

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
- Komm. Direktor: Prof. Dr. med. C. Thorns -

Molekulare Charakterisierung des Epstein-Barr Virus assoziierten diffusen
großzelligen B-Zell Lymphoms des älteren Menschen



Inauguraldissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Medizin

Vorgelegt von
Frau Judith Gebauer
aus Kirchheimbolanden

Lübeck 2015

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

2. Prof. Dr. med. Jan Rupp

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.06.2015

Promotionskommission der Sektion Medizin

Für Emil & Justus

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	I
2. Abkürzungen.....	IV
3. Einleitung	6
3.1 Das Epstein-Barr Virus assoziierte diffuse großzellige B-Zell Lymphom des älteren Menschen.....	6
3.1.1 Hintergründe, Klassifikation und Epidemiologie	6
3.1.2 Klinik und Prognose	8
3.1.3 Morphologie	9
3.1.4 Immunhistochemie	9
3.1.5 Molekularpathologie.....	11
3.2 Der NF kappa B-Signaltransduktionsweg.....	12
3.2.1 Allgemeines	12
3.2.2 Der NF kappa B-Signalweg in malignen Lymphomen	12
3.2.3 CD79B.....	13
3.2.4 CARD11	14
3.2.5 MYD88.....	15
3.3 Inhibitoren der Bruton'schen Tyrosinkinase in der Therapie maligner Lymphome (Ibrutinib).....	16
3.3.1 Entwicklung und Wirkungsprofil	16
3.3.2 Therapie mit Ibrutinib.....	17
3.3.3 Resistenz und Resistenzmechanismen.....	17
3.4 <i>EZH2</i> und sein Einfluss auf die epigenetische Genregulation	18
3.4.1 <i>EZH2</i> und seine Rolle in malignen Lymphomen	18
3.4.2 Therapeutische Ansätze mit <i>EZH2</i> Inhibitoren	18
3.5 Chromosomale Aberrationen in DLCBL	19
3.6 Fragestellung	21
4. Material und Methoden	22
4.1 Materialien.....	22
4.1.1 Puffer	22
4.1.2 Chemikalien.....	22
4.1.3 Antikörper.....	22
4.1.4 Oligonukleotide	23
4.1.5 Reagenzien.....	24
4.1.6 Kits.....	24
4.1.7 Geräte.....	25
4.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	26

4.1.9	Software.....	26
4.1.10	In Silico.....	27
4.2	Methoden.....	28
4.2.1	Studiengruppe.....	28
4.2.1.1	Patientenproben.....	28
4.2.2	Histopathologische Methoden.....	28
4.2.2.1	Morphologie.....	28
4.2.2.2	Konstruktion eines <i>Tissue Microarrays</i> (TMA).....	29
4.2.2.3	Immunhistochemie.....	29
4.2.3	Chromogene <i>in situ</i> Hybridisierung – EBER.....	30
4.2.4	Floureszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	31
4.2.5	Molekularpathologische Methoden.....	32
4.2.5.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	32
4.2.5.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung.....	32
4.2.5.3	PCR-basierte Klonalitätsanalysen des Immunglobulinschwerkettenlokus sowie des T-Zellrezeptors nach dem BIOMED2 Protokoll.....	33
4.2.5.4	Kapillarsequenzierung ausgewählter Hot-spots im NF kappa-B Signaltransduktionsweg.....	33
4.2.5.4.1	Auswahl von Zielgenen und Primerdesign.....	34
4.2.5.4.2	PCR.....	34
4.2.5.4.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	35
4.2.5.4.4	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	35
4.2.5.4.5	Sequenzreaktion.....	35
4.2.5.4.6	Aufreinigung von Sequenzreaktionsprodukten.....	35
4.2.5.4.7	Kapillar-Gelelektrophorese.....	36
4.2.5.4.8	<i>In silico</i> Datenauswertung.....	36
4.2.5.5	Pyrosequenzierung der <i>Myd88</i> Punktmutation p.L265P.....	36
4.2.5.5.1	Primerdesign.....	37
4.2.5.5.2	PCR.....	38
4.2.5.5.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
4.2.5.5.4	Immobilisierung der PCR-Produkte.....	38
4.2.5.5.5	Pyrosequenzierung.....	38
4.2.5.6	Array-CGH (Comparative genomic hybridization).....	39
4.2.5.6.1	Probenmarkierung.....	39
4.2.5.6.2	Aufreinigung der markierten DNA.....	40
4.2.5.6.3	Waschen der Microarrays.....	40
4.2.5.6.4	Scanning der Proben.....	40
4.2.5.6.5	Analyse genomischer Daten.....	40

4.2.6 Statistik	41
5. Ergebnisse	42
5.1 Klinische und histopathologische Charakteristika der Studiengruppe	42
5.1.1 Klinische Eigenschaften	42
5.1.2 Morphologische Eigenschaften	44
5.1.3 Ergebnisse der chromogenen <i>in situ</i> Hybridisierung – EBER.....	44
5.1.4 Immunhistochemische Klassifikation nach Hans <i>et al.</i> und Visco <i>et al.</i>	44
5.2 Ergebnisse der Klonalitätsanalysen des Immunglobulinschwerketten- lokus sowie des T-Zellrezeptors	46
5.3 Mutationsstatus funktionsrelevanter Hot-Spots im NF kappa B- Signaltransduktionsweg und in der EZH2-vermittelten Regulation der Genexpression	46
5.3.1 <i>CARD11</i> – Exon 4 – 9	46
5.3.2 <i>CD79B</i> – Exon 5 und 6	46
5.3.3 <i>MYD88</i> – p.L265P	46
5.3.4 <i>EZH2</i> - Exon 16 und 18	46
5.4 Ergebnisse der FISH-Untersuchung auf chromosomale Aberrationen ...	47
5.5 Ergebnisse der array CGH-Untersuchung	49
5.6 Statistische Auswertung	51
6. Diskussion.....	55
7. Zusammenfassung	62
8. Literaturverzeichnis	64
9. Anhang.....	74
9.1 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	74
9.2 Kapillarsequenzierung	76
9.3 Pyrosequenzierung	80
9.4 Array - CGH	83
9.5 Abbildungen: Vysis FISH Sonden von Abbott Molecular	86
10. Danksagung.....	87
11. Lebenslauf.....	88
12. Publikationsverzeichnis	89
12.1 Veröffentlichungen in Peer-Review Journalen:	89
12.2 Poster-Veröffentlichungen:	89
13. Erklärung.....	90

2. Abkürzungen

Kürzel	Bedeutung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c-	Centi-
ca.	<i>circa</i>
cDNA	<i>copy</i> DNA
Da	Dalton
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
ds	doppelsträngig
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
G	Gramm, Erdbeschleunigung
H	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
k	Kilo

Abkürzungen

l	Liter
m	Milli-, Meter
M	Molar
min	Minute
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n	Nano-
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	round per minute
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
TEA	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt

3. Einleitung

Die Gruppe der malignen Lymphome umfasst alle bösartigen Neubildungen des lymphatischen Systems, die sowohl von B- und T-Lymphozyten als auch von Natural Killer (NK) -Zellen ausgehen können. Aufgrund seiner besonderen klinischen und pathologischen Charakteristika wird das Hodgkin-Lymphom, das aus B-Lymphozyten des Keimzentrums hervorgeht, von den restlichen Lymphomerkkrankungen abgegrenzt. Die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) werden je nach Ursprungszelle (B- bzw. T-Lymphozyten oder NK-Zellen unterschiedlicher Reifestadien) in weitere Subtypen unterteilt und unterscheiden sich sowohl histopathologisch als auch in ihrem klinischen Verlauf bzw. Therapieansprechen deutlich voneinander. Nach ihrem biologischen Verhalten werden zudem niedrig-maligne von hochmalignen NHL abgegrenzt. Diese Einteilung ist von großer Relevanz für das therapeutische Vorgehen und die Prognose der Erkrankung.

Insgesamt handelt es sich bei den malignen Lymphomen um seltene Erkrankungen, die mit einer Gesamtinzidenz von etwa 34 pro 100 000 Einwohner/Jahr in den westlichen Industrienationen auftreten. Sie werden in der Regel mit einer systemischen Chemotherapie und/oder einer Radiatio behandelt und zeigen hierbei ein unterschiedliches Therapieansprechen. In den letzten Jahren haben zudem insbesondere monoklonale Antikörper und molekulare zielgerichtete Medikamente einen wichtigen Stellenwert in der Therapie der NHL eingenommen [111].

3.1 Das Epstein-Barr Virus assoziierte diffuse großzellige B-Zell Lymphom des älteren Menschen

3.1.1 Hintergründe, Klassifikation und Epidemiologie

Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom ist mit einem Anteil von ca. 30 % weltweit der häufigste Subtyp der Non-Hodgkin-Lymphome und gehört zu den hochmalignen Lymphomen [109]. Es ist definiert als eine diffuse maligne Proliferation lymphatischer B-Blasten, deren Zellkern gleich groß bzw. größer als ein normaler Makrophagen-Nukleus ist. Es handelt sich hierbei um ein klinisch sowie histo- und molekularpathologisch heterogenes Krankheitsbild mit diversen Subtypen [64]. In den meisten Fällen entsteht es *de novo* in Lymphknoten, kann sich aber seltener auch primär in extranodalem Gewebe manifestieren. Es tritt insbesondere

bei älteren Patienten auf (der Gipfel der Neuerkrankungen liegt in der 7. Lebensdekade) und kommt etwas häufiger bei Männern als bei Frauen vor [1, 7].

Bei dem Epstein-Barr Virus (EBV) handelt es sich um ein weltweit vorkommendes Mitglied der Familie der Herpesviridae, das erstmals im Jahr 1964 von Michael Epstein und Yvonne Barr beschrieben wurde [35]. Ein erster Kontakt mit diesem Erreger findet meistens in der Kindheit bzw. Jugend durch die Übertragung infizierter Körperflüssigkeiten statt und führt zu einer lebenslangen latenten Infektion. Sie kann initial zu dem klinischen Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose führen, präsentiert sich in vielen Fällen allerdings nur subklinisch bzw. mit unspezifischen Symptomen. In bis zu 95 % der erwachsenen Bevölkerung können EBV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Während der Infektion bindet EBV durch das virale gp350 Protein an CD21 auf der Oberfläche der B-Zellen. In der Folge interagiert das virale gp42 mit den MHC Klasse II Molekülen und fördert so die Fusion mit der Membran. Die EBV-infizierten B-Zellen werden im immunkompetentem Organismus durch EBV-spezifische T-Zellen kontrolliert. Es kann jedoch jederzeit durch verschiedene Stimuli, insbesondere durch eine lokale bzw. systemische Immundefizienz, zu einer Reaktivierung der EBV-Infektion kommen [84]. Es wird daher vermutet, dass die EBV-getriggerte Lymphomentstehung in älteren Patienten mit dem immunologischen Abbau bzw. dem immunologischen Alterungsprozess ursächlich verbunden ist [88, 89, 107].

Gelegentlich können die EBV-infizierten B-Zellen zu lymphoblastoiden Zellen mit unbegrenzter Proliferationsfähigkeit werden. Aus diesen lymphoblastären Elementen können in der Folge verschiedene lymphatische Neoplasien wie beispielsweise das endemische Burkitt-Lymphom, das Hodgkin-Lymphom und manche Subtypen des DLBCL entstehen [91].

Das EBV-positive DLBCL des älteren Menschen wurde im Jahr 2003 erstmals an einer Fallstudie mit 22 Patienten von Oyama *et al.* beschrieben [88]. In der WHO Klassifikation maligner Lymphome wurde es 2008 als eigenständige Entität anerkannt [111]. Es handelt sich definitionsgemäß um eine EBV-positive monoklonale großzellige B-Zell-Proliferation, die bei Patienten über 50 Jahren auftritt, bei denen weder eine bekannte Immunschwäche noch eine Vorgeschichte für maligne Lymphomerkrankungen besteht [86]. Fälle von lymphomatoider Granulomatose (Liebow'sche Granulomatose), Mononukleose oder anderen eigenständig beschriebenen verwandten Erkrankungen wie das plasmoblastische Lymphom, das primäre

Ergusslymphom sowie das mit einer chronischen Entzündung assoziierte DLBCL werden aus dieser Kategorie, auch wenn sie EBV-positiv sind, ausgeschlossen.

Die Erkrankung tritt häufiger in Asien auf (8-10 % aller DLBCL-Fälle), wird aber auch in Nordamerika und Europa beobachtet (< 5% der DLBCL-Fälle) [49, 60, 106]. Der Anteil der EBV-positiven an den Gesamt-DLBCL steigt kontinuierlich mit dem Alter bei Erstdiagnose und beträgt bei >90jährigen Patienten 20-25%. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren, wobei Männer etwas häufiger als Frauen betroffen sind (1,4:1) [89]. In der letzten Zeit werden jedoch gehäuft auch Fälle von EBV-positiven DLBCL in jüngeren immunkompetenten Patienten beschrieben, sodass durch die feste Altersgrenze von 50 Jahren in der Definition der WHO-Klassifikation dieser Entität eine gewisse diagnostische Unklarheit besteht [13, 24].

3.1.2 Klinik und Prognose

Die betroffenen Patienten zeigen initial in den meisten Fällen eine Lymphadenopathie und eine mitunter stark ausgeprägte B-Symptomatik (Nachtschweiß, Gewichtsverlust in 6 Monaten von min. 10 % sowie Fieber) [106]. In bis zu 70 % der Fälle liegt ein Befall von extranodalen Organen, insbesondere der Haut, des GI-Traktes, der Milz sowie der Lunge, mit oder ohne simultanem Lymphknotenbefall, vor [8, 60, 89, 106]. Im Gegensatz zu verwandten Erkrankungen wie dem EBV-negativem DLBCL bzw. dem EBV-positiven Morbus Hodgkin sind sie häufiger mit einem fortgeschrittenen Stadium bei Erstdiagnose, einer höheren Risikogruppe nach dem International Prognostic Index (IPI), sowie einem schlechteren Ansprechen auf die initiale Therapie assoziiert [8, 60, 89, 91]. Somit zeigen sie in der Regel ein deutlich reduziertes medianes progressionsfreies Überleben (13 Monaten) sowie ein verkürztes Gesamtüberleben (26-36 Monaten) [8, 91].

Von diesen klinischen Faktoren sind allerdings nur das Vorliegen von B-Symptomen sowie ein Alter bei Erstdiagnose von 70 Jahren und älter unabhängige Risikofaktoren für das Gesamtüberleben, wohingegen der IPI bei dieser Entität im Gegensatz zu den EBV-negativen DLBCL keine prognostisch relevante Risikostratifizierung ermöglicht [89].

Die Therapie des DLBCL besteht in der Regel aus einer Polychemotherapie (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison nach dem CHOP-Regime) in Kombination mit dem chimären CD20-Antikörper Rituximab. Hierunter zeigen sich, abhängig von dem molekularen Subtyp, unterschiedliche Heilungsraten von über 50 % selbst

im fortgeschrittenem Stadium, die bei dem EBV-positiven DLBCL des Älteren deutlich erniedrigt sind [6, 8, 73, 91, 99, 105]. Kürzlich konnten jedoch Ok *et al.* an einer kleinen Fallzahl beobachten, dass eine zugrundeliegenden EBV-Infektion keinen signifikanten Einfluss auf den klinischen Verlauf einer DLBCL Erkrankung haben muss [85].

3.1.3 Morphologie

Zunächst wurde das EBV-positive DLBCL des Älteren morphologisch in zwei Gruppen unterteilt, in einen polymorphen sowie in einen monomorphen Subtyp. Diese Unterteilung, unterstreicht das breite histomorphologische Spektrum, von Hodgkin-artigen Läsionen bis hin zu großzelligen Lymphomen, das für diese Entität charakteristisch ist [8, 73, 86]. In beiden Subtypen können große veränderte Zellen oder Immunblasten genauso wie Hodgkin- und Reed-Sternberg (HRS)-Riesenzellen vorkommen. Des Weiteren können sie regelmäßig eine gesteigerte mitotische Aktivität sowie Gebiete mit landkartenartigen Nekrosen zeigen.

Der polymorphe Subtyp ist gekennzeichnet durch ein breites Spektrum an B-Zellen unterschiedlicher Reifestadien, wobei sich die Läsionen aus Zentroblasten, Immunblasten und Plasmoblasten mit einem variablen Anteil an reaktiven Zellen (inkl. kleinen Lymphozyten, Plasmazellen, (epitheloiden) Histiocyten) zusammensetzen.

Der monomorphe Subtyp zeigt charakteristisch einen monotonen Rasen von blastären B-Zellen [111]. Da es auch Fälle von EBV-positiven DLBCL mit sowohl polymorphen als auch monomorphen Anteilen gibt, stellen diese beiden initial differenzierten Subgruppen insofern wohl eher die beiden entgegengesetzten Endpunkte eines breiten histomorphologischen Spektrums da, in dem sich diese Entität bewegt [8, 111].

3.1.4 Immunhistochemie

Immunhistochemische Algorithmen werden eingesetzt, um zeit- und kostengünstiger als durch Genexpressionsuntersuchungen eine Unterteilung in prognostisch relevante DLBCL-Subtypen vorzunehmen. Grundlage dieser Algorithmen sind immunhistochemische Färbungen mittels spezifischer Antikörper. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Oberflächenmarker, die im folgenden kurz erläutert werden sollen.

CD10 ist eine membranassoziierte neutrale Endopeptidase, die von Keimzentrumzellen in reaktivem lymphoiden Gewebe exprimiert wird [32]. Bei MUM1/IRF-4 (multiple myeloma

oncogene 1/interferon regulatory factor-4) handelt es sich um ein lymphoid-spezifisches Mitglied der Interferon-Regulationsfaktoren-Familie der Transkriptionsfaktoren [70]. Es wird auf Plasmazellen sowie in geringerem Ausmaß auf Keimzentrumzellen exprimiert [77]. *BCL 2* (B-cell lymphoma 2) ist ein Protoonkogen, das in der physiologischen B-Zell Reifung zeitlich begrenzt als Inhibitor der Apoptose fungiert [39, 81]. *BCL6* (B-cell lymphoma 6) ist ein Zinkfinger Protein, das als transkriptioneller Repressor fungiert und sowohl von Keimzentrum-B-Zellen als auch von manchen CD4+-Zellen exprimiert wird [19, 36]. *FOXP1* liegt auf Chromosom 3p14.1 und trägt die genetische Information für ein Mitglied der FOX Transkriptionsfaktoren-Familie [108]. Zwei alternativ gespligte *FOXP1* mRNA Isoformen sind in bestimmten DLBCL-Subtypen stark exprimiert und einige Studien zeigen, dass eine hohe FOXP1 (forkhead box protein P1) Protein-Expression mit einem schlechteren Überleben bei DLBCL Patienten assoziiert ist [10, 16].

Der Hans'Algorithmus verwendet CD10, MUM1 sowie BCL6 und erreicht hiermit eine Konkordanz mit den Ergebnissen von Genexpressionsprofilen von ca. 80 % [45]. Er unterteilt in eine überwiegend CD10- sowie BCL-6-positive GCB (germinal center b-cell-like)-Gruppe mit einem 5-Jahres-Überleben von 76%, sowie in eine prognostisch mit einem 5-Jahres-Überleben von 34 % deutlich ungünstigere non-GCB-Gruppe (Konkordanzrate: 71 % für GCB bzw. 88% für non-GCB). Die prognostische Aussagekraft für diesen immunhistochemischen Klassifikator kann nach Einschätzung der Autoren der Originalarbeit noch über der von Genexpressionsprofilen liegen [45]; zahlreiche Studien haben jedoch in den darauffolgenden Jahren widersprüchliche Ergebnisse im Hinblick auf diese Annahme erbracht [76, 82, 118]. Unter anderem ergab sich der Kritikpunkt, dass die prognostische Relevanz des Hans'Algorithmus aus einem Datensatz von Patienten, die mit einer CHOP-Polychemotherapie behandelt worden waren, abgeleitet wurde. Seit der Zulassung von Rituximab stellt dies nicht mehr die Standardtherapie bei DLBCL dar. Es wurden daher weitere Algorithmen entwickelt, die an mit R-CHOP behandelten Patienten getestet wurden.

Der Choi-Algorithmus verwendet ebenfalls CD10, BCL6, und MUM1 sowie zusätzlich zum Beginn des Entscheidungsbaums den Keimzentrum-Antikörper GCET1 und später FOXP1 [74]. Er zeigt eine mit ca. 90 % hohe Sensitivität für sowohl mit R-CHOP als auch mit CHOP therapierte DLBCL, die im Gegensatz zum Hans-Algorithmus für den GCB-Subtyp deutlich höher als für den non-GCB-Subtyp ausfällt. [22].

Der ausschließlich auf mit R-CHOP behandelten DLBCL basierende Visco-Young-Algorithmus setzt eine neue Kombination immunhistochemischer Marker ein (CD10, FOXP1, BCL6). Er unterscheidet ebenfalls einen GCB- und non-GCB-Subtyp und erreicht damit eine Konkordanz von knapp 93% mit den Ergebnissen aus Genexpressionsuntersuchungen. Es zeigte sich eine hohe prognostische Aussagekraft unabhängig vom IPI für diesen Algorithmus [121].

Weitere Algorithmen, beispielsweise nach Nymann *et al.* und Muris *et al.*, setzen die gleichen sowie weitere immunhistochemische Marker ein und erreichen damit ähnliche Übereinstimmungen zu Genexpressionsuntersuchungen [76, 83].

3.1.5 Molekularpathologie

Aufgrund molekularpathologischer Charakteristika unterscheidet man drei unterschiedliche Subtypen des DLBCL: den ABC- (activated b-cell-like), GCB (germinal center b-cell-like) – DLBCL und den primär mediastinales B-Zell-Lymphom (PMBL)- Subtyp [4, 63]. Diese Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Genexpression und scheinen von B-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung auszugehen. Zudem differiert der Prozess der malignen Transformation zwischen den einzelnen Subtypen. Des Weiteren unterscheiden sie sich in ihrer klinischen Präsentation und zeigen ein unterschiedliches Ansprechen auf Standard-Chemotherapie-Protokolle und in der Folge deutlich divergierende Heilungsraten [63].

Der GCB-DLBCL-Subtyp exprimiert insbesondere Gene, die spezifisch für Keimzentrums-B-Zellen sind. Die maligne Zelle durchläuft weiterhin den Prozess der somatischen Hypermutation und die Zellen tragen häufig rekombinierte Immunglobulin Schwerketten (IgH)-Klassen [62].

In dem mit einer Heilungsrate von unter 40 % prognostisch ungünstigen ABC-DLBCL-Subtyp zeigen die Zellen hingegen das Expressionsmuster von post-germinalen B-Blasten und exprimieren für die Immunglobulinsekretion wichtige Transkriptionsfaktoren [4, 99]. Die ABC-DLBCL-Zellen enthalten einen großen Anteil des für die Lymphomgenese wichtigen Mutatorenzym AID und ihre IgH Gene sind häufig stark mutiert. Im Gegensatz zu den GCB-DLBCL liegt bei ihnen jedoch meistens keine Klassenwechsel-Rekombination vor und sie exprimieren IgM [62]. Klassischerweise ist in diesem Subtyp der anti-apoptotische NF kappa B-Signalweg durch onkogene Mutationen, insbesondere in *CARD11*, *CD79A* sowie *MYD88*,

oder einen chronisch aktiven B-Zell-Rezeptor-Signalweg, hervorgerufen durch eine A20 Inaktivierung, konstitutiv aktiv [29]. In einigen ABC-DLBCL ist zudem der JAK Kinase Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 induziert, welcher wiederum synergistisch zum NF kappa B-Signalweg die Apoptose inhibiert [31].

Die Mehrheit der EBV-positiven DLBCL des Älteren präsentiert sich mit Merkmalen des ABC-Subtyps [73]. Immunhistochemisch fanden sich Hinweise, dass sowohl bekannte als auch alternative NF kappa B-Signalweg-Aktivierungen im ABC- wie auch im GCB-Subtyp dieser Entität gehäuft auftreten [73].

Der dritte Subtyp PMBL präsentiert sich typischerweise mit einer mediastinalen Tumormasse bei junge Frauen, meistens im dritten Lebensjahrzehnt. Die Tumormasse enthält häufig Thymusreste, sodass vermutet wird, dass diese Erkrankung ihren Ursprung in thymischen B-Zellen hat [63, 100].

3.2 Der NF kappa B-Signaltransduktionsweg

3.2.1 Allgemeines

B-Zellen tragen an ihrer Oberfläche sowohl einen Antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptor (BCR) als auch einen oder mehrere Toll-like-Rezeptoren, die Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind [96]. Diese duale Mustererkennung verleiht den B-Zellen die Fähigkeit zu einer umfassenden Reaktion auf verschiedenste Stimuli, die unter anderem zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität des NF kappa B-Signalweges führt.

Die NF kappa B-Familie besteht aus Transkriptionsfaktoren, die multiple zelluläre Prozesse kontrollieren. So sind sie an der Tumorentstehung und -progression und hier insbesondere an der Zytokinsekretion, Entzündungsreaktion, zellulären Proliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung beteiligt [67].

3.2.2 Der NF kappa B-Signalweg in malignen Lymphomen

Der NF kappa B-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Lymphomgenese und ist in verschiedenen Subtypen der Non-Hodgkin Lymphome (insbesondere im ABC-DLBCL sowie dem EBV-positiven DLBCL) hochreguliert. Dies führt zu einer Hochregulierung des

Transkriptionsfaktors IRF-4 (Interferon regulatory factor 4), der die B-Zellen zur plasmazytischen Differenzierung anregt [26, 28]. IRF-4 ist ein direktes Ziel der NF kappa B-Transkriptionsfaktoren und kann sowohl über den B-Zell- als auch über den Toll-like-Rezeptor stimuliert werden [98, 102].

Die antiapoptotische und pro-proliferative NF kappa B-Signalweg-Aktivierung in DLBCL kann über verschiedene Aktivierungswege stattfinden und scheint bei manchen Patienten mit ABC- DLBCL abhängig vom Vorhandensein spezifischer aktivierender Mutationen zu sein.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des NF kappa B-Signalweges ein unabhängiger prognostischer Marker in DLBCL darstellt, der auf ein schlechteres Langzeitüberleben hinweist [11]. Zuletzt wurde daher in zahlreichen Studien an blastischen B-Zell Lymphomen die Prävalenz aktivierender Mutationen innerhalb der NF kappa B aktivierenden Signalkaskade untersucht, da sich hieraus mögliche Therapieoptionen durch eine NF kappa B-Inhibition ergeben können [11, 15, 38].

Im EBV-positiven DLBCL des Älteren scheint die NF kappa B-Signalweg-Aktivierung über alternative Mechanismen stattzufinden. So befinden sich die EBV-assoziierten Proteine LMP1 und LMP2 (latent membrane protein) in der Zellmembran lymphoblastoider und *post-transplant* B-Zell-Tumor-Zelllinien nach EBV-Infektion [114]. LMP1 zeigt dabei das Verhalten eines klassischen Onkogens und hat zahlreiche Funktionen, unter anderem eine Induktion anti-apoptotischer Proteine (bcl-2, A20) sowie die Stimulation der Zytokinproduktion (IL-6 und -8) [33, 34, 47]. Studien haben gezeigt, dass LMP1 als konstitutiv aktives Mitglied der TNFR (tumor necrosis factor receptor) Superfamilie agiert und verschiedene Signalwege, unter anderem auch den NF kappa B-Signalweg, durch die Aktivierung der PI3K (Phosphatidyl- inositol 3-kinase) auf eine ligandenunabhängige Weise aktiviert [30, 43].

3.2.3 CD79B

Bei CD79B (Ig- β) handelt es sich um einen Co-Rezeptor des B-Zell-Rezeptors (BCR). Gemeinsam mit CD79A (Ig- α) bildet es ein Heterodimer, das als Gerüst für die Zusammenlagerung und Expression des BCR dient und nach Antigenstimulation nachgeordnete Signalwege wie den NF kappa B-, PI3 Kinase-, ERK MAP Kinase- und NF-AT-Signalweg stimuliert [27].

Eine *CD79B* Mutation liegt in ca. 21 % der Fälle von ABC-DLBCL vor und führt zu einer dauerhaften B-Zell-Rezeptor-Signalweg-Aktivierung. Sie ist häufig mit einer *MYD88* Mutation vergesellschaftet und kann mit einer Sensitivität gegenüber bestimmten therapeutischen Substanzen einhergehen [29].

In EBV-positiven DLBCL, die sich häufig als ABC-DLBCL-Subtyp präsentieren, scheinen *CD79B* Mutationen nicht nachweisbar zu sein [55].

3.2.4 CARD11

CARD11 (Caspase recruitment domain-containing protein 11) (auch: CARMA1 bzw. Bimp3) wird in gesunden B-Zellen nach Antigen-Stimulation des BCR aktiviert [27]. Dies geschieht über eine Phosphorylierung durch PKC β (Proteinkinase C β), die CARD11 zur Bildung eines Signalkomplexes (CBM-Komplex) mit BCL-10 (B-cell lymphoma/ leukaemia 10) und MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) anregt. Dieser Multiproteinkomplex aktiviert wiederum IKK (I κ B Kinase) und initiiert hierdurch eine BCR- abhängige Aktivierung des NF kappa B-Signalweges [29, 78, 97].

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei *CARD11* um ein Onkogen handelt, das eine wichtige Rolle in der Entstehung mancher DLBCL spielt. So sind auf CARD11 ausgerichtete shRNAs (small hairpin RNAs) toxisch für ABC-, nicht aber für GCB-DLBCL-Zelllinien [78]. Somatische Mutationen in *CARD11*, die zu einer pathologischen CBM-Komplex-Aktivierung führen können, liegen in bis zu 10% der ABC-DLBCL-Fälle, jedoch nur in knapp 4 % der GCB-DLBCL, vor [53, 61]. Diese Mutationen betreffen in der Regel die coiled-coil Domäne von CARD11, die essentiell für die Oligomerisierung und die NF kappa B-Signalweg-Aktivierung ist [61, 113]. Zudem findet in *CARD11* mutierten Zelllinien eine konstitutive NF kappa B-Signalweg-Aktivierung auch ohne PKC β -Protein, welches im Rahmen der physiologischen BCR-Signalweg-Aktivierung CARD11 aktiviert, statt [61].

In DLBCL mit *CARD11*-Wildtyp-Variante wird NF kappa B über einen chronisch aktiven BCR-Signalweg aktiviert. ABC-DLBCL-Zellen, die diesen Mechanismus zeigen, scheinen sensitiver für eine Inhibition von NF kappa B aktivierenden Zielmolekülen zu sein als Zellen mit einer aktivierenden *CARD11*-Mutation [29].

3.2.5 MYD88

Bei MYD88 handelt es sich um ein Adaptorprotein, welches im Rahmen der normalen Immunantwort mit Toll-like Rezeptoren sowie Rezeptoren für Interleukin (IL-)1 interagiert und in der Folge den NF kappa B-Signalweg aktiviert. Es koordiniert die Zusammenlagerung eines aus vielen Untereinheiten, u. a. aus verschiedenen Vertretern der IRAK Familie der Serin-Threonin-Kinasen, bestehenden Signalkomplexes [68].

Es konnte gezeigt werden, dass *MYD88* Mutationen in knapp 40 % der ABC-DLBCL auftreten und somit zu den häufigsten genetischen Aberrationen dieser Erkrankung gehören. Eine bestimmte Mutation (L265P), die zu einem Aminosäureaustausch von Leucin gegen Prolin in der kodierenden Region des *MYD88* Gens führt, tritt hierbei mit Abstand am häufigsten auf. Es handelt sich um eine zumeist heterozygot auftretende gain-of-function Mutation, die essentiell für das Überleben der ABC-DLBCL-Tumorzellen zu sein scheint. Diese Variante konnte nur selten bis gar nicht in den anderen DLBCL-Subtypen GCB-DLBCL sowie PMBL nachgewiesen werden [79]. Sie betrifft die TIR Domäne, welche mit den TIR Domänen zahlreicher Rezeptoren der angeborenen Immunantwort interagiert [66]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Domäne einen stabilen Signalkomplex, der phosphoryliertes IRAK1 enthält, koordiniert, welches ein Grund für die beobachtete häufige Mutationsfrequenz sein kann. Weitere seltenere *MYD88* Mutationen wurden in deutlich geringerer Frequenz beschrieben, liegen größtenteils ebenfalls in der TIR Domäne und führen auch zur NF kappa B-Signalweg-Aktivierung.

Zudem treten in manchen ABC-DLBCL-Fällen zusätzlich zu *MYD88* Mutationen auch Aberrationen in *CARD11*, *A20* und *CD79B/A* auf [55]. Dies kann eine funktionelle Interaktion zwischen dem chronisch aktivierten B-Zell-Rezeptor-Signalweg, mit dem beispielsweise eine *CD79B/A* Mutation assoziiert ist, und den durch *MYD88* Mutationen hochregulierten Signalwegen anzeigen. Ein simultanes Vorkommen einer *MYD88* Mutation mit einer *CARD11* Mutation, die zu einer ausgeprägten NF kappa B-Signalweg-Aktivierung führt, zeigt darüber hinaus, dass eine *MYD88* Mutation zusätzliche biologische Eigenschaften neben der NF kappa B-Signalweg-Aktivierung beinhaltet. Hier ist insbesondere die Förderung des JAK-STAT3-Signalweges zu nennen, die gemeinsam mit der NF kappa B-Signalweg-Aktivierung das Zellüberleben in den Lymphomzellen beeinflusst. Es findet hierbei eine IL-6 und -10 vermittelte autokrine Aktivierung des JAK-Signalweges statt, wobei die Interleukinproduktion wiederum durch die über IRAK-1 und -4 vermittelte NF kappa B- und

MAP-Kinase-Signalweg-Stimulation übermittelt wird. Hieraus wiederum ergeben sich neue mögliche Therapieoptionen [79].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass große Unterschiede hinsichtlich der Prävalenz einer *MYD88* Mutation im Hinblick auf den Entstehungsort des Lymphoms bestehen. So sind insbesondere DLBCL an immunprivilegierten Stellen, beispielsweise dem ZNS und dem Hoden, in bis zu 75 % der Fälle von einer solchen genetischen Variante betroffen, wohingegen sie in primär nodal manifestierenden ABC-DLBCL eher selten in ca. 17 % nachgewiesen werden [55].

3.3 Inhibitoren der Bruton'schen Tyrosinkinase in der Therapie maligner Lymphome (Ibrutinib)

3.3.1 Entwicklung und Wirkungsprofil

Im Jahr 2007 wurden irreversible Inhibitoren der Bruton'schen Tyrosinkinase (BTK) entwickelt, die kovalent an Cystein-481 in der TK/SH1 Domäne der BTK binden und hierdurch eine irreversible und selektive Hemmung verursachen. Hier zeigte sich Ibrutinib (PCI-32765) als oral verfügbarer kleinmolekularer BTK-Inhibitor aufgrund seiner hohen Potenz (IC₅₀, 0.5 nM) und Selektivität als besonders effektiv und wurde daher für die klinische Testung ausgewählt [90]. Zudem verhindert er die vollständige BTK-Aktivierung, indem er eine hierfür notwendige Autophosphorylierung an Tyrosin-223 inhibiert [50].

Die BTK ist Teil des BCR-Signalweges und von entscheidender Bedeutung für die B-Zell-Proliferation [123]. BTK wird primär in hämatopoetischen Zellen, hauptsächlich in den B-Zellen, nicht jedoch in T- und Plasmazellen exprimiert [40]. Die selektive Wirkung von Ibrutinib auf DLBCL-Zellen und hier insbesondere auf ABC-DLBCL lässt vermuten, dass sein Wirkmechanismus eine konstitutive BCR-Signalweg-Aktivierung voraussetzt [98].

Des Weiteren zeigen *in vitro* Studien, dass Ibrutinib eine dosisabhängige Zytotoxizität in Tumorzellen der chronischen lymphatischen Leukämie der B-Zell Reihe (B-CLL) besitzt und die DNA-Replikation sowie TLR-Signalweg-vermittelte Proliferation unterdrückt bzw. verhindert [48, 94].

3.3.2 Therapie mit Ibrutinib

Ibrutinib ist ein BTK-Inhibitor mit einer hohen Potenz und zeigte ein gutes klinisches Ansprechen in der Therapie der CLL sowie bestimmter NHL. In Phase I und II Studien mit Patienten im Rezidiv bzw. primären Therapieversagen, die an einem DLBCL unterschiedlicher Subtypen erkrankt waren, zeigten insbesondere ABC-Subtypen ein gutes klinisches Ansprechen auf eine Ibrutinibtherapie mit 560 mg/Tag [2, 46, 98]. Zudem ergab sich eine sehr gute Verträglichkeit des Medikamentes auch in höheren Dosierungen [122].

Es konnte durch molekularpathologische Analysen gezeigt werden, dass das klinische Ansprechen sowohl bei nachgewiesener *CD79B*-Mutation als auch beim Vorliegen eines *CD79B*-Wildtyps stattfand. Hieraus lässt sich vermuten, dass Ibrutinib keine BCR-Mutation benötigt, um effektiv zu sein, da alternative Mechanismen des BCR-Signalweges eine Rolle zu spielen scheinen. In kleinen Fallgruppen zeigten Patienten, die nur eine *MYD88*-Mutation hatten, im Gegensatz zu Patienten mit dem simultanen Auftreten einer *MYD88*- und *CD79B*-Mutation, kein Therapieansprechen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die BTK ein wichtiges Zielmolekül im Zeitalter der spezifischen molekularen Therapien darstellt, deren effektive Hemmung jedoch von der An- bzw. Abwesenheit bestimmter Mutationen abhängig zu sein scheint [98].

3.3.3 Resistenz und Resistenzmechanismen

Bereits aus der Therapie der CML mit dem BCR-ABL-Inhibitor Imatinib ist bekannt, dass es bei wenigen Patienten unter Therapie zu einer Resistenzentwicklung gegenüber dem Kinaseinhibitor kommen kann. Die häufigste Ursache dieser Resistenz liegt in *ABL*-Punktmutationen, die eine effektive Bindung von Imatinib an die Kinase-Domäne von ABL verhindern [44]. Kürzlich konnte nun gezeigt werden, dass sich in seltenen Fällen auch im Verlauf einer Ibrutinibtherapie Resistenzmechanismen entwickeln, die eine effektive BTK-Inhibition verhindern und zu einem Krankheitsprogress unter Therapie führen. Diese Mechanismen umfassen einerseits Mutationen der BTK an der Ibrutinibbindestelle, die die Bindungsaffinität des Inhibitors verringern, indem sie beispielsweise anstatt einer irreversiblen nur eine reversible Bindung zulassen. Des Weiteren konnten in wenigen Patienten *PLC γ 2* Mutationen identifiziert werden, die zu einer autonomen BTK-unabhängigen BCR-Signalweg-Aktivierung führen. Neue Medikamente bzw. Medikamentenkombinationen, die eine erneute Remission nach Entwicklung einer

Ibrutinibresistenz unter Therapie einleiten können, befinden sich derzeit in klinischer Prüfung [21, 124].

3.4 *EZH2* und sein Einfluss auf die epigenetische Genregulation

In Eukaryoten ist die posttranslationale Modifikation der Histone essentiell für die Regulation der Chromatinstruktur und der Genexpression [72]. *EZH2* (Enhancer of zeste homolog 2) ist die katalytische Untereinheit des PRC2 Polycomb Komplexes und vermittelt transkriptionelle Repression durch seine Histon- Methyltransferase-Aktivität (Methylierung von Lysin27 des Histons H3 (H3K27)) [119]. PolycombGroup (PcG)-Proteine stellen eine Familie von Transkriptionsrepressoren dar, die an der Zelldifferenzierung und der Regulation des Stammzellkompartiments sowie maligner Neoplasien beteiligt sind. Eine Überexpression von *EZH2* trägt daher zur Tumorgenese bei und ist in verschiedenen malignen Erkrankungen mit einer schlechten Prognose assoziiert [72, 75, 127].

3.4.1 *EZH2* und seine Rolle in malignen Lymphomen

Es konnte gezeigt werden, dass die häufigste somatische *EZH2* Mutation in Exon 15 des Gens, die zu einem Aminosäureaustausch von Tyrosin (Tyr641) in der katalytischen SET Domäne des Proteins führt, in ca. 22 % der GCB-DLBCL, jedoch nicht in ABC-DLBCL vorkommt [75, 98]. Es handelt sich hierbei um eine gain of function Mutation und sie führt zu einer Zunahme der Trimethylierung von H3K27 [127]. Somit stellt *EZH2* eine wichtige Schaltstelle im GCB-DLBCL dar und Mutationen im zugehörigen Gen fördern die Lymphomentstehung durch transkriptionelles Silencing von antiproliferativen Genen und Tumorsuppressorgenen, die den Zellzyklus regulieren (beispielsweise *CDKN1A*) [119].

3.4.2 Therapeutische Ansätze mit *EZH2* Inhibitoren

Lymphomzellen mit *EZH2* Mutation scheinen im Hinblick auf ihre Proliferationsfähigkeit von der gesteigerten Histon-Methyltransferase-Aktivität abhängig zu sein [54]. Folglich führen selektive *EZH2*-Inhibitoren wie GSK126 und E11 zu einer verringerten Proliferation sowie zu einer Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose in DLBCL-Zellen im Mausmodell [72]. Aufgrund dieser Ergebnisse befindet sich zur Zeit ein oraler *EZH2* Inhibitor, E7438, in der klinischen Testung für Patienten mit rezidivierendem DLBCL unabhängig vom Subtyp.

3.5 Chromosomale Aberrationen in DLBCL

Aufgrund der morphologischen und klinischen Heterogenität des DLBCL wurden verschiedene Subtypen hinsichtlich ihrer molekularpathologischen oder ätiologischen Unterschiede definiert. Jedoch fallen weiterhin die meisten DLBCL-Fälle in die Kategorie DLBCL-NOS (not otherwise specified) [111]. In der jüngeren Vergangenheit wurden daher Versuche unternommen, weitere DLBCL-Subgruppen aufgrund molekularer Unterscheidungsmerkmale zu definieren. Hierzu wurde unter anderem die array CGH-Technik, die den Nachweis submikroskopischer Deletionen bzw. Amplifikationen genomischer DNA ermöglicht, eingesetzt.

Durch eine alternative Mikroarray-basierte Technologie, das gene expression profiling, wurden deutliche Unterschiede zwischen GCB- und ABC- DLBCL hinsichtlich ihrer Genexpression nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass der mit einer ungünstigeren klinischen Prognose assoziierte ABC-Subtyp charakteristische Gene aktivierter B-Zellen exprimiert, wohingegen die GCB-DLBCL-Zellen die molekulare Signatur einer normalen Keimzentrums-B-Zelle zeigen [4, 99, 125]. Zudem wurden rekurrente CNV (copy number variation) sowie prognostische Indikatoren in einer Reihe von DLBCL-Subtypen nachgewiesen; beispielsweise waren bestimmte CNV mit einer Resistenz gegenüber einer R-CHOP- Polychemotherapie assoziiert [12, 56].

Lenz *et al.* konnten zeigen, dass die charakteristischen Aberrationen des ABC-Subtyps eine Trisomie 3, eine Deletion von Chromosom 6q, eine Deletion/Duplikation von 18q sowie eine Deletion der *INK4a/ARF* Tumorsuppressorgene auf Chromosom 9 waren. Die häufigste genetische Veränderung, die Trisomie 3, konnte in 26 % aller ABC-DLBCL nachgewiesen werden. Hier zeigte sich am häufigsten eine Hochregulation des Onkogens *FOXP1*. Im Gegensatz zu nur 4 bzw. 3 % der GCB-DLBCL bzw. PMBL zeigten 38 % der ABC-DLBCL eine *FOXP1* CNV [64]. Die Amplifikation von 18q, die ebenfalls signifikant häufiger in ABC- DLBCL beschrieben wurde, ist mit einer Überexpression von *BCL-2* und *NFATC1* assoziiert.

Charakteristisch für den GCB-Subtyp zeigten sich hingegen eine 1,4 Mb-Amplifikation auf Chromosom 13, eine 7,6 Mb- Amplifikation auf Chromosom 12, die eine Hochregulation von *MDM2*, einem negativen Regulator von p53, zur Folge hatte, sowie eine Deletion des *PTEN*

Tumorsuppressorgens auf Chromosom 10 und eine Amplifikation des *REL*-Locus auf Chromosom 2.

Diese sowie weitere Ergebnisse von array CGH-basierten Studien an DLBCL zeigen, dass der ABC- sowie der GCB- und weitere seltenere Subtypen genetisch unterschiedlich sind und ihr maligner Phänotyp von verschiedenen genetischen Aberrationen ausgeht [64, 112, 115].

Zudem sind eine Reihe weiterer Lymphom-assoziiierter chromosomaler Aberrationen bekannt, die häufig als balancierte Translokationen vorliegen und daher nicht mittels array CGH-Technik erfasst, aber mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden können. Bestimmte karyotypische Anomalitäten sind dabei in manchen Fällen eng mit einem bestimmten Lymphom-Subtyp assoziiert und daher auch von diagnostischem Wert. Als klassisches Beispiel ist hier die t(8;14)(q24;q32) Translokation des *c-myc*- Protoonkogens an einen Immunglobulin- Schwerkettenloкус zu nennen, die insbesondere in Burkitt-Lymphomen, aber auch in manchen Fällen von DLBCL sowie seltener in anderen NHL-Subtypen auftritt [18, 120].

MYC wird initial in B-Zellen nach der Interaktion mit Antigen und T-Zellen exprimiert und ist essentiell für die Keimzentrumsbildung. Die darauf folgende Hochregulation von *bcl-6* unterdrückt zunächst MYC, welches im Verlauf durch NF kappa B-Signalweg-Aktivierung in manchen B-Zellen wieder re-exprimiert wird [69]. Ungefähr 5-14 % der DLBCL tragen *c-myc*-Translokationen; ein geringerer Anteil zeigt *c-myc*-Amplifikationen [87, 116].

Eine weitere häufige Translokation t(14;18) betrifft den *bcl-2*-Locus auf Chromosom 18, der auf einen Immunglobulin-Schwerkettenloкус auf Chromosom 14 transloziert wird. Diese Veränderung wird insbesondere in folliculären Lymphomen, aber auch in ca. 20 % der DLBCL beobachtet [3, 37].

Strukturelle Alterationen der *bcl-6*-Promoterregion gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen in NHL und finden sich insbesondere in DLBCL (in ca. 30 % der Fälle) [37]. *Bcl-6* kodiert für ein POZ/Zinkfinger Transkriptionsrepressorprotein und wird für die Bildung von Keimzentrums-B-Zellen benötigt, indem es IL-4-, BCR- und CD40L-Signale moduliert [36, 80].

Lymphome mit einer *c-myc*- und einer *bcl2*- bzw. *bcl6*-Translokation werden als double-hit-Lymphome bezeichnet und sind durch einen aggressiven klinischen Verlauf mit ungünstiger

Prognose gekennzeichnet. Sie zeigen Charakteristika sowohl von DLBCL als auch von Burkitt-Lymphomen [92].

3.6 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie ist es, durch immunhistochemische sowie molekulargenetische Untersuchungen den seltenen und erst seit einigen Jahren als eigenständige Entität anerkannten Subtyp des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen genauer zu charakterisieren und im Zeitalter der zielgerichteten molekularen Therapien mögliche Therapieoptionen aufzuzeigen. Hierzu werden Proben dieser seltenen Entität mittels array CGH- sowie FISH-basierter Methoden auf genomische Verluste, Hinzugewinne bzw. Rearrangements analysiert. Im Hinblick auf den möglichen germinalen bzw. post-germinalen Ursprung dieser Erkrankung soll zudem die Prävalenz aktivierender Mutationen im NF kappa B-Signalweg in den häufig betroffenen Genen *CARD11*, *MYD88* und *CD79B* sowie das Auftreten onkogener Mutationen in dem an der Histonmodifikation beteiligten *EZH2* bestimmt werden. Abschließend soll auf Basis dieser Ergebnisse eine genauere Einordnung dieser Entität in das klinisch und pathogenetisch umfassende Spektrum der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome erfolgen. Zudem soll ein Ausblick hinsichtlich medikamentöser Optionen im Zeitalter der zielgerichteten molekularen Therapien gegeben werden.

4. Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
TAE (50×)	2 M (w/v) Tris-HCl; 1 M (v/v) Eisessig; 0,1 M EDTA, pH 7,6
Gelladepuffer	62,5% (v/v) Glycerin; 0,4% (v/v) SDS; 0,05% (w/v) Bromphenolblau

Tabelle 1: verwendete Puffer

4.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen.

4.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Klon	Verdünnung	Antigendemaskierung (pH)
Bcl2	Lab Vision ¹	100/D5	1:100	Dampftopf (6,1)
Bcl6	Dako ³	BG-B6p	1:25	Dampfgerar (9,0)
CD10	Menarini ²	56C6	1:30	Dampfgerar (9,0)
MUM-1 (Irf4)	Dako ³	Mum 1P	1:400	Mikrowelle
FOXP1	Lab Vision ¹	polyklonal	1:100	Bond (9,0)
Ki-67	Dako ³	Mib-1	1:500	Dampftopf (6,0)
¹ Lab Vision Thermo FisherScientific Inc. (Fremont, CA, USA) ² A.Menarini Diagnostics (Berlin, Deutschland) ³ dako (Glostrup, Dänemark) ⁴ Cell Marque (Rocklin, CA, USA)				

Tabelle 2: verwendete Antikörper

4.1.4 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller	Verwendung
CARD11-ex4-F	5'-aggatgagaccagccacagag-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex4-R	5'-agaacctgccactactgagg-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex5-F1	5'-aagagcttggcacaacgttgg-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex5-R1	5'-atctttagtagaccgctcctgg-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex5-F2	5'-tgagaagaagcagatgacgc-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex5-R2	5'-gcctgcacctgcttatgggag-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex6-F	5'-ctgagtgttcttccacctgc-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex6-R	5'-cctggcaggttcacgtttcc-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex7-F	5'-ctgttgctggttcttctgtcc-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex7-R	5'-ctgctgacacacacctgc-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex8-F	5'-ggcgggaaggcagcagcagag-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex8-R	5'-gtcagtgatgttgcactgg-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex9-F	5'-ctgggccagctggatttggc-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CARD11-ex9-R	5'-ccacagccctcagtgggcacc-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CD79b-ex5-F	5'-ccttcattcagctgttcttgc-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CD79b-ex5-R	5'-ggccaatgtccaggccctgg-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CD79b-ex6-F	5'-caggcccagcagctctgagtc-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
CD79b-ex6-R	5'-gccatgagccaggcagctccg-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
EZH2-ex16-F	5'-aggctctgaggatttacagtg-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
EZH2-ex16-R	5'-ccaatcaaaccacagacttac-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
EZH2-ex18-F	5'-gcaggcaaaccctgaagaac-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
EZH2-ex18-R	5'-tggtgtcagtgagcatgaag-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR, Sequenzierung
MYD88-265-F	5'-gaatgtgtgccaggggtactt-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR
MYD88-265-R	5'-Biotin-tcaggatgctggggaactc-3'	Tib Mol Biol ¹	PCR
MYD88-265-Fseq	5'-cccatcagaagcgac-3'	Tib Mol Biol ¹	Sequenzierung

BIOMED2-Primer für IgH FR1-3 und TCR γ	siehe [117]	Tib Mol Biol ¹	Klonalitätsanalyse
¹ Tib Mol Biol (Berlin, Deutschland). Das gelieferte Lyophilisat wurde in HPLC-aufgereinigtem H ₂ O resuspendiert (Konzentration in Lösung: 10pmol)			

Tabelle 3: verwendete Oligonukleotide

4.1.5 Reagenzien

Name	Hersteller
1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Agarose „Molecular Biology Grade“	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
BrightVision +Poly-HRP-Anti Ms/Rb/Rt	ImmunoLogic (Duiven, Niederlande)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg, Deutschland)
HPLC-H ₂ O	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Oligo aCGH ChIP on Chip Wash Buffer Set	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
PyroMark Annealing buffer version 1	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PyroMark Binding buffer version 1	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PyroMark Q24 reagents 5x24	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PyroMark Wash buffer 10x	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Stabilization and Drying Solution	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Streptavidin Sepharose Beads	GE Health Care (Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Großbritannien)

Tabelle 4: verwendete Reagenzien

4.1.6 Kits

Name	Hersteller
aCGH Hybridization Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Agencourt cleanSEQ Kit	Beckman & Coulter (Brea, CA, USA)
BrightVision +Poly- HRP-Anti Ms/Rb/Rt IgG Biotin-free Kit	ImmunoLogic (Duiven, Niederlande)
GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Beckman & Coulter (Brea, CA, USA)
PyroMark PCR Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SureTag Complete DNA labeling kit	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

Tabelle 5: verwendete Kits

4.1.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Abzüge	Erlab (Köln, Deutschland), Heraeus instruments, (Hanau, Deutschland)
Agarose-Elektrophoresekammern	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Brutschrank	Memmert (Schwabach, Deutschland)
CEQ 8800	Beckman & Coulter (Brea, CA, USA)
Dampftopf	Tefal (Rumilly, Frankreich)
Elektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Feinwaagen	Ohaus (Nänikon, Schweiz), Kern (Balingen, Deutschland)
Fluoreszenzfilter Vysis	Abbott (Chicago, IL, USA)
Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop)	Zeiss (Jena, Deutschland)
Hybridisierungskammer G2534A	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Hybridisierungsofen G2545A	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Kapillarspalt-Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr (Biberach, Deutschland)
Magnetplattenständer (Agencourt)	Beckman & Coulter (Brea, CA, USA)
Magnetrührer	IKA (Staufen, Deutschland)
Mehrkanalpipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Microarray Scanner G2505C Series	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Mikroskop (Axioskop)	Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Minishaker	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Fotodokumentation (CellCam)	Phase GmbH (Lübeck, Deutschland)
Picofugen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) Stratagene (La Jolla, CA, USA)
QuickRay® Tissue Micro Array System	Unitma (Seoul, Korea)
PyroMark Q24	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Rotationsmikrotom DSC1	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Slide Holder G2505	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
TechMate™-Automaten	DAKO (Glostrup, Dänemark)

Thermocycler T1	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer	Gerhardt (Königswinter, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifugen	Beckman & Coulter (Brea, CA, USA), Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
UV-Spectrophometer	NanoDropTechnologies (Wilmington, DE USA)

Tabelle 6: verwendete Geräte

4.1.8 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
96-Well-Reaktionsplatten	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Arrayabdeckplatte für 4-Array slide	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Eppendorf-Gefäße	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Human catalog CGH Microarray 4x180K	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Objektträger	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner bio-one (Frickhausen, Deutschland)
Wägeschälchen	Hassa (Lübeck, Deutschland)

Tabelle 7: verwendete Verbrauchsmaterialien

4.1.9 Software

Programm	Hersteller
Cytogenomics 2.7.08	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
Endnote X3	Thomas Reuters (Frankfurt, Deutschland)
Excel 12	Microsoft (Redmond, WA, USA)
Genesis 1.7.6	Sturn & Snajder, (TU Graz, Schweiz)
GenomeLab 10.2	Beckman & Coulter (Brea, CA, USA)
Prism 5 for Mac OS X	GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA)

PyroMark Assay design 2.0	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PyroMark Q24 – Laufprogramm	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Scan Control A 8.5.1	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
SeqWorks	Sven Opitz

Tabelle 8: verwendete Software

4.1.10 In Silico

Programm	URL
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Ensembl	http://www.ensembl.org
Primer-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
COSMIC	http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/

Tabelle 9: Datenauswertung

4.2 Methoden

4.2.1 Studiengruppe

Im Folgenden wird die Rekrutierung der Studiengruppe anhand der berücksichtigten Auswahlkriterien beschrieben.

4.2.1.1 Patientenproben

Es wurden für die Studie Proben aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des UK-SH, Campus Lübeck rekrutiert, die neben dem morphologischen und immunhistochemischen Bild eines diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms bei Diagnosestellung auch eine Positivität für Epstein-Barr Nukleinsäuren in der chromogenen *in situ* Hybridisierung (EBER) aufwiesen. Entscheidend war hier eine Reaktivität von >50% der B-Zell Blasten. Ein weiteres Einschlusskriterium bestand in Übereinstimmung mit der WHO Klassifikation maligner Lymphome in einem Mindestalter der Patienten bei Diagnosestellung von 50 Jahren. Auch mussten weitere synchrone Neoplasien des lymphatischen und/oder hämatopoetischen Systems zumindest klinisch ausgeschlossen sein. Berücksichtigt wurden Proben aus den Jahren 2008 bis 2013. Alle Proben samt zugehöriger klinischer Daten wurden nach der Rekrutierung für die Studie einer umgehenden Anonymisierung im Sinne der genehmigten Ethikanzeige der Ethikkommission der Universität zu Lübeck zugeführt. (Aktenzeichen: 14-005A)

4.2.2 Histopathologische Methoden

4.2.2.1 Morphologie

Die morphologisch/histopathologische Aufarbeitung der Proben erfolgte an Haematoxylin-Eosin-, Giemsa- und PAS-gefärbten Paraffinschnitten. Alle Schnitte und Färbungen wurden von Mitarbeitern/innen des Labors für hämatologische Diagnostik des Instituts für Pathologie in Lübeck angefertigt. Die initiale morphologische Begutachtung wurde von zwei Untersuchern (Prof. Dr. med. Christoph Thorns und Judith Gebauer) durchgeführt.

Die Diagnosen wurden in Übereinstimmung mit der aktuellen WHO Klassifikation für maligne Lymphome von zwei Pathologen validiert (Prof. Dr. med. Christoph Thorns und Prof. Dr. med. Alfred C. Feller) [111].

4.2.2.2 Konstruktion eines *Tissue Microarrays* (TMA)

Bei einem Tissue Microarray (TMA) handelt es sich um einen Paraffinblock, der die parallele Aufarbeitung von zahlreichen unterschiedlichen Formalin-fixierten Gewebeproben ermöglicht. Durch dieses Verfahren kann somit eine Vielzahl von Proben simultan und unter gleichen Bedingungen sowohl konventionell morphologisch und immunhistochemisch als auch unter Verwendung von *in situ*-Hybridisierungen analysiert werden.

Für die Konstruktion des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten TMAs wurden zunächst repräsentative Lymphomanteile mit einem Tumorzellanteil > 90% auf frisch angefertigten HE-Schnitten aller Proben gekennzeichnet und diese Markierung in der Folge auf die sog. Donatorblöcke übertragen. Im Anschluss wurden mit einer QuickRay® Hohlzylinder jeweils 1,5 mm durchmessende Stanzzylinder aus diesen extrahiert und in den TMA Akzeptorblock übertragen. Um einen Gewebstransfer zu gewährleisten, bei dem möglichst geringe Spannungen im Akzeptorblock induziert werden, wurde dieser zuvor auf 37 °C erhitzt. Zur zweifelsfreien Identifikation der eingebrachten Gewebeproben wurden Landmarken im Sinne von Leber-, Lungen- und Nieren-Proben flankierend arrangiert. In der vorliegenden Studie wurden alle berücksichtigten immunhistochemischen Färbungen und *in situ* Hybridisierungen an Schnittstufen dieses TMAs durchgeführt.

4.2.2.3 Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischer Verfahren können Antigene in Gewebeproben durch die Bindung spezifischer Antikörper sowie chromogener Substanzen am Paraffinschnitt markiert und durch eine Gegenfärbung mit Haematoxylin speziellen histomorphologischen Strukturen zugeordnet werden. Zur Anwendung kommt hier die indirekte Immunhistochemie, bei der ein Primärantikörper an das zu visualisierende Epitop bindet und entweder im Falle monoklonaler Maus-Antikörper als Primärreagenz über einen Enhancer-Schritt oder im Falle von polyklonalen Antikörpern oder auch rabbit-monoklonalen Antikörpern einem enzymgekoppelten Sekundärantikörper (heute in Form eines Polymers) in einem zweiten (bzw. dritten) Schritt als Zielstruktur dient. Das gekoppelte Enzym katalysiert im Folgenden den sichtbaren Farbumschlag durch Präzipitation eines zugesetzten Chromogens. Bei allen verwendeten Antikörpern wurde das ursprünglich fast farblose Chromogen Diaminobenzidin (DAB) zugesetzt, welches durch die enzymatisch katalysierte Oxidation einen Farbumschlag in einen braun-schwarzen Niederschlag am Ort des Zielantigens zeigt. Die notwendigen Inkubations- und Waschschrte wurden mit dem TechMate™-Automaten durchgeführt. Die

vorherige Antigendemaskierung erfolgte mit Puffern verschiedener pH-Werte mittels Hitzevorbehandlungen in der Mikrowelle, im Dampfgarer und im Dampftopf. Es kamen Primärantikörper gegen folgende Zielstrukturen zur Anwendung: BCL2, BCL6, CD10, FOXP1, MUM1, Ki-67. Zur Visualisierung wurde das BrightVision +Poly- HRP-Anti Ms/Rb/Rt IgG Biotin-free Kit verwendet. Dies beinhaltet einen IgG-Sekundärantikörper, mit dem die HR-Peroxidase konjugiert ist (Poly-HRP-Anti-mouse/rabbit/rat IgG).

Antikörper	Auswerte modus	Grenzwerte	Verwendung
Bcl2	negativ	< 50% der Tumorzellen markiert	Immunhistochemie, Klassifikation nach Muris ³
	positiv	> 50% der Tumorzellen markiert	
Bcl6	negativ	< 30% der Tumorzellen markiert	Immunhistochemie, Klassifikation nach Hans ¹ , Visco-Young ²
	positiv	> 30% der Tumorzellen markiert	
CD10	negativ	< 30% der Tumorzellen markiert	Immunhistochemie, Klassifikation nach Hans ¹ , Muris ³ , Visco-Young ²
	positiv	> 30% der Tumorzellen markiert	
FOXP1	negativ	< 80% der Tumorzellen markiert	Immunhistochemie, Klassifikation nach Nyman ⁴ , Visco-Young ²
	positiv	> 80% der Tumorzellen markiert	
MUM1	negativ	< 30% der Tumorzellen markiert	Immunhistochemie, Klassifikation nach Hans ¹ , Muris ³ , Nyman ⁴
	positiv	> 30% der Tumorzellen markiert	
MIB-1	quantitativ	Auswertung erfolgte in 5%- Abstufung	Immunhistochemie
Immunhistochemische Klassifikationsalgorithmen nach ¹ Hans et al. [45], ² Visco-Young et al. [121], ³ Muris et al. [76], ⁴ Nyman et al. [83]			

Tabelle 10: Immunhistochemische Auswertung

4.2.3 Chromogene *in situ* Hybridisierung – EBER

Die chromogene *in situ* Hybridisierung stellt ein gängiges Verfahren für den Nachweis einer floriden, chronischen oder reaktivierten Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) an Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben dar.

Der Nachweis der *EBV encoded RNA* (EBER) erfolgte an 5µm dicken, entparaffinierten Gewebsschnitten, welche auf Objektträger aufgezogen wurden. Von besonderer Wichtigkeit sind für die Präparation garantiert RNase-freie Reaktionsbedingungen. Zunächst erfolgte ein 30-minütiger Verdau mit Proteinase K sowie eine Inkubation mit Flourescein Isozyanat (FITC) – konjugierten EBER Peptid-Nukleinsäure (PNA) – Sonden. Diese Sonden wurden in einem nächsten Schritt mittels konjugierter Anti-FITC Antikörper sichtbar gemacht.

4.2.4 Floureszenz-*in situ*-Hybridisierung

Mit dem Ziel der Visualisierung von genomischen Amplifikationen oder Translokationen der *BCL2*, *BCL6* und *cMYC* Loci wurden alle Fälle der Studiengruppe mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung unter Verwendung der in Tabelle 11 genannten Sonden untersucht.

Zunächst wurden 4 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträgern immobilisiert. Im Anschluss an die Entparaffinierung erfolgten eine zweistufige Antigendemaskierung sowie die Fixierung mit Paraformaldehyd. Hiernach folgte eine 72-stündige Inkubation mit der jeweiligen Sonde bei 37°C, ein abschließender Waschvorgang mit unterschiedlichen Waschpuffern sowie einer Kerngegenfärbung unter Verwendung von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Protokoll und Bildmaterial s. Anhang).

Sonde	Hersteller
Dual color break apart 18q21	Abbott Vysis (Wiesbaden, Deutschland)
LSI BCL6 3q27	Abbott Vysis (Wiesbaden, Deutschland)
Dual color break apart 8q24	Abbott Vysis (Wiesbaden, Deutschland)

Tabelle 11: verwendete FISH-Sonden

Die Beurteilung der Hybridisierungen wurde durch drei Untersucher (Prof. Dr. med. Christoph Thorns, Judith Gebauer, Dr. med. Niklas Gebauer,) 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 drei Sonden, ab denen ein Biopsat als transloziert angesehen wurde, erfolgte über Testhybridisierungen an nicht-neoplastisch veränderten Tonsillengewebssproben. Diese wurden ausgewertet und der Grenzwert aus der Summe von

Mittelwert und dreifacher Standardabweichung ermittelt [120]. Dazu wurden fünf nicht-neoplastisch veränderte Fälle mit allen Sonden hybridisiert und durch die drei Untersucher ausgewertet. Anhand oben beschriebener Methode ergab sich ein Grenzwert von 5% Splitsignale für die eingesetzten Split-Sonden.

4.2.5 Molekularpathologische Methoden

4.2.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Die DNA-Isolierung aus FFPE-Patientenmaterial erfolgte unter Verwendung des QiaAmp Mini Kit 250 zur anschließenden

- Pyrosequenzierung der *MYD88*-Punktmutation p.L265P sowie deren relativer Quantifizierung
- Kapillarsequenzierung bekannter Hot-Spots des NF kappa-B Signalwegs (*CARD11*, *CD79B*)
- Kapillarsequenzierung bekannter Hot-Spots des *EZH2* Gens
- Array CGH-Analyse
- PCR-basierte Klonalitätsanalyse des Immunglobulinschwerkettenlokus sowie des T-Zell-Rezeptors

Die Präparation erfolgte hierbei unter Verwendung einer Silika-Matrix, welche selektiv Nukleinsäuren bindet.

4.2.5.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD). Gemessen wurde die Absorption der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der die aromatischen Ringe der Nukleinsäuren die maximale Absorption erreichen. Die Absorptionsmessung erfolgte unter Verwendung des NanoDrop. Anhand des Verhältnisses der OD260 nm und der OD280 nm (Proteine) konnte auf die Reinheit der Nukleinsäuren geschlossen werden. Für reine DNA sollte der Quotient um 1,8 liegen. Niedrigere Werte deuten Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte Verunreinigungen durch Salze und Zucker an.

4.2.5.3 PCR-basierte Klonalitätsanalysen des Immunglobulinschwerkettenlokus sowie des T-Zellrezeptors nach dem BIOMED2 Protokoll

Obwohl die meisten Fälle von lymphoproliferativen Erkrankungen aufgrund ihrer zytomorphologischen, histomorphologischen sowie immunhistochemischen Eigenschaften als eindeutig reaktiv oder maligne differenziert werden können, bleibt ein kleiner Teil (ca 5-10% der Fälle), bei dem diese Unterscheidung anhand der gängigen Untersuchungsmethoden nicht sicher getroffen werden kann. Klonalitätsanalysen können in diesen Fällen zur Diagnosefindung beitragen, da sich maligne Zellen aus einem gemeinsamen Zellklon entwickeln. Wurden früher hierzu vor allem Southern-Blot-basierte Analysen durchgeführt, hat sich im letzten Jahrzehnt insbesondere aufgrund ihrer schnellen Durchführbarkeit bei hoher Sensitivität, sowie der Möglichkeit, auch Proben aus fixiertem und Paraffin-eingebetteten Materialien (und dadurch häufig DNA von niedrigerer Qualität) zu verwenden, die PCR-basierte Klonalitätsanalyse durchgesetzt.

Hierfür werden Primer für die Immunglobulin- sowie für die T-Zell Rezeptor-Loci verwendet. Befindet sich in dem amplifizierten Bereich ein Zellklon, bildet sich dieser in der nachfolgend durchgeführten Kapillargelelektrophorese, in Abweichung von einer physiologisch polyklonalen (Normal-) Verteilung, als monoklonaler Peak in der betroffenen Region ab. Detektiert wird hierbei ein uniform rearrangiertes Schwerketten- bzw. T-Zell Rezeptor Muster.

In der vorliegenden Arbeit kamen standardisierte Primer, PCR- und Elektrophorese-Bedingungen nach dem BIOMED-2 Protokoll für die Detektion klonal rearrangierter Immunglobulin-Schwerkettenloci FR 1-3 sowie des T-Zell Rezeptors gamma zur Anwendung [117].

4.2.5.4 Kapillarsequenzierung ausgewählter Hot-spots im NF kappa-B Signaltransduktionsweg

Die Kettenabbruchmethode durch Didesoxynukleotide nach Sanger stellt die am weitesten verbreitete Methode zur DNA-Sequenzierung dar, die es erlaubt, eine rein qualitative, bidirektionale Aussage über die Basenabfolge eines DNA-Doppelstranges zu treffen. Von neueren Methoden nach wie vor unerreicht ist die Möglichkeit, in Abhängigkeit von der Qualität der DNA-Matritze, 800 – 1000 Basen pro Lauf zu sequenzieren. Unter

Berücksichtigung der häufig regressiv veränderten Nukleinsäuren aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe ist hier allerdings in der Regel die Analyse von PCR-Amplifikaten von maximal 350 – 400 Basen pro Lauf bidirektional möglich.

4.2.5.4.1 Auswahl von Zielgenen und Primerdesign

Aufgrund der eingangs geschilderten biologischen und potentiell pharmakologischen Relevanz von Mutationen in Hotspots der BCR-vermittelten Aktivierungskaskade des NF-kappa B Signalwegs sowie der *EZH2*-regulierten Histonmethylierung wurden die folgenden Amplikons für die bidirektionale Sanger-Sequenzierung ausgewählt:

Gen	Exon	Domäne
<i>CD79B</i>	5 und 6	ITAM
<i>CARD11</i>	4 – 9	Coiled-coil
<i>EZH2</i>	16 und 18	SET

Tabelle 12: Amplikons zur Sanger-Sequenzierung

Für das Primerdesign wurden die genomischen Referenzsequenzen der genannten Exone sowie der flankierenden intronischen Sequenzen berücksichtigt.

4.2.5.4.2 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode, die die Vervielfältigung von geringsten DNA-Mengen ermöglicht. Sie untergliedert sich in drei wiederholt ablaufende Schritte, die Denaturierung, die Hybridisierung sowie die Amplifikation. In einem Ansatz aus Proben-DNA, Primern, Nukleotiden und DNA-Polymerase wird erstere zunächst bei einer Temperatur von 95 °C denaturiert. Nun liegen die komplementären DNA-Einzelstränge vor. Danach wird die Temperatur auf 55 °C gesenkt, was den Primern erlaubt, komplementär an die Einzelstrang-DNA zu binden. Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bzw. *Annealing* bezeichnet. Nun kommt die bereits im Ansatz befindliche Polymerase zum Einsatz, die bei 72°C aus den ebenfalls zugegebenen Nukleotiden an den Einzelstrangmatrizen eine komplementäre DNA-Sequenz synthetisiert.

Hierdurch verdoppelt sich im ersten Durchlauf der zu untersuchende DNA-Abschnitt; in jedem weiteren Zyklus steigt die DNA-Menge exponentiell an. Somit liegen nach durchschnittlich 30-45 Zyklen die untersuchten DNA-Bereiche in hoher Anzahl amplifiziert vor, welches die Voraussetzung für nachfolgende Untersuchungsmethoden wie beispielsweise die Sequenzierung oder eine Fragmentanalyse bildet.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der benötigte Master-Mix für die PCR angesetzt und um Amplikon-spezifische Primer sowie Proben-DNA ergänzt. Anschließend erfolgte die Amplifikation im Thermocycler. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit dem Ziel der Darstellung der amplifizierten DNA-Fragmente wurden diese ihrer Größe nach in einem horizontalen Agarosegel aufgetrennt. Zu diesem Zweck wurden das PCR-Produkt sowie DNA-Marker auf ein zuvor mit Ethidiumbromid versetztes Agarose-Gel aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese mit abschließender Auswertung unter UV-Licht. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.4.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden zunächst in eine 96 well Platte überführt, dort mit ferromagnetischen Partikeln versetzt und in einen Magnetplattenständer gestellt. Dort erfolgte eine dreimalige Ethanolwaschung sowie anschließend (zunächst ohne, später unter erneutem Einsatz des Magnetplattenständers) eine Resuspension in Wasser. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.4.5 Sequenzreaktion

Die aufgereinigten und somit von verbleibenden Nukleotiden und Enzymen befreiten PCR-Produkte wurden im Anschluss mit Forward- bzw. Reverse-Primer sowie mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden und der notwendigen Polymerase versetzt und anschließend in den Thermocycler überführt (Protokoll s. Anhang).

4.2.5.4.6 Aufreinigung von Sequenzreaktionsprodukten

Die fluoreszenzmarkierten Produkte der Sequenzreaktion wurden zunächst mit magnetischen Partikeln versetzt und in einen Magnetplattenständer überführt. Nachfolgend wurden sie (analog zur Aufreinigung der PCR Produkte) mehrfach mit Ethanol gewaschen und

anschließend mit Wasser (zunächst ohne, später wieder unter Einsatz des Magnetplattenständers) resuspendiert. Zur anschließenden Kapillarsequenzierung erfolgte dann die Überführung in eine Beckman & Coulter Platte, die mit Öl beschichtet wurde. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.4.7 **Kapillar-Gelelektrophorese**

Es erfolgte nun der Start des Kapillar-Gelelektrophorese-Programms mit Denaturierung, Injektion und nachfolgender Separation nach durch den Hersteller empfohlenen Temperatur- und Spannungsvorgaben. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.4.8 ***In silico* Datenauswertung**

Die Datenauswertung erfolgte mittels GenomeLab 10.2. von Beckman & Coulter. Anhand der Ensembl Datenbank wurden vorbeschriebene Polymorphismen von der weiteren Analyse ausgeschlossen

4.2.5.5 **Pyrosequenzierung der *Myd88* Punktmutation p.L265P**

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode zur DNA-Sequenzierung, die, anders als die Kettenabbruchmethode durch Didesoxynukleotide nach Sanger, auf dem Prinzip der Sequenzierung parallel zur Synthese in Echtzeit basiert. Detektiert wird hierbei Pyrophosphat (PPi), welches durch die Zugabe und den anschließenden Einbau von Nukleotiden durch die DNA-Polymerase frei wird. Trotz der gegenwärtigen Limitierung auf etwa 400-500 Basen pro Lauf, im Gegensatz zu etwa 800-1000 Nukleotiden nach Sanger, bietet die Pyrosequenzierung einen Ansatz für die parallele Bearbeitung vieler Proben und ermöglicht so einen höheren Durchsatz. Die Präparation der Matrize für die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von Streptavidin-beschichteten Sepharose-Beads. Bei dem hier verwendeten Verfahren wird die Immobilisierung durch die Biotinylierung eines Primers und somit in der Folge dessen Bindung an Streptavidin auf den Beads ermöglicht. Die zu sequenzierende DNA liegt als Einzelstrang vor und wird mit dem sog. Sequencing-Primer hybridisiert. Außerdem werden noch DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase, Apyrase und Adenosin-5'Phosphosulfat sowie Luciferin zugesetzt. Die sequenzielle Inkubation mit Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) bzw. dATP α S an Stelle von dATP, da letzteres als Substrat der Luciferase fungiert, induziert bei korrekter Hybridisierung den Einbau des komplementären Nukleotids durch die DNA-Polymerase, wobei PPi frei wird. Die ATP-

Sulfurylase synthetisiert ATP aus Adenosin-5'Phosphosulfat in Gegenwart des so freiwerdenden PPi. ATP vermittelt in der Folge die katalytische Umwandlung von Luciferin in Oxiluciferin durch die Luciferase. Das hierbei generierte Licht wird durch eine Kamera detektiert und ist in seiner Quantität dem freiwerdenden ATP und somit der Anzahl der polymerisierten Nukleotide proportional. Zuletzt werden unverbaute Nukleotide sowie unverbrauchtes ATP durch die Apyrase neutralisiert und die Reaktion kann mit einem weiteren Nukleotid von neuem ablaufen.

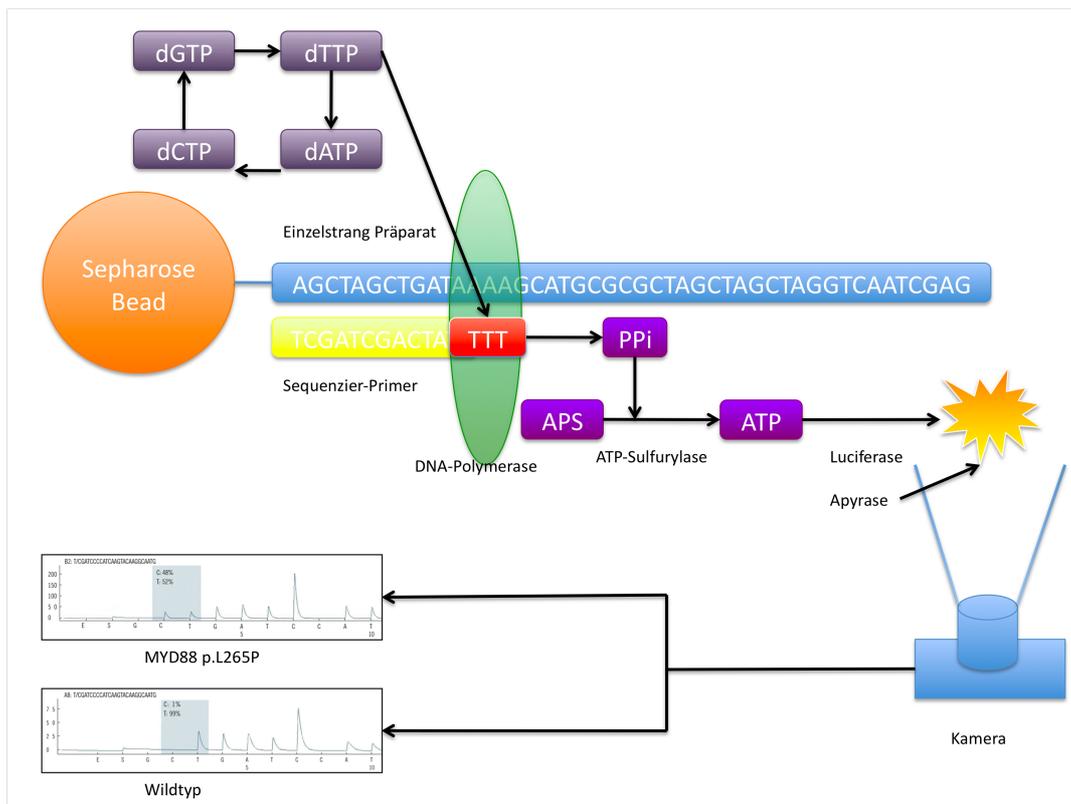


Abbildung 1: Konzept der Pyrosequenzierung, modifiziert nach Gharizadeh *et al.* [42].

4.2.5.5.1 Primerdesign

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe der PyroMark Assay design Software 2.0 unter Betrachtung der benachbarten Sequenzabschnitte des bekannten Lokus der *MYD88*-Punktmutation p.L265P generiert. Ziel war die Amplifikation eines Abschnittes von nicht mehr als 120 Basenpaaren. Der Sequenzprimer wurde in unmittelbarer Nähe der betroffenen Base platziert.

4.2.5.5.2 PCR

Die Proben-DNA wurde jeweils mit den Primern zusammengeführt und anschließend wurde im Thermocycler die PCR-Reaktion gestartet. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit dem Ziel der Darstellung der amplifizierten DNA-Fragmente wurden diese ihrer Größe nach in einem horizontalen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. (Protokoll s. Anhang)

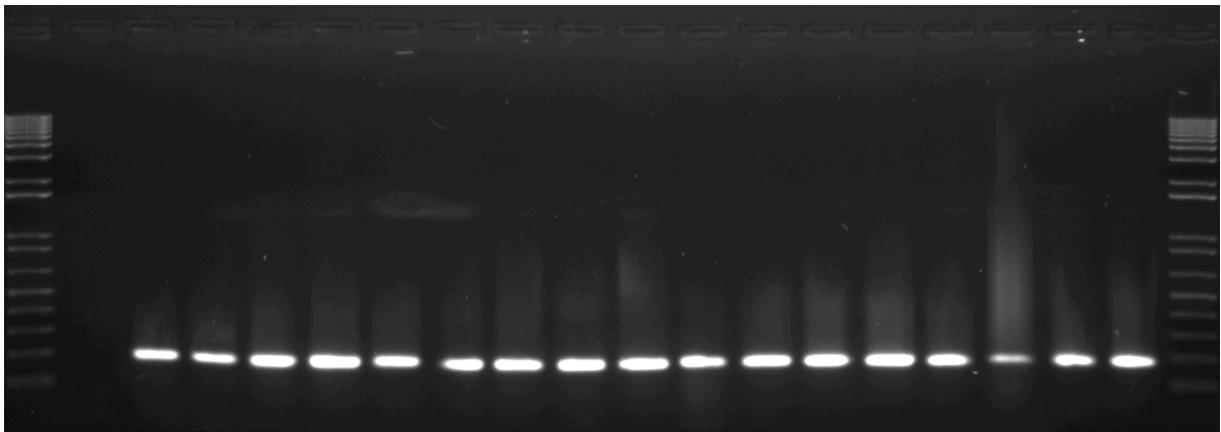


Abbildung 2: Darstellung der im horizontalen Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte unter UV-Licht

4.2.5.5.4 Immobilisierung der PCR-Produkte

Die Einzelstrangpräparation erfolgte durch Zugabe eines Immobilisierungsmixes zur Matrize mit anschließender Überführung auf eine Reaktionsplatte. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.5.5 Pyrosequenzierung

In einem letzten Schritt wurden eine Sequenzier- und Immobilisierungsplatte angesetzt, diese aufgereinigt und nachfolgend denaturiert sowie abschließend die Pyrosequenzierung im PyroMark24 durchgeführt. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.6 Array-CGH (Comparative genomic hybridization)

Die Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH) ist eine Methode, die den Nachweis submikroskopischer Deletionen bzw. Amplifikationen genomischer DNA ermöglicht. Dabei werden fluoreszenzmarkierte Proben-DNA sowie geschlechtsadaptierte unterschiedlich markierte Referenz-DNA gegen ein Raster immobilisierter DNA-Fragmente (Sonden) hybridisiert. Dies erfolgt an Metaphase-Chromosomen in einem Verhältnis von 1:1. Die hier verwendeten Arrays bilden das menschliche Genom in annähernd gleichmäßiger Verteilung auf knapp 180.000 Sonden ab. Somit besteht zwischen den einzelnen Sonden ein durchschnittlicher Abstand von 13 kB. Nachfolgend werden die Fluoreszenzintensitäten jeder einzelnen Sonde im Vergleich mit der Referenz-DNA gemessen, wobei das Verhältnis der Signale Aufschluss über Hinzugewinne bzw. Verluste an genomischem Material gibt. Höhere Farbintensitäten in den untersuchten Proben bedeuten hierbei Zugewinne in der entsprechenden chromosomalen Region, schwächerer Intensitäten werden als Verluste im untersuchten Material gewertet.

Somit besteht mit der Array-CGH-Untersuchung die Möglichkeit, chromosomale numerische Aberrationen ab einer Größe von 52 kB (festgelegt durch den Abstand zwischen den einzelnen Sonden, wobei lediglich Aberrationen mit gleichsinnigen Veränderungen an vier und mehr aufeinanderfolgenden Sonden als signifikant gewertet werden können) zu detektieren. Im Unterschied zu der klassischen Chromosomenanalyse, bei der in der Regel Veränderungen erst ab einer Größe von ca. 10MB erfasst werden können, ermöglicht diese Methode folglich die Erfassung deutlich kleinerer Aberrationen. Da allerdings eine rein quantitative Analyse durchgeführt wird, werden balancierte Veränderungen nicht erfasst. Zusätzlich eignet sich dieses Verfahren nicht nur für die Analyse aus Blut- bzw. aus frischen unfixierten Gewebeproben sondern zusätzlich für die Verwendung von Formalin-fixiertem und Paraffin eingebettetem Material.

4.2.5.6.1 Probenmarkierung

Es erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der Proben-DNA (Labeling) mittels Cyanine 5-dUTP (blauer Farbstoff) sowie der Kontroll-DNA mit Cyanine 3-dUTP (roter Farbstoff). (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.6.2 Aufreinigung der markierten DNA

Zur Aufreinigung der gelabelten DNA wurden die Proben zentrifugiert sowie mit TE-Puffer versetzt und auf die dem Kit beiliegende Säule pipettiert. Nachfolgend wurden die Proben mit Hybridization Master Mix zusammen geführt, bevor sie auf die Microarrays übertragen und für 48h bei 65 °C im Hybridisierungsöfen inkubiert wurden. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.6.3 Waschen der Microarrays

Nach Abtrennen der Microarrays von der Deckplatte erfolgte die aufeinanderfolgende Überführung der Proben in zwei Pufferlösung, nachfolgend in Acetonitril sowie abschließend in Stabilitäts- und Trockenlösung. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.6.4 Scanning der Proben

Die abschließende Erfassung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte im Microarrayscanner und wurde im Weiteren mittels der Software „Agilent Scan Control“ durchgeführt. (Protokoll s. Anhang)

4.2.5.6.5 Analyse genomischer Daten

Die erfassten genomischen Daten wurden aus den hinterlegten TIFF files mittels Feature Extraction and CytoGenomics V. 2.7.08 Software (Agilent Technologies Inc.) extrahiert. Die Definition von genomischem Hinzugewinn (+0,25), Deletion (-0,25), Amplifikation (+1) und vollständigem Verlust (-1) wurde anhand eines \log_2 Verhältnis-Grenzwertes und eines Minimums von vier aufeinanderfolgenden gleichsinnig betroffenen Sonden festgelegt. Zusätzlich wurde der p-Wert als Parameter für statistische Signifikanz (unter Berücksichtigung von Aberrationsintensität und Schwankungen zwischen den einzelnen Sonden) in Anlehnung an die publizierte Literatur als $\min. 5.0 \times 10^{-6}$ definiert [103]. Wiederkehrende Bereiche von numerischen chromosomalen Veränderungen wurden festgelegt als solche, die in drei oder mehr der erstellten Array CGH-Profilen auftraten [101]. CNV, die zufolge UCSC Genome Bioinformatics database als bekannte Polymorphismen beschrieben sind, wurden nicht berücksichtigt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Um wiederholt aufgetretene chromosomale Veränderungen visuell aufzubereiten, wurde eine binäre Matrix erstellt, die jede Probe mit jeder wiederholt aufgetretenen Aberration verbindet.

Hierbei wurde eine normale Kopienanzahl als “0”, Veränderungen der Kopienzahl als “-1” für Verluste bzw. “+1” für Zugewinne verschlüsselt [110].

4.2.6 Statistik

In der statistischen Auswertung wurde das Vorkommen der chromosomalen Aberrationen und Mutationen in den beiden Subtypen GCB- und non-GCB DLBCL sowie bei nodaler bzw. extranodaler Primärmanifestation im Hinblick auf das Vorliegen einer statistisch signifikanten Divergenz hin analysiert. Das Signifikanzniveau wurde auf einen alpha-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt. Das bedeutet, dass lediglich eine Wahrscheinlichkeit von 5 % oder kleiner für das fälschliche Verwerfen der Null-Hypothese zulässig ist.

Zur Bestimmung des p-Wertes wurde der Fisher’s exact test eingesetzt, der sich insbesondere für kleine Fallzahlen eignet und daher für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurde.

Zudem wurde der Proliferationsindex (Ki-67 in %) der primär nodal bzw. extranodal manifestierten Lymphomen und der GCB- bzw. non-GCB-Subtypen verglichen. Hier wurde das Signifikanzniveau ebenfalls auf $\leq 0,05$ festgelegt.

Zur Signifikanztestung dieser nicht-normalverteilten, aber kontinuierlich skalierten Variablen kam der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test speziell auch unter Berücksichtigung der kleinen Fallzahl zur Anwendung.

5. Ergebnisse

5.1 Klinische und histopathologische Charakteristika der Studiengruppe

5.1.1 Klinische Eigenschaften

Das Geschlechterverhältnis in der untersuchten Kohorte betrug 1:1. Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose lag bei 75,8 Jahren (Spannweite: 59-90 Jahre), der Median bei 78 Jahren. Die Lymphome fanden sich überwiegend im Lymphknoten (n = 18; 69,2 %), gefolgt von Bindegewebe und Mundschleimhaut (n = 2; 8 %) sowie Tonsille, Milz, Aorta und Nasenschleimhaut (je n = 1; 3,8 %). Somit lag in 30,8 % der Fälle (n=8) eine primär extranodale Lokalisation vor. Die Charakteristika der Studienteilnehmer sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Fall-nummer	Lokalisation	Geschlecht	Alter bei Erstdiagnose	Kommentar
1	Nodal	M	80	
2	Extranodal	M	70	
3	Nodal	M	80	
4	Nodal	W	59	
5	Extranodal	W	79	
6	Extranodal	W	77	
7	Nodal	W	83	
8	Nodal	M	68	
9	Nodal	M	83	
10	Nodal	W	71	
11	Nodal	M	84	
12	Nodal	W	81	
13	Nodal	W	80	
14	Nodal	W	71	
15	Nodal	W	78	
16	Extranodal	M	74	
17	Extranodal	W	80	aufgrund eingeschränkter DNA-Qualität konnte keine Array-CGH-Analyse durchgeführt werden
18	Nodal	W	74	
19	Nodal	M	68	
20	Extranodal	M	81	
21	Extranodal	W	90	
22	Nodal	M	81	
23	Nodal	M	64	aufgrund mangelndem Tumormaterial nach DNA-Extraktion konnten nicht alle immunhistochemischen Färbungen erfolgen
24	Nodal	M	76	
25	Nodal	W	62	
26	Extranodal	M	78	aufgrund eingeschränkter DNA-Qualität konnte keine Array-CGH-Analyse durchgeführt werden

Tabelle 13: Klinische Charakteristika der Studienteilnehmer

5.1.2 Morphologische Eigenschaften

In der konventionell morphologischen Aufarbeitung kam in allen Fällen der charakteristische Phänotyp eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms mit einer (sub-) totalen Auflösung der zu Grunde liegenden Gewebestruktur sowie einer hochgradigen Infiltration durch neoplastische Zellen zur Darstellung. Es fanden sich hierbei B-Zellen unterschiedlicher Reifestadien, überwiegend jedoch blastäre B-Zellen. Zudem zeigte sich ein variabler Anteil reaktiver Zellen sowie Areale mit landkartenartig konfigurierten Nekrosen (s. Abbildung 3).

5.1.3 Ergebnisse der chromogenen *in situ* Hybridisierung – EBER

Eine zugrundeliegende EBV-Infektion wurde durch den Nachweis der EBV encoded RNA (EBER) durch chromogene *in situ* Hybridisierung bestätigt. Als Einschlusskriterium für die vorliegende Studie wurde festgelegt, dass mindestens 50 % der malignen Zellen EBER-positiv sein müssen. Dies konnte in allen Fällen nachgewiesen werden (s. Abbildung 3). Somit lag in Zusammenschau mit den morphologischen und klinischen Charakteristika in allen Fällen ein EBV-positives DLBCL des älteren Menschen vor und alle Proben konnten in die weitere Analyse eingeschlossen werden.

5.1.4 Immunhistochemische Klassifikation nach Hans *et al.* und Visco *et al.*

Im Rahmen der immunhistochemischen Klassifikation nach Hans *et al.* kam in der Mehrzahl der Fälle (n=14; 56%) ein non-GCB Phänotyp zur Darstellung [45]. Die zusätzlich durchgeführte Klassifikation nach Visco-Young zeigte in 52 % der Fälle (n= 13) einen nonGCB-Subtyp und damit nahezu übereinstimmende Resultate mit einer Konkordanzrate von 96 % zu dem Hans'Algorithmus [121]. An einem Fall konnten keine immunhistochemischen Untersuchungen erfolgen.

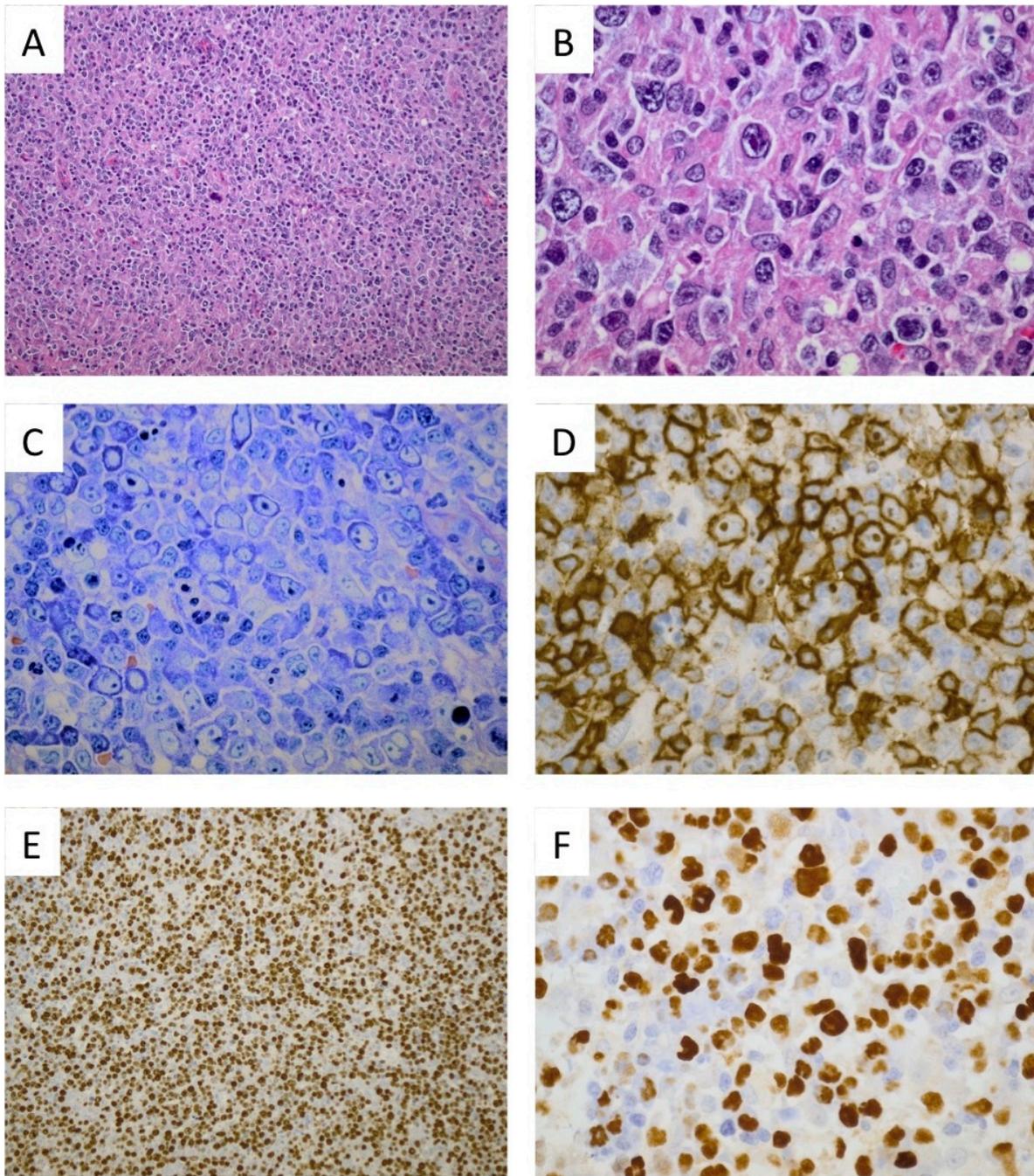


Abbildung 3: Ein charakteristischer Fall eines EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen im Lymphknoten; Histopathologische und immunhistochemische Färbungen; Vollständig aufgelöste Lymphknotenarchitektur mit Infiltration durch eine monomorphe maligne Neoplasie (A: HE Originalvergrößerung 100fach), Überwiegend blastäre Infiltrate mit hochgradigen zytologischen Atypien – vereinbar mit lymphatischen Blasten (B+C HE/Giemsa Originalvergrößerung 400fach), teils schwache, aber durchgehende Positivität für CD20 (D: IHC CD20 Originalvergrößerung 400fach), hoher Proliferationsindex (E: IHC Ki67/Mib1 Originalvergrößerung 100fach) und >50% Zellen mit EBV-Nachweis in der chromogenen *in situ* Hybridisierung (F: EBER CISH Originalvergrößerung 400fach).

5.2 Ergebnisse der Klonalitätsanalysen des Immunglobulinschwerkettenlokus sowie des T-Zellrezeptors

Die Kapillarelektrophorese erbrachte den Nachweis einer B-Zell-Klonalität in 73 % der Fälle (n=19 von 26); T-Zell-Klonalität konnte in 2 weiteren Fällen nachgewiesen werden (8 % ; in einem Fall konnte keine T-Zell-Klonalitätsanalyse erfolgen). In insgesamt 19,2 % (n= 5) konnte somit weder eine B- noch eine T-Zell-Klonalität gezeigt werden. Bei dem EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen handelt es sich folglich um eine klonale B-Zell-Erkrankung, die gelegentlich von klonalen T-Zell-Infiltraten begleitet sein kann.

5.3 Mutationsstatus funktionsrelevanter Hot-Spots im NF kappa B-Signaltransduktionsweg und in der EZH2-vermittelten Regulation der Genexpression

5.3.1 *CARD11* – Exon 4 – 9

In 2 Fällen (7,6 %) erfolgte der Nachweis einer Missense Mutation in der untersuchten coiled coil Domäne von *CARD11* an Position p. E258K und p. T128M.

5.3.2 *CD79B* – Exon 5 und 6

Die PCR-basierte Sanger-Sequenzierung der ITAM-Domäne von *CD79B* erbrachte keinen Mutationsnachweis in den analysierten Proben (n= 0) .

5.3.3 *MYD88* – p.L265P

Die Pyrosequenzierung der am häufigsten in der Literatur beschriebenen *MYD88* Mutation p.L265P konnte in keinem der untersuchten Fälle nachgewiesen werden (n= 0).

5.3.4 *EZH2* - Exon 16 und 18

In der SET-Domäne des *EZH2*-Gens konnte eine (n= 1; 3,8 %) in der Literatur als onkogen beschriebene Missense-Mutation an Position p.Y602S nachgewiesen werden.

5.4 Ergebnisse der FISH-Untersuchung auf chromosomale Aberrationen

Mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung konnte in 4 Fällen (15,4 %) eine chromosomale Aberration am *bcl6*-Lokus nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch keine chromosomalen Aberrationen am *c-myc*- bzw. *bcl2*-Lokus (s. Abbildung 4).

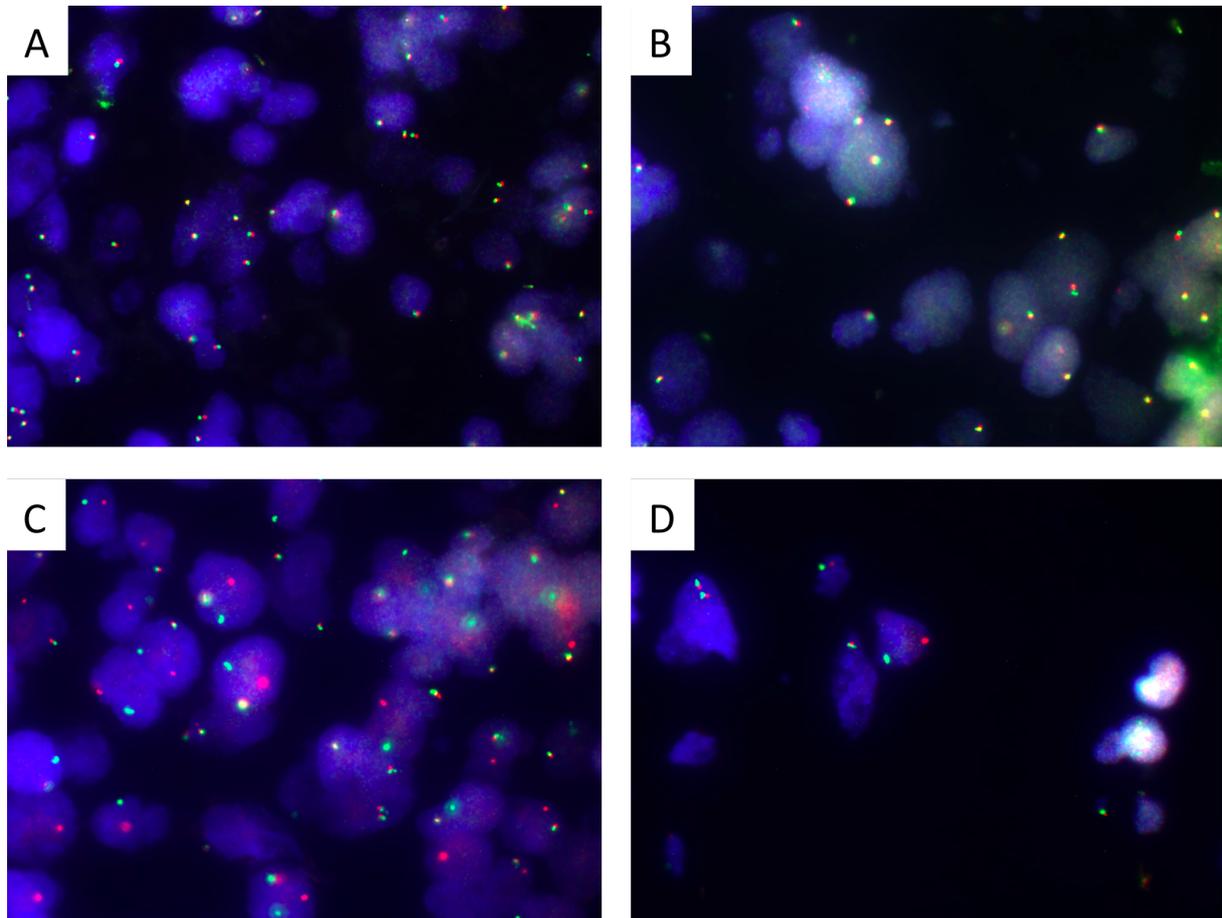


Abbildung 4: Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung häufiger chromosomaler Aberrationen (A: MYC-Sonde Originalvergrößerung 1000fach Normalbefund; B: BCL2-Sonde Originalvergrößerung 1000fach Normalbefund; C+D: BCL6-Sonde Originalvergrößerung 1000fach mit Bruchereignis)

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung sowie der Sequenzierung und der FISH-Analyse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Klinische, immunhistochemische und genomische Charakteristika der Studiengruppe

Nr	Lokali-sation	G	A	MIB1*	CD10 ¹	bcl2 ²	bcl6 ³	mum1 ⁴	FOXPI ⁵	Hans ⁶	Visco-Young ⁷	FISH			Mutation	Klonalität	
												bcl2	bcl6	c-myc		IgH	TCR
1	nodal	M	80	65%	-	+	-	-	-	nGCB	nGCB	-	-	-	-	+	-
2	extranodal	M	70	55%	-	-	-	-	-	nGCB	nGCB	-	-	-	CARD11 p.E258K	+	-
3	nodal	M	80	90%	-	+	-	+	+	nGCB	nGCB	-	-	-	-	-	+
4	nodal	W	59	50%	-	+	-	-	-	nGCB	nGCB	-	-	-	-	+	-
5	extranodal	W	79	55%	+	+	+	+	-	GCB	GCB	-	+	-	-	+	-
6	extranodal	W	77	80%	-	-	-	+	+	nGCB	nGCB	-	+	-	-	+	-
7	nodal	W	83	75%	+	-	+	-	+	GCB	GCB	-	-	-	CARD11 p.T128M	+	-
8	nodal	M	68	65%	+	+	+	+	+	GCB	GCB	-	+	-	-	+	-
9	nodal	M	83	50%	+	+	+	-	-	GCB	GCB	-	-	-	EZH2 p.Y602S	+	-
10	nodal	W	71	65%	-	-	+	-	-	GCB	GCB	-	-	-	-	-	-
11	nodal	M	84	55%	-	+	-	-	-	nGCB	nGCB	-	-	-	-	+	-
12	nodal	W	81	80%	-	-	-	-	-	nGCB	nGCB	-	-	-	-	-	-
13	nodal	W	80	40%	+	+	+	+	-	GCB	GCB	-	+	-	-	+	-
14	nodal	W	71	65%	-	-	+	+	-	nGCB	GCB	-	-	-	-	+	-
15	nodal	W	78	70%	-	-	-	-	-	nGCB	nGCB	-	-	-	-	-	-
16	extranodal	M	74	90%	+	+	+	-	-	GCB	GCB	-	-	-	-	-	+
17	extranodal	W	80	80%	-	+	-	+	-	nGCB	nGCB	-	-	-	-	+	NA
18	nodal	W	74	45%	-	+	+	+	+	nGCB	nGCB	-	-	-	-	+	-
19	nodal	M	68	85%	-	+	-	-	-	nGCB	nGCB	-	-	-	-	+	-
20	extranodal	M	81	99%	-	-	-	+	-	nGCB	nGCB	-	-	-	-	+	-
21	extranodal	W	90	45%	+	-	-	-	-	GCB	GCB	-	-	-	-	+	-
22	nodal	M	81	45%	+	-	+	-	-	GCB	GCB	-	-	-	-	-	-
23	nodal	M	64	45%	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	+	-
24	nodal	M	76	55%	+	-	-	+	-	GCB	GCB	-	-	-	-	+	-
25	nodal	W	62	55%	-	+	-	+	-	nGCB	nGCB	-	-	-	-	+	-
26	extranodal	M	78	45%	+	-	-	-	-	GCB	GCB	-	-	-	-	-	-

*Prozentzahl der MIB1 (Ki-67) positiv gefärbten Zellen; ¹CD10 Expression – cutoff: 30% positiv gefärbte Zellen; ² BCL2 Expression – cutoff: 50% positiv gefärbte Zellen; ³ BCL6 Expression – cutoff: 30% positiv gefärbte Zellen; ⁴ MUM1 Expression – cutoff: 30% positiv gefärbte Zellen; ⁵ FOXPI Expression – cutoff: 80% positiv gefärbte Zellen; ⁶ Klassifikation entsprechend des immunhistochemischen Algorithmus nach Hans *et al.* [45]; ⁷ Klassifikation entsprechend des immunhistochemischen Algorithmus nach Visco & Young *et al.* [121]
G, Geschlecht, A, Alter, GCB, germinal center like B-cell; nGCB, non-germinal center B-cell subtype; NA, nicht auswertbar.

5.5 Ergebnisse der array CGH-Untersuchung

Die genomweite hochauflösende Analyse auf CNV mittels array CGH-Untersuchung konnte erfolgreich an insgesamt 24 Fällen des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen durchgeführt werden. In jedem dieser Fälle konnten CNVs nachgewiesen werden, wobei sich durchschnittlich 9 CNVs pro Fall zeigten. Die höchste Anzahl unabhängiger CNVs erbrachte die Analyse von Fall 21 (46 CNVs), wohingegen die Fälle 16,19 und 22 jeweils nur eine CNV zeigten.

Zugewinne an genetischem Material wurden auf Chromosom 14q32.33 (n=12; 50 %), 1p36.33 (n=1; 4,2 %), 2p11.2 (n=3; 12,5 %), 6p22.1 (n= 5; 20,8 %), 6p22.2 (n= 7; 29,2 %), 6q14.3 (n= 4; 16,7 %), 9p13.3 (n= 3; 12,5 %), 10p11.22 (n= 3; 12,5 %), 17p13.1 (n= 3; 12,5 %), 20p11.22 (n= 3; 12,5 %) und 20p13 (n= 4; 16,7 %) nachgewiesen.

Verluste an genetischem Material wurden insbesondere auf Chromosom 1p36.33 (n= 2; 8,3 %), 2p11.2 (n= 1; 4,2 %), 2q37.3 (n= 4; 16,7 %), 8q24.3 (n= 3; 12,5 %), 10q26.3 (n= 8; 33,3 %), 15q11.1–q11.2 (n= 4; 16,7 %), 16p11.2 (n= 3; 12,5 %), 20q13.33 (n= 4; 16,7 %) und 21q11.2 (n= 3; 12,5 %) identifiziert.

Diese rekurrenten chromosomalen Aberrationen sowie einige der dort lokalisierten Gene sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Zudem wurden die betroffenen Loci unter Anwendung einer binären Matrix graphisch dargestellt (Abbildung 5).

Aberration	Anzahl Fälle	Betroffene Gene
Gewinne		
1p36.33	1	C1orf86 HES2, HES5 TNFRSF14 TP73 DFFB CHD5
2p11.2	3	-
6p22.1	5	Histoncluster
6p22.2	7	Histoncluster TRIM38 BTN2A2, BTN1A1 3A1
6q14.3	4	-
9p13.3	3	IL11RA CCL19, 21, 27
10p11.22	3	-
14q32.33	12	Immunoglobulin Schwerkettenlokus
17p13.1	3	-
20p11.22	3	-
20p13	4	SIRPD, SIRPB1, SIRPG
Verluste		
1p36.33	2	C1orf86 HES2, HES5 TNFRSF14 TP73 DFFB CHD5
2p11.2	1	-
2q37.3	4	HDAC4 GPC1
8q24.3	3	BAI1
10q26.3	8	BNIP3 KNDC1 UTF1 VENTX ADAM8
15q11.1 - q11.2	4	BCL8
16p11.2	3	-
20q13.33	4	TAF4 GATA5 NTSR1 OGFR
21q11.2	3	-

Tabelle 15: Rekurrente Regionen genomischer Imbalancen in EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen und assoziierte Gene mit mutmaßlicher pathogenetischer Relevanz

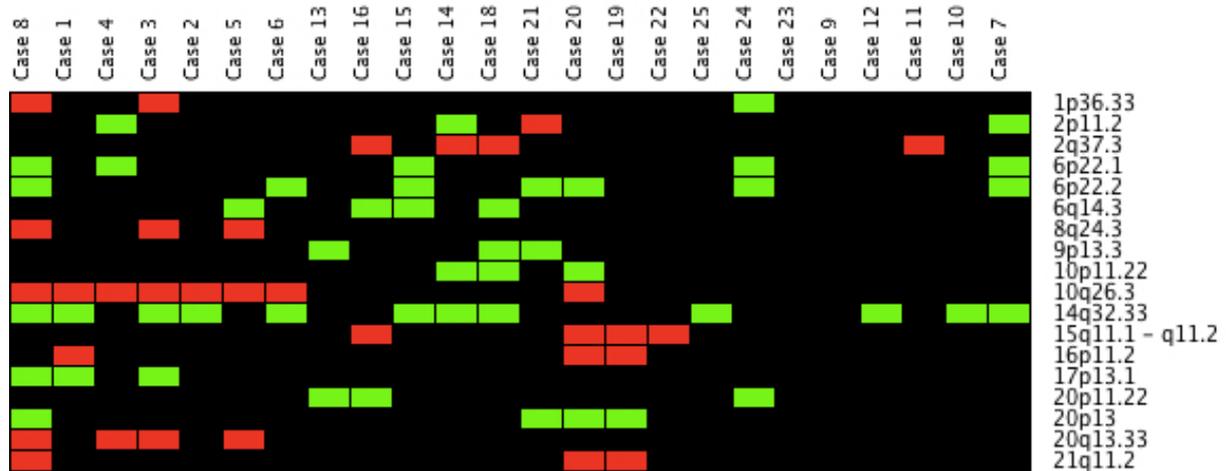


Abbildung 5: Genomische Daten der EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen nach array CGH-Analyse, dargestellt in einer binären Matrix (copy number- Zugewinne: grün, copy number- Verluste: rot, copy number- Neutralität: schwarz)

5.6 Statistische Auswertung

Zunächst wurde die Proliferationsrate (Ki-67-Index, MIB1-Score) der GCB- und der non-GCB-Subtypen verglichen. In diesem Zusammenhang kam der nicht parametrische Mann-Whitney U-Test zur Anwendung. Hierbei konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,0604$) in der Proliferationsrate zwischen dem non-GCB-Subtyp (Median: 67,5 %; 25. Perzentile 55%; 75. Perzentile 81,25%) im Vergleich zu dem GCB-Subtyp (Median: 55 %; 25. Perzentile 45%; 75. Perzentile 65 %) nachgewiesen werden (s. Abbildung 6, Klassifikation nach Hans *et al.*). Wenn man die immunhistochemische Einteilung nach Visco-Young *et al.* zu Grunde legt, ergab sich mit einem p-Wert von 0,0745 ebenfalls keine statistische Signifikanz.

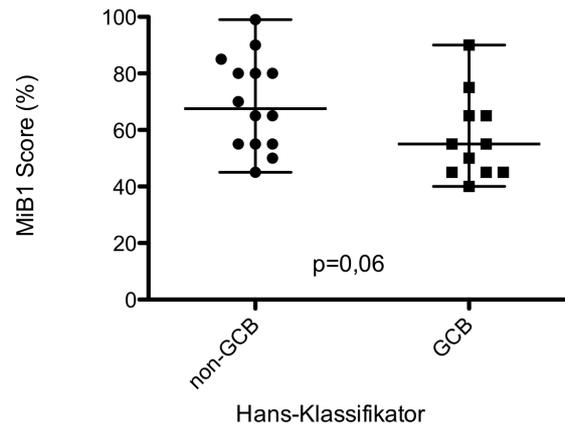


Abbildung 6: Median und Spannweite der Proliferationsrate (MIB1-Score) im GCB-/non-GCB-Subtyp (nach Hans *et al.*)

Im Vergleich der primären Lymphomlokalisierung als nodale bzw. extranodale Manifestation zeigte sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied in der proliferativen Aktivität ($p = 0,3614$).

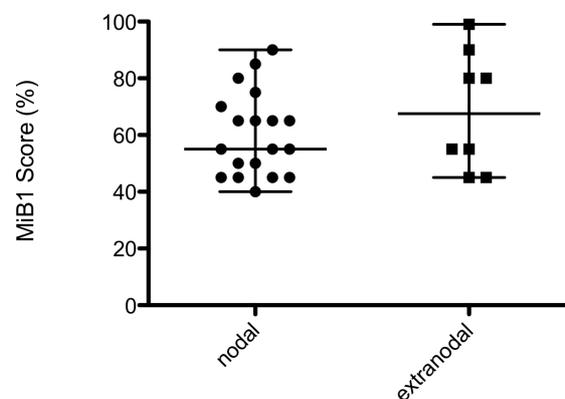


Abbildung 7: Median und Spannweite der Proliferationsrate (MIB1-Score) bei nodaler bzw. extranodaler Primärlokalisierung

Im nächsten Schritt wurden die nachgewiesenen chromosomalen Aberrationen (beim Auftreten in min. 4 Fällen) und Mutationen im Hinblick auf ihr Vorkommen in den als GCB- bzw. non-GCB-Subtypen klassifizierten Fällen sowie in den Fällen mit primär nodaler bzw. extranodaler Manifestation (nicht grafisch dargestellt) ausgewertet. Hierbei konnte ebenfalls

für keine Aberration und keine Mutation ein statistisch signifikant häufigeres Vorkommen in einem der beiden Subtypen nachgewiesen werden (Tabellen 16, 17 und 18 sowie Abbildung 8 (exemplarisch)).

Aberration	GCB (Hans <i>et al.</i>)		non-GCB (Hans <i>et al.</i>)		<i>p</i> -Wert
	Wildtyp	CNV	Wildtyp	Mutiert	
2q37.3	9	1	10	3	0,6036
6p22.1	7	3	11	2	0,6175
6p22.2	6	4	10	3	0,65
6q14.3	8	2	11	2	1,00
10q26.3	8	2	7	6	0,3788
14q32.33	7	3	4	9	0,0995
15q11.1 - q11.2	8	2	11	2	1,00
20p13	8	2	11	2	1,00
20q13.33	8	2	11	2	1,00

Tabelle 16: Auftreten von chromosomalen Aberrationen im GCB-/non-GCB-Subtyp, klassifiziert nach Hans *et al.*

Aberration	GCB (Visco-Young <i>et al.</i>)		non-GCB (Visco-Young <i>et al.</i>)		<i>p</i> -Wert
	Wildtyp	Mutiert	Wildtyp	Mutiert	
2q37.3	9	2	10	2	1,00
6p22.1	8	3	10	2	0,6404
6p22.2	7	4	9	3	0,6668
6q14.3	9	2	10	2	1,00
10q26.3	9	2	6	6	0,193
14q32.33	7	4	4	8	0,2203
15q11.1 - q11.2	9	2	10	2	1,00
20p13	9	2	10	2	1,00
20q13.33	9	2	10	2	1,00

Tabelle 17: Auftreten von chromosomalen Aberrationen im GCB-/non-GCB-Subtyp, klassifiziert nach Visco-Young *et al.*

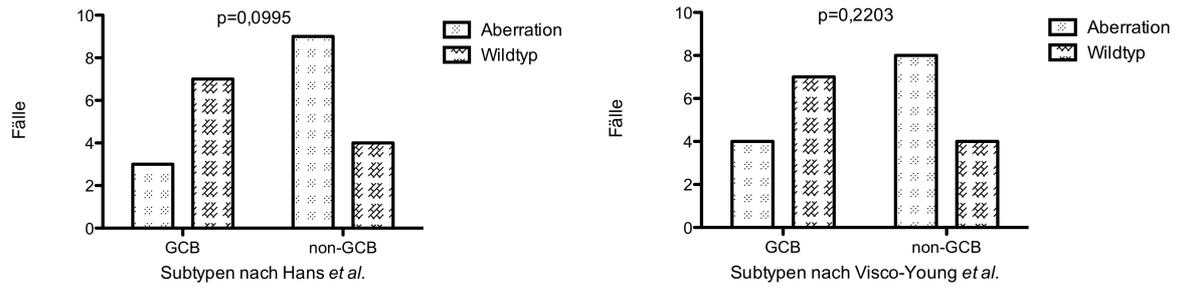


Abbildung 8: Auftreten des chromosomalen Zugewinns am 14q32.33-Locus im GCB-/non-GCB-Subtyp (exemplarisch)

Mutation	GCB		non-GCB		<i>p-Wert</i>
	Wildtyp	mutiert	Wildtyp	mutiert	
<i>CARD11</i> p.E258K	11 (12)	0	13 (12)	1	1,0 (1,0)
<i>CARD11</i> p.T128M	10 (11)	1	14 (13)	0	0,44 (0,48)
<i>EZH2</i> p.Y602S	10 (11)	1	14 (13)	0	0,44 (0,48)

Tabelle 18: Auftreten von *CARD11*- bzw. *EZH2*-Punktmutationen im GCB-/non-GCB-Subtyp, klassifiziert nach Hans et al. (in Klammer nach Visco-Young et al.)

6. Diskussion

In den vergangenen Jahren haben viele Studien die Notwendigkeit eines Paradigmenwechsels in der Definition pathologischer Entitäten, von einer bisher vorrangig histopathologisch basierten hin zu einer molekulargenetischen Herangehensweise, betont [41]. Dies ist insbesondere auch im Hinblick auf therapeutische Entscheidungen für die heterogene Entität der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome, die aus einer Vielzahl von klinisch und molekularpathologisch verschiedenen Subtypen besteht, von entscheidender Bedeutung. Diese Subtypen sind unter anderem mit einem unterschiedlichen Ansprechen auf eine Immunochemotherapie und in der Folge auch mit einer deutlich divergierenden klinischen Prognose assoziiert. Hierbei unterscheidet man anhand von immunhistochemischen Färbungen und Genexpressionsprofilen den prognostisch günstigeren GCB-Subtyp von dem prognostisch ungünstigeren ABC-Subtyp [63]. Die präzisere molekulargenetische Diagnostik der DLBCL-Subtypen trug zudem zum besseren Verständnis der unterschiedlichen Pathogenese bei. So zeigt der ABC-DLBCL-Subtyp vorrangig eine Abhängigkeit von der BCR/TLR-vermittelten NF kappa B-Signalweg-Aktivierung, wohingegen in dem von Keimzentrums-B-Zellen ausgehenden GCB-DLBCL-Subtyp die *EZH2*-vermittelte Histonmodifikation eine wichtige Rolle spielt [27]. Auch wenn die Einführung einer additiven Immuntherapie mit dem CD20-Antikörper Rituximab zusätzlich zu der etablierten Anthrazyklin-basierten Chemotherapie eine signifikante Prognoseverbesserung der DLBCL bewirkt hat, zeigen manche Subgruppen und insbesondere der ABC-Subtyp weiterhin ein deutlich reduziertes Therapieansprechen. Dies unterstreicht die pathogenetische Bedeutung spezifischer onkogener Mutationen in wichtigen Signalwegen, aus deren Kenntnis die Möglichkeit neuer zielgerichteter Therapieoptionen resultierte [98, 128].

Onkogene Mutationen in *CARD11* können in geringer Frequenz im EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen nachgewiesen werden.

Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, die Prävalenz aktivierender Mutationen in Schlüsselproteinen entlang der BCR/TLR-vermittelten NF kappa B-Signalweg-Aktivierung in dem bisher molekularpathologisch unzureichend charakterisiertem Subtyp des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen zu ermitteln. Hierzu wurden Mutationsprofile in einer Kohorte aus 26 Fällen mit Therapie-naiven EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen erstellt. Aus vorausgegangenen Studien an DLBCL verschiedener Subtypen sind onkogene Mutationen im kodierenden Gen des TLR-Signalweg-Adaptorproteins MYD88 beschrieben, die insbesondere

im ABC-, nicht aber im GCB- DLBCL-Subtyp auftreten [79]. Die therapeutisch seit wenigen Jahren mit großem Erfolg in der Behandlung der CLL sowie einiger anderer Non-Hodgkin-Lymphome eingesetzten BTK-Inhibitoren wie beispielsweise Ibrutinib zeigten in *in vitro*-Versuchen eine starke Zytotoxizität gegenüber DLBCL-Zellen in der Abwesenheit onkogener Mutationen im kodierenden Gen des im BCR-Signalweg involvierten und der BTK nachgeordnet gelegenen *CARD11* [29]. Um die Relevanz dieser neueren zielgerichteten medikamentösen Option für den Subtyp des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen zu ermitteln, wurden in der vorliegenden Studie daher das Gen des der BTK vorgeschalteten Proteins *CD79B* sowie das Gen des alternativ NF kappa B-aktivierenden Adaptorproteins *MYD88* auf häufige Mutationen hin untersucht. In Übereinstimmung mit einer vorausgegangenen Studie von Kraan *et al.*, in der ein geringer Anteil EBV-positiver DLBCL in einer Gruppe heterogener DLBCL mit divergierender primärer Lokalisation hinsichtlich rekurrenter Mutationen in diesen beiden Zielgenen untersucht wurde, konnten von uns keine signifikanten Mutationen in *MYD88* und *CD79B* detektiert werden [55]. Es gelang jedoch der Nachweis aktivierender Mutationen in der funktionell relevanten coiled-coil-Domäne von *CARD11* in knapp 8 % der untersuchten Fälle. Diese Veränderungen fanden sich sowohl in einem immunhistochemisch als ABC- als auch in einem als GCB-DLBCL charakterisierten Fall und zeigen in Analogie zu Lenz *et al.*, dass *CARD11*-Mutationen in beiden Subtypen auftreten können [61]. Der fehlende Nachweis eines dominierenden Vorkommens im ABC-Subtyp ist höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit der geringen Fallzahl der untersuchten Kohorte zu sehen. Es wurde in der Vergangenheit vermutet, dass diese funktionell relevanten *CARD11*-Mutationen eine Resistenz gegenüber einer medikamentösen BTK-Inhibition bedingen [29]. Es erscheint daher sinnvoll, bei Patienten mit nachgewiesenem EBV-positiven DLBCL eine prätherapeutische Diagnostik hinsichtlich einer *CARD11*-Mutation zur Evaluation der Erfolgsaussichten einer Ibrutinib-Therapie durchzuführen.

In der immunhistochemischen Klassifikation des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen findet sich gehäuft der non-GCB-Subtyp.

Immunhistochemische Färbungen, ausgewertet nach dem weit verbreiteten Hans-Algorithmus, zeigten eine leichte Dominanz des non-GCB-Subtyps in der Studiengruppe. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass dieser unter anderem auf der Expression von MUM-1 beruhende Algorithmus durch die in EBV-positiven Lymphomen mittels EBNA (EBV nuclear antigen) 3C-vermittelte IRF-4-Deregulation nur eingeschränkt aussagekräftig sein kann. Daher wurde zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit zusätzlich der seit kurzem

etablierte Visco-Young-Algorithmus, der anstatt des MUM-1- das FOXP1-Expressionsmuster auswertet, eingesetzt. Mit bis auf einen divergierenden Fall übereinstimmenden Ergebnissen konnte nicht nur die Aussagekraft der Studienergebnisse erhöht, sondern auch eine hohe Konkordanz dieser beider unterschiedlicher Algorithmen nachgewiesen werden [45, 51, 121]. Auf den Einsatz weiterer Algorithmen, beispielsweise nach Choi *et al.*, Nyman *et al.* bzw. Muris *et al.*, wurde in Ermangelung eines zusätzlichen Erkenntnisgewinns verzichtet [22, 76, 83].

In der statistischen Auswertung wurde die proliferative Aktivität im GCB- bzw. non-GCB-Subtyp sowie bei primär nodaler bzw. extranodaler Lymphomanifestation untersucht. Hierbei zeigte sich ein Trend zu einer höheren Proliferationsrate im postgerminalen non-GCB-Subtyp sowie in schwächerer Ausprägung bei extranodaler Manifestation. Diese Phänomene verfehlten das statistische Signifikanzniveau, wobei in diesem Zusammenhang die geringe Fallzahl zu berücksichtigen ist. Nichtsdestotrotz könnten diese Befunde auf einen aggressiveren Phänotyp der extranodalen sowie der post-germinal differenzierten EBV-positiven DLBCL hinweisen.

Eine therapeutische NF kappa B-Signalweg-Inhibition, beispielsweise mit einem BTK-Inhibitor, kann eine sinnvolle medikamentöse Option für Patienten mit EBV-positivem DLBCL darstellen.

Es wurde bisher vermutet, dass eine EBV-Infektion eine NF kappa B-Signalweg-Aktivierung auf direktem Weg über die assoziierten Membranproteine LMP1 und LMPA2 in einem Zusammenspiel mit der BCR- sowie CD40- vermittelten Signaltransduktion sowohl in normalen als auch in malignen Zellen bewirken kann [59, 71, 73]. Montes-Moreno *et al.* konnten eine funktionelle Relevanz dieses Mechanismus in der Mehrheit der untersuchten Fälle nachweisen und schlussfolgerten daher, dass die therapeutische NF kappa B-Signalweg-Inhibition, in Analogie zur Therapie des ABC-DLBCL-Subtyps, auch von praktischer Bedeutung für diese Erkrankung sein könnte [73]. Da in der Mehrzahl der im Rahmen dieser Studie untersuchten Fälle immunhistochemisch ein post-germinaler Ursprung aufgezeigt werden konnte, woraus sich eine ausgeprägte Relevanz der Abhängigkeit vom NF kappa B-Signalweg ergibt, lassen sich diese Schlussfolgerung möglicherweise auch auf unsere Kohorte übertragen.

Auch unter Berücksichtigung der guten Übereinstimmung immunhistochemischer DLBCL-Subtyp-Bestimmung mit Genexpressionsprofilen wäre es für künftige Studien sinnvoll, das

Differenzierungsstadium der Ursprungszelle der Lymphomerkrankung (zusätzlich) über Genexpressionsuntersuchungen zu bestimmen. Zuletzt konnten zwar NF kappa B- sowie JAK-STAT-Signalweg-Aktivierungen an einer geringen Anzahl EBV-positiver DLBCL durch die Erstellung von Genexpressionsprofilen nachgewiesen werden, eine Zusammenführung mit den Ergebnissen aus Mutationsanalysen zum Nachweis der zugrundeliegenden Pathogenese ist bisher jedoch noch nicht erfolgt [52].

Auf der Grundlage unserer Ergebnisse in Zusammenschau mit den aus vorangegangenen Studien gewonnenen Erkenntnissen kann vermutet werden, dass eine latente EBV-Infektion zu einer alternativen ligandenunabhängigen NF kappa B-Signalweg-Aktivierung in der Mehrzahl der Fälle von EBV-positiven DLBCL führt. Hieraus können sich durch die seit kurzem eingesetzten BTK-Inhibitoren mögliche neue zielgerichtete Therapieoptionen für diese häufig mit einer eher ungünstigen Prognose assoziierte Entität ergeben. Jedoch scheint in wenigen Fällen auch eine aktivierende *CARD11*-Mutation, analog zur Pathogenese im ABC-DLBCL-Subtyp, eine konstitutive NF kappa B-Signalweg-Aktivierung zu bewirken. In diesen Fällen scheint eine medikamentöse BTK-Inhibition weniger zielführend zu sein.

Nach der Diagnose eines EBV-positiven DLBCL vom GCB-Subtyp kann eine Bestimmung des *EZH2*- Mutationsstatus therapeutisch relevant sein.

Des Weiteren haben wir den an der Histonmodifikation beteiligten Transkriptionsrepressor EZH2 als mögliches therapeutisches Zielmolekül, aber auch im Hinblick auf seine enge und nahezu exklusive Assoziation mit dem GCB-DLBCL-Subtyp untersucht. Hier fand sich in einem immunhistochemisch als GCB-Subtyp klassifizierten Fall eine onkogene *EZH2*-Mutation. Im Hinblick auf eine individuelle zielgerichtete Therapie kann sich hieraus in der Zukunft eine Rationale für eine prätherapeutische molekulargenetische Diagnostik zur Evaluation eines möglichen Profits einzelner Patienten von einer medikamentösen *EZH2*-Inhibition ergeben [54, 72]. Zudem unterstreichen diese Erkenntnisse in Zusammenschau mit den Ergebnissen aus der immunhistochemischen Analyse, die in 44 respektive 48 % der Fälle einen GCB-Subtyp aufzeigten, die Einordnung des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen zwischen die beiden pathogenetisch unterschiedlichen ABC- und GCB-Subtypen. In diesem Zusammenhang könnte eine Analyse anderer an der Chromatinmodifikation beteiligter Proteine wie beispielsweise MLL2 und CREBBP in zukünftigen Studien diese Einordnung im Hinblick auf den Stellenwert eines beeinträchtigten Chromatinremodellings im EBV-positiven DLBCL genauer beleuchten.

Die genetische Charakterisierung ermöglicht eine genauere Einordnung des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen in das biologische Spektrum der hochmalignen Lymphome.

In dem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde durch eine Mikroarray-basierte CGH-Untersuchung eine zytogenetische Charakterisierung des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen durchgeführt. Dabei stellt diese Untersuchung die erste umfassende Genomanalyse auf submikroskopische Deletionen bzw. Amplifikationen in dieser seltenen Entität mit einer aussagekräftigen Fallzahl in Analogie zu kürzlich durchgeführten Analysen an häufigeren DLBCL-Subtypen dar [12]. Die array CGH-Analyse zeigte überlappende zytogenetische Charakteristika des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen mit anderen Lymphomerkrankungen wie beispielsweise dem plasmoblastischen Lymphom (1p36, 17p13, 10q26, 20q13), dem EBV-negativen DLBCL NOS sowohl des GCB- als auch des ABC-Subtyps (1p36.33, 2p11.2, 17p13.1) sowie manchen Subtypen der PTL (post-transplant lymphoproliferative disorder) (1p36.33, 14q32.33) [20, 64, 93]. Dies unterstreicht die Vermutung, dass es sich bei diesen Erkrankungen eher um künstliche Landmarken innerhalb eines biologischen Kontinuums handelt als um eigenständige Entitäten. Spezifische Aberrationen, die signifikant gehäuft mit dem GCB-/non-GCB-Subtyp bzw. mit primär nodaler/extranodaler Manifestation einhergehen, ließen sich hierbei nicht darstellen.

Hinzugewinne bzw. Verluste in immunregulierenden Genabschnitten können an der Lymphomentstehung beteiligt sein.

Zudem lässt sich über die pathogenetische Bedeutung der zugrundeliegenden EBV-Infektion als Ausdruck eines lokalen bzw. systemischen Immundefizits spekulieren. Diese Infektion ist vermutlich in der Lage, sowohl zytogenetische als auch histopathologische (beispielsweise eine verminderte CD20-Expression) Aspekte des gängigen malignen Phänotypes dieser Erkrankungen zu beeinflussen [25, 111]. Zudem kann ein onkogener Effekt eines bisher unbeschriebenen genetischen Zugewinns auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p13.3), von dem die mutmaßlichen Ko-Aktivatoren und Effektoren eines amplifizierten NF kappa B-Signalweges *CCL19* und *CCL27* betroffen sind, sowie auf dem kurzen Arm von Chromosom 20 (20p13), von dem die an einer Reihe von immunregulatorischen Prozessen beteiligte *SIRP*-Genfamilie betroffen ist, auf die Entstehung und Progression des EBV-positiven DLBCL vermutet werden [5, 9, 126]. Des Weiteren waren Gene wie die Tumorsuppressorgene und epigenetischen Regulatoren *TP73*, *HDAC4* und *CHD5* sowie das an der DNA-Reparatur und

Apoptose beteiligte *BAl1* von rekurrenten Verlusten im Bereich des kurzen Arms von Chromosom 1 (1p36.33) sowie des langen Arms von Chromosom 2 und 8 (2q37.3; 8q24.3) betroffen [58, 65, 95, 104]. Es liegt in Kenntnis der biologischen Funktion dieser Gene nahe zu vermuten, dass ihr Verlust in der aus Tumorgewebe isolierten DNA möglicherweise im Zusammenhang zur Lymphomentstehung bzw. -progression zu sehen ist.

Nichtsdestotrotz sollte einschränkend erwähnt werden, dass durch aus FFPE-Material gewonnene DNA entstandene array CGH-Daten sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Ergebnisse liefern können. Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine etablierte Plattform, die in der Vergangenheit wiederholt Daten hoher Validität produziert hat, eingesetzt wurde, und alle Qualitätskontrollen entsprechend den Herstellervorgaben durchgeführt wurden, könnten zusätzliche SNP-array-Untersuchungen an aus frischem Gewebe gewonnener DNA die hier ausgeführten Erkenntnisse sinnvoll ergänzen [57, 103]. Zudem ist die vorliegende Studie hinsichtlich ihrer Studiengröße, die im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten an dieser Entität allerdings als verhältnismäßig groß angesehen werden kann, nur von begrenzter Aussagekraft. Insofern werden weitere Studien notwendig sein, um statistisch valide Aussagen treffen zu können und ggf. auch eine Korrelation der gewonnenen Erkenntnisse mit umfassenderen klinischen Daten zur Abschätzung einer eventuellen prognostischen sowie therapeutischen Relevanz zu ermöglichen.

Chromosomale Aberrationen des *bcl6*-Lokus treten im EBV-positiven DLBCL in geringer Frequenz auf.

Zusätzlich wurden häufige chromosomale Aberrationen mittels FISH-Diagnostik untersucht. Hierbei zeigte sich in 15 % der Fälle ein Bruchereignis am *bcl6*-Lokus, wohingegen weder eine *bcl2*- noch eine *c-myc*-Aberration nachgewiesen wurde. Somit konnte gezeigt werden, dass diese insgesamt häufigen, in bis zu 30 % der DLBCL (unabhängig vom Subtyp) auftretenden chromosomalen Aberrationen im EBV-positiven DLBCL-Subtyp in deutlich geringerer Frequenz nachzuweisen waren [37, 116]. Diese Ergebnisse stehen, wenn auch in geringerer Ausprägung, die sicherlich zumindest teilweise durch die im Vergleich deutlich kleinere Studiengruppe bedingt sein kann, in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von Montes-Moreno *et al.*, wonach *c-myc*- und *bcl6*-betreffende Translokationen nur selten, Amplifikationen am *bcl6*-Lokus jedoch deutlich häufiger in EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen vorkommen.

Bei dem EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen handelt es sich um eine klonale B-Zell-Erkrankung, die gelegentlich von klonalen T-Zell-Infiltraten begleitet ist.

Ebenfalls in Analogie zu den kürzlich von Montes-Moreno *et al.* publizierten Ergebnissen, wonach klonale T-Zell-Populationen ein Charakteristikum des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen darstellen, konnten wir, wenn auch in einer geringeren Frequenz von 8 % (versus über 20 % bei Montes-Moreno *et al.*), ebenfalls ein klonales Rearrangement des TCR-Lokus nachweisen [73]. Diese monoklonalen Populationen können Ausdruck der physiologischen T-Zell-Antwort auf die virale Infektion sein [14, 17, 23]. Insofern können diese Erkenntnisse dazu beitragen, die Fehldiagnose einer assoziierten malignen T-Zell Neoplasie zu verhindern.

7. Zusammenfassung

Bei dem EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen handelt es sich um eine seltene und erst seit wenigen Jahren als eigenständige Entität anerkannte Erkrankung aus dem biologischen Spektrum der hochmalignen B-Zell-Lymphome. Aufgrund ihrer geringen Inzidenz, ihrer schlechten Prognose sowie der noch nicht abschließend geklärten pathogenetischen Bedeutung der beteiligten viralen Infektion ist sowohl der Stellenwert der Erkrankung in der Gruppe der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome als auch ihre bestmögliche medikamentöse Therapie Gegenstand aktueller Forschung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen Beitrag zur immunhistochemischen und molekulargenetischen Charakterisierung des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen zu erbringen. Hierbei konnte zunächst gezeigt werden, dass es sich immunhistochemisch mehrheitlich, jedoch nicht ausschließlich um non-GCB-DLBCL handelt. In wenigen der untersuchten Fälle erfolgte der Nachweis einer onkogenen *CARD11*-Mutation und in einem GCB-DLBCL fand sich eine *EZH2*-Mutation. Daher lässt sich vermuten, dass eine medikamentöse BTK- bzw. EZH2-Inhibition eine therapeutische Option für bestimmte Patienten mit EBV-positivem DLBCL darstellt.

Des Weiteren gelang eine umfassende molekulargenetische Analyse des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen, die diese Entität innerhalb des Spektrums anderer EBV-positiver Erkrankungen wie dem plasmoblastischen Lymphom sowie der PTLD als auch der EBV negativen DLBCL NOS einordnet. Zudem konnten chromosomale Zugewinne bzw. Verluste in immunregulierenden Genabschnitten nachgewiesen werden, die in Zusammenhang mit der Lymphomentstehung bzw. -progression stehen können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die in anderen DLBCL häufig beobachteten die *bcl2*-, *bcl-6*- und *c-myc*-Loci betreffenden chromosomalen Rearrangements bei dieser Entität eher selten und mit einer deutlichen Dominanz chromosomaler Aberrationen der *bcl6*-Region zu finden sind. Darüber hinaus ließen sich in wenigen Fällen klonale T-Zell-Populationen nachweisen, die ein Ausdruck der körpereigenen Immunreaktion auf die virale Infektion sein können.

In Zukunft werden zur Validierung bzw. Erweiterung der vorliegenden Ergebnisse noch weitere molekular- und zytogenetische Analysen an größeren Fallstudien der Entität des EBV-positiven DLBCL des älteren Menschen notwendig sein. Die vorliegende Arbeit liefert jedoch bereits eine Rationale für eine prätherapeutische molekulargenetische Diagnostik bei

betroffenen Patienten sowie für zielgerichtete molekulare Therapien dieser insgesamt mit einer ungünstigen Prognose assoziierten Erkrankung.

8. Literaturverzeichnis

1. *A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project.* Blood, 1997. **89**(11): p. 3909-18.
2. Advani, R.H., et al., *Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies.* J Clin Oncol, 2013. **31**(1): p. 88-94.
3. Aisenberg, A.C., B.M. Wilkes, and J.O. Jacobson, *The bcl-2 gene is rearranged in many diffuse B-cell lymphomas.* Blood, 1988. **71**(4): p. 969-72.
4. Alizadeh, A.A., et al., *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling.* Nature, 2000. **403**(6769): p. 503-11.
5. Andres, R.M., et al., *NF-kappaB and STAT3 inhibition as a therapeutic strategy in psoriasis: in vitro and in vivo effects of BTH.* J Invest Dermatol, 2013. **133**(10): p. 2362-71.
6. Armitage, J.O., *My treatment approach to patients with diffuse large B-cell lymphoma.* Mayo Clin Proc, 2012. **87**(2): p. 161-71.
7. Armitage, J.O. and D.D. Weisenburger, *New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project.* J Clin Oncol, 1998. **16**(8): p. 2780-95.
8. Asano, N., et al., *Age-related Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly patients.* Blood, 2009. **113**(12): p. 2629-36.
9. Barclay, A.N. and M.H. Brown, *The SIRP family of receptors and immune regulation.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 457-64.
10. Barrans, S.L., et al., *Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome.* Blood, 2004. **104**(9): p. 2933-5.
11. Bavi, P., et al., *The biological and clinical impact of inhibition of NF-kappaB-initiated apoptosis in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL).* J Pathol, 2011. **224**(3): p. 355-66.
12. Bea, S., et al., *Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction.* Blood, 2005. **106**(9): p. 3183-90.
13. Beltran, B.E., et al., *EBV-positive diffuse large b-cell lymphoma in young immunocompetent individuals.* Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2011. **11**(6): p. 512-6.

14. Bharadwaj, M., et al., *Longitudinal dynamics of antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes following primary Epstein-Barr virus infection*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2588-9.
15. Bohers, E., et al., *Targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC diffuse large B-cell lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2014. **53**(2): p. 144-53.
16. Brown, P.J., et al., *Potentially oncogenic B-cell activation-induced smaller isoforms of FOXP1 are highly expressed in the activated B cell-like subtype of DLBCL*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2816-24.
17. Callan, M.F., et al., *Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis*. Nat Med, 1996. **2**(8): p. 906-11.
18. Chaganti, R.S., et al., *Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance*. Semin Hematol, 2000. **37**(4): p. 396-411.
19. Chang, C.C., et al., *BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 6947-52.
20. Chang, C.C., et al., *Genomic profiling of plasmablastic lymphoma using array comparative genomic hybridization (aCGH): revealing significant overlapping genomic lesions with diffuse large B-cell lymphoma*. J Hematol Oncol, 2009. **2**: p. 47.
21. Cheng, S., et al., *Functional Characterization of BTK mutation that confers ibrutinib resistance: Exploration of alternative kinase inhibitors*. Leukemia, 2014.
22. Choi, W.W., et al., *A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(17): p. 5494-502.
23. Cohen, J.I., et al., *Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008*. Ann Oncol, 2009. **20**(9): p. 1472-82.
24. Cohen, M., et al., *Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma association is not only restricted to elderly patients*. Int J Cancer, 2014.
25. Colomo, L., et al., *Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities*. Am J Surg Pathol, 2004. **28**(6): p. 736-47.
26. Compagno, M., et al., *Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma*. Nature, 2009. **459**(7247): p. 717-21.
27. Dal Porto, J.M., et al., *B cell antigen receptor signaling 101*. Mol Immunol, 2004. **41**(6-7): p. 599-613.

28. Davis, R.E., et al., *Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1861-74.
29. Davis, R.E., et al., *Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma*. Nature, 2010. **463**(7277): p. 88-92.
30. Dawson, C.W., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 3694-704.
31. Ding, B.B., et al., *Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1515-23.
32. Dogan, A., et al., *CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas*. Am J Surg Pathol, 2000. **24**(6): p. 846-52.
33. Eliopoulos, A.G., et al., *Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16085-96.
34. Eliopoulos, A.G. and L.S. Young, *LMP1 structure and signal transduction*. Semin Cancer Biol, 2001. **11**(6): p. 435-44.
35. Epstein, M.A., B.G. Achong, and Y.M. Barr, *VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA*. Lancet, 1964. **1**(7335): p. 702-3.
36. Falini, B., et al., *Bcl-6 protein expression in normal and neoplastic lymphoid tissues*. Ann Oncol, 1997. **8 Suppl 2**: p. 101-4.
37. Garcia-Sanz, R., et al., *Detection of single and associated lesions of the Bcl-1, Bcl-2, Bcl-6, c-myc, p53 and p16 genes in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: value of molecular analysis for a better assignment of the histologic subtype*. Haematologica, 1998. **83**(3): p. 209-16.
38. Gaurnier-Hausser, A., et al., *NEMO-binding domain peptide inhibits constitutive NF-kappaB activity and reduces tumor burden in a canine model of relapsed, refractory diffuse large B-cell lymphoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(14): p. 4661-71.
39. Gebauer, N., et al., *TP53 mutations are frequent events in double-hit B-cell lymphomas with MYC and BCL2 but not MYC and BCL6 translocations*. Leuk Lymphoma, 2014.
40. Geneviev, H.C., et al., *Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage*. Eur J Immunol, 1994. **24**(12): p. 3100-5.
41. Gerlinger, M., et al., *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*. N Engl J Med, 2012. **366**(10): p. 883-92.

42. Gharizadeh, B., et al., *Typing of human papillomavirus by pyrosequencing*. Lab Invest, 2001. **81**(5): p. 673-9.
43. Gires, O., et al., *Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule*. EMBO J, 1997. **16**(20): p. 6131-40.
44. Gorre, M.E., et al., *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification*. Science, 2001. **293**(5531): p. 876-80.
45. Hans, C.P., et al., *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray*. Blood, 2004. **103**(1): p. 275-82.
46. Harrison, C., *Trial watch: BTK inhibitor shows positive results in B cell malignancies*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(2): p. 96.
47. Henderson, S., et al., *Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death*. Cell, 1991. **65**(7): p. 1107-15.
48. Herman, S.E., et al., *Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6287-96.
49. Hofscheier, A., et al., *Geographic variation in the prevalence of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a comparative analysis of a Mexican and a German population*. Mod Pathol, 2011. **24**(8): p. 1046-54.
50. Honigberg, L.A., et al., *The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(29): p. 13075-80.
51. Jiang, S., et al., *Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C binds to BATF/IRF4 or SPI1/IRF4 composite sites and recruits Sin3A to repress CDKN2A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(1): p. 421-6.
52. Kato, H., et al., *Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways*. Cancer Sci, 2014. **105**(5): p. 537-44.
53. Kloo, B., et al., *Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(1): p. 272-7.
54. Knutson, S.K., et al., *A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells*. Nat Chem Biol, 2012. **8**(11): p. 890-6.
55. Kraan, W., et al., *High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites*. Blood Cancer J, 2013. **3**: p. e139.

56. Kreisel, F., et al., *High resolution array comparative genomic hybridization identifies copy number alterations in diffuse large B-cell lymphoma that predict response to immuno-chemotherapy*. *Cancer Genet*, 2011. **204**(3): p. 129-37.
57. Krijgsman, O., et al., *CGH arrays compared for DNA isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded material*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012. **51**(4): p. 344-52.
58. Kudo, S., et al., *Inhibition of tumor growth through suppression of angiogenesis by brain-specific angiogenesis inhibitor 1 gene transfer in murine renal cell carcinoma*. *Oncol Rep*, 2007. **18**(4): p. 785-91.
59. Kuppers, R., *B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(10): p. 801-12.
60. Kuze, T., et al., *The characteristics of Epstein-Barr virus (EBV)-positive diffuse large B-cell lymphoma: comparison between EBV(+) and EBV(-) cases in Japanese population*. *Jpn J Cancer Res*, 2000. **91**(12): p. 1233-40.
61. Lenz, G., et al., *Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma*. *Science*, 2008. **319**(5870): p. 1676-9.
62. Lenz, G., et al., *Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma*. *J Exp Med*, 2007. **204**(3): p. 633-43.
63. Lenz, G. and L.M. Staudt, *Aggressive lymphomas*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(15): p. 1417-29.
64. Lenz, G., et al., *Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(36): p. 13520-5.
65. Lestou, V.S., et al., *Characterization of the recurrent translocation t(1;1)(p36.3;q21.1-2) in non-Hodgkin lymphoma by multicolor banding and fluorescence in situ hybridization analysis*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003. **36**(4): p. 375-81.
66. Li, C., J. Zienkiewicz, and J. Hawiger, *Interactive sites in the MyD88 Toll/interleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1beta signaling pathway*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(28): p. 26152-9.
67. Lim, K.H., Y. Yang, and L.M. Staudt, *Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF-kappaB in lymphoid malignancies*. *Immunol Rev*, 2012. **246**(1): p. 359-78.
68. Lin, S.C., Y.C. Lo, and H. Wu, *Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling*. *Nature*, 2010. **465**(7300): p. 885-90.
69. Lin, Y., K. Wong, and K. Calame, *Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation*. *Science*, 1997. **276**(5312): p. 596-9.

70. Mamane, Y., et al., *Interferon regulatory factors: the next generation*. Gene, 1999. **237**(1): p. 1-14.
71. Mancao, C. and W. Hammerschmidt, *Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3715-21.
72. McCabe, M.T., et al., *EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations*. Nature, 2012. **492**(7427): p. 108-12.
73. Montes-Moreno, S., et al., *EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor- κ B activation*. Mod Pathol, 2012. **25**(7): p. 968-82.
74. Montes-Moreno, S., et al., *Gcet1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of germinal center-derived lymphomas*. Blood, 2008. **111**(1): p. 351-8.
75. Morin, R.D., et al., *Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin*. Nat Genet, 2010. **42**(2): p. 181-5.
76. Muris, J.J., et al., *Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma*. J Pathol, 2006. **208**(5): p. 714-23.
77. Natkunam, Y., et al., *Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry*. Mod Pathol, 2001. **14**(7): p. 686-94.
78. Ngo, V.N., et al., *A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 106-10.
79. Ngo, V.N., et al., *Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma*. Nature, 2011. **470**(7332): p. 115-9.
80. Niu, H., *The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development*. Hematol Oncol, 2002. **20**(4): p. 155-66.
81. Nunez, G., et al., *Growth- and tumor-promoting effects of deregulated BCL2 in human B-lymphoblastoid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(12): p. 4589-93.
82. Nyman, H., et al., *Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4930-5.
83. Nyman, H., et al., *Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP*. Mod Pathol, 2009. **22**(8): p. 1094-101.
84. Odumade, O.A., K.A. Hogquist, and H.H. Balfour, Jr., *Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(1): p. 193-209.

85. Ok, C.Y., et al., *Prevalence and clinical implications of epstein-barr virus infection in de novo diffuse large B-cell lymphoma in Western countries*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(9): p. 2338-49.
86. Ok, C.Y., et al., *EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly*. Blood, 2013. **122**(3): p. 328-40.
87. Ott, G., A. Rosenwald, and E. Campo, *Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013. **2013**: p. 575-83.
88. Oyama, T., et al., *Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients*. Am J Surg Pathol, 2003. **27**(1): p. 16-26.
89. Oyama, T., et al., *Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(17): p. 5124-32.
90. Pan, Z., et al., *Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase*. ChemMedChem, 2007. **2**(1): p. 58-61.
91. Park, S., et al., *The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma*. Blood, 2007. **110**(3): p. 972-8.
92. Pillai, R.K., et al., *Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas*. Am J Surg Pathol, 2013. **37**(3): p. 323-32.
93. Poirel, H.A., et al., *Characteristic pattern of chromosomal imbalances in posttransplantation lymphoproliferative disorders: correlation with histopathological subcategories and EBV status*. Transplantation, 2005. **80**(2): p. 176-84.
94. Ponader, S., et al., *The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo*. Blood, 2012. **119**(5): p. 1182-9.
95. Quan, J., et al., *The Chromatin Remodeling Factor CHD5 Is a Transcriptional Repressor of WEE1*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e108066.
96. Rawlings, D.J., et al., *Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 282-94.
97. Rawlings, D.J., K. Sommer, and M.E. Moreno-Garcia, *The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 799-812.
98. Roschewski, M., L.M. Staudt, and W.H. Wilson, *Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(1): p. 12-23.

99. Rosenwald, A., et al., *The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2002. **346**(25): p. 1937-47.
100. Rosenwald, A., et al., *Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 851-62.
101. Rouveirol, C., et al., *Computation of recurrent minimal genomic alterations from array-CGH data*. Bioinformatics, 2006. **22**(7): p. 849-56.
102. Rui, L., et al., *Malignant pirates of the immune system*. Nat Immunol, 2011. **12**(10): p. 933-40.
103. Salawu, A., et al., *High quality genomic copy number data from archival formalin-fixed paraffin-embedded leiomyosarcoma: optimisation of universal linkage system labelling*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50415.
104. Sandhu, S.K., et al., *miR-155 targets histone deacetylase 4 (HDAC4) and impairs transcriptional activity of B-cell lymphoma 6 (BCL6) in the Emu-miR-155 transgenic mouse model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(49): p. 20047-52.
105. Sato, A., et al., *Clinical outcome of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in the rituximab era*. Cancer Sci, 2014. **105**(9): p. 1170-5.
106. Shimoyama, Y., et al., *Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders: diagnostic approach to a newly recognized clinicopathological entity*. Pathol Int, 2009. **59**(12): p. 835-43.
107. Shimoyama, Y., et al., *Senile Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: a mini review*. J Clin Exp Hematop, 2006. **46**(1): p. 1-4.
108. Shu, W., et al., *Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27488-97.
109. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.
110. Sturn, A., J. Quackenbush, and Z. Trajanoski, *Genesis: cluster analysis of microarray data*. Bioinformatics, 2002. **18**(1): p. 207-8.
111. Swerdlow SH, C.E., Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. 2008: IARC.
112. Tagawa, H., et al., *Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1770-7.

113. Tanner, M.J., et al., *CARMA1 coiled-coil domain is involved in the oligomerization and subcellular localization of CARMA1 and is required for T cell receptor-induced NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2007. **282**(23): p. 17141-7.
114. Thorley-Lawson, D.A., *Epstein-Barr virus: exploiting the immune system*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 75-82.
115. Tirado, C.A., et al., *Genomic profiling using array comparative genomic hybridization define distinct subtypes of diffuse large B-cell lymphoma: a review of the literature*. J Hematol Oncol, 2012. **5**: p. 54.
116. Valera, A., et al., *MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy*. Haematologica, 2013. **98**(10): p. 1554-62.
117. van Dongen, J.J., et al., *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2257-317.
118. Veelken, H., et al., *Immunophenotype as prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy*. Ann Oncol, 2007. **18**(5): p. 931-9.
119. Velichutina, I., et al., *EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis*. Blood, 2010. **116**(24): p. 5247-55.
120. Ventura, R.A., et al., *FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue*. J Mol Diagn, 2006. **8**(2): p. 141-51.
121. Visco, C., et al., *Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study*. Leukemia, 2012. **26**(9): p. 2103-13.
122. Wang, M.L., et al., *Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2013. **369**(6): p. 507-16.
123. Winer, E.S., R.R. Ingham, and J.J. Castillo, *PCI-32765: a novel Bruton's tyrosine kinase inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies*. Expert Opin Investig Drugs, 2012. **21**(3): p. 355-61.
124. Woyach, J.A., et al., *Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib*. N Engl J Med, 2014. **370**(24): p. 2286-94.
125. Wright, G., et al., *A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9991-6.

126. Yang, Y., et al., *Whole body irradiation induces cutaneous dendritic cells depletion via NF-kappaB activation*. Cell Physiol Biochem, 2013. **32**(1): p. 200-9.
127. Yap, D.B., et al., *Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation*. Blood, 2011. **117**(8): p. 2451-9.
128. Young, R.M. and L.M. Staudt, *Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(3): p. 229-43.

9. Anhang

9.1 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Entparaffinierung:

1. Dreimalige Inkubation in Roti-Histol für je 5min
2. Spülen mit Alkohol in absteigender Konzentration (100%, 85%, 70%) für je 2 min
3. Inkubation in destilliertem Wasser für 5 min

Antigendemaskierung:

1. Kochen im Dampftopf bei höchster Druckstufe für 1 min in 1mM EDTA-Puffer (pH 0,8)
2. Inkubation in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur für 2 min
3. Andauung der Präparate mittels Pepsin (15 mg Pepsin +1,5 ml 1M HCl+150 ml destilliertes Wasser) bei 37 °C für 30 min

Fixierung:

1. Waschen in destilliertem Wasser für 2 min
2. Fixierung in 100 % Paraformaldehyd für 2 min
3. Waschen der Präparate in destilliertem Wasser für 1 min
4. Spülen mit Alkohol in zunehmender Konzentration (70%, 85%, 10%) für je 2 min
5. Lufttrocknung der Präparate vor dem Ventilator für 10 min

Hybridisierung:

1. Auftragen von 2 µl Sondenmix (1 µl Sonde, 2 µl steriles destilliertes Wasser, 7 µl Hybridisierungspuffer) auf ein markiertes Areal
2. Versiegelung des Deckglases mit Fixogum
3. Denaturierung im Wasserbad bei 80 °C für 30 min
4. Hybridisierung bei 37 °C für 72h

Waschen und Färben:

1. Waschen der Objektträger in Waschpuffer 1 (2ml 20x SSC, 300 µl Igepal, 100 ml destilliertes Wasser) bei 73 °C für 2 min
2. Waschen der Präparate in Waschpuffer 2 (10 ml 20x SSC, 100 µl Igepal, 100 ml destilliertes Wasser) bei Raumtemperatur für 1 min
3. Spülen in 2x SSC
4. Kerngegenfärbung mit DAPI für 7 min
5. Erneut Spülen mit 2x SSC
6. Eindeckung der Präparate mit Antifade (Vectashield mounting medium; Vektor H-1000)

9.2 Kapillarsequenzierung

PCR:

1. Entnahme der Reagenzien des Kits zum Auftauen aus dem Tiefkühlschrank
2. Herstellung einer wässrigen DNA-Lösung mit einer Konzentration von 100ng/ μ l
3. Vorlegen des folgenden PCR-Mixes:

Komponente	Volumen
PyroMark PCR MasterMix (2x)	12,5 μ l
CoralLoad Konzentrat (10x)	2,5 μ l
H ₂ O	7 μ l
Sequenzspezifischer Forward-Primer (10pmol)	1 μ l
Sequenzspezifischer Reverse-Primer (10pmol)	1 μ l

4. Hinzufügen von 1 μ l der DNA-Lösung
5. Starten des folgenden PCR-Programms im Thermocycler:

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	10 min	1
95°C	30 sec	45
58°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	1
4°C	Endlos	

Agarose-Gelelektrophorese:

1. 5 µl des PCR-Produkts wurden gemeinsam mit 1,5 µl 1 kb-DNA-Marker auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen (Zusatz von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid beim Gießen des Gels)
2. Gelelektrophorese über 40 min bei 100 V und 400 mA
3. Bandenauswertung unter UV-Licht (Geldokumentation)

Aufreinigung von PCR-Produkten:

1. Überführen der Produkte in eine 96 Well Platte
2. Pro Well 25µl Ampure beads zugeben, mehrfach resuspendieren
3. Bei Raumtemperatur für 5 min stehen lassen
4. Überführen der Platte in den Magnetplattenständer für 5 min
5. Überstand absaugen
6. Proben mit 100µl 70% Ethanol waschen, Ethanol wieder entfernen
7. Proben mit 150µl 70% Ethanol waschen, Ethanol wieder entfernen
8. Proben mit 200µl 70% Ethanol waschen, Ethanol möglichst vollständig absaugen
9. Platte vom Magnetständer nehmen und Proben in 50µl Wasser resuspendieren
10. Proben bei Raumtemperatur für 5 min und danach für weitere 5 min in dem Magnetplattenständer stehen lassen
11. Je 40µl Probe in eine neue Platte überführen

Sequenzreaktion:

1. Sequenzieransatz aus je:

Komponente	Volumen
Aufgereinigtes PCR-Produkt	2,5 µl
HPLC H ₂ O	5 µl
DTCS (GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit)	5 µl
Primer Forward oder Reverse (10pmol)	1 µl

herstellen.

2. Thermocycler für Sequenzreaktion mit folgenden Zyklen starten:

Temperatur	Dauer	Zyklen
96 °C	20 sec	30x
50 °C	20 sec	30x
60 °C	240 sec	30x

Aufreinigung von Sequenzreaktionsprodukten:

(unter Einsatz des Agencourt cleanSEQ System von Beckman & Coulter (Brea, CA, USA))

1. Je 10 µl Magnetbeads pro well mit je 45 µl 85%igem Ethanol zu den 10 µl Sequenzier-Produkt hinzugeben
2. dieses Gemisch zu den beads in die Aufreinigungsplatte pipettieren und dabei mehrfach resuspendieren
3. Überführen der Platte in den Magnetplattenständer für 3 min
4. Überstand entfernen
5. Proben mit 100 µl 85% Ethanol waschen, für 30 sec belassen, Ethanol entfernen
6. Proben mit 150 µl 85% Ethanol waschen, für 30 sec belassen, Ethanol entfernen
7. Proben mit 200 µl 85% Ethanol waschen, für 30 sec belassen, Ethanol möglichst vollständig in mehreren Wiederholungen entfernen
8. Aufreinigungsplatte aus dem Magnetplattenständer herausnehmen
9. Proben mit 50 µl SLS mehrfach resuspendieren
10. Überführen der Platte in den Magnetplattenständer stellen für 5 min
11. Überführen von je 35 µl in die Beckman & Coulter-Platte
12. Mit Öl überschichten und zur Messung in den CEQ 8800 überführen

Kapillar-Gelelektrophorese:

(unter Einsatz des CEQ 8800 von Beckman & Coulter (Brea, CA, USA))

1. Starten der SeqRoutine-Methode mit folgenden Abläufen:

Vorgang	Temperatur	Spannung	Dauer
Erhitzen der Kapillare	57 °		
Denaturierung	90°		120 sec
Injektion		2 kV	15 sec
Separation		6 kV	45 min

2. Nach Programmende Datenauswertung mittels GenomeLab 10.2
3. Abgleichen der identifizierten Mutationen mit bekannten Polymorphismen und Mutationen anhand der Ensembl Datenbank

9.3 Pyrosequenzierung

PCR:

1. Entnahme der Reagenzien des Kits zum Auftauen aus dem Tiefkühlschrank
2. Vermischen von 20 ng DNA je Probe mit HPLC-H₂O zu einem Gesamtvolumen von 9 µl
3. Hinzufügen des folgenden PCR-Mixes zu jeder Probe:.

Komponente	Volumen
PyroMark PCR MasterMix (2x)	12,5 µl
CoralLoad Konzentrat (10x)	2,5 µl
H ₂ O	7 µl
MYD88-265-F	1 µl
MYD88-265-R	1 µl

4. Starten des folgenden PCR-Programms am Thermocycler:

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	15 min	1
95°C	30 sec	45
58°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	1
4°C	Endlos	

Agarose-Gelelektrophorese:

1. 5 μ l des PCR-Produkts wurden gemeinsam mit 1,5 μ l 1 kb-DNA-Marker auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen (Zusatz von 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid beim Gießen des Gels)
2. Gelelektrophorese über 40 Minuten bei 100V und 400 mA
3. Bandenauswertung unter UV-Licht

Immobilisierung der PCR-Produkte:

1. Zunächst wurde im Sinne der Einzelstrangpräparation der Matrize ein Immobilisierungsmix angesetzt und auf eine, auf den PyroMark Q24 zugeschnittene, Reaktionsplatte gegeben.

Ansatz für die Einzelstrangpräparation:

Komponente	Volumen
PyroMark PCR Bindungspuffer	40 μ l
Streptavidin Sepharose beads	2 μ l
PCR-Produkt	10 μ l
Wasser	28 μ l

2. Im Anschluss wurde die Reaktionsplatte bei Raumtemperatur für 10 min bei 1400 U geschüttelt.

Pyrosequenzierung:

1. Vorheizen eines Heizblocks auf 80°C
2. Hinterlegen des Laufs in der PyroMark Software
3. Vorbereitung der Waschstation
4. Ansetzen der folgenden Reagenzien für die Sequenzreaktion:

Komponente	Volumen
MYD88-265-Fseq	0,5 µl
PyroMark Annealing-Puffer	24,5 µl

5. Einsetzen und Aufreinigung der Sequenzier- sowie der Immobilisierungsplatte in der Waschstation
6. Denaturierung der Sequenzierplatte für 2 min bei 80°C, danach Abkühlen bei Raumtemperatur für 5 min
7. Bestücken einer Kartusche mit Substraten, den Enzymen sowie den dNTPs
8. Einsetzen von Sequenzierplatte und Kartusche in den PyroMark und Starten des Laufs
9. Erfassung und Verarbeitung der Messdaten unter Verwendung der PyroMark Q24 Software in der Version 2.0

9.4 Array - CGH

Probenmarkierung:

1. Probevolumen 26 μl (entsprechend 1 μg DNA) sowie Kontroll-DNA (geschlechtsadaptiert) ansetzen
2. 3 Heizblöcke auf 37°C und 65°C und 95°C vorheizen
3. Proben 1 min zentrifugieren
4. 26 μl Probe + 5 μl Random-Primer (gesamt: 31 μl), gut vermischen
5. 10 min bei 95°C inkubieren
6. 5 min auf Eis kühlen
7. Proben erneut 1 min zentrifugieren.
8. Fluoreszenzmarkierung (Labeling): 1 Mix mit Cyanine 5-dUTP (Probe, blau) + 1 Mix mit Cyanine 3-dUTP (Kontrolle, rot) pro Probe

Reagenzien	Menge
5x Reaktionspuffer	10 μl
10x dNTPs	5 μl
Cy5 oder Cy3	3 μl
Exo (-) Klenow	1 μl
gesamt:	19 μl

9. 31 μl Probe + 19 μl Mix (gesamt: 50 μl), gut mixen
10. 2 h bei 37°C inkubieren, mit Alufolie abdecken
11. 10 min bei 65°C inkubieren, danach auf Eis lagern

Aufreinigung der gelabelten DNA:

1. Proben 1 min zentrifugieren (6000rpm)
2. 430 μl 1xTE (pH 8,0) zu der Probe geben und gesamte Probe auf die Säule geben
3. 10 min bei 14000rpm zentrifugieren, danach Lösung verwerfen

4. Erneut 480 μl 1xTE (pH 8,0) auf die Säule geben
5. 10 min bei 14000rpm zentrifugieren.
6. Säulen umgedreht in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführen
7. 1 Min zentrifugieren (1000rpm)
8. Quantifizierung der Probe (Zielparameter: 20-32 μl Probenmaterial)
9. Verwerfung der Säulen
10. Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop
11. Angleichung des Produktes von DNA Konzentration und Grad der erfolgreichen Fluoreszenzmarkierung für Probe und Kontrolle. Anhand der berechneten Volumina Probe und Kontrolle zusammenführen (Zielwert 39 μl , ggf. mit TE- Puffer auffüllen)
12. Vorheizen des Heizblocks auf 95°C und Vorheizen eines zweiten Heizblocks auf 37°C
13. Ansetzten des Hybridization Master Mix exemplarisch für 8 Proben bei 4-pack microarray:

Reagenzien	Vol μl (1x)	Vol μl gesamt (8x)
Cot-1 DNA (1,0 mg/mL)	5	47,5
10x aCGH Blocking Agent	11	104,5
2x HI- RPM Hybridization Buffer	55	522,5
Final Volumen Mastermix	71	674,5

14. 71 μl Mastermix in jede Probe überführen, mischen und anzentrifugieren
15. bei 95 °C 3 min und anschließend bei 37°C für 30min inkubieren
16. 110 μl auf die Microarrays geben (Luftblasen auf Microarrays vermeiden)
17. Mit Arrayplatte abdecken
18. Barcode + Probennummern notieren
19. Bei 65°C und 9rpm für 48h im Hybridisierungssofen inkubieren

Waschen der Microarrays:

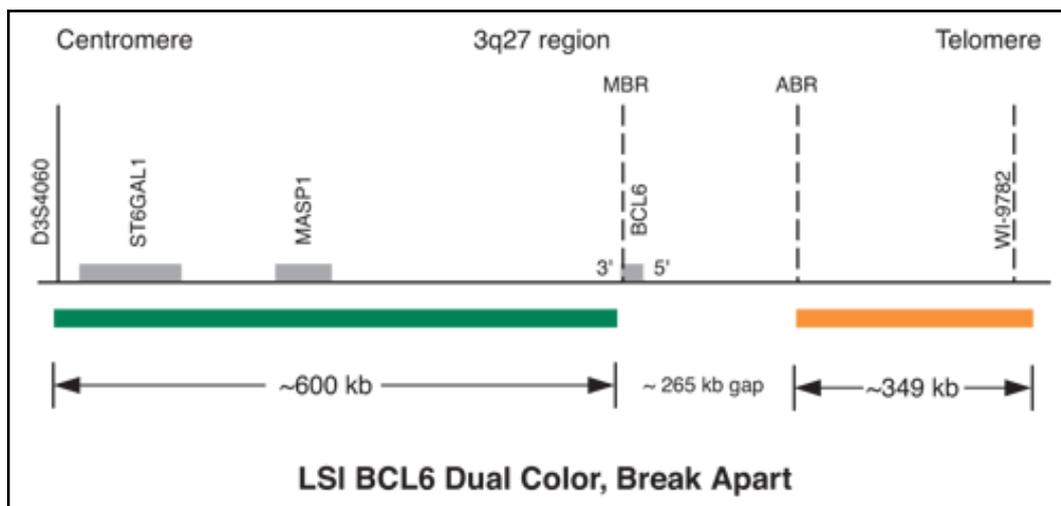
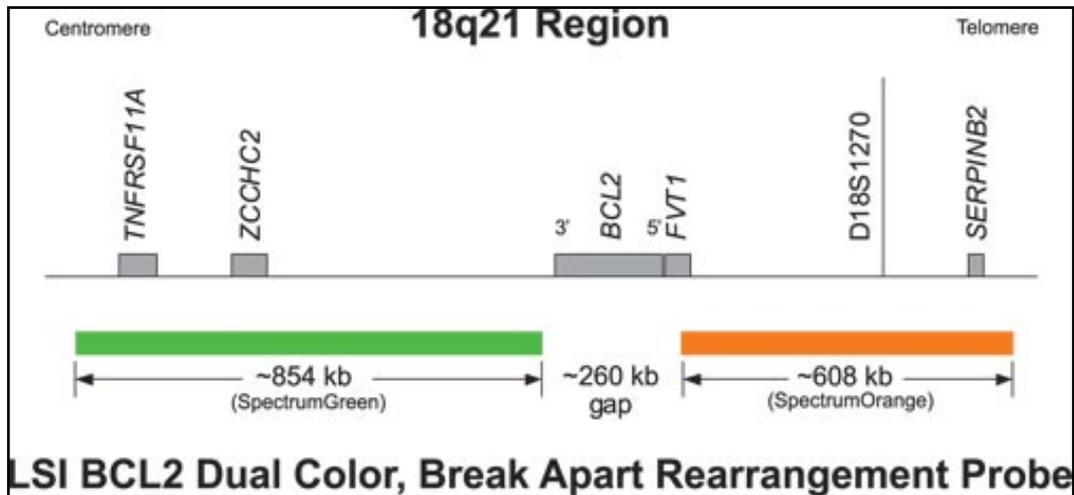
1. 24h zuvor: über Nacht Puffer 2 auf 37°C im Heizschrank aufwärmen
2. Zum Trennen von Microarray und Deckplatte in separatem Gefäß mit Puffer 1 tauchen und dort vorsichtig am Barcode mittels spitzer Pinzette voneinander lösen
3. Microarray in Rahmen in Puffer 1 überführen und dort bei Raumtemperatur 5min mit Magnetrührer belassen
4. Überführen in Puffer 2 für 2 min (37°C)
5. Überführen in 50ml Falconröhrchen mit Acetonitril für 1min
6. Überführen in Stabilization and Drying Solution für 30sec
7. Überführen des tropfenfreien Microarrays in mit Alufolie umwickelte Falconröhrchen

Scannen der Proben mittels Agilent Scanner:

1. min. 10 min vor Beginn PC, Bildschirm, DNA Mikroarray Scanner starten
2. Starten der Software „Agilent Scan Control“
3. Auswahl der Profile:
 - a. Agilent G3 CGH
 - b. Start Slot 1 - ... End Slot (Anzahl Microarrays)
 - c. Resolution: 3µm double pass
 - d. Tiff: 16 bit
 - e. Zielordner eingeben
4. Beladen des Scanners
5. Objekträgerhalter öffnen (Agilentseite oben), verschließen und in Scanner Slot 1-... stecken
6. Scan starten
7. Daten auf USB Stick ziehen

9.5 Abbildungen: Vysis FISH Sonden von Abbott Molecular

(Bildmaterial verwendet mit Genehmigung des Copyrightinhabers)



10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Alfred C. Feller für die Möglichkeit bedanken, diese Promotion am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck anfertigen zu können. Erst die hervorragenden Arbeitsbedingungen haben diese Arbeit möglich gemacht.

Bei Herrn Prof. Dr. Christoph Thorns möchte ich mich für die Überlassung des Themas sowie für die zuverlässige und wohlwollende Betreuung während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit bedanken. Es war für das Gelingen dieser Promotion entscheidend, dass er mir als Ansprechpartner immer zur Seite stand.

Bei Frau Dr. Veronica Bernard möchte ich mich für die Hilfe im Zusammenhang mit den molekulargenetischen Methoden in dieser Arbeit bedanken. Zu Dank bin ich ebenfalls den MTAs des Labors für Immunhistochemie sowie des Molekular-Labors, insbesondere Biggi Steinfeldt und Tanja Oeltermann, verpflichtet.

Abschließend gehört mein besonderer Dank meiner Familie für ihre fortwährende Unterstützung und Liebe. Ich danke meinen lieben Eltern, die mich in allen meinen Plänen und Ideen unterstützt haben und mir hierdurch die Fähigkeiten und das Selbstvertrauen für eine solche Arbeit vermittelt haben. Mama- Vielen Dank für Deine ständige und zuverlässige Hilfe mit den Kindern (ich hätte sonst wahrscheinlich noch nicht mal das Studium beendet). Es bedeutet mir soviel, dass du immer da bist Papa- Danke für die Freude am Lernen und Lesen und für Deinen unumstößlichen Glauben in meine Fähigkeiten (ich vermisse Dich so sehr). Emil und Justus- Ihr zwei seid mir Inspiration und Ansporn in allem, was ich tue und sein möchte (ihr seid das größte Geschenk). Niklas- Dein Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit ist nicht in Worte zu fassen; Du warst und bist mir der beste Doktorarbeitsbetreuer, Ansprech- und Diskussionspartner, Motivator, Freund und Ehemann, den ich mir nur wünschen könnte.
Danke

11. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name:	Judith Gebauer
Geburtstag:	28.01.1987
Geburtsort:	Kirchheimbolanden
Anschrift:	Erich-Klann-Str. 22 23560 Lübeck
Staatsangehörigkeit:	deutsch



Schulbildung:

1993-97	Grundschule Mühlheim
1997-2006	Leininger Gymnasium in Grünstadt
2006	Abitur (Durchschnittsnote 1,0)

Hochschulausbildung:

2006	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2009	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung – Note: gut (2,0)
2012-2013	Praktisches Jahr am Institut für Humangenetik des UKSH Campus Lübeck, den Inneren und chirurgischen Kliniken der Sana Klinik Lübeck
2013	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung – Note: sehr gut (1,5)
2013-2014	Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Institut für Pathologie, UKSH Campus Lübeck
Seit 2014	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Medizinischen Klinik I sowie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

12. Publikationsverzeichnis

12.1 Veröffentlichungen in Peer-Review Journalen:

[1] Gebauer N*, **Gebauer J***, Hardel TT, Bernard V, Biersack H, Lehnert H, Rades D, Feller AC and Thorns C. Prevalence of targetable oncogenic mutations and genomic alterations in Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Leuk Lymphoma* 2014; 1-7. *geteilte Erstautorenschaft

[2] Gebauer N*, Hardel TT*, **Gebauer J**, Bernard V, Merz H, Feller AC, Rades D, Biersack H, Lehnert H and Thorns C. Activating Mutations Affecting the NF-kappa B Pathway and EZH2-mediated Epigenetic Regulation are Rare Events in Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma. *Anticancer Res* 2014; 34: 5503-5507. *geteilte Erstautorenschaft

[3] Knief J*, Gebauer N*, Bernard V, Schemme J, Reddemann K, **Gebauer J**, Rades D, Brabant G, Lehnert H, Feller AC and Thorns C. Oncogenic mutations and chromosomal aberrations in primary extranodal diffuse large B-cell lymphomas of the thyroid - a study of 21 cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; jc20143250. *geteilte Erstautorenschaft

12.2 Poster-Veröffentlichungen:

[1] Gebauer N*, **Gebauer J***, Hardel TT, Bernard V, Biersack H, Lehnert H, Rades D, Feller AC and Thorns C. Prevalence of targetable oncogenic mutations and genomic alterations in Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2014.* *geteilte Erstautorenschaft

[2] Gebauer N*, Hardel TT*, **Gebauer J**, Bernard V, Merz H, Feller AC, Rades D, Biersack H, Lehnert H and Thorns C. Activating Mutations Affecting the NF-kappa B Pathway and EZH2-mediated Epigenetic Regulation are Rare Events in Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma. *Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2014.* *geteilte Erstautorenschaft

13. Erklärung

Gemäß §9 Abs. 1 der Promotionsordnung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe im Institut für Pathologie unter Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Christoph Thorns und Frau Dr. rer. nat. Veronica Bernard angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe weder anderweitig versucht eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Judith Gebauer