

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Andreas Rosenwald

**Identifikation und Charakterisierung von Progressionsfaktoren
Follikulärer Non-Hodgkin Lymphome in einem Kollektiv des
Verbundprojektes "Molekulare Mechanismen bei malignen
Lymphomen (MMML)"**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Raphael Witzig
aus Ludwigsburg

Würzburg, März 2018



Referent bzw. Referentin: Prof. Dr. med. German Ott

Korreferent bzw. Korreferentin: Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2018

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Maligne Lymphome	1
1.2	Non-Hodgkin-Lymphome	1
1.2.1	Ätiologie	2
1.2.2	Epidemiologie	2
1.3	Follikuläres Lymphom	3
1.3.1	Epidemiologie	4
1.3.2	Pathophysiologie und Genetik	4
1.3.3	Morphologische Klassifikation des FL	6
1.3.4	Immunologie	7
1.3.5	Therapie	8
1.3.6	Prognose	9
1.4	MMML Projekt	11
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Untersuchungsmaterial	14
2.1.2	Kits, FISH-Sonden und Antikörper	14
2.2	Methoden	16
2.2.1	Genexpressionsanalysen	16
2.2.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung	17
2.3	Immunhistochemie	17
2.3.1	Immunhistochemische Färbungen an Paraffinmaterial	17
2.4	Statistik	18
2.4.1	Clusteranalyse	18
2.4.2	Varianzanalyse	19
2.4.3	Hauptkomponenten-Analyse	20
2.4.4	Klassifikationsanalyse	21
3	Ergebnisse	23
3.1	Kohorte	23
3.2	Genexpressionsanalysen	27
3.2.1	Vergleich anhand der Graduierung der FL	27

3.2.2	Vergleich anhand der An- oder Abwesenheit der t(14;18)	45
4	Diskussion.....	59
4.1	Zusammenstellen einer Kohorte follikulärer Lymphome mit klar definierten histologischen Subtypen.....	59
4.2	Genexpressionsprofile unterschiedlicher histologischer FL-Subtypen und Identifikation möglicher tumor-relevanter Marker	62
4.2.1	Differentiell exprimierte Gene zwischen FL3 und FL1/2	65
4.2.1.1	Homolog, double strand break repair nuclease (MRE11A)	67
4.2.1.2	Thioredoxin (TXN)	67
4.2.1.3	Topoisomerase II alpha (TOP2A)	69
4.3	Vergleich anhand der An- und Abwesenheit von t(14;18).....	70
4.4	Ausblick	73
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis.....	I
7	Lebenslauf.....	VI
8	Danksagung.....	VIII

1 Einleitung

1.1 Maligne Lymphome

Der Begriff „Lymphom“ beschreibt im ursprünglichen Sinne eine Vergrößerung eines Lymphknotens, wobei deren Ursache nicht detailliert wird. Im modernen Sprachgebrauch versteht man darunter jedoch in erster Linie eine primäre Neoplasie des lymphatischen Systems, also das „maligne Lymphom“.^{1,2}

Die neoplastischen, proliferierenden Zellen eines Lymphoms können grundsätzlich in B- und T-Zellen unterschieden werden, so wird der Ursprung und die Zuordnung zu einer bestimmten Zellreihe hergestellt.^{1,2}

Eine Einteilung dieser heterogenen Gruppe von Tumoren erfolgt anhand histologischer, zytochemischer und immunologischer Kriterien in das Hodgkin Lymphom und die Non-Hodgkin-Lymphome, wobei die Mehrzahl der Fälle (ca. 90 %) letzterem angehören.^{1,2}

Während die Hodgkin Lymphome eine homogene Erkrankung von lymphatischen Zellen der B-Zellreihe darstellen, finden sich im Non-Hodgkin-Lymphom Tumoren, die der B-Zellreihe oder der T-Zellreihe entstammen. Maligne Lymphome treten mit einer Inzidenz von ca. 34 pro 100.000 Personen auf.^{3,4}

1.2 Non-Hodgkin-Lymphome

In ihrer Gesamtheit stellen Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) eine heterogene Gruppe von lymphoproliferativen Erkrankungen dar, was sowohl eine standardisierte Nomenklatur als auch eine genaue Klassifikation erschwert. Die neueste Klassifikation der World Health Organization (WHO) bezieht zur Klassifikation alle verfügbaren Parameter, wie Morphologie, Immunhistochemie, Genetik und klinische Symptome, ein.⁵

1.2.1 Ätiologie

NHL haben in der westlichen Hemisphäre ihren Ursprung zu 80 bis 85% in B-Zellen und zu 15 bis 20% in T-Zellen.² Während zwei Drittel der Erkrankungen primär nodal mit fakultativer sekundärer extranodaler Manifestation entstehen, treten etwa ein Drittel der Fälle primär extranodal auf.² Neben den Lymphknoten infiltrieren primär nodale Lymphome vor allem die Milz, die Leber, das Knochenmark und den Gastrointestinaltrakt, primär extranodale Lymphome finden sich vor allem in der Haut und dem Gastrointestinaltrakt.²

1.2.2 Epidemiologie

Die überwiegende Mehrzahl der NHL sind B-Zell NHL. Die Inzidenz liegt hierfür bei ca. 26 pro 100.000 Personen, für T-Zell NHL bei ca. 2.^{3,6} Die Inzidenz für NHL, aber auch für praktisch alle malignen Lymphome zeigte in den vergangenen Jahrzehnten weltweit einen um jährlich 3-4% steigenden Trend.^{3,7} Ursächlich hierfür könnte vor allem das allgemein steigende Alter der Bevölkerung sein. Da das NHL bevorzugt ein Tumor des höheren Alters ist, steigt durch das Erreichen eines höheren Lebensalters auch das Risiko, an einem NHL zu erkranken. Zwar trägt die steigende Inzidenz von HIV-Infizierten hierzu auch bei, dies aber nur in geringerem Umfang.⁵

NHL umfassen als Gruppe eine Vielzahl von unterschiedlichen Lymphomen. Die häufigsten Vertreter sind das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) und das folliculäre Lymphom (siehe Abbildung 1.1).

Einleitung

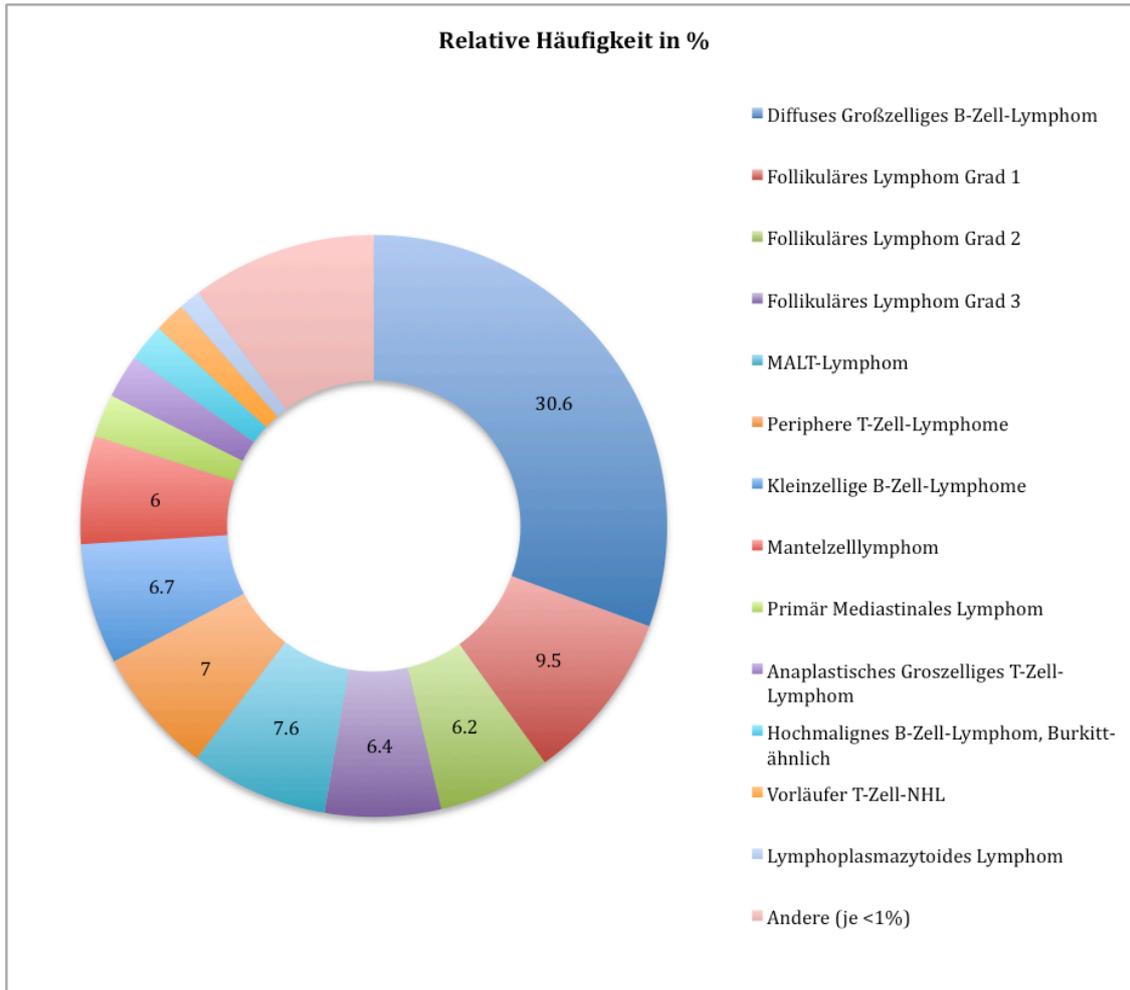


Abbildung 1.1 nach ⁸: In diesem Kreisdiagramm sind verschiedene Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) nach ihrer relativen Häufigkeit unter den NHL gezeigt.

1.3 Follikuläres Lymphom

Follikuläre Lymphome (FL) sind indolente, wenig proliferierende Neoplasien von B-Zellen mit einem Ursprung in den Keimzentren der Lymphfollikel, die mikroskopisch ein zumindest partiell follikuläres Wachstumsmuster aufweisen. Im Verlauf der Erkrankung nimmt der Grad des FL häufig zu, auch eine Transformation in ein DLBCL ist möglich.^{3,9}

1.3.1 Epidemiologie

Das Follikuläre Lymphom ist nach dem DLBCL das häufigste B-Zell-Lymphom und das am häufigsten vorkommende indolente Lymphom. Es macht ca. 20-30% aller Lymphome aus.⁵ In Europa weist es eine Inzidenz von 2.18 pro 100.000 Personen auf, in den USA ist die Inzidenz etwas höher.^{5,10} Das FL manifestiert sich meist im höheren Alter; das mittlere Erkrankungsalter liegt in der Mitte der 6. Dekade. Es tritt nur sehr selten bei Kindern oder jungen Erwachsenen unter 18 Jahren auf.^{3,11} Die Raten für Inzidenz zeigen eine deutliche Varianz in Abhängigkeit von der geographischen Region, so tritt das FL weniger häufig in Asien und in Entwicklungsländern auf als in Westeuropa und den USA.⁵ Dies deutet auf ein unterschiedlich ausgeprägtes Auftreten in Bezug auf Geographie und ethnischen Hintergrund hin. Ethnisch sind Weiße stärker betroffen als schwarze Menschen oder Asiaten. So ist die Inzidenz für Schwarze aus Afrika oder der Karibik beispielsweise um die Hälfte niedriger als bei Weißen.¹² Die Inzidenz für FL zeigte in den letzten Jahrzehnten einen steigenden Trend.⁵ Analog zu den steigenden Trends für das NHL insgesamt steht auch hier die steigende Lebenserwartungen damit im Zusammenhang (siehe 1.2.2 Epidemiologie des NHL). In Bezug auf das Geschlecht gibt es leicht unterschiedliche Angaben hinsichtlich der Häufigkeit. Frauen und Männer scheinen ungefähr gleich häufig betroffen zu sein.^{5,13,14}

1.3.2 Pathophysiologie und Genetik

In den letzten Jahren wurden umfangreiche neue Erkenntnisse über die molekularen Veränderungen gewonnen, die mit dem FL assoziiert sind. Als primäre genetische Veränderung gilt die Translokation t(14;18)(q32;q21), die das *BCL2*- und das *IGH*-Gen betrifft, und die bei 90% der FL vorliegt.⁵

Das *BCL2*-Protein hat eine antiapoptotische Wirkung. Das hierfür kodierende Gen liegt auf Chromosom 18. Bei der für das FL typischen t(14;18)-Translokation wird

Einleitung

dieses Gen auf das Chromosom 14 verlagert und gerät damit unter den Einfluss der „Enhancer“-Region des Immunglobulin-Schwerkettengens (IGH), das in B-Zellen stark transkribiert wird. Unter dem Einfluss der unphysiologischen Aktivität des Immunglobulin-Promotors kommt es zu einer konstitutiven Überexpression des *BCL2*-Gens und des Proteins, das somit seine starke antiapoptotische Wirkung ausübt. Primär steht also eine verlängerte Überlebenszeit der B-Zelle in der Pathogenese dieses Lymphoms im Mittelpunkt, welche durch *BCL2* oder andere äquivalente Aberrationen zustande kommen kann.^{2,14,15}

Die Frequenz für ein *BCL2*-Translokation positives FL ist bei Erkrankten in westlichen, kaukasischen, Populationen höher, als bei erkrankten Personen in Asien, jedoch zeigen beide Populationen ähnliche Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten einer solchen Translokation im Blut der gesunden Normalbevölkerung, was auf weitere Faktoren für die Entstehung dieser Krankheit hinweist.^{16,17}

Infolge der primären *BCL2*-Translokation gibt es wohl zwei Wege der weiteren Entwicklung des Tumors mit weiteren spezifischen Veränderungen. So beeinflussen molekular unterschiedliche Tumorzellen ihre nähere Umgebung, also das Mikromilieu, und werden daraufhin auch ihrerseits durch immunologische Wechselwirkungen von T-Helfer-Zellen stimuliert (extrinsische Faktoren). Das Zusammenwirken der genetischen und immunologischen Gegebenheiten bestimmt dann vermutlich auch den klinischen Verlauf des Lymphoms.¹⁵ In ca. 30% der FL finden sich zudem wohl sehr früh in der Tumorgenese auftretende „loss-of-function“ Mutationen in für Histon-Acetyltransferasen kodierenden Genen, was darauf hinweist, dass epigenetische Faktoren ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese des FL spielen.¹⁴ Höglund et al.¹⁸ diskutierten für das FL eine Vielzahl häufiger genetischer Aberrationen, die sich mit der Progression und damit auch der Prognose in Zusammenhang bringen lassen. Darunter waren beispielsweise Deletionen von Chromosom 17p [del(17p)] und Zugewinne von Chromosom 12 (+12), die mit einem schlechteren klinischen Verlauf korrelierten. De Jong¹⁵ fasste diese Daten in zwei mögliche Wege der Pathogenese des FL zusammen und benannte Deletion von Chromosom 6q (-6q) und Zugewinne von Chromosom 1q

Einleitung

(+1q) als häufige Aberrationen in FL mit schlechterer Prognose und Zugewinne der Chromosomen 7 und 8 (+7, +8), sowie strukturelle Veränderungen von Chromosom 18 [+der(18)] als Chromosomenveränderungen in FL mit besserem klinischen Verlauf.¹⁵ Zusätzliche Mutationen und Aberrationen nehmen mit steigendem Grad eines FL und schließlich der Transformation zu einem DLBCL zu.³ Neuere Erkenntnisse über die molekularen Abläufe im FL tragen maßgeblich zur Verbesserung in Therapie und Diagnostik bei.¹⁹ Hierzu, sowie auch zum besseren Verständnis der FL auf molekularer Ebene soll auch das „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“ Projekt (MMML Projekt, siehe 1.4 MMML Projekt) beitragen.

1.3.3 Morphologische Klassifikation des FL

Das FL wird anhand der in der WHO-Klassifikation maligner Lymphome definierten Eigenschaften diagnostiziert. Das FL wird anhand der Anzahl von Zentrozyten und Zentroblasten in vier histomorphologische Grade eingeteilt: Grad 1, Grad 2 und in die Grade 3A und 3B.³ So ist ein FL mit 0-50 Zentroblasten pro 10 *high power fields* (hpf; Gesichtsfeld, 40x Vergrößerung) ein FL Grad 1. Ein hpf entspricht 0,159 mm². Weist ein FL 51-150 Zentroblasten pro 10 hpf auf, so wird es als Grad 2 bezeichnet, bei über 150 Zentroblasten pro 10 hpf, wird es als Grad 3 klassifiziert.³

Die Einteilung in Grad 3A und 3B basiert auf dem gesamten Erscheinungsbild des FL. Sind Zentrozyten in den neoplastischen Keimzentren noch präsent, so handelt es sich um ein FL Grad 3A, handelt es sich ausschließlich um Zentroblasten, so spricht man von einem FL Grad 3B.³

Das Wachstumsmuster des FL kann zudem in folliculär, folliculär und diffus, sowie überwiegend diffus eingeteilt werden. Ausschlaggebend ist der Anteil des folliculären Wachstumsmusters. Für ein folliculäres FL ist der Anteil von folliculären Strukturen >75%, für ein folliculär und diffuses FL 25-75%, und für ein überwiegend diffuses FL <25%.³ Ein diffuses Wachstum eines FL spricht allgemein für eine schnellere Progression und eine schlechtere Prognose.²⁰

Einleitung

Nach den Regeln der WHO bedingen diffuse Wachstumsareale mit >150 Zentroblasten pro 10 hpf die Diagnose eines diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms, ggf. mit zusätzlichen Anteilen eines follikulären Lymphoms.³

Eine Auflistung der o.g. Kriterien und Definitionen zeigt Tabelle 1.2.

Grading	Definition
Grad 1	0-50 Zentroblasten pro 10 hpf
Grad 2	51-150 Zentroblasten pro 10 hpf
Grad 3	>150 Zentroblasten pro 10 hpf
Grad 3A	Vorhandensein von Zentrozyten
Grad 3B	Ausschliesslich Zentroblasten
Einteilung der Wachstumsstruktur	Prozentualer Anteil follikulär
Follikulär	>75%
follikulär und diffus	25-75%
überwiegend follikulär	<25%

Tabelle 1.2 nach ³: Grading und Wachstumsmuster des follikulären Lymphoms.

Trotz genauer Definition durch die Kriterien der World Health Organization (WHO) ist die morphologische Graduierung des FL schwierig reproduzierbar, auch unter Lymphomexperten.^{21,22}

1.3.4 Immunologie

In der Diagnosefindung ist die Ermittlung des Immunphänotyps hilfreich und gilt deshalb als Standard in der Routinediagnostik. FL weisen eine Expression von Pan-B-Zellmarkern wie CD19, CD20, CD22 und Pax-5 auf, zudem zeigen sie in charakteristischer Weise auch eine Expression von Keimzentrumzell-Markern wie CD10 und BCL6.⁹ Der Verlust einer Expression von CD10 ist allerdings nicht

Einleitung

unüblich für das FL.⁹ Nach Horn et al. verringert sich die Frequenz der CD10-positiven Tumoren mit zunehmendem Grad des FL von nahezu 100% bei FL1/2 bis zu 83% bei FL3A und 43% bei reinen FL3B.²³ Dem gegenüber steht eine Zunahme der Expression von IRF4/MUM1 (post-Keimzentrumsmarker), das bei FL1/2 und FL3A nicht exprimiert wird, bei FL3B aber in 42% der Fälle positiv war.²³

Die Expression von BCL2 wird in den meisten FL nachgewiesen, vor allem in FL der morphologischen Grade 1 und 2. Dies liegt offenbar wiederum in der erhöhten Frequenz der Translokation t(14;18)(q32;q21) in diesen FL.^{2,9,14} Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die *BCL2*-Translokation überwiegend in FL1/2 und in geringerem Ausmaß in FL3A vorkommt, während die Frequenz in den FL3B niedriger ist.^{23,24} Bei der Translokation von *BCL6* hängt die beschriebene häufige Aberration in den FL3B wohl mit der Koexistenz von DLBCL zusammen (ca. 50%), wie Horn et al. zeigten,^{23,25} wohingegen reine FL3B selten (17%) eine *BCL6*-Translokation aufweisen, auch FL1/2 und FL3A weisen diese Aberration nur in geringem prozentualen Anteil auf (zusammen ca. 10%).^{23,26} Ein Rearrangement des *MYC*-Gens ist vorwiegend in FL3B (22% bei reinen FL3B) zu finden und nicht oder kaum bei den FL1/2 oder FL3A.²³

1.3.5 Therapie

Grundsätzlich stellt das FL eine mit konventioneller Therapie nicht heilbare Erkrankung dar.^{14,27} Ziel der Therapie ist deshalb die Verbesserung des Wohlbefindens der Patienten und die Verlängerung der Überlebenszeit. Da Patienten mit FL neben einer zumeist schmerzlosen Lymphadenopathie oft keine Beschwerden aufweisen, die meisten Therapieformen für FL aber u.U. beträchtliche Nebenwirkungen haben, besteht die Möglichkeit sich in ärztlicher Kontrolle zunächst abwartend zu verhalten („watch and wait“). Praktisch werden die Patienten oft wegen sekundärer Probleme der Lymphomerkkrankung behandelt, wie Anämie, Thrombozytopenie oder Neutropenie aufgrund einer Knochenmarksinfiltration. Wenn der Zustand des Patienten jedoch beeinträchtigt

Einleitung

ist, er B-Symptome oder eine große Tumormasse, also einen „Bulk“ aufweist, oder Organe beeinträchtigt oder vital gefährdet sind, sollte eine Therapie eingeleitet werden.⁵

Die Therapie ist abhängig vom Stadium des FL. Bei lokalisiertem Befund, erfolgt eine *involved field* oder *extended field* Bestrahlung. Zusätzlich erfolgt eventuell eine neoadjuvante Therapie mit Rituximab.²⁷ In generalisierten Stadien wird derzeit mit R-CHOP (bestehend aus Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon) oder R-Benda (Rituximab und Bendamustin) behandelt. Dies geschieht häufig jeweils in 6 Zyklen mit nachfolgender Erhaltung mit Rituximab in Monotherapie.²⁷

Seit der Einführung des anti-CD20 Antikörpers Rituximab, die sowohl durch die Identifikation des CD20 Markers als Therapietarget als auch die Möglichkeit der Herstellung monoklonaler Antikörper möglich war, hat Rituximab auch Eingang in die Therapie des FL gefunden und sowohl die Frequenz der Remission erhöht, als auch die progressionsfreie Zeit verlängert. Eine Heilung wurde aber nicht erreicht. Die Nebenwirkungen sind jedoch deutlich geringer als die der reinen Chemotherapeutika.⁵

1.3.6 Prognose

Das Ansprechen auf die Therapie ist bei der Mehrzahl der Patienten gut und verlängert die Überlebenszeit bis auf das dreifache.⁵ Das Vorhandensein einer *BCL2*-Translokation wirkt sich wohl nicht auf den Verlauf der Erkrankung aus.²⁸ Ein klinischer Index zur Einschätzung der Prognose ist der sogenannte FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index). Hierbei fließen klinische Daten und Labordaten zur Prognosestellung ein. Generell zeigt das FL einen langsam progredienten klinischen Verlauf. In 40% der Fälle transformiert das FL in ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL). Die Heilungschancen für dieses sind aber geringer als die eines *de novo* entstandenen DLBCL.¹⁴

Einleitung

Das Überleben der Erkrankten ist aufgrund der Indolenz des Tumors mit durchschnittlich 7-9 Jahren vergleichsweise lang (Spannweite 2-20 Jahre). Die Spannweite von 18 Jahren in der Lebenserwartung zeigt eine sehr große Ungenauigkeit in der Prognoseberechnung auf. Der FLIPI-Score ist ein erster Schritt, den klinischen Verlauf einzuschätzen (siehe Abbildung 1.3). Die Kenntnisse der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und die daraus resultierende gemeinsame Beurteilung molekularer und klinischer Parameter sind insbesondere bei der Prognose von FL von offenbar immenser Bedeutung. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Auftreten von Mutationen in sieben Genen in Kombination mit den Parametern des FLIPI (=m7-FLIPI) die Risikostratifizierung von FL-Patienten deutlich optimieren.²⁹

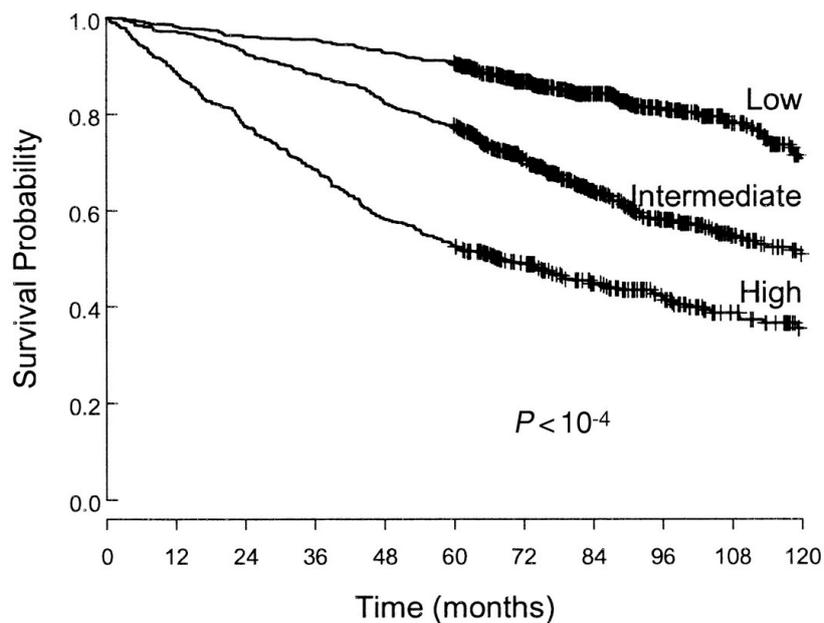


Abbildung 1.3 nach ³⁰: Überleben von 1795 Patienten nach den Risikogruppen des FLIPI.

1.4 MMML Projekt

Obwohl für die Diagnose und Prognose maligner Lymphome nach wie vor die Histopathologie und klinische Parameter grundlegend sind, gewinnt die Berücksichtigung molekularbiologischer Faktoren immer mehr an Bedeutung, wie auch das Beispiel des m7-FLIPI²⁹ verdeutlicht. Das MMML Projekt („Molekulare Mechanismen in malignen Lymphomen“) ist eine multizentrische Studie, die innerhalb Deutschlands in Zusammenarbeit mit der Deutschen Krebshilfe initiiert wurde. Ziel dieses Projekts, in das Kliniker, Pathologen sowie Human- und Molekulargenetiker, aber auch Statistiker und Bioinformatiker integriert sind, ist die Identifikation und Charakterisierung von molekularen Parametern, die Einfluss auf die Therapie und die Prognose von malignen Lymphomen haben. Damit soll die Definition neuer Therapiestrategien gewährleistet werden, um diese zielgenauer und individueller gestalten zu können, um einen möglichst großen Nutzen bei geringen Nebenwirkungen zu erzielen. Innerhalb des MMML-Verbundes, der 2003 initiiert wurde, konnte eine große Anzahl von Frischmaterialproben maligner Lymphome (n=925) mit annotierten klinischen Daten gesammelt werden. Internationales Alleinstellungsmerkmal des Verbundes war und ist die herausragende histopathologische Klassifikation der untersuchten Lymphome durch ein Pathologie-Referenzpanel. Von allen gesammelten Lymphomen wurde eine umfassende genetische Charakterisierung durchgeführt (siehe Abbildung 1.4).

Einleitung

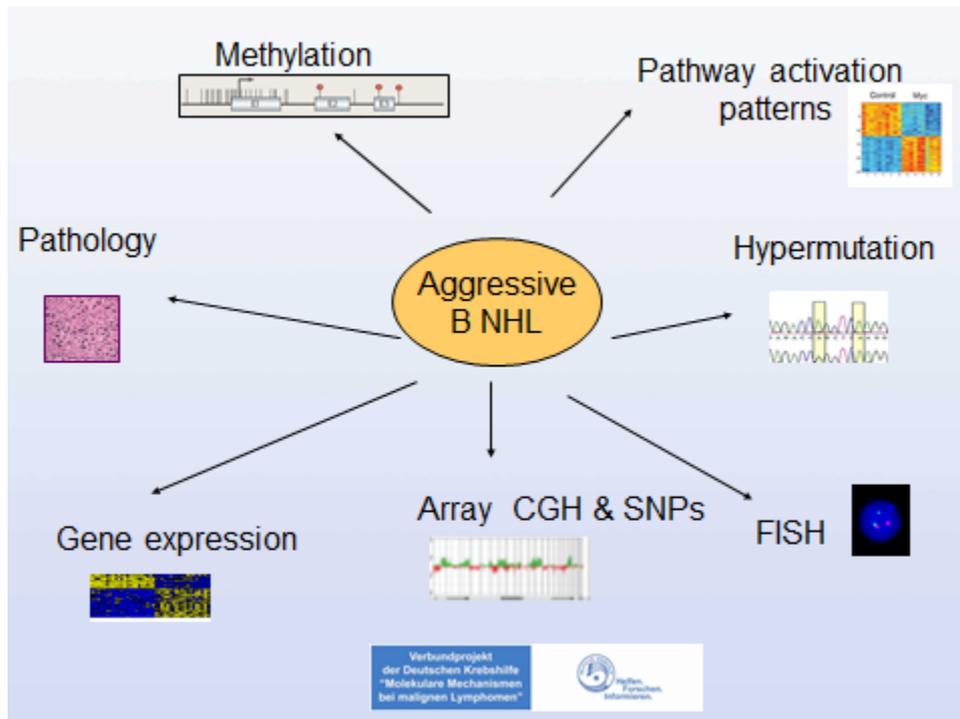


Abbildung 1.4: Übersicht über das Methodenspektrum im MMML-Verbundprojekt

Das MMML-Verbundprojekt umfasst eine Vielzahl von Teilprojekten, welche einerseits die umfassende genetische Charakterisierung aller Lymphomproben mittels u.a. Genexpression, Immunhistochemie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) beinhaltet. Andererseits wurden innerhalb der Teilprojekte verschiedene Fragestellungen bearbeitet, die zum verbesserten Verständnis der Tumorphathogenese beitragen sollen.

Das Teilprojekt M4 befasste sich mit der Identifikation und Charakterisierung von Progressionsfaktoren in folliculären Non-Hodgkin-Lymphomen unterschiedlicher histomorphologischer Grade.

Die aktuelle Diagnostik folliculärer Lymphome basiert auf der morphologischen Begutachtung der Tumoren unter Zuhilfenahme einiger weniger immunhistochemischer Marker. Die Einteilung der FL in die unterschiedlichen Grade, basierend auf der Anzahl von Zentrozyten und Zentroblasten ist selbst unter erfahrenen Hämatopathologen schwierig.^{21,22} Desweiteren ist die

Einleitung

zugrundeliegende Tumorbiologie der FL-Subtypen nicht geklärt. Es wird momentan davon ausgegangen, dass sich FL3A aus den FL1/2 entwickeln, da diese auch häufig zusammen auftreten, während FL3B eher dem DLBCL zugeordnet werden, da FL3B, wenn überhaupt, nur selten in Kombination mit FL1/2 oder 3A, häufig aber mit DLBCL gemeinsam auftreten. Aufgrund der geringen Fallzahlen und oftmals schwer charakterisierbarer Fälle gibt es bislang nur wenig Information zu dieser Hypothese. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb v.a. die FL3A und FL3B umfassend (mittels FISH, Immunhistochemie und Genexpression) untersucht werden und hinsichtlich deren Zuordnung innerhalb der FL1/2 und DLBCL (bzw. FL3B/DLBCL) geklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Das MMML Projekt umfasste 863 erfasste Lymphome, davon waren 191 FL. Die Auswahl der Kohorte für die vorliegenden Daten berücksichtigte zunächst die Gruppe der reinen FL3B (n=6). Die weiteren Proben wurden so gewählt, dass entsprechend relevante Diagnosen vorlagen. Es standen 16 FL3A, 9 FL3B+DLBCL, 22 FL1/2 und 25 t(14;18)-positive de novo DLBCL zur Verfügung. Alle in das MMML einfließenden Fälle entstammten den deutschen Referenzzentren für Lymphknotenpathologie in Berlin, Kiel, Lübeck, Frankfurt, Würzburg und Ulm.

2.1.2 Kits, FISH-Sonden und Antikörper

Kit	Hersteller
AllPrep DNA/RNA Mini Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Eukariot Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, California, USA
GeneChip IVT Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, California, USA
GeneChip Sample Cleanup Module	Affymetrix, Santa Clara, California, USA

Tabelle 2.1: Auflistung der im Rahmen der MMML Studie verwendeten Kits.

Material und Methoden

Antikörper	Hersteller
Histostain-Plus Staining Kit Biotin/Streptavidin/Meerrettichperoxidase	Zymed, San Francisco, USA
bcl2, Clone 124, Verdünnung 1:400	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
bcl6, Klon PG-B6p, Verdünnung 1:20	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
CD5, Clone 4C7, Verdünnung 1:40	Novocastra Reagents, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
CD10, Klon NCL-CD10-270, Verdünnung 1:100	Novocastra Reagents, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
CD20, Clone L26, Verdünnung 1:1000	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
MUM1, Klon MUM1p, Verdünnung 1:8000	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
ki67, Klon MM1, Verdünnung 1:30	Novocastra Reagents, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar

Tabelle 2.2: Auflistung der im Rahmen der MMML Studie verwendeten Antikörper.

Sonden	Hersteller
Vysis LSI® BCL2 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Vysis LSI® BCL6 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Vysis LSI® MYC Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Vysis LSI® IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Tabelle 2.3: Auflistung der im Rahmen der MMML Studie verwendeten Gensonden zur FISH-Diagnostik.

2.2 Methoden

Alle innerhalb des MMML durchgeführten Analysetechniken wurden zentralisiert durchgeführt, abgesehen von den immunhistochemischen Untersuchungen, die im Rahmen der Routinediagnostik im jeweiligen Referenzzentrum durchgeführt wurden. Die RNA-Extraktion sowie die anschließenden Genexpressionsanalysen erfolgten in Berlin (Institut für Pathologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin), während die FISH-Untersuchungen in Kiel (Institut für Humangenetik, Christian-Albrechts-Universität Kiel) durchgeführt wurden.

2.2.1 Genexpressionsanalysen

Die Herangehensweisen an die Frage, welche Gene in einer Zelle exprimiert werden ist über verschiedene Wege möglich. Prinzipiell geschieht dies aber über die RNA oder über die Proteine in der Zelle. In dieser Studie wurde die RNA der Lymphomzellen untersucht.

Die Genexpression der MMML Studie wurde mit dem GeneChip Human Genome U133A Array von Affimetrix (Affimetrix, Santa Clara, California, USA) durchgeführt. Die RNA wurde aus gefrorenem Gewebe mithilfe von AllPrep DNA/RNA Mini Extracion Kit von Qiagen (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Aufbereitung des Materials wurden mit Eukariot Poly-A RNA Control Kit, dem GeneChip IVT Labeling Kit und dem GeneChip Sample Cleanup Module (jeweils Affymetrix, Santa Clara, California, USA) durchgeführt.

2.2.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Interphasen Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) wurde mit in Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe durchgeführt. Dazu wurden Sonden, die spezifisch für den IGH- (IG heavy chain=Schwerketten), IGK- (IG Kappa) und IGL- (IG Lambda, letztere beide Teile der Leichtketten -light chain-) Locus, sowie für das *MYC*-, *BCL2*- und *BCL6*-Gen verwendet. Alle Sonden waren sogenannte *Break-Apart*-Sonden, die den jeweiligen Bruchpunkt des Gens/Genlokus flankieren.

Die Ergebnisse der Biopsie-Proben wurden als „IG-MYC“ beschrieben, wenn *MYC* mit IGH, IGK oder IGL fusionierte. Wenn ein Bruchpunkt ohne Beteiligung der IG-Loci detektiert wurde, wurden die Proben als „non-IG-MYC“ gekennzeichnet.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Immunhistochemische Färbungen an Paraffinmaterial

Für die untersuchten Lymphome wurden zur weiteren Charakterisierung immunhistochemische Färbungen durchgeführt, um die Expression der Antigene zu ermitteln. Untersucht wurden die Marker BCL2, BCL6, CD5, CD10, CD20, MUM1 und Ki67 (siehe Tabelle 2.2).

Für CD10, IRF4/MUM1, BCL2 und BCL6 wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen in Quartilen gemessen (0 = negativ, 1 = 1-25%

positive Zellen, 2 = 26-50% positive Zellen, 3 = 51-75% positive Zellen, 4 = 76-100% positive Zellen). CD10, IRF4/MUM1 und BCL6 wurde bei $\geq 26\%$, BCL2 bei $\geq 51\%$ positiv gefärbten Zellen als positiv gewertet. Die Färbung von Ki67 wurde als stark positiv gewertet, wenn $\geq 70\%$ der Zellen positiv gefärbt wurden.

Die untersuchten Paraffinschnitte wurden durch Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Für die Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate 10 Minuten mit 30% Peroxid (5m μ l in 70 ml Methanol) inkubiert und dann die hitzevermittelte Epitop-Demaskierung mit 10 mM Citratpuffer mit einem pH von 7,0 oder mit Target Retrieval (DakoCytomation, Hamburg) im Schnellkochtopf durchgeführt. Die Schnitte wurden anschließend mit nach Herstellerangaben verdünnten Primärantikörpern (siehe Tabelle 2.2) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Detektion geschah mittels Immunperoxidase mit Histostain-Plus Kit (Zymed, USA) nach Herstellerangaben, mithilfe des Streptavidin-Avidin Detektionssystems unter Verwendung von 3,3'Diaminobenzidine als Chromogen.

2.4 Statistik

2.4.1 Clusteranalyse

Im Rahmen einer Clusteranalyse sollen bestehende inhärente Gruppen innerhalb eines Datensatzes identifiziert werden. Dieses Verfahren ist unsupervidiert d.h. die Klassenlabel (z.B. FL1, FL2, $t_{1418}(+)$ oder $t_{1418}(-)$) werden hierbei nicht berücksichtigt (da diese in den meisten Fällen a priori nicht bekannt sind).

In einem ersten Schritt werden die paarweisen Abstände zwischen allen Proben auf Basis der Expression vorausgewählter Features (= Expressionswerte) berechnet (z.B. 100 Features mit der größten Varianz über den gesamten Datensatz). Als gängiges Maß zur Berechnung des Abstandes wird die *Euklidische Distanz* verwendet. Je kleiner diese Distanz zwischen zwei Proben ist, desto ähnlicher ist deren Expressionsprofil zueinander. Liegen alle paarweisen

Distanzen vor, so werden die Proben in einem mehrstufigem Prozess mittels *hierarchischem Clustering* zuerst zu einzelnen Clustern vereint. Danach werden diese erneut iterativ zu größeren Clustern zusammengefasst bis am Ende ein einziges großes Cluster übrig bleibt. Das Resultat des Clusterings wird graphisch in Form eines *Dendrogramms* dargestellt. In einem Dendrogramm liegen Proben mit einem ähnlichen Expressionsprofil nahe beieinander. Die Hoffnung ist, dass das Expressionsprofil von Proben gleichen Typs (z.B. FL1 oder FL3A) eine geringe räumliche Entfernung aufweisen und somit miteinander clustern.

Ein Dendrogramm wird oftmals im Zusammenhang mit einer Heatmap verwendet. Die Expressionswerte (= Features) aller Proben werden zu einer $n \times m$ Matrix zusammengefasst, wobei n die Anzahl Proben (= Spalten) und m die Anzahl Features (= Zeilen) codiert. Jedem Expressionswert dieser Matrix wird nun ein entsprechender Farbwert zugewiesen, dessen Intensität vom Expressionswert abhängt (blau: niedrig exprimiert, gelb: hoch exprimiert). Da das Dendrogramm bereits eine Ordnung der Fälle vorgibt, werden die Fälle innerhalb der Heatmap gemäß der Reihenfolge im Dendrogramm angeordnet. Dadurch werden ähnliche Fälle auch innerhalb einer Heatmap entsprechend gruppiert.

2.4.2 Varianzanalyse

Als ANOVA (analysis of variance, Varianzanalyse) wird ein supervidiertes statistisches Verfahren bezeichnet, welches auf Gruppenunterschiede testet. Hierbei wird die Gesamtvarianz einer numerischen Variable (z.B. Genexpression) in ab- bzw unabhängige Komponenten zerlegt (= Varianzanalyse). Der Großteil dieser Varianz sollte durch unabhängige Faktoren erklärt werden (= *inter variance*, Varianz zwischen den Gruppen), der Rest wird als Zufallsprozess modelliert (*intra variance*, Varianz innerhalb der Gruppen). Im klassischen *Case/Control* setting (= 2 Gruppen) wird der t-Test als Testverfahren zur Quantifizierung der Mittelwertunterschiede zwischen den beiden Gruppen

angewandt. Dessen Nullhypothese H_0 (= kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen) ist definiert als

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

mit den Gruppenmittelwerten μ_1 und μ_2 . Die Alternativhypothese H_1 ist definiert als

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2.$$

In der einfachsten Form ist die ANOVA als Verallgemeinerung des t-Tests auf den gleichzeitigen Vergleich von Mittelwerten über mehrere Gruppen hinweg anwendbar.

Die Nullhypothese bei einer ANOVA ist definiert als

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n,$$

d.h. es gibt keine Mittelwertunterschiede zwischen den n Gruppen. Die Alternativhypothese ist definiert als

$$H_1: \exists i, j: \mu_i \neq \mu_j.$$

Das bedeutet, dass ein Unterschied zwischen mindestens zwei Mittelwerten beobachtbar ist. Die Prüfung auf Signifikanz erfolgt über den F-Test.

2.4.3 Hauptkomponenten-Analyse

Die Principal Component Analyse (PCA) ist ein statistisches Verfahren, welches bestimmte Eigenschaften eines Datensatzes (z.B. das Ausmaß der Variabilität von n Expressionswerten im n -dimensionalen Raum) aus hoch-dimensionalen Räumen auf die wichtigsten Komponenten (\rightarrow Hauptkomponenten, Principal Components) bei Erhalt der relevanten Information reduziert. Hierbei erfolgt eine Transformation der Hauptachsen in Richtung der größten Varianz, wobei die Hauptachsen orthogonal (=senkrecht) zueinanderstehen. Meist sind nur die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) von Interesse, da diese zum einen den Großteil der relevanten Information enthalten und zum anderen anschaulich in

einen 2-dimensionalen Scatterplot (\rightarrow X-Achse: PC1 und Y-Achse: PC2) aufgetragen werden können. Sind beispielsweise zwei Proben im 100-dimensionalen Raum zueinander ähnlich (= kleine euklidische Distanz basierend auf 100 Features) so sind sie das auch im 2-dimensionalen Raum (unter einziger Betrachtung von PC1 und PC2). Die Vereinfachung eines hoch-dimensionalen Datensatzes auf wenige relevante Hauptkomponenten erlaubt eine übersichtliche Darstellung der räumlichen Orientierung der Proben zueinander.

2.4.4 Klassifikationsanalyse

Die Klassifikationsanalyse ist ein maschinelles Lernverfahren welches Sample-spezifische Eigenschaften (zB Expressionswerte) zur Einordnung in zuvor definierten Klassen ermöglicht. In einem ersten Schritt wird der komplette Datensatz in ein Trainings-Set und ein Test-Set aufgeteilt. Auf dem Trainings-Set wird ein linearer Klassifikator zur Diskriminierung zweier Gruppen (z.B. t(14;18)-positive vs t(14;18)-negative oder FL1/2 vs FL3A) erlernt. Dieser Klassifikator wird auf das Test-Set angewandt und ordnet jedes darin enthaltene Sample einer der beiden Gruppe zu (= predicted label). Der Klassifikator besteht aus ausgewählten Features

(x_1, x_2, \dots, x_n)

und ihrem individuellen Gewichtungsfaktor

$(w_1, w_2, \dots, w_n),$

die während des Trainingsdurchgangs optimiert worden sind (= minimaler Klassifikationsfehler). Die (stark vereinfachte) Anwendung dieses Klassifikators auf ein ungelabeltes Sample erfolgt in zwei Schritten:

1. Berechnung einer gewichteten Summe $S = x_1 \times w_1 + x_2 \times w_2 + \dots + x_n \times w_n$
2. Anhand der gewichteten Summe S wird eine Wahrscheinlichkeit errechnet, welcher Klasse (z.B. t1418(+)) oder t1418(-)) das Sample zugeordnet wird.

Material und Methoden

Sobald diese Wahrscheinlichkeit größer als 50% für eine Klasse beträgt, wird das Sample dieser zugeordnet.

Da es oftmals vorkommt, dass die Fallzahlen pro Gruppe innerhalb des Trainings-Sets bisweilen stark unterschiedlich sein können, wird die Klassifikationsanalyse mehrmals und mit jeweils gleich großen Trainingsgruppen durchgeführt. Dadurch wird ein Bias des Klassifikators in Richtung der überrepräsentierten Gruppe ausgeglichen. In jeder Wiederholung wird somit aus der größeren Gruppe des Trainings-Sets eine zufällige Anzahl an Proben gezogen damit beide Gruppen gleich stark vertreten sind. Da nun die einzelnen Proben mehrmals *gelabelt* werden, lässt sich daraus nun ein prozentualer Anteil der Klassenzugehörigkeit ableiten. Wird ein Sample nun in 80% aller Fälle der Gruppe 1 zugeteilt, so entspricht dessen Expressionsprofil mehrheitlich den korrekten Vertretern (= per Definition des Trainings-Sets) aus dieser Gruppe. Stellt sich andererseits heraus, dass ein Fall der Gruppe 1 in lediglich beispielsweise 20% aller Durchgänge auch tatsächlich der Gruppe 1 zugeordnet wird, so ist davon auszugehen, dass dessen Expressionsprofil eher Gruppe 2 entspricht.

3 Ergebnisse

3.1 Kohorte

Untersucht wurden Tumor-Gewebeproben von insgesamt 78 Patienten. Davon waren 53 folliculäre Lymphome und 25 t(14;18)-positive *de novo* DLBCL. Von den 53 FL waren 22 FL1/2, 16 FL3A, 9 FL3B mit einem DLBCL-Anteil und 6 rein folliculäre FL3B (siehe Tabelle 3.1). Die Untersuchung der Kohorte erfolgte durch Genexpressionsanalysen, zudem wurden innerhalb des MMML Untersuchungen zum Translokationsstatus der *BCL2*-, *BCL6*- und *MYC*-Gene durchgeführt. Darüber hinaus lagen Daten zur Proteinexpression von CD10, MUM1, Ki67, BCL2 und BCL6 vor.

Kategorie	Anzahl der Fälle
FL Grad 3A	16
FL Grad 3B	6
FL Grad 3B + DLBCL	9
FL1/2	22
<i>de novo</i> DLBCL t(14;18)+	25
Gesamt	78

Tabelle 3.1: Auflistung der Anzahl der Proben in der Kohorte mit Angabe der Diagnose.

BCL2-Translokationen wurden am häufigsten in FL1/2 (18/22 82%) gefunden, mit einer abnehmenden Tendenz bei FL3A und FL3B (12/16, 75% bzw. 3/6, 50%),

Ergebnisse

FL3B/DLBCL zeigten die geringste Frequenz (1/9, 11%) (s. Tab. 3.2/ Abb. 3.1). Eine *BCL6*-Translokation zeigte sich am häufigsten in FL3B/DLBCL (4/9, 44%), in FL3A (5/16, 31%) und in *de novo* t(14;18)-positiven DLBCL (6/25, 24%) und weniger häufig in FL3B und FL1/2 (1/6, 17% bzw. 2/22, 9%) (s. Tab. 3.2/ Abb. 3.1). Das Auftreten eines *MYC*-Rearrangements zeigte sich vorwiegend in t(14;18)-positiven *de novo* DLBCL und FL3B/DLBCL (5/19, 26% bzw. 2/9, 22%), seltener in FL3B (1/6, 17%) und selten in FL3A und FL1/2 (1/16, 6% bzw. 1/22, 5%) (s. Tab. 3.2/ Abb. 3.1).

Die immunhistochemische Expression von CD10 divergierte nur gering zwischen FL1/2, FL3A und FL3B/DLBCL (13/21, 62%; 8/12, 67%; 4/7, 57%), die 2 getesteten FL3B waren positiv und die t(14;18)-positiven *de novo* DLBCL zeigten nahezu durchweg eine starke Expression von CD10 (20/22, 90%) (s. Tab. 3.2/ Abb. 3.2).

Die Expression von IRF4/MUM1 war in FL1/2 nicht nachweisbar (0/16, 0%), FL3B/DLBCL, FL3A und FL3B hingegen zeigten eine erhöhte Expression (2/6, 33%; 4/8, 50%; 2/3, 67%). In t(14;18)-positiven *de novo* DLBCL war eine IRF4/MUM1-Expression in nur einer geringen Anzahl der Fälle nachweisbar (2/18, 11%) (s. Tab. 3.2/ Abb. 3.2).

Der prozentuale Anteil von FL mit erhöhter Ki67-Expression zeigte eine steigende Tendenz von FL1/2 (3/20, 15%), über FL3A und FL3B (4/15, 27% bzw. 3/5, 60%) zu FL3B/DLBCL (7/8, 88%). t(14;18)-positive *de novo* DLBCL wiesen in 17 von 23 gemessenen Proben eine eher hohe Proliferation auf (74%) (s. Tab 3.2/ Abb. 3.2).

Eine Expression des BCL2-Proteins zeigte sich, ausgenommen in den FL3B (2/4, 50%) und t(14;18)-positiven *de novo* DLBCL (21/22, 95%), annähernd gleich in allen untersuchten FL-Subtypen (71-80%). Die BCL6-Expression war in allen untersuchten Subtypen durchweg hoch (71-100%, siehe Tabelle 3.2, Abb. 3.2).

Ergebnisse

	FL1/2	FL3A	FL3B	FL3B/DLBCL	de novo DLBCL t(14;18)+
Anzahl der Fälle	22	16	6	9	25
BCL2-Break (%)	18/22 (82)	12/16 (75)	3/6 (50)	1/9 (11)	25/25 (100)
BCL6-Break (%)	2/22 (9)	5/16 (31)	1/6 (17)	4/9 (44)	6/25 (24)
MYC-Break (%)	1/22 (5)	1/16 (6)	1/6 (17)	2/9 (22)	5/19 (26)
CD10 (%)	13/21 (62)	8/12 (67)	2/2 (100)	4/7 (57)	20/22 (90)
IRF4/MUM1 (%)	0/16 (0)	4/8 (50)	2/3 (67)	2/6 (33)	2/18 (11)
Ki67 (%)	3/20 (15)	4/15 (27)	3/5 (60)	7/8 (88)	17/23 (74)
BCL2 (%)	15/20 (75)	12/15 (80)	2/4 (50)	5/7 (71)	21/22 (95)
BCL6 (%)	15/17 (88)	12/13 (92)	3/3 (100)	5/7 (71)	18/18 (100)

Tabelle 3.2: Auflistung von Anzahl und Ergebnisse der FISH- sowie der immunhistochemischen Tests.

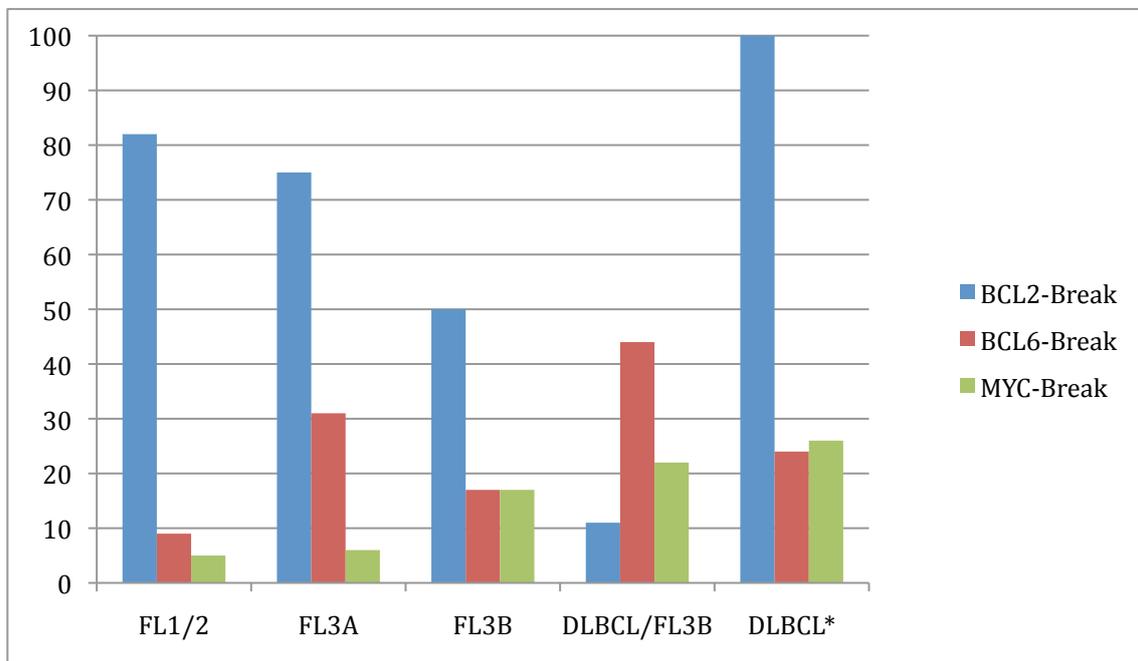


Abbildung 3.1: Prozentuale Darstellung der Positivität in der FISH-Untersuchung.

* *de novo* DLBCL t(14;18)-positiv

Ergebnisse

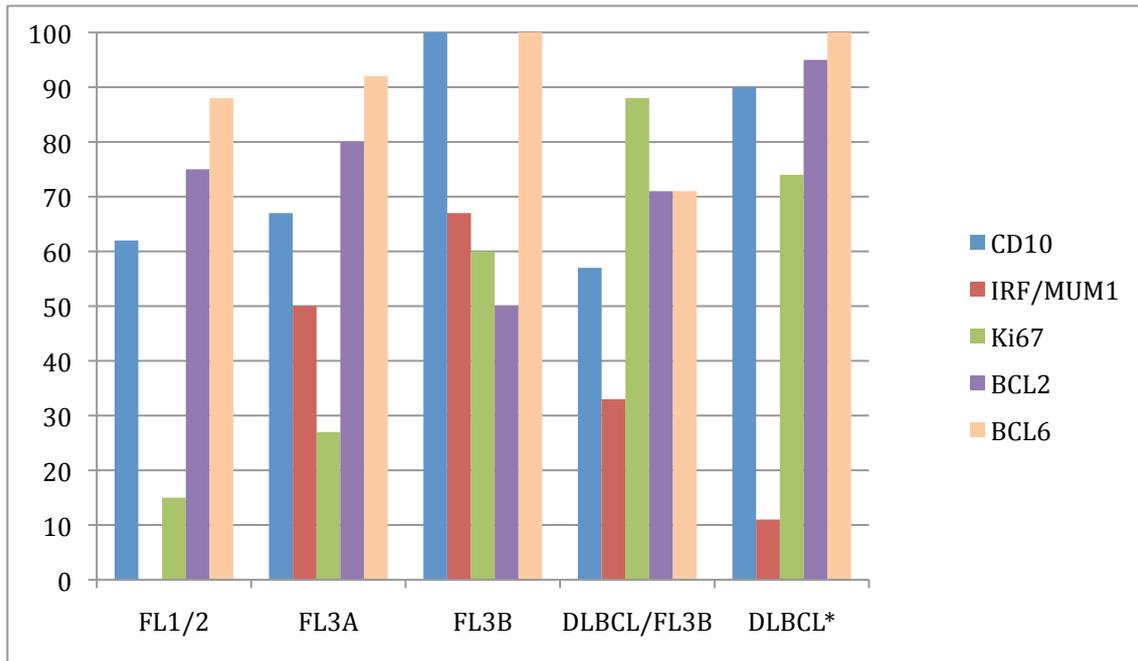


Abbildung 3.2: Prozentuale Darstellung der Positivität in der immunhistologischen Untersuchung.

* *de novo* DLBCL t(14;18)-positiv

3.2 Genexpressionsanalysen

3.2.1 Vergleich anhand der Graduierung der FL

Die primäre Analyse der Genexpression erfolgte im Vergleich zu der initialen histomorphologischen Klassifikation des FL. Die untersuchten Proben wurden demnach in folgende Gruppen eingeteilt, deren Genexpression dann untereinander verglichen werden sollte:

- FL Grad 1/2 (n=22)
- FL Grad 3A (n=16)
- FL Grad 3B (n=6)
- DLBCL mit einem FL3B-Anteil (n=9)
- t(14;18)-positive *de novo* DLBCL (n=25)

Die Tabelle 3.3 zeigt eine Auflistung der Anzahl differentiell exprimierter Gene zwischen den untersuchten Gruppen.

Vergleich	Differentiell exprimierte Gene
FL1 vs. FL2	0
FL3A vs. FL1/2	643
FL3A vs. FL3B	0
FL3B vs. FL1/2	3
FL3B vs. FL3B/DLBCL	0
FL3B vs. DLBCL	250
FL1/2 vs. DLBCL	4171
t(14;18)-positive vs. t(14;18)-negative	582

Tabelle 3.3: Auflistung der Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene zwischen den Gruppen.

Ergebnisse

Ein Vergleich zwischen den Gruppen zeigte keine Unterschiede der Genexpression in den Gruppen FL1 und FL2, sowie der Gruppen FL3A und FL3B (Siehe Tabelle 3.3).

Während also sowohl zwischen den FL1 und 2 wie auch zwischen FL3A und FL3B keine differentiell exprimierte Gene zu detektieren waren, zeigte der Vergleich der Gruppen FL1/FL2 mit FL3A in 643 Genen einen signifikant unterschiedlichen Expressionsstatus, FL3B unterschieden sich zu FL1/2 jedoch nur in 3 Genen (siehe Tabelle 3.3).

FL3B und DLBCL unterschieden sich in der Expression von 250 Genen, während zwischen FL3B und FL3B/DLBCL keine differentielle Expression gemessen werden konnte. DLBCL unterschieden sich mit 4171 Genen deutlich von FL1/2 (siehe Tabelle 3.3).

Ein Vergleich der t(14;18)-positiven und -negativen Tumoren zeigte einen Unterschied der Expression in 582 Genen (siehe Tabelle 3.3).

Zur Darstellung der differentiellen Genexpression in FL1/2 versus FL3A wurde eine Heatmap erstellt, welche die Proben auf der x-Achse und die 643 Gene mit den größten Unterschieden in der Expression auf der y-Achse abbildet. Die Darstellung der Heatmap umfasst eine 3-fache reduzierte Expression eines Gens (blau), bis hin zur 3-fachen Erhöhung (gelb), die Zwischenstufen werden in einem Verlauf dieser beiden Farben über schwarz (keine Differenz in der Expression) dargestellt. Die Anordnung der Heatmap erfolgte anhand der Höhe der Expression der Gene, somit entstand eine quantitative Ordnung von links (niedrigere Expression) nach rechts (höhere Expression). Die Klassifikation der Proben wird in einem Farbcode an der oberen Kante des Graphen wiedergegeben. FL1 ist hier lila dargestellt, FL2 orange und FL3A grün.

Die Graphik zeigt zwischen FL1/2 und FL3A kein homogenes, sondern ein heterogenes Bild. Es wird ein Kontinuum von 3-fach niedrigerer Expression bis hin zu 3-fach höherer Expression für dasselbe Gen innerhalb der diagnostischen Gruppe des FL dargestellt (siehe Abbildung 3.3).

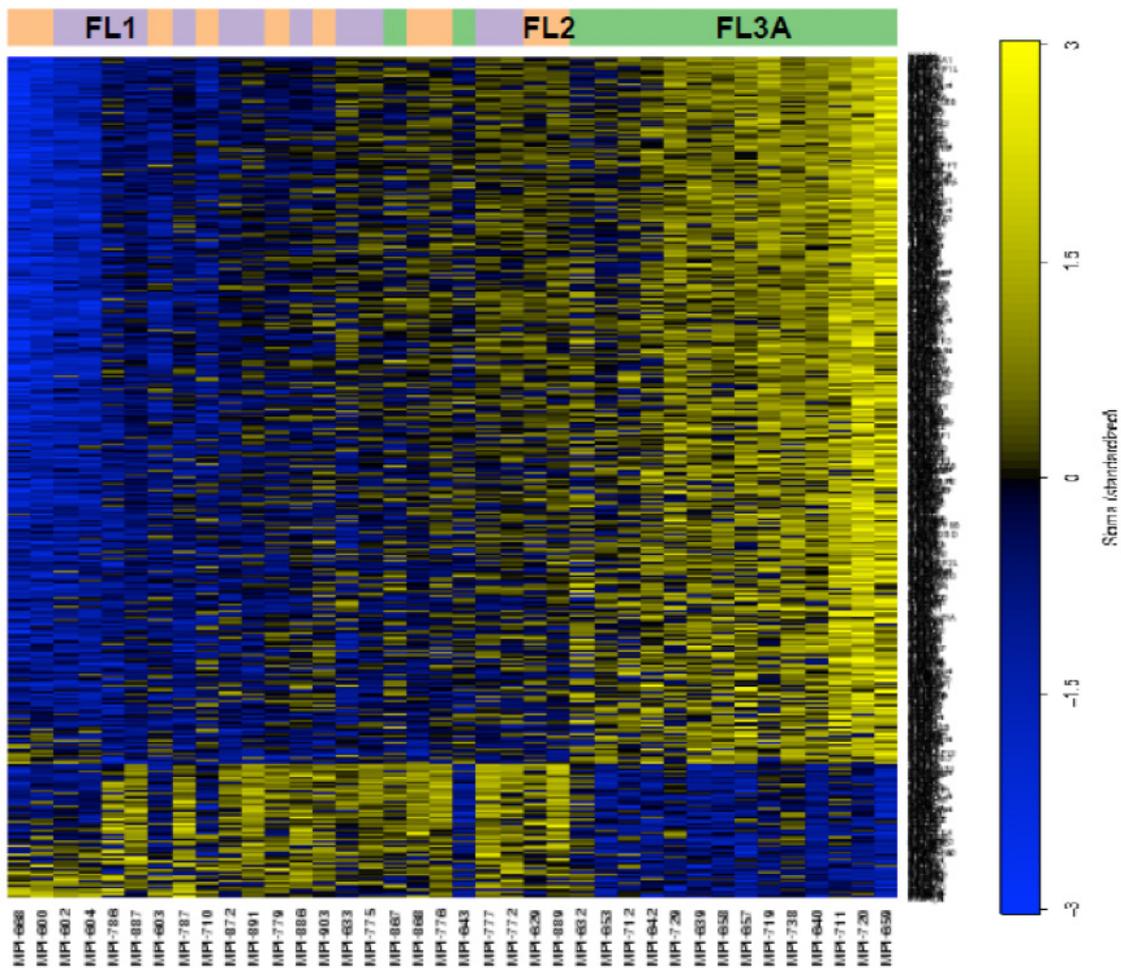


Abbildung 3.3: Heatmap der Genexpression aller Proben von FL1, FL2 und FL3A. Auf der x-Achse abgebildet sind die verschiedenen Proben, auf der y-Achse die 643 Gene mit der größten Expressionsdifferenz dieser Proben. Die Expression der jeweiligen Gene wird jeweils mit einem Farbwert zwischen gelb (höhere Expression, +3) und blau (niedrigere Expression, -3) angegeben, schwarz steht für keine differentielle Expression der Gene in den Gruppen. FL1 werden oben in der Leiste lila, FL2 orange und FL3A grün dargestellt.

Daraufhin wurde eine supervidierte Clusteranalyse dieser 643 differentiell exprimierten Gene innerhalb der FL1, FL2, und FL3A durchgeführt und wieder in einer Heatmap dargestellt. Die daraus entstehende Graphik zeigt, dass FL1 und FL2 zusammen ein recht homogenes Bild aufweisen, während sich die FL3A

Ergebnisse

anhand der 643 differentiell exprimierten Gene deutlich von FL1/2 abgrenzen (siehe Abbildung 3.4).

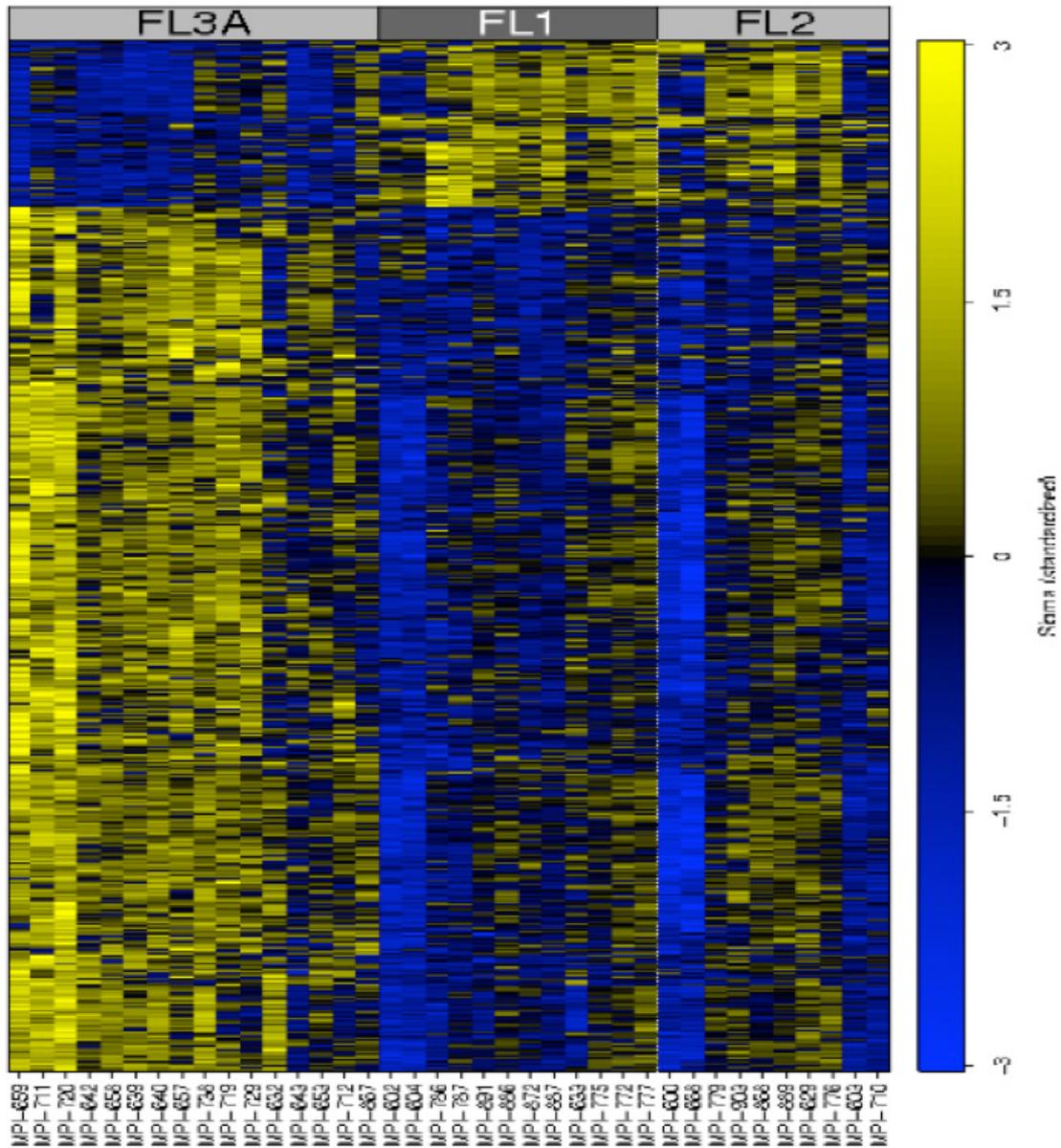


Abbildung 3.4: Heatmap mit Clusteranalyse der Genexpression in den Gruppen FL3A, FL1 und FL2. Auf der x-Achse abgebildet sind die Proben der Gruppen FL3A, FL1 und FL2 in den jeweiligen Gruppen, auf der y-Achse die 643 Gene mit der größten Genexpressions-Differenz dieser Proben.

Ergebnisse

Die Frage war nun, wo sich die Gruppe der FL3B in dieses Bild einfügen würden. Um dies herauszufinden wurden die FL3B (n=6) zu den Analysemodellen hinzugefügt.

Wie bereits in Tabelle 3.3 dargestellt, zeigt der Vergleich der FL3A mit den FL3B in unserer Analyse keinen Unterschied in der Genexpression. Unsere Daten weisen demnach zwar auf eine Abgrenzung von FL3A zu FL1/2 hin, FL3B sind hingegen von den FL3A nicht zu trennen.

Diese Ergebnisse unterscheiden sich signifikant von einer GE-Studie, die 2008 von Piccaluga et al.³¹ durchgeführt wurde. Um die hier vorliegenden Ergebnisse zu validieren, sollten die gleichen statistischen Analysearten verwendet werden wie von Piccaluga und Kollegen, die mittels ANOVA eine klare Abgrenzung der FL3B von den FL3A zeigen konnten.

Mittels der ANOVA konnten in unseren Genlisten 13 Probesets (=12 Gene) identifiziert werden, deren Genexpression eine Trennung der FL3A und FL3B von FL1/2 ermöglicht (siehe Tabelle 3.4). Die ANOVA führte bei den am höchsten differentiell exprimierten Probesets das Gen TROVE2 zweimal auf, da manche Gene auf dem Affymetrix-Genchip mehrfach erfasst werden. Daher wurden mittels ANOVA also die folgenden 12 differentiell exprimierte Gene identifiziert:

Ergebnisse

Gen	Beschreibung	Funktion	Genlokus
RPP40	ribonuclease P/MRP subunit p40	keine Information	6p25.1
TMEM5	transmembrane protein 5	Metabolismus (Glycosyltransferase)	12q14.2
CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	Zellproliferation	9q22.2
MRE11A	MRE11 homolog, double strand break repair nuclease	DNA-Reparatur	11q21
TXN	Thioredoxin	Metabolismus (Redoxreaktion)	9q31.3
COPB1	coatamer protein complex subunit beta 1	intrazellulärer Proteintransport	11p15.2
KIF5B	kinesin family member 5B	keine Information	10p11.22
GTPBP8	GTP binding protein 8 (putative)	keine Information	3q13.2
TROVE2	TROVE domain family member 2	keine Information	1q31.2
TNPO1	transportin 1	Intrazellulärer Proteintransport	5q13.2
C1orf27	chromosome 1 open reading frame 27	keine Information	1q31.1
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha	DNA-Transkription und -Replikation	17q21.2

Tabelle 3.4: Liste der 12 in der ANOVA ermittelten Gene, die zwischen den drei Gruppen FL1/2, FL3A und FL3B am höchsten differentiell exprimiert wurden.

Ergebnisse

Werden diese 12 Gene (13 Probesets) sowie die FL1/2, FL3A und FL3B in einer Heatmap dargestellt, wird wiederum eine deutliche differentielle Genexpression innerhalb der FL1/2 und FL3A ersichtlich, während die überwiegende Mehrheit der FL3B (5/6) anhand ihres GE-Profiles der Gruppe der FL3A zugeordnet werden (siehe Abbildung 3.5). Demnach können mittels der 12 ANOVA-Gene zwar FL1/2 von FL3A und FL3B unterschieden werden; FL3B grenzen sich von den FL3A hingegen nicht ab.

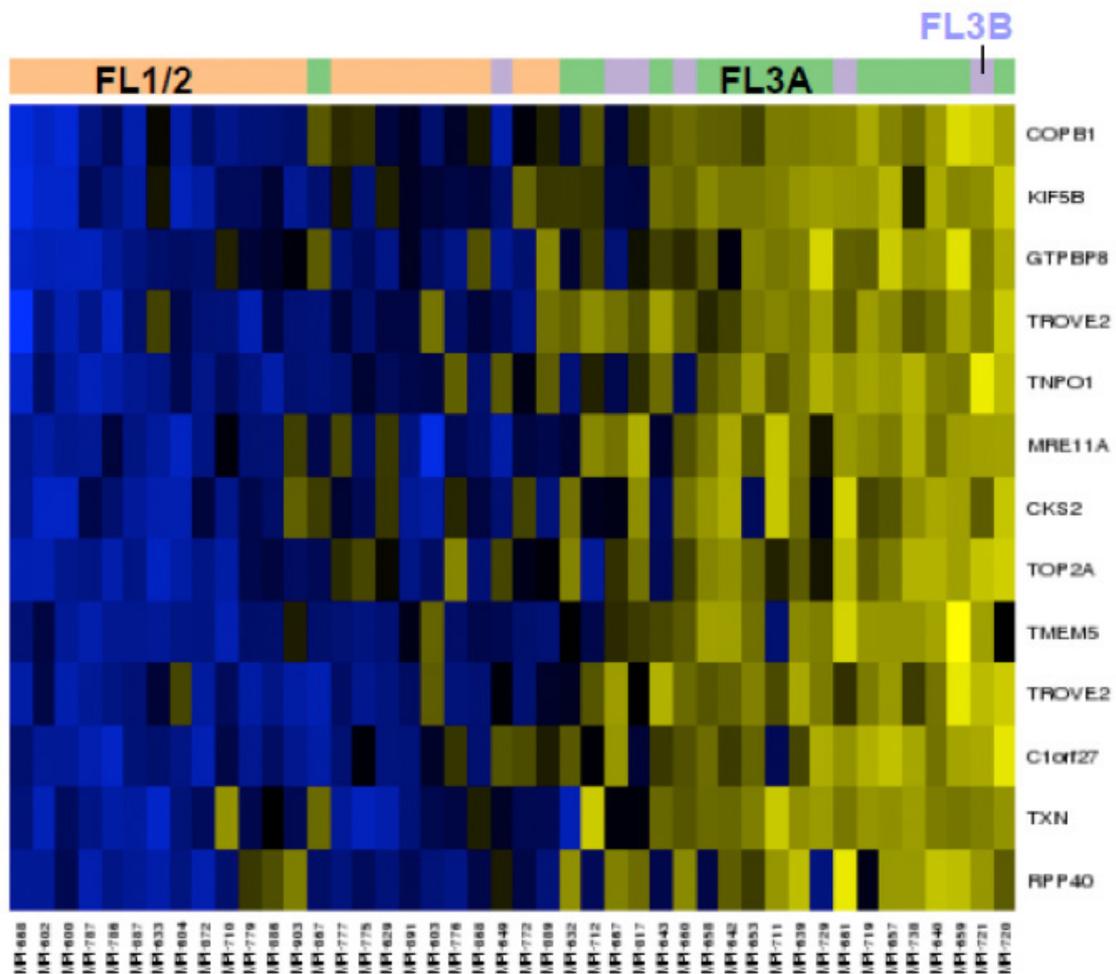


Abbildung 3.5: Heatmap der Genexpression unter Anwendung der ANOVA. Auf der x-Achse abgebildet sind die verschiedenen FL-Subgruppen, auf der y-Achse die 12 differentiell exprimierten Gene. Die Zugehörigkeit der Proben zu den Gruppen FL1/2, FL3A und FL3B werden über dem Diagramm dargestellt, orange ist hierbei FL1/2, grün ist FL3A und lila FL3B.

Ergebnisse

Der gleiche Ansatz wurde auch für eine supervidierte Clusteranalyse innerhalb der drei FL-Klassen durchgeführt, in der FL3A, FL3B und FL1+FL2 (von links nach rechts) angeordnet wurden, um die GE-Unterschiede dieser Gruppen besser beurteilen zu können (siehe Abbildung 3.6). Grundlage waren ebenfalls die in der ANOVA ermittelten 12 Gene. Es zeigte sich eine recht homogene Überexpression der 12 Gene für die Gruppe der FL3A und FL3B, während sich die FL1/2 anhand ihres GE-Profiles deutlich von diesen abgrenzten und eine signifikant verminderte Expression dieser Gene aufwiesen. Die FL3B scheinen anhand ihrer GE den FL3A deutlich ähnlicher sind als den FL1/2.

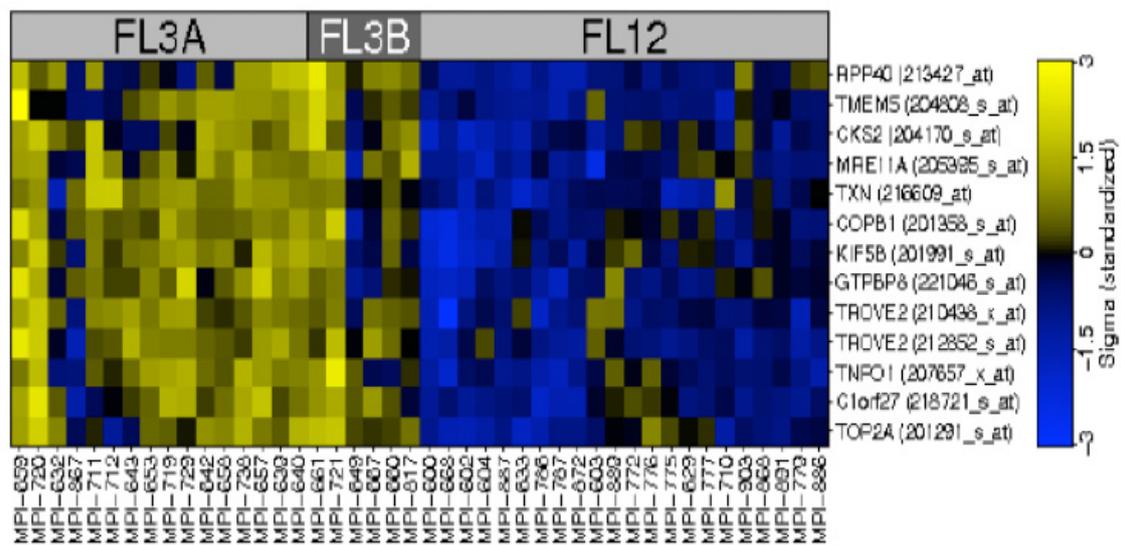


Abbildung 3.6: Clusteranalyse innerhalb von Gruppen in einer Heatmap. Auf der x-Achse werden die FL-Subgruppen dargestellt, auf der y-Achse die in der ANOVA ermittelten 12 unterschiedlichen Gene dieser drei Gruppen. Die Expression wird mithilfe eines Farbverlaufs dargestellt, hier ist gelb überexprimiert und blau unterexprimiert, keine Differenz wird als schwarz wiedergegeben.

Diese Befunde sollten hinsichtlich der Einordnung der FL3B im Kontext der FL noch deutlicher dargestellt werden und so wurde zur besseren Beurteilbarkeit der Gruppen FL3A, FL3B und FL1/2 eine PCA auf der Grundlage der Ergebnisse der 12 ANOVA-Gene durchgeführt. Hierbei wurden die 13 Probeset-Werte für die

Ergebnisse

Genexpression jeder Probe verrechnet und reduziert, so dass sie durch die zwei Hauptkomponenten PC1 und PC2 in einem zweidimensionalen System dargestellt werden konnten (siehe Abbildung 3.7). Durch die PCA wird ersichtlich, dass die FL1/2 (blau) auf der linken Seite erscheinen, während sich die FL3B (grün) eher in der Gruppe der FL3A (rot, rechts) eingliedern, ohne allerdings eine klare Gruppenabgrenzung zu diesen zu zeigen. Es bestätigt sich also das Ergebnis aus der Clusteranalyse, dass FL3B eher den FL3A als den FL1/2 zuzuordnen sind (siehe Abbildung 3.7).

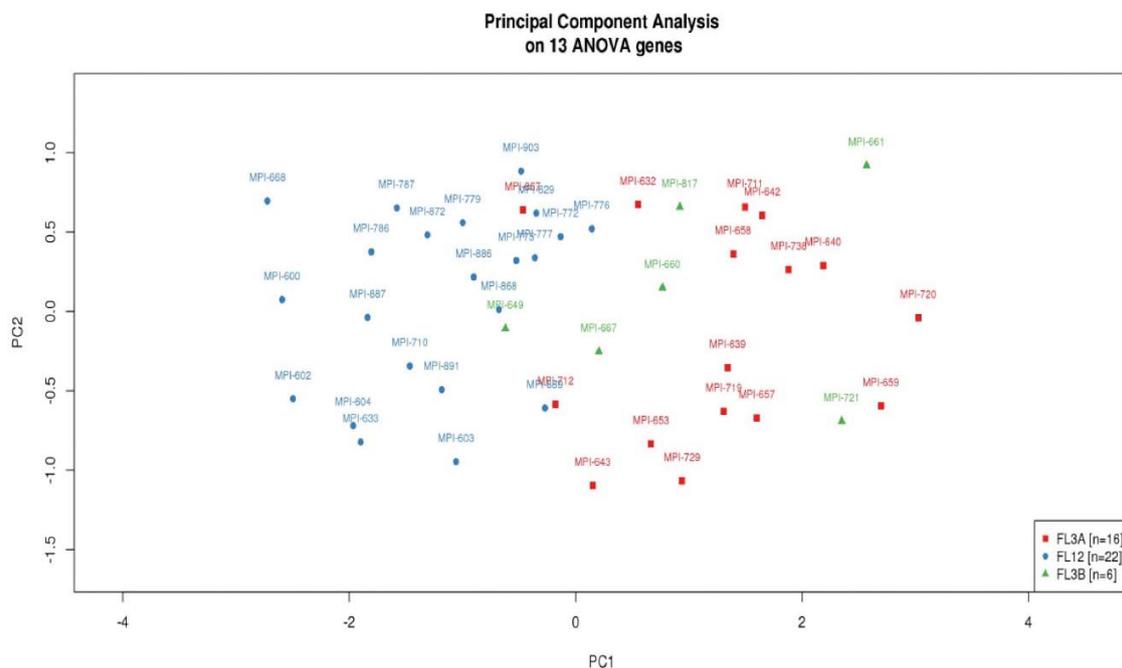


Abbildung 3.7: Principal Component Analyse von den 13 durch ANOVA ermittelten unterschiedlichen Probesets der Gruppen FL1/2 (FL12), FL3A und FL3B. Auf der x-Achse ist die erste Hauptkomponente (PC1) wiedergegeben, auf der y-Achse die zweite (PC2). Die Proben der Gruppe FL1/2 sind blau, FL3A sind rot und FL3B grün dargestellt.

Das Dendrogramm in Abbildung 3.6, basierend auf den 13 ANOVA Probesets (=12 Gene), teilt die Proben hierarchisch in eine Reihenfolge anhand ihrer Genexpression. Unter Verwendung dieser 13 Probesets werden die Proben

Ergebnisse

sichtbar in zwei Gruppen geteilt: während auf der linken Seite alle FL1 und FL2 zusammengefasst sind, sind auf der rechten Seite alle FL3A und FL3B dargestellt (siehe Abbildung 3.8, rot gepunktet angedeutete Kästen). Einzige Ausnahmen bilden ein FL3A (MPI-867) und ein FL3B (MPI-649), die in die Gruppe der FL1 und FL2 eingeordnet wurden.

Ergebnisse

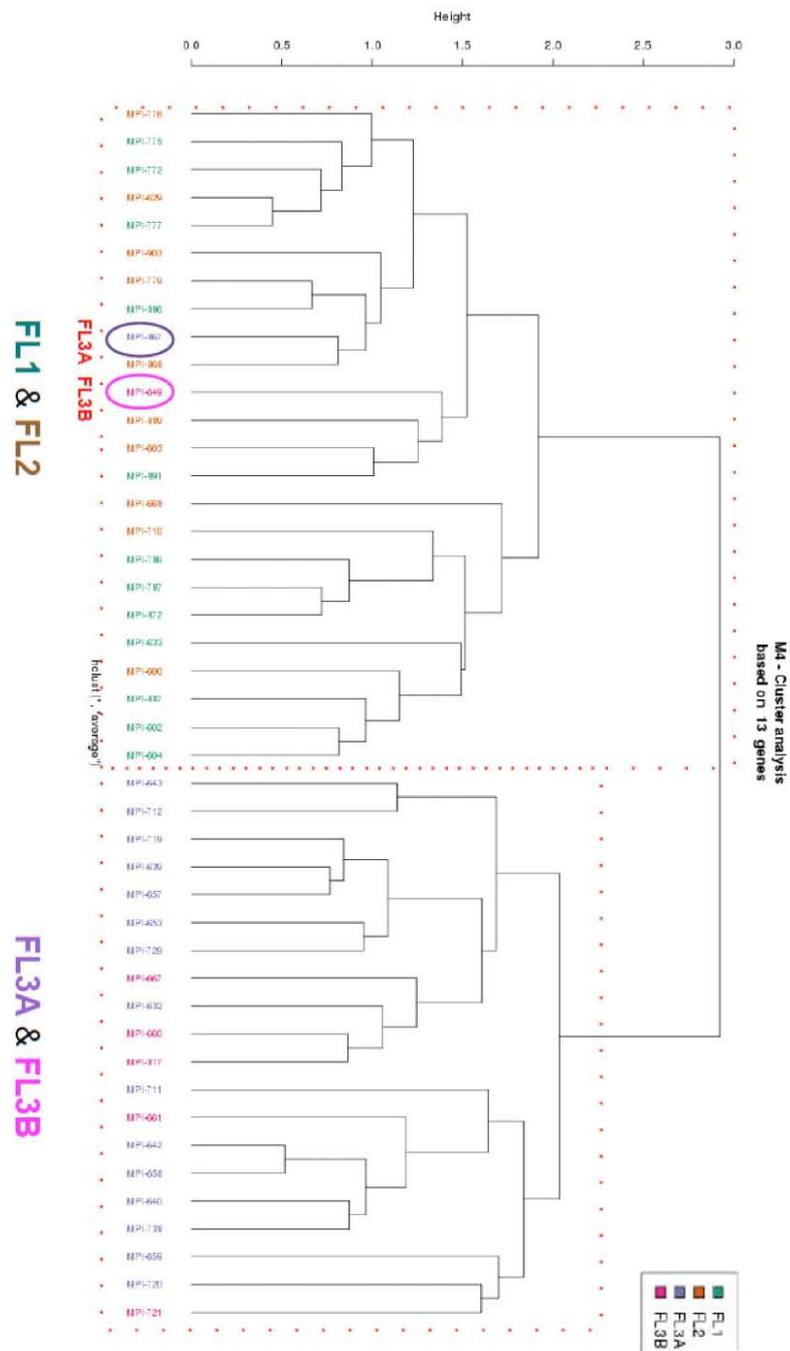


Abbildung 3.8: Clusteranalyse, Darstellung als Dendrogramm. Auf der x-Achse sind die FL-Subgruppen abgebildet, auf der y-Achse ist die (relative) Differenz angegeben. Die mit roten Punkten angedeuteten Kästen zeigen die Aufteilung der Proben in ihre Gruppen (FL1/2 und FL3A/B) durch die Clusteranalyse. Die Ausnahmen wurden mit einem Kreis hervorgehoben.

Ergebnisse

Der Anteil t(14;18)-positiver FL3B ist in der vorliegenden Kohorte mit 50% (3/6), verglichen mit bisher beschriebenen Häufigkeiten (beispielsweise 9% in 23 reinen FL3B²³), überdurchschnittlich hoch. Daher wurden die t(14;18)-positiven FL3B in einer weiteren Analyse aus der bestehenden Gruppe der FL3B herausgenommen. Die Anzahl von FL3B verringerte sich also von 6 auf 3. Die nun ermittelte Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene wurde im ANOVA-Ansatz auf 10 Gene minimiert (siehe Tabelle 3.5). Neun der 10 Gene stimmten mit den Genen der ersten ANOVA-Analyse überein (siehe Tabelle 3.4), während die erneute ANOVA-Berechnung ohne t(14;18)-positive FL3B zur Identifikation eines weiteren Gens (*HILPDA*) führte, das in der ersten ANOVA-Analyse nicht vertreten war. Die Tabelle 3.5 zeigt eine Auflistung der 10 Gene.

Ergebnisse

Gen	Beschreibung	Signalweg	Genlokus
RPP40	ribonuclease P/MRP subunit p40	keine Information	6p25.1
TMEM5	transmembrane protein 5	Metabolismus (Glycosyltransferase)	12q14.2
MRE11A	MRE11 homolog, double strand break repair nuclease	DNA-Reparatur	11q21
TXN	thioredoxin	Metabolismus (Redoxreaktion)	9q31.3
COPB1	coatamer protein complex subunit beta 1	intrazellulärer Proteintransport	11p15.2
KIF5B	kinesin family member 5B	keine Information	10p11.22
GTPBP8	GTP binding protein 8 (putative)	keine Information	3q13.2
TNPO1	transportin 1	Intrazellulärer Proteintransport	5q13.2
C1orf27	chromosome 1 open reading frame 27	keine Information	1q31.1
HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet associated	keine Information	7q32.1

Tabelle 3.5: Liste der 10 in der ANOVA ermittelten (höchst) differentiell exprimierten Gene zwischen den drei Gruppen FL1/2, FL3A und FL3B t(14;18)-negativ.

Ergebnisse

Diese differentiell exprimierten Gene wurden wiederum in einer Heatmap dargestellt (siehe Abbildung 3.9). Die Anordnung der Heatmap erfolgte analog der Höhe der Genexpression von links, schwach exprimiert (blau) bis rechts, stark exprimiert (gelb). Es zeigt sich, wie auch schon im ersten Durchlauf mit allen 6 FL3B, eine nähere Verwandtschaft der t(14;18)-negativen FL3B mit den FL3A gegenüber FL1/2.

Das gleiche Bild zeigte sich so auch in der Heatmap mit der zusammengefassten Darstellung der verschiedenen FL-Subtypen (siehe Abbildung 3.10), wobei FL3A und FL3B erneut ein homogenes GE-Profil aufwiesen, das durch eine erhöhte Expression der 10 Gene repräsentiert ist, während die FL1/2 eine verminderte Expression dieser Gene zeigten.

Ergebnisse

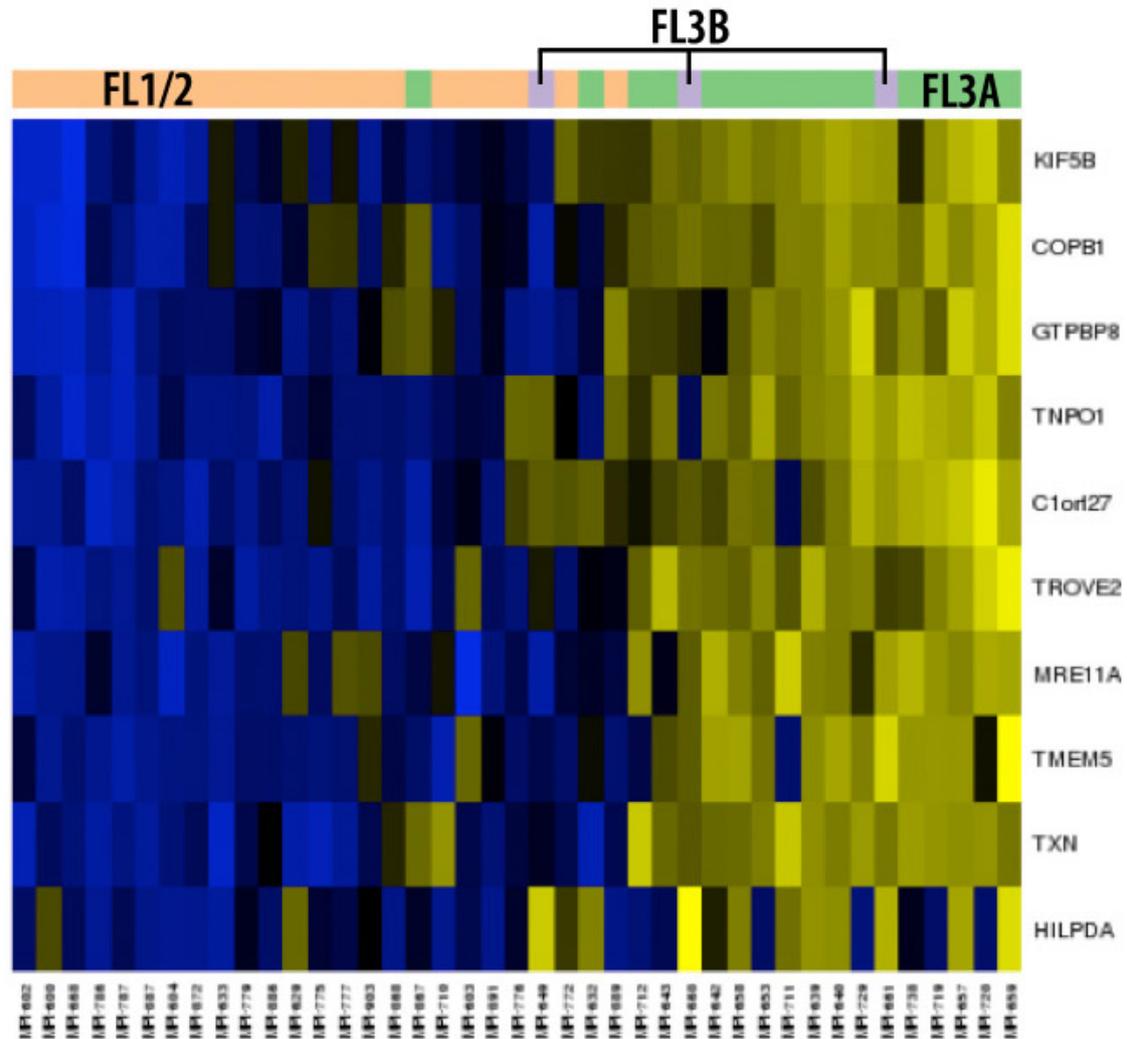


Abbildung 3.9: Dargestellt in einer Heatmap sind die 10 unterschiedlich exprimierten Gene in den Gruppen FL1/2, FL3A und t(14;18)-negative FL3B. Auf der x-Achse die Proben aufgelistet, über dem Diagramm zeigt ein Balken die Zugehörigkeit zu den Gruppen FL1/2 (orange), FL3A (grün) und FL3B t(14;18)-negativ (lila). Auf der y-Achse sind die 10 unterschiedlich exprimierten Gene dargestellt.

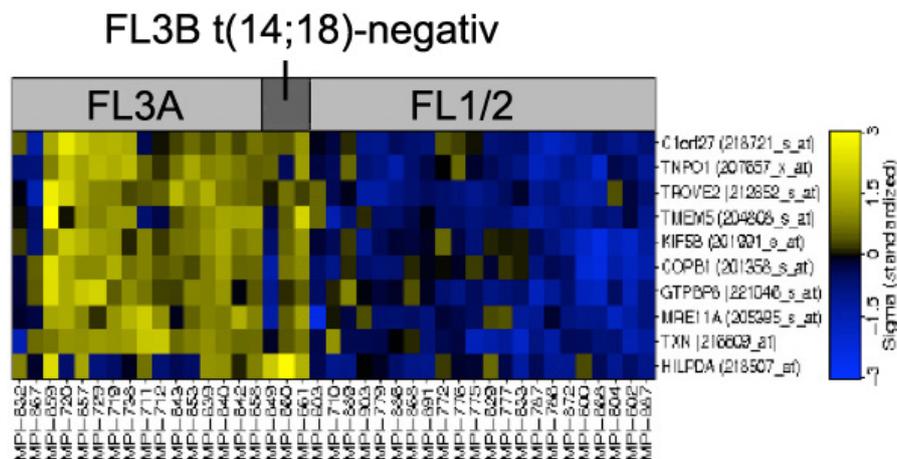


Abbildung 3.10: Heatmap, Clusteranalyse innerhalb der Gruppen. Auf der x-Achse werden die FL-Proben dargestellt, eingeteilt in FL3A, FL3B t(14;18)-negativ und FL1/2, wie über der Heatmap in der Leiste zu sehen ist. Auf der y-Achse sind die in der ANOVA ermittelten 10 differentiell exprimierte Gene dieser drei Gruppen aufgetragen. Die Expression wird mithilfe eines Farbverlaufs dargestellt, hier ist gelb überexprimiert und blau unterexprimiert, keine Differenz wird als schwarz wiedergegeben.

Anhand der durch ANOVA ermittelten 10 Gene wurde wieder eine PCA durchgeführt. Die Expression der 10 Gene wurden dabei in 2 Hauptkomponenten zusammengefasst, die durch PC1 und PC2 in einem zweidimensionalen System dargestellt werden können.

Die Proben der FL1/2 (blau) und FL3A (rot) wurden auf der Graphik jeweils in einer abgegrenzten Gruppe dargestellt und eine Trennung dieser Subtypen war deutlich erkennbar. Die t(14;18)-negativen FL3B (grün) lagerten sich eher in Richtung FL3A an. Erfolgte die Bewertung allein über die Einzelkomponente PC1, schien ein FL3B (MPI-649, siehe auch Abbildung 3.8) den FL1/2 näher zu sein als den FL3A (siehe Abbildung 3.11). Die PCA zeigte jedoch eine Ähnlichkeit der FL3B zu beiden Gruppen und nicht als eine von diesen abzutrennende Entität. Im Gegensatz hierzu waren die FL3B vor dem Ausschluss der t(14;18)-positiven FL3B stärker innerhalb der Gruppe der FL3A dargestellt (siehe Abbildung 3.7).

Ergebnisse

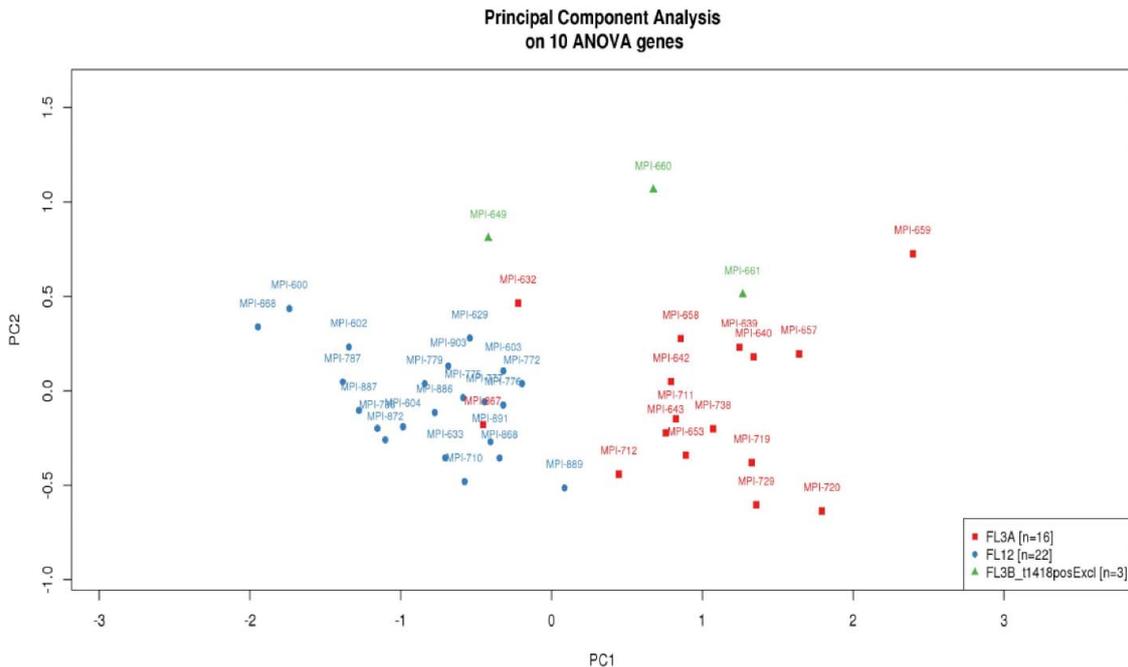


Abbildung 3.11: Principal Component Analyse von den 10 durch ANOVA ermittelten unterschiedlichen Genen der Gruppen FL1/2 (FL12), FL3A und FL3B t(14;18)-negativ. Auf der x-Achse ist die erste Hauptkomponente (PC1) wiedergegeben, auf der y-Achse die zweite (PC2). Die Proben der Gruppe FL1/2 sind blau, FL3A sind rot und t(14;18)-negative FL3B sind grün dargestellt. Es wurde eine Trennung von FL1/2 und FL3A sichtbar. FL3B gliederte sich hier zwischen FL1/2 und FL3A eher an FL3A an, jedoch ohne eine erkennbare Trennung zu diesen.

Eine weitere PCA sollte noch einmal und fokussiert die Gruppen FL3A (n=16) und FL3B (n=6; ohne Ausschluss der t(14;18)-positiven FL3B) vergleichen und diese Gruppen, wenn möglich, trennen. Diese Analyse wurde mit den 100 Genen durchgeführt, welche die größte differentielle Expression aufwiesen. Die 100 Gene wurden in zwei Hauptkomponenten wiedergegeben, die in der Graphik als PC1 auf der x-Achse und PC2 auf der y-Achse angegeben wurden. Wie bereits durch die ANOVA und in den Heatmaps dargestellt, zeigte auch dieser Ansatz eher eine „Durchmischung“ der Proben und keine deutliche Abgrenzung der beiden Gruppen (siehe Abbildung 3.12).

Ergebnisse

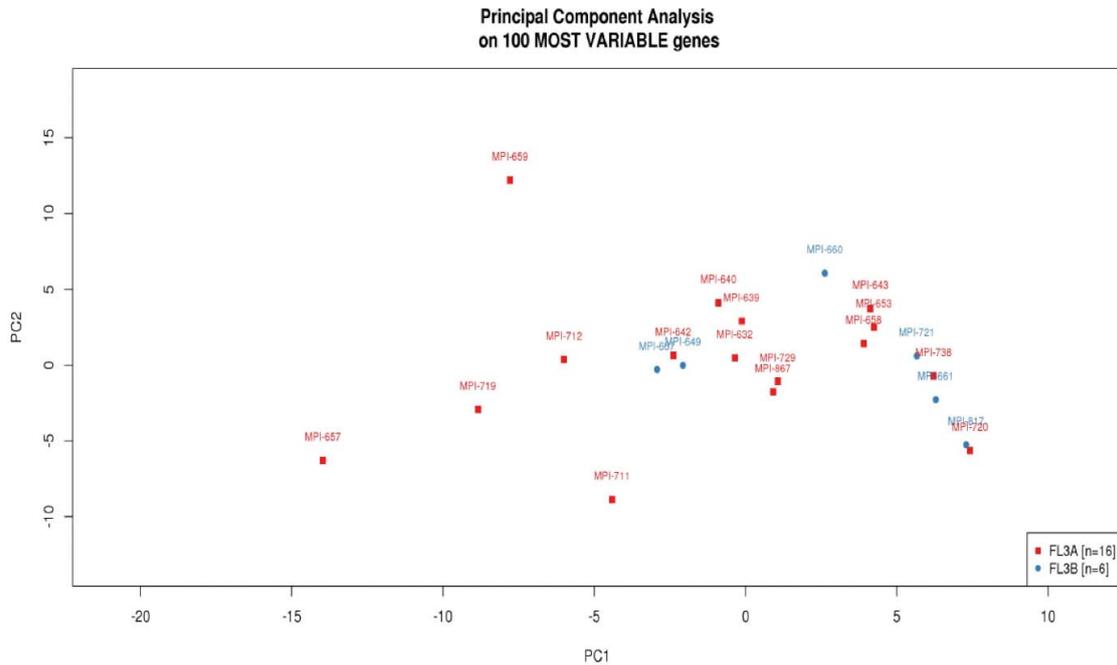


Abbildung 3.12: Darstellung einer PCA der Gruppen FL3A und FL3B anhand der 100 in der Expression unterschiedlichsten Gene. Auf der x-Achse ist die erste Hauptkomponente (PC1) wiedergegeben, auf der y-Achse die zweite (PC2). Die Proben der Gruppe FL3A sind rot und die der FL3B blau dargestellt. Es zeigt sich keine Trennung der Gruppen.

3.2.2 Vergleich anhand der An- oder Abwesenheit der t(14;18)

Um auszuschließen, dass die differentielle GE der FL1/2 und der FL3A nur vom t(14;18)-Status abhängt, wurden die Indices der Genexpression in den Gruppen FL1, FL2 und FL3A untereinander untersucht und im Anschluss mit denen der Gruppen der t(14;18)-positiven und -negativen Lymphome verglichen (siehe Abbildungen 3.14 und 3.15). Der Genexpressionsindex ist ein Wert, der die Expressionsstärke von Genen einer Probe oder Probengruppe relativ zu einer anderen Probe oder Probengruppe stellt und die Differenzen zu einem Wert reduziert.

Betrachtet man die Genexpression der 50 am stärksten unterschiedlich exprimierten Gene, wie in Abbildung 3.13 gezeigt, und führt eine differentielle Expressionsanalyse (DEA) in den Gruppen FL1, FL2 und FL3A durch, so zeigen sich die Genexpressionsindices der Gruppen FL1 und FL2 als etwa gleich, während FL3A leicht erhöhte Indices aufweisen (siehe Abbildung 3.14). Desweiteren sind die Gene von FL1/2 im Mittel im Vergleich eher unterexprimiert (Mittelwerte unter 0), während die Expression der Gene bei FL3A höher ist (Mittelwert um 0,5). Die Rate der *BCL2*-Translokationen ist in diesen Gruppen ähnlich (FL1/2: 82% vs. FL3A: 75%). Betrachtet man die Genexpressionsindices der t(14;18)-positiven und der t(14;18)-negativen FL, so zeigen sich diese Indices in etwa gleich (siehe Abbildung 3.15), die Streuung der Expression der Proben scheint jedoch bei vorhandener t(14;18) größer zu sein.

Folglich zeigen unsere Ergebnisse eine differentielle GE der Gruppen FL1/2 und FL3A, die nicht auf den Translokationsstatus zurückzuführen sind, da dort keine Unterschiede erkennbar sind. Im Umkehrschluss sind auch die Unterschiede der GE zwischen t(14;18)-positiven und -negativen Lymphomen nicht ursächlich auf die Unterschiede zwischen den Graden der FL zurückzuführen, da sich die differentiell exprimierten Gene zwischen FL unterschiedlicher Grade und zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL ebenfalls unterscheiden.

Ergebnisse

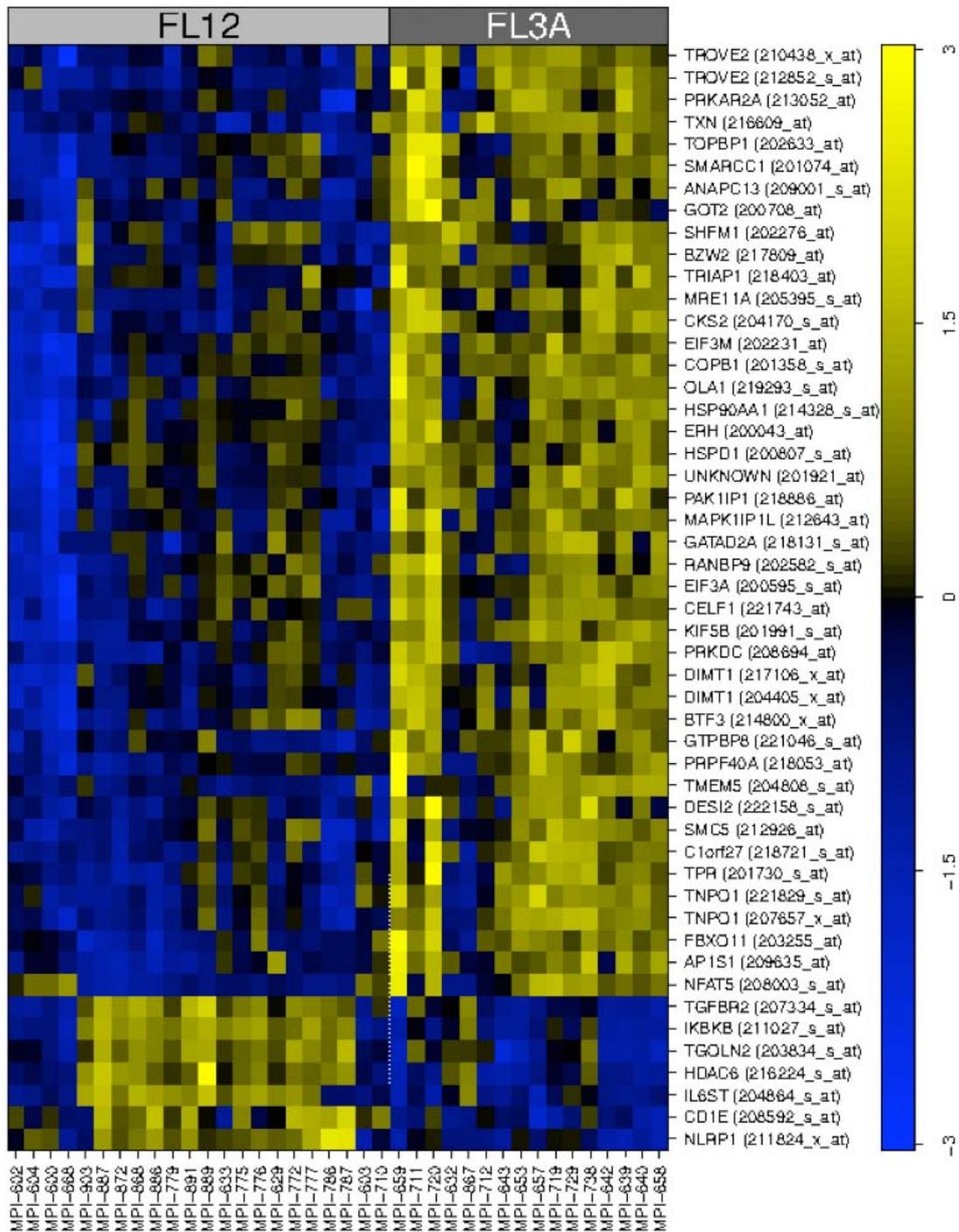


Abbildung 3.13: Heatmap der Genexpression. Die FL-Subtypen auf der x-Achse sind nach den Gruppen FL1/2 (FL12) und FL3A sortiert, auf der y-Achse sind die 50 Gene aufgetragen deren Expression sich in den beiden Gruppen am stärksten unterscheiden. Diese Differenzen sind in einem Farbverlauf dargestellt: gelb ist dabei überexprimiert und blau unterexprimiert.

Ergebnisse

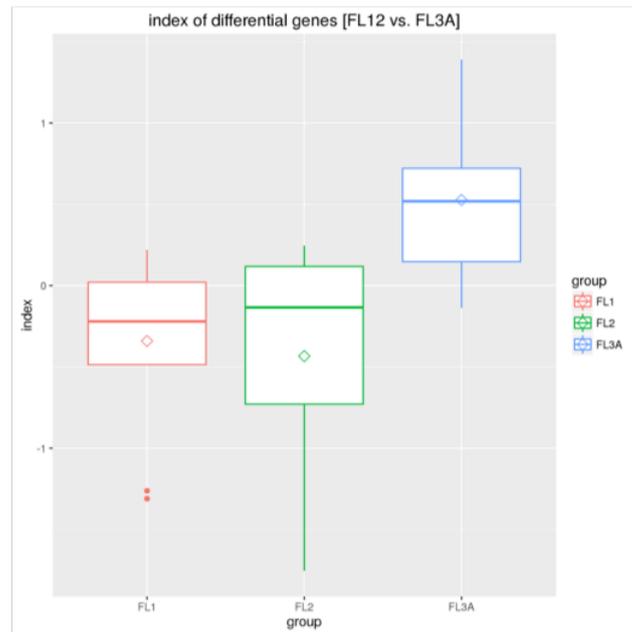


Abbildung 3.14: Darstellung der Genexpressionsindices der Gruppen FL1, FL2 und FL3A in einem Boxplot. Auf der x-Achse sind die Gruppen FL1, FL2 und FL3A wiedergegeben, auf der y-Achse der Genexpressionsindex.

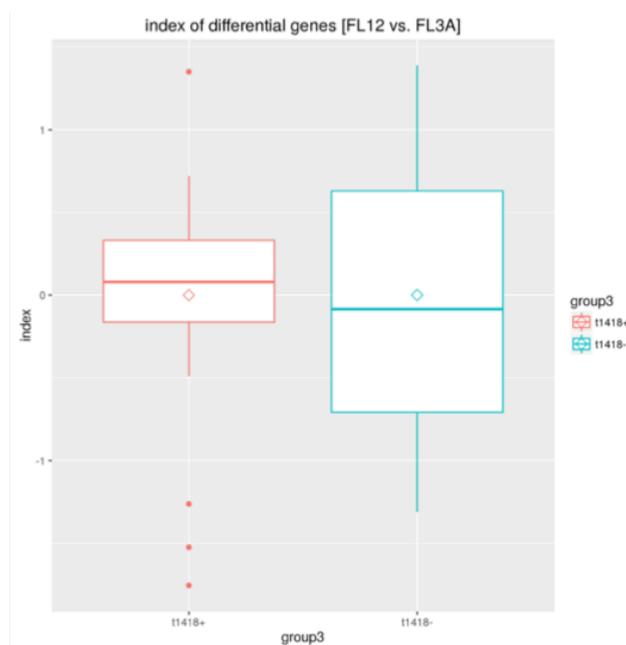


Abbildung 3.15: Darstellung der Genexpressionsindices der t(14;18)-positiven und t(14;18)-negativen FL in einem Boxplot. Auf der x-Achse sind die Gruppen t(14;18)-positiv und t(14;18)-negativ wiedergegeben, auf der y-Achse der Genexpressionsindex.

Ergebnisse

Werden die FL und DLBCL in t(14;18)-positive (n=70) und t(14;18)-negative (n=23) Tumoren eingeteilt und sucht man nach Genen, die diese Gruppen unterscheiden, so zeigen sich 1523 differentiell exprimierte Probesets (=582 Gene).

Grundlage für die Einteilung in t(14;18)-negative und -positive FL ist hierbei die FISH-Untersuchung mit der Vysis LSI® *BCL2* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe und der Vysis LSI IGH Dual Color Break Apart Rearrangement Probe. Zeigen die Proben positive Signalkonstellationen sowohl bei der Hybridisierung mit der *BCL2*- als auch mit der IGH-Sonde, geht man von einer Verlagerung des *BCL2*-Genlokus zum IGH-Lokus aus und bezeichnet die Proben dann als t(14;18)-positiv.

Von den 1523 differentiell exprimierten Probesets (=582 Gene) wurden 1187 Probesets in der t(14;18)-positiven Kohorte überexprimiert, 336 Probesets wurden unterexprimiert.

Werden die Unterschiede in der Genexpression in einer Heatmap wiedergegeben und die Proben nach dieser Expression aufsteigend sortiert, so zeigt sich ein angedeuteter Verlauf mit vergleichsweise niedriger Expression für t(14;18)-negative Tumoren auf der linken Seite hin zu einer erhöhten Expression von t(14;18)-positiven Tumoren (siehe Abbildung 3.16). Die Klassifikation in t(14;18)-positive und -negative Tumoren wird über der Graphik in einer Leiste angegeben, die Proben sind auf der x-Achse, die 582 Gene mit signifikanten GE-Unterschieden sind auf der y-Achse wiedergegeben.

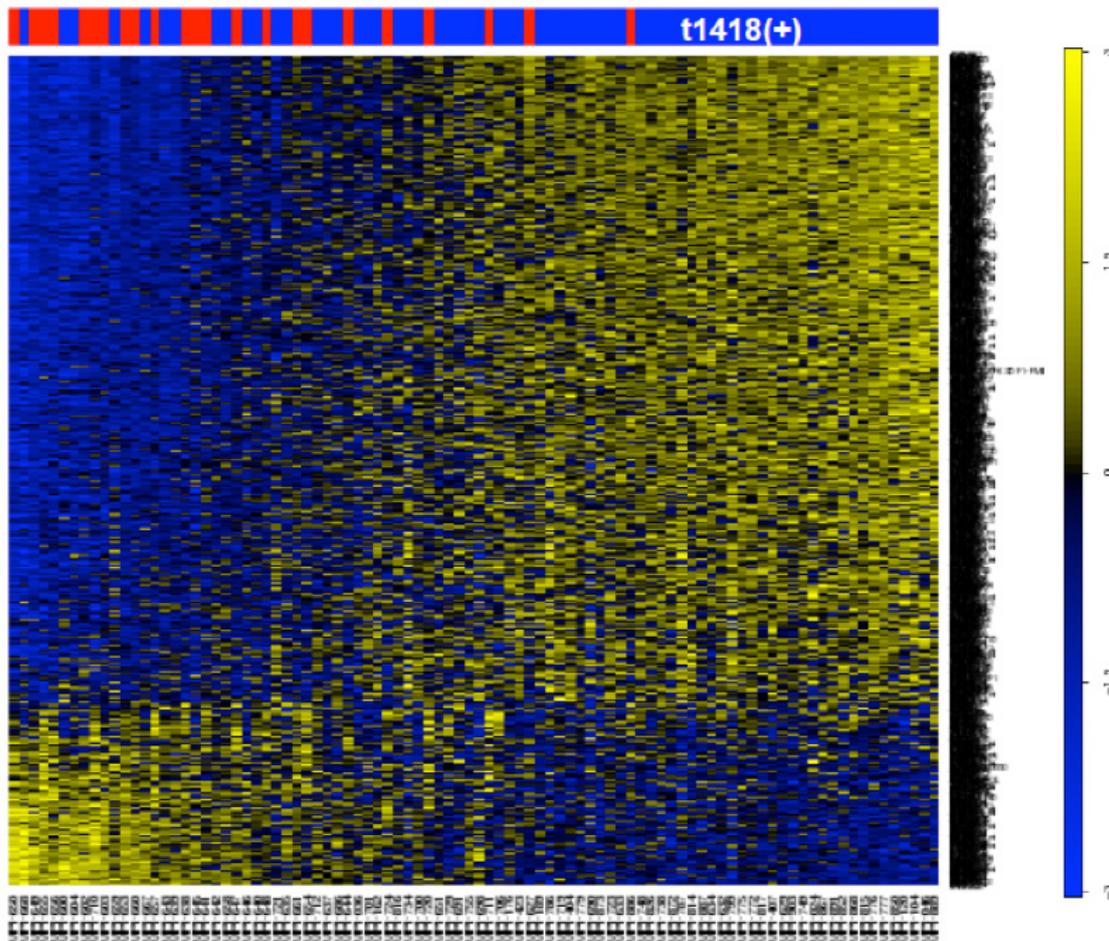


Abbildung 3.16: Heatmap von 582 unterschiedlich exprimierten Genen der t(14;18)-positiven (t1418(+), blau in Leiste oben) und t(14;18)-negativen (t1418(-), rot in Leiste oben) Lymphome. Auf der x-Achse abgebildet sind die verschiedenen Proben, auf der y-Achse die 582 Gene mit der größten GE-Differenz dieser Tumoren.

Wie in den Gruppen der FL1, FL2 und FL3A, wurde auch zur Frage der t(14;18) Translokation eine supervidierte Heatmap erstellt, in der die Proben den Gruppen t(14;18)-positiv und -negativ zugeteilt wurden. Die Graphik zeigt ein recht homogenes Bild innerhalb der Gruppen und eine deutliche Trennung zwischen den Gruppen. Es gibt jedoch einige wenige Proben, die, obwohl sie mittels FISH-Untersuchung positiv für eine t(14;18) getestet wurden, in der Genexpression eher t(14;18)-negativen FL gleichen und umgekehrt (siehe Abbildung 3.17).

Ergebnisse

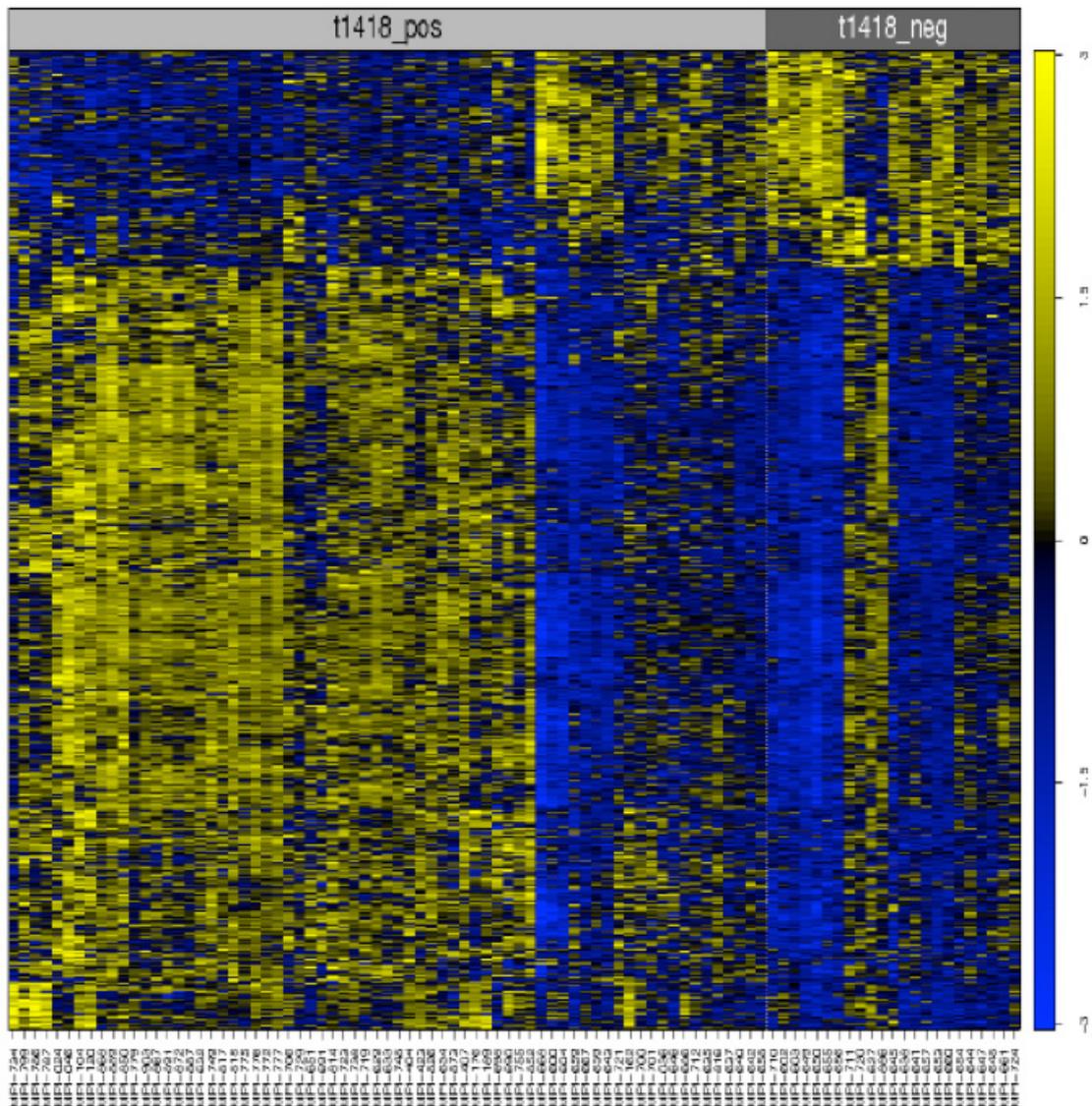


Abbildung 3.17: Heatmap der Genexpression innerhalb der Gruppen t(14;18)-positive (t1418_pos) und t(14;18)-negativen (t1418_neg) FL. Auf der x-Achse abgebildet sind die Proben der Gruppen t(14;18)-positiv und -negativ in den jeweiligen Gruppen, auf der y-Achse die 582 Gene mit der größten Differenz dieser Proben.

Um die oben beschriebenen Ergebnisse besser auswerten und vergleichen zu können, wurde eine PCA durchgeführt. Grundlage der Darstellung war hierbei die Berücksichtigung der 100 am stärksten unterschiedlich exprimierten Gene.

Ergebnisse

Werden diese LIMMA-Unterschiede in einer PCA dargestellt, so wird wiederum erkennbar, dass die beiden Gruppen zwar als getrennt erscheinen, dass aber keine klar ersichtliche Trennlinie besteht und ein Teil der Fälle der beiden Gruppen sich im Diagramm überschneiden (siehe Abbildung 3.18). Dieses Muster ist auch mit dem in der vorherigen Heatmap (siehe Abbildung 3.17) dargestellten Profil vergleichbar.

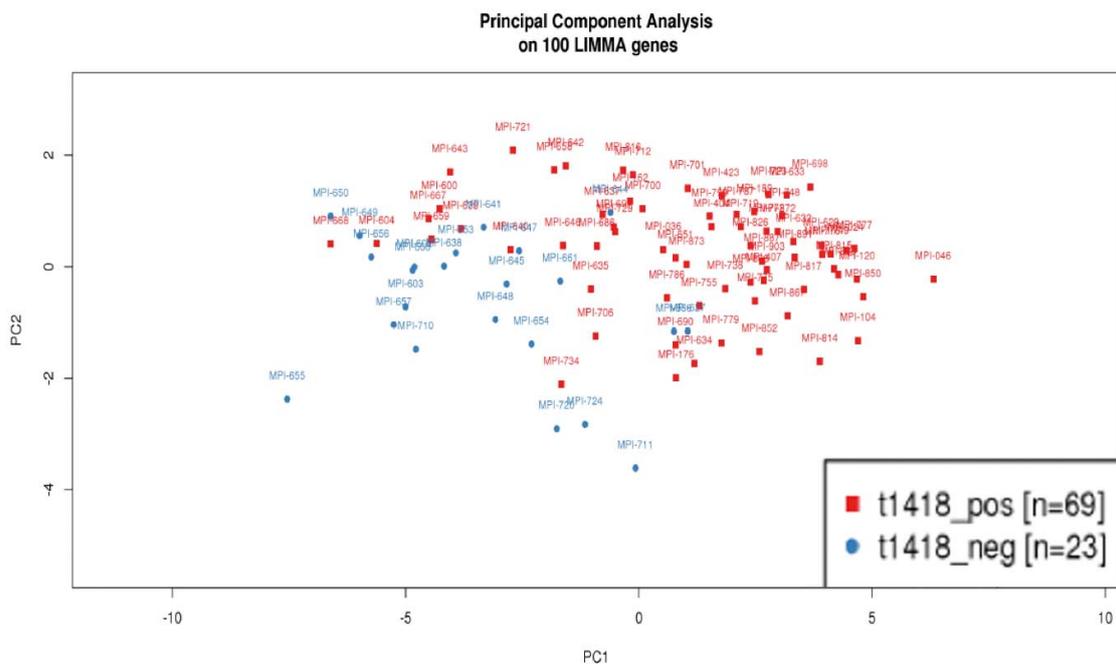


Abbildung 3.18: Principal Component Analysis von 100 differentiell exprimierten Genen. Rot dargestellt sind 69 t(14;18)+ Fälle, blau dargestellt sind 23 t(14;18)-Fälle.

Betrachtet man die Genexpression der verschiedenen Fälle, die in t(14;18)-negative und t(14;18)-positive Lymphome anhand der 50 Gene mit größten Differenz in ihrer Expression eingeteilt wurden, dann zeigt sich ein Bild, in dem die Großzahl der Tumoren innerhalb der jeweiligen Gruppe recht homogen erscheint, es aber einige Proben in jeder Gruppe gibt, die anhand ihres Genexpressionsprofils eher der anderen Gruppe zugeordnet werden könnten (siehe Abbildung 3.19). So

Ergebnisse

ähneln einige wenige t(14;18)-negative FL hinsichtlich ihrer GE der Mehrzahl der t(14;18)-positiven FL und umgekehrt.

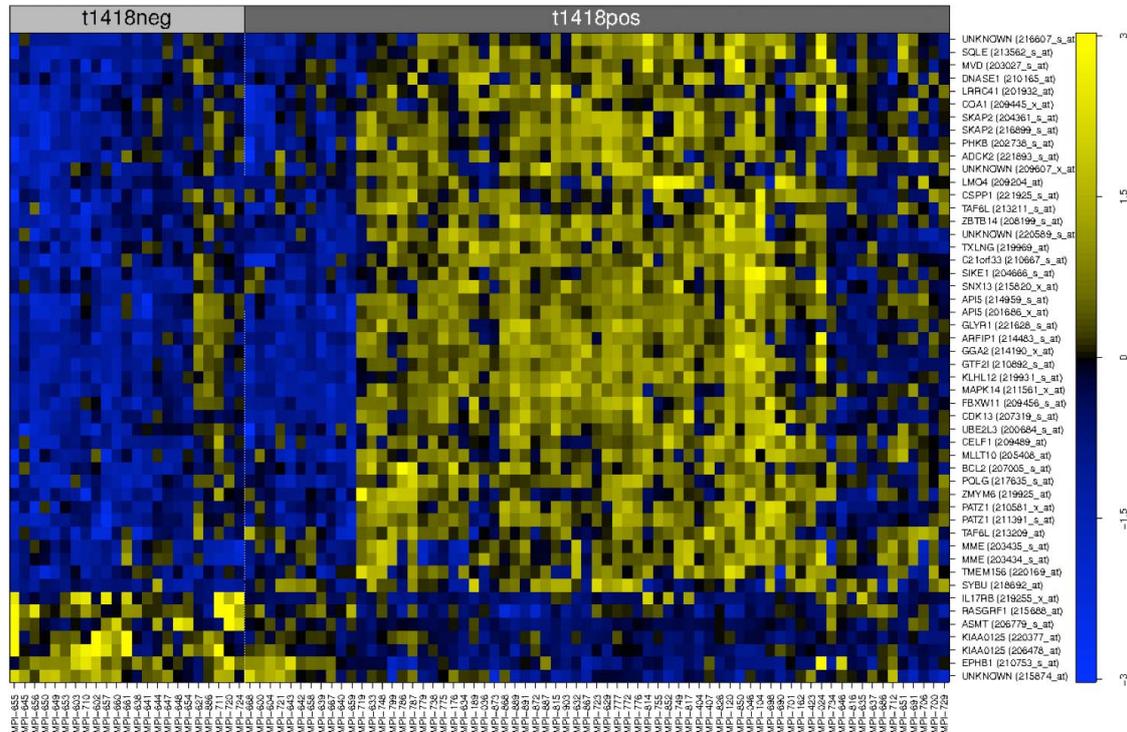


Abbildung 3.19: Heatmap der in die Gruppen t(14;18)-positiv und t(14;18)-negativ eingeteilten Lymphome (x-Achse). Die 50 unterschiedlich exprimierten Gene sind auf der y-Achse angeordnet, die Expression ist gelb für überexprimiert und blau für unterexprimiert.

Um nach diesen Ergebnissen auszuschließen, dass es sich um ein Artefakt der Methode, welche die 582 unterschiedlichsten Gene gefunden hat, handelt, wurde eine unabhängige Klassifikationsanalyse durchgeführt, welcher der gesamte Datensatz zugrunde lag.

Die Klassifikation wurde 1000 Mal wiederholt und das Ergebnis in Prozent für die Klassifikation als t(14;18)-positiv angegeben. Somit finden sich auf der y-Achse nahe bei 100% die Proben, die in der Mehrzahl der 1000 Klassifikationsläufen als t(14;18)-positiv und nahe bei 0% diejenigen, die mehrheitlich als t(14;18)-negativ klassifiziert wurden (siehe Abbildung 3.20). Die Kategorie der Original-Label

Ergebnisse

wurde mithilfe von rot für t(14;18)-positiv und blau für t(14;18)-negativ dargestellt. Analog zu der Darstellung in der vorangegangenen Heatmap (siehe Abbildung 3.19), bei der einige wenige t(14;18)-negative FL in ihrer GE der Mehrzahl der t(14;18)-positiven FL glichen und umgekehrt, würden sich hier solche Funde als Proben mit *original* Label t(14;18)-positiv und *predicted* Label t(14;18)-negativ finden lassen und umgekehrt. Als Schwellenwert für eine Fehlklassifikation wurden Proben mit einer Differenz des Labels >75% gewählt, d.h. in über 75% der 1000 Klassifizierungsdurchgänge würde diese bestimmte Probe mit dem Label vorausgesagt, welche nicht ihrem *original* Label entsprach. Diese „fehlklassifizierten“ Proben sind in Abbildung 3.20 demzufolge als rote Punkte mit einem Wert <25% dargestellt, die basierend ihrer Genetik als t(14;18)-positive Fälle eingestuft wurden, aber eine Genexpression aufweisen, die den t(14;18)-negativen FL entspricht. Blaue Punkte mit einem Wert >75% zeigen FL ohne nachweisbare t(14;18) Translokation, die allerdings ein GE-Profil vergleichbar den t(14;18)-positiven FL aufweisen.

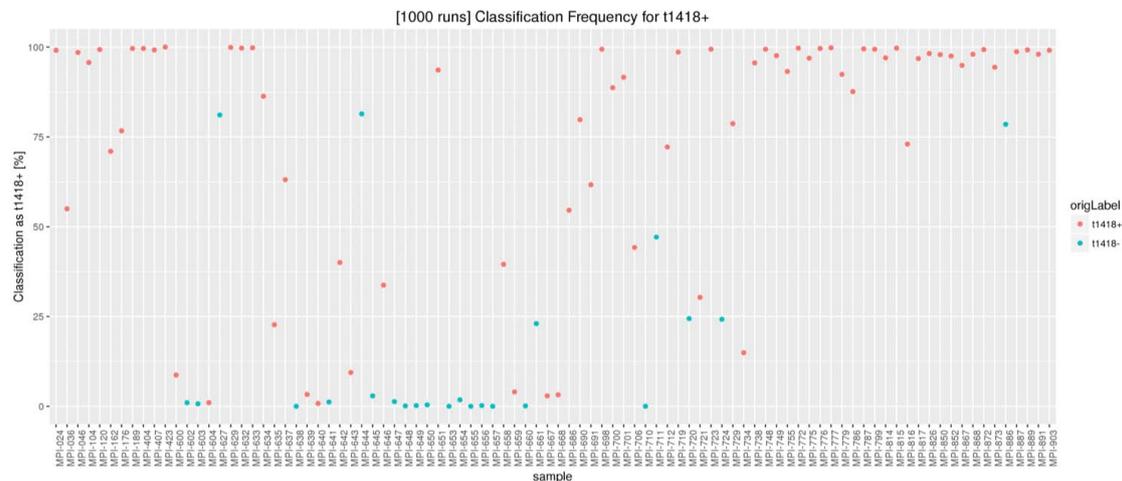


Abbildung 3.20: Darstellung einer Klassifikationsanalyse. Auf der x-Achse sind die Proben alphabetisch sortiert, auf der y-Achse ist die Klassifikation als t(14;18)-Positivität in Prozent angegeben. Die in der FISH-Untersuchung festgestellte Klassifikation wird mit den Farben blau für t(14;18)-negativ und rot für t(14;18)-positiv dargestellt.

Ergebnisse

Diese durch die Klassifikationsanalyse fehlklassifizierten FL waren in der Gruppe der t(14;18)-positiven Lymphome die Fälle MPI-600, MPI-604, MPI-635, MPI-639, MPI-640, MPI-643, MPI-659 und MPI-667. In der Gruppe der t(14;18)-negativen Lymphome waren es die Fälle MPI-627, MPI-644 und MPI-886.

Während das GE-Profil einiger t(14;18)-positiver Fälle eher der Genexpression der t(14;18)-negativen Tumoren entsprach und umgekehrt, war die immunhistochemische Expression des BCL2-Proteins hingegen in der Mehrzahl der fehlklassifizierten Fälle stark (in 2/3 (67%) t(14;18)-negativen und in 9/9 (100%) t(14;18)-positiven Tumoren). Es stellte sich daher die Frage, ob die Translokation des *BCL2*-Gens auch mit der Expression des BCL2-Proteins korreliert. Dazu wurde die Expression von *BCL2* in den Subgruppen untersucht und untereinander verglichen (siehe Auflistung unten). In dieser Untersuchung wurden also die Ergebnisse der FISH Analyse mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse hinsichtlich der *BCL2*-Genexpression gegenübergestellt.

Dabei wurden vier Gruppen definiert, die folgende Konstellationen berücksichtigt (wobei Gruppe 2 und Gruppe 4 die „fehlklassifizierten“ Fälle beinhaltet):

- Gruppe 1:
t(14;18)-pos (n=60)
= mittels FISH t(14;18)-positive FL mit GE entsprechend den t(14;18)-positiven FL
- Gruppe 2:
t(14;18)-pos GE neg (n=3)
= mittels FISH nachweislich t(14;18)-positive FL mit GE entsprechend den t(14;18)-negativen FL
- Gruppe 3:
t(14;18)-neg (n=20)
= mittels FISH t(14;18)-negative FL mit GE entsprechend den t(14;18)-negativen FL

Ergebnisse

- Gruppe 4:
t(14;18)-neg GE pos (n=10)
= mittels FISH t(14;18)-negative FL mit GE entsprechend den t(14;18)-positiven FL

Aus den Boxplots in Abbildung 3.21 wird ersichtlich, dass sowohl die „t(14;18)-pos“ (Gruppe 1) FL mit einer GE t(14;18)-positiver Lymphome, als auch die „t(14;18)-neg“ (Gruppe 3) FL mit einer GE t(14;18)-negativer Lymphome die höchste Expression für BCL2 aufweisen. In beiden durch die Genexpression „fehlklassifizierten“ Gruppen (Gruppen 3 und 4) liegen die Mediane der *BCL2*-Expression niedriger als in den Gruppen, in denen die FISH-Klassifikation dem Bild der Genexpression entspricht.

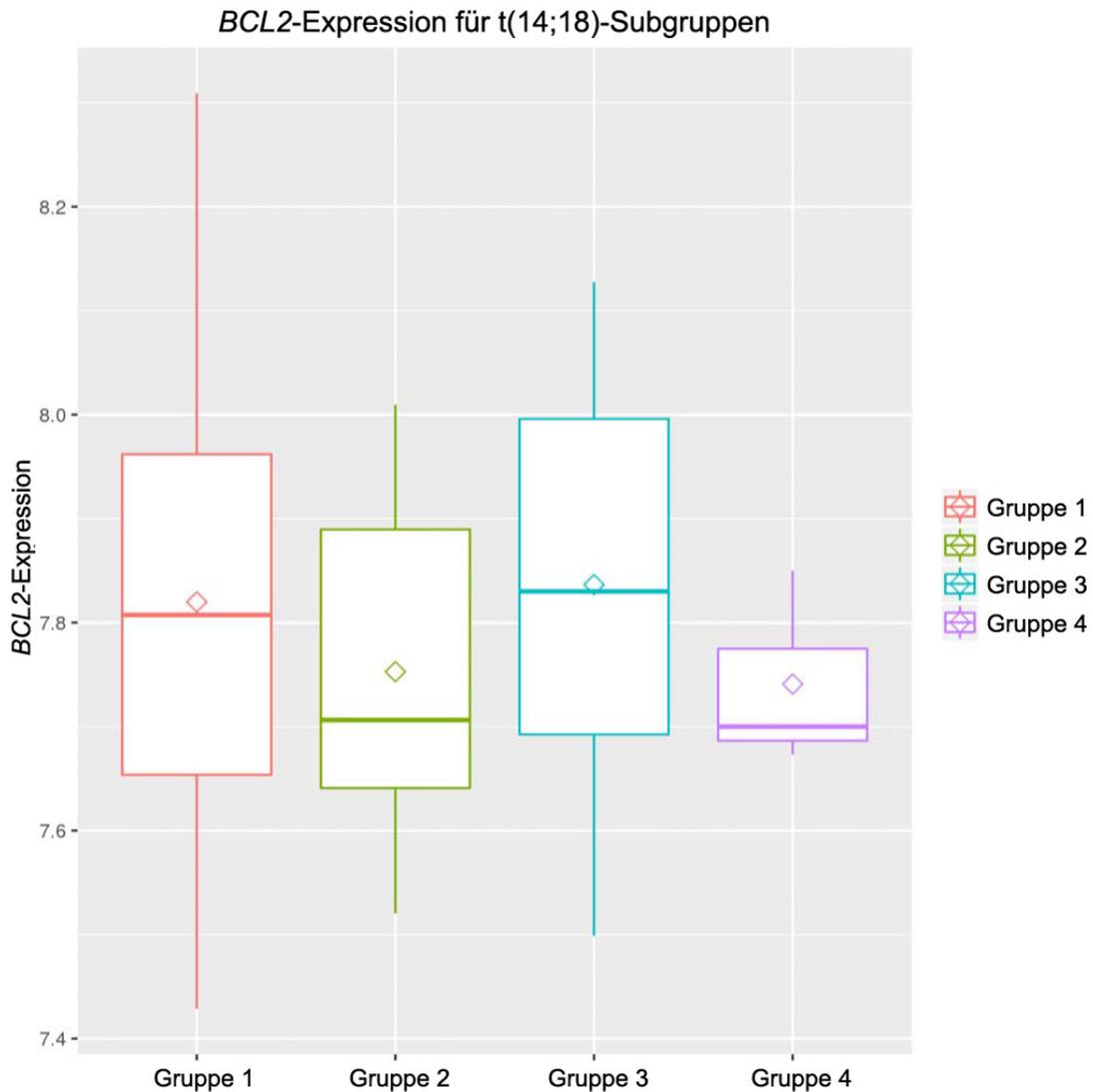


Abbildung 3.21: Boxplot der *BCL2*-Genexpression der verschiedenen Subgruppen von FL. Auf der x-Achse sind diese Gruppen wiedergegeben (siehe auch vorangehende Auflistung). Auf der y-Achse ist die Expressionsstärke von *BCL2* in den Zellen der Lymphome angegeben.

Um zu untersuchen, inwiefern sich die durch die GE fehlklassifizierten Fälle von den regelhaft klassifizierten t(14;18)-positiven und -negativen Tumoren unterscheiden, wurde auf die im Rahmen des MML erhobenen immunhistochemischen Daten und auf die FISH-Ergebnisse zurückgegriffen. Die Expression folgender Marker konnte für die Vergleiche herangezogen werden:

Ergebnisse

CD20, CD10, CD5, BCL2, BCL6, MUM1, HLADR, KI67. Darüber hinaus konnte auf vorhandene FISH-Daten hinsichtlich des *MYC*-, *BCL2*- und *BCL6*-Translokationsstatus zurückgegriffen werden.

Die oben beschriebenen vier Tumorgruppen wurden mithilfe des T-Tests auf ihre Positivität in den immunhistochemischen Untersuchungen miteinander verglichen.

Die t(14;18)-positiven Lymphome, sowie Lymphome mit einer GE ähnlich der Kohorte der t(14;18)-positiven Tumoren zeigten im Vergleich zu den restlichen Proben eine höhere Frequenz einer CD10-Positivität ($p < 0.03$, bzw. $p < 0.02$). Lymphome mit der GE entsprechend der t(14;18)-negativen Tumoren zeigten zudem eine niedrigere Reaktivität für MUM1 ($p < 0.005$).

Ausgehend hiervon stellte sich nun die Frage, wie sich die „fehlklassifizierten“ Fälle dazu einordnen. Die in der FISH t(14;18)-positiven, aber mittels GE t(14;18)-negativen Tumoren (Gruppe 2) zeigten hier eine erhöhte Frequenz von MUM1-Positivität ($p < 0.01$). Der Vergleich der Gruppe 4 mit den anderen Tumoren zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Es kristallisieren sich zwei Marker heraus, die signifikant mit dem Ergebnis der Klassifikation anhand der GE korrelieren, diese sind CD10 und MUM1. Bei Positivität für das CD10-Protein weisen die Proben vermehrt eine GE der t(14;18)-positiven Tumoren auf. Ist MUM1 vermehrt positiv, so ähnelt die GE eher der der t(14;18)-negativen Lymphome (siehe Abbildung 3.22).

Ergebnisse

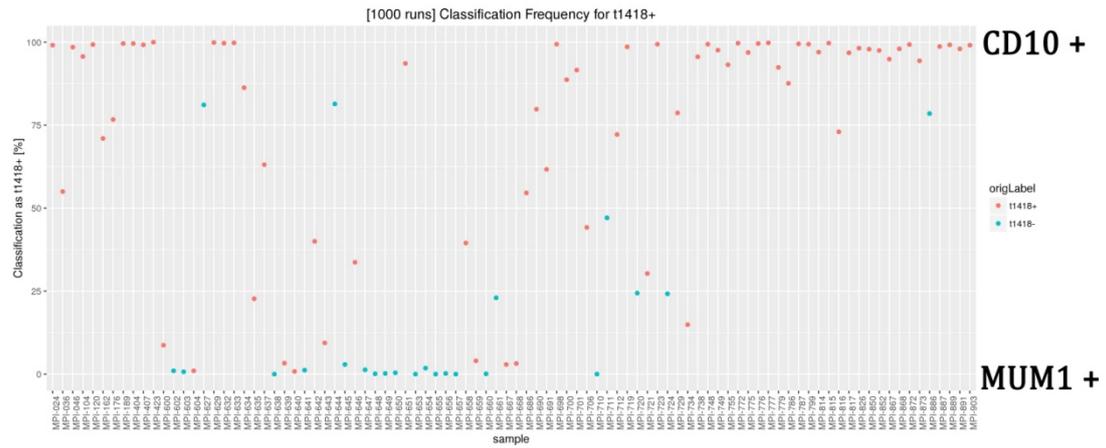


Abbildung 3.22: Klassifikation anhand der GE (siehe Abbildung 3.20). Proben mit höherer CD10 sind vermehrt im oberen Teil des Diagramms zu finden, Proben mit höherer MUM1 eher im unteren Teil.

4 Diskussion

4.1 Zusammenstellen einer Kohorte folliculärer Lymphome mit klar definierten histologischen Subtypen

Nach der aktuellen Klassifikation lymphatischer Tumoren der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization: WHO), wird das FL mit steigender Zahl der Zentroblasten in drei histologische Grade eingeteilt.³ Die Grade FL1 und FL2, definiert durch 0-50 bzw. 51-150 Zentroblasten pro 10 Gesichtsfelder (40x Vergrößerung) sind die weitaus größte Gruppe und zeigen eine hohe biologische und klinische Ähnlichkeit.^{23,24,31} FL3 hingegen, definiert durch eine Blastenzahl >150/10 HPF sind zu diesen unterschiedlich. Ihre Inzidenz ist niedriger, und daher enthalten viele Studien häufig nur eine geringe Zahl von FL3. Zudem treten diese oft in Mischformen zusammen mit anderen Graden (FL1/2 und FL3A) oder dem DLBCL (FL3B) auf. So bestehen bis heute Fragen nach der genauen Einordnung der FL3A und FL3B in Bezug auf ihre Pathogenese, optimale Therapie, Kurabilität und Prognose, aber auch hinsichtlich ihrer genetischen Konstitution im Vergleich zu FL1/2.

Ein systematischer Vergleich bisheriger, zu FL veröffentlichter Studien zeigt diese Problematik auf. In einigen älteren Studien werden FL noch nach alter Klassifikation eingeteilt (^{32,33}), beispielsweise der Kiel-Klassifikation von 1974 und der REAL Klassifikation (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*) von 1994. Im Verlauf wurden diese Klassifikationen 2001 das erste Mal durch die heute gängige WHO Klassifikation abgelöst, und jüngere Studien arbeiten unter Berücksichtigung der neueren, 2008 und 2016 revidierten WHO Klassifikation (^{21,23,31,34}). Das FL wurde in der WHO Klassifikation aus dem Jahr 2001³⁵ in 3 Grade unterteilt, nicht aber weiter in FL3A und FL3B differenziert. Die

Diskussion

Notwendigkeit der Differenzierung innerhalb dieses Grades konnte jedoch gezeigt werden²⁴. Deshalb wurden diese Erkenntnisse in die Auflage von 2008⁶ aufgenommen und in der revidierten Ausgabe von 2017³ beibehalten.

Weitere Probleme hinsichtlich der Vergleichbarkeit zwischen Studien zeigten sich unter Berücksichtigung dieser Klassifikation. Einige Studien fassten alle FL eines Grades, wie zum Beispiel FL3B (\pm DLBCL), in eine Gruppe (^{34,36}) zusammen, während andere Studien zwischen Mischformen, wie z.B. FL3B (+DLBCL), und reinen Formen, wie FL3B (-DLBCL) unterschieden (^{21,23,24,26,31}).

Die Daten und Proben der vorliegenden Studie entstammen dem MML-Projekt, in das Patienten bzw. Gewebeproben aus mehreren Standorten in Deutschland retrospektiv eingeschlossen wurden. Innerhalb dieses großen, nationalen Verbundprojektes wurden insgesamt 863 Lymphome untersucht, davon 191 FL. Diese wurden in Referenzpathologien begutachtet, um eine korrekte Diagnose zu gewährleisten, auch bei den selteneren und schwieriger klassifizierbaren Subtypen. Im Rahmen des Verbundes wurden FISH-Analysen, Genomanalysen und immunhistochemische Färbungen (zentralisiert in spezialisierten Einrichtungen) durchgeführt. Zusätzlich zu diesen Analysen wurden auch die klinischen Daten zu den Fällen zusammengetragen.

Das vorliegende Projekt hatte zum Ziel, die molekulare Pathogenese verschiedener Subtypen des FL, insbesondere der FL Grad 3, systematisch zu untersuchen, insbesondere auch deren Einordnung in das Spektrum der FL und DLBCL. Es konzentrierte sich daher auf reine FL3A (n=16) und FL3B (n=6). Die Daten anderer FL- bzw. DLBCL-Subtypen (FL1/2, FL3B+DLBCL, DLBCL) dienten hierbei zum Vergleich. Da die Größe unserer Kohorte vor allem durch die niedrige Zahl der FL3B eingeschränkt war, wurde die Größe der anderen Gruppen so gewählt, dass die Anzahl der untersuchten Proben der Anzahl der Kontrollgruppe entsprach, so dass alle statistischen und bioinformatischen Analysen adäquat durchgeführt werden konnten. Mit der Zusammenstellung der Kohorte und der Vorgabe, zwischen reinen FL und Mischformen zu unterscheiden, sollten detailliertere

Diskussion

Erkenntnisse hinsichtlich der Biologie des FL Grad 3 im Vergleich zu FL1/2 und DLBCL, bzw. FL3B+DLBCL erlangt werden.

Während bisherige Studien sich entweder auf genetische/immunhistochemische Untersuchungen oder aber auf die Analyse von Genexpressionsprofilen unterschiedlicher FL-Subtypen fokussierten, sollte in der für die vorliegende Arbeit ausgewählten FL-Kohorte erstmalig eine systematische Untersuchung erfolgen, die sowohl die Charakterisierung genetischer Aberrationen (*BCL2*-, *BCL6*- und *MYC*-Translokationen), die Proteinexpression FL-typischer Marker mittels immunhistochemischer Färbungen (CD10, MUM1/IRF4, Ki67, BCL2, BCL6) und die Analyse von Genexpressionsprofilen der unterschiedlichen FL-Subtypen einschloss.

4.2 Genexpressionsprofile unterschiedlicher histologischer FL-Subtypen und Identifikation möglicher tumor-relevanter Marker

Hinsichtlich ihrer histomorphologischen Eigenschaften gelten FL3A und FL1/2 als ähnlich; so weisen viele FL3A auch häufig Areale eines FL1/2 auf. Daraus wird gefolgert, dass FL3A und FL1/2 eng miteinander verwandt sind.²¹

Während bei den FL1/2 und FL3A eine enge Verwandtschaft, auch in Zusammenhang mit ihrer molekularen Pathogenese gesehen wird, wurde das FL3B in den Studien der letzten Jahre oft als davon abgetrennt gesehen, bis hin zur Frage, ob es sich um eine eigenständige Entität mit eigener Pathogenese handele.^{23-26,31}

Mit diesem Hintergrund ist zu diskutieren, ob das FL3B sich, wie in der WHO-Klassifikation vorgesehen, zu den FL eingliedern lässt. Im Angesicht dieser Studien ist eine Beschreibung des FL3B als follikuläre Variante des DLBCL ebenfalls denkbar. In der Kiel Klassifikation wurde das FL3B als „follikuläres zentroblastisches Lymphom“ definiert und so der Entität der DLBCL als follikuläre Variante zugeordnet.³⁷ Die Fälle einer Koexistenz von FL1/2 und FL3A, sowie FL3B und DLBCL scheinen ebenfalls in diese Richtung zu weisen.

Seit dem Jahr 2008 sieht die WHO-Klassifikation des FL3B bei zusätzlich vorhandenem DLBCL eine Diagnose von DLBCL als Primärdiagnose mit Anteilen eines FL3B vor.⁶ Die meist als „FL3B+DLBCL“ beschriebenen Lymphome sind demnach keine Varianten des FL3B, sondern Varianten des DLBCL, folglich „DLBCL+FL3B“. In nahezu allen Studien^{21,24,25,34,36} zu FL3B wurden diese mit der Nomenklatur „FL3B+DLBCL“ beschrieben, jedoch nicht getrennt von FL3B untersucht. Das Wissen über das reine FL3B ist folglich noch relativ gering.

Passend zu diesen histomorphologischen Ähnlichkeiten von FL1/2 und FL3A waren diese hinsichtlich Genetik und Immunhistochemie ähnlich, insbesondere hinsichtlich der *BCL2*-Translokation, *BCL2*-Expression und CD10, während eine *BCL6*- und *MYC*-Translokation oder eine MUM1-Reaktivität selten beobachtet

Diskussion

wurde. Im Gegensatz hierzu wiesen FL3B eine niedrigere Positivität für eine *BCL2*-Translokation und Protein-Expression, sowie CD10 auf und wiesen eine höhere Rate einer Reaktivität für MUM1 und der *MYC*-Translokation auf.^{23,24,26}

Auch in den vorliegenden Daten konnte eine Abnahme der Frequenz der *BCL2*-Translokation mit dem Tumorgrad beobachtet werden, wenn auch die Unterschiede nicht signifikant waren. Die Positivität für MUM1 nahm mit höherer Zentroblastenzahl ebenfalls zu. Eine niedrigere Frequenz der CD10 Expression konnte bei den FL3B nicht beobachtet werden, jedoch lagen nur zu 2 der 6 FL3B vor. Die zuvor beschriebenen Charakteristika der FL wurden demnach bestätigt und eine unterschiedliche Pathogenese von FL3A und FL3B ist anhand dieser Daten denkbar.

Die Kiel Klassifikation für Lymphome unterteilte die heutigen FL in Tumoren mit Zentrozyten und Zentroblasten, sogenannte „zentroblastisch-zentrozytische Lymphome“ (heute entsprechend FL1/2 und evtl. FL3A) und Tumore mit überwiegend Zentroblasten, sogenannte „zentroblastische Lymphome“ (heutiges DLBCL, aber auch FL3B fällt in diese Kategorie). Folglich ergab sich die Frage, ob das FL3B in der WHO-Klassifikation nun den FL oder den DLBCL als eine ihrer morphologischen Varianten zugeordnet werden sollte.^{37,38}

Obwohl klar ist, dass FL1/2 einen indolenten Verlauf aufweisen, besteht keine grundsätzliche Einigkeit darüber, ob FL3A als indolente Lymphome in das Spektrum der FL1/2 einzugruppiert sind³⁴ oder doch eher den aggressiver geltenden FL3B gleichen, die im klinischen Verlauf den DLBCL näher stehen.³⁶

Hinsichtlich ihres klinischen Verlaufs sehen Wahlin et al.³⁶ FL1/2 und FL3A als vergleichbar an, während Koch et al.²¹ in kürzlich erhobenen retrospektiven Daten aus den RICOVER-60 und FL-Studien der GLSG („Deutsche Studiengruppe Niedrigmaligner Lymphome“) zeigen, dass FL3A isoliert betrachtet in ihrer Prognose eher den FL3B gleichen und insbesondere nach Immunchemotherapie ein verlängertes progressionsfreies Überleben aufweisen. Zeigen sie zusätzlich Areale von FL1/2, ist die Prognose etwas ungünstiger.²¹

Diskussion

Für ein besseres Verständnis der FL3 wurden die vorliegenden Daten zur Immunhistochemie und Genetik durch Genexpressions-Analysen erweitert.

Die vergleichende Analyse der Genexpression von FL1/2 und FL3A zeigte eine differentielle Expression in 643 Genen, die v.a. den Proteinmetabolismus (in FL3A hoch exprimiert; u.a.: *PRKAR2A*, *COPB1*, *RANBP9*, *HSP90AA*, *HSPD1*, *DIMT1*, *TPR*) und das Mikromilieu des Tumors (in Zusammenhang mit nicht-malignen „bystander-Zellen“, in FL1/2 Tumoren hoch exprimiert; u.a.: *ZBTB7B*, *CD1E*, *FGFR2*, *IL6ST*, *EPB41*, *FOXP3*, *JAK3*) betrafen. Die Expressionswerte dieser Gruppen zeigten in den FL3A überwiegend eine Überexpression dieser differentiell exprimierten Gene.

Dass sich FL1/2 hinsichtlich ihrer Genexpression von den FL3A unterscheiden, konnte bislang nicht gezeigt werden. Die einzige bis dato vergleichbare Studie von Piccaluga et al.³¹ beschrieb FL1/2 und FL3A hinsichtlich der Genexpression als nicht voneinander trennbar, während sich FL3B von diesen abgrenzten.

Obwohl die vergleichenden Analyse differentiell exprimierter Gene zeigte, dass sich FL1/2 anhand der Expression von 643 Genen deutlich von FL3A unterschieden, wurde zwischen FL3A und FL3B kein Unterschied hinsichtlich der Genexpression beobachtet.

In der bislang einzigen GE-Studie zeigten Piccaluga et al., dass FL1/2 und FL3A anhand von 30 unterschiedlich exprimierten Genen zusammen clustern, während FL3B sich davon abgetrennt gruppieren.

Anhand der vorliegenden Daten konnte dies nicht reproduziert werden. Vielmehr zeigte sich eine signifikante Differenz in der GE zwischen FL1/2 und FL3A, während FL3A den FL3B glichen. Anhand der 12 Gene, die durch die ANOVA-Analyse in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, kann eine allgemeine Zweiteilung der Proben in die Gruppen FL1/2 und FL3A/3B vollzogen werden.

Obwohl Piccaluga et al. ebenfalls reine FL3B untersuchten, werden die FL3A jedoch nicht näher beschrieben. Folglich ist möglich, dass hier sowohl FL3A, als auch die häufig vorkommenden FL3A mit Anteilen von FL1/2 in der Kohorte waren. Nachdem Koch et al.²¹ zeigten, dass sich FL3A und FL3A mit Anteilen von

FL1/2 in ihrem klinischen Verlauf unterscheiden, ist eine differenzierte Betrachtung dieser erforderlich, um unterschiedliche Ergebnisse, wie hier gezeigt, vorzubeugen.

Die Frequenz der *BCL2*-Translokation nimmt mit steigendem histologischen Grad ab, die Frequenz bei FL3B wurde zuvor als 9% angegeben.²³ Gegensätzlich zu diesen publizierten Daten waren 3/6 FL3B (50%) in unserer Kohorte t(14;18)-positiv. Um eine Verfälschung der Ergebnisse aufgrund der hier zufällig erhöhten Frequenz an *BCL2*-translozierten Fällen zu vermeiden, wurden die oben beschriebenen Analysen nochmals mit ausschließlich t(14;18)-negativen FL3B (n=3) durchgeführt. Die dadurch ermittelten Ergebnisse zeigten jedoch keine relevanten Veränderungen, folglich liegt keine relevante Verfälschung durch die scheinbare Überrepräsentierung von t(14;18)-positiven FL3B vor. Auch bei isolierter Betrachtung von ausschließlich FL3A und FL3B konnten diese durch ihre GE nicht voneinander getrennt werden.

Aufgrund der geringen Anzahl an verfügbaren Studien und der niedrigen Fallzahlen ist eine allgemeine Aussage noch nicht möglich. Die vorliegenden Daten weisen jedoch auf eine deutliche Ähnlichkeit zwischen den FL3A und den FL3B hin. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur immunhistochemischen und genetischen Charakteristik der FL, die eine engere Beziehung zwischen FL1/2 und FL3A suggerierten und FL3B als hiervon unterschiedlich zeigten.

Das Konzept der Therapie der FL ist noch nicht gänzlich geklärt. Ob die hier gezeigte ähnliche GE der FL3A und FL3B im Zusammenhang mit dem scheinbar ähnlichen klinischen Verlauf von FL3A und FL3B, wie kürzlich gezeigt²¹, zu sehen ist, bleibt noch zu klären.

4.2.1 Differenziell exprimierte Gene zwischen FL3 und FL1/2

Wie schon erwähnt und wie auch in einem gemeinsam von der „American Association for Cancer Research“ und der „European School of Oncology“

Diskussion

initiierten Arbeit gezeigt, liegt aufgrund der Variabilität des klinischen Verlaufs des FL ein Fokus auf der Suche nach neuen Biomarkern, die eine bessere Stratifizierung des FL in Prognose- bzw. Behandlungsgruppen ermöglicht.³⁹

FL, die einen frühen Progress (POD, *progression of disease*) verzeichnen (innerhalb von 2 Jahren nach Diagnosestellung), stellen eine Risikogruppe dar.⁴⁰ Erste Arbeiten zeigen die Bedeutung des Einschlusses biologischer Marker oder auch Genexpressionsprofile in die Risikostratifizierung von FL-Patienten, die ein frühes Erkennen solcher und eine Anpassung der Therapie ermöglichen.^{29,41,42} Trotzdem stellt sich aktuell noch das Problem einer möglichen Überbehandlung mancher Patienten mit einem zu aggressiven Therapieschema und starken Nebenwirkungen, während andere Patienten in der Hochrisikogruppe eventuell eine angepasste, noch intensivere Therapie benötigen würden.³⁹

Ein besseres Verständnis der molekularbiologischen Beschaffenheit des FL und eine Beschreibung der Unterschiede zwischen verschiedenen FL-Subtypen ist hier unabdingbar.

In den statistischen Berechnungen wurden beim Vergleich der Genexpression der Gruppen FL1/2, FL3A und FL3B 12 Gene identifiziert, die eine Unterscheidung dieser in die Gruppen FL1/2 und FL3A/B ermöglichen. Beim Ausschluss der t(14;18)-positiven FL3B wurden 10 Gene ermittelt, die oben beschriebene Gruppierung zeigte sich auch hier. Alle diese differentiell exprimierten Gene sind in FL3A und FL3B im Vergleich zu den FL1/2 überexprimiert. Von den insgesamt 13 ermittelten Genen konnten 9 Gene in beiden ANOVA-Analysen (mit und ohne t(14;18)-positive FL3B) als signifikant differentiell exprimiert beschrieben werden: *RPP40*, *TMEM5*, *MRE11A*, *TXN*, *COPB1*, *KIF5B*, *GTPBP8*, *TNPO1* und *C1orf27*. Vier Gene waren jeweils nur in einer dieser Analyserunden vorhanden: *CKS2*, *TROVE2* und *TOP2A*, *HILPDA*. Im Folgenden sollen die Gene *MRE11A*, *TXN* und *TOP2A* diskutiert werden. Zu diesen Genen konnten Studien gefunden werden, die diese Gene und die zugehörigen Proteine mit der FL-Pathogenese in Zusammenhang brachten.

4.2.1.1 Homolog, double strand break repair nuclease (MRE11A)

Das Protein MRE11A kommt in jeder DNA-haltigen Zelle des Körpers vor und bildet mit RAD50 und NBS1 den MRN-Komplex. Die Aufgabe dieses Komplexes ist die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen und die Initiation des Reparaturvorgangs, des Weiteren spielt es auch in der Erhaltung der Telomere eine Rolle, ist an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt und stoppt diesen bei vorhandenen DNA-Schäden.⁴³ Der MRN-Komplex spielt ebenfalls eine Rolle in der V(D)J Rekombination, die im Zusammenhang mit der Genese der *BCL2*-Translokation steht.⁴⁴ Ein Funktionsverlust in MRE11A führt zu einer größeren genetischen Instabilität und erhöhten Sensitivität beispielsweise gegenüber einer Bestrahlung.⁴⁴

In einer Studie wurde eine Haplotyp-Variante des *MRE11A* gefunden, die mit einem geringeren Auftreten von FL korrelierte. Untersucht wurden hier sogenannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs: single nucleotide polymorphisms). Schlussfolgernd wurde hier ein möglicher Einfluss von *MRE11A* auf die Pathogenese des NHL allgemein sowie auch auf die Pathogenese des FL diskutiert.⁴⁴ Eine ähnliche Studie zeigte, dass das Zusammenwirken spezifischer *MRE11A* und *NBS1*-SNPs mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines NHL assoziiert sei.⁴⁵

Diese Studien lassen vermuten, dass das Protein MRE11A eine Rolle in der Entstehung von NHL und auch FL spielt. Es bleibt zu klären, ob die beschriebenen *MRE11A*-SNPs möglicherweise auch einen Einfluss auf die MRE11A-Expression nehmen.

4.2.1.2 Thioredoxin (TXN)

Thioredoxin ist ein Protein, das in jedem Organismus vorkommt. Zusammen mit NADPH und der Thioredoxin-Reduktase bildet es einen Komplex, der an vielen Redox-Reaktionen und generell an der Disulfidreduktion beteiligt ist, ähnlich wie Glutathion, das ebenfalls mit NADPH und der Glutathion-Reduktase einen Komplex

bildet. Thioredoxin ist ein durch Stress induzierbares Antioxidans und zusätzlich ein von der Zelle freisetzbare Zytokin und Chemokin für Monozyten, Makrophagen, Neutrophile und T-Zellen.⁴⁶ Des Weiteren soll Thioredoxin auch die Funktion eines Wachstumsfaktors haben^{47,48} und verhindert apoptotische Vorgänge. Dies geschieht zum einen durch die Aufrechterhaltung der Redox-Kapazität der Zelle, zum anderen auch durch Bindung an und Inhibition von ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*), dies jedoch nur in seiner reduzierten Form.⁴⁹ Ein funktionierendes TXN-System ist also Voraussetzung für die Stabilität der Zelle, gleichzeitig wird bei einem Überangebot an Radikalen die Apoptose begünstigt, da TXN dann vor allem im oxigenierten Zustand vorkommt und nicht mehr an ASK1 binden kann.

In vielen Tumoren ist die Expression von TXN und TXN Reduktase im Vergleich zum normalen Gewebe erhöht⁴⁸ und es wird darüber hinaus angenommen, dass die Expression mit der Aggressivität des Tumors korrelieren könne.⁵⁰ In diesen Fällen scheint die Erhöhung mit einer erhöhten Redox-Kapazität, einem Vorliegen von TXN in reduziertem Zustand und somit einer antiapoptotischen Wirkung auf den Tumor einherzugehen.⁵⁰ TXN wird mit dem Hypoxie-induzierten Factor (HIF) in Verbindung gebracht und soll diesen zum einen stabilisieren und zum anderen auch dessen Produktion stimulieren. HIF wiederum induziert Signalwege, die der Proliferation und dem Wachstum von Tumorzellen zuträglich sind und vermittelt zudem die Angiogenese.^{48,51} TXN soll auch den *nuclear factor* κ B (NF- κ B) aktivieren, der unter anderem die Transkription proliferationsfördernder und antiapoptotischer Gene begünstigt.⁵² Bisherige Studien haben gezeigt, dass ein erhöhtes TXN mit einer Resistenz gegen bestimmte Chemotherapeutika, wie Cisplatin und Docetaxel korreliert,^{53,54} jedoch sind diese im Therapieschema des FL nicht enthalten. Fraglich ist hier, ob eine höhere Expression von TXN auch bei FL mit einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapeutika einhergeht.

Im Zusammenhang mit einer Strahlentherapie, wie sie beim FL auch angewandt wird, ist eine erhöhte Expression von TXN-Reduktase wohl von Nachteil. Die Wirkung der Bestrahlung, die oxidativen Stress im Gewebe verursachen soll, ist reduziert und so ist die gewünschte Sensibilisierung für weitere Therapien ebenfalls nicht voll wirksam.⁵⁵

TXN, sowie zu dem TXN-System gehörende Proteine werden schon als potentielle Targets in der Therapie von unterschiedlichen Tumoren gehandelt.⁴⁹ Ein Beispiel hierfür ist SAHA⁵⁶, das in der Therapie des kutanen T-Zell Lymphoms seit 2006 zugelassen ist und TXN indirekt über die induzierte Expression von TBP-2 (*thioredoxin-binding protein-2*) hemmt, das TXN bindet und dadurch inhibiert.^{49,57} Auch bei den FL wäre eine solche Behandlung prinzipiell denkbar, um die Tumorzellen für eine Chemotherapie zu sensibilisieren und die Apoptose zu induzieren.

4.2.1.3 Topoisomerase II alpha (TOP2A)

Die Topoisomerase II alpha gehört zu den Topoisomerasen und kommt in allen DNA-haltigen Zellen und Organismen vor. Sie lockert und löst Helix-Windungen und ist somit im Prozess der Zellteilung besonders aktiv. Besonders erwähnenswert ist die Tatsache, dass die Topoisomerase Angriffspunkt von Anthracyclinen ist, die auch in der Therapie der FL eine Rolle spielen; z.B. findet Doxorubicin im CHOP-Schema Anwendung.

Für einige Tumore, die mit Doxorubicin behandelt werden (u.a. das Mantelzell-Lymphom) wurde gezeigt, dass die Expression von TOP2A mit dem Ansprechen des Tumors auf Doxorubicin korreliert.^{58,59} Auch eine Studie mit FL hat gezeigt, dass die TOP2A-Expression mit dem Ansprechen auf eine Chemotherapie korreliert, dass also eine erhöhte Expression von TOP2A mit einer besseren Wirkung einhergeht.⁶⁰ TOP2A könnte somit hypothetisch ein Enzym sein, das das unterschiedliche Ansprechen von FL1/2 und FL3A auf Therapie mitbestimmen könnte.²¹ Um diese Aussagen zu belegen oder widerlegen bedarf es jedoch weitere Studien, welche die Rolle von TOP2A in den FL untersuchen.

4.3 Vergleich anhand der An- und Abwesenheit von t(14;18)

Neben Unterschieden in der Genexpression, die zwischen FL Grad 1/2 und FL Grad 3 gefunden wurden, konnten auch Unterschiede in der Genexpression zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL gefunden werden. Fraglich war, ob diese Unterschiede in einem kausalen Zusammenhang standen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die differentielle Genexpression, die zwischen FL1/2 und FL3A gefunden wurde, nicht mit dem *BCL2*-Translokationsstatus korreliert. Dies geht daraus hervor, dass einerseits zwischen den Gruppen FL1/2 und FL3A keine signifikante Differenz bezüglich der Häufigkeit der t(14;18) zu finden war (82% vs. 75%), deren Genindices jedoch andererseits eine Differenz aufwiesen (Mittelwert um 0 vs. um 0,5). Die Genexpressionsindices der t(14;18)-positiven und -negativen lagen im Mittel ungefähr gleich.

Im Umkehrschluss können die Unterschiede der Genexpression zwischen den t(14;18)-positiven und -negativen nicht allein auf die Unterschiede zwischen den Graden zurückgeführt werden. GE-Differenzen der verschiedenen FL-Grade und der t(14;18)-positiven und -negativen sind folglich getrennt zu bewerten.

Koch et al. zeigten, dass der Nachweis einer *BCL2*-Translokation für FL3A ein erhöhtes Risiko darstellt, da t(14;18)-positive FL3A einen schlechteren klinischen Verlauf aufwiesen.²¹ Die t(14;18)-Translokation ist mit einer Häufigkeit von 85-90% die häufigste genetische Aberration und die „Hallmark“-Translokation von FL. Bei der t(14;18)-Translokation gerät das *BCL2*-Gen (Chromosom 18) unter die Kontrolle des Promoters des Ig-Schwerketten-Lokus (Chromosom 14) und wird daher konstitutiv exprimiert. Sowohl die t(14;18)-Translokation als auch die damit verbundene Überexpression von *BCL2* sind charakteristisch für das FL. Anhand dieser Translokation allein lassen sich FL jedoch nicht *per se* in Risiko- oder Behandlungsgruppen einteilen.

Anhand der Genexpression der vorliegenden Daten wurden die t(14;18)-Positiven und -Negativen sichtbar in zwei Gruppen geteilt. Unter den t(14;18)-Positiven gab

Diskussion

es jedoch einige Fälle, deren Genexpression der der t(14;18)-Negativen glich, das gleiche galt auch umgekehrt.

Von den hier 68 untersuchten Proben wurden 12 Proben (18%) so „fehlklassifiziert“. Dieser Vergleich zeigt, dass trotz gleichem Translokationsstatus die Genexpression divergieren kann, was folglich auf eine Differenz auf molekularer Ebene hindeutet.

Allgemein zeigten t(14;18)-positive FL einen überwiegend erhöhten Genexpressionsindex der 582 differentiell exprimierten Gene.

Es konnte jedoch schon gezeigt werden, dass sowohl t(14;18)-Positive, als auch t(14;18)-Negative unabhängig von dieser Translokation das betroffene Gen und Protein BCL2 häufig exprimieren. Ott et al.²⁴ beispielsweise hatte in seiner Kohorte 9 FL1/2 mit fehlender *BCL2*-Translokation, jedoch waren 9/9 dieser positiv auf BCL2 getestet worden, lediglich 2 FL3A mit negativer t(14;18) zeigten keine Expression für BCL2.

Auch in den vorliegenden Daten der GE war dies so. Die *BCL2*-Expression variierte nur schwach zwischen t(14;18)-positiven und -negativen.

Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine Überexpression des selben Proteins über ein kryptisches Genrearrangement, eine Amplifikation des Genlokus oder aber ein alternativer Mechanismus für die Überexpression von *BCL2*, jedoch ohne zugrunde liegende Translokation t(14;18).^{24,61}

Ein Vergleich der immunhistochemischen Daten der FL mit denen der Genexpression zeigte, dass FL, die anhand der Genexpression den t(14;18)-positiven zugeordnet wurden, eine stärkere Färbung des Keimzentrumsmarkers CD10 aufwiesen. Wurden die FL mittels Genexpression als t(14;18)-negativ klassifiziert, so war der Post-Keimzentrumsmarker MUM1 verstärkt exprimiert.

Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen von Leich et al. vergleichbar, die ähnliche Marker für t(14;18)-Positive und -Negative sahen.²³ Eine erhöhte Rate an „Fehlklassifikationen“ zwischen FISH- und Genexpressionsanalysen konnte in der Arbeit von Leich und Kollegen⁶² jedoch nicht verzeichnet werden, die für ihren Vergleich jedoch fast ausschließlich FL1/2 und einige wenige FL3A verwendeten. In der vorliegenden Arbeit hingegen flossen beim Vergleich der t(14;18)-Positiven

Diskussion

und -Negativen auch FL3B/DLBCL und DLBCL ein, was ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der „Fehlklassifikation“ sein könnte.

4.4 Ausblick

Die vorliegenden Daten umfassen die bis dato größte Anzahl an reinen FL3B innerhalb einer Genexpressionsstudie und zeigen, dass diese den FL3A ähnlich und nicht von den FL getrennt zu sehen sind. Allerdings ist die vorliegende Arbeit mit nur sechs reinen FL3B doch sehr limitiert und es bedarf weiterer Studien, die eine detaillierte molekularbiologische Analyse dieses Subtyps ermöglichen. Des Weiteren muss die Untersuchung der FL3B auch im Kontext der FL3B+DLBCL und der DLBCL erfolgen, um diese Gruppen, genauer und getrennt voneinander zu definieren, da eine Vielzahl der FL3B in dieser Mischform vorliegen.

Darüber hinaus ist ein Abgleichen der zwischen den FL1/2 und den FL3A/B differentiell exprimierten Gene, mit vorhandenen Datenbanken für Tumore denkbar, um diese ggf. zu validieren. Es wäre von großem Interesse, diese Gene und auch deren Proteinexpression in weiteren Studien mit dem klinischen Verlauf dieser Tumore zu korrelieren und zu prüfen, ob und inwieweit die Expression dieser Gene/Proteine als prognostische Marker dienen und Einfluss auf die Therapie nehmen könnten.

Die *BCL2*-Translokation ist charakterisierend für das FL. Dennoch konnte mit der vorliegenden Arbeit erneut gezeigt werden, dass auch ohne die t(14;18)-Translokation die *BCL2* Expression bei den FL erhöht ist. Hier bedarf es weiterer Studien, die diesen Sachverhalt klären und eventuelle alternative Wege der *BCL2*-Überexpression aufzeigen, die t(14;18)-negative Lymphome mit einer den t(14;18)-positiven ähnlichen Genexpression erscheinen lässt oder auch ein differentes Genexpressionsbild zeigt, das aber ebenfalls zum Phänotyp des FL führt.

Sowohl der Diagnoseprozess, die Wahl und der Zeitpunkt der Therapie, als auch Aussagen über den klinischen Verlauf weisen derzeit ihre Schwierigkeiten auf und es werden weitere Studien benötigt, die Lücken im Verständnis des FL und dessen Progress besser zu verstehen, um auf die genannten Fragen Antworten geben zu können.

Diskussion

Es konnte jedoch erstmalig gezeigt werden, dass FL3B und FL3A mittels Genexpression nicht voneinander zu trennen sind und wohl der gleichen Tumorentität angehören. Desweiteren konnten in der Genexpression neue potentielle Targets in der Therapie des FL identifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Das folliculäre Lymphom (FL) wird nach der aktuellen Klassifikation der WHO (*World Health Organization Classification of Lymphoid Tumours*) anhand der Zahl der Zentroblasten in drei Grade und der Grad 3 weiter in 3A und 3B eingeteilt. Bis heute ist der Aggressivitätsgrad der FL3A/B umstritten und aufgrund der morphologischen und genetischen Unterschiede des FL3B zu den anderen FL wird eine eigene Entität und Pathogenese des FL3B diskutiert. In der Mehrzahl der Studien wurden die Daten zum großen Teil von FL3B mit Anteilen von DLBCL generiert, da das FL3B in seiner reinen Form ein sehr seltener Tumor ist.

Durch das Verbundprojekt „Molekulare Mechanismen in malignen Lymphomen“ (MMML) konnten 6 reine FL3B, 16 reine FL3A und 22 FL1/2, 9 FL3B+DLBCL und 25 *de novo* DLBCL mit nachgewiesener *BCL2*-Translokation anhand von bereits vorliegenden Daten zu FISH-, Genexpressionsanalysen und immunhistochemischen Färbungen bearbeitet werden.

In der vergleichenden Analyse der Genexpression zeigten sich die FL3A anhand von 643 differentiell exprimierten Genen als von den FL1/2 unterschiedlich, FL3A wiesen hier einen erhöhten Genexpressionindex auf. Zwischen FL3A und FL3B konnte jedoch kein Unterschied hinsichtlich der Genexpression beobachtet werden, sie bildeten eine homogene Gruppe. Es konnte eine Abgrenzung der FL1/2 zu den FL3A/B durch die erhöhte Expression von 13 Genen in den FL3A/B gefunden werden, von denen *Homolog, double strand break repair nuclease (MRE11A)*, Topoisomerase II alpha (*TOP2A*) und Thioredoxin (*TXN*) schon zuvor im Rahmen von FL und NHL diskutiert wurden. Weitere Unterschiede zeigten sich zwischen den t(14;18)-positiven und -negativen Lymphomen, die anhand der Genexpression innerhalb dieser Gruppen größtenteils homogen erschienen. Die Genexpression einiger t(14;18)-positiver Lymphome glich jedoch dem der

Zusammenfassung

t(14;18)-negativen Tumoren und umgekehrt, diese wurden als Gruppe von „fehlklassifizierten FL“ bezeichnet (12/68, 18%). Auch die Immunhistochemie war in den t(14;18)-positiven bzw. - negativen FL durchaus ähnlich. So war in der GEP bei t(14;18)-positiven Lymphomen CD10 und bei t(14;18)-negativen Tumoren MUM1 vermehrt exprimiert.

Um allgemeine Aussagen treffen zu können sind die Fallzahlen von FL3B noch zu niedrig, und auch ganz allgemein stehen nur wenige Daten aus Studien mit Genexpressionsanalysen zur Verfügung. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch, dass FL3B als eine Untergruppe von FL zu sehen sind und mit den FL3A eine homogene Gruppe bilden. Diese Gruppe unterscheidet sich anhand der Genexpression auch von FL1/2. Zudem wurde gezeigt, dass das Genexpressions-Profil einiger FL nicht dem typischen Genexpressions-Profil des jeweiligen t(14;18)-Status entspricht.

6 Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis

1. Bühling KJ, Lепенies J, Witt K. *Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. aktual. Aufl. ed. München Jena: Elsevier Urban & Fischer; 2008.
2. Böcker W, Heitz PU. *Pathologie*. 5., vollst. überarb. Aufl. ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2012.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Revised 4th edition ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
4. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390.
5. Canellos GP, Lister TA, Young BD. *The lymphomas*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006.
6. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
7. Hartge P DS, Fraumeni JF Jr. Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. In: *Doll R, Fraumeni JF Jr, Muir CS, eds, Trends in Cancer Incidence and Mortality Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994: 423-53*. 1994.
8. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*. 1997;89(11):3909-3918.
9. Dabbs DJ. *Diagnostic immunohistochemistry*. 2nd ed. Edinburgh ; Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone; 2006.
10. Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010;116(19):3724-3734.
11. Junlen HR, Peterson S, Kimby E, et al. Follicular lymphoma in Sweden: nationwide improved survival in the rituximab era, particularly in elderly women: a Swedish Lymphoma Registry Study. *Leukemia*. 2015;29(3):668-676.
12. Shirley MH, Sayeed S, Barnes I, Finlayson A, Ali R. Incidence of haematological malignancies by ethnic group in England, 2001–7. *British Journal of Haematology*. 2013;163(4):465-477.
13. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006;107(1):265-276.

14. Kumar V, Robbins SL. *Robbins Basic pathology*. 9. ed. ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2013.
15. Jong Dd. Molecular Pathogenesis of Follicular Lymphoma: A Cross Talk of Genetic and Immunologic Factors. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(26):6358-6363.
16. Biagi JJ, Seymour JF. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood*. 2002;99(12):4265-4275.
17. Colon-Otero G, Van Wier SA, Ahmann GJ, et al. Prevalence of BCL-2/J(H) Translocation in Healthy African Americans. *Annals of Hematology*. 2016:1-5.
18. Höglund M, Sehn L, Connors JM, et al. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2004;39(3):195-204.
19. Weigert O, Weinstock DM. The promises and challenges of using gene mutations for patient stratification in follicular lymphoma. *Blood*. 2017.
20. Ioachim HL, Medeiros LJ, Ioachim HL, Ovid Technologies Inc. Ioachim's lymph node pathology. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
21. Koch K, Hoster E, Ziepert M, et al. Clinical, pathological and genetic features of follicular lymphoma grade 3A: a joint analysis of the German low-grade and high-grade lymphoma study groups GLSG and DSHNHL. *Ann Oncol*. 2016;27(7):1323-1329.
22. Lozanski G, Pennell M, Shana'ah A, et al. Inter-reader variability in follicular lymphoma grading: Conventional and digital reading. *Journal of Pathology Informatics*. 2013;4:30.
23. Horn H, Schmelter C, Leich E, et al. Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles. *Haematologica*. 2011;96(9):1327-1334.
24. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*. 2002;99(10):3806-3812.
25. Bosga-Bouwer AG, van den Berg A, Haralambieva E, et al. Molecular, cytogenetic, and immunophenotypic characterization of follicular lymphoma grade 3B; a separate entity or part of the spectrum of diffuse large B-cell lymphoma or follicular lymphoma? *Human Pathology*. 2006;37(5):528-533.
26. Katzenberger T, Ott G, Klein T, Kalla J, Muller-Hermelink HK, Ott MM. Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *Am J Pathol*. 2004;165(2):481-490.
27. Herold G. *Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Herold; 2013.
28. Leich E, Hoster E, Wartenberg M, et al. Similar clinical features in follicular lymphomas with and without breaks in the BCL2 locus. *Leukemia*. 2016;30(4):854-860.

29. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *The Lancet Oncology*. 2015;16(9):1111-1122.
30. Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood*. 2004;104(5):1258-1265.
31. Piccaluga PP, Califano A, Klein U, et al. Gene expression analysis provides a potential rationale for revising the histological grading of follicular lymphomas. *Haematologica*. 2008;93(7):1033-1038.
32. Rodriguez J, McLaughlin P, Hagemester FB, et al. Follicular large cell lymphoma: an aggressive lymphoma that often presents with favorable prognostic features. *Blood*. 1999;93(7):2202-2207.
33. Bartlett NL, Rizeq M, Dorfman RF, Halpern J, Horning SJ. Follicular large-cell lymphoma: intermediate or low grade? *J Clin Oncol*. 1994;12(7):1349-1357.
34. Shustik J, Quinn M, Connors JM, Gascoyne RD, Skinnider B, Sehn LH. Follicular non-Hodgkin lymphoma grades 3A and 3B have a similar outcome and appear incurable with anthracycline-based therapy. *Ann Oncol*. 2011;22(5):1164-1169.
35. Jaffe ES, Cancer IAFRo. *Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 2001.
36. Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. *Br J Haematol*. 2012;156(2):225-233.
37. Wright DH. Updated Kiel classification for lymphomas. *The Journal of Pathology*. 1989;157(4):283-284.
38. Harris NL, Kluin P. Follicular lymphoma grade 3B: is it a real disease? *Haematologica*. 2011;96(9):1244-1246.
39. Gascoyne RD, Nadel B, Pasqualucci L, et al. Follicular lymphoma: State-of-the-art ICML workshop in Lugano 2015. *Hematol Oncol*. 2017.
40. Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, et al. Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J Clin Oncol*. 2015;33(23):2516-2522.
41. Jurinovic V, Kridel R, Staiger AM, et al. Clinicogenetic risk models predict early progression of follicular lymphoma after first-line immunochemotherapy. *Blood*. 2016;128(8):1112-1120.
42. Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJM, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood*. 2005;105(1):301-307.
43. Lamarche BJ, Orazio NI, Weitzman MD. The MRN complex in Double-Strand Break Repair and Telomere Maintenance. *FEBS letters*. 2010;584(17):3682-3695.
44. Rollinson S, Kesby H, Morgan GJ. Haplotypic variation in MRE11, RAD50 and NBS1 and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2006;47(12):2567-2583.

45. Rendleman J, Antipin Y, Reva B, et al. Genetic Variation in DNA Repair Pathways and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *PLoS ONE*. 2014;9(7):e101685.
46. Banerjee R. Redox biochemistry. Online-Ausg. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Wiley-Interscience; 2008.
47. Powis G, Oblong JE, Gasdaska PY, Berggren M, Hill SR, Kirkpatrick DL. The thioredoxin/thioredoxin reductase redox system and control of cell growth. *Oncol Res*. 1994;6(10-11):539-544.
48. Berggren M, Gallegos A, Gasdaska JR, Gasdaska PY, Warneke J, Powis G. Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res*. 1996;16(6B):3459-3466.
49. Tonissen KF, Di Trapani G. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009;53(1):87-103.
50. Lincoln DT, Ali Emadi EM, Tonissen KF, Clarke FM. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Res*. 2003;23(3B):2425-2433.
51. Evens AM, Schumacker PT, Helenowski IB, et al. Hypoxia-Inducible Factor-Alpha Activation in Lymphoma and Relationship to the Thioredoxin Family. *British journal of haematology*. 2008;141(5):676-680.
52. Pasanen AK, Kuitunen H, Haapasaari KM, et al. Expression and prognostic evaluation of oxidative stress markers in an immunohistochemical study of B-cell derived lymphomas. *Leukemia & lymphoma*. 2012;53(4):624-631.
53. Yamada M, Tomida A, Yoshikawa H, Taketani Y, Tsuruo T. Increased expression of thioredoxin/adult T-cell leukemia-derived factor in cisplatin-resistant human cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 1996;2(2):427-432.
54. Kim SJ, Miyoshi Y, Taguchi T, et al. High thioredoxin expression is associated with resistance to docetaxel in primary breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(23):8425-8430.
55. Smart DK, Ortiz KL, Mattson D, et al. Thioredoxin Reductase as a Potential Molecular Target for Anticancer Agents That Induce Oxidative Stress. *Cancer Research*. 2004;64(18):6716-6724.
56. Butler LM, Zhou X, Xu WS, et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11700-11705.
57. Marks PA. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene*. 2007;26(9):1351-1356.
58. Schrader C, Meusers P, Brittinger G, et al. Topoisomerase II[alpha] expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. *Leukemia*. 2004;18(7):1200-1206.
59. Järvinen TAH, Tanner M, Rantanen V, et al. Amplification and Deletion of Topoisomerase II α Associate with ErbB-2 Amplification and Affect Sensitivity to Topoisomerase II Inhibitor Doxorubicin in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*. 2000;156(3):839-847.

Literaturverzeichnis und Abbildungsverzeichnis

60. Björck E, Ek S, Landgren O, et al. High expression of cyclin B1 predicts a favorable outcome in patients with follicular lymphoma. *Blood*. 2005;105(7):2908-2915.
61. Vaandrager J-W, Schuurin E, Philippon K, Kluin PM. V(D)J recombinase-mediated transposition of the *BCL2* gene to the *IGH* locus in follicular lymphoma. *Blood*. 2000;96(5):1947-1952.
62. Leich E, Salaverria I, Bea S, et al. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood*. 2009;114(4):826-834.

7 Lebenslauf

Name Raphael Martin Witzig

E-mail raphael.witzig@stud-mail.uni-wuerzburg.de

Nationalität Deutsch

Geburtsort Ludwigsburg

Klinische Erfahrung

Arzt in Weiterbildung

Datum seit Dezember 2017

Abteilung Kardiologie (RMK Winnenden)

Praktisches Jahr

Datum Mai 2015 - April 2016

- Schwerpunkte**
- Innere Medizin (Klinikum Ludwigsburg)
 - Chirurgie (Klinikum Ludwigsburg)
 - Pädiatrie (Uniklinik Würzburg)

Famulaturen

Zeitraum April 2012 - April 2015

- Schwerpunkte**
- Strahlenmedizin (Station und Labor, Uniklinik Würzburg)
 - Anästhesie (OP und Intensivstation, Klinikum Ludwigsburg)
 - Viszeralchirurgie (Klinikum Ludwigsburg)
 - Internistische Notaufnahme (Klinikum Ludwigsburg)

Rettungsdienst / Zivildienst

Datum Juli 2009 - April 2010

Ort Rettungsdienst Ludwigsburg,
Deutsches Rotes Kreuz

Lebenslauf

Bildung

Strukturiertes Promotionsstudium

Titel	Identifikation und Charakterisierung von Progressionsfaktoren Follikulärer Non-Hodgkin Lymphome in einem Kollektiv des Verbundprojektes "Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen" (MMML)
Zeitraum	Oktober 2016 - März 2018
Ort	Institut für Klinische Pathologie, Robert-Bosch-Krankenhaus. Promotionsstudium an der Universität Würzburg
Doktorvater	Prof. Dr. G. Ott
Betreuerin	Dr. H. Horn
Abschluss	Kolloquium 11.12.2018, „cum laude“

Studium Humanmedizin

Datum	April 2010 - September 2016
Ort	Universität Würzburg
Abschluss	Ärztliche Prüfung, "gut"

Schulbildung

Datum	September 1996 - Juni 2009
Ort	Ludwigsburg
Abschluss	Allgemeine Hochschulreife, "sehr gut"

Sprachkenntnisse

Muttersprache	Deutsch
verhandlungssicher	Englisch (Medical English Language Certificate, Universität Würzburg)

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Andreas Rosenwald bedanken, der es mir ermöglichte meine Doktorarbeit im pathologischen Institut der Universität Würzburg anzufertigen.

Einen weiteren großen Dank möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. German Ott, den Leiter der Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart, aussprechen, der immer mit konstruktiver Kritik zur Seite stand und dafür sorgte, dass die Doktorarbeit reibungsfrei ausgearbeitet werden konnte.

Meiner Betreuerin Dr. Heike Horn vom Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart danke ich ganz besonders für ihre herausragende, immer konstruktive und freundliche Unterstützung bei der Umsetzung der Doktorarbeit.

Ich möchte zudem Christian Kohler von der Universität Regensburg für die Unterstützung bei den statistischen Ausarbeitungen danken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen des Projektes „Molekulare Mechanismen in malignen Lymphomen“ (MMML) bedanken, die diese Doktorarbeit möglich gemacht haben.

Einen großen Dank möchte ich an dieser Stelle auch meiner ganzen Familie aussprechen, die mich während der ganzen Zeit unterstützt und mir oft den Rücken freigehalten hat und der ich in meinem Leben einfach so viel zu verdanken habe.