle ließen sich demnach in 2 Gruppen einteilen. Die eine Gruppe (Gruppe 3, rot gekennzeichnet) setzte sich aus 17 Fällen zusammen. Darunter waren 8 Fälle der Referenzgruppe, 8 BCL6+ FL und ein nicht neoplastisch veränderter Lymphknoten. Die andere Gruppe (Gruppe 4, grau gekennzeichnet) bestand ebenfalls aus 17 Fällen. Davon gehörten sieben Fälle zu den BCL6+ FL, sechs Fälle zur Referenzgruppe und vier Fälle waren nicht neoplastisch veränderte Lymphknoten. In keiner der beiden Gruppen fanden sich statistisch gehäuft BCL6+ Lymphome ($p=0,85$). Die Gruppierung keimzentrumsspezifischer miRNAs führte dementsprechend nicht zu einer Differenzierung von BCL6 positiven und BCL6 negativen follikulären Lymphomen. Zwischen den beiden Gruppen zeigte keiner der untersuchten morphologischen und immunhistochemischen Parameter einen signifikanten Unterschied. Durchschnittlich waren die Patienten in Gruppe 3 bei Diagnosestellung ungefähr 10 Jahre jünger als in Gruppe 4 (50, 9J. vs. 60, 3J.), aber der Altersunterschied zeigte nur einen Trend an und war nicht signifikant ($p=0,096$). Die Patienten mit einem Alter über 60 Jahren waren in der Gruppe 4 tendenziell häufiger anzufinden (Gruppe3: 5/16 Gruppe4: 8/13, $p=0,11$).

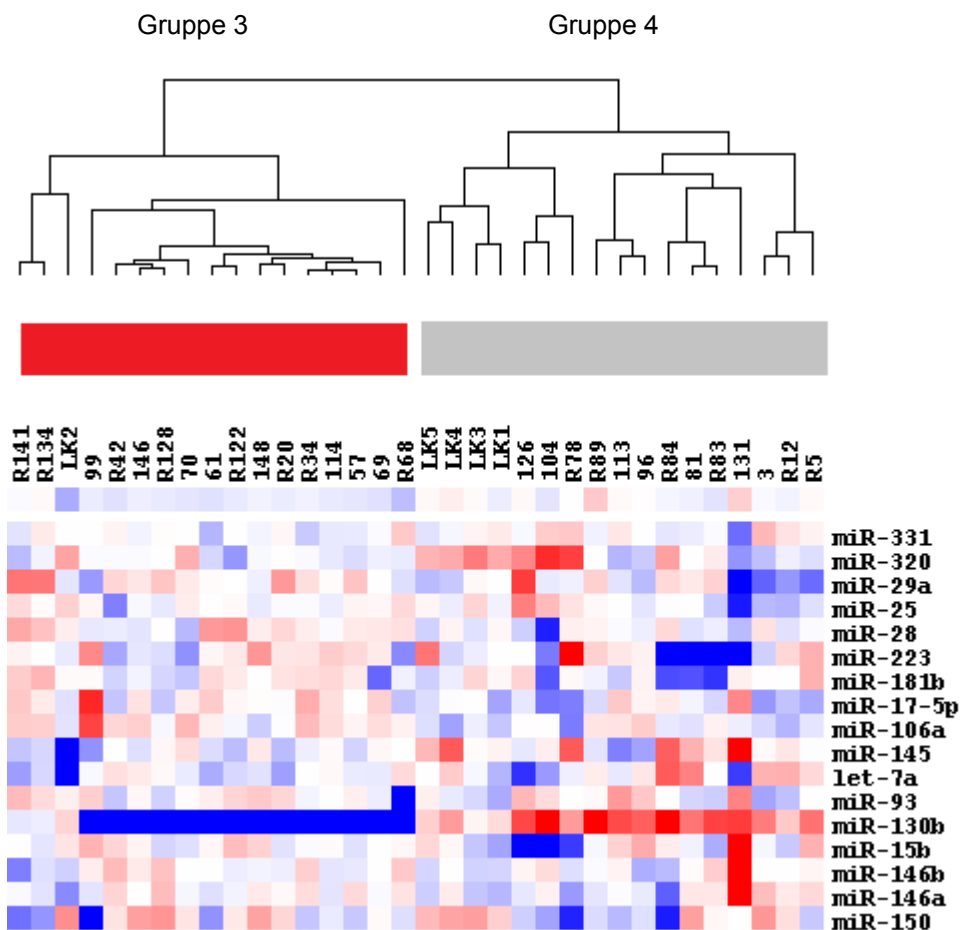


Abbildung 17: Gruppierung von 29 follikulären Lymphomen und fünf Lymphknoten anhand von 16 keimzentrumsspezifischen miRNAs (Tan2009). Die Gruppierung erfolgte anhand der "complete linkage" Methode nach Normalisierung am Gesamtgehalt an miRNAs und Mittelwertzentrierung. Starke Expression in rot, schwache Expression in blau. Horizontal aufgetragen die 29 Lymphome und 5 Lymphknoten. Vertikal aufgetragen die 16 keimzentrumsspezifischen miRNAs nach Tan 2009 (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). R=Referenzgruppenlymphom, LK=Lymphknoten.

5. Diskussion

Bei der vorliegenden Studie handelte es sich um eine Subgruppenanalyse, in der die Fälle aller in 2005 und 2006 im Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck erstmalig diagnostizierten FL mit Bruchereignis im BCL6-Gen mit klassischen FL verglichen wurden. Die Grundlage bildete der bereits publizierte Datensatz von 102 follikulären Lymphomen (Gollub 2009, Thorns 2009). Aus den 102 follikulären Lymphomen wurden alle Fälle ausgewählt, bei denen durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ein Rearrangement des BCL6-Gens nachgewiesen werden konnte (BCL6+). Das BCL6-Protoonkogen auf Chromosom 3q27 kodiert für einen Transkriptionsrepressor, der in Vorgänge bei der B-Zellaktivierung, der Differenzierung, der Apoptose, dem Zellzyklus, der Signalübertragung durch Zytokine, Interferone und Toll-like Rezeptoren sowie der Reaktion auf DNA-Schäden eingreift und somit die Funktion von Keimzentrums-B-Zellen reguliert (Basso 2010). Als Vergleichsgruppe diente eine Kollektiv aus 14 klassischen follikulären Lymphomen (BCL2+ BCL6-, Grad 1 oder 2 FL (low grade), Anteil mit diffusum Wachstumsmuster <30% der Gesamttumorfläche).

Laut Literatur weisen ungefähr 5-15% aller FL Aberrationen am BCL6-Genlocus auf (Bastard 1994, Cattoretti 1995, Gu 2009). Dies lies sich in unserer Studie bestätigen. Von insgesamt 98 auswertbaren Fällen follikulärer Lymphome wurde bei 15 Fällen (ca. 15%) ein Splitsignal der BCL6-Splitsonde detektiert und damit eine Aberration am BCL6-Genlocus nachgewiesen. Der Translokationspartner konnte durch diese Methode nicht ermittelt werden. Die Verwendung von Fusionssonden, um das Bruchereignis noch einmal zu bestätigen und den Translokationspartner bestimmen zu können, wäre nicht praktikabel gewesen, da derzeit über zwanzig potentielle Translokationspartner des BCL6-Gens bekannt sind (Ye 1995, Ohno 1995). Bei 83 Fällen (85%) lag in dieser Studie kein Bruchereignis des BCL6-Gens vor.

Als charakteristisch für follikuläre Lymphome gilt die Translokation t(14;18), durch die das BCL2-Protoonkogen auf Chromosom 18 unter die Kontrolle des Promotors des IgH-Gens auf Chromosom 14 gerät und zu einer Überexpression des antiapoptotisch wirkenden bcl2-Proteins führt. Bei 10 bis 30% aller FL ist jedoch keine Translokation t(14;18) nachweisbar, sodass noch andere protoonkogene Faktoren in der Genese follikulärer Lymphome naheliegend sind. Einer dieser Faktoren ist die Translokationen des BCL6-Gens auf Chromosom 3q27. In dieser Studie sollten deshalb follikuläre Lymphome mit Rearrangements des BCL6-Gens auf ihre morphologischen, immunhistochemischen

und molekularbiologischen Besonderheiten im Vergleich zu klassischen nicht bcl6-translozierten follikulären Lymphomen untersucht werden.

Ziel dieser Studie war es, Unterschiede zwischen BCL6-translozierten follikulären Lymphomen und einer Referenzgruppe aus typischen follikulären Lymphomen auf der Ebene von microRNAs zu beschreiben.

5.1. Morphologische und immunhistochemische Eigenschaften BCL6 positiver follikulärer Lymphome

In den meisten der morphologischen und immunhistochemischen Parameter waren sich die BCL6 positiven und die BCL6 negativen follikulären Lymphome sehr ähnlich. Die Alters- und Geschlechterverteilung waren in beiden Gruppen annähernd gleich. Eine Sklerosierung, die Reaktivität der Follikelmantelzellen für IgD, die Expression monotypischer Leichtketten, der Anteil CD23 positiver Tumorzellen, die Reaktivität für bcl2 sowie eine Marginalzonendifferenzierung waren in beiden Gruppen ähnlich ausgeprägt. Auch das Mikromilieu, gemessen an dem Gehalt der verschiedenen T-Zellsubpopulationen, zeigte ein ähnliches Bild in beiden Gruppen. Weiterhin traten Knochenmarksbefall und tumoröse Lymphknotenkapselinvasion vergleichbar häufig auf. Aussagen zum klinischen Verlauf und zu Unterschiede im Gesamtüberleben gab konnten mit dieser Studie nicht gemacht werden, da keine klinischen Daten vorlagen.

Die Graduierung erfolgte nach der Klassifizierung der WHO in FL Grad 1 (0-5 Zentroblasten/hpf), Grad 2 (5-15 Zentroblasten/hpf), Grad 3a (>15 Zentroblasten/hpf, Zentrozyten noch nachweisbar) und Grad 3b (>15 Zentroblasten/hpf, geschlossene Zentroblastenrasen) sowie t-FL (mit Transformation in Richtung diffus großzelliger B-Zell Lymphome). Laut Katzenberger et al. handelt es sich bei BCL6 translozierten follikulären Lymphomen hauptsächlich um Grad 3b FL mit einer diffus großzelligen Komponente (Katzenberger 2004). In unser Studie waren 2 der BCL6 positiven Fälle reine Grad 3b FL, 2 Fällen war zeigten hauptsächlich eine diffus großzelliges Wachstumsmuster und einem Fall war ein Grad3b mit diffus großzelliger Komponente zuzuordnen. Es ist denkbar, dass die reinen Grad 3b Tumore im weiteren Krankheitsverlauf transformierten, dieses wurde jedoch in der vorliegenden Studie nicht weiter untersucht. Der mittlere Flächenanteil mit diffusem Wachstumsmuster bezogen auf die Gesamttumorfläche war bei den BCL6

positiven Fällen mit 26% signifikant höher als bei den Referenzfällen (0% diffuses Wachstum). Jedoch war ein Anteil von weniger als 30% Flächenanteil mit diffusem Wachstumsmuster ein Kriterium, um der Gruppe der Referenzfälle überhaupt zugeordnet werden zu können. Dadurch veränderte sich auch der mittlere diffuse Flächenanteil und die Vergleichbarkeit wurde eingeschränkt.

Außerdem war die Proliferationsaktivität der Tumorzellen im Mittel und bezogen auf das Areal mit der größten Zellteilungsrate bei den BCL6 positiven Fällen signifikant höher (im Mittel: 33,2% BCL6+ vs. 12,3% REF, $p=0,016$; im „hot spot“: 54,3% BCL6+ vs. 27,1% REF, $p=0,024$). Da die Proliferationsrate mit zunehmendem Tumorgrad im gesamten Kollektiv stieg, ist eine höhere Proliferationsaktivität der BCL6 positiven Fälle im Gegensatz zu den Referenzfällen naheliegend.

Weiterhin waren die Netzwerke CD23 positiver follikulärer dendritischer Zellen bei den Fällen mit 3q27 Translokation signifikant spärlicher vorhanden (47% BCL6+ vs. 100% REF, $p=0,002$). Im gesamten Kollektiv nahm die Dichte der FDC-Netzwerke mit zunehmendem Malignitätsgrad ab. Möglicherweise sind FL mit höherem Malignitätsgrad und damit einer zunehmenden Zahl von genetischen Defekten, wie beispielsweise einer BCL6-Translokation, nicht mehr so stark auf eine Interaktion mit den FDC-Netzen angewiesen.

Darüber hinaus waren die BCL6 positiven Fälle signifikant seltener stark positiv für den Keimzentrumsmarker CD10 (BCL6 60% REF 100%, $p=0,017$). Jardin et al. und Horsman et al. beschrieben bereits, dass im Vergleich von BCL6+ BCL2- FL zu typischen FL mit BCL2-Translokation die BCL6 translozierten Fällen öfter einen CD10 negativen Phänotyp aufwiesen (Horsman 1995, Jardin 2002).

5.2. MicroRNA-Expressionsprofile BCL6 positiver FL

MicroRNAs sind kleine RNAs von circa 19-25 nt Länge und fungieren als Transkriptionsregulatoren. Zahlreiche Studien haben bisher gezeigt, dass microRNAs dazu geeignet sind zwischen malignen Tumorzellen und normalen Zellen bzw. Geweben zu unterscheiden.

In dieser Studie sollten deshalb follikuläre Lymphome mit nachgewiesenem Bruchereignis

des BCL6-Gens auf ihre microRNA-Signaturen im Vergleich zu typischen follikulären Lymphomen untersucht werden. Dazu wurden aus dem Gesamtkollektiv von 102 Fällen zwei Gruppen herausgefiltert. Die erste Gruppe umfasste alle FL bei denen durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mittels einer Splitsonde, ein Bruchereignis des BCL6-Gens festgestellt wurde (abgekürzt als BCL6+). Diese Gruppe bestand aus insgesamt 15 Fällen, von denen zehn Fälle sowohl BCL6 positiv als auch BCL2 positiv (BCL6+ BCL2+) waren und fünf Fälle nur BCL6 transloziert waren (BCL6+ BCL2-). Gegenübergestellt wurde dieser Gruppe eine Referenzgruppe (abgekürzt als REF) von 14 typischen follikulären Lymphomen. Voraussetzungen um der Gruppe typischer FL zugeordnet werden zu können waren: BCL2 positive und zugleich BCL6 negative Fälle, FL Grad 1 oder 2, Flächenanteil mit diffusem Wachstumsmuster <30% der Gesamttumorfläche. Von allen 15 BCL6 positiven follikulären Lymphomen und den Fällen der Referenzgruppe wurde der miRNA-Gehalt mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion bestimmt und microRNA-Expressionsprofile erstellt. Außerdem wurden die microRNA-Expressionsprofile von fünf nicht neoplastisch veränderten Lymphknoten hinzugezogen.

BCL6 positive FL unterschieden sich hinsichtlich ihrer microRNA Signationsprofile nicht wesentlich von typischen follikulären Lymphomen.

Bei dem Vergleich von allen FL mit Rearrangements des BCL6-Gens (BCL6+ BCL2+ und BCL6+ BCL2-) mit den FL der Referenzgruppe waren 30 von insgesamt 376 untersuchten microRNAs signifikant unterschiedlich exprimiert, wovon folgende zwölf microRNAs bei den BCL6 translozierten Fällen mit einem ΔCT von >1 (einer zweifachen Überexpression entsprechend) überexprimiert waren: miR188, miR202, miR381, miR433, miR501, miR572, miR584, miR596, miR612, miR302c, miR373# und miR526b. Die in BCL6 positiven FL im Vergleich zu den typischen follikulären Lymphomen der Referenzgruppe hochregulierten miRNAs wirken dabei teilweise als Oncomirs und teils als TumorsuppressormicroRNAs. Am deutlichsten war miR612 in den BCL6 positiven Fällen herauf reguliert ($\Delta CT=2,76$, $p=0,043$). Über die Rolle von miR612 ist jedoch bis dato wenig erforscht. Bekannt ist bisher, dass die Behandlung der AML Zelllinie HL-60 mit all-trans-Retinsäure (ATRA) zu einer Herunterregulierung von miR612 führt (Jian 2011). MiR202 hemmt beispielsweise über Bindung an die 3'UTR von MYCN die Proliferationsaktivität von Neuroblastomzelllinien (Buechner 2011). Auch miR584 wirkt als Tumorsuppressor durch Herabregulierung von ROCK-1 in klarzelligen Nierenkarzinomen (Ueno 2011). Von miR381 sind hingegen onkogene und das Tumorwachstum hemmende Wirkungsmechanismen erforscht. So hemmt miR381 LLRC4 und fördert in vitro und in

vivo die Proliferation von Gliomzellen und fungiert in Adenokarzinomen der Lunge über Hemmung von ID1 als Tumorsuppressor (Tang 2011, Rothschild 2012).

Ebenso können den microRNAs, die in der Gruppe der BCL6 translozierten Fälle vermindert exprimiert wurden, sowohl Tumorsuppressorfunktionen als auch onkogene Wirkungsmechanismen zugeschrieben werden. Von den 30 signifikant unterschiedlich exprimierten microRNAs waren neun microRNAs mit einem ΔCT von >1 bei den BCL6 positiven Fällen unterexprimiert: miR33, miR138, miR153, miR184, miR224, miR375, miR135a, miR200a und miR517c. Insgesamt war miR135a bei den BCL6+ Fällen am stärksten herabreguliert ($\Delta CT = -2,48$). MiR135a kann als Oncomir und als Tumorsuppressor wirken. In Kolonkarzinomen fördert miR135a über MTSS1 und Hemmung des APC-Gens das Tumorwachstum und die Metastasierung (Rushworth 2011, Zhou 2012). Bei Magenkarzinomen und Hodgkin Lymphomen kommt miR135a über eine Hemmung der Janus Kinase JAK2 eine Tumorsuppressorfunktionen zu (Navarro 2009, Wu 2012). MiR138 gilt als Tumorsuppressor in hepatozellulären Karzinomen, nasopharyngealen Karzinomen und klarzelligen Nierenkarzinomen über seine Zielstrukturen CCND3 und HIF-1alpha (Song 2011, Liu 2012, Wang 2012a). MiR184 und miR200a gelten als tumorsupprimierende microRNAs und wirken unter anderem über AKT2 in Neuroblastomen oder den Wnt/ β -Catenin Signalweg in Karzinomzellen (Foley 2010, Su 2012). MiR224 dagegen wirkt beispielsweise als Oncomir in duktalem Pankreaskarzinomen und ebenfalls in Mammakarzinomzellen über Inhibierung des Tumorsuppressorproteins RKIP (Mees 2009, Huang 2012).

Es ließ sich insgesamt auch bei den anderen signifikant differentiell exprimierten miRNAs kein Trend erkennen, dass FL mit Bruchereignissen im BCL6-Gen Oncomirs oder tumorsupprimierende microRNAs gegenüber der Referenzgruppe stärker oder vermindert exprimierten. Diese Beobachtungen korrelierten mit den Ergebnissen der morphologischen und immunhistochemischen Untersuchungen dahingehend, dass sich die Referenzgruppe von den FL mit Rearrangements am BCL6-Genlocus in der Mehrheit der untersuchten Parameter nicht signifikant unterschied. Insbesondere unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant hinsichtlich der Häufigkeit von tumoröser Lymphknotenkapselinvasion, Knochenmarksinfiltration und dem Anteil an diffusem Tumorwachstum. Die durchschnittliche und maximale Proliferationsaktivität war allerdings bei den Fällen mit Rearrangement des 3q27 Genlocus signifikant höher. Hier ist anzumerken, dass in dieser Studie keine Angaben zum Auftreten von B-Symptomen und zum Krankheitsverlauf vorlagen. Somit konnten keine Rückschlüsse vom Translokations- und microRNA-Status auf die klinische Symptomatik gezogen werden.

BCL6 positive FL ohne gleichzeitige Translokation t(14;18) zeigten gegenüber der Referenzgruppe tendenziell eine Überexpression onkogen wirkender microRNAs und eine verminderte Expression von TumorsuppressormiRNAs.

In der Gruppe der BCL6 translozierten FL ohne simultanes Bruchereignis im BCL2-Gen (BCL6+ BCL2-) waren gegenüber den klassischen FL der Referenzgruppe 25 microRNAs signifikant differentiell exprimiert. Davon lag bei 9 microRNAs mit einem Δ CT von >1 eine mehr als doppelt so hohe Überexpression vor: miR21, miR197, miR205, miR432, miR612, miR193b, miR302b, miR519a und miR525#. Diese in BCL6+ BCL2- FL hochregulierten miRNAs sind dabei überwiegend als Oncomirs bekannt.

MiR21 ist eine der am häufigsten hochregulierten microRNAs in vielen Malignomen wie Mamma-, Lungen-, Prostata-, Kolon- und Ösophaguskarzinomen. Sie hemmt zahlreiche Tumorsuppressoren wie PDCD 4, PTEN, SPRY1 und SPRY2 und wirkt über den JAK/STAT-, den MAPK- sowie den Wnt-Signalweg (Buscaglia 2011, Gao 2012, Guan 2012). Auch miR197 gilt als Oncomir und ist in Schilddrüsentumoren, Lungenkarzinomen und Brustkrebs bei Männer hochreguliert (Nikiforova 2008, Lehman 2010, Zheng 2011). Du et al. haben miR197 als negativen Regulator des Tumorsuppressorgens FUS 1 beschrieben (Du 2009). Auch miR519a wirkt eher onkogen und ist in hepatozellulären Karzinomen hochreguliert und eine hohe Expression von miR519a in Ovarialkarzinomen geht mit einer schlechten Prognose einher (Kim 2010, Wang 2012a, Wang 2012c). Allerdings hat miR193b in vielen Tumoren eine Tumorsuppressorfunktion. In Prostata- und Mammakarzinomen wirkt miR193b über den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen über Cyclin D1 und uPA (Li 2009, Hu 2012, Xie 2012a). Über miR205 ist bisher erforscht, dass sie sowohl als Oncomir als auch als TumorsuppressormiR fungieren kann (Fuse 2012, Hanna 2012, Xie 2012b).

Im Einklang mit dieser Beobachtung waren bei den BCL6+ BCL2- Fällen verglichen mit den Referenzfällen die microRNAs herunterreguliert, die vorwiegend Tumorsuppressorfunktionen besitzen. Insgesamt waren folgende sechs miRNAs bei den BCL6+ BCL2- Fällen gegenüber der REF mit einem Δ CT von >1 unterexprimiert: miR28, miR153, miR184, miR597, miR302a und miR30a-3p. Rizzo et al. beschrieben, dass miR28 in unsterblichen Mäusefibroblasten als Tumorsuppressor wirkt und über Hemmung des protoonkogenen Faktors ASF/SF2 die Apoptose induzieren kann (Rizzo 2011). Almeida et al. untersuchten die Rolle von miR28 und kamen zu zwei Ergebnissen. Eine Überexpression von miR28 bei Mäusen führte dazu, dass diese erst später ein Kolonkarzinom entwickelten, die Metastasierung wurde durch einen hohen Gehalt an

miR28 jedoch gefördert (Almeida 2012). MiR30a-3p wirkt eher tumorsupprimierend. Der Gehalt an miR30a-3p in kolorektalen Karzinomen ist gegenüber dem gesunden Gewebe vermindert (Ma 2012). In Harnblasenkarzinomen führt eine Erniedrigung von miR30a-3p außerdem zu einem Anstieg von Keratin 7, welches in Harnblasenkarzinomen verglichen mit dem Normalgewebe überexprimiert ist (Ichimi 2009). Wie oben bereits beschrieben wirkt auch miR184 als Tumorsuppressor (Foley 2010).

Ob sich diese Unterschiede auch in morphologischer Hinsicht und in Bezug auf die klinische Krankheitsprogression auswirken, bedarf weiterer Untersuchungen.

BCL6-Translokationen gingen nicht mit Änderungen der microRNA-Signatur in Richtung einer germinalen oder postgerminalen Differenzierung einher.

Wang et al. haben die Tumorzellen von 16 Patienten mit follikulären Lymphomen auf ihr microRNA-Expressionsmuster untersucht und mit denen von Zellen follikulärer Hyperplasien verglichen (Wang 2012b). Sie haben dabei eine Anzahl von 133 signifikant unterschiedlich exprimierten microRNAs gefunden und mit Hilfe von 44 microRNAs eine microRNA-Signatur follikulärer Lymphome erstellt. Untersuchungen des microRNA-Status verschiedener Subtypen follikulärer Lymphome sind derzeit noch nicht veröffentlicht worden. In unserer Studie wurden die microRNA-Signaturen von 14 typischen follikulären Lymphomen, 15 BCL6 positiven follikulären Lymphomen und fünf nicht neoplastisch veränderten Lymphknoten ermittelt und miteinander verglichen. Dafür wurden die miRNA-Signaturen Mittelwert-zentriert und durch die „complete linkage“-Methode gruppiert, um zu überprüfen, welche Gruppen sich mittels des unüberwachten Gruppierens (unsupervised clustering) bildeten. Das unüberwachte Gruppieren ergab zwei Gruppen mit jeweils ähnlichen microRNA-Expressionsprofilen. Diese zwei ermittelten Gruppen zeigten jedoch keine Übereinstimmung mit dem molekularen BCL6- oder BCL2-Status. Auch der Vergleich morphologischer und immunhistochemischer Parameter erbrachte keine signifikanten Unterschiede der beiden Cluster. In einem weiteren Schritt wurde eine Gruppierung keimzentrumsspezifischer microRNAs vorgenommen (16 keimzentrumsspezifische microRNAs nach Tan 2009). Die BCL6 translozierten Fälle zeigten dabei keine microRNA-Expressionsmuster im Sinne einer germinalen oder postgerminalen Differenzierung. Auch eine Differenzierung von BCL6 positiven und BCL6 negativen follikulären Lymphomen oder Rückschlüsse auf morphologische und immunhistochemische Eigenschaften waren so nicht möglich.

Daraus lässt sich folgern, dass mit Hilfe der von uns untersuchten 376 microRNAs keine Rückschlüsse auf eventuell vorhandene BCL6- und BCL2-Translokationen möglich sind beziehungsweise, dass BCL6-Rearrangements mit keinen einheitlichen Veränderungen des microRNA-Status einhergehen. Möglicherweise ließe sich anhand einer größeren Anzahl von microRNAs eine charakteristische Signatur BCL6 positiver FL und anderer Subtypen des follikulären Lymphoms erstellen. Wang et al. hatten 2012 beispielsweise mit 851 untersuchten microRNAs ein mehr als doppelt so großes Repertoire von microRNAs zur Verfügung.

6. Zusammenfassung

Follikuläre Lymphome sind mit einem Anteil von etwa 22% die zweithäufigsten Non-Hodgkin Lymphome. Der Erkrankung verläuft zumeist indolent und wird zu einem Großteil erst in bereits fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Die mediane Überlebenszeit beträgt dabei circa 10 Jahre. Die charakteristische genetische Alteration ist die Translokation t(14;18), wodurch eine Überexpression des antiapoptotisch wirkenden bcl2-Proteins entsteht. In 5-15 % aller follikulären Lymphome liegen Rearrangements des BCL6-Genlocus auf Chromosom 3q27 vor. Dieser kodiert für einen Transkriptionsrepressor, der die Funktion von Keimzentrum-B-Zellen reguliert. Ziel dieser Studie war es zu prüfen, welchen Einfluss BCL6-Translokationen auf den Phänotyp und die Expression von microRNAs bei follikulären Lymphomen haben.

Die Mehrheit der untersuchten allgemeinen, morphologischen und immunhistochemischen Merkmale ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen BCL6 translozierten und typischen FL. Die BCL6 translozierten Fälle unterschieden sich signifikant von typischen follikulären Lymphomen in vier untersuchten Parametern. So waren die CD23 positiven FDC-Netzwerke und die Reaktivität für CD10 bei den BCL6 positiven Fällen deutlich geringer ausgeprägt. Die Proliferationsaktivität, bezogen sowohl auf das gesamte Tumorareal als auch das Gebiet mit der höchsten Zellteilungsrate, war hingegen bei den Fällen mit Rearrangement des 3q27 Genlocus signifikant höher.

Es wurden die microRNA-Signaturen von 14 typischen follikulären Lymphomen, 15 BCL6 positiven follikulären Lymphomen und fünf nicht neoplastisch veränderten Lymphknoten erstellt und miteinander verglichen. Dabei waren tendenziell Oncomirs (z.B. miR21, miR197) bei den BCL6 positiven FL ohne gleichzeitige Translokation t(14;18) im Vergleich zu den typischen FL hochreguliert und tumorsupprimierende miRNAs (miR28, miR30a-3p, miR184) vermindert exprimiert. Unüberwachtes Gruppieren (unsupervised clustering) ergab zwei Cluster mit jeweils ähnlichen microRNA-Expressionsprofilen, wobei diese zwei Gruppen nicht mit dem molekularen BCL6- oder BCL2-Status übereinstimmten und keine signifikanten morphologischen und immunhistochemischen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen detektierbar waren. Die BCL6 translozierten Fälle zeigten keine microRNA-Expressionsmuster im Sinne einer germinalen oder postgerminalen Differenzierung und BCL6-Rearrangements gingen mit keinen einheitlichen Veränderungen des microRNA-Status einher. Demnach können mittels der 376 von uns untersuchten microRNAs keine Rückschlüsse auf die Existenz von BCL6- und BCL2-Translokationen gezogen werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3'untranslated region
Abb.	Abbildung
ABR	Alternative breakpoint region
AKT2	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Adenomatous polyposis coli
ASF/SF2	Alternative splicing factor/splicing factor 2
ATRA	All-trans-Retinsäure
BCL2, BCL6	B-cell lymphoma 2 bzw. 6 Gen
bcl2, bcl6	B-cell lymphoma 2 bzw. 6 Protein
BCL2+, BCL6+	Fälle mit nachgewiesenem Bruchereignis im BCL2- bzw. BCL6-Gen
BCL2-, BCL6-	Fälle ohne Bruchereignis im BCL2- bzw. BCL6-Gen
CCND3	Cyclin D3
CD	Cluster of differentiation
CEP17	Zentromer auf Chromosom 17
C-MYC	C-Myc-Protoonkogen
CT	Cycle threshold
DAB	Diaminobenzidin
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
FL	Follikuläres Lymphom
FDC	Follikuläre dendritische Retikulumzellen
FUS 1	Nuclear fusion protein FUS1
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF-1alpha	Hypoxia-inducible factor 1alpha
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HL	Hodgkin-Lymphom
hpf	High power field (gemäß WHO 0,159 mm ²)
ID1	Inhibitor of differentiation 1
IgH	Immunglobulin schwere Ketten
ILSG	International Lymphoma Study Group
JAK2	Janus Kinase 2
LLRC4	Leucine-rich Repeat containing 4
MBR	Major breakpoint region
MIB1	Antikörper, der an das proliferationsassoziierte Ki-67-Antigen bindet

MiRNA	MicroRibonukleinsäure
MTSS1	Metastasis suppressor 1
MYCN	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
NFYB	Nuclear transcription factor Y subunit beta
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
nt	Nukleotid(e)
NTRK3	Neutrophin-3 Rezeptor Gen
PDCD 4	Programmed cell death protein 4
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
REF	Referenzgruppe (BCL2+ BCL6-, Grad1 oder 2, diffuse Areale < 30% der Gesamttumorfläche)
RKIP	Raf kinase inhibitory protein
ROCK-1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
SPRY1, -2	Sprouty homolog 1, -2
SPSS	Statistikprogramm SPSS
SSC	Saline sodium citrate buffer (Pufferlösung)
t(14;18)	Translokation (14;18)
Tab.	Tabelle
t-FL	Transformiertes follikuläres Lymphom
TP53	Tumor Protein p53
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
WHO	World Health Organization

8. Literaturverzeichnis

Akasaka H, Akasaka T, Kurata M, Ueda C, Shimizu A, Uchiyama T, Ohno H (2000): Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res* 60(9):2335-41

Akasaka T, Lossos IS, Levy R (2003): BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* 102(4):1443-8

Albinger-Hegyi A, Hochreutener B, Abdou MT, Hegyi I, Dours-Zimmermann MT, Kurrer MO, Heitz PU, Zimmermann DR (2002): High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas: improved polymerase chain reaction protocols for their detection. *Am J Pathol* 160(3):823-32

Almeida MI, Nicoloso MS, Zeng L, Ivan C, Spizzo R, Gafà R, Xiao L, Zhang X, Vannini I, Fanini F, Fabbri M, Lanza G, Reis RM, Zweidler-McKay PA, Calin GA (2012): Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 142(4):886-896

Allman D, Jain A, Dent A, Maile RR, Selvaggi T, Kehry MR, Staudt LM (1996): BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* 87(12):5257-68

Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD (1998): Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* 9(7):717-20

Aster JC, Longtine JA (2002): Detection of BCL2 rearrangements in follicular lymphoma. *Am J Pathol* 2002 160(3):759-63

Bachy E, Brice P, Delarue R, Brousse N, Haioun C, Le Gouill S, Delmer A, Bordessoule D, Tilly H, Corront B, Allard C, Foussard C, Bosly A, Coiffier B, Gisselbrecht C, Solal-

Celigny P, Salles G (2010): Long-term follow-up of patients with newly diagnosed follicular lymphoma in the prirituximab era: effect of response quality on survival--A study from the groupe d'etude des lymphomes de l'adulte. *J Clin Oncol* 28(5):822-9

Basso K, Saito M, Sumazin P, Margolin AA, Wang K, Lim WK, Kitagawa Y, Schneider C, Alvarez MJ, Califano A, Dalla-Favera R (2010): Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* 115(5):975-84

Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, Fruchart C, Duval C, Monconduit M, Tilly H (1994): LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* 83(9):2423-7

Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ (2007): Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 21(1):18-29

Besson H, Brennan P, Becker N, De Sanjosé S, Nieters A, Font R, Maynadié M, Foretova L, Cocco PL, Staines A, Vornanen M, Boffetta P (2006): Tobacco smoking, alcohol drinking and Hodgkin's lymphoma: a European multi-centre case-control study (EPILYMPH). *Br J Cancer* 95(3):378-84

Bonnet C, Beguin Y, Deprijck B, de Leval L, Fillet G (2009): Current treatment of follicular lymphoma. *Rev Med Suisse* 5(214):1663-7

Bonzheim I, Salaverria I, Haake A, Gastl G, Adam P, Siebert R, Fend F, Quintanilla-Martinez L (2011): A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma. *Blood* 118(12):3442-4

Bosga-Bouwer AG, van Imhoff GW, Boonstra R, van der Veen A, Haralambieva E, van den Berg A, de Jong B, Krause V, Palmer MC, Coupland R, Kluin PM, van den Berg E, Poppema S (2003): Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined

subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood* 101(3):1149-54

Buechner J, Tømte E, Haug BH, Henriksen JR, Løkke C, Flægstad T, Einvik C (2011): Tumour-suppressor microRNAs let-7 and mir-101 target the proto-oncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma. *Br J Cancer* 105(2):296-303

Buscaglia LE, Li Y (2011): Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer* 30(6):371-80

Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, (2005): A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353(17):1793-801

Calin GA, Croce CM (2006): MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6(11):857-66

Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R (1995): BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86(1):45-53

Chang CC, Ye BH, Chaganti RS, Dalla-Favera R (1996): BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(14):6947-52

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005): Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33(20):e179

Chiu BC, Dave BJ, Blair A, Gapstur SM, Zahm SH, Weisenburger DD (2006): Agricultural pesticide use and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 108(4):1363-9

Christie L, Kernohan N, Levison D, Sales M, Cunningham J, Gillespie K, Batstone P, Meiklejohn D, Goodlad J (2008): C-MYC translocation in t(14;18) positive follicular lymphoma at presentation: An adverse prognostic indicator? *Leuk Lymphoma* 49(3):470-6

Cleary ML, Sklar J (1985): Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(21):7439-43

Cleary ML, Galili N, Sklar J (1986a): Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphomas. *J Exp Med* 164(1):315-20

Cleary ML, Smith SD, Sklar J (1986b): Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47(1):19-28

Cowland JB, Hother C, Grønbaek K (2007): MicroRNAs and cancer. *APMIS* 115(10):1090-106

DeLong EF, Wickham GS, Pace NR: Phylogenetic stains (1989) : Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243(4896):1360-3

de Jong D (2005): Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol* 23(26):6358-63

de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, Sander B, Thorns C, Campo E, Molina T, Hagenbeek A, Horning S, Lister A, Raemaekers J, Salles G, Gascoyne R, Weller E (2008): Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications. A study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium (LLBC). *J Clin Oncol* 25(7):805-12

de Sanjosé S, Benavente Y, Nieters A, Foretova L, Maynadié M, Cocco PL, Staines A, Vornanen M, Boffetta P, Becker N, Alvaro T, Brennan P (2006): Association between

personal use of hair dyes and lymphoid neoplasms in Europe. *Am J Epidemiol* 164(1):47-55

Du L, Schageman JJ, Subauste MC, Saber B, Hammond SM, Prudkin L, Wistuba II, Ji L, Roth JA, Minna JD, Pertsemlidis A (2009): miR-93, miR-98, and miR-197 regulate expression of tumor suppressor gene FUS1. *Mol Cancer Res* 7(8):1234-43

Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2003): MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 5(1):R1

Foley NH, Bray IM, Tivnan A, Bryan K, Murphy DM, Buckley PG, Ryan J, O'Meara A, O'Sullivan M, Stallings RL (2010): MicroRNA-184 inhibits neuroblastoma cell survival through targeting the serine/threonine kinase AKT2. *Mol Cancer* 9:83

Forero-Torres A, de Vos S, Pohlman BL, Pashkevich M, Cronier DM, Dang NH, Carpenter SP, Allan BW, Nelson JG, Slapak CA, Smith MR, Link BK, Wooldridge JE, Ganjoo KN (2012): Results of a Phase 1 Study of AME-133v (LY2469298), an Fc-Engineered Humanized Monoclonal Anti-CD20 Antibody, in FcγRIIIa-Genotyped Patients with Previously Treated Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res* 18(5):1395-1403

Freedman AS (2005): Biology and management of histologic transformation of indolent lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 314–320

Fuse M, Kojima S, Enokida H, Chiyomaru T, Yoshino H, Nohata N, Kinoshita T, Sakamoto S, Naya Y, Nakagawa M, Ichikawa T, Seki N (2012): Tumor suppressive microRNAs (miR-222 and miR-31) regulate molecular pathways based on microRNA expression signature in prostate cancer. *J Hum Genet* doi: 10.1038/jhg.2012.95. [Epub ahead of print]

Gao W, Xu J, Liu L, Shen H, Zeng H, Shu Y (2012): A systematic-analysis of predicted miR-21 targets identifies a signature for lung cancer. *Biomed Pharmacother* 66(1):21-8

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al.(1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*

Giné E, Gutiérrez-García G, López-Guillermo A (2010): Current immunochemotherapy strategies in follicular lymphoma. *Adv Ther* 27(10):704-13

Gollub W, Stassek B, Huckhagel T, Bernd HW, Krokowski M, Merz H, Feller AC, Thorns C (2009): BCL6-translocations affect the phenotype of follicular lymphomas only in the absence of t(14;18)IgH/BCL2. *Anticancer Res* 29(11): 4649-55

Goodlad JR, Batstone PJ, Hamilton D, Hollowood K (2003): Follicular lymphoma with marginal zone differentiation: cytogenetic findings in support of a high-risk variant of follicular lymphoma. *Histopathology* 42(3):292-8

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006): miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34(Database issue):D140-4

Grulich AE, Vajdic CM (2005): The epidemiology of non-Hodgkin lymphoma. *Pathology* 37(6):409-19

Gu K, Fu K, Jain S, Liu Z, Iqbal J, Li M, Sanger WG, Weisenburger DD, Greiner TC, Aoun P, Dave BJ, Chan WC (2009): t(14;18)-negative follicular lymphomas are associated with a high frequency of BCL6 rearrangement at the alternative breakpoint region. *Mod Pathol* 22(9):1251-7

Guan P, Yin Z, Li X, Wu W, Zhou B (2012): Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 31(1):54

Guo Y, Karube K, Kawano R, Yamaguchi T, Suzumiya J, Huang GS, Ohshima K (2005): Low-grade follicular lymphoma with t(14;18) presents a homogeneous disease entity otherwise the rest comprises minor groups of heterogeneous disease entities with Bcl2 amplification, Bcl6 translocation or other gene aberrances. *Leukemia* 19(6):1058-63

Guo Y, Karube K, Kawano R, Suzumiya J, Takeshita M, Kikuchi M, Huang GS, Li Q, Ohshima K (2007): Bcl2-negative follicular lymphomas frequently have Bcl6 translocation and/or Bcl6 or p53 expression. *Pathol Int* 57(3):148-52

Hanna JA, Hahn L, Agarwal S, Rimm DL (2012): In situ measurement of miR-205 in malignant melanoma tissue supports its role as a tumor suppressor microRNA. *Lab Invest* 2012 Oct;92(10):1390-7

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84(5):1361-92

Hiddemann W, Dreyling M, Stahel RA (2005): Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of newly diagnosed follicular lymphoma. *Ann Oncol* 16(1):56-7

Hitz F, Ketterer N, Lohri A, Mey U, Pederiva S, Renner C, Taverna C, Hartmann A, Yeow K, Bodis S, Zucca E (2011): Diagnosis and treatment of follicular lymphoma. *Swiss Med Wkly* 141:w13247

Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348(6299):334-6

Horsman DE, McNeil BK, Anderson M, Shenkier T, Gascoyne RD (1995): Frequent association of t(3;14) or variant with other lymphoma-specific translocations. *Br J Haematol* 89(3):569-75

Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD (2001): Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes Cancer* 30(4):375-82

Hu H, Li S, Liu J, Ni B (2012): MicroRNA-193b modulates proliferation, migration, and invasion of non-small cell lung cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44(5):424-30

Huang L, Dai T, Lin X, Zhao X, Chen X, Wang C, Li X, Shen H, Wang X (2012): MicroRNA-224 targets RKIP to control cell invasion and expression of metastasis genes in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 25(2):127-33

Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, Kunimoto R, Chiyomaru T, Kawamoto K, Kawahara K, Toki K, Kawakami K, Nishiyama K, Tsujimoto G, Nakagawa M, Seki N (2009): Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *Int J Cancer* 125(2):345-52

Jardin F, Gaulard P, Buchonnet G, Contentin N, Leprêtre S, Lenain P, Stamatoullas A, Picquenot JM, Duval C, Parmentier F, Tilly H, Bastard C (2002): Follicular lymphoma without t(14;18) and with BCL-6 rearrangement: a lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics. *Leukemia* 16(11):2309-17

Jardin F, Ruminy P, Bastard C, Tilly H (2007): The BCL6 proto-oncogene: a leading role during germinal center development and lymphomagenesis. *Pathol Biol (Paris)* 55(1):73-83

Jian P, Li ZW, Fang TY, Jian W, Zhuan Z, Mei LX, Yan WS, Jian N (2011): Retinoic acid induces HL-60 cell differentiation via the upregulation of miR-663. *J Hematol Oncol* 4:20

Katzenberger T, Ott G, Klein T, Kalla J, Müller-Hermelink HK, Ott MM (2004): Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *Am J Pathol* 165(2):481-90

Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocq G, Bastard C (1993): LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nat Genet* 5(1):66-70

Kim VN (2005): MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 May;6(5):376-85

Kim TH, Kim YK, Kwon Y, Heo JH, Kang H, Kim G, An HJ (2010): Deregulation of miR-519a, 153, and 485-5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours. *Histopathology* 57(5):734-43

Klefstrom J, Franssila K, Peltomäki P, Kaartinen M, Solin ML, Knuutila S (1994): Major and minor breakpoint sites of chromosomal translocation t(14;18) in subtypes of non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res* 18(4):245-50

Küppers R (2004): Prognosis in follicular lymphoma--it's in the microenvironment. *N Engl J Med* 351(21):2152-3

Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CD, Palazzo S, Paterson JC (2007): MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer* 121(5):1156-61

Lawrie CH, Chi J, Taylor S, Tramonti D, Ballabio E, Palazzo S (2009): Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma. *J Cell Mol Med* 13(7):1248-60.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5):843-54

Lee YS, Dutta A (2009): MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 4:199-227

Leich E, Ott G, Rosenwald A (2011): Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL. *Best Pract Res Clin Haematol* 24(2):95-109

Lehmann U, Streichert T, Otto B, Albat C, Hasemeier B, Christgen H, Schipper E, Hille U, Kreipe HH, Länger F (2010): Identification of differentially expressed microRNAs in human male breast cancer. *BMC Cancer* 10:109

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120(1):15-20

Li XF, Yan PJ, Shao ZM (2009): Downregulation of miR-193b contributes to enhance urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression and tumor progression and invasion in human breast cancer. *Oncogene* 28(44):3937-48

Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, Schuurin E, Kluin PM (1995): Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 85(9):2528-36

Ling H, Zhang W, Calin GA (2011): Principles of microRNA involvement in human cancers. *Chin J Cancer* 30(11):739-48

Liu X, Lv XB, Wang XP, Sang Y, Xu S, Hu K, Wu M, Liang Y, Liu P, Tang J, Lu WH, Feng QS, Chen LZ, Qian CN, Bei JX, Kang T, Zeng YX (2012): MiR-138 suppressed

nasopharyngeal carcinoma growth and tumorigenesis by targeting the CCND1 oncogene. *Cell Cycle* 11(13):2495-506

Lossos IS, Gascoyne RD (2011): Transformation of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 24(2):147-63

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mark RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005): MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(7043):834-8

Ma Y, Zhang P, Yang J, Liu Z, Yang Z, Qin H (2012): Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: systematic review profiling studies and experimental validation. *Int J Cancer* 130(9):2077-87

Mees ST, Mardin WA, Sielker S, Willscher E, Senninger N, Schleicher C, Colombo-Benkmann M, Haier J (2009): Involvement of CD40 targeting miR-224 and miR-486 on the progression of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Ann Surg Oncol* 16(8):2339-50

Meng DM, Miao ZM (2008): Research Progress of microRNAs and human hematological diseases – review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 16(4):979-83

Morton LM, Hartge P, Holford TR, Holly EA, Chiu BC, Vineis P, Stagnaro E, Willett EV, Franceschi S, La Vecchia C, Hughes AM, Cozen W, Davis S, Severson RK, Bernstein L, Mayne ST, Dee FR, Cerhan JR, Zheng T (2005): Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (interlymph). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(4):925-33

Nambiar M, Raghavan SC (2012): Mechanism of Fragility at BCL2 Gene Minor Breakpoint Cluster Region during t(14;18) Chromosomal Translocation. *J Biol Chem* 287(12):8688-70

Navarro A, Diaz T, Martinez A, Gaya A, Pons A, Gel B, Codony C, Ferrer G, Martinez C, Montserrat E, Monzo M (2009): Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 114(14):2945-51

Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE (2008): MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab* 93(5):1600-8

Ohno H, Fukuhara S (1997): Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leuk Lymphoma* 27(1-2):53-63

O'Shea D, O'Riain C, Taylor C, Waters R, Carlotti E, Macdougall F, Gribben J, Rosenwald A, Ott G, Rimsza LM, Smeland EB, Johnson N, Campo E, Greiner TC, Chan WC, Gascoyne RD, Wright G, Staudt LM, Lister TA, Fitzgibbon J (2008): The presence of TP53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. *Blood* 112(8):3126-9

Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert JP, Jaffe ES, Raffeld M (1995): Analysis of LAZ3 (BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. *Blood* 85(10):2877-84

Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rüdiger T, Wilhelm M, Kalla J, Rosenwald A, Müller JG, Ott MM, Müller-Hermelink HK (2002): Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 99(10):3806-12

Park C-S, Choi YS (2005): How do follicle dendritic cells interact intimately with B-cells in the germinal center? *Immunology* 114(1): 2–10

Phan RT, Dalla-Favera R (2004): The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432(7017):635-9

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W (2005): Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309(5740):1573-6

Prochazka V, Papajik T, Jarosova M, Indrak K (2011): Prognostic factors in follicular lymphoma in the rituximab era: how to identify a high-risk patient? Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 155(2):99-108

Rizzo M, Evangelista M, Simili M, Mariani L, Pitto L, Rainaldi G (2011): Immortalization of MEF is characterized by the deregulation of specific miRNAs with potential tumor suppressor activity. Aging (Albany NY) 3(7):665-71

Roehle A, Hoefig KP, Repsilber D, Thorns C, Ziepert M, Wesche KO, Thiere M, Loeffler M, Klapper W, Pfreundschuh M, Matolcsy A, Bernd HW, Reiniger L, Merz H, Feller AC (2008): MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. Br J Haematol 142(5):732-44

Ross JS (2010): Measuring circulating miRNAs: the new "PSA" for Breast Cancer? Oncologist 15(7):656

Rothschild SI, Tschan MP, Jaggi R, Fey MF, Gugger M, Gautschi O (2012): MicroRNA-381 represses ID1 and is deregulated in lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol 7(7):1069-77

Rushworth SA (2011): Targeting the oncogenic role of miRNA in human cancer using naturally occurring compounds. Br J Pharmacol 162(2):346-8

Salaverria I, Siebert R (2011): Follicular lymphoma grade 3B. Best Pract Res Clin Haematol 24(2):111-9

Salles GA (2007): Clinical features, prognosis and treatment of follicular lymphoma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 216-25

Schüler F, Hirt C, Dölken G (2003): Chromosomal translocation t(14;18) in healthy individuals. Semin Cancer Biol 13(3):203-9

Sinkovics JG (2012): Molecular biology of oncogenic inflammatory processes. I. Non-oncogenic and oncogenic pathogens, intrinsic inflammatory reactions without pathogens, and microRNA/DNA interactions (Review). *Int J Oncol* 40(2):305-49

Slack GW, Gascoyne RD (2011): MYC and aggressive B-cell lymphomas. *Adv Anat Pathol* 18(3):219-28

Song T, Zhang X, Wang C, Wu Y, Cai W, Gao J, Hong B (2011): MiR-138 suppresses expression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in clear cell renal cell carcinoma 786-O cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2(5):1307-11

Staudt LM, Dent AL, Shaffer AL, Yu X (1999): Regulation of lymphocyte cell fate decisions and lymphomagenesis by BCL-6. *Int Rev Immunol* 18(4):381-403

Stewart BW, Kleihues P (2003): *World Cancer Report*. IARC Press

Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM (2005): Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 123(6):1133-46

Su J, Zhang A, Shi Z, Ma F, Pu P, Wang T, Zhang J, Kang C, Zhang Q (2012): MicroRNA-200a suppresses the Wnt/ β -catenin signaling pathway by interacting with β -catenin. *Int J Oncol* 40(4):1162-70

Swenson WT, Wooldridge JE, Lynch CF, Forman-Hoffman VL, Chrischilles E, Link BK (2005): Improved survival of follicular lymphoma patients in the United States. *J Clin Oncol* 23(22):5019-26

Tan LP, Wang M, Robertus JL, Schakel RN, Gibcus JH, Diepstra A, Harms G, Peh SC, Reijmers RM, Pals ST, Kroesen BJ, Kluin PM, Poppema S, van den Berg A (2009): miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes. *Laboratory Investigation* 89:708-716

Tang H, Liu X, Wang Z, She X, Zeng X, Deng M, Liao Q, Guo X, Wang R, Li X, Zeng F, Wu M, Li G (2011): Interaction of hsa-miR-381 and glioma suppressor LRRC4 is involved in glioma growth. *Brain Res* 1390:21-32

The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997): A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 89(11):3909-18

Thorns C, Kalies K, Fischer U, Höfig K, Krokowski M, Feller AC, Merz H, Bernd HW (2007): Significant high expression of CD23 in follicular lymphoma of the inguinal region. *Histopathology* 50(6):716-9

Thorns C, Bernd HW, Krokowski M, Feller AC (2008): Preservation of follicle mantle in follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma* 49(1):166-7

Thorns C (2009): Das follikuläre Lymphom . Eine morphologische, immunhistochemische und molekulare Analyse. Med. Habil. Schr. Lübeck

Tosi P, Leoncini L, Spina D, del Vecchio MT (1984) :Morphometric nuclear analysis of lymphoid cells in center cell lymphomas and in reactive germinal centers. *Am J Pathol* 117(1):12-7

Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985): The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 229(4720):1390-3

Ueno K, Hirata H, Shahryari V, Chen Y, Zaman MS, Singh K, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R (2011): Tumour suppressor microRNA-584 directly targets oncogene Rock-1 and decreases invasion ability in human clear cell renal cell carcinoma. *Br J Cancer* Jan 104(2):308-15

Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335(6189):440-2

Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, Siebert R (2006): FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 8(2):141-51

Viardot A, Möller P, Högel J, Werner K, Mechttersheimer G, Ho AD, Ott G, Barth TF, Siebert R, Gesk S, Schlegelberger B, Döhner H, Bentz M (2002): Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 20(23):4523-30

Vidal L, Gafter-Gvili A, Salles G, Dreyling MH, Ghielmini M, Hsu Schmitz SF, Pettengell R, Witzens-Harig M, Shpilberg O (2011): Rituximab maintenance for the treatment of patients with follicular lymphoma: an updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 103(23):1799-806

Vose JM, Chiu BC, Cheson BD, Dancey J, Wright J (2002): Update on epidemiology and therapeutics for non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 241-62

Wang W, Zhao LJ, Tan YX, Ren H, Qi ZT (2012a): MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 33(5):1113-20

Wang W, Corrigan-Cummins M, Hudson J, Maric I, Simakova O, Neelapu SS, Kwak LW, Janik JE, Gause B, Jaffe ES, Calvo KR (2012b): MicroRNA profiling of follicular lymphoma identifies microRNAs related to cell proliferation and tumor response. *Haematologica* 97(4):586-94

Wang W, Zhao LJ, Tan YX, Ren H, Qi ZT (2012c): Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 18(38):5442-53

Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75(5):855-62

Wu L, Fan J, Belasco JG (2006): MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(11):4034-9

Wu H, Huang M, Cao P, Wang T, Shu Y, Liu P (2012): MiR-135a targets JAK2 and inhibits gastric cancer cell proliferation. *Cancer Biol Ther* 13(5):281-8

Xie C, Jiang XH, Zhang JT, Sun TT, Dong JD, Sanders AJ, Diao RY, Wang Y, Fok KL, Tsang LL, Yu MK, Zhang XH, Chung YW, Ye L, Zhao MY, Guo JH, Xiao ZJ, Lan HY, Ng CF, Lau KM, Cai ZM, Jiang WG, Chan HC (2012a): CFTR suppresses tumor progression through miR-193b targeting urokinase plasminogen activator (uPA) in prostate cancer. *Oncogene* doi: 10.1038/onc.2012.251. [Epub ahead of print]

Xie H, Zhao Y, Caramuta S, Larsson C, Lui WO (2012b): miR-205 Expression Promotes Cell Proliferation and Migration of Human Cervical Cancer Cells. *PLoS One* 7(10):e46990

Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R (1993): Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262(5134):747-50

Ye BH, Chaganti S, Chang CC, Niu H, Corradini P, Chaganti RS, Dalla-Favera R (1995): Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J* 14(24):6209-17

Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, Leung C, Nouri-Shirazi M, Orazi, A, Chaganti RS, Rothmann P, Stall AM, Pandolfi PP, Dalla-Favera R (1997): The BCL6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 16(2):161-70

Yuen AR, Kamel OW, Halpern J, Horning SJ (1995): Long-term survival after histologic transformation of low-grade follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 13:1726–1733.

Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A (1982): Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 307(20):1231-6

Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M (1987): Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med* 316(2):79-8

Zheng D, Haddadin S, Wang Y, Gu LQ, Perry MC, Freter CE, Wang MX (2011): Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 4(6):575-86

Zhou Y, Chen L, Barlogie B, Stephens O, Wu X, Williams DR (2010): High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(17):7904-9.

Zhou KS, Yu Z, Yi SH, Li ZJ, An G, Wang YY, Zou DH, Qi JY, Zhao YZ, Song YP, Qiu LG (2011): Expression of microRNA-223 and its clinical value in B lymphoproliferative disorders. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 91(34):2384-7

Zhou W, Li X, Liu F, Xiao Z, He M, Shen S, Liu S (2012): MiR-135a promotes growth and invasion of colorectal cancer via metastasis suppressor 1 in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 4(10):838-46

Bücher:

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardimann JW: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. 4. Auflage 160 ff International Agency for Research on Cancer, Lyon (2008)

Webseiten:

<http://www.mirbase.org/> (Tag des Zugriffs 01.10.2012)

9. Anhänge

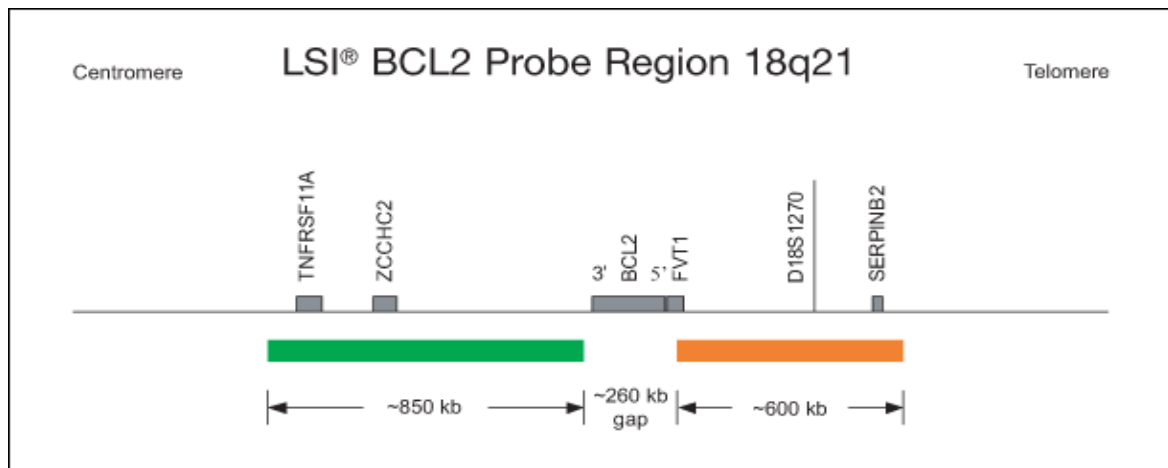


Abbildung 18: Chromosomale Lokalisation der Bruch-Sonde für den BCL2-Genlocus auf 18q21. Abbildung von http://www.abbottmolecular.com/HematologyProbes_5284.aspx

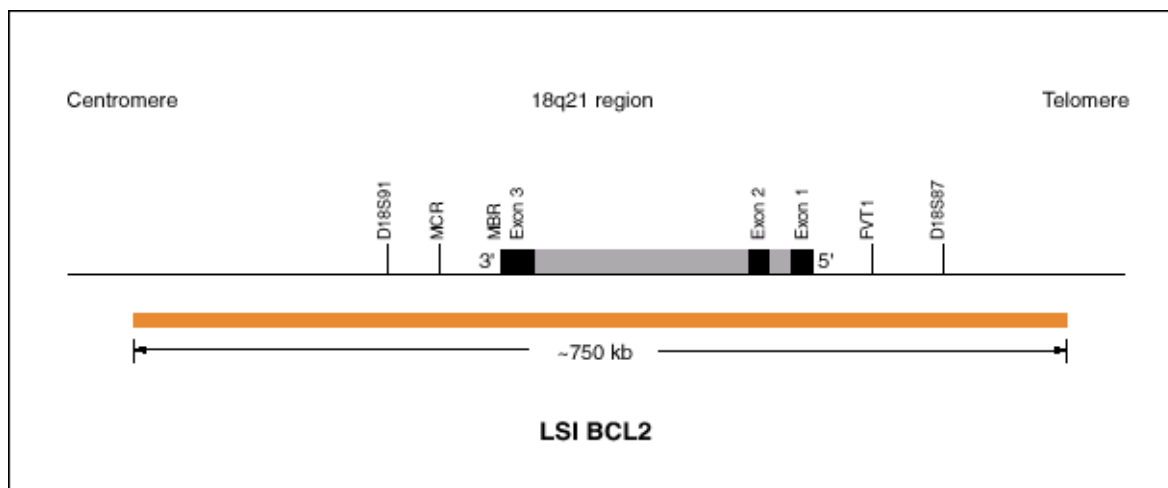


Abbildung 19: Chromosomale Lokalisation der Fusionssonde für den BCL2-Genlocus (18q21). Abbildung von http://www.abbottmolecular.com/HematologyProbes_5284.aspx

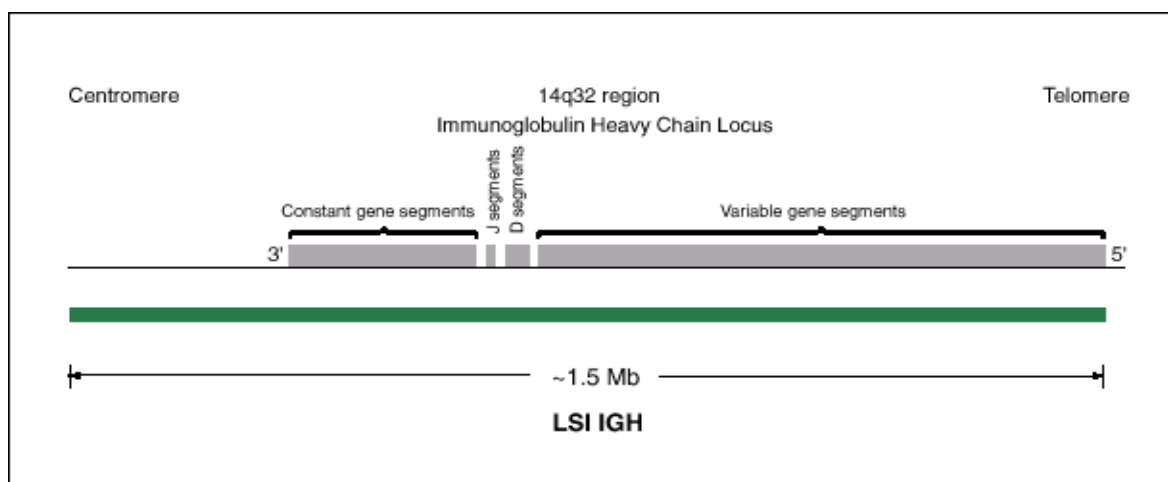


Abbildung 20: Chromosomale Lokalisation der Fusionssonde für den IgH-Genlocus (14q32). Abbildung von http://www.abbottmolecular.com/HematologyProbes_5284.aspx

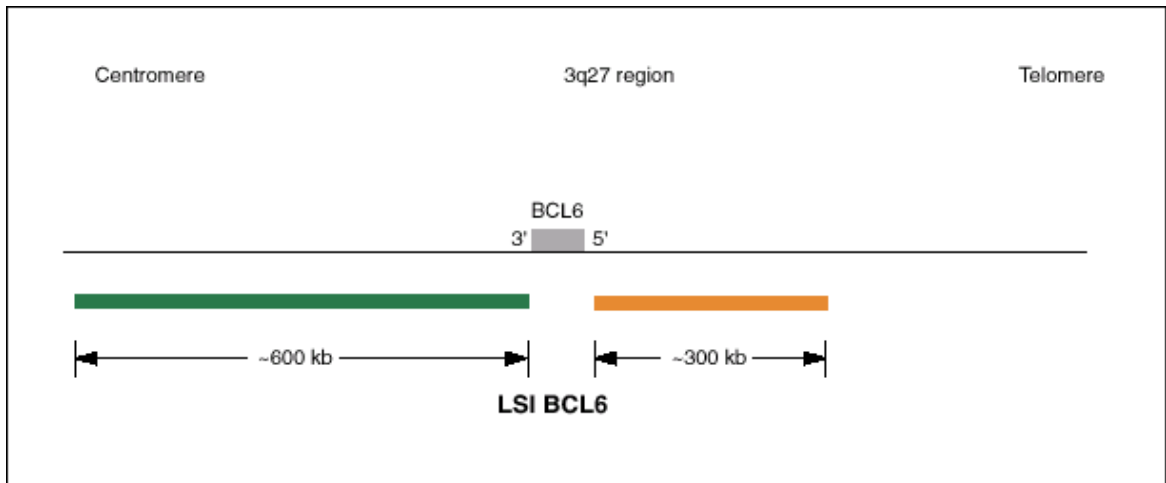
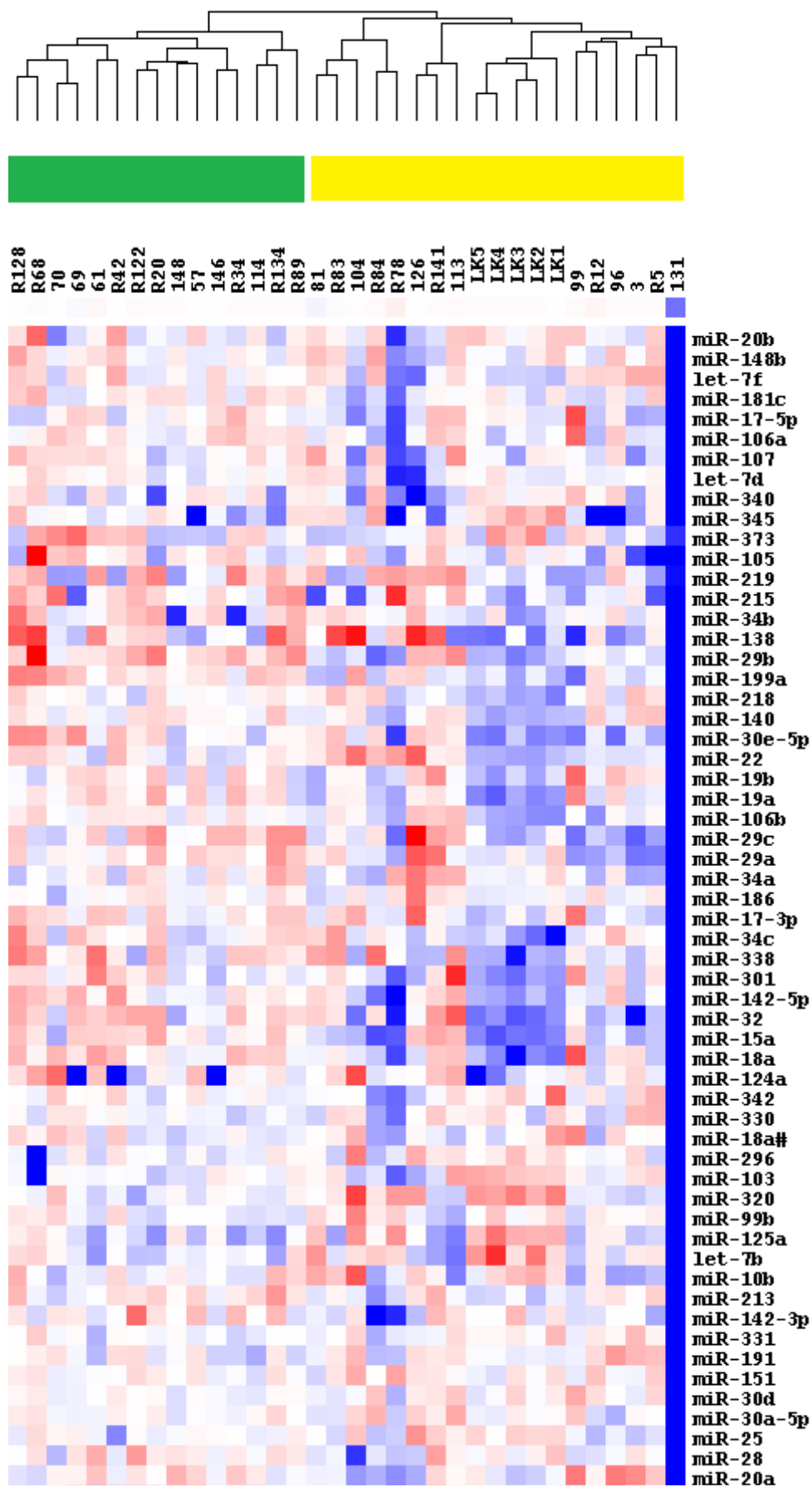
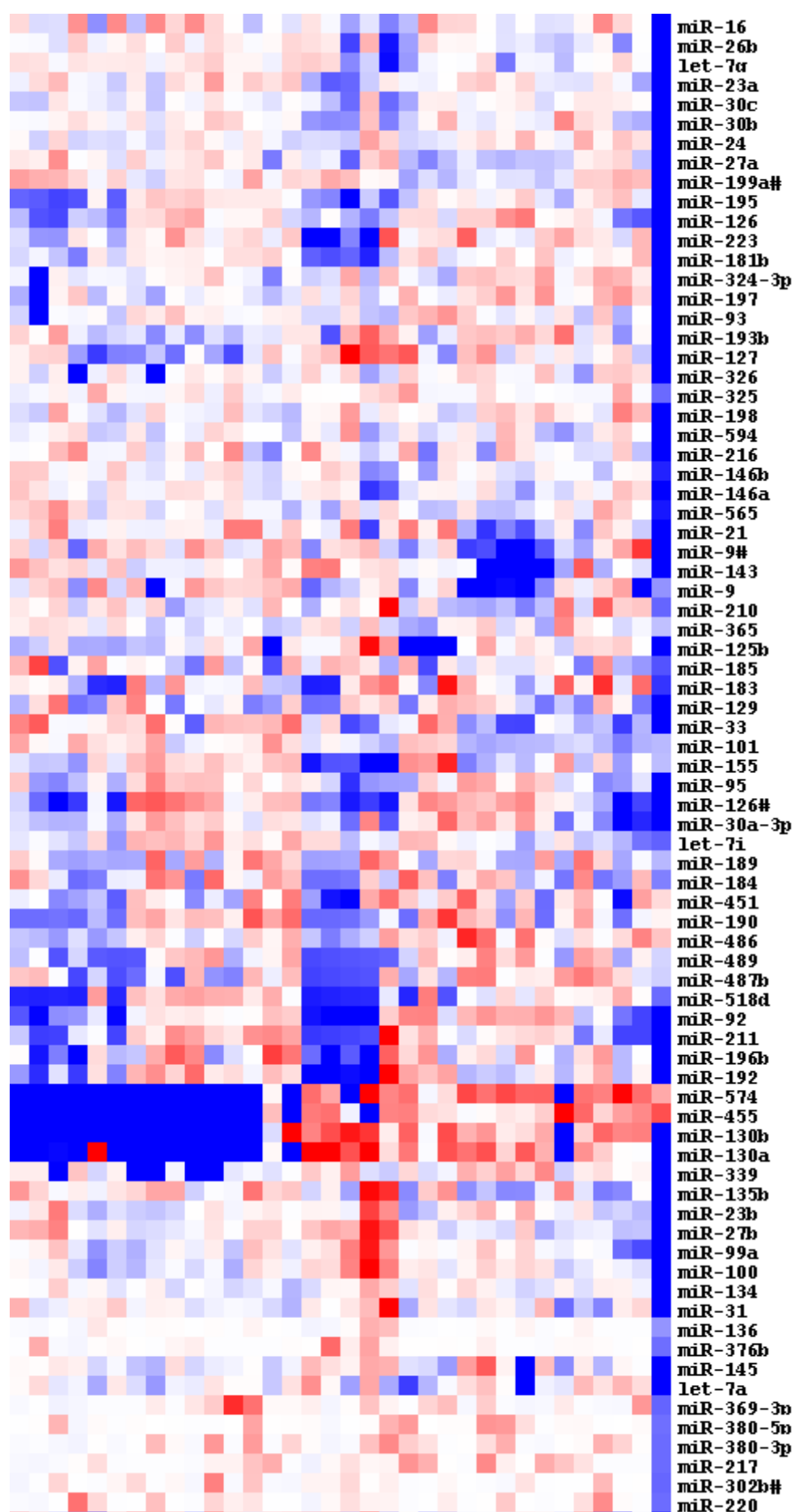
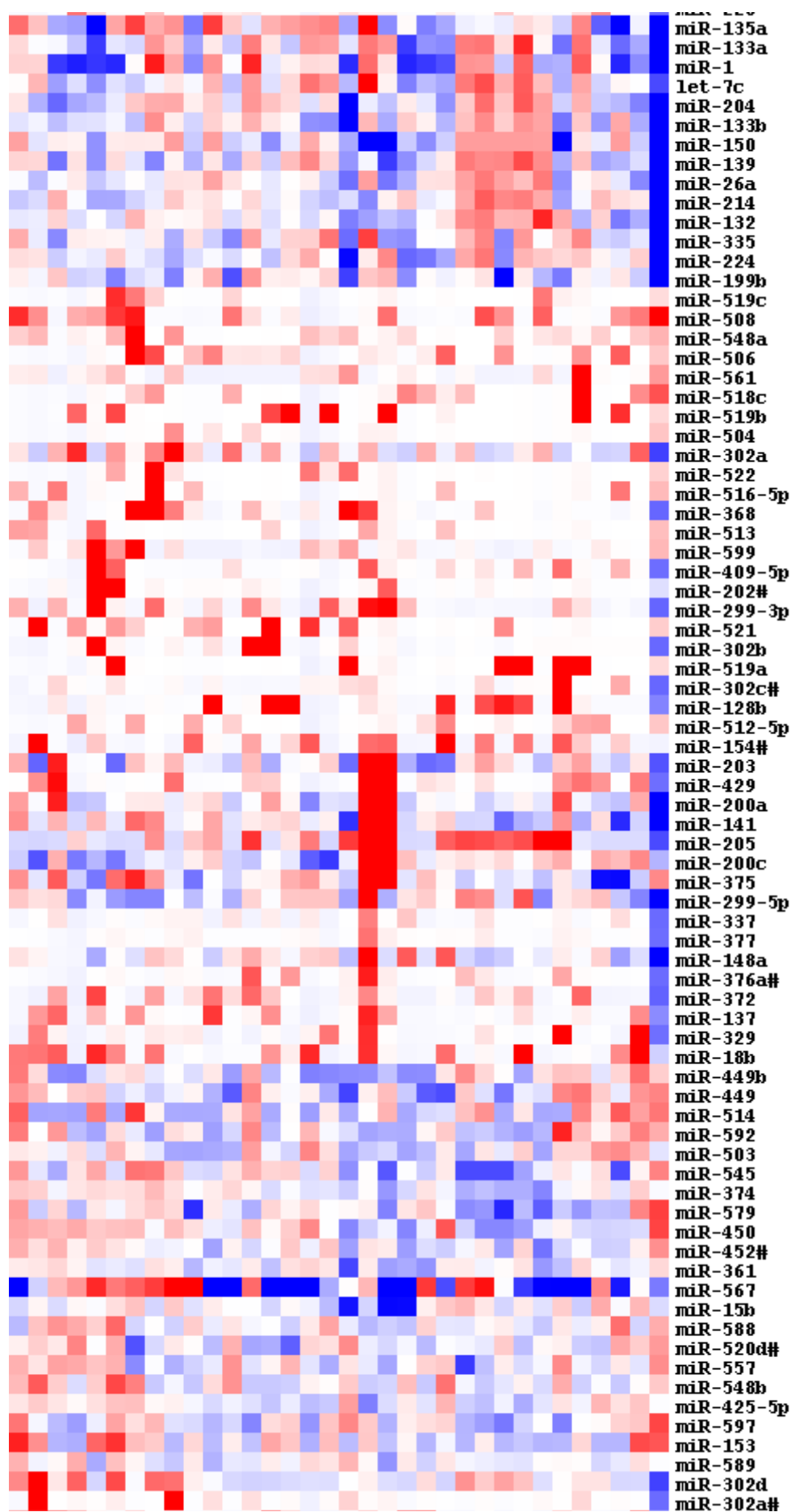
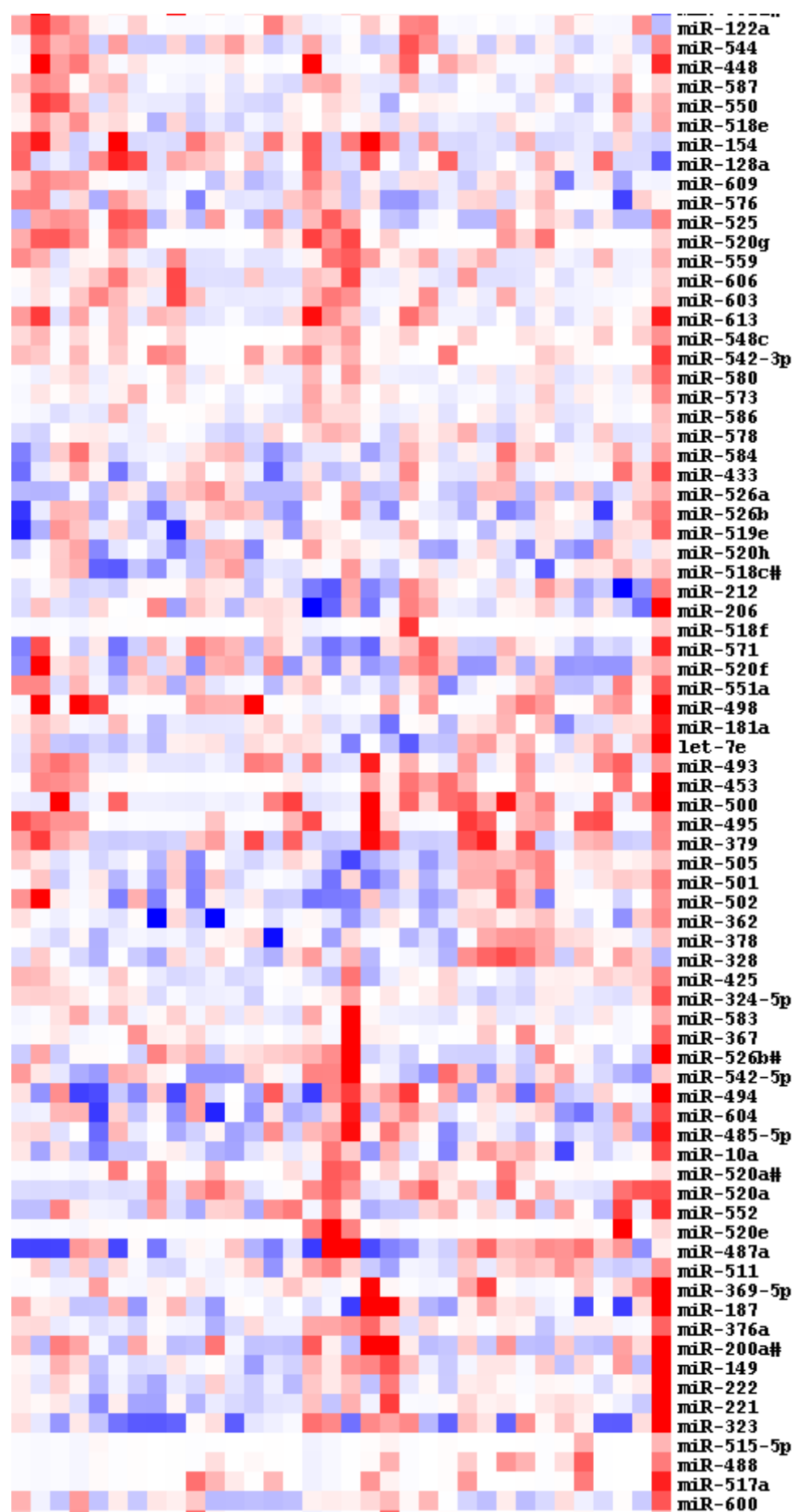


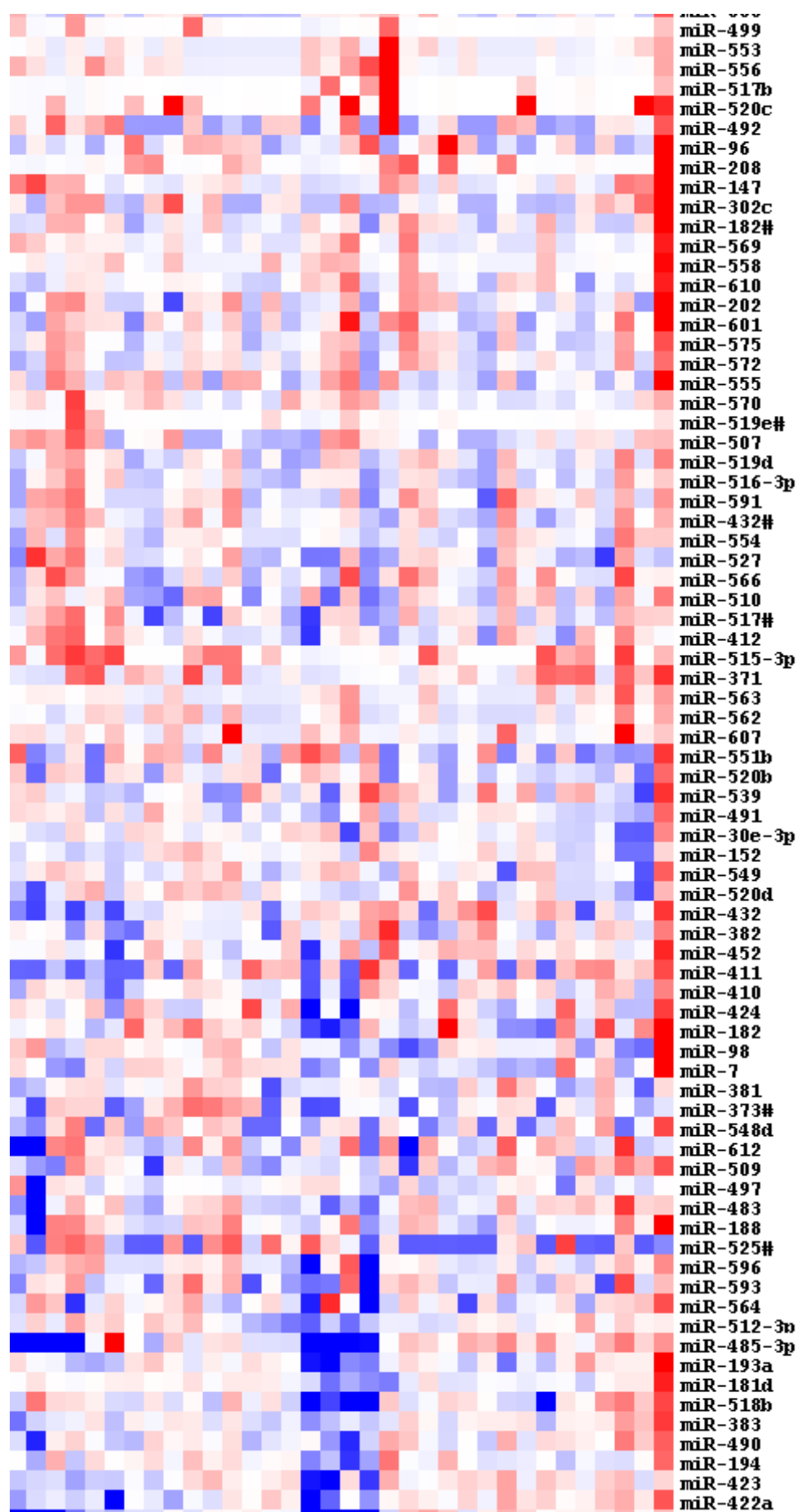
Abbildung 21: Chromosomale Lokalisation der Bruch-Sonde für den BCL6-Genlocus auf 3q27. Abbildung von http://www.abbottmolecular.com/HematologyProbes_5284.aspx











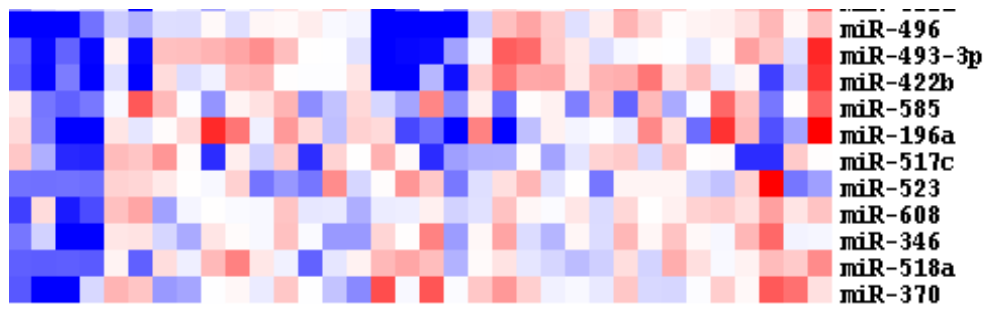


Abbildung 22: Gruppierung von 29 follikulären Lymphomen und 5 Lymphknoten mittels 376 miRNA-Expressionen. Unüberwachte Gruppierung (unsupervised clustering) nach der „complete linkage“-Methode nach Normalisierung am Gesamtgehalt an miRNAs und Mittelwertzentrierung. Starke Expression in rot, schwache Expression in blau. Horizontal aufgetragen die 34 follikulären Lymphome und Lymphknoten. Vertikal aufgetragen die einzelnen microRNAs.
<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer Bruchsonde für den BCL6-Genlocus auf Chromosom 3q27. Neben den physiologischen gelben Fusionssignalen zeigen sich vermehrt rote und grüne Einzelsignale (Splitsignale) als Ausdruck eines Bruchereignisses im BCL6-Gen.....	19
Abbildung 2: Unterteilung von 97 follikulären Lymphomen, bei denen FISH-Daten zum BCL6- und zum BCL2- Genort vorlagen. Fälle bei, denen Daten zum BCL6- oder BCL2- Genlocus fehlten, wurden nicht berücksichtigt.	20
Abbildung 3: Unterteilung der BCL6 positiven follikulären Lymphome in Abhängigkeit vom BCL2-Status.....	21
Abbildung 4: Verteilung der Grade bei BCL6+ und REF FL, es wurde jeweils nur der höchste Grad berücksichtigt.....	23
Abbildung 5: Links: FL Grad 1 mit überwiegend Zentrozyten und nur wenigen eingestreuten Zentroblasten. Rechts: FL Grad 3b mit Zentroblastenrasen. Giemsa-Färbung, Originalvergrößerung 400fach.....	24
Abbildung 6: Follikuläres Wachstumsmuster. HE-Färbung, Originalvergrößerung 25fach.	24
Abbildung 7: Ausgeprägte Sklerosierung innerhalb eines follikulären Lymphoms. HE-Färbung, Originalvergrößerung 25fach.	25
Abbildung 8: Tumoröse Infiltration der Lymphknotenkapsel. HE-Färbung, Originalvergrößerung 25fach.....	25
Abbildung 9: Links: Vorwiegend perifollikuläres Verteilungsmuster von T-Zellen, Immunhistochemische Reaktion für CD3. Rechts: Peri- und intrafollikuläre Ansammlungen CD4 positiver T-Zellen. Immunhistochemische Reaktion für CD4, Originalvergrößerung jeweils 100fach.....	29
Abbildung 10: FL mit Netzwerken follikulärer dendritischer Retikulumzellen. Immunhistochemische Reaktion für CD23, Originalvergrößerung 100fach.....	30
Abbildung 11: Kräftige Expression von CD10 in den Keimzentren. Immunhistochemische Reaktion für CD10, Originalvergrößerung 25fach.....	31
Abbildung 12: Starke Reaktivität für bcl2 in den Keimzentren. Immunhistochemische Reaktion für bcl, Originalvergrößerung 25fach.....	31
Abbildung 13: Follikuläres Lymphom mit überwiegend erhaltenen Follikelmantelzonen. Immunhistochemische Reaktion für IgD, Originalvergrößerung 100fach.....	32
Abbildung 14: Oben: Geringe Proliferations-rate in einem follikulären Lymphom. Unten:	

Hohe Proliferationsaktivität in einem „hot spot“. Immunhistochemische Reaktion für MiB1, Originalvergrößerung 25fach und 100fach.....	33
Abbildung 15: FL mit monotypischer Leichtkettenexpression. Links: lambda. Rechts: kappa. Originalvergrößerung jeweils 25fach.....	34
Abbildung 16: Ausschnitt aus der Gruppierung von 29 follikulären Lymphomen und fünf Lymphknoten mittels 376 miRNA-Expressionen. Die Gruppierung erfolgte anhand der "complete linkage" Methode nach Normalisierung am Gesamtgehalt an miRNAs und Mittelwertzentrierung. Starke Expression in rot, schwache Expression in blau. Horizontal aufgetragen die 29 Lymphome und 5 Lymphknoten. Vertikal aufgetragen ein Ausschnitt aus den untersuchten miRNAs (http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm).	
R=Referenzgruppenlymphom, LK=Lymphknoten.	40
Abbildung 17: Gruppierung von 29 follikulären Lymphomen und fünf Lymphknoten anhand von 16 keimzentrumsspezifischen miRNAs (Tan2009). Die Gruppierung erfolgte anhand der "complete linkage" Methode nach Normalisierung am Gesamtgehalt an miRNAs und Mittelwertzentrierung. Starke Expression in rot, schwache Expression in blau. Horizontal aufgetragen die 29 Lymphome und 5 Lymphknoten. Vertikal aufgetragen die 16 keimzentrumsspezifischen miRNAs nach Tan 2009 (http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm). R=Referenzgruppenlymphom, LK=Lymphknoten.	42
Abbildung 18: Chromosomale Lokalisation der Bruch-Sonde für den BCL2-Genlocus auf 18q21. Abbildung von http://www.abbottmolecular.com/HematologyProbes_5284.aspx .	71
Abbildung 19: Chromosomale Lokalisation der Fusionssonde für den BCL2-Genlocus (18q21). Abbildung von http://www.abbottmolecular.com/HematologyProbes_5284.aspx	71
Abbildung 20: Chromosomale Lokalisation der Fusionssonde für den IgH-Genlocus (14q32).Abbildung von http://www.abbottmolecular.com/HematologyProbes_5284.aspx .	71
Abbildung 21: Chromosomale Lokalisation der Bruch-Sonde für den BCL6-Genlocus auf 3q27. Abbildung von http://www.abbottmolecular.com/HematologyProbes_5284.aspx	72
Abbildung 22: Gruppierung von 29 follikulären Lymphomen und 5 Lymphknoten mittels 376 miRNA-Expressionen. Unüberwachte Gruppierung (unsupervised clustering) nach der „complete linkage“-Methode nach Normalisierung am Gesamtgehalt an miRNAs und Mittelwertzentrierung. Starke Expression in rot, schwache Expression in blau.Horizontal aufgetragen die 34 follikulären Lymphome und Lymphknoten. Vertikal aufgetragen die einzelnen microRNAs. (http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm).....	78

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Untersuchte morphologische Eigenschaften und verwendete Auswertemodi bei der Analyse von 102 follikulären Lymphomen.	12
Tabelle 2: Bei der Immunhistochemie eingesetzte Antikörper mit Verdünnung und Methoden der Antigendemaskierung; 1Lab Vision, Thermo Fisher Scientific Inc., Fremont, CA, USA; 2 A. Menarini Diagnostics, Berlin, Deutschland; 3 Dako, Glostrup, Dänemark; Tabelle in abgewandelter Form übernommen aus Thorns 2009.....	13
Tabelle 3: Verwendete Antikörper und jeweiliger Modus der Auswertung bei den Analysen von 102 follikulären Lymphomen.....	14
Tabelle 4: Vorgehensweise bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.	15
Tabelle 5: Patientenalter und Geschlechterverteilung in den Gruppen der BCL6-translozierten FL, der Referenzfälle (REF) und aller 102 untersuchten FL. 1U-Test. *Signifikanz und p-Wert beziehen sich nur auf den Vergleich zwischen BCL6 positiven Fällen und der Referenzgruppe. n.s.: nicht signifikant ($p>0,05$).....	22
Tabelle 6: Zusammenfassung der morphologischen Eigenschaften der BCL6-translozierten FL, der Referenzfälle (REF) und aller 102 untersuchten FL. 1U-Test. *Signifikanz und p-Wert beziehen sich nur auf den Vergleich zwischen BCL6 positiven Fällen und der Referenzgruppe. n.s.: nicht signifikant ($p>0,05$). k.A.: keine Angaben (Die Verteilung der Grade wurde nicht statistisch ausgewertet, da die Selektionskriterien der REF nur Grad 1 und Grad2 FL einschlossen).....	26
Tabelle 7: Zusammenfassung der immunhistochemischen Eigenschaften der BCL6-translozierten FL, der Referenzfälle (REF) und aller 102 untersuchten FL. 1U-Test. *Signifikanz und p-Wert beziehen sich nur auf den Vergleich zwischen BCL6 positiven Fällen und der Referenzgruppe. n.s.: nicht signifikant ($p>0,05$). 2 Vergleich keine bzw. wenige FDC-Netzwerke mit mäßig bzw. stark ausgeprägten Netzwerken follikulärer dendritischer Retikulumzellen.....	28
Tabelle 8: MicroRNAs, die bei den follikulären Lymphomen der Referenzgruppe und den BCL6 positiven FL (BCL6+ BCL2+ und BCL6+ BCL2-) differentiell exprimiert sind, bei einem nicht für multiples Testen adjustierten Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$. ΔCT = Differenz der durchschnittlichen CT-Werte. ΔCT -Werte > 1 grau unterlegt.....	36
Tabelle 9: MicroRNAs, die bei den follikulären Lymphomen der Referenzgruppe und den BCL6 positiven FL ohne t(14;18) (BCL6+ BCL2-) differentiell exprimiert sind, bei einem nicht für multiples Testen adjustierten Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$. ΔCT = Differenz der durchschnittlichen CT-Werte. ΔCT -Werte >1 grau unterlegt.....	38
Tabelle 10: MicroRNAs, die bei den BCL6 positiven FL ohne t(14;18) (BCL6+ BCL2-) und	

den doppelt positiven follikulären Lymphomen (BCL6+ BCL2+) differentiell exprimiert sind, bei einem nicht für multiples Testen adjustierten Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$. $\Delta CT =$ Differenz der durchschnittlichen CT-Werte. ΔCT -Werte >1 grau unterlegt39

14. Publikation

Gollub W, Stassek B, Huckhagel T, Bernd HW, Krokowski M, Merz H, Feller AC, Thorns C (2009): BCL6-translocations affect the phenotype of follicular lymphomas only in the absence of t(14;18)IgH/BCL2. Anticancer Res 29(11): 4649-55