

Aus dem Institut für Pathologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Alfred C. Feller

**Molekulargenetische und immunhistochemische  
Charakterisierung von primär  
extranodalen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen  
der Schilddrüse**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck  
- Sektion Medizin -

Vorgelegt von

**Juliana Knief**  
aus Hannover

Lübeck  
Februar 2015



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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Saleh Ibrahim

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.10.2015

Promotionskommission der Sektion Medizin



Meinen Eltern  
In Liebe und Dankbarkeit



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	LYMPHOMME DER SCHILDDRÜSE.....	1
1.2	MOLEKULARE MERKMALE EPITHELIALER SCHILDDRÜSENNEOPLASIEN .....	2
1.3	KLINISCHE ASPEKTE DIFFUSER GROßZELLIGER B-ZELL LYMPHOME.....	3
1.4	IMMUNHISTOCHEMISCHE MERKMALE DIFFUSER GROßZELLIGER B-ZELL-LYMPHOME.....	5
1.5	MOLEKULARE MERKMALE DIFFUSER GROßZELLIGER B-ZELL-LYMPHOME .....	7
1.6	MYD88 .....	10
1.7	FRAGESTELLUNG .....	10
<b>2</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>11</b>
2.1	PATIENTENPROBEN .....	11
2.2	MORPHOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE AUFARBEITUNG .....	11
2.3	DNA-ISOLIERUNG AUS FORMALIN-FIXIERTEM UND IN PARAFFIN EINGEBETTETEM GEWEBE .....	13
2.4	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	14
2.5	SANGERSEQUENZIERUNG .....	15
2.6	PYROSEQUENZIERUNG .....	16
2.7	ARRAY-CGH .....	17
2.8	FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (BCL2, BCL6, CMYC).....	19
2.9	MATERIALIEN .....	20
2.10	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	20
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>21</b>
3.1	PATIENTENCHARAKTERISTIKA .....	21
3.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN .....	23
3.3	PYROSEQUENZIERUNG FÜR MYD88 .....	26
3.4	BRAF- UND NRAS- MUTATIONSHÄUFIGKEIT .....	26
3.5	ACGH-ERGEBNISSE .....	27
3.5.1	<i>Beobachtungen im Gesamtkollektiv</i> .....	27
3.5.2	<i>DLBCL vom GCB-Typ</i> .....	29
3.5.3	<i>DLBCL vom non-GCB-Typ</i> .....	30
3.5.4	<i>Unterschiede bezüglich detektierter chromosomaler Aberrationen in beiden Gruppen</i> .....	31
3.6	FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG FÜR BCL2, BCL6 UND CMYC.....	32
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>57</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aCGH - array comparative genomic hybridization  
A.d. – Aqua destillata  
AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome  
B-ALL – akute lymphatische Leukämie der B-Zell Reihe  
B-CLL - chronische lymphatische Leukämie (der B-Zell Reihe)  
BRAF - B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase  
DNA - Deoxyribonucleic acid  
DLBCL – diffus großzelliges B-Zell Lymphom  
EtOH - Ethanol  
FFPE – formalin-fixed paraffin-embedded  
FISH – Fluoreszenz in-situ Hybridisierung  
GCB-Typ – germinal center B-cell like-Typ  
HE - Hämatoxylin-Eosin  
HIV – humanes Immundefizienz Virus  
IP-DLBCL – DLBCL immunprivilegiertes Lokalisationen  
LDH - Laktatdehydrogenase  
MALT-Lymphom - Mucosa-Associated-Lymphoid-Tissue Lymphoma  
MAPK - Mitogen-activated protein kinase  
mg – Milligramm  
min - Minute  
ml - Milliliter  
NFKappaB - nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells  
OS - overall survival  
OT - Objektträger  
PCR – Polymerase Kettenreaktion  
ptDLBCL – primär thyreoidales diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom  
RAS - Rat sarcoma Protoonkogen  
rpm – rounds per minute  
RNA - ribonucleic acid  
RT – Raumtemperatur  
sek - Sekunde  
µl - Mikroliter

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 *Lymphome der Schilddrüse*

Primäre Lymphome der Schilddrüse sind seltene Tumoren und machen im Untersuchungsgut des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck weniger als 1 % aller Schilddrüsenneoplasien aus. In der Literatur wird eine Häufigkeit von weniger als 3%, bezogen auf extranodale Lymphome bzw. 5%, bezogen auf bösartige Schilddrüsen-Neoplasien angegeben [1]. Zumeist sind Personen mittleren Alters betroffen, das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung liegt bei etwa 64 Jahren [2]. Das Verhältnis betroffener Frauen und Männer schwankt je nach Publikation, in einigen Studien beträgt die Ratio 2:1, in anderen bis zu 14:1 [3, 4]. Die Mehrzahl weist eine zugrunde liegende lymphozytäre Thyreoiditis (Hashimoto-Thyreoiditis) auf [2, 5], die Latenz zur Lymphomentstehung beträgt im Mittel 20 – 30 Jahre, wobei das Risiko für die Entwicklung eines Schilddrüsen-Lymphoms 40 – 80 mal höher als in der Normalbevölkerung ist [6, 7]. Lediglich ein kleiner Teil der Patienten (<7 % der Fälle) besitzt keine nachgewiesene Hashimoto-Assoziation, als mögliche Ursache wird hier eine inadäquate Erfassung des Gewebes (sog. „sampling error“) diskutiert [2].

98 % der primären Schilddrüsen-Lymphome sind B-Zell-Ursprungs [8], in lediglich 2 % finden sich T-Zell-Lymphome [6, 9, 10]. Innerhalb der Gruppe der B-Zell-Lymphome finden sich in absteigender Häufigkeit diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (ptDLBCL, etwa 50 – 70 % [4]), Marginalzonen-Lymphome (23 – 30 % [11]), follikuläre Lymphome und kleinzellige lymphozytische Lymphome (SLL) [8, 11], seltener auch Hodgkin- oder Burkitt-Lymphome [12]. Klinisch fallen die Betroffenen durch einen schnell wachsenden Tumor, z. T. mit Obstruktionssymptomatik (Heiserkeit, Dyspnoe, Dysphagie) auf, daneben auch durch eine zervikale Lymphadenopathie, seltener eine B-Symptomatik [4, 12, 13] oder kalte Knoten der Schilddrüse (keine oder verminderte Anreicherung von radioaktivem Jod –  $^{131}\text{I}$  - in der Schilddrüsenzintigraphie als hypofunktioneller Bezirk). Meist liegt eine euthyreote Stoffwechsellage vor, bis zu 10 % der Fälle weisen eine Hypothyreose auf [11].

Der Großteil der Patienten (bis zu 90 %) befindet sich bei Diagnosestellung in einem lokalisierten Stadium der Erkrankung (sog. „Early Stage Disease“) [14]. Bei extrathyreoidaler Beteiligung sind gehäuft das Knochenmark, der Gastrointestinaltrakt, die Lunge, Leber oder Harnblase befallen.

## 1.2 Molekulare Merkmale epithelialer Schilddrüsenneoplasien

In epithelialen Schilddrüsenneoplasien (sowohl benigne als auch maligne) sind als häufigste molekulare Aberrationen *BRAF*- und *RAS*-Mutationen beschrieben, zusammengenommen lassen sich diese in 70 % aller papillären und follikulären Schilddrüsenneoplasien detektieren [15].

Bei *BRAF* handelt es sich um ein Onkogen (Serin-/Threonin-Kinase), das als sog. „Downstream“-Molekül einen Teil des *RAS/MAPK*- sowie des *RET*-Signalweges darstellt [16, 17]. Die häufigste *BRAF*-Mutation (etwa 90 % der Fälle) besteht in einem Aminosäureaustausch von Valin zu Glutaminsäure an Position 600 in Exon 15 des *BRAF*-Gens (p.V600E-Mutation) [16, 18]. Diese Mutation ist in etwa 7 - 8 % aller bösartigen Tumoren zu finden [19], unter anderem in Melanomen und Haarzell-Leukämien, daneben auch in Kolon- und Rektum-, Schilddrüsen- und Ovarialkarzinomen [19-23].

Insgesamt wird der *BRAF*-Mutation ein niedriges onkogenes Potential zugeschrieben, das etwa 50-mal niedriger als das onkogene Potential von *HRAS*-Mutationen ist [17].

Bei Schilddrüsenneoplasien ist eine *BRAF*-Mutation häufiger mit Rezidiven, höheren T-Stadien, extrathyreoidaler Ausbreitung, Lymphknotenmetastasen und papillären Karzinomen assoziiert, allerdings nicht mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen [17, 24-26].

Die Familie der *RAS*-Proteine umfasst verschiedene Proto-Onkogene (für maligne Tumoren sind *KRAS*, *NRAS* und *HRAS* von Bedeutung), die in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen als Schaltmoleküle fungieren und Einfluss auf Zellwachstums- und -differenzierungsprozesse nehmen sowie in verschiedenen nachgeschalteten Signalkaskaden (z.B. *MAPK*-Weg) von Bedeutung sind [27, 28]. Neben einer direkten Einflussnahme auf den Zellzyklus mit Immortalisierung der Zellen werden onkogenen *RAS*-Mutationen weitere Effekte zugeschrieben (Veränderungen in der Mikroumgebung der Tumorzellen, prometastatische und metabolische Wirkungen) [29, 30]. *RAS*-Mutationen finden sich nahezu ausschließlich in den Codons 12, 13 (*KRAS*, *HRAS*) und 61 (*NRAS*) [28], sind vermehrt in follikulären Schilddrüsenkarzinomen beschrieben und lassen sich weniger oft in papillären Neoplasien nachweisen [15, 25, 31, 32]. In verschiedenen Studien lässt sich eine positive Korrelation des *RAS*-Mutationsstatus mit dem Vorhandensein von Metastasen – im Speziellen in knöchernen Strukturen – feststellen [33, 34].

Zudem handelt es sich bei *BRAF* und *NRAS* um Mutationen, die in der Regel nicht gemeinsam auftreten [17].

Mithilfe von aCGH-Analysen lassen sich in epithelialen Schilddrüsenneoplasien folgende häufige chromosomale Aberrationen feststellen: 1p, 1q, 4q, 5q, 9q, 13q, 17q und 22q (Zugewinne in papillären Schilddrüsenkarzinomen), 9q, 13q, 17p und 22q (Verluste in papillären Schilddrüsenkarzinomen) [35, 36]. In anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen zeigen sich vermehrt Zugewinne in den Regionen 7p, 8q, 9q, 20p und 20q [37].

### ***1.3 Klinische Aspekte diffuser großzelliger B-Zell Lymphome***

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) stellen mit einem Anteil von 25 - 40 % weltweit die häufigsten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome dar und machen zudem knapp 80-90 % aller hochmalignen Lymphome aus [38, 39]. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt in der 7. Lebensdekade bei etwa 64 Jahren, wobei sich eine minimale (Prä)-Dominanz des männlichen Geschlechts zeigt (Ratio m:w 1,2:1) [40]. Zwischen Personen unterschiedlicher ethnischer Gruppen lassen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Prävalenz bzw. Inzidenz feststellen [41-46].

Der Großteil aller DLBCL entsteht de novo. Eindeutige Risikofaktoren, die für die Entwicklung prädisponieren, sind bislang nicht bekannt. Diskutiert werden jedoch neben Umwelteinflüssen - wie der Anwendung bestimmter Pestizide - sowohl Ernährungsfaktoren und -gewohnheiten als auch die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung [47, 48]. Selten findet sich eine zu Grunde liegende, angeborene oder erworbene Immundefizienz (z.B. bei HIV-Infektion als sog. AIDS-definierende Erkrankung) [49].

Seltener entstehen sekundäre DLBCL, bei denen meist eine Transformation aus einem simultan auftretenden oder präexistenten, niedrigmalignen (sog. indolenten) Lymphom vorliegt. Als zugrunde liegende Entitäten finden sich neben follikulären Lymphomen [50] eine chronische lymphatische Leukämie (B-CLL mit sog. Richter-Transformation), lymphoplasmozytische Lymphome, MALT-Lymphome und Marginalzonenlymphome, seltener ist eine Entstehung aus einem nodulären lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphom oder klassischem Hodgkin-Lymphom beschrieben [45, 51]. In Einzelfällen gehen T-Zell-Lymphome, meist angioimmunoblastische T-Zell-Lymphome, voraus [52, 53]. Bei solchen sekundär entstandenen DLBCL können im Randbereich Anteile des zugrunde liegenden Lymphoms nachweisbar sein [54], gelegentlich findet sich ein Nebeneinander niedrig- und hochmaligner Anteile [55].

Der größte Teil diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome nimmt seinen Ursprung in den Lymphknoten (primär nodale Manifestation), etwa 30% zeigen einen primär extranodalen Befall [56]. Gehäuft sind sowohl der Gastrointestinaltrakt als auch der Waldeyer'sche Rachenring (als sekundäres lymphatisches Organ) betroffen, prinzipiell sind primär extranodale Manifestationen jedoch in jedem Organ möglich. 71 % aller Patienten entwickeln im Krankheitsverlauf auch bei primär nodalem Befall extranodale Läsionen als Ausdruck einer systemischen Ausbreitung in fortgeschrittenen Krankheitsstadien [57].

Als Erfassungssystem zur Ausbreitungsdiagnostik maligner Lymphome (sowohl von Hodgkin- als auch von Non-Hodgkin-Lymphomen) hat sich die sog. Ann-Arbor-Klassifikation bewährt, die anhand des Befallsmusters definierter Lymphknotenregionen eine Aussage zum klinischen

Stadium, der weitergehenden Prognose und nachfolgenden Behandlungsstrategien ermöglicht. Es werden insgesamt vier Stadien registriert, bewertet werden die infiltrierten Lymphknotenstationen, das Vorhandensein bzw. Fehlen von Allgemeinsymptomen und ein extralymphatischer bzw. extranodaler Befall. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Ann-Arbor-Klassifikation.

Eine Spezifizierung der extralymphatischen Organmanifestationen bzw. die Beteiligung einzelner Organe wird üblicherweise nicht erfasst [58], was zu Einschränkungen der Beurteilbarkeit primär extranodaler oder exklusiv extranodaler Lymphome führt. Zudem finden sich spezielle Lymphome (hier sind MALT-Lymphome zu nennen), die nicht nach diesem Schema klassifiziert werden, sodass auch diese Gruppe zu einer erschwerten Beurteilbarkeit bzw. Inhomogenität in der Stadieneinteilung führt [59].

**Tabelle 1 Ann-Arbor-Klassifikation zur Stadieneinteilung der Non-Hodgkin-Lymphome (modifiziert nach [58]):**

Stadium	Primär nodale oder extranodale Manifestation
I	Befall einer einzigen Lymphknotenregion (I <sub>N</sub> ) oder Vorliegen eines einzigen oder lokalisierten extranodalen Herdes (I <sub>E</sub> )
II	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II <sub>N</sub> ) oder Vorliegen lokalisierter extranodaler Herde (II <sub>E</sub> ) und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II <sub>NE</sub> )
III	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III <sub>N</sub> ) oder Befall von lokalisierten extranodalen Herden und Lymphknotenbefall (III <sub>E</sub> oder III <sub>NE</sub> )
III <sub>1</sub>	Subphrenische Lokalisation, beschränkt auf Milz, zöliakale und/oder portale Lymphknoten
III <sub>2</sub>	Subphrenische Lokalisation mit Beteiligung paraaortaler, mesenterialer, iliakaler und/oder inguinaler Lymphknoten
IV	Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Lymphknotenbefall
Zum lymphatischen Gewebe gehören: Lymphknoten, Thymus, Waldeyer'scher Rachenring, Appendix vermiformis.	
<u>Zusatz:</u>	
A: Fehlen von Allgemeinsymptomen.	
B: Mit Fieber (> 38°C) u./o. Nachtschweiß u./o. Gewichtsverlust (> 10 % in den letzten 6 Monaten).	

Der klinische Verlauf diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome ist aggressiv, ohne Therapie tritt der Tod der Patienten oft bereits 1-2 Jahre nach Diagnosestellung ein. Durch eine gezielte therapeutische Intervention – mittels Chemotherapie nach dem CHOP- oder R-CHOP-Regime (eine Kombinationstherapie aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon mit bzw. ohne Rituximab) - ist die Erkrankung potentiell kurabel, die Raten kompletter Remissionen liegen bei 40 - 63% (CHOP-Therapie) [44, 60, 61] bzw. bei 76 % (R-CHOP) [61]. Die 5-Jahres-Überlebensrate wird durch Zugabe von Rituximab (einem monoklonalen Antikörper gegen das CD20-Antigen [62]) um etwa 15 - 20 % verbessert [38, 60, 62].

## ***1.4 Immunhistochemische Merkmale diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome***

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome zeigen immunhistochemisch im Regelfall eine durchgehende Expression von CD45 (Tyrosinphosphatase, die auf allen Leukozyten exprimiert wird) sowie von einer Reihe sog. „Pan-B-Zell-Marker“ (CD19, CD20, CD22, CD79a, PAX5). In 50-75 % der Fälle findet sich eine oberflächliche oder zytoplasmatische Immunglobulin-Expression (IgM > IgG > IgA [63]). T-Zell-Marker sind auf den Lymphomzellen negativ. Eine CD10-Expression findet sich in 20 – 40 % der Fälle, in 50% ist eine Expression von bcl2 zu beobachten, zudem sind etwa 60-90 % der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome bcl6-positiv [64]. Etwa 10% zeigen eine CD5-Expression [57]. CD138 wird sehr variabel exprimiert (studienabhängig bei 39 % bzw. 16 % der Patienten nachweisbar) und ist mit schlechten Überlebensraten assoziiert [65, 66]. Die Proliferationsrate (gemessen an Ki-67) liegt regelhaft bei über 20 %, bleibt aber meist unter 90 %.

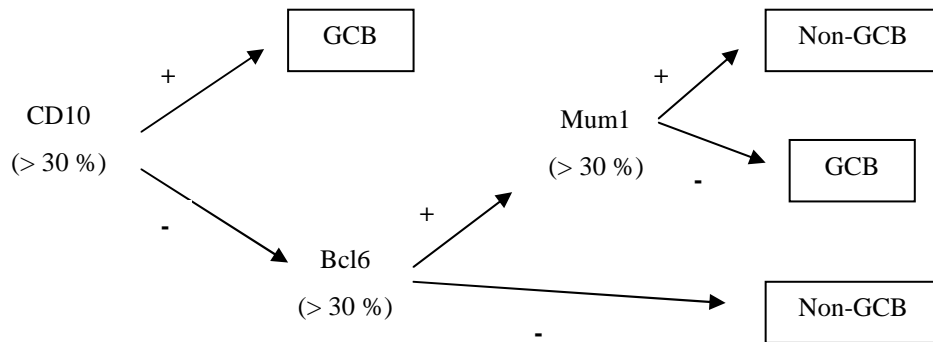
Mithilfe von Gen-Expressionsanalysen wurden innerhalb der DLBCL zwei Gruppen identifiziert, die sich hinsichtlich ihres Expressionsprofils und ihrer Prognose unterscheiden [67].

Es folgten immunhistochemische Algorithmen zur Unterscheidung dieser Gruppen: Die erste Gruppe zeigt ein Expressionsmuster, das Keimzentrums-(germinalen) B-Lymphozyten ähnelt (Expression von CD10, bcl6) und deshalb als GCB-Typ bezeichnet wird [45, 67]. Die zweite Gruppe ähnelt aktivierten B-Zellen (mit Expression von Mum1) und wird als non-GCB-Typ bezeichnet [67, 68]. Nach Ergebnissen von Expressionsanalysen existiert eine dritte heterogene Gruppe, deren biologisches Verhalten den non-GCB-Typen ähnelt und deshalb meist diesen zugeordnet wird [69].

Die beiden gebräuchlichsten immunhistochemischen Schemata sind der Hans- bzw. Choi-Algorithmus, daneben existieren zahlreiche weitere Systematiken (beispielsweise die Algorithmen nach Colomo, Muris, Tally oder Visco-Young). Die Konkordanz mit zuvor erhobenen Genexpressionsprofilen ist uneinheitlich: Einige Arbeiten zeigen exzellente Übereinstimmungen, andere Studien konnten diese nicht belegen [68, 70, 71].

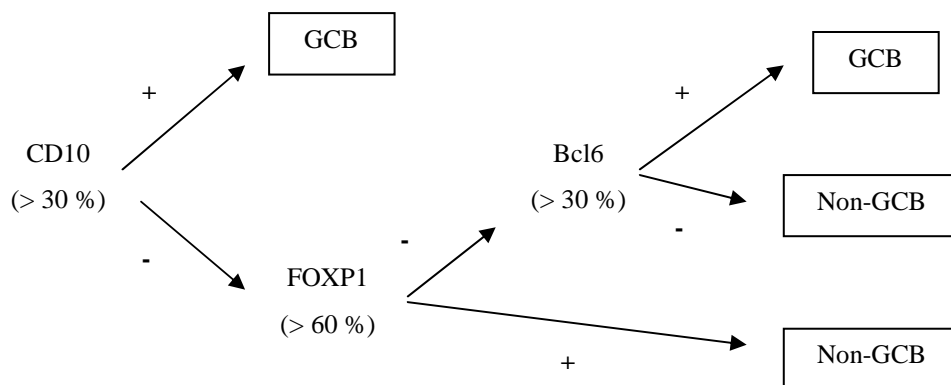
Beim Hans-Algorithmus finden Antikörper gegen CD10, bcl6 und Mum1 Verwendung: Alle Fälle mit CD10-Expression oder Koexpression von bcl6 und CD10 werden dem GCB-Typ zugeordnet. Bei Negativität beider Marker gehört der Fall der non-GCB-Gruppe an. Bei CD10-Negativität und bcl6-Positivität entscheidet die Mum1-Expression über die Gruppenzugehörigkeit.

Diagramm 1 bildet den Hans-Algorithmus ab.



**Diagramm 1 Hans-Algorithmus zur Klassifikation diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome in den GCB- und non-GCB-Typ (Immunhistochemische Färbungen für CD10, bcl6 und Mum1), positive Färbereaktion (+), negative Färbereaktion (-) mit Angabe der Grenzwerte (in Prozent).**

Eine Erweiterung stellt der Visco-Young-Algorithmus dar, der zusätzlich die FOXP1-Expression (bzw. -Negativität) der Tumorzellen mit einbezieht (der Cut-Off-Wert für eine als positiv zu wertende Expression liegt bei 60 % positiv reagierender Tumorzellen) [72]. FOXP1 ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl in zahlreichen epithelialen Tumoren als auch in MALT-Lymphomen und DLBCL dereguliert ist und zu einer möglichen Tumorsuppressorregion (in der chromosomalen Region 3p14.1) korreliert [73, 74]. Eine Expression von FOXP1 ist mit DLBCL des non-GCB-Typs assoziiert [75] und stellt einen negativen prognostischen Faktor dar [75, 76]. Diagramm 2 bildet den Visco-Young-Algorithmus ab.



**Diagramm 2 Visco-Young-Algorithmus zur Klassifikation diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome in den GCB- und non-GCB-Typ (Immunhistochemische Färbungen für CD10, bcl6 und FOXP1); positive Färbereaktion (+), negative Färbereaktion (-) mit Angabe der Grenzwerte (in Prozent).**

## 1.5 Molekulare Merkmale diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome

In etwa 12 – 30 % aller DLBCL sind *BCL2*-Rearrangements (im Sinne einer t(14;18)-Translokation) nachweisbar, diese finden sich häufiger bei primär nodalen als primär extranodalen DLBCL [77] und lassen sich gehäuft im GCB-Typ feststellen [78]. *BCL2* führt zu einer Inhibierung der Apoptose und dem durch Chemotherapeutika ausgelösten Zelltod [77], was eine Immortalisierung der Zellen bewirkt.

Etwa 30 - 50 % aller DLBCL-Patienten zeigen *BCL6*-Rearrangements, hiervon findet sich nur ein kleiner Teil in primär extranodalen DLBCL (etwa 7 % dieser Fälle) [79]. *BCL6* (zytogenetische Lage: 3q27) kodiert für einen Transkriptions-Repressor [80], der die Aktivität des Tumorsuppressorgens *TP53* (Apoptose-Induktor) hemmt und zu einer Immortalisierung der Zellen führt [77, 78, 81, 82].

Seltener treten *cMYC*-Rearrangements auf (Transkriptionsfaktor, dessen onkogene Aktivierung besonders in Burkitt-Lymphomen beschrieben ist [77]): Als „Single-hit“-Konstellation (d.h. ein *cMYC*-Rearrangement ist das einzige Ereignis) findet sie sich in etwa 6 - 14 % aller DLBCL [83, 84], vermehrt in primär extranodalen Fällen (16 % vs. 2 % bei primär nodalen DLBCL) [77].

Daneben zeigen etwa 4 % aller DLBCL „Double“- oder „Triple-hit“-Konstellationen, bei denen zwei bzw. drei Rearrangements gemeinsam vorliegen: Meist handelt es sich um eine Kombination von *cMYC* und *BCL2* [83].

Auch ein Teil der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome weist Mutationen im *BRAF*- und *NRAS*-Gen auf: Für *BRAF* beträgt die Mutationsfrequenz etwa 6,0 % (dabei sind gehäuft andere als die „klassische“ p.V600E-Mutation zu finden, beispielsweise p.G468R) [85], speziell in ptDLBCL wurden *BRAF*-Mutationen (Exon 15) in 32 % der untersuchten Fälle nachgewiesen. Die häufigsten Mutationen betrafen dabei (in absteigender Häufigkeit): p.D594G, p.K601N und p.V600E. In derselben Studie zeigte sich für ptDLBCL eine Mutationsfrequenz des *NRAS*-Gens von 8 %, alle nachgewiesenen Mutationen fanden sich in Exon 2, Codon 61 (p.Q61K bzw. p.Q61H) [31]. Insgesamt fanden sich *NRAS*-Mutationen häufiger in non-GCB-Typen, *BRAF*-Mutationen häufiger im GCB-Typ [31].

Bei 90 % aller DLBCL sind mit zytogenetischen Studien abnorme Karyotypen nachweisbar [86], rekurrente chromosomale Translokationen werden insbesondere in der Region 14q32, entsprechend dem Schwerkettenloкус beobachtet [39, 87].

Arbeiten, die mittels Array-CGH-Analyse chromosomale Imbalancen in DLBCL untersucht haben, zeigen für unterschiedliche Studienpopulationen folgende Ergebnisse:

In extranodalen DLBCL sind Zugewinne rekurrent in den Regionen 7q11.23, 7q21, 8q22, 8q24, 11q12.2-q13.1, 12p13.2, 12q24, 14q11.2, 18q21.31, 19p13.3-p12, 22q13 und Xq21.33-q26.2 zu finden, während Verluste sich in den Regionen 1q32, 3q13, 5p15, 6p21, 6q14.1-6q27, 7p21.1, 8p23.1, 9p21.3, 14q32.2 und 18q22 zeigen [88, 89]. Hier wurden überwiegend extranodale DLBCL des Gastrointestinaltraktes sowie der Kopf-Hals-Region untersucht.

Bei DLBCL des zentralen Nervensystems und primär kutanen DLBCL (sog. leg-type-Lymphomen) finden sich wiederkehrend Zugewinne in 1q32, 7p, 7q, 8q24, 11q, 18q und 22q13, Verluste in den Regionen 6p21, 14q32 und Xq [90].

Nodale DLBCL und DLBCL sog. immunprivilegierter Lokalisationen (testikuläre und ZNS-Lymphome) zeigen unter anderem rekurrente Zugewinne in den Regionen 1q32.1, 3q13, 3q24, 7, 12q, 12q24, 13q22, 18q12, 18q22 und Xq25, während Verluste sich in 1p34, 1q32, 6p21, 6q23, 8p22, 9q23, 17p12, 19p13 und 22q finden [91, 92].

Ebenso finden sich Studien, die Aberrationen in DLBCL der GCB- und non-GCB-Typen aufzeigen: Bei DLBCL vom GCB-Typ finden sich Zugewinne unter anderem in den Regionen 1q22-q32, 3q13, 6p21-23, 7p21.1, 7q11, 8q22-q26 und 12q21-q24, Verluste rekurrent in 5p15.33, 8q24, 13q12-q22, 18q22 und 22q13. Bei non-GCB-Fällen zeigen sich Zugewinne in 1q32, 3q13, 6p21, 7p21.1, 7q22-31.1, 8q21-q26, 12q24 und 18q21, Verluste in den Regionen 5p15, 8q24, 9p21.3 und 14q32 [93, 94].

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht chromosomaler Aberrationen in nodalen und extranodalen DLBCL verschiedener Lokalisationen sowie DLBCL des GCB- und non-GCB-Typs.

**Tabelle 2** Gegenüberstellung ausgewählter, wiederkehrender chromosomaler Aberrationen in nodalen und extranodalen DLBCL unterschiedlicher Lokalisationen [82, 88, 90, 91] sowie DLBCL des GCB- und non-GCB-Typs [93, 94]. Farblegende: Die blaue Färbung ■ steht für Zugewinne, eine rote ■ für Verluste genetischen Materials, während gelb ■ für Zugewinne und Verluste steht. Eine weiße Färbung □ zeigt nicht rekurrent veränderte Regionen bzw. Regionen ohne entsprechende Angaben in der zitierten Literatur.

Chromosomale Region	Extranodale DLBCL [88, 89]	Primär kutane und zerebrale DLBCL [90]	Nodale DLBCL und DLBCL immunprivilegiertes Lokalisationen [91, 92]	DLBCL vom GCB-Typ [93, 94]	DLBCL vom non-GCB-Typ [93, 94]
1p34			■		
1q32	■	■	■	■	■
3q13	■		■	■	
3q24			■		
5p15.33-p15.32	■			■	■
6p21	■	■	■	■	■
6q14.1-6q27	■				
6q23			■		
7			■		
7p21.1	■	■		■	■
7q11.23	■	■		■	
7q21	■				
8p22			■		
8p23.1	■				
8q22	■			■	■
8q24	■	■		■	■
9p21.3	■				■
9q23			■		
11q12.2-q13.1	■	■			
12p13.2	■				
12q			■		
12q24	■		■	■	■
13q22			■	■	
14q11.2	■				
14q32	■	■			■
17p12			■		
18q12			■		
18q21.31	■				■
18q22	■	■	■	■	
19p13.3-p12	■		■		
22q			■		
22q13	■	■		■	
Xq21.33-q26.2	■	■			
Xq25			■		

## 1.6 *MYD88*

Bei *MYD88* handelt es sich um ein Adapterprotein, das eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Signalen spielt, die durch den Toll-like-Rezeptor (TLR) bzw. Interleukin1 und Interleukin18 vermittelt werden [95, 96]. Es handelt sich um eine Upstream-Komponente im NFkappaB-Weg [97], die über verschiedene Mechanismen zu einer Zell-Immortalisierung führt [95, 98]. Eine Inhibierung von *MYD88* führt zu vermehrter Apoptose und vermindert die Zellproliferation [96]. Über zahlreiche proinflammatorische Mechanismen wird *MYD88* eine Rolle in Tumorentstehung und –unterhaltung zugeschrieben [99].

Die häufigste *MYD88*-Mutation findet sich in Exon 5 und besteht aus einem Basenaustausch (c.794T>C), der zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt (p.L265P-Mutation) [95]. Mutationen im *MYD88*-Gen sind unter anderem in kutanen DLBCL mit einer Frequenz von 61 - 69 % beschrieben [100], zudem finden sie sich gehäuft in DLBCL immunprivilegierter Lokalisationen [98]: In 75 % der ZNS-Lymphome bzw. 71 % der Hoden-Lymphome, in gastrointestinalen und nodalen DLBCL hingegen lediglich in 11 % bzw. 17 %. Weitere Studien zeigen bei der Gesamtheit diffuser großzelliger B-Zell Lymphome eine Mutationshäufigkeit von 6,5 %, nahezu ausschließlich finden sich – wie auch in anderen Studien - non-GCB-Typen [95, 98, 101].

## 1.7 *Fragestellung*

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome sind weltweit die häufigsten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome und stellen eine heterogene Gruppe dar. DLBCL verschiedener Lokalisationen und Subtypen variieren in Bezug auf die klinische Präsentation, die Prognose und molekulare Merkmale wie chromosomale Aberrationen und Translokationen.

Epitheliale Schilddrüsenneoplasien weisen charakteristischerweise Mutationen im *BRAF*- und *NRAS*-Gen auf, die eine positive Korrelation mit einigen klinischen Parametern und dem Vorhandensein oder Fehlen von Nodal- und Fernmetastasen zeigen.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels Array-CGH, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (für *BCL2*, *BCL6* und *cMYC*) und Pyro- sowie Sangersequenzierung ausgewählter Onkogene (*NRAS*, *BRAF*, *MYD88*) ein genetisches Profil primär extranodaler diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome der Schilddrüse (ptDLBCL) zu erstellen und einen Vergleich mit bereits publizierten Daten in Bezug auf epitheliale Schilddrüsenneoplasien und DLBCL anderer Lokalisationen zu ermöglichen.

## **2    METHODEN**

### ***2.1    Patientenproben***

Es wurden 21 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben (FFPE) von 21 Patienten mit primären DLBCL der Schilddrüse (ptDLBCL) für die Studie rekrutiert, die keine primäre Manifestationen in Lymphknoten zeigten (primär extranodale Lymphome).

Alle Gewebeproben stammen aus den Archiven der Pathologie des UKSH, Campus Lübeck der Jahre 2001 - 2013.

Alle Proben nebst der zugehörigen klinischen Daten wurden nach der Rekrutierung für die Studie im Sinne der eingereichten Ethikanzeige bei der Ethikkommission der Universität zu Lübeck (AZ 13-182A) einer umgehenden Anonymisierung unterzogen.

### ***2.2    Morphologische und immunhistochemische Aufarbeitung***

Die morphologische Aufarbeitung der Proben erfolgte an Hämatoxylin-Eosin- sowie Giemsa-gefärbten Paraffinschnitten. Des Weiteren wurden für jeden Fall eine Gomori-Versilberung und PAS-Reaktion durchgeführt.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde mittels des Unitma QuickRay®-Systems ein Tissue MicroArray (TMA) angefertigt. Von jeder Probe wurde eine 1,5 mm große Stanze des Tumorgewebes entnommen. Die Auswahl der Tumorzellareale erfolgte anhand eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Paraffinschnittes; es wurde ein repräsentatives Areal mit höchstmöglichem vitalem Tumorzellgehalt gewählt. Mithilfe eines Rotationsmikrotoms erfolgte anschließend die Anfertigung von Schnittpräparaten mit einer Stärke von 1,5 µm.

Für die immunhistochemischen Analysen wurde das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Die notwendigen Inkubations- und Waschschrte wurden mit dem TechMate™-Automaten von DAKO (Glostrup, Dänemark) durchgeführt, die Färbungen mittels des Menarini Bond Max. Die Antigendemaskierung erfolgte mit Puffern verschiedener pH-Werte (sog. „Epitope Retrieval“-Lösung: Citrat- bzw. EDTA-Puffer mit einem pH-Wert von 6,0 bzw. 9,0). Alle Färbungen sowie die Anfertigung der Schnittpräparate wurden von Mitarbeitern/innen des Labors für hämatologische Diagnostik des Instituts für Pathologie in Lübeck durchgeführt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte durch vier Untersucher in einem Konsensusverfahren (A.C. Feller, C. Thorns, N. Gebauer, J. Knief) in Analogie zum Hans- bzw. Visco-Young-Algorithmus (Diagramm 1, Diagramm 2). Zudem wurden - in Übereinstimmung mit der gängigen WHO-Klassifikation - die folgenden Kriterien von den o.g. Untersuchern beurteilt: Diffuses Wachstumsmuster, blastäres Zellinfiltrat, B-Zell-Phänotyp, Proliferationsrate (MiB1-Färbung) > 40 %.

Es kamen Primärantikörper der Firmen Dako, NCL Menarini, Epitomics und Thermo gegen folgende Epitope zur Anwendung: CD20, CD10, bcl2, bcl6, FOXP1, Mum1 und MiB1 (Tabelle 3).

**Tabelle 3 Für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendete Antikörper mit Angabe des Klons, der Verdünnung und der Art der Vorbehandlung. <sup>1</sup> Dako, Glostrup, Dänemark; <sup>2</sup> Menarini Diagnostics, Berlin, Deutschland; <sup>3</sup> Epitomics, Burlingame, USA; <sup>4</sup> Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland.**

Antikörper	Hersteller	Klon	Verdünnung	Vorbehandlung
CD20	Dako <sup>1</sup>	L26	1:800	Epitope Retrieval Solution 2, pH 9,0
CD10	NCL Menarini <sup>2</sup>	56C6	1:30	Epitope Retrieval Solution 1, pH 6,0
bcl2	Epitomics <sup>3</sup>	E17	1:100	Epitope Retrieval Solution 2, pH 9,0
bcl6	Dako <sup>1</sup>	PG-B6p	1:10	Epitope Retrieval Solution 1, pH 6,0
FOXP1	Thermo <sup>4</sup>	polyklonal	1:200	Epitope Retrieval Solution 2, pH 9,0
MiB1	Dako <sup>1</sup>	MiB 1	1:500	Epitope Retrieval Solution 2, pH 9,0
Mum1	Dako <sup>1</sup>	Mum1-P	1:400	Epitope Retrieval Solution 2, pH 9,0

## 2.3 DNA-Isolierung aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

Zur Isolierung chromosomaler DNA wurde FFPE-Material verwendet. Die DNA-Isolierung und -Quantifizierung erfolgte mithilfe des QiaAmp MiniKit 250 (Verwendung nach Herstellerangaben). Der DNA-Gehalt der jeweiligen Probe wurde mit Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) ermittelt. Tabelle 4 zeigt die Arbeitsschritte zur DNA-Isolierung.

**Tabelle 4 Arbeitsschritte zur DNA-Isolierung aus FFPE-Gewebe.**

Arbeitsschritt	Vorgehen
<b>Vorbereitung der Paraffinröllchen</b>	Herstellung eines Paraffinröllchens (mindestens 3 x 10 µm) am Rotationsmikrotom. Das Paraffinröllchen wird in ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorfcup überführt. Anfertigung eines HE-gefärbten Kontrollschnittes (Rotationsmikrotom).
<b>Entparaffinierung der Röllchen</b>	Zu jeder Probe werden 1000 µL Xylol zugegeben, die Probe vortexen und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 Minuten. Abnahme des Xylolüberstandes. Bei sehr viel Material einmalige Wiederholung des gesamten Vorganges. Nach der letzten Xylolüberstandabnahme bei 13000 rpm kurz zentrifugieren und Reste des Xylols aus Eppendorfcup mittels Pipette entnehmen. Zugabe von 1000 µl 100% Ethanol, vortexen und bei 13000 rpm 3 Minuten zentrifugieren. Abnahme des Überstandes. Bei sehr viel Material einmalige Wiederholung des gesamten Vorganges. Nach der letzten Ethanolüberstandabnahme bei 13000 rpm kurz zentrifugieren und Reste des Ethanols aus Eppendorfcup mittels Pipette entnehmen. Trocknen der Proben bei 56 °C für mindestens 15 Minuten (maximal 1 Stunde in Abhängigkeit von der Materialmenge). Zugabe von 180 µL ATL Puffer und 30 µl Proteinase K. Vortexen und mindestens 2 Tage bei 56 °C bei 1000 rpm im Thermomixer inkubieren.
<b>Aufbereitung der Proben nach Qiagen</b>	Nach der Inkubation: Zugabe von 200 µl Puffer AL, kurz vortexen. Inkubation bei 70°C für 1 Stunde, anschließend kurz zentrifugieren und Zugabe von 200 µl Ethanol p. A. absolut zur Probe. Die Probe mit Präzipitat auf Elutionssäule (in 2 ml Tube) überführen. Danach 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren. Das Säulchen in ein neues 2 ml Tube stecken, 500 µl Puffer AW1 zugeben, und bei 8000 rpm 1 Minute zentrifugieren. Säulchen danach in ein weiteres 2 ml Tube stellen, 500 µl Puffer AW2 zugeben und bei maximaler Geschwindigkeit (13000 rpm) 3 Minuten zentrifugieren. Das Säulchen in das vorbereitete, beschriftete 1,5 ml Eppendorfcup stecken. Auf die Elutionssäule 100 µl AE Puffer geben und die Probe 20-25 Minuten bei Raumtemperatur belassen. 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren, anschließend Säulchen verwerfen und Eppendorfcup schließen.
<b>Messung des DNA-Gehaltes mit Nanodrop ND-1000</b>	Am Computer innerhalb des Nanodrop-Programms „Nucleic Acid Measurement“ wählen. Für die Kalibrierung wird 2 µl AE Puffer eingesetzt. Danach 2 µl der Probe auftragen und mit „Measure“ bestätigen. Reinigung nach jeder Messung. Sobald die letzte Probe gemessen wurde, Nanodrop mit 70% Ethanol säubern und mit A.d. nachreinigen.

## 2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In jeder PCR wurden zwischen 20 und 100ng DNA der jeweiligen Probe eingesetzt. Für die durchgeführte PCR wurde ein Totalvolumen von 25µl angesetzt. Hierbei handelte es sich um den folgenden, in Tabelle 5 aufgeführten Mix (unter Verwendung des PyroMark PCR MasterMix Kits):

**Tabelle 5 Für die PCR verwendeter Ansatz unter Verwendung des PyroMark PCR MasterMix Kits.**

Reagenz	Menge
PyroMark MasterMix 2x	12,5 µl
RNasefreeWater	7 µl
CoralLoadConcentrate 10x	2,5µl
Forward-Primer	1µl
Reverse-Primer	1µl
20 ng DNA verdünnt	1µl
Total:	25 µl

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte anschließend apparativ im Thermocycler unter Verwendung des in Tabelle 6 aufgeführten PCR-Programmes:

**Tabelle 6 Verwendetes PCR-Programm unter Angabe der Arbeitsschritte, der Temperatur, der Zeitdauer und Anzahl der durchgeführten Zyklen.**

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94°C	15 min	1
Denaturierung	94°C	30 sek	44
Primerhybridisierung	57°C	30 sek	
Elongation und DNA-Synthese	72°C	45 sek	
Elongation und DNA-Synthese	72°C	4 min	1
Abkühlung	4°C	-	-

Sowohl die erforderliche PCR für die anschließende Sanger- als auch für die Pyrosequenzierung wurden mit dem o.g. Programm und unter Einsatz der jeweiligen Primer durchgeführt.

Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch in einem Agarosegel (1,5 %) aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht (Laufzeit ca. 35 min bei 100 Volt).

## 2.5 Sangersequenzierung

Die molekularpathologische Untersuchung von Exon 15 des *BRAF*-Gens sowie von Exon 2, 3 und 4 des *NRAS*-Gens auf Sequenzveränderungen erfolgte mittels Sangersequenzierung auf dem Kapillarsequenzierer CEQ 8800 (Beckmann Coulter) mit der Herstellersoftware CEQ Genome Lab.

Tabelle 7 zeigt die hierbei verwendeten Primer.

**Tabelle 7 Für die Sangersequenzierung verwendete Primer des BRAF-Gens (Exon 15) und des NRAS-Gens (Exon 2, 3 und 4) mit Angabe der Primersequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsstränge.**

Primer	Sequenz
<i>BRAF</i> Exon 15 forward	5'- CCTAAACTCTTCATAATGCTTGCTC-3'
<i>BRAF</i> Exon 15 reverse	5'- TCTAGTAACTCAGCAGCATCTC-3'
<i>NRAS</i> Exon 2 forward	5'- AGAACCAAATGGAAGGTCACAC-3'
<i>NRAS</i> Exon 2 reverse	5'- CGACAAGTGAGAGACAGGATC-3'
<i>NRAS</i> Exon 3 forward	5'- CTCCTCCCTGCCCCCTTACC -3'
<i>NRAS</i> Exon 3 reverse	5'- CTTCCCTAGTGTGGTAACCTC -3'
<i>NRAS</i> Exon 4 forward	5'- CATGTTGCCCAGGCTAATCTC -3'
<i>NRAS</i> Exon 4 reverse	5'- CAACTGATGCAAACCTCTGCAC -3'

Die verwendeten Primer wurden mit der Software Seqworks.exe erstellt und in der Datenbank ensemble.com auf ihre Einsatzfähigkeit überprüft.

Tabelle 8 zeigt die Arbeitsschritte der Sangersequenzierung.

**Tabelle 8 Arbeitsschritte zur Sangersequenzierung auf dem Kapillarsequenzierer CEQ 8800.**

Arbeitsschritt	Vorgehen
<b>Aufreinigung der PCR-Produkte</b>	Überführen der PCR-Produkte in eine 96 Well Platte, pro Well 30µl Ampure XPbeads zugeben. Zehnmalige Resuspension mit der Pipette und Belassen bei Raumtemperatur (5 min). Platte für 5 min in den Magnetständer stellen und danach den Überstand abnehmen. Proben mit 100µl 70% EtOH, dann mit 150µl 70% EtOH und erneut mit 100µl 70% EtOH je 30 sek benetzen. EtOH abnehmen und jede Probe in 50µl Wasser resuspendieren. 5 min bei Raumtemperatur belassen, danach 30µl der gereinigten Probe in eine neue Platte überführen.
<b>Sequenzier-Reaktion</b>	In einer neuen 96 Well Platte die Sequenzier-Reaktion mit folgenden Reagenzien ansetzen: Je 1µl Forward- oder Reverse-Primer, 4µl DTCS, 2,5µl H <sub>2</sub> O und 2,5µl aufgereinigtes PCR-Produkt. Starten des Thermocycler-Programmes (Tab.8).
<b>Aufreinigung der Sequenzierungs-Produkte</b>	Nach der Sequenzier-Reaktion im Thermocycler: Zugabe von 10µl Agencourt clean seqbeads zu jeder Probe sowie Zugabe von 45µl 85% EtOH, zehnmalige Resuspension. Für 5 min bei Raumtemperatur und weitere 5 min im Magnetständer belassen. Überstandabnahme, dann Waschen mit je 100µl 85% EtOH, 150µl 85% EtOH und weiteren 150µl 85% EtOH für je 30 sek. Überstandabnahme, Resuspension in 50µl SLS. Nach 5 min im Magnetständer 40µl in eine neue 96 Well Platte überführen und mit einem Tropfen Öl überschichten. Zusätzlich die Wells in einer Pufferplatte mit 200µl Puffer befüllen. Analyse der Sequenzierung im Gerät (CEQ 8800, Beckmann Coulter) starten.

Die Direktsequenzierung für die jeweiligen Proben erfolgt nach dem in Tabelle 9 gezeigten Thermocycler Programm im Thermocycler (Biometra T-1 Thermoblock):

**Tabelle 9 Verwendetes Thermocycler-Programm im Rahmen der Sangersequenzierung unter Angabe der Temperatur, der Zeitdauer und Anzahl der durchgeführten Zyklen.**

Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
96°C	20 sek	30
50°C	20 sek	
60°C	4 min	
4°C	-	-

## 2.6 Pyrosequenzierung

Die DNA-Extraktion wurde mit dem QiaAmp Mini Kit 250 durchgeführt (Protokoll siehe Tabelle 4). Die darauf folgende PCR wurde wie in Abschnitt 2.4 durchgeführt. Für die Untersuchung des *MYD88*-Gens auf die Mutation p.L265P in Exon 5 erfolgte dann eine Pyrosequenzierung auf dem PyroMark Q24 System von Qiagen.

Hierfür wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Primer verwendet.

**Tabelle 10 Für die Pyrosequenzierung verwendete Primer des MYD88-Gens (Exon 5) mit Angabe der Sequenzen des Vorwärts- und Rückwärtsstranges sowie des Sequenzierungsprimers.**

Primer	Sequenz
MYD88 Exon 5 forward	5'-GAATGTGTGCCAGGGGTACTT-3'
MYD88 Exon 5 reverse	5'-biotin-TCAGGATGCTGGGGAAGTC-3'
MYD88 Exon 5 Sequenzierungsprimer	5'-CCCATCAGAAGCGAC-3'

Diese Primer wurden mithilfe der Software PyroMark Assay Design erstellt.

Für die Sequenzierung auf dem PyroMark Q24 System wurden die in Tabelle 11 dargestellten Arbeitsschritte durchgeführt.

**Tabelle 11 Arbeitsschritte zur Pyrosequenzierung auf dem PyroMark Q24 System (Qiagen).**

Arbeitsschritt	Vorgehen
<b>Vorbereitung</b>	Heizplatte auf 80°C vorheizen. Pipettieren von 40 µl PyroMark PCR Bindungspuffer, 28 µl H <sub>2</sub> O, 10 µl PCR-Produkt und 2 µl Sepharose-Beads in eine 96 Well Platte (sog. Immobilisierungsplatte) und auf dem Schüttler befestigen. 20 min bei 1400 rpm bei Raumtemperatur schütteln. In einer Pyromarkplatte wird die Sequenzier-Reaktion mit 0,5 µl Sequenzierprimer und 24,5 µl PyroMark Annealing-Puffer angesetzt. Anschließend wird die Waschstation nach Angaben des Herstellers vorbereitet und befüllt (mit H <sub>2</sub> O, EtOH, Waschpuffer und Denaturierungs-Solution). Vortexen der Nukleotide und Einfüllen in die Kartusche. Sequenzierplatte in die Waschstation einsetzen.
<b>Aufreinigung</b>	Immobilisierungsplatte vom Schüttler nehmen und ebenfalls in die Waschstation einsetzen. Sofort mit der Aufreinigung nach Angaben des Herstellers beginnen: PCR-Produkte 15 sek aus der Well Platte absaugen und 5 sek in EtOH, dann 5 sek in Denaturierungs-Solution, anschließend 10 sek in Waschpuffer waschen (jeweils mit eingeschaltetem Vakuum). Ohne Vakuum die Beads in die Sequenzierplatte „schütteln“. Danach Sequenzierplatte für 2 min auf der Heizplatte platzieren, dann für 5 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Anschließend den Vakuum-Sauger mit H <sub>2</sub> O spülen. Einsetzen in den PyroMark und starten des Laufes.
<b>Auswertung</b>	Auswertung mittels Software PyroMark Q24 2.0.6.20: 100 reads pro Probe für ein gut verwertbares Ergebnis notwendig. <5 % veränderter DNA bedeutet keine Mutation, bei 5-9 % veränderter DNA handelt es sich um sog. Grenzfälle, ab 10 % veränderter DNA liegt definitiv eine Mutation vor.

## 2.7 Array-CGH

Die aCGH-Analyse der Proben zur Karyotypisierung und Analyse numerischer und struktureller Chromosomenanomalien (Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Translokationen) erfolgte mittels eines Surescan high-resolution DNA-Microarray Scanners (Agilent Technologies Inc.)

unter Verwendung geschlechtsspezifisch korrelierter Referenz-DNA (Agilent Technologies Inc.) und 180 K Oligo Arrays (Agilent Technologies Inc.). In Tabelle 12 sind die Arbeitsschritte zur aCGH dargestellt.

**Tabelle 12 Arbeitsschritte bei der Array-CGH-Analyse.**

Arbeitsschritt	Vorgehen
<b>Probenmarkierung</b>	Drei Heizblöcke auf 37°C, 65°C und 95°C vorheizen. Proben 1 min zentrifugieren. Zu 26 µl der Probe 5 µl Random-Primer hinzugeben und vortexen. 10 min bei 95°C inkubieren, danach 5 min auf Eis abkühlen. Proben erneut 1 min zentrifugieren. Markieren der Probe mit Labeling-Mix (für eine Probe je 1 Mix mit Cyanine 5-dUTP und für die Referenz-DNA 1 Mix mit Cyanine 3-dUTP ansetzen). Dieser besteht aus 10 µl Reaktionspuffer, 5 µl dNTPs, 3 µl Cyanine 5 bzw. Cyanine 3 und 1 µl Exo(-)Klenow (insgesamt 19 µl). Gesamtvolumen (50 µl) vortexen und 2 Stunden bei 37°C inkubieren (nicht schütteln), weitere 10 min bei 65°C inkubieren und anschließend auf Eis lagern.
<b>Aufreinigung der markierten DANN</b>	Zentrifugieren der Proben für 1 min bei 6000 rpm. 430 µl TE (pH-Wert 8,0) zur Probe geben und die gesamte Probe auf die Säule überführen. 10 min bei 14000 rpm zentrifugieren. 480 µl TE (pH-Wert 8,0) zur Säule geben und 10 min bei 14000 rpm zentrifugieren. Die Säulen umgedreht in neue Eppendorfcups geben und 1 min bei 1000 rpm zentrifugieren. Testung der Probe und Überprüfen der Konzentration mittels Nanodrop (Zielparameter: 20-32 µl Probenmaterial). Verwerfen der Säulen. Berechnung des Yield („Ertrag“), ggf. Angleichung an Kontrolle (Zielparameter: Yield x „degree of Labeling“ sollen bei Probe und Kontrolle in etwa gleich sein). Anschließend anhand der berechneten Volumina Zusammenführung von Kontrolle und Probe mit einem Zielwert von 39 µl.
<b>Ansetzen des Hybridization Master Mix</b>	71 µl des Hybridization Master Mix werden in jede Probe überführt, gemischt und anzentrifugiert. Der Master Mix für eine Probe besteht aus: 5 µl Cot-1 DNA (1,0 mg/mL), 11 µl aCGH Blocking Agent und 55 µl HI-RPM Hybridization Buffer. Anschließend werden die Proben 3 min bei 95°C inkubiert, daraufhin für 30 min bei 37°C. Die gesamten 110 µl pro Probe (Master Mix und markierte, gereinigte DNA) werden auf einen Objektträger gegeben, mit der Arrayplatte bedeckt und für 48 Stunden bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert.
<b>Waschen der Objektträger</b>	Trennen von Objektträger und Platte in einem separaten Gefäß (gefüllt mit Pufferlösung 1), dann bei Raumtemperatur 5 min auf den Magnetrührer stellen. Überführen in Pufferlösung 2 und Inkubation für 2 min bei 37°C. Überführen in ein 50 ml Falconröhrchen mit Acetonitril für 1 min. Für 30 sek Überführung in Stabilitätslösung und Drying Solution. Überführen in mit Alufolie umwickelte Falconröhrchen.
<b>Scannen der Proben (Agilent Scanner)</b>	Nach Selbsttest des Scanners Starten der Agilent Scan Control Software. Entriegeln und Bestücken des Scanners mit Objektträgerhaltern. Start des Scans. Folgende Profile werden gewählt: Agilent G3 CGH; Resolution: 3 µm double pass; Tiff: 16 bit; Start Slot 1 – End Slot... (Anzahl der Objektträger).
<b>Auswertung</b>	Die Auswertung erfolgt anhand der Software.

## 2.8 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (*BCL2*, *BCL6*, *cMYC*)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Untersuchung auf Bruchereignisse in den Genloci für *BCL2*, *BCL6* und *cMYC* erfolgte an dem Material der TMAs. Die Auswertung fand nach Dunkeladaptation mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axioskop von Zeiss) und Filtern der Firma Vysis statt. Für jede Probe wurden mindestens 60 Zellkerne ausgezählt, als Grenzwert für ein Bruchereignis wurden 10 % Splitsignale veranschlagt. Verwendung fanden die in Tabelle 13 aufgeführten Sonden der Firma Abbott/Vysis (Sondenaufbau in Abbildung 4 – 6 im Anhang).

**Tabelle 13 Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendete Breakpart-Sonden.**

Sonde	Hersteller/Firma
<i>LSI/BCL2</i> -Breakapart	Abbott/Vysis
<i>LSI/BCL6</i> -Breakapart	Abbott/Vysis
<i>LSI/CMYC</i> -Breakapart	Abbott/Vysis

Zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden folgende Arbeitsschritte (Tabelle 14) durchgeführt.

**Tabelle 14 Arbeitsschritte bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.**

Arbeitsschritt	Vorgehen
<b>Aufbringen des Materials auf den Objektträger</b>	Auf silanisierte Objektträger (OT) werden Paraffinschnitte von 5 $\mu$ - 20 $\mu$ Stärke aufgebracht. Diese werden über Nacht bei 37 °C getrocknet.
<b>Entparaffinierung der Objektträger</b>	Zweimalige Inkubation der Objektträger mit Xylol (für jeweils 10 min). Zweimaliges Spülen in Xylol (jeweils 10min). Einmaliges Spülen in 100 % EtOH, anschließend Spülen in absteigender Alkoholreihe mit jeweils 100 %, 85 % und 70 % Ethanol (für je 2 min). Waschen in destilliertem Wasser für 5 min.
<b>Antigendemaskierung</b>	Kochen der Objektträger in 1 Liter 1mM EDTA-Puffer (2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 auf 1l A.d.) im Dampfkochtopf. Auf höchster Druckstufe 2 min kochen und anschließend den Topf im Waschbecken unter laufendem, kaltem Leitungswasser von außen abkühlen, Dampf entweichen lassen. Öffnen des Deckels und Einfüllen von kaltem Leitungswasser. Objektträger dann bei Raumtemperatur 2 min in A.d. waschen.
<b>Pepsinverdau</b>	Zugabe von 2 ml 1M HCL in 200 ml A.d. und 1 ml Pepsin. Inkubation bei 37°C (30 min).
<b>Fixierung</b>	Waschen in A.d. für 1 min. Fixierung in 1 % Paraformaldehyd für 2 min. Anschließend 1 min in A.d. waschen. Waschen der OT in aufsteigender Alkoholreihe mit 70 %, 85 % und 100 % EtOH (für jeweils 2 min). Lufttrocknen der Objektträger für 10 Minuten.
<b>Hybridisierung</b>	Pipettieren von 2 $\mu$ l Sondenverdünnung auf das zuvor markierte zu hybridisierende Areal. Auflegen eines runden Deckglases (Durchmesser 10-13 mm), Fixierung mit Fixogum. Denaturierung im 80 °C heißen Wasserbad für 30 min. Hybridisierung für 72 Stunden im Hybridisierungsöfen bei 37 °C.

## **2.9 Materialien**

Eine ausführliche, tabellarische Aufstellung der Materialien, die in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der o.g. Methoden Verwendung fanden, findet sich im Anhang (Tabelle 22 - 27).

## **2.10 Statistische Auswertung**

Für die statistische Analyse wurde, abhängig von der Beschaffenheit der zu untersuchenden Daten, ein ungepaarter t-Test (Zweistichproben-t-Test) bzw. ein Z-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde im Folgenden ein  $p$ -Wert von  $< 0,05$  gewertet.

Die Durchführung der statistischen Tests erfolgte mittels Erstellung eines Excel-Datenblattes und unter Verwendung der GraphPad Software (QuickCalcs, Freeware, 2014).

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 *Patientencharakteristika*

Das Geschlechterverhältnis der 21 Proben betrug 3,2:1 (w:m). Der Altersmittelwert lag bei 67,3 Jahren (Altersspanne 46 - 89 Jahre), der Median bei 72 Jahren.

Alle Proben stammten aus der Schilddrüse, bei 11 Patienten waren in den Archiven zudem ein oder mehrere Beckenkamm-Stanzzyylinder vorhanden (Fälle 1, 3, 7 – 9, 13, 15 – 18 und 20) - diese zeigten keine Lymphom-Infiltrate. In drei Fällen fanden sich (Partial-) Infiltrate mitübersandter zervikaler Lymphknoten sowie eine partiell infiltrierte Nebenschilddrüse (Fall 1, 17 und 18).

Bei 4 Patienten war eine zugrundeliegende lymphozytäre Thyreoiditis bekannt oder konnte im Untersuchungsgut nachgewiesen werden (Fall 1, Fall 11, Fall 12, Fall 19). Eine Struma colloidosa lag bei 2 Patienten vor (Fall 6, Fall 7). In einem Fall bestand ein Marine-Lenhart-Syndrom (zeitgleiches Auftreten einer Hyperthyreose und einer Autoimmunerkrankung der Schilddrüse) mit Erhöhung der mikrosomalen Antikörper im Serum (Fall 15). Für die übrigen Fälle waren keine solchen Daten verfügbar.

Ein zugrundeliegendes niedrigmalignes (follikuläres) Lymphom war in 5 Fällen (Fall 2, Fall 4, Fall 10, Fall 17, Fall 20) in der Vorgeschichte bekannt.

Es fand sich ein dokumentierter Todesfall mit Obduktion im Institut für Pathologie des UKSH, Campus Lübeck (Fall 17, Obduktion 110 Tage nach Diagnosestellung des Lymphoms). Tumorrestgewebe war nach dreimaliger R-CHOP-Behandlung nicht mehr nachweisbar, die Patientin befand sich pathologisch in kompletter Remission (der Lymphomkrankung).

Bei den übrigen Fällen standen keine Daten im Rahmen der klinischen Nachbeobachtung (Follow-Up-Daten) zur Verfügung.

Tabelle 15 bildet einige der o.g. Charakteristika der untersuchten Kohorte ab.

**Tabelle 15 Patientencharakteristika der untersuchten Fälle mit Angabe des Patientenalters, des Geschlechtes (m:männlich bzw. w:weiblich) und ggf. zugrundeliegender lymphozytärer Thyreoiditis bzw. zugrundeliegendem follikulärem Lymphom.**

Fall	Patientenalter	Geschlecht	Zugrundeliegende lymphozytäre Thyreoiditis	Zugrundeliegendes follikuläres Lymphom
1	51	w	+	-
2	52	w	-	+
3	89	w	-	-
4	77	w	-	+
5	77	w	-	-
6	64	m	-	-
7	75	m	-	-
8	72	w	-	-
9	72	w	-	-
10	82	w	-	+
11	65	w	+	-
12	60	m	+	-
13	46	w	-	-
14	66	w	-	-
15	54	w	-	-
16	74	w	-	-
17	76	w	-	+
18	52	m	-	-
19	82	w	+	-
20	79	w	-	+
21	48	m	-	-

### 3.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Durch Bestimmung der immunhistochemischen Expression von CD10, bcl6, Mum1 und FOXP1 erfolgte anhand der Algorithmen nach Hans bzw. Visco-Young und den hiernach jeweils geltenden Grenzwerten (vgl. Diag. 1 und 2) eine Unterscheidung der Proben in GCB- bzw. non-GCB-Typ.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen dargestellt.

**Tabelle 16 Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen mit Unterteilung in GCB- bzw. non-GCB-Typ (nach Hans- bzw. Visco-Young-Algorithmus [71, 72]) anhand der Expression von CD10, bcl6, Mum1 und FOXP1 (vgl. Diag. 1 und 2) sowie Angabe der Proliferationsrate (gemessen an MiB1-positiven Zellen).**

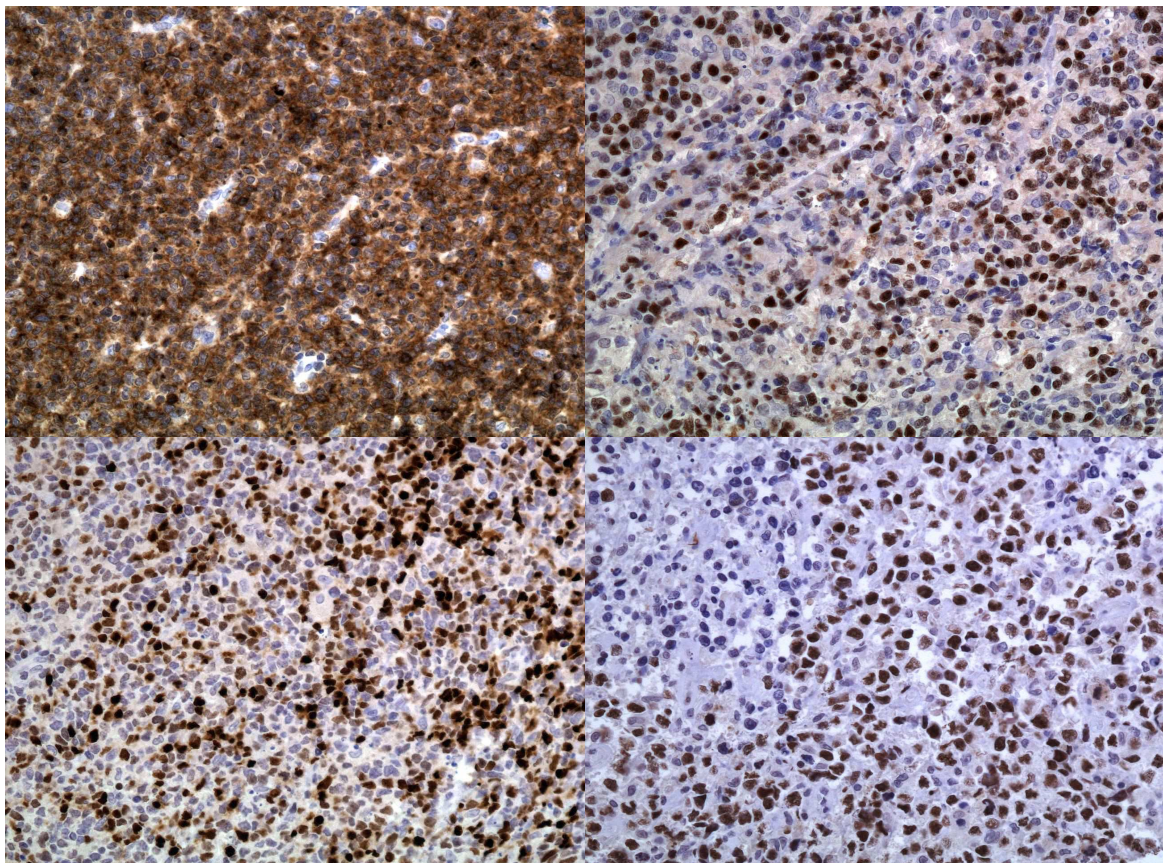
Fall	CD10	Bcl6	Mum1	FOXP1	MiB1 (in%)	GCB/non-GCB-Typ
1	+	+	-	-	60	GCB
2	+	+	-	-	70	GCB
3	-	+	+	+	60	non-GCB
4	+	+	-	-	80	GCB
5	+	-	+	+	70	GCB
6	-	-	+	+	70	non-GCB
7	-	-	-	-	50	non-GCB
8	-	+	-	-	90	GCB
9	+	-	-	-	60	GCB
10	-	+	-	-	70	GCB
11	+	+	+	+	90	GCB
12	+	+	-	+	90	GCB
13	+	+	+	+	90	GCB
14	-	-	+	+	90	non-GCB
15	+	+	-	+	80	GCB
16	+	+	+	+	90	GCB
17	-	-	-	-	40	non-GCB
18	-	-	-	-	50	non-GCB
19	-	+	+	+	90	non-GCB
20	+	+	-	+	70	GCB
21	+	+	+	+	80	GCB

Es fanden sich 14 GCB- (66,7 %) und 7 non-GCB-Fälle (33,3 %). Zwischen den Klassifikatoren nach Hans und Visco-Young bestand eine Konkordanz von 100 %.

Insgesamt zeigten 12 Fälle (57,1 %) eine CD10-Expression, 14 Fälle (66,7 %) reagierten positiv gegenüber bcl6, 9 Fälle (42,9 %) zeigten eine Mum1-Expression und bei 12 Fällen (57,1 %) bestand eine positive Reaktion gegenüber FOXP1.

Von den 14 untersuchten GCB-Fällen zeigte lediglich ein Fall (7,1 %) eine ausschließliche CD10-Expression, weitere 2 Fälle (14,3 %) waren ausschließlich positiv für bcl6, während 4 Fälle (28,6 %) eine Expression aller vier untersuchten Marker zeigten. Von den übrigen GCB-Fällen waren 3 (21,4 %) positiv für CD10, bcl6 und FOXP1, weitere 3 Fälle (21,4 %) zeigten eine Expression von CD10 und bcl6, ein weiterer Fall (7,1 %) reagierte positiv gegenüber CD10, Mum1 und FOXP1.

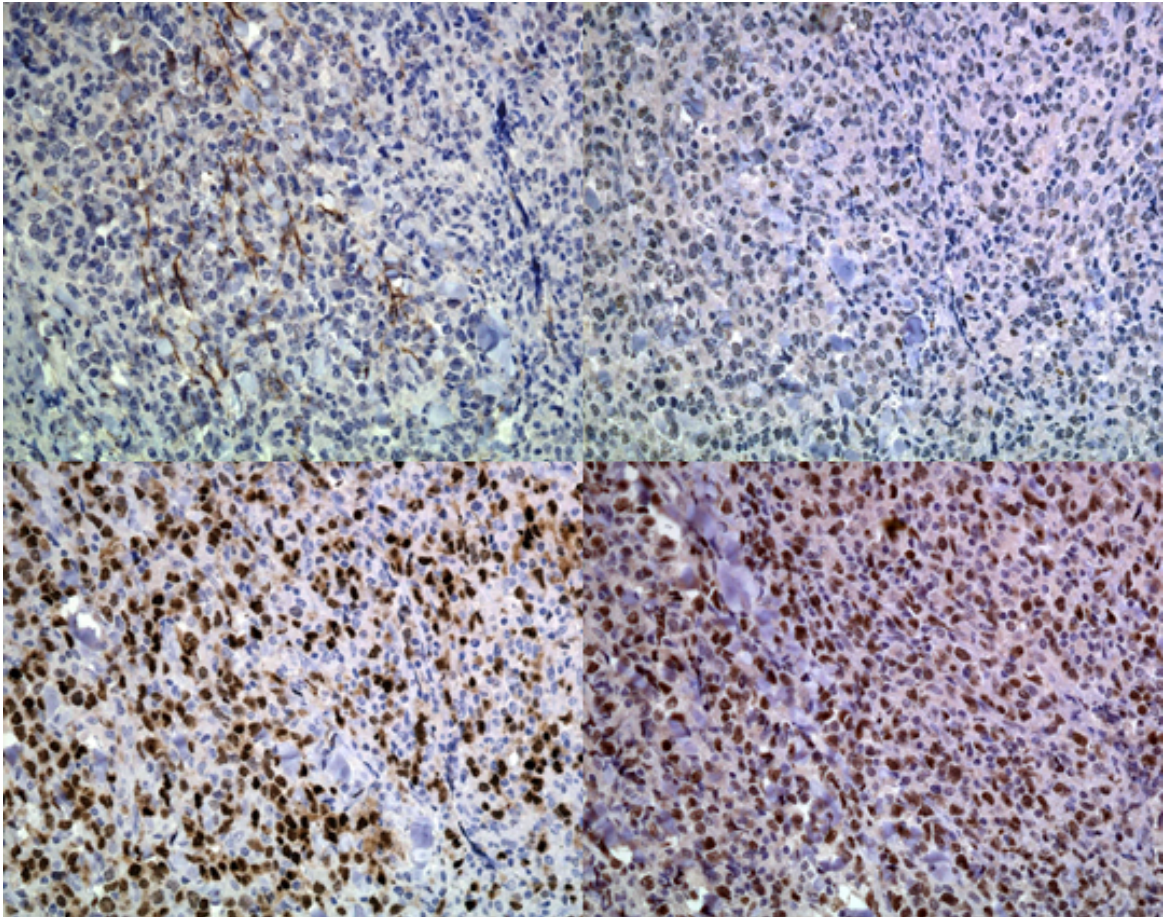
Abbildung 1 stellt exemplarisch einen als GCB-Typ klassifizierten Fall dar.



**Abbildung 1 Immunhistochemisches Expressionsmuster eines als GCB-Typ klassifizierten Falles (Fall 21). Links oben: CD10 (+); Rechts oben: Bcl6 (+); Links unten: Mum1 (+); Rechts unten: FOXP1 (+). Originalvergrößerung jeweils 200fach.**

Alle 7 Fälle der non-GCB-Gruppe reagierten negativ gegenüber CD10, 3 Fälle (42,9 %) wiesen keinerlei Expression der untersuchten Marker auf, jeweils zwei weitere Fälle (je 28,6 %) zeigten eine Positivität gegenüber bcl6, Mum1 und FOXP1 bzw. gegenüber Mum1 und FOXP1.

Abbildung 2 stellt exemplarisch einen als non-GCB-Typ klassifizierten Fall dar.



**Abbildung 2 Immunhistochemisches Expressionsmuster eines als non-GCB-Typ klassifizierten Falles (Fall 6). Links oben: CD10 (-); Rechts oben: Bcl6 (-); Links unten: Mum1 (+); Rechts unten: FOXP1 (+). Originalvergrößerung jeweils 200fach.**

Alle Fälle wiesen eine hohe Proliferationsrate auf (gemessen an MiB1-positiven Zellen), der Mittelwert lag bei 73 %, der Median betrug 70 % (Schwankungsbreite 40 - 90 %).

### 3.3 *Pyrosequenzierung für MYD88*

Die Pyrosequenzierung des *MYD88*-Gens zum Nachweis der Punktmutation p.L265P (c.794T>C) in Exon 5 wurde für alle Proben durchgeführt. Hierbei erfolgte eine Analyse der Sequenz T/CGATCCCCATCAAGTACAAGGCAATG zum Nachweis eines Basenaustausches. Der prozentuale Anteil der Mutation (Detektion von Cytosin anstelle von Thymin) in Relation zum Wildtyp wurde anhand des Verhältnisses der Peaks an beiden Positionen berechnet und tabellarisch hinterlegt.

In keiner der untersuchten Proben ließ sich eine *MYD88*-Mutation in o.g. Sequenz nachweisen.

### 3.4 *BRAF- und NRAS- Mutationshäufigkeit*

Die Untersuchung von Exon 15 des *BRAF*-Gens sowie von Exon 2, 3 und 4 des *NRAS*-Gens auf Sequenzveränderungen erfolgte für alle Proben mittels Sequenzierung auf dem Kapillarsequenzierer CEQ 8800.

In einem der untersuchten Fälle fand sich eine *BRAF*-V600E-Mutation (Fall 7) mit Nachweis eines Basenaustausches (c.1799T>A). Die Mutationsfrequenz für *BRAF* betrug im vorliegenden Patientenkollektiv 4,76 % (1/21).

Daneben bestanden in zwei weiteren Fällen Mutationen in Exon 4 des *NRAS*-Gens (Fall 6, Fall 18). Die Mutationsfrequenz für *NRAS* betrug somit 9,52 % (2/21).

Bei einer Mutation handelte es sich um eine sog. stille Mutation mit einem Basenaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) ohne Änderung der Basenabfolge (Fall 6, p.H131H-Mutation).

Die zweite Mutation in Exon 4 des *NRAS*-Gens (Fall 18) bestand in einem Basenaustausch von Guanin (G) zu Adenin (A) mit einer Änderung der Aminosäuresequenz (sog. Missense-Mutation). An folgender Position: p.C118Y.

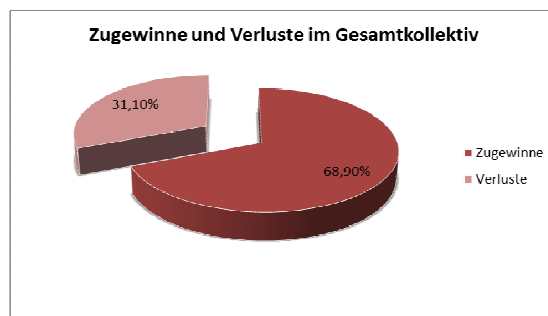
Es ließen sich keinerlei Mutationen in Exon 2 und 3 des *NRAS*-Gens nachweisen.

## 3.5 aCGH-Ergebnisse

### 3.5.1 Beobachtungen im Gesamtkollektiv

Mittels aCGH-Analyse ließen sich in allen 21 ptDLBCL genetische Alterationen nachweisen. Von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden Polymorphismen, d.h. pathogenetisch nicht bedeutsame Normvarianten. Als wiederkehrend wurden Veränderungen (sowohl Zugewinne als auch Verluste genetischen Materials) definiert, die in drei oder mehr untersuchten Fällen nachweisbar waren (addiert entsprechend > 10 % des Gesamtkollektives). Es fanden sich in der Gesamtheit 11 als rekurrent verändert gewertete Genloci in folgenden chromosomalen Regionen: 6p21.33-p21.32, 6p22.2, 10q26.3, 12p13.31, 14q31.1, 14q32.33, 19p13.3, 20q13.33, 21q11.2, 22q11.22 und Xp22.33. Eine tabellarische Auflistung aller detektierten Aberrationen findet sich im Anhang (Tabelle 21).

Die mittlere Anzahl der Aberrationen lag bei 8,7 Ereignissen pro Fall bei einer Spannweite von 1 – 18. Von insgesamt 183 Alterationen entsprachen 126 Zugewinnen (68,9 %), 57 Verlusten (31,1 %) (Darstellung in Diagramm 3). Die Anzahl der Zugewinne lag im Mittel bei 6 (Spannweite 1 – 14), die der Verluste bei 2,7 (Spannweite 0 – 11). Jeder der untersuchten Fälle zeigte mindestens einen Zugewinn, in 5 Fällen (23,8 %) waren keine Verluste zu detektieren.



**Diagramm 3: Übersicht der Zugewinne und Verluste genetischen Materials im Gesamtkollektiv**

Die Anzahl der Alterationen unterschied sich nicht maßgeblich zwischen den einzelnen Subgruppen: In der Gruppe der GCB-Typen fanden sich im Mittel 8,3 Aberrationen, in der Gruppe der non-GCB-Typen 9,6 ( $p=0,6066$ ), ferner im Mittel 6,1 Zugewinne in der GCB-Gruppe, in der non-GCB-Gruppe 5,9 ( $p=0,9091$ ). In der GCB-Gruppe ließen sich im Mittel 2,2 Verluste nachweisen, in der non-GCB-Gruppe 3,7 ( $p=0,2919$ ).

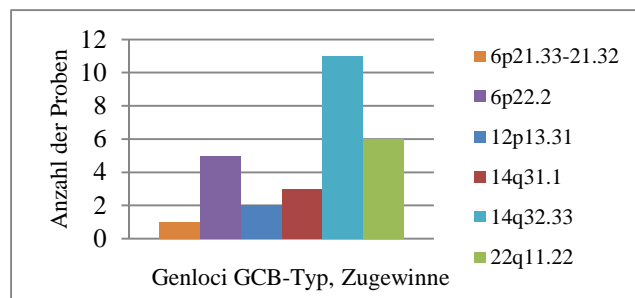
Tabelle 17 zeigt eine Auflistung der als rekurrent verändert definierten chromosomalen Alterationen mit assoziierten, potentiell pathogenetisch bedeutsamen Genen.

**Tabelle 17 Regionen wiederkehrender chromosomaler Alterationen mit assoziierten (potentiell pathogenetisch relevanten) Genen.**

Aberration	Anzahl der Fälle mit Zugewinnen	Anzahl der Fälle mit Verlusten	Assoziierte Gene
6p21.33 - p21.31	1	2	C4A, C4B FKBPL NOTCH4 HLA-DRA BRD2
6p22.2	6	0	TRIM38
10q26.3	0	5	BNIP3 NKX6-2 UTF1
12p13.31	3	0	CD27 NCAPD2 GAPDH PTMS CDCA3 TPI1 PTPN6 miR-141 CD163
14q31.1	6	0	DIO2
14q32.33	14	0	IgH (Schwerkettenlokus) ADAM6
19p13.3	1	2	TNFSF9 CD70
20q13.33	0	5	CDH4 NTSR1
21q11.2	0	4	-
22q11.22	7	0	TOP3B PRAME Lambda light chain BCR
Xp22.33	2	1	PLCXD1 CRLF2 IL3RA

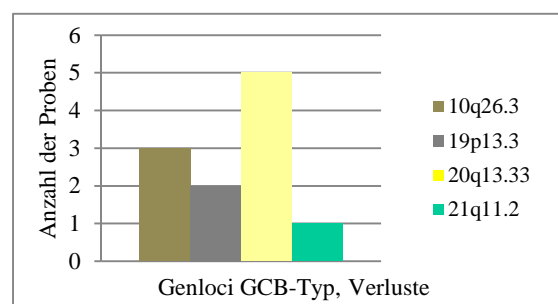
### 3.5.2 DLBCL vom GCB-Typ

14 ptDLBCL vom GCB-Typ zeigten mittels aCGH jeweils in mindestens einem der o.g. Genloci Zugewinne. Diese fanden sich in 6 Fällen (42,9 %) auf Chromosom 6 in 6p22.2 (5 Fälle, 35,7 %) bzw. 6p21.33-p21.32 (1 Fall, 7,1 %). 2 weitere Fälle (14,3 %) zeigten Zugewinne auf Chromosom 12 (12p13.31), 14 Fälle auf Chromosom 14: 3 Fälle (21,4 %) in 14q31.1, 11 Fälle (78,6 %) in 14q32.33. 6 Fälle (42,9 %) zeigten Zugewinne auf Chromosom 22 (22q11.22).



**Diagramm 4: Anzahl der Proben mit chromosomalen Zugewinnen unter Angabe der Genloci, GCB-Gruppe.**

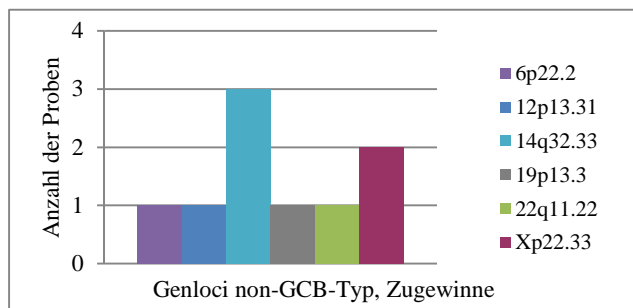
Verluste fanden sich in 3 Fällen (21,4 %) auf Chromosom 10 (10q26.3), in zwei weiteren Fällen (14, 3 %) auf Chromosom 19 (19p13.3) sowie auf in 5 Fällen (35,7 %) auf Chromosom (20q13.33) und in einem weiteren Fall (7,1 %) auf Chromosom 21 (21q11.2). 6 von 14 Fällen (42,9 %) zeigten in keinem der o.g. Genloci Verluste.



**Diagramm 5: Anzahl der Proben mit Verlusten genetischen Materials unter Angabe der Genloci, GCB-Gruppe.**

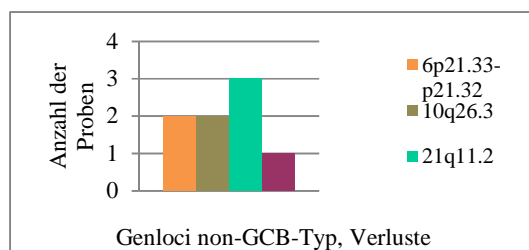
### 3.5.3 DLBCL vom non-GCB-Typ

Es wurden 7 ptDLBCL vom non-GCB-Typ mittels aCGH untersucht. Zugewinne fanden sich in 1 von 7 Fällen auf Chromosom 6 (14,3 %) in der Region 6p22.2, in einem weiteren Fall (14,3 %) auf Chromosom 12 (12p13.31). In 6 Fällen (85,7 %) zeigten sich Zugewinne auf Chromosom 14: In 3 Fällen (42,9 %) in der Region 14q31.1, in 3 Fällen (42,9 %) in der Region 14q32.33. In jeweils einem Fall (je 14,3 %) fanden sich Zugewinne auf Chromosom 19 (19p13.3) bzw. auf Chromosom 22 (22q11.22). Zwei Fälle (28,6 %) wiesen zudem Zugewinne auf dem X-Chromosom (Xp22.33) auf. Eine Probe (14,3 %) zeigte in keinem dieser Genloci einen Zugewinn (Fall 6).



**Diagramm 6: Anzahl der Proben mit Zugewinnen genetischen Materials unter Angabe der Genloci, non-GCB-Gruppe.**

Verluste fanden sich in 2 Fällen (28,6 %) auf Chromosom 6 in der Region 6p21.33-p21.32, in 2 Fällen (28,6 %) auf Chromosom 10 in der Region 10q26.3, in 3 Fällen (42,9 %) auf Chromosom 21 (Region 21q11.2) sowie in einem weiteren Fall (14,3 %) auf dem X-Chromosom (Region Xp22.33). Drei der untersuchten Proben (42,9 %) zeigten in keinem der o.g. Genloci einen Verlust.



**Diagramm 7: Anzahl der Proben mit Verlusten genetischen Materials unter Angabe der Genloci, non-GCB-Gruppe.**

### 3.5.4 Unterschiede bezüglich detektierter chromosomaler Aberrationen in beiden Gruppen

Vergleicht man die GCB- und non-GCB-Gruppe hinsichtlich der detektierten chromosomalen Aberrationen, so lässt sich feststellen, dass einzelne Genloci gehäuft in einer der beiden Gruppen zu finden sind. Im Folgenden wurden lediglich Genloci betrachtet, die in beiden Gruppen Aberrationen zeigten oder in einer der beiden Gruppen > 3 Fälle betrafen. Aus diesen Daten wurden die folgenden Trends abgeleitet:

In der Gruppe der GCB-Typen fanden sich häufiger Zugewinne auf 22q11.22 (42,9 % vs. 14,3 %,  $p=0,095$ ) und 14q32.33 (78,6 % vs. 42,9 %,  $p=0,051$ ). Bei den Verlusten zeigte sich ein Trend für 20q13.33 (35,7 % vs. 0 %,  $p=0,035$ ).

In der Gruppe der non-GCB-Typen fanden sich vermehrt Aberrationen (Zugewinne und Verluste) auf dem X-Chromosom in Xp22.33 (42,9 % vs. 0 %,  $p=0,004$ ), zudem ließen sich gehäuft Verluste auf 21q11.2 feststellen (42,9 % vs. 7,1 %,  $p=0,025$ ).

Die geschilderten Unterschiede sind in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18 Vergleich der chromosomalen Aberrationen in der GCB- und non-GCB-Gruppe unter Aufschlüsselung von Zugewinnen und Verlusten mit Angabe des jeweiligen p-Wertes.**

Aberration	Anzahl der Fälle mit Zugewinnen in der GCB-Gruppe	Anzahl der Fälle mit Zugewinnen in der non-GCB-Gruppe	p-Wert	Anzahl der Fälle mit Verlusten in der GCB-Gruppe	Anzahl der Fälle mit Verlusten in der non-GCB-Gruppe	p-Wert
6p21.33 - p21.31	1	0	0,24	0	2	0,018
6p22.2	5	1	0,154	0	0	-
10q26.3	0	0	-	3	2	0,36
12p13.31	2	1	0,5	0	0	-
14q31.1	3	3	0,15	0	0	-
14q32.33	11	3	0,051	0	0	-
19p13.3	0	1	0,07	2	0	0,15
20q13.33	0	0	-	5	0	0,035
21q11.2	0	0	-	1	3	0,025
22q11.22	6	1	0,095	0	0	-
Xp22.33	0	2	0,02	0	1	0,073

### 3.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung für *BCL2*, *BCL6* und *cMYC*

21 ptDLBCL wurden mittels Zwei-Farben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf ein Bruchereignis in den Loci für *BCL2*, *BCL6* und *cMYC* (sog. Breakapart-Sonden) analysiert (zum Aufbau der verwendeten Sonden vgl. Abb. 4 – 6 im Anhang der Arbeit).

Bei 7 Proben ließen sich Bruchereignisse als sog. „Single-Hit“-Ereignisse feststellen (Ereignisfrequenz von 33,3 %). Kombinationen von mehreren Bruchereignissen (als „double-hit“- oder „triple-hit“-Konstellationen) lagen nicht vor. Bei drei Patienten (14,3 %) fand sich ein Bruch im *BCL2*-Locus, jeweils zwei weitere Patienten (je 9,52 %) zeigten einen Bruch im *BCL6*- bzw. *cMYC*-Locus. Alle drei Patienten mit einem *BCL2*-Bruchereignis entsprachen immunhistochemisch einem GCB-Typ, ebenso entsprachen alle Fälle mit einem *cMYC*-Rearrangement einem GCB-Typ. Jeweils einer der beiden Patienten mit *BCL6*-Bruchereignis zeigte einen GCB- bzw. einen non-GCB-Typ (je 50 %). Die Ergebnisse der FISH-Analysen sind in Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 19 Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Angabe eines Bruchereignisses (+) in den Genloci für *Bcl2*, *Bcl6* und *cMYC*. Ein negatives Ergebnis wurde als (-) verschlüsselt.**

Fall	GCB-/non-GCB-Typ nach Hans- bzw. Visco-Young-Algorithmus [71, 72]	<i>Bcl2</i>	<i>Bcl6</i>	<i>cMYC</i>
1	GCB	-	-	-
2	GCB	+	-	-
3	non-GCB	-	-	-
4	GCB	+	-	-
5	GCB	-	+	-
6	non-GCB	-	+	-
7	non-GCB	-	-	-
8	GCB	-	-	-
9	GCB	-	-	-
10	GCB	-	-	-
11	GCB	-	-	-
12	GCB	-	-	+
13	GCB	-	-	-
14	non-GCB	-	-	-
15	GCB	-	-	+
16	GCB	-	-	-
17	non-GCB	-	-	-
18	non-GCB	-	-	-
19	non-GCB	-	-	-
20	GCB	+	-	-
21	GCB	-	-	-

## 4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit stellt die erste Analyse des genetischen Profils von ptDLBCL mittels aCGH dar. Weiterhin wurde an diesen 21 Fällen, um den Vergleich mit zuvor publizierten Daten zu ermöglichen, eine Mutationsanalyse des *BRAF*-, *NRAS*- und *MYD88*-Gens durchgeführt. Zusätzlich wurden immunhistochemische Untersuchungen (zur Einteilung in GCB- und non-GCB-Typ) durchgeführt, sowie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen für *BCL2*, *BCL6* und *cMYC*.

*ptDLBCL zeigen immunhistochemisch häufig einen Keimzentrums-Phänotyp.*

Mithilfe der Algorithmen nach Hans et al. und Visco-Young et al. erfolgte eine Unterteilung in den GCB- und non-GCB-Typ [71, 72]. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Dominanz des GCB-Typs gegenüber den non-GCB-Fällen (66,7 % vs. 33,3 %) mit vollständiger Konkordanz zwischen beiden Klassifikatoren (vgl. Tabelle 16).

Diese Beobachtungen stimmen mit einem Teil bereits publizierter Daten überein, wonach primär extranodale DLBCL - unter anderem der Schilddrüse - häufiger dem GCB-Typ angehören [88, 102]. Allerdings lassen sich mittels Literaturrecherche auch Studien finden, die für extranodale DLBCL eine gegensätzliche Korrelation beschreiben: Hier handelt es sich um primäre DLBCL des Knochens, die etwas häufiger den non-GCB-Typ aufweisen [103]. Diese Beziehung lässt sich ebenso für testikuläre DLBCL, ZNS-DLBCL und DLBCL der Mamma nachweisen [104, 105].

*BRAF- und NRAS-Mutationen sind seltene Ereignisse in ptDLBCL.*

Sowohl epitheliale Neoplasien der Schilddrüse (insbesondere papilläre, follikuläre und anaplastische Schilddrüsenkarzinome) als auch andere solide Tumoren und hämatologische Neoplasien weisen Mutationen der *BRAF*- und *NRAS*-Gene auf [15, 19, 21, 25, 26, 32, 106]. Eine aktuellere Untersuchung von Aggarwal et al. konnte speziell für 25 diffus großzellige B-Zell-Lymphome der Schilddrüse eine Mutationsfrequenz von 32 % (*BRAF*) bzw. 8 % (*NRAS*) nachweisen. In der hier vorliegenden Studie von 21 ptDLBCL ließen sich diese in 4,76 % (1/21) bzw. 9,52 % (2/21) der Fälle detektieren und wiesen damit eine geringere (*BRAF*) bzw. etwa gleiche Frequenz (*NRAS*) auf [31], wobei es sich bei einem Fall mit *NRAS*-Mutation um eine stille Mutation ohne onkogenes Potential handelt. Da die zweite detektierte *NRAS*-Mutation bislang in der Literatur nicht beschrieben ist, lässt sich deren onkogenes Potential nicht einschätzen.

Mit n=25 (Aggarwal et al) und n=21 (aktuelle Studie) bestehen beide Kollektive – aufgrund der o.g. Seltenheit der Erkrankung - aus einer nur geringen Fallzahl, die eine statistische Verzerrung

möglich werden lässt. Nichtsdestotrotz lässt das bloße Vorhandensein onkogener Mutationen in den vorliegenden Genen Vermutungen darüber zu, dass eine pathogenetische Verwandtschaft von DLBCL der Schilddrüse mit anderen Entitäten bestehen könnte. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass *NRAS*-Mutationen bei DLBCL gehäuft für non-GCB-Typen beschrieben sind, während sich *BRAF*-Mutationen nahezu ausschließlich bei GCB-Typen finden [31]. Dieser Trend lässt sich im vorliegenden Untersuchungsgut nicht in Gänze abbilden: Zwar finden sich beide *NRAS*-Mutationen in non-GCB-Typen (Fall 6, Fall 18), aber auch die *BRAF*-Mutation wurde in einem als non-GCB-Typ klassifizierten Fall detektiert (Fall 7), in GCB-Fällen waren keine Veränderungen der untersuchten Gene zu beobachten.

Die geschilderten Beobachtungen werfen weitere Fragen auf: So ist zu überlegen, ob die Mutationen im vorliegenden Fall Ausdruck einer genetischen Verwandtschaft mit anderen Schilddrüsenneoplasien sind oder ob es sich um zufällige und sporadisch auftretende Alterationen zahlreicher Tumorentitäten handelt, ohne dass ein pathogenetischer Zusammenhang besteht - d.h. sind *BRAF*- und *NRAS*-Mutationen lediglich Ausdruck eines dysfunktionellen Signalweges zahlloser unabhängiger Tumoren oder lassen sich ggf. Rückschlüsse auf die Herkunft der Tumoren ziehen? Betrachtet man die publizierten Daten dezidiert, so erscheint es wenig wahrscheinlich, dass die bei DLBCL der Schilddrüse nachgewiesenen Mutationen organspezifische Eigenschaften widerspiegeln: Mit einer *BRAF*-Mutationsfrequenz von nahezu 100 % bei Haarzell-Leukämien [107, 108] sowie *RAS*-Mutationen in Tumoren verschiedenster Organsysteme ist als Auslöser eine allgemeine Störung zellulärer Signalwege und Differenzierungsprozesse wesentlich wahrscheinlicher als eine Gewebs- oder Organspezifität.

*MYD88 L265P-Mutationen sind kein Charakteristikum von ptDLBCL.*

Die Pyrosequenzierung des *MYD88*-Gens erbrachte keinen Nachweis einer p.L265P-Mutation innerhalb der untersuchten Sequenz.

Nach Literaturangaben sind Mutationen im *MYD88*-Gen überwiegend in DLBCL des non-GCB-Typs sowie kutanen, testikulären und ZNS-Lymphomen nachgewiesen und zeigen hier eine Frequenz von 29 %, 61-69%, 71 % bzw. 75 % [95, 98, 100].

Der Umstand, dass das vorliegende Kollektiv keinerlei *MYD88*-Mutationen zeigt, ist in diesem Kontext somit nicht verwunderlich:

Zum einen handelt es sich vorwiegend um GCB-Typen (66,7 % der Fälle), die nur selten *MYD88*-Mutationen zeigen; sofern *MYD88*-Mutationen in diesen Typen vorliegen, sind gehäuft andere Veränderungen als die „klassische“ p.L265P-Mutation zu finden [95]. In der vorliegenden Studie

wurde die Pyrosequenzierung für *MYD88* nur in einer Sequenz durchgeführt, die eine p.L265P-Mutation nachweist. Ob sich ggf. Mutationen in anderen Abschnitten des *MYD88*-Gens finden, ist somit nicht zu beantworten.

Dennoch steht die Mutationsfrequenz für *MYD88* in Einklang mit bereits publizierten Studien: Bei einer durchschnittlichen Ereignisfrequenz von 29 % innerhalb der non-GCB-Typen [95] wären im vorliegenden Untersuchungsgut lediglich 2,03 Ereignisse zu erwarten gewesen, sodass bei der vorliegenden Fallzahl (unter Berücksichtigung der statistischen Wahrscheinlichkeit) das geschilderte Ergebnis gut nachvollziehbar ist und den vorliegenden Datensätzen grundsätzlich nicht widerspricht.

Zum anderen handelt es sich bei der Schilddrüse nicht um eine der eingangs angesprochenen immunprivilegierten Lokalisationen (zu denen neben ZNS und Hoden weiterhin die Augen gehören [109]), sodass auch hier der erwartete Ereigniswert niedrig gewesen ist.

Eine Assoziation von ptDLBCL mit *MYD88*-Mutationen könnte lediglich dadurch erwartet werden, dass DLBCL der Schilddrüse überproportional häufig im Rahmen von chronischen Entzündungsprozessen (Hashimoto-Thyreoiditis) entstehen und *MYD88* durch immunmodulatorische und proinflammatorische Prozesse eine Rolle in der Karzinogenese zugesprochen wird [99]. Eine solche zugrunde liegende lymphozytäre Thyreoiditis ließ sich nur bei 4 Fällen nachweisen bzw. war anamnestisch bekannt. Inwiefern autoimmune Prozesse für die übrigen Fälle eine Rolle gespielt haben, ist nicht abschließend zu klären. Zu erwarten wäre nach Literaturangaben jedoch ein hoher Prozentsatz von Patienten mit assoziierter Autoimmunthyreoiditis [2, 5].

Abschließend scheint ein *MYD88*-induzierter bzw. -assoziierter proinflammatorischer Weg offenbar eine eher untergeordnete Rolle in der Pathogenese von ptDLBCL zu spielen bzw. wird durch andere Mutationen als die hier analysierte p.L265P-Mutation vermittelt. Zur Beantwortung dieser Frage sind weitergehende Untersuchungen von ptDLBCL im Allgemeinen und hiermit vergesellschaftete *MYD88*-Mutationen im Speziellen vonnöten.

Insgesamt implizieren diese Ergebnisse, dass bei ptDLBCL der Schilddrüse keine *MYD88*-vermittelte konstante Überstimulation durch NFkappaB vorzuliegen scheint. Dennoch finden sich neben *MYD88* weitere – onkogen bedeutsame – Mutationen in alternativen Komponenten des NFkappaB-Weges (beispielsweise *CARD11*, *CD79B*), die durch dauerhafte Überstimulation zur Lymphomagenese beitragen können, jedoch im vorliegenden Patientenkollektiv nicht analysiert wurden [97, 110]. Möglicherweise könnten diese Komponenten in zukünftigen Studien weitere Anhalte für zugrundeliegende pathogenetische Mechanismen geben und Ausgangspunkte für neue therapeutische und diagnostische Strategien bilden.

*ptDLBCL zeigen mittels aCGH-Analyse einzelne Überschneidungen mit genetischen Profilen von B-Zell-Lymphomen im Allgemeinen und DLBCL bzw. Burkitt-Lymphomen im Speziellen.*

Betrachtet man die in ptDLBCL nachgewiesenen Aberrationen und vergleicht diese mit bereits publizierten Datensätzen in Bezug auf unterschiedliche Tumorentitäten (nodale und extranodale DLBCL, Burkitt-Lymphome), so lassen sich innerhalb der am häufigsten aberrierten Loci einzelne Überschneidungen feststellen:

Insbesondere ist hier die Region 14q32.33 mit dem Immunglobulin-Schwerkettenloкус (IgH) zu nennen. Dieser ist nicht nur bei diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen, sondern auch bei zahlreichen anderen niedrig- und hochmalignen B-Zell-Lymphomen von einem Rearrangement betroffen und stellt offensichtlich einen frühen Schritt in der Pathogenese von B-Zell-Lymphomen dar [111, 112]. Speziell bei DLBCL wird in der Literatur eine Häufigkeit von Alterationen im Schwerkettenloкус von 25-72 % beschrieben [87, 89], sodass die Ergebnisse der vorliegenden Studie (Aberrationen in 14q32.33 in 14/21 Fällen, entsprechend 66,7 %) diese Daten bestätigen.

Ein weiterer Genloкус mit wiederkehrenden Aberrationen in ptDLBCL findet sich in der Region 19p13.3 (3/21 Fälle, entsprechend 14,3 %) – zuvor publizierte Studien zeigen in einem Teil der Burkitt-Lymphome, DLBCL und Hodgkin-Lymphome ebenfalls Alterationen mit einer ähnlich hohen Frequenz von 9 – 14,6 % [113], hier handelte es sich ausschließlich um Deletionen.

Zwei der hier kodierten Gene (TNFSF7 und TNFSF9) gehören zur Familie der Tumornekrose-Faktoren und werden als mögliche Tumorsuppressoren vermutet, sodass entsprechende Deletionen eine Tumorprogression bzw. –entwicklung begünstigen können [113]. Andere Studien zeigen ebensolche Alterationen, die sowohl CD70 als auch TNFSF9 anführen. CD70 wird hier ein onkogenes Potential zugeschrieben, es konnte gezeigt werden, dass somatische Hypermutationen und eine erhöhte Expression einen prognostisch ungünstigen Faktor darstellen und mit einem kürzeren Überleben der Patienten assoziiert sind [114]. Auch in den untersuchten ptDLBCL fanden sich in ebendieser Region Alterationen, neben 2 Fällen mit Verlusten auch ein Fall mit entsprechendem Zugewinn. In Anbetracht der Datenlage scheint ein Tumorprogress durch Deletion plausibel (bezogen auf TNFSF9), während ein entsprechender Zugewinn durch eine onkogene Wirkung von CD70 erklärt werden kann. Inwiefern dies auch eine prognostische Bedeutung in der Gruppe der ptDLBCL nach sich zieht, kann allerdings (mangels entsprechender Follow-Up-Daten) vorerst nicht abschließend beantwortet werden.

Die weiteren (in Tabelle 17 aufgeführten) Aberrationen zeigten keine solchen Überschneidungen mit DLBCL anderer Lokalisationen oder Burkitt-Lymphomen.

*ptDLBCL zeigen mittels aCGH-Analyse keine Überschneidungen mit den genetischen Profilen epithelialer Schilddrüsenneoplasien.*

Mit den in Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesenen Aberrationen (in den Regionen 1p, 1q, 4q, 5q, 7p, 8q, 9q, 13q, 17q, 20p, 20q und 22q (Zugewinne) bzw. 9q, 13q, 17p und 22q (Verluste) [35-37]) zeigten sich in der aktuellen Studienpopulation keine Überlappungen (vgl. Tabelle 20). Ebenso waren die in ptDLBCL detektierten Alterationen nicht in epithelialen Schilddrüsentumoren nachweisbar. Inwiefern es sich allerdings (bedingt durch die kleine Studienpopulation von 21 Fällen und die Seltenheit der Erkrankung) um inzidentelle Ereignisse handelt bzw. um Alterationen, die nicht auf ptDLBCL im Allgemeinen übertragen werden können, kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

In Tabelle 20 findet sich eine Auflistung und Gegenüberstellung häufiger und wiederkehrend veränderter Genloci der o.g. Tumorentitäten sowie von ptDLBCL (ausgewählte Genloci unter Berücksichtigung der Häufigkeiten in den unterschiedlichen Studienkollektiven).

**Tabelle 20 Chromosomale Alterationen verschiedener Entitäten [82, 88, 90, 91] im Vergleich mit ptDLBCL [93, 94]. Farblegende: Blau ■ steht für Zugewinne, rot ■ für Verluste genetischen Materials, gelb ■ für Zugewinne und Verluste, weiß □ für nicht rekurrent veränderte Regionen/Regionen ohne Angaben in der o.g. Literatur.**

Chromosomale Region	Extra-nodale DLBCL [88, 89]	Kutane, ZNS-DLBCL [90]	Nodale, IP-DLBCL [91, 92]	DLBCL, GCB-Typ [93, 94]	DLBCL, non-GCB-Typ [93, 94]	Schilddrüsenkarzinome (papillär, anaplastisch) [35-37]	Burkitt-Lymphome [113, 115]	pt-DLBCL
1p						■		
1p34			■					
1q32	■	■	■	■	■			
1q						■	■	
3p							■	
3q13	■		■	■	■			
4q						■		
5q						■		
5p15.33-32	■			■	■			
6p21	■	■	■	■	■			
6p21.33 - p21.31								■
6p22.2								■
7p						■		
7p21.1	■	■		■	■			
7q11.23	■	■		■				
8q						■	■	
8q22	■			■	■			
8q24	■	■		■	■			
9q			■			■		
10q26.3								■
11q12.2-q13.1	■	■						
12p13.31								■
12q24	■		■	■	■			
13q						■	■	
14q31.1								■
14q32	■	■			■			■
17p			■			■	■	
17q						■		
18q22	■	■	■	■				
19p13.3	■		■				■	■
20p						■		
20q						■		
20q13.33								■
21q11.2								■
22q						■		
22q11.22								■
22q13	■	■		■				
Xp22.33								■
Xq21.33-q26.2	■	■						
Xq25			■					

*Besonderheiten einzelner Genloci des untersuchten Kollektivs im Kontext publizierter Daten.*

Im Folgenden soll auf Besonderheiten einzelner aberrierter Genloci hingewiesen werden (vgl. Tabelle 17). Diese wurden nach ihrer biologischen Funktion in Hinblick auf die Entstehung maligner Tumore im Allgemeinen bzw. die Entstehung maligner Lymphome im Speziellen bewertet. Ein Blick auf die folgenden Gene lohnt in Zusammenhang mit der aktuellen Studie: NOTCH4 und BRD2 (6p21.33-p21.31), CDCA3 (12p13.31) und NTSR1 (20q13.33).

Sowohl NOTCH4 als auch BRD2 und CDCA3 wird eine Rolle in der Tumorprogression zugeschrieben – speziell BRD2 scheint an einer B-Zell-Expansion beteiligt zu sein, während NOTCH4 nachgewiesenermaßen ein Onkogen ist [116-118]. Eine Überexpression dieser Gene könnte somit einen Tumorprogress bzw. eine Tumorentwicklung induzieren bzw. dessen Expansion begünstigen. Inwieweit diese Effekte in den untersuchten Fällen zum Tragen kommen, lässt sich mittels der durchgeführten Untersuchungen nicht abschließend bewerten und bedarf weitergehender Analysen (speziell der Genexpression), eine Assoziation scheint allerdings möglich.

NTSR1 (in der Region 20q13.33, die in 5 Fällen der aktuellen Studie Verluste zeigte) ist nach Literaturangaben in malignen B-Zell-Linien vermindert exprimiert [119]. Eine pathogenetische Verbindung zwischen der Entwicklung eines malignen B-Zell-Lymphoms und der entsprechenden chromosomalen Aberration ist hier zu vermuten. Ob sich diese Veränderung auch bei anderen B-Zell-Lymphomen detektieren lässt oder ob es sich hier um ein DLBCL-spezifisches Phänomen bedarf jedoch weitergehender Untersuchungen.

Demnach scheint ein Teil der in der vorliegenden Studie als aberrant gewerteten Genloci in verschiedensten Tumorentitäten eine Rolle in der Pathogenese bzw. dem Tumorprogress zu spielen und es ist demnach wahrscheinlich, dass auch in ptDLBCL diese Gene solche Funktionen ausüben. Da sich jedoch nicht in allen untersuchten Fällen entsprechende Veränderungen nachweisen lassen und die vorliegende Studie keine weitergehenden Untersuchungen in Bezug auf die biologische Aktivität der genannten Gene anstellt, ist nicht klar, welchen Anteil diese an der Lymphomgenese oder dem Krankheitsprogress haben. Eine Beteiligung der genannten Gene scheint nichtsdestotrotz wahrscheinlich, wenngleich weitere Analysen zur abschließenden Einschätzung vonnöten sind.

*Mittels FISH detektierte Bruchereignisse in den Loci für BCL2, BCL6 und cMYC sind seltene Ereignisse in primär extranodalen DLBCL der Schilddrüse.*

Rearrangements in den Loci für *BCL2*, *BCL6* und *cMYC* lassen sich nach Literaturangaben in DLBCL in 12-30 %, 30-50 % bzw. 6-14 % der Fälle nachweisen [77, 81-84]. Auffällig ist, dass sich vor allem *BCL2*- und *cMYC*-Rearrangements nahezu ausschließlich in Fällen detektieren lassen, die immunhistochemisch einen GCB-Typ aufweisen, während non-GCB-Typen gehäuft *BCL6*-Translokationen zeigen [78, 98]. Weitere Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass primär nodale DLBCL häufiger als primär extranodale Fälle eine Translokation von *BCL2* und *BCL6* aufweisen [77, 79]. Gegensätzlich ist das Verhältnis bei *cMYC*-Rearrangements, die sich deutlich häufiger bei primär extranodalen Fällen finden lassen [77].

Im aktuell untersuchten Patientenkollektiv ließen sich entsprechende Bruchereignisse mittels FISH in 14,3 % (*BCL2*) bzw. 9,52 % (für *BCL6* und *cMYC*) der untersuchten Proben detektieren.

Die Frequenz der Bruchereignisse liegt somit – bezogen auf *BCL6* – deutlich unterhalb der Rate, die nach Datenlage erwartet werden könnte, während die Ereignisfrequenzen für *BCL2* und *cMYC* jeweils im unteren Drittel der zuvor publizierten Häufigkeiten liegen. In Einklang mit bereits publizierten Daten ist jedoch der Umstand, dass es sich bei allen Fällen, die ein *BCL2*- oder *cMYC*-Rearrangement aufweisen, immunhistochemisch um GCB-Fälle handelt [98].

Jeder der drei Fälle mit einem *BCL2*-Rearrangement wies in der Vorgeschichte ein niedrigmalignes bzw. follikuläres Lymphom auf oder ließ dieses im Untersuchungsgut histologisch nachweisen, nach Literaturangaben ist ein solches Rearrangement äußerst charakteristisch für follikuläre Lymphome und in diesen in etwa 85 % der Fälle nachweisbar [120]. Allerdings fanden sich weitere zwei Fälle, in denen ein zugrunde liegendes follikuläres Lymphom bekannt war, ohne dass sich im analysierten Material ein *BCL2*-Rearrangement nachweisen ließ.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist (neben der Tatsache, dass etwa 15 % der follikulären Lymphome kein entsprechendes Rearrangement aufweisen), dass die FISH-Untersuchungen an kleinen, ausgewählten Tumorzellarealen (der Tissue Microarrays) durchgeführt wurden und so – bei heterogenem Verteilungsmuster der o.g. Rearrangements in einzelnen Tumoren - falsch-negative Ergebnisse im vorliegenden Kollektiv durchaus möglich sind, da nicht alle verfügbaren Tumorzellen in die FISH-Analyse einbezogen wurden.

*Fälle mit Bruchereignissen zeigen in der aCGH keine Aberrationen in entsprechenden Genloci.*

Eine weitergehende Analyse der Fälle, die in mittels FISH ein Bruchereignis in einem der untersuchten Loci nachweisen ließen, zeigt, dass diese in den entsprechenden Genloci 8q24 (*cMYC*), 18q21 (*BCL2*) und 3q27 (*BCL6*) keine Aberrationen zeigen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass ptDLBCL sich anhand des genetischen Profils von epithelialen Schilddrüsentumoren unterscheiden (mittels aCGH lassen sich keine Überschneidungen feststellen) und auch die Mutationsfrequenzen für *BRAF* und *NRAS* zwischen beiden Entitäten grundlegende Häufigkeitsunterschiede zeigen.

Auch in Bezug auf andere B-Zell-Lymphome (sowohl niedrig- als auch hochmaligne) zeigen sich mittels aCGH nur einzelne Übereinstimmungen, die – wie z.B. Rearrangements im Immunglobulin-Schwerkettenloкус (IgH) - zumeist einen frühen Schritt in der Pathogenese darstellen.

Auch die Rate nachgewiesener Bruchereignisse in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bleibt wesentlich hinter den – nach anderen Studien zu erwartenden – Häufigkeiten für diffuse großzellige B-Zell-Lymphome zurück.

Dennoch sollte eine abschließende Bewertung, in welchem Ausmaß es sich bei ptDLBCL genetisch um eine eigenständige Entität handelt - gerade aufgrund der geringen Fallzahl, bedingt durch die Seltenheit der untersuchten Erkrankung [1] - nicht auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie allein gestützt werden und ggf. in der Zukunft durch weitergehende Analysen (z.B. whole genome sequencing) ergänzt werden, um eine genauere Charakterisierung relevanter Gene oder potentieller therapeutischer Zielstrukturen zu ermöglichen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome machen einen Großteil aller B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome aus und sind in dieser Gruppe die häufigsten hochmalignen Lymphome. Primär extranodale DLBCL der Schilddrüse (ptDLBCL) jedoch sind seltene Tumoren, die im Untersuchungsgut des Institutes für Pathologie am UKSH, Campus Lübeck weniger als 1 % aller Schilddrüsenneoplasien ausmachen und die bislang nur in einer einzelnen Studie dezidiert im Hinblick auf molekulare Charakteristika untersucht wurden. Eine Analyse zur Frage wiederkehrender chromosomaler Aberrationen (sog. Copy number alterations) ist an dieser Entität bislang nicht durchgeführt worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 21 ptDLBCL mittels immunhistochemischer und molekulargenetischer Methoden charakterisiert. Hierbei wurden sowohl die Mutationsfrequenz von *BRAF*, *NRAS* und *MYD88* als auch ein Rearrangement von *BCL2*, *BCL6* und *cMYC* sowie das Auftreten wiederkehrender chromosomaler Aberrationen untersucht. Zur Anwendung kamen neben einer Pyro- und Sangersequenzierung die Zweifarben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und aCGH-Analyse. Das untersuchte Kollektiv enthielt 14 Proben des GCB- und 7 Proben des non-GCB-Typs. In vier Fällen bestand eine zugrunde liegende lymphozytäre Thyreoiditis oder war im Untersuchungsmaterial histologisch zu sichern, weitere fünf Fälle wiesen in der Vorgeschichte ein niedrigmalignes (follikuläres) Lymphom auf. Für die übrigen Fälle standen keine solchen klinischen Parameter zur Verfügung.

Bei allen untersuchten Proben fanden sich mittels aCGH chromosomale Aberrationen, im Mittel zeigten sich 8,7 Alterationen pro Fall, wobei sich mehr Zugewinne als Verluste fanden. Die Anzahl detektierbarer Aberrationen unterschied sich zwischen den GCB- und non-GCB-Gruppen nicht signifikant. Die häufigsten wiederkehrenden Zugewinne genetischen Materials betrafen die Regionen 6p21.33-p21.31, 6p22.2, 12p13.31, 14q31.1, 14q32.33, 19p13.3 und 22q11.22, Verluste waren am häufigsten in den folgenden Regionen zu finden: 6p21.3-p21.31, 10q26.3, 19p13.3, 20q13.33 und 21q11.2. Aberrationen auf 6p22.2 und 14q32.33 sowie 22q11.22 zeigten zwischen Proben des GCB- und non-GCB-Typs geringe Häufigkeitsunterschiede, deutlichere Veränderungen ließen sich jedoch nur in den Regionen 20q13.33 und 21q11.2 nachweisen.

Einzelne der o.g. Alterationen sind – nach aktueller Datenlage (Stand Dezember 2014) – in B-Zell-Lymphomen im Allgemeinen bzw. DLBCL und Burkitt-Lymphomen im Speziellen zu finden. Hierbei handelt es sich zum einen um den Immunglobulin-Schwerkettenloкус (IgH) auf 14q32.33, der bei zahlreichen B-Zell-Lymphomen Rearrangements zeigt und offenbar einen frühen Schritt in der Pathogenese darstellt. Zum anderen handelt es sich um die Region 19p13.3, die Alterationen mit einer Frequenz von 9 – 14,6 % zeigt und für verschiedene Tumorsuppressoren und Onkogene (u.a. TNFSF7, TNFSF9 und CD70) kodiert.

Mit den in epithelialen Schilddrüsentumoren nachgewiesenen Aberrationen hingegen fanden sich in der aCGH keine Überschneidungen.

Die Analyse von *BRAF* und *NRAS* zeigte lediglich einzelne Fälle mit detektierbaren Mutationen, die Mutationsfrequenzen betragen im untersuchten Kollektiv 4,8 % (1/21) bzw. 9,5 % (2/21). Keine der Proben wies eine *MYD88*-Mutation (p.L265P) auf.

In der Zweifarben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung fanden sich Rearrangements des *BCL2*-, *BCL6*- bzw. *cMYC*-Locus in drei bzw. jeweils zwei untersuchten Fällen (entsprechend 14,3 %, 9,5 % und 9,5% aller Fälle). Alle Fälle mit einem *BCL2*- und *cMYC*-Rearrangement waren immunhistochemisch dem GCB-Typ zuzuordnen, im Falle eines *BCL6*-Rearrangements lagen je einmal der GCB- und non-GCB-Typ vor. Alterationen in den korrespondierenden Genloci (8q24 (*cMYC*), 18q21 (*BCL2*) und 3q27 (*BCL6*)) ließen sich in der aCGH jedoch in keinem der Fälle detektieren.

In der Zusammenfassung weisen die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass ptDLBCL sich genetisch von epithelialen Schilddrüsentumoren unterscheiden und auch mit anderen B-Zell-Lymphomen nur einzelne Überschneidungen zeigen, die zumeist einen frühen Schritt in der Pathogenese darstellen. Aufgrund der Seltenheit und der daraus resultierenden relativ geringen Fallzahl sollte eine abschließende Bewertung, in welchem Ausmaß es sich bei ptDLBCL genetisch um eine eigenständige Entität handelt, jedoch nicht auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie allein gestützt werden. Weiterführende Analysen (z.B. whole genome sequencing) mit dem Ziel einer genaueren Charakterisierung relevanter Gene könnten einen tiefergehenden Einblick in pathogenetische Mechanismen gewähren und potentielle therapeutische Zielstrukturen aufzeigen.

## 6 ANHANG

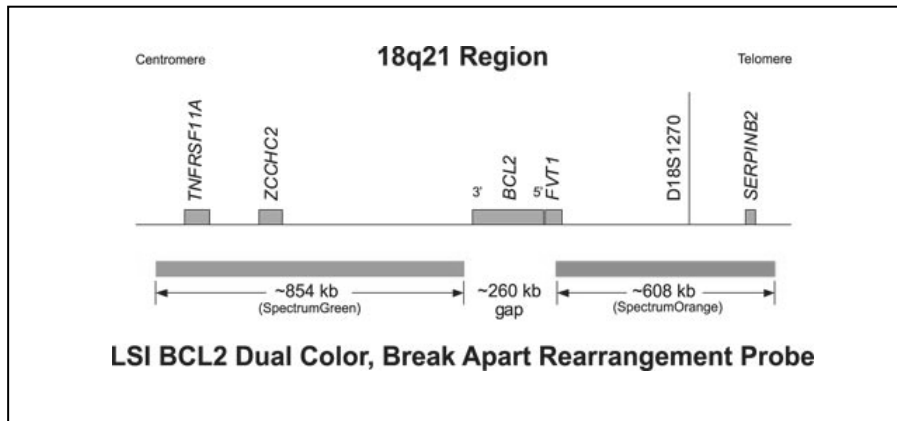


Abbildung 3 Chromosomale Lokalisation der Zweifarben-Bruchsonde des BCL2-Locus (18q21-Region).  
Abbildung aus: <https://www.abbottmolecular.com/products/oncology/fish/hematology-probes.html>.

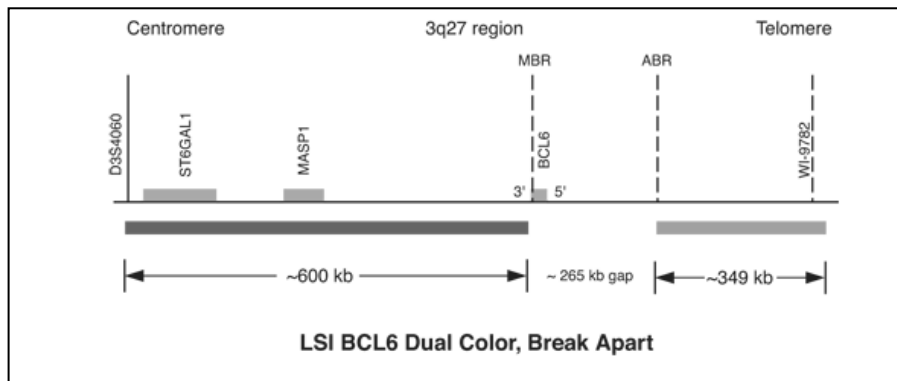


Abbildung 4 Chromosomale Lokalisation der Zweifarben-Bruchsonde des BCL6-Locus (3q27-Region).  
Abbildung aus: <https://www.abbottmolecular.com/products/oncology/fish/hematology-probes.html>.

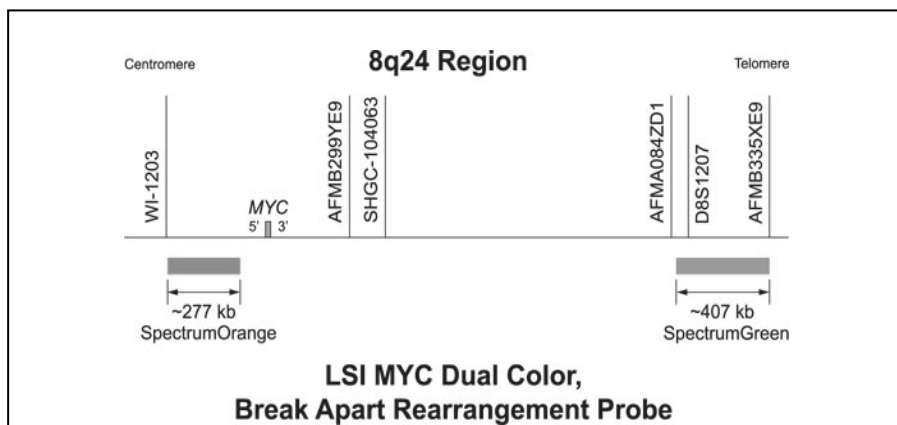


Abbildung 5 Chromosomale Lokalisation der Zweifarben-Bruchsonde des cMYC-Locus (8q24-Region).  
Abbildung aus: <https://www.abbottmolecular.com/products/oncology/fish/hematology-probes.html>.

**Tabelle 21 Übersicht aller untersuchten ptDLBCL mit Angabe der mittels aCGH detektierten chromosomalen Aberrationen.**

Fallnummer	Chromosomale Regionen mit Zugewinnen genetischen Materials	Chromosomale Regionen mit Verlusten genetischen Materials
1	2p11.2; 2q24.3; 3q23 - q24; 3q27.3 - q28; 5q23.2; 6p22.2 - p22.1; 6p22.1; 7p21.1; 11q24.3; 12p13.1 - p12.3; 13q14.2 - q14.3; 21q22.12; Xq26.2; Xq28	2q37.1 - q37.2; 3p14.2; 6p22.1; 11p11.2 - p11.12
2	22q11.22	3p21.31; 15q15.3-q21.1; 15q26.2
3	6p22.2 - p22.1; 11p13; 12p13.31; 14q32.33	10q26.3; 22q13.31 - q13.33
4	2q32.3; 3q27.3 - q28; 4q31.1; 6p22.2; 6p22.1; 6p21.32, 8q12.1; 11q24.3; 13q14.11	2q37.3; 20q13.33; 22q13.32 - q13.33
5	14q32.33	
6	9p24.1 - p21.1; 16p13.3 - p12.1; 21q21.1 - q22.3; Xq11.1 - q28	
7	1p36.22; 1p35.1; 11q23.3; 14q31.1; 14q32.33; Yq11.223	6p21.33 - p21.32; 10q25.3 - q26.11; 12q24.23 - q24.31; 16p12.2; 21q11.2
8	14q31.1; 14q32.33	10q26.3; 20q13.33
9	14q32.33; 22q11.22	
10	14q23.2; 14q32.33; 15q11.1 - q11.2; 19q11	10q26.3
11	6p22.2 - p22.1; 14q32.33	19p13.3 - p13.2
12	3p21.31 - p21.1; 7q11.23; 7q22.1; 10q21.3 - q22.2; 11q12.2 - q13.2; 11q23.3; 14q31.1; 14q32.33; 16q22.1; 17p13.3 - p13.1; 17p12 - p11.2; Yq11.21 - q12	2p25.3
13	14q31.1; 14q32.33; 15q15.1; 19q13.41 - q13.42; 22q11.22	Xp22.31
14	1q24.2 - q25.1; 7p22.2 - p22.1; 7q11.22 - q11.23; 7q21.3 - q22.1; 10p15.1 - p14; 12q13.11 - q13.13; 14q31.1	1q25.2 - q31.1; 6p21.33 - p21.31 8q12.1 - q12.3; 9p21.3; 10p15.3 - p15.2; 10p14; 10q26.3; 17q25.1 - q25.3; 18q11.1 - q11.2; 21q11.2; 21q22.3
15	6p22.2 - p22.1; 13q31.3 - q32.1; 14q32.33; 22q11.22	10q26.3; 20q13.33; 21q11.2
16	6p22.2; 6p21.33 - p21.32; 6q11.1 - q13; 12p13.31; 14q32.33, 18q12.1; 18q21.2; 18q21.33; 21q22.12	20p13; 20q13.33; 22q13.2 - q13.33
17	1p36.33 - p36.13; 19p13.3 - p12; 22q11.22; Xp22.33	1p36.13 - p34.3; 5q14.3 - q21.3; 14q32.2 - q32.33; 15q14 - q21.1
18	1q21.2 - q21.3; 7p12.1 - p11.2; 14q31.1; Xp22.33; Xp21.3 - p11.21; Yq11.222 - q11.113; Yq12	
19	13q14.2 - q14.3; 14q32.33	5p14.3; 8p23.3 - p23.2; 8q24.3; 9p23; 10q26.2 - q26.3; 12q24.33; 13q34; 21q11.2; 22q13.31 - q13.33; Xp22.33; Xq11.1 - q11.2
20	6q14.3, 8q11.21 - q12.1; 14q32.33; 17q21.2 - q21.32; 17q23.2 - q23.3; 22q11.22; Xp11.22 - p11.21; Xq13.1	1p36.32 - p36.23; 6q15; 9p21.3; 16p13.3 - p13.2; 17q23.2; 17q23.3 - q24.1; 19p13.3 - p13.2
21	3p25.3; 4q31.1; 5q33.3; 12p13.31; 12p13.1 - p12.3; 14q32.33; 22q11.22	7q36.3; 8p23.3 - p23.2; 8q24.3, 15q11.1 - q11.2; 20q13.33; 22q13.32 - q13.33; Yp11.31 - p11.2

**Tabelle 22 Reagenzien**

Reagenz	Hersteller/Firma
PyroMark Master Kit	PyroMark, Qiagen, Hilden
PyroMark PCR Bindungspuffer	PyroMark, Qiagen, Hilden
PyroMark Annealing Puffer	PyroMark, Qiagen, Hilden
Streptavidin Sepharose High Perf.	Geyer
RNasefree Water	Qiagen
Coral Load Concentrate 10x	Qiagen
Ethanol (100 %, 85 %, 70 %)	Merck
Pepsinpulver	Sigma P6887
1 M HCl	Merck
0,5 M EDTA	Gibco
Paraformaldehyd	Merck
Fixogum	Qbiogene
Xylol	Th. Geyer
Ampure XPbeads	Agencourt
SLS (sample loading solution)	Beckmann & Coulter
Öl	Beckmann & Coulter
Puffer	Beckmann & Coulter
DTCS Seq Starter Kit	Genomelab
Cleanseq Aufreinigungskit, Cleanseq Beads	Agencourt
Agarosegel 1,5 %	Geyer
Ethidiumbromid	Geyer
Qia Amp Mini Kit	Qiagen
Proteinase K	Qiagen
ATL Puffer	Qiagen
AL Puffer	Qiagen
AW1 Puffer	Qiagen
AW2 Puffer	Qiagen
AE Puffer	Qiagen
Diaminobenzidin	DAKO
Referenz-DNA	Agilent
180 K Oligo Arrays	Agilent
Random-Primer	Agilent
Labeling Mix (Cyanine 5-dUTP und 3-dUTP)	Agilent
Exo(-)Klenow	Agilent
TE	Agilent
Hybridization Master Mix	Agilent
HI-RPM Hybridization Puffer	Agilent
aCGH Blocking Agent	Agilent
Drying Solution	Agilent
Pufferlösung 1, Pufferlösung 2	Agilent

**Tabelle 23 Geräte**

Gerät	Hersteller
Pyromark Q24	Qiagen
Surescan high-resolution Scanner	Agilent
Thermocycler T1	Biometra
Tischzentrifugen	Beckmann, Heraeus Instruments, Eppendorf
Mikroskop- Axioskop	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop)	Zeiss
Rotationsmikrotom	Leica DSC1
Mehrkanalpipetten	Eppendorf
Schüttler	TecNoMara
QuickRay®	Unitma
CEQ 8800	Beckmann & Coulter, Fullerton Genome Lab GeXP
Kühl-/Gefrierschrank	Liebherr
Magnetständer	Ikamag
Kochplatte	Koch
Vortexer	IKA Genius 3
Wasserbad	Köttermann, GFL
Hybridisierungssofen	Equip
Dampf-/Schnellkochtopf	Tefal Clipso 6 l
Picofuge	Sarstedt
Feinwaagen	Ohaus, Kern
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Multipipetten (20 µl, 100 µl)	Eppendorf
Bench-Werkbank	Heraeus
Heraeus Biofuge	Heraeus
Eismaschine	Scotman
Brutschrank	Heraeus
Magnetrührer	Ikamag
Fluoreszenzfilter	Visis
Abzüge	Captair, Heraeus Instruments
Kapillarspalt-Objekträger	Marienfeld
Bond Max	Menarini
Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific
TechMate	DAKO

**Tabelle 24 In silico (Computer-) Ressourcen**

Programm	URL
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
Ensemble	<a href="http://www.ensemble.com">http://www.ensemble.com</a>

**Tabelle 25 Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller/Firma
96 Well Platte	Thermo Scientific
Array Platte	Agilent
Silanisierte Objektträger	Menzel-Gläser
Pipettenspitzen	Sarstedt
Deckgläschen	Leica
Deckgläschen rund	Leica
Küvetten	Leica
Eppendorf Cups	Eppendorf
PCR-Cups	Sarstedt
Proben- und Pufferplatten	Beckmann
Haftetiketten	Herma
Miniprep-Röhrchen	Sarstedt
Combitips	Omnilab, Eppendorf
Filtertips	Sarstedt, Biozym
OT Metallhalter	Leica Biosystems
Superfrost-Objektträger	Menzel-Gläser

**Tabelle 26 Verbrauchslösungen**

Lösung	Hersteller
Bond Epitope Retrieval Solution 1, Citratpuffer, ph 6,0	Leica Biosystems
Bond Epitope Retrieval Solution 2, EDTA-Puffer, ph 9,0	Leica Biosystems
Staging wash solution (Verdünnung 1:10)	Leica Biosystems
Acetonitril	Agilent
Dewax solution	Leica Biosystems
Aqua dest.	Merck

**Tabelle 27 Software**

Software	Hersteller
CEQ System Version 9.0	Beckmann & Coulter
PyroMark Assay Design 2.0	PyroMark, Qiagen, Hilden
PyroMark Q24 2.0.6.20	PyroMark, Qiagen, Hilden
Agilent CytoGenomics Edition 2.5.8.11	Agilent Technologies
GraphPad QuickCalcs	GraphPad Software, Freeware, 2014
Microsoft Excel	Microsoft Office, Version 2010
Microsoft Word	Microsoft Office, Version 2010
Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific
Seqworks.exe	SeqWorks Freeware

## 7 LITERATUR

1. Walsh, S., et al., *Thyroid lymphoma: recent advances in diagnosis and optimal management strategies*. *Oncologist*, 2013. **18**(9): p. 994-1003.
2. Derringer, G.A., et al., *Malignant lymphoma of the thyroid gland: a clinicopathologic study of 108 cases*. *Am J Surg Pathol*, 2000. **24**(5): p. 623-39.
3. Hyjek, E. and P.G. Isaacson, *Primary B cell lymphoma of the thyroid and its relationship to Hashimoto's thyroiditis*. *Hum Pathol*, 1988. **19**(11): p. 1315-26.
4. Alzouebi, M., et al., *Primary thyroid lymphoma: the 40 year experience of a UK lymphoma treatment centre*. *Int J Oncol*, 2012. **40**(6): p. 2075-80.
5. Kato, I., et al., *Chronic thyroiditis as a risk factor of B-cell lymphoma in the thyroid gland*. *Jpn J Cancer Res*, 1985. **76**(11): p. 1085-90.
6. Pedersen, R.K. and N.T. Pedersen, *Primary non-Hodgkin's lymphoma of the thyroid gland: a population based study*. *Histopathology*, 1996. **28**(1): p. 25-32.
7. Holm, L.E., H. Blomgren, and T. Lowhagen, *Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis*. *N Engl J Med*, 1985. **312**(10): p. 601-4.
8. Kumar, R., et al., *Survival and failure outcomes in primary thyroid lymphomas: a single centre experience of combined modality approach*. *J Thyroid Res*, 2013. **2013**: p. 269034.
9. Abdul-Rahman, Z.H., et al., *T-cell lymphoma in Hashimoto's thyroiditis*. *Histopathology*, 1996. **29**(5): p. 455-9.
10. Kim, N.R., Y.H. Ko, and Y.D. Lee, *Primary T-cell lymphoma of the thyroid associated with Hashimoto's thyroiditis, histologically mimicking MALT-lymphoma*. *J Korean Med Sci*, 2010. **25**(3): p. 481-4.
11. Widder, S. and J.L. Pasiaka, *Primary thyroid lymphomas*. *Curr Treat Options Oncol*, 2004. **5**(4): p. 307-13.
12. Thieblemont, C., et al., *Primary thyroid lymphoma is a heterogeneous disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(1): p. 105-11.
13. Chenna, H., et al., *[Primitive non-Hodgkin lymphoma of the thyroid: about seven cases]*. *Pan Afr Med J*, 2012. **12**: p. 79.
14. Graff-Baker, A., et al., *Prognosis of primary thyroid lymphoma: demographic, clinical, and pathologic predictors of survival in 1,408 cases*. *Surgery*, 2009. **146**(6): p. 1105-15.
15. Nikiforov, Y.E., *Molecular diagnostics of thyroid tumors*. *Arch Pathol Lab Med*, 2011. **135**(5): p. 569-77.
16. Chen, D., et al., *BRAFV600E Mutation and Its Association with Clinicopathological Features of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90607.
17. Xu, X., et al., *High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines*. *Cancer Res*, 2003. **63**(15): p. 4561-7.
18. Tufano, R.P., et al., *BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis*. *Medicine (Baltimore)*, 2012. **91**(5): p. 274-86.
19. Flaherty, K.T. and G. McArthur, *BRAF, a target in melanoma: implications for solid tumor drug development*. *Cancer*, 2010. **116**(21): p. 4902-13.
20. Gajewski, T.F., *Molecular profiling of melanoma and the evolution of patient-specific therapy*. *Semin Oncol*, 2011. **38**(2): p. 236-42.
21. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. *Nature*, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
22. Sclafani, F., et al., *BRAF mutations in melanoma and colorectal cancer: a single oncogenic mutation with different tumour phenotypes and clinical implications*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013. **87**(1): p. 55-68.
23. Tiacci, E., et al., *BRAF mutations in hairy-cell leukemia*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(24): p. 2305-15.

24. Fernandez, I.J., et al., *Clinical significance of BRAF mutation in thyroid papillary cancer*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2013. **148**(6): p. 919-25.
25. Eze, O.P., L.F. Starker, and T. Carling, *The role of epigenetic alterations in papillary thyroid carcinogenesis*. J Thyroid Res, 2011. **2011**: p. 895470.
26. Kimura, E.T., et al., *High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(7): p. 1454-7.
27. Braun, B.S. and K. Shannon, *Targeting Ras in myeloid leukemias*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(8): p. 2249-52.
28. Johnson, D.B., K.S. Smalley, and J.A. Sosman, *Molecular Pathways: Targeting NRAS in Melanoma and Acute Myelogenous Leukemia*. Clin Cancer Res, 2014.
29. Fedorenko, I.V., G.T. Gibney, and K.S. Smalley, *NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management*. Oncogene, 2013. **32**(25): p. 3009-18.
30. Pylayeva-Gupta, Y., E. Grabocka, and D. Bar-Sagi, *RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(11): p. 761-74.
31. Aggarwal, N., et al., *Thyroid carcinoma-associated genetic mutations also occur in thyroid lymphomas*. Mod Pathol, 2012. **25**(9): p. 1203-11.
32. Vasko, V., et al., *Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2745-52.
33. Basolo, F., et al., *N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression*. Thyroid, 2000. **10**(1): p. 19-23.
34. Garcia-Rostan, G., et al., *ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(17): p. 3226-35.
35. Rodrigues, R., et al., *Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas*. Oncol Rep, 2007. **18**(4): p. 917-26.
36. Finn, S., et al., *Low-level genomic instability is a feature of papillary thyroid carcinoma: an array comparative genomic hybridization study of laser capture microdissected papillary thyroid carcinoma tumors and clonal cell lines*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(1): p. 65-73.
37. Lee, J., J.A. Hwang, and E.K. Lee, *Recent progress of genome study for anaplastic thyroid cancer*. Genomics Inform, 2013. **11**(2): p. 68-75.
38. Held, G., N. Murawski, and M. Pfreundschuh, *Therapiestrategien beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom*. Der Onkologe, 2011. **17**(9): p. 789-798.
39. Ott, G. and A. Rosenwald, *[Extranodal diffuse large B-cell lymphoma--an organotypic disease?]*. Pathologe, 2007. **28**(1): p. 29-35.
40. *A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project*. Blood, 1997. **89**(11): p. 3909-18.
41. Campo, E., et al., *The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications*. Blood, 2011. **117**(19): p. 5019-32.
42. Jaffe, E.S. and S. Pittaluga, *Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 506-14.
43. Armitage, J.O. and D.D. Weisenburger, *New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project*. J Clin Oncol, 1998. **16**(8): p. 2780-95.
44. Coiffier, B., *Diffuse large cell lymphoma*. Curr Opin Oncol, 2001. **13**(5): p. 325-34.
45. Menon, M.P., S. Pittaluga, and E.S. Jaffe, *The histological and biological spectrum of diffuse large B-cell lymphoma in the World Health Organization classification*. Cancer J, 2012. **18**(5): p. 411-20.

46. Anderson, J.R., J.O. Armitage, and D.D. Weisenburger, *Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project.* Ann Oncol, 1998. **9**(7): p. 717-20.
47. Blinder, V., S.G. Fisher, and N.Y. Lymphoma Research Foundation, *The role of environmental factors in the etiology of lymphoma.* Cancer Invest, 2008. **26**(3): p. 306-16.
48. Friedberg, J.W. and R.I. Fisher, *Diffuse large B-cell lymphoma.* Hematol Oncol Clin North Am, 2008. **22**(5): p. 941-52, ix.
49. Leiggenger, C.S., et al., *[HIV-associated lymphoma -- an unusual cause of pathological mandibular fracture].* Mund Kiefer Gesichtschir, 2005. **9**(1): p. 48-52.
50. Montoto, S. and J. Fitzgibbon, *Transformation of indolent B-cell lymphomas.* J Clin Oncol, 2011. **29**(14): p. 1827-34.
51. Maeshima, A.M., et al., *Diffuse large B-cell lymphoma after transformation from low-grade follicular lymphoma: morphological, immunohistochemical, and FISH analyses.* Cancer Sci, 2008. **99**(9): p. 1760-8.
52. Yang, Q.X., et al., *Secondary cutaneous Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a case report and review of literature.* Diagn Pathol, 2012. **7**: p. 7.
53. Skugor, N.D., et al., *Diffuse large B-cell lymphoma in patient after treatment of angioimmunoblastic T-cell lymphoma.* Coll Antropol, 2010. **34**(1): p. 241-5.
54. Gurbuxani, S., J. Anastasi, and E. Hyjek, *Diffuse large B-cell lymphoma--more than a diffuse collection of large B cells: an entity in search of a meaningful classification.* Arch Pathol Lab Med, 2009. **133**(7): p. 1121-34.
55. Canelhas, A., et al., *Marginal zone lymphoma of both spleen and kidney displaying transformation into large B-cell lymphoma.* Int Urol Nephrol, 2006. **38**(3-4): p. 431-7.
56. Harris, N.L., et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group.* Blood, 1994. **84**(5): p. 1361-92.
57. Jaffe, E.S., et al., *Hematopathology.* 2010: Elsevier Science Health Science Division.
58. Armitage, J.O., *Staging non-Hodgkin lymphoma.* CA Cancer J Clin, 2005. **55**(6): p. 368-76.
59. Bacon, C.M., M.Q. Du, and A. Dogan, *Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma: a practical guide for pathologists.* J Clin Pathol, 2007. **60**(4): p. 361-72.
60. Coiffier, B., et al., *CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma.* N Engl J Med, 2002. **346**(4): p. 235-42.
61. Plosker, G.L. and D.P. Figgitt, *Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia.* Drugs, 2003. **63**(8): p. 803-43.
62. Coiffier, B., *Rituximab therapy in malignant lymphoma.* Oncogene, 2007. **26**(25): p. 3603-13.
63. Loddenkemper, C., et al., *Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas.* J Pathol, 2004. **202**(1): p. 60-9.
64. Berglund, M., et al., *Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis.* Mod Pathol, 2005. **18**(8): p. 1113-20.
65. Bodoor, K., et al., *Evaluation of BCL-6, CD10, CD138 and MUM-1 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients: CD138 is a marker of poor prognosis.* Asian Pac J Cancer Prev, 2012. **13**(7): p. 3037-46.
66. Oh, Y.H. and C.K. Park, *Prognostic evaluation of nodal diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemical profiles with emphasis on CD138 expression as a poor prognostic factor.* J Korean Med Sci, 2006. **21**(3): p. 397-405.
67. Alizadeh, A.A., et al., *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling.* Nature, 2000. **403**(6769): p. 503-11.
68. Gutierrez-Garcia, G., et al., *Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy.* Blood, 2011. **117**(18): p. 4836-43.

69. Rosenwald, A., et al., *The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2002. **346**(25): p. 1937-47.
70. Choi, W.W., et al., *A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(17): p. 5494-502.
71. Hans, C.P., et al., *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray*. Blood, 2004. **103**(1): p. 275-82.
72. Visco, C., et al., *Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study*. Leukemia, 2012. **26**(9): p. 2103-13.
73. Katoh, M., et al., *Cancer genetics and genomics of human FOX family genes*. Cancer Lett, 2013. **328**(2): p. 198-206.
74. Feng, J., et al., *High expression of FoxP1 is associated with improved survival in patients with non-small cell lung cancer*. Am J Clin Pathol, 2012. **138**(2): p. 230-5.
75. Hu, C.R., et al., *Both FOXP1 and p65 expression are adverse risk factors in diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective study in China*. Acta Histochem, 2013. **115**(2): p. 137-43.
76. Banham, A.H., et al., *Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(3): p. 1065-72.
77. Kramer, M.H., et al., *Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3152-62.
78. Nedomova, R., et al., *Cytogenetics and molecular cytogenetics in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2013. **157**(3): p. 239-47.
79. Katzenberger, T., et al., *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): p. 481-90.
80. Chang, C.C., et al., *BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 6947-52.
81. Prakash, S. and S.H. Swerdlow, *Nodal aggressive B-cell lymphomas: a diagnostic approach*. J Clin Pathol, 2007. **60**(10): p. 1076-85.
82. Robledo, C., et al., *Array comparative genomic hybridization identifies genetic regions associated with outcome in aggressive diffuse large B-cell lymphomas*. Cancer, 2009. **115**(16): p. 3728-37.
83. Valera, A., et al., *MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy*. Haematologica, 2013. **98**(10): p. 1554-62.
84. Akyurek, N., et al., *Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab*. Cancer, 2012. **118**(17): p. 4173-83.
85. Lee, J.W., et al., *BRAF mutations in non-Hodgkin's lymphoma*. Br J Cancer, 2003. **89**(10): p. 1958-60.
86. Cook, J.R., S. Shekhter-Levin, and S.H. Swerdlow, *Utility of routine classical cytogenetic studies in the evaluation of suspected lymphomas: results of 279 consecutive lymph node/extranodal tissue biopsies*. Am J Clin Pathol, 2004. **121**(6): p. 826-35.
87. Zhao, X., et al., *Chromosome abnormalities in diffuse large B-cell lymphomas: analysis of 231 Chinese patients*. Hematol Oncol, 2013. **31**(3): p. 127-35.
88. Al-Humood, S.A., et al., *Genotypic and phenotypic differences between nodal and extranodal diffuse large B-Cell lymphomas*. J Histochem Cytochem, 2011. **59**(10): p. 918-31.

89. Dijkman, R., et al., *Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(2): p. 296-305.
90. Tirado, C.A., et al., *Genomic profiling using array comparative genomic hybridization define distinct subtypes of diffuse large B-cell lymphoma: a review of the literature*. J Hematol Oncol, 2012. **5**: p. 54.
91. Booman, M., et al., *Genomic alterations and gene expression in primary diffuse large B-cell lymphomas of immune-privileged sites: the importance of apoptosis and immunomodulatory pathways*. J Pathol, 2008. **216**(2): p. 209-17.
92. Berglund, M., et al., *Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization*. Mod Pathol, 2002. **15**(8): p. 807-16.
93. Guo, Y., et al., *Array-comparative genomic hybridization profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alterations*. Cancer Sci, 2014. **105**(4): p. 481-9.
94. Tagawa, H., et al., *Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1770-7.
95. Ngo, V.N., et al., *Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma*. Nature, 2011. **470**(7332): p. 115-9.
96. Poulain, S., et al., *MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia*. Blood, 2013. **121**(22): p. 4504-11.
97. Kim, Y., et al., *CD79B and MYD88 mutations in diffuse large B-cell lymphoma*. Hum Pathol, 2014. **45**(3): p. 556-64.
98. Kraan, W., et al., *High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites*. Blood Cancer J, 2013. **3**: p. e139.
99. Coste, I., et al., *Dual function of MyD88 in RAS signaling and inflammation, leading to mouse and human cell transformation*. J Clin Invest, 2010. **120**(10): p. 3663-7.
100. Pham-Ledard, A., et al., *MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(8): p. 2118-20.
101. Choi, J.W., et al., *MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma*. Hum Pathol, 2013. **44**(7): p. 1375-81.
102. Watanabe, N., et al., *Clinicopathological features of 171 cases of primary thyroid lymphoma: a long-term study involving 24553 patients with Hashimoto's disease*. Br J Haematol, 2011. **153**(2): p. 236-43.
103. Bhagavathi, S., et al., *Primary bone diffuse large B-cell lymphoma: clinicopathologic study of 21 cases and review of literature*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(10): p. 1463-9.
104. Booman, M., et al., *Primary testicular diffuse large B-cell lymphomas have activated B-cell-like subtype characteristics*. J Pathol, 2006. **210**(2): p. 163-71.
105. Aviv, A., T. Tadmor, and A. Polliack, *Primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: looking at pathogenesis, clinical issues and therapeutic options*. Ann Oncol, 2013. **24**(9): p. 2236-44.
106. Caronia, L.M., J.E. Phay, and M.H. Shah, *Role of BRAF in thyroid oncogenesis*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(24): p. 7511-7.
107. Arcaini, L., et al., *The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms*. Blood, 2012. **119**(1): p. 188-91.
108. Boyd, E.M., et al., *High resolution melting analysis for detection of BRAF exon 15 mutations in hairy cell leukaemia and other lymphoid malignancies*. Br J Haematol, 2011. **155**(5): p. 609-12.
109. Riemens, A., et al., *Diffuse large B-cell lymphoma in immunoprivileged sites: association of vitreoretinal, testicular and central nervous system lymphoma*. Acta Ophthalmol, 2014. **92**(2): p. e159-60.

110. Davis, R.E., et al., *Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1861-74.
111. Wrench, D., S. Montoto, and J. Fitzgibbon, *Molecular signatures in the diagnosis and management of follicular lymphoma*. Curr Opin Hematol, 2010. **17**(4): p. 333-40.
112. Bikos, V., et al., *Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: ontogenetic implications*. Leukemia, 2012. **26**(7): p. 1638-46.
113. Scholtysik, R., et al., *Recurrent deletions of the TNFSF7 and TNFSF9 genes in 19p13.3 in diffuse large B-cell and Burkitt lymphomas*. Int J Cancer, 2012. **131**(5): p. E830-5.
114. Bertrand, P., et al., *The costimulatory molecule CD70 is regulated by distinct molecular mechanisms and is associated with overall survival in diffuse large B-cell lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2013. **52**(8): p. 764-74.
115. Toujani, S., et al., *High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7089.
116. Uchida, F., et al., *Overexpression of cell cycle regulator CDCA3 promotes oral cancer progression by enhancing cell proliferation with prevention of G1 phase arrest*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 321.
117. Belkina, A.C., et al., *The double bromodomain protein Brd2 promotes B cell expansion and mitogenesis*. J Leukoc Biol, 2014. **95**(3): p. 451-60.
118. Nagamatsu, I., et al., *NOTCH4 is a potential therapeutic target for triple-negative breast cancer*. Anticancer Res, 2014. **34**(1): p. 69-80.
119. Saada, S., et al., *Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes*. J Immunol, 2012. **189**(11): p. 5293-303.
120. Kridel, R., L.H. Sehn, and R.D. Gascoyne, *Pathogenesis of follicular lymphoma*. J Clin Invest, 2012. **122**(10): p. 3424-31.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ann-Arbor-Klassifikation zur Stadieneinteilung der Non-Hodgkin-Lymphome .....	4
Tabelle 2 Gegenüberstellung ausgewählter, wiederkehrender chromosomaler Aberrationen in nodalen und extranodalen DLBCL unterschiedlicher Lokalisationen sowie DLBCL des GCB- und non-GCB-Typs.....	9
Tabelle 3 Für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendete Antikörper mit Angabe des Klons, der Verdünnung und der Art der Vorbehandlung.....	12
Tabelle 4 Arbeitsschritte zur DNA-Isolierung aus FFPE-Gewebe.....	13
Tabelle 5 Für die PCR verwendeter Ansatz unter Verwendung des PyroMark PCR MasterMix Kits.....	14
Tabelle 6 Verwendetes PCR-Programm unter Angabe der Arbeitsschritte, der Temperatur, der Zeitdauer und Anzahl der durchgeführten Zyklen.....	14
Tabelle 7 Für die Sangersequenzierung verwendete Primer des BRAF-Gens (Exon 15) und des NRAS-Gens (Exon 2, 3 und 4) mit Angabe der Primersequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsstränge. ....	15
Tabelle 8 Arbeitsschritte zur Sangersequenzierung auf dem Kapillarsequenzierer CEQ 8800.....	16
Tabelle 9 Verwendetes Thermocycler-Programm im Rahmen der Sangersequenzierung unter Angabe der Temperatur, der Zeitdauer und Anzahl der durchgeführten Zyklen. ....	16
Tabelle 10 Für die Pyrosequenzierung verwendete Primer des MYD88-Gens (Exon 5) mit Angabe der Sequenzen des Vorwärts- und Rückwärtsstranges sowie des Sequenzierungsprimers.....	17
Tabelle 11 Arbeitsschritte zur Pyrosequenzierung auf dem PyroMark Q24 System (Qiagen). ....	17
Tabelle 12 Arbeitsschritte bei der Array-CGH-Analyse. ....	18
Tabelle 13 Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendete Breakapart-Sonden.....	19
Tabelle 14 Arbeitsschritte bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	19
Tabelle 15 Patientencharakteristika der untersuchten Fälle mit Angabe des Patientenalters, des Geschlechtes und ggf. zugrundeliegender lymphozytärer Thyreoiditis bzw. zugrundeliegendem follikulärem Lymphom..	22
Tabelle 16 Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen mit Unterteilung in GCB- bzw. non-GCB-Typ anhand der Expression von CD10, bcl6, Mum1 und FOXP1 sowie Angabe der Proliferationsrate.....	23
Tabelle 17 Regionen wiederkehrender chromosomaler Alterationen mit assoziierten (potentiell pathogenetisch relevanten) Genen.....	28
Tabelle 18 Vergleich der chromosomalen Aberrationen in der GCB- und non-GCB-Gruppe unter Aufschlüsselung von Zugewinnen und Verlusten mit Angabe des jeweiligen p-Wertes. ....	31
Tabelle 19 Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Angabe eines Bruchereignisses (+) in den Genloci für <i>Bcl2</i> , <i>Bcl6</i> und <i>cMYC</i> . ....	32
Tabelle 20 Chromosomale Alterationen verschiedener Entitäten im Vergleich mit ptDLBCL. ....	38
Tabelle 21 Übersicht aller untersuchten ptDLBCL mit Angabe der mittels aCGH detektierten chromosomalen Aberrationen. ....	45
Tabelle 22 Reagenzien .....	46
Tabelle 23 Geräte .....	47
Tabelle 24 In silico (Computer-) Ressourcen.....	47
Tabelle 25 Verbrauchsmaterialien.....	48
Tabelle 26 Verbrauchslösungen .....	48
Tabelle 27 Software.....	48

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Immunhistochemisches Expressionsmuster eines als GCB-Typ klassifizierten Falles. ....	24
Abbildung 2 Immunhistochemisches Expressionmuster eines als non-GCB-Typ klassifizierten Falles. ....	25
Abbildung 3 Chromosomale Lokalisation der Zweifarben-Bruchsonde des BCL2-Locus (18q21-Region)...	44
Abbildung 4 Chromosomale Lokalisation der Zweifarben-Bruchsonde des BCL6-Locus (3q27-Region)....	44
Abbildung 5 Chromosomale Lokalisation der Zweifarben-Bruchsonde des cMYC-Locus (8q24-Region)....	44

## **Verzeichnis der Diagramme**

Diagramm 1 Hans-Algorithmus zur Klassifikation diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome in den GCB- und non-GCB-Typ mit Angabe der Grenzwerte (in Prozent).....	6
Diagramm 2 Visco-Young-Algorithmus zur Klassifikation diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome in den GCB- und non-GCB-Typ mit Angabe der Grenzwerte (in Prozent). ....	6
Diagramm 3: Übersicht der Zugewinne und Verluste genetischen Materials im Gesamtkollektiv .....	27
Diagramm 4: Anzahl der Proben mit chromosomalen Zugewinnen unter Angabe der Genloci, GCB-Gruppe. ....	29
Diagramm 5: Anzahl der Proben mit Verlusten genetischen Materials unter Angabe der Genloci, GCB-Gruppe.....	29
Diagramm 6: Anzahl der Proben mit Zugewinnen genetischen Materials unter Angabe der Genloci, non-GCB-Gruppe. ....	30
Diagramm 7: Anzahl der Proben mit Verlusten genetischen Materials unter Angabe der Genloci, non-GCB-Gruppe.....	30

## 8 DANKSAGUNG

Ohne die zuverlässige und beständige Unterstützung einiger wichtiger Personen, denen ich an dieser Stelle danken möchte, wäre die Realisierung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Christoph Thorns für die kompetente und zuverlässige Betreuung, die zahlreichen kritischen Anmerkungen, beharrlichen Hinweise und fachlichen Ratschläge sowie die humorvollen Aufmunterungen und seine unerschöpfliche Geduld.

Herrn Prof. Dr. med. A.C. Feller danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Pathologie im UKSH, Campus Lübeck, durchzuführen sowie für die Überlassung und Vermittlung dieses äußerst interessanten Themas. Ferner danke ich für die kontinuierliche Unterstützung des Projekts und Zur-Verfügungstellung sämtlicher notwendiger Materialien, Geräte und Räumlichkeiten.

Fr. Dr. rer. nat. Veronika Bernard, Fr. Dipl.-Biol. Janina Schemme und Herrn Dr. med. Niklas Gebauer danke ich für die unterhaltsame und fruchtbare Zusammenarbeit in den Laboratorien, ohne deren geduldige Anleitung und Hilfestellung die Ergebnisse dieser Arbeit nicht zustande gekommen wären.

Ich danke Biggi Steinfeldt und Tanja Oeltermann für die exzellente Anleitung und Unterstützung bei den Experimenten.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Mitarbeitern/innen des Labors für hämatologische Diagnostik des Instituts für Pathologie in Lübeck für die Anfertigung zahlreicher Schnittpräparate und immunhistochemischer Färbungen.

Ferner danke ich meinen Arbeitskolleginnen Fr. Katharina Reddemann, Fr. Dr. med. Christiane Kümpers und Fr. Dr. med. Julika Ribbat-Idel für den mir entgegengebrachten mentalen Rückhalt und – in Zeiten des Zweifels – die beständige Motivation.

Ich erkläre, dass ich die am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Molekulargenetische und immunhistochemische Charakterisierung von primär extranodalen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen der Schilddrüse**

im pathologischen Institut der Universität Schleswig-Holstein, Campus Lübeck unter Betreuung von

Herrn Professor Dr. med. Ch. Thorns

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel noch nicht erworben habe.

Die durchgeführten Untersuchungen sind vor Beginn der Arbeit von der Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck genehmigt worden (Aktenzeichen: 13-182A; Genehmigung am 30.08.2013).

Der Zulassung von Zuhörerinnen/Zuhörern bei der mündlichen Prüfung widerspreche ich auf diesem Weg.

Juliana Knief

Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung an folgende Publikationsorgane eingereicht und angenommen (in 8 Exemplaren separat beigelegt):

The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism

**Knief J, Gebauer N, Bernard V, Schemme J, Reddemann K, Gebauer J, Rades D, Brabant G, Lehnert H, Feller AC, Thorns C. Oncogenic mutations and chromosomal aberrations in primary extranodal diffuse large B-cell lymphomas of the thyroid - a study of 21 cases. J Clin Endocrinol Metab. 2014 Nov 25:jc20143250.**