

MUTATIONSANALYSE DES TUMORSUPPRESSORGENS TNFAIP₃
IM
KLASSISCHEN HODGKIN-LYMPHOM

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Barbara-Magdalena Etzel
geboren am 26.03.1982 in Erfurt

Gutachter

1. Prof. Dr. Iver Petersen, Jena
2. Prof. Dr. Paul La Rosée, Jena
3. Prof. Dr. Andreas Rosenwald, Würzburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05. September 2016

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zell-Rezeptor (engl. B cell receptor)
bp	Basenpaar
CD	Differenzierungscluster (engl. cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary desoxyribonucleid acid)
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
CTP	Cytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DHSG	Deutsche Hodgkin Studiengruppe
DLBCL	Diffus-grosszelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleid acid)
dNTPs	Desoxy-Nukleosid-Triphosphate
EBER	Epstein-Barr-Virus kodierte RNA (engl. EBV-encoded RNA)
EBNA-1	Epstein-Barr Virusspezifisches nukleäres Antigen-1
EBV	Epstein-Barr Virus
et al.	und andere (lat. et altera)
GC	Keimzentrum (engl. germinal center)
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
HE	Hämatoxylineosin

HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin und Reed/Sternberg
Ig	Immunglobulin
IgC	konstante Region der Immunglobulin Ketten (engl. Ig constant region)
IgH	schwere Immunglobulinkette (engl. heavy chain)
IgV	Variables Gensegment der Immunglobulinkette
I κ B	Inhibitorisches κ B-Protein
IKK	I κ B-Kinase-Komplexes (IKK)
IL	Interleukin
ISH	In-Situ-Hybridisierung
J-Kette	Verbindungs-Gensegment der Immunglobulinkette (engl. joining region)
JAK	Januskinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L&H Zellen	lymphozytische und histiozytische Zellen
LDHL	Lymphozytenarmes Hodgkin-Lymphom
LK	Lymphknoten
LMP	Latentes Membranprotein des Epstein-Barr Virus (engl. Epstein-Barr virus latent membrane proteine)
LP-Zellen	Lymphozytenprädominanzzellen (engl. lymphocyte predominant cells)
LRCHL	Lymphozytenreiches Hodgkin-Lymphom
MAPK	mitogenaktivierende Proteinkinase (engl. mitogen-activated protein kinase)
MCHL	Gemischtzelliges Hodgkin-Lymphom
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
MMP	Matrixmetalloproteinase

mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	NF- κ B essentieller Modulator
NF- κ B	Nuklear-factor-kappa B
NIK	NF- κ B-induzierende Kinase
NLPHL	Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom
nosCHL	nicht näher klassifiziertes Hodgkin-Lymphom
NSHL	Nodulär sklerosierendes Hodgkin-Lymphom
OTU	Eierstocktumordomäne (engl. ovarian tumor like domain)
PAS	engl. periodic acid-Schiff reaction
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
REL	Untereinheit des NF- κ B-Komplexes, Rel-Homologie-Domäne (RHD)
RIP 1	Receptor interacting serine/threonine-protein kinase 1
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkription
STAT	engl. signal transducers and activators of transcription
Taq Pol	DNA-Polymerase des <i>Thermus aquaticus</i> Bakteriums
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFAIP ₃	Tumornekrosefaktor Alpha-induzierendes Protein 3
TRAF	TNF receptor associated factor
TTP	Thymidintriphosphat
Vol	Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. world health organisation)
ZnF	Zink-Finger

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	9
2.	Einleitung	11
2.1	Hodgkin-Lymphom	11
2.1.1	<i>Definition, Epidemiologie und Klinik</i>	11
2.1.2	<i>Diagnostik und Histologie des klassischen Hodgkin-Lymphoms</i>	13
2.1.3	<i>Therapie und Prognose</i>	16
2.1.4	<i>Histiogenese und Molekularpathogenese der HRS-Zellen</i>	18
2.1.5	<i>Bedeutung einer Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion</i>	23
2.2	Das TNFAIP3-Gen	25
2.2.1	<i>Genstruktur und Expression</i>	25
2.2.2	<i>A20 - Biologische Effekte</i>	25
2.2.3	<i>A20 - NF-κB-Inhibitor</i>	26
2.2.4	<i>A20 als Tumorsuppressor</i>	26
2.2.5	<i>Bedeutung von TNFAIP3-Mutationen in Lymphomen</i>	27
2.2.6	<i>A20-Antikörper</i>	27
3.	Zielstellung der Arbeit	28
4.	Material und Methoden	29
4.1	Epidemiologie	29
4.1.1	<i>Kollektiv der epidemiologischen Untersuchungen</i>	29
4.1.2	<i>Statistische Analyse</i>	29
4.2	Mutationsanalyse	29
4.2.1	<i>Material der Mutationsanalyse</i>	29
4.2.1.1	<i>Kollektiv</i>	29

4.2.1.2 Enzyme und Chemikalien.....	30
4.2.1.3 Geräte.....	31
4.2.1.4 Kommerzielle Analysesysteme.....	32
4.2.1.5 Primer.....	32
4.2.1.6 Puffer-Rezeptur.....	34
4.2.1.7 Software.....	34
4.2.1.8 Statistik.....	35
4.2.2 Methoden der Mutationsanalyse.....	35
4.2.2.1 HE-Schnitte.....	35
4.2.2.2 DNA-Extraktion.....	35
4.2.2.3 semi-nested Polymerase-Kettenreaktion (semi-nested PCR).....	37
4.2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA.....	40
4.2.2.5 DNA-Sequenzierung.....	40
4.2.2.6 Sequenzanalyse.....	42
4.3 EBV-Nachweis mittels EBER-in situ-Hybridisierung (ISH).....	42
4.4 A20-Antikörper.....	43
5. Ergebnisse.....	44
5.1 Epidemiologie des Hodgkin-Lymphom im Raum Jena/Thüringen.....	44
5.1.1 Subtypenverteilung des klassischen Hodgkin-Lymphom.....	44
5.1.2 Geschlechts- und Altersverteilung.....	45
5.2 TNFAIP 3-Mutationsanalyse.....	47
5.3 EBV-Assoziation.....	52
5.4 A20 Antikörper.....	55

6. Diskussion	<hr/>	57
6.1 Epidemiologie	57
6.2 TNFAIP3-Mutationsanalyse	62
6.3 EBV-Assoziation	63
6.4 A20-Antikörper	64
7. Schlussfolgerungen	<hr/>	66
8. Literatur- und Quellenverzeichnis	<hr/>	68
9. Anhang	<hr/>	73
9.1 Abbildungsverzeichnis	73
9.2 Tabellenverzeichnis	74
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung	75

1. Zusammenfassung

Als 1862 der englische Arzt Sir Thomas Hodgkin erstmalig das Hodgkin-Lymphom als eigenständige Erkrankung beschrieb, war noch lange nicht klar, welche verschiedenen Mechanismen in der Pathogenese der Krankheit eine Rolle spielen. Erst in den letzten Jahren konnte die Zugehörigkeit der Hodgkin-Reed-Sternbergzellen (HRS) zur Zellreihe der B-Lymphozyten geklärt werden. Die Beteiligung genetischer Veränderungen, deregulierte Signaltransduktionswege sowie eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus sind seit einiger Zeit in den Mittelpunkt weiterer Forschungen auf der Suche nach dem Verständnis der komplexen Pathogenese gerückt. In diesem Zusammenhang wurde in verschiedenen Studien bereits die Bedeutung des TNFAIP₃-Gens analysiert. Das Gen kodiert das zytoplasmatische Protein A20. A20 gilt als zytoprotektives und antiapoptisches Protein, wobei auch hier die genauen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind. Relativ gut erforscht ist die Funktion des Proteins als Inhibitor der Tumornekrosefaktor-(TNF)-vermittelten NF-κB-(Nuklear-factor-kappa B)-Aktivität. Da fast jeder Tumor mit einer chronischen NF-κB-Aktivierung einhergeht, gilt A20 als Tumorsuppressor in gesunden Geweben.

In einer epidemiologischen Voruntersuchung wurden alle registrierten Hodgkin-Lymphom-Fälle am Institut für Pathologie der Universität Jena im Zeitraum 2000-2008 hinsichtlich ihres histologischen Subtyps, Patientenalter und -geschlecht ausgewertet. Ungeachtet der histologischen Subtypenunterteilung zeigt sich auch in unserem Kollektiv eine bimodale Altersverteilung (ein erster Häufigkeitsanstieg im Alter der jungen Erwachsenen zwischen 26. und 45. Lebensjahr, zweiter Anstieg im Alter über 75 Jahre). Ebenfalls konnte eine Bevorzugung des männlichen Geschlechtes gezeigt werden. Der häufigste histologische Subtyp, das NSHL (42%) wird vorwiegend bei Frauen der Altersklassen 15.- 40. Lebensjahr diagnostiziert. Das MCHL (35%) zeigt wiederum einen bimodalen Verlauf der Alterskurve mit deutlicher Bevorzugung des männlichen Geschlechtes. Unsere erhobenen epidemiologischen Daten sind übereinstimmend mit den Daten großer nationaler und internationaler Datenbanken (nationale Daten des Robert-Koch-Institutes, www.rki.de; internationale Daten der International Agency for Research on Cancer (IARC), einer Behörde der Weltgesundheitsorganisation, <http://globocan.iarc.fr/>).

In der hier durchgeführten Mutationsanalyse des TNFAIP₃-Gens konnte mittels semi-nested PCR bestätigt werden, dass es im klassischen Hodgkin-Lymphom häufig zu Mutationen kommt.

Insgesamt zeigte sich in dem untersuchten Kollektiv eine Häufigkeit der Mutation von 21,6% (8 von 37 Proben).

Patienten nach Mononukleoseinfektion, hervorgerufen durch das Epstein-Barr-Virus, haben im Laufe des Lebens ein höheres Risiko an einem klassischen Hodgkin-Lymphom zu erkranken. Man geht davon aus, dass 90% der Bevölkerung latent mit EBV infiziert sind. Unterschiede finden sich je nach Alter und ethnischer Herkunft. In der westlichen Welt sind in ca. 40% aller cHL-Fälle die HRS-Zellen mit dem EBV infiziert. Mit Hilfe der EBER-in situ-Hybridisierung (ISH) wurden die Proben dieser Arbeit auf eine latente EBV-Infektion hin untersucht. Insgesamt konnte in 19% eine EBV-Infektion nachgewiesen werden (7 von 37 Proben).

Sowohl unsere Ergebnisse, als auch die Ergebnisse aus Voruntersuchungen untermauern die These, dass es unterschiedliche pathogenetische Mechanismen in den einzelnen histologischen Subgruppen des Hodgkin-Lymphoms gibt. So ist es als sehr wahrscheinlich anzusehen, dass eine latente EBV-Infektion die Ausbildung eines Hodgkin-Lymphomes vom gemischtzelligen Typ (MCHL) begünstigt. Wir konnten in 41,6% aller MCHL-Proben eine Infektion nachweisen.

Anschließend wurde der Mutationsstatus des TNFAIP₃-Gens mit dem EBV-Status verglichen. Alle Mutationen konnten in Tumorgeweben mit negativem EBV-Status nachgewiesen werden. Somit kann bestätigt werden, dass Mutationen im TNFAIP₃-Gen signifikant häufiger in EBV-negativen Hodgkin-Lymphomen zu finden sind als in Tumoren mit positivem EBV-Status. Dies bestätigt ebenfalls die Theorie, dass eine Mutation im TNFAIP₃-Gen und die EBV-Infektion unterschiedliche pathogenetische Mechanismen bei der Tumorgenese darstellen und hebt die Bedeutung einer latenten EBV-Infektion im Hodgkin-Lymphom nochmals hervor.

Im Gegensatz zu aufwendigen Mutationsanalysen mittels PCR haben sich in der alltäglichen Routinepraxis Proteinantikörper zum Proteinnachweis als praktisch erwiesen. Im Jahr 2012 gelang die Entwicklung des monoklonalen anti-TNFIP₃ (A20) Antikörper (Ber-A20) zur Detektion unmutierter A20-Proteine (Proteinnachweis). In unserer Testung dieses Antikörpers zeigte sich eine Sensitivität des Antikörpers von 80% sowie eine Spezifität von ca. 73% bezüglich der Detektion eines A20-Proteinverlustes. Damit stellt der Antikörper eine mögliche Alternative in der Diagnostik A20-defizienter Gewebe dar, kann derzeit jedoch den molekulargenetischen Nachweis einer TNFAIP₃-Mutation nicht ersetzen.

2. Einleitung

2.1 Hodgkin-Lymphom

2.1.1 Definition, Epidemiologie und Klinik

„On the morbid appearances of the Adsorbent Glands and Spleen“ (1832), so beschreibt der englische Arzt, Sir Thomas Hodgkin erstmals das Hodgkin-Lymphom als eigenständige Krankheit. Es handelt sich hierbei um eine maligne Neoplasie des lymphatischen Systems. 1898 folgten Beschreibungen der histologischen Veränderungen durch Carl Sternberg und Dorothy Reed (1902). Bis heute werden die unterschiedlichen Ursachen und Auslöser der Erkrankung diskutiert. Lange Zeit war nicht klar, von welchen Zellen des lymphatischen Systems sich das Hodgkin-Lymphom ableitet. Erst 1994 gelang der Forschungsgruppe um Ralf Küppers, der molekularbiologische Beweis, dass die malignen HRS-Zellen ihren Ursprung in B-Lymphozyten haben, welche im Keimzentrum der Lymphknoten gebildet werden (Küppers et al. 1994; Bräuninger et al. 2006). Noch immer ist die Pathogenese jedoch nicht vollständig geklärt. Neben genetischen Veränderungen und deregulierten Signaltransduktionswegen scheint auch eine Epstein-Barr-Virus-(EBV)-Infektion an der Entstehung eines Hodgkin-Lymphoms beteiligt zu sein.

Im Vergleich zu anderen malignen Erkrankungen ist das Hodgkin-Lymphom selten. Insgesamt handelt es sich nur in etwa 15% aller Lymphome um ein Hodgkin-Lymphom (Jaffe et al. 2009). Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird auf 2-3 pro 100.000 Personen geschätzt. Im Jahr 2012 lag die Zahl der Neuerkrankungen nach WHO (globocan.iarc.fr) bei 2017 (1081 Männer, 936 Frauen; Inzidenz 2,5). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt zwischen 75% und 90%. Damit hat die Erkrankung eine günstige Prognose (Engert et al. 2009; Engert et al. 2010). Aus diesem Grund ist die Prävalenz der Diagnose deutlich höher als die Inzidenz. In Deutschland lebten im Jahre 2012 ca. 6600 Menschen mit einer bis zu fünf Jahre zurückliegenden Diagnose des Hodgkin-Lymphoms (5-Jahres-Prävalenz: 9,3; globocan.iarc.fr).

Grundsätzlich kann die Erkrankung in jedem Alter auftreten. Es handelt sich jedoch um eine der häufigsten malignen Erkrankungen im jungen Erwachsenenalter (Thomas et al. 2002). Hinsichtlich des Erkrankungsalters zeigen sich zwei Häufigkeitsgipfel: ein größerer zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr und einen kleineren Gipfel nach dem 65. Lebensjahr.

Das klinische Bild wird durch eine schmerzlose Lymphadenopathie bestimmt. In 70% der Fälle sind zervikale Lymphknoten betroffen, seltener mediastinale, axilläre, abdominale oder inguinale

Lymphknotenstationen. Hinzu kommen unspezifische Allgemeinsymptome (B-Symptomatik) wie unklares Fieber über 38°C, Nachtschweiß oder nicht erklärbarer Gewichtsverlust (mehr als 10% des Körpergewichtes innerhalb von 6 Monaten). Zudem treten häufig paraneoplastische Symptome, wie Pruritus oder der oft beschriebene Alkoholschmerz auf. Laborveränderungen sind uncharakteristisch. Zur Zeit gibt es keinen spezifischen Laborparameter zur Diagnostik oder Verlaufskontrolle (Fuchs 2007).

Die klinische Stadieneinteilung der Erkrankung erfolgt nach der im Rahmen der Cotswolds-Konferenz modifizierten Ann-Arbor-Klassifikation (1989). Unterschieden werden vier Stadien. Die Stadien I-III werden definiert durch Zahl und Lokalisation der befallenen lymphatischen Organe (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Klinisches Staging des Hodgkin-Lymphoms nach der Ann-Arbor-Klassifikation. I-IV bezeichnen das klinische Stadium. (S3-Leitlinie Hodgkin-Lymphom, www.leitlinienprogramm-onkologie.de)

Stadium I:	Befall einer einzigen Lymphknotenregion (I/N) oder Vorliegen eines einzigen oder lokalisierten extranodalen Herdes (I/E)
Stadium II:	Befall von 2 oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/N) oder Vorliegen lokalisierter extranodaler Herde und Befall einer oder mehrerer Lk-Regionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/E)
Stadium III:	Befall von 2 oder mehr Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III/N) oder Befall von lokalisierten extranodalen Herden und Lymphknoten, sodass ein Befall auf beiden Seiten des Zwerchfells vorliegt (III/E)
Stadium IV:	disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall von Lymphknoten
Zusätze:	<p>B: mit Allgemeinsymptome</p> <p>A: ohne Allgemeinsymptome</p> <p>X: bulky disease (Lymphknoten über 10 cm Größe oder großer Mediastinaltumor, d.h. $\geq 1/3$ des max. Thoraxquerdurchmessers in der konventionellen Röntgen-Aufnahme des Thorax p.a.)</p> <p>E: extranodal Befall (S: Milz, M: Knochenmark, D: Haut, H: Leber, L: Lunge, O: Knochen, P: Pleura)</p>

2.1.2 Diagnostik und Histologie des klassischen Hodgkin-Lymphoms

Die Diagnose des Hodgkin-Lymphoms erfolgt durch die Histopathologie. Diese sollte möglichst anhand einer Biopsie des betroffenen Lymphknotens (oder eines anderen primär betroffenen Organs) gestellt werden. Eine Feinnadelaspiration (Zytologie) zur Diagnosestellung ist unzureichend, da die charakteristischen malignen Hodgkin/Reed-Sternberg-(HRS)-Zellen nur weniger als 1% der Tumormasse ausmachen können. Man findet sie eingebettet in einem zellulären Infiltrat verschiedener Zelltypen hämatopoetischen Ursprungs. HRS-Zellen sind große (über 20 µm), mehrkernige Zellen (2-5 Zellkerne) mit blasiger Chromatinstruktur und prominenten eosinophilen Nukleolen. Sie sind umgeben von einem charakteristischen Begleitinfiltrat aus kleinen Lymphozyten, Histiozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Plasmazellen und Fibroblasten in wechselnder Anzahl, sowie neugebildeten Blutgefäßen und extrazellulärer Matrix (Abbildung 1). Die Lymphozytenpopulation besteht vorwiegend aus CD4⁺-T-Helfer-Lymphozyten, welche häufig auch Rosetten um die Tumorzellen bilden. Zur histologischen Diagnosestellung sollte immer ein Referenzpathologe hinzugezogen werden (S3-Leitlinie Hodgkin-Lymphom, www.leitlinienprogramm-onkologie.de).

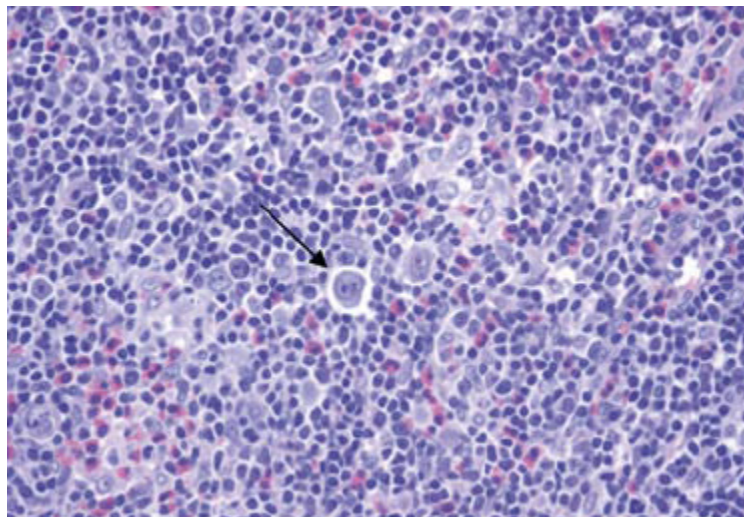


Abbildung 1: Klassisches Hodgkin-Lymphom vom Mischtyp. Der Pfeil zeigt eine Hodgkin-Reed-Sternbergzelle. HE-Färbung, 400:1 (Rosenwald und Küppers 2010)

In der World-Health-Organisation-(WHO)-Klassifikation von 2008 werden Hodgkin-Lymphome anhand ihrer Histologie in klassische Hodgkin-Lymphome (classical hodgkin lymphoma, cHL) und in lymphozytenprädominante Hodgkin-Lymphome (nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma, NLPHL) unterteilt (Tabelle 2). Beide Formen unterscheiden sich histologisch, klinisch und immunologisch. Das cHL wird aufgrund seines histologischen Erscheinungsbildes in weitere vier Subgruppen unterteilt.

Tabelle 2: WHO-Klassifikation (2008). S 3-Leitlinie Hodgkin-Lymphom, www.leitlinienprogramm-onkologie.de

WHO-Klassifikation (2008)		
A. Klassische Hodgkin-Lymphome (cHL)		95%
1	nodulär-sklerosierendes Hodgkin-Lymphom (NSHL)	65%
2	Gemischtzelliges Hodgkin-Lymphom (MCHL)	25%
3	Lymphozytenarmes Hodgkin-Lymphom (LDHL)	1%
4	Lymphozytenreiches Hodgkin-Lymphom (LRHL)	4%
B. Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom (NLPHL)		5%

Nodulär-sklerosierendes Hodgkin-Lymphom (NSHL)

Kollagene Faserbündel, welche von der verbreiterten Lymphknotenkapsel ausgehen, sind histologisch kennzeichnend. Hinzu kommt ein knotiges Infiltrationsmuster, wobei die Tumorknoten ebenfalls durch kräftige Kollagenbänder umschlossen werden. Die Faserbündel imponieren in der Polarisationsmikroskopie doppelbrechend und sind PAS-positiv (wichtig zur Abgrenzung des NSHL vom Mischtyp). Die HRS-Zellen sind eingebettet zwischen Lymphozyten, Histiocyten und eosinophilen Granulozyten. Als besondere Variante der HRS-Zellen findet man häufig Lakunarzellen. Es handelt sich hierbei um Varianten der HRS-Zellen mit viel klarem bis leicht eosinophilem Zytoplasma (Rüdiger 2000). Immunhistochemisch unterscheidet sich das NSHL nicht von den anderen Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms.

Gemischtzelliges Hodgkin-Lymphom (MCHL)

Das MCHL ist durch ein buntes Zellbild charakterisiert. Der Lymphknoten ist diffus mit HRS-Zellen, Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, Neutrophilen, Plasmazellen und Histozyten durchsetzt.

Lymphozytenreiches Hodgkin-Lymphom (LRHL)

Die HRS-Zellen liegen in einem lymphozytenreichem Hintergrund. Die neoplastischen Zellen sind kleiner und ähneln im HE-Schnitt den LP-Zellen des Nodulär lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphoms. Zur genauen Differenzierung ist eine immunhistochemische Untersuchung notwendig. Eosinophile Granulozyten sind nur ganz vereinzelt und außerhalb der Infiltrate nachzuweisen (Abgrenzung zum MCHL).

Lymphozytenarmes Hodgkin-Lymphom (LDHL)

LDHL ist der seltenste Subtyp der klassischen Hodgkin-Lymphome. Im Zellbild zeigt sich eine Depletion der kleinen Lymphozytenformen und eine hohe Anzahl an HRS-Zellen. Beim pleomophen Typ finden sich HRS-Zellen vermischt mit histiozytären und bizarren Spindelzellen (fibrohistiozytärer Typ). In anderen Fällen besteht eine diffuse Fibrosierung des Tumorgewebes bei nur geringer Tumorzellzahl (diffuse Fibrose). Morphologisch können die HRS-Zellen anaplastisch erscheinen. Die differenzialdiagnostische Abgrenzung ist oft schwierig.

Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom (NLPHL)

NLPHL ist eine monoklonale B-Zellneoplasie. Aufgrund seines vom klassischen Hodgkin-Lymphom verschiedenen morphologischen, immunphänotypischen und klinischen Bildes, stellt es eine eigene Entität unter den Hodgkin-Lymphomen dar. Im histologischen Bild zeigt sich ein nodulär-diffuses Bild. Die einzelnen Noduli werden von Lymphozyten, follikulären dendritischen Zellen, Histozyten, Epitheloidzellen und häufig wenigen neoplastischen LP-Zellen (lymphocyte predominant cells, früher L&H Zellen) gebildet. LP-Zellen sind große, unregelmäßig geformte Zellen mit blassem Zytoplasma und gelappten, aufgelockert imponierten Zellkernen mit kleinen Nukleolen. Man findet LP-Zellen vor allem im Zentrum stark vergrößerter Keimzentren.

Immunhistochemisch lässt sich das NLPHL vom klassischen Typ durch Expression von CD20 bei negativer CD30 Reaktion abgrenzen. CD79a und J-Kette als weitere B-Zell-Marker werden in 90% der Fälle, EMA in 50-60% exprimiert; die CD15-Reaktion ist negativ (Stein et al. 2001). Das Begleitinfiltrat ist durch viele kleine B-Lymphozyten charakterisiert. T-Lymphozyten sind CD4 und CD57 positiv (Rüdiger 2000).

2.1.3 Therapie und Prognose

Die Therapie des Hodgkin-Lymphoms erfolgt anhand der klinisch-anatomischen Tumorausbreitung und individueller Risikofaktoren des Patienten. In Deutschland wurde 2013 die neue S3-Leitlinie Hodgkin-Lymphom der Deutschen Gesellschaft für Hämato-Onkologie herausgegeben, die sich streng an die Studienprotokolle der deutschen Hodgkin Studiengruppe (DHSG) anlehnt (www.leitlinienprogramm-onkologie.de). Die DHSG hat vier Risikofaktoren (RF) definiert, anhand derer zusätzlich zur Ann-Arbor-Klassifikation die Einteilung in frühe, intermediäre und fortgeschrittene Stadien vorgenommen wird (Abbildung 2):

- großer Mediastinaltumor (mehr als ein Drittel des maximalen Thoraxquerdurchmessers),
- Extranodalbefall (ohne Milz),
- hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit (bei A-Symptomen ≥ 50 mm/h, bei B-Symptomen ≥ 30 mm/h),
- drei oder mehr befallene Lymphknotenareale.

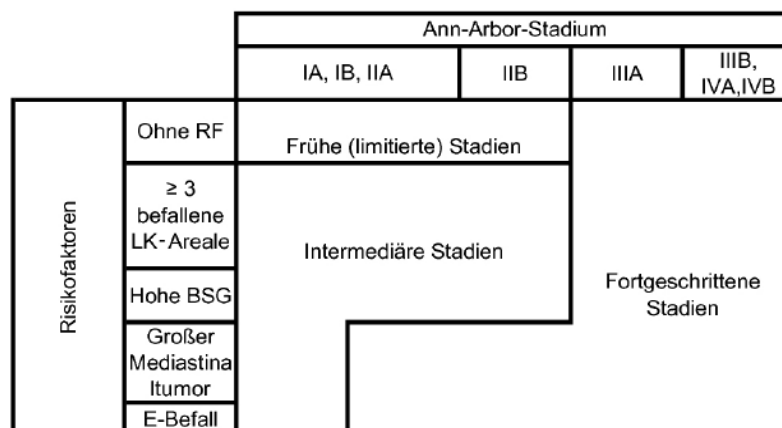


Abbildung 2: Risikofaktoren mit Stadieneinteilung zur Therapieplanung. Einteilung der Deutschen Hodgkin Studiengruppe (DHSG), (www.dgho-onkopedia.de)

Ein frühes Stadium liegt bei den Ann-Arbor-Stadien I–IIA/B ohne die oben genannten Risikofaktoren vor, ein intermediäres Stadium bei den Stadien IA/B und IIA mit den Risikofaktoren 1-4 und bei einem Stadium IIB mit den Risikofaktoren 3 und 4. Das fortgeschrittene Stadium umfasst das Stadium IIB mit den Risikofaktoren 1 und 2 sowie die Stadien III–IVA/B (Abbildung 2). Die Therapie der frühen Stadien umfasst zwei Zyklen ABVD (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin) und eine zusätzliche Strahlentherapie mit 20 Gy im „Involved Field“ (IF)-Areal. Im intermediärem Stadium wird aufgrund einer höheren Effektivität mit 2 Zyklen BEACOPP_{eskaliert} (Bleomycin, Etoposid, Adriablastin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazin, Prednison) und 2 Zyklen ABVD + 20 Gy IF-Radiotherapie therapiert. Bei den fortgeschrittenen Stadien besteht die Therapie aus 8 Zyklen BEACOPP_{eskaliert} mit zusätzlicher Strahlentherapie bei Resttumoren von über 2,5 cm Durchmesser (Abbildung 3).

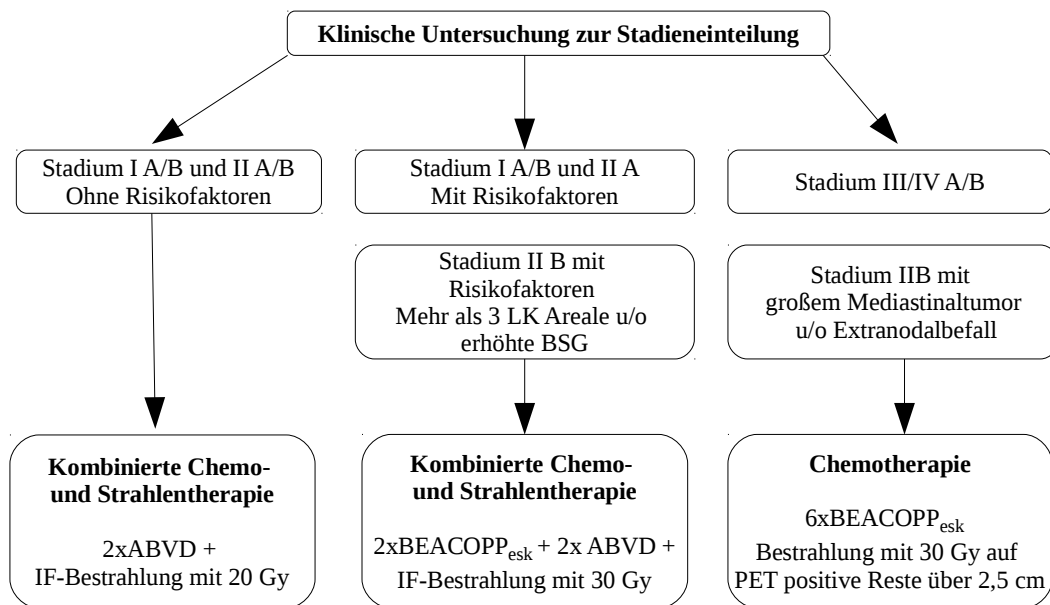


Abbildung 3: Algorithmus für die stadiengerechte Therapie nach S 3-Leitlinie. (Abbildung modifiziert nach www.dgho-onkopedia.de)

Durch die guten diagnostischen Möglichkeiten sowie eine kombinierte Chemo- und Strahlentherapie erreicht man heute selbst in späteren Stadien eine Heilungsrate bis zu 85% (Nagel et al. 2014). Gegenstand gegenwärtiger Forschungen ist die Reduktion therapieassoziiertes Früh- und Spättoxizitäten durch risikoadaptierte Therapiedeescalation, da es sich bei den kurativ behandelten Patienten meist um junge Erwachsene handelt. Häufige Zweitneoplasien sind vor allem akute myeloische Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphome sowie solide Tumore.

2.1.4 Histiogenese und Molekularpathogenese der HRS-Zellen

Hodgkin-Reed-Sternbergzellen leiten sich von B-Lymphozyten ab. Der Nachweis gelang erst durch die Entwicklung sensitiver Verfahren zur Isolation einzelner HRS-Zellen, durch die Mikrodissektionstechnik sowie die Etablierung sensitiver Methoden der Polymerasekettenreaktion zur Detektion umgelagerter IgV-Gene (Küppers et al. 1994; Bräuninger et al. 2006).

Die Pathogenese maligner Lymphome der B-Zell-Reihe ist eng mit der Keimzentrumsreaktion verknüpft. Diese dient den B-Zellen zur Affinitätsreifung der variablen Region der Immunglobulin-

(Ig)-Gene durch somatische Hypermutation sowie den Ig-Klassenwechsel nach Antigenkontakt. Es kommt zur Expansion des entsprechenden B-Zell-Klons mit fortlaufenden Mutations- und Rekombinationsereignissen des Genoms. Beides zusammen stellt ein hohes Risiko für die Entstehung onkogener Läsionen dar. Fehler während der somatischen Hypermutation und des Ig-Klassenwechsels gelten als wichtige Mechanismen zur Aktivierung von Protoonkogenen in Onkogene durch Mutationen wie etwa chromosomale Translokationen oder Nukleotid austausch (Mathas et al. 2009).

Die HRS-Zellen des cHL zeigen in etwa 25% der Fälle in ihren IgV-Genen inaktivierende Mutationen (Stopp-Codons, Deletionen, Insertionen), die zu einer Verschiebung des Leserasters führen (Bräuninger et al. 2006). Normalerweise werden B-Zellen ohne B-Zellrezeptor (BCR) durch Apoptose zerstört. Somit deuten Mutationen in HRS-Zellen im Rahmen der somatischen Hypermutation auf eine Abstammung von präapoptotischen GC-B-Zellen hin (Kanzler et al. 1996; Bräuninger et al. 2006). HRS-Zellen haben den B-Zell-Phänotyp jedoch verloren. Trotz ihrer B-Zell-Abstammung, exprimieren sie kaum B-Zell-spezifische Proteine (Schwering et al. 2003). Ebenso fehlen zahlreiche B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren. Ursache könnte eine fehlende Ig-Transkription (Stein et al. 2001; Torlakovic et al. 2001) oder epigenetische Mechanismen wie die Methylierung der Promotoren der Ig-Gene sein (Ushmorov et al. 2004). Die Funktion des Verlustes der B-Zell-Identität in der Pathogenese des cHL ist derzeit noch unklar.

Für die Pathogenese und das Überleben der HRS-Zellen sind deregulierte Signaltransduktionswege essentiell. Da B-Zellen ohne funktionsfähigen BCR nicht überlebensfähig sind, erfordert der Verlust des BCR in den HRS-Zellen eine starke Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und Signalwege um eine Apoptose der Zelle zu verhindern. Vorrangig sind die IKK/NF- κ B-, JAK/STAT- und MAPK/AP-1-Signalwege zu nennen. Alle drei Systeme sind in HRS-Zellen dauerhaft aktiv und führen zu einer konstitutiven NF- κ B-Aktivität.

IKK/NF- κ B-Signalweg

NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, Nuklear-factor-kappa B) ist ein Transkriptionsfaktor mit großer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation sowie im Rahmen der Apoptose. Er nimmt eine zentrale Rolle innerhalb der Entzündungsreaktion ein. Außerdem erfüllt NF- κ B wichtige Funktionen im Bereich der Entwicklung des Immunsystems und der lymphatischen Organe. Es handelt sich dabei nicht um ein einzelnes Protein, sondern um fünf bzw. sieben verschiedene Proteine, deren gemeinsames Kennzeichen eine Domäne von etwa 300 Aminosäuren ist, die sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD). Sie ist verantwortlich für die Interaktion mit anderen Proteinen, die Bindung an DNS und die Kerntranslokation (Hayden und Ghosh 2004). Jeweils zwei Untereinheiten können in unterschiedlichen Kombinationen aneinander binden und somit Dimere bilden (Abbildung 4). Die drei Rel- Proteine werden direkt als reife Proteine synthetisiert, während p50 und p52 durch Proteolyse aus ihren Vorläufern p105 bzw. p100 hergestellt werden.

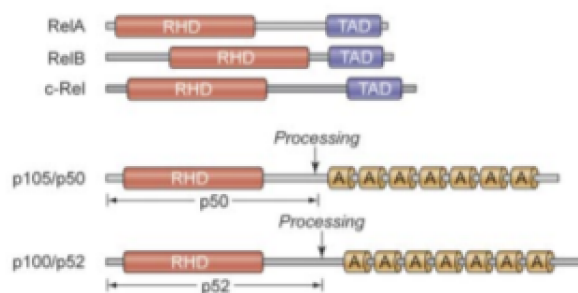


Abbildung 4: NF- κ B Untereinheiten Schematische Darstellung der 5 Mitglieder der NF- κ B Familie (Jost und Ruland 2007)

- NF- κ B-Transkriptionsfaktoren:
1. RelA (p65)
 2. RelB
 3. c-Rel
 4. NF- κ B1 (p50 bzw. p105)
 5. NF- κ B2 (p52 bzw. p100)

NF- κ B kann an ein spezifisches DNA-Motiv von etwa zehn Basenpaaren, das sogenannte κ B-Motiv, binden. Im nicht-stimulierten Zustand befinden sich die NF- κ B-Dimere inaktiv im Zytoplasma. Dabei sind sie entweder an ihren Inhibitor I κ B α gebunden oder liegen als nicht aktive Vorläufer vor. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt im wesentlichen über zwei Signalwege, den klassischen und den alternativen NF- κ B-Aktivierungsweg. Beide Wege basieren auf der Aktivierung des IK-Komplexes (IKK) nach entsprechender Stimulation. Dieser Serin/Threonin-Kinase Komplex besteht aus 2 Untereinheiten mit katalytischer Funktion, IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2) sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO (NF- κ B essentieller Modulator).

Klassischer Aktivierungsweg

Die Stimulation erfolgt durch die TNF-Rezeptoren CD40 und CD30 mittels Liganden, durch Zellen des Mikromilieus oder endogene LMP1-Signalübermittlung (in EBV-positiven HRS-Zellen). Es kommt zur Aktivierung des IKK-Komplexes. Die IKK phosphorylieren anschließend die NF- κ B-Inhibitoren I κ B α und I κ B ϵ (an Serin-32 und Serin-36), die daraufhin proteasomal abgebaut werden. Die freien NF- κ B-Dimere (vor allem das p50/RelA-Heterodimer) translozieren in den Zellkern, binden an spezifische DNS-Motive und aktivieren die Gentranskription zahlreicher entzündungsfördernder Zytokine (IL6, IL13, TNF α) sowie antiapoptotischer Faktoren (Hinz et al. 2002, Jost und Ruland 2007, Hayden und Ghosh 2004). Die molekularen Ursachen für die NF- κ B-Aktivierung sind bisher nur teilweise verstanden. Diskutiert werden verschiedene Mechanismen der Ligandenstimulation der TNF-Rezeptoren CD30 und CD40 durch Zellen des Mikromilieus oder die endogene LMP1-Signalübermittlung bei EBV-positiven HRS-Zellen. Das Mikromilieu der HRS-Zellen wird vermutlich durch die Sekretion zahlreicher Zytokine und Chemokine aktiviert (Jost und Ruland 2007, Küppers et al. 2009; Abbildung 5).

Alternativer Aktivierungsweg

Die Aktivierung erfolgt durch TNF-Rezeptorfaktoren und führt zur Stimulation der NF- κ B-induzierende Kinase (NIK-Kinase, diese kann auch den klassischen Signalweg aktivieren). Daraufhin wird der IKK α -Komplex aktiviert. Es folgt die proteolytische Aufspaltung (Prozessierung) von p100 zu p52, welches nun als aktives p52/RelB Heterodimer zur Aktivierung der Gentranskription in den Zellkern transloziert (Küppers et al. 2009; Abbildung 5).

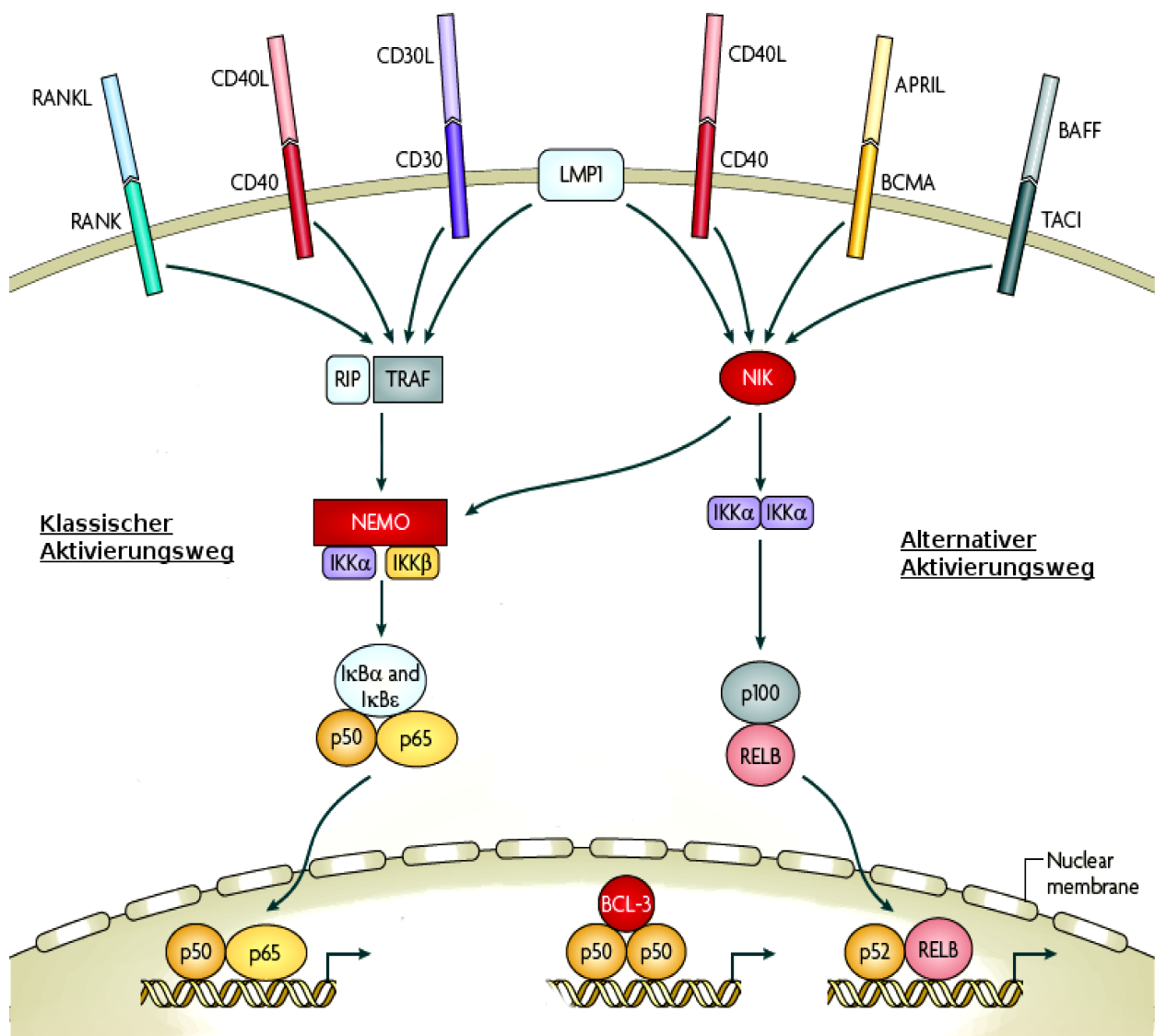


Abbildung 5: NF-κB-Aktivierungswege.

Klassischer Aktivierungsweg: Verschiedene Stimuli (u.a. Zytokine) aktivieren den IK-Komplex. Es kommt zur Phosphorylierung der IκB-Proteine, es folgt die proteolytische Degradation der IκB mit Freisetzung der NF-κB-Dimere in das Zytoplasma und Translokation in den Zellkern zur Aktivierung der Gentranskription.

Alternativer Aktivierungsweg: IKKα phosphoryliert den p100-Vorläufer der NF-κB/p52 Untereinheit, dieser Aktivierungsweg benötigt nicht die regulatorische Untereinheit NEMO.

LMP1 kann beide Signalwege aktivieren.

(nach Küppers et al. 2009)

JAK/STAT-Signalweg

Die intrazelluläre Zytokinstimulation erfolgt über den JAK/STAT-Signalweg. STAT-Transkriptionsfaktoren liegen normalerweise inaktiv im Zytoplasma vor. Zytokinsignale führen zur Aktivierung von Januskinasen (JAK). Daraufhin erfolgt die Phosphorylierung der STAT-Proteine. Diese dimerisieren, wandern in den Zellkern und aktivieren ihre Zielgene (O'Shea und Murray 2008). In HRS-Zellen sind verschiedene STAT-Proteine (STAT3, STAT5, STAT6) konstitutiv nachweisbar (Hinz et al. 2002). Eine Blockade der STAT-Aktivität beeinträchtigt das Wachstum der HRS-Zellen und induziert so Apoptose (Holtrick et al. 2005).

MAPK/AP-1-Signalweg

AP-1 ist ebenfalls aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt und wird schnell und kurzzeitig als Antwort auf extrazelluläre Signale hin aktiviert. Im Gegensatz zu einer solchen Kurzzeitaktivierung, ist AP-1 in HRS-Zellen grundlegend aktiv. Eine Blockade der MAPK/AP-1-Aktivität induziert in HRS-Zellen einen Wachstumsarrest. Trotz guter Charakterisierungen der einzelnen Signalkaskaden, gibt es derzeit nur verhältnismäßig wenige Erkenntnisse über die Vernetzung der einzelnen Signalwege miteinander (Mathas et al. 2002).

2.1.5 Bedeutung einer Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion

Das Epstein-Barr-Virus ist weltweit verbreitet. Über 90% der Menschen sind mit dem γ -Herpesvirus infiziert (Küppers 2003). Das Virus wird vorwiegend durch Speichel übertragen. Die Primärinfektion erfolgt meist im Kindesalter und verläuft normalerweise asymptomatisch. Bei einer Infektion im jungen Erwachsenenalter kann es zur Ausbildung der infektiösen Mononukleose kommen. Kennzeichnend sind Schwellungen der Lymphknoten und Tonsillen, verbunden mit einer Monozytose im Blutbild. Dabei handelt es sich um infizierte B-Zellen und T-Lymphozyten. Im Anschluss an die Krankheit verbleibt das Virus latent in B-Lymphozyten (Kutok und Wang 2006). Patienten nach einer infektiösen Mononukleose haben ein signifikant höheres Risiko, später an einem cHL zu erkranken (Rosdahl et al. 1974). In der westlichen Welt sind in ca. 40% aller cHL-Fälle die HRS-Zellen mit dem EBV infiziert. Bei den meisten Fällen handelt es sich um MCHL und LDHL, weniger um NSCHL und LRCHL, seltenst um NLPHL (Küppers 2009). In den HRS-Zellen liegt das Virusgenom in klonaler Form vor. Dies bestätigt die Theorie, dass bereits Vorläuferzellen

des HL-Klons infiziert waren. Man unterscheidet zwei Phasen der EBV-Infektion: Die lytische und die latente Phase. Primär infiziert das Virus den B-Lymphozyten. Die lineare DNA wird zum Zellkern transportiert und dort schließen sich die Enden zu einem ringförmigen Genom (Episom) zusammen. Das Episom verbleibt meist als extrachromosomale genetische Information im Zellkern. Auf die primäre Infektion der B-Zellen folgt die schnelle Vermehrung der infizierten Zellen. Durch Zelllyse werden die Viren dann freigesetzt und infizieren weitere B-Zellen (lytische Phase). Das Immunsystem reagiert auf die Infektion mit einer EBV-spezifischen zytotoxischen-T-Zell-Reaktion (natürliche Killer-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen). Die Vermehrung der infizierten Zellen wird dadurch gestoppt. Während dieser latenten Infektion verbleibt das Virus lebenslang in den infizierten B-Zellen.

EBV-positive HRS-Zellen prägen in der Regel EBNA-1, LMP1 und LMP2a aus. LMP1 ist ein antiapoptotisches Membranprotein und essentiell für die Etablierung des Latenzzyklus in B-Zellen. Die Signaltransduktion von LMP1 ist ähnlich der von CD40- und B-Zellrezeptoren. LMP1 kann beide NF- κ B-Signalwege unabhängig von einer Ligandenstimulation aktivieren (Nagel et al. 2014). LMP2a ist ebenfalls ein Membranprotein. Es ist in der Lage, die Anwesenheit eines BCR zu imitieren (Mimikry). Dies könnte die Erklärung für das Überleben BCR-defizienter HRS-Vorläuferzellen im Keimzentrum sein (Caldwell et al. 1998; Bechtel et al. 2005; Mancao und Hammerschmidt 2007). Zwei weitere virale Genprodukte sind EBER-1 und -2 (Epstein-Barr encoded RNA 1 und 2). Es handelt sich um zwei nicht-translatierte, kleine virale RNA-Moleküle (165 bzw. 169 Basen lang). Sie liegen zahlreich im Zellkern vor (bis 106 Kopien pro Zelle). Die genaue Funktion ist bislang unklar, für Proteine kodieren sie nicht. Da in allen Latenzformen der EBV-Infektion große Mengen an EBER-Molekülen vorkommen, eignet sich diese RNA als Zielnukleinsäure („Template“) für eine in-situ-Hybridation zum Virusnachweis als diagnostisches Mittel (EBER-ISH).

2.2 Das TNFAIP₃-Gen

2.2.1 Genstruktur und Expression

Das TNFAIP₃-Gen codiert für das zytoplasmatische Protein A20 mit 790 Aminosäuren. Es befindet sich auf Chromosom 6q23, ist 4400 bp lang und hat ein Molekulargewicht von 90 kDa. Das A20-Protein besitzt zwei funktionelle Domänen. N-Terminal befindet sich eine Eierstocktumor-Domäne (OTU, ovarian-tumor-like) mit 10 β -Strängen und 10 α -Helices. C-Terminal findet man 7 Zinkfinger (ZnF, Hymowitz et al. 2010; Abbildung 6).

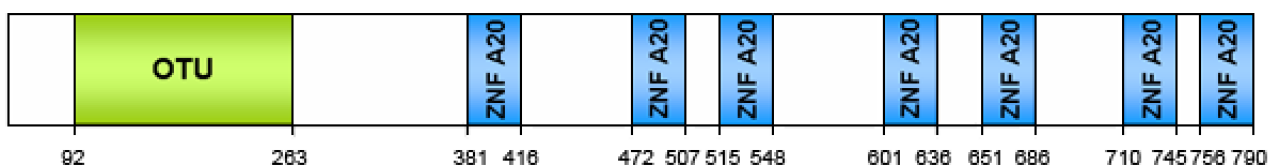


Abbildung 6: TNFAIP₃-Genstruktur. Blau dargestellt sind die 7 Zinkfinger, grün die OTU-Domäne (www.atlasgeneticsoncology.org).

Die Expression des Proteins erfolgt in vielen Organen, induziert durch verschiedene Stimuli, wie Interleukin-1 β (IL-1 β), TNF- α , Epstein-Barr virus-latent membrane proteine 1 (LMP1) oder proinflammatorische Zytokine. A20 findet sich konstitutiv in ruhenden peripheren T-Zellen. Die T-Zell-Aktivierung führt zur Suppression der A20-Expression. TNF induziert keine Expression des Proteins in aktivierten T-Zellen, obwohl diese TNF-Rezeptoren exprimieren. In B-Zellen findet sich keine konstitutive A20 Expression (Zahng et al. 2012).

2.2.2 A20 - Biologische Effekte

A20 ist ein zytoprotektives, antiapoptotisches Protein. Diese Eigenschaften sind jedoch kein generelles Merkmal, es schützt nur einige bestimmte Zelltypen vor Apoptose-induzierenden Stoffen. Die A20-Induktion nach viraler Infektion scheint infizierte Zellen vor einer p53-induzierten Apoptose zu schützen (Verstrepen et al. 2010). Die genauen Mechanismen, wie A20 die Apoptose inhibiert, sind unklar. Überexpressions-Experimente zeigten, dass die C-terminalen ZnF unbedingt notwendig sind für die antiapoptotische Wirkung durch TNF-Stimulation. A20 inhibiert nicht nur TNF-induzierte Apoptose, sondern in einigen Zelllinien auch TNF-induzierte Nekrose (in Fibrosarkomzelllinie L929, Verstrepen et al. 2010). Die Mechanismen der anti-nekrotischen

Funktion sind derzeit ebenfalls noch unklar.

2.2.3 A20 - NF- κ B-Inhibitor

A20 inhibiert die TNF vermittelte NF- κ B-Aktivität (Wertz et al. 2004). Der molekulare Mechanismus der NF- κ B-Inhibition durch A20 wurde von Wu et al. 2006 bzw. Ea et al. 2006 aufgeklärt. Es erfordert die Aktivierung des IKK-Komplexes durch TNF-Rezeptor-stimulierte Polyubiquitinierung des Rezeptor-interagierenden Faktors RIP1 an Lysin 63-Resten (K63) dieses Proteins. Die regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes, die Kinase IKK- γ (NEMO), bindet spezifisch diese Proteinmodifikation des RIP1-Proteins und aktiviert infolgedessen den IKK-Komplex. A20 entfernt diese K63-Polyubiquitinketten von RIP1 und fügt Polyubiquitinketten an Lysin 48-Reste (K48) des RIP1-Proteins, was zur Degradierung dieses Faktors durch das Proteasom führt (Wertz et al. 2004, Malynn, Ma 2009).

2.2.4 A20 als Tumorsuppressor

Fast jeder Tumor geht mit einer chronischen NF- κ B-Aktivierung einher. Persistierende NF- κ B-Aktivität in Tumoren korreliert mit einer höheren Inzidenz an Metastasen, schnellerer Krankheitsprogression, höherer Rezidivrate, schlechterem Überleben und Therapieresistenz. NF- κ B-Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von TNF α , IL-1, IL-6. Außerdem reguliert NF- κ B Gene, welche Proteine codieren, die Apoptose ermöglichen oder die replikative Aktivität limitieren (z. B. Cyclin D1, Telomerase). NF- κ B verstärkt die Gewebeinvasion und Metastasierung unter anderem durch die Induktion der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2), MMP9, Cathepsin B, Cathepsin 2 (Hymowitz S, Wertz I. 2010). In diesem Zusammenhang wurden in A20 inaktivierende Mutationen und/oder Deletionen in primären mediastinalen B-Zell Lymphomen, in einem Teil der Diffus großzelligen B-Zell Lymphomen, MALT-Lymphomen und im klassischen Hodgkin Lymphom gefunden. Diese Lymphome zeigen alle eine konstitutive Ausprägung von NF- κ B und der Verlust von A20 führt zu einem verbesserten Überleben der Lymphomzellen (Compagno et al 2009; Honma et al. 2008; Kato et al. 2009; Schmitz et al. 2009).

2.2.5 Bedeutung von TNFAIP₃-Mutationen in Lymphomen

Lymphome sind die 5. häufigsten Malignome des Menschen. Die Lebenszeitprävalenz beträgt 2%. Schmitz et al. 2009 zeigten, dass 40% der klassischen Hodgkin-Lymphome biallelische Mutationen von A20 aufweisen. A20 ist inaktiviert durch Deletion, Promotormethylierung, frame-shift-mutationen und/oder non-sense-Mutationen, welche in Translokationen und Punktmutationen enden. Das Protein fungiert als Negativregulator von NF-κB und inhibiert die Signaltransduktion von den RIP- und TRAF-Proteinen zu den IKK-Kinasen, die für die NF-κB-Aktivierung essentiell sind. TNFAIP₃-Mutationen finden sich vermehrt in EBV-negativen cHL, sodass eine EBV-Infektion und die Inaktivierung von A20 möglicherweise alternative pathogenetische Mechanismen darstellen (Kato et al. 2009, Schmitz et al. 2009).

2.2.6 A20-Antikörper

Zur einfacheren und schnelleren Diagnostik eignen sich Antikörper. Im Jahr 2012 gelang es der Forschergruppe um Hirsch et al. einen monoklonalen anti-TNFIP₃ (A20) Antikörper (Ber-A20) zu entwickeln. Somit ist es möglich durch einfache Immunhistochemie unmutierte A20 Proteine in Gewebematerial verschiedenster Art zu detektieren. Der ber-A20 Antikörper bindet an Epitope des c-terminalen Endes von A20. So werden nur A20-Proteine der vollen Länge detektiert. Ein Verlust des Proteins durch Frameshift-Mutationen, Nonsense-Mutationen oder Hypermethylierung der A20-Promotorregion sowie Deletionen im Gen kann mit dem Antikörper entdeckt werden (Hirsch et al. 2012).

3. Zielstellung der Arbeit

In den vergangenen Jahren wurden in zahlreichen Studien, u.a. bezüglich des klassischen Hodgkin-Lymphoms, immer wieder Mutationen im TNFAIP₃-Gen beschrieben. Schmitz et al. entdeckten als eine der ersten Forschungsgruppe das signifikant häufigere Vorkommen von Mutationen im TNFAIP₃-Gen und damit seine Funktion als Tumorsuppressorgen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die von Schmitz et al. aufgestellte These des Zusammenhangs zwischen dem Vorkommen von TNFAIP₃-Mutationen und dem Auftreten des klassischen Hodgkin-Lymphoms zu überprüfen. Dabei wurden differenziert die einzelnen Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms analysiert um eventuelle pathogenetische Unterschiede zu entdecken.

Bezüglich der unterschiedlichen Pathogenesewege in der Entstehung eines Hodgkin-Lymphoms wurden alle Proben auf eine Infektion mit dem EB-Virus hin untersucht. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Mutation im TNFAIP₃-Gen und eine latente EBV-Infektion im Zusammenhang stehen oder ob es Hinweise auf unterschiedliche Pathogenesewege in der Entstehung eines Hodgkin-Lymphoms gibt.

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene A20-Antikörper zur Diagnostik in der Forschung entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde am vorliegenden Material die Sensitivität und Spezifität des A20-Antikörpers bezüglich der Detektion eines A20-Proteinverlustes geprüft werden, welcher im Rahmen der Routinediagnostik eingesetzt werden könnte.

Mit der vorliegenden Studie wurden zudem erstmals epidemiologische Daten zum Hodgkin-Lymphom in der Region Jena erhoben und ausgewertet.

4. Material und Methoden

4.1 Epidemiologie

4.1.1 Kollektiv der epidemiologischen Untersuchungen

Für die epidemiologische Untersuchung wurden alle am Institut für Pathologie in Jena diagnostizierten Hodgkin-Lymphom Fälle in den Jahren 2000 bis 2008 analysiert (insgesamt 103 Fälle). Die Recherche erfolgte über die Datenbank des Institutes. Als Referenzdatenbanken dienten die Daten der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) sowie internationale Daten über die Datenbank "Globocan" der International Agency for Research on Cancer (IARC), einer Behörde der Weltgesundheitsorganisation WHO (<http://globocan.iarc.fr/>).

4.1.2 Statistische Analyse

Die Analyse der statistischen Daten erfolgte hinsichtlich des Erkrankungsalters, der Geschlechtsverteilung in Bezug auf die unterschiedlichen histologischen Subtypen. Die statistische Auswertung wurde mit dem Softwareprogramm IBM SPSS Statistics durchgeführt. Zur Anwendung kam der Fisher's exact Test.

4.2 Mutationsanalyse

4.2.1 Material der Mutationsanalyse

4.2.1.1 Kollektiv

Das Untersuchungsmaterial für die Mutationsanalyse umfasst 37 Proben des Hodgkin-Lymphoms aus dem diagnostischen Routineeingang des Instituts für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena (2000-2008). Das Material wurde stichprobenartig nach histologischen Qualitätseigenschaften erfasst. Hierbei wurde vor allem auf die Qualität und Quantität des Paraffinmaterials geachtet, sowie das Vorhandensein ausreichender HRS-Zellen im Material. Es erfolgte die morphologische und immunhistochemisch Subtypenklassifikation der Proben anhand der WHO-Klassifikation von 2008. Daraus ergab sich folgende Verteilung (Tabelle 3).

Für die vorliegende Studie wurde ein positives Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikum Jena eingeholt (Bearbeitungs-Nr.: 4342-02/15).

Tabelle 3: Kollektiv Mutationsanalyse

NSCHL	MCHL	LDHL	LRHL	nosHL	Gesamt
18	13	1	1	4	37

4.2.1.2 Enzyme und Chemikalien

10 x PCR-Puffer	10 x Reactionbuffer S PeQlab Lot. 020110, Erlangen, Deutschland
Agarose	Serva 11404, Heidelberg, Deutschland
dNTP-Mix	Fermentas #R0241 Lot. 00040319 2mM/1ml, St. Leon-Rot, Deutschland
EDTA	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gel-Red	GelRed™ Nucleic Acid Stain, Biotrend GmbH, Köln, Deutschland
Hot Taq DNA polymerase	PeQlab, Erlangen, Deutschland
Längenmarker	Fermentas Gene Ruler 100bp DNA Ladder Lot.00039881, St. Leon-Rot, Deutschland
Loading Dye	Fermentas #R0611 6xDNA Loading Dye 1ml Lot. 00043363, St. Leon-Rot, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-Base	EMD Chemicals, San Diego, CA, USA
Tween	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA

4.2.1.3 Geräte

0.2 ml flexi-PCR-tubes	Kisker Biotech, Steinfurth, Deutschland
0.5/1.5/2.0 ml micro tubes	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
10/100/200/1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Drucker	Sony Digital Graphic printer UP-D897
Spannungsquelle, Gelkammer	Electrophoresis Power Supply EV231 PeQlab
Hotplate/Stirrer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Imager Flourchem® FC2	Alpha Innotec
Thermo-Fast 96 PCR Plates	PeQlabErlangen, Deutschland
Mikrowellenherd	Bomann, Deutschland
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	PeQlab, Erlangen, Deutschland
PCR-Thermocycler	PeQlab, Erlangen, Deutschland
PH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten	PeQlab, Erlangen, Deutschland
Schnittmikrotom	Autocut, Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland
Scout Pro SPU402 Analysewaage	Ohaus, Parsipanny, IN, USA
TELAVAL 31 inverse microscope	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge Universal 320R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

4.2.1.4 Kommerzielle Analysesysteme

DNA Clean&Concentrator 5-KIT	Zymo Research, Cat.No. D4003, Orange, USA
DNA-Extraktions-KIT QIAamp®DNA	QIAGEN GmH, Hilden, Germany
FFPE Tissue KIT (50) Cat.No. 56404	
DNA-Extraktions-KIT QIAamp®DNA	QIAGEN GmH, Hilden, Germany
Mini KIT (50), Cat.No. 51304	
E.Z.N.A.® FFPE DNA Isolation Kit D3399-01	OMEGA bio tek, Norcross, USA

4.2.1.5 Primer

Anhand publizierter Sequenzen (Schmitz et al. 2009) wurden folgende Primer für Exon 2, 4-5, 7 und 9 des TNFAIP3-Gens zur semi-nested-PCR ausgewählt (sämtliche Primer Firma Sigma-Aldrich, München, Deutschland):

Name	Sequenz 5' > 3', Verwendung
A20E2exF	5' TGCCTACAGATCAGGGTAATGACAAG 3' Exon 2 (externe PCR, forward)
A20E2intF	5' GTTTCCTGCAGGCAGCTATAGAGG 3' Exon 2 (interne PCR, forward)
A20E2R	5' AGCTTCATGAATGGGGATCCAGCAG 3' Exon 2 (externe und interne PCR, reverse)

Name	Sequenz 5' > 3', Verwendung
A20E4-5exF	5' TGAATAATTGTAGAGTGATGTCAGAATGAC 3' Exon 4/5 (externe PCR, forward)
A20E4-5intF	5' TACAGGGAGTACAGGATACATTCAAGC 3' Exon 4/5 (interne PCR, forward)
A20E4-5R	5' GGAAAACCCTGATGTTTCAGTGTCTAG 3' Exon 4/5 (interne und externe PCR, reverse)
Name	Sequenz 5' > 3', Verwendung
A20E7.1exF	5' GGTCTACAATTCTTGCCATAATCCAC 3' Exon 7 (externe PCR, forward)
A20E7.1intF	5' GAGCTAATGATGTAAAATCTTGTGTGTG 3' Exon 7 (interne PCR, forward)
A20E7.1R	5' CAAAATCCGTTGTGCTGCACATTCAG 3' Exon 7 (interne und externe PCR, reverse)
A20E7.2Fa	5' CTCTCGGGGAGAAGCCTATGAGC 3' Exon 7 (interne und externe PCR, forward)
A20E7.2intR	5' GAACAAAACCCCTTCTGGACAGCAG 3' Exon 7 (interne PCR, reverse)

Name	Sequenz 5' > 3', Verwendung
A20E9exF	5' GTAGACTCCACACTCTCCAATGAG 3' Exon 9 (externe PCR, forward)
A20E9intF	5' GTGCTCTCCCTAAGAAATGTGAGC 3' Exon 9 (interne PCR, forward)
A20E9R	5' GGGTTACCAAACCTGAGCATCGTGC 3' Exon 9 (interne und externe PCR, reverse)

4.2.1.6 Puffer-Rezeptur

TAE-Puffer:	242 g Tris Base
	57.1 ml Eisessig
	100 ml 0.5 M EDTA (pH=8.0)

4.2.1.7 Software

BLAST Basic local alignment search tool	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Finch-TV	http://www.geospiza.com
Microsoft Office Word 2003	http://www.microsoft.com
Microsoft Office Excel 2003	http://www.microsoft.com
OpenOffice.org 3.2	http://openoffice.com
Software package IBM SPSS 22.0	Chicago, USA

4.2.1.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes IBM SPSS Statistics for windows unter Verwendung des Chi-Square Tests und des Fisher's exact test.

4.2.2 Methoden der Mutationsanalyse

4.2.2.1 HE-Schnitte

Vor jeder DNA-Extraktion wurden je Probe jeweils 3 Leerschnitte und ein Hämatoxylin-Eosin-Schnitt (HE-Schnitt) angefertigt, um eine erneute Reevaluierung des histologischen Subtypes durchzuführen. Es wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms Paraffinschnitte von ca. 5 µm Dicke hergestellt und anschließend nach folgendem Protokoll gefärbt.

Die Entparaffinierung erfolgte mit Xylol für 20 Minuten und anschließend 2 Minuten. Daraufhin wurde das Material zweimal kurz in 100% und 96% Ethanol, sowie jeweils einmal in 70% und 50% Ethanol getaucht und nachfolgend dreimal mit Wasser gespült. Es erfolgte die Inkubation mit Hämatoxylin für 20 Minuten, nach erneutem Spülen mit Leitungswasser, ruhte das Material 15 Minuten im Leitungswasser. Daraufhin wurde es 3 Minuten in Eosin gefärbt, dann kurz einmal in 70% sowie jeweils zweimal in 96% und 100% Ethanol eingetaucht (aufsteigende Alkoholreihe). Im Anschluß wurden die Proben noch 2 Minuten in eine 1:1-Mischung aus 100% Ethanol und Xylol eingetaucht. Abschließend folgte das Eindecken mit Pertex und einem Deckglas.

4.2.2.2 DNA-Extraktion

DNA-Extraktion mittels QIAamp®DNA FFPE Tissue KIT (50), Cat.No. 56404, Qiagen und QIAamp®DNA Mini KIT (50), Cat.No. 51304, Qiagen

Zur DNA-Extraktion wurden 10 µm dünne Schnitte in ein Eppendorfröhrchen geschnitten und mit Xylol 2 Minuten bei 13300 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Xylolüberstand abpipettiert und der Vorgang wiederholt. Zur Entfernung des Xylols, das die PCR inhibieren kann, wurde 100% Ethanol zugegeben. Nach dem erneuten Zentrifugieren (2 min bei 13300 U/min, bei Raumtemperatur), Abpipettieren des Ethanolüberstandes und Trocknen der Proben, erfolgte die Proteinase-K-Lyse mittels DNA-Extraktions-KIT (QIAamp®DNA FFPE Tissue KIT;

QIAamp®DNA Mini KIT). Die Extraktion erfolgte laut Herstelleranweisung. Dazu wurden die Proben in 180 µL ATL-Puffer gelöst und mit Zusatz von 20 µL Proteinase K bei 56°C über Nacht inkubiert. Nach vollständiger Lyse des Gewebes folgte eine weitere Inkubationszeit von 1 Stunde bei 90°C. Nach dem Hinzufügen von 200 µl AL-Puffer sowie Zugabe von 200 µl Ethanol wurde das Gemisch auf eine Qiagen-Extraktionssäule pipettiert. Diese besteht im Wesentlichen aus Silikat, um die DNA zu binden. Bei 8000 rpm wurde die Extraktionssäule und das dazugehörige 2 ml Auffanggefäß für eine Minute zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde gewechselt und das abzentrifugierte Eluat verworfen. Um eventuell vorhandene Verunreinigungen zu entfernen, wurden 500 µl Waschpuffer AW 1 auf die Säule pipettiert, für eine Minute bei 8000 U/min zentrifugiert und das Auffanggefäß gewechselt. Dieser Schritt wurde mit 500 µl Waschpuffer AW2 wiederholt, danach wurde zusätzlich 3 Minuten bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Die Extraktionssäule wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die gebundene DNA wurde durch Zugabe von 25 µl Elutionspuffer gelöst und bei 8000 U/min für eine Minute zentrifugiert.

DNA-Extraktion mittels E.Z.N.A.® FFPE DNA Isolation Kit D3399-01 OMEGA bio tek

Zur DNA-Extraktion wurden 10 µm dünne Schnitte in ein Eppendorfröhrchen geschnitten und mit 400 µl FTL Puffer laut Herstellerangaben versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 90°C für 15 Minuten und für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (15 sec. vortexen) inkubierten die Proben über Nacht bei 55°C. Anschließend wurden 460 µl BL-Puffer und 500 µl 100% Ethanol hinzugefügt. 100 µl Equilibrationspuffer wurden auf das MicroElute DNA Auffanggefäß (rosa Säule) gegeben und 1 Minute bei 10000 U/min zentrifugiert. Die Probe wurde auf die Säule überführt und erneut 1 Minute zur DNA-Bindung zentrifugiert (10000 U/min). In einem neuem Auffanggefäß wurden 500 µl HB-Puffer auf die Säule gegeben (Zentrifugation 1 Minute, 10000 U/min). Darauf folgend wurden wiederum jeweils in einem neuem Auffanggefäß, 700 µl Wash-Puffer hinzugefügt und ebenfalls zentrifugiert (1 Minute, 10000 U/min). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Es folgte die vollständige Trocknung der Säule (Zentrifugation bei maximaler Umdrehung, 3 Minuten bei Raumtemperatur ruhen lassen). Anschließend wurden 20 µl -100 µl Elutionspuffer auf 70°C erwärmt, auf die Säule gegeben und 1 Minute bei maximaler Umdrehung zentrifugiert.

4.2.2.3 semi-nested Polymerase-Kettenreaktion (semi-nested PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion lassen sich DNA-Abschnitte in-vitro amplifizieren. Als Ausgangspunkt für die DNA-Polymerase dienen hierbei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer). Die genomischen DNA-Doppelstränge werden zuerst im Thermocycler auf 95°C erhitzt und dabei voneinander getrennt (Denaturierung). Im nächsten Schritt wird die Temperatur gesenkt. Die spezifischen Primer binden nur an die Stellen des DNA-Templates über Wasserstoff-Brücken, deren komplementäre Sequenz sie selbst tragen (Annealing). Je schneller dieser Abkühlungsvorgang stattfindet, umso eher bleibt die DNA einzelsträngig. Die Annealing-Temperatur wurde abhängig vom GC-Gehalt und der Länge der Primersequenz berechnet und erfolgte nach Herstellerangaben. (Berechnung der Annealing-Temperatur nach der Formel $T_m = 4(C+G)+2(A+T)$.) Es folgt der Synthese-Schritt. Die Oligonukleotide werden von einer thermostabilen taq-DNA-Polymerase bei 72°C verlängert (Elongation), sodass erneut ein Doppelstrang mit der gesuchten Sequenz vorliegt. Dieser Doppelstrang wird wiederum denaturiert und im nächsten Schritt wieder dupliziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine semi-nested PCR durchgeführt. Dazu werden zwei PCR-Reaktionen nacheinander geschaltet. Ein Anteil des PCR-Produktes aus der ersten Amplifikation (externe PCR) dient als Matrize für die zweite (interne) PCR. Hierbei wird durch ein zweites Primerpaar, das an Sequenzbereiche innerhalb dieser Matrize bindet (nested primer), ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert. Der Vorteil der semi-nested PCR gegenüber der Standard-PCR ist eine gesteigerte Sensitivität und Spezifität.

Durch Mitführen einer Negativkontrolle (gleicher PCR-Ansatz, jedoch ohne DNA) wurde eine nachträgliche Kontamination mit fremder DNA ausgeschlossen.

Hierbei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Externe PCR: Reaktionsgemisch 50 μ l Gesamtvolumen:

1 μ l	DNA-Extrakt (Konzentration <500ng DNA/ μ l)
5 μ l	10 x PCR-Puffer
2 μ l	dNTP-Mix
0,25 μ l	Taq-Polymerase
2 μ l	forward Primer
2 μ l	reverse Primer
37,75 μ l	Aqua dest

PCR-Schema:

1. Heat Lid 110,0 °C
2. 95,0°C für 15 Minuten (Denaturierung)
3. Start Loop, 35 Zyklen
4. 94,0°C für 1 Minute
5. 63,0°C für 45 Sekunden (Annealing)
6. 72,0°C für 45 Sekunden (Elongation)
7. Close Loop
8. 72,0°C für 10 Minuten
9. Aufbewahrung bei 4,0°C

Interne PCR: Reaktionsgemisch 50 μ l Gesamtvolumen:

2 μ l	DNA der externen PCR
5 μ l	10x PCR-Puffer
2 μ l	dNTP-Mix
0,25 μ l	Taq-Polymerase
2 μ l	forward Primer
2 μ l	reverse Primer
36,75 μ l	Aqua dest

PCR-Schema:

1. Heat Lid 110,0 °C
2. 95,0°C für 15 Minuten (Denaturierung)
3. Start Loop, 40 Zyklen
4. 94,0°C für 1 Minute
5. 65,0°C für 45 Sekunden (Annealing)
6. 72,0°C für 45 Sekunden (Elongation)
7. Close Loop
8. 72,0°C für 10 Minuten
9. Aufbewahrung bei 4,0°C

4.2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA

Während der Gel-Elektrophorese wandert eine Mischung aus DNA-Molekülen im elektrischen Feld durch ein 1,5%-iges Agarose-Gel. Das Gel befindet sich in einer ionischen Pufferlösung. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das Gel. Da die DNA in wässriger Lösung ein negativ geladenes Zucker-Phosphat-Gerüst besitzt und das Verhältnis von Ladung und Molekülgröße bei Nukleinsäuren konstant ist, ist die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld abhängig von der Molekülmasse. Während der Elektrophorese werden die Nukleinsäuren nach diesen Kriterien aufgetrennt.

Herstellung eines Agarosegels:

Zur Elektrophorese wurden 1,5%-ige Agarose-Gele verwendet. 1,5 g Agarose wurde mit 100 ml TAE-Puffer im Mikrowellen-Herd kurz aufgeköcht, um eine klare, möglichst blasenfreie, Lösung zu erhalten. Nach etwa zwei Minuten war die Agarose vollständig gelöst und wurde in die vorbereiteten Gelkammern mit Kämmen gegossen. Nach vollständigem Aushärten des Gels, erfolgte die Entfernung der Käme.

Durchführung:

Es erfolgte die Füllung der Gelkammer mit TAE-Puffer. Je 5 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl 6fach-Loading-Dye gemischt und in die Taschen eines Agarose-Gels pipettiert. Pro Gel wurde ein 100 bp-Längenmarker in die jeweils äußerste Tasche pipettiert. An die Gel-Kammer wurden je nach Größe des Gels 90 bzw. 100 Volt Spannung für 53 bzw. 63 Minuten angelegt.

Anschließend erfolgte die Färbung des Elektrophorese-Gels mit Gel-Red (3fach Lösung aus 15 µl Gel-Red, 5 ml NaCl 1M und 45 ml Aqua dest.; abgedunkelt, 15-30 min.)

4.2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Probenaufreinigung zur Sequenzierung erfolgte mittels PCR-Aufreinigungs-Kit (DNA Clean&Concentrator 5-KIT). Bei diesem Reinigungs-Kit wurde das PCR-Produkt mit dem 2-fachen Ausgangs-Volumen eines DNA Binding Puffers versetzt und auf das geeignete Spin Column Tube

überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Mini-Säule für 1 Minute bei 13300 U/min. Danach wurde 200 µl Waschpuffer auf die Säule aufgetragen und wiederum 1 Minute bei 13300 U/min zentrifugiert (Vorgangswiederholung). Anschließend wurden 11 µl Aqua dest. auf die Säule gegeben, 1 Minute ruhen lassen und 1 Minute bei 13300 U/min zentrifugiert. Abschließend erfolgte die spektrophotometrische Konzentrationsmessung der aufgereinigten DNA (Nano Drop). Gemessen wurde, wie viel Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert wurde. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum aufgrund der aromatischen Ringe ihrer Basen bei 260nm. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260nm und 280nm (Absorptionsmaximum der Proteine) kann man die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Reine DNA-Lösungen besitzen einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert von 1,8 (optische Dichte).

Die Sequenzierung der DNA erfolgte mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger durch die Sequenzierungsfirma AGOWA in Berlin. Die Kettenabbruchsynthese (Didesoxymethode) nach Sanger stellt eine enzymatische Sequenzierungsmethode dar. Durch eine DNA-Polymerase wird, ausgehend von einem Primer, einer der beiden komplementären DNA-Stränge verlängert. Zur Gewinnung der DNA-Einzelstränge wird die Doppelhelix durch Erwärmung denaturiert. In vier Ansätzen mit den vier Nukleotiden dATP, dCTP, dGTP und dTTP wird je eine der vier Basen zum Teil als Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) hinzugegeben. Diese Kettenabbruch-ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxygruppe, damit fehlt die OH-Gruppe am 3'-C-Atom zur Bindung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotides. Eine Verlängerung der DNA durch die DNA-Polymerase ist nicht mehr möglich (Abbruch der Polymerisationsreaktion). Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die in jedem Ansatz mit dem gleichen ddNTP enden. Entweder der Primer oder die ddNTP's sind markiert. Nach der Sequenzierungsreaktion werden die markierten Abbruchprodukte aus jedem Ansatz mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt. Es erfolgt der Vergleich der Ansätze (Sequenzen). Die hierzu komplementäre Sequenz ist die Sequenz der einsträngigen DNA-Matrize.

4.2.2.6 Sequenzanalyse

Die Ergebnisse der Sequenzierungsfirma AGOWA Berlin wurden mit Hilfe der Software „Finch-TV“ angezeigt und ausgewertet. Die Sequenz der einzelnen Probe wurde mit der Wildtypsequenz des betroffenen Genabschnittes mittels der Software BLAST verglichen. BLAST (basic local alignment search tool), wird verwendet, um beliebig lange DNA- oder RNA-Sequenzen mit den in einer Genbank gespeicherten Sequenzen zu vergleichen und Ähnlichkeiten zu finden. Dabei zerlegt BLAST die eingegebene Sequenz in charakteristische Sequenzabschnitte, die dann in der Datenbank gesucht werden. So erhöht sich sowohl die Geschwindigkeit der Suche, als auch die Trefferwahrscheinlichkeit. Werden Treffer gefunden, wird versucht die gesamte Sequenz im Bereich des Treffers wiederzufinden. Die Software listet schließlich die Treffer auf und bewertet sie, entsprechend der Länge der Übereinstimmung, mit einem Score (Altschul et al. 1990). Wird eine Mutation nachgewiesen, so wird der Austausch der jeweiligen Aminosäuren und das betroffene Codon dokumentiert (Bestimmung des Mutationstyps).

4.3 EBV-Nachweis mittels EBER-in situ-Hybridisierung (ISH)

Vorteil eines in situ Nachweises des EBV ist, dass die Morphologie der infizierten Zelle und des Gewebes erhalten bleibt und somit die infizierte Zelle selbst identifiziert und im Zusammenhang mit dem umgebenden Gewebe beurteilt werden kann.

Bei der ISH von Nukleinsäuren werden speziell synthetisierte, radioaktiv oder nicht-radioaktiv markierte Nukleinsäurestränge („Sonden“) sichtbar gemacht. Diese Sonden sind komplementär zu den nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen. Sie hybridisieren mit den entsprechenden Abschnitten der Zielnukleinsäuren und werden anschließend sichtbar gemacht. Bei dieser Methode muss eine hohe Kopienzahl der Zielnukleinsäuren in den Zellen vorliegen. Da in allen Latenzformen der EBV-Infektion regelmäßig EBER-Moleküle in großer Zahl produziert werden, ist diese RNA als Zielnukleinsäure („Template“) für die ISH besonders geeignet (EBER-ISH). Die ISH erfolgte vollautomatisiert am Bond-Max (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) nach vorgegebenen Standardprotokoll.

4.4 A20-Antikörper

16 Proben mit bekanntem Mutationsstatus wurden herausgesucht um den monoklonalen anti-TNFIP₃ (A20) Antikörper (Maus, Größe 100µg, Isotop IgG1) zu testen (Konzentration 1:25, Abcam, Cambridge, UK). Die immunhistochemische Aufarbeitung erfolgte nach dem vorbeschriebenem Protokoll von Chen et al. 2007.

Es erfolgte die Inkubation des Antikörpers bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Die Detektion und Visualisierung fand nach der Herstelleranweisung (LSAB 2-kits, Dako, Denmark) statt.

Anschließend wurden die Schnitte durch einen Pathologen (I. Petersen) begutachtet. Die Immunhistochemie galt als positiv, wenn mehr als 5% der Tumorzellen eine Kernfärbungen von A20 aufwiesen.

5. Ergebnisse

5.1 Epidemiologie des Hodgkin-Lymphom im Raum Jena/Thüringen

5.1.1 Subtypenverteilung des klassischen Hodgkin-Lymphom

Für die epidemiologischen Untersuchungen wurden alle registrierten Hodgkin-Lymphomfälle der institutsinternen Datenbank der Friedrich-Schiller-Universität Jena in den Jahren zwischen 2000 und 2008 analysiert. Insgesamt konnten in diesem Zeitraum 89 klassische Hodgkin-Lymphome diagnostiziert werden, darunter auch ein NLPHL. Die Auswertung der histologischen Subtypenverteilung zeigte am häufigsten das nodulär-sklerosierende Hodgkin-Lymphom (n= 37, 42%). Das MCHL stellte sich in 35% (n=31) der Fälle dar. Die seltenen Subklassen LDHL und LRHL ließen sich in jeweils 3% (n=3) nachweisen. Hodgkin-Lymphome, welche sich aus dem histologischen Bild nicht eindeutig in eine Subklasse einordnen ließen, wurden in 14 Fällen (16%) gefunden. Diese Gruppe wird im Folgenden als nos-cHL (not-otherwise-specified cHL) benannt. Abbildung 7 zeigt die prozentuale histologische Subtypenverteilung im Kollektiv Jena, Abbildung 8 stellt die Verteilung im Zusammenhang mit dem Geschlecht der Patienten dar.

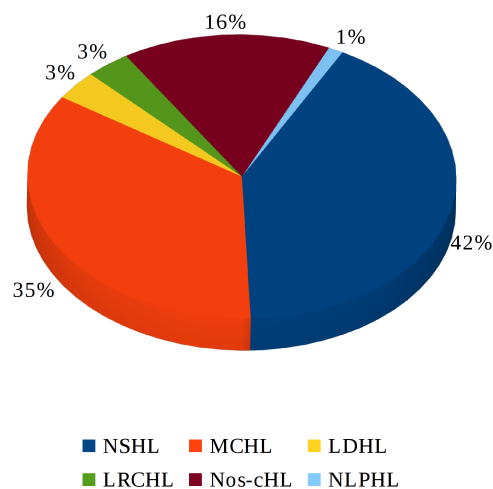


Abbildung 7: Subtypenklassifizierung nach WHO. Jena 2000-2008 (n=89)

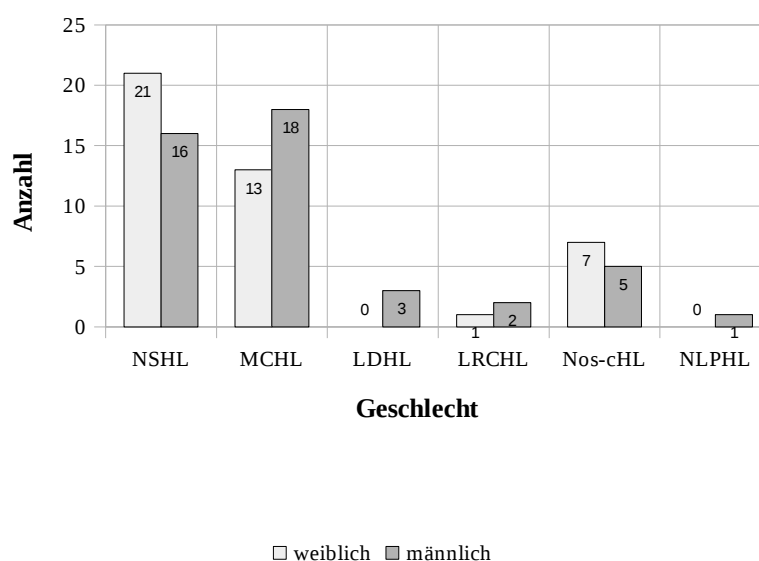


Abbildung 8: Subtypenverteilung nach Geschlecht. Gezeigt werden die absoluten Häufigkeiten der histologischen Subtypen in Abhängigkeit des Geschlechts der Patienten

5.1.2 Geschlechts- und Altersverteilung

Es erfolgte die Auswertung der Datenbankergebnisse nach Patientenalter zum Diagnosezeitpunkt sowie hinsichtlich des Patientengeschlechts. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden 10 Altersklassen definiert. Die Einteilung erfolgte in Anlehnung an die Referenzdatenbank der WHO (www.globocan.iarc.fr). Die erste Altersklasse umfasst Kinder und Jugendliche bis 14 Jahre, die zweite Altersstufe betrifft junge Erwachsene zwischen dem 15. und 39. Lebensjahr. Anschließend wurde das Alter in 5-Jahrestufen bis zum 74. Lebensjahr unterteilt, gefolgt von der letzten Altersklasse, der über 75-jährigen Patienten.

Ungeachtet der histologischen Subgruppen, zeigt sich eine bimodale Altersverteilung. Ein erster größerer flacher Gipfel fand sich in der Altersklasse der jungen Erwachsenen (15-39 Jahre). Ein zweiter kleinerer steilgipfliger Anstieg bei den älteren Patienten nach dem 70. Lebensjahr (Abbildung 9). Das klassische Hodgkin-Lymphom wurde etwas häufiger bei Männern als bei Frauen diagnostiziert. Das Geschlechtsverhältnis (male-to-female-ratio) der gesamten Gruppe beträgt 1,1.

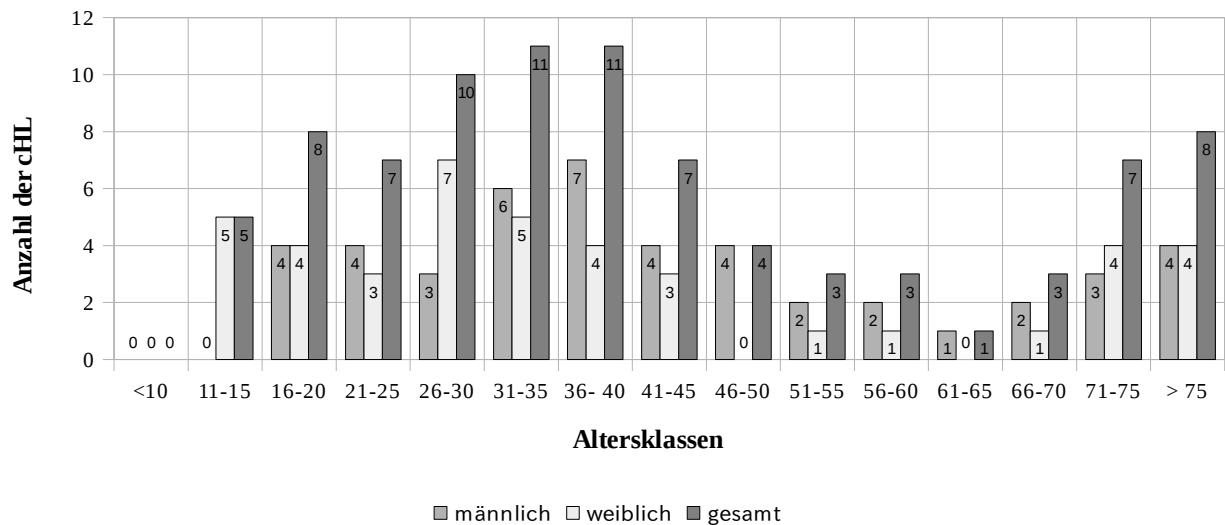


Abbildung 9: Gesamtaltersverteilung des cHL nach Geschlecht. Insgesamt zeigt sich eine bimodale Altersverteilung mit erstem größerem Häufigkeitsgipfel in der Altersklasse 26-40 Jahre, sowie ein zweiter Gipfel in den Altersklassen über 71 Jahre.

Bei der Betrachtung innerhalb der histologischen Subgruppen sind jedoch deutliche Unterschiede sichtbar. Der häufigste Subtyp, das NSHL kommt im genannten Kollektiv vor allem häufiger bei jüngeren Frauen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr vor (Male-to-female-ratio:0,8) (Abbildung 10).

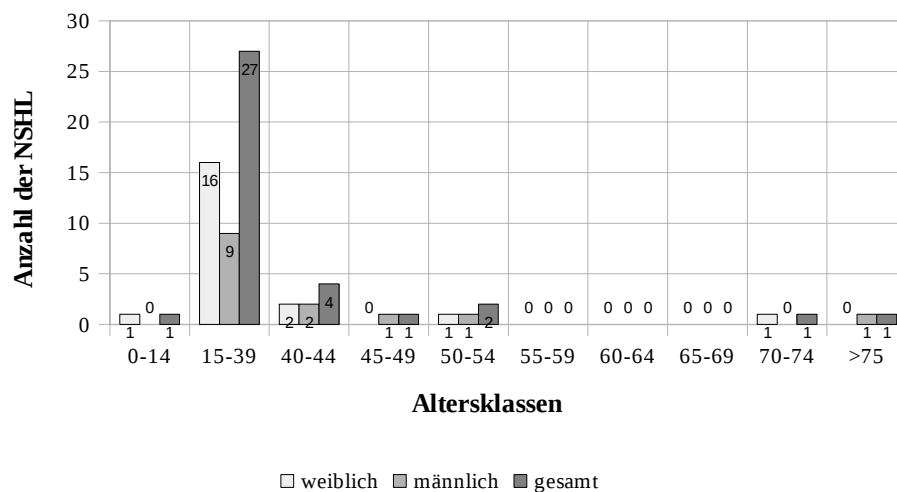


Abbildung 10: Alters- und Geschlechtsverteilung des NSHL. Dargestellt sind die Altersklassen der erkrankten Patienten im Zusammenhang mit dem Geschlecht des Patienten. Deutlich wird der steile Häufigkeitsanstieg im jungen Erwachsenenalter.

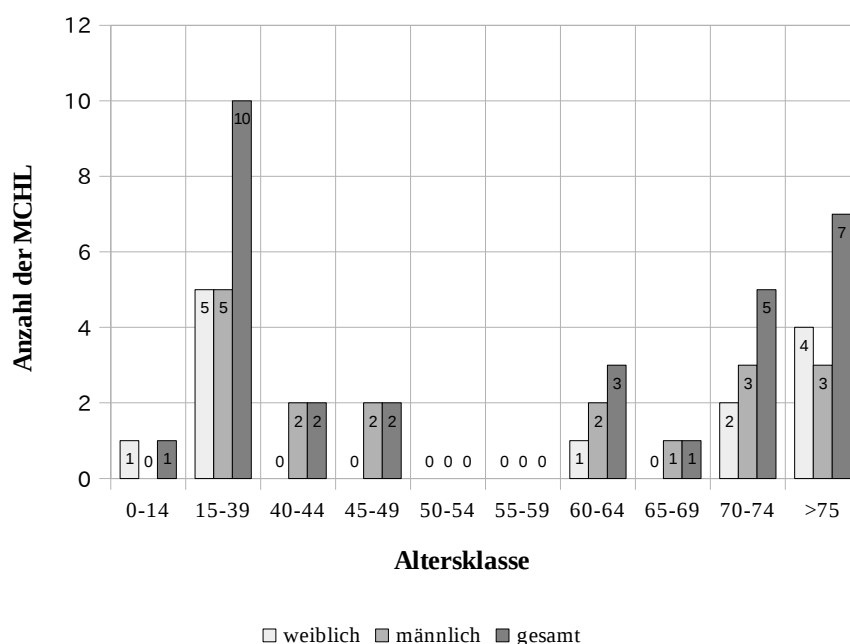


Abbildung 11: Alters- und Geschlechtsverteilung des MCHL. Dargestellt ist der bimodale Altersverlauf mit erstem Anstieg bei den jungen Erwachsenen und zweitem Anstieg im Alter.

Die Auswertung der diagnostizierten Fälle eines MCHL zeigt in der Altersverteilung einen bimodalen Kurvenverlauf. Ein erster flachgipfliger Anstieg in der Gruppe der jungen Erwachsenen (20.-40. Lebensjahr) und ein zweiter größerer steilgipfliger Anstieg im Alter (70.-80. Lebensjahr). Dieser Subtyp wurde häufiger bei Männern gefunden, die Male-to-female-ratio betrug 1,4 (Abbildung 11).

5.2 TNFAIP₃-Mutationsanalyse

Die Mutationsanalyse umfasst insgesamt 37 Proben klassischer Hodgkin-Lymphome aus dem diagnostischen Routineeingang des Instituts für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena (2000-2008). Das Material wurde stichprobenartig nach histologischen Qualitätseigenschaften erfasst. Hierunter zählten insbesondere die Anzahl der malignen HRS-Zellen im vorliegenden Material. Es erfolgte die morphologische und immunhistologische Subtypenklassifikation der Proben anhand der WHO-Klassifikation (2008). In 4 Fällen konnte keine eindeutige Zuordnung zu einem WHO-Subtyp erfolgen, diese wurden als nos-CHL (not-otherwise-specified) klassifiziert. Tabelle 4 zeigt die Subtypenverteilung der untersuchten Proben.

Tabelle 4: Subtypenverteilung der zur Mutationsanalyse untersuchten Proben nach WHO 2008

	NSHL	MCHL	LDHL	LRHL	nos-CHL	HL-Gesamt
weiblich	8	6	0	1	2	17
männlich	10	7	1	0	2	20
gesamt	18	13	1	1	4	37

In den 37 untersuchten Proben konnte in 8 Proben eine Mutation im TNFAIP₃-Gen nachgewiesen werden. Damit beträgt die Prävalenz der Mutation im TNFAIP₃-Gen 21,6%. Im Folgenden wurden die Stichproben hinsichtlich ihrer histologischen Subgruppen getrennt analysiert. Die größte Mutationshäufigkeit zeigte sich mit 22% im Subtyp der nodulären Sklerose (4 von 18). In der Gruppe der nos-CHL konnten in 2 von 4 Proben Mutationen gefunden werden. Lediglich eine Mutation wurde unter den 13 untersuchten Proben des MCHL gefunden. Eine Zusammenfassung der Aufteilung der mutierten Proben in Abhängigkeit ihres histologischen Subtypus zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Anzahl der mutierten Proben – Subtypverteilung. Insgesamt wurden 8 Proben mit Mutationen gefunden, wobei die meisten den histologischen Subtyp der nodulären Sklerose aufwiesen (4 von 8).

Subtyp	NSHL	MCHL	LDHL	LRHL	nos-CHL
Mutationsanzahl (n=8)	4	1	1	0	2

Das TNFAIP₃-Gen besitzt 8 codierende Exone. Schmitz et al. publizierten 2009 häufig mutierte Sequenzen des TNFAIP₃-Gens, es wurden die gleichen Primer für die Amplifikation der am häufigsten mutierten Exone 2, 4-5, 7 und 9 verwendet (Schmitz et al. 2009). Untersucht wurde die Mutationshäufigkeit (Prävalenz) in Bezug auf die histologische Subtypenverteilung. Insgesamt wurden 11 mutierte Exone in 8 Proben gefunden. Tabelle 6 zeigt einen Überblick zu den häufigsten Lokalisation der Mutationen.

Tabelle 6: Lokalisation der Mutationen im TNFAIP₃-Gen. Die Sequenzanalyse des TNFAIP₃-Gens umfasste die Exone 2, 4-5, 7 und 9. Am häufigsten wurden Mutationen im Exon 9 gefunden.

Position der Mutation	Anzahl der ermittelten mutierten Exone (n=11)
Exon 2	1
Exon 4-5	2
Exon 7	2
Exon 9	6

Betrachtet man die Verteilung der Mutationen auf die einzelnen Exone, fällt auf, dass sich 55% (6 von 11) in Exon 9 befinden. In einer Probe eines nodulär sklerosierenden Hodgkin-Lymphoms (Probe-Nr. 34) konnten gleichzeitig Mutationen in Exon 2, 4-5 und 7 gefunden werden. Lediglich in einer Probe wurde eine Mutation im Exon 2 detektiert. Es handelt sich um eine Missense-Mutation (A182T) in einem NSHL (Probe 34). Eine Mutation in Exon 4-5 konnte in 2 Proben nachgewiesen werden, in Probe 31 mit Material aus einem lymphozytenarmen Hodgkin-Lymphom als Missense-Mutation (V258I) und in Probe 34 (nodulär sklerosierendes Hodgkin-Lymphom). Ebenfalls zwei Proben wiesen Mutationen in Exon 7 auf. Die Probe eines nos-CHL zeigte eine Missense-Mutation (T553I). Proben-Nr. 34 zeigte ebenfalls in Exon 7 Mutationen, es handelt sich um eine Frameshiftmutation an der Position aa558 sowie an Position Q415 um ein Stop-Codon (nonsense-Mutation). Die Analyse von Exon 9 erfolgte insgesamt an 36 Hodgkin-Lymphomproben, eine Probe (Proben-Nr. 19) konnte nicht analysiert werden aufgrund mangelnden histologischen Materials, Tabelle 7 gibt einen Überblick über die einzelnen Mutationen. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen Auswertungsbeispiele der Mutationsanalyse des TNFAIP₃-Gens in den jeweiligen Sequenz-Elektropherogrammen.

Tabelle 7: Ergebnisse Mutationsanalyse. Dargestellt sind die gefundenen Mutationen in den Proben. In Probe-Nr. 34 konnten Mehrfachmutationen nachgewiesen werden; wt=wildtyp.

Proben-Nr.	Subtyp	Exon 2	Exon 4-5	Exon 7	Exon 9
30	nos-CHL	wt	wt	wt	C716S
31	LDHL	wt	V258I	wt	wt
32	nos-CHL	wt	wt	T553I	wt
33	MCHL	wt	wt	wt	E731K, P754L, P758S
34	NSHL	A182T	G221S	Q415Stop, frameshift aa 558	wt
35	NSHL	wt	wt	wt	G746R, E751K, P752S
36	NSHL	wt	wt	wt	frameshift aa758
37	NSHL	wt	wt	wt	P765S

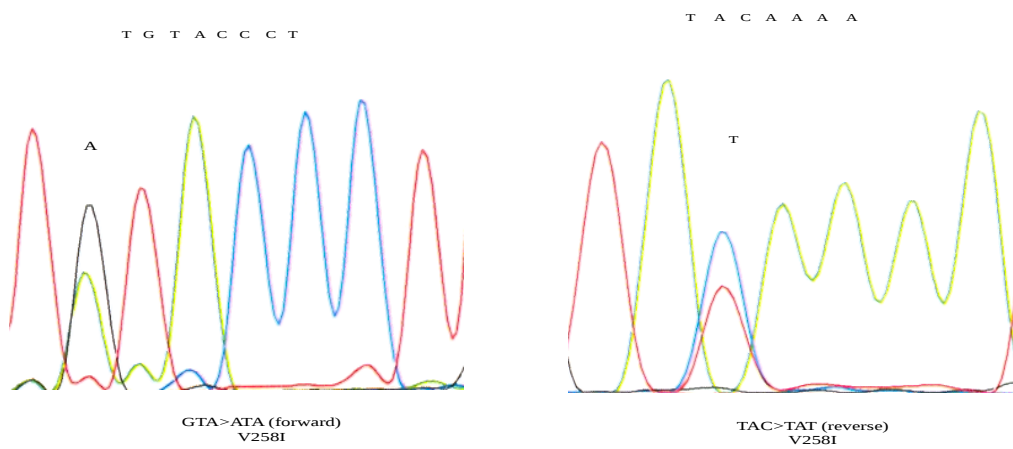


Abbildung 12: Grafische Auswertung Mutationsanalyse, Beispiel 1. Dargestellt sind Beispiele der beobachteten Mutationen in den Sequenz-Elektropherogrammen. Probe-Nr. 31, LDHL.

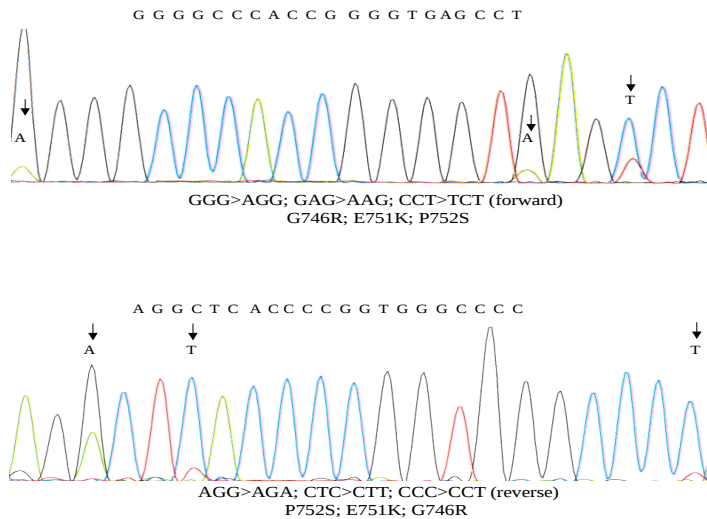


Abbildung 13: Grafische Auswertung Mutationsanalyse, Beispiel 2. Dargestellt sind Beispiele der beobachteten Mutationen in den Sequenz-Elektropherogrammen. Probe-Nr. 35, NSHL, Mutation in Exon 9.

5.3 EBV-Assoziation

Das Epstein-Barr-Virus ist weltweit verbreitet. Über 90% der Menschen sind mit dem γ -Herpesvirus EBV infiziert (Küppers 2003). Nach Ausheilung der Krankheit verbleibt das Virus latent in den B-Lymphozyten. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Patienten nach einer infektiösen Mononukleose ein signifikant höheres Risiko haben, später an einem Hodgkin-Lymphom zu erkranken. Aus diesem Grund wurde in der Folge an allen 37 Hodgkin-Lymphom-Proben der vorangegangenen Mutationsanalyse, eine EBER-ISH zur Bestimmung des EBV-Status durchgeführt. In 19% konnte eine EBV-Infektion durch eine positive EBER-ISH, nachgewiesen werden (7 von 37 Proben). Differenziert nach den histologischen Subtypen betrachtet, wurde in 100% aller untersuchten Proben vom NSHL-Subtyp (n=18) der EBER-Nachweis nicht erbracht. Das heißt alle untersuchten NSHL-Proben waren EBV-negativ (p=0,008), der Patient war nie an EBV erkrankt. Die EBER-Analyse von 13 MCHL ergab 6 EBV-positive Proben (p=0,004; Tabelle 8). Beide Analysen zeigen statistische Signifikanz. Die untersuchten LDHL (n=1) und LRHL (n=1) waren jeweils EBV-negativ, ein EBER-Nachweis gelang hier nicht. In der Gruppe der nicht klassifizierbaren Hodgkin-Lymphome (nos-CHL, n=4) befanden sich eine EBV-positive und 3 EBV-negative Proben. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen Mikroskopiebilder der EBER-ISH mit jeweils einem positiven und einem negativen EBER-Nachweis. Tabelle 8 stellt die absoluten Häufigkeiten des Nachweises in den untersuchten Proben dar.

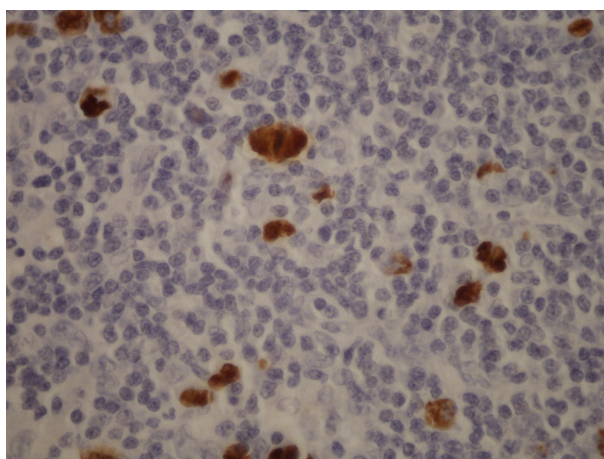


Abbildung 14: EBER-ISH positiv. Positiver EBV-Nachweis in einem MCHL; 630 fache Vergrößerung mit Mitose; (Probe-Nr. 18)

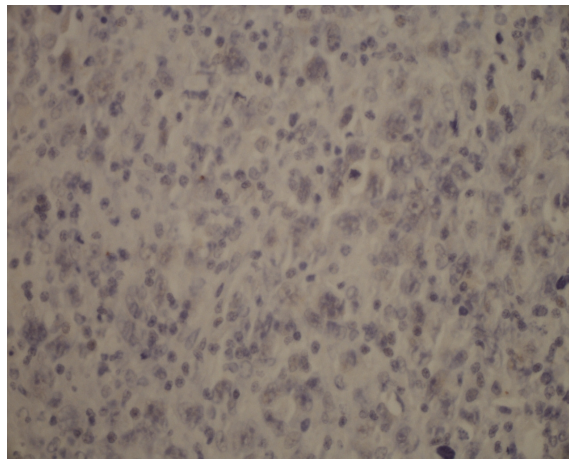


Abbildung 15: EBER-ISH negativ. Negativer EBV-Nachweis in NSHL; 400 fache Vergrößerung (Probe-Nr. 37)

Tabelle 8: EBV-Nachweis und histologische Subtypen.

EBV-Status	NSHL n=18	MCHL n=13	LDHL n=1	LRHL n=1	Nos-CHL n=4	CHL gesamt n=37
EBV+	0	6	0	0	1	7
EBV-	18	7	1	1	3	30

Anschließend wurden die Ergebnisse aus der vorausgegangenen Mutationsanalyse mit dem Ergebnis der EBER-ISH in Beziehung gesetzt. Es stellte sich heraus, dass alle Proben mit nachgewiesenen Mutationen (n=8) einen negativen EBER-Nachweis aufwiesen. Das heißt, keine Probe mit Mutation im TNFAIP₃-Gen war mit dem EBV infiziert (0 von 8, Mutationsfrequenz 0%). Während 27% aller EBV-negativen Proben TNFAIP₃-Mutationen aufzeigten (8 von 30; Tabelle 9 und 10).

Tabelle 9: EBV-Nachweis-Mutation. Dargestellt ist die tabellarische Übersicht zur Auswertung des EBV-Nachweises in allen untersuchten Proben der Mutationsanalyse.

	Mutation		<i>Gesamtsumme</i>
	nachgewiesen	nicht nachgewiesen	
EBV-positiv	0 (0%)	7 (100%)	<i>7 (20%)</i>
EBV-negativ	8 (27%)	22 (73%)	<i>30 (80%)</i>
<i>Gesamtsumme</i>	8 (22%)	29 (78%)	<i>37 (100%)</i>

Tabelle 10: Zusammenfassende Übersicht. Mutationsanalyse, n=37 Proben umfassend, gezeigt sind die untersuchten Exone, jeweils mit Mutationsnachweis (mu) bzw. ohne Mutationsnachweis (wildtyp=wt). A20-Antikörpernachweis (pos.=positiv, neg.=negativ, n.a.=nicht analysiert. EBER-Analyse: pos.=positiver EBER-Nachweis, Probe ist damit EBV-positiv; neg.=negativer EBER-Nachweis, Probe ist damit EBV-negativ; n.a.=nicht analysiert. Subtypenunterteilung nach WHO. Geschlechtsunterteilung (m=männlich, w=weiblich)

Probe-Nr.	Exon 2	Exon 4	Exon 5	Exon 7	exon 9	EBV	HL-Subtyp
1	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
2	wt	wt	wt	wt	wt	neg	MCHL
3	wt	wt	wt	wt	wt	pos	nosHL
4	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
5	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
6	wt	wt	wt	wt	wt	neg	nosHL
7	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
8	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
9	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
10	wt	wt	wt	wt	wt	pos	MCHL
11	wt	wt	wt	wt	wt	pos	MCHL
12	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
13	wt	wt	wt	wt	wt	neg	MCHL
14	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
15	wt	wt	wt	wt	wt	neg	MCHL
16	wt	wt	wt	wt	wt	neg	MCHL
17	wt	wt	wt	wt	wt	neg	LRCHL
18	wt	wt	wt	wt	wt	pos	MCHL
19	wt	wt	wt	wt	n.a.	pos	MCHL
20	wt	wt	wt	wt	wt	pos	MCHL
21	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
22	wt	wt	wt	wt	wt	neg	MCHL
23	wt	wt	wt	wt	wt	pos	MCHL
24	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
25	wt	wt	wt	wt	wt	neg	MCHL
26	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
27	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
28	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
29	wt	wt	wt	wt	wt	neg	NSHL
30	wt	wt	wt	wt	mu	neg	nosHL
31	wt	wt	mu	wt	wt	neg	LDHL
32	wt	wt	wt	mu	wt	neg	nosHL
33	wt	wt	wt	wt	mu	neg	MCHL
34	mu	wt	mu	mu	wt	neg	NSHL
35	wt	wt	wt	wt	mu	neg	NSHL
36	wt	wt	wt	wt	mu	neg	NSHL
37	wt	wt	wt	wt	mu	neg	NSHL

5.4 A20 Antikörper

Es wurden 16 Proben mit bekanntem Mutationsstatus herausgesucht um den monoklonalen anti-TNFAIP₃-(A20)-Antikörper zu testen. In 56% des vorliegenden Materials (9/16) konnte das A20-Protein durch den A20-Antikörper nachgewiesen werden (Tabelle 11). Die histologischen Präparate zeigten eine positive A20-Färbung (Abbildung 16). In 7 von 16 Proben (44%) zeigte sich keine A20-Expression (Abbildung 17). Anschließend wurden die immunhistochemischen Ergebnisse mit den Ergebnissen der Mutationsanalyse verglichen um die Sensitivität und Spezifität des neuen monoklonalen anti-TNFAIP₃-(A20)-Antikörper zu testen. Es zeigt sich eine Sensitivität von 80,0%, sowie eine Spezifität des Antikörpertests von 73,3% (Tabelle 11).

Tabelle 11: A20 Immunhistochemie im Vergleich zur TNFAIP₃-Mutationsanalyse

A20-Immunhistochemie mit A20-Antikörper	TNFAIP ₃ -Mutationsanalyse	
	A20 Mutation	A20 Wildtyp
A20-Nachweis negativ	4	3
A20-Nachweis positiv	1	8
Gesamt	5	11

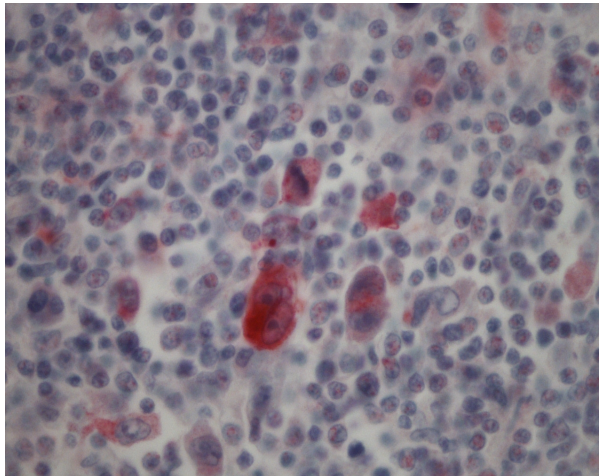


Abbildung 16: A20-Antikörper positiv. Positiver Nachweis des Proteins A20 mit A20-Antikörper im MCHL (Proben-Nr. 12, 630 fache Vergrößerung)

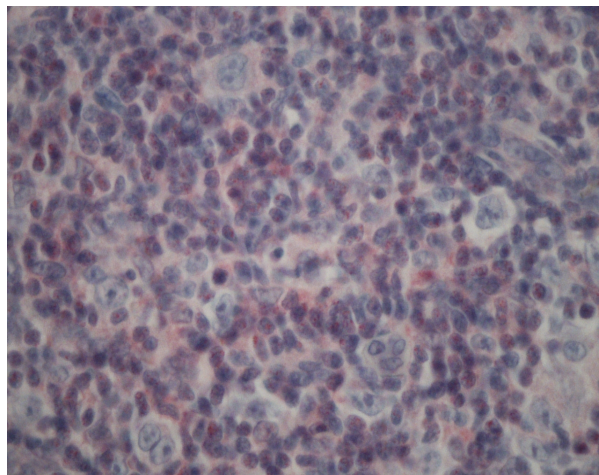


Abbildung 17: A20-Antikörper negativ. Negativer Nachweis des Proteins A20 mit A20-Antikörper im MCHL (Proben-Nr. 33, 630 fache Vergrößerung)

6. Diskussion

6.1 Epidemiologie

Die Epidemiologie des klassischen Hodgkin-Lymphoms ist komplex. Verschiedene epidemiologische Studien ergaben große Unterschiede bezüglich der Inzidenz je nach Alter, Geschlecht und Geografie (Huang et al. 2011). Im Jahr 2012 zeigten internationale Daten der International Agency for Research on Cancer (IARC), einer Behörde der Weltgesundheitsorganisation einen 12-fachen Unterschied der Inzidenzen zwischen Westeuropas/Nordamerikas (2,4 pro 100.000 pro Jahr) und im Westpazifik (WPRO, 0,2 pro 100.000 pro Jahr, <http://globocan.iarc.fr/>). In Israel ist die Inzidenz mit 3,7 Neuerkrankungen pro 100.000/Jahr weltweit am höchsten. Die Zahl der Neuerkrankungen eines Hodgkin-Lymphoms im Jahr 2012 betrug weltweit 65950 Menschen, darunter 38520 Männer und 27430 Frauen. In Deutschland wurden 2017 Neuerkrankungen (1081 Männer, 936 Frauen) registriert. Damit beträgt die Inzidenz 2,2 pro 100.000 Einwohner und liegt leicht über der europäischen Gesamtinzidenz. Abbildung 18 zeigt ein Vergleich der unterschiedlichen Inzidenzen.

Eine Übersicht zu den wichtigsten epidemiologischen Daten des Hodgkin-Lymphoms in Deutschland ist in Tabelle 12 zusammengefasst, Herausgeber der Daten ist das Robert-Koch-Institut, Stand 2012.

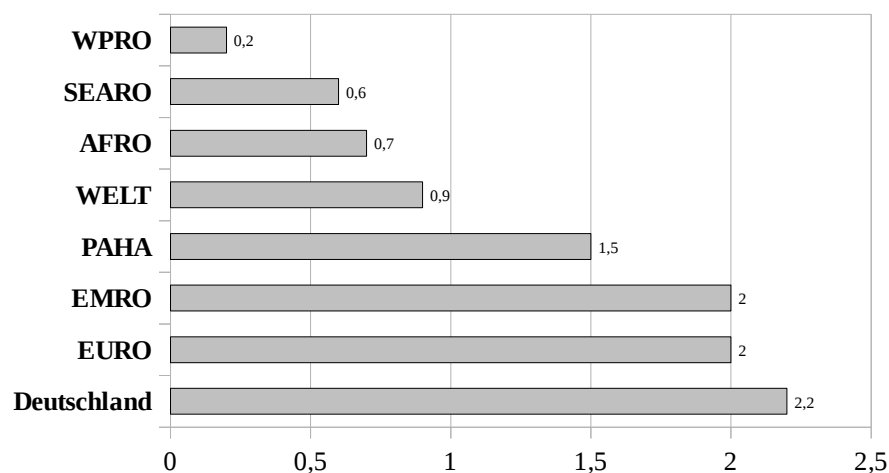


Abbildung 18: Inzidenzen 2012 im Vergleich. Dargestellt ist ein Vergleich der unterschiedlichen Inzidenzen im Jahr 2012, aufgegliedert nach WHO-Populationen, im Vergleich zur gesamten Welt und Deutschland (WHO-Populationen: AFRO = Afrika, PAHO =Amerika, SEARO = Südostasien, EURO = Europa, EMRO = östlicher Mittelmeerraum, WPRO = Westpazifik; GLOBOCAN 2012)

Tabelle 12: Übersicht der wichtigsten epidemiologischen Daten für Deutschland 2012. ICD-10 C81 Hodgkin-Lymphom. ¹ je 100.000 Personen, ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung, ³Median; Quelle: Krebs in Deutschland (www.rkide)

	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	1.300	900
rohe Erkrankungsrate¹	3,2	2,3
standardisierte Erkrankungsrate^{1,2}	3,0	2,2
mittleres Erkrankungsalter³	45	41
Sterbefälle	169	147
rohe Sterberate¹	0,4	0,4
standardisierte Sterberate^{1,2}	0,3	0,2
5-Jahres-Prävalenz	5.200	3.900

Die Inzidenz im Raum Jena wurde nicht berechnet, weil sich die Populationsgröße des Einzugsgebietes des Pathologischen Institutes Jena nicht einschätzen lässt, da weitere Pathologien im Umkreis Mittelthüringens Routinediagnostiken durchführen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch im Raum Jena mehr Männer als Frauen an einem Hodgkin-Lymphom erkranken. Die male-to-female-ratio der gesamten Gruppe beträgt 1,1.

Die Erkrankung kann prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten. In der Gesamtbetrachtung findet man jedoch eine bimodale Altersverteilung der Inzidenz. Es besteht ein größerer Häufigkeitsgipfel zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr und einen kleineren Gipfel nach dem 50. Lebensjahr. Im untersuchten Kollektiv Jena/Thüringen (n=89) konnte die bimodale Altersverteilung bestätigt werden. Jedoch zeigte sich im Vergleich zur Altersverteilung-Deutschland (Tabelle 13, Abbildung 19 und 20), deutlich mehr Diagnosen im Alter (> 75. Lebensjahr). Während der Auswertung der epidemiologischen Datenbank gelang jedoch nicht immer die sichere Zuordnung einer Diagnose als Erstdiagnose, diese Angaben wurden in der Datenbank nicht regelmäßig hinterlegt. Insofern ist es möglich, dass sich unter den diagnostizierten Fällen auch Rezidive befinden. Dies kann den zweiten, im Vergleich zur WHO-Datenbank, erhöhten Altersgipfel erklären.

Tabelle 13: Altersspezifische Inzidenz 2012 Deutschland. Gezeigt wird die Anzahl der Neuerkrankungen bzw. Inzidenz eines Hodgkin-Lymphoms im Jahr 2012 in Deutschland, aufgeteilt nach Altersklassen und Geschlecht. (GLOBOCAN 2012)

Altersklasse		0-14	15-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-75	75+
Gesamt	2017	90	751	148	147	130	117	115	117	142	260
		0,8	3,2	2,4	2,0	2,0	2,1	2,4	2,7	3,0	3,2
Männer	1081	45	371	87	93	83	73	68	66	76	119
		0,8	3,1	2,8	2,5	2,5	2,6	2,9	3,2	3,4	3,9
Frauen	141	936	45	380	61	54	47	44	47	51	66
		0,8	3,3	2,0	1,5	1,5	1,5	1,9	2,3	2,6	2,9

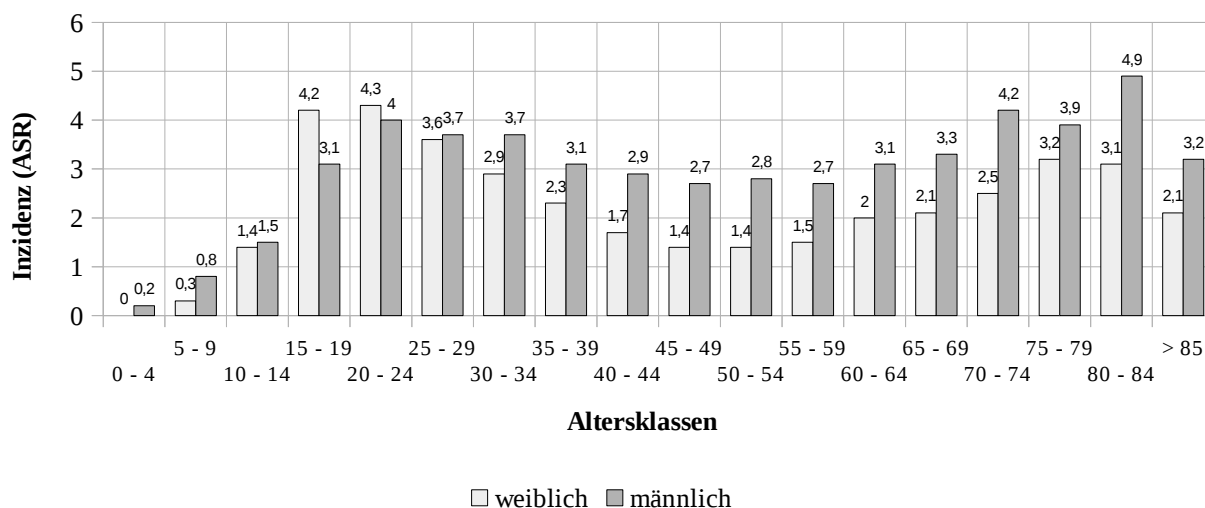


Abbildung 19: Inzidenz, Altersstandardisierte Rate in Deutschland pro 100.000 Einwohner 2000-2010. Quelle: Krebs in Deutschland rki

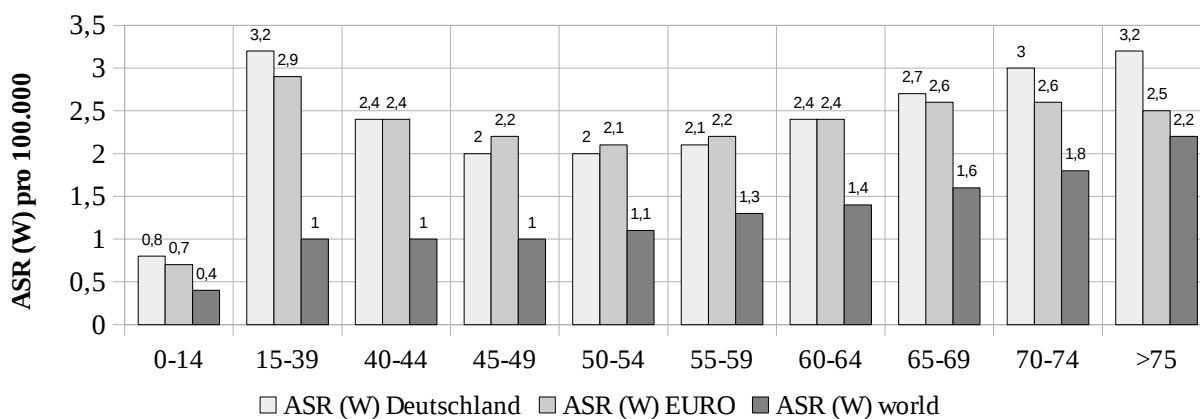


Abbildung 20: Vergleich Inzidenzraten ASR(W). Quelle: GLOBOCAN 2012

Nach WHO-Klassifikation (2008) wird das klassische Hodgkin-Lymphom aufgrund seines histologischen Erscheinungsbildes in vier Subgruppen unterteilt. Die Untergruppen zeigen Unterschiede in der Epidemiologie und damit verbunden evtl. auch in der Ätiologie. Die prognostische Relevanz der Subgruppierung beschränkt sich nur auf genau definierte Patientenkollektive. Zur Therapieplanung werden die Subgruppen aktuell nicht mit einbezogen. Es liegt nahe, dass dies auch der Grund ist, dass in den nationalen und internationalen Krebsregistern keine Unterteilung der Subklassen erfolgt. Die Deutsche Hodgkin-Studiengruppe (DHSG) geht von folgender Verteilung der Subklassen aus: NSHL 5%, MCHL 25%, LRHL 4%, LDHL 1 (Tabelle 14). Im Raum Jena zeigte sich im Vergleich eine erhöhte Rate des MCHL mit 35% (n=31). Am häufigsten ist auch in der Population Jenas das nodulär-sklerosierende Hodgkin-Lymphom mit 42% (n=37), wenn auch deutlich weniger häufig als in den Datenbanken der Deutschen Hodgkin-Studiengruppe. Die seltenen Subklassen LDHL und LRHL ließen sich in den Befunden des Pathologiesystems jeweils in 3% (n=3) nachweisen. Das NLPHL machte lediglich 1% aus. 16% (n=14) der Hodgkin-Lymphome ließen sich anhand der Datenbankdaten nicht subklassifizieren. Diese Gruppe wird im folgenden als nos-CHL (not-otherwise-specified) benannt. Die Ursache der Unterschiede in den Häufigkeiten des NSHL bzw. MCHL zur Vergleichsdatenbank ist auch mit der relativ großen Gruppe der nos-CHL begründet. Es ist zu vermuten, dass sich in dieser Gruppe noch einige nodulär-sklerosierende HL finden.

Tabelle 14: Vergleich der histologischen Subtypen Population Jena - Deutschland. Daten für Deutschland nach Informationen der Deutschen Hodgkin Studiengruppe (DHSG; www.ghsg.org)

	Klassisches Hodgkin-Lymphom						NLPHL
		NSHL	MCHL	LDHL	LRHL	nos-CHL	
DHSG	95%	65%	25%	1%	4%	-	5%
Jena	99%	42%	35%	3%	3%	16%	1%

Vergleicht man die Altersstruktur innerhalb der histologischen Subklassifizierung sind deutliche Unterschiede erkennbar. Der häufigste Subtyp, das NSHL kommt im Kollektiv Jena vor allem bei jungen Erwachsenen vor. Dies ist übereinstimmend mit Daten von Mani et al. 2009. Es zeigte sich

eine Bevorzugung des weiblichen Geschlechts. Die Auswertung der diagnostizierten Fälle eines MCHL zeigten übereinstimmend mit vorangegangenen Studien einen bimodalen Kurvenverlauf bezogen auf das Erkrankungsalter. Ein erster flachgipfliger Anstieg in der Gruppe der jungen Erwachsenen (20.-40 Lebensjahr) und ein zweiter größerer steilgipfliger Anstieg im Alter (70.-80. Lebensjahr). Das MCHL wurde auch im Kollektiv Jena häufiger bei Männer gefunden, die Male-to-female-ratio betrug 1,4, Auch dies ist übereinstimmend mit bereits publizierten Daten (Mani et al. 2009, Morton et al. 2006; Tabelle 15).

Tabelle 15: Vergleich der epidemiologischen Daten bezogen auf den histologischen Subtyp.

*Male-to-female-ratio nicht berechnet aufgrund der niedrigen Fallzahl

Subtyp	Modif. nach Mani und Jaffe 2009, Morton et al. 2006 (USA)	Deutschland (DHSG)	Jena, Thüringen
NSHL	häufigster Subtyp in westlichen Ländern, Jugendliche und junge Erwachsene, B-Symptome Male-to-female-ratio: 1.0	65-70% (60%, EBV+ 25%)	42% Male-to-female-ratio: 0,8
MCHL	Entwicklungsländer, Kinder und ältere Erwachsene, HIV-Patienten Male-to-female-ratio: 2.0	25% (24%, EBV+ 75%)	35,0% Male-to-female-ratio: 1,4
LDHL	selten, Entwicklungsländer, HIV-Patienten Male-to-female-ratio: 4,0	0,8–1% (1%)	3% Male-to-female-ratio: *
LRHL	Male-to-female-ratio: 2,0	2–3% (3%)	3% Male-to-female-ratio: *
CHL-Nos			16% Male-to-female-ratio: 0,7
CHL-ges		Male-to-female-ratio:1,2	Male-to-female-ratio:1,1
NLPHL	eingipflig im 4. Lebensjahrzehnt, auch bei Kindern Male-to-female-ratio: 3,0	2–3% (7%)	1% Male-to-female-ratio: *

6.2 TNFAIP₃-Mutationsanalyse

In den letzten Jahren gelang in verschiedenen Studien der Nachweis von Mutationen im TNFAIP₃-Gen. Es handelte sich um Untersuchungen bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten (z.B. Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Vereecke et al. 2009) und Lymphomen (Hartmann et al. 2008; Honma et al. 2008, Schmitz et al. 2009). Dies gab den Anstoß zu weiteren Studien zur Identifikation des Gens als Tumorsuppressorgen.

In der hier vorliegenden Untersuchung konnte mittels semi-nested PCR eine Prävalenz der Mutation im TNFAIP₃-Gen von 21,6% (8 von 37 Proben) gefunden werden. Die Bestätigungen der Mutationen lassen den Rückschluss zu, dass es sich hier um ein wichtiges Tumorsuppressorgen handelt. Die beschriebenen Mutationen sind Hinweise auf eine Inaktivierung des A20-Proteins als Folge der Mutation im TNFAIP₃-Gen. Bestätigt wird diese Hypothese durch den fehlenden immunhistochemischen Proteinnachweis im Gewebeschnitt.

Kato et al. publizierten 2009 den Nachweis von 33,3% (5/15) TNFAIP₃-Mutationen in Hodgkin-Lymphomen. Diese Arbeit umfasste jedoch nur Proben mit dem histologischen Bild der nodulären Sklerose. Betrachtet man in der hier vorliegenden Untersuchung nur diesen Subtyp, konnten 4 Mutationen in 18 NSHL-Proben detektiert werden. Dies entspricht, innerhalb aller untersuchten NSHL-Proben, einer Mutationshäufigkeit von 22%, dies ist weniger als in der Arbeitsgruppe um Kato. Schmitz et al. 2007 fand A20-Mutationen in 44% (16/36) der verwendeten Proben. Darunter fanden sich CHL unterschiedlicher Subtypen sowie zwei HL-Zelllinien. Die relativ großen Unterschiede in den Mutationsfrequenzen sind vor allem auf die Tatsache zurückzuführen, dass in den Studien unterschiedliche Methoden zur Materialgewinnung benutzt wurden. Die eigentlichen malignen Hodgkin-Reed-Sternbergzellen können lediglich 1% der gesamten Tumormasse ausmachen. Die Zellgewinnung aus entparaffinierten Tumormaterial ohne Mikrodissektion ist schwierig. Schmitz et al. entwickelten die Technik der Mikrodissektion, um so an die eigentlichen Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms zu gelangen und isolierte HRS-Zellen zu untersuchen. Dies könnte der Grund sein, warum in der hier vorliegenden Arbeit die Mutationshäufigkeiten geringer sind als in den vorbeschriebenen Studien. Für diese Untersuchung wurden die Proben im Vorfeld nur nach mikroskopischer Voruntersuchung herausgesucht, dabei wurde auf Material mit einem hohen Anteil an Tumorzellen (Quantität) geachtet.

Das TNFAIP₃-Gen besitzt 8 codierende Exone. Die Exone 2, 4-5, 7 und 9 wurden von Schmitz et al. 2009 als die häufigsten Mutationsorte beschrieben. In dieser Arbeit wurden nur diese Exone und nicht die gesamte kodierende Sequenz untersucht. Auch dies könnte ein Grund für die relativ niedrigeren Mutationsraten sein.

55% der Mutationen konnten in Exon 9 nachgewiesen werden (6/11 positiven Proben). Dieses Exon repräsentiert ca. 12% der codierenden Region des TNFAIP₃-Gens. Weniger häufig waren Mutationen in den Exonen 2, 4-5 und 7 zu beobachten. Interessanterweise gelang in einer Probe der Nachweis von gleichzeitigen Mutationen in Exon 2, 4-5 und 7. Ein Patient hatte Mutationen nur im Exon 5 und ein weiterer isoliert in Exon 7.

6.3 EBV-Assoziation

Patienten nach einer infektiösen Mononukleose, hervorgerufen durch das γ -Herpesvirus EBV, haben ein signifikant höheres Risiko, später an einem cHL zu erkranken (Rosdahl et al. 1974). Über 90% der Menschen sind mit dem EBV infiziert (Küppers 2003). Nach Ausheilung der Krankheit verbleibt das Virus latent in B-Lymphozyten. In der westlichen Welt sind in ca. 40%-60% aller cHL-Fälle, die HRS-Zellen latent mit dem Epstein-Barr Virus infiziert (Küppers 2009), wobei EBV-assoziierte HL häufiger in der kaukasischen und hispanischen Bevölkerung zu finden sind (Banerjee et al. 2011). In diesen Fällen exprimieren die HRS-Zellen EBV-kodierende RNAs (EBER). Durch eine ISH kann man die EBER-Expression nachweisen und damit den EBV-Status bestimmen. Mani und Jaffe 2009 gehen von einer Assoziation eines CHL mit einer EBV-Infektion in 20 bis 100% der Fälle aus. Sie ist abhängig vom Patientenalter, häufiger bei Kindern und älteren Erwachsenen, tritt geschlechtsspezifisch häufiger bei Männern auf und histologisch vorwiegend in NSCHL und LDHL (Banerjee et al. 2011). In der vorliegenden Untersuchung konnte nur in 19% der untersuchten HL die EBER-Expression nachgewiesen werden (7/37). Die EBV-Assoziation der HRS-Zellen im MCHL wird in der Literatur höher als in den anderen Subtypen angegeben und kann bis zu 75% erreichen (Rosenwald, Küppers 2010). Diese Aussage konnte durch unsere Daten bestätigt werden. Die meisten EBV-Infektionen fanden sich in MCHL-Proben, wenn auch nur zu 41,6% (5/12). Die Unterschiede lassen sich durch die regionalen Inzidenzunterschiede der EBV-Infektion erklären. In der Literatur wird die Möglichkeit der Koexistenz zwei verschiedener Hodgkinformen diskutiert. Eine Form in immunkompetenten Patienten ohne EBV-Assoziation und eine weitere in Patienten

mit Immunschwäche, die EBV-assoziiert ist (Banerjee et al. 2011). Es gelang kein positiver EBER-Nachweis (n=0) in NSHL, LDHL und LRHL. Sowohl unsere Ergebnisse, als auch die Ergebnisse aus Voruntersuchungen untermauern die These, dass es unterschiedliche pathogenetische Mechanismen in den einzelnen histologischen Subgruppen gibt. Einen pathogenetischen Zusammenhang einer EBV-Infektion und der Ausbildung eines Hodgkin-Lymphom vom gemischtzellulären Subtyp ist sehr wahrscheinlich.

Anschließend wurde der Mutationsstatus des TNFAIP₃-Gen mit dem EBV-Status verglichen. Alle Mutationen konnten in Tumorgeweben mit negativem EBV-Status nachgewiesen werden. Somit kann die Aussage der Forschungsgruppe um Schmitz et al. und Hirsch et al. bestätigt werden, dass Mutationen im TNFAIP₃-Gen signifikant häufiger in EBV-negativen Hodgkin-Lymphomen zu finden sind als in Tumoren mit positivem EBV-Status. Dies bestätigt auch die Theorie, dass eine Mutation im TNFAIP₃-Gen und die EBV-Infektion unterschiedliche pathogenetische Mechanismen bei der Tumorgenese darstellen und hebt die pathogenetische Bedeutung einer latenten EBV-Infektion im Hodgkin-Lymphom nochmals hervor.

6.4 A20-Antikörper

Hirsch et al. entwickelte 2012 einen monoklonalen anti-TNFIP₃ (A20) Antikörper (Ber-A20) zur Detektion unmutierter A20 Proteine durch Immunhistochemie. Der Forschungsgruppe gelang der A20-Nachweis in 76% der untersuchten CHL-Fälle (78/103). In 25 von 103 cHL-Fällen konnte das A20-Protein immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden, dies entspricht 24%. Alle Proben mit negativem A20-Proteinnachweis waren EBV-negativ. Die Forscher gehen davon aus, dass der A20-Proteinverlust mit dem Ber-A20-Antikörper immunhistochemisch mit einer Sensitivität ähnlich den komplexen molekulargenetischen Untersuchungsmethoden diagnostiziert werden kann (Hirsch et al. 2012). Sie beziehen sich dabei auf Daten von Schmitz et al. die A20-Mutationen in 44% ihrer molekulargenetisch untersuchten HL-Proben fanden. In der vorliegenden Untersuchung zeigte der Antikörper eine Sensitivität von 80%, eine Spezifität von ca. 73%.

16 Proben mit bekanntem Mutationsstatus wurden immunhistochemisch mit dem Ber-A20-Antikörper aufgearbeitet. 9 Proben zeigten eine positive A20-Färbung (56%). Das heißt A20 wird in diesen Zellen exprimiert, es dürfte dementsprechend keine Mutation vorliegen, die einen Verlust der

A20-Expression zur Folge hatte. In 7 Proben konnte das A20-Protein immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Anschließend wurden die immunhistochemischen Ergebnisse mit den Ergebnissen der Mutationsanalyse verglichen. Innerhalb der 5 Proben mit nachgewiesener TNFAIP₃-Mutation, konnte die fehlende Expression des A20-Proteins in 4 Fällen bestätigt werden (4/5). Unter den 11 Hodgkin-Lymphom-Proben ohne molekulargenetische nachgewiesener Mutation im TNFAIP₃-Gen, konnte in 8 Fällen die Expression des Proteins auch immunhistochemisch mit den A20-AK festgestellt werden (8/11), lediglich in 3 Fällen zeigte der AK nicht das Vorhandensein des Proteins an. Es handelt sich um eine signifikante Beziehung zwischen fehlender A20-IHC Expression und positiven TNFAIP₃-Mutationsstatus ($p = 0,041$), wie auch von Hirsch et al. 2012 publiziert. Alle von Hirsch et al. als A20-negativ diagnostizierten Proben wiesen einen negativen EBV-Nachweis auf. Auch in unserer Untersuchung waren alle Proben mit negativen A20 Nachweis (d. h. A20 wird nicht exprimiert), in der Immunhistochemie EBV-negativ. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Analyseergebnissen von Schmitz et al. überein.

Abschließend betrachtet stellt der neue Ber-A20-Antikörper eine kostengünstige und deutlich weniger aufwendige Alternative zu molekulargenetischen Untersuchungen dar. Jedoch muß darauf hingewiesen werden, dass die Spezifität mit ca. 73% noch relativ gering ist, dass heißt es werden zu viele falsch positive Proben detektiert. Insofern kann die A20 Immunhistochemie den molekulargenetischen Nachweis einer TNFAIP₃-Mutation zur Zeit nicht ersetzen.

7. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend betrachtet, ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, die Bedeutung des TNFAIP₃-Gen als Tumorsuppressorgen zu bestätigen. In erster Linie ist hierfür die Funktion des A20-Proteins als Inhibitor der Tumornekrosefaktor-(TNF)-vermittelten NF-κB-(Nuklear-factor-kappa B)-Aktivität als verantwortlich zu sehen (Wertz et al. 2004). Da fast jeder Tumor mit einer chronischen NF-κB-Aktivierung einhergeht, gilt A20 als Tumorsuppressor in gesunden Geweben (Hymowitz, Wertz 2010). Es konnte bestätigt werden, dass es im klassischen Hodgkin-Lymphom häufig zu Mutationen im TNFAIP₃-Gen kommt. Insgesamt zeigte sich eine Prävalenz der Mutation im Gen von 21,6% (8 von 37 Proben). Damit liegen unsere Ergebnisse nur wenig unterhalb der bereits publizierten Ergebnisse (Schmitz et al. 2009). Ursächlich hierfür sind vor allem methodische Unterschiede in der Materialgewinnung (Mikrodissektion).

Die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) zählt zu den Risikofaktoren eines Hodgkin-Lymphoms. In der westlichen Welt sind in ca. 40% aller Hodgkin-Lymphom-Fälle die HRS-Zellen mit dem EBV infiziert (Küppers 2009). Mit Hilfe der EBER-in situ-Hybridisierung (ISH) wurden in dieser Arbeit die Proben auf eine latente EBV-Infektion hin untersucht. In 19% konnte eine Infektion nachgewiesen werden (7 von 37 Proben). Einen pathogenetischer Zusammenhang einer EBV-Infektion mit der Ausbildung eines Hodgkin-Lymphom vom gemischtzellulären Subtyp ist sehr wahrscheinlich, da sich die meisten EBV-Infektionen in MCHL-Proben fanden (41,6%).

Die Mutationsanalyse zeigte, dass alle Mutationen in EBV-negativen Tumormaterial nachgewiesen werden konnten. Somit kann die Aussage der Forschungsgruppe um Schmitz et al. und Hirsch et al. bestätigt werden, dass Mutationen im TNFAIP₃-Gen häufiger in EBV-negativen Hodgkin-Lymphomen zu finden sind, als in Tumoren mit positivem EBV-Status. Dies bestätigt auch die Theorie, dass eine Mutation im TNFAIP₃-Gen und die EBV-Infektion unterschiedliche Mechanismen bei der Tumorgenese darstellen und hebt die pathogenetische Bedeutung einer latenten EBV-Infektion im Hodgkin-Lymphom nochmals hervor.

Im Gegensatz zu aufwendigen Mutationsanalysen mittels PCR haben sich in der alltäglichen Routinepraxis Proteinantikörper zum Proteinnachweis als praktisch erwiesen. Der von Hirsch et al. entwickelte Antikörper zur Detektion unmutierter A20-Proteine (Proteinnachweis) zeigte in dieser Untersuchung eine Sensitivität von 80% sowie eine Spezifität von ca. 73%. Damit stellt der Antikörpereinsatz zwar prinzipiell eine günstige und schnelle Alternative in der Diagnostik A20-

defizienter Gewebe dar, er kann zur Zeit jedoch den molekulargenetischen Nachweis einer TNFAIP₃-Mutation nicht ersetzen.

Sicher sind noch nicht alle pathogenetischen Mechanismen in der Entstehung eines Hodgkin-Lymphoms erklärt und verstanden. Die Bedeutung von A20 und seinem Verlust durch inaktivierende Mutationen gilt als hinreichend bewiesen. In der Zukunft wird es weitere Untersuchungen geben müssen, um zu klären, in wie fern das Protein als diagnostischer und prognostischer Marker verwendet werden kann. A20 ist nicht nur in der Tumorgenese ein wichtiges Protein, auch die zytoprotektive und antiinflammatorische Funktion im Rahmen von Autoimmunerkrankungen stellt ein interessantes Forschungsgebiet dar.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Altschul S, Gish W, et al. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3):403–10.
- Armitage J (2011) Clinical Evaluation. In: *Hodgkin Lymphoma - A Comprehensive Update On Diagnostics and Clinics* (Engert, A., ed), pp 65-76 Springer.
- Bechtel D, Kurth J, Unkel C, Küppers R. 2005. Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood* 106:4345–50.
- Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renne C, Hansmann M-L, Küppers R. 2006. Molecular biology of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Cancer* 118:1853–61.
- Caldwell R. G., Wilson J. B., Anderson S. J. and Longnecker R. 1998. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9, 405-411.
- Chen Y, Pacyna-Gengelbach M, Ye F et al. 2007. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) has a potential tumor- suppressive activity in human lung cancer. *Journal of Pathology* 211:431-438.
- Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q et al. 2009. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009; 459: 717–721.
- Diehl V, Klimm B, Re D. 2005. Hodgkin lymphoma: a curable disease. What comes next? *Eur. J. Haematol. Suppl.* 75:6–13.
- Ea C K, Deng L, Xia ZP, et al. 2006. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22(2): 245-.
- Eichenauer DA, Engert A, Dreyling M. 2011. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 22 Suppl 6:vi55-58.
- Engert A, Diehl V, Franklin J, Lohri A, Dorken B, Ludwig WD, et al. 2009. Escalated-dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 years of follow-up of the GHSG HD9 study. *J Clin Oncol* 27:4548-4554.

- Engert A, Plutschow A, Eich HT, Lohri A, Dorken B, Borchmann P, et al. 2010. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 363:640-652.
- Fuchs M 2009. Hodgkin-Lymphome. Available from: <http://www.dgho-onkopedia.de/onkopedia/leitlinien/hodgkin-lymphome>.
- Hartmann S, Martin-Subero I, Gesk S et al. 2008. Detection of genomic imbalances in microdissected Hodgkin- and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma by array based comparative genomic hybridization. *Haematologica*. 93:1318–1326.
- Hayden MS and Ghosh S. 2004. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev*. 18: 2195-2224
- Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, et al. 2002. Nuclear-factor- κ B dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J. Exp. Med*. 196:605–17.
- Hirsch B, Grünbaum M, Wagner F et al. 2012. A novel A20 (TNFAIP₃) antibody (Ber-A20) can be used to detect unmutated A20 by immunohistology. *Histopathology*. 60:19–27.
- Hodgkin T. 1832. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med. Chir. Trans*. 17:68–114.
- Holtrick U, Vockerodt M, Pinkert D et al. 2005. STAT3 is essential for Hodg kin lymphoma cell proliferation and is a target of tyrphostin AG17 which confers sensitization for apoptosis. *Leukemia* 19:936-944.
- Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, et al. 2008. TNFAIP3 is the target gene of chromosome band 6q23.3-q24.1 loss in ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 47(1): 1-7.
- Huang X, Nolte I, Gao Z et al. 2011. Epidemiology of Classical Hodgkin Lymphoma and its Association with Epstein Barr Virus in Northern China. *PloS ONE* 6(6):e21152. Doi:10.1371/journal.pone.0021152.
- Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, et al. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Berlin 2010. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.

- Hymowitz SG, Wertz IE. 2010. A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nat Rev Cancer*.10:332–41.
- Jost PJ, Ruland J 2007. Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences and therapeutic implications. *Blood* 109:2700-2707.
- Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. 1996. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 184:1495–505.
- Kato M, Sanada M, Kato I, et al. 2009. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 459:712–6.
- Küppers R, Klein U, Schwering I, Distler V, Bräuninger A, et al. 2003. Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J. Clin. Invest.* 111:529–37.
- Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, et al. 1994. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*91:10962–66.
- Küppers R. 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 5:251-262.
- Küppers, R. 2009. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat. Rev. Cancer*. 9:15–27.
- Kutok JL and Wang F. 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1:375-404.
- Malynn BA, Ma A. 2009. A20 takes on tumors: tumor suppression by an ubiquitin-editing enzyme. *JexpMed*. 206:977–80.
- Mancao C, Hammerschmidt W. 2007. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B cell receptor mimic and essential for B cell survival. *Blood* 110:3715–21
- Mani H, Jaffe ES 2009. Hodgkin Lymphoma: An update on its biology with newer insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma* 9(3): 206–216.
- Mathas S, Dörken B, et al. 2009. Die molekulare Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms. *Dtsch Med Wochenschr* 2009; 134:1944-1948.

- Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, et al. 2002. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF- κ B. *EMBO J.* 21:4104–13.
- Morton LM, Wang SS, Devesa SS et al. 2006. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107:265-276.
- Nagel D, Vincendeau M, Eitelhuber AC, Krappmann D. 2014. NF- κ B activation in B-cell lymphoid malignancies, *Oncogene* 33, 5655–5665
- O'Shea JJ, Murray PJ 2008. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28(4): 477-87.
- Reed, D 1902. On the pathological changes in Hodgkin's disease with special reference to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hospital Reports*, 10, 133–193.
- Rosdahl N, Larsen SO, Clemmesen J 1974. Hodgkin's disease in patients with previous infectious mononucleosis: 30 years' experience. *Br Med J* 2(5913): 253-6.
- Rosenwald A (2011) Pathology and Molecular Pathology of Hodgkin Lymphoma. In: Hodgkin Lymphoma A Comprehensive Update on Diagnostics and Clinics (Engert, A., Horning SJ., ed), pp 33-48 Heidelberg: Springer-Verlag.
- Rosenwald A, Küppers R. 2010. Pathologie und molekulare Pathologie des Hodgkin-Lymphoms. *Der Onkologe* 2010.16:9-17.
- Rüdiger T. 2000. Diagnostik und Differentialdiagnose der Hodgkin-Lymphome. *Der Onkologe* 2000.6-1142-1150.
- Schmitz R, Hartmann S, Giefing M, Mechttersheimer G, Zuhlke-Jenisch R, et al. 2007. Inactivating mutations of TNFAIP₃ (A20) indicate a tumor suppressor role for A20 in Hodgkin's lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *Haeamtologica/Hematol. J.* 92(Suppl. 5):41 (Abstr.)
- Schmitz R, Stanelle J, Hansmann M-L, Küppers R. 2009. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol.* 4:151-174.
- Schmitz, R, Hansmann ML, Bohle V, et al. 2009. TNFAIP₃ (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin's lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp. Med.* 206:981–989.

- Schwering I, Bräuninger A, Klein U, et al. 2003. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*.101:1505-1512.
- Stein H, Marafioti T, Foss HD, Laumen H, Hummel M, et al. 2001. Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood* 97:496–501.
- Sternberg C 1898. Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Z. Heilkunde* 19, 21–90.
- Swerdlow AJ. Epidemiology of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2003 30 Suppl 1:S3-12.
- Thomas RK, Re D, Zander T, Wolf J, Diehl V. Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology* 2002 13 Suppl 4:147-152.
- Torlakovic E, Tierens A, Dang HD et al. 2001. The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 159(5):1807–14.
- Ushmorov A, Ritz O, Hummel M, Leithauser F, Moller P, et al. 2004. Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood* 104:3326–34.
- Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. 2009. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP₃) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol.* 30:383–91.
- Verstrepen L, Verhelst K, Loo G, et al. 2010. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP₃). *Biochem Pharmacol.*
- Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, et al. 2004. De-ubiquitination and ubiquitinligase domains of A20 downregulate NF-κB signalling. *Nature* 430:694–99.
- Wu CJ, Conze DB, Li T, et al. 2006. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NfκappaB activation. *Nat Cell Biol* 8(4): 398-406.
- Zahng F, Yang L, Li Y 2012. The role of A20 in the pathogenesis of lymphocytic malignancy. *Cancer Cell International* 12:44.

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassisches Hodgkin-Lymphom vom Mischtyp.....	13
Abbildung 2: Risikofaktoren mit Stadieneinteilung zur Therapieplanung.....	17
Abbildung 3: Algorithmus für die stadiengerechte Therapie nach S 3-Leitlinie.....	18
Abbildung 4: NF- κ B Untereinheiten Schematische Darstellung der 5 Mitglieder der NF- κ B Familie	20
Abbildung 5: NF- κ B-Aktivierungswege.....	22
Abbildung 6: TNFAIP3-Genstruktur.....	25
Abbildung 7: Subtypenklassifizierung nach WHO.....	44
Abbildung 8: Subtypenverteilung nach Geschlecht.....	45
Abbildung 9: Gesamtaltersverteilung des cHL nach Geschlecht.....	46
Abbildung 10: Alters- und Geschlechtsverteilung des NSHL.....	46
Abbildung 11: Alters- und Geschlechtsverteilung des MCHL.....	47
Abbildung 12: Grafische Auswertung Mutationsanalyse, Beispiel 1.....	51
Abbildung 13: Grafische Auswertung Mutationsanalyse, Beispiel 2.....	51
Abbildung 14: EBER-ISH positiv.....	52
Abbildung 15: EBER-ISH negativ.....	52
Abbildung 16: A20-Antikörper positiv.....	56
Abbildung 17: A20-Antikörper negativ.....	56
Abbildung 18: Inzidenzen 2012 im Vergleich.....	57
Abbildung 19: Inzidenz, Altersstandardisierte Rate in Deutschland pro 100.000 Einwohner 2000- 2010.....	59
Abbildung 20: Vergleich Inzidenzraten ASR(W).....	59

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinisches Staging des Hodgkin-Lymphoms nach der Ann-Arbor-Klassifikation.....	12
Tabelle 2: WHO-Klassifikation (2008).....	14
Tabelle 3: Kollektiv Mutationsanalyse.....	30
Tabelle 4: Subtypenverteilung der zur Mutationsanalyse untersuchten Proben nach WHO 2008.....	48
Tabelle 5: Anzahl der mutierten Proben – Subtypverteilung.....	48
Tabelle 6: Lokalisation der Mutationen im TNFAIP3-Gen.....	49
Tabelle 7: Ergebnisse Mutationsanalyse.....	50
Tabelle 8: EBV-Nachweis und histologische Subtypen.....	53
Tabelle 9: EBV-Nachweis-Mutation.	53
Tabelle 10: Zusammenfassende Übersicht.....	54
Tabelle 11: A20 Immunhistochemie im Vergleich zur TNFAIP3-Mutationsanalyse.....	55
Tabelle 12: Übersicht der wichtigsten epidemiologischen Daten für Deutschland 2012.....	58
Tabelle 13: Altersspezifische Inzidenz 2012 Deutschland.....	59
Tabelle 14: Vergleich der histologischen Subtypen Population Jena - Deutschland.....	60
Tabelle 15: Vergleich der epidemiologischen Daten bezogen auf den histologischen Subtyp.....	61

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Iver Petersen, Dr. Yuan Chen, Melanie Gerth,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Weimar, 20.09.2015

Barbara-Magdalena Etzel