

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

**MicroRNA-Analysen bei Follikulären Lymphomen mit diffusem
Anteil**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Medizinischen Fakultät –
vorgelegt von
Björn Stassek
aus Braunschweig
Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Christoph Thorns
 2. Berichterstatter: Professor Dr. med. Dr. h.c. Karl-Friedrich Klotz
- Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2014
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.04.2014
- Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	1
1.1 Überblick.....	1
1.2 Definition.....	1
1.3 Epidemiologie.....	2
1.4 Klinik und Therapie.....	3
1.5 Pathologie und Pathophysiologie.....	4
1.6 Prognose.....	7
1.7 Micro-RNAs.....	9
2 Fragestellung.....	13
3 Material und Methoden.....	14
3.1 Patienten/ Patientinnen.....	14
3.2 Morphologische Untersuchungen.....	14
3.3 Immunhistochemische Untersuchungen.....	15
3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	17
3.5 Micro-RNA-Signaturen.....	17
3.6 Statistik.....	20
4 Ergebnisse.....	21
4.1 Klinische, morphologische und immunhistochemische Parameter.....	21
4.1.1 Patientenalter.....	22
4.1.2 Sklerose.....	22
4.1.3 Knochenmarkbefall.....	22
4.1.4 CD10	23
4.1.5 BCL2.....	24
4.1.6 CD23-Netzwerke und CD23-Reaktivität im Tumorgewebe.....	24
4.1.7 Durchbruch der Lymphknotenkapsel.....	25
4.1.8 Erhaltene IgD-positive Mantelzonen.....	25
4.1.9 Monotypische Leichtkettenexpression.....	25
4.1.10 CD3, CD4, CD8, CD4/CD8-Ratio.....	25
4.2 Micro-RNA-Expressionen.....	28
5 Diskussion.....	30
5.1 Klinische, morphologische und immunhistochemische Parameter.....	31

5.1.1 Sklerose.....	32
5.1.2 Knochenmarkinfiltration.....	32
5.1.3 Starke Reaktivität für CD10 und BCL2.....	32
5.1.4 CD23-Netzwerke.....	33
5.1.5 CD23-Reaktivität im Tumorgewebe.....	33
5.1.6 Alter der Patienten bei Erstdiagnose.....	33
5.1.7 Durchbruch der Lymphknotenkapsel.....	33
5.1.8 Erhaltene IgD-positive Mantelzonen.....	33
5.1.9 Monotypische Leichtkettenexpression.....	34
5.1.10 CD3, CD4, CD8 sowie CD4/CD8-Ratio.....	34
5.2 MicroRNA-Expressionen.....	34
5.2.1 DFL zeigen kein für ein spezifisches Differenzierungsstadium typisches Expressionsmuster	34
5.2.2 DFL überexprimieren Onco-miRs und unterexprimieren Tumorsuppressor-miRs.....	35
5.2.3 Für viele der bei DFL über- und unterexprimierten MicroRNAs ist die Datenlage diskrepant oder unvollständig.....	36
5.2.4 Überexprimierte MicroRNAs bei DFL	42
5.2.5 Unterexprimierte MicroRNAs bei DFL.....	44
6 Zusammenfassung.....	49
Literaturverzeichnis.....	50
Danksagungen.....	66
Lebenslauf.....	67

Abkürzungsverzeichnis

ANP32 = acidic nuclear phosphoprotein 32

APC = Adenomatosis poliposis coli

BCL2 bzw. 6 = B-cell lymphoma 2- bzw. 6-Gen

bcl2 bzw 6 = B-cell lymphoma 2- bzw. 6-Protein

BLIMP1 = B-Lymphozyten-induziertes Maturationsprotein 1

CD = Cluster of differentiation

CLL = Chronische lymphatische Leukämie

C-MYC = C-Myc-Protoonkogen

CXCR4 = C-X-C Chemokine Receptor 4

DFL = Diffus wachsende(s) Follikuläre Lymphom(e)

DLBCL = Diffuse large b-cell lymphoma (=Diffuses Großzelliges B-Zell-Lymphom)

FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FL = Follikuläre(s) Lymphom(e)

FLIPI = Follicular lymphoma international prognostic index

hpf = high power field

Ig = Immunglobulin

IgH = Immunglobulin schwere Ketten

IR = immune response

LMO2 = LIM domain only 2

MiB1 = ein Proliferationsmarker

MicroRNA = Micro-Ribonukleinsäure

miR = Micro-Ribonukleinsäure

mRNA = messenger Ribonukleinsäure

MYC = Myelocytomatosis Oncogene

PCR = Polymerase-chain-reaction (= Polymerase-Ketten-Reaktion)

qPCR = quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

RAS = Rat sarcoma

RHOC = Recombinant Human Osteocalcin

ROCK = Rho-Associated Coiled Coil Forming Protein Kinase

WHO = World health organization (Weltgesundheitsorganisation)

1 Einleitung

1.1 Überblick

„Auf Basis der aktuellen Hochrechnungen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. für das Jahr 2007 erkrankten in Deutschland jedes Jahr etwa 246.000 Männer und 214.000 Frauen neu an einer Krebserkrankung. An Krebs sterben in Deutschland jedes Jahr etwa 116.000 Männer und 100.000 Frauen (...). Damit liegt Krebs hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen weiter an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik in Deutschland. (...)“ (Pritzlueit et al., Jahresbericht 2011: Krebs in Schleswig-Holstein - Band 9 - Inzidenz und Mortalität im Jahr 2008).

Maligne Lymphome machen etwa drei bis vier Prozent aller malignen Neoplasien aus und sind damit relativ seltene Erkrankungen. Sie werden grob in das Hodgkin-Lymphom und in die Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) unterteilt. Als NHL wird eine heterogene Gruppe maligner Lymphome zusammengefasst, die sich zytologisch vom Hodgkin-Lymphom abgrenzen lassen. Sie gehen meist von den B-, aber auch von den T-Lymphozyten aus. Das häufigste NHL ist das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (= diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) gefolgt vom Follikulären Lymphom (FL).

1.2 Definition

Nach der zurzeit gültigen Definition der Weltgesundheitsorganisation (= World health organization, WHO) (Harris et al., 2008) ist das FL eine aus B-Lymphozyten bestehende Neoplasie in den Keimzentren der Lymphknoten. Der Tumor imitiert das Wachstumsmuster eines Keimzentrumsfollikels und weist deshalb ein zumindest teilweise follikuläres Wachstumsmuster auf. Er zählt zu den niedrig-malignen Lymphomen der B-Zell-Reihe. Die WHO-Definition berücksichtigt neben der Morphologie den Immunphänotyp sowie genetische und klinische Merkmale.

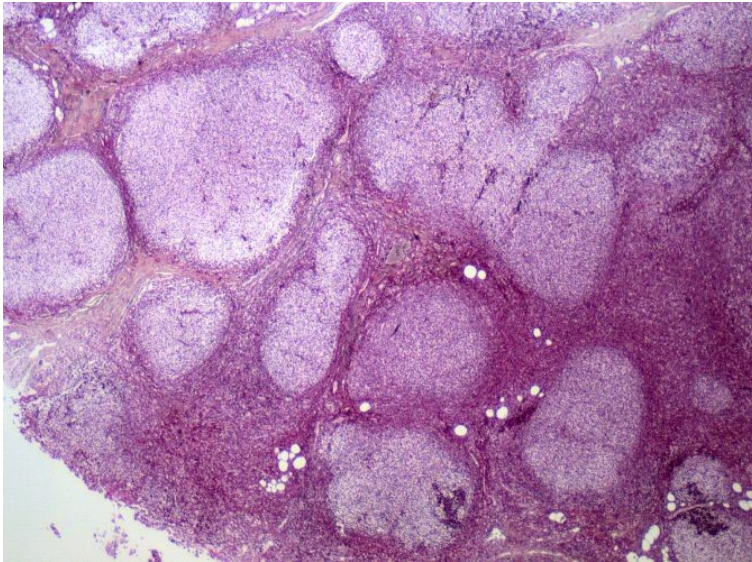


Abbildung 1: Klassisches Follikuläres Lymphom

1.3 Epidemiologie

Maligne Lymphome machen ungefähr drei bis vier Prozent aller malignen Neoplasien aus. Die Inzidenz der NHL beträgt in der westlichen Welt derzeit zehn pro 100.000 Einwohner jährlich, mit zunehmender Tendenz. Das FL macht etwa 20 % der NHL aus und ist damit das zweithäufigste der NHL. Haupterkrankungsalter ist das sechste Lebensjahrzehnt. Frauen sind etwas häufiger als Männer betroffen (Mann : Frau = 1 : 1,7) (de Jong 2005, Freedman 2012, Leich et al, 2011a).

In Deutschland wurde im Jahr 2007 bei 6.592 männlichen und bei 6.221 weiblichen Patienten ein NHL diagnostiziert. Dies entspricht einem Anteil von 2,7 % beziehungsweise 2,9 % an allen Krebserkrankungen. 2.926 Männer und 2.658 Frauen sind im Jahr 2008 an einem NHL gestorben. In Schleswig-Holstein wurde diese Diagnose im Jahr 2008 bei 240 Männern und 214 Frauen gestellt, wobei das DLBCL mit 59,2 % die meisten Fälle ausmachte, gefolgt vom FL mit einer Häufigkeit von 21,8 %. Periphere und kutane T-Zell-Lymphome machten 8,6 % der Fälle aus, sonstige und nicht näher bezeichnete Typen 10,4 % (Pritzlueke et al., 2011).

1.4 Klinik und Therapie

FL zeigen sehr variable klinische Verläufe. Die Mehrzahl der Fälle zeichnet sich durch ein langsames, indolentes Wachstum über lange Zeiträume aus. Deshalb ist die Erkrankung bei vielen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits fortgeschritten (Harris et al., 2008, Freedman 2012, Leich et al., 2011a).

Hauptmanifestationsorte sind neben den Lymphknoten die Milz, das periphere Blut und das Knochenmark, das in 40 bis 70 % der Fälle befallen ist. Der Gastrointestinaltrakt und verschiedene Weichteilgewebe können im Rahmen einer fortgeschrittenen Erkrankung ebenfalls betroffen sein. Das FL tritt in seltenen Fällen primär in extranodalen Organen auf wie zum Beispiel in der Haut, im Gastrointestinaltrakt, in den Gonaden sowie in der Brustdrüse (Harris et al., 2008). In ungefähr einem Viertel aller Fälle kommt es zu einer Transformation in ein hochmalignes Lymphom, meistens in ein DLBCL (Freedman, 2012, Leich et al., 2011a). Das DLBCL stellt eine eigene Krankheitsentität dar und muss separat betrachtet werden. Die mittlere Überlebenszeit beträgt beim DLBCL zwei Jahre (Leich et al., 2011a).

So heterogen wie die Untergruppen der NHL, so vielfältig sind auch die Therapieoptionen. Wie bei den meisten anderen Lymphomen auch, hängt das therapeutische Vorgehen beim FL vom Erkrankungsstadium ab. Bei einem lokalisierten Stadium (I, II) kommen eine lokale Bestrahlung sowie gegebenenfalls zusätzlich eine zytostatische Therapie in Frage, in bestimmten Fällen kann auch abgewartet und beobachtet werden (Freedmann, 2012).

In generalisierten Stadien ist der Therapieansatz palliativ. Die Behandlung wird dann beim Auftreten krankheitsassoziierter Symptome begonnen. Therapieoptionen bestehen in alleiniger Chemotherapie, Immunochemotherapie und Radiochemotherapie. Anschließend erfolgt eine Erhaltungstherapie mit dem CD20-Antikörper Rituximab. Bei ungenügendem Ansprechen auf die Therapie sowie bei Rezidiven kann im Rahmen von Studien eine Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer oder allogener Stammzelltransplantation angezeigt sein (Freedmann, 2012).

1.5 Pathologie und Pathophysiologie

Laut WHO werden FL nach ihrem Grad und ihrem Wachstumsmuster klassifiziert (Harris et al., 2008). Maßgeblich ist bei der Graduierung die Anzahl der Zentroblasten pro Gesichtsfeld bei starker Vergrößerung (high power field; hpf). Bei einem Gesichtsfelddurchmesser von 0,159 mm² geschieht die Graduierung nach folgendem Schema:

- Grad 1: 0-5 Zentroblasten/hpf
- Grad 2: 6-15 Zentroblasten/hpf
- Grad 3: >15 Zentroblasten/hpf

Beim FL Grad 3 wird zwischen den Graden 3a und 3b differenziert. Sind Zentrozyten zwischen den Blasten nachzuweisen, liegt ein FL Grad 3a vor. Liegen dagegen zusammenhängende Flächen von Zentroblasten vor, handelt es sich um ein FL Grad 3b. Sind zusätzlich Anteile diffusen Wachstumsmusters vorhanden, wird ein DLBCL diagnostiziert (Harris et al., 2008).

Unterschieden werden ein follikuläres und ein diffuses Wachstumsmuster. Weisen mehr als 75 % der untersuchten Bereiche ein follikuläres Muster auf, wird der Wachstumstyp als rein follikulär klassifiziert. Bei einem follikulären Anteil zwischen 25 und 75 % gilt der Wachstumstyp als follikulär und diffus. Liegt der Anteil unter 25 %, heißt der Wachstumstyp fokal follikulär. Bei Null Prozent follikulärem Wachstum ist der Typ rein diffus (Harris et al., 2008).

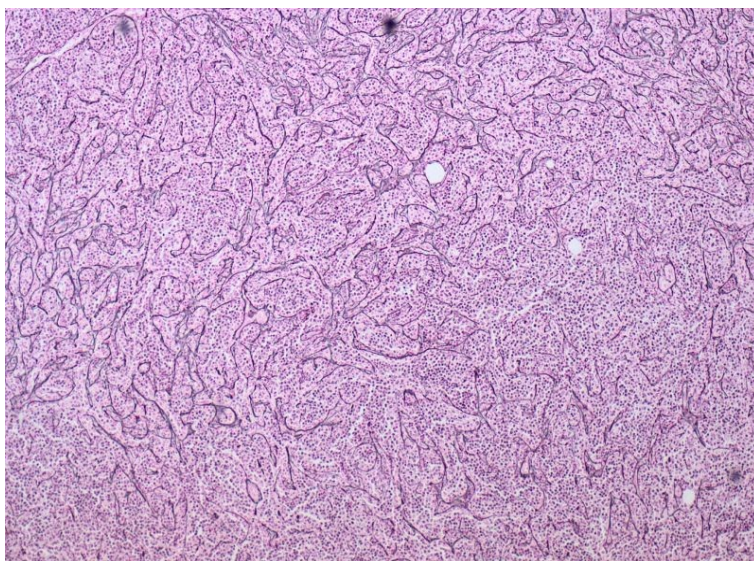


Abbildung 2: Diffuser Wachstumstyp beim FL

Für die Diagnostik des Wachstumsmusters dient der Marker für Follikulär-dendritische Zellen CD23. CD23 fehlt in diffusen Arealen, während er in neoplastischen Follikeln in der Regel vorhanden ist (Leich et al., 2011a).

Da es sich beim FL um eine B-Zellneoplasie handelt, exprimieren die Tumorzellen B-Zell-assoziierte Antigene (CD 19, CD 20, CD 22, CD 79a, Pax 5) und sind BCL2-positiv (Klapper, 2011, Harris et al., 2008). Der Keimzentrumsursprung zeigt sich durch Positivität für Keimzentrumsantigene wie CD10, BCL6, CD38, LMO2, AID, GCET1, CXCR4, wobei CD10 und BCL6 die diagnostisch nützlichsten darstellen. Mehr als 90 % der FL vom Grad 1 oder 2 sind CD10-positiv, während höhergradige FL, solche mit diffusem Wachstumstyp oder solche ohne t(14;18) (q32;q21)-Translokation, häufiger CD10-negativ, aber BCL6-positiv sind (Klapper, 2011).

Die B-Zellen sind von anderen Zellen des Immunsystems umgeben. Dies sind in erster Linie T-Zellen, die mit T-Zellmarkern wie CD3 identifiziert werden können (Klapper, 2011).

Zentraler Ausgangspunkt in der Ätiopathogenese des FL ist die t(14;18)(q32;q21)-Translokation. Hierbei ist das BCL2-Protoonkogen von Chromosom 18 auf das Chromosom 14 in den Bereich des Immunglobulin-Schwerketten-Gens transloziert. Das translozierte BCL2-Gen steht unter dem Einfluss der Promotoraktivität des Immunglobulin-Schwerketten-Genlocus (IgH), was zu einer konstitutiven Expression des BCL2-Proteins führt. Dieses Protein ist antiapoptotisch wirksam und wird physiologisch in langlebigen B-Gedächtniszellen, jedoch nicht in den B-Lymphozyten der Keimzentren exprimiert. Die konstitutive Expression von BCL2 bewirkt eine Reduktion der Apoptose von Keimzentrums-B-Zellen, welche sich daraufhin anhäufen. Das anfängliche Tumorwachstum kann somit als eine passive Akkumulation langlebiger, der Apoptose entgangener B-Lymphozyten angesehen werden (De Jong, 2005). Je nach verwendeter Methode schwankt die Häufigkeit der detektierten BCL2-Translokation in FL zwischen 50 und 90 % (Johnson et al., 1995, Lopez-Guillermo et al., 1999, Montoto et al., 2003, Vaandrager et al., 2000, Gollub et al., 2009).

Die t(14;18)(q32;q21)Translokation scheint nach heutigem Kenntnisstand in der Mehrzahl der Fälle ein initiiierendes Ereignis für ein FL zu sein. Da die Translokation auch in Lymphozyten im Knochenmark, im Blut, in der Milz und in den Tonsillen von gesunden Personen ohne klinischen Anhalt für ein Lymphom gefunden wurde (Limpens et al., 1991), erscheint sie aber als alleinige Ursache für ein FL nicht ausreichend. Auch die Tatsache, dass bei einem Teil der FL keine BCL2-Translokation nachgewiesen werden kann, deuten auf weitere zur Pathogenese beitragende genetische Veränderungen hin. Anzahl und Komplexität sekundärer genetischer Veränderungen nehmen mit dem histologischen Grad zu. Im Durchschnitt liegen sechs genetische Veränderungen vor (Höglund et al., 2004). Grob können submikroskopische Deletionen, wie zum Beispiel Punktmutationen, von größeren chromosomalen Veränderungen unterschieden werden. Klapper (2011) beschreibt als häufigste sekundäre genetische Veränderungen -1p36 (18 % der Fälle), +2p15 (24 %), -3q (14 %), -6q (25 %), +7p (19 %), +7q (23 %), +8q (14 %), -9p (16 %), -11q (15 %), +12q (20 %), -13q (11%), -17p (16 %), +18p (18 %) und + 18q (28 %). In den betroffenen Regionen sind verschiedene Protoonkogene lokalisiert.

Für Translokationen des BCL6-Gens auf 3q27 werden Häufigkeiten zwischen 14 und 23 % beschrieben (Lee et al., 2008, Katzenberger et al., 2004, Diaz-Alderete et al., 2008, Gollub et al., 2009). Analog zur oben beschriebenen BCL2-Translokation kann eine Translokation des BCL6-Gens zu einer konstitutiven Überexpression des BCL6-Proteins führen. Die entscheidende Funktion des BCL6-Proteins ist eine Differenzierungsblockade von Keimzentrumszellen zu reifen Plasmazellen. Dies geschieht indem das BCL6-Protein die Expression des BLIMP-1 (B-Lymphozyten-induziertes-Maturations-Protein-1)-Gens unterdrückt. Das BLIMP-1-Protein ist verantwortlich für die Differenzierung der Keimzentrumszellen zu reifen Plasmazellen. Zusätzlich zu dieser Differenzierungsblockade scheint BCL6 auch die Proliferation von B-Zellen steigern zu können (Crotty et al., 2010).

Zum Einfluss charakteristischer genetischer Anomalien auf Verlauf und Prognose der Erkrankung liegen unterschiedliche, teils widersprüchliche Daten vor. Jedoch besteht ein breiter Konsens darüber, dass die klassische Form des FL in der Regel

mit einer BCL2-Translokation einhergeht, während diese bei höhergradigen Formen oft nicht gefunden wird (Leich et al., 2011a, Gollub et al., 2009, Diaz-Alderete et al., 2008). Verluste in den Chromosomen 1p, 6q, 10q, 17p, eine Trisomie 21 sowie Zugewinne auf Chromosom 1q scheinen mit einer klinisch aggressiveren Präsentation einher zu gehen. Zusätzlich scheinen Veränderungen von MYC, BCL6 sowie eine Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 entscheidende Einflüsse auf eine Transformation in ein aggressives Lymphom zu haben (Leich et al., 2011a).

Katzenberger et al. (2008) beschreiben einen t(14;18)-negativen Subtyp des FL mit einem überwiegend diffusen Wachstumsmuster, häufiger Lokalisation in der Inguinalregion und mit der Formation großer lokalisierter Tumore. In fast allen Fällen lagen Deletionen in 1p36 vor.

Zum Nachweis genetischer Translokationen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Dies sind die klassische Zytogenetik, die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) sowie die Southern-Blot-Methode. In der Pathologie haben sich die FISH und die PCR als gängige Methoden etabliert, weil sie an Formalin-fixierten Proben durchführbar sind. Das sensitivste Verfahren ist die PCR, die jedoch nur Translokationen detektiert, die einen bestimmten Bruchpunkt betreffen. Mit der FISH können auch atypische Translokationen und Genamplifikationen nachgewiesen werden.

1.6 Prognose

Das FL stellt eine biologisch und klinisch heterogene Krankheitsentität dar. Typisch sind langsame, indolente Verläufe über lange Zeiträume (Harris et al., 2008, Freedman 2011, Leich et al., 2011a). In ungefähr einem Viertel aller Fälle kommt es zur Transformation in ein DLBCL mit mittleren Überlebenszeiten von ungefähr zwei Jahren (Freedman 2011, Leich et al., 2011a). Deshalb stellt sich die Frage nach Parametern, welche eine zuverlässige Abschätzung der Prognose erlauben und damit klinisch tätigen Ärzten eine Hilfestellung bei Entscheidungen über Art und Umfang der Therapie geben.

In der Klinik hat sich der Follicular Lymphoma international prognostic index (FLIPI) etabliert, der jedoch nur eine grobe Abschätzung der Prognose erlaubt (Klapper, 2011, Leich et al., 2011a, Freedman, 2011). Beim FLIPI gehen fünf Parameter ein: Alter > 60 Jahre, Stadium III oder IV, Befall von mehr als vier Lymphknotenregionen, Hämoglobinwert < 12 g/dl sowie erhöhte Serumkonzentration für Lactatdehydrogenase. Pro Parameter wird ein Punkt berechnet. Definitionsgemäß spricht man bei Vorliegen von keinem oder einem Punkt von einem Stadium mit niedrigem Risiko, bei Vorliegen von zwei Punkten von einem Stadium mit mittlerem Risiko und bei drei oder mehr Punkten von einem Stadium mit hohem Risiko. Die drei verschiedenen Gruppen weisen unterschiedliche Fünf-Jahres-Überlebensraten auf, die sich seit Einführung neuerer Therapieoptionen gebessert haben (Freedmann, 2011). Vor Einführung der Therapie mit Rituximab lag die durchschnittliche Überlebenszeit zwischen acht und zehn Jahren (Leich et al., 2011a).

Welche histopathologischen Marker als weitere zuverlässige Prognoseparameter dienen könnten, ist ein unter Experten seit langem kontrovers diskutiertes Thema. Diverse Arbeitsgruppen haben klinische, morphologische, immunhistochemische und molekulargenetische Parameter mit Überlebensraten verglichen und sind zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen.

Zur Gradeinteilung nach WHO als Prognoseparameter beim FL liegen widersprüchliche Daten vor. Harris et al. (2008) beschreiben einen Zusammenhang zwischen histologischem Grad und dem Gesamtüberleben. Sowohl Klapper et al. (2007) als auch Bhagavati et al. (2009) konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen diesen Parametern feststellen, Klapper et al. (2007) dafür zwischen dem Nachweis von Sklerose im Tumor und einer schlechten Gesamtüberlebensrate. Harris et al. (2008) beschreiben zudem einen Zusammenhang zwischen diffusem Wachstumsmuster und einer schlechteren Prognose. Klapper et al. (2007) konnten diesbezüglich einen Trend nachweisen.

Das Vorhandensein oder das Fehlen spezifischer genetischer Veränderungen – zum Beispiel die t(14;18)(q32;q21)Translokation – dienen zur Prognoseabschätzung. Jedoch ist auch hier die Datenlage nicht eindeutig.

Ein weiterer Ansatz sind Genexpressionsanalysen. Dave et al. (2004) konnten für zwei unterschiedliche Expressionsmuster – immun response 1 (IR1) und immune response 2 (IR2) – abweichende Überlebensraten zuordnen.

Auch das Mikromilieu aus nicht-neoplastischen Zellen des Immunsystems ist essentiell für das Wachstum von NHL (Alvaro et al., 2006, Lee et al., 2006, Carreras et al., 2006, Glas et al., 2007). Alvaro et al. (2006) fanden heraus, dass ein Vorhandensein von Zellen der spezifischen Immunität – wie CD4+ und CD8+-Zellen – eher mit einem prognostisch günstigen Verlauf einhergeht, während ein Überwiegen von Elementen der unspezifischen Immunität – CD57+ Zellen, Makrophagen – eher mit klinisch aggressiveren Tumoren und schlechterer Prognose assoziiert ist.

1.7 Micro-RNAs

MicroRNAs sind ungefähr 18 bis 25 Nukleotide kurze Moleküle, die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren. Vermutlich existieren über 1.000 verschiedene humane MicroRNAs, durch die schätzungsweise zehn bis 30 % aller humanen Gene reguliert werden (Di Leva und Croce, 2010, Lawrie, 2009). Sie werden in sämtlichen Organismen exprimiert und da sie in gleicher Form in unterschiedlichen Spezies vorkommen, wurden sie offenbar über lange Zeiträume in der Entwicklungsgeschichte konserviert (Iorio und Croce 2009).

Die Mehrheit der MicroRNAs sind in Genregionen lokalisiert, die mit Mechanismen der Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden. Sie haben entscheidende Einflüsse auf Funktionen wie Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Gewebe- und Organentwicklung sowie Apoptose (Di Leva und Croce, 2010, Lawrie et al., 2009, Iorio und Croce, 2009). Damit können sie sowohl als (Proto-)onkogene als auch als Tumorsuppressorgene fungieren (Di Leva und Croce 2010). Da sie im peripheren Blut und auch in konservierten Gewebeproben nachgewiesen werden können und zudem für verschiedene Gewebe und Entwicklungsstadien hochspezifisch sind, könnten sie als Tumormarker und/oder Prognoseparameter nützlich sein (Chin und Slack, 2008).

Die Geschichte von der Entdeckung der MicroRNAs geht bis in die 1980er Jahre zurück. 1981 ergaben sich bei Experimenten mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* erste Hinweise, dass die Transkriptionsprodukte des Gens *lin-4* reguliert werden könnten. Dies konnte 1993 bestätigt werden. In zwei voneinander unabhängigen Studien wurde herausgefunden, dass *lin-4* nicht für ein Protein, sondern für zwei RNA-Transkripte mit Längen von ungefähr 20 beziehungsweise 60 Nukleotiden kodiert, deren Sequenzen komplementär zum 3'UTR-Ende des Gens *lin-14* sind. Daraufhin konnte nachgewiesen werden, dass die Translation der mRNA von *lin-14* durch die RNA-Moleküle von *lin-4* supprimiert werden kann (Di Leva und Croce, 2010).

Die immense Bedeutung der MicroRNAs für die Medizin zeichnete sich erst einige Jahre später ab. Im Jahr 2000 wurde *let-7* entdeckt, eine 21 Nukleotide lange RNA mit komplementären Sequenzen für die Gene *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* und *daf-12*. Es konnte ein zu *lin-4* analoger Mechanismus nachgewiesen werden. Es folgten die Entdeckungen zahlreicher weiterer MicroRNAs und ihrer Einflüsse auf verschiedene zelluläre Funktionen (Di Leva und Croce, 2010). Es ist zu erwarten, dass das Wissen um die Bedeutung der MicroRNAs in den nächsten Jahren bis Jahrzehnten weiter zunimmt (Jima et al., 2010).

Die Bildung der MicroRNA-Moleküle geschieht auf folgendem Weg (Iorio und Croce, 2009): nach Transkription der MicroRNA-Gene entstehen zunächst 100 bis 150 Nukleotide lange primäre MicroRNA-Vorstufen (*pri-microRNA*). Durch Palindromsequenzabschnitte innerhalb eines *pri-microRNA*-Moleküls bilden sich über kovalente Basenpaarung Schleifenstrukturen aus. Im Zellkern schneidet die RNA-Endonuklease DROSHA kurze Teile von der *pri-microRNA* ab. Es entstehen 70 bis 100 Nukleotide lange precursor microRNA (*pre-microRNA*). Durch das Transportmolekül Exportin 5 gelangt die *pre-microRNA* aus dem Nukleus in das Zytoplasma, wo die RNA-Endonuklease DICER die Schleifenstruktur abtrennt. Es entstehen ungefähr 22 Nukleotide kurze Moleküle. Deren Stränge teilen sich in einen Positiv- und in einen Negativstrang. Die Einzelstrang-microRNA wird in einen Komplex namens microRNA-beihaltenden Ribonukleoprotein-Komplex inkorporiert. Innerhalb dieses Komplexes stellt die MicroRNA die biologisch aktive Form dar.

MicroRNAs regulieren die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene. Sie binden an die 3'-untranslatierte Region der mRNAs von Zielgenen und bewirken entweder ein direktes Zerschneiden der mRNA oder eine Hemmung der nachfolgenden Translation (Chin und Slack, 2008, Di Leva und Croce, 2010, Wang et al., 2011). Da sie mit unvollständiger Komplementarität an ihre Ziel-mRNA binden, können sie theoretisch verschiedene mRNAs beeinflussen. Somit kann der Verlust einer funktionsfähigen MicroRNA möglicherweise die Expression vieler Proteine beeinträchtigen (Chin und Slack, 2008).

Zur Nomenklatur des MicroRNA-Systems ist Folgendes zu erwähnen (Hussein, 2011): an die Kürzung mir – für die pre-microRNA – beziehungsweise miR – für die mature Form – wird eine Zahl gehängt. Auf diese Weise werden die humanen MicroRNAs durchnummeriert, zum Beispiel miR-21. Der Zusatz „*“ bezeichnet den komplementären Strang der microRNA, der degradiert wird. Bei Paralogen handelt es sich um MicroRNAs, die sich lediglich in ein bis zwei Basen voneinander unterscheiden. In diesen Fällen werden an die Bezeichnung MIR-21 die Zusätze a, b oder c angehängt. Zudem kommt es vor, dass aus zwei unterschiedlichen pri-microRNAs zwei identische mature MicroRNAs entstehen. Dann werden sie als miR-1-1 und miR-1-2 bezeichnet. Die beiden erstbeschriebenen microRNAs let-7 und lin-4 behalten ihre ursprüngliche Bezeichnung.

Die Bedeutung von MicroRNAs bei Krebserkrankungen konnte erstmals von Croce am Beispiel der chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL) nachgewiesen werden (Iorio und Croce, 2009). Croce konnte nachweisen, dass die beiden MicroRNAs miR-15a und miR-16-1 als Tumorsuppressoren agieren. Mutationen im miR-15/16-Allel fanden sich bei Patienten mit CLL in 50 bis 70 % der Fälle.

Inzwischen gibt es vielfältige Untersuchungen, die sowohl Unterschiede im Expressionsmuster von Micro-RNAs zwischen sämtlichen Tumorarten und gesundem Gewebe als auch Unterschiede zwischen Subgruppen von Tumoren nachgewiesen haben (Chin und Slack, 2008). Somit können spezifische Expressionsmuster vielen spezifischen Tumorentitäten zugeordnet werden.

Auffällig ist, dass in Tumoren insgesamt mehr MicroRNAs herunter- als hochreguliert sind (Di Leva und Croce, 2010). Da viele MicroRNAs zelluläre Differenzierungsprozesse regulieren, spekulieren Di Leva und Croce (2010), dass diese globale Repression von MicroRNAs in Tumoren Ausdruck eines weniger differenzierten Zellstatus sein könnte. Es könnte auch ein zufälliges Nebenprodukt von Neoplasien sein.

Ein Beispiel für eine MicroRNA, die als Tumorsuppressor wirkt, ist let-7. Let-7 inhibiert die Expression von Onkogenen wie RAS, MYC und HMGA2 (Di Leva und Croce, 2010). Eine der ersten MicroRNAs, bei der onkogene Wirkungen nachgewiesen werden konnte, war das miR-17-92-Cluster, das in sechs MicroRNAs prozessiert wird. Das miR-17-92-Cluster kodiert für ein primäres Transkript, aus welchem sechs verschiedene mature MicroRNAs hervorgehen (Tsuchida et al., 2011).

Beispiele dafür, dass für bestimmte MicroRNAs gegensätzliche Wirkungen beschrieben sind, sind miR-221 und miR-222. Einerseits inhibieren sie die Erythropoese, andererseits ist ihre Hochregulierung Teil eines spezifischen Expressionsmusters bei Lebermalignomen (Di Leva und Croce, 2010).

Auch bei der Metastasierung von Tumoren konnte der Einfluss von MicroRNAs nachgewiesen werden (Di Leva und Croce, 2010). Ein entscheidender Schritt bei der Metastasierung ist die Epithel-Mesenchym-Transition. Die miR-200-Familie, zu der miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 und miR-429 gehören, sowie miR-205 regulieren die Epithel-Mesenchym-Transition. Sie wird durch Verlust dieser MicroRNAs aktiviert.

MicroRNA-Analysen beim FL haben Röhle et al. (2008), Lawrie et al. (2009), Wang W et al. (2012) und Leich et al. (2011) durchgeführt.

2 Fragestellung

Das FL ist ein morphologisch und genetisch relativ gut charakterisiertes niedrig-malignes B-Zelllymphom. Bei einem Teil der Fälle wird die Transformation in ein hochmalignes Lymphom beobachtet. Noch ist relativ unklar, welche Rolle andere genetische Veränderungen neben der BCL2-Translokation spielen. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich beim FL um eine biologisch heterogene Lymphom-Gruppe handelt.

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine Subgruppenanalyse eines Kollektivs von 102 Fällen FL aus den Jahren 2005 und 2006 aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Diese wurden morphologisch, immunhistochemisch und molekulargenetisch untersucht. Als Subgruppe wurden 15 Fälle mit einem Anteil diffusen Wachstums $> 25\%$ ausgewählt (Gruppe DFL) und deren Daten mit denen einer aus 14 Fällen klassischer FL bestehenden Referenzgruppe verglichen.

Mit dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich bei Betrachtung von FL mit einem Anteil diffusen Wachstums $> 25\%$ Hinweise auf das Vorliegen einer eigenen biologischen Entität ergeben.

3 Material und Methoden

Wie beschrieben, handelt es sich bei dieser Arbeit um eine Subgruppenanalyse eines aus 102 Fällen FL bestehenden Kollektivs (Gollub et al., 2009, Thorns, 2009).

3.1 Patienten/ Patientinnen

Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, wurden alle vorhandenen Proben von FL aus den Jahren 2005 und 2006 ausgewählt. Diese wurden auf folgende drei Kriterien geprüft: diagnostische Erstbiopsie, gleichzeitiges Vorliegen einer Beckenkammbiopsie sowie ausreichendes Material. Die Kriterien erfüllten insgesamt 102 Fälle, welche im Rahmen des Projekts untersucht wurden.

Das Geschlechterverhältnis (m/w = 1/1,2) war in etwa ausgeglichen. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose betrug 58 Jahre. Bei 78 Fällen handelte es sich um diagnostische Lymphknotenbiopsien, bei zehn Fällen um extranodale Biopsate während in 14 Fällen eine sichere Zuordnung nicht möglich war. Die häufigsten Lokalisationen der Biopsien waren cervikal (n = 29), inguinal (n = 22) und axillär (n = 13).

3.2 Morphologische Untersuchungen

Die morphologischen Parameter der Weichgewebsbiopsate wurden in einem Konsensusverfahren von drei Untersuchern (Wiebke Gollub, Christoph Thorns, Björn Stassek) an Haematoxylin-Eosin-, Giemsa- und PAS-gefärbten Schnitten erhoben. Zudem wurde eine Versilberung angefertigt.

Die folgenden morphologischen Parameter wurden nach einem standardisierten

Schema erfasst:

- Die Graduierung erfolgte nach den beschriebenen Kriterien der WHO-Klassifikation von 2001. Bei gleichzeitigem Vorliegen von unterschiedlichen Graden wurden ein primärer (dominierender) und ein sekundärer Grad angegeben.
- Das Wachstumsmuster ist in den meisten Fällen follikulär mit diffusen Anteilen. Die diffusen Anteile wurden in Prozent, bezogen auf die Gesamttumorfläche, angegeben.
- Sklerosierung ist ein sowohl nach Entzündungen als auch nach tumorösen Veränderungen häufig gesehenes Phänomen. Die Ausprägung der Sklerose wurde semiquantitativ (nicht vorhanden, gering, stark) erfasst.
- Relativ häufig infiltrieren FL die Lymphknotenkapsel. Dieser Befund wurde als vorhanden oder nicht vorhanden dokumentiert.
- Eine Infiltration des Knochenmarktrepanats wurde als vorhanden oder nicht vorhanden erfasst. Des Weiteren wurde das Ausmaß der Infiltration, bezogen auf die Gesamtfläche und auf die Zellularität, sowie das Infiltrationsmuster festgestellt.
- Eine Marginalzonendifferenzierung wurde als monozytoide oder plasmazytoide Tumorzellpopulation mit perifollikulärer Ausbreitung definiert und als vorhanden oder nicht vorhanden dokumentiert.

3.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Mit der Immunhistochemie können Proteine in Biopsaten von Geweben markiert werden. Hierbei kommen Antikörper und Chromogene zum Einsatz. Ein Primärantikörper ist gegen das gesuchte Epitop gerichtet. Ein sekundärer Antikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt, welches einen Farbumschlag des Chromogens katalysiert. Bei unseren Untersuchungen wurde Diaminobenzidin als Chromogen verwendet.

Alle Inkubationen und Waschschrte wurden auf dem Techmate-Automaten von DAKO durchgeführt. Zuvor wurden Hitzevorbehandlungen in der Mikrowelle, im

Dampfgerar und Dampfopf mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte (pH 6,1 und pH 9,5) durchgeföhrt.

Antikörper gegen folgende Epitope kamen zum Einsatz: CD20, CD3, CD68, CD4, CD8, CD23, CD10, bcl2, bcl6, IgD, Kappa, Lambda, MiB1.

Folgende immunhistochemische Marker wurden nach einem jeweils beschriebenen Schema bestimmt:

- CD20 ist ein B-Zellmarker. Er wurde als positiv oder negativ dokumentiert.
- CD3, CD4 und CD8 sind T-Zellmarker. Für diese Marker wurden jeweils der Anteil an der Gesamtzellularität und das Verteilungsmuster bestimmt (intrafollikulär, perifollikulär und diffus).
- CD68 wird auf Makrophagen exprimiert. Auch hier wurde der Anteil an der Gesamtzellularität sowie das Verteilungsmuster bestimmt (intrafollikulär, perifollikulär und diffus).
- CD10 und BCL6 sind Keimzentrumsmarker. Sie wurden als negativ, schwach positiv oder stark positiv gewertet.
- BCL2 ist ein antiapoptotisch wirksames Protein, das physiologisch auf T-Zellen exprimiert wird, beim Follikulären Lymphom jedoch charakteristischerweise auch auf B-Zellen exprimiert wird. Zur Auswertung wurde zum Vergleich die BCL2-Reaktivität der T-Zellen genutzt. Auf diesen ist BCL2 physiologisch vorhanden. War die immunhistochemische Reaktivität der B-Zellen ebenso stark wie die der T-Zellen, wurde sie als stark positiv gewertet. War sie schwächer ausgeprägt als auf den T-Zellen, wurde sie als schwach positiv gewertet.
- CD23 wird auf follikulären dendritischen Zellen und auf einem Teil der Follikel-Mantelzellen exprimiert. CD23 dient der Unterscheidung von follikulärem und diffusem Wachstum. Ausgewertet haben wir die Ausprägung der Netzwerke, die die follikulären dendritischen Zellen bilden (keine, wenige, mäßige, kräftige Ausprägung).
- Die Reaktionen für die Immunglobulin-Leichtketten Kappa und Lambda wurden als monotypische oder polytypische Leichtkettenexpression dokumentiert.

- IgD wird von Zellen der Mantelzone exprimiert, jedoch nicht von neoplastischen Follikelzellen. Deshalb diente er dazu, den Anteil erhaltener Mantelzonen zu bestimmen. Eine erhaltene Mantelzone wurde definiert als ein Kranz von IgD-positiven Zellen, welcher mindestens ein Drittel der Zirkumferenz des Follikels umfasst.
- MiB-1 ist ein Proliferationsmarker. Wir erfassten den Anteil an markierten Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation, sowie den prozentualen Anteil positiver Zellen in dem Bereich innerhalb des Gesichtsfeldes (400fache Vergrößerung) mit der höchsten Proliferationsrate („hot spot“).

3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Der Primärdatensatz umfasste Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen zur Detektion von Translokationen und Amplifikationen von BCL2, BCL6 und CMYC bei allen 102 Fällen des Gesamtkollektivs. Voraussetzung für den Einschluss in die Referenzgruppe waren unter anderem der Nachweis einer BCL2-Translokation sowie der Nichtnachweis einer BCL6-Translokation.

3.5 Micro-RNA-Signaturen

Die MicroRNA-Analysen stellen eine Subgruppenanalyse des aus 102 Fällen FL bestehenden Gesamtkollektivs dar. Als Subgruppe wurden alle 15 Fälle mit einem Anteil diffusen Wachstums über 25 % zusammengefasst. Einschlusskriterien für die Referenzgruppe waren: WHO-Grad I oder II, Anteil diffusen Wachstums unter 25 %, starke Reaktivität für CD10 und BCL2, Nachweis einer BCL2-Translokation, Nichtnachweis einer BCL6-Translokation.

Die Isolierung der RNA aus dem Gewebe mit dem RecoverAll Kit (Ambion, Austin, Texas, USA) sowie die nachfolgende Messung der RNA-Konzentrationen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1) Entparaffinierung

- 1 ml Xylol zum Gewebe geben, vortexen und drei Minuten im Wasserbad bei 50°C inkubieren.
- Zentrifugieren (Zwei Minuten, maximale Umlaufgeschwindigkeit), Überstand absaugen.
- 1 ml 100 % Ethanol zugeben, vortexen, zentrifugieren (Zwei Minuten, maximale Umlaufgeschwindigkeit), Überstand absaugen und Wiederholung dieses Schrittes.
- Pellet erneut zentrifugieren (15 Sekunden, maximale Umlaufgeschwindigkeit), Überlauf mit einer gelben Spitze abnehmen.
- Pellet 15 Minuten trocknen

2) Proteaseverdau (RNA- und DNA-Isolierung)

- 400 µl Digestion-Puffer zu jeder Probe geben
- 4 µl Protease zu jeder Probe geben
- Probe leicht schütteln, so dass das Gewebe in der Lösung schwimmt
- Inkubation bei 50 °C für drei Stunden

3) RNA-Isolierung

- 480 µl Isolation Additive zu jeder Probe geben und vortexen.
- 1,1 ml 100 % Ethanol zugeben und durch Hoch- und Herunterpipettieren mischen. Die Lösung sollte klar werden.
- In drei Schritten die 1,98 ml des Probengemischs auf eine Säule laden und bei < 10.000 g für 30 Sekunden zentrifugieren. Durchfluss jeweils verwerfen.
- Säule mit 700 µl Wash-1-Lösung waschen (20 Sekunden; Raumtemperatur; < 10.000 x g). Durchfluss verwerfen.
- Säule mit 500 µl Wash-2/3-Lösung waschen (30 Sekunden; Raumtemperatur; < 10.000 x g). Durchfluss verwerfen.
- Säule trocknen (30 Sekunden; Raumtemperatur; < 10.000 x g). Durchfluss nicht verwerfen.

4) Nukleaseverdau und finale Elution

- Zugabe von 60 µl DNase-Mix (6 µl 10 mal DNase Puffer, 4 µl DNase, 50 µl Ambion-Wasser) ins Zentrum der Säule.
- 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur.
- Säule mit 700 µl Wash-1-Lösung waschen (30 Sekunden; Raumtemperatur; < 10.000 x g). Durchfluss verwerfen.
- Säule mit 500 µl Wash-2/3-Lösung waschen (30 Sekunden; Raumtemperatur; < 10.000 x g). Durchfluss verwerfen und Wiederholung dieses Waschschrilles. Zentrifugieren.
- Zur Elution 30 µl 95 ° heißen, nukleasefreien Ambionwassers in die Mitte der Säule geben, eine Minute inkubieren und anschließend zentrifugieren (Eine Minute bei maximaler Umlaufgeschwindigkeit). Anschließend die Prozedur wiederholen, so dass schließlich in 60 µl Ambionwasser eluiert wurde.
- Messung der RNA-Konzentrationen mit dem Nanodrop Spectrophometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA)

Mit einem Thermocycler wurde eine Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT Reaktion) durchgeführt. Mit dem Roche Light Cycler 480 wurde eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) durchgeführt und die MicroRNA-Expressionen erfasst. Das folgende Übersichtsschema entstammt dem TaqMan® Small RNA Assays Protocol:

1) RT Reaktion

- Vorbereitung des RT Reaktion-Master-Mix
- Vorbereitung der RT Reaktion
- Durchführung der RT Reaktion

2) qPCR

- Mischen der Reagenzien
- Vorbereitung des qPCR Reaktions-Mix
- Vorbereitung der PCR Reaktionsplatte
- Durchführung der Messungen mit 45 Zyklen.

3) Analyse der Daten

- Sichtung der Amplifikationsplots

- Festlegung einer Baseline und der Schwellenwerte

Verwendet wurden das MicroRNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems, Artikelnummer 4366597, sowie der TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase, Artikelnummer 4324020.

3.6 Statistik

Für die statistischen Analysen wurde SPSS verwendet. Als parametrischer Test diente der exakte Test nach Fisher nach zweiseitiger Signifikanz, als nicht-parametrischer Test der Mann-Whitney-U-Test. Da es sich bei meiner Studie um eine Untersuchung mit stark explorativem Charakter handelt, wurde auf eine Alpha-Adjustierung des globalen Signifikanzniveaus nach Bonferroni verzichtet. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha = 5\%$ festgelegt. Bei einem p-Wert $< 0,1$ und $> 0,05$ wird von einem Trend gesprochen. Ein p-Wert $< 0,01$ bezeichnet einen hochsignifikanten Unterschied.

Für die Clusteranalysen der microRNA-Signaturen diente der Software Cluster 3.0 von Michael Eisen (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). Die Normalisierung der miRNA-Signaturen wurde auf Basis der Expression von miRNA-16 vorgenommen.

Die statistische Beratung erfolgte durch das Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck.

4 Ergebnisse

Wie beschrieben handelt es sich bei dieser Arbeit um eine Subgruppenanalyse eines Kollektivs von 102 Fällen FL aus den Jahren 2005 und 2006 aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Diese wurden morphologisch, immunhistochemisch und molekulargenetisch untersucht (Gollub et al., 2009, Thorns, 2009).

Um Antworten auf die Fragestellung zu finden, ob es sich bei DFL um eine eigene biologische Krankheitsentität handelt, verglichen wir zwei Gruppen im Hinblick auf klinische, morphologische und immunhistochemische Parameter: FL mit einem Flächenanteil > 25 % an diffusem Wachstumsmuster (n = 15) und solche einer Referenzgruppe (n = 14).

Die Auswahl der Fälle für diese beiden Gruppen erfolgte folgendermaßen: Aus dem Gesamtkollektiv von 102 Fällen wurden alle Fälle mit einem diffusem Wachstumsanteil über 25 % zur Gruppe DFL zusammengefasst. Für die Referenzgruppe wurden alle Fälle ausgewählt, die folgende Kriterien erfüllten: WHO-Grad I oder II, kein diffuses Wachstum, starke Reaktivität für CD10 und BCL2, Nachweis einer BCL2-Translokation, Nichtnachweis einer BCL6-Translokation.

4.1 Klinische, morphologische und immunhistochemische Parameter

Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigten sich bei folgenden morphologischen und immunhistochemischen Parametern: Sklerose, Knochenmarkbefall, starke Reaktivität für die immunhistochemischen Marker CD10 und BCL2, CD23-Netzwerke sowie Reaktivität der Tumorzellen für CD23. Keine Unterschiede zeigten sich hingegen bei den Parametern Patientenalter, Infiltration der Lymphknotenkapsel, IgD-Expression in nicht-neoplastischen Arealen, monotypische Leichtkettenexpression sowie bei den T-Zellmarkern CD3, CD4, CD8 und bei der CD4/CD8-Ratio.

4.1.1 Patientenalter

Keine Unterschiede ergaben sich im Hinblick auf das Alter der Patienten. In beiden Gruppen waren etwa gleich viele Betroffene über beziehungsweise unter 60 Jahre alt (sieben in der Gruppe DFL, sechs in der Referenzgruppe).

4.1.2 Sklerose

Während in der Referenzgruppe fünf Fälle eine Sklerose aufwiesen, waren es in der Gruppe DFL nur elf. Aufgrund der niedrigen Fallzahl erwies sich der Unterschied als nicht signifikant, zeigte jedoch einen Trend ($p = 0,066$).

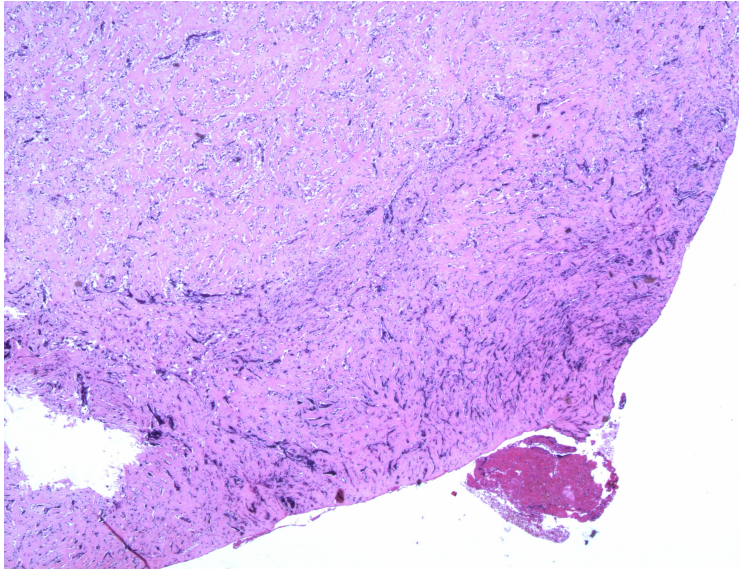


Abbildung 3: Sklerose

4.1.3 Knochenmarkbefall

In der Referenzgruppe zeigten neun der Fälle einen Knochenmarkbefall, in der Gruppe DFL hingegen nur drei ($p = 0,025$).

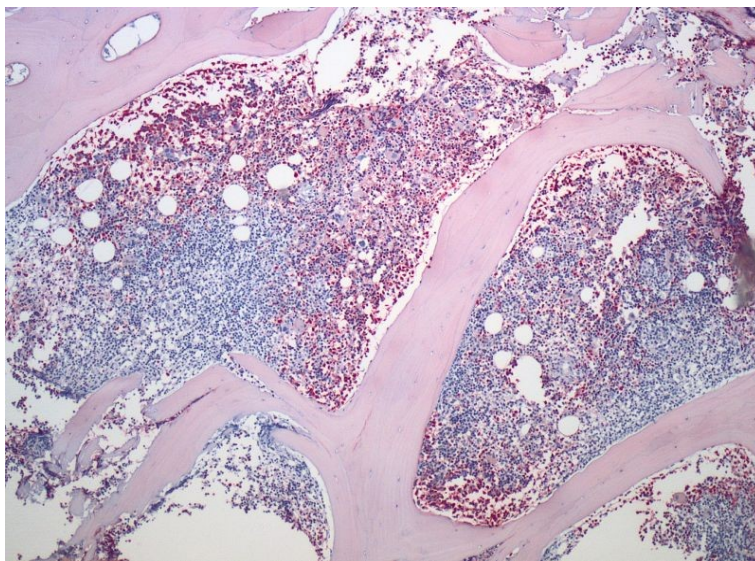


Abbildung 4: Knochenmarkbefall

4.1.4 CD10

Für den Keimzentrumsmarker CD10 konnte ein hochsignifikanter Unterschied nachgewiesen werden: In der Referenzgruppe zeigten alle 14 Fälle den

Ausprägungsgrad „stark“, während es in der Gruppe DFL nur sieben waren ($p = 0,002$).

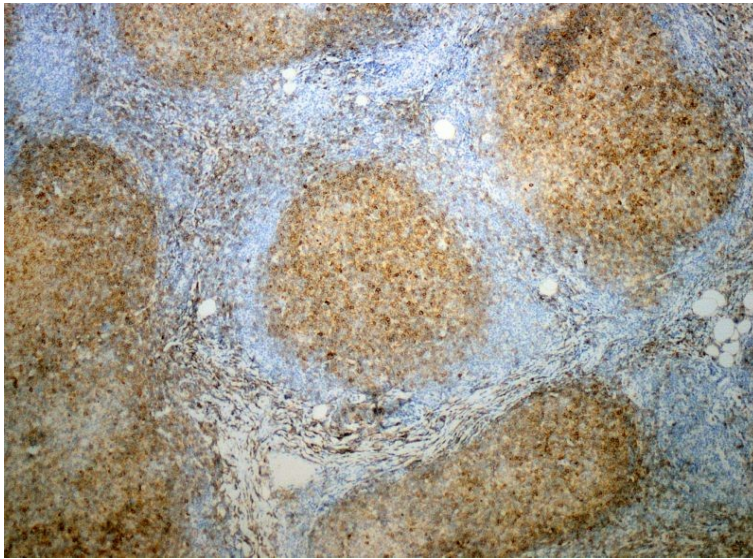


Abbildung 5: Starke Reaktivität für den Keimzentrumsmarker CD10

4.1.5 BCL2

Auch die Reaktivität für BCL2 zeigte einen signifikanten Unterschied. Alle 14 Fälle in der Vergleichsgruppe, hingegen nur neun in der betrachteten Gruppe waren stark BCL2-positiv ($p = 0,017$).

4.1.6 CD23-Netzwerke und CD23-Reaktivität im Tumorgewebe

Ein hochsignifikanter Unterschied zeigte sich des Weiteren bei der Ausprägung der FDC-Netzwerke: Während in der Referenzgruppe in allen 14 Fällen FDC-Netzwerke nachweisbar waren, waren diese in der Gruppe DFL nur bei sechs Fällen nachweisbar ($p = 0,001$). Auch war die CD23-Reaktivität im Tumorgewebe signifikant unterschiedlich: Innerhalb der Gruppe DFL ergab sich eine Reaktivität bei sieben Fällen, in der Referenzgruppe in nur einem Fall ($p = 0,035$).

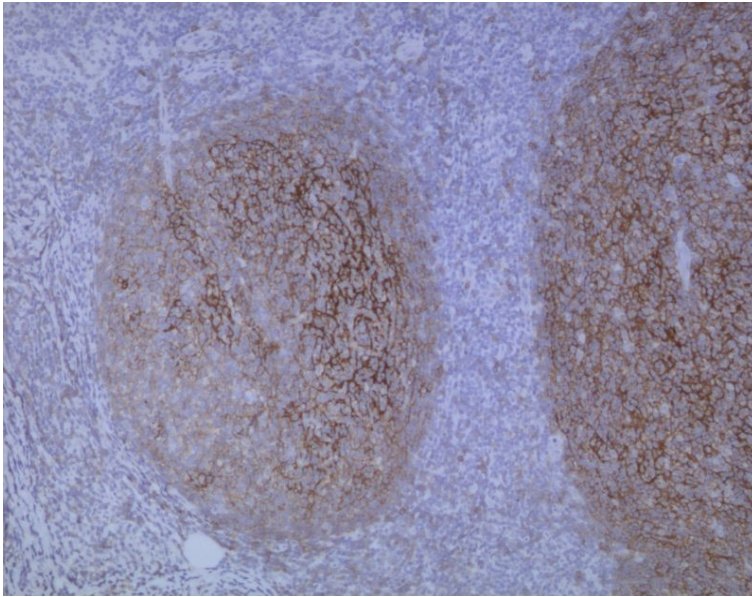


Abbildung 6: CD23-Netzwerke

4.1.7 Durchbruch der Lymphknotenkapsel

Bei der Frage nach einem Durchbruch des Tumors durch die Lymphknotenkapsel konnte ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden. In der Referenzgruppe konnte bei zehn Fällen, in der Gruppe mit DFL in neun Fällen ein Kapseldurchbruch diagnostiziert werden.

4.1.8 Erhaltene IgD-positive Mantelzonen

Ähnliche, nicht signifikant unterschiedliche Ergebnisse zeigten sich bei Immunglobulin D. In beiden Gruppen konnte Immunglobulin D bei drei Fällen nachgewiesen werden.

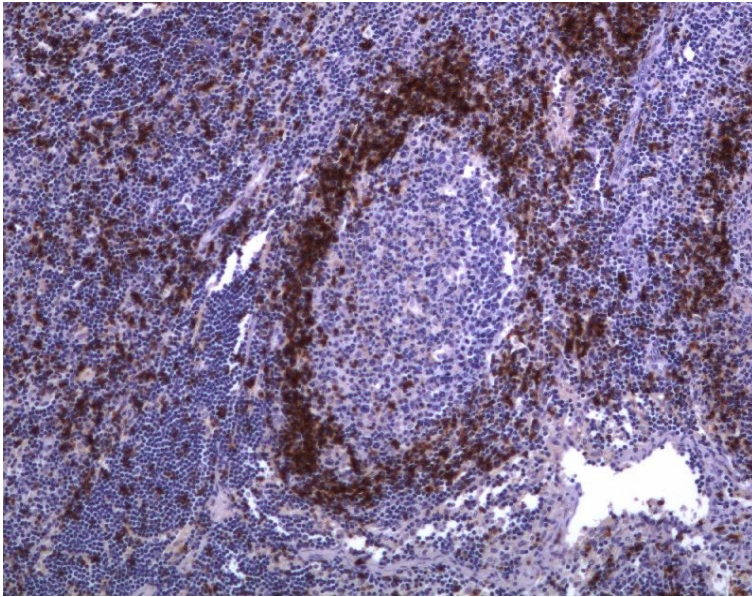


Abbildung 7: Erhaltene IgD-positive Mantelzone

4.1.9 Monotypische Leichtkettenexpression

Beim Vergleich der monotypischen Leichtkettenexpression waren es in der Gruppe DFL vier, in der Referenzgruppe fünf.

4.1.10 CD3, CD4, CD8, CD4/CD8-Ratio

Keine signifikanten Unterschiede konnten wir beim Vergleich der prozentualen Anteile der T-Zellmarker CD3, CD4 und CD8 sowie bei der CD4/CD8-Ratio feststellen.

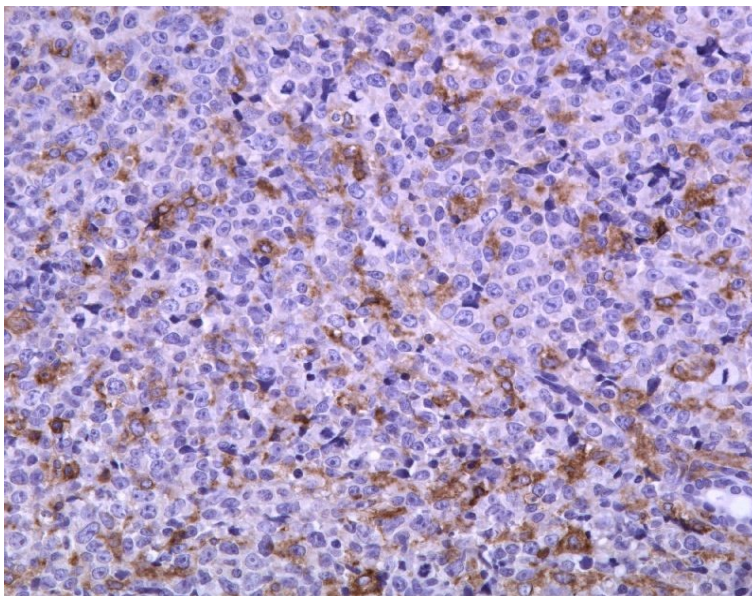


Abbildung 8: CD4-positive Zellen

	Gruppe DFL (n = 15)	Referenzgruppe (n = 14)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Gesamtkollektiv
Alter > 60 Jahre	7	6	n.s.	50 / 103 (48,5 %)
Sklerose	11	5	Trend	61 / 103 (59,2 %)
Kapsel-durchbruch	9	10	n.s.	66 / 79 (83,5 %)
Knochenmark-infiltration	3	9	p = 0,025	47 / 103 (45,6 %)
Starke CD10-Reaktivität	7	14	p = 0,002	77 / 103 (74,8 %)
Starke BCL2-Reaktivität	9	14	p = 0,017	74 / 103 (71,8 %)
Erhaltene IgD-positive Mantelzonen	3	3	n.s.	32 / 103 (31,1 %)
CD23-Netzwerke	6	14	p = 0,001	57 / 103 (55,3 %)
CD23-Reaktivität Tumor	7	1	p = 0,035	34 / 103 (33,0 %)
Monotypische Leichtketten	4	5	n.s.	38 / 103 (36,9 %)
Alter	55,3 Jahre	53,2 Jahre	n.s.	57,5 Jahre
CD3-Anteil	19,00%	20,00%	n.s.	20,00%
CD4-Anteil	13,70%	15,70%	n.s.	15,00%
CD8-Anteil	7,70%	8,70%	n.s.	8,00%
CD4/CD8-Ratio	2	2,3	n.s.	2,36

Tabelle 1: Ergebnisübersicht, Teil1: Klinische, morphologische und immunhistochemische Parameter. Die exakte zweiseitige Signifikanz bezieht sich auf den Vergleich DFL mit der Referenzgruppe. Die Daten des Gesamtkollektivs sind zum Vergleich angegeben.

4.2 Micro-RNA-Expressionen

Folgende MicroRNAs wiesen signifikant erhöhte Konzentrationen auf bei DFL im Vergleich zur Referenzgruppe: miR-132, miR-154#, miR-21, miR-424, miR-432, miR-452, miR-525#, miR-9.

Folgende MicroRNAs wiesen signifikant erniedrigte Konzentrationen bei DFL auf: Let-7b, miR-10b, miR-133a, miR-135a, miR-139, miR-148a, miR-149, miR-184, miR-26b, miR-302a, miR-34b, miR-34c, miR-375, miR-559, miR-574, miR-576, miR-589, miR-597, miR-609.

Die MicroRNAs miR-124a, miR-17-5, miR-20a, miR-220, miR-27a, miR-382, miR-409-5p, miR-498, miR-502, miR-517c, miR-572 und miR-92 lagen in erhöhter Konzentration vor, erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau, wenngleich sie einen Trend zeigten ($p < 0,1$). Entsprechendes gilt für die im Vergleich zur Referenzgruppe erniedrigten MicroRNAs miR-143, miR-151, miR-187, miR-215, miR-32, miR-324-5p, miR-520a, miR-561, miR-580, miR-586.

Hochregulierte MicroRNAs bei DFL	Exakte zweiseitige Signifikanz (p)	Herunterregulierte MicroRNAs bei DFL	Exakte zweiseitige Signifikanz
miR-9	p = 0,014	Let-7b	p = 0,049
miR-17-5	Trend	miR-10b	p = 0,011
miR-20a	Trend	miR-133a	p = 0,012
miR-21	p = 0,017	miR-135a	p = 0,000
miR-27a	Trend	miR-139	p = 0,017
miR-92	Trend	miR-143	Trend
miR-124a	Trend	miR-148a	p = 0,042
miR-132	p = 0,018	miR-149	p = 0,012
miR-154#	p = 0,023	miR-151	Trend
miR-382	Trend	miR-184	p = 0,001
miR-409-5p	Trend	miR-187	Trend
miR-424	p = 0,012	miR-215	Trend
miR-432	p = 0,017	miR-26b	p = 0,049
miR-452	p = 0,038	miR-302a	p = 0,007
miR-498	Trend	miR-32	Trend
miR-502	Trend	miR-324-5p	Trend
miR-517c	Trend	miR-34b	p = 0,025
miR-525#	p = 0,006	miR-34c	p = 0,047
miR-572	Trend	miR-375	p = 0,006
miR-220	Trend	miR-520a	Trend
		miR-559	p = 0,041
		miR-561	Trend
		miR-574	p = 0,040
		miR-576	p = 0,034
		miR-580	Trend
		miR-586	Trend
		miR-589	p = 0,047
		miR-597	p = 0,012
		miR-609	p = 0,025

Tabelle 2: Ergebnisübersicht Teil 2: Veränderte MicroRNA-Expressionen bei DFL

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist, der Frage nachzugehen, ob es sich bei DFL um eine eigene Krankheitsentität handelt. Hierzu dient eine Subgruppenanalyse eines Kollektivs von 102 Fällen FL aus den Jahren 2005 und 2006 aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Diese wurden morphologisch, immunhistochemisch und molekulargenetisch untersucht (Gollub et al., 2009, Thorns, 2009). Als Subgruppe wurden 15 Fälle mit einem diffusen Wachstumsanteil > 25 % ausgewählt und deren Daten mit denen einer aus 14 Fällen klassischer FL bestehenden Referenzgruppe verglichen.

Da die Fälle im Vorfeld unserer Untersuchungen anonymisiert wurden, kennen wir lediglich das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie deren Geschlecht. Somit können wir keine direkten Zusammenhänge zwischen den von uns erhobenen Parametern und klinischen Aspekten herstellen.

Das FL stellt eine biologisch und klinisch heterogene Krankheitsentität dar. Typisch ist ein langsamer, indolenter Verlauf über lange Zeiträume (Harris et al., 2008, Freedman 2011, Leich et al., 2011a). In ungefähr einem Viertel aller Fälle kommt es zur Transformation in ein hochmalignes Lymphom mit mittleren Überlebenszeiten von ungefähr zwei Jahren (Freedman 2011, Leich et al., 2011a). Deshalb ist es wichtig, Parameter zu finden, die eine zuverlässige Abschätzung der Prognose erlauben und damit klinisch tätigen Ärzten eine Hilfestellung bei Entscheidungen über Art und Umfang der Therapie geben.

Zu histopathologischen Prognoseparametern ist die Datenlage sehr vielfältig. Teilweise wird der Einfluss bestimmter Parameter auf Verlauf und Prognose der Erkrankung unterschiedlich beschrieben. Neben dem Nachweis oder dem Nichtnachweis bestimmter genetischer Aberrationen, der Genexpressionsanalyse und der Analyse des aus nicht-neoplastischen Zellen bestehenden Mikromilieus werden der histologische Grad nach WHO sowie das Wachstumsmuster als

Prognoseparameter diskutiert.

Harris et al. (2008) beschreiben einen Zusammenhang zwischen histologischem Grad und dem Gesamtüberleben. Im Kontrast hierzu stehen die Arbeiten von Hans et al. (2003), Klapper et al. (2007) und von Bhagavati et al. (2009), nach denen das Grading nach WHO keinen Einfluss auf die Prognose des FL hat. Dafür beschreiben Hans et al. (2003) einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem diffusen Wachstumsanteil über 50 % und einer niedrigen Gesamtüberlebensrate bei FL Grad 3. Klapper et al. (2007) konnten für die Korrelation zwischen diffusem Wachstumstyp und Gesamtüberleben zumindest einen Trend nachweisen. Sie stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Sklerose im Tumor und einer schlechten Gesamtüberlebensrate fest. Bhagavati et al. (2009) fanden wiederum keine Assoziation zwischen Wachstumsmuster und Prognose.

Wegen dieser widersprüchlichen Datenlage zum Einfluss des Wachstumstyps auf Verlauf und Prognose des FL möchte ich mit meiner Arbeit DFL im Hinblick darauf untersuchen, ob sich Hinweise für das Vorliegen einer eigenen Krankheitsentität ergeben.

5.1 Klinische, morphologische und immunhistochemische Parameter

Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigten sich bei Betrachtung folgender Parameter: Sklerose (mehr Fälle in der Gruppe DFL), Knochenmarkbefall (mehr Fälle in der Referenzgruppe), starke Reaktivität für die immunhistochemischen Marker CD10 und BCL2 (jeweils mehr Fälle in der Referenzgruppe), CD23-Netzwerke (mehr Fälle in der Referenzgruppe) sowie Reaktivität der Tumorzellen für CD23 (mehr Fälle in der Gruppe DFL). Keine Unterschiede zeigten sich bei Vergleich der Parameter Patientenalter bei Erstdiagnose, Durchbruch der Lymphknotenkapsel, IgD-Expression in nicht-neoplastischen Arealen, monotypische Leichtkettenexpression sowie bei den T-

Zellmarkern CD3, CD4 und CD8 und bei der CD4/CD8-Ratio.

5.1.1 Sklerose

Dass in der Gruppe DFL mehr Fälle eine Sklerose aufwiesen als in der Referenzgruppe, könnte ein Hinweis darauf sein, dass DFL einer aggressiveren Entität angehören. Klapper et al. (2007) haben wie beschrieben einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Sklerose und einer niedrigen Gesamtüberlebensrate nachgewiesen.

5.1.2 Knochenmarkinfiltration

Wie beschrieben, ist das Knochenmark zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in 40 bis 70 % aller FL mit befallen (Harris et al., 2008), wobei die Rate in niedriggradigen FL mit 40 bis 70 % höher ist als in höhergradigen mit einer Rate von 30 bis 35 % (McKenna et al., 1975, Thorns 2009). Trotzdem ist auch der Einfluss einer Knochenmarkinfiltration auf Verlauf und Prognose der Erkrankung ein unter Experten kontrovers diskutierter Aspekt. Nach Canioni et al. (2004) eignet sich das Infiltrationsmuster bei FL mit hoher Tumorlast als Prognoseparameter. Demnach gehen mehrere nebeneinander bestehende Infiltrationsmuster mit einer niedrigeren Gesamtüberlebensrate einher als ein einziges Infiltrationsmuster. Liegt keine Knochenmarkinfiltration vor, ist das Gesamtüberleben noch höher. Dass bei meiner Untersuchung weniger DFL eine Knochenmarkinfiltration aufwiesen, könnte dadurch erklärt werden, dass höhergradige FL oft auch ein diffuses Wachstumsmuster zeigen, diese aber seltener das Knochenmark infiltrieren.

5.1.3 Starke Reaktivität für CD10 und BCL2

Starke Reaktivität für die immunhistochemischen Marker CD10 und BCL2 waren Auswahlkriterien für die Fälle der Referenzgruppe. Bei Fällen vom Grad 3 ist dies weniger häufig der Fall (Thorns, 2009). DFL gehen häufig mit einem höheren Grad einher. Dies erklärt, weshalb die Reaktivität für CD10 und BCL2 in der Gruppe mit diffusem Wachstum weniger stark ausgeprägt war.

5.1.4 CD23-Netzwerke

CD23 ist der Marker für Follikulär-dendritische Zellen und dient zur Diagnostik des Wachstumsmusters. CD23 fehlt in diffusen Arealen während er in neoplastischen Follikeln in der Regel vorhanden ist (Leich et al., 2011a). Hiermit ist auch zu erklären, dass bei lediglich sechs Fällen DFL CD23-Netzwerke nachweisbar waren im Gegensatz zu allen 14 Fällen der Referenzgruppe.

5.1.5 CD23-Reaktivität im Tumorgewebe

Während in der Gruppe DFL sieben Fälle eine Reaktivität für CD23 zeigten, traf dies in der Referenzgruppe nur für einen Fall zu.

5.1.6 Alter der Patienten bei Erstdiagnose

Eine direkte Korrelation zwischen dem Patientenalter und histopathologischen Parametern wie WHO-Grad oder Wachstumstyp besteht nach derzeitigem Kenntnisstand nicht. Der Grund dafür, dass der Parameter „Alter der Patienten über 60 Jahre“ in den FLIPI mit eingeht, ist die Annahme, dass mit zunehmendem Alter einhergehende Komorbiditäten tendenziell die Prognose verschlechtern.

5.1.7 Durchbruch der Lymphknotenkapsel

Ein Durchbruch der Lymphknotenkapsel ist ein häufig gefundener Befund bei FL. Bisher ist kein Zusammenhang zwischen einem Kapseldurchbruch und klinischen Parametern bekannt.

5.1.8 Erhaltene IgD-positive Mantelzonen

IgD dient dazu, einen Erhalt der Mantelzone um das Keimzentrum nachzuweisen. Zwischen beiden untersuchten Kollektiven konnte hier kein Unterschied festgestellt werden.

5.1.9 Monotypische Leichtkettenexpression

Die monotypischen Leichtketten sind im Stadium der postgerminalen Differenzierung höher exprimiert. Deshalb hätte hier ein Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen einen Hinweis dafür erbringen können, dass DFL aus Keimzentren im Stadium der postgerminalen Differenzierung hervorgehen. Dies war bei meiner Untersuchung nicht der Fall. Ein Vergleich der beiden Gruppen zeigte keinen Unterschied.

5.1.10 CD3, CD4, CD8 sowie CD4/CD8-Ratio

CD3, CD4 und CD8 sind T-Zellmarker und eignen sich als Surrogatmarker der Immunreaktion im Tumorgewebe. Nach Alvaro et al. (2006) ist ein Überwiegen von Zellen der spezifischen Immunität - wie CD4+ und CD8+-Zellen - im Tumorgewebe eher mit einem prognostisch günstigen Verlauf assoziiert. Bei meinem Vergleich zeigte sich kein Unterschied im Expressionsmuster dieser T-Zellmarker.

5.2 MicroRNA-Expressionen

Ich möchte der Frage nachgehen, ob sich für die bei meiner Untersuchung identifizierten MicroRNAs in der wissenschaftlichen Literatur Assoziationen mit Krebserkrankungen beziehungsweise mit NHL finden. Da das FL ein aus den Keimzentren-B-Zellen hervorgehender Tumor ist, gehe ich zudem der Frage nach, ob die identifizierten MicroRNAs mit spezifischen Stadien der Keimzentren-B-Zell-Differenzierung assoziiert sind.

5.2.1 DFL zeigen kein für ein spezifisches Differenzierungsstadium typisches Expressionsmuster

Während ihrer Differenzierung im Keimzentrum durchlaufen die B-Lymphozyten verschiedene Stadien: naive B-Lymphozyten werden zu Keimzentren-B-Zellen. Diese gehen entweder in Apoptose, entwickeln sich zu Plasmazellen oder zu B-

Gedächtniszellen (Carbone et al., 2009). Zhang et al. (2009) sowie Jima et al. (2010) haben die Expressionen von MicroRNAs in naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen und B-Gedächtniszellen analysiert und hierbei diverse MicroRNAs identifiziert, die für bestimmte Stadien der B-Zell-Differenzierung spezifisch sind. *Tabelle 3* listet von diesen ausschließlich die MicroRNAs auf, die sich auch bei meiner Untersuchung DFL verändert zeigten.

DFL-spezifische MicroRNAs.	Assoziation mit der B-Zell-Differenzierung	
miR-17-5p (↑)	↑ in Keimzentrums-B-Zellen ^{1 2}	Keimzentrums-miRs
miR-9(↑)	↑ in Keimzentrums-B-Zellen ²	
miR-92(↑)	↑ in Keimzentrums-B-Zellen ²	
miR-148a (↓)	↑ in Keimzentrums-B-Zellen ²	
miR-20a (↑)	↑ in Keimzentrums-B-Zellen ²	
miR-151(↓)	↓ in Plasmazellen ²	
miR-27a (↑)	↑ in B-Gedächtniszellen ²	Gedächtniszell-miRs
miR-26b (↓)	↑ in B-Gedächtniszellen ²	

Tabelle 3: In DFL veränderte MicroRNAs und ihre Assoziation mit der Differenzierung von B-Lymphozyten (vereinfachte Darstellung der Ergebnisse von Zhang et al., 2009 und Jima et al., 2010).

Der in *Tabelle 3* dargestellte Vergleich lässt keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen den MicroRNA-Expressionen bei DFL und denen bei der B-Zell-Differenzierung erkennen. Somit ist festzuhalten, dass DFL kein für ein spezifisches Stadium der B-Zell-Differenzierung typisches Expressionsmuster zeigen.

5.2.2 DFL überexprimieren Onco-miRs und unterexprimieren Tumorsuppressor-miRs

DFL unterscheiden sich signifikant in ihren Expressionsmustern im Vergleich zu klassischen FL: MicroRNAs mit einer in der Literatur beschriebenen onkogenen Wirkung (Onco-miRs) zeigten sich in der Gruppe DFL vielfach erhöht (miR-21, miR-27a, miR-424, miR-452, miR-498, miR-92), während MicroRNAs mit einem

¹ Zhang et al., 2009

² Jima et al., 2010

tumorsuppressiven Potential (Tumorsuppressor-miRs) vielfach erniedrigt waren (Let-7b, miR-26b, miR-34b, miR-34c, miR-133a, miR-139, miR-143, miR-148a, miR-149, miR-520a, miR-559)(*Tabelle 4*).

MicroRNAs mit Überexpression bei DFL und mit beschriebenen onkogenen Potential	MicroRNAs mit Unterexpression bei DFL und mit beschriebenen tumorsuppressiven Potential
miR-17-5 (Trend)	Let-7b (p = 0,049)
miR-21 (p = 0,017)	miR-26b (p = 0,049)
miR-27a (Trend)	miR-34b (p = 0,025)
miR-92 (Trend)	miR-34c (p = 0,047)
miR-424 (p = 0,012)	miR-133a (p = 0,012)
miR-452 (p = 0,038)	miR-139 (p = 0,017)
miR-498 (Trend)	miR-148a (p = 0,042)
	miR-149 (p = 0,012)
	miR-520a (Trend)
	miR-559 (p = 0,041)

Tabelle 4: MicroRNAs mit beschriebenem onkogenen und solche mit beschriebenem tumorsuppressiven Potential

5.2.3 Für viele der bei DFL über- und unterexprimierten MicroRNAs ist die Datenlage diskrepant oder unvollständig

Von der „Regel“ nach der DFL Onco-miRs über- und Tumorsuppressor-miRs unterexprimieren, gibt es zahlreiche Ausnahmen. Für einige dieser MicroRNAs sind in der wissenschaftlichen Literatur sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Wirkungen beschrieben (*Tabelle 5*).

MicroRNAs mit Erhöhung in der Gruppe „Diffuses Wachstum“ und diskrepanter Datenlage	MicroRNAs mit Erniedrigung in der Gruppe „Diffuses Wachstum“ und diskrepanter Datenlage
miR-9 (p = 0,014)	miR-10b (p = 0,011)
miR-20a (Trend)	miR-135a (p = 0,000)
miR-132 (p = 0,018)	miR-143 (Trend)
	miR-151 (Trend)
	miR-184 (p = 0,001)
	miR-375 (p = 0,006)

Tabelle 5: MicroRNAs mit in der Literatur beschriebenen onkogenen und tumorsuppressiven Wirkungen.

Für miR-124a, die bei meiner Untersuchung erhöht war jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte, sind ausschließlich Herunterregulationen in verschiedenen Tumoren beschrieben (*Tabelle 6*). Für miR-32, in DFL erniedrigt (Trend), ist eine Hochregulation im Prostatakarzinom beschrieben (Jalava et al., 2012). Für weitere MicroRNAs, die sich bei DFL über- oder unterexprimiert zeigten, finden sich in der Literatur unspezifische oder keine Daten.

Die Tatsache, dass DFL Onco-miRs vielfach über- und Tumorsuppressor-miRs unterexprimieren, sind als Hinweis dafür zu deuten, dass DFL aggressivere Eigenschaften aufweisen als klassische FL. Festzuhalten bleibt aber auch, dass FL eine heterogene Krankheitsentität mit fließenden Übergängen zwischen möglichen Subtypen darstellen. Die Tatsache, dass die Datenlage für viele MicroRNAs diskrepanz beziehungsweise unzureichend ist, verdeutlicht, dass weitere Untersuchungen nötig sind, um mehr über die Funktion dieser MicroRNAs bei der Ätiopathogenese von Neoplasien zu erfahren. Hierbei ist auch zu bedenken, dass einzelne MicroRNAs durchaus gegensätzliche Wirkungen im Zellzyklus haben können (Di Leva und Croce, 2010).

Die *Tabellen 6* und *7* fassen den aktuellen Wissensstand über die Assoziation der in meiner Untersuchung identifizierten MicroRNAs mit Krebserkrankungen zusammen.

Über-exprimierte MicroRNAs	Exakte zweiseitige Signifikanz	Assoziation mit Neoplasien
miR-9	p = 0,014	↑ in FL ^{3 4 5} , ↓ in Melanom ⁶ , Nierenzellkarzinom ⁷ , Tumorsuppression in Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und des Pharynx ⁸
miR-17-5	Trend	↑ in DLBCL ³ , Gallenepithelkarzinom ⁹
miR-20a	Trend	↑ in FL ⁵ , Magenkarzinom ⁹ , Kolorektalem Karzinom ⁹ , Nierenzellkarzinom ⁷ ↓ in Pankreaskarzinom ¹⁰
miR-21	p = 0,017	↑ in FL ⁴ , DLBCL ¹¹ , Glioblastoma multiforme ¹² , Mundhöhlenkarzinom ¹³ , papilläres Schilddrüsenkarzinom ¹⁴ , Mammakarzinom ¹⁵ , Gallenepithelkarzinom ⁹ , Pankreaskarzinom ⁹ , Plattenepithel- und Adenokarzinom des Ösophagus ⁹ , Magenkarzinom ⁹ , Kolorektalem Karzinom ⁹ , Nierenzellkarzinom ⁷ , Prostatakarzinom ⁷
miR-27a	Trend	Maligne Entartung von Bronchialepithelzellen ¹⁶
miR-92	Trend	↑ in Kolorektalem Karzinom ^{9 17} , Prostatakarzinom ⁷ , Magenkarzinom ⁹ , Nierenzellkarzinom ¹⁸ , nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom ¹⁹
miR-124a	Trend	↓ in Hepatozellulärem Karzinom ²⁰ , Mammakarzinom ²¹ , Wachstumshehmung in Glioblastom ²² und Zervixkarzinom ²³

3 Röhle et al., 2008

4 Lawrie et al., 2009

5 Wang et al., 2012

6 Liu et al., 2011

7 Fendler et al., 2011

8 Minor et al., 2011

9 Hong et al., 2010

10 Yan et al., 2010

11 Fabbri et al., 2009

12 Purow et al., 2010

13 Wu BH et al., 2011

14 Pallante et al., 2010

15 Farazi et al., 2011

16 Wang Q et al., 2011

17 Tsuchida et al., 2011

18 Valera et al., 2011

19 Lin PY et al., 2010

20 Zheng et al., 2011

21 Lv et al., 2011

22 Silber et al., 2008

23 Wilting et al., 2010

Über-exprimierte MicroRNAs	Exakte zweiseitige Signifikanz	Assoziation mit Neoplasien
miR-132	p = 0,018	↑ + ↓ in Pankreaskarzinom ^{24 25}
miR-154#	P = 0,023	Nicht bekannt
miR-220	Trend	Nicht bekannt
miR-382	Trend	Nicht bekannt
miR-409-5p	Trend	Nicht bekannt
miR-424	p = 0,012	↑ in Ösophaguskarzinom ⁹
miR-432	p = 0,017	Nicht bekannt
miR-452	P = 0,038	↑ in Urothelkarzinom ²⁶
miR-498	Trend	↑ in Retinoblastom ²⁷
miR-502	Trend	Nicht bekannt
miR-517c	Trend	Nicht bekannt
miR-525#	p = 0,006	Nicht bekannt
miR-572	Trend	Nicht bekannt

Tabelle 6: Bei DFL überexprimierte MicroRNAs und ihre Assoziation mit Neoplasien

24 Park et al., 2011

25 Zhang et al., 2011

9 Hong et al., 2010

26 Veerla et al., 2009

27 Zhao et al., 2009

Unter-exprimierte MicroRNAs	Exakte zweiseitige Signifikanz	Assoziation mit Neoplasien
let-7b	p = 0,049	↓ in Plattenepithel- und Adenokarzinom der Lunge ¹⁸ , Hepatozellulärem Karzinom ⁹ , Gallenepithelkarzinom ⁹ , Ösophaguskarzinom ⁹ , Kolorektalem Karzinom ⁹ , Prostatakarzinom ⁷
miR-10b	P = 0,011	Tumorsuppressor im Glioblastom ²⁸ ↑ in Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ^{9 29} , Pankreaskarzinom ³⁰ , Mammakarzinom ³¹
miR-26b	p = 0,049	↓ in DLBCL (im Vergleich zu FL) ⁴ , in t(14;18)-negativen FL ³² , Gliom ³³ , Mammakarzinom ³⁴
miR-32	Trend	↑ in Prostatakarzinom ³⁵
miR-34b	p = 0,025	CpG-Methylierung in nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom ³⁶ , Kolonkarzinom ³⁷ , Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ³⁷ , Melanom ³⁷
miR-34c	p = 0,047	CpG-Methylierung in Kolonkarzinom, Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, Melanom ³⁷
miR-133a	P = 0,012	↓ in Plattenepithelkarzinomen des Sinus maxillaris ³⁸ , der Zunge ³⁸ , des Ösophagus ³⁸ , der Lunge ³⁸ , Pankreaskarzinom ³⁸ , Nierenzellkarzinom ³⁸ , Urothelzellkarzinom ³⁸ , Prostatakarzinom ³⁸ , Rhabdomyosarkom ³⁸ , Kolorektalem Karzinom ⁹ ↑ im Multiplen Myelom ³⁸
miR-135a	p = 0,000	↑ in Kolorektales Karzinom ³⁹ ↓ in Magenkarzinom ⁴⁰
miR-139	p = 0,017	↓ in FL ³ , ↓ bei Hepatozellulärem Karzinom schlechte Überlebensrate ⁴¹
miR-143	Trend	↓ in B-Zell-Lymphomen ⁴² , Kolonkarzinom ⁹ ↑ in FL ⁴

18 Lin PY et al., 2010

9 Hong et al., 2010

7 Fendler et al., 2011

28 Gabriely et al., 2011

29 Tian et al., 2010

30 Nakata et al., 2011

31 Ma et al., 2007

32 Leich et al., 2011b

33 Wu N et al., 2011

34 Liu et al., 2011

35 Jalava et al., 2012

36 Tanaka et al., 2011

37 Hermeking, 2009

38 Nohota et al., 2012

39 Nagel et al., 2008

40 Wu et al., 2012

3 Röhle et al., 2008

41 Wong et al., 2011

42 Yukihiro et al., 2007

Unter-exprimierte MicroRNAs	Exakte zweiseitige Signifikanz	Assoziation mit Neoplasien
miR-148a	p = 0,042	↓ in Pankreaskarzinom ⁹ , Magenkarzinom ⁹
miR-149	p = 0,012	↓ in FL ³ , Induktion von Apoptose in Krebszellen ⁴³
miR-151	Trend	↓ in Kolonkarzinom ⁹ ↑ in DLBCL ³
miR-184	p = 0,001	↓ in Gallenepithelkarzinom ⁹ ↑ in Plattenepithelkarzinom der Zunge ⁴⁴
miR-187	Trend	unbekannt
miR-215	Trend	unbekannt
miR-302a	p = 0,007	unbekannt
miR-324-5p	Trend	unbekannt
miR-375	p = 0,006	↓ in Adenokarzinom ⁴⁵ und Plattenepithelkarzinom ⁴⁶ des Ösophagus, Magenkarzinom ⁴⁷ , Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs ⁴⁸ , Hepatozellulärem Karzinom ⁴⁹ , Melanom ⁵⁰ ↑ in Prostatakarzinom ⁵¹
miR-520a	Trend	↓ in Mammakarzinom ⁵²
miR-559	p = 0,041	Tumorsuppressor ⁵³
miR-561	Trend	unbekannt
miR-574	p = 0,040	unbekannt
miR-576	p = 0,034	unbekannt
miR-580	Trend	unbekannt
miR-586	Trend	unbekannt
miR-589	p = 0,047	unbekannt
miR-597	p = 0,012	unbekannt
miR-609	p = 0,025	unbekannt

Tab. 7: Unterexprimierte MicroRNAs bei DFL und ihre Assoziation mit Neoplasien

4 Lawrie et al., 2009

3 Röhle et al., 2008

43 Lin RJ et al., 2011

9 Hong et al., 2010

44 Wong et al., 2008

45 Leidner et al., 2012

46 Komatsu et al., 2011

47 Tsakumoto et al., 2010

48 Harris et al., 2012

49 He et al., 2011

50 Mazar et al., 2011

51 Selth et al., 2011

52 Keklikoglou et al., 2011

53 Chen et al., 2009

5.2.4 Überexprimierte MicroRNAs bei DFL

MiR-9 gehört zu den MicroRNAs, für die in der Literatur sowohl Hinweise auf onkogene als auch auf tumorsuppressive Wirkungen zu finden sind. Interessant ist, dass Erhöhungen ausschließlich beim FL aber bei keinen anderen Tumorerkrankungen beschrieben sind (Röhle et al., 2008, Lawrie et al., 2009, Wang et al., 2012). Ein Erklärungsansatz könnte darin zu finden sein, dass miR-9 als für Keimzentrums-B-Zellen spezifische MicroRNA identifiziert wurde (Jima et al., 2010).

Verschiedene Studien sprechen miR-9 eine tumorsuppressive Wirkung zu. Liu et al. (2011) konnten Erniedrigungen von miR-9 bei metastasierten Melanomen nachweisen und beschreiben die tumorsuppressive Funktion von miR-9 in Bezug auf das Melanom. Demnach reguliert miR-9 die Expression von Snail1 und NF-kappaB1 herunter. Dies führt im Falle von Überexpression von miR-9 zu verminderter Zellproliferation und zur Regulation verschiedener das Zytoskelett beeinflussender GTPasen. Beim Nierenzellkarzinom ist eine erniedrigte Expression von miR-9 beschrieben (Fendler et al., 2011). Des Weiteren ist für miR-9 eine Funktion als Tumorsuppressor in Mundhöhlen- und Pharynxkarzinomen nachgewiesen (Minor et al., 2011).

MiR-20a ist wie miR-92 Teil des miR-17-92-Clusters. Dieses Cluster kodiert für ein primäres Transkript, aus welchem sechs verschiedene mature MicroRNAs hervorgehen, namentlich miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, und miR-92a (Tsuchida et al., 2011). Es ist bekannt, dass die MicroRNAs dieses Clusters über verschiedene Mechanismen zur Tumorentstehung beitragen. Beschrieben sind sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Wirkungen der sechs MicroRNAs (Xiang und Wu 2010). Interessanterweise fanden Fassina et al. (2012) signifikante Überexpressionen aller sechs MicroRNAs des miR-17-92-Clusters beim Keimzentrums-Typ des DLBCL im Vergleich zu Grad 3 FL. Somit könnten diese MicroRNAs als Differenzierungsmerkmale zwischen den verglichenen Entitäten dienen.

Erhöhungen des Paraloges MIR-20a sind beim FL (Wang et al., 2012), beim

Magenkarzinom (Hong et al., 2010), beim Kolonkarzinom (Hong et al., 2010) sowie beim Nierenzellkarzinom (Fendler et al., 2011) beschrieben. Erwiesen ist, dass miR-20a die Expression des Zellzyklusinhibitors CDKN1A/p21 hemmt (Wang et al., 2012). Wang et al. (2012) spekulieren, dass dies zu einer Verlängerung der G1-Phase des Zellzyklus führt, was auch ein besseres Ansprechen auf klassische Chemotherapeutika erklären könnte. Zudem sind Erhöhungen von miR-20 mit dem Gallenepithelkarzinom assoziiert (Hong et al., 2010). Eine andere Studie spricht miR-20 ein eher tumorsuppressives Potential zu: nach Yan et al. (2010) ist eine Überexpression von miR-20 mit einer Hemmung von Proliferation und Metastasierung bei Pankreaskarzinomen assoziiert.

MiR-21 kommt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von verschiedenen Tumoren zu. MiR-21 hemmt die Expression der Tumorsuppressoren ANP32A und SMARCA4 (Schramedei et al., 2011). Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass ein durch miR-21 bedingter Mangel der Tumorsuppressoren ANP32A und SMARCA4 ein verstärktes und dadurch diffuses Wachstum begünstigt. Für viele verschiedene Tumorarten ist eine Erhöhung von miR-21 beschrieben. Hierzu gehören neben dem FL (Lawrie et al., 2009) und dem DLBCL (Fabbri et al., 2009) das Glioblastoma multiforme (Purow et al., 2010), das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Wu BH et al., 2011), das papilläre Schilddrüsenkarzinom (Pallante et al., 2010), das Mammakarzinom (Farazi et al., 2011), das Gallenepithelkarzinom (Hong et al., 2010), das Pankreaskarzinom (Hong et al., 2010), das Plattenepithelkarzinom sowie das Adenokarzinom des Ösophagus (Hong et al., 2010), das Magenkarzinom (Hong et al., 2010), das Kolonkarzinom (Hong et al., 2010), das Nierenzellkarzinom (Fendler et al., 2011) sowie das Prostatakarzinom (Fendler et al., 2011) .

Für miR-27a (Trend) ist ebenfalls eine onkogene Wirkung bekannt. Es wird für die maligne Entartung von Bronchialepithelzellen verantwortlich gemacht (Wang et al., 2011). Erwähnenswert ist, dass miR-27a zudem in B-Gedächtniszellen erhöht war im Vergleich zu B-Keimzentrumzellen (Jima et al., 2010).

MiR-92 (Trend) ist Teil des MIR-17-92-Clusters. Tsuchida et al. (2011) und Hong et al. (2010) fanden Erhöhungen von MIR-92a beim Kolonkarzinom. Tsuchida et al.

beschreiben den zugrunde liegenden Mechanismus: Ziel von MIR-92a ist das antiapoptotisch wirksame Molekül namens BCL-2-interagierender Zelltodmediator (BIM). Zudem induziere die Antagomir Anti-miR-92 die Apoptose von aus Kolonkarzinom entstammenden Zelllinien. Erhöhungen von miR-92 sind außerdem beim Prostatakarzinom (Fendler et al., 2011), beim Magenkarzinom (Hong 2010), beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Lin et al., 2011) sowie beim Nierenzellkarzinom (Valera et al., 2011) beschrieben.

MiR-124 wird eine tumorsuppressive Wirkung bei verschiedenen Neoplasien zugeschrieben. MiR-124 hemmt die Expression der Onkogene ROCK2 und EZH2 und fungiert auf diese Weise als Tumorsuppressor beim Hepatozellulären Karzinom (Zheng et al., 2011). Des Weiteren ist bekannt, dass miR-124 verschiedene Schritte der Metastasierung beim Mammakarzinom hemmt (Lv et al., 2011). Silber et al. (2008) beschreiben eine Wachstumshemmung in Glioblastomen durch miR-124. Auch beim Zervixkarzinom wird miR-124 eine solche Wirkung zugesprochen (Wilting et al., 2010).

Für miR-132 ist die bisherige Datenlage widersprüchlich. Nach Park et al. (2011) ist seine Erhöhung mit dem Adenokarzinom des Pankreas assoziiert. Zudem hemmt es die Expression des Retinoblastom Tumorsuppressors Rb1 (Park et al., 2011). Dies steht im Gegensatz zur Studie von Zhang et al., (2011), die eine Erniedrigung von miR-132 beim Pankreaskarzinom beschreiben.

5.2.5 Unterexprimierte MicroRNAs bei DFL

Let-7b: Die Paraloge von let-7 sind Tumorsuppressoren und in verschiedenen Neoplasien erniedrigt. Hierzu gehören das Plattenepithel- und das Adenokarzinom der Lunge (Lin PY et al., 2010), das Hepatozelluläre Karzinom (Hong et al., 2010), das Gallengangkarzinom (Hong 2010), das Ösophaguskarzinom (Hong et al., 2010), das Kolonkarzinom (Hong et al., 2010) sowie das Prostatakarzinom (Fendler et al., 2011). Let-7 kommt eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des DLBCL zu – sie inaktiviert die mRNA des Tumorsuppressorgens PRDM1/Blimp-1 (B-Lymphozyten-induziertes-Maturations-Protein 1) beim Nicht-GCB-Typ des DLBCL (Nie et al., 2010).

MiR-10b ($p = 0,011$) wird eine Funktion als Tumorsuppressor in Glioblastomen zugesprochen (Gabriely et al., 2011). Demnach hemmt miR-10b das Zellwachstum durch Zellzyklusstop und Apoptose. Diese zellulären Antworten werden durch erhöhte Expressionen der Gene BCL2L1/Bim, TFAP2C/AP-2 γ , CDKN1A/p21 und CDKN2A/p16 vermittelt. Deren Expressionsprodukte hemmen normalerweise das unkontrollierte Zellwachstum.

Jedoch gibt es auch für miR-10b Studien, die ein onkogenes Potential belegen: Hong et al. (2010) sowie Tian et al. (2010) beschreiben, dass das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit Erhöhungen von miR-10b assoziiert sei. Zudem beschreiben Nakata et al. (2011) eine Assoziation von Erhöhungen von MIR-10b mit dem Pankreaskarzinom und hier insbesondere mit einer hohen Invasivität und schlechter Prognose. Ma et al. (2007) schreiben miR-10b eine Assoziation mit hoher Invasivität und schlechter Prognose beim Mammakarzinom zu. Demnach induziert die Überexpression von miR-10b in nicht-metastasierten Mammakarzinomen eine Metastasierung. Die Expression von miR-10b verstärkt die Expression von RHOC, einem gut charakterisierten Gen, welches Metastasierung begünstigt.

Interessanterweise haben Lawrie et al. (2009) eine Unterexpression von miR-26b beim DLBCL im Vergleich zum FL gefunden. Zudem haben Leich et al. (2011) eine verminderte Expression bei t(14;18)-negativen FL im Vergleich zu t(14;18)-positiven FL nachgewiesen. Nach Liu et al. (2011) ist miR-26b beim Mammakarzinom herunterreguliert und agiert miR-26b als Tumorsuppressor durch Hemmung der Expression von SLC7A11. Auch bei Gliomen sind Erniedrigungen von miR-26b und eine Funktion als Tumorsuppressor beschrieben (Wu N et al., 2011).

miR-34b, miR-34c sowie deren Paralog miR-34a sind nachgewiesenermaßen an der Entstehung verschiedener Tumoren beteiligt (Hermeking, 2009). Zu erwähnen ist, dass miR-34b und miR-34c – im Gegensatz zu miR-34a – auf einem gemeinsamen Gen lokalisiert sind und ein gemeinsames Transkript haben. Die MicroRNAs der miR-34-Familie stellen direkte Ziele für das Tumorsuppressionsprotein p53 dar, durch das ihre Expression induziert wird. P53

ist bei vielen Tumorarten von Mutationen betroffen. Dies erklärt, warum diese MicroRNAs bei vielen Tumoren herunterreguliert sind. Sie binden mit unterschiedlicher Affinität an mehrere hundert verschiedene Ziele und regulieren auf diese Weise die Expression von vielen Proteinen. Beispielsweise hemmen sie die Expression von BCL2. Zudem ist bekannt, dass CpG-Methylierungen zur Inaktivierung von miR-34b/c führen. CpG-Methylierungen von miR-34b/c wurden beim Kolorektalen Karzinom, beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle sowie beim malignen Melanom nachgewiesen (Hermeking, 2009).

MiR-133a ist eine MicroRNA mit bekannter tumorsuppressiver Wirkung, die in verschiedenen Tumoren herunterreguliert ist. Dies ist belegt für Plattenepithelkarzinome der Kieferhöhle, der Zunge, des Ösophagus, der Lunge, das Pankreaskarzinom, das Nierenzellkarzinom, das Urothelzellkarzinom, das Prostatakarzinom, das Rhabdomyosarkom (Nohota et al., 2012) sowie für das Kolorektale Karzinom (Hong et al., 2010). Nohota et al. (2012) erwähnen eine Überexpression beim Multiplen Myelom.

Für miR-135a sind sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Wirkungen beschrieben. Nach Nagel et al. (2008) unterdrückt miR-135a die Expression des APC-Gens. Dessen Inaktivierung stellt ein initiiertes Ereignis in kolorektalen Adenomen und Karzinomen dar. Wu et al. (2012) beschreiben ein tumorsuppressives Potential von miR-135a bei Magenkarzinomen: über eine Hemmung der Janus-Kinase 2 durch miR-135a werden die Aktivierung von p-STAT3, cyclin D1 und die Expression von Bcl-xl gehemmt.

Röhle et al. (2008) haben eine Erniedrigung von miR-139 beim FL nachgewiesen. Nach Wong et al. (2011) ist eine Erniedrigung von miR-139 beim Hepatozellulärem Karzinom mit einer schlechten Überlebensrate und einer erhöhten Metastasierungswahrscheinlichkeit verbunden. Überexpression von miR-139 hemmt demnach die Expression der Rho-Kinase 2.

Eine Erniedrigung von miR-143 ist sowohl beim Kolonkarzinom (Hong et al., 2010) als auch bei verschiedenen B-Zell-Neoplasien wie zum Beispiel CLL und anderen B-Zell-Lymphomen beschrieben (Yukihiro et al., 2007). Diese tumorsuppressive

Wirkung von MIR-143 steht im Gegensatz zur Studie von Lawrie et al. (2009), der eine Erhöhung beim FL und beim DLBCL nachweisen konnte.

MiR-149: Beschrieben ist zum einen eine Erniedrigung beim FL (Röhle et al., 2008). Zudem sprechen Lin RJ et al. (2010) miR-149 eine tumorsuppressive Wirkung zu.

Für miR-151 ist eine Erniedrigung beim Kolonkarzinom bekannt (Hong et al., 2010). Publiziert ist jedoch auch eine Assoziation mit einer vermehrten Metastasierung beim Hepatozellulären Karzinom (Luedde, 2010). Demnach beeinflusst miR-151 die Expression von RhoGDIA, einem Gen, dem die Suppression der Metastasierung beim Hepatozellulären Karzinom zugesprochen wird. Röhle et al. (2008) haben eine Erhöhung von miR-151 beim DLBCL festgestellt.

Für miR-184 ist eine Erniedrigung beim Gallenepithelkarzinom bekannt (Hong et al., 2010). Zudem ist bekannt, dass miR-184 als Tumorsupressor beim Neuroblastom agiert (Tivnan et al., 2010). Hingegen wird miR-184 ein onkogenes Potential beim Plattenepithelkarzinom der Zunge zugesprochen (Wong et al., 2008).

Auch für miR-375 ist eine tumorsuppressive Wirkung durch verschiedene Studien belegt. Beschrieben sind Erniedrigungen von miR-375 beim Magenkarzinom (Tsakumoto et al., 2010), beim Adenokarzinom des Ösophagus (Leidner et al. 2012) sowie beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Komatsu et al., 2011, Kong et al., 2011). Harris et al. (2012) haben eine Assoziation niedriger Konzentrationen von miR-375 beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs mit einer vermehrten Metastasierung und einer schlechten Prognose nachgewiesen. Harris et al. (2012) postulieren, dass die Funktion von miR-375 darin bestehe, invasive Eigenschaften von Tumoren zu unterdrücken. He et al. (2011) fanden niedrige Konzentrationen von miR-375 beim Hepatozellulären Karzinom und konnten nachweisen, dass miR-375 die Expression des Astrozyten-elevierten Gen-1 (AEG-1) hemmt. Postuliert wird, dass AEG-1 Tumoreigenschaften unterdrückt. Hingegen sind Erhöhungen von miR-375 beim

Prostatakarzinom beschrieben (Selth et al., 2011).

Für miR-559 liegen bisher keine Daten zu Veränderungen in Tumoren vor. Chen et al. (2009) sprechen miR-559 jedoch eine mögliche Rolle als Tumorsuppressor zu. Dies geschehe durch Hemmung der Expression von ERBB2, deren Überexpression in verschiedenen Tumoren nachgewiesen wurde.

Zu folgenden bei DFL signifikant erniedrigten MicroRNAs liegen in der wissenschaftlichen Literatur keine oder unspezifische Daten vor: miR-302a, miR-502, miR-574, miR-576, miR-589, miR-597, miR-609.

6 Zusammenfassung

Diffus wachsende Follikuläre Lymphome unterschieden sich bei meinen Analysen von klassischen in mehrfacher Hinsicht. Hervorzuheben sind die Unterschiede bei den Analysen der MicroRNA-Expressionen. Die diffus wachsenden Follikulären Lymphome überexprimieren vielfach OncomiRs und unterexprimieren vielfach Tumorsuppressor-miRs. Diese Ergebnisse sind als Hinweis darauf zu deuten, dass diffus wachsende Follikuläre Lymphome malignere Eigenschaften aufweisen als klassische Follikuläre Lymphome.

Zu vielen veränderten MicroRNAs ist die Datenlage diskrepant oder unzureichend. Dies verdeutlicht, dass die Funktionen spezifischer MicroRNAs weiter untersucht werden müssen.

Zudem ist zu erwähnen, dass diffus wachsende Follikuläre Lymphome kein für ein spezifisches Stadium der B-Zell-Differenzierung typisches Expressionsmuster zeigten.

Die beiden Gruppen unterschieden sich zudem bei den Parametern Sklerose, Knochenmarkbefall, starke Reaktivität für die immunhistochemischen Marker CD10 und BCL2, Ausprägung von CD23-Netzwerken sowie Reaktivität der Tumorzellen für CD23.

Für das Verständnis des Follikulären Lymphoms sind weitere prospektive Studien erforderlich. Hierbei sollten insbesondere klinische Parameter miteinbezogen werden.

Literaturverzeichnis

Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Lopez C, Jaen J, Bosch R, Pons LE (2006): Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behaviour in Follicular Lymphoma patients. Journal of clinical oncology 2006 24: 5350-5357

Bhagavati S, Gu K, Loberiza FR, Bast M, Vose JM, Weisenburger DD (2009): Does a diffuse growth pattern predict for survival in patients with low-grade follicular lymphoma? Leuk Lymphoma 2009 Jun;50(6):900-3

Bentz M, Werner CA, Döhner H, Joos S, Barth TF, Siebert R, Schröder M, Stilgenbauer S, Fischer K, Möller P, Lichter P (1996): High incidence of chromosomal imbalances and gene amplifications in the classical follicular variant of follicle centre lymphoma. Blood 1996 88: 1437-1444

Canioni D, Brice P, Lepage E, Chababi M, Meignin V, Salles B, Xerri L, Péaud PY, Rousselot P, Peuchmaur M, Solal-Céligny P, Brousse N; Groupe d'Etude des Lymphomes folliculaires (2004): Bone marrow histological patterns can predict survival of patients with grade 1 or 2 follicular lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. Br J Haematol. 2004 Aug;126(3):364-71

Carbone A, Gloghini A, Cabras A, Elia G (2009): The germinal centre-derived lymphomas seen through their cellular microenvironment. 2009. British Journal Haematology, 145, 468-480.

Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, Banham AH (2006): High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. Blood 2006 Nov 1;108(9):2957-64.

Chai H, Liu M, Tian R, Li X, Tang H (2011): miR-20a targets BNIP2 and contributes

chemotherapeutic resistance in colorectal adenocarcinoma SW480 and SW620 cell lines. *Acta Biochem Biophys Sin (Shanghai)* 2011 Mar;43(3):217-25.

Chen H, Sun JG, Cao XW, Ma XG, Xu JP, Luo FK, Chen ZT (2009): Preliminary validation of ERBB2 expression regulated by miR-548d-3p and miR-559. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Aug 7;385(4):596-600.

Chin LJ, Slack FJ (2008): A truth serum for cancer – micrnas have major potential as cancer biomarkers. *Cell Res.* 2008 Oct;18(10):983-4.

Crotty S, Johnston RJ, Schoenberger SP (2010): Effectors and memories: BCL6 and BLIMP-1 in T- and B-Lymphocyte differentiation. *Nat immunol.* 2010 Feb;11(2):114-20.

Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Lansdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat W, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M, Staudt LM (2004): Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J M.* 2004 Nov 18;351(21):2159-69.

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

Díaz-Alderete A, Doval A, Camacho F, Verde L, Sabin P, Arranz-Sáez R, Bellas C, Corbacho C, Gil J, Perez-Martín M, Ruiz-Marcellán M, Gonzalez L, Montalbán C, Piris M, Menarguez J. (2008): Frequency of BCL2 and BCL6 translocations in follicular lymphoma: relation with histological and clinical features. *Leuk Lymphoma* 49(1):95-101

Di Leva G, Croce CM (2010): Roles of small rnas in tumor formation. *Trends Mol Med.* 2010 Jun;16(6):257-67.

Fabbri M, Croce CM, Calin GA (2009): Micrnas in the ontogeny of leukemias and lymphomas. *Leuk. Lymphoma* 50: 160-170.

Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve JJ, Mihailovic A, Halfwerk H, Morozov P, Brown M, Hafner M, Reyat F, van Kouwenhove M, Kreike B, Sie D, Hovestadt V, Wessels LF, van de Vijver MJ Tuschl T (2011): MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res.* 2011 Jul 1;71(13):4443-53

Fassina A, Marino F, Siri M, Zambello R, Ventura L, Fassan M, Simonato F, Cappellesso R (2012): The miR-17-92 microRNA cluster: a novel diagnostic tool in large B-cell malignancies. *Lab invest.* 2012 Sep 10. doi: 10.1038/labinvest.2012.129.

Fendler A, Stephan C, Yousef GM, Jung K, (2011): MicroRNAs as regulators of signal transduction in urological tumors. *Clin Chem* 57: 954-968

Freedmann A (2012): Follicular lymphoma: 2012 update on diagnosis and management. *Am J Hematol.* 2012 Oct;87(10):988-95.

Gabriely G, Yi M, Narayan RS, Niers JM, Wurdinger T, Imitola J, Ligon KL, Kesari S, Esau C, Stephens RM, Tannous BA, Krichevsky AM (2011): Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. *Cancer Res.* 2011 May 15;71(10):3563-72.

Garzon R, Croce CM (2008): MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Current opinion in hematology* 2008, 15; 352-358.

Glas AM, Knoop L, Delahaye L, Kersten MJ, Kibbelaar RE, Wessels LA, van Laar R, van Krieken JH, Baars JW, Raemaekers J, Kluin PM, van't Veer LJ, de Jong D (2007): Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007 Feb 1;25(4):390-8.

Gollub W, Stassek B, Huckhagel T, Bernd HW, Krokowski M, Merz H, Feller AC,

Thorns C (2009): BCL6-Translocations in Follicular Lymphomas with and without t(14;18)IgH/BCL2. Leuk Lymphoma

Gururajan M, Haga CL, Das S, Leu CM, Hodson D, Josson S, Turner M, Cooper MD (2010) MicroRNA-125b inhibition of b cell differentiation in germinal centers. Int Immunol 2010 Jul;22(7):583-92.

Hans CP, Weisenburger DD, Vose JM, Hock LM, Lynch JC, Aoun P, Greiner TC, Chan WC, Bociek RG, Bierman PJ, Armitage JO (2003): A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. Blood 2003 Mar 15;101(6):2363-7.

Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, Ott G, Nathwani BN, de Jong D, Yoshino T, Spagnolo D (2008): Follicular lymphoma. WHO.

Harris T, Jimenez L, Kawachi N, Fan JB, Chen J, Belbin T, Ramnauth A, Loudig O, Keller CE, Smith R, Prystowsky MB, Schlecht NF, Segall JE, Childs JE (2012): Low-Level Expression of miR-375 Correlates with Poor Outcome and Metastasis While Altering the Invasive Properties of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Am J Pathol 2012 Jan 7

He XX, Chang Y, Meng FY, Wang MY, Xie QH, Tang F, Li PY, Song YH, Lin JS (2011): MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo. Oncogene 2011 Nov 7. doi: 10.1038/onc.2011.500.

Hermeking H (2009): The mir-34 family in cancer and apoptosis. Cell death and differentiation 2010, 17, 193-199

Hong L, Han Y, Li S et al (2010): The malignant phenotype-associated microRNA in gastroenteric, hepatobiliary and pancreatic carcinomas. Expert Opin Biol Ther 10: 1693-1701

Höglund M, Sehn L, Connors JM, Gascoyne RD, Siebert R, Säll T, Mitelman F,

Horsman DE (2004): Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 39(3):195-204

Hunt S, Jones AV, Hinsley EE, Whawell SA, Lambert DW (2010): MicroRNA-124 suppresses oral squamous cell carcinoma motility by targeting ITGB1. *FEBS Lett.* 2011 Jan 3;585(1):187-92.

Hussein K (2011): Pathobiologie des MicroRNA-Systems. *Pathologe* 2012 Feb;33(1):70-8.

Iorio MV, Croce CM (2009): MicroRNAs in cancer: small molecules with huge impact. *Journal of clinical oncology*. Volume 27, number 34, december 1 2009. 5845-5855

Jalava SE, Urbanucci A, Latonen L, Waltering KK, Sahu B, Jänne OA, Seppälä J, Lähdesmäki H, Tammela TL, Visakorpi T (2012): Androgen-regulated miR-32 targets BTG2 and is overexpressed in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene* 2012 Jan 23. doi: 10.1038/onc.2011.624.

Jima DD, Zhang J, Jacobs C, Richards KL, Dunphy CH, Choi WWL, Au WY, Srivastava G, Czader MB, Rizzieri DA, Lagoo AS, Lugar PL, Mann KP, Flowers CR, Bernal-Mizrachi L, Naresh KN, Evens AM, Gordon LI, Luftig M, Friedman DR, Weinberg JB, Thompson MA, Gill JA, Liu Q, How T, Grubor V, Gao Y, Wu H, Zhu Jun, Globe GC, Lipsky PE, Chadburn A, Dave SS (2010): Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood*, 2 December 2010. Volume 116, Number 23, e118-e127.

Johnson A, Brun A, Dictor M, Rambech E, Akerman M, Anderson H (1995): Incidence and prognostic significance of t(14;18) translocation in follicle center cell lymphoma of low and high grade. A report from southern Sweden. *Ann Oncol.* 1995 Oct;6(8):789-94.

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

Katzenberger T, Kalla J, Leich E, Stöcklein H, Hartmann E, Barnickel S, Wessendorf S, Ott MM, Müller-Hermelink HK, Rosenwald A, Ott G (2009): A distinctive subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36. *Blood* 2009 Jan 29;113(5):1053-61.

Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A, Allgayer H, Gückel B, Fehm T, Schneeweiss A, Sahin O, Wiemann S, Tschulena U (2011): MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene* 2011 Dec 12. doi: 10.1038/onc.2011.571.

Klapper W (2011): Pathobiology and diagnosis of follicular lymphoma. *Semin Diagn Path* 2011 May;28(2):146-60.

Klapper W, Hoster E, Rölver L, Schrader C, Janssen D, Tiemann M, Bernd HW, Determann O, Hansmann ML, Möller P, Feller A, Stein H, Wacker HH, Dreyling M, Unterhalt M, Hiddemann W, Ott G; German Low Grade Lymphoma Study Group (2007): Tumor sclerosis but not cell proliferation or malignancy grade is a prognostic marker in advanced-stage follicular lymphoma: the German Low Grade Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 25(22):3330-6

Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Morimura R, Nagata H, Kosuga H, Iitaka D, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E (2011): Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Brit J Cancer* 2011 Jun 28;105(1):104-11.

Kong KL, Kwong DL, Chan TH, Law SY, Chen L, Li Y, Qin YR, Guan XY (2011): MicroRNA-375 inhibits tumour growth and metastasis in oesophageal squamous

cell carcinoma through repressing insulin-like growth factor 1 receptor. *Gut* 2012 Jan;61(1):33-42.

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulton J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL (2008): Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141(5):672-5

Lawrie CH, Chi J, Taylor S, Trnonti D, Ballabio E, Palazzo S, Saunders NJ, Pezzella F, Boulton J, Wainscoat JS, Hatton CSR (2009): Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma. *J. Cell. Med.* Vol 13, No7, 2009 pp. 1248 – 1260

Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, Davies AJ, Jordan S, MacDougall F, Matthews J, Norton AJ, Gribben JG, Lister TA, Goff LK (2006): Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol* 24: 5052-5059.

Lee D, Seo J, Oh Y, Kim J, Ko Y (2008): Analysis of follicular lymphoma by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch* 452(1): 75-81

Leidner RS, Ravi L, Leahy Y, Chen Y, Bednarchik B, Streppel M, Canto M, S Wang J, Maitra A, Willis J, Markowitz SD, Barnholtz-Sloan J, Adams MD, Chak A, Guda K (2012): The micrnas mir-31 and mir-375 as candidate markers in barret's esophageal carcinogenesis. *Genes chromosomes cancer* 2012 Feb 3. doi: 10.1002/gcc.21934.

Leich E, Ott G, Rosenwald A (2011a): Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL. *Best practice & research clinical haematology* 24 (2011), 95-109.

Leich E, Zamo A, Horn H, Haralambiera E, Puppe B, Gascoyne RD, Chan WC, Braziel RM, Rimsza LM, Weisenburger DD, Delabie J, Jaffe ES, Fitzgibbon J,

Staudt LM, Müller-Hermelink HK, Calaminici M, Campo E, Ott G, Hernandez L, Rosenwald A (2011b): Microna profiles of t(14;18)-negative follicular lymphoma support a late germinal center b-cell phenotype. *Blood*, volume 118, number 20, 5550-5557

Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, Price CG, Young BD, van Ommen GJ, Kluin PM (1991): Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 6(12):2271-6

Lin RJ, Lin YC, Yu A (2010): miR-149* induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells. *Mol carcinog.* 2010 Aug;49(8):719-27.

Lin PY, Yu SL, Yang PC (2010): MicroRNA in lung cancer. *Br J Cancer* 103: 1144-1148.

Liu XX, Li XJ, Zhang B, Liang YJ, Zhou CX, Cao DX, He M, Chen GQ, He JR, Zhao Q (2011): Microna-26b is underexpresses in human breast cancer and induces cell apoptosis by targeting SLC7A11. *FEBS Lett.* 2011 May 6; 585(9): 1363-7.

Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, Mclaughlin P, Smith T, Pugh W, Hagemeister F, Rodriguez MA, Romaguera JE, Younes A, Sarris AH, Preti HA, Lee MS (1999): Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood.* 1999 May 1;93(9):3081-7.

Luedde T (2010): MicroRNA-151 and its hosting gene FAK (focal adhesion kinase) regulate tumor cell migration and spreading of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2010 Sep;52(3):1164-6.

Lv XB, Jiao Y, Qing Y, Hu H, Cui X, Lin T, Song E Yu F (2011): miR-124 suppresses multiple steps of breast cancer metastasis by targeting a cohort of pro-metastatic genes in vitro. *Chin J Cancer.* 2011 Dec;30(12):821-30.

Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA (2007): Tumour invasion and metastasis

initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007 Oct 11;449(7163):682-8.

Mazar J, DeBlasio D, Govindarajan SS, Zhang S, Perera RJ (2011): Epigenetic regulation of microRNA-375 and its role in melanoma development in humans. *FEBS Lett.* 2011 Aug 4;585(15):2467-76.

McKenna RW, Bloomfield CD, Brunning RD (1975): Bone marrow and blood manifestations. *Cancer.* 1975 Aug;36(2): 428-440

Minor J, Wang X, Zhang F, Song J, Jimeno A, Wang XJ, Lu X, Gross N, Kulesz-Martin M, Wang D, Lu SL (2012): Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral oncol.* 2012 Jan;48(1):73-8.

Montoto S, Lopez-Guillermo A, Colomer D, Extrove J, Bosch F, Ferrer A, Villamor N, Moreno C, Campo E, Montserrat E (2003): Incidence and clinical significance of bcl-2/IgH rearrangements in follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2003 Jan;44(1):71-6.

Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Ikenaga N, Sakai H, Lin C, Fujita H, Otsuka T, Aishima S, Nagai E, Oda Y, Tanaka M (2011): MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer, promotes its invasiveness, and correlates with a poor prognosis. *Surgery* 2011 Nov;150(5):916-22.

Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A, Meijer GA, Agami R (2008): Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2008 Jul 15;68(14):5795-802

Nie K, Zhang T, Allawi H, Gomez M, Liu Y, Chadburn A, Wang YL, Knowles DM, Tam W (2010): Epigenetic down-regulation of the tumor suppressor gene PRDM1/Blimp-1 in diffuse large B cell lymphomas: a potential role of the microRNA let-7. *Am J Pathol.* 2010 Sep;177(3):1470-9.

Nohota N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N (2012): MicroRNA-1/133a and

microRNA-206/133b clusters: Dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget* 2012 Feb 4.

Norton AJ, Gribben JG, Lister TA, Goff LK (2006): Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein p3-positive cells in Diagnostic follicular lymphoma tissue microarray *Am J Pathol* 2010 Sep;177(3):1470-9.s correlates with outcome. *Journal of clinical oncology*, volume 24, number 31, pp. 5052 – 5059

Pallante P, Visone R, Croce CM, Fusco A (2010): Deregulation of microRNA expression in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2010 Jan 29;17(1):F91-104.

Park JK, Henry JC, Jiang J, Esau C, Gusev Y, Lerner MR, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD (2011): miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar 25;406(4):518-23.

Pritzlueit R, Holzmann M, Eisemann N, Gerdemann U, Katalinic A (2011): Krebs in Schleswig-Holstein Band 9 Inzidenz und Mortalität im Jahr 2008. Institut für Krebs epidemiologie e.V. 2011 2 Diagnosejahr 2008 Krebsregister Schleswig-Holstein Die Deutsche Bibliothek — CIP-Einheitsaufnahme

Purow B (2010): The elephant in the room: do microRNA-based therapies have a realistic chance of succeeding for brain tumors such as glioblastoma? *Journal of neurooncology* 2011 Jul;103(3):429-36.

Roehle A, Hoefig KP, Repsilber D, Thorns C, Ziepert M, Wesche KO, Thiere M, Loeffler M, Klapper W, Pfreundschuh M, Matolcsy A, Bernd HW, Reiniger L, Merz H, Feller AC (2008): microRNA signatures characterize diffuse large b-cell lymphomas and follicular lymphomas. *British journal of haematology* 142, 732 – 744

Schramedei K, Mörbt N, Pfeifer G, Rosolowski M, Horn F, von Bergen M, Brocke-Heidrich K (2011): MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and

SMARCA4. *Oncogene* 2011 Jun 30;30(26):2975-85. doi: 10.1038/onc.2011.15.

Selth LA, Townley S, Gillis JL, Ochnik AM, Murti K, Macfarlane RJ, Chi KN, Marshall VR, Tilley WD, Butler LM (2011): Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *Int J Cancer*. 2011 Aug 30. doi: 10.1002/ijc.26405.

Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG (2008): miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med*. 2008 Jun 24;6:14.

Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Yamamoto H, Maki Y, Muraoka T, Shien K, Furukawa M, Ueno T, Asano H, Tsukuda K, Aoe K, Miyoshi S (2011): Frequent methylation and oncogenic role of microRNA-34b/c in small-cell lung cancer. *Lung cancer*. 2011 Oct 31.

Tian Y, Luo A, Cai Y, Su Q, Ding F, Chen H, Liu Z (2010): MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines. *J Biol Oncol* 2010 Mar 12;285(11):7986-94.

Tivnan A, Foley NH, Tracey L, Davidoff AM Stallings RL (2010): MicroRNA-184-mediated inhibition of tumour growth in an orthotopic murine model of neuroblastoma. *Anticancer Res*. 2010 Nov;30(11):4391-5.

Thorns, Christoph: Das follikuläre Lymphom - eine morphologische, immunhistochemische und molekulare Analyse. *Med.Habil.Schr.Lübeck*, 2009.

Tsakumoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M (2010): MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Res* 2010 Mar 15;70(6):2339-49.

Tsuchida A, Ohno S, Wu W, Borjigin N, Fujita K, Aoki T, Ueda S, Takanashi M, Kuroda M (2011): miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci.* 2011 Dec;102(12):2264-71.

Valera VA, Walter BA, Linehan WM, Merino MJ (2011): Regulatory effects of microRNA-92 (mir-92) on VHL, Gene Expression and the Hypoxic Activation of miR-210 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Cancer* 2011; 2: 515-26.

Vaandrager JW, Schuurin E, Philippo K, Kluin PM (2000): V(D)J recombinase-mediated transposition of the BCL2 gene to the IGH locus in follicular lymphoma. *Blood.* 2000 Sep 1;96(5):1947-52.

Veerla S, Lindgren D, Kvist A, Frigyesi A, Staaf J, Persson H, Liedberg F, Chebil G, Gudjonsson S, Borg A, Mansson W, Rovira C, Höglund M (2009): MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. *Int J Cancer.* 2009 May 1;124(9):2236-42.

Wang Q, Li DC, Li ZF, Liu CX, Xiao YM, Zhang B, Li XD, Zhao J, Chen LP, Xing XM, Tang SF, Lin YC, Lai YD, Yang P, Zeng JL, Xiao Q, Zeng XW, Lin ZN, Zhuang ZX, Zhuang SM, Chen W (2011): Upregulation of miR-27a contributes to the malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by SV40 small T antigen. *Oncogene* 2011 Sep 8;30(36):3875-86.

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

Wilting SM, van Boerdonk RA, Henken FE, Meijer CJ, Diosdado B, Meijer GA, le Sage C, Agami R, Snijders PJ, Steenbergen RD (2010): Methylation-mediated silencing and tumour suppressive function of hsa-miR-124 in cervical cancer. *Mol. Cancer* 2010 Jun 26;9:167.

Wong CC, Wong CM, Tung EK, Au SL, Lee JM, Poon RT, Man K, Ng IO (2011): The microRNA miR-139 suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating Rho-kinase 2. *Gastroenterology* 2011 Jan;140(1):322-31.

Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW Yuen AP, Wei WI (2008): Mature miR-184 as potential oncogenic microrna of squamous cell carcinoma of tongue. *Clin Cancer Res* 2008 May 1; 14(9): 2588-92.

Wu BH, Xiong XP, Jia J, Zhang WF (2011): MicroRNAs: new actors in the oral cancer scene. *Oral Oncol.* 2011 May;47(5):314-9.

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

Wu N, Zhao X, Liu M, Liu H, Yao W, Zhang Y, Cao S, Lin X (2011): Role of microrna-26b in glioma development and its mediated regulation on EphA2. *Plos One.* 2011 Jan 14; 6(1):e16264

Xiang J, Wu J (2010): Feud or Friend? The Role of the miR-17-92 Cluster in Tumorigenesis. *Curr Genomics* 2010 Apr;11(2):129-35

Yan H, Wu J, Liu W, Zuo Y, Chen S, Zhang S, Zeng M, Huang W (2010): MicroRNA-20a overexpression inhibited proliferation and metastasis of pancreatic carcinoma cells. *Hum Gene Ther.* 2010 Dec; 21(12): 1723-34

Yukihiro Akao, Yoshihito Nakagawa, Yukio Kitade, Tomohiro Kinoshita, Tomoki Naoe (2007): Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci* December 2007 vol. 98 no. 12 1914–1920

Zhang S, Hao J, Xie F, Hu X, Liu C, Tong J, Zhou J, Wu J, Shao C (2011) Downregulation of miR-132 by promoter methylation contributes to pancreatic cancer development. *Carcinogenesis* 2011 Aug;32(8):1183-9.

Zhang J, Jima DD, Jacobs C, Fischer R, Gottwein E, Huang G, Lugar PL, Lagoo SS, Rizzieri DA, Friedman DR, Weinberg JB, Lipsky PE, Dave SS (2009): Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation. *Blood*. 2009 May 7; 113(19): 4586-4594.

Zhao JJ, Yang J, Lin J, Yao N, Zhu Y, Zheng J, Xu J, Cheng JQ, Lin JY, Ma X (2009): Identification of mirnas associated with tumorigenesis of retinoblastoma by mirna microarray analysis. *Childs Nerv System*. 2009 Jan;25(1):13-20.

Zheng F, Liao YJ, Cai MY, Liu YH, Liu TH, Chen SP, Bian XW, Guan XY, Lin MC, Zeng YX, Kung HF, Xie D (2011): The putative tumour suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2. *Gut* 2012 Feb;61(2):278-89.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassisches Follikuläres Lymphom.....	2
Abbildung 2: Diffuser Wachstumstyp beim FL.....	4
Abbildung 3: Sklerose.....	22
Abbildung 4: Knochenmarkbefall.....	23
Abbildung 5: Starke Reaktivität für den Keimzentrumsmarker CD10.....	23
Abbildung 6: CD23-Netzwerke.....	24
Abbildung 7: Erhaltene IgD-positive Mantelzone.....	25

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisübersicht, Teil1: Klinische, morphologische und immunhistochemische Parameter. Die exakte zweiseitige Signifikanz bezieht sich auf den Vergleich DFL mit der Referenzgruppe. Die Daten des Gesamtkollektivs sind zum Vergleich angegeben.	27
Tabelle 2: Ergebnisübersicht Teil 2: Veränderte MicroRNA-Expressionen bei DFL	29
Tabelle 3: In DFL veränderte MicroRNAs und ihre Assoziation mit der Differenzierung von B-Lymphozyten (vereinfachte Darstellung der Ergebnisse von Zhang et al., 2009 und Jima et al., 2010).....	35
Tabelle 4: MicroRNAs mit beschriebenem onkogenen und solche mit beschriebenem tumorsuppressiven Potential.....	36
Tabelle 5: MicroRNAs mit in der Literatur beschriebenen onkogenen und tumorsuppressiven Wirkungen.....	37
Tabelle 6: Bei DFL überexprimierte MicroRNAs und ihre Assoziation mit Neoplasien.....	38
Tab. 7: Unterexprimierte MicroRNAs bei DFL und ihre Assoziation mit Neoplasien.....	40

Danksagungen

Diese Arbeit wäre ohne die zuverlässige Unterstützung einiger wichtiger Personen nicht möglich gewesen. Diesen möchte ich an dieser Stelle danken.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Christoph Thorns für die jahrelange zuverlässige Betreuung, die vielen kritischen Anmerkungen und die humorvollen Aufmunterungen.

Herrn Prof. Dr. med. A.C. Feller danke ich für die Vermittlung sowie die kontinuierliche Unterstützung des Projekts.

Meiner Mitdoktorandin Wiebke Gollub danke ich für die unterhaltsame und hilfreiche Zusammenarbeit bei den Experimenten.

Ich danke Sabine Didlaukat, Biggi Brahnke und Anette Kaiser für die exzellente Anleitung und Unterstützung bei den Experimenten.

Ich danke Florian Massel für die technische Unterstützung am PC.

Ich danke meiner Mutter Cornelia Stassek, meiner Freundin Carolin Kirsch und Uwe Rosental für die jahrelange Unterstützung und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Kommilitonen Doreen Thomas, Kristin Waldow, Monika Perl und Jan Kaiser – um nur die allerwichtigsten zu nennen – danke ich für jahrelangen Zusammenhalt und Motivation.

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Björn Stassek
Geburtsdaten: 24.09.1981 in Braunschweig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

■ Schulbildung

08/88 – 06/01 Grundschole, Orientierungsstufe und Gymnasium in Braunschweig, Abschluss: Abitur.

■ Ersatzdienst

08/01 - 05/02 Ersatzdienst im Pflegebereich der Klinik für Hämatologie und Onkologie des Städtischen Klinikums Braunschweig.

■ Berufliche Ausbildung

10/02 - 09/05 Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger, evangelisch-lutherischen Diakonissenanstalt Marienstift in Braunschweig.

■ Studium

10/05 - 12/11 Studium der Medizin an der Universität zu Lübeck
09/07 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/11 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

■ Praktisches Jahr

Anästhesiologie: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Innere Medizin: Klinikum Itzehoe
Chirurgie: Klinikum Itzehoe

■ Beruflicher Werdegang

Seit 04/12: Assistenzarzt Medizinische Klinik 3, Klinik für
Hämatologie und Onkologie, Städtisches Klinikum
Braunschweig.

■ Publikationen

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