

Aus dem Institut für Pathologie
(Prof. Dr. med. P. Ströbel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Vergleichende immunhistochemische
Analyse onkogener Signalwegssignaturen in
Lymphomen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Philipp Vincent Stauder

aus

Karlsruhe

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer*in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. med. G. Wulf

Prüfungskommission

Referent*in: Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Referent*in: Prof. Dr. med. G. Wulf

Drittreferent*in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 07.03.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Vergleichende immunhistochemische Analyse onkogener Signalwegssignaturen in Lymphomen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

Philipp Stauder

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert
(*online ahead of print*):

Wilke AC, Doebele C, Zindel A, Lee KS, Rieke SA, Ceribelli M, Comoglio F, Phelan JD, Wang JQ, Pikman Y, Jahn D, Häupl B, Schneider C, Scheich S, Tosto FA, Bohnenberger H, **Stauder P** et al. (2021): SHMT2 inhibition disrupts the TCF3 transcriptional survival program in Burkitt lymphoma. *Blood* (im Druck)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Abbildungsverzeichnis | III |
| Tabellenverzeichnis | V |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 B-Zell-Lymphome..... | 1 |
| 1.1.1 Einteilung maligner Lymphome | 1 |
| 1.1.2 Burkitt-Lymphom..... | 3 |
| 1.2 BCR-Signaling in Lymphomen | 4 |
| 1.3 Methoden zur Untersuchung essentieller BCR-abhängiger Signalwegs- signaturen in Lymphomen..... | 5 |
| 1.3.1 Phosphoproteomische Analysen..... | 5 |
| 1.3.2 RNA-Interferenz..... | 7 |
| 1.3.3 Immunhistochemische Färbung | 9 |
| 1.4 Ziel der Arbeit | 10 |
| 2 Material und Methoden..... | 11 |
| 2.1 Materialien | 11 |
| 2.2 Ethikantrag..... | 12 |
| 2.3 Auswahl der Proteine für Expressionsanalyse | 13 |
| 2.4 Formalinfixierung und Paraffineinbettung..... | 13 |
| 2.5 <i>tissue microarray</i> (TMA)..... | 13 |
| 2.5.1 Erstellen von TMAs..... | 13 |
| 2.5.2 Immunhistochemie..... | 14 |
| 2.5.3 Auswertung der IHC-Färbungen | 14 |
| 2.6 Statistische Überlebenszeitanalyse..... | 15 |
| 3 Ergebnisse | 17 |
| 3.1 Identifizierung essentieller Signalwegssignaturen des BCR beim BL | 17 |
| 3.1.1 Quantitative phosphoproteomische Analysen | 17 |
| 3.1.2 RNAi-Screen..... | 18 |
| 3.1.3 Kombination der Daten aus phosphoproteomischen Analysen und RNAi- Screen | 21 |
| 3.2 Vergleichende immunhistochemische Expressionsanalyse an humanen B-Zell- Lymphomen..... | 22 |
| 3.2.1 Lymphom-Kollektiv für immunhistochemische Expressionsanalyse | 22 |
| 3.2.2 Überlebenszeitanalyse Lymphom-Kollektiv nach Diagnose | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3 Expression von BCL2, BCL6 und MYC in humanen B-Zell-Lymphomen..... | 25 |
| 3.3.1 BCL2 | 25 |
| 3.3.2 BCL6 | 27 |
| 3.3.3 MYC | 29 |
| 3.3.4 Überlebenszeitanalyse BCL2, BCL6 und MYC in DLBCL | 30 |
| 3.4 Expression BCR-abhängiger Signalwegsignaturen in humanen B-Zell-Lymphomen..... | 33 |
| 3.4.1 ACTN4..... | 33 |
| 3.4.2 ARFGEF2 | 37 |
| 3.4.3 BCL11A | 42 |
| 3.4.4 CARD11 | 46 |
| 3.4.5 CDKN1B | 49 |
| 3.5 Expression von Proteinen des One-Carbon-Metabolismus in humanen B-Zell-Lymphomen..... | 54 |
| 3.5.1 MTHFD1 | 55 |
| 3.5.2 MTHFD2..... | 58 |
| 3.5.3 SHMT2 | 62 |
| 3.5.4 MTHFD1/MTHFD2/SHMT2 und MYC | 66 |
| 4 Diskussion | 67 |
| 4.1 Methodischer Ansatz | 67 |
| 4.2 BCL2, BCL6, MYC | 68 |
| 4.3 ACTN4..... | 71 |
| 4.4 ARFGEF2 | 72 |
| 4.5 BCL11A | 74 |
| 4.6 CARD11 | 76 |
| 4.7 CDKN1B..... | 78 |
| 4.8 MTHFD1, MTHFD2, SHMT2..... | 81 |
| 5 Zusammenfassung..... | 84 |
| 6 Literaturverzeichnis..... | 85 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: B-Zell-Differenzierung in Lymphfollikeln mit korrespondierenden B-Zell-Lymphomen | 2 |
| Abb. 2: Chronisch aktives und tonisches BCR-Signaling | 5 |
| Abb. 3: SILAC-basierte massenspektrometrische Analyse zur Erfassung BCR-abhängiger Veränderungen in der Phosphorylierung | 7 |
| Abb. 4: RNA-Interferenz mittels shRNA | 8 |
| Abb. 5: TMA | 10 |
| Abb. 6: Globales Phosphoproteom (GPome) für BL | 18 |
| Abb. 7: Essentielle Gene bei BL und Karzinomen | 20 |
| Abb. 8: shRNA-Effekte in BL- und Karzinom-Zelllinien | 20 |
| Abb. 9: Überlebenszeitanalyse Lymphom-Kollektiv | 24 |
| Abb. 10: Expression von BCL2 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-BCL2..... | 25 |
| Abb. 11: Expression von BCL2 in humanen Lymphomen | 26 |
| Abb. 12: Expression von BCL6 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-BCL6..... | 27 |
| Abb. 13: Expression von BCL6 in humanen Lymphomen | 28 |
| Abb. 14: Expression von MYC nach immunhistochemischer Färbung mit anti-MYC..... | 29 |
| Abb. 15: Expression von MYC in humanen Lymphomen | 30 |
| Abb. 16: Überlebenszeitanalyse DLBCL in Abhängigkeit von BCL2-, BCL6- und MYC-Expression | 31 |
| Abb. 17: Überlebenszeitanalyse DLBCL in Abhängigkeit von Co-Expression MYC/BCL2 und MYC/BCL6..... | 32 |
| Abb. 18: Expression von ACTN4 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-ACTN4 | 33 |
| Abb. 19: Expression von ACTN4 in humanen Lymphomen | 34 |
| Abb. 20: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von ACTN4-Expression | 36 |
| Abb. 21: Expression von ARFGEF2 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-ARFGEF2..... | 37 |
| Abb. 22: Expression von ARFGEF2 in humanen Lymphomen | 38 |
| Abb. 23: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von ARFGEF2-Expression | 41 |

| | |
|--|----|
| Abb. 24: Expression von BCL11A nach immunhistochemischer Färbung mit anti-BCL11A..... | 42 |
| Abb. 25: Expression von BCL11A in humanen Lymphomen..... | 43 |
| Abb. 26: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von BCL11A-Expression | 45 |
| Abb. 27: Expression von CARD11 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-CARD11 | 46 |
| Abb. 28: Expression von CARD11 in humanen Lymphomen..... | 47 |
| Abb. 29: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von CARD11-Expression..... | 48 |
| Abb. 30: Expression von CDKN1B nach immunhistochemischer Färbung mit anti-CDKN1B | 49 |
| Abb. 31: Expression von CDKN1B in humanen Lymphomen | 50 |
| Abb. 32: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von CDKN1B-Expression | 53 |
| Abb. 33: Schematische Darstellung des zellulären One-Carbon-Metabolismus..... | 54 |
| Abb. 34: Expression von MTHFD1 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-MTHFD1 | 55 |
| Abb. 35: Expression von MTHFD1 in humanen Lymphomen | 56 |
| Abb. 36: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von MTHFD1-Expression | 57 |
| Abb. 37: Expression von MTHFD2 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-MTHFD2 | 58 |
| Abb. 38: Expression von MTHFD2 in humanen Lymphomen | 59 |
| Abb. 39: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von MTHFD2-Expression | 61 |
| Abb. 40: Expression von SHMT2 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-SHMT2..... | 62 |
| Abb. 41: Expression von SHMT2 in humanen Lymphomen..... | 63 |
| Abb. 42: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von SHMT2-Expression..... | 65 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Geräte und Laborutensilien | 11 |
| Tab. 2: Chemikalien und Reagenzien..... | 11 |
| Tab. 3: Antikörper..... | 12 |
| Tab. 4: Software und Internetadressen | 12 |
| Tab. 5: Auswahlkriterien für Expressionsanalyse | 13 |
| Tab. 6: Ausgewählte Proteine aus phosphoproteomischen Analysen und RNAi-Screen | 21 |
| Tab. 7: Lymphom-Kollektiv für immunhistochemische Expressionsanalyse..... | 22 |
| Tab. 8: Überlebenszeitanalyse Lymphom-Kollektiv | 23 |
| Tab. 9: Absolute Auswertung TMA anti-BCL2 | 26 |
| Tab. 10: Absolute Auswertung TMA anti-BCL6 | 28 |
| Tab. 11: Absolute Auswertung TMA anti-MYC | 30 |
| Tab. 12: Absolute Auswertung TMA anti-ACTN4..... | 34 |
| Tab. 13: Absolute Auswertung TMA anti-ARFGEF2..... | 38 |
| Tab. 14: Assoziation von ARFGEF2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex..... | 39 |
| Tab. 15: Absolute Auswertung TMA anti-BCL11A..... | 43 |
| Tab. 16: Assoziation der Proteinexpression von BCL11A und BCL6 für DLBCL, BL und FL..... | 44 |
| Tab. 17: Absolute Auswertung TMA anti-CARD11 | 47 |
| Tab. 18: Absolute Auswertung TMA anti-CDKN1B..... | 50 |
| Tab. 19: Assoziation von CDKN1B-Expression und Ki-67-Proliferationsindex..... | 51 |
| Tab. 20: Absolute Auswertung TMA anti-MTHFD1 | 56 |
| Tab. 21: Absolute Auswertung TMA anti-MTHFD2..... | 59 |
| Tab. 22: Assoziation von MTHFD2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex..... | 60 |
| Tab. 23: Absolute Auswertung TMA anti-SHMT2 | 63 |
| Tab. 24: Assoziation von SHMT2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex | 64 |
| Tab. 25: DLBCL – Assoziation der Expression von MTHFD1/ MTHFD2/SHMT2 und MYC..... | 66 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| 1C- | Einkohlenstoff- |
| ABC | aktivierte B-Zelle |
| ACTN4 | Actinin 4 |
| AKT | Proteinkinase B |
| ARFGEF2 | <i>adenosine diphosphate ribosylation factor guanyl nucleotid exchange factor 2</i> |
| BCL2/6/11a | B-Zell-Lymphom 2/6/11a (Protein) |
| BCR | B-Zell-(Antigen)rezeptor |
| B-CLL | chronische lymphatische B-Zell-Leukämie |
| BL | Burkitt-Lymphom |
| -CA | -Karzinom |
| CARD11 | <i>caspase recruitment domain (containing protein) 11</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CDKN1B | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i> |
| cHL | klassisches Hodgkin-Lymphom |
| DEL | Double-Expressor-Lymphom |
| DHL | Double-Hit-Lymphom |
| DLBCL | diffuses großzelliges B-Zell Lymphom |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| eBL | endemisches Burkitt-Lymphom |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| FL | Follikuläres Lymphom |
| GCB | Keimzentrums-B-Zelle |
| HL | Hodgkin-Lymphom |
| HRS | Hodgkin-Reed-Sternberg (Zellen) |
| hivHL | HIV-assoziiertes Hodgkin-Lymphom |
| Ig | Immunglobulin |
| IHC | Immunhistochemie |
| KD | Knockdown |
| Ki-67 | Kiel-67 (Proliferationsmarker) |
| MALT | <i>mucosa associated lymphoid tissue</i> |
| MCL | Mantelzelllymphom |
| MM | Multiplres Myelom |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| MTHFD1/2 | Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 1/2 |
| mTOR | <i>mechanistic target of rapamycin</i> |

| | |
|-----------|---|
| MZL | Marginalzonenlymphom |
| NHL | Non-Hodgkin-Lymphom |
| NK-Zellen | natürliche Killerzellen |
| NSCLC | nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom |
| OS | Gesamtüberleben |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| RKI | Robert Koch-Institut |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| sBL | sporadisches Burkitt-Lymphom |
| SHMT2 | Serinhydroxymethyltransferase 2 |
| shRNA | <i>short hairpin RNA</i> |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SILAC | <i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i> |
| SYK | <i>spleen tyrosine kinase</i> |
| TEL | Triple-Expressor-Lymphom |
| THL | Triple-Hit-Lymphom |
| TMA | <i>tissue microarray</i> |
| UMG | Universitätsmedizin Göttingen |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

1 Einleitung

1.1 B-Zell-Lymphome

1.1.1 Einteilung maligner Lymphome

Bösartige Erkrankungen des lymphatischen Systems werden als maligne Lymphome bezeichnet. Zusammengefasst stellen sie mit einer Inzidenz von ca. 33/100000 Einwohner und einem Anteil von 5 – 6% an allen Krebserkrankungen die vierthäufigste Tumorerkrankung in Deutschland dar (RKI 2021). Die Einteilung maligner Lymphome erfolgt anhand der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Swerdlow et al. 2016). Je nach entartetem Zelltyp werden dabei B-Zell-Lymphome von T- bzw. NK-Zell-Lymphomen unterschieden, wobei B-Zell-Lymphome mit > 90% am häufigsten vorkommen (RKI 2021). Innerhalb der Gruppe der B-Zell-Lymphome lassen sich traditionell Hodgkin- (~ 15%) von Non-Hodgkin-Lymphomen (~ 85%) voneinander abgrenzen. Bei den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) wird wiederum zwischen hochmalignen (aggressiven) Lymphomen und niedrigmalignen (indolenten) Lymphomen unterschieden. Je nach entartetem Zelltyp, Pathogenese, klinischer Präsentation und genetischen Merkmalen unterscheidet die Lymphom-Klassifikation der WHO darüber hinaus zahlreiche verschiedene Subtypen (Swerdlow et al. 2016). Abb. 1 gibt einen Überblick über die häufigsten B-Zell-Lymphome anhand ihrer Entstehung aus verschiedenen Entwicklungsstufen im Rahmen der B-Zell-Differenzierung. Bezogen auf das Keimzentrum in den Lymphfollikeln werden **präfollikuläre** (Mantelzellymphom (MCL), Chronische lymphatische B-Zell-Leukämie (B-CLL) unmutiert), **follikuläre** (Burkitt-Lymphom (BL), Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL), Follikuläres Lymphom (FL), Hodgkin-Lymphom (HL)) und **postfollikuläre** (B-CLL, Marginalzonenlymphom (MZL), Multiples Myelom (MM)) B-Zell-Neoplasien unterschieden. Die malignen B-Zellen weisen je nach Entwicklungsstufe charakteristische Antigene (z. B. *cluster of differentiation* (CD)) auf der Zelloberfläche auf, die für die Diagnostik entscheidend sind. Darüber hinaus sind die verschiedenen Lymphom-Entitäten durch spezifische morphologische und pathogenetische Merkmale gekennzeichnet und unterscheiden sich im klinischen Erscheinungsbild (Jaffe et al. 2008).

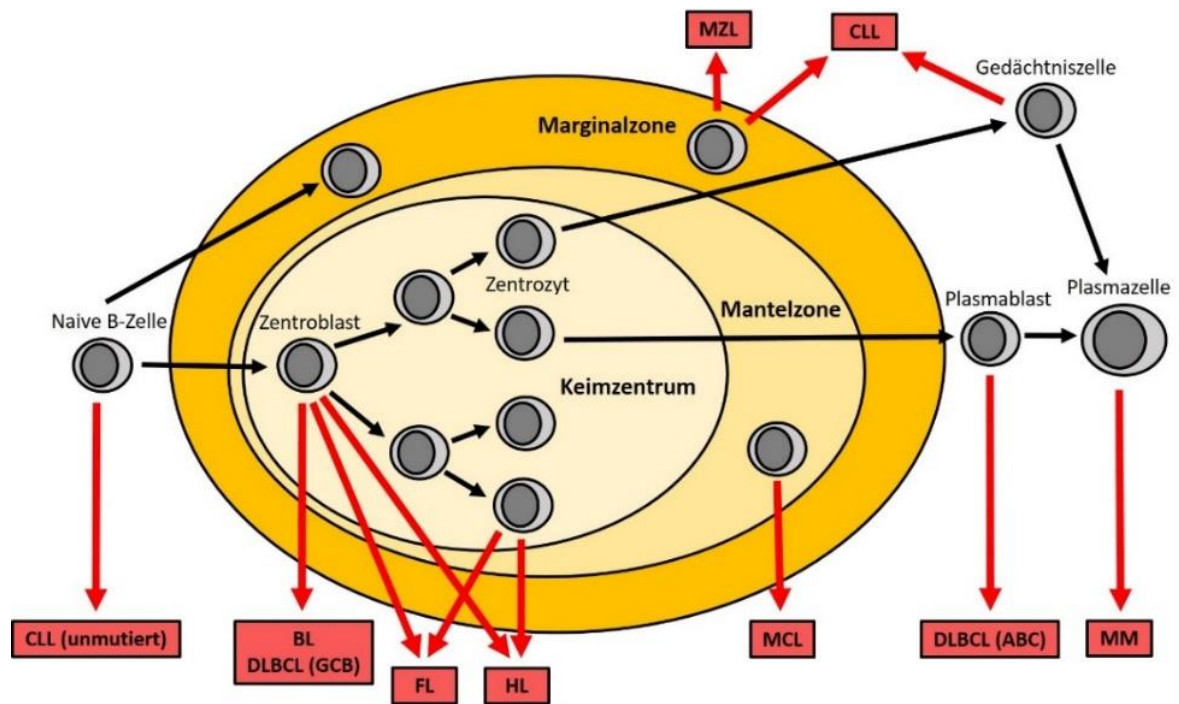


Abb. 1: B-Zell-Differenzierung in Lymphfollikeln mit korrespondierenden B-Zell-Lymphomen
 Vereinfachte schematische Darstellung. Mantelzone: Naive B-Zellen ohne Antigenkontakt. Keimzentrum: Nach Antigenkontakt Transformation naiver B-Zellen zu Zentroblasten, klonale Expansion und somatische Hypermutation. Transformation zu Zentrozyten und Selektion. Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen (Marginalzone) oder antikörperproduzierenden Plasmazellen (Migration ins Knochenmark). Dargestellt sind die häufigsten B-Zell-Lymphome: BL, DLBCL (GCB), FL, HL, CLL, MCL, MZL, MM, DLBCL (ABC). Basierend auf Küppers (2005). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

DLBCL bilden eine heterogene Gruppe aggressiver NHL. Mittels Genexpressionsanalyse können beim nicht weiter spezifizierten DLBCL (NOS) der aus transformierten Zentroblasten entstehende Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL) und der aus Plasmazellvorläufern bestehende aktivierte B-Zell-Typ (ABC-DLBCL) als zwei wesentliche Subtypen unterschieden werden (Stein et al. 2008). Das FL ist ein niedrigmalignes NHL mit meist follikulärem Wachstumsmuster. Die Lymphomzellen weisen charakteristischerweise eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins BCL2 auf, die in ca. 90% der Fälle auf der balancierten Translokation t(14;18) beruht (Kishimoto et al. 2014; Ott 2002). Die B-CLL zeichnet sich durch einen leukämischen Verlauf aus, wobei für den Ursprung der Tumorzellen sowohl eine Entstehung aus naiven B-Zellen, als auch aus postfollikulären Zellen der Marginalzone diskutiert wird (Darwiche et al. 2018). MZL bilden eine Gruppe niedrig maligner NHL. Anhand der primären Lokalisation werden das extranodale MZL vom *mucosa associated tissue*-Typ (MALT-Lymphom, 70%), das nodale MZL (NMZL, 10%) und das splenische MZL (SMZL, 20%) als drei wesentliche Subtypen unterschieden (Srisankarajah et al. 2017; Swerdlow et al. 2016). MALT-Lymphome entstehen häufig auf dem Boden einer chronischen Entzündung (infektiös oder autoimmun), wobei verstärkt extranodales lymphatisches Gewebe gebildet wird, welches sekundär entarten kann (Ferreri et al. 2009; Raderer et al. 2016). MCL zeigen meist einen aggressiven klinischen

Verlauf mit ungünstiger Prognose (Bosch et al. 1998). Die Lymphomzellen entstammen i. d. R. naiven B-Zellen der inneren Mantelzone und können diffuse, noduläre und mantelzonenartige Wachstumsmuster aufweisen (Argatoff et al. 1997; Swerdlow et al. 2008). Bei fast allen MCL zeigt sich zudem eine konstitutive Überexpression von CyclinD1 als Folge der balancierten Translokation t(11;14) (Pérez-Galán et al. 2011, Li et al. 1999). Das MM ist eine Plasmazell-Neoplasie mit Manifestation im Knochenmark. Charakteristisch ist die Produktion funktionsloser monoklonaler Antikörper (Immunglobulin(Ig)G 50%, IgA 20%) oder freier Leichtketten (20%), die sich mittels Immunelektrophorese im Serum und im Urin detektieren lassen (Kyle et al. 2003). Von den NHL lassen sich HL traditionell aufgrund des spezifischen morphologischen Erscheinungsbilds abgrenzen. So finden sich beim HL große und z. T. mehrkernige Tumorzellen (sog. Hodgkin-Reed-Sternberg(HRS)-Zellen), die aus transformierten B-Zellen entstehen und von einem nicht-malignen inflammatorischen Hintergrund u. a. aus T-Lymphozyten, Plasmazellen und Granulozyten umgeben sind. Diese sog. Bystander-Zellen machen dabei nicht selten bis zu 99% der Zellen in den befallenen Lymphknoten aus (Küppers et al. 2012).

1.1.2 Burkitt-Lymphom

Das BL zählt zu den hochmalignen NHL und zeichnet sich durch eine sehr hohe Proliferationsaktivität aus. Es werden insgesamt drei Formen unterschieden (Piccaluga et al. 2011, Leoncini et al. 2008): Das endemische BL (eBL) tritt in Äquatorialafrika v. a. bei Kindern auf, befällt meist die Kiefer-/Schädelregion und ist in nahezu allen Fällen mit einer Infektion durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert. Das sporadische BL (sBL) tritt dagegen mit geringer Inzidenz in der ganzen Welt meist bei Kindern und jungen Erwachsene auf, wobei bevorzugt abdominale Organe betroffen sind. Außerdem kann das BL auch im Rahmen einer HIV-Infektion auftreten (hivBL). Eine EBV-Infektion findet sich beim sBL und hivBL deutlich seltener als beim eBL (Shannon-Lowe et al. 2017).

Mikroskopisch zeigt sich meist ein Bild aus monomorphen blastären Zellen, die aus Zentroblasten des folliculären Keimzentrums entstehen und eine starke Expression von MYC bei häufig fehlender BCL2-Expression aufweisen (Schmitz et al. 2014, Leoncini et al. 2008). Die MYC-Überexpression ist i. d. R. bedingt durch eine Translokation des *MYC*-Gens zum Gen-Locus einer Immunglobulinkette (meist t(8;14)), die sich als klassisches pathogenetisches Merkmal in > 90% aller BL findet (Dalla-Favera et al. 1982). Insgesamt unterscheidet sich das BL im Genexpressionsprofil deutlich von ebenfalls hochmalignen DLBCL und stellt somit eine eigene Lymphom-Entität dar (Schmitz et al. 2012). Das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen beruhen im Wesentlichen auf einem B-Zell-Antigenrezeptor(BCR)-abhängigen Grundsignal (tonisches BCR-Signaling), das über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg vermittelt wird (Bhatti et al. 2018; Corso et al. 2016; Schmitz et al. 2012).

Aufgrund der starken Tumorpheriferation ist eine rasche Therapieeinleitung unumgänglich.

Diese erfolgt i. d. R. in kurativer Intention als intensive Polychemotherapie, häufig in Kombination mit dem CD20-Antikörper Rituximab und zusätzlicher Prophylaxe des zentralen Nervensystems (ZNS) (Jacobson et al. 2014). Patienten mit sBL < 55 Jahre haben unter adäquater Therapie ein durchschnittliches Gesamtüberleben von 84%, wohingegen Patienten > 55 Jahre sowie Patienten mit eBL mit 62% und 70% ein geringeres Gesamtüberleben aufweisen (Hoelzer et al. 2014; Molyneux et al. 2017). Dies ist darauf zurückzuführen, dass ältere Patienten mit Komorbiditäten und Patienten in Entwicklungsländern häufig nicht für eine intensive Polychemotherapie geeignet sind.

1.2 BCR-Signaling in Lymphomen

Der BCR ist auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten lokalisiert und stellt den Ausgangspunkt für verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden dar, welche für die Entwicklung, Reifung, Proliferation und das Überleben von B-Zellen essentiell sind. Die Signaltransduktion erfolgt dabei über die Aktivierung von nachgeschalteten BCR-Effektorproteinen mittels reversibler Veränderungen in der Phosphorylierung und führt letztlich zur verstärkten Expression spezifischer Gene im Zellkern. Eine Dysregulierung dieses BCR-Signalings stellt einen wesentlichen Pathomechanismus in B-Zell-Lymphomen dar (Niemann et al. 2013, Seda et al. 2015). Dabei lassen sich grundsätzlich zwei verschiedenen Formen des BCR-Signalings unterscheiden (vgl. Abb. 2):

Beim chronisch aktiven BCR-Signaling werden BCR-abhängige Signalwege durch unterschiedliche Mechanismen verstärkt aktiviert. Dies geschieht zum einen durch Mutationen in den Genen von BCR-Effektorproteinen (u. a. CD79b, CARD11), die etwa beim ABC-Typ des DLBCL zu einem starken BCR-Signaling über den NF- κ B-Signalweg führen (Davis et al. 2010). Einen weiteren Mechanismus für diese sog. intrinsische Aktivierung des BCR-Signalwegs bilden genetische Translokationen. Bei MALT-Lymphomen führen Translokationen des BCL10- und MALT1-Gens zur verstärkten Proteinexpression, wodurch wiederum ein konstitutiv aktives NF- κ B-Signaling resultiert (Nakagawa et al. 2006). Darüber hinaus kann das Signaling in B-Zell-Lymphomen auch durch direkte Stimulierung des BCR mittels Antigen oder Autoantigen erfolgen (extrinsische Aktivierung). Beispiele hierfür sind B-CLL und MCL, wo sog. stereotype BCR bestimmte aktivierende (Auto)antigene erkennen, sowie MZL, wo infektiöse Antigene (Hepatitis-C-Virus, *Helicobacter pylori*) zur Stimulierung des BCR führen können (Niemann et al. 2013).

Im Unterschied zum aktiven BCR-Signaling erfolgt beim tonischen BCR-Signaling keine Stimulierung des BCR durch (Auto)antigene und es finden sich keine charakteristischen Mutationen in proximalen BCR-Effektorproteinen. Diese Form des BCR-Signalings findet sich beim GCB-Typ des DLBCL sowie beim BL (Havranek et al. 2017; Schmitz et al. 2012). Ein tonisches BCR-abhängiges Grundsignal ist dabei essentiell für das Überleben der Tumorzellen. Anders als beim aktiven BCR-Signaling, welches häufig über den NF- κ B-Signalweg erfolgt, spielt beim tonischen BCR-Signaling der PI3K/AKT/mTOR Signalweg

eine entscheidende Rolle (Young et al. 2013).

Verschiedene B-Zell-Lymphome sind auf unterschiedliche Formen des BCR-Signaling angewiesen. Das BL unterscheidet sich hierbei deutlich vom ebenfalls hochmalignen DLBCL. So konnten beim BL, im Gegensatz zum ABC-DLBCL, weder aktivierenden Mutationen in proximalen BCR-Effektorproteinen (CD79a/b, CARD11) nachgewiesen werden, noch scheint der NF-κB-Signalweg essentiell für BL-Zellen zu sein (Keller et al. 2005; Schmitz et al. 2012). Im Vergleich zum GCB-DLBCL bestehen zudem signifikante Unterschiede im Genexpressionsprofil, was darauf schließen lässt, dass das tonische Signaling beim BL über entitätsspezifische Signalwege und Effektorproteine vermittelt wird (Dave et al. 2006).

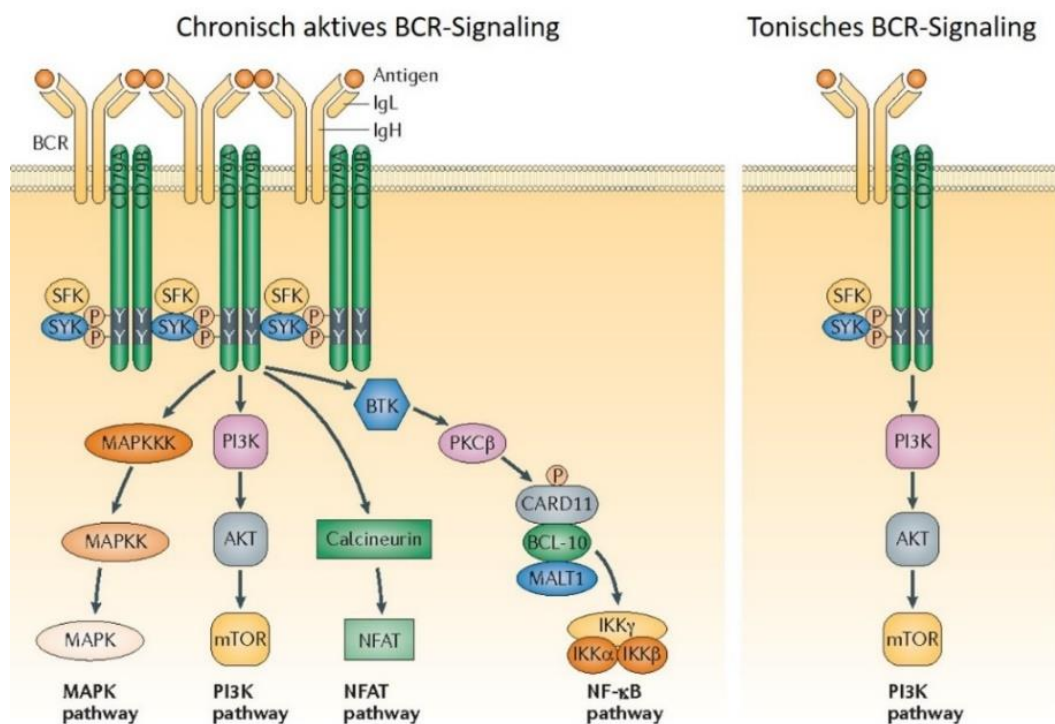


Abb. 2: Chronisch aktives und tonisches BCR-Signaling

Vereinfachte schematische Darstellung verschiedener BCR-abhängiger Signalwege mit den wichtigsten BCR-Effektorproteinen. Regulierung der Proteine über reversible Phosphorylierung (P), an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin (Y). Modifiziert nach Young et al. (2013). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von *Springer Nature*.

1.3 Methoden zur Untersuchung essentieller BCR-abhängiger Signalwegssignaturen in Lymphomen

1.3.1 Phosphoproteomische Analysen

Eine Dysregulation BCR-abhängiger Signalwege trägt zur Pathogenese zahlreicher B-Zell-Lymphome bei. Beim chronisch aktiven sowie beim tonischen BCR-Signaling werden die dem BCR nachgeschalteten Effektorproteine durch posttranslationale Modifikationen, i. d. R. mittels Phosphorylierung, verändert und dadurch in ihrer Aktivität reguliert (Satpathy

et al. 2015). Phosphorylierte Proteine bzw. Phosphopeptide einer Zellpopulation lassen sich quantitativ mittels Massenspektrometrie erfassen (Olsen et al. 2006). Für die massenspektrometrische Analyse werden die Proteine fragmentiert, in einen gasförmigen Aggregatzustand überführt und ionisiert. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und in einem Analysator nach dem Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) sortiert. Dabei wird in Abhängigkeit vom Masse-Ladungs-Verhältnis jeweils die Intensität der Ionen bestimmt. Anhand der Messdaten erfolgt mittels entsprechender Software eine Identifizierung und Quantifizierung der Peptide bzw. Proteine (Aebersold et al. 2003). Die Gesamtheit der auf diese Weise identifizierten Proteine in einer Zellkultur wird als globales Proteom bezeichnet. Analog wird die durch spezielle Anreicherungsverfahren identifizierte Gesamtheit der phosphorylierten Proteine in einer Zellkultur als globales Phosphoproteom bezeichnet (Corso et al. 2016).

Zur Untersuchung BCR-abhängiger Veränderungen im globalen Phosphoproteom einer Zelllinie eignet sich besonders das Verfahren des *stable isotope labeling of amino acids in cell culture* (SILAC). Das Grundprinzip dabei ist die unterschiedliche metabolische Markierung bestimmter Zellpopulationen. Dies geschieht durch die Kultivierung in verschiedenen Nährmedien, welche unterschiedliche nicht-radioaktive Isotope (unterschiedliche Massen der Kohlenstoff- und Stickstoffatome) essentieller Aminosäuren (i. d. R. Arginin und Lysin) enthalten. Eine Zellpopulation wird dabei mit „leichten“ Isotopen kultiviert, wohingegen die andere Zellpopulation mit „schweren“ Isotopen kultiviert wird. Während der Kultivierung werden die im Nährmedium vorhandenen Aminosäuren in die Proteine der Zellen eingebaut. Anschließend werden die beiden Zellkulturen lysiert, im Verhältnis 1:1 vermischt, mittels Trypsin verdaut, die Phosphopeptide angereichert und massenspektrometrisch ausgewertet. So ergeben sich Paare von Phosphopeptiden, die sich durch das unterschiedliche SILAC-Labeling in der Masse unterscheiden („leicht“ vs. „schwer“) und dadurch der jeweiligen Zellkultur zugeordnet werden können. Anhand der massenspektrometrisch ermittelten Intensitäten kann die Menge eines bestimmten Phosphopeptids in einer Zellpopulation bestimmt werden. Der Unterschied zwischen den Intensitäten beider Zellpopulationen wird für jedes Phosphopeptid als SILAC-Ratio angegeben (Chen et al. 2015). Auf diese Weise können Veränderungen des globalen Phosphoproteoms im Rahmen des aktiven BCR-Signalings durch den Vergleich einer BCR-stimulierten Zellpopulation mit einer nicht BCR-stimulierten Zellpopulation untersucht werden. Effektorproteine des tonischen BCR-Signalings können mittels Inhibierung des BCR-Signalwegs in einer Zellpopulation und den Vergleich mit einer nicht inhibierten Zellpopulation identifiziert werden (Corso et al. 2016; siehe Abb. 3).

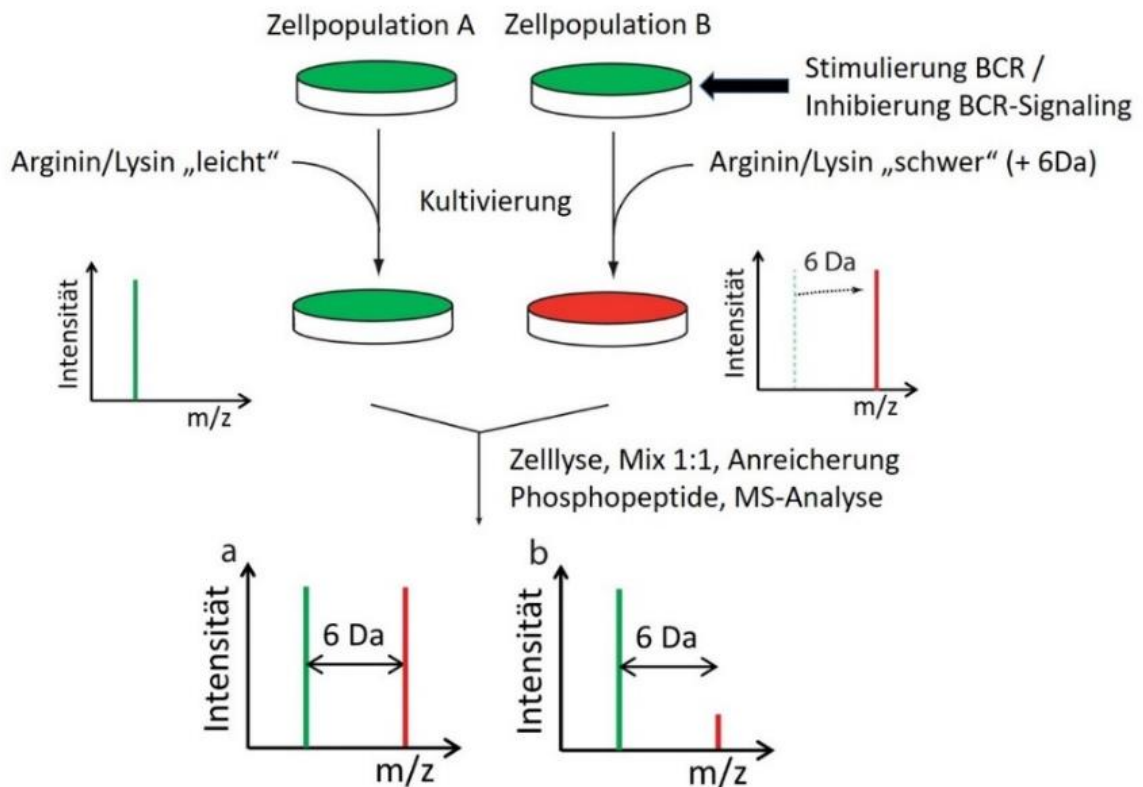


Abb. 3: SILAC-basierte massenspektrometrische Analyse zur Erfassung BCR-abhängiger Veränderungen in der Phosphorylierung

Schematische Darstellung für den Vergleich zweier Zellpopulationen (A und B). In Zellpopulation B Stimulierung des BCR (aktives BCR-Signaling) oder Inhibition des tonischen BCR-Signalings. Kultivierung von Zellpopulation A mit „leichtem“ (grün) Arginin/Lysin und Zellpopulation B mit „schwerem“ (rot) Arginin/Lysin (hier beispielhaft Massenunterschied von 6 Da). Anschließend Zellyse, Mix von Zellpopulation A und B im Verhältnis 1:1, Anreicherung von Phosphopeptiden und MS-Analyse. Jeweils Bestimmung des Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) in Abhängigkeit von der Intensität (korreliert zur Menge des Phosphopeptids). Vergleich der Intensitäten in Zellpopulation A (grün) und B (rot), Beispiele: a) keine Veränderung in der Phosphorylierung bei BCR-Stimulation / Inhibition BCR-Signaling ($A = B$), b) Abnahme der Phosphorylierung bei BCR-Stimulation / Inhibition BCR-Signaling ($A > B$). Abkürzungen: BCR = B-Zell-Antigenrezeptor, Da = Dalton, MS = Massenspektrometrie, SILAC = *stable isotope labeling of amino acids in cell culture*. Modifiziert nach Krüger (2012). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des *Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung*.

1.3.2 RNA-Interferenz

Essentielle Proteine besitzen eine wichtige Funktion für die Proliferation und das Überleben von Zellen und stellen daher in der Tumorforschung interessante Ziele für die Entwicklung neuer Inhibitoren dar. Zur Identifizierung essentieller zellulärer Proteine wird häufig das Verfahren der RNA-Interferenz (RNAi) angewendet (Cheung et al. 2011; Ngo et al. 2006; Schlabach et al. 2008). Das Grundprinzip dabei beruht auf der gezielten Stilllegung von Genen (Gen-Knockdown) durch die Wechselwirkung von kurzen RNA-Fragmenten (siRNA = *short interfering RNA*) mit der transkribierten *messenger RNA* (mRNA), wodurch die Genexpression (Translation) und somit die Expression des Proteins unterdrückt wird (Eggert et al. 2003). Handelt es sich um ein für das zelluläre Überleben essentielles Gen, führt der Knockdown nach einer gewissen Zeit zur Apoptose der Zellen. Für den

experimentellen Gen-Knockdown werden meist *short hairpin RNAs* (shRNAs) verwendet. Eine shRNA besteht aus einer doppelsträngigen RNA-Sequenz (Sense- und Antisense-Strang), die gegen eine spezifische komplementäre mRNA-Sequenz gerichtet ist, sowie aus einer einsträngigen Loop-Sequenz (Eggert et al. 2003; Mun et al. 2016; Paddison et al. 2002). Mithilfe eines meist retroviralen Vektors wird die shRNA in die Zellen eingeschleust (Transduktion) und in die zelluläre Desoxyribonukleinsäure (DNA) integriert (siehe Abb. 4). Im Zellkern erfolgt die Transkription der shRNA, aus der anschließend im Zytoplasma durch Entfernung der Loop-Sequenz eine doppelsträngige siRNA entsteht. Nach Assoziation der siRNA mit verschiedenen Proteinen des *RNA-induced silencing complex* (RISC) und Entfernung eines RNA-Strangs, bindet die siRNA-Sequenz an die komplementäre mRNA-Sequenz. Je nach Stärke der Bindung führt dies zur Spaltung und zum Abbau der mRNA bzw. zur Inhibierung der Translation (Leung et al. 2005; O'Keefe 2013).

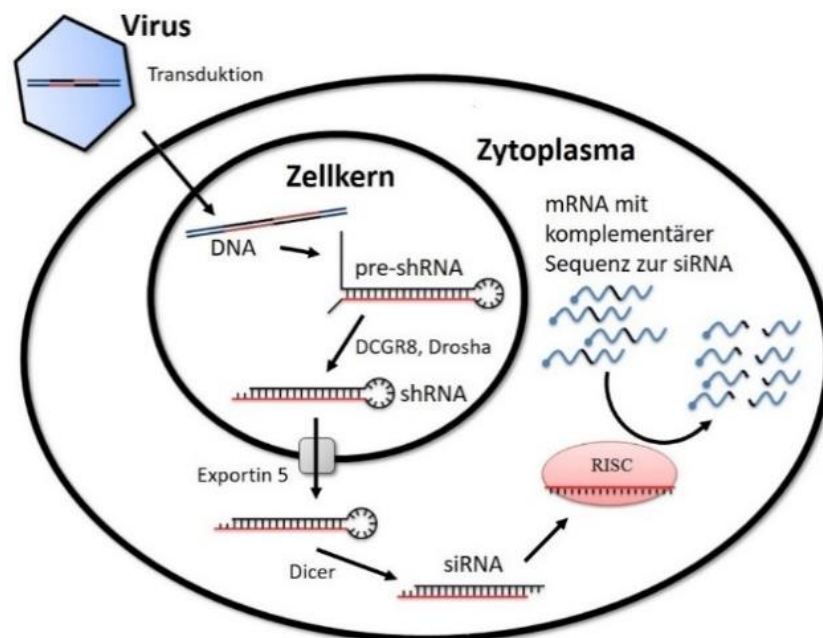


Abb. 4: RNA-Interferenz mittels shRNA

Vereinfachte schematische Darstellung mit beteiligten Enzymen. Mittels retroviralem Vektor Transduktion der shRNA in die Zielzelle und Einbau in zelluläre DNA. Im Zellkern Transkription und Modifizierung von pre-shRNA zu shRNA durch DCGR8 und Drosha. Ausschleusung der shRNA ins Zytoplasma durch Exportin 5, dort Entfernung der Loop-Sequenz durch Dicer. Assoziation mit Proteinen des RISC, Entfernung eines RNA-Strangs und Bindung an komplementäre mRNA-Sequenz. Spaltung der mRNA durch Proteine des RISC. Abkürzungen: DNA = Desoxyribonukleinsäure, shRNA = *short hairpin RNA*, siRNA = *short interfering RNA*, mRNA = *messenger RNA*, RISC = *RNA-induced silencing complex*. Modifiziert nach Lingor (2010). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Der Gen-Knockdown mittels shRNA wird meist als genomweiter RNAi-Screen durchgeführt, um bisher unbekannte essentielle Gene in einer bestimmten Zelllinie zu identifizieren (Cheung et al. 2011; Ngo et al. 2006). Dabei wird eine sog. shRNA-Bibliothek, bestehend aus Tausenden verschiedener shRNAs, mithilfe von Vektoren in die Zellen eingebracht (Hu et al. 2012). Auf diese Weise können in einem einzigen Experiment tausende verschiedener

Gene stillgelegt und die Auswirkung auf das Überleben der Zellen untersucht werden. Die shRNAs enthalten häufig eine sog. Barcode-Sequenz, anhand derer sie identifiziert und quantifiziert werden können (Mun et al. 2016; Ngo et al. 2006). Mithilfe verschiedener Verfahren der Hochdurchsatzsequenzierung kann so jeweils die shRNA-Menge nach einer gewissen Zeit der Zellkultivierung im Vergleich zur shRNA-Ausgangsmenge bestimmt werden. Ist eine shRNA gegen ein essentielles Gen gerichtet, führt dies zur Apoptose der infizierten Zellen und dem Verlust der shRNA (shRNA-Depletion), sodass im Vergleich zur Ausgangsmenge eine deutlich geringere shRNA-Menge detektiert wird (Ngo et al. 2006; Schaefer et al. 2018; Sims et al. 2011).

1.3.3 Immunhistochemische Färbung

Bestimmte Proteine werden in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe verstärkt oder vermindert exprimiert. Für die Darstellung der Proteinexpression in Gewebe ist die immunhistochemische Färbung (IHC-Färbung) die Methode der Wahl. Dabei werden von in Paraffin eingebetteten Gewebsstücken Schnitte mit einer Dicke von ca. 2 µm hergestellt und auf einen Objektträger aufgebracht. Die Gewebsschnitte werden mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch gegen ein zu untersuchendes Protein (Antigen) gerichtet ist. Ist das Protein im Gewebe vorhanden, bindet der Antikörper an das entsprechende Antigen. Alle Antikörper, die keine Bindung eingegangen sind, werden abgespült. Die Antikörper-Antigen-Komplexe können auf unterschiedliche Weise farblich markiert werden: Bei der direkten Methode wird der an das Antigen gebundenen Antikörper mit einem Enzym oder Farbstoff gekoppelt und durch Zugabe eines Substrates sichtbar gemacht. Bei der indirekten Methode wird in einem zweiten Schritt ein weiterer Antikörper zugegeben, der gegen den Primärantikörper gerichtet und mit einem Nachweissystem (z. B. einem Enzym) gekoppelt ist. Durch eine Enzym-Substrat-Reaktion wird ein Farbstoff freigesetzt, der die Antikörperbindung markiert (Grundmann et al. 2010). Für die gemeinsame IHC-Färbung unterschiedlicher Gewebe werden *tissue microarrays* (TMAs) verwendet. Dabei werden aus dem zu untersuchenden Gewebe von sog. Spenderblöcken Gewebstanzen (meist 0,6 mm Durchmesser) entnommen und diese in einem neuen sog. Empfängerblock (TMA-Block) zusammengefügt, der daraufhin immunhistochemisch gefärbt wird (siehe Abb. 5). Auf diese Weise kann mit einer einzigen IHC-Färbung die Proteinexpression im Gewebe von bis zu 1000 verschiedenen Spenderblöcken untersucht und verglichen werden, ohne dass dabei Schwankungen durch veränderte Arbeitsprozesse entstehen. Im Anschluss werden die IHC-Färbungen mikroskopisch ausgewertet (Al Kuraya et al. 2004; Bubendorf et al. 2001).

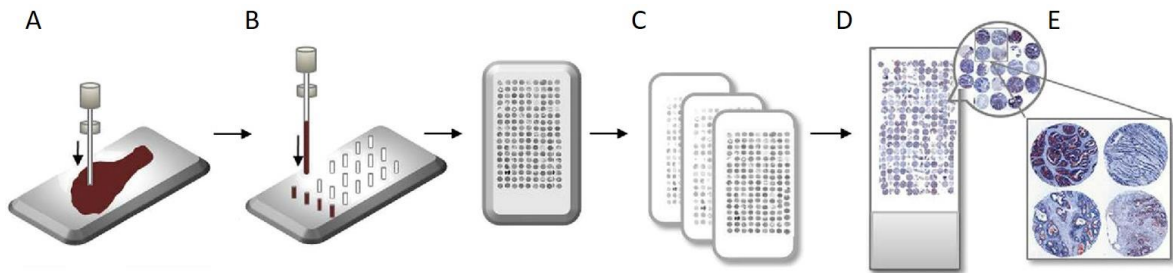


Abb. 5: TMA

Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Erstellung eines TMA: Entnahme einer Gewebsstanze aus Spenderblock (A). Zusammenfügen mehrerer Gewebsstanzen aus unterschiedlichen Spenderblöcken in Empfängerblock (B). Herstellung von Schnitten aus Empfängerblock (C) und IHC-Färbung (D). Mikroskopische Auswertung der Färbung (E). Modifiziert nach Oberländer et al. (2014). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von *Springer Nature*.

1.4 Ziel der Arbeit

Das BL zählt zu den hochmalignen NHL und wird meist mittels intensiver Chemotherapie behandelt (Jacobson et al. 2014). Eine aggressive Therapie ist jedoch bei älteren Patienten mit Begleiterkrankungen sowie bei Patienten mit eBL in Entwicklungsländern häufig nicht möglich, sodass diese Patienten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben aufweisen (Hoelzer et al. 2014; Molyneux et al. 2017). Hier besteht ein Bedarf an neuen Therapieformen.

Im Fokus der gezielten Therapie (*targeted therapy*) maligner B-Zell-Lymphome stehen seit einigen Jahren verstärkt Signalmoleküle, die an onkogenen Signalleitungsprozessen über den BCR beteiligt sind (Niemann et al. 2013). Beim BL ist ein BCR-abhängiges Grundsignal, das über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg vermittelt wird, essentiell für das Überleben der Tumorzellen (Schmitz et al. 2012). Jedoch ist bis dato nur wenig über weitere, am tonischen BCR-Signaling beteiligte Signalwege und Effektorproteine bekannt. Diese Arbeit verfolgt das übergeordnete Ziel, beim BL onkogene Signalwegssignaturen des tonischen BCR-Signaling zu identifizieren. Durch Kombination und Neuauswertung bereits publizierter Datensätze aus einer phosphoproteomischen Analyse (Corso et al. 2016) sowie einem RNAi-Screen (Huellein et al. 2019) sollen Proteine identifiziert werden, die beim BL sowohl signifikant BCR-abhängig reguliert werden, als auch essentiell für das Überleben der Lymphomzellen sind. In einer vergleichenden immunhistochemischen Analyse soll dann an einem Kollektiv aus BL und weiteren B-Zell-Lymphom-Entitäten die Expression der Proteine in humanem Lymphomgewebe untersucht werden. Dies dient zum einen der Validierung der beim BL *in vitro* identifizierten Signalwegssignaturen anhand ihrer Proteinexpression in humanem Lymphomgewebe, zum anderen der Identifizierung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden in der Proteinexpression zwischen verschiedenen B-Zell-Lymphomen. In Überlebenszeitanalysen soll außerdem der prognostische Einfluss der Proteinexpression auf das Gesamtüberleben von Lymphom-Patienten untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden findet sich eine tabellarische Auflistung der Geräte, Laborutensilien, Chemikalien und Antikörper, die für die Erstellung der TMA-Blöcke und deren IHC-Färbung verwendet wurden. Zudem sind die für die statistische Auswertung der Daten und die Verschriftlichung der Arbeit verwendete Software und Internetadressen aufgeführt.

| Geräte und Laborutensilien | | |
|------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Gerät/Material | Hersteller | Firmensitz |
| Akkupipettierhilfe Akujet | Brand | Wertheim, Deutschland |
| Autoklaven | Systec | Linden, Deutschland |
| Feinwaage R160P | Sartorius | Göttingen, Deutschland |
| Mikroskop BX41 | Olympus | Tokio, Japan |
| Mikroskop Axio Scope.A1 | Zeiss | Oberkochen, Deutschland |
| Mikrotom Microm HM430 | Thermo Fischer Scientific | Waltham, USA |
| Kamera Axioacam 105 color | Zeiss | Oberkochen, Deutschland |
| Objektträger Süssefrost weiß | Süsse Labortechnik | Gudensberg, Deutschland |
| pH-Meter | Schott Instruments | Mainz, Deutschland |
| Pipetten (2,5/20/100/1000 µl) | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Serologische Pipetten (5/10/25 ml) | Sarstedt | Nümbrecht, Deutschland |
| TMA Master | 3DHistech | Budapest, Ungarn |
| Verschlussröhrchen (2 ml) | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |

Tab. 1: Geräte und Laborutensilien

Verwendete Geräte und Laborutensilien mit Angabe des Herstellers und dessen Firmensitz.

| Chemikalien und Reagenzien | | |
|---|-------------------|------------------------|
| Reagenz | Hersteller | Firmensitz |
| DAB (Diaminobenzidin) | Dako | Hamburg, Deutschland |
| EnVision Flex Target Retrieval Solution | Dako | Hamburg, Deutschland |
| EnVision Flex+ Visualization System | Dako | Hamburg, Deutschland |
| Ethanol (75%, 96%, 100%) | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Formaldehyd (4%, gepuffert) | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Hämatoxylin | Dako | Hamburg, Deutschland |
| Paraffin | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Xylol | Roth | Karlsruhe, Deutschland |

Tab. 2: Chemikalien und Reagenzien

Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers und dessen Firmensitz.

| Antikörper | | | | |
|-------------------|----------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| Antikörper | Hersteller (Nummer) | Ursprung | Verdünnung | pH-Wert Puffer |
| anti-CD20 | Dako (IR604) | Maus | ready to use | high |
| anti-BCL2 | Dako (IR614) | Maus | ready to use | high |
| anti-BCL6 | Dako (IR 625) | Maus | ready to use | high |
| anti-MYC | Abcam (ab32072) | Kaninchen | 1:100 | high |
| anti-ACTN4 | Atlas Antibodies (HP1873) | Kaninchen | 1:1000 | low |
| anti-ARFGEF2 | Abcam (ab72420) | Kaninchen | 1:100 | low |
| anti-BCL11A | Atlas Antibodies (HP29003) | Kaninchen | 1:50 | low |
| anti-CARD11 | Sigma (HPA52984) | Kaninchen | 1:100 | low |
| anti-CDKN1B | Abnova (H1027-M01) | Kaninchen | 1:500 | low |
| anti-MTHFD1 | Atlas Antibodies (HPA1290) | Kaninchen | 1:500 | low |
| anti-MTHFD2 | Abnova (H10797-M01) | Maus | 1:500 | low |
| anti-SHMT2 | Sigma (HPA20549) | Kaninchen | 1:200 | low |

Tab. 3: Antikörper

Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Darstellung spezifischer Antigene auf den Lymphomzellen. Jeweils Angabe des Herstellers mit Produktnummer sowie Ursprung, Verdünnung und pH-Wert der verwendeten Pufferlösung.

| Software und Internetadressen | | |
|--------------------------------------|-------------------------|--------------------|
| Software | Hersteller | Firmensitz |
| Microsoft Excel 2013 | Microsoft | Redmond, USA |
| Microsoft PowerPoint 2013 | Microsoft | Redmond, USA |
| Microsoft Word 2013 | Microsoft | Redmond, USA |
| Microsoft Fotos 2019 | Microsoft | Redmond, USA |
| STATISTICA 13.3.1 | StatSoft | Tusla, USA |
| Citavi 6 | Swiss Academic Software | Wädenswil, Schweiz |
| Internetadressen | | |
| www.ncbi.nlm.nih.gov | | |
| www.uniprot.org | | |
| www.phosphosite.org | | |

Tab. 4: Software und Internetadressen

Verwendete Software mit Angabe des Herstellers und dessen Firmensitz sowie verwendete Internetadressen.

2.2 Ethikantrag

Für diese Arbeit wurde humanes Lymphomgewebe verwendet und es wurden krankheitsassoziierte Daten ausgewertet. Die patientenspezifischen Informationen umfassen Angaben zu WHO-Diagnose, Alter, Geschlecht, Zeitpunkt der Erstdiagnose und einem eventuellen Todesereignis. Dies wurde durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) genehmigt (Ethikantragsnummer 19-2-16) und unter Einhaltung der gesetzlichen Richtlinien durchgeführt.

2.3 Auswahl der Proteine für Expressionsanalyse

Die immunhistochemisch untersuchten Proteine wurden durch eine Neuauswertung bereits publizierter Daten aus einer Massenspektrometrie-basierten phosphoproteomischen Analyse (Corso et al. 2016) sowie einem RNAi-Screen (Huellein et al. 2019) an BL-Zelllinien ausgewählt, wobei die Datensätze kombiniert wurden. Die Auswahl umfasste alle Proteine, die beide der in Tab. 5 dargestellten Kriterien erfüllten.

| Auswahlkriterien für Expressionsanalyse | |
|---|--|
| I | Signifikante Veränderung in der Phosphorylierung mindestens einer Phosphorylierungsstelle in mindestens einer BL-Zelllinie (DG75 oder Daudi) bei Blockade des tonischen BCR-Signalings (SYK-Inhibierung oder CD79a-Knockdown) gemessen an der \log_2 SILAC-Ratio (Z-Score < -2 bzw. > 2). |
| II | Starke Toxizität mindestens zweier verschiedener shRNAs auf entsprechende Gene in BL-Zelllinien bei geringer bis fehlender Toxizität in Karzinom-Zelllinien gemessen am Unterschied im shRNA Fold-change ($p < 0,05$ und $\log_2FC_{BL} < -0,5$ und $\log_2FC_{BL} - \log_2FC_{Karzinom} < -0,5$). |

Tab. 5: Auswahlkriterien für Expressionsanalyse

Kriterien für die Auswahl von Proteinen aus der phosphoproteomischen Analyse von Corso et al. (2016) (I) sowie dem RNAi-Screen von Huellein et al. (2019) (II). Für die immunhistochemische Expressionsanalyse wurden nur Proteine berücksichtigt, die beide Kriterien (I+II) erfüllten.

2.4 Formalinfixierung und Paraffineinbettung

Das entnommene Tumorgewebe wurde zunächst je nach Größe für mindestens 16 h bei Raumtemperatur in Formalin (4%, neutral gepuffert) fixiert. Anschließend wurde das Gewebe zugeschnitten und zur Entwässerung für 30 min in Ethanol 75%, für 45 min in Ethanol 96% und für 1 h in Ethanol 100% gegeben. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit dem Intermedium Xylol für insgesamt 1 h 50 min, wobei die Flüssigkeit nach 20 min, 30 min und 1 h jeweils durch neues Reagenz ersetzt wurde. Abschließend wurden die Gewebstücke in Kassetten mit flüssigem Paraffin gegossen und bei 56°C ausgehärtet, wodurch ein fester Gewebblock entstand.

2.5 *tissue microarray* (TMA)

2.5.1 Erstellen von TMAs

Durch Mitarbeiter des Instituts für Pathologie der UMG wurden bereits im Rahmen der Diagnostik von Paraffin-eingebetteten Gewebestücken maligner Lymphome Schnitte mit einer Dicke von 2 μ m hergestellt, welche anschließend auf einen Objektträger aufgebracht und mit tumorspezifischen Antikörpern gefärbt wurden (siehe 2.5.2). Diese bereits vorhandenen IHC-Färbungen wurden zum Auffinden von Lymphomzellen im Gewebe

verwendet. Dabei wurden Tumorzellen verschiedener B-Zell-Lymphom-Entitäten anhand von charakteristischen Expressionsmerkmalen identifiziert. So zeigten atypische B-Zellen eine starke Expression des B-Lymphozytenantigens CD20. Beim HL wurden HRS-Zellen anhand der klassischen Zellmorphologie mit großen, z. T. mehrkernigen Zellen sowie meist starker Expression der Oberflächenproteine CD15 und CD30 identifiziert. MM-Zellen wurden aus Knochenmarksbiopsien mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) identifiziert. Unter mikroskopischer Aufsicht wurden auf dem Objektträger jeweils zwei Markierungen in Gebieten mit einer hohen Dichte an Tumorzellen gesetzt. Der Objektträger diente daraufhin als Schablone für die Entnahme von Gewebszylindern aus den Paraffinblöcken. Entsprechend der Markierung wurden an den jeweiligen Stellen aus den Gewebsblöcken Gewebszylinder entnommen und mehrere dieser Stanzzyylinder in einem neuen Paraffinblock (TMA) vereint. Die Gewebsentnahme und -zuführung wurde von der Firma *TARGOS Molecular Pathology GmbH* (Germaniastraße 7, 34119 Kassel, Deutschland) mit dem *TMA Master* der Marke *3DHISTECH* durchgeführt. Ein fertiger TMA-Block enthielt bis zu 66 x 1,5 mm große Gewebefelder und mindestens vier Felder ohne Gewebe. Letztere wurden blockspezifisch angeordnet und dienten somit der sicheren Wiedererkennung.

2.5.2 Immunhistochemie

Von den Gewebs- bzw. TMA-Blöcken wurden Schnitte mit einer Dicke von 2 µm hergestellt. Diese wurden für 40 min bei Raumtemperatur in *EnVision FLEX Target Retrieval Solution* (Dako) inkubiert. Dabei wurde je nach Antikörper eine Lösung mit niedrigem oder hohem pH-Wert verwendet. Anschließend wurden die Gewebsschnitte für 30 min bei Raumtemperatur mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert. Die Verdünnung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper ist in Tab. 3 beschrieben. Danach wurden die Schnitte mit einem HRP-gekoppelten (horseradish peroxidase) Detektionssystem (*EnVision FLEX+*, Dako) inkubiert. Sichtbar gemacht wurde die Bindung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Dako).

2.5.3 Auswertung der IHC-Färbungen

Alle IHC-Färbungen wurden nach dem gleichen Prinzip ausgewertet. Die Lymphomzellen wurden unter 10-facher, 40-facher und z. T. 60-facher mikroskopischer Vergrößerung bzgl. ihrer Farbintensität nach einem dreistufigen System beurteilt. Bei fehlender Färbung oder ≤ 10% positiv gefärbter Tumorzellen wurde ein Fall als „negativ“ bewertet. Zeigte sich eine schwach positive Färbung oder war nur ein geringer Teil der Tumorzellen (> 10%) positiv gefärbt, erfolgte eine Einstufung als „mäßig positiv“. Fälle mit einer homogenen stark positiven Färbung wurden als „stark positiv“ bezeichnet. Um sicherzugehen, dass es sich bei den angefärbten Zellen um atypische B-Zellen handelt, wurden die TMA-Blöcke

zusätzlich mit einem CD20-Antikörper gefärbt. Die Grafiken und Tabellen wurden mittels *Excel, Vers. 2013* und *PowerPoint, Vers. 2013* erstellt. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm *STATISTICA, Vers. 13.3.1* durchgeführt. Als Signifikanztests auf statistische Unabhängigkeit wurden der Chi-Quadrat-Test und der Fisher-Yates-Test angewendet. Sofern nicht anders angegeben, galt für alle Auswertungen ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$.

2.6 Statistische Überlebenszeitanalyse

Für jeden Patienten des unter 3.2.1 beschriebenen Lymphom-Kollektivs wurde das Datum der Erstdiagnose und, falls vorhanden, das Sterbedatum ermittelt. Bei Patienten, für die in der pathologischen Datenbank kein Sterbedatum angegeben war, wurden Anfragen an die jeweiligen Einwohnermeldeämter gestellt. Diese umfassten eine Angabe zum Überlebensstatus, sowie zum evtl. Sterbedatum der Patienten. Insgesamt erfolgten zwei voneinander getrennte Anfragen im August 2016 und im Januar 2019. Anhand der gesammelten Daten wurde für jeden Patienten die Überlebenszeit (OS) in Monaten seit der Erstdiagnose ermittelt. Endereignis der Messung war der Tod jedweder Art. Waren die Patienten bis zu einem gewissen Stichtag nicht verstorben, wurden die Überlebenszeiten zensiert. Für die meisten Patienten wurde dabei der 15.01.2019 als Stichtag angegeben. Für 17 Fälle lagen allerdings keine Daten aus der zweiten Einwohnermeldeamt-Anfrage im Januar 2019 vor, sodass hier der 15.08.2016 als Stichtag verwendet wurde. Insgesamt wurden alle Überlebenszeitanalysen für einen maximalen Beobachtungszeitraum von fünf Jahren (60 Monate) durchgeführt. Bei Patienten, die bis 60 Monate nach Erstdiagnose nicht verstorben waren, wurden die Überlebenszeiten ebenfalls zensiert. Die Überlebenszeitanalysen wurden graphisch mittels Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Dabei ist auf der y-Achse jeweils die kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit (0,0 – 1,0) und auf der x-Achse jeweils die Überlebenszeit (OS) in Monaten (0 – 60) aufgetragen. Zum Vergleich des Überlebens zweier verschiedener Patientengruppen diente der Logrank-Test. Wurden mehr als zwei verschiedene Patientengruppen miteinander verglichen, wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Als Gruppierungsvariablen für die verschiedenen Überlebenszeitanalysen dienten die Proteinexpressionen von BCL2, BCL6, MYC, ACTN4, ARFGEF2, BCL11A, CARD11, CDKN1B, MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2. Die Proteinexpression wurde jeweils durch die Färbung mit spezifischen Antikörpern bestimmt (siehe Tab. 3). Basierend auf den Auswertungen der IHC-Färbungen erfolgten sowohl Überlebenszeitanalysen am gesamten Lymphom-Kollektiv, als auch Analysen an bestimmten Gruppen von Lymphom-Entitäten mit ähnlicher Proteinexpression sowie Einzelanalysen an ausgewählten Lymphom-Entitäten. Wie unter 2.5.3 beschrieben, basierte die Auswertung der IHC-Färbungen auf einem dreistufigen Prinzip, wobei „negative“, „mäßig positive“ und „stark positive“ Fälle unterschieden wurden. Für alle Überlebenszeitanalysen wurden daher zunächst auch „negative“ von „mäßig positiven“ von

„stark positiven“ Fällen unterschieden. Zeigten dabei „negative“ und „mäßig positive“ Fälle einen ähnlichen Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven, wurden „negative/mäßig positive“ Fälle zusammengefasst und mit „stark positiven“ Fällen verglichen. Zeigten „mäßig positive“ Fälle dagegen einen ähnlichen Kurvenverlauf wie „stark positive“ Fälle, wurden „mäßig/stark positive“ Fälle als „positive“ Fälle zusammengefasst und mit „negativen“ Fällen verglichen. Für die Überlebenszeitanalysen wurden nur Patientengruppen berücksichtigt, die mindestens fünf Fälle umfassten. Außerdem galt als Voraussetzung bei jeder Analyse, dass mindestens fünf Patienten im Beobachtungszeitraum verstorben waren. Die statistischen Berechnungen und Abbildungen wurden mit dem Programm *STATISTICA*, Vers. 13.3.1 durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, galt ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung essentieller Signalwegssignaturen des BCR beim BL

3.1.1 Quantitative phosphoproteomische Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Neuauswertung bereits publizierter Daten aus quantitativen phosphoproteomischen Analysen von Corso et al. (2016).

Zur Identifizierung neuer Effektorproteine des BCR im Rahmen des aktiven und tonischen BCR-Signalings (siehe 1.2) wurden die humanen BL-Zelllinien DG75 und Daudi massenspektrometrisch untersucht. Durch Stimulierung des BCR mittels Antikörper wurde ein aktives BCR-Signal erzeugt. Für jeweils unterschiedliche Zeiten einer BCR-Stimulierung (2 min, 5 min, 10 min, 20 min) wurden Veränderungen in der Phosphorylierung von Proteinen mittels SILAC-basierter Massenspektrometrie quantitativ erfasst (siehe 1.3.1). Insgesamt konnte auf diese Weise bei 577 Proteinen eine signifikante BCR-abhängige Veränderung der Phosphorylierung nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Phosphorylierung von Proteinen bei Ausschaltung des BCR-Signalwegs verändert. Das tonische BCR-Signaling wurde durch einen Gen-Knockdown von CD79a mittels RNA-Interferenz sowie durch eine pharmakologische Inhibierung der *spleen tyrosine kinase* (SYK) unterbunden. Der Knockdown des BCR-assoziierten Proteins CD79a führt zu einer stark verminderten Expression des BCR auf der Zelloberfläche, wodurch das BCR-Signal ausbleibt (Corso et al. 2016). Die Inhibierung von SYK führt zu einer Blockade der Signaltransduktion vom BCR auf nachgeschaltete Signalwege (Coffey et al. 2012). In getrennten Analysen wurden die Auswirkungen eines CD79a-Knockdowns und einer SYK-Inhibierung auf die Phosphorylierungen von Proteinen quantitativ mittels SILAC-basierter Massenspektrometrie erfasst. Insgesamt wurden durch den CD79a-Knockdown 515 und durch die SYK-Inhibierung 441 Phosphorylierungsstellen signifikant reguliert. Abb. 6 zeigt eine von Corso et al. (2016) erstellte Cluster-Analyse. Darin sind zahlreiche Phosphorylierungsstellen, die beim BL durch BCR-Stimulierung, CD79a-Knockdown und SYK-Inhibierung reguliert werden, graphisch dargestellt (Hochregulierung = rot, Downregulierung = grün). Zumeist wurden Phosphorylierungsstellen, die durch ein aktives BCR-Signal (BCR-Stimulierung) hochreguliert wurden, bei Ausschaltung des tonischen BCR-Signals (CD79a-Knockdown, SYK-Inhibierung) herunterreguliert. Allerdings fanden sich auch Phosphorylierungsstellen, die bei fehlendem tonischen BCR-Signaling hochreguliert wurden, wohingegen sie durch aktives BCR-Signaling kaum verändert wurden und umgekehrt.

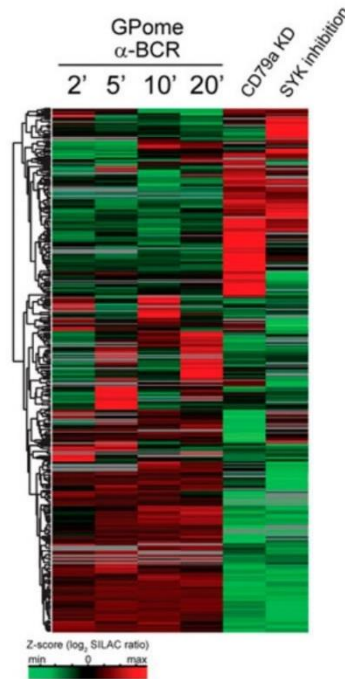


Abb. 6: Globales Phosphoproteom (GPome) für BL

Cluster-Analyse zur Darstellung aller Phosphorylierungsstellen mit signifikanter Regulation bei BCR-Stimulierung, CD79a-Knockdown und SYK-Inhibierung. Spalten: BCR-Stimulierung (α -BCR) für 2 min (2'), 5 min (5'), 10 min (10'), 20 min (20'); CD79a-Knockdown (CD79a KD); SYK-Inhibierung (SYK inhibition). Zeilen: Phosphorylierungsstellen. Farbcodierung der Regulation basierend auf Z-Score aus log₂-SILAC-Ratio: rot = hoher Z-Score, grün = niedriger Z-Score. Gruppierung von Phosphorylierungsstellen mit ähnlicher Regulation. Modifiziert nach Corso et al. (2016). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von PNAS.

3.1.2 RNAi-Screen

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Neuauswertung bereits publizierter Daten aus einem RNAi-Screen von Huellein et al. (2019).

Zur Identifizierung neuer essentieller Gene im BL wurde ein RNAi-Screen an acht verschiedenen humanen BL-Zelllinien (BJAB, BL60, Raji, Ramos, BL2, LY47, Salina, Seraphine) durchgeführt. Für den Gen-Knockdown wurden shRNAs verwendet (siehe 1.3.2). Im RNAi-Screen führt ein shRNA-Knockdown von Genen, die für das zelluläre Überleben essentiell sind, zur Apoptose der Zellen und somit zum Verlust der shRNA. Die shRNA-Depletion kann mittels RNA-Sequenzierung erfasst werden, wodurch ein Rückschluss auf die Toxizität der shRNA und die Rolle des Gens für das zelluläre Überleben möglich ist. Zur Unterscheidung generell überlebenswichtiger Gene von krankheits- bzw. tumorspezifischen überlebenswichtigen Genen werden die Daten mit anderen Zelllinien verglichen.

Im RNAi-Screen von Huellein et al. (2019) wurde durch 27495 shRNAs die Expression von 5045 Genen herunterreguliert. Die shRNAs wurden mittels eines viralen Vektors in die Zellen eingebracht. Anschließend wurden die Zellen kultiviert und nach 14 Tagen wurde die Depletion der shRNAs quantitativ mittels Fluoreszenz-basierter Hochdurchsatzsequenzierung (Barcode-Sequenzierung) erfasst. Dabei diente jeweils eine bestimmte Barcode-

RNA-Sequenz der shRNA-Identifizierung, die Anzahl einer shRNA-spezifischen Barcode-Sequenz wurde als *read counts* quantitativ erfasst. Als Maß für die Depletion diente der zur Basis zwei logarithmierte shRNA Fold-change (\log_2FC), welcher jeweils die *read counts* an Tag 14 nach der Transduktion als X-faches des Ausgangswertes (Tag 2 nach der Transduktion) beschrieb. Es zeigte sich, dass ca. ein Viertel (24%) aller shRNAs um mindestens den Faktor 2 reduziert wurden ($\log_2FC \leq -1$). Eine hohe Depletion fand sich v. a. bei shRNAs, die gegen Gene von Zellbestandteilen gerichtet waren, welche bekanntermaßen essentiell für das Überleben von Zellen sind (Ribosomen, Proteasomen). Um BL-spezifische essentielle Gene zu identifizieren, wurden die Daten aus dem RNAi-Screen an BL-Zelllinien mit Daten aus RNAi-Screens an verschiedenen Karzinom(CA)-Zelllinien (Prostata-CA, Mamma-CA, Ovarial-CA) bzw. Zelllinien myeloiden (akute myeloische Leukämie (AML)) und lymphatischen Ursprungs (DLBCL) verglichen. Dabei wurden stets die gleichen shRNAs verwendet. Es wurden jeweils zwei verschiedene Gruppen von Zelllinien (z. B. BL vs. Karzinom) hinsichtlich der shRNA-Depletion (gemessen am shRNA *Fold change*) miteinander verglichen, wobei jeweils der p-Wert berechnet wurde. Auf diese Weise wurden insgesamt 76 essentielle Gene im BL identifiziert, darunter Gene, die mit der hämatopoetischen Zelldifferenzierung oder der Entwicklung und Aktivierung von B-Zellen assoziiert sind. Für diese Gene fand sich in BL-Zelllinien eine starke shRNA-Depletion und zudem eine signifikant höhere shRNA-Toxizität im Vergleich zu Karzinom-Zelllinien. Abb. 7 zeigt einen Volcano-Plot aus der Arbeit von Huellein et al. (2019). Darin sind die essentiellen Gene im BL (orange) essentiellen Genen in Karzinomen (blau) gegenübergestellt. Benannt sind die stärksten BL- oder Karzinom-spezifischen Gene basierend auf den Unterschieden im shRNA Fold-change. Abb. 8 entstammt ebenfalls der Arbeit von Huellein et al. (2019) und verdeutlicht die unterschiedlichen shRNA-Effekte zwischen BL- und Karzinom-Zelllinien für ausgewählte BL-spezifische Gene.

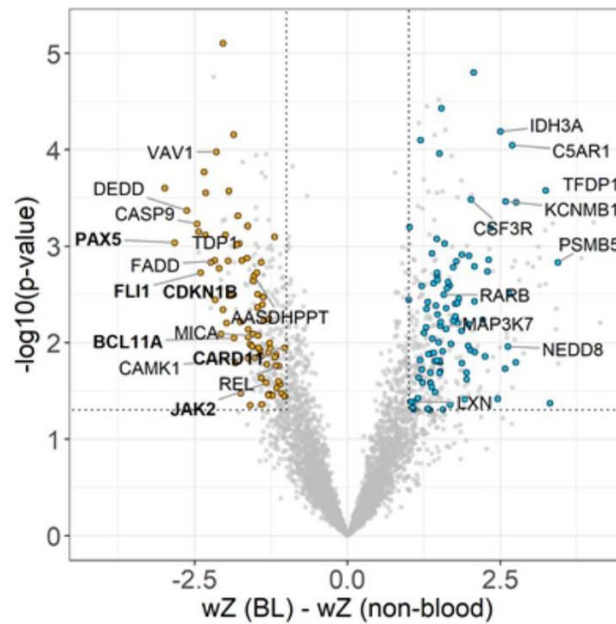


Abb. 7: Essentielle Gene bei BL und Karzinomen

Volcano Plot zum Vergleich der shRNA-Effekte auf BL-Zelllinien (BL) und Karzinom-Zelllinien (non-blood). Markierung essentieller Gene im BL (orange) und in Karzinomen (blau). Angabe der stärksten Classifier für BL und Karzinome basierend auf dem Unterschied im shRNA Fold-change. wZ = gewichteter Z-Score: Abweichung des shRNA Fold-change vom Median in Standardabweichungen, dabei Kombination verschiedener shRNA-Effekte auf das gleiche Gen. X-Achse: wZ -Differenz zwischen BL- und Karzinom-Zelllinien, Signifikanz: wZ -Differenz < -1 bzw. > 1 (senkrechte Linien). Y-Achse: negative und zur Basis Zehn logarithmierte p-Werte (p-value), Signifikanz: $p < 0,05$ (waagrechte Linien). Modifiziert nach Huellein et al. (2019). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der *American Association for Cancer Research*.

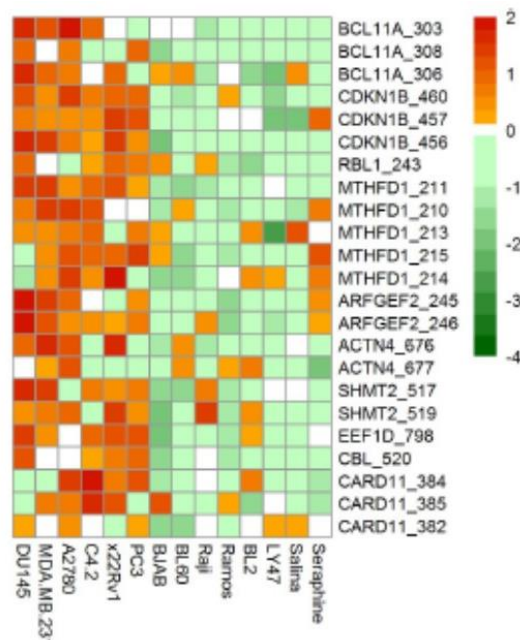


Abb. 8: shRNA-Effekte in BL- und Karzinom-Zelllinien

Dargestellt sind shRNAs für ausgewählte BL-spezifische Gene. Jeweils Angabe des shRNA-Effekts als \log_2FC (farbkodiert) in acht BL-Zelllinien (Seraphine, Salina, LY47, BL2, Ramos, Raji, BL60, BJAB) und sechs Karzinom-Zelllinien (PC3, x22Rv1, C4.2, A2780, MDA.MB.231, DU145). Modifiziert nach Huellein et al. (2019), Grafik unpubliziert. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Autoren.

3.1.3 Kombination der Daten aus phosphoproteomischen Analysen und RNAi-Screen

Mittels phosphoproteomischer Analysen wurden in BL-Zelllinien Proteine identifiziert, deren Phosphorylierung in Abhängigkeit vom BCR reguliert wird (Corso et al. 2016). Außerdem wurden mittels RNAi-Screen Gene identifiziert, die eine essentielle Rolle für das Überleben von BL-Zellen spielen (Huellein et al. 2019). Die Kombination der beiden Datensätze diente der gezielten Identifizierung von Proteinen, die beim BL sowohl signifikant BCR-abhängig reguliert werden, als auch essentiell für das Überleben speziell von BL-Zellen sind. Als Auswahlkriterium galt zum einen eine signifikante Regulierung mindestens einer Phosphorylierungsstelle im Rahmen des tonischen BCR-Signalings (CD79a-Knockdown oder SYK-Inhibierung) gemessen an der \log_2 SILAC-Ratio (Z-Score < -2 bzw. > 2) in mindestens einer BL-Zelllinie, zum anderen eine starke shRNA-Toxizität auf entsprechende Gene in BL-Zelllinien bei geringer bis fehlender Toxizität in Karzinom-Zelllinien gemessen am Unterschied im shRNA Fold-change ($p < 0,05$). Beide dieser Kriterien mussten erfüllt sein. Auf diese Weise wurden 20 Proteine identifiziert. Die 10 Proteine mit der höchsten BL-Spezifität wurden gezielten shRNA-Einzelanalysen unterzogen. Dabei wurden shRNAs selektiert, die eine starke Toxizität in BL-Zelllinien (\log_2FC in BL $< -0,5$) sowie eine geringe bis fehlender Toxizität in Karzinom-Zelllinien zeigten (\log_2FC BL - \log_2FC Karzinom $< -0,5$). Alle Proteine, bei denen mindestens zwei verschiedene shRNAs eine derartige Toxizität auf die entsprechenden Gene aufwiesen sind in Tab. 6 dargestellt und wurden für die immunhistochemische Expressionsanalyse ausgewählt (siehe auch 2.3).

| Ausgewählte Proteine aus phosphoproteomischen Analysen und RNAi-Screen | | | | | | |
|--|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| | ACTN4 | ARFGEF2 | BCL11A | CARD11 | CDKN1B | MTHFD1 |
| Phosphoproteomische Analysen | | | | | | |
| log ₂ SILAC-Ratio (p-Site) | -1,342 (Y212) | -1,350 (S349) | 0,896 (T701) | 0,685 (S886) | -0,889 (S140) | -0,678 (S546) |
| Zelllinie | Daudi | Daudi | DG75 | DG75 | DG75 | Daudi |
| SYK-/CD79a KD | SYK- | SYK- | CD79a KD | SYK- | SYK- | SYK- |
| RNAi-Screen | | | | | | |
| Gen-Score BL vs. Karzinom | 1,62 | 1,62 | 1,78 | 1,67 | 1,84 | 1,62 |
| Gen-Rang BL vs. Karzinom | 64 | 65 | 8 | 31 | 3 | 58 |
| p-Wert BL vs. Karzinom | 0,006 | 0,006 | < 0,001 | 0,003 | < 0,001 | 0,008 |

Tab. 6: Ausgewählte Proteine aus phosphoproteomischen Analysen und RNAi-Screen

Darstellung der Proteine ACTN4, ARFGEF2, BCL11A, CARD11, CDKN1B und MTHFD1. Jeweils Angabe der signifikanten Resultate aus phosphoproteomischen Analysen (Corso et al. 2016) und RNAi-Screen (Huellein et al. 2019). Bei Phosphorylierung jeweils Angabe der am stärksten signifikant regulierten Phosphorylierungsstelle (p-Site) und Aminosäure (Y = Tyrosin, S = Serin, T = Threonin) bei SYK-Inhibierung (SYK-) bzw. CD79a-Knockdown (CD79a KD). Bei RNAi-Screen jeweils Angabe des p-Werts für Unterschied im shRNA Fold-change zwischen BL und Karzinom sowie Gen-Score (durch gewichtete Z-Transformation aus p-Wert berechnet) und Gen-Rang als Maß für BL-Spezifität (Signifikanz).

3.2 Vergleichende immunhistochemische Expressionsanalyse an humanen B-Zell-Lymphomen

3.2.1 Lymphom-Kollektiv für immunhistochemische Expressionsanalyse

Ausgehend von den *in vitro* durchgeführten Untersuchungen an BL-Zelllinien wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression der beschriebenen Proteine in humanem Lymphomgewebe für verschiedene B-Zell-Lymphom-Entitäten mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht. Hierfür wurde ein Lymphom-Kollektiv bestehend aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Geweben zusammengestellt (siehe 2.4). Aus dem Lymphomgewebe wurden TMA-Blöcke hergestellt (siehe 2.5) und diese mit den in Tab. 3 genannten Antikörpern gefärbt. Das verwendete Gewebematerial entstammt dem Archiv des Instituts für Pathologie der UMG und wurde bereits im Vorfeld von Pathologen des Instituts histologisch beurteilt, wobei die jeweilige Lymphomdiagnose nach WHO-Kriterien gestellt wurde. Die zusätzlich gesammelten Patienteninformationen entstammen der Datenbank des Instituts für Pathologie der UMG. Zur Ermittlung des Überlebensstatus der Patienten wurden außerdem Anfragen an Einwohnermeldeämter gestellt (siehe 2.6). Insgesamt enthält das Kollektiv 280 Fälle von B-Zell-Lymphomen, die sich wie folgt auf acht verschiedene Entitäten verteilen: 18 BL, 83 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 29 MCL, 27 MZL, 26 MM sowie 30 HL. Unter den Patienten waren 166 (59%) männliche und 114 (41%) weibliche Personen. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren die Patienten zwischen 18 und 93 Jahre alt, wobei das mediane Alter bei 61,5 Jahren lag (siehe Tab. 7).

| Lymphom-Kollektiv für Expressionsanalyse | |
|--|---------------|
| Gesamt | n = 280 |
| BL | n = 18 (6%) |
| DLBCL | n = 83 (30%) |
| B-CLL | n = 28 (10%) |
| FL | n = 39 (14%) |
| MCL | n = 29 (10%) |
| MZL | n = 27 (10%) |
| MM | n = 26 (9%) |
| HL | n = 30 (11%) |
| Geschlecht | |
| männlich | n = 166 (59%) |
| weiblich | n = 114 (41%) |
| Alter (Jahre) | |
| Range | 18-93 |
| Median | 61,5 |

Tab. 7: Lymphom-Kollektiv für immunhistochemische Expressionsanalyse

Absolute und prozentuale Darstellung der Fallzahlen für verschiedene Lymphom-Entitäten des Kollektivs. Klassifizierung der Patienten nach Geschlecht und Alter.

3.2.2 Überlebenszeitanalyse Lymphom-Kollektiv nach Diagnose

Von 279 Patienten waren 92 (31%) im Beobachtungszeitraum von max. 60 Monaten verstorben (siehe Tab. 8). Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Entitäten. So wiesen die hochproliferativen Lymphome BL und DLBCL mit 44% und 52% eine im Vergleich zum gesamten Kollektiv überdurchschnittlich hohe Mortalität auf. Auch beim MCL und MM fand sich mit 36% und 46% eine Sterberate über dem Durchschnitt. Im Gegensatz dazu waren nur 13% der FL-Patienten und nur 7% der HL-Patienten verstorben. Das mediane Gesamtüberleben aller untersuchten Patienten lag bei 38,0 Monaten. Es wurden Kaplan-Meier-Kurven zur graphischen Darstellung der Überlebenszeiten erstellt (siehe Abb. 9). Darin zeigten sich hoch signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben verschiedener Lymphom-Entitäten (Chi-Quadrat-Test $p < 0,0001$). Mittels Logrank-Test wurde untersucht, ob sich jeweils zwei unterschiedliche Gruppen von Patienten im Gesamtüberleben signifikant voneinander unterscheiden. Wie zu erwarten zeigte sich beim Vergleich von hochmalignen Lymphomen (BL/DLBCL) mit indolenten Lymphomen (B-CLL/FL/MZL) oder HL ein hoch signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der Patienten (jeweils Logrank-Test $p < 0,0001$). Dagegen fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben von BL-, DLBCL-, MCL- und MM-Patienten (jeweils Logrank-Test $p > 0,05$). Ebenso ließen sich beim Vergleich von B-CLL-, FL-, MZL- und HL-Patienten jeweils kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben erkennen (jeweils Logrank-Test $p > 0,05$).

| Überlebenszeitanalyse Lymphom-Kollektiv | |
|--|------------------|
| Mortalität | |
| Gesamt | n = 92/297 (31%) |
| BL | n = 8/18 (44%) |
| DLBCL | n = 43/83 (52%) |
| B-CLL | n = 6/28 (21%) |
| FL | n = 5/39 (13%) |
| MCL | n = 10/28 (36%) |
| MZL | n = 6/27 (22%) |
| MM | n = 12/26 (46%) |
| HL | n = 2/30 (7%) |
| Gesamtüberleben (Monate)* | |
| Range | 0-60 |
| Median | 38,0 |

Tab. 8: Überlebenszeitanalyse Lymphom-Kollektiv

Absolute und prozentuale Darstellung der Mortalität für das gesamte Kollektiv sowie für verschiedene Lymphom-Entitäten. Darstellung des Gesamtüberlebens (Range und Durchschnitt) in Monaten ab Erstdiagnose für das gesamte Kollektiv. *im Beobachtungszeitraum, max. 60 Monate.

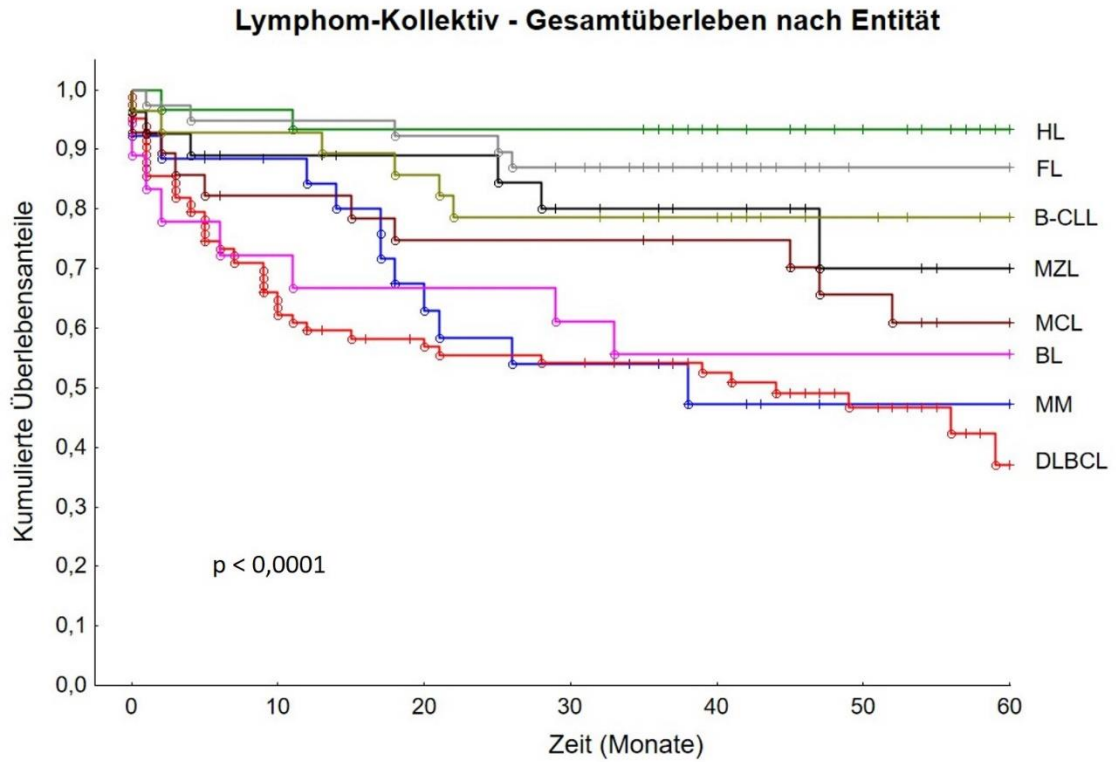


Abb. 9: Überlebenszeitanalyse Lymphom-Kollektiv

Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten verschiedener B-Zell-Lymphom-Entitäten: BL, DLBCL, B-CLL, FL, MCL, MZL, MM, HL. Angabe des p-Werts aus Chi-Quadrat-Test. Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten. Legende: o = verstorben, + = zensiert.

3.3 Expression von BCL2, BCL6 und MYC in humanen B-Zell-Lymphomen

Zur Validierung des unter 3.2.1 beschriebenen Lymphom-Kollektivs erfolgte eine vergleichende Darstellung der Expression bekannter Onkoproteine in verschiedenen Lymphomen-Entitäten. Dafür wurde das Gewebe mit einem gegen BCL2, BCL6 und MYC spezifischen Antikörper gefärbt (siehe 2.5.2).

3.3.1 BCL2

Es konnten insgesamt 279 Fälle wie unter 2.5.3 beschrieben ausgewertet werden (18 BL, 82 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 29 MCL, 27 MZL, 26 MM und 30 HL). Die resultierenden Intensitäten der immunhistochemischen Färbung sind beispielhaft in Abb. 10 dargestellt.

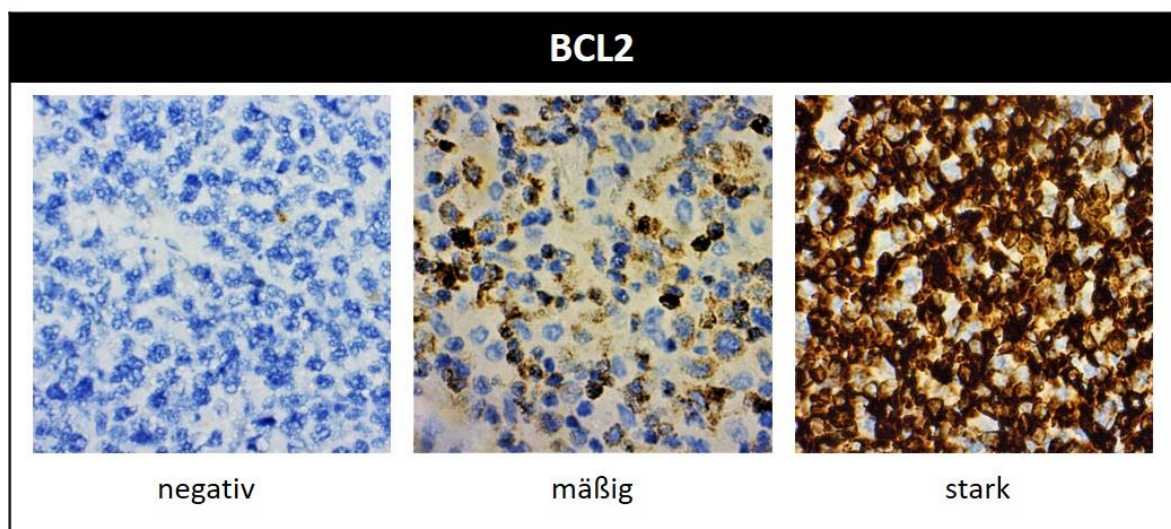


Abb. 10: Expression von BCL2 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-BCL2

Links: Lymphomzellen negativ für anti-BCL2. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Insgesamt waren 243 von 279 Fällen und somit der Großteil der Lymphome positiv für BCL2 gefärbt. Dabei zeigte sich bei 171 Fällen eine stark positive Färbung. Abb. 11 und Tab. 9 geben einen Überblick über die Ergebnisse der Auswertung. Abgesehen vom BL und HL fand sich bei allen Lymphom-Entitäten ein BCL2-positiver Anteil von > 90% der Fälle. Im Gegensatz dazu war beim BL nur ein Drittel (33%), beim HL ca. die Hälfte aller Fälle (53%) positiv gefärbt. Die hochproliferativen Entitäten BL und DLBCL unterschieden sich somit signifikant im Anteil BCL2-positiver Fälle (Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$). Die indolenten Lymphome MZL, FL, B-CLL und MCL wiesen mit 78 – 100% einen sehr hohen Anteil an Fällen mit stark positiver BCL2-Proteinexpression auf. Bei den übrigen Entitäten variierte dieser Anteil von 33% beim HL bis zu 46% beim DLBCL. Im Gegensatz dazu fand sich beim BL nur in einem von 18 Fällen (5%) eine stark positive Färbung. Der hohe Anteil an stark positiven Fällen bei B-CLL, FL, MCL, MZL erwies sich im Vergleich zu den übrigen

Lymphom-Entitäten als hoch signifikant (Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$) und kann somit als spezifisch für indolente Lymphome angesehen werden. Jedoch besteht bzgl. einer stark positiven Färbung keine Spezifität für einen bestimmten Lymphom-Subtyp, da sich beispielsweise MCL und B-CLL hier nicht signifikant voneinander unterscheiden (Fisher-Yates-Test $p = 0,49$). Einzig beim BL waren im Vergleich zu jeder anderen Lymphom-Entität signifikant weniger Fälle stark positiv gefärbt (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,05$).

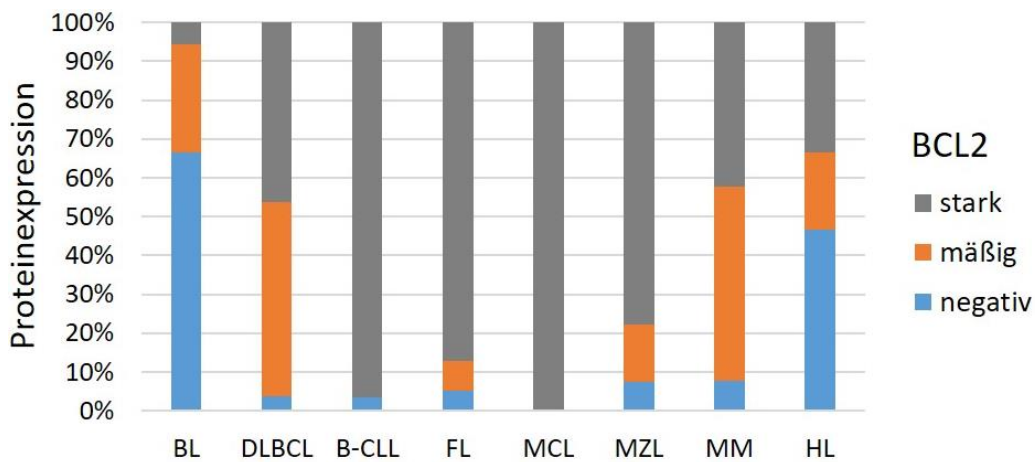


Abb. 11: Expression von BCL2 in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von BCL2 (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität.

| BCL2 | | | | |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------|
| | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
| BL | 12 (67) | 5 (28) | 1 (5) | 18 |
| DLBCL | 3 (4) | 41 (50) | 38 (46) | 82 |
| B-CLL | 1 (4) | 0 (0) | 27 (96) | 28 |
| FL | 2 (5) | 3 (8) | 34 (87) | 39 |
| MCL | 0 (0) | 0 (0) | 29 (100) | 29 |
| MZL | 2 (7) | 4 (15) | 21 (78) | 27 |
| MM | 2 (8) | 13 (50) | 11 (42) | 26 |
| HL | 14 (47) | 6 (20) | 10 (33) | 30 |
| Gesamt | 36 | 72 | 171 | 279 |

Tab. 9: Absolute Auswertung TMA anti-BCL2

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von BCL2.

3.3.2 BCL6

In die Auswertung gingen insgesamt 280 Fälle ein. Davon waren 18 BL-, 83 DLBCL-, 28 B-CLL-, 39 FL-, 29 MCL-, 27 MZL-, 26 MM- und 30 HL-Fälle. Das Spektrum der Farbintensitäten ist in Abb. 12 dargestellt.

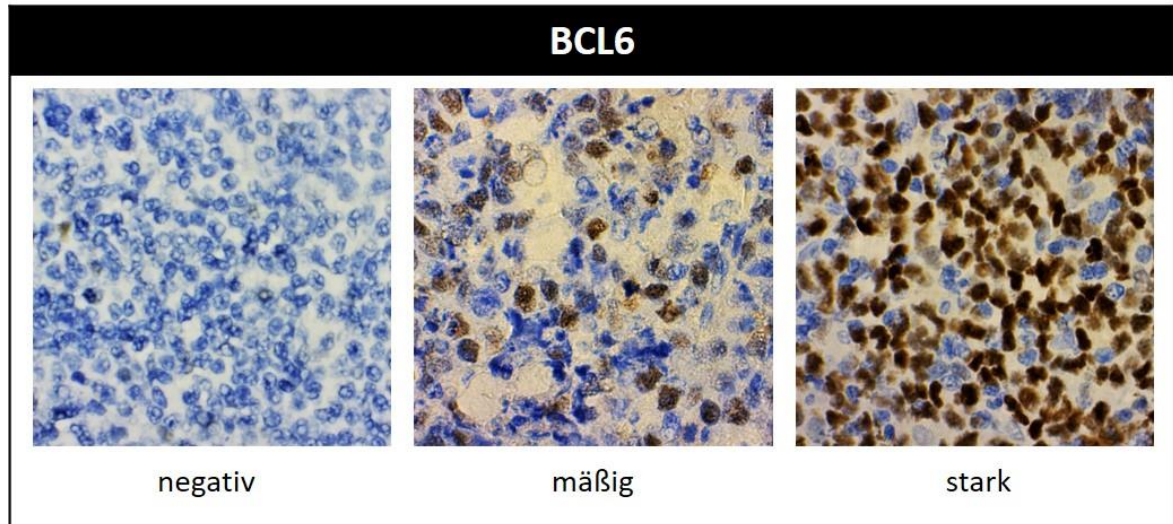


Abb. 12: Expression von BCL6 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-BCL6

Links: Lymphomzellen negativ für anti-BCL6. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Von insgesamt 280 Fällen färbten sich 132 Fälle positiv für anti-BCL6, davon zeigten 60 Fälle eine stark positive Proteinexpression. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abb. 13 und Tab. 10 dargestellt. FL und BL waren in > 90% aller Fälle BCL6-positiv. Auch beim DLBCL fand sich mit 66 von 83 Fällen (80%) ein hoher positiv gefärbter Anteil. Im Gegensatz dazu wiesen die übrigen Lymphom-Entitäten deutlich geringere BCL6-positive Anteile auf. So waren nur 26% der MZL und 11% der B-CLL-Fälle positiv gefärbt. Beim MCL zeigte sich nur in einem Fall eine positive Färbung, MM und HL waren vollständig negativ. Eine hohe BCL6-Proteinexpression ist folglich nicht spezifisch für eine bestimmte Lymphom-Entität. Der Anteil an BCL6-positiven Fällen war allerdings bei BL, DLBCL und FL jeweils signifikant erhöht im Vergleich zu jeder der übrigen Lymphom-Entitäten (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$). Eine stark positive Proteinexpression fand sich bei ca. der Hälfte aller BL- und FL-Fälle (55% und 51%), sowie bei 22% der DLBCL- und 7% der MZL-Fälle. Dagegen waren B-CLL, MCL, MM und HL nicht stark positiv gefärbt. Da BL und FL ein ähnliches Färbeverhalten aufwiesen (Fisher-Yates-Test $p = 0,78$), besteht auch bzgl. einer stark positiven BCL6-Expression keine Spezifität für einen bestimmten Lymphom-Subtyp.

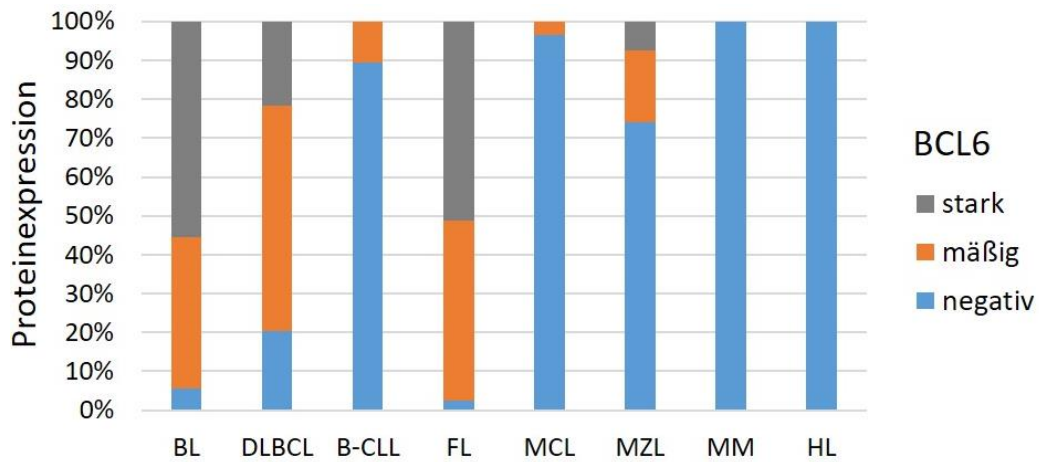


Abb. 13: Expression von BCL6 in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von BCL6 (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität.

| BCL6 | | | | |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------|
| | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
| BL | 1 (6) | 7 (39) | 10 (55) | 18 |
| DLBCL | 17 (20) | 48 (58) | 18 (22) | 83 |
| B-CLL | 25 (89) | 3 (11) | 0 (0) | 28 |
| FL | 1 (3) | 18 (46) | 20 (51) | 39 |
| MCL | 28 (97) | 1 (3) | 0 (0) | 29 |
| MZL | 20 (74) | 5 (19) | 2 (7) | 27 |
| MM | 26 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 26 |
| HL | 30 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 30 |
| Gesamt | 148 | 82 | 50 | 280 |

Tab. 10: Absolute Auswertung TMA anti-BCL6

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von BCL6.

3.3.3 MYC

Die Auswertung erfolgte an insgesamt 279 Lymphom-Fällen (18 BL, 82 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 29 MCL, 27 MZL- 26 MM und 30 HL). Abb. 14 zeigt exemplarisch die verschiedenen Farbintensitäten.

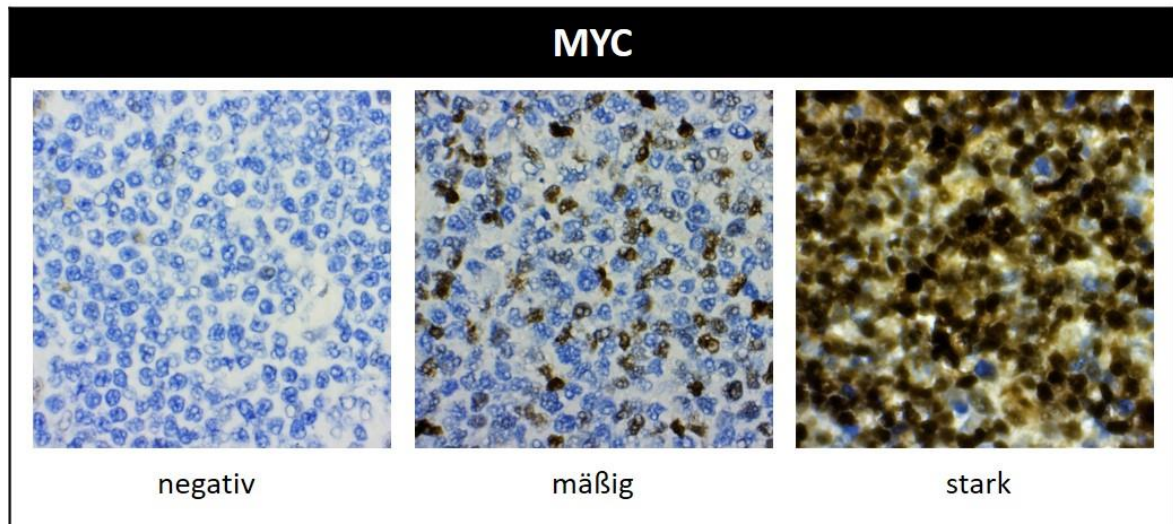


Abb. 14: Expression von MYC nach immunhistochemischer Färbung mit anti-MYC

Links: Lymphomzellen negativ für anti-MYC. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Insgesamt färbten sich 102 von 279 Fällen positiv für anti-MYC, wobei 45 Fälle eine stark positive Proteinexpression aufwiesen. Abb. 15 und Tab. 11 fassen die Ergebnisse der Auswertung zusammen. Beim BL zeigten alle Fälle eine positive MYC-Expression. Beim DLBCL waren 60% und beim HL ca. die Hälfte aller Fälle (46%) positiv gefärbt. Bei den übrigen Lymphom-Entitäten war dieser Anteil deutlich geringer und variierte von lediglich einem mäßig positiven Fall (4%) beim MZL bis zu 23% beim MM. Die hochproliferativen Lymphome BL und DLBCL unterscheiden sich signifikant im Anteil an MYC-positiven Fällen (Fisher-Yates-Test $p = 0,0005$). Folglich ist die extrem hohe Proteinexpression beim BL (100% positive Fälle) als spezifisch für diese Entität zu werten. Darüber hinaus waren beim BL 15 von 18 Fällen (83%) stark positiv gefärbt und somit signifikant mehr als bei allen anderen B-Zell-Lymphomen (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$). Bei MM, HL und DLBCL waren lediglich 13 – 23% der Fälle stark positiv gefärbt, die übrigen Entitäten zeigten in keinem bis maximal einem Fall eine starke Positivität für anti-MYC.

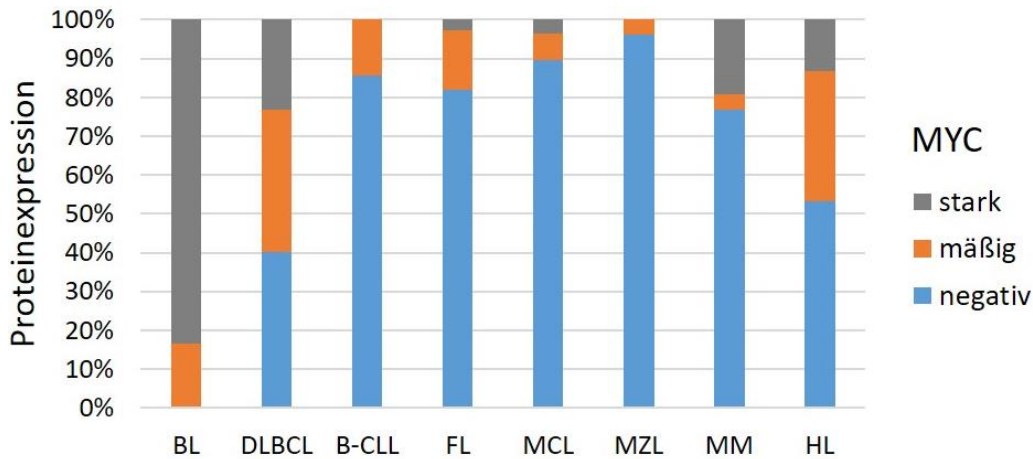


Abb. 15: Expression von MYC in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von MYC (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität.

| MYC | | | | |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------|
| | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
| BL | 0 (0) | 3 (17) | 15 (83) | 18 |
| DLBCL | 33 (40) | 30 (37) | 19 (23) | 82 |
| B-CLL | 24 (86) | 4 (14) | 0 (0) | 28 |
| FL | 32 (82) | 6 (15) | 1 (3) | 39 |
| MCL | 26 (90) | 2 (7) | 1 (3) | 29 |
| MZL | 26 (96) | 1 (4) | 0 (0) | 27 |
| MM | 20 (77) | 1 (4) | 5 (19) | 26 |
| HL | 16 (54) | 10 (33) | 4 (13) | 30 |
| Gesamt | 177 | 57 | 45 | 279 |

Tab. 11: Absolute Auswertung TMA anti-MYC

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von MYC.

3.3.4 Überlebenszeitanalyse BCL2, BCL6 und MYC in DLBCL

Im Folgenden soll die Auswirkung der Proteinexpression von BCL2, BCL6 und MYC auf das Gesamtüberleben von Patienten mit DLBCL am beschriebenen Kollektiv jeweils einzeln und kombiniert untersucht werden. Dafür wurden, basierend auf den Ergebnissen der immunhistochemischen Auswertung, Überlebenszeitanalysen durchgeführt (siehe 2.6). Es gingen 82 DLBCL-Fälle in die Analysen ein, davon waren 79 Fälle (96%) positiv für anti-BCL2, 65 Fälle (80%) positiv für anti-BCL6 und 49 Fälle (60%) positiv für anti-MYC. Stark positiv färbten sich 38 Fälle (46%) für anti-BCL2, 17 Fälle (22%) für anti-BCL6 und 19 Fälle (23%) für anti-MYC. Insgesamt waren 43 Patienten (52%) innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnose verstorben, davon der größte Teil (77%) innerhalb der ersten 12 Monate. Das mediane Follow-Up betrug 30,0 Monate (Range 0 – 60 Monate). Bei den Färbungen mit anti-BCL2, anti-BCL6 und anti-MYC zeigten negative und mäßig positive DLBCL-Fälle

jeweils einen ähnlichen Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven und wurden daher für die Überlebenszeitanalysen zusammengefasst (siehe 2.6).

Zunächst wurde das Gesamtüberleben von DLBCL-Patienten mit negativer/mäßig positiver Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben von DLBCL-Patienten mit stark positiver Expression von BCL2, BCL6 und MYC verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt. Eine starke Expression von MYC korrelierte dabei signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben (Logrank-Test $p = 0,031$), während eine starke Expression von BCL6 tendentiell eher mit einem besseren Überleben korrelierte (Logrank-Test $p = 0,132$). BCL2 hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben.

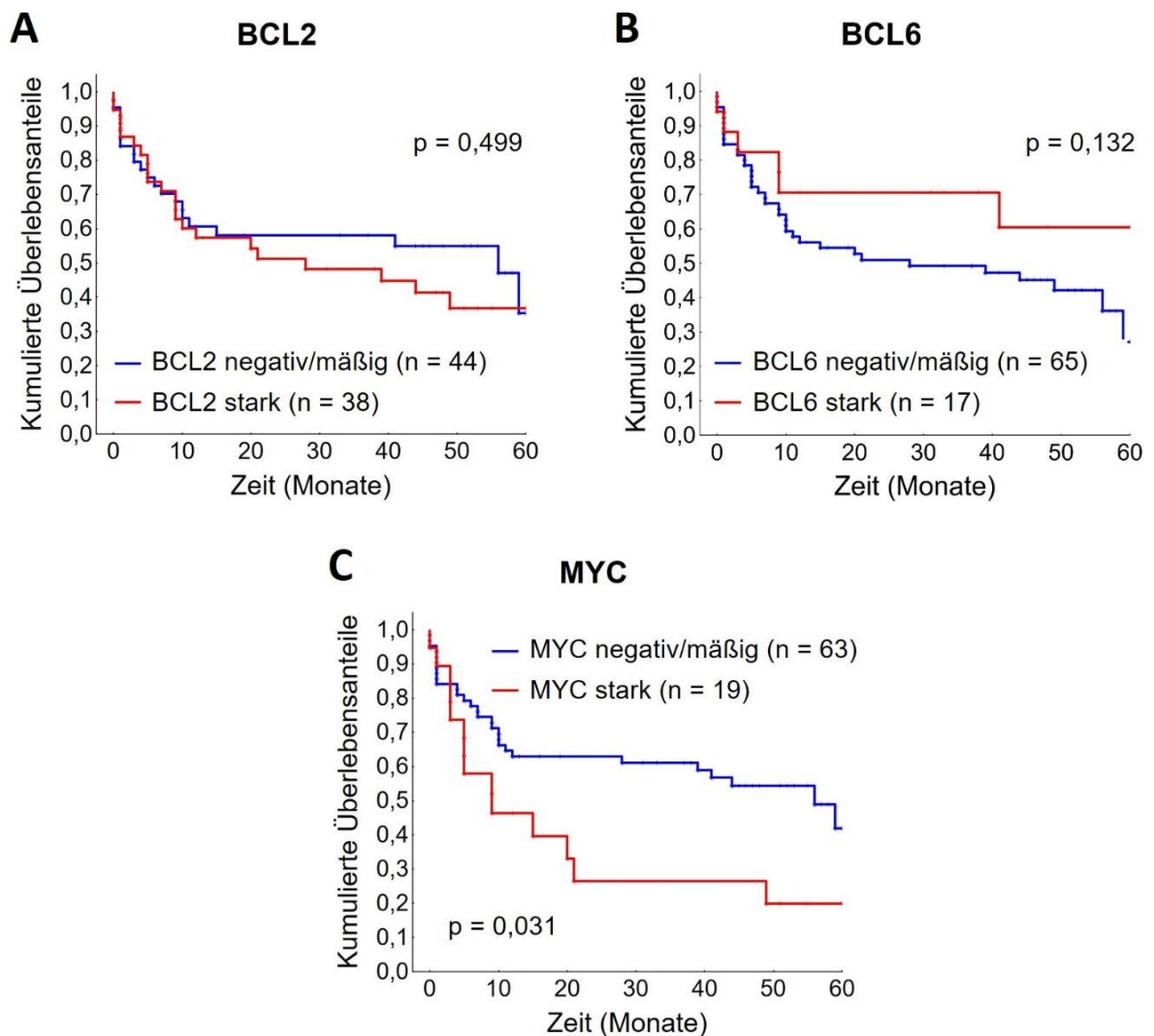


Abb. 16: Überlebenszeitanalyse DLBCL in Abhängigkeit von BCL2-, BCL6- und MYC-Expression

Vergleich des Gesamtüberlebens von DLBCL-Patienten mit negativer/mäßig positiver vs. stark positiver Proteinexpression von BCL2 (A), BCL6 (B) und MYC (C). Angabe des p-Werts aus Logrank-Test. Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten.

In weiteren Analysen wurde die Auswirkung der Co-Expressionen MYC/BCL2 und MYC/BCL6 auf das Gesamtüberleben der DLBCL-Patienten untersucht. Dabei wurden

jeweils Fälle mit zweifacher Überexpression (stark positive Färbung für beide Proteine) mit Fällen mit einfacher Überexpression (stark positive Färbung für eines der beiden Proteine) mit Fällen mit fehlender Überexpression (negative/mäßig positive Färbung für beide Proteine) verglichen. Abb. 17 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Auswertung. Von insgesamt 82 Fällen waren 13 (16%) bzw. 5 Fälle (6%) stark positiv für MYC und BCL2 bzw. MYC und BCL6 gefärbt (DEL = Double-Expressor-Lymphome). Eine stark positive Expression aller drei Proteine (TEL = Triple-Expressor-Lymphome) zeigte sich in lediglich zwei Fällen (2%), sodass für diese Patientengruppe keine gesonderte Überlebenszeitanalyse durchgeführt wurde.

Eine Überexpression von MYC war jeweils mit einem schlechteren Gesamtüberleben verbunden, wobei innerhalb dieser Gruppe eine Expression von BCL2 oder BCL6 zu einer etwas besseren Prognose führte. Das beste Gesamtüberleben hatten Patienten ohne MYC-Überexpression und ohne BCL2- (MYC-/BCL2-) oder mit BCL6-Expression (MYC-/BCL6+). Bei der kombinierten Expression MYC/BCL2 bzw. MYC/BCL6 unterschieden sich Fälle mit der besten (MYC-/BCL2- bzw. MYC-/BCL6+) und der schlechtesten Prognose (MYC+/BCL2- bzw. MYC+/BCL6-) signifikant bzw. nur knapp nicht signifikant voneinander (Logrank-Test $p = 0,040$ bzw. $p = 0,099$).

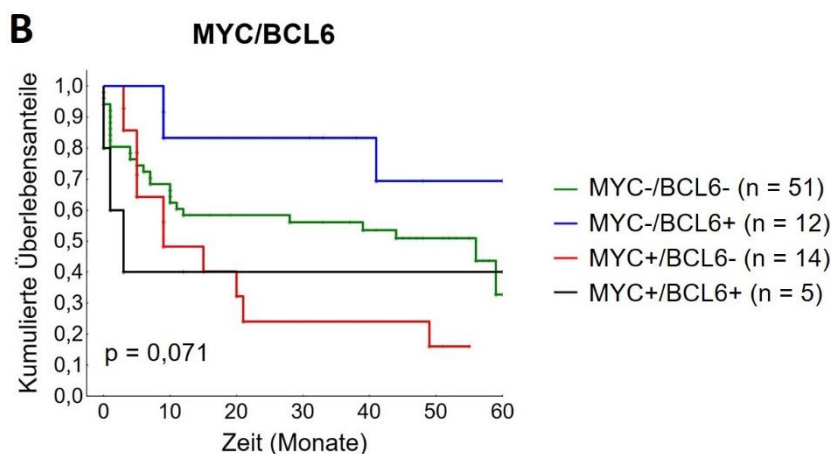
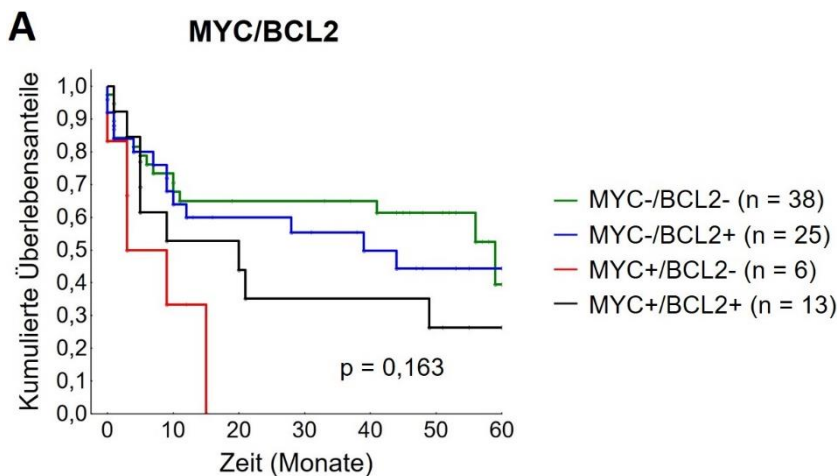


Abb. 17: Überlebenszeitanalyse DLBCL in Abhängigkeit von Co-Expression MYC/BCL2 und MYC/BCL6

Vergleich des Gesamtüberlebens von DLBCL-Patienten mit kombinierter Überexpression von MYC/BCL2 (A) und MYC/BCL6 (B). Jeweils Vergleich von zweifacher (+/+), einfacher (+/- und -/+) und fehlender (-/-) Überexpression. Angabe des p-Werts aus Chi-Quadrat-Test. Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten.

3.4 Expression BCR-abhängiger Signalwegssignaturen in humanen B-Zell-Lymphomen

Mittels phosphoproteomischer Analysen (siehe 3.1.1) wurde für die Proteine ACTN4, ARFGEF2, BCL11A, CARD11, CDKN1B und MTHFD1 in BL-Zelllinien eine signifikante BCR-abhängige Phosphorylierung im Rahmen des tonischen BCR-Signalings nachgewiesen. Ebenso wurden diese Proteine durch einen RNAi-Screen (siehe 3.1.2) in BL-Zelllinien als essentielle und BL-spezifische Proteine identifiziert. Im Folgenden soll die Expression dieser Proteine in humanem Lymphomgewebe verschiedener Lymphom-Entitäten untersucht werden. Die Expression von MTHFD1 wird in Kapitel 3.5 beschrieben.

3.4.1 ACTN4

3.4.1.1 Proteinexpression von ACTN4 in humanen Lymphomen

Bei der immunhistochemischen Färbung mit anti-ACTN4 konnten insgesamt 280 Fälle ausgewertet werden, wovon 18 BL-, 83 DLBCL-, 28 B-CLL-, 39 FL-, 29 MCL-, 27 MZL-, 26 MM- und 30 HL-Fälle waren. Abb. 18 zeigt exemplarisch das Spektrum der Farbintensitäten.

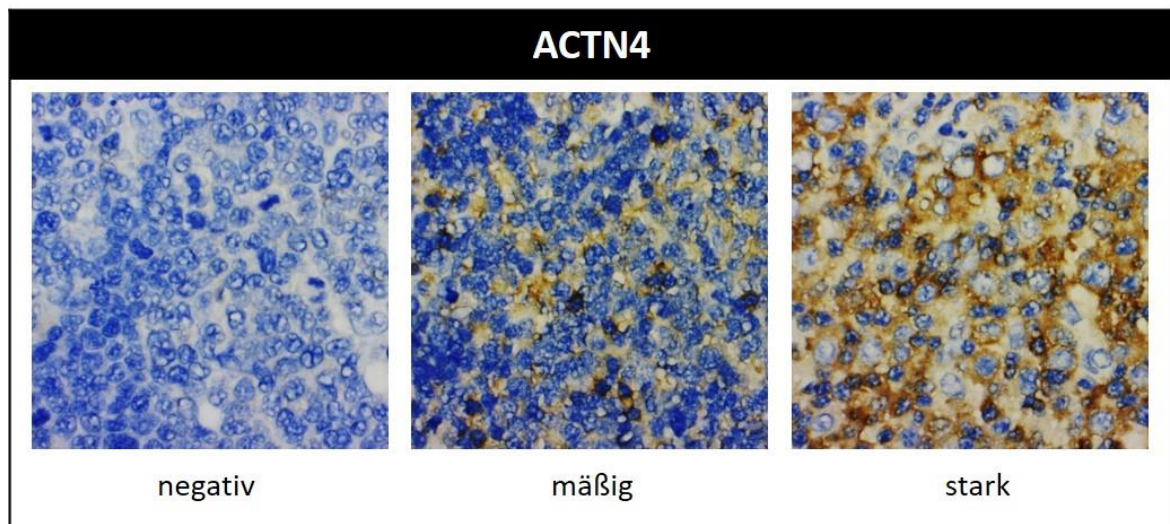


Abb. 18: Expression von ACTN4 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-ACTN4

Links: Lymphomzellen negativ für Anti-ACTN4. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Von 280 Fällen färbten sich 62 Fälle mäßig und 36 Fälle stark positiv für anti-ACTN4. Abb. 19 und Tab. 12 geben einen Überblick über die Ergebnisse der Auswertung. Insgesamt wiesen BL mit 83% den mit Abstand höchsten Anteil an positiven Fällen auf, wobei die Hälfte der BL-Fälle (50%) eine mäßig positive und ein Drittel (33%) eine stark positive ACTN4-Expression zeigte. Im Gegensatz dazu waren DLBCL nur in 25% der Fälle und somit signifikant seltener positiv gefärbt (Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$). Folglich kann die Färbung mit anti-ACTN4 bei den hochproliferativen Lymphomen der Unterscheidung

zwischen BL und DLBCL dienen. Beim MM waren 58% der Fälle positiv gefärbt, wobei mit 14 von 26 Fällen (54%) der höchste Anteil an stark positiven Fällen verzeichnet wurde. Bei den übrigen Entitäten variierte der ACTN4-positive Anteil von 11% bei B-CLL bis zu 48% bei MZL. Insgesamt waren BL signifikant häufiger positiv gefärbt als nahezu alle anderen B-Zell-Lymphome (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,05$), einzig der Vergleich mit MM war nur knapp nicht signifikant (Fisher-Yates-Test $p = 0,10$). BL und MM zeigten auch einen im Vergleich zum Rest signifikant höheren Anteil an Fällen mit stark positiver Proteinexpression (Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$), wobei zwischen BL und MM wiederum kein signifikanter Unterschied bestand (Fisher-Yates-Test $p = 0,23$).

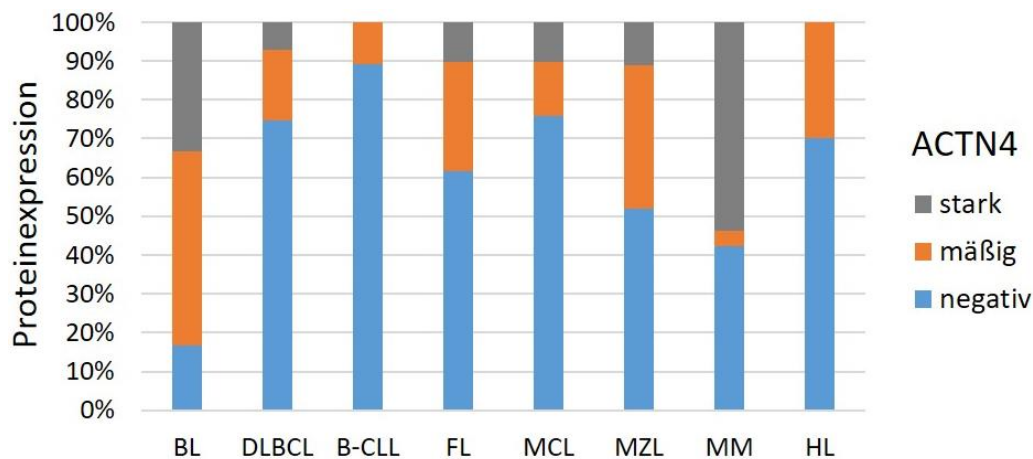


Abb. 19: Expression von ACTN4 in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von ACTN4 (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität.

| ACTN4 | | | | |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------|
| | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
| BL | 3 (17) | 9 (50) | 6 (33) | 18 |
| DLBCL | 62 (75) | 15 (18) | 6 (7) | 83 |
| B-CLL | 25 (89) | 3 (11) | 0 (0) | 28 |
| FL | 24 (62) | 11 (28) | 4 (10) | 39 |
| MCL | 22 (76) | 4 (14) | 3 (10) | 29 |
| MZL | 14 (52) | 10 (37) | 3 (11) | 27 |
| MM | 11 (42) | 1 (4) | 14 (54) | 26 |
| HL | 21 (70) | 9 (30) | 0 (14) | 30 |
| Gesamt | 182 | 62 | 36 | 280 |

Tab. 12: Absolute Auswertung TMA anti-ACTN4

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von ACTN4.

3.4.1.2 Überlebenszeitanalyse ACTN4

Im Folgenden soll die Auswirkung der ACTN4-Expression auf das Gesamtüberleben von Lymphom-Patienten am beschriebenen Kollektiv untersucht werden. In die Überlebenszeitanalyse (siehe 2.6) gingen insgesamt 279 Fälle ein, wovon 18 BL-, 83 DLBCL-, 28 B-CLL-, 39 FL-, 28 MCL-, 27 MZL-, 26 MM- und 30 HL-Fälle waren.

In einer ersten Analyse am gesamten Kollektiv wurden Patienten mit negativer (182 Fälle), mäßig positiver (61 Fälle) und stark positiver ACTN4-Expression (36 Fälle) untereinander verglichen (siehe A in Abb. 20). Dabei wiesen Patienten mit positiver (mäßig oder stark) Expression eine etwas bessere Gesamtprognose auf als Patienten mit negativer Expression, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Logrank-Test $p = 0,245$). In weiteren Analysen wurde das Gesamtüberleben für ausgewählte Lymphom-Entitäten einzeln untersucht. Da B-CLL-Fälle kaum positiv gefärbt waren (siehe Tab. 12) und bei FL und HL die Mortalität im Beobachtungszeitraum sehr gering war (siehe Tab. 8), wurden diese Entitäten nicht berücksichtigt. Beim DLBCL hatten Fälle mit negativer und mäßig positiver ACTN4-Färbung ein ähnliches Gesamtüberleben (siehe B in Abb. 20). Im Gegensatz dazu wiesen Fälle mit stark positiver ACTN4-Expression eine signifikant bessere Prognose auf (Logrank-Test $p = 0,016$). BL waren nur in drei Fällen negativ gefärbt, sodass Patienten mit negativer und mäßig positiver ACTN4-Expression zusammengefasst und mit Patienten mit stark positiver Proteinexpression verglichen wurden. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben (Logrank-Test $p = 0,586$; Abb. hier nicht dargestellt). Für MCL, MM und MZL erfolgte aufgrund der geringen Anzahl mäßig- bzw. stark positiver Fälle (siehe Tab. 12) ebenfalls kein getrennter Vergleich zwischen den drei Farbintensitäten. Stattdessen wurden jeweils negative und positive (mäßig oder stark) Fälle miteinander verglichen. Während beim MCL das Gesamtüberleben für ACTN4-positive Fälle signifikant besser war (Logrank-Test $p = 0,024$; siehe C in Abb. 20), ließ sich bei MM (siehe D in Abb. 20) und MZL (Abb. hier nicht dargestellt) kein signifikanter Unterschied feststellen (Logrank-Test $p = 0,935$ und $p = 0,524$).

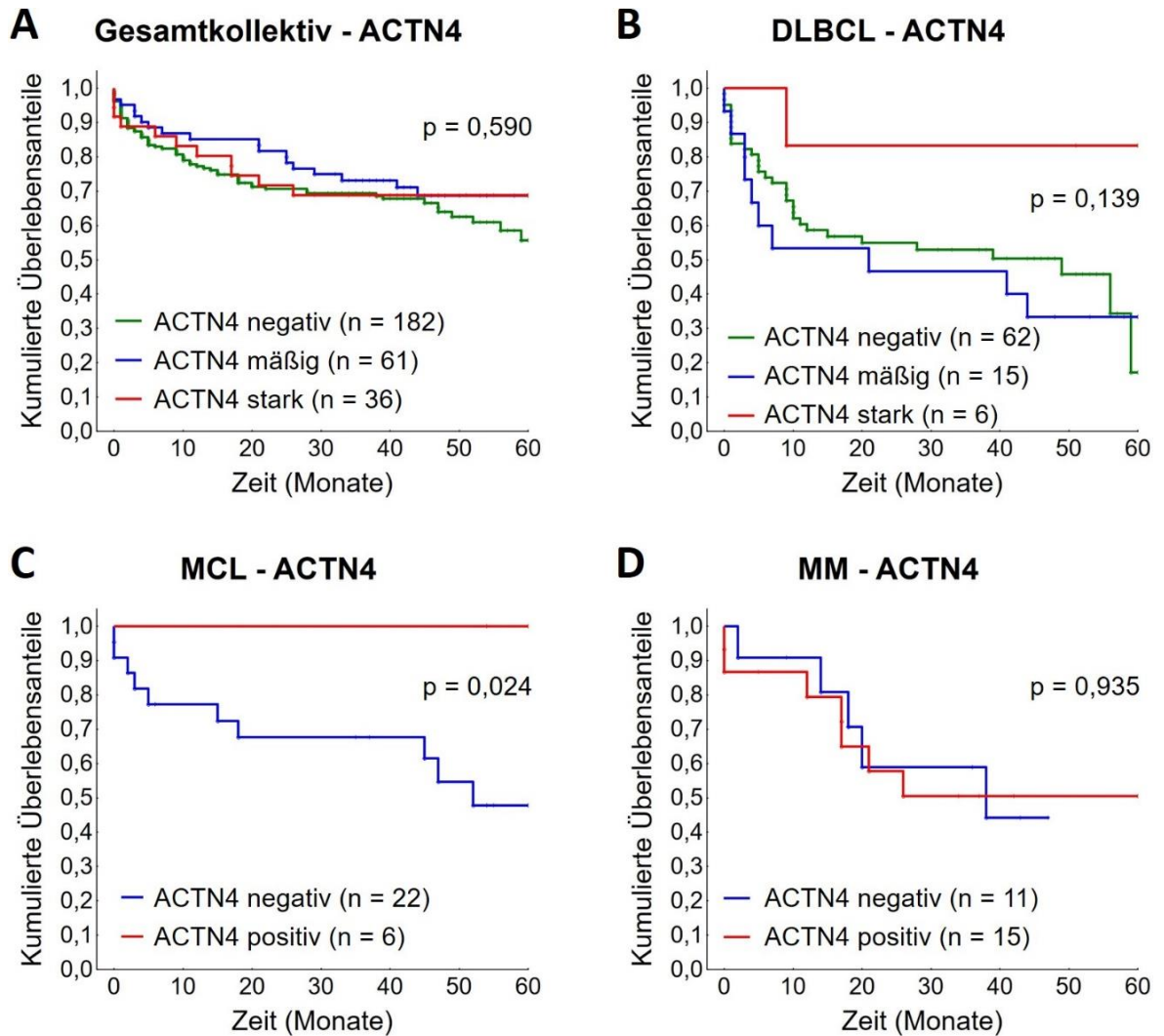


Abb. 20: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von ACTN4-Expression

Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. mäßig positiver vs. stark positiver Proteinexpression von ACTN4 für (A) Gesamtkollektiv (BL/DLBCL/B-CLL/FL/MCL/MZL/MM/HL) und (B) DLBCL. Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. positiver Proteinexpression von ACTN4 für (C) MCL und (D) MM. Angabe des p-Werts aus Chi-Quadrat-Test (A,B) und Logrank-Test (C,D). Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten.

3.4.2 ARFGEF2

3.4.2.1 Proteinexpression von ARFGEF2 in humanen Lymphomen

Bei der Färbung mit anti-ARFGEF2 konnten insgesamt 276 Fälle ausgewertet werden (18 BL, 83 DLBCL, 27 B-CLL, 37 FL, 29 MCL, 27 MZL, 26 MM und 29 HL). Die möglichen Farbintensitäten sind beispielhaft in Abb. 21 dargestellt.

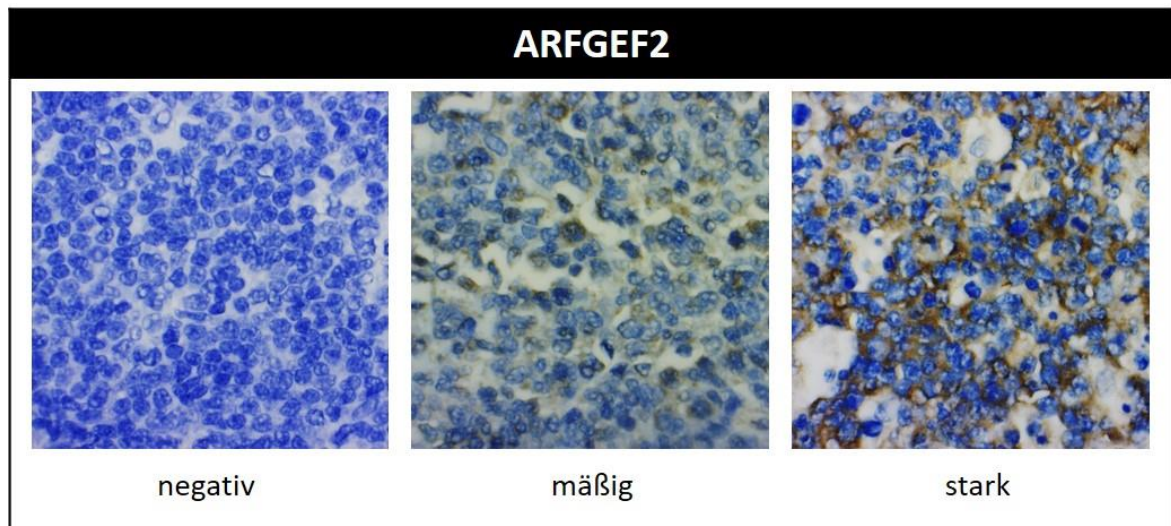


Abb. 21: Expression von ARFGEF2 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-ARFGEF2
Links: Lymphomzellen negativ für anti-ARFGEF2. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Von 276 Fällen färbten sich 106 mäßig und 43 stark positiv für anti-ARFGEF2. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abb. 22 und Tab. 13 dargestellt. BL und DLBCL zeigten eine positive Proteinexpression in 89% bzw. 87% der Fälle. Im Gegensatz dazu war bei B-CLL und MCL jeweils nur einer von 27 bzw. 29 Fällen mäßig positiv gefärbt bei ansonsten fehlender ARFGEF2-Expression. Der Anteil an positiven Fällen unter den übrigen Lymphom-Entitäten variierte von 35% bei HL bis zu 62% bei MM. Die verschiedenen Entitäten lassen sich somit anhand des Färbeverhaltens für ARFGEF2 in drei Gruppen einteilen: BL und DLBCL mit positiver Proteinexpression in > 80% der Fälle (I), B-CLL und MCL mit negativer Proteinexpression in nahezu allen Fällen (II) und FL, MZL, MM und HL mit positiver Proteinexpression in 35 – 62% der Fälle (III). Die Unterschiede zwischen diesen Gruppen hinsichtlich des Anteils an positiven Fällen sind hoch signifikant (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu kann mit dem Antikörper anhand einer positiven Expression nicht zwischen den Entitäten innerhalb einer Gruppe unterschieden werden (jeweils Fisher-Yates-Test bzw. Chi-Quadrat-Test $p > 0,05$). BL und DLBCL ähneln sich auch hinsichtlich des Anteils an Fällen mit stark positiver ARFGEF2-Expression. So waren 28% der BL und 27% der DLBCL stark positiv gefärbt. MM zeigten mit 24% einen ähnlich hohen Anteil an stark positiven Fällen. MZL, FL und HL waren in lediglich 7 – 14% der Fälle stark positiv gefärbt und somit signifikant seltener als BL, DLBCL und MM (Fisher-Yates-Test $p = 0,006$).

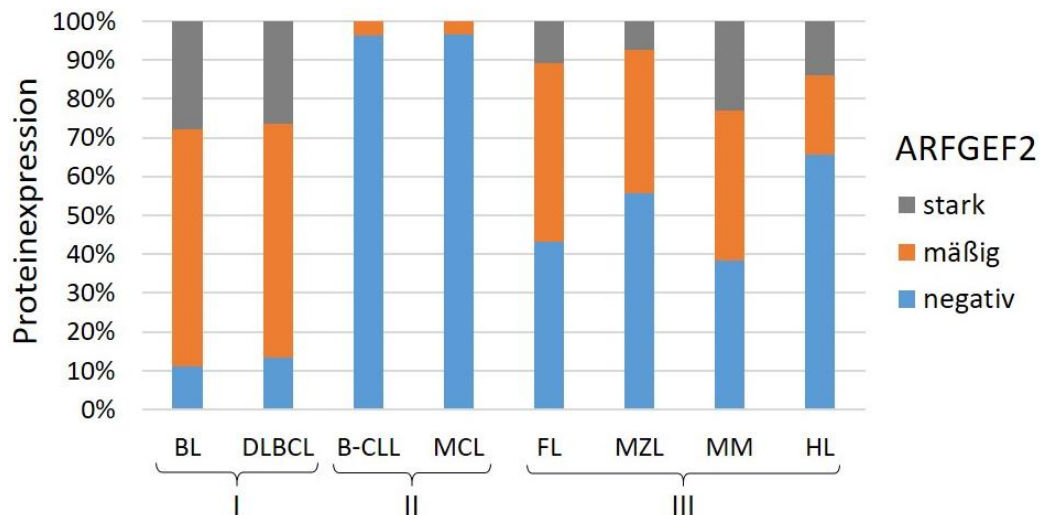


Abb. 22: Expression von ARFGEF2 in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von ARFGEF2 (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität. Gruppierung der Entitäten nach Anteil an positiven Fällen in drei Gruppen: I) > 80% positive Fälle, II) fast keine positiven Fälle, III) 35 – 62% positive Fälle.

| ARFGEF2 | | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
|---------|-------|-------------|-----------|-----------|-------|
| I | BL | 2 (11) | 11 (61) | 5 (27) | 18 |
| | DLBCL | 11 (13) | 50 (60) | 22 (27) | 83 |
| II | B-CLL | 26 (96) | 1 (4) | 0 (0) | 27 |
| | MCL | 28 (97) | 1 (3) | 0 (0) | 29 |
| III | FL | 16 (43) | 17 (46) | 4 (11) | 37 |
| | MZL | 15 (56) | 10 (37) | 2 (7) | 27 |
| | MM | 10 (38) | 10 (38) | 6 (24) | 26 |
| | HL | 19 (65) | 6 (21) | 4 (14) | 29 |
| Gesamt | | 127 | 106 | 43 | 276 |

Tab. 13: Absolute Auswertung TMA anti-ARFGEF2

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von ARFGEF2. Einteilung der Lymphom-Entitäten nach Anteil an positiven Fällen in drei Gruppen: I) > 80% positive Fälle, II) fast keine positiven Fälle, III) 35 – 62% positive Fälle.

3.4.2.2 ARFGEF2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex

Der signifikant hohe Anteil ARFGEF2-positiver Fälle bei den hochproliferativen Entitäten BL und DLBCL wirft die Frage auf, ob eine positive Expression von ARFGEF2 bei Lymphomen generell mit einer hohen Proliferationsrate assoziiert ist. Hierfür wurde die Proteinexpression von ARFGEF2 mit der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 verglichen. Der Ki-67-Index wurde für zahlreiche Fälle des untersuchten Lymphom-Kollektivs bereits im Rahmen der Diagnostik von Pathologen des Institutes für Pathologie

der UMG bestimmt. Diese Daten wurden für die Auswertung verwendet. Für MM und HL war der Ki-67-Index nur bei einem bzw. zwei ARFGFE2-positiven Fällen und für BL nur bei einem ARFGFE2-negativen Fall angegeben. Diese Entitäten wurden daher für die Analyse nicht berücksichtigt. Auch waren B-CLL und MCL aufgrund der insgesamt zu geringen Anzahl ARFGFE2-positiver Fälle (vgl. Tab. 13) für die Analyse nicht verwertbar. 75 DLBCL-, 34 FL- und 22 MZL-Fälle wurden anhand des Ki-67-Index in jeweils zwei Gruppen eingeteilt. Basierend auf der Verteilung der Ki-67-Werte wurde beim DLBCL ein Ki-67-Grenzwert von 75%, bei FL und MZL ein Grenzwert von 25% festgelegt. Die Grenzwerte entsprechen dabei in etwa dem jeweils medianen Ki-67-Wert. Zudem erfolgte eine Einteilung in ARFGFE2-positive (ARFGFE2+) und ARFGFE2-negative (ARFGFE2-) Fälle. Tab. 14 gibt einen Überblick über die Verteilung der Fälle. Der Fisher-Yates-Test ergab weder bei DLBCL ($p = 1,00$), noch bei FL ($p = 0,73$) und bei MZL ($p = 0,41$) eine signifikante Assoziation von ARFGFE2-Expression und Ki-67-Index. ARFGFE2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex sind somit in den untersuchten Lymphom-Entitäten als voneinander unabhängig zu werten.

| Assoziation von ARFGFE2 und Ki-67 | | | | |
|--|-----------|----------------------|-------------------|-------|
| | | Ki-67 \leq 75% (%) | Ki-67 $>$ 75% (%) | Total |
| DLBCL p = 1,00 | ARFGFE2 + | 26 (35) | 39 (52) | 65 |
| | ARFGFE2 - | 4 (5) | 6 (8) | 10 |
| | Gesamt | 30 (40) | 45 (60) | 75 |
| | | Ki-67 \leq 25% (%) | Ki-67 $>$ 25% (%) | Total |
| FL p = 0,73 | ARFGFE2 + | 12 (35) | 8 (23) | 20 |
| | ARFGFE2 - | 7 (21) | 7 (21) | 14 |
| | Gesamt | 19 (56) | 15 (44) | 34 |
| | | Ki-67 \leq 25% (%) | Ki-67 $>$ 25% (%) | Total |
| MZL p = 0,41 | ARFGFE2 + | 6 (27) | 3 (14) | 9 |
| | ARFGFE2 - | 6 (27) | 7 (32) | 13 |
| | Gesamt | 12 (54) | 10 (46) | 22 |

Tab. 14: Assoziation von ARFGFE2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex

Absolute und prozentuale Verteilung der Proliferationsrate in Bezug auf den ARFGFE2-Status für DLBCL, FL und MZL. Einteilung des Ki-67-Index in $\leq 75\%$ und $> 75\%$ für DLBCL sowie $\leq 25\%$ und $> 25\%$ für FL und MZL. Einteilung des ARFGFE2-Status in positiv (ARFGFE2+) und negativ (ARFGFE2-). Angabe des p-Werts aus Fisher-Yates-Test.

3.4.2.3 Überlebenszeitanalyse ARFGEF2

In Überlebenszeitanalysen wurde die Auswirkung der Proteinexpression von ARFGEF2 auf das Gesamtüberleben der Patienten am beschriebenen Kollektiv untersucht. Die Analysen umfassten insgesamt 275 Fälle (18 BL, 83 DLBCL, 27 B-CLL, 37 FL, 28 MCL, 27 MZL, 26 MM und 29 HL).

Zunächst wurden, unabhängig von der jeweiligen Lymphom-Entität, Patienten mit negativer ARFGEF2-Expression (127 Fälle) mit Patienten mit mäßig positiver (105 Fälle) und stark positiver Expression (43 Fälle) verglichen. Wie in A) in Abb. 23 dargestellt, hatten stark positive Fälle eine erkennbar schlechtere Gesamtprognose als mäßig positive Fälle und diese wiederum eine schlechtere Prognose als negative Fälle. Patienten mit positiver (mäßig und stark) Proteinexpression zeigten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben als Patienten mit negativer Expression (Logrank-Test $p = 0,014$). Dies ist jedoch evtl. darauf zurückzuführen, dass eine positive ARFGEF2-Färbung v. a. bei den hochproliferativen Entitäten BL und DLBCL vorkommt, die generell eine erhöhte Mortalität aufweisen (siehe Tab. 8 und Tab. 13). Im Folgenden wurden daher, basierend auf den Ergebnissen der IHC-Analyse, Fälle der Gruppe I (BL und DLBCL) und Fälle der Gruppe III (FL, MZL, MM, HL) getrennt untersucht. Da Fälle der Gruppe II (B-CLL, MCL) fast vollständig ARFGEF2-negativ waren, wurden sie für weitere Überlebenszeitanalysen nicht berücksichtigt. Patienten der Gruppe I hatten mit zunehmender Stärke der Proteinexpression ein etwas schlechteres Gesamtüberleben (siehe B in Abb. 23), wobei die prognostischen Unterschiede zwischen negativen und positiven bzw. negativ/mäßig positiven und stark positiven Fällen nicht signifikant waren (Logrank-Test $p = 0,671$ und $p = 0,475$). In der Gruppe III hatten Fälle mit negativer, mäßig und stark positiver ARFGEF2-Färbung eine ähnliche Gesamtprognose (Chi-Quadrat-Test $p = 0,775$; siehe C in Abb. 23). Es erfolgten weitere Überlebenszeitanalysen für ausgewählte Lymphom-Entitäten. Da FL- und HL-Patienten nur eine geringe Mortalität im Beobachtungszeitraum aufwiesen, waren diese Fälle für aussagekräftige Überlebenszeitanalysen nicht geeignet. Beim DLBCL hatten stark positiv gefärbte Fälle die schlechteste Prognose, mäßig positive und negative Fälle wiesen dagegen ein nahezu identisches Gesamtüberleben auf (siehe D in Abb. 23). Der prognostische Unterschied war hier nicht signifikant (Logrank-Test $p = 0,208$). Für die Analyse beim BL wurden ARFGEF2-negative Fälle aufgrund der geringen Anzahl mit mäßig positiven Fällen zusammengefasst und mit stark positiven Fällen verglichen. Im Gegensatz zum DLBCL hatten stark positive BL-Fälle im Vergleich ein besseres Gesamtüberleben (Logrank-Test $p = 0,140$; Abb. hier nicht dargestellt). Bei MM (siehe E in Abb. 23) und MZL (Abb. hier nicht dargestellt) bestand kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben von ARFGEF2-positiven (mäßig oder stark) und negativen Fällen (Logrank-Test $p = 0,368$ und $p = 0,606$)

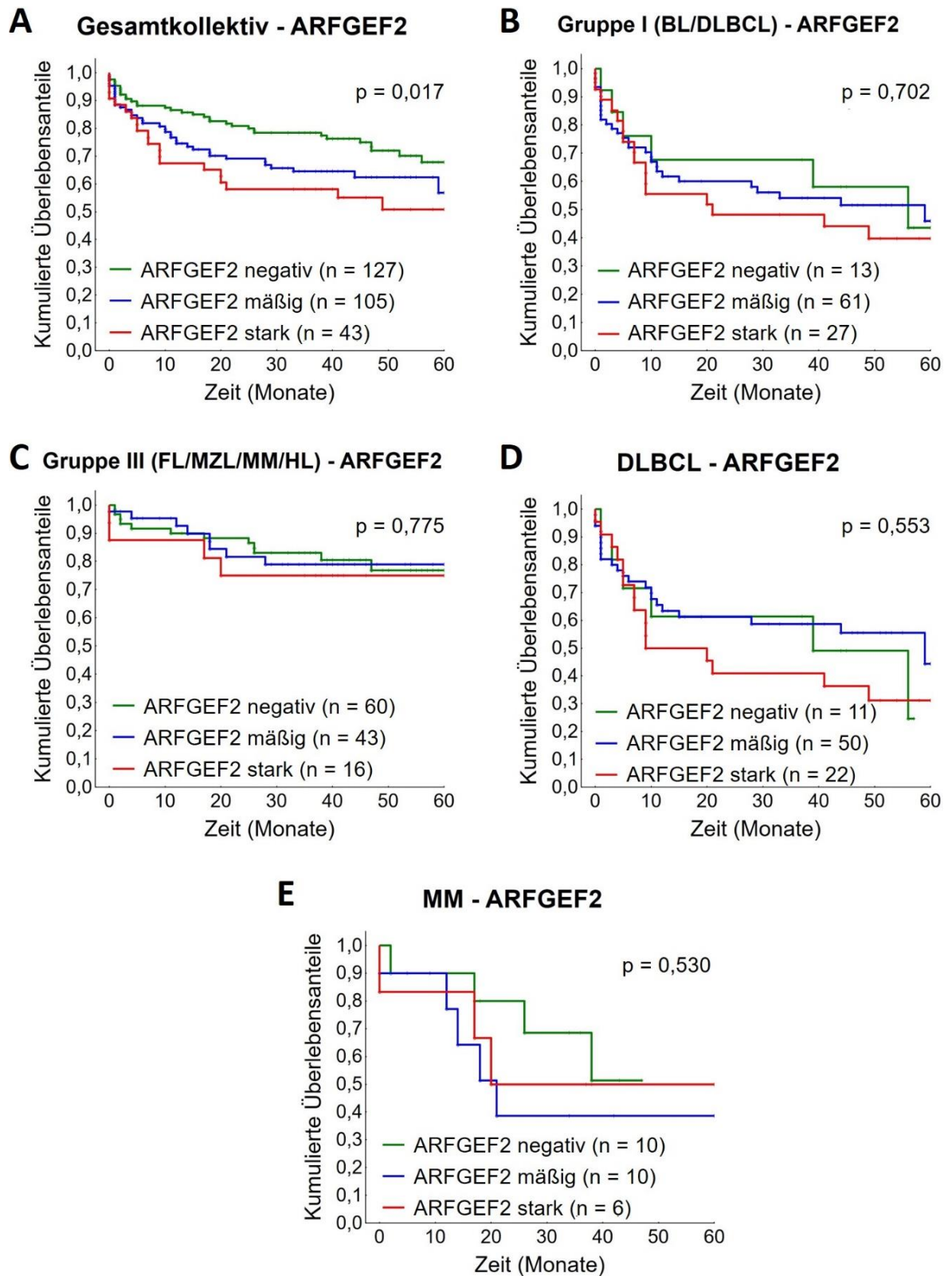


Abb. 23: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von ARFGEF2-Expression

Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. mäßig positiver vs. stark positiver Proteinexpression für (A) Gesamtkollektiv (BL/DLBCL/B-CLL/FL/MCL/MZL/MM/HL), (B) Gruppe I (BL/DLBCL), (C) Gruppe III (FL/MZL/MM/HL), (D) DLBCL und (E) MM. Angabe des p-Werts aus Chi-Quadrat-Test. Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten.

3.4.3 BCL11A

3.4.3.1 Proteinexpression von BCL11A in humanen Lymphomen

Es wurden insgesamt 280 Fälle mit anti-BCL11A gefärbt und ausgewertet (18 BL, 83 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 29 MCL, 27 MZL, 26 MM, 30 HL). Abb. 24 zeigt beispielhaft das Spektrum der Farbintensitäten.

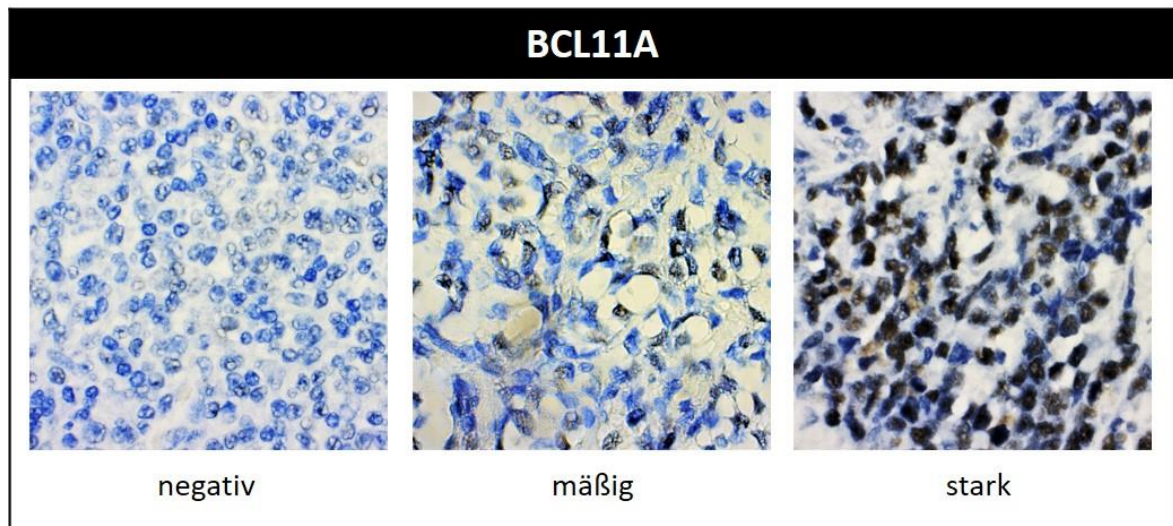


Abb. 24: Expression von BCL11A nach immunohistochemischer Färbung mit anti-BCL11A

Links: Lymphomzellen negativ für anti-BCL11A. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Von 280 Fällen färbten sich 64 Fälle mäßig und 34 Fälle stark positiv für anti-BCL11A. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abb. 25 und Tab. 15 dargestellt. Die verschiedenen Lymphom-Entitäten lassen sich anhand der BCL11A-Expression in zwei Gruppen einteilen: Bei BL, DLBCL, B-CLL, FL, MCL und MZL variierte der Anteil positiver Fälle zwischen 26 – 55% (I). Im Gegensatz dazu fehlte die Proteinexpression bei allen MM und fast allen HL (II). Zwischen diesen beiden Gruppen besteht somit ein hoch signifikanter Unterschied in der BCL11A-Expression (Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu kann mit dem Antikörper nicht zwischen den Entitäten innerhalb einer Gruppe unterschieden werden. Verglichen mit den übrigen Lymphomen der Gruppe I fand sich bei MZL erkennbar seltener eine positive sowie keine stark positive Proteinexpression. Allerdings waren nur MCL und FL signifikant häufiger positiv gefärbt als MZL (Fisher-Yates-Test $p = 0,03$ und $p = 0,04$). Der Anteil stark positiver Fälle variierte von 7% bei DLBCL bis zu 33% bei BL. BL, FL, MCL und B-CLL unterschieden sich diesbezüglich nicht signifikant voneinander (jeweils Fisher-Yates-Test $p > 0,05$). DLBCL waren im Vergleich zu BL und FL signifikant seltener stark positiv gefärbt (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,05$).

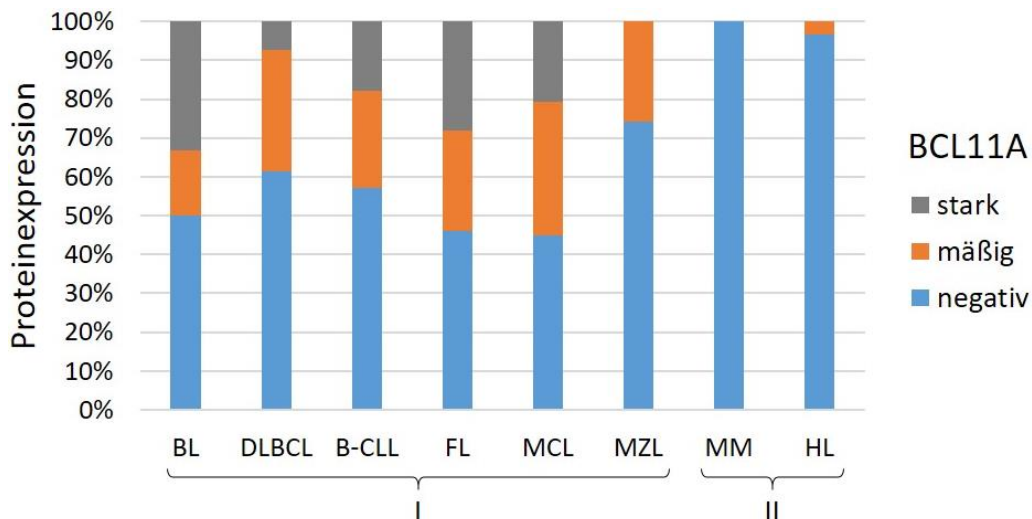


Abb. 25: Expression von BCL11A in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von BCL11A (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität. Gruppierung der Entitäten nach Anteil an positiven Fällen in zwei Gruppen: I) 26 – 55% positive Fälle, II) keine bzw. fast keine positiven Fälle.

| BCL11A | | | | |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------|
| | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
| I | | | | |
| BL | 9 (50) | 3 (17) | 6 (33) | 18 |
| DLBCL | 51 (62) | 26 (31) | 6 (7) | 83 |
| B-CLL | 16 (57) | 7 (25) | 5 (18) | 28 |
| FL | 18 (46) | 10 (26) | 11 (28) | 39 |
| MCL | 13 (45) | 10 (34) | 6 (21) | 29 |
| MZL | 20 (74) | 7 (26) | 0 (0) | 27 |
| II | | | | |
| MM | 26 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 26 |
| HL | 29 (97) | 1 (3) | 0 (0) | 30 |
| Gesamt | 182 | 64 | 34 | 280 |

Tab. 15: Absolute Auswertung TMA anti-BCL11A

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von BCL11A. Einteilung der Lymphom-Entitäten nach Anteil an positiven Fällen in zwei Gruppen: I) 26 – 55% positive Fälle, II) keine bzw. fast keine positiven Fälle.

3.4.3.2 Proteinexpressionen von BCL11A und BCL6

In B-Lymphozyten des folliculären Keimzentrums findet sich eine Co-Lokalisation und Interaktion der Proteine BCL11A und BCL6 (Liu et al. 2006; Miles et al. 2005; Nakamura et al. 2000). Eine signifikante Korrelation zwischen BCL11A- und BCL6-Expression wurde bereits beim DLBCL beschrieben (Pulford et al. 2006). Im Folgenden soll am genannten Kollektiv untersucht werden, ob bei den Keimzentrumslymphomen DLBCL, BL und FL eine Assoziation zwischen BCL11A- und BCL6-Expression besteht. Die Ergebnisse sind in

Tab. 16 dargestellt. Beim DLBCL zeigten > 90% (30/32) der Fälle mit positiver BCL11A-Expression eine positive BCL6-Färbung und ca. 90% (15/17) der BCL6-negativen Fälle wiesen eine ebenfalls negative BCL11A-Expression auf (Fisher-Yates-Test $p = 0,012$). Da FL und BL bei der Färbung mit anti-BCL6 jeweils nur in einem Fall negativ bzw. positiv gefärbt waren, wurden bei diesen Entitäten BCL11A-positive bzw. negative Fälle mit Fällen mit stark positiver bzw. negativer/mäßig positiver BCL6-Expression verglichen. Dabei zeigte sich beim FL eine ähnliche Assoziation zwischen BCL11A- und BCL6-Expression wie beim DLBCL, jedoch war das Ergebnis knapp nicht signifikant (Fisher-Yates-Test $p = 0,056$). Ebenso ließ sich diese Tendenz beim BL erkennen (Fisher-Yates-Test $p = 0,153$). Insgesamt deuten alle Ergebnisse auf eine Assoziation zwischen BCL11A- und BCL6-Expression bei Keimzentrumslymphomen hin.

| Assoziation von BCL11A und BCL6 | | | | |
|---------------------------------|----------|--------------|--------------|-------|
| | | BCL11A + (%) | BCL11A - (%) | Total |
| DLBCL p = 0,01 | BCL6 + | 30 (36) | 36 (43) | 66 |
| | BCL6 - | 2 (3) | 15 (18) | 17 |
| | Gesamt | 32 (39) | 51 (61) | 83 |
| <hr/> | | | | |
| | | BCL11A + (%) | BCL11A - (%) | Total |
| BL p = 0,15 | BCL6 ++ | 7 (39) | 3 (17) | 10 |
| | BCL6 -/+ | 2 (11) | 6 (33) | 8 |
| | Gesamt | 9 (50) | 9 (50) | 18 |
| <hr/> | | | | |
| | | BCL11A + (%) | BCL11A - (%) | Total |
| FL p = 0,06 | BCL6 ++ | 14 (36) | 6 (15) | 20 |
| | BCL6 -/+ | 7 (18) | 12 (31) | 19 |
| | Gesamt | 21 (54) | 18 (46) | 39 |

Tab. 16: Assoziation der Proteinexpression von BCL11A und BCL6 für DLBCL, BL und FL

Absolute und prozentuale Verteilung der BCL11A-Expression in Bezug auf die BCL6-Expression. Einteilung der BCL11A-Expression in positiv (BCL11A +) und negativ (BCL11A -). Einteilung der BCL6-Expression bei DLBCL in positiv (BCL6 +) und negativ (BCL6 -), bei BL und FL in stark positiv (BCL6 ++) und negativ/mäßig (BCL6 -/+). Angabe des p-Werts aus Fisher-Yates-Test.

3.4.3.3 Überlebenszeitanalyse BCL11A

Im Folgenden soll am beschriebenen Kollektiv der prognostische Einfluss der BCL11A-Expression untersucht werden. Die Überlebenszeitanalysen umfassten insgesamt 279 Fälle (18 BL, 83 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 28 MCL, 27 MZL, 26 MM, 30 HL).

Am Gesamtkollektiv wurden Patienten mit negativer (182 Fälle), mäßig positiver (63 Fälle) und stark positiver BCL11A-Expression (34 Fälle) untereinander verglichen, wobei sich kein signifikanter prognostischer Unterschied zwischen den Gruppen zeigte (Chi-Quadrat-Test $p = 0,742$; Abb. hier nicht dargestellt). Eine weitere Überlebenszeitanalyse beschränkte sich auf Lymphom-Entitäten der Gruppe I aus obiger Auswertung (BL, DLBCL, B-CLL, FL, MCL, MZL), die allesamt einen relevanten Anteil an BCL11A-positiven Fällen aufwiesen (siehe Tab. 15). Auch in dieser Untersuchung hatten negative, mäßig positive und stark positive Fälle eine ähnliche Gesamtprognose (Chi-Quadrat-Test $p = 0,671$; siehe A in

Abb. 26). In weiteren Analysen wurden Lymphom-Entitäten der Gruppe I einzeln untersucht. Hier ließ sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen BCL11A-Expression und Gesamtüberleben der Patienten nachweisen. Ein prognostischer Unterschied war jeweils zwischen stark positiven und negativ/mäßig positiven Fällen erkennbar. So war eine starke Proteinexpression bei DLBCL und MCL mit einer tendenziell besseren Prognose verbunden (Logrank-Test $p = 0,330$ und $p = 0,226$, siehe B und D in Abb. 26), wohingegen sich bei FL und B-CLL ein schlechteres Gesamtüberleben zeigte (Logrank-Test $p = 0,085$ und $p = 0,292$, Abb. hier nicht dargestellt). Im Gegensatz zu DLBCL hatten BL mit BCL11A-Expression eine ungünstigere Prognose (Logrank-Test $p = 0,235$, siehe C in Abb. 26).

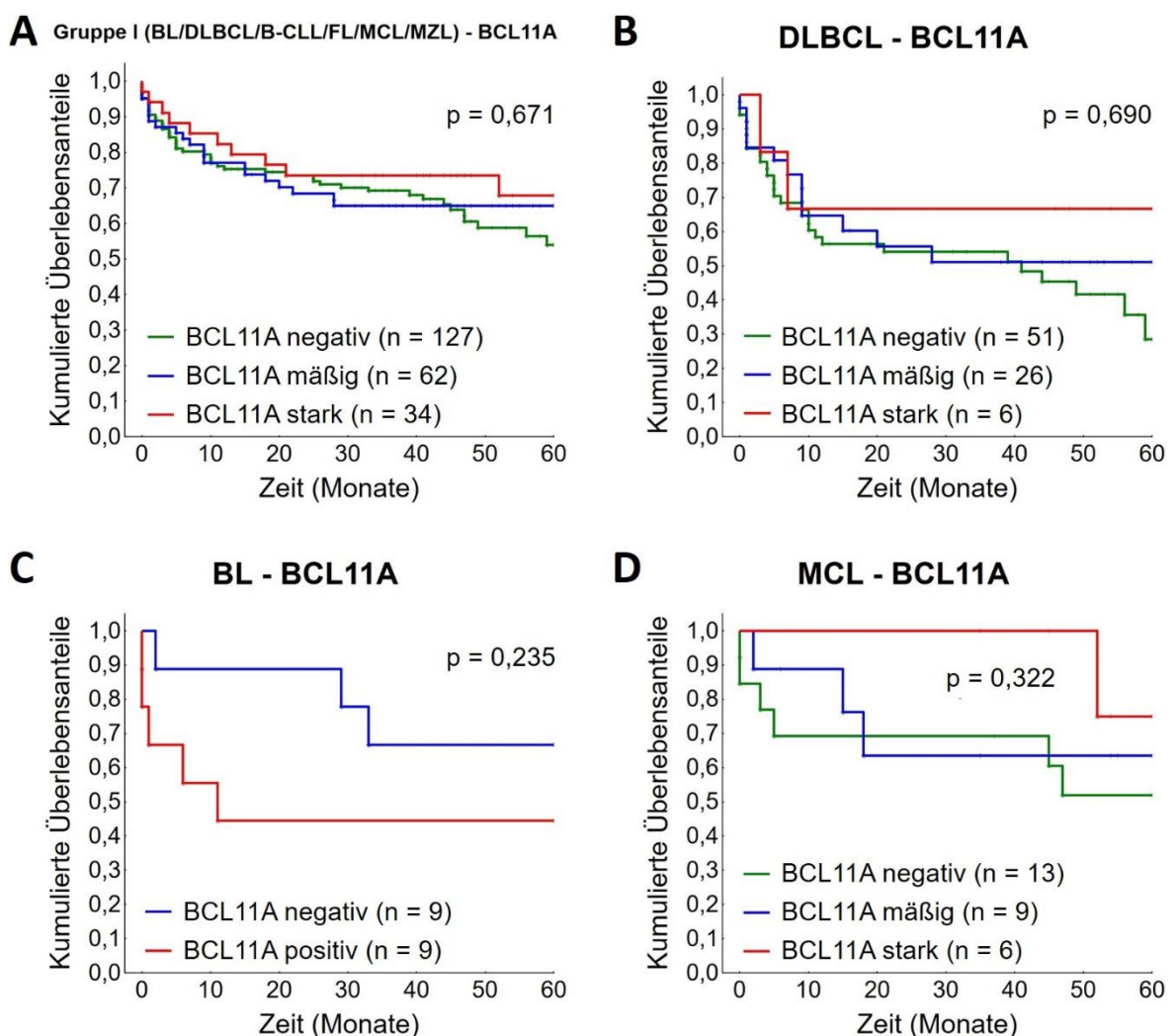


Abb. 26: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von BCL11A-Expression

Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. mäßig positiver vs. stark positiver Proteinexpression von BCL11A für (A) Gruppe I (BL/DLBCL/B-CLL/FL/MCL/MZL), (B) DLBCL und (D) MCL. Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. positiver Proteinexpression von BCL11A für (C) BL. Angabe des p-Werts aus Chi-Quadrat-Test (A,B,D) und Logrank-Test (C). Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten.

3.4.4 CARD11

3.4.4.1 Proteinexpression von CARD11 in humanen Lymphomen

Bei der immunhistochemischen Färbung mit anti-CARD11 konnten insgesamt 279 Fälle des Lymphom-Kollektivs ausgewertet werden. Darunter befanden sich 18 BL, 82 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 29 MCL, 27 MZL, 26 MM und 30 HL. Die verschiedenen Farbtintensitäten sind exemplarisch in Abb. 27 dargestellt.

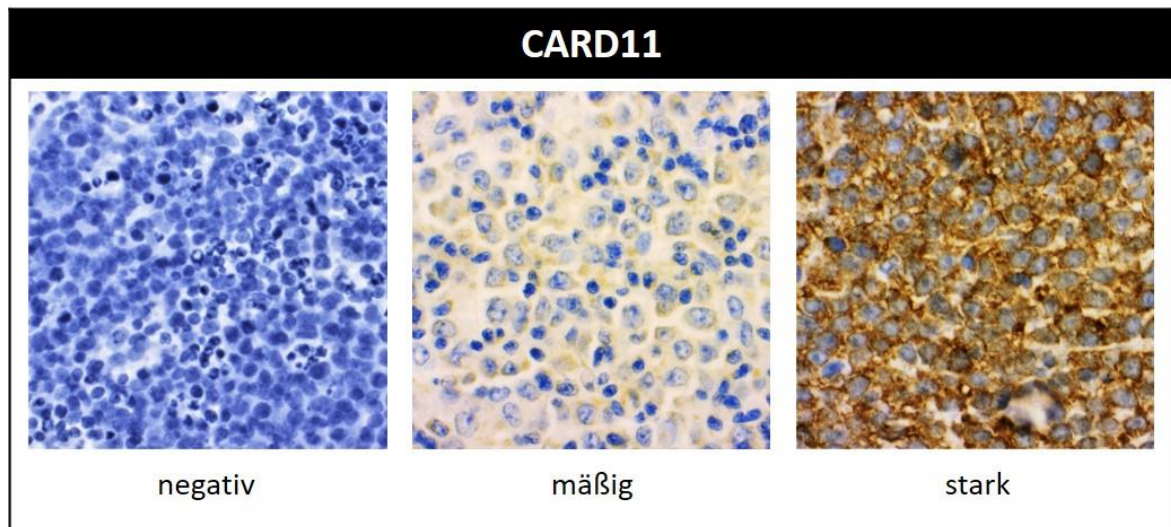


Abb. 27: Expression von CARD11 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-CARD11

Links: Lymphomzellen negativ für anti-CARD11. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Von insgesamt 279 Fällen färbten sich 93 Fälle mäßig positiv und 62 Fälle stark positiv für anti-CARD11. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abb. 28 und Tab. 17 dargestellt. Insgesamt zeigten die verschiedenen Lymphom-Entitäten ein relativ homogenes Färbeverhalten für anti-CARD11 und wiesen ähnlich hohe Anteile an positiven Fällen auf. So waren bei DLBCL, FL und MZL jeweils ca. zwei Drittel der Fälle positiv gefärbt. MCL, B-CLL und BL zeigten in ungefähr der Hälfte aller Fälle eine positive Proteinexpression. Im Gegensatz dazu färbte sich nur etwa ein Drittel der HL- und MM-Fälle positiv für anti-CARD11. Zwischen BL, DLBCL, B-CLL, FL, MCL und MZL zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Anteils an Fällen mit positiver Proteinexpression (jeweils Fisher-Yates-Test $p > 0,05$). MM und HL waren zwar seltener CARD11-positiv gefärbt, aber nur die Vergleiche mit MZL, FL und DLBCL erwiesen hierbei als signifikant (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,05$). Auch der Anteil stark positiver Fälle variierte zwischen den Entitäten nur gering. So zeigten BL, DLBCL, B-CLL, FL, MCL, MZL und MM diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied (jeweils Fisher-Yates-Test $p > 0,05$). Einzig HL waren signifikant seltener positiv gefärbt als BL, DLBCL, FL und MZL (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,05$).

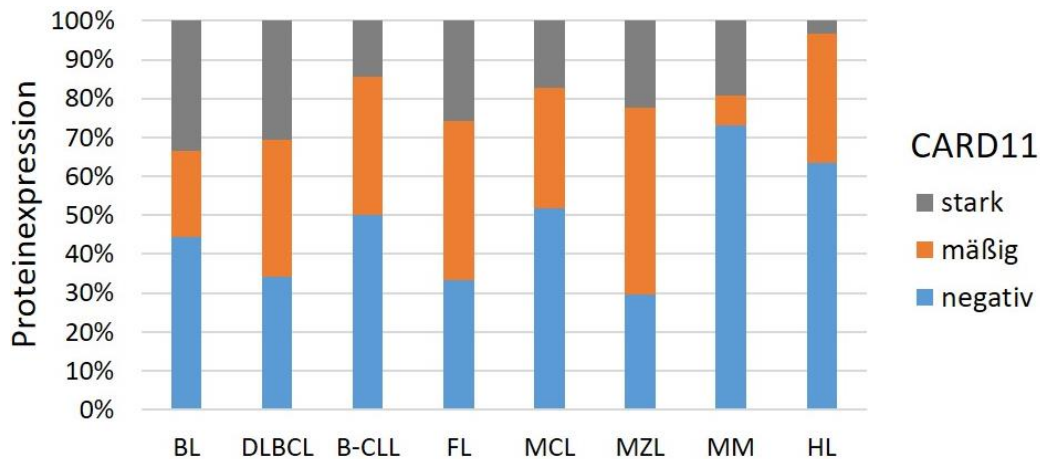


Abb. 28: Expression von CARD11 in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von CARD11 (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität.

| CARD11 | | | | |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------|
| | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
| BL | 8 (45) | 4 (22) | 6 (33) | 18 |
| DLBCL | 28 (34) | 29 (35) | 25 (31) | 82 |
| B-CLL | 14 (50) | 10 (36) | 4 (14) | 28 |
| FL | 13 (33) | 16 (41) | 10 (26) | 39 |
| MCL | 15 (52) | 9 (31) | 5 (17) | 29 |
| MZL | 8 (30) | 13 (48) | 6 (22) | 27 |
| MM | 19 (73) | 2 (8) | 5 (19) | 26 |
| HL | 19 (64) | 10 (33) | 1 (3) | 30 |
| Gesamt | 124 | 93 | 62 | 279 |

Tab. 17: Absolute Auswertung TMA anti-CARD11

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von CARD11.

3.4.4.2 Überlebenszeitanalyse CARD11

In die Überlebenszeitanalysen zur prognostischen Auswirkung der Proteinexpression von CARD11 gingen insgesamt 278 Fälle des beschriebenen Kollektivs ein (18 BL, 82 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 28 MCL, 27 MZL, 26 MM, 30 HL).

In einer ersten Untersuchung am gesamten Kollektiv zeigten Patienten mit negativer (124 Fälle), mäßig positiver (92 Fälle) und stark positiver CARD11-Expression (62 Fälle) ein quasi identisches Gesamtüberleben (Chi-Quadrat-Test $p = 0,965$, siehe A in Abb. 29). In weiteren Analysen wurde die Auswirkung der CARD11-Expression in verschiedenen Entitäten einzeln untersucht, wobei HL aufgrund der geringen Mortalität hierfür nicht berücksichtigt wurden. Für keine der untersuchten Entitäten ließ sich ein signifikanter prognostischer Unterschied für Fälle mit positiver bzw. stark positiver Färbung nachweisen. Bei DLBCL und MCL war eine positive (mäßig oder stark) CARD11-Expression mit einem

erkennbar besseren Gesamtüberleben assoziiert als eine negative Proteinexpression (Logrank-Test $p = 0,139$ und $p = 0,184$, siehe B und D in Abb. 29). Im Gegensatz dazu hatten CARD11-positive Fälle beim BL eine schlechtere Prognose (Logrank-Test $p = 0,212$, siehe C in Abb. 29). Gleiches zeigte sich beim FL, wo der prognostische Unterschied zwischen positiven (mäßig oder stark) und negativen Fällen nur knapp nicht signifikant war (Logrank-Test $p = 0,087$, Abb. hier nicht dargestellt). Die Analysen für B-CLL, MM und MZL zeigten jeweils ein ähnliches Gesamtüberleben für CARD11-positive und negative Fälle (Logrank-Test $p = 0,909$, $p = 0,676$ und $p = 0,442$, Abb. hier nicht dargestellt).

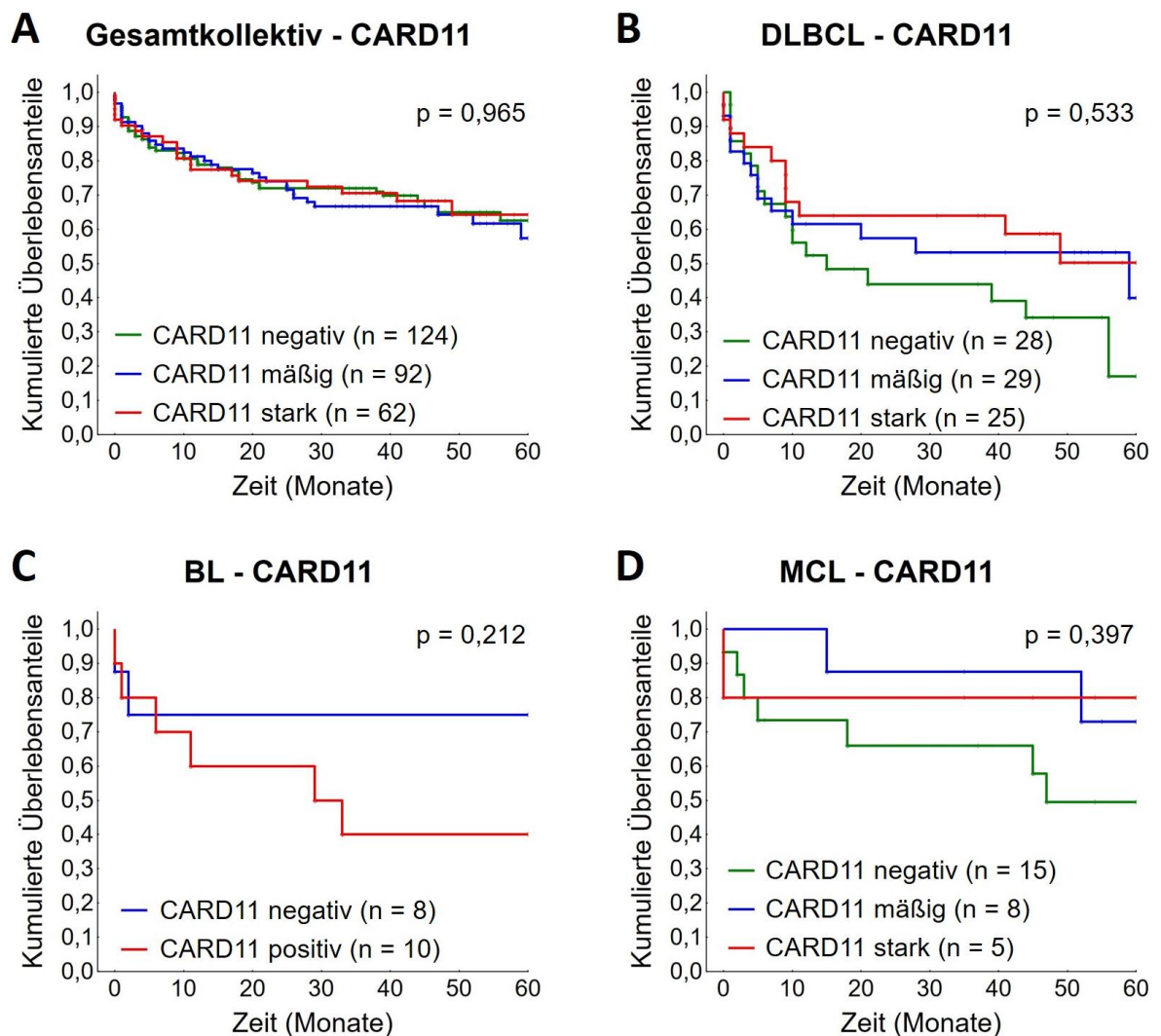


Abb. 29: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von CARD11-Expression

Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. mäßig positiver vs. stark positiver Proteinexpression von CARD11 für (A) Gesamtkollektiv (BL/DLBCL/B-CLL/FL/MCL/MZL/MM/HL), (B) DLBCL und (D) MCL. Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. positiver Proteinexpression von CARD11 für (C) BL. Angabe des p-Werts aus Chi-Quadrat-Test (A,B,D) und Logrank-Test (C). Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten.

3.4.5 CDKN1B

3.4.5.1 Proteinexpression von CDKN1B in humanen Lymphomen

Zur Untersuchung der CDKN1B-Expression konnten insgesamt 278 Fälle des beschriebenen Kollektivs ausgewertet werden (18 BL, 82 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 29 MCL, 27 MZL, 26 MM und 29 HL). Die verschiedenen Farbintensitäten der IHC-Färbung sind beispielhaft in Abb. 30 dargestellt

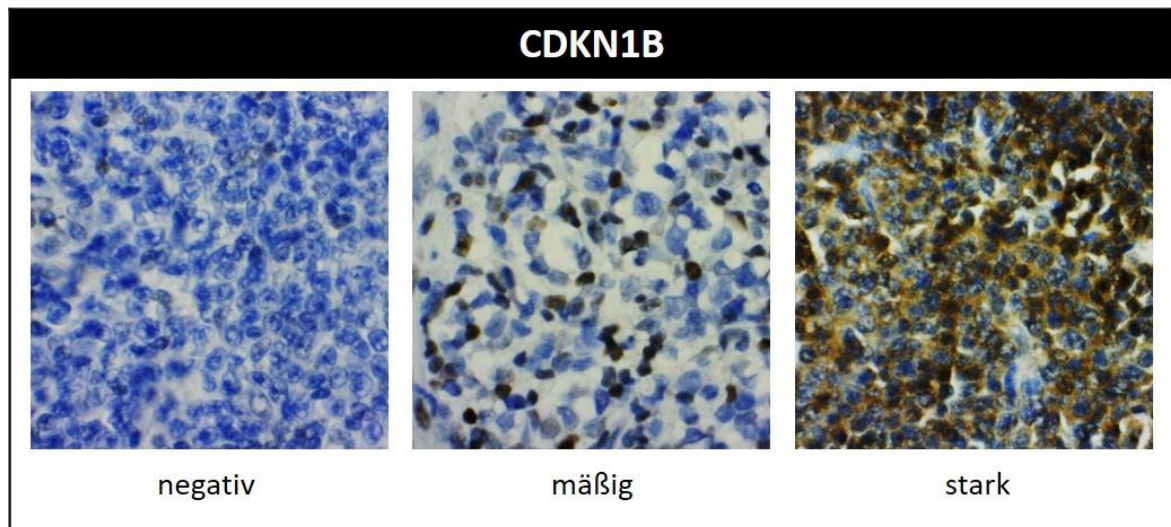


Abb. 30: Expression von CDKN1B nach immunhistochemischer Färbung mit anti-CDKN1B

Links: Lymphomzellen negativ für anti-CDKN1B. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Von insgesamt 278 Fällen zeigten 79 Fälle eine positive CDKN1B-Expression, wovon wiederum 26 Fälle stark positiv gefärbt waren. Abb. 31 und Tab. 18 fassen die Ergebnisse der Auswertung zusammen. Ähnlich hohe Anteile an positiven Fällen fanden sich bei B-CLL (61%), MZL (59%) und FL (54%). Die übrigen Entitäten waren mit 12% (BL) bis 23% (MM) der Fälle deutlich seltener positiv gefärbt. Bei MCL zeigte sich nur in einem von 29 Fällen eine mäßig positive Proteinexpression, bei HL war das Ergebnis ausschließlich negativ. Anhand des Färbeverhaltens lassen sich die verschiedenen Lymphom-Entitäten somit in drei Gruppen einteilen: B-CLL, MZL und FL mit positiver Proteinexpression in > 50% der Fälle (I), HL und MCL mit negativer Proteinexpression in (fast) allen Fällen (II) sowie BL, DLBCL und MM mit positiver Proteinexpression in 12 – 23% der Fälle (III). Diese Gruppen unterscheiden sich signifikant in der Häufigkeit CDKN1B-positiver Fälle (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,001$). Im Gegensatz dazu lässt sich mittels CDKN1B-Färbung nicht zwischen den Entitäten innerhalb einer Gruppe bzgl. des Anteils an positiv gefärbten Fällen unterscheiden (jeweils Chi-Quadrat-Test $p > 0,05$). Die Proteinexpression von CDKN1B ist folglich bei indolenten Lymphomen (B-CLL, MZL, FL) signifikant häufiger anzutreffen als bei hochmalignen Lymphomen (BL, DLBCL). Bei B-CLL färbten sich 12 von 28 Fällen (43%) und bei MZL 9 von 27 Fällen (33%) stark positiv für anti-CDKN1B und damit signifikant mehr als bei allen anderen Entitäten (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$).

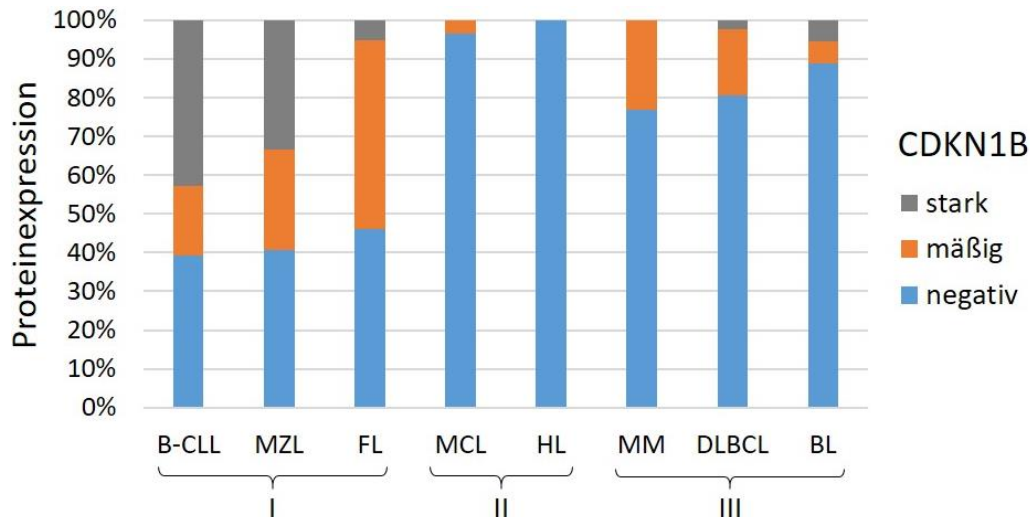


Abb. 31: Expression von CDKN1B in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von CDKN1B (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität. Gruppierung der Entitäten nach Anteil an positiven Fällen in drei Gruppen: I) > 50% positive Fälle, II) (fast) keine positiven Fälle, III) 12 – 23% positive Fälle.

| CDKN1B | | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
|--------|-------|-------------|-----------|-----------|-------|
| I | B-CLL | 11 (39) | 5 (18) | 12 (43) | 28 |
| | MZL | 11 (41) | 7 (26) | 9 (33) | 27 |
| | FL | 18 (46) | 19 (49) | 2 (5) | 39 |
| II | MCL | 28 (97) | 1 (3) | 0 (0) | 29 |
| | HL | 29 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 29 |
| III | MM | 20 (77) | 6 (23) | 0 (0) | 26 |
| | DLBCL | 66 (80) | 14 (17) | 2 (3) | 82 |
| | BL | 16 (88) | 1 (6) | 1 (6) | 18 |
| Gesamt | | 199 | 53 | 26 | 278 |

Tab. 18: Absolute Auswertung TMA anti-CDKN1B

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von CDKN1B. Einteilung der Lymphom-Entitäten nach Anteil an positiven Fällen in drei Gruppen: I) > 50% positive Fälle, II) (fast) keine positiven Fälle, III) 12 – 23% positive Fälle.

3.4.5.2 CDKN1B-Expression und Ki-67-Proliferationsindex

Die signifikant niedrigere CDKN1B-Expression bei DLBCL und BL im Vergleich zu indolenten Lymphomen (vgl. Tab. 18) lässt vermuten, dass möglicherweise eine inverse Korrelation zwischen Proteinexpression und Proliferationsrate besteht. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen wurde die Expression von CDKN1B mit der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 verglichen. Dafür wurden bereits vorhandene Ki-67-Werte

verwendet, die im Rahmen der Diagnostik von Pathologen des Institutes für Pathologie, UMG bestimmt wurden. BL, MCL und HL waren aufgrund der insgesamt zu geringen Anzahl CDKN1B-positiver Fälle ($n \leq 2$) für die Analyse nicht verwertbar. Beim MM fehlten bis auf einen Fall Angaben zum Ki-67-Proliferationsindex. 74 DLBCL-, 23 B-CLL, 36 FL- und 22 MZL-Fälle wurden anhand ihres Ki-67-Index in jeweils zwei Gruppen eingeteilt. Dabei galt für DLBCL ein Ki-67-Grenzwert von 75%, für B-CLL, FL und MZL ein Grenzwert von 25%. Basierend auf der jeweiligen Verteilung der Ki67-Werte entsprechen die Grenzwerte in etwa dem medianen Ki-67-Wert. Zudem erfolgte eine Einteilung in CDKN1B-positive (CDKN1B+) und CDKN1B-negative (CDKN1B-) Fälle. Die Verteilung der Fälle ist in Tab. 19 dargestellt. Bei keiner der untersuchten Entitäten konnte eine signifikante Assoziation von CDKN1B-Expression und Ki-67-Index festgestellt werden (jeweils Fisher-Yatest-Test: DLBCL $p = 0,23$; B-CLL $p = 0,21$; FL $p = 0,74$; MZL $p = 1,00$). Somit sind CDKN1B-Expression und Proliferationsindex bei diesen Entitäten als voneinander unabhängig zu werten.

| Assoziation von CDKN1B und Ki-67 | | | | |
|---|----------|-----------------------|--------------------|-------|
| | | Ki-67 $\leq 75\%$ (%) | Ki-67 $> 75\%$ (%) | Total |
| DLBCL $p = 0,23$ | CDKN1B + | 8 (11) | 6 (8) | 14 |
| | CDKN1B - | 22 (30) | 38 (51) | 60 |
| | Gesamt | 30 (41) | 44 (59) | 74 |
| | | Ki-67 $\leq 25\%$ (%) | Ki-67 $> 25\%$ (%) | Total |
| B-CLL $p = 0,21$ | CDKN1B + | 9 (39) | 3 (13) | 12 |
| | CDKN1B - | 5 (22) | 6 (26) | 11 |
| | Gesamt | 14 (61) | 9 (39) | 23 |
| | | Ki-67 $\leq 25\%$ (%) | Ki-67 $> 25\%$ (%) | Total |
| FL $p = 0,74$ | CDKN1B + | 12 (34) | 8 (22) | 20 |
| | CDKN1B - | 8 (22) | 8 (22) | 16 |
| | Gesamt | 20 (56) | 16 (44) | 36 |
| | | Ki-67 $\leq 25\%$ (%) | Ki-67 $> 25\%$ (%) | Total |
| MZL $p = 1,00$ | CDKN1B + | 7 (31) | 5 (23) | 12 |
| | CDKN1B - | 5 (23) | 5 (23) | 10 |
| | Gesamt | 12 (54) | 10 (46) | 22 |

Tab. 19: Assoziation von CDKN1B-Expression und Ki-67-Proliferationsindex

Absolute und prozentuale Verteilung der Proliferationsrate in Bezug auf den CDKN1B-Status. Einteilung des Ki-67-Index in $\leq 75\%$ und $> 75\%$ für DLBCL sowie $\leq 25\%$ und $> 25\%$ für B-CLL, FL und MZL. Einteilung des CDKN1B-Status in positiv (CDKN1B+) und negativ (CDKN1B-). Angabe des p-Werts aus Fisher-Yates-Test.

3.4.5.3 Überlebenszeitanalyse CDKN1B

Zur Untersuchung einer möglichen prognostischen Auswirkung der CDKN1B-Expression erfolgten Überlebenszeitanalysen an 277 Fällen des beschriebenen Kollektivs (18 BL, 82 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 28 MCL, 27 MZL, 26 MM, 29 HL).

Zunächst wurden generell Patienten mit negativer (198 Fälle), mäßig positiver (53 Fälle) und stark positiver CDKN1B-Expression (26 Fälle) untereinander verglichen. Dabei zeigten positiv gefärbte Fälle gegenüber negativen Fällen ab dem zehnten Monat nach Erst-diagnose ein erkennbar besseres Gesamtüberleben (Logrank-Test $p = 0,109$), wobei die Prognose von mäßig und stark positiven Fällen nahezu identisch war (siehe A in Abb. 32). Der prognostisch günstige Effekt einer positiven Färbung lässt sich jedoch evtl. darauf zurückführen, dass bei der Färbung mit anti-CDKN1B Lymphom-Entitäten wie DLBCL, BL, MM und MCL, die generell eine erhöhte Mortalität aufweisen, größtenteils negativ gefärbt waren. Daher wurden Fälle der Gruppe I (B-CLL, MZL, FL) und Fälle der Gruppe III (MM, DLBCL, BL) in getrennten Analysen untersucht. Fälle der Gruppe II (MCL, HL) waren nahezu vollständig CDKN1B-negativ und somit für Überlebenszeitanalysen nicht geeignet. In der Gruppe I ließ sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben zwischen negativen, mäßig positiven und stark positiven Fällen feststellen (Chi-Quadrat-Test $p = 0,622$; siehe B in Abb. 32). Auch in Gruppe III hatte die Proteinexpression von CDKN1B keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose der Patienten (Logrank-Test $p = 0,642$; siehe C in Abb. 32). In weiteren Analysen wurde die prognostische Auswirkung für ausgewählte Entitäten einzeln untersucht. BL wurden hierbei nicht berücksichtigt, da insgesamt nur zwei BL-Fälle positiv gefärbt waren. Beim DLBCL war eine positive (mäßig oder stark) Proteinexpression gegenüber einer negativen Expression mit einer erkennbar besseren Gesamtprognose assoziiert, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war (Logrank-Test $p = 0,335$; siehe D in Abb. 32). Bei B-CLL, MZL und FL fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Gesamtüberleben von negativen, mäßig positiven und stark positiven Fällen (jeweils Logrank-Test $p > 0,49$; Abb. hier nicht dargestellt).

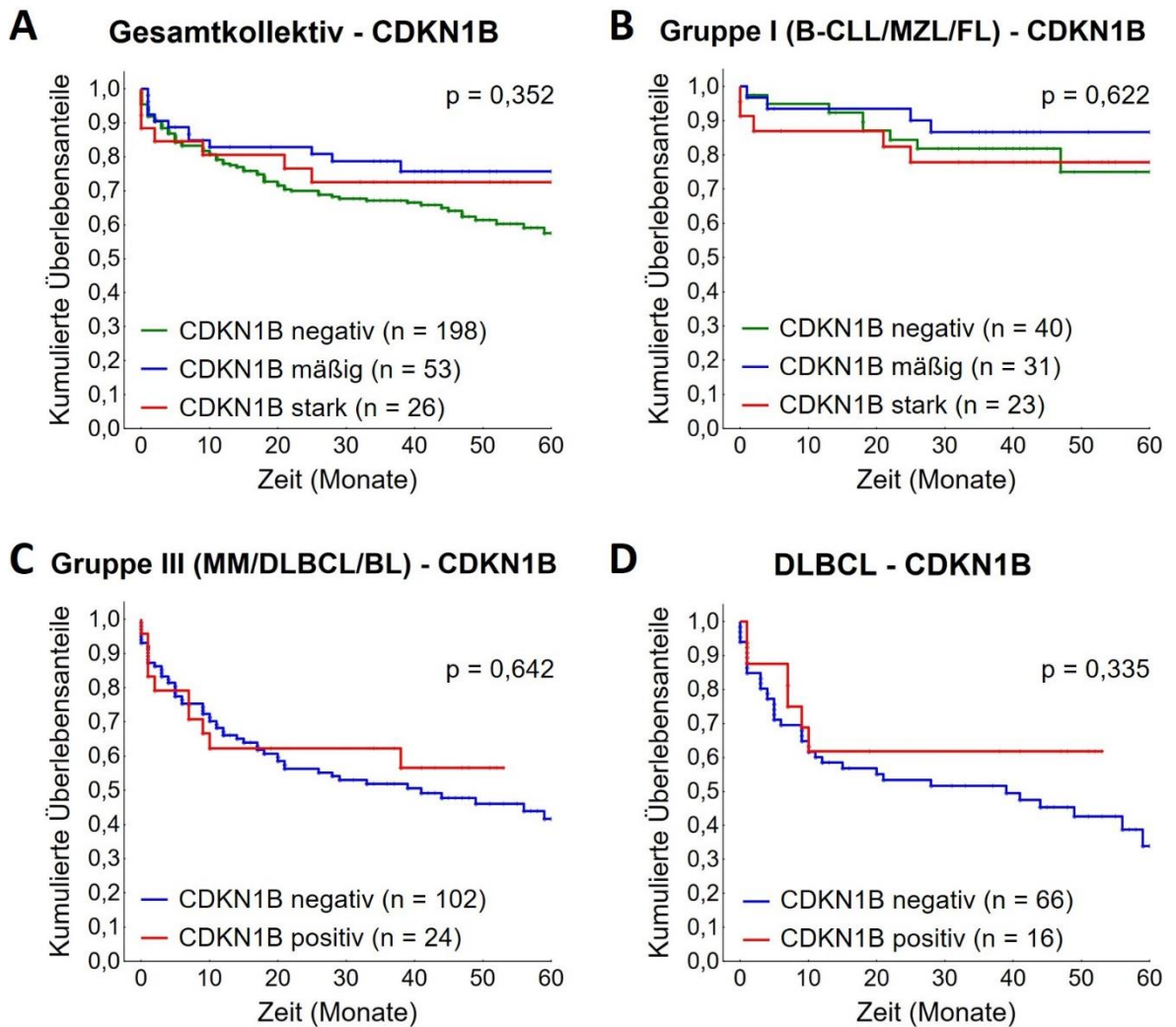


Abb. 32: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von CDKN1B-Expression

Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. mäßig positiver vs. stark positiver Proteinexpression von CDKN1B für (A) Gesamtkollektiv und (B) Gruppe I (B-CLL/MZL/FL). Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. positiver Proteinexpression von CDKN1B für (C) Gruppe III (MM/DLBCL/BL und (D) DLBCL. Angabe des p-Werts aus Chi-Quadrat-Test (A,B) und Logrank-Test (C,D). Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten.

3.5 Expression von Proteinen des One-Carbon-Metabolismus in humanen B-Zell-Lymphomen

Durch die Neuauswertung publizierter Daten aus phosphoproteomischen Analysen und einem RNAi-Screen an BL-Zelllinien (siehe 3.1) wurde mit MTHFD1 ein Protein identifiziert, das als Enzym entscheidende Reaktionen des zellulären One-Carbon-Metabolismus (1C-Metabolismus) katalysiert. In diesem für die Nukleotidbiosynthese essentiellen Stoffwechsel spielen auch die mitochondrialen Proteine MTHFD2 und SHMT2 eine entscheidende Rolle (siehe Abb. 33). Daher sollen im Folgenden neben der Expression von MTHFD1 auch die Proteinexpressionen von MTHFD2 und SHMT2 in verschiedenen B-Zell-Lymphomen und die damit verbundenen Auswirkungen auf das Gesamtüberleben der Patienten untersucht werden. Die Darstellung der jeweiligen Proteinexpression erfolgte wie beschrieben mittels immunhistochemischer Färbung am beschriebenen Lymphom-Kollektiv (siehe 3.2.1).

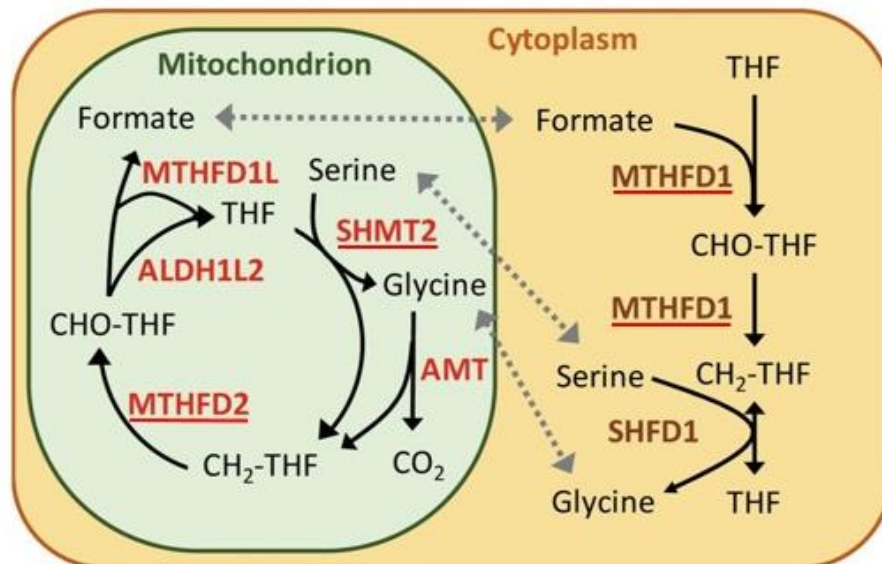


Abb. 33: Schematische Darstellung des zellulären One-Carbon-Metabolismus

Vereinfachte Darstellung der wichtigsten katalysierten Reaktionen mit beteiligten Enzymen. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2 sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Abkürzungen: THF = Tetrahydrofolsäure, ALDH = Aldehyddehydrogenase, AMT = Aminomethyltransferase, MTHFD = Methylentetrahydrofolatdehydrogenase, SHMT2 = Serinhydroxymethyltransferase. Modifiziert nach Koseki et al. (2018). Lizenz: CC BY 4.0.

3.5.1 MTHFD1

3.5.1.1 Proteinexpression von MTHFD1 in humanen Lymphomen

Bei der Färbung mit anti-MTHFD1 konnten insgesamt 279 Fälle des beschriebenen Kollektivs ausgewertet werden. Darunter waren 18 BL-, 82 DLBCL-, 28 B-CLL-, 39 FL-, 29 MCL-, 27 MZL-, 26 MM- und 30 HL-Fälle. Abb. 34 zeigt das Spektrum der Farbintensitäten, welches für die Auswertung verwendet wurde.

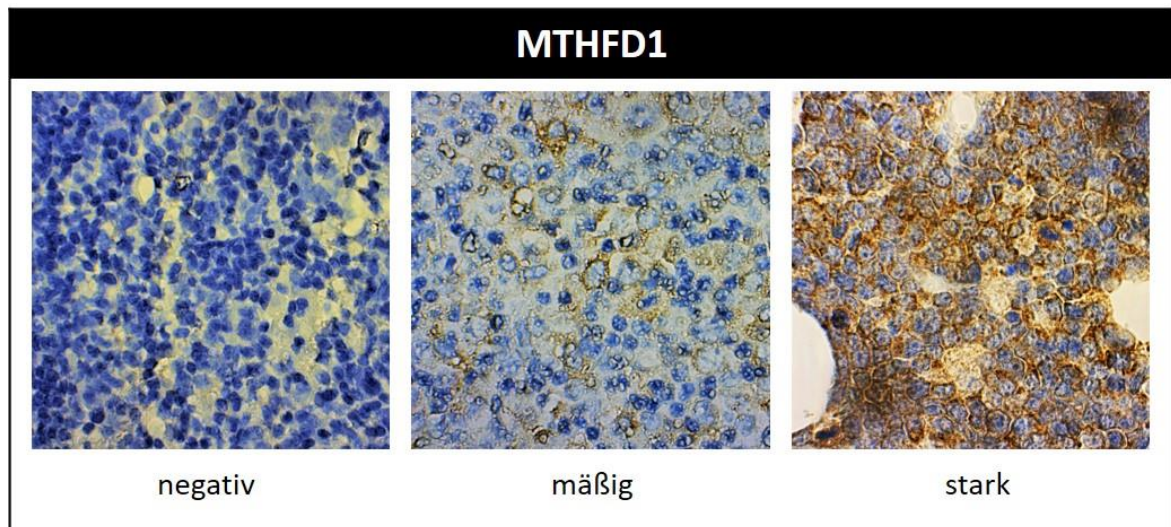


Abb. 34: Expression von MTHFD1 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-MTHFD1
Links: Lymphomzellen negativ für anti-MTHFD1. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Von insgesamt 279 Fällen färbten sich 65 mäßig und 58 stark positiv für anti-MTHFD1. Abb. 35 und Tab. 20 zeigen die Ergebnisse der Auswertung. HL waren mit 80% der Fälle am häufigsten positiv gefärbt, ein ähnlich hoher Anteil fand sich bei BL (72%). MZL, MM und DLBCL wiesen in 44 – 56% der Fälle eine MTHFD1-Expression auf. Im Gegensatz dazu waren MCL, B-CLL und FL nur in nur 6 – 26% der Fälle positiv gefärbt. Während HL und BL sich in der Häufigkeit der MTHFD1-Expression nicht signifikant voneinander unterschieden (Fisher-Yates-Test $p = 0,72$), waren HL signifikant häufiger positiv gefärbt als alle übrigen Entitäten (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,05$). Beim BL war der Anteil MTHFD1-positiver Fälle im Vergleich zu DLBCL, MM und MZL nicht signifikant erhöht (Fisher-Yates-Test $p = 0,29$, $p = 0,21$ und $p = 0,08$). Eine starke MTHFD1-Expression fand sich am häufigsten beim BL (67% der Fälle), wobei auch ein großer Teil der MM- und HL-Fälle (46% und 43%) stark positiv gefärbt waren. Beim DLBCL lag dieser Anteil bei lediglich 19%, bei den übrigen Entitäten jeweils unter 10%. Anhand einer stark positiven Färbung mit anti-MTHFD1 kann somit nicht signifikant zwischen BL, MM und HL unterschieden werden (Chi-Quadrat-Test $p = 0,26$), jedoch waren diese Entitäten signifikant häufiger stark positiv gefärbt als der Rest (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,05$).

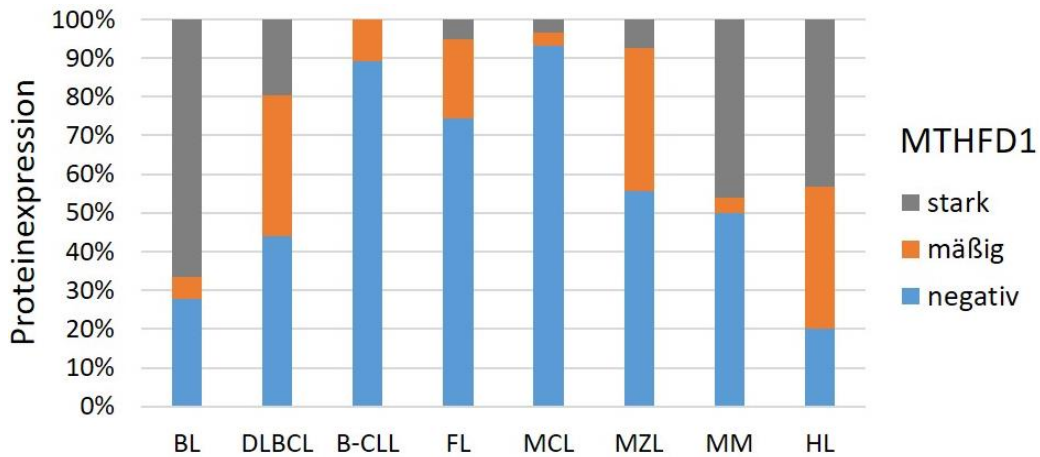


Abb. 35: Expression von MTHFD1 in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von MTHFD1 (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität.

| MTHFD1 | | | | |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------|
| | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
| BL | 5 (28) | 1 (5) | 12 (67) | 18 |
| DLBCL | 36 (44) | 30 (37) | 16 (19) | 82 |
| B-CLL | 25 (89) | 3 (11) | 0 (0) | 28 |
| FL | 29 (74) | 8 (21) | 2 (5) | 39 |
| MCL | 27 (94) | 1 (3) | 1 (3) | 29 |
| MZL | 15 (56) | 10 (37) | 2 (7) | 27 |
| MM | 13 (50) | 1 (4) | 12 (46) | 26 |
| HL | 6 (20) | 11 (37) | 13 (43) | 30 |
| Gesamt | 156 | 65 | 58 | 279 |

Tab. 20: Absolute Auswertung TMA anti-MTHFD1

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von MTHFD1.

3.5.1.2 Überlebenszeitanalyse MTHFD1

In die Überlebenszeitanalysen zur prognostischen Auswirkung der MTHFD1-Expression gingen insgesamt 278 Fälle ein, wovon 18 BL-, 82 DLBCL-, 28 B-CLL-, 39 FL-, 28 MCL-, 27 MZL-, 26 MM- und 30 HL-Fälle waren.

Am Gesamtkollektiv wurden MTHFD1-negative Fälle (n = 156) mit mäßig positiven Fällen (n = 65) mit stark positiven Fällen (n = 57) verglichen. Die Gesamtprognose der Patienten war dabei umso schlechter, je stärker die MTHFD1-Expression im Lymphomgewebe war. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Kaplan-Meier-Kurven trotz dieses erkennbaren Trends nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test p = 0,144; siehe A in Abb. 36). Es erfolgten weitere entitätsspezifische Analysen, wobei B-CLL und MCL aufgrund der wenigen positiven Fälle (siehe Tab. 20) und HL bei nur sehr geringer Mortalität im Beobachtungszeitraum (siehe Tab. 8) nicht berücksichtigt wurden. Bei DLBCL (siehe B in

Abb. 36), BL und FL (Abb. hier nicht dargestellt) war kein prognostischer Einfluss der MTHFD1-Expression erkennbar (jeweils Logrank-Test $p > 0,7$). Bei MM war eine MTHFD1-Expression mit einer erkennbar schlechteren Gesamtprognose verbunden, wobei der Unterschied nur knapp nicht signifikant war (Logrank-Test $p = 0,096$; siehe D in Abb. 36). Im Gegensatz dazu wirkte sich die Proteinexpression bei MZL prognostisch günstig aus (Logrank-Test $p = 0,226$, siehe E in Abb. 36).

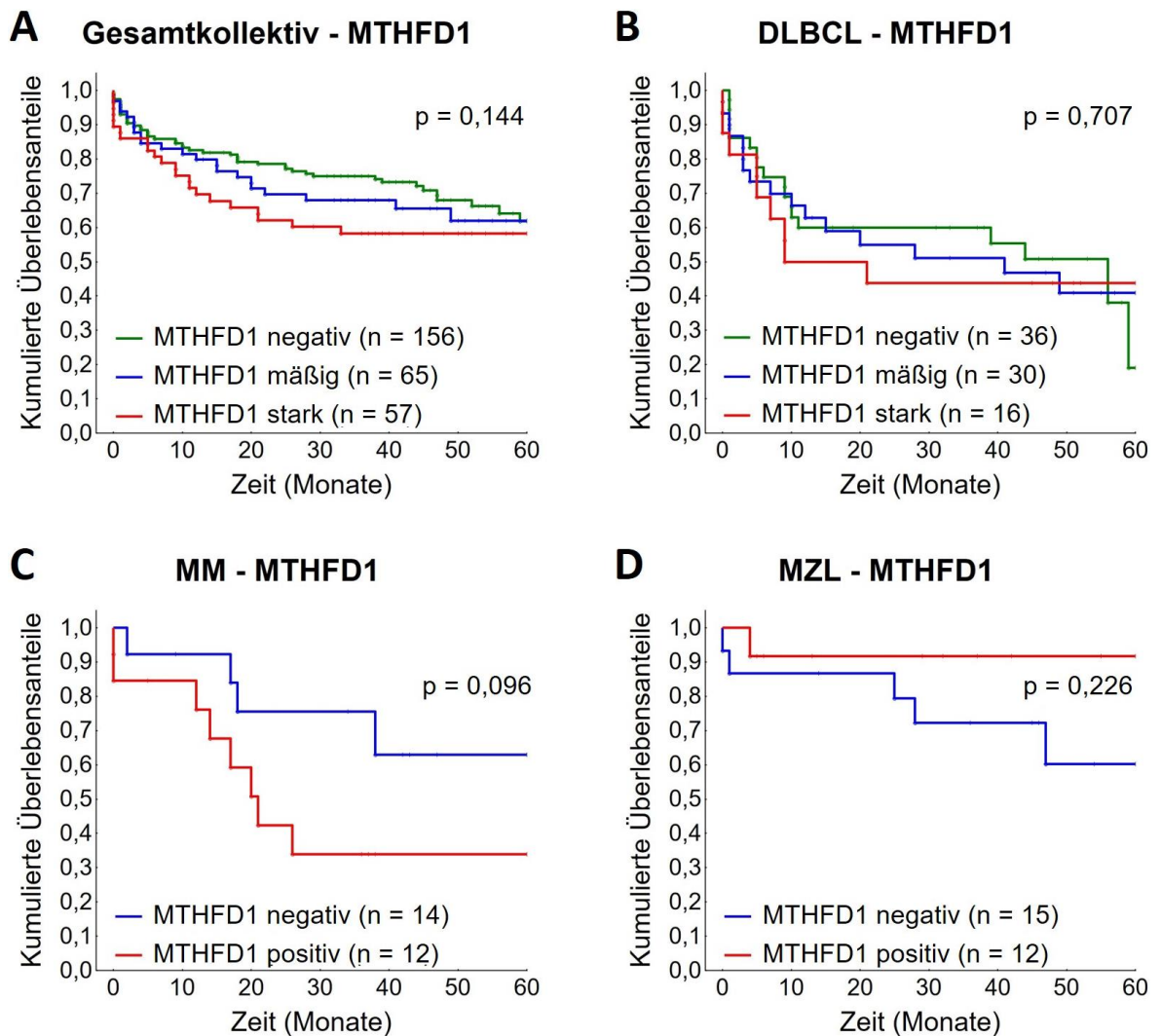


Abb. 36: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von MTHFD1-Expression

Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. mäßig positiver vs. stark positiver Proteinexpression von MTHFD1 für (A) Gesamtkollektiv (BL/DLBCL/B-CLL/FL/MCL/MZL/MM/HL) und (B) DLBCL. Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. positiver Proteinexpression von MTHFD1 für (C) MM und (D) MZL. Angabe des p-Werts aus Chi-Quadrat-Test (A,B) und Logrank-Test (C,D). Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten.

3.5.2 MTHFD2

Für MTHFD2 konnte beim BL keine signifikante BCR-abhängige Veränderung in der Phosphorylierung nachgewiesen werden (Corso et al. 2016). In BL-Zelllinien war ein Gen-Knockdown von MTHFD2 mittels shRNA stark toxisch, allerdings bestand dabei kein signifikanter Unterschied zu Karzinom-Zelllinien (BL vs. Karzinom: $p = 0,287$, Gen-Rang 1643, Gen-Score 0,99; vgl. 3.1.3).

3.5.2.1 Proteinexpression von MTHFD2 in humanen Lymphomen

Die MTHFD2-Expression wurde an insgesamt 279 Fällen des genannten Lymphom-Kollektivs untersucht (18 BL, 83 DLBCL, 28 B-CLL, 38 FL, 29 MCL, 27 MZL, 26 MM und 30 HL). Abb. 37 zeigt exemplarisch die verschiedenen Intensitäten der IHC-Färbung.

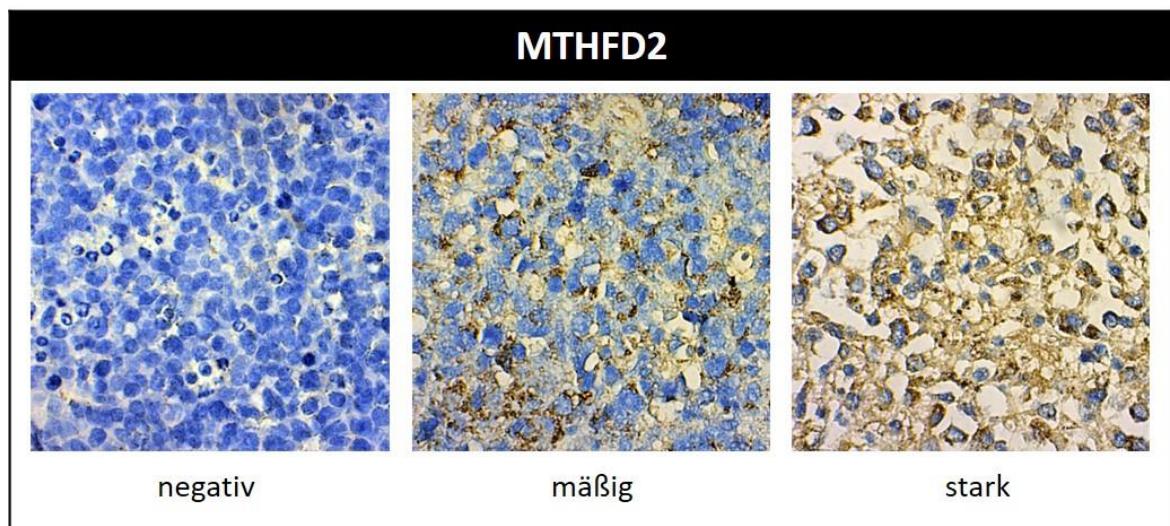


Abb. 37: Expression von MTHFD2 nach immunhistochemischer Färbung mit anti-MTHFD2
Links: Lymphomzellen negativ für anti-MTHFD2. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Von insgesamt 279 Fällen färbten sich 38 Fälle mäßig und 29 Fälle stark positiv für MTHFD2. Abb. 38 und Tab. 21 geben einen Überblick über die Ergebnisse der Auswertung. Beim BL fand sich mit zwei Drittel aller Fälle (67%) am häufigsten eine positive Proteinexpression. Auch waren zahlreiche DLBCL- (40%) und HL-Fälle (54%) positiv gefärbt. Im Gegensatz dazu war der Anteil MTHFD2-positiver Fälle bei den übrigen Lymphom-Subtypen sehr gering und lag jeweils unter 10%. Die verschiedenen Entitäten lassen sich somit anhand der MTHFD2-Proteinexpression in zwei Gruppen einteilen: DLBCL, HL und BL mit positiver Proteinexpression in 40 – 67% der Fälle (I) sowie B-CLL, FL, MZL, MM und MCL mit positiver Proteinexpression in < 10% der Fälle (II). Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen hinsichtlich des Anteils an positiven Fällen ist hoch signifikant (Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu kann mit dem Antikörper anhand einer positiven Expression nicht signifikant zwischen den Entitäten

innerhalb einer Gruppe unterschieden werden (jeweils Fisher-Yates-Test $p > 0,05$). DLBCL, BL und HL waren zudem ähnlich häufig (19 – 27%) stark positiv gefärbt (Chi-Quadrat-Test $p = 0,70$).

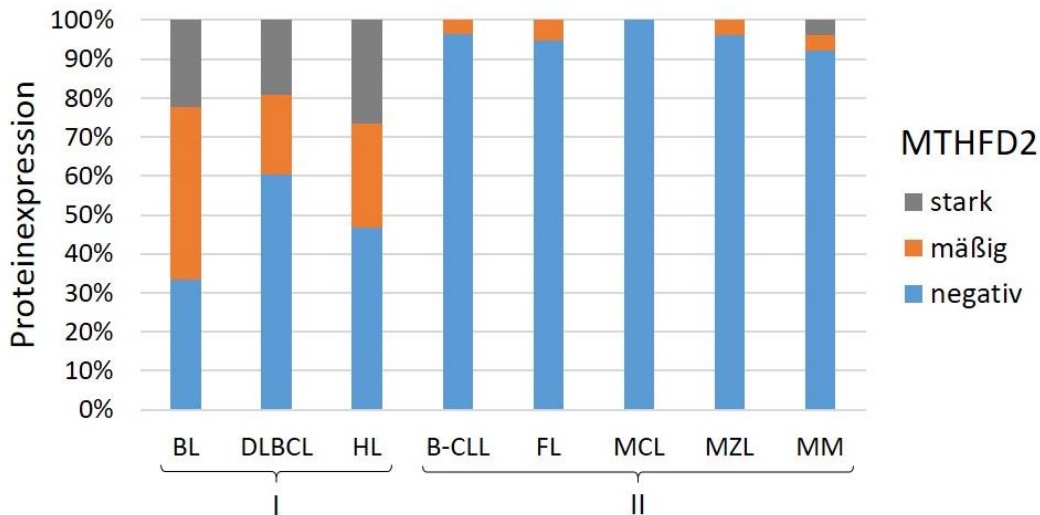


Abb. 38: Expression von MTHFD2 in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von MTHFD2 (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität. Gruppierung der Entitäten nach Anteil an positiven Fällen in zwei Gruppen: I) 40 – 67% positive Fälle, II) < 10% positive Fälle.

| MTHFD2 | | | | | |
|--------|-------|-------------|-----------|-----------|-------|
| | | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
| I | BL | 6 (33) | 8 (45) | 4 (22) | 18 |
| | DLBCL | 50 (60) | 17 (21) | 16 (19) | 83 |
| | HL | 14 (46) | 8 (27) | 8 (27) | 30 |
| II | B-CLL | 27 (96) | 1 (4) | 0 (0) | 28 |
| | FL | 36 (95) | 2 (5) | 0 (0) | 38 |
| | MCL | 29 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 29 |
| | MZL | 26 (96) | 1 (4) | 0 (0) | 27 |
| | MM | 24 (92) | 1 (4) | 1 (4) | 26 |
| Gesamt | | 212 | 38 | 29 | 279 |

Tab. 21: Absolute Auswertung TMA anti-MTHFD2

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von MTHFD2. Einteilung der Lymphom-Entitäten nach Anteil an positiven Fällen in zwei Gruppen: I) 40 – 67% positive Fälle, II) < 10% positive Fälle.

3.5.2.2 MTHFD2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex

Außer HL waren v. a. die hochproliferativen Entitäten BL und DLBCL häufig MTHFD2-positiv gefärbt (siehe Abb. 38). Zur Untersuchung einer möglichen Assoziation zwischen

MTHFD2-Expression und Proliferationsrate der Lymphomzellen wurde im Folgenden die Proteinexpression von MTHFD2 wie beschreiben mit der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 verglichen. Hier dargestellt ist das lediglich das Ergebnis der Auswertung für BL- und DLBCL-Fälle, da die übrigen Entitäten entweder kaum positiv gefärbt waren (B-CLL, FL, MCL, MZL, MM) oder der Ki-67-Status bei zu wenigen Fällen bekannt war (HL). 18 BL- und 75 DLBCL-Fälle wurden anhand ihres Ki-67-Index in zwei Gruppen eingeteilt, wobei beim BL ein Ki-67-Grenzwert von 85% und beim DLBCL ein Grenzwert von 75% festgelegt wurde. Dieser Grenzwert entspricht in etwa dem medianen Wert der beim BL und DLBCL ermittelten Ki-67-Werte. Außerdem erfolgte eine Einteilung in MTHFD2-positive (MTHFD2+) und MTHFD2-negative (MTHFD2-) Fälle. Die Verteilung der Fälle ist in Tab. 22 dargestellt. Dabei zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen MTHFD2-Expression und Ki-67-Index (Fisher-Yates-Test $p = 0,61$ und $p = 0,81$). Folglich sind MTHFD2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex bei BL und DLBCL als voneinander unabhängig zu werten.

| Assoziation von MTHFD2 und Ki-67 | | | | |
|---|----------|----------------------|-------------------|-------|
| | | Ki-67 \leq 85% (%) | Ki-67 $>$ 85% (%) | Total |
| BL $p = 0,61$ | MTHFD2+ | 3 (17) | 8 (48) | 11 |
| | MTHFD2 - | 2 (12) | 4 (23) | 6 |
| | Gesamt | 5 (29) | 12 (71) | 17 |
| | | Ki-67 \leq 75% (%) | Ki-67 $>$ 75% (%) | Total |
| DLBCL $p = 0,81$ | MTHFD2 + | 11 (15) | 19 (25) | 30 |
| | MTHFD2 - | 19 (25) | 26 (35) | 45 |
| | Gesamt | 30 (40) | 45 (60) | 75 |

Tab. 22: Assoziation von MTHFD2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex

Absolute und prozentuale Verteilung der Proliferationsrate in Bezug auf den MTHFD2-Status. Einteilung des Ki-67-Index in $\leq 85\%$ und $> 85\%$ beim BL und $\leq 75\%$ und $> 75\%$ beim DLBCL. Einteilung des MTHFD2-Status in positiv (MTHFD2+) und negativ (MTHFD2-). Angabe des p-Werts aus Fisher-Yates-Test.

3.5.2.3 Überlebenszeitanalyse MTHFD2

Es wurden Überlebenszeitanalysen zur prognostischen Auswirkung der Proteinexpression von MTHFD2 durchgeführt. Wie gezeigt wurde, fand sich nur bei BL, DLBCL und HL (Gruppe I) eine relevante Anzahl positiv gefärbter Fälle. Die übrigen Entitäten (Gruppe II) waren (fast) ausschließlich negativ gefärbt und daher für Überlebenszeitanalysen nicht geeignet. Auch wurden HL aufgrund der geringen Mortalität im Beobachtungszeitraum (7%) nicht berücksichtigt. Somit gingen 18 BL und 83 DLBCL in die Analysen ein.

Zunächst wurden beide Entitäten gemeinsam untersucht, wobei Fälle mit negativer ($n = 56$), mäßig positiver ($n = 25$) und stark positiver MTHFD2-Expression ($n = 20$) unter-

einander verglichen wurden. Hierbei zeigten positiv bzw. stark positiv gefärbte Fälle gegenüber dem Rest keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben (Logrank-Test $p = 0,596$ bzw. $p = 0,419$; siehe A in Abb. 39). In weiteren Analysen wurden BL und DLBCL getrennt untersucht. Beim DLBCL war eine positive (mäßig oder stark) MTHFD2-Expression im Vergleich zur fehlenden Proteinexpression mit einer ungünstigeren Prognose verbunden (Logrank-Test $p = 0,345$), wobei stark positive Fälle wiederum ein etwas schlechteres Gesamtüberleben aufwiesen als negative und mäßig positive Fälle (Logrank-Test $p = 0,309$; siehe B in Abb. 39). Beim BL war kein signifikanter prognostischer Unterschied zwischen negativen und positiven Fällen festzustellen (Logrank-Test $p = 0,710$; siehe C in Abb. 39).

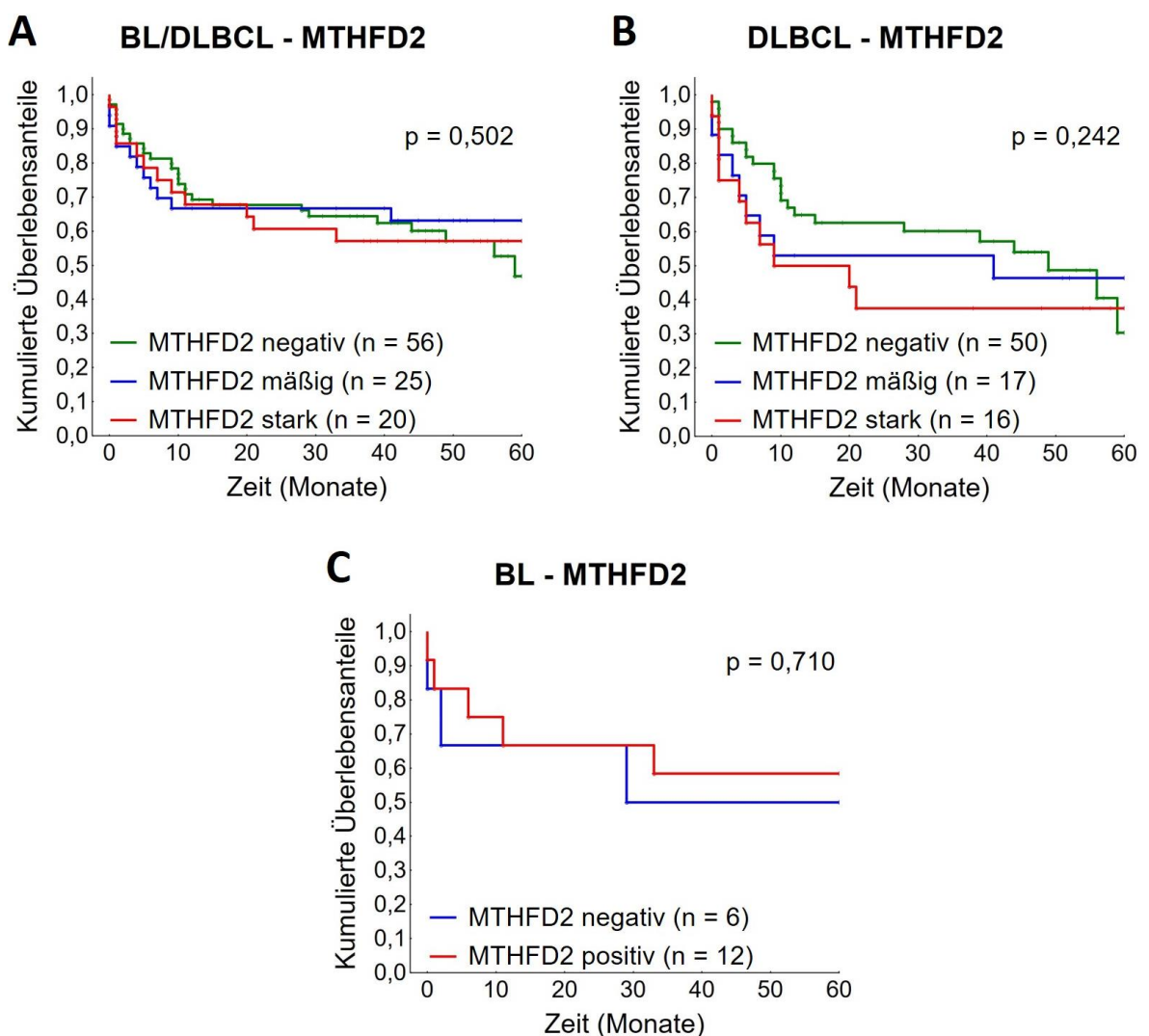


Abb. 39: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von MTHFD2-Expression

Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. mäßig positiver vs. stark positiver Proteinexpression von MTHFD2 für (A) BL/DLBCL und (B) DLBCL. Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. positiver Proteinexpression von MTHFD2 für (C) BL. Angabe des p-Werts aus Chi-Quadrat-Test (A,B) und Logrank-Test (C). Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten.

3.5.3 SHMT2

In den phosphoproteomischen Analysen von Corso et al. (2016) wurde für SHMT2 in BL-Zelllinien (DG75, Daudi) keine signifikante Regulierung im Rahmen des tonischen BCR-Signalings nachgewiesen. In DG75-Zellen führte ein CD79a-Knockdown jedoch zu einer erkennbaren Veränderung in der Phosphorylierung an Position S245 (\log_2 SILAC-Ratio -0,714). Im shRNA-Screen von Huellein et al. (2019) hatte der Knockdown von SHMT2 einen starken toxischen Effekt auf BL-Zellen, allerdings mit geringerer BL-Spezifität im Vergleich zum Knockdown der unter 3.1.3 identifizierten Proteine (BL vs. Karzinom: $p = 0,039$, Gen-Rang 294, Gen-Score 1,43).

3.5.3.1 Proteinexpression von SHMT2 in humanen Lymphomen

Für die Expressionsanalyse konnten insgesamt 276 Fälle des beschriebenen Kollektivs ausgewertet werden (18 BL, 82 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 29 MCL, 26 MZL, 26 MM, 28 HL). Die möglichen Farbintensitäten sind beispielhaft in Abb. 40 dargestellt.

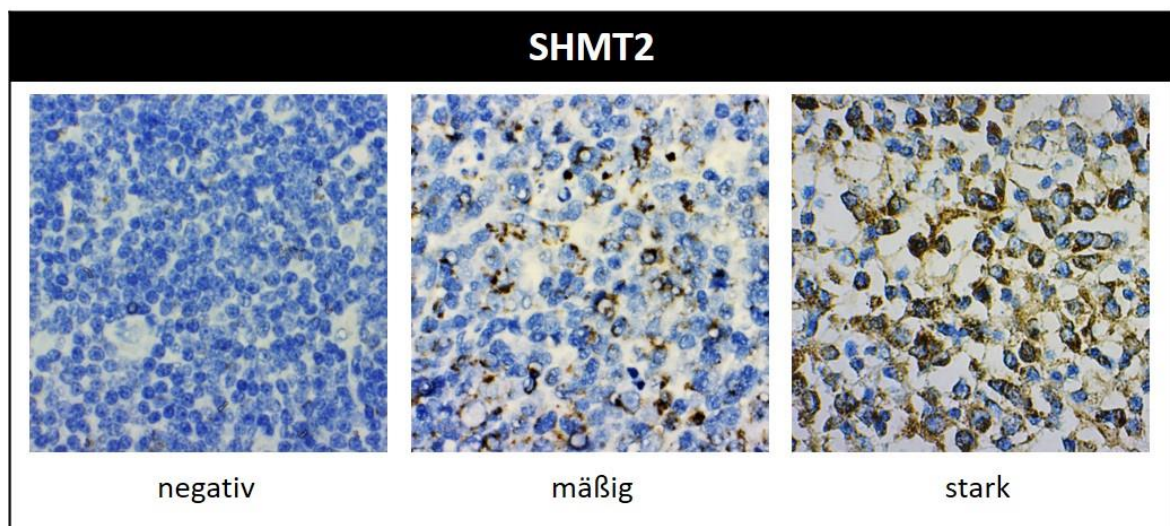


Abb. 40: Expression von SHMT2 nach immunohistochemischer Färbung mit anti-SHMT2

Links: Lymphomzellen negativ für anti-SHMT2. Mitte: mäßig positiv. Rechts: stark positiv. Vergrößerung jeweils x63.

Von 276 Fällen färbten sich 73 mäßig und 71 stark positiv für anti-SHMT2. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abb. 41 und Tab. 23 dargestellt. BL waren zu 100% positiv gefärbt und somit signifikant häufiger als alle anderen Entitäten (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,05$). Auch DLBCL und HL zeigten mit 74% und 61% hohe Anteile an SHMT2-positiven Fällen. Im Gegensatz dazu färbten sich nur 8% der MM positiv. Bei den übrigen Entitäten variierte dieser Anteil von 31% bei MZL bis zu 48% bei MCL. DLBCL waren signifikant häufiger positiv als MCL, FL, B-CLL, MZL und MM (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,05$), einzig HL zeigten einen ähnlich hohen Anteil an positiven Fällen (Fisher-Yates-Test $p = 0,24$). Allerdings waren HL gegenüber B-CLL, FL und MCL nicht signifikant häufiger

positiv gefärbt (jeweils Fisher-Yates-Test $p > 0,05$), sodass eine hohe SHMT2-Expression in erster Linie für hochproliferative Lymphome (BL, DLBCL) charakteristisch ist. Eine stark positive SHMT2-Färbung fand sich am häufigsten bei BL (67%). In den Lymphomzellen von DLBCL und HL war SHMT2 in 37% und 47% der Fälle stark exprimiert. Somit unterschieden sich BL zwar signifikant von DLBCL im Anteil stark positiver Fälle (Fisher-Yates-Test $p = 0,03$), allerdings nicht von HL (Fisher-Yates-Test $p = 0,23$). B-CLL, FL und MCL waren in 11 – 24% der Fälle stark positiv, wohingegen MZL- und MM-Fälle keine starke SHMT2-Expression aufwiesen.

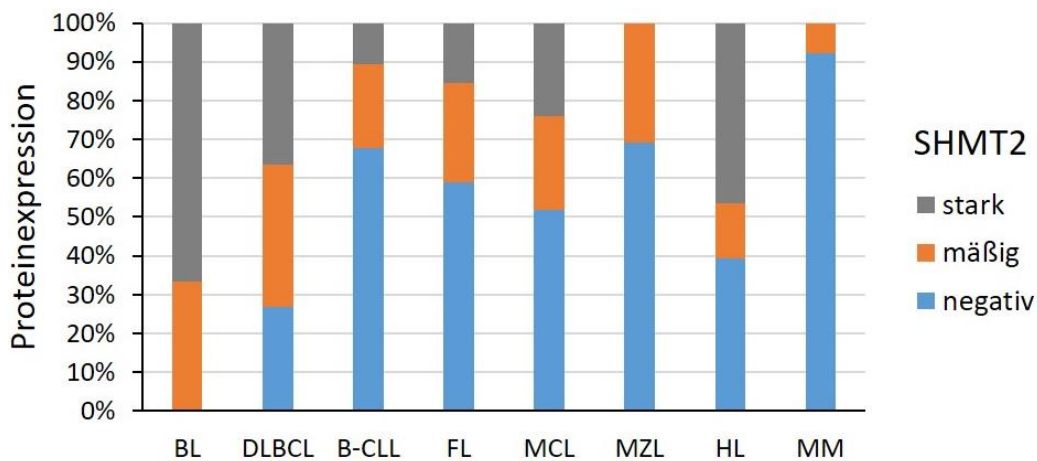


Abb. 41: Expression von SHMT2 in humanen Lymphomen

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der immunhistochemisch ermittelten Expression von SHMT2 (negativ, mäßig, stark) in Abhängigkeit von der Lymphom-Entität.

| SHMT2 | | | | |
|--------|-------------|-----------|-----------|-------|
| | Negativ (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | Total |
| BL | 0 (0) | 6 (33) | 12 (67) | 18 |
| DLBCL | 22 (26) | 30 (37) | 30 (37) | 82 |
| B-CLL | 19 (68) | 6 (21) | 3 (11) | 28 |
| FL | 23 (59) | 10 (26) | 6 (15) | 39 |
| MCL | 15 (52) | 7 (24) | 7 (24) | 29 |
| MZL | 18 (69) | 8 (31) | 0 (0) | 26 |
| MM | 24 (92) | 2 (8) | 0 (0) | 26 |
| HL | 11 (39) | 4 (14) | 13 (47) | 28 |
| Gesamt | 132 | 73 | 71 | 276 |

Tab. 23: Absolute Auswertung TMA anti-SHMT2

Absolute und prozentuale Verteilung der Expression (negativ, mäßig, stark) von SHMT2.

3.5.3.2 SHMT2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex

Besonders bei den hochproliferativen Lymphomen BL und DLBCL fand sich ein hoher Anteil SHMT2-positiver Fälle. Für die Untersuchung einer möglichen Assoziation zwischen

SHMT2-Expression und Proliferationsrate der Lymphomzellen erfolgte wie beschrieben ein Vergleich mit dem Proliferationsmarker Ki-67. Für positiv gefärbte MM- und HL-Fälle wurden kaum Angaben zum Ki-67-Index gemacht, sodass diese Entitäten für den Vergleich nicht berücksichtigt wurden. 74 DLBCL, 17 BL, 23 B-CLL, 36 FL, 27 MCL und 21 MZL wurden anhand des Ki-67-Index in jeweils zwei Gruppen eingeteilt, wobei anhand der Verteilung der Ki-67-Werte für BL ein Grenzwert von 85%, für DLBCL ein Grenzwert von 75% und für die übrigen Entitäten ein Grenzwert von 25% festgelegt wurde. Die Grenzwerte entsprechen dabei in etwa dem medianen Wert der der jeweiligen Ki-67-Werte. Zudem erfolgte eine Einteilung in SHMT2-positive (SHMT2+) und SHMT2-negative (SHMT2-) Fälle, beim BL wurden mäßig positive (SHMT2+) und stark positive Fälle (SHMT2++) verglichen. Wie in Tab. 24 dargestellt fand sich bei keiner Entität eine signifikante Assoziation von SHMT2-Expression und Ki-67-Index (jeweils Fisher-Yates-Test $p > 0,05$).

| Assoziation von SHMT2 und Ki-67 | | | | | | | | | |
|--|----------|-----------------|---------|----|-------------------------------|---------|---------|---------|----|
| | | Ki-67 ≤ 85% (%) | | | Ki-67 > 85% (%) | | | Total | |
| BL p = 0,60 | SHMT2 ++ | 4 (23) | 7 (42) | 11 | FL p = 1,00 | SHMT2 + | 8 (22) | 7 (20) | 15 |
| | SHMT2 + | 1 (6) | 5 (29) | 6 | | SHMT2 - | 12 (33) | 9 (25) | 21 |
| | Gesamt | 5 (29) | 12 (71) | 17 | | Gesamt | 20 (55) | 16 (45) | 36 |
| | | Ki-67 ≤ 75% (%) | | | Ki-67 > 75% (%) | | | Total | |
| DLBCL p = 0,42 | SHMT2 + | 24 (32) | 31 (42) | 55 | MCL p = 0,25 | SHMT2 + | 4 (15) | 9 (33) | 13 |
| | SHMT2 - | 6 (8) | 13 (18) | 19 | | SHMT2 - | 8 (30) | 6 (22) | 14 |
| | Gesamt | 30 (40) | 44 (60) | 74 | | Gesamt | 12 (45) | 15 (55) | 27 |
| | | Ki-67 ≤ 25% (%) | | | Ki-67 > 25% (%) | | | Total | |
| B-CLL p = 0,18 | SHMT2 + | 3 (13) | 5 (22) | 8 | MZL p = 1,00 | SHMT2 + | 3 (14) | 3 (14) | 6 |
| | SHMT2 - | 11 (48) | 4 (17) | 15 | | SHMT2 - | 9 (43) | 6 (29) | 15 |
| | Gesamt | 14 (61) | 9 (39) | 23 | | Gesamt | 12 (57) | 9 (43) | 21 |

Tab. 24: Assoziation von SHMT2-Expression und Ki-67-Proliferationsindex

Absolute und prozentuale Verteilung der Proliferationsrate in Bezug auf den SHMT2-Status. Einteilung des Ki-67-Index in ≤ 85% und > 85% für BL, ≤ 75% und > 75% für DLBCL sowie ≤ 25% und > 25% für B-CLL, FL, MCL und MZL. Einteilung des SHMT2-Status in positiv (SHMT2+) und negativ (SHMT2-), beim BL in mäßig positiv (SHMT2+) und stark positiv (SHMT2++). Angabe des p-Werts aus Fisher-Yates-Test.

3.5.3.3 Überlebenszeitanalyse SHMT2

In die Überlebenszeitanalysen zur prognostischen Auswirkung der SHMT2-Expression gingen insgesamt 275 Fälle ein (18 BL, 82 DLBCL, 28 B-CLL, 39 FL, 28 MCL, 26 MZL, 26 MM, 28 HL).

Zunächst wurden Patienten mit negativer (132 Fälle), mäßiger (72 Fälle) und stark positiver SHMT2-Färbung (71 Fälle) untereinander verglichen. Dabei hatten positive Fälle eine erkennbar schlechtere Gesamtprognose als negative Fälle (Logrank-Test $p = 0,177$), wobei stark positive Fälle wiederum ein etwas schlechteres Gesamtüberleben aufwiesen als mäßig positive Fälle (siehe A in Abb. 42). In nachfolgenden Analysen wurden verschiedene

Entitäten jeweils einzeln untersucht, wobei MM und HL aufgrund der geringen Proteinexpression bzw. Mortalität nicht berücksichtigt wurden (siehe Tab. 23 bzw. Tab. 8). Beim DLBCL und MCL war eine stark positive SHMT2-Expression mit der erkennbar ungünstigsten Gesamtprognose assoziiert, wohingegen negative und mäßig positive Fälle ein ähnliches Gesamtüberleben zeigten (siehe B und D in Abb. 42). Allerdings war der Unterschied jeweils nicht signifikant (Logrank-Test $p = 0,242$ und $p = 0,121$). BL waren allesamt positiv gefärbt, weshalb hier mäßig und stark positive Fälle verglichen wurden. Im Unterschied zum DLBCL hatten BL-Patienten mit stark positiver SHMT2-Expression eine bessere Prognose als Patienten mit mäßig positiver Färbung. Dieser Unterschied war nur knapp nicht signifikant (Logrank-Test $p = 0,099$, siehe C in Abb. 42). Für Patienten mit FL, B-CLL und MZL ließ sich jeweils kein signifikanter prognostischer Einfluss einer Proteinexpression von SHMT2 feststellen (jeweils Logrank-Test $p > 0,4$; Abb. hier nicht dargestellt).

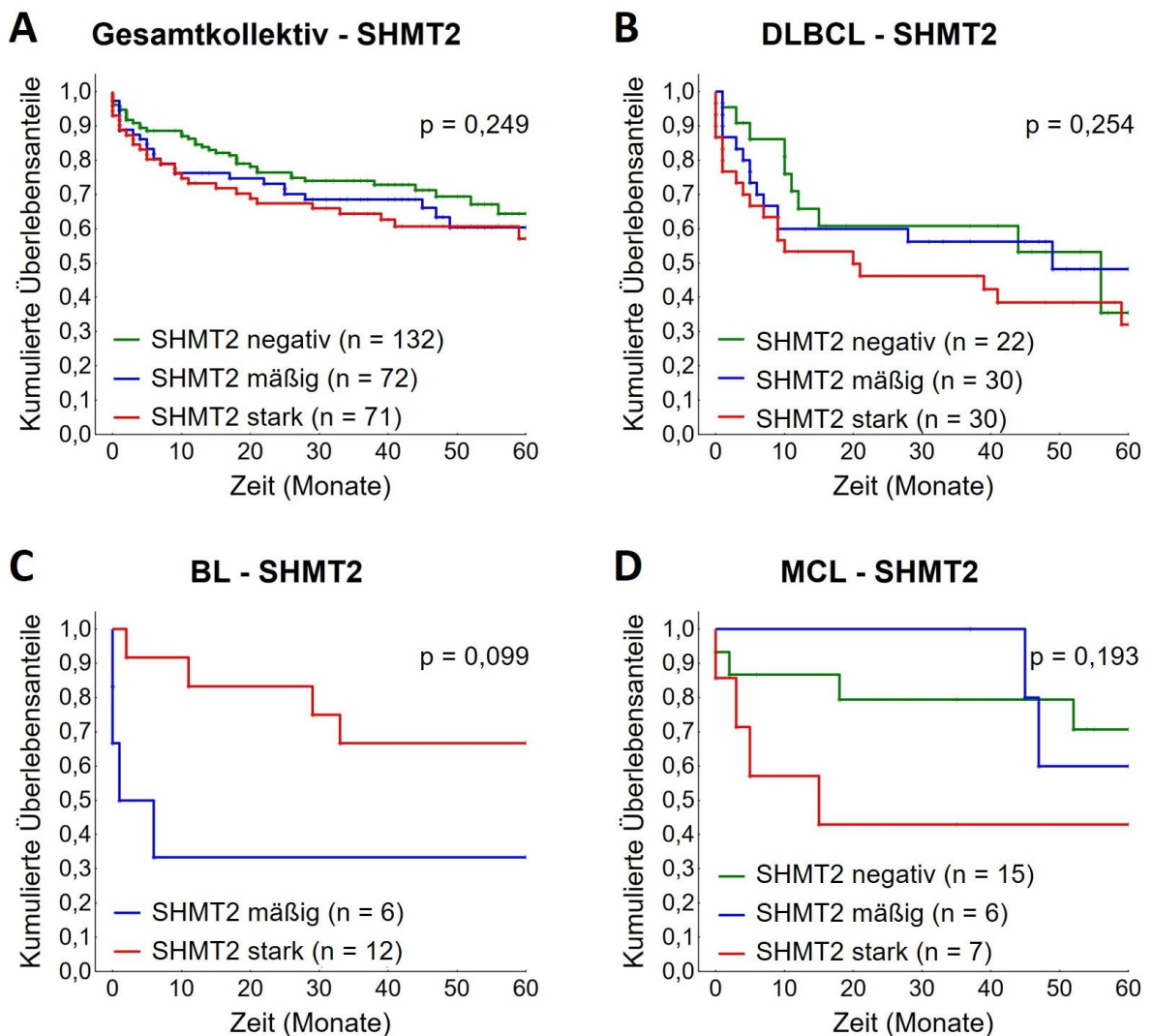


Abb. 42: Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von SHMT2-Expression

Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit negativer vs. mäßig positiver vs. stark positiver Proteinexpression von SHMT2 für (A) Gesamtkollektiv (BL/DLBCL/B-CLL/FL/MCL/MZL/MM/HL), (B) DLBCL und (D) MCL. Vergleich des Gesamtüberlebens von Patienten mit mäßig positiver vs. stark positiver Proteinexpression von SHMT2 für (C) BL. Angabe des p-Werts aus Chi-Quadrat-Test (A,B,D) und Logrank-Test (C). Y-Achse: kumulierte Überlebensanteile. X-Achse: Zeit in Monaten.

3.5.4 MTHFD1/MTHFD2/SHMT2 und MYC

MYC reguliert den 1C-Metabolismus über die Transkription verschiedener Gene und fördert dadurch die Zellproliferation (Morrish et al. 2008; Shuvalov et al. 2017). Auch *SHMT2* (direktes Zielgen) und *MTHFD1* werden MYC-abhängig verstärkt exprimiert (Nikiforov et al. 2002; Morrish et al. 2008). Im Folgenden soll daher untersucht werden, inwieweit die Proteinexpression von MYC bei B-Zell-Lymphomen Einfluss auf die Proteinexpression von MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2 nimmt. In den entsprechenden immunhistochemischen Analysen waren hochmaligne Lymphome (BL, DLBCL) sowie HL am häufigsten positiv gefärbt, die übrigen Entitäten zeigten v. a. für MYC und MTHFD2 nur selten eine positive Färbung (vgl. 3.3.3 und 3.5). Aus diesem Grund beschränkte sich die Untersuchung auf BL, DLBCL und HL. Beim DLBCL bestand jeweils eine signifikante Assoziation zwischen MYC-Expression und der Expression von MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2 (jeweils Fisher-Yates-Test $p < 0,05$, siehe Tab. 25). Da alle BL-Fälle sowohl MYC- als auch SHMT2-positiv gefärbt waren, wurden hier jeweils stark positive Fälle mit mäßig positiven Fällen verglichen. Dabei zeigte sich für BL kein Zusammenhang zwischen der Expression von MYC und der von MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2 (jeweils Fisher-Yates-Test $p = 1,000$; Tab. hier nicht dargestellt). Auch ließ sich beim HL kein signifikanter Zusammenhang zwischen MYC-Expression und den Expressionen von MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2 ausmachen (Fisher-Yates-Test $p = 0,175$, $p = 1,000$ und $p = 0,460$; Tab. hier nicht dargestellt).

| DLBCL - Assoziation von MTHFD1/MTHFD2/SHMT2 und MYC | | | | |
|---|---------|--------------|--------------|-------|
| | | MTHFD1 + (%) | MTHFD1 - (%) | Total |
| p = 0,006 | c-MYC + | 34 (41) | 15 (18) | 49 |
| | c-MYC - | 12 (15) | 21 (26) | 33 |
| | Gesamt | 46 (56) | 36 (44) | 82 |
| | | MTHFD2 + (%) | MTHFD2 - (%) | Total |
| p = 0,006 | c-MYC + | 25 (30) | 24 (29) | 49 |
| | c-MYC - | 7 (9) | 26 (32) | 33 |
| | Gesamt | 32 (39) | 50 (61) | 82 |
| | | SHMT2 + (%) | SHMT2 - (%) | Total |
| p = 0,012 | c-MYC + | 41 (50) | 8 (10) | 49 |
| | c-MYC - | 19 (23) | 14 (17) | 33 |
| | Gesamt | 60 (73) | 22 (27) | 82 |

Tab. 25: DLBCL – Assoziation der Expression von MTHFD1/MTHFD2/SHMT2 und MYC

Absolute und prozentuale Verteilung der MTHFD1/MTHFD2/SHMT2-Expression in Bezug auf die MYC-Expression. Einteilung der Expression in positiv (+) und negativ (-). Angabe des p-Werts aus Fisher-Yates-Test.

4 Diskussion

4.1 Methodischer Ansatz

Zur Identifizierung essentieller Effektorproteine des tonischen BCR-Signalings beim BL wurden bereits publizierte Datensätze aus Massenspektrometrie-basierten phosphoproteomischen Analysen (Corso et al. 2016) sowie einem RNA-Interferenz-Screen (Huellein et al. 2019) kombiniert und neu ausgewertet. Bei den Proteinen ACTN4, ARFGEF2, BCL11A, CARD11, CDKN1B und MTHFD1 wurde in BL-Zelllinien sowohl eine signifikante Veränderung in der Phosphorylierung bei Blockade des tonischen BCR-Signalings (CD79a-Knockdown oder SYK-Inhibierung) als auch eine signifikante Abnahme der Zellzahl bei Inhibierung der Translation (shRNA-Interferenz) nachgewiesen. Dabei ist anzumerken, dass unterschiedliche BL-Zelllinien für den Phospho-Screen (DG75, Daudi) und den RNAi-Screen (BJAB, BL60, Raji, Ramos, BL2, LY47, Salina, Seraphine) verwendet wurden und dass sich die Ergebnisse der *in vitro* durchgeführten Untersuchungen je nach Zelllinie z. T. deutlich unterschieden. Für die Auswertung des RNAi-Screens wurden daher die Ergebnisse aller untersuchten BL-Zelllinien kombiniert und es wurden verschiedene shRNAs verwendet, um Zelllinien- und shRNA-spezifische Veränderungen zu vermeiden. Bei den phosphoproteomischen Analysen basierte die Auswahl dagegen auf der signifikanten Regulierung einer Phosphorylierungsstelle in einer BL-Zelllinie entweder bei CD79a-Knockdown oder SYK-Inhibierung. Folglich ist die signifikante BCR-abhängige Regulierung der Proteine in erster Linie als spezifisch für DG75- oder Daudi-Zellen zu werten.

Für die immunhistochemische (IHC) Expressions- und Überlebenszeitanalyse wurde ein Lymphom-Kollektiv aus 280 Fällen erstellt, das die häufigsten B-Zell-Lymphom-Entitäten BL, DLBCL, B-CLL, FL, MCL, MZL, MM und HL umfasste. Dabei wurde versucht, möglichst gleichgroße Subgruppen (mindestens 25 Fälle) zu bilden. Aufgrund der niedrigen Prävalenz von BL war diese Entität im Kollektiv mit 18 Fällen (6%) unterrepräsentiert. DLBCL-Fälle waren wiederum überrepräsentiert, um einen ausreichend großen Anteil an hochmalignen Lymphomen zu gewährleisten. In den Überlebenszeitanalysen waren die Subgruppen häufig sehr klein, was vermutlich die wenigen signifikanten Resultate erklärt. Zudem waren die Analysen für indolente Lymphome aufgrund der niedrigen Mortalität nur bedingt aussagekräftig. Zur Vermeidung von Verzerrungen (Bias) in der statistischen Analyse und für aussagekräftige Überlebenszeitanalysen empfiehlt sich daher generell die Untersuchung eines größeren Kollektivs über einen längeren Beobachtungszeitraum sowie die Durchführung mehrfaktorieller Varianzanalysen unter Einbeziehung von klinischen Parametern.

Die IHC-Färbungen wurden an TMAs durchgeführt, um eine schnelle und gleichmäßige Färbung verschiedener Gewebsschnitte zu gewährleisten. Für die Auswertung wurde eine

dreistufige Einteilung der Farbtintensitäten in „negativ“, „mäßig positiv“ und „stark positiv“ verwendet, wobei Fälle mit < 10% positiver Zellen im Tumorgewebe ebenfalls als „negativ“ eingestuft wurden. Ein Vorteil dieser dreistufigen Einteilung ist die relativ einfache Klassifizierung und statistische Auswertung der Fälle, was zur Fehlervermeidung beiträgt, sowie die einfache Generierung von Subgruppen für die Überlebenszeitanalyse. Ein Nachteil besteht darin, dass der Übergang zwischen „mäßig positiv“ und „stark positiv“ nicht klar durch einen objektiven Wert definiert ist. Da die Farbtintensität in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper unterschiedlich stark ausfällt, muss die Einteilung in „mäßig positiv“ und „stark positiv“ für jede Antikörperfärbung einzeln definiert werden. Der gewählte *cut-off* von mindestens 10% gefärbter Zellen für die Einstufung als „mäßig positiv“ gewährleistet, dass der Anteil „mäßig positiver“ Fälle nicht zu sehr durch „negative“ Fälle verfälscht wird, andererseits birgt er auch die Gefahr, dass vereinzelt „mäßig positive“ Fälle als „negativ“ klassifiziert werden.

4.2 BCL2, BCL6, MYC

Das BCL2-Protein ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, wo es durch die Inhibierung pro-apoptotischer Proteine dem Zelltod durch Apoptose entgegenwirkt. Eine Überexpression von BCL2 resultiert in einem verstärkten anti-apoptotischen Signal, das bei zahlreichen B-Zell-Lymphomen zum Überleben der Tumorzellen beiträgt (Cory et al. 2003; Adams et al. 2007). Dementsprechend wiesen die meisten der hier untersuchten Entitäten (DLBCL, FL, B-CLL, MCL, MZL, MM) eine hohe Proteinexpression (> 90% positive Fälle) auf, wie sie bereits in ähnlichen Untersuchungen beschrieben wurde (Agarwal et al. 2002; Hanada et al. 1993; Lai et al. 1998; Pettersson et al. 1992; Tsuyama et al. 2017; Wang et al. 1995). Im Gegensatz dazu zeigte sich beim BL eine niedrige bis fehlende Proteinexpression (33% positive Fälle), was wiederum charakteristisch für diese Entität ist (Pervez et al. 2011). Die hochmalignen Lymphome BL und DLBCL unterscheiden sich somit signifikant in der BCL2-Expression. Beim HL war ca. die Hälfte der Fälle (53%) positiv gefärbt, ähnlich hohe Werte werden auch in der Literatur beschrieben (Rassidakis et al. 2002). Folglich kann Verteilung der BCL2-Expression bei den verschiedenen Entitäten des untersuchten Kollektivs als repräsentativ für B-Zell-Lymphome angesehen werden.

BCL6 spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung reaktiver Keimzentren in den sekundär lymphatischen Organen während der humoralen Immunantwort (Dent 1997; Fukuda et al. 1997). In reaktiven B-Lymphozyten unterdrückt BCL6 u. a. die Transkription von Genen zur DNA-Reparatur, Regulation der Proliferation und Plasmazelldifferenzierung, was die Zellproliferation und Ausbildung somatischer Hypermutationen in den Immunglobulin-Genen fördert (Hatzi et al. 2014). Physiologischerweise wird die Keimzentrumsreaktion durch die Herunterregulierung von BCL6 beendet. Eine konstitutive, dysregulierte Aktivierung von BCL6 kann jedoch zur malignen Transformation der Zellen

führen. Der Funktion von BCL6 entsprechend findet sich eine hohe Proteinexpression v. a. im Gewebe der Keimzentrumslymphome BL, DLBCL, FL (Basso et al. 2010; Huang et al. 2015; Ramezani-Rad et al. 2017). Dies ließ sich auch am untersuchten Kollektiv nachweisen, wo diese drei Entitäten signifikant häufiger positiv gefärbt waren als der Rest. FL können somit differentialdiagnostisch u. a. anhand einer BCL6-Färbung von anderen indolenten Lymphomen (B-CLL, MCL und MZL), die ihren Ursprung außerhalb des Keimzentrums haben, abgegrenzt werden (Dogan et al. 2000; Raible et al. 1999).

MYC reguliert als Transkriptionsfaktor zahlreiche zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Dang et al. 2006; Obaya et al. 1999). Eine verstärkte Proteinexpression, meist bedingt durch chromosomale Translokationen im *MYC*-Gen, trägt zur Entstehung maligner Neoplasien bei und ist in B-Zell-Lymphomen mit einem aggressiven Verlauf assoziiert (Chisholm et al. 2015; Nguyen et al. 2017). Klassisches Beispiel ist das Burkitt-Lymphom (BL) mit der charakteristischen Translokation t(8;14) in über 80% der Fälle (Dalla-Favera et al. 1982; Taub et al. 1982). Dementsprechend waren in der Expressionsanalyse alle BL-Fälle MYC-positiv gefärbt. Auch DLBCL weisen häufig Rearrangements im *MYC*-Gen auf (Karube et al. 2015; Nguyen et al. 2017). Hier fand sich eine Proteinexpression in 60% der Fälle und damit ähnlich häufig wie in vergleichbaren Untersuchungen (Chisholm et al. 2015; William et al. 2012; Zhang et al. 2018). Im Gegensatz dazu zeigten indolente Lymphome deutlich seltener eine MYC-Expression. Zwar werden für B-CLL, FL und MCL in der Literatur MYC-positive Anteile von bis zu 70% beschrieben (vs. < 20% in der hier durchgeführten Untersuchung), wobei nur selten mehr als 25% der Tumorzellen positiv gefärbt waren (reviewed in Chisholm et al. 2015; Nguyen et al. 2017). Folglich ist der niedrige Anteil positiver Fälle bei diesen Entitäten am ehesten auf den für die Auswertung verwendeten *cut-off* von 10% positiv gefärbter Zellen zurückzuführen. Dagegen waren MZL, MM und HL generell seltener positiv gefärbt als in entsprechenden Publikationen (Benharroch et al. 1995; Gang et al. 2013; Kodali et al. 2015; Huang et al. 2014; Kiliçarslan et al. 2018). Anders als die hochmalignen Entitäten zeigten niedrig maligne Lymphome meist keine homogene MYC-Expression.

Hochmaligne B-Zell-Lymphome mit kombinierter bzw. dreifacher Translokation der Gene *MYC*, *BCL2* und *BCL6* werden als Double- (DHL) bzw. Triple-Hit-Lymphome (THL) bezeichnet und weisen meist einen aggressiven, prognostisch ungünstigen Verlauf auf (Li et al. 2016; Rosenthal et al. 2017). Analog wurden DLBCL mit MYC/BCL2-Expression als Double- (DEL), und bei zusätzlicher BCL6-Expression als Triple-Expressor-Lymphome (TEL) bezeichnet. Im Unterschied zu DHL kommen DEL häufiger vor (19-34%) und besitzen i. d. R. eine bessere Prognose (Hu et al. 2013; Rosenthal et al. 2017).

Die prognostische Auswirkung der zweifachen und dreifachen Proteinexpression wurde am DLBCL-Kollektiv untersucht. Dabei war das Gesamtüberleben der Patienten v. a. abhängig von der MYC-Expression, da nur hier stark positive Fälle eine signifikant schlechtere Prognose aufwiesen. Die Proteinexpression von BCL2 hatte dagegen kaum Einfluss auf

das Gesamtüberleben. Zwar wird in 20 repräsentativen Studien, die in einer Metaanalyse von Li et al. (2018) zusammengefasst wurden, sowohl für MYC, als auch für BCL2 bei starker Expression eine signifikant schlechtere Prognose beschrieben, allerdings existieren ebenso Publikationen, die für eine alleinige BCL2-Überexpression keinen signifikanten prognostischen Einfluss nachweisen konnten (Hans et al. 2004; Hill et al. 1996; Kramer et al. 1996; Piris et al. 1994; Tang et al. 1994). Insgesamt ist die prognostische Relevanz der Expression von BCL2 bei DLBCL-Patienten somit nicht völlig klar. DEL (MYC/BCL2) hatten in der Untersuchung sogar ein etwas besseres Gesamtüberleben als Patienten mit alleiniger MYC-Expression. Der prognostisch ungünstige Effekt von MYC scheint somit nicht zusätzlich durch BCL2 verstärkt zu werden. Allerdings wird durch zahlreiche Studien für DEL eine im Vergleich zur fehlenden oder einfachen Proteinexpression signifikant schlechtere Prognose beschrieben (Abdulla et al. 2016; Green et al. 2012; Hu et al. 2013; Scott et al. 2015; Yan et al. 2014).

Im Gegensatz dazu hatten Fälle mit stark positiver BCL6-Färbung eine bessere Prognose als nicht stark positiv gefärbte Fälle. Ebenso hatten Fälle mit kombinierter Überexpression von MYC/BCL6 eine bessere Prognose als Fälle mit alleiniger MYC-Expression. Dieser prognostisch günstige Effekt von BCL6 wird in verschiedenen Studien beschrieben (Barrans et al. 2002; Hans et al. 2004; Horn et al. 2013; Lossos et al. 2001; Yan et al. 2014; Winter et al. 2006). Passend dazu wurde in einer Untersuchung von Abdulla et al. (2016) auch gezeigt, dass TEL eine bessere Gesamtprognose aufweisen als DEL. Beim Vergleich der DLBCL-Subtypen wird der Unterschied in der BCL6-Expression und somit der Prognose besonders deutlich: So weist der Keimzentrumstyp (GCB) signifikant häufiger eine BCL6-Expression auf als der aktivierte B-Zell-Typ (ABC) und hat eine signifikant bessere Prognose im Hinblick auf das Gesamtüberleben (Hans et al. 2004). Folglich dient die Bestimmung der BCL6-Expression auch der Differenzierung zwischen diesen beiden Subtypen. Abgesehen von MYC lieferten die hier durchgeführten Überlebenszeitanalysen keine signifikanten Resultate, wofür es verschiedene mögliche Erklärungen gibt: Basierend auf der dreistufigen Einteilung der Farbintensitäten wurden jeweils stark positive Fälle mit nicht stark positiven Fällen („negativ“ oder „mäßig positiv“) verglichen. Beim Vergleich mit anderen Studien fällt auf, dass dadurch generell prozentual weniger Fälle als „positiv“ bewertet wurden (Abdulla et al. 2016; Horn et al. 2013; Hu et al. 2013; Scott et al. 2015; Winter et al. 2006; Yan et al. 2014). Somit fanden sich auch DEL im DLBCL-Kollektiv deutlich seltener als in der Literatur beschrieben (reviewed in Rosenthal et al. 2017). Der Vergleich mit ähnlichen Studien (Li et al. 2018) legt außerdem nahe, dass die Größe des DLBCL-Kollektivs (82 Fälle) und der mittlere Beobachtungszeitraum (26,5 Monate) vermutlich zu gering sind, um ausreichend große Subgruppen für die Überlebenszeitanalysen bilden zu können. Dazu kommt, dass die meisten Todesfälle innerhalb der ersten 12 Monate und meist unabhängig von der BCL2-, BCL6- oder MYC-Expression eintraten, sodass für das weitere Follow-Up nur ein geringer Anteil an Patienten zur Verfügung stand.

4.3 ACTN4

ACTN4 (α -Aktinin 4) ist ein Aktin-bindendes Protein und wird zur Spektrin-Superfamilie gezählt. Insgesamt umfasst die Gruppe der α -Aktinine zwei muskuläre (ACTN2 und ACTN3) sowie zwei non-muskuläre (ACTN1 und ACTN4) Isoformen. Die non-muskulären Isoformen spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen der Zelladhäsion und -migration indem sie Aktinfilamente über die Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen mit der Plasmamembran verbinden (Otey et al. 2004).

ACTN4 wurde 1998 als tumorassoziiertes Protein beim Mammakarzinom entdeckt. (Honda et al. 1998). Eine starke Proteinexpression – häufig bedingt durch eine Amplifikation des *ACTN4*-Gens auf Chromosom 19q13 – findet sich im Gewebe verschiedener Karzinome sowie beim Osteosarkom (Honda 2015). Dagegen ist bis dato nur wenig über die Rolle und Expression von ACTN4 in malignen Lymphomen bekannt. *In vitro* wurde beim BL erstmals eine essentielle Funktion mit BCR-abhängiger Regulierung nachgewiesen (Corso et al. 2016; Huellein et al. 2019).

Die hier durchgeführte immunhistochemische Expressionsanalyse deutet ebenfalls auf eine besondere Funktion von ACTN4 beim BL hin, da sich dort signifikant häufiger eine (stark) positive Färbung zeigte als bei den übrigen Entitäten. Insbesondere zwischen den hochmalignen Lymphomen BL und DLBCL war der Unterschied im Anteil ACTN4-positiver Fälle hochsignifikant. Eine vergleichbare Analyse von Corso et al. (2016) bestätigt den hohen Anteil (stark) positiver Fälle beim BL, allerdings ohne relevanten Unterschied zum DLBCL. Somit ist die Überexpression von ACTN4 wohl nicht spezifisch für das BL, jedoch ist ein hoher Anteil positiv gefärbter Fälle als charakteristisch für diese Entität zu werten und scheint speziell dort eine essentielle Funktion zu besitzen. Letzteres wird auch dadurch deutlich, dass ein Gen-Knockdown von *ACTN4* für BL-Zellen toxisch ist, jedoch nicht für Zellen des GCB-DLBCL (Corso et al. 2016).

Beim BL wird ACTN4 in Abhängigkeit vom BCR reguliert, vermutlich im Rahmen des für diese Entität charakteristischen tonischen BCR-Signalings über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (Corso et al. 2016; Schmitz et al. 2012). Ein derartiger Zusammenhang wurde bereits beim Ovarialkarzinom beschrieben, wo eine Stimulierung des PI3K/AKT-Signalwegs durch Östrogen zu einer verstärkten Proteinexpression von ACTN4 führte (Lu et al. 2014). Auch wurde bereits gezeigt, dass α -Aktinine an eine Untereinheit der PI3-Kinase binden können (Shibasaki et al. 1994) und dass sie durch die Bindung an die Phosphoinositide PIP2 und PIP3 (Substrat und Produkt der PI3-Kinase) in ihrer Aktivität sowie im Bindungsverhalten an Aktinfilamente reguliert werden (Fralely et al. 2005; Fukami et al. 1992). Zudem wurde für ACTN4 eine Interaktion mit der Kinase AKT1 (Proteinkinase B), nachgewiesen. Dabei reguliert ACTN4 die Lokalisation und Funktion von AKT1, ein Gen-Knockdown von ACTN4 führt zu einer Abnahme der Phosphorylierung von AKT1 und zur verminderten Zellproliferation (Ding et al. 2006). All dies deutet darauf hin, dass die hohe Proteinexpression von ACTN4 beim BL im Zusammenhang mit dem für diese Entität charakteristischen tonischen BCR-Signaling über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

steht. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen um diesen Zusammenhang zu verifizieren und die genaue Funktion von ACTN4 beim BL zu erforschen.

Entsprechend der Funktion von ACTN4 im Rahmen der Zellmigration hat die Überexpression des Proteins bei zahlreichen Karzinomen einen ungünstigen Effekt auf das invasive Wachstum, die Metastasierung, sowie die Prognose (Honda 2015; Honda et al. 1998; Kakuya et al. 2017; Kikuchi et al. 2008; Liu et al. 2017; Otey et al. 2004; Yamamoto et al. 2009). Auch bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) wurde eine erhöhte Proteinexpression als potentieller prognostischer Risikofaktor identifiziert (Li et al. 2017). Dies konnte für B-Zell-Lymphome am untersuchten Kollektiv nicht bestätigt werden. Eine ACTN4-Färbung war hier insgesamt sogar mit einem etwas besseren Gesamtüberleben verbunden, wenn auch ohne Signifikanz. Je nach untersuchter Entität zeigten sich z. T. deutliche Unterschiede in der prognostischen Auswirkung einer ACTN4-Expression. Zwar hatten bei MCL und DLBCL positive bzw. stark positive Fälle ein signifikant besseres Gesamtüberleben, jedoch umfassten die jeweiligen Subgruppen nur 6 Fälle, sodass diese Resultate möglicherweise durch Zufall zustande kamen. Es ist insgesamt fraglich, ob eine Überexpression von ACTN4 bei B-Zell-Lymphomen prognostische Relevanz besitzt. Da bei Karzinomen die ungünstige Prognose bei erhöhter Proteinexpression v. a. auf der Assoziation mit fortgeschrittenen Tumorstadien (Liu et al. 2017), Chemotherapieresistenz (Yamamoto et al. 2009) sowie invasivem Wachstum und Metastasierung (Huang et al. 2019; Kikuchi et al. 2008; Liu et al. 2017) beruht, empfiehlt es sich, auch bei Lymphomen den Zusammenhang zwischen ACTN4-Expression und klinischen Parametern, wie etwa dem Ann-Arbor-Stadium, zu untersuchen.

4.4 ARFGEF2

ARFGEF2 (ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2) zählt zur Familie der hochmolekularen Guanin Nukleotid-Exchangefaktoren (GEFs). Deren Hauptaufgabe besteht in der Aktivierung von Adenosin-Ribosylierungsfaktoren (Arfs) im Rahmen des intrazellulären Vesikeltransports durch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) mit Guanosintriphosphat (GTP) (Casanova 2007). Arfs sind durch die Rekrutierung von Proteinen zu Membranen des Golgi-Apparates wesentlich an der Bildung sog. *coated vesicles* beteiligt (Jackson 2018). ARFGEF2 ist v. a. im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und in Endosomen lokalisiert und interagiert bevorzugt mit den Isoformen Arf1 und Arf3 (Casanova 2007). Mutationen im *ARFGEF2*-Gen auf Chromosom 20 sind für eine Form der autosomal rezessiv vererbten periventrikulären nodulären Heterotopie (BPNH) verantwortlich, einer schweren Malformation des zerebralen Kortex, die mit Mikrozephalie, mentaler Retardierung und motorischen Störungen einhergeht (Sheen et al. 2004).

Bis dato ist nur wenig über die Rolle von ARFGEF2 in Malignomen bekannt, da dazu kaum publizierte Studien existieren. Beim Pankreaskarzinom ließ sich eine Proteinexpression von ARFGEF2 im Tumorgewebe nachweisen und es fanden sich im Pankreassekret deutlich

höhere Proteinlevel im Vergleich zu Pankreatitis oder gesundem Pankreasgewebe (Park et al. 2011), was auf eine tumorassoziierte Expression von ARFGEF2 hinweist. Im Kontext maligner B-Zell-Lymphome wurde das Protein erstmals von Corso et al. (2016) beschrieben, wobei eine BCR-abhängige Regulierung beim BL nachgewiesen wurde.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Proteinexpression im Lymphomgewebe für BL und DLBCL untersucht, das Ergebnis entspricht dabei in etwa dem Resultat der hier durchgeführten Expressionsanalyse (Corso et al. 2016). So waren im untersuchten Kollektiv BL und DLBCL ähnlich häufig positiv (89% und 87%) und stark positiv (28% und 27%) gefärbt und insgesamt fand sich bei den hochproliferativen Entitäten signifikant häufiger eine positive ARFGEF2-Färbung als bei den übrigen Lymphomen. Auffallend war auch, dass sich bei B-CLL und MCL quasi keine Färbung zeigte, während FL, MZL, MM und HL in 35 – 62% aller Fälle positiv gefärbt waren. Diese z. T. deutlichen Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den Entitäten deuten darauf hin, dass die Rolle von ARFGEF2 im Kontext maligner B-Zell-Lymphome differenziert zu betrachten ist. Zwar wird ARFGEF2 nicht entitätsspezifisch exprimiert, jedoch scheint eine Proteinexpression in erster Linie für hochproliferative Lymphome charakteristisch zu sein. Es wurde daher spekuliert, ob die Expression von ARFGEF2 bei Lymphomen generell im Zuge einer verstärkten Zellproliferation auftritt. Allerdings ließ sich diesbezüglich keine signifikante Assoziation mit dem Ki67-Proliferationsindex nachweisen.

Trotz des vergleichbaren Expressionsmusters bei BL und DLBCL ist ein Gen-Knockdown von *ARFGEF2* lediglich für BL-Zellen toxisch, nicht jedoch für GCB-DLBCL-Zellen (Corso et al. 2016). Bei beiden Entitäten ist ein tonisches BCR-abhängiges Grundsignal essentiell für das Überleben der Tumorzellen (Corso et al. 2016; Havranek et al. 2017), allerdings scheint das Signaling dabei über unterschiedliche Effektorproteine vermittelt zu werden. Dies würde zumindest die BL-spezifische essentielle Funktion von ARFGEF2 erklären. Ob und wie genau ARFGEF2 mit dem für das BL charakteristischen tonischen BCR-Signaling in Verbindung steht, ist bis dato unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der ARFGEF2-vermittelte intrazelluläre Vesikeltransport auch Komponenten des BCR-Signalwegs umfasst. So konnte ein Zusammenhang zwischen intrazellulärem Vesikeltransport und BCR-Signaling bereits für das Adaptorprotein SLP-65, ein Substrat der Tyrosinkinase SYK, nachgewiesen werden (Engelke et al. 2014). Möglicherweise führt eine verstärkte Expression von ARFGEF2 in den Lymphomzellen über die Bereitstellung von Effektorproteinen zu einem stärkeren BCR-Signaling und fördert dadurch letztlich die Zellproliferation. Beim BL könnte dieser Mechanismus eine essentielle Funktion für das zelluläre Überleben darstellen.

Zum prognostischen Einfluss einer Proteinexpression von ARFGEF2 bei Tumorpatienten existieren bis dato keine Publikationen. In dieser Arbeit wurde erstmals der Zusammenhang zwischen ARFGEF2-Expression und dem Gesamtüberleben von Lymphom-Patienten untersucht. Insgesamt zeigte sich dabei eine signifikante Verschlechterung der Gesamtprognose mit zunehmender Stärke der Proteinexpression. Dieses Ergebnis ist

jedoch hauptsächlich auf den hohen Anteil ARFGEF2-positiver Fälle bei BL und DLBCL zurückzuführen, die im Vergleich zu anderen Entitäten generell ein schlechteres Gesamtüberleben aufweisen. In der Gruppe der hochmalignen Lymphome bestand zudem eine positive Korrelation zwischen Stärke der ARFGEF2-Expression und ungünstiger Gesamtprognose, allerdings fehlte hierfür die Signifikanz. Auch die entitätsspezifischen Analysen erbrachten keine signifikanten Resultate, deuten jedoch ebenfalls darauf hin, dass eine ARFGEF2-Expression bei Lymphom-Patienten tendenziell mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist. Dies stützt die o. g. These, dass der ARFGEF2-vermittelte Vesikeltransport die Zellproliferation fördert. Bei fehlender Signifikanz sind die Ergebnisse jedoch lediglich als Trend zu werten, es sollten weitere entitätsspezifische Untersuchungen an größeren Kollektiven erfolgen.

4.5 BCL11A

BCL11A (B-cell lymphoma 11A) zählt zur Gruppe der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und besitzt eine essentielle Funktion im Rahmen der Entwicklung lymphatischer Vorläuferzellen und früher B-Lymphozyten im Knochenmark (Yu et al. 2012). Immunhistochemisch lässt sich eine nukleäre Proteinexpression hauptsächlich in B-Lymphozyten im Keimzentrum peripherer Lymphknoten nachweisen (Pulford et al. 2006). Durch alternatives Splicing der pre-mRNA existieren vier verschiedene Isoformen von BCL11A, die je nach Größe des Transkripts als BCL11A-XL, -L, -S und -XS bezeichnet werden (Liu et al. 2006).

Auch in malignen lymphatischen Zellen scheint BCL11A eine essentielle Rolle zu spielen. So wirkte sich ein Gen-Knockdown beim BL toxisch auf das zelluläre Überleben aus (Huellein et al. 2019). Es ist naheliegend, dass das BCR-Signaling in den Lymphomzellen die BCL11A-vermittelte Transkription essentieller Gene fördert, da BCL11A in BL-Zellen nachweislich in Abhängigkeit vom BCR reguliert wird (Corso et al. 2016). Allerdings ist bis dato unklar, ob und inwieweit dieser Mechanismus für das tonische BCR-Signaling beim BL spezifisch ist.

Zumindest die Expression des Proteins fand sich in mehr oder weniger gleichem Ausmaß bei verschiedenen B-Zell-Lymphomen (BL, DLBCL, B-CLL, FL, MCL, MZL). Dabei zeigte maximal die Hälfte der Fälle einer Entität eine positive Färbung. Folglich scheint die Proteinexpression weder entitätsspezifisch, noch spezifisch für hoch- oder niedrigmaligne Lymphome zu sein. Passend dazu wird BCL11A auch in nicht-malignen B-Zellen relativ unspezifisch exprimiert (Pulford et al. 2006). Die quasi fehlende Proteinexpression beim HL steht im Einklang mit der Tatsache, dass in HRS-Zellen zahlreiche B-Zell-spezifische Gene herunterreguliert sind (Schwering et al. 2003). Zwar finden sich beim HL und anderen B-Zell-Lymphomen (DLBCL, PMBCL, FL) nicht selten Amplifikationen des Genlocus 2p16.1, der die Gene von BCL11A und REL, einem Transkriptionsfaktor der NFκB-Familie, umfasst (reviewed in Kober-Hasslacher et al. 2019). Allerdings ist aufgrund der genetischen Nähe

von *BCL11A* und *REL* fraglich, ob *BCL11A* das Hauptziel dieser Alterationen darstellt (Martín-Subero et al. 2002), zumal *REL* direkt am chronisch aktiven BCR-Signaling maligner Lymphome beteiligt ist (Kober-Haslacher et al. 2019). Die fehlende Expression in Plasmazellen bzw. MM-Zellen ist wahrscheinlich bedingt durch eine Herunterregulierung des Proteins im Rahmen der Plasmazelldifferenzierung, wobei *BCL11A* durch den Transkriptionsfaktor Blimp1 negativ reguliert wird (Sciammas et al. 2004). Insgesamt kommen die wenigen existierenden Publikationen zur *BCL11A*-Expression in B-Zell-Lymphomen mittels Western-Blot (Liu et al. 2006) und IHC-Färbung (Pulford et al. 2006) zu ähnlichen Ergebnissen. Letztere beschreibt für einige Entitäten zwar *BCL11A*-positive Anteile von > 90%, allerdings wurde dabei ein für die *BCL11A*-XL-Isoform spezifischer Antikörper verwendet und pro Entität wurden meist nur wenige Fälle immunhistochemisch untersucht.

In B-Lymphozyten des folliculären Keimzentrums sind die Transkriptionsfaktoren *BCL11A* und *BCL6* innerhalb subnukleärer Kompartments (*paraspeckles*) co-lokalisiert und interagieren dort miteinander (Liu et al. 2006; Miles et al. 2005; Nakamura et al. 2000). Pulford et al. (2006) beschreiben in diesem Zusammenhang beim DLBCL eine positive Korrelation der Proteinexpressionen von *BCL11A*-XL und *BCL6*. Auch am untersuchten DLBCL-Kollektiv ließ sich eine signifikante Korrelation von *BCL11A*- und *BCL6*-Expression nachweisen. Ebenso war bei BL und FL, trotz fehlender Signifikanz, eine derartige Assoziation deutlich erkennbar. Die Interaktion der Transkriptionsfaktoren *BCL11A* und *BCL6* kommt bei Keimzentrumslymphomen folglich auch in der gemeinsamen Proteinexpression zum Ausdruck.

In der Überlebenszeitanalyse am DLBCL-Kollektiv war das Gesamtüberleben der Patienten umso länger, je stärker die *BCL11A*-Expression im Gewebe war, allerdings war dieser prognostische Unterschied nicht signifikant. Gleiches beschreiben Pulford et al. (2006) für die Expression von *BCL11A*-XL beim DLBCL. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass auch eine *BCL6*-Expression bei DLBCL-Patienten mit einem tendenziell besseren Gesamtüberleben verbunden ist (siehe 3.3.4). Aufgrund der Korrelation von *BCL11A*- und *BCL6*-Expression, könnte die günstigere Prognose somit auch durch die Co-Expression von *BCL6* bedingt sein. Bei den übrigen Entitäten war eine (stark) positive Färbung des Proteins mal mit einer tendenziell besseren (MCL), mal mit einer schlechteren (B-CLL, FL, BL) Prognose verbunden, allerdings bei jeweils fehlender Signifikanz.

Auch bei verschiedenen Karzinomen, die im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöhte Level von *BCL11A* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene aufweisen, scheint sich die Proteinexpression unterschiedlich auf die Prognose auszuwirken (Jiang et al. 2013; Zhu et al. 2019). So trägt sie beim Mammakarzinom über eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zur Tumorzellproliferation, Invasion und Metastasierung bei und ist mit einem ungünstigen Gesamtüberleben assoziiert (Chen et al. 2018; Zhu et al. 2019). Dagegen scheint eine starke *BCL11A*-Expression beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) einen protektiven Effekt zu haben, denn es besteht eine signifikante Korrelation zu

geringerem Lymphknotenbefall und frühen Krankheitsstadien, in denen NSCLC-Patienten mit starker BCL11A-Expression zudem ein signifikant besseres Gesamtüberleben aufweisen (Jiang et al. 2013). Im Zusammenhang mit NSCLC wurde von Jiang et al. (2013) über eine mögliche duale Rolle von BCL11A spekuliert: So könnte BCL11A u. a. durch die negative Regulierung des CDK-Inhibitors p21 sowie des Tumorsuppressors p53 zur Tumorentstehung beitragen (Yin et al. 2009; Yu et al. 2012), andererseits jedoch in Tumoren einen protektiven Effekt bzgl. LK-Metastasierung und Gesamtüberleben haben. Ähnliches wäre auch für B-Zell-Lymphome denkbar. BCL11A könnte einerseits zur Lymphomentstehung beitragen und – möglicherweise im Rahmen des dysregulierten bzw. tonischen BCR-Signalings – das Überleben der Tumorzellen sichern, andererseits jedoch das aggressive Wachstum und die Ausbreitung verlangsamen und somit die Prognose günstig beeinflussen. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob auch bei Lymphomen eine Assoziation zwischen BCL11A-Expression und klinischen Parametern besteht. Letztlich ist anhand der Resultate aber auch nicht auszuschließen, dass eine BCL11A-Expression keinen wesentlichen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat.

4.6 CARD11

CARD11 (Caspase recruitment domain containing protein 11) zählt zur Proteinfamilie der membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUK) und ist hauptsächlich im lymphatischen Gewebe exprimiert (Blonska et al. 2011; Wang et al. 2001). In B- und T-Lymphozyten ist CARD11 als sog. Gerüstprotein (*scaffold protein*) wesentlich an der Antigenrezeptor-vermittelten Aktivierung des NFκB-Signalwegs im Rahmen der adaptiven Immunantwort beteiligt. Dabei bildet CARD11 mit BCL10 und MALT1 den sog. CBM-Komplex, der – zusammen mit weiteren assoziierten Proteinen – eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion einnimmt (Bedsaul et al. 2018; Thome et al. 2010). Die Regulation von CARD11 erfolgt mittels reversibler Phosphorylierung. Eine Aktivierung des Proteins führt zur Konformationsänderung, sodass CARD11 mittels CARD-Domäne an BCL10 und weitere Proteine binden kann (Bedsaul et al. 2018; Thome et al. 2010; Thys et al. 2018). Eine konstitutiv aktive Form von CARD11 führt über eine verstärkte Aktivierung der NFκB-Transkriptionsfaktoren zur raschen, unkontrollierten Zellproliferation und der Entstehung von Lymphomen mit aggressivem Phänotyp (Knies et al. 2015). Besonders beim ABC-Typ des DLBCL spielt das CARD11-vermittelte NFκB-Signaling eine essentielle Rolle (Davis et al. 2010). Hier finden sich in ca. 10% der Fälle Gain-of-Function-Mutationen im *CARD11*-Gen, die wesentlich zum chronisch aktiven BCR-Signaling beitragen (Compagno et al. 2009; Lenz et al. 2008). Während derartige Mutationen auch bei bis zu 6% der MCL sowie für einige T-Zell-Lymphomen beschrieben werden, sind sie beim BL nicht zu finden (Juilland et al. 2016; Wu et al. 2016). Allerdings hat auch beim BL ein Knockdown von *CARD11* einen toxischen Effekt auf die Tumorzellen (Huellein et al. 2019). Dies ist interessant, da das Überleben der BL-Zellen nicht vom chronisch aktiven BCR-Signaling über den NFκB-

Signalweg abhängt, sondern wesentlich auf einem tonischen BCR-Signaling über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg beruht (Dave et al. 2006; Schmitz et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass CARD11 auch im Rahmen des tonischen BCR-Signaling beim BL mittels reversibler Phosphorylierung an der Position S886 signifikant reguliert wird (Corso et al. 2016). Allerdings wurde diese Phosphorylierungsstelle bis dato nicht im Rahmen der CARD11-Aktivierung beschrieben (Thome et al. 2010; Thys et al. 2018), sodass unklar ist, inwieweit eine Phosphorylierung von S886 die CARD11-Aktivität beeinflusst, hier bedarf es weiterer Untersuchungen. CARD11 scheint jedenfalls beim BL eine von der NFκB-Aktivierung unabhängige Funktion zu besitzen, die essentiell für das Überleben der Tumorzellen ist und möglicherweise BCR-abhängig reguliert wird.

Immunhistochemisch zeigte sich für CARD11 bei verschiedenen B-Zell-Lymphomen eine weitestgehend homogene Proteinexpression. So waren DLBCL, FL und MZL in etwa zwei Drittel, MCL, B-CLL und BL in ca. der Hälfte und HL und MM in ca. einem Drittel der Fälle positiv gefärbt. Folglich scheint CARD11 bei Lymphomen weder entitätsspezifisch, noch proliferationsassoziiert exprimiert zu werden. Dies entspricht auch der generellen Expression des Proteins in lymphatischem Gewebe (Blonska et al. 2011; Egawa et al. 2003). Auffallend war auch, dass im Kollektiv nur sehr wenige Fälle stark positiv gefärbt waren. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass in B-Zell-Lymphomen die onkogene Rolle von CARD11 nicht auf einer Überexpression des Proteins, etwa durch chromosomale Translokationen und Amplifikationen im *CARD11*-Gen, beruht, sondern BCR-abhängige Mechanismen sowie Gain-of-Function-Mutationen zu dessen verstärkter Aktivierung führen (Bedsaul et al. 2018; Onaindia et al. 2017). Trotz der zentralen Rolle im BCR-Signaling existieren nur wenige Publikationen zur CARD11-Expression im Gewebe humaner B-Zell-Lymphome. Ähnlich häufig wird eine Proteinexpression für DLBCL (65% vs. 66%) und gastrale MZL (60% vs. 70%) beschrieben (Nakamura et al. 2005; Zhao et al. 2016). Für das HL konnte in einer vergleichbaren IHC-Analyse keine Proteinexpression nachgewiesen werden (Re et al. 2008). Zwar sind auch HRS-Zellen auf ein starkes NFκB-Signaling angewiesen, jedoch erfolgt die NFκB-Aktivierung bei fehlendem BCR sowie der Herunterregulierung B-Zell-spezifischer Gene über alternative Signalwege (Bräuninger et al. 2006; Jost et al. 2007; Schwering et al. 2003).

Ein genereller Zusammenhang zwischen CARD11-Expression und Gesamtüberleben der Patienten war am untersuchten Lymphom-Kollektiv nicht erkennbar. Insgesamt hatten negative, mäßig und stark positive Fälle eine quasi identische Gesamtprognose. Je nach Lymphom-Entität war eine Expression des Proteins mal mit einer besseren (DLBCL, MCL), mal mit einer schlechteren (BL, FL) Prognose verbunden. Dabei waren zwar teils deutliche prognostische Unterschiede erkennbar, jedoch ließ sich dafür keine Signifikanz nachweisen. Beim DLBCL war die Prognose der Patienten umso besser, je stärker CARD11 im Tumorgewebe exprimiert war. Dies überrascht zunächst, da aufgrund der zentralen Rolle von CARD11 im chronisch aktiven BCR-Signaling besonders beim prognostisch ungünstigeren ABC-Subtyp eine CARD11-Expression zu erwarten wäre

(Davis et al. 2010; Frick et al. 2011). Auch steht das Resultat im Widerspruch zu einer Studie von Zhao et al. (2016), wo die CARD11-Expression beim DLBCL mit einem signifikant kürzeren ereignisfreien Überleben korrelierte. Allerdings spiegelt sich die onkogene Rolle von CARD11, wie oben erwähnt, meist nicht in einer verstärkten Proteinexpression wider. Auch haben CARD11-Mutationen, wie sie beim ABC-DLBCL zu finden sind, vermutlich keine signifikante Auswirkung auf die Gesamtprognose sowie das ereignisfreie Überleben von DLBCL-Patienten, sondern sind lediglich mit höheren Krankheitsstadien assoziiert (Dong et al. 2011). Beim BL scheint CARD11 eine bis dato unbekannte essentielle Funktion zu besitzen, die sich von der Funktion beim ABC-DLBCL unterscheidet (siehe oben). Dies könnte die unterschiedliche prognostische Auswirkung der Proteinexpression bei BL und DLBCL erklären. Bei jeweils fehlender Signifikanz lässt sich darüber jedoch nur spekulieren, hier bedarf es weiterer Analysen an größeren Kollektiven. Insgesamt steht die scheinbar entitätsspezifische prognostische Auswirkung der CARD11-Expression im Widerspruch zur weitestgehend homogen und unspezifisch verteilten Proteinexpression in verschiedenen Lymphom-Entitäten. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine CARD11-Expression – wie die Analyse am Gesamtkollektiv vermuten lässt – keine prognostische Relevanz bei Lymphom-Patienten besitzt.

4.7 CDKN1B

CDKN1B (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), auch P27^{Kip1} bzw. P27 genannt, zählt zur Cip/Kip-Familie der CDK-Inhibitoren, die eine wichtige Funktion in der Zellzyklusregulierung einnehmen (Besson et al. 2008). Die Rolle von CDKN1B beruht dabei v. a. auf der Inhibierung des Cyclin E/CDK2-Komplexes in der G0/G1-Phase des Zellzyklus, was den Übergang in die S-Phase verhindert (Polyak et al. 1994). Eine hohe CDKN1B-Konzentration findet sich dementsprechend v. a. in ruhenden Zellen in der G0-Phase. Mitogene Stimuli führen zur signifikanten Abnahme der Proteinexpression in der G1- und S-Phase, wohingegen die mRNA-Level in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus weitestgehend konstant bleiben (Hengst et al. 1996; Millard et al. 1997). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die zelluläre CDKN1B-Konzentration nur geringfügig transkriptionell, sondern hauptsächlich über die Degradierung des Proteins durch den SCF^{SKP2}-Ubiquitin-Ligase-Komplex reguliert wird (Abukhdeir et al. 2008; Tsvetkov et al. 1999).

Eine Inaktivierung von CDKN1B fördert die unkontrollierte Zellproliferation und dadurch die Entstehung maligner Neoplasien. Dementsprechend findet sich eine stark reduzierte bis fehlende Proteinexpression bei ca. 50% aller humanen Malignome, u. a. bei Karzinomen von Lunge, Brust, Kolon, Ovar, Ösophagus, Schilddrüse und Prostata sowie bei ZNS-Tumoren und Lymphomen (Slingerland et al. 2000; Viglietto et al. 2002). Wie im gesunden lymphatischen Gewebe ist bei B-Zell-Lymphomen die CDKN1B-Expression invers proliferationsassoziiert, was sich durch die Funktion von CDKN1B als Checkpoint-Inhibitor bei der Zellteilung erklären lässt (Erlanson et al. 1998; Sánchez-Beato et al. 1997). So

waren im untersuchten Kollektiv indolente Lymphome (B-CLL, FL und MZL) in etwas mehr als der Hälfte aller Fälle CDKN1B-positiv gefärbt, wohingegen hochmaligne Lymphome (BL und DLBCL) in weniger als 25% der Fälle positiv waren. Dieses Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten aus ähnlichen Untersuchungen (Chiarle et al. 2002; Erlanson et al. 1998; Latres et al. 2001; Quintanilla-Martinez et al. 1998; Sáez et al. 1999; Sánchez-Beato et al. 1997). Da die Zellteilungsrate in aggressiven Keimzentrumslymphomen besonders hoch ist, muss v. a. dort die Zellzyklusregulierung durch CDKN1B umgangen werden, um die starke Zellproliferation zu gewährleisten. Die Inaktivierung erfolgt dabei meist durch eine verstärkte Proteolyse mittels SCF^{SKP2}-Ubiquitin-Ligase-Komplex (Viglietto et al. 2002), sodass die Expression von CDKN1B in Lymphomen indirekt mit der SKP2-Expression korreliert (Latres et al. 2001). Trotz der inversen Korrelation zwischen CDKN1B-Expression und Malignitätsgrad (indolent vs. hochmaligne) ließ sich am Kollektiv für einzelne Entitäten kein signifikanter Zusammenhang mit dem Ki67-Proliferationsindex nachweisen. Eine Untersuchung von Sáez et al. (1999) am DLBCL ließ ebenfalls keine derartige Assoziation erkennen. Vermutlich ist die Varianz der Ki67-Indizes innerhalb einer Entität zu gering um signifikante Resultate zu erzielen.

Die niedrige bis fehlende Proteinexpression beim BL steht möglicherweise im Zusammenhang mit dem für diese Entität charakteristischen tonischen BCR-Signaling über den PI3K/AKT-Signalweg sowie der Überexpression von MYC (Schmitz et al. 2012). So wurde gezeigt, dass beide Mechanismen v. a. über die verstärkte Degradierung mittels SCF^{SKP2}-Ubiquitin-Ligase-Komplex zur Inhibierung von CDKN1B führen (García-Gutiérrez et al. 2019 und Liang et al. 2003). Dabei spielt wahrscheinlich die PI3K-abhängige Hochregulierung von SKP2 eine entscheidende Rolle (Liang et al. 2003). Die positive CDKN1B-Färbung bei einigen wenigen Fällen von BL und DLBCL könnte wiederum auf einer funktionellen Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 bei diesen Entitäten beruhen. Dieser Zusammenhang erwies sich bereits als signifikant, wobei spekuliert wurde, dass die Hochregulierung von CDKN1B einen ineffektiven kompensatorischen Mechanismus darstellen könnte, um die p53-Inaktivierung auszugleichen (Sánchez-Beato et al. 1997).

Im Gegensatz zur Funktion von CDKN1B als Tumorsuppressor scheint die Genexpression für das Wachstum und Überleben von Tumorzellen essentiell zu sein (Abukhdeir et al. 2008). Beispielsweise tragen beim Prostatakarzinom niedrige Gen-Level an *CDKN1B* zum Tumorwachstum bei, wohingegen ein kompletter Gen-Knockout das Wachstum inhibiert (Gao et al. 2004). Dies zeigte sich auch beim BL, wo ein Gen-Knockdown sich toxisch auf das Überleben der Tumorzellen auswirkte (Huellein et al. 2019). Passend dazu erfolgt die Inaktivierung von CDKN1B, wie bereits erwähnt, v. a. über den Abbau des Proteins, während die mRNA-Level weitestgehend konstant bleiben (Viglietto et al. 2002).

Neben der inhibitorischen Wirkung könnte CDKN1B zudem auch ein gewisses onkogenes Potential besitzen. So kann CDKN1B auf den CyclinD/CDK4/6-Komplex auch nicht-inhibitorisch wirken, wobei Phosphorylierungen an den Positionen Y88 und Y89 v. a. unter Wachstumsbedingungen mit der nicht-inhibitorischen Wirkung einhergehen (James et al.

2008). Interessanterweise phosphoryliert auch die Tyrosinkinase LYN, die in B-Lymphozyten wesentlich am BCR-Signaling beteiligt ist, CDKN1B an Position Y88 (Grimmler et al. 2007). In Lymphomzellen könnte diese LYN-abhängige Phosphorylierung über eine vermehrt non-inhibitorischen Wirkung von CDKN1B auf den Cyclin D/CDK4/6-Komplex zur Zellproliferation beitragen. Beim BL wird CDKN1B zudem an Position S140 signifikant BCR-abhängig phosphoryliert (Corso et al. 2016). Eine Phosphorylierung von S140 durch die Kinase ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*) führt zur Stabilisierung von CDKN1B v. a. nach DNA-Doppelstrangbrüchen (Cassimere et al. 2016), sodass dieser Mechanismus für die Lymphomzellen einen gewissen Überlebensvorteil darstellen könnte.

Eine niedrige Proteinexpression von CDKN1B ist bei Tumoren generell mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und einem schlechteren Outcome assoziiert (Lloyd et al. 1999 und Viglietto et al. 2002), was sich durch den Wegfall der CDKN1B-abhängigen Zellzyklusregulierung begründen lässt. So geht eine reduzierte bis fehlende Proteinexpression u. a. bei Karzinomen von Lunge, Kolon und Magen mit einem kürzeren Gesamtüberleben einher (Esposito et al. 1997; Gao et al. 2013; Hershko et al. 2006; Sun et al. 2016). Beim Mammakarzinom ist sie zudem ein unabhängiger, prognostisch ungünstiger Faktor für das ereignisfreie sowie das Gesamtüberleben der Patienten (Guan et al. 2010).

Auch bei B-Zell-Lymphomen korreliert eine niedrige CDKN1B-Expression signifikant mit einer ungünstigen Prognose (Erlanson et al. 1998; Ma et al. 2016). Dies zeigte sich – wenn auch ohne statistische Signifikanz – am untersuchten Kollektiv, wo Patienten mit negativer CDKN1B-Expression ein erkennbar schlechteres Gesamtüberleben aufwiesen. Ebenso ließ sich dieser Zusammenhang am DLBCL-Kollektiv nachweisen. Zu dem gleichen Ergebnis kam eine Untersuchung von Seki et al. (2010), in der eine niedrige CDKN1B-Expression bei DLBCL-Patienten therapieunabhängig mit einem kürzeren Gesamtüberleben korrelierte. Zwar wird in der Literatur an anderer Stelle auch eine signifikant schlechtere Gesamtprognose für CDKN1B-positive DLBCL-Fälle beschrieben, allerdings galt in der zugrundeliegenden Untersuchung ein Fall bereits als positiv gefärbt, wenn mehr als 5% der Tumorzellen eine CDKN1B-Expression aufwiesen (Sáez et al. 1999). Bei niedrigmalignen Lymphomen wie B-CLL, FL und MZL war kaum eine prognostische Auswirkung der CDKN1B-Expression erkennbar. Ein Grund dafür könnte die niedrige Mortalität im Beobachtungszeitraum sein. Möglicherweise wirkt sich die Proteinexpression bei indolenten Lymphomen aber auch nicht so stark auf die Prognose aus, da diese Entitäten aufgrund der geringeren Zellteilungsrate nicht so sehr auf den Wegfall der Checkpoint-Inhibierung durch CDKN1B angewiesen sind. So ist die Krankheitsprogression bei indolenten Lymphomen i. d. R. weniger auf eine exzessive Proliferation als vielmehr auf die Akkumulation von Tumorzellen zurückzuführen. In einer Analyse von Vrhovac et al. (1998) korrelierte eine CDKN1B-Expression bei B-CLL-Patienten sogar signifikant mit einer schlechteren Prognose, wobei spekuliert wurde, dass eine höhere CDKN1B-Expression die Tumorzellen womöglich vor Apoptose schützt.

4.8 MTHFD1, MTHFD2, SHMT2

Der 1C-Metabolismus ist für die Biosynthese von Nukleotiden essentiell. Besonders in proliferierenden Zellen werden mithilfe des Co-Faktors Folsäure 1C-Kohlenstoffeinheiten für die Purin- und Thymidinsynthese bereitgestellt. Hierbei katalysieren die Enzyme MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2 entscheidende Reaktionen (Ducker et al. 2017b). Das mitochondriale Enzym MTHFD2 besitzt wie das korrespondierende zytoplasmatische Enzym MTHFD1 eine Dehydrogenase- und Cyclohydrolase-Aktivität. Beide Enzyme sind an der Modifikation von an Tetrahydrofolsäure (THF) gebundenen 1C-Kohlenstoffeinheiten beteiligt (Vazquez et al. 2013). SHMT2 spielt durch die Konversion von Serin zu Glycin eine entscheidende Rolle bei der Produktion von 1C-Kohlenstoffeinheiten (Stover et al. 1990). Rasch proliferierende Zellen sind zur Synthese neuer DNA- und RNA-Bausteine besonders auf den 1C-Metabolismus angewiesen. Dementsprechend findet sich in Tumorgewebe meist eine im Vergleich zu Normalgewebe erhöhte Aktivität bzw. Überexpression von MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2 (Ding et al. 2018; Lee et al. 2014; Nilsson et al. 2014). Beim hier untersuchten Lymphom-Kollektiv zeigte sich eine hohe Enzymexpression v. a. bei den hochmalignen Entitäten sowie beim HL. Am deutlichsten war dies für die Färbung mit MTHFD2 erkennbar, wo BL, DLBCL und HL signifikant häufiger positiv waren als der Rest (40 – 67% vs. < 10%). Auch SHMT2 wurde bei BL und DLBCL im Vergleich zu den übrigen Entitäten signifikant häufiger exprimiert, einzig HL zeigten einen ähnlich hohen Anteil an positiven Fällen. Die hohe Proteinexpression von MTHFD2 und SHMT2 v. a. bei den hochmalignen Lymphomen steht im Einklang mit der Tatsache, dass die Expression dieser Enzyme in Tumorgewebe generell mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert ist (Gustafsson Sheppard et al. 2015; Lee et al. 2014). Diesbezüglich wurde gezeigt, dass die Proteinexpression von MTHFD2 unabhängig von der enzymatischen Dehydrogenase-Aktivität zur verstärkten Proliferation der Tumorzellen führt (Gustafsson Sheppard et al. 2015). Allerdings ließ sich für MTHFD2 und SHMT2 bei keiner Entität eine signifikante Korrelation zwischen Proteinexpression und Ki67-Proliferationsrate nachweisen, was vermutlich durch die niedrige Fallzahl und die nur geringen Unterschiede in der Proliferation innerhalb einer Subgruppe bedingt ist. Für die Expression von MTHFD1 war kein signifikanter Unterschied zwischen hoch- und niedrigmalignen Lymphomen feststellbar. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass v. a. die mitochondriale Komponente des 1C-Metabolismus zur gesteigerten Zellproliferation beiträgt.

Für die rasch proliferierenden Lymphomzellen beim BL ist ein Knockdown der Gene *MTHFD1*, *MTHFD2* und *SHMT2* jeweils stark toxisch (Huellein et al. 2019). Diese essentielle Funktion spiegelt sich auch in der Proteinexpression wider. So wiesen zwei Drittel der BL-Fälle eine MTHFD1- und MTHFD2-Expression auf und alle Fälle waren SHMT2-positiv gefärbt. Dabei bleibt jedoch anzumerken, dass nur für *MTHFD1* und *SHMT2* eine BL-spezifische essentielle Funktion nachgewiesen werden konnte (Huellein et al. 2019). MTHFD2 scheint dagegen auch bei Karzinomen eine ähnlich wichtige Funktion zu besitzen (Nilsson et al. 2014). Im Gegensatz zu MTHFD2 und SHMT2 wird einzig MTHFD1

beim BL signifikant im Rahmen des tonischen BCR-Signalings mittels reversibler Phosphorylierung reguliert (Corso et al. 2016). Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch MTHFD2 in B-Lymphozyten bei Stimulierung des BCR verstärkt exprimiert wird und die mRNA aller drei Proteine im Rahmen der B-Zell-Aktivierung mittels CD40L signifikant hochreguliert wird (Wang et al. 2019). Es ist daher anzunehmen, dass alle drei Proteine in mehr oder weniger starkem Ausmaß bei B-Zell-Aktivierung über einen verstärkten 1C-Metabolismus die Proliferation der Lymphozyten begünstigen.

Die hohe SHMT2-Expression beim BL steht vermutlich im Zusammenhang mit der für diese Entität charakteristischen Überexpression von MYC, da der mitochondriale 1C-Metabolismus durch MYC reguliert wird und SHMT2 ein direktes Zielgen von MYC darstellt (Nikiforov et al. 2002; Pikman et al. 2016; Shuvalov et al. 2017; Wang et al. 2019). Eine mögliche Korrelation zwischen MYC-Expression und der Expression von SHMT2, MTHFD1 und MTHFD2 ließ sich für BL aufgrund fehlender MYC-negativer Fälle nicht untersuchen. Da jedoch alle BL sowohl MYC- als auch SHMT2-positiv gefärbt waren, kann man hier indirekt auf einen Zusammenhang schließen. Darüber hinaus ließ sich eine signifikante Korrelation beim DLBCL beobachten. MYC scheint somit insgesamt einen positiven Einfluss auf die Proteinexpression von SHMT2, MTHFD1 und MTHFD2 zu haben.

Interessanterweise zeigten HRS-Zellen ähnlich häufig eine Expression der drei Enzyme wie die rasch proliferierenden Zellen hochmaligner Lymphome. Ein Grund dafür könnte die wie bei BL und DLBCL hohe Aktivität der Kinase mTOR in den HRS-Zellen sein (Mark et al. 2013). So wurde bereits gezeigt, dass der mTOR-Komplex 1 (mTORC1) die Nukleotidbiosynthese fördert und direkt Einfluss auf die MTHFD2-Expression nimmt (Ben-Sahra et al. 2016; Zeng et al. 2019). Beim BL ist die hohe mTOR-Aktivität bedingt durch die BCR-abhängige Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, sodass hier vermutlich ein direkter Zusammenhang zwischen tonischem BCR-Signaling und 1C-Metabolismus besteht (Mark et al. 2013; Schmitz et al. 2012). Des Weiteren könnte die Proteinexpression zu einem gewissen Teil durch EBV bedingt sein. Eine EBV-Infektion lässt sich bei ca. einem Drittel aller sBL und HL nachweisen (Shannon-Lowe et al. 2017). Kurz nach der Infektion wird der 1C-Metabolismus in B-Lymphozyten verstärkt aktiviert, wobei das virale Protein EBNA2 die Aufnahme, Synthese und Metabolisierung von Serin reguliert. *In vitro* war ein starker Verbrauch von Serin innerhalb einer Woche nach EBV-Infektion zu beobachten, verbunden mit einer BL-artigen Proliferation der B-Zellen (Wang et al. 2019). Es ist somit anzunehmen, dass v. a. die SHMT2-Expression bei EBV-positiven Lymphomen erhöht ist. Generell sind Lymphome beim Zellwachstum stark auf die Glycin-Produktion durch SHMT2 angewiesen. So führt v. a. bei hochproliferativen Entitäten eine pharmakologische Blockade von SHMT2 zur signifikanten Inhibierung des Zellwachstums, wobei zumindest beim DLBCL das fehlende Glycin nicht mittels Glycin-Uptake kompensiert werden kann (Ducker et al. 2017a).

Bei zahlreichen Karzinomen ist v. a. die Überexpression der Enzyme MTHFD2 und SHMT2 mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Koseki et al. 2018; Lee et al. 2014; Nilsson et

al. 2014; Ning et al. 2018; Noguchi et al. 2018; Wu et al. 2017). Für MTHFD1 wurde u. a. beim NSCLC sowie beim Hepatozellulären Karzinom (HCC) ein derartiger Zusammenhang nachgewiesen (Ding et al. 2018; Yu et al. 2019). Auch bei B-Zell-Lymphomen scheint eine hohe Expression der Enzyme einen ungünstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten zu haben. So ergaben die Überlebenszeitanalysen am Gesamt- und DLBCL-Kollektiv für MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2 jeweils eine mit der Expressionsstärke zunehmend schlechtere Prognose. Dieser Zusammenhang ist nachvollziehbar, da alle drei Proteine über den zellulären 1C-Metabolismus die Nukleotid-Biosynthese und somit die Zellproliferation bzw. Tumorprogression fördern (Shuvalov et al. 2017). Allerdings bleibt anzumerken, dass die Resultate allesamt nicht signifikant waren und daher lediglich als Trend zu werten sind. Die widersprüchlichen Ergebnisse bei FL und MZL könnten zudem darauf hindeuten, dass die Enzymexpression und somit der 1C-Metabolismus bei diesen indolenten Lymphomen aufgrund der geringen Proliferationsrate der Tumorzellen keine prognostische Relevanz besitzt. Insgesamt lässt sich anhand der durchgeführten Überlebenszeitanalysen keine generelle Aussage zur prognostischen Auswirkung der Enzymexpression in Lymphomen treffen. Hinzu kommt auch, dass in der Analyse für MTHFD2 nur hochmaligne Lymphome untersucht werden konnten, da sich nur dort eine positive Färbung zeigte. Abgesehen vom DLBCL-Kollektiv waren aussagekräftige Überlebenszeitanalysen für einzelne Entitäten aufgrund zu kleiner Subgruppen und/oder niedriger Mortalität nicht möglich. Es empfiehlt sich daher, die Auswirkung der Proteinexpression an größeren Kollektiven und über einen längeren Zeitraum zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die zielgerichtete Therapie maligner B-Zell-Lymphome umfasst die Inhibierung onkogener Signalleitungsprozesse, die über den B-Zell-Antigenrezeptor vermittelt werden. Für die effiziente Behandlung des hochmalignen Burkitt-Lymphoms fehlen derartige Therapieformen jedoch bisher. Ziel dieser Arbeit war es daher, beim Burkitt-Lymphom onkogene Signalwegssignaturen zu identifizieren, die eine Regulierung in Abhängigkeit vom B-Zell-Antigenrezeptor aufweisen und essentiell für das Überleben der Lymphomzellen sind. Dies erfolgte durch die Neuauswertung und Kombination bereits publizierter Datensätze aus phosphoproteomischen Analysen sowie einem RNA-Interferenz-Screen an Burkitt-Zelllinien. Auf diese Weise wurden neben bereits bekannten B-Zell-assoziierten Proteinen (BCL11A, CARD11) und dem Zellzyklus-Inhibitor CDKN1B auch Proteine identifiziert, die bis dato kaum oder noch gar nicht im Kontext maligner B-Zell-Lymphome beschrieben wurden (ACTN4, ARFGF2, MTHFD1).

Die identifizierten Proteine, sowie die mit MTHFD1 assoziierten Enzyme MTHFD2 und SHMT2, wurden hinsichtlich ihrer Expression in humanem Lymphomgewebe untersucht. Zudem erfolgten Überlebenszeitanalysen zur prognostischen Auswirkung der Proteinexpression auf das Gesamtüberleben von Lymphompatienten. Hierfür wurde ein Kollektiv aus Burkitt- und weiteren B-Zell-Lymphomen erstellt. Es zeigte sich, dass die Proteinexpression zwischen den Entitäten z. T. deutlich variierte, wobei sich häufig hoch- und niedrigmaligne Lymphome voneinander unterschieden. So war die Expression von ARFGF2, MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2 mit hochmalignen Lymphomen und einer eher ungünstigen Prognose assoziiert, während CDKN1B v. a. bei niedrigmalignen Lymphomen exprimiert war und mit einer tendenziell günstigen Prognose in Verbindung stand. BCL11A und CARD11 waren bei hoch- und niedrigmalignen Entitäten gleichermaßen exprimiert. ACTN4 färbte sich v. a. beim Burkitt-Lymphom positiv. Insgesamt zeigte die Expressionsanalyse, dass die *in vitro* beim Burkitt-Lymphom identifizierten Proteine – abgesehen von CDKN1B – allesamt verstärkt in humanem Burkitt-Gewebe exprimiert werden, diese Expression jedoch nicht spezifisch für das Burkitt-Lymphom ist. Zur Validierung der Ergebnisse sollten Expressions- und Überlebenszeitanalysen an größeren Kollektiven und über einen längeren Beobachtungszeitraum unter Einbeziehung von klinischen Parametern (multivariate Analysen) erfolgen.

Die hier gewonnenen Resultate können als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen. Aufgrund der erhöhten Enzymexpression scheint besonders der One-Carbon-Metabolismus mit den beteiligten Enzymen MTHFD1, MTHFD2 und SHMT2 in hochproliferativen B-Zell-Lymphomen eine essentielle Rolle zu spielen. Hier lohnt es sich, eine mögliche Aktivierung des One-Carbon-Metabolismus über den B-Zell-Antigenrezeptor genauer zu untersuchen. Gleiches gilt für die in diesem Kontext bis dato weitestgehend unbekannt Proteine ARFGF2 und ACTN4. Auch hier deutet die verstärkte Expression auf eine mögliche onkogene Funktion bei hochproliferativen Lymphomen hin.

6 Literaturverzeichnis

- Abdulla M, Laszlo S, Triumf J, Hedström G, Berglund M, Enblad G, Amini RM (2016): A population-based study of cellular markers in R-CHOP treated diffuse large B-cell lymphoma patients. *Acta Oncol* 55, 1126–1131
- Abukhdeir AM, Park BH (2008): P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med* 10, e19
- Adams JM, Cory S (2007): The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324–1337
- Aebersold R, Mann M (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207
- Agarwal B, Naresh KN (2002): Bcl-2 family of proteins in indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma: study of 116 cases. *Am J Hematol* 70, 278–282
- Al Kuraya K, Simon R, Sauter G (2004): Tissue microarrays for high-throughput molecular pathology. *Ann Saudi Med* 24, 169–174
- Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD (1997): Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 89, 2067–2078
- Barrans SL, Carter I, Owen RG, Davies FE, Patmore RD, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS (2002): Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 99, 1136–1143
- Basso K, Dalla-Favera R (2010): BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol* 105, 193–210
- Bedsaul JR, Carter NM, Deibel KE, Hutcherson SM, Jones TA, Wang Z, Yang C, Yang YK, Pomerantz JL (2018): Mechanisms of Regulated and Dysregulated CARD11 Signaling in Adaptive Immunity and Disease. *Front Immunol* 9, 2105
- Benharroch D, Yermiahu T, Geffen DB, Prinsloo I, Gopas J, Segal S, Aboud M (1995): Expression of c-myc and c-ras oncogenes in the neoplastic and non-neoplastic cells of Hodgkin's disease. *Eur J Haematol* 55, 178–183
- Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJH, Asara JM, Manning BD (2016): mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* 351, 728–733
- Besson A, Dowdy SF, Roberts JM (2008): CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14, 159–169
- Bhatti M, Ippolito T, Mavis C, Gu J, Cairo MS, Lim MS, Hernandez-Ilizaliturri F, Barth MJ (2018): Pre-clinical activity of targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in Burkitt lymphoma. *Oncotarget* 9, 21820–21830
- Blonska M, Lin X (2011): NF- κ B signaling pathways regulated by CARMA family of scaffold proteins. *Cell Res* 21, 55–70
- Bosch F, López-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, Vallespí T, Woessner S, Montserrat E (1998): Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 82, 567–575
- Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann ML, Küppers R (2006): Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 118, 1853–1861
- Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G (2001): Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 195, 72–79
- Casanova JE (2007): Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic* 8, 1476–1485
- Cassimere EK, Mauvais C, Denicourt C (2016): p27Kip1 Is Required to Mediate a G1 Cell Cycle Arrest Downstream of ATM following Genotoxic Stress. *PLoS One* 11, e0162806
- Chen B, Wei W, Huang X, Xie X, Kong Y, Dai D, Yang L, Wang J, Tang H, Xie X (2018): circEPSTI1 as a Prognostic Marker and Mediator of Triple-Negative Breast Cancer Progression. *Theranostics* 8, 4003–4015

- Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F (2015): Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics* 15, 3175–3192
- Cheung HW, Cowley GS, Weir BA, Boehm JS, Rusin S, Scott JA, East A, Ali LD, Lizotte PH, Wong TC et al. (2011): Systematic investigation of genetic vulnerabilities across cancer cell lines reveals lineage-specific dependencies in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12372–12377
- Chiarle R, Fan Y, Piva R, Boggino H, Skolnik J, Novero D, Palestro G, De Wolf-Peeters C, Chilosi M, Pagano M et al. (2002): S-phase kinase-associated protein 2 expression in non-Hodgkin's lymphoma inversely correlates with p27 expression and defines cells in S phase. *Am J Pathol* 160, 1457–1466
- Chisholm KM, Bangs CD, Bacchi CE, Molina-Kirsch H, Cherry A, Natkunam Y (2015): Expression profiles of MYC protein and MYC gene rearrangement in lymphomas. *Am J Surg Pathol* 39, 294–303
- Coffey G, DeGuzman F, Inagaki M, Pak Y, Delaney SM, Ives D, Betz A, Jia ZJ, Pandey A, Baker D et al. (2012): Specific inhibition of spleen tyrosine kinase suppresses leukocyte immune function and inflammation in animal models of rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 340, 350–359
- Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, Bertoni F, Ponzoni M, Scandurra M, Califano A et al. (2009): Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459, 717–721
- Corso J, Pan KT, Walter R, Doebele C, Mohr S, Bohnenberger H, Ströbel P, Lenz C, Slabicki M, Hüllelein J et al. (2016): Elucidation of tonic and activated B-cell receptor signaling in Burkitt's lymphoma provides insights into regulation of cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 5688–5693
- Cory S, Huang DCS, Adams JM (2003): The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590–8607
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982): Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824–7827
- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F (2006): The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 16, 253–264
- Darwiche W, Gubler B, Marolleau JP, Ghamlouch H (2018): Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cell Normal Cellular Counterpart: Clues From a Functional Perspective. *Front Immunol* 9, 683
- Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, Greiner TC, Weisenburger DD, Rosenwald A, Ott G et al. (2006): Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 354, 2431–2442
- Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y et al. (2010): Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463, 88–92
- Dent AL (1997): Control of Inflammation, Cytokine Expression, and Germinal Center Formation by BCL-6. *Science* 276, 589–592
- Ding K, Jiang J, Chen L, Xu X (2018): Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase 1 Silencing Expedites the Apoptosis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells via Modulating DNA Methylation. *Med Sci Monit* 24, 7499–7507
- Ding Z, Liang J, Lu Y, Yu Q, Songyang Z, Lin S-Y, Mills GB (2006): A retrovirus-based protein complementation assay screen reveals functional AKT1-binding partners. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15014–15019
- Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG (2000): CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 24, 846–852
- Dong G, Chanudet E, Zeng N, Appert A, Chen YW, Au WY, Hamoudi RA, Watkins AJ, Ye H, Liu H et al. (2011): A20, ABIN-1/2, and CARD11 mutations and their prognostic value in gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 17, 1440–1451

- Ducker GS, Ghergurovich JM, Mainolfi N, Suri V, Jeong SK, Hsin-Jung Li S, Friedman A, Manfredi MG, Gitai Z, Kim H et al. (2017a): Human SHMT inhibitors reveal defective glycine import as a targetable metabolic vulnerability of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 11404–11409
- Ducker GS, Rabinowitz JD (2017b): One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* 25, 27–42
- Egawa T, Albrecht B, Favier B, Sunshine MJ, Mirchandani K, O'Brien W, Thome M, Littman DR (2003): Requirement for CARMA1 in Antigen Receptor-Induced NF- κ B Activation and Lymphocyte Proliferation. *Current Biology* 13, 1252–1258
- Eggert C, Fischer U (2003): RNA-Interferenz: Ein neues Werkzeug zur Analyse der Genfunktion. *BIOspektrum (Heidelb.)*, 372–374
- Engelke M, Pirkuliyeva S, Kühn J, Wong L, Boyken J, Herrmann N, Becker S, Griesinger C, Wienands J (2014): Macromolecular assembly of the adaptor SLP-65 at intracellular vesicles in resting B cells. *Sci Signal* 7, ra79
- Erlanson M, Portin C, Linderholm B, Lindh J, Roos G, Landberg G (1998): Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. *Blood* 92, 770–777
- Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A (1997): Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 57, 3381–3385
- Ferreri AJM, Ernberg I, Copie-Bergman C (2009): Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med* 265, 421–438
- Fraley TS, Pereira CB, Tran TC, Singleton C, Greenwood JA (2005): Phosphoinositide binding regulates alpha-actinin dynamics: mechanism for modulating cytoskeletal remodeling. *J Biol Chem* 280, 15479–15482
- Frick M, Dörken B, Lenz G (2011): The molecular biology of diffuse large B-cell lymphoma. *Ther Adv Hematol* 2, 369–379
- Fukami K, Furuhashi K, Inagaki M, Endo T, Hatano S, Takenawa T (1992): Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature* 359, 150–152
- Fukuda T, Yoshida T, Okada S, Hatano M, Miki T, Ishibashi K, Okabe S, Koseki H, Hirosawa S, Taniguchi M et al. (1997): Disruption of the Bcl6 Gene Results in an Impaired Germinal Center Formation. *J Exp Med* 186, 439–448
- Gang AO, Pedersen MØ, Poulsen TS, Klausen TW, Nørgaard PH (2013): C-MYC Expression In Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Blood* 122, 3156
- Gao H, Ouyang X, Banach-Petrosky W, Borowsky AD, Lin Y, Kim M, Lee H, Shih WJ, Cardiff RD, Shen MM et al. (2004): A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17204–17209
- Gao L, Gu W, Zheng J, Ren W, Chang S, Wang X, Li S, Song T, Huang C, Zhi K (2013): Clinicopathological and prognostic significance of p27 expression in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Int J Biol Markers* 28, e329-35
- García-Gutiérrez L, Delgado MD, León J (2019): MYC Oncogene Contributions to Release of Cell Cycle Brakes. *Genes (Basel)* 10, 244
- Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, Nielsen O, Gadeberg OV, Mourits-Andersen T, Frederiksen M et al. (2012): Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 30, 3460–3467
- Grimmler M, Wang Y, Mund T, Cilensek Z, Keidel EM, Waddell MB, Jäkel H, Kullmann M, Kriwacki RW, Hengst L (2007): Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell* 128, 269–280
- Grundmann E, Roessner A, Bohle RM, Dombrowski F, Feiden W, Fink LJ, Fischer HP, Geißinger E, Knüchel-Clarke R, Kreipe HH et al. (Hrsg.): *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. 11. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2010

- Guan X, Wang Y, Xie R, Chen L, Bai J, Lu J, Kuo MT (2010): p27(Kip1) as a prognostic factor in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Cell Mol Med* 14, 944–953
- Gustafsson Sheppard N, Jarl L, Mahadessian D, Strittmatter L, Schmidt A, Madhusudan N, Tegnér J, Lundberg EK, Asplund A, Jain M et al. (2015): The folate-coupled enzyme MTHFD2 is a nuclear protein and promotes cell proliferation. *Sci Rep* 5, 15029
- Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC (1993): bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82, 1820–1828
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES et al. (2004): Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103, 275–282
- Hatzi K, Melnick A (2014): Breaking bad in the germinal center: how deregulation of BCL6 contributes to lymphomagenesis. *Trends Mol Med* 20, 343–352
- Havranek O, Xu J, Köhrer S, Wang Z, Becker L, Comer JM, Henderson J, Ma W, Man Chun Ma J, Westin JR et al. (2017): Tonic B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 130, 995–1006
- Hengst L, Reed SI (1996): Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271, 1861–1864
- Hershko DD, Shapira M (2006): Prognostic role of p27Kip1 deregulation in colorectal cancer. *Cancer* 107, 668–675
- Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, Di Stefano F, Anderson L, Vaughan Hudson G, Mason D et al. (1996): Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 88, 1046–1051
- Hoelzer D, Walewski J, Döhner H, Viardot A, Hiddemann W, Spiekermann K, Serve H, Dührsen U, Hüttmann A, Thiel E et al. (2014): Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial. *Blood* 124, 3870–3879
- Honda K (2015): The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell Biosci* 5, 41
- Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S (1998): Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 140, 1383–1393
- Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TFE, Bernd HW, Feller AC, Klapper W, Hummel M, Stein H, Hansmann ML et al. (2013): MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 121, 2253–2263
- Hu G, Luo J (2012): A primer on using pooled shRNA libraries for functional genomic screens. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44, 103–112
- Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, Liu WM, Visco C, Li Y, Miranda RN et al. (2013): MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 121, 4021-31
- Huang C, Melnick A (2015): Mechanisms of action of BCL6 during germinal center B cell development. *Sci China Life Sci* 58, 1226–1232
- Huang Q, Li X, Huang Z, Yu F, Wang X, Wang S, He Z, Lin J (2019): ACTN4 Promotes the Proliferation, Migration, Metastasis of Osteosarcoma and Enhances its Invasive Ability through the NF-κB Pathway. *Pathol Oncol Res* 26, 893-904
- Huang W, Guo L, Liu H, Zheng B, Ying J, Lv N (2014): C-MYC overexpression predicts aggressive transformation and a poor outcome in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 5634–5644
- Huellein J, Slabicki M, Rosolowski M, Jethwa A, Habringer S, Tomska K, Kurilov R, Lu J, Scheinost S, Wagener R et al. (2019): MDM4 is an essential disease driver targeted by 1q gain in Burkitt lymphoma. *Cancer Res* 79, 3125-3138

- Jackson CL (2018): Activators and Effectors of the Small G Protein Arf1 in Regulation of Golgi Dynamics During the Cell Division Cycle. *Front Cell Dev Biol* 6, 29
- Jacobson C, LaCasce A (2014): How I treat Burkitt lymphoma in adults. *Blood* 124, 2913–2920
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri SA, Swerdlow SH: Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hrsg.): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Internat. Agency for Research on Cancer, Lyon 2008, 158–166
- James MK, Ray A, Leznova D, Blain SW (2008): Differential modification of p27Kip1 controls its cyclin D-cdk4 inhibitory activity. *Mol Cell Biol* 28, 498–510
- Jiang BY, Zhang XC, Su J, Meng W, Yang XN, Yang JJ, Zhou Q, Chen ZY, Chen ZH, Xie Z et al. (2013): BCL11A overexpression predicts survival and relapse in non-small cell lung cancer and is modulated by microRNA-30a and gene amplification. *Mol Cancer* 12, 61
- Jost PJ, Ruland J (2007): Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 109, 2700–2707
- Juilland M, Thome M (2016): Role of the CARMA1/BCL10/MALT1 complex in lymphoid malignancies. *Curr Opin Hematol* 23, 402–409
- Kakuya T, Mori T, Yoshimoto S, Watabe Y, Miura N, Shoji H, Onidani K, Shibahara T, Honda K (2017): Prognostic significance of gene amplification of ACTN4 in stage I and II oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 46, 968–976
- Karube K, Campo E (2015): MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol* 52, 97–106
- Keller U, Nilsson JA, Maclean KH, Old JB, Cleveland JL (2005): Nfkb 1 is dispensable for Myc-induced lymphomagenesis. *Oncogene* 24, 6231–6240
- Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, Hiraoka N, Imoto I, Kosuge T, Umaki T, Onozato K, Shitashige M, Yamaguchi U et al. (2008): Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 14, 5348–5356
- Kiliçarslan A, Öztürk V, Yikilmaz AŞ, Doğan M, Akyol M (2018): Evaluation of the Prognostic Importance of c-Myc and Bcl-2 Expressions and the Presence of Epstein-Barr Virus in Classical Hodgkin Lymphoma. *Turk Patoloji Derg* 34, 199–206
- Kishimoto W, Nishikori M (2014): Molecular Pathogenesis of Follicular Lymphoma. *J Clin Exp Hematopathol* 54, 23–30
- Knies N, Alankus B, Weilemann A, Tzankov A, Brunner K, Ruff T, Kremer M, Keller UB, Lenz G, Ruland J (2015): Lymphomagenic CARD11/BCL10/MALT1 signaling drives malignant B-cell proliferation via cooperative NF-κB and JNK activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E7230-8
- Kober-Hasslacher M, Schmidt-Suppran M (2019): The Unsolved Puzzle of c-Rel in B Cell Lymphoma. *Cancers (Basel)* 11, 941
- Kodali S, Yu H, Cerny J (2015): Assessing MYC Expression in Multiple Myeloma. *J Hematol Thrombo Dis* 03, e119
- Koseki J, Konno M, Asai A, Colvin H, Kawamoto K, Nishida N, Sakai D, Kudo T, Satoh T, Doki Y et al. (2018): Enzymes of the one-carbon folate metabolism as anticancer targets predicted by survival rate analysis. *Sci Rep* 8, 303
- Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, van Groningen K, van Krieken JH, Jong D de, Kluin PM (1996): Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol* 14, 2131–2138
- Krüger M (2012): Quantitative Proteinanalysen mittels Massenspektrometrie. Forschungsbericht 2012, Max-Planck-Institut für Herz und Lungenforschung. https://www.mpg.de/6719679/MPI_fuer_Herz-_Lungenforschung_JB_20131; abgerufen am 09.06.2019
- Küppers R (2005): Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 251–262
- Küppers R, Engert A, Hansmann ML (2012): Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* 122, 3439–3447

- Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR et al. (2003): Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 78, 21–33
- Lai R, Arber DA, Chang KL, Wilson CS, Weiss LM (1998): Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B-cell hyperplasia. *Mod Pathol* 11, 864–869
- Latres E, Chiarle R, Schulman BA, Pavletich NP, Pellicer A, Inghirami G, Pagano M (2001): Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2515–2520
- Lee GY, Haverty PM, Li L, Kljavin NM, Bourgon R, Lee J, Stern H, Modrusan Z, Seshagiri S, Zhang Z et al. (2014): Comparative oncogenomics identifies PSMB4 and SHMT2 as potential cancer driver genes. *Cancer Res* 74, 3114–3126
- Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, Dave SS, Zhao H, Xu W, Rosenwald A et al. (2008): Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 319, 1676–1679
- Leoncini L, Raphaël M, Stein H, Harris NL, Jaffe ES, Kluin PM: Burkitt lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hrsg.): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Internat. Agency for Research on Cancer, Lyon 2008, 262-264
- Leung RKM, Whittaker PA (2005): RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* 107, 222–239
- Li C, Kuang L, Zhu B, Chen J, Wang X, Huang X (2017): Identification of prognostic risk factors of acute lymphoblastic leukemia based on mRNA expression profiling. *Neoplasma* 64, 494–501
- Li JY, Gaillard F, Moreau A, Harousseau JL, Laboisie C, Milpied N, Bataille R, Avet-Loiseau H (1999): Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 154, 1449–1452
- Li L, Li Y, Que X, Gao X, Gao Q, Yu M, Ma K, Xi Y, Wang T (2018): Prognostic significances of overexpression MYC and/or BCL2 in R-CHOP-treated diffuse large B-cell lymphoma: A Systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 8, 146
- Li S, Desai P, Lin P, Yin CC, Tang G, Wang XJ, Konoplev SN, Khoury JD, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ (2016): MYC/BCL6 double-hit lymphoma (DHL): a tumour associated with an aggressive clinical course and poor prognosis. *Histopathology* 68, 1090–1098
- Liang J, Slingerland JM (2003): Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2, 339–345
- Lingor P: Regulation of Cell Death and Survival by RNA Interference – The Roles of miRNA and siRNA. In: Cecconi F, D'Amelio M (Hrsg.): Apoptosome. Springer Netherlands, Dordrecht 2010, 95-117
- Liu H, Ippolito GC, Wall JK, Niu T, Probst L, Lee BS, Pulford K, Banham AH, Stockwin L, Shaffer AL et al. (2006): Functional studies of BCL11A: characterization of the conserved BCL11A-XL splice variant and its interaction with BCL6 in nuclear paraspeckles of germinal center B cells. *Mol Cancer* 5, 18
- Liu X, Chu KM (2017): α -Actinin-4 promotes metastasis in gastric cancer. *Lab Invest* 97, 1084–1094
- Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW (1999): p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 154, 313–323
- Lossos IS, Jones CD, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, Zehnder JL, Tibshirani R, Levy R (2001): Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 98, 945–951
- Lu Z, Zhang Y, Yan X, Chen Y, Tao X, Wang J, Jia N, Lyu T, Wang J, Ding J et al. (2014): Estrogen stimulates the invasion of ovarian cancer cells via activation of the PI3K/AKT pathway and regulation of its downstream targets E-cadherin and α -actinin-4. *Mol Med Rep* 10, 2433–2440
- Ma Y, Yan M, Huang H, Zhang L, Wang Q, Zhao Y, Zhao J (2016): Associations and prognostic significance of p27Kip1, Jab1 and Skp2 in non-Hodgkin lymphoma. *Mol Clin Oncol* 5, 357–364

- Mark A, Hajdu M, Varadi Z, Sticz TB, Nagy N, Csomor J, Berczi L, Varga V, Csoka M, Kopper L et al. (2013): Characteristic mTOR activity in Hodgkin-lymphomas offers a potential therapeutic target in high risk disease -- a combined tissue microarray, in vitro and in vivo study. *BMC Cancer* 13, 250
- Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Hansmann ML et al. (2002): Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 1474–1477
- Miles RR, Crockett DK, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ (2005): Analysis of BCL6-interacting proteins by tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 4, 1898–1909
- Millard SS, Yan JS, Nguyen H, Pagano M, Kiyokawa H, Koff A (1997): Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem* 272, 7093–7098
- Molyneux E, Schwalbe E, Chagaluka G, Banda K, Israels T, Depani S, Mittermayer-Vassallo K, Windebank K, Mvula J, Njiram'madzi J et al. (2017): The use of anthracyclines in the treatment of endemic Burkitt lymphoma. *Br J Haematol* 177, 984–990
- Morrish F, Neretti N, Sedivy JM, Hockenbery DM (2008): The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell Cycle* 7, 1054–1066
- Mun J, Kim DU, Hoe KL, Kim SY (2016): Genome-wide functional analysis using the barcode sequence alignment and statistical analysis (Barcas) tool. *BMC Bioinformatics* 17, 475
- Nakagawa M, Seto M, Hosokawa Y (2006): Molecular pathogenesis of MALT lymphoma: two signaling pathways underlying the antiapoptotic effect of API2-MALT1 fusion protein. *Leukemia* 20, 929–936
- Nakamura S, Nakamura S, Matsumoto T, Yada S, Hirahashi M, Suekane H, Yao T, Goda K, Iida M (2005): Overexpression of caspase recruitment domain (CARD) membrane-associated guanylate kinase 1 (CARMA1) and CARD9 in primary gastric B-cell lymphoma. *Cancer* 104, 1885–1893
- Nakamura T, Yamazaki Y, Saiki Y, Moriyama M, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG (2000): Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 20, 3178–3186
- Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G, Lam LT, Dave S, Yang L, Powell J et al. (2006): A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 441, 106–110
- Nguyen L, Papenhausen P, Shao H (2017): The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes (Basel)* 8, 116
- Niemann CU, Wiestner A (2013): B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin Cancer Biol* 23, 410–421
- Nikiforov MA, Chandriani S, O'Connell B, Petrenko O, Kotenko I, Beavis A, Sedivy JM, Cole MD (2002): A functional screen for Myc-responsive genes reveals serine hydroxymethyltransferase, a major source of the one-carbon unit for cell metabolism. *Mol Cell Biol* 22, 5793–5800
- Nilsson R, Jain M, Madhusudhan N, Sheppard NG, Strittmatter L, Kampf C, Huang J, Asplund A, Mootha VK (2014): Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer. *Nat Commun* 5, 3128
- Ning S, Ma S, Saleh AQ, Guo L, Zhao Z, Chen Y (2018): SHMT2 Overexpression Predicts Poor Prognosis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Gastroenterol Res Pract*, e4369253
- Noguchi K, Konno M, Koseki J, Nishida N, Kawamoto K, Yamada D, Asaoka T, Noda T, Wada H, Gotoh K et al. (2018): The mitochondrial one-carbon metabolic pathway is associated with patient survival in pancreatic cancer. *Oncol Lett* 16, 1827–1834
- Oberländer M, Alkemade H, Bünger S, Ernst F, Thorns C, Braunschweig T, Habermann JK (2014): A 'waterfall' transfer-based workflow for improved quality of tissue microarray construction and processing in breast cancer research. *Pathol Oncol Res* 20, 719-726
- O'Keefe EP (2013): siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. A comprehensive review of siRNAs and shRNAs as tools for gene silencing. *Labome, Materials and Methods*. <https://www.labome.com/method/siRNAs-and-shRNAs-Tools-for-Protein-Knockdown-by-Gene-Silencing.html>; abgerufen am 14.06.2020

- Obaya AJ, Mateyak MK, Sedivy JM (1999): Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* 18, 2934–2941
- Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M (2006): Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635–648
- Onaindia A, Medeiros LJ, Patel KP (2017): Clinical utility of recently identified diagnostic, prognostic, and predictive molecular biomarkers in mature B-cell neoplasms. *Mod Pathol* 30, 1338–1366
- Otey CA, Carpen O (2004): Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* 58, 104–111
- Ott G (2002): Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 99, 3806–3812
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002): Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948–958
- Park JY, Kim SA, Chung JW, Bang S, Park SW, Paik YK, Song SY (2011): Proteomic analysis of pancreatic juice for the identification of biomarkers of pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 137, 1229–1238
- Pérez-Galán P, Dreyling M, Wiestner A (2011): Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 117, 26–38
- Pervez S, Raza MQ, Mirza A, Pal A (2011): Strong BCL2 expression in Burkitt lymphoma is not uncommon in adults. *Indian J Pathol Microbiol* 54, 290–293
- Pettersson M, Jernberg-Wiklund H, Larsson LG, Sundström C, Givol I, Tsujimoto Y, Nilsson K (1992): Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. *Blood* 79, 495–502
- Piccaluga PP, Falco G de, Kustagi M, Gazzola A, Agostinelli C, Tripodo C, Leucci E, Onnis A, Astolfi A, Sapienza MR et al. (2011): Gene expression analysis uncovers similarity and differences among Burkitt lymphoma subtypes. *Blood* 117, 3596–3608
- Pikman Y, Puissant A, Alexe G, Furman A, Chen LM, Frumm SM, Ross L, Fenouille N, Bassil CF, Lewis CA et al. (2016): Targeting MTHFD2 in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 213, 1285–1306
- Piris MA, Pezzella F, Martinez-Montero JC, Orradre JL, Villuendas R, Sanchez-Beato M, Cuenca R, Cruz MA, Martinez B, Pezella F (1994): p53 and bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. *Br J Cancer* 69, 337–341
- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J (1994): Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59–66
- Pulford K, Banham AH, Lyne L, Jones M, Ippolito GC, Liu H, Tucker PW, Roncador G, Lucas E, Ashe S et al. (2006): The BCL11AXL transcription factor: its distribution in normal and malignant tissues and use as a marker for plasmacytoid dendritic cells. *Leukemia* 20, 1439–1441
- Quintanilla-Martinez L, Thieblemont C, Fend F, Kumar S, Pinyol M, Campo E, Jaffe ES, Raffeld M (1998): Mantle Cell Lymphomas Lack Expression of p27kip1, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Am J Pathol* 153, 175–182
- Raderer M, Kiesewetter B, Ferreri AJM (2016): Clinicopathologic characteristics and treatment of marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). *CA Cancer J Clin* 66, 153–171
- Raible MD, Hsi ED, Alkan S (1999): Bcl-6 protein expression by follicle center lymphomas. A marker for differentiating follicle center lymphomas from other low-grade lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 112, 101–107
- Ramezani-Rad P, Rickert RC (2017): Murine models of germinal center derived-lymphomas. *Curr Opin Immunol* 45, 31–36
- Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, Viviani S, Bonfante V, Nadali G, Herling M, Angelopoulou MK, Giardini R, Chilosi M et al. (2002): BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood* 100, 3935–3941

- Re D, Hartlapp I, Greiner A, Diehl V, Wickenhauser C (2008): Analysis of CARMA1/BCL10/MALT1 expression in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 49, 362–364
- RKI (2021): Krebs in Deutschland für 2017/2018. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_inhalt.html; abgerufen am 25.01.2022
- Rosenthal A, Younes A (2017): High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Rev* 31, 37–42
- Sáez A, Sánchez E, Sánchez-Beato M, Cruz MA, Chacón I, Muñoz E, Camacho FI, Martínez-Montero JC, Mollejo M, García JF et al. (1999): p27KIP1 is abnormally expressed in Diffuse Large B-cell Lymphomas and is associated with an adverse clinical outcome. *Br J Cancer* 80, 1427–1434
- Sánchez-Beato M, Sáez AI, Martínez-Montero JC, Sol Mateo M, Sánchez-Verde L, Villuendas R, Troncone G, Piris MA (1997): Cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 in lymphoid tissue: p27KIP1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol* 151, 151–160
- Satpathy S, Wagner SA, Beli P, Gupta R, Kristiansen TA, Malinova D, Francavilla C, Tolar P, Bishop GA, Hostager BS et al. (2015): Systems-wide analysis of BCR signalosomes and downstream phosphorylation and ubiquitylation. *Mol Syst Biol* 11, 810
- Schaefer C, Mallela N, Seggewiß J, Lechtape B, Omran H, Dirksen U, Korsching E, Potratz J (2018): Target discovery screens using pooled shRNA libraries and next-generation sequencing: A model workflow and analytical algorithm. *PLoS One* 13, e0191570
- Schlabach MR, Luo J, Solimini NL, Hu G, Xu Q, Li MZ, Zhao Z, Smogorzewska A, Sowa ME, Ang XL et al. (2008): Cancer proliferation gene discovery through functional genomics. *Science* 319, 620–624
- Schmitz R, Ceribelli M, Pittaluga S, Wright G, Staudt LM (2014): Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a014282
- Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, Wright G, Shaffer AL, Hodson DJ, Buras E et al. (2012): Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490, 116–120
- Schwering I, Bräuninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, Hansmann ML, Dalla-Favera R, Rajewsky K, Küppers R (2003): Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 101, 1505–1512
- Sciammas R, Davis MM (2004): Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *J Immunol* 172, 5427–5440
- Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, Kridel R, Barry GS, Hother C, Abrisqueta P et al. (2015): Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol* 33, 2848–2856
- Seda V, Mraz M (2015): B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol* 94, 193–205
- Seki R, Ohshima K, Fujisaki T, Uike N, Kawano F, Gondo H, Makino S, Eto T, Moriuchi Y, Taguchi F et al. (2010): Prognostic significance of S-phase kinase-associated protein 2 and p27kip1 in patients with diffuse large B-cell lymphoma: effects of rituximab. *Ann Oncol* 21, 833–841
- Shannon-Lowe C, Rickinson AB, Bell AI (2017): Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372, e20160271
- Sheen VL, Ganesh VS, Topcu M, Sebire G, Bodell A, Hill RS, Grant PE, Shugart YY, Imitola J, Khoury SJ et al. (2004): Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nat Genet* 36, 69–76
- Shibasaki F, Fukami K, Fukui Y, Takenawa T (1994): Phosphatidylinositol 3-kinase binds to alpha-actinin through the p85 subunit. *Biochem J* 302 (Pt 2), 551–557

- Shuvalov O, Petukhov A, Daks A, Fedorova O, Vasileva E, Barlev NA (2017): One-carbon metabolism and nucleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy. *Oncotarget* **8**, 23955–23977
- Sims D, Mendes-Pereira AM, Frankum J, Burgess D, Cerone MA, Lombardelli C, Mitsopoulos C, Hakas J, Murugaesu N, Isacke CM et al. (2011): High-throughput RNA interference screening using pooled shRNA libraries and next generation sequencing. *Genome Biol* **12**, R104
- Slingerland J, Pagano M (2000): Regulation of the Cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J. Cell. Physiol.* **183**, 10–17
- Skisandarajah P, Dearden CE (2017): Epidemiology and environmental aspects of marginal zone lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol* **30**, 84–91
- Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKC, Gatter KC, Campo E: Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hrsg.): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Internat. Agency for Research on Cancer, Lyon 2008, 233-237
- Stover P, Schirch V (1990): Serine hydroxymethyltransferase catalyzes the hydrolysis of 5,10-methenyltetrahydrofolate to 5-formyltetrahydrofolate. *J Biol Chem* **265**, 14227–14233
- Sun YQ, Xie JW, Chen PC, Zheng CH, Li P, Wang JB, Lin JX, Lu J, Chen QY, Cao LL et al. (2016): Low Expression of CDK5 and p27 Are Associated with Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *J Cancer* **7**, 1049–1056
- Swerdlow SH, Campo E, Seto M, Müller-Hermelink HK: Mantle cell lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hrsg.): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Internat. Agency for Research on Cancer, Lyon 2008, 229-232
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD et al. (2016): The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2390
- Tang SC, Visser L, Hepperle B, Hanson J, Poppema S (1994): Clinical significance of bcl-2-MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: an analysis of 83 cases. *J Clin Oncol* **12**, 149–154
- Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P (1982): Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7837–7841
- Thome M, Charton JE, Pelzer C, Hailfinger S (2010): Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003004
- Thys A, Douanne T, Bidère N (2018): Post-translational Modifications of the CARMA1-BCL10-MALT1 Complex in Lymphocytes and Activated B-Cell Like Subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Oncol* **8**, 498
- Tsuyama N, Sakata S, Baba S, Mishima Y, Nishimura N, Ueda K, Yokoyama M, Terui Y, Hatake K, Kitagawa M et al. (2017): BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. *Blood* **130**, 489–500
- Tsvetkov, LM; Yeh, KH; Lee, SJ; Sun, H; Zhang, H (1999): p27Kip1 ubiquitination and degradation is regulated by the SCFSkp2 complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol* **9**, 661-664
- Vazquez A, Tedeschi PM, Bertino JR (2013): Overexpression of the mitochondrial folate and glycine-serine pathway: a new determinant of methotrexate selectivity in tumors. *Cancer Res* **73**, 478–482
- Viglietto G, Motti ML, Fusco A (2002): Understanding p27(kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization. *Cell Cycle* **1**, 394–400
- Vrhovac R, Delmer A, Tang R, Marie JP, Zittoun R, Ajchenbaum-Cymbalista F (1998): Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* **91**, 4694–4700

- Wang L, Guo Y, Huang WJ, Ke X, Poyet JL, Manji GA, Merriam S, Glucksmann MA, DiStefano PS, Alnemri ES et al. (2001): Card10 is a novel caspase recruitment domain/membrane-associated guanylate kinase family member that interacts with BCL10 and activates NF-kappa B. *J Biol Chem* 276, 21405–21409
- Wang LW, Shen H, Nobre L, Ersing I, Paulo JA, Trudeau S, Wang Z, Smith NA, Ma Y, Reinstadler B et al. (2019): Epstein-Barr-Virus-Induced One-Carbon Metabolism Drives B Cell Transformation. *Cell Metab* 30, 539-555
- Wang T, Lasota J, Hanau CA, Miettinen M (1995): Bcl-2 oncoprotein is widespread in lymphoid tissue and lymphomas but its differential expression in benign versus malignant follicles and monocytoid B-cell proliferations is of diagnostic value. *APMIS* 103, 655–662
- William J, Chen YH (2012): C-MYC Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Correlation With Hans Classification and Proliferation index. *Am J Clin Pathol* 138, 291
- Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM, Fisher RI, Kurtin PJ, Macon WR, Chhanabhai M et al. (2006): Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood* 107, 4207–4213
- Wu C, Miranda NF de, Chen L, Wasik AM, Mansouri L, Jurczak W, Galazka K, Dlugosz-Danecka M, Machaczka M, Zhang H et al. (2016): Genetic heterogeneity in primary and relapsed mantle cell lymphomas: Impact of recurrent CARD11 mutations. *Oncotarget* 7, 38180–38190
- Wu M, Wanggou S, Li X, Liu Q, Xie Y (2017): Overexpression of mitochondrial serine hydroxyl-methyltransferase 2 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in gliomas. *Onco Targets Ther* 10, 3781–3788
- Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Onozato K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O (2009): Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer: a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Mod Pathol* 22, 499–507
- Yan LX, Liu YH, Luo DL, Zhang F, Cheng Y, Luo XL, Xu J, Cheng J, Zhuang HG (2014): MYC expression in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *PLoS One* 9, e104068
- Yin B, Delwel R, Valk PJ, Wallace MR, Loh ML, Shannon KM, Largaespada DA (2009): A retroviral mutagenesis screen reveals strong cooperation between Bcl11a overexpression and loss of the Nf1 tumor suppressor gene. *Blood* 113, 1075–1085
- Young RM, Staudt LM (2013): Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* 12, 229–243
- Yu H, Wang H, Xu HR, Zhang YC, Yu XB, Wu MC, Jin GZ, Cong WM (2019): Overexpression of MTHFD1 in hepatocellular carcinoma predicts poorer survival and recurrence. *Future Oncol* 15, 1771–1780
- Yu Y, Wang J, Khaled W, Burke S, Li P, Chen X, Yang W, Jenkins NA, Copeland NG, Zhang S et al. (2012): Bcl11a is essential for lymphoid development and negatively regulates p53. *J Exp Med* 209, 2467–2483
- Zeng JD, Wu WKK, Wang HY, Li XX (2019): Serine and one-carbon metabolism, a bridge that links mTOR signaling and DNA methylation in cancer. *Pharmacol Res* 149, 104352
- Zhang Y, Wang H, Ren C, Yu H, Fang W, Zhang N, Gao S, Hou Q (2018): Correlation Between C-MYC, BCL-2, and BCL-6 Protein Expression and Gene Translocation as Biomarkers in Diagnosis and Prognosis of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Front Pharmacol* 9, 1497
- Zhao D, Li D, Zhong D, Zhang W (2016): Expression and prognostic value of CARD11 in diffuse large B cell lymphoma. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 37, 30–34
- Zhu L, Pan R, Zhou D, Ye G, Tan W (2019): BCL11A enhances stemness and promotes progression by activating Wnt/ β -catenin signaling in breast cancer. *Cancer Manag Res* 11, 2997–3007

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Philipp Ströbel (Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen) bedanken, der mir diese Promotion am von ihm geleiteten Institut ermöglicht hat und während dieser Zeit immer als Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Auch möchte ich meinem Co-Betreuer und Mitglied des Promotionsausschusses Herrn Prof. Dr. med. Gerald Wulf (Abteilung Hämatologie/Onkologie, Universitätsmedizin Göttingen) meinen Dank aussprechen. Für Fragen stand er stets zur Verfügung und durch ihn wurde mein Interesse an der Thematik der Arbeit zusätzlich befördert.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. Hanibal Bohnenberger (Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen). Durch ihn erhielt ich mein Promotionsthema und die Motivation, mich wissenschaftlich zu betätigen. Während der kompletten Zeit meiner Arbeit war er mir stets eine große Hilfe, ein fester Rückhalt und ein ausnahmslos zuverlässiger und kompetenter Ansprechpartner. Seine Ratschläge und konstruktive Kritik waren wegweisend dafür, dass ich mich in meiner Arbeit weiterentwickeln und mein Projekt erfolgreich abschließen konnte.

Auch möchte ich Frau Jennifer Appelhans (Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen) für die zuverlässige Durchführung der immunhistochemischen Färbungen ein großes Dankeschön aussprechen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Stefan Küffer (Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen) der mir als Laborleiter bei Fragen und Problemen stets weiterhalf.

Für die Erstellung der Tissue-Micro-Arrays danke ich der *Targos Molecular Pathology GmbH* (Kassel).