

Aus der Klinik der Inneren Medizin I
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

Die onkogenen Effekte der B-Zell-spezifischen Mutation von *MYD88*^{L265P} im autochthonen Mausmodell

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Darya Korovkina
aus Smila (Ukraine)

promoviert am 13. Januar 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. med. H. C. Reinhard
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. H. Kashkar

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Herr Dr. Gero Knittel.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir unter Betreuung von Hr. Dr. Knittel durchgeführt worden.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die initiale Entwicklung des Allels sowie die Kontrolle der korrekten Integration durch Southern Blot wurde von der Firma Taconic Biosciences umgesetzt.

Ich habe die nachfolgenden lentiviralen Transduktionsexperimente sowie die cDNA-Sequenzierungen an embryonalen Mausfibroblasten zur Bestätigung der Funktionalität des Alles durchgeführt.

Die weitere Betreuung der Mauskohorten sowie die entsprechenden Genotypisierungsexperimente und Ereigniszeitanalysen wurden von mir umgesetzt. Weiterhin führte ich die longitudinale Überwachung mit Hilfe der Magnetresonanztomographie durch.

Die Gewinnung des biologischen Mausmaterials für die histologischen Analysen erfolgte durch mich. Die weitere Verarbeitung der murinen und humanen Proben wurden durch die medizinisch-technischen Assistentinnen des Institutes für Pathologie der Uniklinik Köln vorgenommen. Die Auswertung der histologischen Ergebnisse erfolgte durch mich unter Anleitung des Pathologen Dr. Stephan Schäfer vom Institut für Pathologie der Uniklinik Köln.

Die Proben für die Southern Blot Analyse zur Untersuchung der Klonalität des murinen Läsionen wurden von mir gewonnen und im Folgenden von Dr. Mona Al-Maarri vom Max-Planck-Institut für Stoffwechselforschung in Köln verarbeitet.

Das Targeted Sequencing und die Prozessierung der Rohdaten des humanen Materials wurden durch Prof. Dr. Margarete Odenthal vom Institut für Pathologie der Uniklinik Köln durchgeführt. Die Analyse und Visualisierung der Mutationstabelle erfolgte durch mich.

Die Betreuung der *Myd88*^{c-p.L252P/wt}; *Rosa26*^{LSL.BCL2.IRES.GFP/wt}; *Cd19*^{Cre/wt} -Mauskohorte sowie die Ereigniszeitanalysen wurden durch Dr. Paul Liedgens durchgeführt. Die Verlaufsbeobachtung mithilfe von Magnetresonanztomographie wurde von mir umgesetzt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 12.07.2024

Darya Korovkina

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. ZUSAMMENFASSUNG	15
2. EINLEITUNG	16
2.1. DLBCL	16
2.2. Klassifikation	17
2.2.1. Klassifizierung nach der Ursprungszelle	17
2.2.2. Genetische Klassifikation	18
2.3. Pathogenese	20
2.4. Molekularbiologische Mechanismen des ABC-DLBCL	23
2.4.1. NF- κ B	24
2.4.2. MYD88	30
2.4.3. Kooperation zwischen dem BZR- und dem TLR-Signalwegen	33
2.4.4. BCL2	33
2.4.5. Ziel der Dissertation	36
3. MATERIAL UND METHODEN	38
3.1. Material	38
3.2. Methoden	41
3.2.1. Gezielte Genmodifikation	41
3.2.2. Southern Blot	41
3.2.3. Validierung des Allelkonstrukts	41
3.2.4. Betreuung der Mauskohorten	42
3.2.5. Genotypisierung	43
3.2.6. Magnetresonanztomographie	45
3.2.7. Ereigniszeitanalysen	45
3.2.8. Histologische und immunhistologische Charakterisierung	45
3.2.9. Klonalitätsanalysen per Southern Blot	45
3.2.10. Mutationsanalyse der humanen DLBCL-Kohorte	46
4. ERGEBNISSE	47
4.1. Konditionales Maus-Allel mit B-Zell-spezifischer Expression von <i>Myd88</i> ^{c-p.L252P}	47
4.2. Das generierte <i>Myd88</i> ^{c-p.L252P} -Allel ermöglicht die konditionale Expression von <i>Myd88</i> ^{p.L252P}	50
4.3. Die B-Zell-spezifische Expression von <i>Myd88</i> ^{p.L252P} führt zu verkürztem Gesamtüberleben und lymphoproliferativen Organmanifestationen	51

4.4.	<i>Myd88</i>^{p.L252P} verursacht Infiltrate mit lymphoproliferativer Morphologie und führt gelegentlich zur Entwicklung eines DLBCL-ähnlichen Phänotyps	52
4.5.	<i>Myd88</i>^{p.L252P} führt gelegentlich zur Lymphoproliferation klonalen Ursprungs	55
4.6.	ABC-DLBCL zeigt eine hohe BCL2-Expression	57
4.7.	Die Kooperation zwischen <i>Myd88</i>^{p.L252P} und <i>BCL2</i>-Überexpression beschleunigt die Entwicklung einer lymphoproliferativen Erkrankung vom ABC-DLBCL-Typ	58
5.	DISKUSSION	61
6.	LITERATURVERZEICHNIS	64

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

32P- α -CTP	Mit Phosphorisotop ^{32}P an der α -Phosphatgruppe radioaktiv markiertes Cytidintriphosphat
A1	engl. <i>BCL2 related protein A1</i>
A20	siehe <i>TNFAIP3</i>
A53	Cluster der gen. Klass., charakterisiert durch Alterationen von <i>TP53</i>
AID	engl. <i>Activation-Induced Cytidine Deaminase</i> , Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
Aid	<i>Aid</i> ^{Cre/wt} -Mauslinie
ABC-DLBCL	engl. <i>Activated B Cell Like</i> , aktivierten B-Zellen ähnliche DLBCL
Arg	Arginin
ATM	engl. <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Med. Fachgesellschaften
B220	Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C
BAC	engl. <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BAD	engl. <i>BCL2 Associated Agonist of Cell Death</i>
BAFF	engl. <i>B-cell Activating Factor</i>
BAK	engl. <i>BCL-2 Antagonist/Killer</i>
Baul	Restriktionsendonuklease, welche die 5'-C [^] ACGAG-3'- und 3'-GAGCA [^] C'-Sequenzen erkennt
BAX	engl. <i>BCL-2-Associated X Protein</i>
B-Cd19	<i>Rosa26</i> ^{LSL.BCL2.IRES.GFP/wt} x <i>Cd19</i> ^{Cre/wt} -Mauslinie
Bcl	<i>Rosa26</i> ^{LSL.BCL2.IRES.GFP/wt} -Mauslinie
BCL2	engl. <i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BCL2L11	engl. <i>B-Cell-Lymphoma-2-Like 11</i>
BCL6, Bcl6	engl. <i>B-Cell Lymphoma 6</i>

<i>BCL10</i>	engl. <i>B-Cell Lymphoma 10</i>
BCL2-W	engl. <i>Bcl-2-Like Protein 2</i>
BCL-XL	engl. <i>B-Cell Lymphoma-Extra Large</i>
BH3	engl. <i>BCL-2 Homology 3</i>
BID	engl. <i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
BIK	engl. <i>BCL2 Interacting Killer</i>
BIM, Bim	siehe BCL2L11
BioMaSOTA	Biologische Material Sammlung zur Optimierung Therapeutischer Ansätze
BL/6N	Bezeichnung der Mausinzuchtlinie
<i>BLIMP1</i>	engl. <i>B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1</i> , Synonym <i>PRDM1</i>
BLINK	engl. <i>B-Cell Linker Protein</i>
BMF	engl. <i>BCL2 modifying factor</i>
BN2	Cluster der gen. DLBCL Klass., charakterisiert durch Veränderungen von <i>BCL6</i> und der NOTCH2-Signalkaskade
BTK	Brutons Tyrosinkinase
BZR	B-Zell Rezeptor
C57BL/6N	Bezeichnung der Mausinzuchtlinie
CAGGS-Promoter	Synthetischer Promoter bestehend aus den Nukleotidbasen Cytosin (C), Adenin (A), Guanin (G) und einer spezifischen Splicesequenz (S)
CAR	chimäre Antigenrezeptoren
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
<i>CARD11</i>	engl. <i>Caspase Recruitment Domain Family Member 11</i> , Caspasenrekrutierungsdomäne Familienmitglied 11
<i>CARMA1</i>	engl. <i>CARD-Containing MAGUK Protein 1</i>
CBM-Komplex	Proteinkomplex aus <i>CARD11</i> , <i>BCL10</i> und <i>MALT1</i>
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i> , Oberflächenmarker von Zellen
Cd19	<i>Cd19^{Cre/wt}</i> -Mauslinie

Cd21	<i>Cd21^{Cre/wt}</i> -Mauslinie
CDKN2A	engl. <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i> , Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A
cDNA	engl. <i>complementary DANN</i> , komplementäre DNS
<i>Cg1</i>	engl. <i>Immunoglobulin Gamma1 Heavy Chain Constant Region Gene</i>
CNPY3	engl. <i>Canopy FGF Signaling Regulator 3</i>
COO	engl. <i>Cell of Origin</i> , Ursprungszelle
CpG	5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'
Cre	engl. <i>Cre recombinase (causes recombination)</i> , Cre-Rekombinase
CRE	engl. <i>cAMP-responsive element</i>
CREB	engl. <i>CRE-Binding Protein</i> , CRE-bindendes Protein, s. CRE
<i>CREBBP</i>	engl. <i>CREB-Binding Protein</i> , CREB-bindendes Protein, s. CREB
C-REL	Protein aus der NF-κB-Transkriptionsfaktorfamilie
CSR	engl. <i>Class Switch Recombination</i> , Antikörperklassenwechsel
D	engl. <i>diversity</i>
<i>DDX3X</i>	engl. <i>DEAD-box Helicase 3 X-Linked</i>
DICOM	engl. <i>digital imaging and communications in medicine</i> , dt. digitale Bildgebung und Kommunikation in der Medizin
DLBCL	engl. <i>Diffuse Large B-cell Lymphoma</i> , diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DLBCL NOS	engl. <i>Not Otherwise Specified</i> , DLBCL, nicht weiter spezifiziert
DMEM	engl. <i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	engl. Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dsRNA	engl. <i>double-stranded Ribonucleic Acid</i> , Doppelstrang-Ribonukleinsäure
Eco91I	Restriktionsendonuklease, welche die 5'-G ^A GTNACC-3' und 3'-CCANTG ^A G-5'-Sequenzen erkennt

EcoRI	Restriktionsendonuklease, welche die 5'-G ^A AATTC-3'- und 3'-CTTAA ^G -5'-Sequenzen erkennt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E μ : <i>TCL1</i>	Mauslinie, die das <i>TCL1</i> -Gen (engl. <i>T-cell Leukemia/Lymphoma 1</i>) unter Kontrolle des VH-Promoter-IgH-E μ exprimiert
<i>EP300</i>	Histonacetyltransferase P300 Gen
ERK	engl. <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
<i>ETV6</i>	engl. <i>ETS Variant Transcription Factor 6</i>
<i>EZH2</i>	engl. <i>Enhancer of Zeste Homolog 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
EZB	Cluster der gen. DLBCL-Klass. charakterisiert durch <i>BCL2</i> -Translokationen u. Mutationen chromatinmodifizierender Enzyme wie EZH
F3	Flankierungssequenzen um die Puromycinresistenzkassette
FBS	engl. <i>Fetal Bovine Serum</i> , fetales Kälberserum
<i>FBXW7</i>	engl. <i>F-box and WD Repeat Domain Containing 7</i>
fl	engl. <i>Flox, flanked by two Lox P sites</i>
Frt	engl. <i>Flippase Recognition Target</i>
fwd	engl. <i>forward</i>
GC	engl. <i>Germinal Center</i> , Keimzentrum
GCB-DLBCL	engl. <i>Germinal Center B-Cell Like</i> , keimzentrumsartige DLBCL
<i>GNA13</i>	engl. <i>G Protein Subunit Alpha 13</i>
HEBS	engl. <i>HEPES-Buffered Saline</i> , HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEK293T	Humane embryonale Nieren 293-Zellen, die das große T-Antigen des Simian Virus exprimieren; von engl. <i>Human Embryonic Kidney</i>
HindIII	Restriktionsendonuklease, welche die 5'-AAGCTT-3-Sequenz erkennt
HLA	Humanes Leukozytenantigen

HRK	Harakiri, engl. <i>BCL2 Interacting Protein</i>
HSP110	engl. <i>Heat Shock Protein 110</i> , Hitzeschockprotein 110
Igα	s. CD79A
Igβ	s. CD79B
IgH	engl. <i>Immunoglobulin Heavy Chain</i> , Immunglobulinschwerkette
IgM	Immunglobulin M
<i>IGLL5</i>	engl. <i>Immunoglobulin Lambda Like Polypeptide 5</i>
IKK	engl. <i>Inhibitor of NF-κB Kinase 2</i>
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IRAK	IL-1R-assoziierte-Kinase
Irf4	engl. <i>Interferon Regulatory Factor 4</i>
ITAMs	engl. <i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motifs</i>
J	engl. <i>joining</i>
JAK-STAT3	Janus-Kinase-Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription 3
JNK	engl. <i>c-Jun-N-Terminal Kinases</i>
Kapa 2G HS	Hot Start PCR-Kit der zweiten Generation der Firma Roche
Ki67	Protein, das als Proliferationsmarker dient
<i>KMT2D</i>	engl. <i>Histone-Lysine N-Methyltransferase 2D</i> , s. a. <i>MLL</i>
KpnI	Restriktionsendonuklease, welche die 5'-GGTAC [^] C-3'-Sequenz erkennt
LAH	engl. <i>Long Arm of Homology</i>
Leu	Leucin
LPL	Lymphoplasmazytisches Lymphom
LRR	engl. <i>Leucine-Rich Repeat</i>
LYN	engl. <i>Lck/Yes-Related Novel Protein Tyrosine Kinase</i>
M	1. <i>Myd88</i> ^{c-p.L252P/wt} -Mauslinie (Text), 2. Milz (Abb.)

M-Aid	<i>Aid</i> ^{Cre/wt} ; <i>Myd88</i> ^{c-p.L252P/wt} -Mauslinie
M-B-Cd19	<i>Myd88</i> ^{c-p.L252P/wt} x <i>Rosa26</i> ^{LSL.BCL2.IRES.GFP/wt} x <i>Cd19</i> ^{Cre/wt} -Mauslinie
M-Cd19	<i>Myd88</i> ^{c-p.L252P/wt} x <i>Cd19</i> ^{Cre/wt} -Mauslinie
M-Cd21	<i>Cd21</i> ^{Cre/wt} ; <i>Myd88</i> ^{c-p.L252P/wt} -Mauslinie
MAP-Kinase	engl. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCD	Cluster der gen. DLBCL-Klass. charakterisiert durch <i>MYD88</i> ^{p.L265P} und <i>CD79B</i> -Mutationen
MCL-1	engl. <i>Myeloid Cell Leukemia Sequence 1</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
<i>miR-17-92</i>	Mikro-RNA-Cluster 17-92
MMR	Mismatch Reparatur
<i>MLL</i>	engl. <i>Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia 1</i> , s. a. <i>KMT2D</i>
mRNA	engl. <i>Messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	engl. <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MW	Morbus Waldenström
<i>MYC, Myc</i>	Onkogen, das für den gleichnamigen Transkriptionsfaktor Myc oder auch c-myc kodiert
<i>MYD88</i>	engl. <i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i>
My-T-BCR	Proteinkomplex bestehend aus MyD88, TLR und BCR
N	Niere
N1	Cluster der gen. DLBCL-Klass. charakterisiert durch <i>NOTCH1</i> Mutationen
NaeI	Restriktionsendonuklease, welche 5'-GCC [^] GGC-3'-Sequenzen erkennt
Neo	Neomycin
NF-AT	engl. <i>Nuclear Factor of Activated T-Cells</i>
NF-κB	engl. <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells</i>

<i>NFKBIA, Nfkbia</i>	engl. <i>NF-κB Inhibitor Alpha</i> , Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF-κB
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NHEJ	engl. <i>Nonhomologous End-Joining</i> , nicht-homologe Endverknüpfung
<i>NOTCH1</i>	engl. <i>Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1</i>
<i>NOTCH2</i>	engl. <i>Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 2</i>
NOXA	s. PMAIP1
P38	engl. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Alpha</i>
P65	Synonym RelA
pA	Polyadenylierung
PAMPs	engl. <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
<i>PAX5</i>	engl. <i>Paired Box Protein Pax-5</i>
PBS	engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PGN	Peptidoglykan
PI3K	Phosphoinositidkinase 3
<i>PI3KCA</i>	engl. <i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
<i>PI3KCD</i>	engl. <i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Delta</i>
<i>PIM1, Pim1</i>	engl. <i>Proto-oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase</i>
PKC β	Proteinkinase C β
PMAIP1	engl. <i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1</i>
pMDL g/p RRE	lentivirales Verpackungsplasmid, das für die gag- und pol-Proteine des Wildtyp-HIV sowie für RRE (engl. <i>Rev responsive element</i>) kodiert
PolyA-Signal	Polyadenylierungssignal
<i>PRDM1</i>	engl. <i>Positive Regulatory Domain I-Binding Factor 1</i> , Synonym <i>BLIMP1</i>
Pro	Prolin
P/S	Penicillin/Streptomycin

<i>PTEN</i>	engl. <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
<i>PTPN6</i>	engl. <i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 6</i>
PUMA	engl. <i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>
Puro	Puromycin
<i>RAG1/2</i>	engl. <i>Recombination-Activating Genes 1/2</i>
R26	ROSA26
<i>RB1</i>	engl. <i>Retinoblastoma 1</i>
R-CHOP	Rituximab - Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Prednisolon
<i>REL</i>	Gen, welches das c-Rel-Protein kodiert
<i>RELA</i>	Gen, welches das gleichnamige Protein RelA kodiert
RELA/RelA	Protein aus der NF-κB-Transkriptionsfaktorfamilie
<i>RELB</i>	Gen, welches das gleichnamige Protein RelB kodiert
RELB/RelB	Protein aus der NF-κB-Transkriptionsfaktorfamilie
rev	engl. <i>reverse</i>
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RSV-rev	Rev cDNA exprimierendes Plasmid unter Transkriptionskontrolle durch den Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) U3 Promoter
SAH	engl. <i>Short Arm of Homology</i>
SDS	engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
<i>SF3B1</i>	engl. <i>Splicing Factor 3B Subunit 1</i>
<i>SGK1</i>	Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Proteinkinase 1
SHM	somatische Hypermutation
Src	Tyrosinkinase Src
ssRNA	engl. <i>single-stranded RNA</i> , Einzelstrang-RNA
ST2	Cluster der gen. Klass. Charakterisiert durch <i>SGK1</i> und <i>TET2</i> -Mutationen

<i>STAT3, Stat3</i>	engl. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
SYK	engl. <i>Spleen Tyrosin Kinase</i>
<i>TET2</i>	engl. <i>Ten-Eleven Translocation Methylcytosin Dioxygenase 2</i>
TIR	engl. <i>Toll-Interleukin-1 Receptor</i>
TIRAP	engl. <i>TIR Domain Containing Adaptor Protein</i>
TLR	engl. <i>Toll-Like Receptor</i> , Toll-like Rezeptor
<i>TNFAIP3</i>	engl. <i>Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 3</i> , Synonym A20
<i>TOX</i>	engl. <i>Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box</i>
<i>TP53</i>	engl. <i>Tumor Protein 53</i>
TRAM	engl. <i>TRIF-Related Adaptor Molecule</i>
TRIF	engl. <i>TIR-Domain-Containing Adapter-inducing Interferon-β</i>
TZR	T-Zell Rezeptor
UNC93B1	engl. <i>Unc-93 Homolog B1</i>
UTR	untranslatierte Region
V(D)J- Umlagerung	genetischer DNA-Umstrukturierungsprozess zur Erhöhung der Vielfalt von Immunglobulinen unter Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente der Immunglobulin-DNA
V	engl. <i>variable</i>
VSV-G	Glykoprotein aus dem vesikulären Stomatitis-Virus (VSV)
wt	wildtyp
<i>XPO1</i>	engl. <i>Exportin 1</i>

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) gehört zu den aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen und ist eine molekularbiologisch heterogene Erkrankung mit hoher genetischer Variabilität. In etwa 18% der Fälle finden sich *MYD88*-Mutationen (engl. *Myeloid differentiation primary response 88*); dabei handelt es meistens um die Variante *MYD88* L265P. Besonders häufig, in fast einem Drittel der Fälle, kommt *MYD88* L265P in der ABC- beziehungsweise Non-GCB-DLBCL Gruppe vor, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist.

Als Bestandteil des TLR-Signalweges und des My-T-BCR-Proteinkomplexes ist der Signaladapter MyD88 an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt, und bildet einen zentralen Knotenpunkt im Netzwerk der ABC-DLBCL-Tumorbiologie. Das Ziel dieser Arbeit war, einen Modellorganismus zu generieren, der unter Verwendung von *MYD88* L265P den Pathomechanismus der besonders aggressiven Subentität ABC-DLBCL simuliert.

Zu diesem Zweck wurde ein konditionales Allel entwickelt, das die B-Zell-spezifische Expression von *Myd88*^{p.L252P}, dem murinen orthologen Gen des humanen *MYD88*^{p.L265P}, aus seinem endogenen Locus ermöglicht. Ein funktionales Allel wurde generiert, das nach Cre-vermittelter Rekombination zur Expression der *Myd88*^{p.L252P} mRNA und dessen Translation in Protein führt. Beobachtungen an den transgenen Mäusen zeigten, dass die B-Zell-spezifische Expression von *Myd88*^{p.L252P} die Entstehung lymphoproliferativer Organmanifestationen induziert und mit einem verkürztem Gesamtüberleben assoziiert ist. Es wurde nicht nur die Entwicklung diffuser lymphoproliferativer Erkrankung beobachtet, sondern auch gelegentlich das Auftreten von Infiltraten, die morphologisch und immunhistochemisch dem ABC-DLBCL ähneln. Klonalitätsanalysen bestätigten, dass die umschriebenen Lymphoproliferationen mit DLBCL-ähnlicher Morphologie klonalen Ursprungs waren.

Es folgten weitere Untersuchungen einer humanen DLBCL-Kohorte. Hier zeigte sich erneut, dass der ABC-DLBCL-Subtyp überproportional häufig die *MYD88*^{p.L265P}-Mutation aufweist und mit einer erhöhten Expression von BCL2 korreliert. Um die humane Erkrankung möglichst realitätsnah zu simulieren, wurde das *Myd88*-Allel mit einem BCL2-Überexpressionsallel kombiniert. Die gleichzeitige *Myd88*^{p.L252P} Expression und *BCL2*-Überexpression *in vivo* provozierte die Entwicklung von Lymphomen, deren Morphologie und Immunphänotyp am ehesten dem ABC-DLBCL entsprechen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Mausmodell etabliert werden, das auf der B-Zell-spezifischen *Myd88*^{p.L252P}-Expression basiert und eine dem humanen ABC-DLBCL ähnliche Erkrankung reproduziert.

2. EINLEITUNG

2.1. DLBCL

Lymphome sind maligne, proliferative Erkrankungen, die durch die klonale Expansion neoplastischer Zellen des lymphatischen Systems entstehen. In Abhängigkeit von der Ursprungszelle werden T- und B-Zell-Lymphome unterschieden, wobei Letztere mit einem Anteil von etwa 80-90% deutlich häufiger auftreten (Lennert et al., 1975; Stein et al., 1972). B-Zell-Lymphome leiten sich von entarteten B-Lymphozyten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien ab (Kuppers et al., 1999). Anhand ihres klinischen Verlaufs können B-Zell-Lymphome weiter in indolente wie zum Beispiel das folliculäre Lymphom und aggressive Formen wie das Burkitt- und das diffus großzellige B-Zell-Lymphom unterteilt werden (Swerdlow et al., 2016). Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (engl. *diffuse large B cell lymphoma*, DLBCL) bildet den größten Teil der aggressiven B-Zell-Lymphome und ist mit einem Drittel der Fälle der häufigste Non-Hodgkin-Lymphomtyp überhaupt (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997). In der weißen Bevölkerung der Vereinigten Staaten von Amerika liegt die Inzidenz bei sieben Fällen pro 100.000 Einwohner (Morton et al., 2006). In Deutschland ist das DLBCL mit etwa 9000 Neuerkrankungen pro Jahr das häufigste Lymphom bei Erwachsenen (Prof. Dr. med. M. Pfreundschuh, 2023).

Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom ist definiert als eine Neoplasie aus großen B-Zellen, die in einem diffusen Muster angeordnet sind (Li et al., 2018; Swerdlow et al., 2016). Anhand morphologischer und immunphänotypischer Merkmale, klinischer Aspekte sowie der Assoziation zu bestimmten infektiösen Agenzien können weitere eigenständige Entitäten des DLBCL differenziert werden, die jedoch insgesamt eher selten vorkommen (Sukswai et al., 2020; Swerdlow et al., 2016). Der Großteil des DLBCL, etwa 80-85%, hat keine besondere klinische oder pathologische Merkmale, und wird daher unter der Bezeichnung „DLBCL, nicht weiter spezifiziert“ (engl. *Not otherwise specified*, NOS) zusammengefasst (Sukswai et al., 2020; Swerdlow et al., 2016). Das DLBCL NOS wird im weiteren Verlauf nur als DLBCL bezeichnet und ist Gegenstand dieser Arbeit.

Das DLBCL ist eine molekularbiologisch und klinisch sehr heterogene Erkrankung. Die einzelnen DLBCL-Fälle zeigen eine hohe Variabilität in ihren jeweiligen Genexpressionsmustern und genetischen Merkmalen. Die Exom-Sequenzierung von über tausend DLBCL-Fällen identifizierte 150 unterschiedliche Gene von pathogenetischer Relevanz mit einer Mutationsfrequenz von mehr als fünf Prozent (Reddy et al., 2017). Andere Studien lieferten ähnlich hohe Zahlen (Morin et al., 2013).

Trotz der vielfältigen Unterschiede wurde das DLBCL bislang nach dem „one-size-fits-all“-Prinzip mit einer Standardimmunchemotherapie mit R-CHOP, einer Kombination aus dem

CD20-Antikörper Rituximab (R) und den Chemotherapeutika Cyclophosphamid (C), Hydroxydaunorubicin (H), Vincristin (O) und Prednisolon (P) behandelt. Seit 2022 ist das neue Therapieschema Pola-R-CHP für die Erstlinientherapie zugelassen. Dabei wird das etablierte R-CHP mit dem Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Polatuzumab-Vedotin – ein monoklonaler CD79b-Antikörper, gekoppelt an das Zytostatikum Monomethyl-Auristatin E (Vedotin) – kombiniert (Leitlinienprogramm Onkologie; Tilly et al., 2022). Dabei zeigte sich eine signifikante Verbesserung des primären Endpunktes des progressionsfreien Überlebens (76.7% vs. 70.2% nach zwei Jahren), jedoch ergaben sich keine Unterschiede im Gesamtüberleben (Tilly et al., 2022). Die Heilungsraten des DLBCL liegen bei ca. 65% (Coiffier et al., 2010; Tilly et al., 2022), unterscheiden sich jedoch erheblich innerhalb der einzelnen Subtypen (Alizadeh et al., 2000; Lenz, Wright, et al., 2008; Rosenwald et al., 2002).

Die genetische und phänotypische Heterogenität des DLBCL lässt die Vermutung zu, dass es sich beim DLBCL um mehr als nur eine Tumorentität handelt. Die Anwendung von Genexpressionsanalysen revolutionierte das Verständnis vom DLBCL und ermöglichte eine genauere Klassifizierung der Erkrankung.

2.2. Klassifikation

Die Klassifikation des DLBCL differenzierte sich mit voranschreitender Forschung immer weiter aus. Während die Erkrankung zu Beginn ihrer Erforschung eher grob anhand von morphologischen und histologischen Merkmalen unterteilt wurde, berücksichtigt das heutige Klassifikationssystem der WHO mitunter ätiologische Faktoren und pathogenetische Mechanismen. Durch Anwendung neuer Forschungsergebnisse lassen sich neue Klassifikationssysteme etablieren.

2.2.1. Klassifizierung nach der Ursprungszelle

Genexpressionsanalysen gewähren einen umfassenden Einblick in die Pathogenese des DLBCL. In ihrem Genexpressionsprofil zeigen die Tumoren Ähnlichkeit zu B-Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, woraus sich die Klassifizierung entsprechend der mutmaßlichen Ursprungszelle (engl. *cell of origin*, COO) ableitet (Alizadeh et al., 2000). Es erfolgt eine Unterteilung in das keimzentrumsartige (engl. *germinal center B cell like*, GCB) DLBCL, das sich von B-Lymphozyten aus dem Keimzentrum ableitet, und in das aktivierten B-Zellen ähnliche (engl. *activated B cell like*, ABC) DLBCL, das am ehesten von aktivierten B-Zellen abstammt, welche die Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben und sich hin zu Plasmablasten, einem Entwicklungsstadium vor der terminalen Differenzierung zur Plasmazelle, differenzieren. Bis zu 90% der DLBCL-Fälle können nach dieser Methode klassifiziert werden. Es verbleiben dennoch 10-15%, die sich keinem der beiden Subtypen zuordnen lassen (Alizadeh et al., 2000).

Die neu identifizierten Subtypen unterscheiden sich voneinander in ihrem klinischen Verhalten und dem Therapieansprechen. Während GCB-DLBCL-Patienten eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 60% aufweisen, überleben nur 35% der ABC-DLBCL-Patienten die ersten fünf Jahre nach der Chemotherapie (Alizadeh et al., 2000; Reddy et al., 2017; Rosenwald et al., 2002).

2.2.2. Genetische Klassifikation

Obwohl die Klassifizierung nach der Ursprungszelle eine Unterteilung des DLBCL in die drei Subtypen ABC, GCB und „unklassifizierbar“ ermöglicht, sind die genannten Untergruppen dennoch recht heterogen in ihrem klinischen Verhalten, was darauf hindeutet, dass die neu identifizierten Subtypen wiederum aus unterschiedlichen Entitäten bestehen könnten (Rosenwald et al., 2002).

Die Auswertung großer Sequenzierungsdatenvolumina brachte zutage, dass bestimmte genetische Aberrationen miteinander assoziiert sind und gehäuft gemeinsam auftreten. Basierend auf dem Mutationsprofil wurden unabhängig voneinander zwei Klassifikationssysteme erarbeitet, die sechs (Schmitz et al., 2018; Wright et al., 2020) beziehungsweise fünf (Chapuy et al., 2018) genetische Subtypen/Cluster des DLBCL definieren. Nach diesen Klassifikationen kann das ABC-DLBCL in vier weitere Subtypen, nämlich MCD/C5, N1, A53/C2 und BN2/C1, und das GCB-DLBCL in die drei Untergruppen EZB/C3, ST2/C4 und BN2/C1 unterteilt werden (Abb. 1). Die Gruppe der unklassifizierbaren DLBCLs setzt sich vornehmlich aus BN2-Fällen zusammen (Chapuy et al., 2018; Schmitz et al., 2018; Wright et al., 2020).

Beinahe identisch stellt sich das MCD Cluster aus der „LymphGen“-Klassifikation beziehungsweise das Cluster C5 von Chapuy et al. dar. Diese Untergruppe setzt sich fast ausschließlich aus Fällen von ABC-DLBCL zusammen und ist gekennzeichnet durch gemeinsames Auftreten von *MYD88* p.L265P- und *CD79B*-Mutationen. Hinzu kommen prognostisch relevante 18q-Amplifikationen des chromosomalen Lokus des anti-apoptotischen *BCL2*-Gens und die Deaktivierung von *PRDM1*.

Eine weitere durch beide Klassifikationen sehr ähnlich beschriebene Untergruppe ist das C2 Cluster von Chapuy et al., definiert durch die Inaktivierung oder den Verlust von Tumorsuppressorgenen wie *TP53*, *CDKN2A*, *RB1* und andere strukturelle Variationen. Sie umfasst laut der Arbeit von Chapuy et al. sowohl GCB- als auch ABC-DLBCL-Tumore. Das Pendant hierzu aus der „LymphGen“-Klassifikation ist die Subgruppe A53, definiert durch Aneuploidie und *TP53*-Inaktivierung, bestehend vor allem aus Fällen des ABC-DLBCL.

Eine weitere Untergruppe aus der „LymphGen“-Klassifikation, die dem ABC-DLBCL zugeordnet werden kann, jedoch kein Korrelat in der Cluster-Klassifikation von Chapuy et al.

findet, ist N1. Diese Untergruppe besteht zu 95% aus ABC-DLBCL und ist charakterisiert durch Aberrationen des *NOTCH1* Gens.

Weitestgehend deckungsgleich präsentiert sich der BN2 Subtyp aus der „LymphGen“-Klassifikation beziehungsweise das C1 Cluster von Chapuy et al., das sich zu gleichen Teilen aus ABC- und GCB-DLBCL-Fällen zusammensetzt. Die wesentlichen Merkmale dieser Untergruppe sind Fusionen des *BCL6*-Gens und Aberrationen der NOTCH2-Signalkaskade. Zusätzlich finden sich häufig Mutationen der Komponenten des NF-κB-Signalwegs wie *BCL10* und *TNFAIP3* (A20).

Ein Cluster, das vornehmlich durch GCB-DLBCL-Fälle dominiert wird, ist EZB beziehungsweise C3. Es ist definiert durch *BCL2*-Translokationen und Mutationen chromatinmodifizierender Enzyme wie *EZH2*, *KMT2D* und *CREBBP*.

Weiterhin beschreiben Chapuy et al. das Cluster C4, das sich primär aus GCB-DLBCL-Fällen zusammensetzt, und häufig Mutationen der Histongene sowie der Komponenten des BZR-, des PI3K- und des NF-κB-Signalweges aufweist. Korrespondierend hierzu findet sich die Untergruppe ST2 aus der „LymphGen“-Klassifikation, die durch *SGK1* und *TET2*-Mutationen definiert wird.

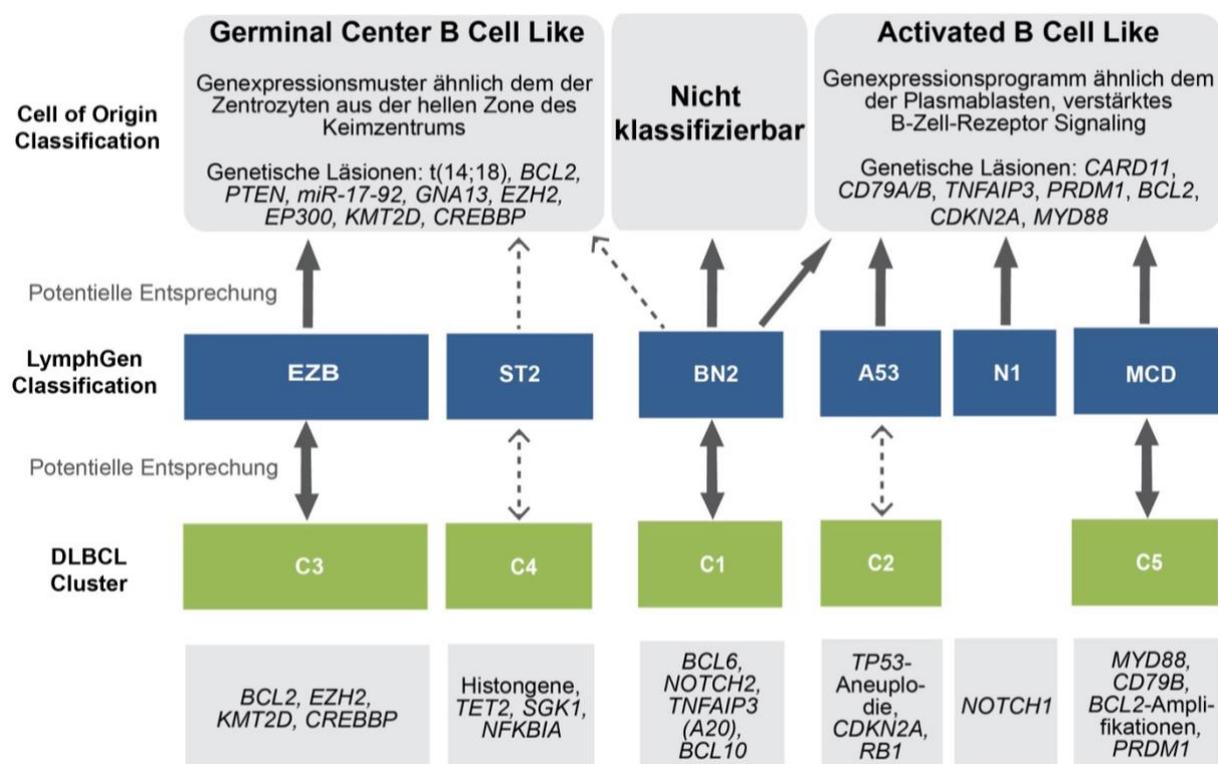


Abbildung 1 **Klassifikation des DLBCL**. Eine Klassifizierung des DLBCL kann entsprechend des Expressionsprofils vorgenommen werden. Basierend auf Gemeinsamkeiten mit der potenziellen Ursprungszelle leitet sich daraus eine Zuordnung nach der Ursprungszelle zu den jeweiligen Untergruppen GCB- und ABC-DLBCL ab („Cell of Origin Classification“). Die „LymphGen“-Klassifizierung und die DLBCL Cluster sind genetische Klassifikationen nach dem Mutationsprofil. Abb. abgeleitet aus (Sehn & Salles, 2021).

2.3. Pathogenese

Krebs ist eine Erkrankung, die durch dynamische Veränderungen des Genoms verursacht wird (Hanahan & Weinberg, 2000). Die Tumorgenese ist ein mehrstufiger Prozess, bestimmt durch die Akkumulation von genetischen Alterationen, die die Transformation von gesunden Zellen hin zu malignen Abkömmlingen fördern. Die progrediente Anhäufung sogenannter Driver-Mutationen verschafft den Zellen einen Wachstumsvorteil und ermöglicht deren klonale Expansion (Greenman et al., 2007; Hanahan & Weinberg, 2000). Der Begriff Driver-Mutation bezeichnet somatische Mutationen an entscheidenden Stellen in Signaltransduktionswegen, die die zelluläre Homöostase aus der Balance bringen, zugunsten der Proliferation der Tumorzelle. Für das DLBCL wurden insgesamt 150 kausale Driver-Gene identifiziert, die mit einer Häufigkeit von über fünf Prozent mutiert sind (Reddy et al., 2017). Eine einzelne DLBCL-Zelle akquiriert im Schnitt etwa acht solcher Mutationen (Reddy et al., 2017).

Die krankheitsverursachenden Mutationen können hereditärer Natur, umweltbedingt oder durch zufällige Fehler der DNA-Replikation während der Zellteilung entstanden sein (Tomasetti et al., 2017). Was die hereditäre Komponente anbelangt, so haben Individuen mit positiver Familienanamnese für NHL ein erhöhtes Risiko an DLBCL zu erkranken (OR=1,95) (J. R. Cerhan et al., 2014). Genomweite Assoziationsstudien identifizierten prädisponierende Einzelnukleotid-Polymorphismen, die mit dem Auftreten von DLBCL korrelieren (James R. Cerhan et al., 2014). Zu den umweltbedingten Risikofaktoren für die Entstehung eines DLBCL zählen klinische Charakteristika wie Übergewicht, Immunsuppression (zum Beispiel bei Zustand nach Organtransplantation), virale Infektionen (durch Hepatitisvirus B/C, Humanes Immundefizienz-Virus, Epstein-Barr-Virus, Humanes-Herpesvirus-8), aber auch chemische Agenzien (Pestizide), physikalische Einflüsse (Strahlung) beziehungsweise Tätigkeiten in bestimmten Berufsgruppen (Friseurhandwerk, Schneiderhandwerk, Landwirtschaft). Einen weiteren Risikofaktor stellen die B-/T-Zell-aktivierende Autoimmunerkrankungen (bspw.: Sjögren-Syndrom, Systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis und glutensensitive Enteropathie) dar. (J. R. Cerhan et al., 2014; Sehn & Salles, 2021) Zusammengenommen sind hereditäre und umweltbedingte Einflüsse für etwa ein Drittel der pathogenen Mutationen verantwortlich. Die große Mehrheit der krankmachenden Mutationen, schätzungsweise zwei Drittel, entstehen jedoch im Rahmen physiologischer DNA-modulierender Prozesse (Tomasetti et al., 2017).

Wie die Mehrheit der B-NHL leitet sich das DLBCL von B-Zellen ab, die die Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben (Klien et al., 1998; Küppers et al., 1997; Pasqualucci et al., 2008). Nachdem reife B-Lymphozyten in der Peripherie durch ein Antigen aktiviert wurden, migrieren sie in die Lymphfollikel der sekundären lymphatischen Organe, wo sie Keimzentren ausbilden. Im Rahmen der Keimzentrumsreaktion vollziehen die B-

Lymphozyten über mehrere Runden von Selektion, genetischer Antigenrezeptor-Modifikation und Proliferation die Affinitätsreifung, die der Bildung und Expansion einer B-Zell-Population mit hochaffinen Antigenrezeptoren dient. B-Lymphozyten in den Keimzentren gehören zu den am stärksten proliferierenden Zellen des menschlichen Körpers; ihre Anzahl verdoppelt sich etwa alle sieben Stunden (Shaffer et al., 2002). Während der Keimzentrumsreaktion sind die B-Zellen einem hohen genetischen Stress ausgesetzt und daher besonders anfällig für pathologische Mutationen (Pasqualucci et al., 2008).

Im Zuge der Affinitätsreifung (Abb. 2) werden die B-Zellen dem Prozess der somatischen Hypermutation (SHM) unterworfen, bei dem die Sequenz der variablen Region der Immunglobulingene durch Einsetzen von Punktmutationen modifiziert wird (Jacob et al., 1991; Nussenzweig & Nussenzweig, 2010). Im Zentrum dieses Vorgangs steht das Enzym Aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase (engl. *Activation-induced cytidine deaminase*, AID), das einzelne Cytidine zu Uracil deaminiert (Muramatsu et al., 2000; Muramatsu et al., 1999). Daraus resultierende C-G-Fehlerpaarungen werden durch das Basenexzisionsreparaturenzym Uracil-DNA-Glycosydase (Di Noia & Neuberger, 2002; Rada et al., 2002) sowie DNA-Reparatur-Enzyme des Fehlerpaarungsreparaturmechanismus (engl. *DNA mismatch repair*, MMR) erkannt und zum Teil fehlerhaft prozessiert, wodurch einzelne Mutationen und DNA-Doppelstrangbrüche entstehen (Noia & Neuberger, 2007; Wilson et al., 2005).

Das Enzym AID ist ebenfalls an dem Vorgang des Immunglobulin-Klassenwechsels beteiligt (Muramatsu et al., 2000). Bei diesem Vorgang kommt es zu einem Austausch des konstanten Segments des Ig-Lokus, welcher die Effektorfunktionen des Antikörpers vermittelt, während die antigenerkennende variable Region des Antikörpers in diesem Prozess unverändert bleibt. Ähnlich wie bei der SHM induziert AID innerhalb der Switch-Regionen der Immunglobulingene, die sich jeweils stromaufwärts von den für die konstanten Regionen der Immunglobuline kodierenden Abschnitten befinden, C-U-Desaminierungen. Die Uracil-Reste werden analog zur SHM von der Uracil-DNA-Glycosydase entfernt; an den entstehenden abasischen Stellen werden durch weitere Enzyme des Basenexzisionsreparatursystems Einzelstrangbrüche eingefügt. Diese werden durch das Fehlerpaarungsreparatursystem in Doppelstrangbrüche umgewandelt, die als Ausgangspunkt für die Rekombination durch Nicht-homologe Endverknüpfung (engl. *nonhomologous end-joining*, NHEJ) dienen (Stavnezer et al., 2008).

Viele der für das DLBCL typischen genetischen Läsionen können als Kollateralschäden der beschriebenen physiologischen B-Zell-Entwicklung verstanden werden (Shaffer et al., 2012). Der Immunglobulin-Klassenwechsel und die somatische Hypermutation sind die Hauptmechanismen in der Entstehung von chromosomalen Translokationen und Mutationen von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen in B-Zell Lymphomen (Überblicksarbeiten hierzu: (Nussenzweig & Nussenzweig, 2010; Shaffer et al., 2002)). An

humanen B-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass AID nicht nur die Immunglobulingene, sondern auch eine ganze Reihe anderer Gene mutieren kann, darunter potente Onkogene wie *MYC* und *BCL6* (Pasqualucci et al., 1998; Pasqualucci et al., 2001; Ramiro et al., 2004; Shen, 1998). Eine Studie, die über hundert in B-Zellen exprimierte Gene untersuchte, stellte fest, dass etwa ein Viertel dieser Gene Mutationen durch AID aufwies (Liu et al., 2008). Außerdem demonstrieren *in vivo* Untersuchungen an etablierten Mausmodellen für Post-GC-Lymphome, dass die fehlerhafte Aktivität von AID im Rahmen des Antigenrezeptoreditings eine Voraussetzung für die Entwicklung von Lymphomen aus B-Zellen in fortgeschrittenen Differenzierungsstufen ist (Pasqualucci et al., 2008).

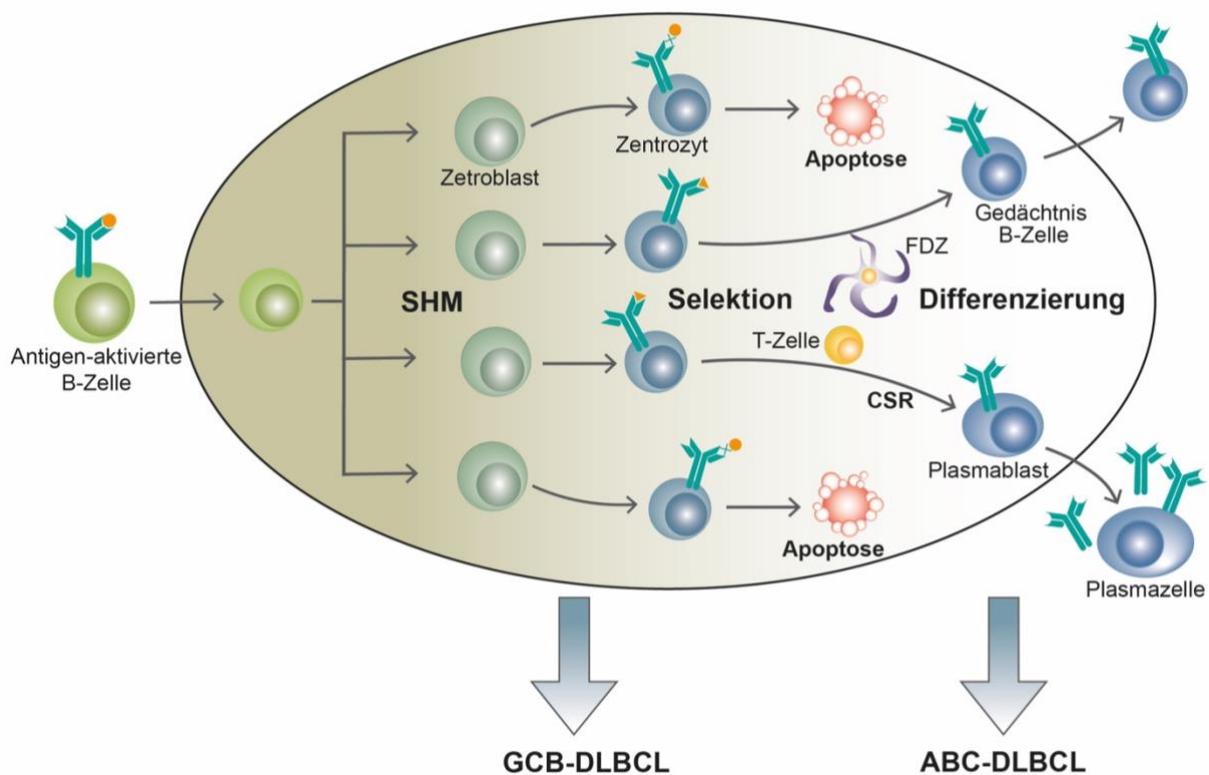


Abbildung 2 Die Keimzentrumsreaktion als Quelle der Lymphomentstehung. Nach Antigenexposition durchlaufen B-Zellen die Keimzentrumsreaktion, in deren Rahmen sie DNA-modifizierenden Prozessen ausgesetzt sind. Hierbei entstehende Mutationen sind Treiber der Lymphomagenese. Mutierte B-Zellen aus der dunklen Zone des Keimzentrums bilden Vorläufer für das GCB-DLBCL, während das ABC-DLBCL sich aus Plasmablasten in der hellen Zone des Keimzentrums ableitet. Abb. modifiziert nach (Pasqualucci & Dalla-Favera, 2018).

Eine umfassende Analyse der Mutationsmuster gab Aufschluss über die Bedeutung der unterschiedlichen Mutationsprozesse in der Pathogenese des DLBCL (Chapuy et al., 2018). Die große Mehrheit der genetischen Läsionen sind Punktmutationen, die durch spontane Desaminierungen von CpG-Dinukleotiden im Laufe des Alterungsprozesses entstehen. Beispiele für hiervon betroffene Gene sind: *MYD88*, *KMT2D* (*MLL2*), *EP300*, *TNFAIP3* (*A20*),

TP53 und *PRDM1 (BLIMP1)* (Chapuy et al., 2018). Viele Mutationen des DLBCL sind jedoch auf die Aktivität von AID im Rahmen der SHM zurückzuführen. Die verschiedenen Reparaturmechanismen, die nach der Desaminierung von Cytidin durch AID einsetzen, führen zu genetischen Aberrationen in Genen wie *MYC*, *BCL2*, *SGK1*, *PAX5*, *PIM1* und *IGLL5* (Chapuy et al., 2018; Pasqualucci et al., 2001). Zeichen einer fehlerhaften SHM finden sich in bis zu 50% der DLBCL-Fälle (Pasqualucci et al., 2001). Dieser Mutationsmechanismus ist insbesondere für die Pathogenese des ABC-DLBCL von Bedeutung: Das von ABC-DLBCL-Fällen dominierte Cluster 5 hat den höchsten Anteil an Mutationen, die mit AID-Aktivität und fehlerhafter SHM assoziiert sind (Chapuy et al., 2018). Viele der Mutationen, die den genetischen Subtyp MCD/C5 definieren, sind auf die Aktivität von AID zurückzuführen (bspw. *PRDM1*, *ETV6*, *TOX*, *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* in MCD) (Wright et al., 2020). Passend hierzu ist AID eines der wenigen Gene der Keimzentrum-B-Zelle, das im ABC-DLBCL stärker exprimiert wird als im GCB-DLBCL (Lenz et al., 2007).

Neben Punktmutationen gehören chromosomale Aberrationen zu den häufigsten Mutationsformen des DLBCL (Chapuy et al., 2018). Allgemein betrachtet sind chromosomale Translokationen die am häufigsten auftretenden genetischen Veränderungen in hämatologischen Erkrankungen und betreffen meistens Zielgene des *Recombination-activating genes 1/2 (RAG1/2)*-Proteinkomplexes, der die somatische Rekombination der Immunglobulingene in Knochenmark-B-Lymphozyten vollführt, und der bereits beschriebenen Aktivierungsinduzierten Cytidin-Deaminase (Nussenzweig & Nussenzweig, 2010). Beim DLBCL sind Translokationen, welche die kodierenden Abschnitte von Proto-Onkogenen unter die transkriptionelle Kontrolle von starken regulatorischen Elementen bringen, die häufigste Form von strukturellen Variationen (Chapuy et al., 2018). Am häufigsten betroffen sind *BCL6* (3q27), *BCL2* (18q21) und *MYC* (8q24). Als Translokationspartner dient dabei meist die Immunglobulinschwerkette (IgH), die auf dem Chromosom 14 lokalisiert ist (Chapuy et al., 2018; Li et al., 2018). Hierdurch gelangen die kodierenden Regionen der Proto-Onkogene unter die transkriptionelle Kontrolle der regulatorischen Elemente (engl. *enhancer*) der IgH, was in erhöhter Expression der Ersteren resultiert (Nussenzweig & Nussenzweig, 2010).

2.4. Molekularbiologische Mechanismen des ABC-DLBCL

Genetische Prädisposition, Umwelteinflüsse, der Alterungsprozess sowie physiologische B-Zell-Vorgänge führen zur Akkumulation von Driver-Mutationen, die letztendlich zur Deregulation entscheidender Signalwege führen. Zu den zentralen Signalwegen, die häufig durch somatische Mutationen dereguliert sind und eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des ABC-DLBCL spielen, zählen der intrinsische Apoptoseweg sowie der NF- κ B-Signalweg.

2.4.1. NF-κB

Der Transkriptionsfaktor Nuclear factor (NF)-κB findet sich in allen menschlichen Zellen und ist maßgeblich an der Regulation der Immunantwort beteiligt, indem er die Expression diverser Zytokine, Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle induziert. In B-Zellen stimuliert NF-κB die Entwicklung, Differenzierung, Proliferation und das Überleben durch transkriptionelle Aktivierung positiver Zellzyklusregulatoren sowie anti-apoptotischer, immunmodulatorischer und inflammatorischer Gene. (Gerondakis et al., 2007; Hayden & Ghosh, 2008; Jost & Ruland, 2007)

Die Familie der NF-κB Transkriptionsfaktoren umfasst die fünf Mitglieder p50/p105 (kodiert durch *NFKB1*), p52/p100 (*NFKB2*), c-REL (*REL*), RELB (*RELB*) und p65 bzw. RELA (*RELA*). Allen gemeinsam ist die N-terminale Rel-Homologie-Domäne (RHD), welche die DNA-Bindung sowie die Homo- und Heterodimerisierung der verschiedenen Untereinheiten ermöglicht. Das Heterodimer aus RelA-p50 aktiviert NF-κB auf dem klassischen Weg, während das RelB-p52-Dimer im Rahmen des alternativen NF-κB-Signalweges rekrutiert wird. Die NF-κB-Dimere binden an das sogenannte κB-Motiv, eine etwa zehn Basenpaare lange DNA-Sequenz innerhalb von Promotoren und Enhancern von Zielgenen, und regulieren deren Expression durch Aktivierung oder Repression der Transkription. (Hayden & Ghosh, 2008)

Während der alternative NF-κB Signalweg durch einige Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie wie CD40 oder den BAFF-Rezeptor induziert wird, erfolgt die Aktivierung des klassischen Signalweges durch eine große Vielfalt an Rezeptoren (Hayden & Ghosh, 2008; Jost & Ruland, 2007). Unterschiedliche Stimuli wie Zytokine oder pathogene Bestandteile induzieren über die Interleukinrezeptoren (IL-1R, IL-18R) sowie Rezeptoren des angeborenen (Toll-like-Rezeptor) und erworbenen Immunsystems (T-Zell-Rezeptor, B-Zell-Rezeptor) den klassischen NF-κB-Signalweg (De Groen et al., 2019; Jost & Ruland, 2007).

Die proliferativen und anti-apoptotischen Eigenschaften von NF-κB spielen eine ausschlaggebende Rolle in der Pathogenese diverser Krebsentitäten. Genetische Läsionen des NF-κB-Signalweges sind ein häufiges Merkmal von B-Zell-Lymphomen (Baldwin, 2001; Kato et al., 2009; Staudt, 2010). Auch in der Pathogenese des ABC-DLBCL stellt die konstitutive Aktivierung des NF-κB-Transkriptionskomplexes einen zentralen Mechanismus dar (Davis et al., 2001). Die Inhibierung des NF-κB-Signalweges in ABC-DLBCL-Zelllinien resultiert in Zellzyklusarrest und Apoptose, und ist toxisch für das ABC-DLBCL (Davis et al., 2001; Ngo et al., 2006). Viele NF-κB-abhängige Gene wie *CCND2* und Mitglieder der anti-apoptotischen *BCL2*-Familie sind im ABC-DLBCL höher exprimiert als im GCB-DLBCL (Alizadeh et al., 2000; Davis et al., 2001). Weiterhin induziert NF-κB im ABC-DLBCL die Transkription von IL-6 und IL-10, die wiederum über autokrine Signalübertragung den JAK-STAT3-Signalweg aktivieren (Lam et al., 2008).

Die Hyperaktivierung von NF- κ B wird durch somatische Mutationen einzelner Komponenten der NF- κ B-Signalkaskade oder ihrer Regulatoren erreicht. Solche genetischen Aberrationen finden sich in mehr als der Hälfte der ABC-DLBCL-Fälle (Compagno et al., 2009; Schmitz et al., 2018). Häufig betroffen ist der negative Regulator des NF- κ B-Signalweges und Tumorsuppressor *A20* (*TNFAIP3*) (Compagno et al., 2009; Honma et al., 2009). Dessen Deletion auf dem Chromosom 6q23.3 ist einer der häufigsten Mutationsmechanismen in Non-Hodgkin-Lymphomen (Honma et al., 2009; Kato et al., 2009) und führt zur Resistenz der Zellen gegenüber Chemotherapien (Honma et al., 2009). Über die Hälfte der ABC- und Non-GCB-Fälle weist einen monoallelischen Verlust von *A20* auf. Etwa ein Drittel der ABC-DLBCL-Fälle weist gar einen biallelischen Verlust von *A20* durch inaktivierende Mutationen und/oder Deletionen auf, was mit dessen Funktion als Tumorsuppressor einhergeht. (Compagno et al., 2009; Honma et al., 2009)

Neben solchen Mutationen, die den NF- κ B-Signalweg unmittelbar treffen, führt auch die Deregulierung von stromaufwärts liegenden, aktivierenden Signalkaskaden zu einer konstitutiven Aktivierung von NF- κ B. Genetische Läsionen innerhalb dieser vorgeschalteten B-Zell-Rezeptor- und Toll-like-Rezeptor-Signalkaskaden mit nachfolgender konstitutiver Aktivierung von NF- κ B sind ein pathologisches Merkmal des ABC-DLBCL.

Der B-Zell-Rezeptor-Signalweg

Die Entwicklung, das Überleben und die Funktion der B-Zellen hängen im Wesentlichen vom B-Zell-Rezeptor (BZR) ab (Kitamura et al., 1991; Kraus et al., 2004; Pelanda et al., 2002; Reichlin et al., 2001). Der BZR ist ein Transmembran-Multiproteinkomplex, zusammengesetzt aus zwei Untereinheiten, die jeweils eine Antigenerkennungs- und eine Signalvermittlungsfunktion haben. Die Untereinheit mit der Antigenerkennungsfunktion ist ein membrangebundener Antikörper, der aus zwei Paaren von Immunglobulinschwer- und leichtketten besteht. Daran angelagert ist ein Heterodimer aus CD79A (Ig α) und CD79B (Ig β), das die Expression des BZR an der Zellmembran reguliert (Gazumyan et al., 2006; Reichlin et al., 2001) sowie die Signaltransduktion ins Zellinnere initiiert (Campbell & Cambier, 1990; Dalporto, 2004; Hombach et al., 1988; Hombach et al., 1990; Young et al., 2015).

Die Aktivierung des BZR durch Antigenbindung führt zu dessen Aggregation und leitet den ersten biochemischen Schritt in der BZR-Signalkaskade ein: die Phosphorylierung der Tyrosine innerhalb der ITAMs (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) von CD79A/B durch Tyrosinkinasen der Src-Familie wie LYN (Sanchez et al., 1993; Yamanashi et al., 1991). Die phosphorylierten ITAMs rekrutieren und aktivieren weitere Tyrosinkinasen der Src- und Nicht-Src-Familie, unter anderem SYK (engl. *spleen tyrosin kinase*) und BLNK (engl. *B cell linker protein*) (Dalporto, 2004; Young et al., 2019). Diese aktivieren wiederum die Bruton Tyrosinkinase (BTK), ein Schlüsselenzym in der B-Zell-Signalkaskade, dessen

Inaktivierung durch Mutationen zum Fehlen reifer B-Zellen und Agammaglobulinämie führt (Rawlings et al., 1993; Seda & Mraz, 2015; Young et al., 2015). Die Signalkaskade terminiert in der Phosphorylierung und Aktivierung von CARD11 (engl. *Caspase recruitment domain-containing protein 11*) durch PKC β (Proteinkinase C β , engl. *protein kinase C β*) (Bertin et al., 2001; Sommer et al., 2005). Daraufhin bildet CARD11 einen Multiproteinkomplex mit BCL10 und MALT1 (CBM-Komplex), welcher den klassischen NF- κ B-Signalweg induziert (Bertin et al., 2001; Lucas et al., 2001; Young et al., 2015). Neben der NF- κ B-Aktivierung führt die BZR-Stimulierung zur Induktion des Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase- (PI3K), des NF-AT-Signalweges sowie der unterschiedlichen MAP-Kinasen-Signalwege (ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinase*), JNK (engl. *c-Jun-N-terminal kinases*) und p38-MAPK) (Davis et al., 2010; Young et al., 2015).

Die chronische Aktivierung des BZR mit nachfolgender konstitutiver Aktivierung von NF- κ B ist ein wesentlicher Pathomechanismus des ABC-DLBCL (Davis et al., 2010).

Innerhalb des MCD-Clusters von Schmitz et al., das sich fast ausschließlich aus ABC-DLBCL zusammensetzt, weisen 75% der Fälle genetische Aberrationen der proximalen Komponenten der BZR-Signalkaskade auf (Schmitz et al., 2018). Ähnlich hohe Mutationsraten finden sich beim genetischen Subtyp BN2, der sich zu einem großen Teil aus ABC-DLBCL Fällen speist (Wright et al., 2020). Mutationen der Komponenten des BZR-abhängigen NF- κ B-Signalweges sind ebenfalls typisch für das N1-Cluster, das ebenso dem ABC-DLBCL zugeordnet wird, und finden sich hier in etwa 60% der Fälle (Wilson et al., 2021).

Besonders häufig, etwa bei einem Viertel der ABC-DLBCL Fälle, jedoch nur selten beim GCB-DLBCL (26.8% beim ABC-DLBCL vs. 1,9% beim GCB-DLBCL), finden sich Mutationen von *CD79B*, welche für das MCD-Cluster kennzeichnend sind (Davis et al., 2010; Schmitz et al., 2018). *CD79A* ist hingegen deutlich seltener (2,9% der ABC-DLBCL-Fälle) von genetischen Aberrationen betroffen, die vor allem beim N1-Typ vorkommen (Davis et al., 2010; Wilson et al., 2021). *CD79B*-Mutationen betreffen vornehmlich das erste Tyrosin des ITAM-Motivs (Davis et al., 2010), das die BZR-Expression mittels dessen Internalisierung durch Endozytose reguliert (Gazumyan et al., 2006; Young et al., 2015). Im Einklang hiermit wurde beim ABC-DLBCL mit *CD79A/B*-Mutationen eine erhöhte Expression des BZR beobachtet (Davis et al., 2010; Young et al., 2015). Dabei bilden die BZR an der Zelloberfläche von ABC-DLBCL Tumorzellen Komplexe, die normalerweise nach Antigenaktivierung bei gesunden B-Zellen beobachtet werden (Davis et al., 2010). Eine weitere Folge der ITAM-Mutationen ist eine verminderte Aktivierung der LYN-Kinase, die unter anderem eine hemmende Wirkung auf die BZR-Signalgebung hat (Davis et al., 2010; Young et al., 2015).

Ein weiterer häufiger Tumormechanismus des ABC-DLBCL ist die onkogene Aktivierung des BZR-Signalweges durch Gain-of-Function-Mutationen von *CARD11* (auch als *CARMA1*

bekannt) (Lenz, Davis, et al., 2008). CARD11 gehört zur Membranassoziierte-Guanylatkinasen-Proteinfamilie, deren Mitglieder als Gerüstproteine (engl. *scaffold proteins*) fungieren und die Bildung von Multiproteinkomplexen an der Plasmamembran vermitteln (Bertin et al., 2001; Gaide et al., 2001). An seinem N-terminalen Ende besitzt CARD11 die namensgebende Caspasen-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne (CARD), welche der Protein-Protein-Interaktion mit den CAR-Domänen anderer Proteine, wie zum Beispiel BCL10, dient. Die Interaktion der CAR-Domänen vermittelt die Ausbildung von multimolekularen Signaltransduktionskomplexen innerhalb der Apoptose- und NF- κ B-Signalwege. (Bertin et al., 2001; Gaide et al., 2001) Innerhalb des CBM-Komplexes stellt CARD11 die Schlüsselverbindung zwischen dem BZR und der Aktivierung von NF- κ B dar (Bertin et al., 2001; Lucas et al., 2001; Sommer et al., 2005).

Mutationen von *CARD11* finden sich in ca. 10% der ABC-DLBCL Fälle und betreffen vornehmlich die Coiled-coil-Domäne, die in ruhenden Zellen durch die autoinhibitorische Interaktion mit der Linkerregion *CARD11* inaktiviert (Lenz, Davis, et al., 2008; Sommer et al., 2005). Die Gain-of-function-Mutationen unterbrechen den autoinhibitorischen Mechanismus und führen zur konstitutiven Aktivierung von *CARD11*, die zur konstitutiven NF- κ B-Induktion beiträgt (Lenz, Davis, et al., 2008). Ein Loss-of-function RNA-Interferenz-Screening zeigte, dass *CARD11* eine Schlüsselrolle für die konstitutive Aktivierung von NF- κ B im ABC-DLBCL zukommt (Ngo et al., 2006). Transgene Mäuse, welche die humane DLBCL-Mutante *CARD11* L225LI B-Zell-spezifisch exprimieren, sterben schon wenige Tage nach der Geburt an einer lymphoproliferativen Erkrankung mit plasmablastischem Phänotyp (Knies et al., 2015). Auf zellulärem Niveau führt die Mutation zur konstitutiven Aktivierung des CBM-Komplexes und daraus folgender Aktivierung von NF- κ B und JNK (Knies et al., 2015). Die dauerhafte Aktivität des CBM-Komplexes induziert eine BZR-Signal-unabhängige B-Zell-Aktivierung (Knies et al., 2015). Die Inhibition von *CARD11* ist selektiv toxisch für ABC-DLBCL Zelllinien, jedoch nicht für andere Formen des DLBCL (Ngo et al., 2006).

In Zusammenschau wird beim ABC-DLBCL durch unterschiedliche Mutationsmechanismen eine Aktivierung der BZR-Signalkaskade und nachfolgend des NF- κ B-Signalweges erzielt.

Die Inhibition einzelner Komponenten der BZR-Signalkaskade ist selektiv toxisch für ABC-DLBCL Zelllinien und resultiert in einer verminderten Expression NF- κ B-abhängiger Gene (Davis et al., 2010). Substanzen, die zielgerichtet einzelne Komponenten des BZR-Signalweges ausschalten, wie der BTK-Inhibitor Ibrutinib, sind bereits in klinischer Erprobung zur Therapie des DLBCL und haben eine Zulassung als Einzeltherapeutika in der Erst- und Zweitlinientherapie anderer NHL (Czuczman et al., 2017; *Imbruvica*, 2021; Wilson et al., 2015; Younes et al., 2019). Eine Phase-III klinische Studie zeigte, dass die Kombination von Ibrutinib mit R-CHOP insbesondere bei jungen (Alter < 60 Jahre) ABC-DLBCL PatientInnen das

ereignisfreie Überleben sowie die Gesamtüberlebensdauer verbessert (Younes et al., 2019). Durch eine weitere Differenzierung der ABC-DLBCL Fälle nach der genetischen Klassifizierung in die einzelnen Subtypen MCD, BN2 und N1 konnte gezeigt werden, dass Ibrutinib vor allem einen Vorteil in der Behandlung von MCD- und N1-Tumoren junger PatientInnen bringt, die eine chronische Aktivierung der BZR-Signalkaskade aufweisen (Wilson et al., 2021). Das ereignisfreie Überleben nach einer Behandlung mit R-CHOP plus Ibrutinib betrug in diesen Gruppen nach drei Jahren 100% im Vergleich zu 42,9% beziehungsweise 50% nach einer Behandlung mit R-CHOP plus Placebo (Wilson et al., 2021).

Der Toll-like-Rezeptor-Signalweg

Weitere pathologische Aktivierung von NF- κ B im DLBCL findet über den Toll-like-Rezeptor-Signalweg statt.

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind evolutionsbiologisch hoch konservierte Strukturen der angeborenen Immunabwehr. Als Mustererkennungsrezeptoren erkennen sie molekulare Bestandteile diverser Pathogene (engl. *pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) und stimulieren daraufhin eine sofortige Antwort des angeborenen Immunsystems (Janeway, 1989; Lemaitre et al., 1996; Medzhitov et al., 1997; Muzio et al., 2009). Auch in der adaptiven Immunabwehr kommt den TLR eine besondere Bedeutung zu, nämlich in der Aktivierung von T-Zell-Immunantworten über die Expression costimulatorischer Signale und Regulierung von dendritischen Zellen sowie in der Regulierung von T-Zell-abhängigen und T-Zell-unabhängigen B-Zell-Immunantworten (Fitzgerald & Kagan, 2020; Kawai et al., 1999; Pasare & Medzhitov, 2004). Im Kontext der Lymphomagenese spielt der TLR-Signalweg eine bedeutende Rolle: etwa die Hälfte der ABC-DLBCL Tumore weist genetische Aberrationen der einzelnen Komponenten der TLR-Signalkaskaden auf (Phelan et al., 2018).

Bisher sind zehn humane TLR identifiziert worden (Iwasaki & Medzhitov, 2010; Kawai & Akira, 2010). Basierend auf ihrer Lokalisation in der Zelle sowie ihren Liganden können die TLR in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Gruppe der membrangebundenen Rezeptoren umfasst die TLR1, TLR2, TLR4-6 und ist auf die Erkennung pathogener Oberflächenbestandteile spezialisiert. Die intrazellulären TLR3 und TLR7-9 befinden sich an Zellorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum, den Endosomen, den Lysosomen und den Endolysosomen, wo sie pathogene Nukleinsäuren erkennen. (Iwasaki & Medzhitov, 2010; Kawai & Akira, 2010) Die Signaltransduktion von den TLR verläuft über verschiedene Adaptermoleküle und kulminiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B mit daraus folgender Freisetzung inflammatorischer Zytokine und Typ-I-Interferons sowie in der Aktivierung der MAP-Kinasen (ERK1, ERK2, P38, JNK) (Kawai & Akira, 2010; Medzhitov et al., 1998). Alle TLR, mit Ausnahme von TLR3, nutzen MYD88 als Signalvermittler. (Kawai & Akira, 2010)

MYD88 (engl. *Myeloid differentiation primary response 88*) ist ein Adapterprotein, welches den Toll-like-Rezeptoren und Interleukin-I-Rezeptoren nachgeschaltet ist und eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr vielfältiger Pathogene spielt (Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997). An seinem C-terminalen Ende besitzt es die evolutionsbiologisch hochkonservierten Toll-Interleukin-I-Domäne (Hultmark, 1994), mittels derer es mit den Mitgliedern der TIR-Familie kommuniziert (Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1997). Über die aminoständige Todesdomäne (Hardiman et al., 1996) rekrutiert MYD88 die Serin-Threonin-Kinasen aus der Familie der IL-1R-assoziierten-Kinasen (IRAK), welche in ihrem N-Terminus ebenfalls eine Todesdomäne enthalten (Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1997). Sechs MYD88-Moleküle, vier IRAK4- und vier IRAK1/2-Moleküle bilden ein helikales Oligomer, das Myddosom, das die Signalvermittlung von den TLRs in das Zellinnere vermittelt (Lin et al., 2010; Motshwene et al., 2009).

Ein RNA-Interferenz Screening aus Staudts Labor deckte die essenzielle Rolle von MYD88 und den assoziierten Kinasen IRAK1 und IRAK4 für die Pathogenese der ABC-DLBCL auf (Ngo et al., 2011). *MYD88*-Mutationen finden sich in 18% der DLBCL-Fälle, wobei *MYD88* L265P die häufigste Variante ist (75%) (Chapuy et al., 2018; Ngo et al., 2011).

Neben *MYD88*-Mutationen weist knapp die Hälfte der ABC-Tumoren Kopienzahlvariationen und Amplifikationen anderer Bestandteile des TLR-Signalwegs wie TLR9 und dessen Chaperone CNPY3 und UNC93B1 auf (Phelan et al., 2018).

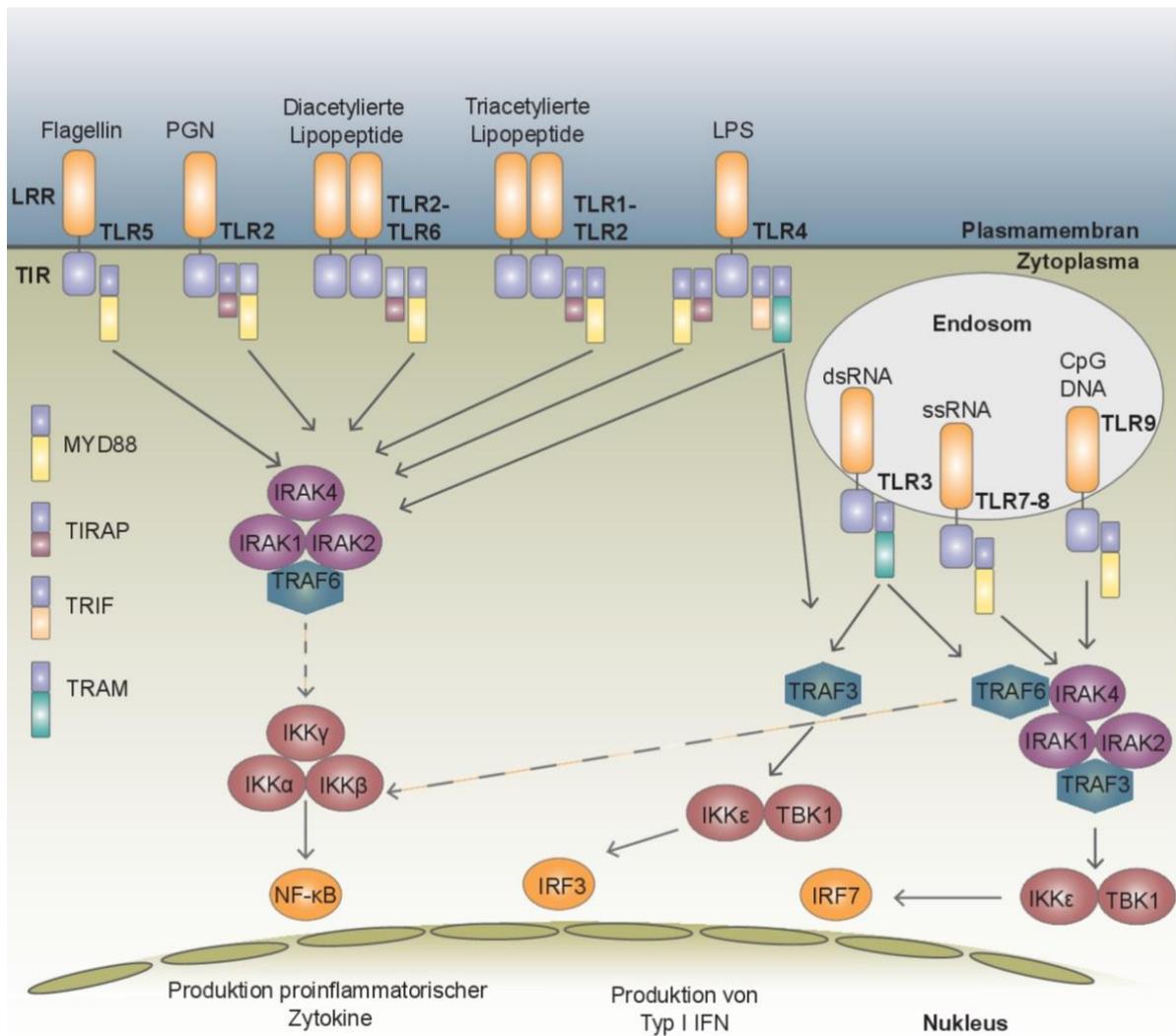


Abbildung 3 Die Toll-like-Rezeptor-Signalkaskade. TLR erkennen über ihre LRR-Domäne pathogene Bestandteile und aktivieren die Immunreaktion über die TIR-Domäne. Membrangebundene TLR werden durch pathogene Oberflächenbestandteile (Flagellin, Peptidoglykan (PGN), di- und triacetylierte Lipoproteine) stimuliert. Zytoplasmatische TLR erkennen pathogene Nucleinsäuren (Einzel- und Doppelstrang-RNA (ssRNA, dsRNA) sowie unmethylierte CpG-DNA). Die TIR-Domäne der TLR assoziiert mit unterschiedlichen Adaptermolekülen (MYD88, TIRAP, TRIF, TRAM), welche die Signale zum Zellkern vermitteln. Dabei stellt MYD88 ein essentielles Adapterprotein für die Signaltransduktion von TLR5 und 7-9 dar. Am Ende der Signalkaskade aktivieren Transkriptionsfaktoren wie IRF3, IRF7 und NF- κ B die Immunantwort. Abb. entnommen aus (Wang, Jeelall, Ferguson, et al., 2014).

2.4.2.MYD88

Als Bestandteil des TLR-Signalweges und des My-T-BCR-Proteinkomplexes ist der Signaladapter MYD88 an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt und bildet somit einen Knotenpunkt im Netzwerk der ABC-DLBCL-Tumorbiologie (Muzio et al., 1997; Ngo et al., 2011; Phelan et al., 2018).

Die Mutation *MYD88* L265P findet sich bei nahezu allen Formen des B-NHL mit einer Prävalenz von 4-90% (Weber et al., 2018). Als erstes wurde die *MYD88* L265P-Mutation beim

DLBCL entdeckt, wo sie mit einer Prävalenz von ca. 16% auftritt (Angabe für DLBCL NOS aus (Ngo et al., 2011)). Es besteht eine signifikante Assoziation zwischen *MYD88* L265P und dem ABC- beziehungsweise Non-GCB-DLBCL-Subtyp, bei welchen fast ein Drittel der Tumoren die *MYD88* L265P-Mutation trägt (Ngo et al., 2011). Besonders häufig findet sich *MYD88* L265P bei klinischen Subformen des DLBCL mit extranodulärer Organmanifestation wie dem DLBCL des zentralen Nervensystems oder dem testikulären DLBCL (Kraan et al., 2013; Lee et al., 2017).

Die höchste Prävalenz von *MYD88* L265P besteht jedoch beim Morbus Waldenström – einem Subtyp des lymphoplasmazytischen Lymphoms (Campo et al., 2011; Treon et al., 2012). Bei dieser Form des indolenten B-NHL infiltrieren kleine B-Lymphozyten in unterschiedlichen Stadien der plasmazytären Differenzierung das Knochenmark und sezernieren große Mengen von monoklonalem IgM (Campo et al., 2011; Yu et al., 2018). Mit 87% ist *MYD88* L265P die häufigste Mutation bei dieser Erkrankung (Treon et al., 2012; Yu et al., 2018). Weitere Entitäten, bei denen die *MYD88* L265P-Mutation mit hoher Prävalenz (>10%) vorkommt, sind als Übersicht in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 **Prävalenzen von *MYD88*^{L265P}**. Modifiziert nach (De Groen et al., 2019; Lee et al., 2017) und (Yu et al., 2018).

Reife B-Zell Neoplasien	Prävalenz von <i>MYD88</i>^{L265P}
Splenisches B-Zell-Lymphom/Leukämie, unklassifiziert	16,7%
Lymphoplasmazytisches Lymphom (LPL)	85,5%
→ LPL, Non-IgM-Subtyp	55%
→ Morbus Waldenström	85,5 - 87%
Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz (IgM)	52,7 - 74%
Nodales Marginalzonen Lymphom	10,3%
DLBCL	15,6%
→ GCB	5,3 - 6%
→ ABC	21 – 24%
DLBCL des zentralen Nervensystems	60,8 - 70%
Primär kutanes DLBCL der unteren Extremität	54 - 62,2%
Intravaskuläres DLBCL	44%
Hochgradiges B-Zell-Lymphom mit <i>MYC</i> -, <i>BCL2</i> -, <i>BCL6</i> - Umlagerungen	11,1%
Primäres DLBCL der Brust	54,3%
Testikuläres DLBCL	68,4%
Vitreoretinales DLBCL	72,7%

Die *MYD88* L265P-Mutation steht unter Verdacht, mit schlechterem Verlauf des DLBCL assoziiert zu sein (Fernández-Rodríguez et al., 2014; Lee et al., 2017; Rovira et al., 2016; Vermaat et al., 2020). Jedoch sind die Studien diesbezüglich widersprüchlich (Lee et al., 2017; Vermaat et al., 2020; Yu et al., 2017). Begründet durch die vermeintliche Auswirkung von *MYD88* L265P auf die Prognose schlagen einige ForscherInnen vor, DLBCL mit *MYD88*-Mutationen als eine eigene Subentität zu klassifizieren (Vermaat et al., 2020).

Funktionale Konsequenzen von MYD88 L265P

MYD88 L265P ist eine Punktmutation, verursacht durch einen Basenwechsel von T→C an der Stelle 38182641 innerhalb des *MYD88*-Gens auf dem Chromosom 3p22.2 (Treon et al., 2012). Der Basenwechsel resultiert in einer Änderung der Aminosäuresequenz von Leucin zu Prolin an der Stelle 265 innerhalb einer hochkonservierten Sequenz der TIR-Domäne von *MYD88* (Ngo et al., 2011).

MYD88 L265P ist eine gain-of-function-Mutation (Ngo et al., 2011). Die mutierte TIR-Domäne zeigt eine konstitutive Aktivität gemessen an ihrer Fähigkeit, NF-κB zu induzieren (Avbelj et al., 2014; Ngo et al., 2011). Computerbasierte Modellierungen prognostizieren, dass die Aminosäuresubstitution einen Wandel von der bevorzugten Heterodimerisierung von *MYD88* hin zu zunehmend homodimeren Interaktionen bewirkt (Zhan et al., 2016). Durch allosterische Effekte wird eine Stabilisierung der Homodimerisierung zwischen den *MYD88*-TIR-Domänen begünstigt, wobei die mutierte TIR-Domäne mit endogenem WT-*MYD88* interagiert (Avbelj et al., 2014; Zhan et al., 2016). *In vitro* fluoreszenzspektroskopische Analysen der *MYD88*-Polymerisierung in einem zellfreien eukaryotischen Translationssystem bestätigten diese Annahme (O'Carroll et al., 2018). Wie sich herausstellte, verläuft die *MYD88*-Aggregation konzentrationsabhängig. Dabei ist die L265P-Mutante in der Lage, bei 40-fach geringeren Konzentrationen im Vergleich zur Wildtypvariante stabile Oligomere zu bilden. ForscherInnen postulieren, die verstärkte Oligomerisierung des *MYD88*-Proteins könnte eine spontane Bildung des Myddosom-Komplexes unabhängig von aktivierenden Upstream-Signalen ermöglichen (Avbelj et al., 2014; Zhan et al., 2016). Diese These wird zum Teil durch *in vitro* Experimente an Antigen-stimulierten B-Zellen bestätigt, in denen *MYD88* L265P eine spontane Proliferation in Abwesenheit mitogener Stimuli und exogener TLR-Liganden induziert (Wang, Jeelall, Beutler, et al., 2014). Eine gewisse Abhängigkeit von dem TLR-Signalweg bleibt dennoch bestehen, da die Inhibition des TLR9-Signalweges die Proliferation von *MYD88* L265P-Zellen bremst (Wang, Jeelall, Beutler, et al., 2014).

In seiner Funktion als Onkogen wird *MYD88* L265P durch das Chaperon HSP110 unterstützt (Boudesco et al., 2018). HSP110 interagiert sowohl mit der Wildtypvariante als auch mit der mutierten *MYD88*-Form. Es assoziiert jedoch stärker mit L265P und stabilisiert es, indem es

MYD88 vor proteosomaler Degradation schützt. Dieser Mechanismus fördert das Überleben der ABC-DLBCL-Zelllinien, indem es die anti-apoptotische Wirkung von NF- κ B stimuliert. Die Inhibierung von HSP110 resultiert in einer reduzierten Phosphorylierung von I κ B und P65 und führt zu einer Erniedrigung der BCL-XL- und BCL2-Proteinspiegel. (Boudesco et al., 2018)

Interessanterweise wurde beim M. Waldenström ein Tumormechanismus entdeckt, bei dem die Lymphomzellen MYD88 L265P in extrazellulären Vesikeln an ihre Umgebung sezernieren. Nach Internalisierung rekrutiert das mutierte Protein endogenes MYD88 der Empfängerzellen und induziert so inflammatorische Signalwege unabhängig von Rezeptorliganden. (Manček-Keber et al., 2018)

2.4.3. Kooperation zwischen dem BZR- und dem TLR-Signalwegen

Sowohl der TLR- als auch der BZR-Signalweg sind beim ABC-DLBCL häufig von Mutationen betroffen (mindestens 46% und 75% der Fälle). Besonders häufig treten Mutationen in den Genen *MYD88* (28,8% für *MYD88* L265P) und *CD79B* (24,5%) auf (Phelan et al., 2018; Schmitz et al., 2018). Das gleichzeitige Vorkommen von *MYD88* L265P und *CD79B*-Mutationen ist mit 11,5% signifikant höher als es zufallsbedingt zu erwarten wäre, was auf eine mögliche Kooperation zwischen den beiden Signalwegen hinweist (Chapuy et al., 2018; Schmitz et al., 2018; Young et al., 2015).

Staudts Labor liefert neue Erkenntnisse, denen zufolge nicht nur eine Konvergenz, sondern eine Überlappung in der Funktion der beiden Signalkaskaden besteht. Sie berichten über einen Proteinkomplex aus dem BZR, dem TLR9 und MYD88, welcher über eine Aktivierung der NF- κ B- und mTOR-Signalwege den malignen Phänotyp des ABC-DLBCL bestimmt (Phelan et al., 2018). In ihrem Modell pendelt der IgM-BZ-Rezeptor konstant zwischen der Zelloberfläche und endolysosomaler Membran, wo er im aktivierten Zustand mit dem TLR9 interagiert. Gemeinsam rekrutieren sie eine Signalplattform aus MYD88 und dem CBM-Komplex, welche den NF- κ B-Signalweg induziert (Phelan et al., 2018).

Ein besonders enger Zusammenhang zwischen den beiden Signalwegen scheint bei *MYD88* L265P-Lymphomzellen zu bestehen (Yang et al., 2013). Immunopräzipitationsexperimente in heterozygot *MYD88* L265P-mutierten MW-Zellen zeigen eine Assoziation zwischen MYD88 L265P und phosphorylierter Bruton Tyrosin Kinase (BTK), welche in WT-MYD88-Zellen nicht beobachtet wurde. Der gleiche Zusammenhang wurde in homozygoten *MYD88* L265P DLBCL-Zelllinien beobachtet. Auch hier konnte eine Assoziation zwischen der BTK und MYD88 L265P, jedoch nicht mit WT MYD88 nachgewiesen werden. (Yang et al., 2013)

2.4.4. BCL2

BCL2 ist ein anti-apoptotisch wirksames Protein, das seine Funktion an der inneren mitochondrialen Membran ausführt (Hockenbery et al., 1990). Die Entdeckung der BCL2-

Proteinfamilie ist eng mit der Erforschung der Lymphome verbunden. *BCL2* wurde erstmals als Translokationspartner bei der t(14;18) Translokation identifiziert, welche ein charakteristisches Merkmal des Follikulären Lymphoms darstellt (Tsujimoto et al., 1985; Tsujimoto et al., 1984).

In Säugerzellen regulieren drei unterschiedliche Proteintypen der BCL2-Proteinfamilie durch die Interaktion an der mitochondrialen Membran den intrinsischen Apoptoseweg, welcher daher auch als mitochondrialer Apoptoseweg bezeichnet wird (Czabotar et al., 2014). Ausgelöst durch interne Faktoren wie diverse zytotoxische Stimuli, kulminiert der Apoptoseweg in der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran durch die Effektorproteine BAX (engl. *BCL-2-associated X protein*) und BAK (engl. *BCL-2 antagonist/killer*), was den Austritt von Cytochrom c aus dem Intermembranraum zur Folge hat (Kluck et al., 1997; Lindsten et al., 2000; Oltvai et al., 1993; Wei et al., 2001). Das pro-survival Protein BCL2 und dessen Analoga BCL-XL, BCL-W, MCL-1 und A1 hemmen die Aktivität von BAX/BAK. Sie konkurrieren dabei kompetitiv mit einer weiteren Gruppe der BCL2-Proteinfamilie, den BH3 („the BCL-2 homology 3 „)-only Proteinen (BIM, BAD, BID, BIK, BMF, HRK, NOXA, PUMA), um die Bindung an BAX/BAK. Akkumulieren genügend zytotoxische Signale, werden BH3-only Proteine aktiviert. Sie verdrängen BCL2 aus der Bindung und befreien BAX/BAK von dessen inhibitorischer Wirkung. (Czabotar et al., 2014)

In einem gesunden Organismus wird BCL2 in B-Vorläuferzellen exprimiert und mit fortschreitender Differenzierung der B-Zellen herunterreguliert (Monni et al., 1999). In den malignen Zellen des DLBCL wird häufig eine erhöhte Expression des BCL2-Proteins verzeichnet. Die BCL2-Überexpression ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert und ist auf strukturelle Variationen des *BCL2*-Lokus zurückzuführen. (Chapuy et al., 2018; Monni et al., 1999; Schmitz et al., 2018) *BCL2*-Translokationen treten in 21% der Fälle auf und gehören zu den häufigsten chromosomalen Strukturveränderungen des DLBCL; fast immer dient dabei der *IgH*-Lokus als Translokationspartner (t(14;18)) (Chapuy et al., 2018). Die Translokation führt zur Überexpression von BCL2, indem das *BCL2*-Gen unter die konstitutive Aktivierung durch den Immunglobulin-Schwerkette-Promoter gestellt wird. Die *BCL2*-Translokationen finden sich vor allem beim GCB-Subtyp, hier in etwa 28% der Fälle, und nur selten beim ABC-DLBCL (<1%) (Schmitz et al., 2018). Im Fall des ABC-DLBCL wird die erhöhte BCL2-Expression durch fokale Amplifikationen und Amplifikation des 18q-Chromosoms erreicht (Chapuy et al., 2018; Monni et al., 1997; Schmitz et al., 2018). So präsentiert das ABC-DLBCL-Cluster C5 von Chapuy et al. flächendeckend eine 18q-Amplifikation (Chapuy et al., 2018).

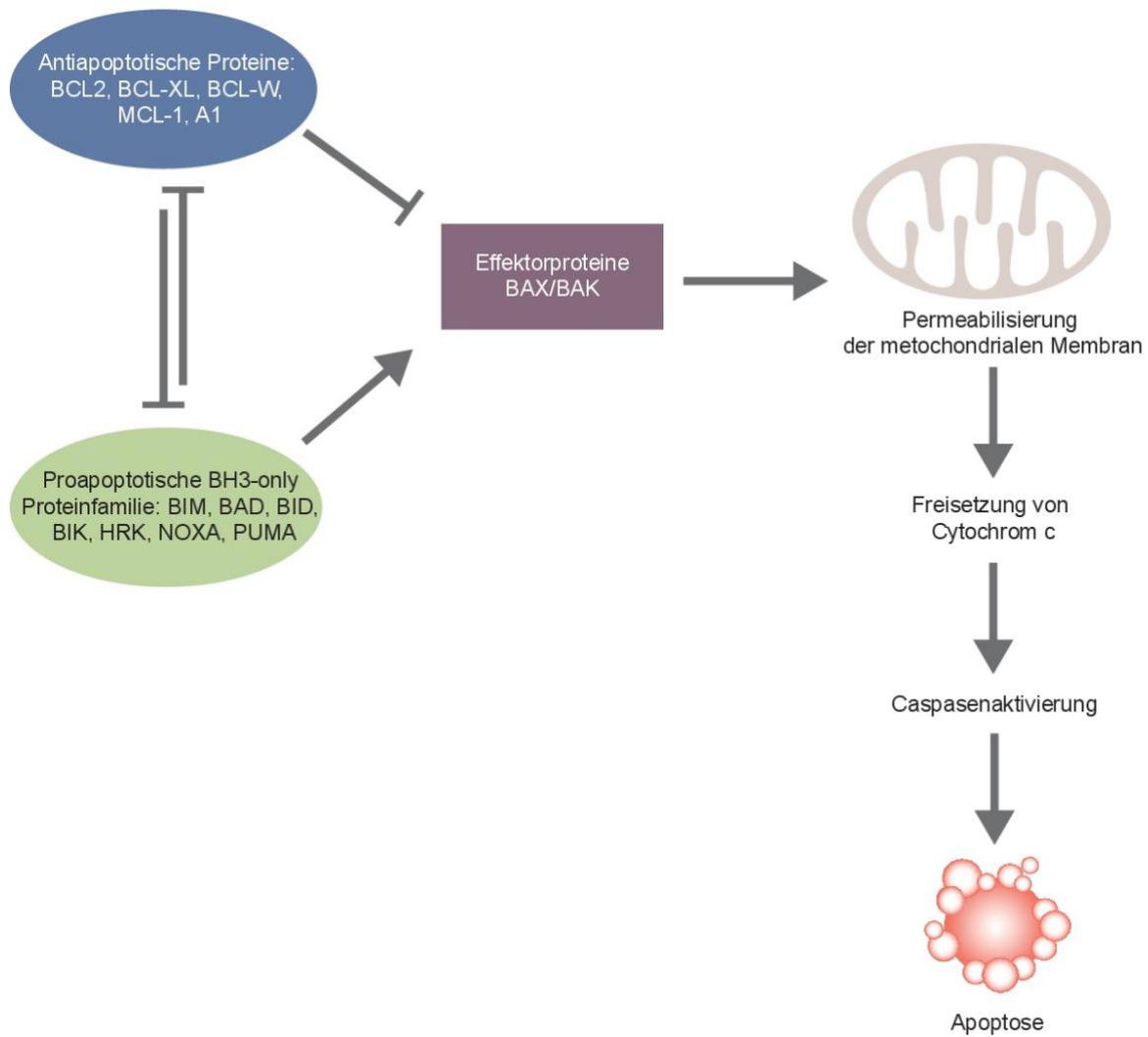


Abbildung 4 **Der intrinsische Apoptoseweg.** Der intrinsische oder auch mitochondriale Apoptoseweg wird durch antiapoptotische Proteine der BCL2-Proteinfamilie reguliert. Antiapoptotischen Proteine wie BCL2 und BCL-XL inhibieren die Effektorproteine BAX/BAK, indem sie um dessen Bindung mit den BH3-only Proteinen konkurrieren. Eine Bindung durch die BH3-only Proteine aktiviert BAX/BAK, welche die mitochondriale Membran permeabilisieren. Infolgedessen kommt es über die Freisetzung von Cytochrom c zur Caspasenaktivierung und folglich zur Apoptose.

2.4.5. Ziel der Dissertation

Dank umfangreicher Sequenzierungsstudien großer DLBCL-Kohorten ist zunehmend mehr über den genauen genetischen Hintergrund der Erkrankung bekannt (Chapuy et al., 2018; Schmitz et al., 2018). Mit zunehmendem Wissen über das Mutationsprofil und die molekularbiologischen Tumormechanismen des DLBCL ist die Anwendung spezifischer molekularer Therapeutika möglich.

Der aktuelle Therapiestandard ist eine Pola-R-CHP basierte Immunchemotherapie. Mit der Erstlinientherapie können Heilungsraten von etwa 65% erzielt werden (Rosenwald et al., 2002). Dennoch bleibt die Behandlung von Menschen mit primär refraktärer Erkrankung und Rezidiven weiterhin eine Herausforderung.

Hochdosisfähigen PatientInnen mit einem späten Rezidiv kann im Rahmen der Zweitlinientherapie eine autologe Stammzelltransplantation angeboten werden. Im Vorfeld werden die Betroffenen einer platinhaltigen Induktionstherapie, gefolgt von einer Hochdosischemotherapie plus Rituximab, unterzogen ("Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge für erwachsene Patient*innen mit einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom und verwandten Entitäten, Langversion 1.0, 2022, AWMF-Registernummer: 018/038OL," 2022). Hiermit können Heilungsraten von 25-35% erreicht werden (Crump et al., 2014; Gisselbrecht et al., 2010; Sehn & Salles, 2021). Aufgrund des hohen Nebenwirkungsprofils kommt jedoch nur etwa die Hälfte der Betroffenen für eine Transplantation in Frage (Sehn & Salles, 2021).

Eine Hoffnung stellen die neuen zellulären Immuntherapien dar. Hierbei werden körpereigene T-Zellen verwendet, deren chimäre Antigenrezeptoren (CAR) gentechnisch so verändert sind, dass sie sich gegen Oberflächenproteine der Tumorzellen richten. Aktuell sind in Europa zwei verschiedene kommerzielle Produkte (Axicabtagene Ciloleucel und Lisocabtagen Maraleucel), die sich gegen den CD19-Rezeptor richten (Anti-CD19-CAR-T-Zellen), in der Zweitlinientherapie hochdosisfähiger PatientInnen mit einer Hochrisikokonstellation zugelassen ("Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge für erwachsene Patient*innen mit einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom und verwandten Entitäten, Langversion 1.0, 2022, AWMF-Registernummer: 018/038OL," 2022). Langfristig liegen die Therapieansprechraten bei etwa 40% erreicht, jedoch ist auch hier mit Rückfällen und umfangreichen Nebenwirkungen zu rechnen (Nagler et al., 2023; Sehn & Salles, 2021).

Aufgrund ihres Nebenwirkungsprofils sind die erläuterten Regimes nicht für die Therapie von Menschen mit eingeschränkter Behandlungsfähigkeit geeignet. Die Therapie dieser PatientInnengruppen bleibt nach wie vor schwierig, mit wenig Aussichten für die Betroffenen.

Die Entwicklung weiterer gezielter und zugleich wirksamer Therapien ist daher notwendig. Molekulare Substanzen, die durch Hemmung von BCL2 (Venetoclax) in die Apoptose eingreifen oder über die BTK die BZR-Signalkaskade inhibieren (Ibrutinib), befinden sich in klinischer Erprobung (Davids et al., 2017; Younes et al., 2019). Mehrere weitere niedermolekulare Verbindungen, die in den BZR- und den TLR-Signalweg eingreifen, stehen zur Verfügung (Weber et al., 2018). In diesem Zusammenhang ist ein geeignetes Versuchsmodell wichtig, um präklinische *in vivo* Testungen zu ermöglichen.

Gentechnisch modifizierte Mauslinien mit Lymphom-typischen genetischen Aberrationen sind geeignete Modellorganismen für die weitere Erforschung der pathogenetischen Mechanismen sowie für die Entwicklung und Testung spezifischer molekularbiologischer Therapeutika abseits von klassischer Chemotherapie. Die genetische Ähnlichkeit zum Menschen sowie die Möglichkeit zur gezielten Genmodifikation innerhalb eines funktionierenden Immunsystems schaffen ideale Bedingungen, um die menschliche Erkrankung möglichst präzise nachzubilden. Zudem weisen diese immunkompetenten Modelle im Gegensatz zu immundefizienten Transplantationssystemen eine intakte Tumorumgebung auf, welche für die Untersuchung indirekter Wirkmechanismen therapeutischer Interventionen relevant ist. (Flümann et al., 2020; Meyer et al., 2021)

Von den neu identifizierten Subtypen des DLBCL weisen insbesondere das ABC-DLBCL beziehungsweise die ABC-DLBCL-dominierten genetischen Cluster MCD und N1 von Schmitz et al. und C5 von Chapuy et al. eine schlechtere Prognose auf. Dies unterstreicht die Notwendigkeit geeigneter Modelle für diese Formen des DLBCL (Alizadeh et al., 2000; Chapuy et al., 2018; Reddy et al., 2017; Rosenwald et al., 2002; Schmitz et al., 2018).

Verschiedene autochthone Mausmodelle, die zur Manifestation von Lymphomen mit einem ABC-DLBCL-ähnlichen Phänotyp führen, existieren bereits. Diese basieren auf der *BCL6*-Translokation t(3;14)(q27;q32) sowie auf bi-allelischer *PRDM1*-Deletion (*Blimp1^{fl/fl}; Cd19-Cre* und *Blimp1^{fl/fl}; Cg1-Cre*), die mit einer konstitutiven Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalweges über das IKK2-Protein (*R26Stop^{FL}-Ikk2ca; Cg1-Cre*) kooperiert (Calado et al., 2010; Cattoretti et al., 2005; Mandelbaum et al., 2010). Jedoch existierte bis dato kein Mausmodell, das *MYD88* L265P reproduziert.

Ziel dieser Arbeit ist die Generierung eines Modellorganismus, der eine der häufigsten Mutationen des ABC-DLBCL trägt, um somit eine präklinische experimentelle Plattform für die Implementierung neuer Therapieformen zu etablieren.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

Antikörper

Zielstruktur	Zusteller	Klon	Katalognummer
CD45R/B220, anti-murin	BD Biosciences	RA3-6B2	553084
BCL2, anti-human	Dako		M0877
Bcl6, anti-murin	Santa Cruz	C-19	sc-368
Cd138, anti-murin	BD Biosciences	281-2 (RUO)	553712
Irf4, anti-murin	Santa Cruz	M-17	sc-6059
Ki67, anti-human	Cell Marque	SP6	
p65, anti-human	Santa Cruz	C-20	sc-372

Chemikalien

Agarose	Carl Roth	3810
Calciumchlorid	Carl Roth	CN93
DMEM	Gibco	11960
DMSO	Carl Roth	A994
dNTPs	Thermo Fisher Scientific	R0181
EDTA	Carl Roth	X986.2
FBS	Gibco	16140071
Glucose	Carl Roth	X997
GoTaq	Promega	M300
HEPES	Carl Roth	6763.3
Isofluran	Piramal Healthcare	30372.00.00
Kaliumchlorid	Carl Roth	6781.1
Natriumchlorid	Carl Roth	3957.4
Puromycin	Sigma Aldrich	P9620
Paraformaldehyd (4%)	AppliChem	252931.1215
PBS (1×)	Gibco	14190250
PBS (10×)	Gibco	14200075
Penicillin/Streptomycin	Gibco	10378016
peqGold TriFast	VWR	30-2010
Polybrene	Sigma Aldrich	TR-1003
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific	EO0491

SDS	Carl Roth	CN30.3
Tris-HCl	Carl Roth	9090.3
Trypsin (0,5%)	Gibco	15400054
Wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O)	Carl Roth	P030.1

Plasmide

Bezeichnung	Addgene-ID
VSVG	8454
RSV-rev	12253
pMDL g/p RRE	12251
Lenti-Cre	17408

Primer

Primer	Sequenz	Primertyp
9969_51	GCCCTTCTGACATTCAATCC	Myd88 fwd
9969_52	ATGGCTCTACAAACTAACACTTCC	Myd88 rev
Cre 4045	CCATCTGCCACCAGCCAG	Cre fwd
Cre 4046	TCGCCATCTTCCAGCAGG	Cre rev

Kits

AMPure® XP	Beckman Coulter, Inc.	A6388-0/1/2
GeneRead DNA Library I Core Kit	Qiagen N. V.	180434
GeneRead DNaseq Panel PCR Kit v2	Qiagen N. V.	181940
GoTaq DNA-Polymerase	Promega Corp.	M300
NEXTflex™ Dual-Indexed DNA Barcodes	Bioo Scientific Corp.	514160
Superscript III	Thermo Fisher Scientific	18080093
„Touchdown“	The Jackson Laboratory	

Software

ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
CLC Genomics Workbench	Qiagen N. V.
ImageLab Software	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Imalytics Software	Philips Innovative Technologies
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
MiSeq Reporter Software	Illumina, Inc.

Geräte

Biomek® FX ^P	Beckman Coulter, Inc.
Ingenia 3.0T MR-System	Philips
MiSeq System	Illumina, Inc.
QIAxcel Advanced System	Qiagen N. V.

Biomaterial

Material	Zusteller	Katalognummer
Aid-Cre (Robbiani 2008)	The Jackson Laboratory	007770
Cd19-Cre (Rickert 1997)	The Jackson Laboratory	006785
Cd21-Cre (Kraus 2004)	The Jackson Laboratory	006368
HEK293T	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	ACC 635

3.2. Methoden

3.2.1. Gezielte Genmodifikation

Der genaue Aufbau des Transgens wird in den Ergebnissen erläutert. Als selektierbare Marker wurden eine Neomycin-Resistenzkassette, flankiert durch Frt, sowie eine Puromycin-Resistenzkassette, flankiert durch F3, verwendet. Der spezifische Vektor wurde durch Amplifikation von BAC-Klonen (engl. *bacterial artificial chromosome*) aus der C57BL/6JRPCIB-37 BAC-Genbank/Genbibliothek erzeugt. Das Zielkonstrukt wurde in embryonale Stammzellen der C57BL/6N Tac Zelllinie durch Transfektion eingebracht. Erfolgreich transfizierte Zellen wurden mithilfe der enthaltenen Resistenzmarker gegen Neomycin und Puromycin selektioniert. Die korrekte Insertion wurde mittels Southern Blot (siehe unten) überprüft. Anschließend wurden die embryonischen Stammzellen in Blastozysten von BL/6N-Mäusen injiziert. Das konditionale Allel wurde nach *in vivo* Flippase-Rekombinase-assoziiierter Deletion der Resistenzgene erzeugt. Die so generierten Allele kodieren zunächst die Wildtypvariante von Myd88. Erst nach Cre-vermittelter *in vivo* Rekombination exprimieren die Versuchstiere das mutierte Myd88p.L252P. Die B-Zell-spezifische Expression von Myd88p.L252P wurde erreicht, indem die Versuchstiere mit Cd19Cre-, AidCre- oder Cd21Cre-Mauslinien (The Jackson Laboratory) gepaart wurden.

3.2.2. Southern Blot

Die korrekte Integration des Transgens wurde von Taconic Biosciences mit der Southern Blot Analyse überprüft. Im Folgenden wird eine kurze Zusammenfassung der Vorgehensweise dargestellt.

Die genomische DNA wurde aus murinen embryonalen Stammzellen der C57BL/6N Tac-Linie mit dem Reagenz-Kit für DNA-Extraktion „DNeasy Blood and Tissue“ von QUIAGEN nach Standardprotokoll des Herstellers isoliert. Die so gewonnene DNA wurde mit den Restriktionsenzymen Baul, Eco91I und KpnI behandelt. (Die jeweiligen Schnittstellen sind in der Abbildung 1A gekennzeichnet.) Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mit der Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und fixiert.

Für die Visualisierung wurde die DNA mit ^{32}P - α -CTP-radioaktiv markierten RNA-Sonden, die mittels Polymerasekettenreaktion hergestellt wurden, hybridisiert.

Die genaue Darstellung der jeweiligen DNA-Fragmente wird in Ergebnissen dargestellt.

3.2.3. Validierung des Allelkonstrukts

Für die Validierung der Allelkonstrukts wurden wildtype murine embryonale Fibroblasten (MEFs) und *Myd88^{c-p.L252P/c-p.L252P}*-mutierte MEFs mit einem lentiviralen Vektor, der für die Cre-Rekombinase kodiert, transduziert.

Für die Herstellung des lentiviralen Vektors verwendeten wir nicht-konfluente HEK293T-Zellen, die in 150 mm-Schalen mit DMEM und 10% FBS kultiviert wurden. Die Transfektion erfolgte nach der Methode der Calcium-Phosphat-Präzipitation. Hierfür wurden das Transferplasmid sowie die drei Verpackungsplasmide (VSV-G, RSV-rev, pMDL g/p RRE) in 400 µl einer 250 mM Calciumchloridlösung gegeben. Weitere 400 µl von zweifachem HEBS-Puffer wurden unter ständigem Mischen auf einem Vortex hinzugefügt. Die Lösung wurde tröpfchenweise zu der 293T-Kultur gegeben und die Zellen über 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen und für weitere 24 Stunden in frischem Medium inkubiert. Der virusenthaltende Überstand wurde jeweils 48 und 72 Stunden nach der Transfektion gesammelt.

Die MEFs wurden aus 13,5-Tage alten *Myd88^{c-p.L265P}*-Embryos gewonnen. Nach Entfernung der bereits differenzierten Organe (Gehirn, Leber) wurde das restliche Gewebe mit 0,5%iger Trypsinlösung eine Stunde bei 37 °C inkubiert und in einzelne Zellen aufgetrennt. Nach zweimaliger Waschung mit PBS, wurden die Fibroblasten in DMSO mit 10% FBS und 1% P/S kultiviert.

Für die lentivirale Transduktion wurden die MEFs über 72 Stunden in virushaltiger Suspension, die alle 24 Stunden erneuert wurde, kultiviert. Unterstützend wurden 8 µg/ml Hexadimethrin Bromid (Polybrene) hinzugegeben. Erfolgreich transduzierte Zellen wurden mit 4 µg/ml Puromycin über drei Tage selektioniert.

Für den Nachweis der Expression von *Myd88^{L265P}* wurden 10⁷ MEFs im TriFast-Reagenz lysiert und RNA für nach Herstellerangaben gewonnen. Für die Anleitung zur cDNA-Synthese siehe SuperScript III von Thermo Fisher. Der zu untersuchende Genabschnitt wurde durch PCR unter Verwendung der Primer „Myd88Seq fwd“ und „Myd88Seq rev“ amplifiziert und der Sanger Sequenzierung zugeführt.

3.2.4. Betreuung der Mauskohorten

Die Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung der Versuchstiere wurde im Einklang mit der geltenden EU Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere sowie der Tierschutzversuchsverordnung des deutschen Tierschutzgesetzes gestaltet.

Die Tiere wurden im Alter von drei Wochen nach Geschlechtern getrennt und Schwanzspitzenbiopsien zur Genotypisierung entnommen. Experimentelle Tiere wurden nach dem Zuchtschema *Myd88^{c-p.L252P/wt}* (M), *Aid^{Cre/wt}* (Aid), *Cd21^{Cre/wt}* (Cd21), *Myd88^{c-p.L252P/wt}* × *Aid^{Cre/wt}* (M-Aid) beziehungsweise *Myd88^{c-p.L252P/wt}* × *Cd21^{Cre/wt}* (M-Cd21) generiert. Tiere mit potenziell belastetem Genotyp wurden täglich in Augenschein genommen. Im Einverständnis mit dem Tierschutzgesetz wurden humane Abbruchkriterien angewandt, um schwere

Belastungen der Tiere zu verhindern. Die Tiere wurden unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen gehalten und *ad libitum* mit Wasser und Nahrung versorgt.

Die Linien $Cd19^{Cre/wt}$ (Cd19), $Myd88^{c-p.L252P/wt} \times Cd19^{Cre/wt}$ (M-Cd19), $Rosa26^{LSL.BCL2.IRES.GFP/wt}$ (Bcl), $Rosa26^{LSL.BCL2.IRES.GFP/wt} \times Cd19^{Cre/wt}$ (B-Cd19) und $Myd88^{c-p.L252P/wt} \times Rosa26^{LSL.BCL2.IRES.GFP/wt} \times Cd19^{Cre/wt}$ (M-B-Cd19) wurden von Laborkollegen gezüchtet (Knittel et al., 2016).

3.2.5. Genotypisierung

Als Ausgangsmaterial dienten Schwanzspitzen, welche den Versuchstieren im Alter von drei Wochen entnommen wurden. Die Lyse erfolgte in einem basischen Puffer (pH 8, 100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA sowie 0,2%iges SDS, Proteinase K 0,2 mg/ml) über Nacht, bei 56 °C. Anschließend wurde das Gemisch über eine Stunde bei 85 °C erhitzt, um die Proteinase K zu deaktivieren.

Für die $Myd88^{p.L265P}$ -PCR wurde 2 µl DNA-Lösung verwendet und nach dem GoTaq DNA-Polymerase Protokoll (Promega) verarbeitet (siehe Tabelle 2). Die einzelnen Komponenten für die PCR sind in Tabelle 3 aufgelistet. Das PCR-Produkt wurde in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und mit dem ChemiDoc Imaging System (BioRad) und der ImageLab Software (BioRad) aufgenommen und ausgewertet. Das Wildtypallel bildet eine 188 bp große Bande, während beim konditionalen Allel eine 307 bp große Bande zur Darstellung kommt.

Tabelle 2 Der Ablauf der $Myd88^{p.L265P}$ -PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 Minuten	1×
Denaturierung	95 °C	1 Minute	} 25 – 35×
Primerhybridisierung	60 °C	1 Minute	
Amplifikation	72 °C	1 Minute/kb	
Finale Amplifikation	72 °C	5 Minuten	1×
Kühlung	4 °C	unbegrenzt	1×

Die Genotypisierung zur Detektion der Cre-Allele $Aid^{Cre/wt}$ und $Cd21^{Cre/wt}$ erfolgte nach demselben Protokoll (siehe Tabelle 4) unter Verwendung von Primern, die eine DNA-Sequenz innerhalb des Cre-Gens erkennen. Die einzelnen Komponenten für die PCR sind in Tabelle 5 aufgelistet. Das Transgen bildet eine 280 bp große Bande.

Tabelle 3 Komponenten für die Myd88^{p.L265P}-PCR

Reagenz	Menge
Primer 1 (9969_51)	0,4 µl
Primer 2 (9969_52)	0,4 µl
Desoxyribonucleosidtriphosphate (10 µM)	0,4 µl
GoTaq Puffer	4 µl
GoTaq	0,1 µl
H ₂ O	12,7 µl
DNA-Lösung	2 µl

Tabelle 4 Der Ablauf der Aid^{Cre/wt}- und Cd21^{Cre/wt}-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 Minuten	
Denaturierung	94 °C	1 Minute	} 2×
Primerhybridisierung	63 °C	1 Minute	
Amplifikation	72 °C	1 Minute	
Denaturierung	94 °C	30 Sekunden	} 30×
Primerhybridisierung	63 °C	30 Sekunden	
Amplifikation	72 °C	30 Sekunden	
Finale Amplifikation	72 °C	3 Minuten	
Kühlung	12 °C	unbegrenzt	

Tabelle 5 Komponenten für die Aid^{Cre/wt}- und Cd21^{Cre/wt}-PCR

Reagenz	Menge
Cre fwd 4045 (10 µM)	0,4 µl
Cre rev 4046 (10 µM)	0,4 µl
Desoxyribonucleosidtriphosphate (10 µM)	0,4 µl
10× PCR Buffer	2 µl
Home made Taq	0,2 µl
H ₂ O	14,6 µl
DNA	2 µl

3.2.6. Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographien wurden mit dem Ingenia 3.0T MR-System (Philips, Niederlande), mit einer 40 mm durchmessenden Magnetspule angefertigt.

Transversale und koronare T2-gewichtete Abdomenaufnahmen wurden unter der Verwendung folgender Einstellungen angefertigt: Turbo Spin-Echo Faktor: 10, Repetitionszeit 2674 ms, Echozeit: 65 ms, Anregungswinkel: 90°, Schnittbilddicke: 1,0 mm, Volumenelementgröße (Voxelgröße): 0,16 × 0,16 × 1,0 mm, Matrixgröße: 256 x 256, Sichtfeld: 40 × 40 mm, Anzahl an Messungen (engl. *number of acquisitions*): 6, Erfassungszeit: 8:30 min für 25 Schnittbilder. Die Bilder wurden im DICOM-Format exportiert und mit Hilfe der Imalytics Software (Philips Innovative Technologies) ausgewertet. Eine halbautomatische Segmentierung der Milz wurde durchgeführt und das Organvolumen bestimmt.

Vor der Durchführung der MRT-Aufnahmen wurden die Mäuse mit 1,5-2,5%iger inhalativer Isofluranlösung anästhesiert.

3.2.7. Ereigniszeitanalysen

Als Ereignis galt der Tod, entweder wenn die Versuchstiere tot aufgefunden wurden oder aufgrund von nicht mit dem Tierschutzgesetz vereinbarem Leiden euthanasiert werden mussten. Als solches Leiden galten ausgeprägte Formen von Hepato-/Splenomegalie sowie der Lymphadenopathie, offene Wunden und Apathie. Tiere, die zu Zwecken der Informationsgewinnung ohne äußere Symptomatik getötet worden waren, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die statistischen Analysen wurden mit Prism (GraphPad) durchgeführt (Log-Rank-Test).

3.2.8. Histologische und immunhistologische Charakterisierung

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Gewebeproben für 48 Stunden in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte im Pathologischen Institut der Uniklinik Köln. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und anschließend zwei bis vier Millimeter dicke Schnitte angefertigt. Es wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen sowie immunhistochemische Färbungen von Ki67, p65, B220, Irf4, Bcl6 und Cd138 durchgeführt. Die Beurteilung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher.

3.2.9. Klonalitätsanalysen per Southern Blot

Zur Klärung der Frage nach der Klonalität führten wir eine Southern Blot Analyse der V(D)J-Umlagerungen in der DNA aus den Infiltraten durch. Die DNA wurde mit den Enzymen EcoRI behandelt und anschließend auf eine Hybond Membran transferiert. Für die Hybridisierung dienten 250 bp lange, mit ³²P-α-CTP radioaktiv markierte Sonden, die aus dem V(D)J-Plasmid mit Hilfe der Restriktionsenzyme HindIII/NaeI gewonnen wurden.

3.2.10. Mutationsanalyse der humanen DLBCL-Kohorte

Für die Mutationsanalyse der DLBCL-Kohorte, bestehend aus 45 PatientInnen, führten wir eine gezielte Sequenzierung des Tumormaterials aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe mit einer Multiplex-PCR im Hinblick auf folgende Gene durch: *MYD88*, *ATM*, *BTK*, *CD79B*, *DDX3X*, *FBXW7*, *MAPK1*, *NOTCH1*, *PIK3CA*, *PIK3CD*, *PTEN*, *PTPN6*, *SF3B1*, *TP53* und *XPO1*.

Für die Multiplex-PCR wurden zehn Nanogramm Ausgangsmaterial sowie das GeneRead *DNAseq* Panel PCR Kit V2 (Qiagen Inc., Hilden, GER) verwendet. Die Gensonden stammten aus einem Primer Set, das in einer früheren Arbeit etabliert wurde (Vollbrecht et al., 2015). Das Amplifikat wurde unter Verwendung des Agencourt® AMPure® XP Aufreinigungsverfahrens mit magnetischen Beads (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) auf der robotischen Arbeitsplattform Biomek® FX^P (Beckman Coulter, Inc.) automatisiert extrahiert.

Die Vorbereitung der DNA-Bibliothek wurde mit dem GeneRead DNA Library I Core Kit (Qiagen) durchgeführt. Nach Adenylierung und Ligation der Ausgangs-DNA an Adaptersequenzen, die NEXTflex™ Dual-Indexed DNA Barcodes (Bioo Scientific, Austin, Texas, USA), wurde die DNA erneut mit magnetischen Beads aufgereinigt und der Größe nach selektiert. Das so gewonnene Material wurde in zehn PCR-Zyklen amplifiziert. Hierbei kam der NEXTflex™ Primer Mix (Bioo Scientific) zur Anwendung. Die Qualität der DNA-Bibliothek wurde mittels Kapillarelektrophorese geprüft. Die Analyse wurde automatisiert mit Hilfe des QIAxcel Advanced System (Qiagen, Inc.) durchgeführt.

Die Sequenzierung wurde mit dem MiSeq System (Illumina, Inc., San Diego, Ca, USA) durchgeführt. 15 pM DNA aus der NGS-Bibliothek wurden zu dem v2 Reagenz Kit zugegeben.

Die Verarbeitung der Daten erfolgte über die Generierung von FASTQ Dateien mit der MiSeq Reporter Software (Illumina, Inc.) und weitere Analyse mit dem CLC Genomics Workbench Programm (Qiagen, Inc.).

Die Zulassung der Versuche mit humanem Ausgangsmaterial wurde entsprechend des BioMaSOTA (Biologische Material Sammlung zur Optimierung Therapeutischer Ansätze) intern geprüft.

4. ERGEBNISSE

4.1. Konditionales Maus-Allel mit B-Zell-spezifischer Expression von *Myd88*^{c-p.L252P}

Um die Bedeutung von *MYD88*^{p.L265P} für die Pathogenese von Lymphomen zu untersuchen, wurde ein konditionales Allel entwickelt, das die B-Zell-spezifische Expression von *Myd88*^{p.L252P}, dem murinen orthologen Gen des humanen *MYD88*^{p.L265P}, aus seinem endogenen Locus ermöglicht.

Das Zielkonstrukt besteht aus den sechs Exonen der Wildtyp-Variante, gefolgt von einem Duplikat der Exone 2-6, die jedoch die zu untersuchende Punktmutation *Myd88*^{p.L252P} im Exon fünf tragen. Ein Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormons am Ende der 3'-untranslatierten Region (UTR) der Wildtyp-Sequenz verhindert die Transkription der darauffolgenden Mutante. Somit exprimiert das Allel die Wildtyp-Form des Myd88-Proteins.

Als Selektionsmarker dienen eine Neomycin-Resistenzkassette umgeben von Frt-Sequenzen im Intron 1 sowie eine Puromycin-Resistenzkassette, flankiert von F3-Stellen distal des Polyadenylierungssignals (Abb. 5A, mittlerer Bildabschnitt). Die Versuchstiere wurden im Verlauf mit Flp-Mäusen gekreuzt, wodurch eine *in vivo* Flippase-vermittelte Deletion der Selektionsmarker erzielt wurde (Abb. 5A, unterer Bildabschnitt).

Die konditionale Expression der Mutante erfolgt nach *in vivo* Cre-vermittelter Deletion der endogenen Exone zwei bis sechs, die mitsamt der 3' UTR und des PolyA-Signals von LoxP-Stellen flankiert werden. Die B-Zell-spezifische Expression der Mutante wird durch die Verwendung von *Aid*^{Cre} (Robbiani et al., 2008) beziehungsweise *Cd21*^{Cre} (Kraus et al., 2004) gewährleistet. Die Verwendung der unterschiedlichen Cre-Allele ermöglicht zudem die Aktivierung des *Myd88*^{p.L252P} Allels zu unterschiedlichen Stadien der B-Zell-Entwicklung. Während der *Aid*-Promoter in Keimzentrum-B-Zellen aktiv ist (Muramatsu et al., 1999), wird *Cd21* in naiven B-Zellen exprimiert (Takahashi et al., 1997).

Die generierten Allele werden folgendermaßen abgekürzt: *Myd88*^{p.L252P} – „M“, *Aid*^{Cre/wt}; *Myd88*^{c-p.L252P/wt} – „M-Aid“, *Aid*^{Cre/wt} – „Aid“, *Cd21*^{Cre/wt}; *Myd88*^{c-p.L252P/wt} – „M-Cd21“, *Cd21*^{Cre/wt} – „Cd21“.

Die korrekte Integration des Transgens wurde mit der Southern Blot Analyse überprüft.

Die genomische DNA wurde aus embryonalen Stammzellen isoliert und mit den Restriktionsenzymen Baul, Eco91I und KpnI behandelt. (Die jeweiligen Schnittstellen sind im oberen Abschnitt der Abb. 5A gekennzeichnet.) Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte mit einer 3'-, einer 5'- und einer Neo-Sonde (Abb. 5A mittlerer Bildabschnitt). Während beim Wildtyp die 5'-Sonde nach Behandlung mit Baul eine Bande von etwa 8,8 kb bildet, kommt bei erfolgreicher Integration des *Myd88*^{c-p.L252P} Allels eine zusätzliche Bande von 6,0 kb

zur Darstellung, da sich eine weitere Baul-Schnittstelle in der Neo-Resistenzkassette befindet. Nach Eco91I-vermittelter DNA-Verdauung bindet die 3'-Sonde eine 11,2 kb große Bande bei wildtypischer DNA und eine weitere 13,3 kb große Bande nach erfolgreichem Gentransfer, da die Puromycin-Resistenzkassette eine weitere komplementäre Region enthält. Nach Behandlung der DNA mit KpnI bindet die Neo-Sonde bei erfolgreicher Integration des mutierten *Myd88*^{c-p.L252P} Allels eine 6,8 kb große Bande innerhalb der Neo-Resistenzkassette (Abb. 5B). Zusammenfassend konnte hier die korrekte Integration des Transgens bestätigt werden.

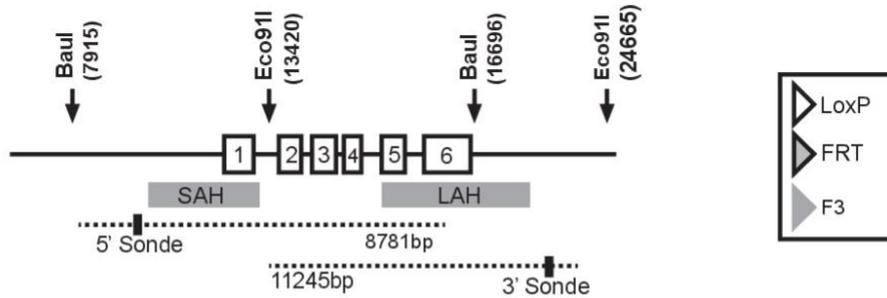
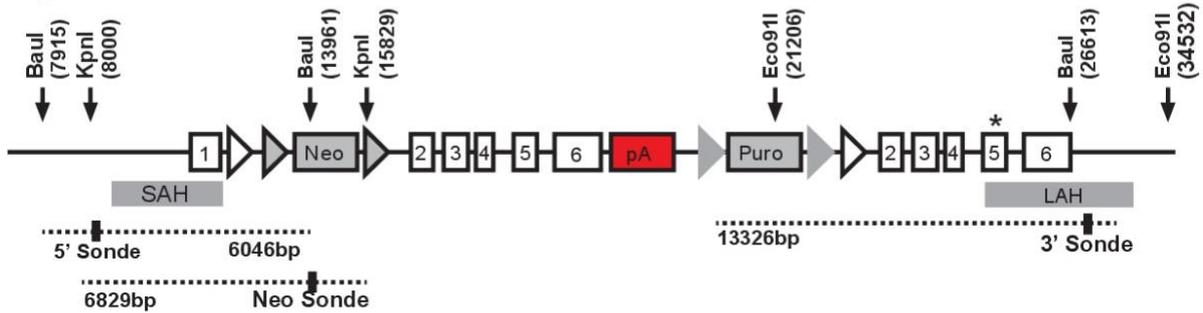
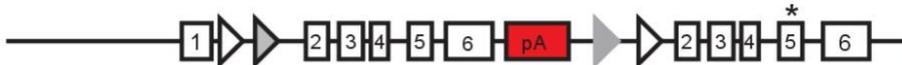
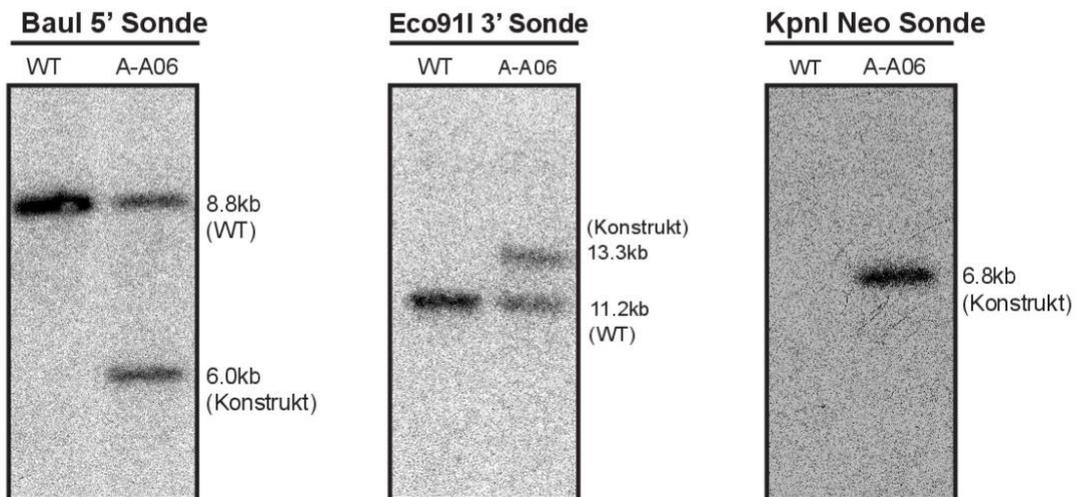
A**Myd88 Wildtyp Allel****Myd88 Zielkonstrukt****Konditionales Myd88 knock-in Allel (nach Flp-vermittelter Rekombination)****B**

Abbildung 5: **Aufbau und Validierung des Myd88^{p.L252P} Allels.** **A)** Oberer Bildabschnitt: Schematische Darstellung des wildtypen murinen Myd88 Gens. Mittlerer Bildabschnitt: Das Myd88^{p.L252P} Allel bestehend aus der Wildtypsequenz, begrenzt durch die Resistenzkassetten (Neo, Puro), und gefolgt von einem Duplikat der Exone zwei bis fünf mit der Punktmutation Myd88^{p.L252P} im Exon fünf (Sternchen). Ein Polyadenylierungssignal (pA) verhindert die Expression der Mutante. SAH – short arm of homology, LAH – long arm of homology. Unterer Bildabschnitt: Das konditionale Allel nach Flp-vermittelter Entfernung der Resistenzkassetten. Die Pfeile markieren die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Baul, Eco91I und KpnI. Die Detektion erfolgt mit 5' und 3' Sonden, deren Bindungsstellen durch gestrichelte Linien symbolisiert sind. **B)** Eine Southern Blot Analyse zur Validierung der korrekten Integration des Transgens.

4.2. Das generierte *Myd88*^{c-p.L252P}-Allel ermöglicht die konditionale Expression von *Myd88*^{p.L252P}

Um die Funktionalität unseres konditionalen Allels zu überprüfen, untersuchten wir die Sequenz der *Myd88*-cDNA von embryonalen Fibroblasten der *Myd88*^{wt/wt}- und *Myd88*^{c-p.L252P/c-p.L252P}-Mäuse mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung, jeweils vor und nach Cre-vermittelter Rekombination.

Das genetische Material für die Untersuchung stammte aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) von *Myd88*^{c-p.L252P/c-p.L252P}-Mäusen. Als Kontrolle dienten MEFs von *Myd88*^{wt/wt}-Tieren. Durch lentivirale Transduktion wurde das Cre-Gen in die MEFs eingeschleust. RNA wurde aus den MEFs isoliert und in cDNA transkribiert, wonach die *Myd88* cDNA der Sanger-Sequenzierung zugeführt werden konnte.

Die initiale Expression von Wildtyp-*Myd88*-mRNA konnte zunächst in beiden Mauslinien gezeigt werden (Abb. 6, oberer und mittlerer Bildabschnitte). Während die lentivirale Transduktion mit Cre keinen Effekt auf die Wildtyp-RNA zeigte (oberer Bildabschnitt), konnte in der mRNA der *Myd88*^{c-p.L252P/c-p.L252P}-MEFs nach Cre-vermittelter Rekombination die *Myd88*^{p.L252P}-Mutation nachgewiesen werden (unterer Bildabschnitt, CTG -> CCG).

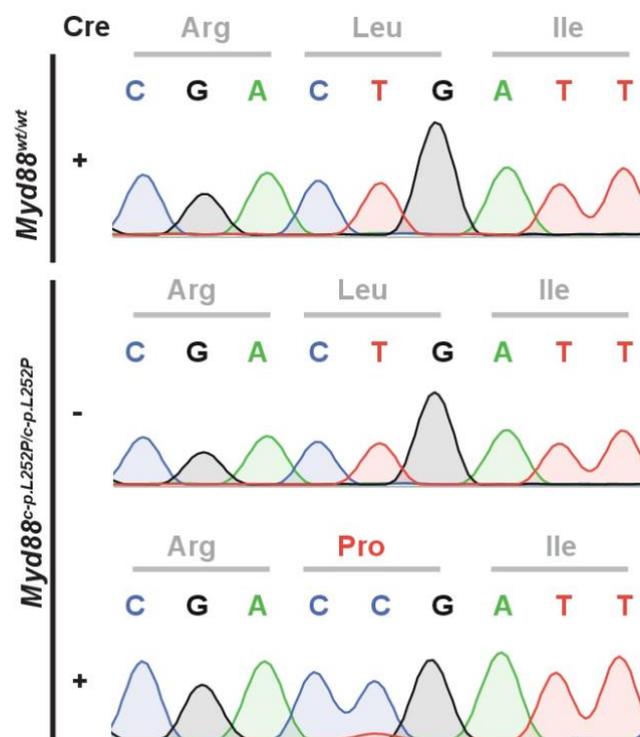


Abbildung 6: Cre-vermittelte Aktivierung des *Myd88*^{c-p.L252P}-Allels führt zur Expression der Mutation auf RNA-Ebene. Murine embryonale Fibroblasten von Wildtyp-Tieren und *Myd88*^{c-p.L252P/c-p.L252P} wurden lentiviral mit Cre transduziert. Anschließend wurde eine Sanger-Sequenzierung des relevanten Bereichs der *Myd88* cDNA durchgeführt. Dargestellt ist die korrespondierende cDNA-Sequenz der Aminosäuren 250-252.

Weitere Experimente der Arbeitsgruppe belegten die Funktionalität des Allels. Westernblot-Experimente wiesen die erfolgreiche Translation der mutierten mRNA in reifes Protein nach sowie dessen Vermögen, NFκB zu aktivieren, was sich in erhöhten Mengen phosphorylierten p65 widerspiegelte (Abb. 1 C, D aus (Knittel et al., 2016)).

Zusammenfassend konnte ein funktionales Allel generiert werden, das nach Cre-vermittelter Rekombination zur Expression der *Myd88*^{p.L252P} mRNA vom endogenen *Myd88*-Lokus und dessen Translation in Protein, in Mengen, die mit denen des Wildtyp-Allels vergleichbar sind, führt.

4.3. Die B-Zell-spezifische Expression von *Myd88*^{p.L252P} führt zu verkürztem Gesamtüberleben und lymphoproliferativen Organmanifestationen

Um die Auswirkungen der B-Zell-spezifischen Expression von *Myd88*^{p.L252P} zu untersuchen, wurden *Aid*^{Cre/wt};*Myd88*^{cc-p.L252P/wt} (M-Aid)- und *Cd21*^{Cre/wt};*Myd88*^{cc-p.L252P/wt} (M-Cd21)-Mäuse sowie die jeweiligen Vergleichsgruppen *Aid*^{Cre/wt} (Aid) und *Cd21*^{Cre/wt} (Cd21) longitudinal MR-tomographisch überwacht. Hierbei fanden sich bei der Mehrheit der untersuchten *Myd88*^{p.L252P}-mutierten Mäuse (M-Aid, M-Cd21), jedoch nicht bei den jeweiligen Kontrolltieren, klinisch-morphologische Anzeichen einer lymphoproliferativen Erkrankung in Form von Splenomegalie und gelegentlicher Lymphadenopathie (Abb. 7A). Eine Splenomegalie konnte in zwei von drei M-Aid-Mäusen und in zwei von drei M-Cd21-Mäusen festgestellt werden. Eine Lymphadenopathie wurde in zwei von drei M-Aid-Mäusen und in einer von drei M-Cd21-Mäusen festgestellt. Die beobachteten lymphoproliferativen Veränderungen spiegelten sich in einer signifikanten Verkürzung der Lebensdauer *Myd88*^{p.L252P}-mutierter Mäuse wider. Die mediane Überlebenszeit der M-Aid-Tiere war mit 574 Tagen signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe (Aid, medianes Gesamtüberleben nicht erreicht). Ebenfalls konnte eine signifikante Reduktion der Lebensdauer der M-Cd21-Tiere auf 610 Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe (Cd21, medianes Gesamtüberleben nicht erreicht) festgestellt werden. (Abb. 7B)

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die B-Zell-spezifische Expression von *Myd88*^{p.L252P} die Entstehung lymphoproliferativer Organmanifestationen begünstigt und damit einhergehend zu verkürztem Gesamtüberleben führt.

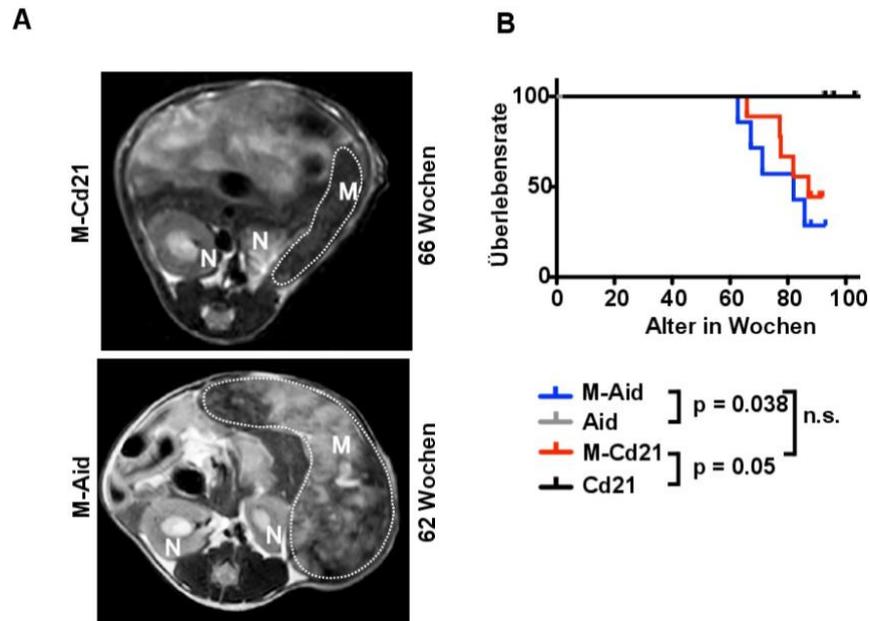


Abbildung 7: **Klinische Manifestation einer lymphoproliferativen Erkrankung in *Myd88*^{p.L252P}-mutierten Mäusen.** Kohorten von M-Cd21- und M-Aid-Mäusen wurden über einen Zeitraum von etwa 90 Wochen auf die Entwicklung von Symptomen hin beobachtet und das Gesamtüberleben dokumentiert. **A)** Diese MRT-Aufnahmen zeigen die Manifestation einer Splenomegalie (M – Milz, N – Niere) bei M-Cd21- (oben) und M-Aid-Mäusen (unten) im Alter von 66 beziehungsweise 62 Wochen. **B)** Überlebenszeitkurve. Die Überlebenszeit der Versuchsgruppe ist signifikant kürzer im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (unterer Bildabschnitt, Log-Rank-Test).

4.4. *Myd88*^{p.L252P} verursacht Infiltrate mit lymphoproliferativer Morphologie und führt gelegentlich zur Entwicklung eines DLBCL-ähnlichen Phänotyps

Histologische Untersuchungen gaben weiteren Aufschluss über den Charakter der pathologischen Veränderungen, die bei den *Myd88*^{p.L252P}-mutierten Tieren auftraten.

Bei allen untersuchten Tieren (drei von drei M-Aid und drei von drei M-Cd21) konnten in Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Milz indolente Infiltrate dargestellt werden, die zu einer Zerstörung der Gewebearchitektur führten. Die Zellpopulationen bestanden aus monomorphen lymphatischen Zellen und entsprachen in ihrer morphologischen Erscheinung dem Bild einer lymphoproliferativen Erkrankung (Abb. 8 A, B). Gelegentlich (eins von drei M-Aid- und eins von drei M-Cd21-Tieren) präsentierten sich Infiltrate aus großen lymphatischen Zellen, die morphologisch an das DLBCL erinnerten (Abb. 8 A, B markiert mit Sternchen). Ein ähnliches Bild ergab sich für die hepatischen Schnitte (Abb. 8 C, D).

Das Knochenmark der mutierten Tiere zeigte sich histologisch unverändert (Abb. 8 E, F).

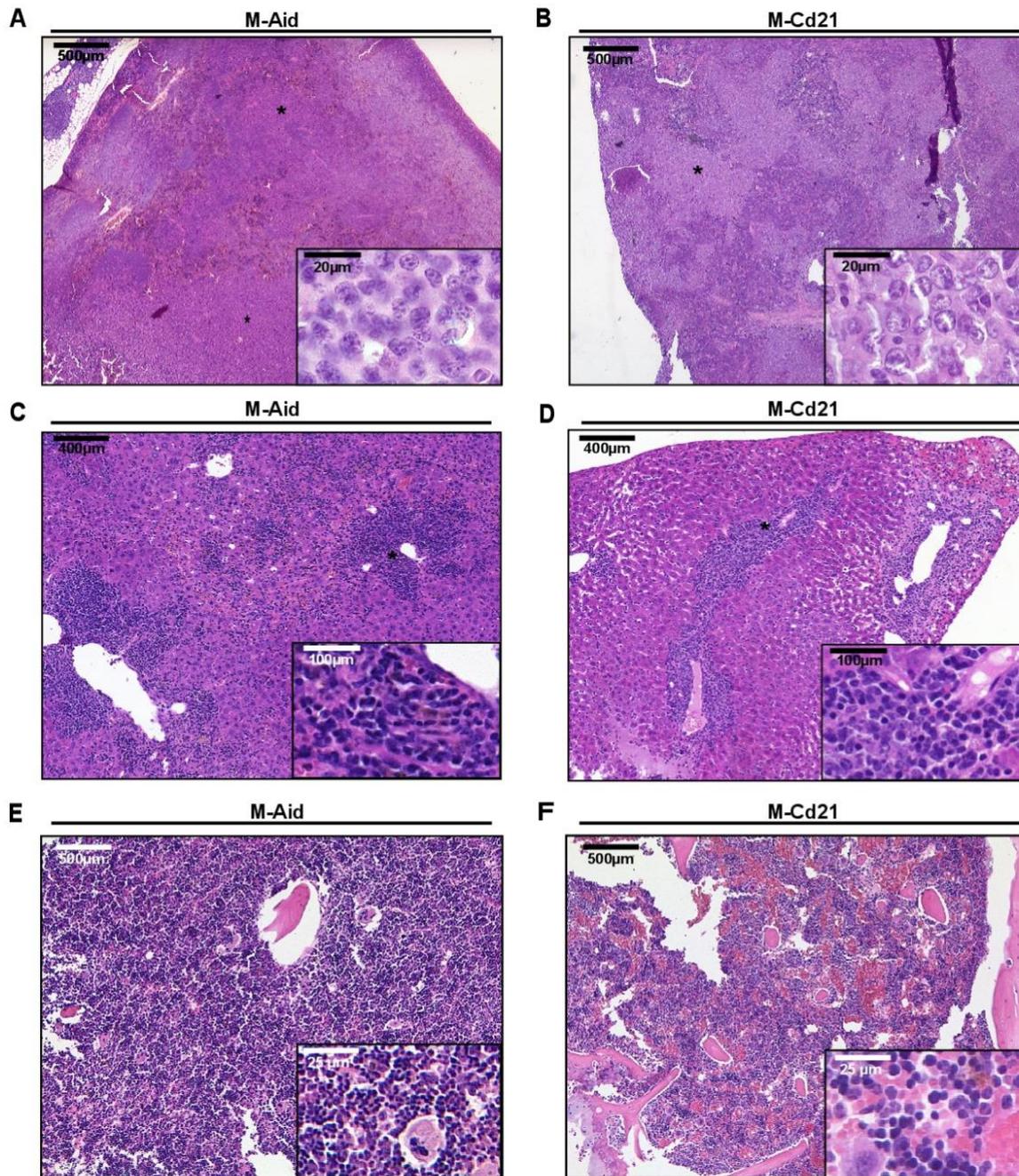


Abbildung 8: *Myd88^{p.L252P} verursacht Lymphoproliferation und die Entwicklung eines DLBCL-ähnlichen Phänotyps. A), B)* Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Milz von M-Aid- und Cd21-Mäusen zeigen lymphatische Infiltrate im Sinne einer lymphoproliferativen Erkrankung. Gelegentlich zeigen sich homogene blastoide Infiltrate mit DLBCL-ähnlicher Morphologie (markiert mit Sternchen, im unteren rechten Kasten vergrößert dargestellt). *C), D)* Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Leber von M-Aid- und Cd21-Mäusen mit lymphatischer Infiltration im Sinne einer lymphoproliferativen Erkrankung. *E), F)* Hämatoxylin-Eosin-Färbungen des Knochenmarks von M-Aid- und Cd21-Mäusen.

Im nächsten Schritt wurde eine immunhistochemische Charakterisierung der Infiltrate anhand der Marker B220 (Pan-B-Zell-Marker, (Coffman & Weissman, 1981)), Irf4 (Marker für B-Zellen nach der Keimzentrumsreaktion (Eisenbeis et al., 1995; Falini et al., 2000; Mittrücker et al., 1997)) und Cd138 (Plasmazellmarker, (Sanderson et al., 1989; Wijdenes et al., 1996)) durchgeführt (Cheong Tan, 2009; Hans, 2004). Die Untersuchungen ergaben ein uneinheitliches Muster. Die indolenten lymphoproliferativen Zellpopulationen stellten sich jedoch größtenteils negativ für Bcl6 (Marker für B-Zellen des Keimzentrums, (Flenghi et al., 1995)) dar.

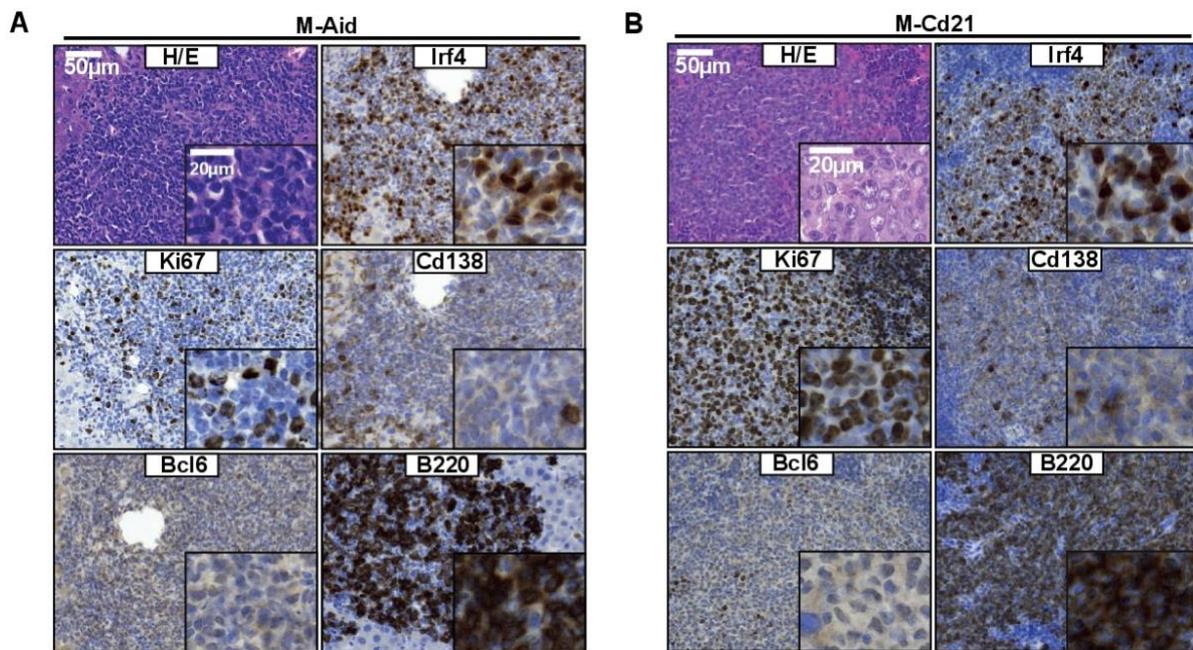


Abbildung 9: **Die homogenen Infiltrate präsentieren einen ABC-DLBCL-Immunphänotyp.** A), B) Immunhistochemische Färbungen der homogenen Infiltrate mit DLBCL-ähnlicher Morphologie zeigen ein B220- und Irf4-positives sowie Bcl6- und Cd138-negatives Färbemuster bei uneinheitlichem Färbeverhalten der restlichen lymphoproliferativen Infiltrate ohne DLBCL-Morphologie (hier nicht dargestellt). Die Wachstumsfraktion wurde durch immunhistochemische Färbungen auf Ki67 dargestellt.

Die gelegentlich auftretenden Proliferationen mit DLBCL-ähnlicher Morphologie hingegen präsentierten ein einheitliches immunhistochemisches Erscheinungsbild. Die Infiltrate zeigten sich positiv für den B-Zell-Marker B220 und gleichzeitig Cd138-negativ. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Tatsache, dass *MYD88*-Mutationen ein charakteristisches, jedoch nicht pathognomisches Merkmal des lymphoplasmozytären B-NHL M. Waldenström sind relevant. Anhand der Färbung können die dargestellten Infiltrate eindeutig als B-Zell-Population identifiziert, jedoch von einer plasmazytären Proliferation abgegrenzt werden. Die Bcl6-Negativität bei gleichzeitig Irf4-positivem Färbemuster veranschaulicht, dass es B-Zellen sind, welche die Keimzentrumsreaktion bereits durchlaufen haben.

In Zusammenschau zeigten sich hier Infiltrate aus B-Zellen, welche die Keimzentrumsreaktion bereits passiert haben, jedoch noch nicht das Stadium der Plasmazelle erreicht haben – passend zum Immunphänotyp des ABC-DLBCL nach der Klassifikation von Hans et al. (Hans, 2004) (Abb. 9 A, B).

Zusammenfassend beobachteten wir im Zusammenhang mit der B-Zell-spezifischen *Myd88*^{p.L252P}-Mutation die Entwicklung diffuser lymphoproliferativer Infiltrate und gelegentlich von Infiltraten, die morphologisch und immunhistochemisch dem ABC-DLBCL ähnelten.

4.5. *Myd88*^{p.L252P} führt gelegentlich zur Lymphoproliferation klonalen Ursprungs

Im Rahmen der Reifung durchlaufen B-Zellen im Knochenmark den Prozess der V(D)J-Rekombination. Die V(D)J-Rekombination beschreibt einen genetischen Umlagerungsprozess, im Zuge dessen die variable Region der Immunglobulingene umstrukturiert wird. Hierbei werden einzelne der verschiedenen V-, D- und J-Segmente, die sich im Keimbahnloкус befinden, nach dem Zufallsprinzip miteinander kombiniert, während die restlichen Segmente entfernt werden. Die hohe Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten erzeugt eine immens hohe Variabilität des V(D)J-Gensegments und stellt ein Unterscheidungsmerkmal der einzelnen B-Zellen dar. Dieser Umstand kann genutzt werden, um die Frage nach der Klonalität einer B-Zell-Population zu untersuchen. (Brack et al., 1978; Dreyer & Bennett, 1965; Rabbits & Forster, 1978)

Hierfür führten wir eine Southern Blot Analyse der V(D)J-Umlagerungen aus der DNA der lymphatischen Organe durch. Eine RNA-Sonde komplementär zu einem Abschnitt im J-Segment markierte bei der Keimbahnkonfiguration eine 6,2 kb große Bande. Nach durchlaufener V(D)J-Rekombination variiert die Länge des sondierten Fragments der einzelnen B-Zellen individuell in Abhängigkeit von der Kombination der einzelnen Gensegmente. Im Fall einer klonalen bis oligoklonalen B-Zell Expansion entsteht eine B-Zell-Population, die ein einzelnes (klonales) bis wenige (oligoklonale) gemeinsame V(D)J-Segmente aufweist. Diese dominanten V(D)J-Umlagerungen kommen im Southern Blot in Form einer oder einiger weniger zusätzlicher Banden variabler Größe zur Darstellung (Abb. 10 B).

Bei Versuchstieren, deren Infiltrate einen lymphoproliferativen Phänotyp aufwiesen, konnte keine Klonalität der Immunglobulingene nachgewiesen werden. Ein anderes Bild zeigte sich bei der Untersuchung der Infiltrate mit DLBCL-ähnlicher Morphologie. Hier konnte, passend zum einheitlichen histologischen Erscheinungsbild, eine Mono- oder Oligoklonalität der V(D)J-Segmente nachgewiesen werden (Abb. 10 A). Als Positivkontrolle dienten Proben aus dem

Tumormaterial der E μ :TCL1-Mäuse, einem bereits etablierten Mausmodell für B-CLL mit oligoklonaler Ausprägung.

Zusammenfassend führt die B-Zell-spezifische Aktivierung von *Myd88*^{p.L252P} häufig zu einer Lymphoproliferation klonalen Ursprungs mit DLBCL-ähnlicher Morphologie.

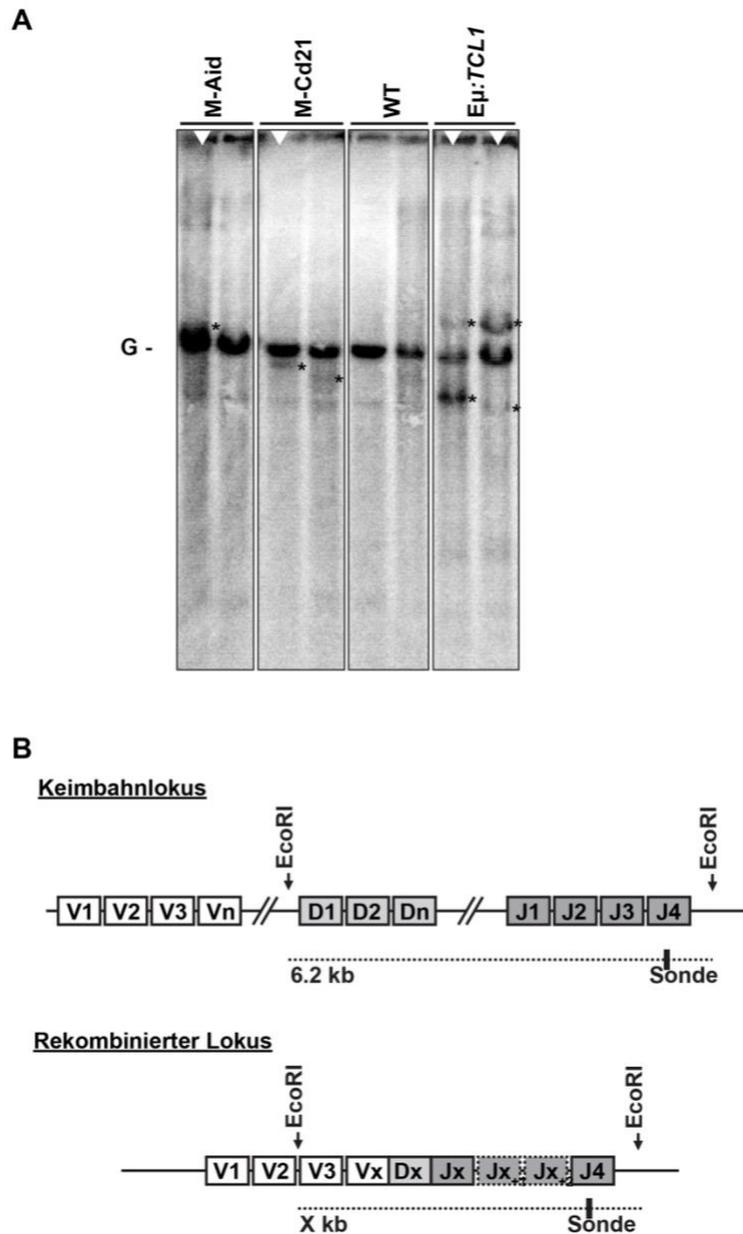


Abbildung 10: **Die Läsionen mit DLBCL-ähnlicher Histomorphologie sind klonaler Natur.** Genomische DNA aus lymphatischen Organen wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* behandelt. **A)** Die Sonde, komplementär zu einem Abschnitt im J-Segment, bildet bei Keimbahnkonfiguration eine 6,2 kb schwere Bande (G). Sternchen markieren weitere Banden variabler Größe, die bei Tieren mit histologischem Lymphomnachweis (weiße Pfeile) erscheinen. E μ :TCL1 Tiere dienen als Positivkontrolle. **B)** Eine schematische Darstellung des VDJ-Genlokus. Die Pfeile markieren die Schnittstellen der Endonuklease. Die gestrichelte Linie symbolisiert die komplementäre Sequenz der RNA-Sonde.

4.6. ABC-DLBCL zeigt eine hohe BCL2-Expression

MYD88-Mutationen sind beim DLBCL häufig mit weiteren genetischen Läsionen assoziiert (Chapuy et al., 2018; Schmitz et al., 2018). Wir untersuchten diese Zusammenhänge in einer Kohorte von DLBCL Patientinnen und Patienten (n = 45), die entsprechend dem Hans-Algorithmus unterteilt wurden in den GCB- (n = 24) und Nicht-GCB-Subtyp (n = 21, eine Kategorie, in die primär GCB-Fälle, aber auch die weniger häufig vertretenen unklassifizierbaren DLBCL-Tumore fallen). Wir sequenzierten das Tumormaterial aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe mit einer Multiplex-PCR im Hinblick auf folgende Gene: *MYD88*, *ATM*, *BTK*, *CD79B*, *DDX3X*, *FBXW7*, *MAPK1*, *NOTCH1*, *PIK3CA*, *PIK3CD*, *PTEN*, *PTPN6*, *SF3B1*, *TP53* und *XPO1*.

In unserer Kohorte waren die Gene *Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)* mit einer Frequenz von 31% sowie *CD79B* und *TP53* mit jeweils 24% am häufigsten mutiert. Es konnten insgesamt zehn *MYD88*-Mutationen (22%) identifiziert werden, davon fünfmal die p.L265P-Variante (Abb. 11 A). Diese traten in der ABC-DLBCL Gruppe häufiger auf als in der GCB-DLBCL Gruppe (19% beziehungsweise 4,2%, Abb. 11 B), was mit den Daten früherer Studien in Einklang steht (Choi et al., 2013; Ngo et al., 2011; Reddy et al., 2017).

Wie bereits eingangs beschrieben, zeigt sich beim DLBCL häufig eine erhöhte Expression von *BCL2* (Chapuy et al., 2018; Monni et al., 1999; Schmitz et al., 2018). Daher untersuchten wir im nächsten Schritt immunhistochemisch die *BCL2*-Expression und sahen eine statistisch signifikant erhöhte Proteinexpression in der ABC-Gruppe (Abb. 11 C, D). Während in der GCB-Subgruppe der Großteil (13 von 23) der Proben keine bis niedrige *BCL2*-Expression aufwies, konnte in der ABC-Gruppe in 18 von 23 Fällen eine hohe Proteinexpression verzeichnet werden (Abb. 11C, D). Dies geht einher mit anderen Studienergebnissen, die erhöhte *BCL2*-mRNA-Spiegel in ABC-Tumoren zeigten (Chapuy et al., 2018; Schmitz et al., 2018).

Insgesamt demonstrierten die Untersuchungen an unserer humanen Kohorte, dass der ABC-DLBCL-Subtyp gehäuft die *MYD88*^{p.L265P}-Mutation aufweist und mit einer erhöhten Expression von *BCL2* korreliert.

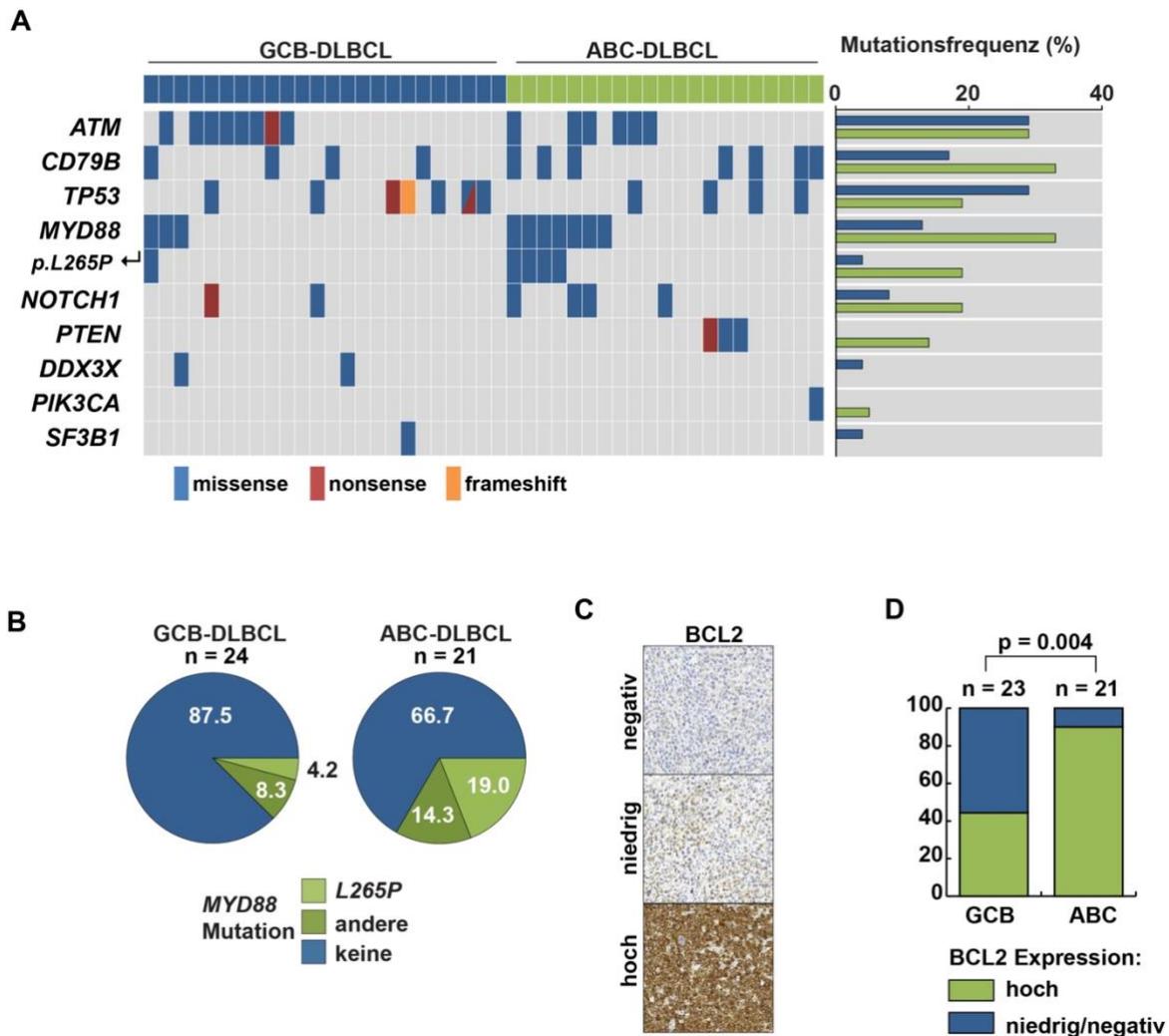


Abbildung 11: **ABC-DLBCL zeigt eine erhöhte BCL2-Expression.** A) Sequenzierungsanalyse von humanen DLBCL Tumoren. Die untersuchten Mutationen sind in der linken Spalte aufgelistet mit den jeweiligen Frequenzen im Balkendiagramm rechts (blau GCB-DLBCL, grün ABC-DLBCL). B) Die Frequenz der MYD88 Mutation beim GCB- bzw. ABC-Subtyp. C) Exemplarische immunohistochemische Färbungen zur Beurteilung der BCL2-Expression. D) Klassifizierung der Expression von BCL2 in den jeweiligen DLBCL-Subtypen (Exakter Fisher-Test).

4.7. Die Kooperation zwischen *Myd88*^{p.L252P} und *BCL2*-Überexpression beschleunigt die Entwicklung einer lymphoproliferativen Erkrankung vom ABC-DLBCL-Typ

Basierend auf der Erkenntnis, dass ABC-DLBCL eine erhöhte Expression von *BCL2* zeigt, ist eine Kooperation zwischen der *MYD88* L265P und *BCL2*-Überexpression in der Lymphomagenese anzunehmen. Um einen potenziellen kooperativen Effekt zwischen diesen beiden Mutationen zu untersuchen, wurde ein Allel zur *BCL2*-Überexpression generiert. Zusammengefasst wurde humane *BCL2*-cDNA in den *Rosa26*-Genlocus inseriert. Die Expression des Transgens steht unter der Kontrolle des CAGGS-Promoters und wird zunächst durch eine LoxP.STOP.LoxP-Kassette gehemmt. Die Expression wird nach Cre-vermittelter

Rekombination ermöglicht und kann mithilfe des Grünen Fluoreszierenden Moleküls, dessen Sequenz ebenfalls im Konstrukt enthalten ist, überwacht werden. (Knittel et al., 2016)

Parallele Arbeiten der Gruppe zeigten, dass sich der Phänotyp von M-Cd19 Tieren (*Myd88^{c-p.L252P}* aktiviert durch Cd19:Cre) nicht wesentlich von dem der M-Aid und M-Cd21 Tiere unterscheidet (Knittel et al., 2016). Für die Untersuchung eines kooperativen Effekts zwischen *BCL2*-Überexpression und *Myd88^{p.L252P}* beschränkten wir uns daher auf die Verwendung des Cd19:Cre Allels.

Im Vergleich zu B-Cd19-Mäusen (B-Zell spezifische Aktivierung des *BCL2*-Überexpressionsallels durch Cd19:Cre) beobachteten wir in der Tat eine drastische Beschleunigung der Lymphoproliferation in den M-B-Cd19 Doppelmutanten, welche sich im signifikant verkürzten Gesamtüberleben widerspiegelte (Median 179 Tage Abb. 12A). Auch im Vergleich zu den M-Aid-, M-Cd21- und M-Cd19 hatten die M-B-Cd19-Mäuse eine deutlich kürzere Überlebensdauer (Abb. 7B und (Knittel et al., 2016)). Damit einhergehend entwickelten die Doppelmutanten wesentlich früher eine Splenomegalie als die anderen Versuchstiere, und zwar bereits in einem Alter von zehn Wochen (Abb. 12 B, Abb. 7 A, Abb. 2 B aus (Knittel et al., 2016)).

Zusammenfassend wurde durch gleichzeitige Expression der *Myd88*-Mutation und einer *BCL2*-Überexpression *in vivo* bei sieben von acht Versuchstieren die Entwicklung von Lymphomen provoziert, deren Morphologie und Immunphänotyp am ehesten dem ABC-DLBCL entsprechen (Knittel et al., 2016).

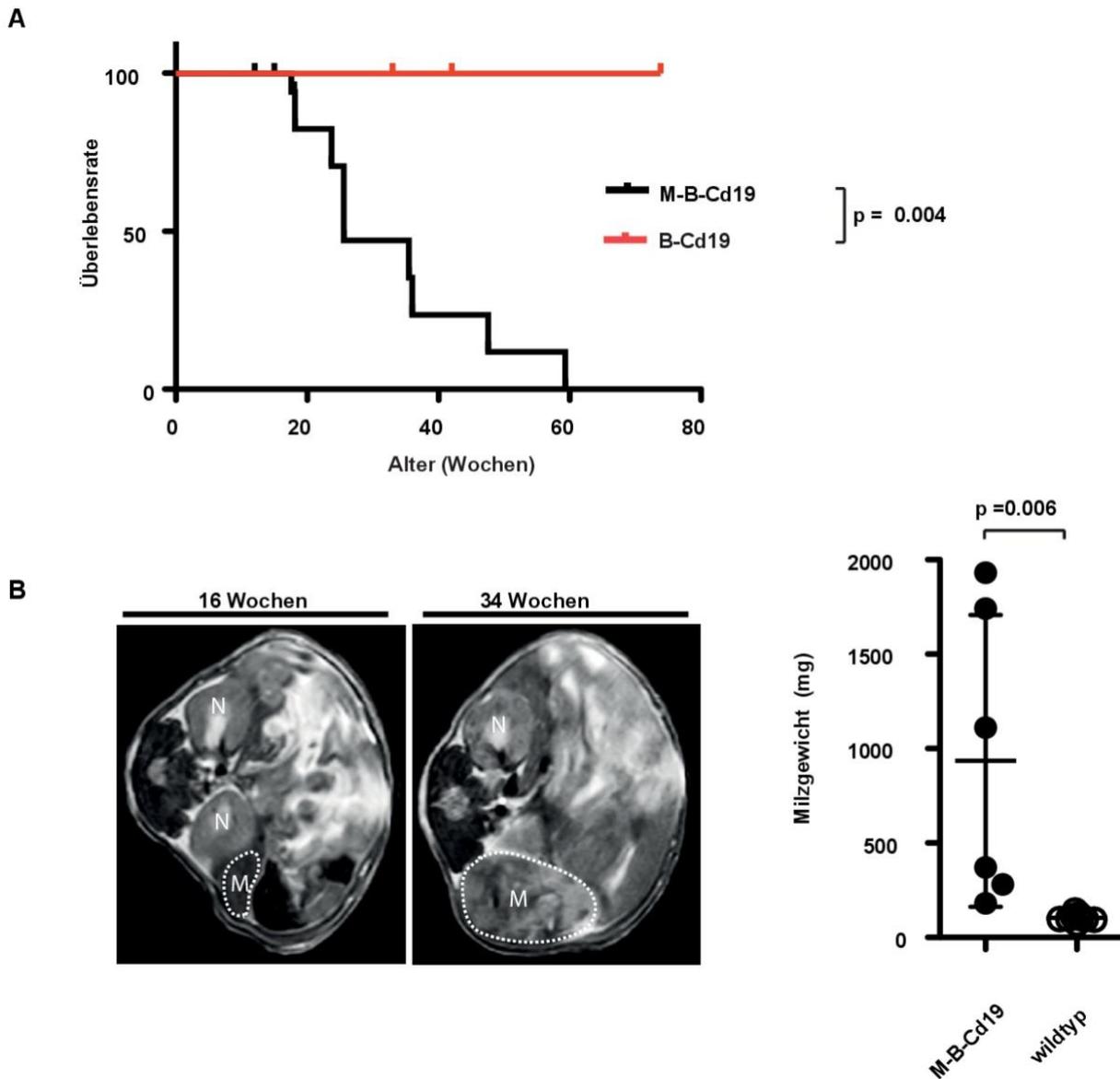


Abbildung 12: *Myd88^{L252P}* und *BCL2*-Überexpression kooperieren bei der Lymphomagenese *in vivo*. **A)** Die Überexpression von *BCL2* in Verbindung mit der B-Zell spezifischen Aktivierung von *Myd88^{L252P}* führen zu einer verkürzten Überlebensdauer (Log-Rank-Test). **B)** MRT-Aufnahmen zeigen, dass die Doppelmutanten deutlich früher eine Splenomegalie entwickeln (links). Quantifizierung des Milzgewichts zum Zeitpunkt des Todes (rechts) (Zweistichproben-t-Test).

5. DISKUSSION

Mit dem Ziel ein Mausmodell für das ABC-DLBCL zu etablieren, entwickelten wir ein konditionales Allel, das die B-Zell-spezifische Expression der *Myd88*^{p.L252P}-Mutante, das Ortholog der humanen *MYD88*^{p.L265P}-Mutation, nach CreLoxP-System-vermittelter Rekombination ermöglicht. Die Lokalisation im endogenen Locus gewährleistet eine möglichst realitätsgetreue Modellierung der Verhältnisse in der menschlichen Pathologie. Für die gezielte Expression des Transgens in den B-Lymphozyten wurden Cre-Allele, die der transkriptionellen Regulation von B-Zell-spezifischen Promotoren unterliegen, gewählt.

Bei dem Großteil der *Myd88*^{p.L252P}-Versuchstiere beobachteten wir die Entwicklung einer lymphoproliferativen Erkrankung, die sich in Form einer Splenomegalie sowie gelegentlicher makroskopischer Lymphadenopathie manifestierte, und zu einem verkürzten Gesamtüberleben der Mäuse führte. Bei einem Teil der Tiere (ca. 30%) kam es zur Progression hin zu einem Lymphom, das die morphologischen, immunphänotypischen und molekularbiologischen Charakteristika des ABC-DLBCL widerspiegelte.

In der immunhistochemischen Untersuchung stellten sich die Lymphome Bcl6-negativ und Irf4-positiv dar, was für die Abstammung von einer Ursprungszelle, welche die Keimzentrumsreaktion durchlaufen hat, spricht (Hans, 2004). Das morphologische und immunhistochemische Verhalten der Infiltrate, gemeinsam mit der Tatsache, dass *MYD88*^{L265P} die häufigste genetische Läsion beim DLBCL des ABC-Subtyps ist (Ngo et al., 2011), führen zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei diesen Lymphomen um das ABC-DLBCL handeln müsste. Die sichere Zuordnung der Tumore zu einer Entität könnte mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse erfolgen, die als Goldstandard zur sicheren Differenzierung der einzelnen DLBCL-Subgruppen gilt (Alizadeh et al., 2000; Wright et al., 2003).

Ähnliche konditionale Mausmodelle mit CreLoxP-System-vermittelter Expression der *Myd88*^{L252P}-Mutante beziehungsweise des humanen mutierten *MYD88*^{L265P}-Gens wurden durch zwei andere Arbeitsgruppen präsentiert. Auch dort wurde die Entwicklung einer polyklonalen lymphoproliferativen Erkrankung von niedrig-maligner Natur festgestellt (Schmidt et al., 2020; Sewastianik et al., 2019). In der Arbeit von Schmidt et. al. konnte in einem Beobachtungszeitraum von 90 Wochen gelegentliche Lymphomagenese im Zusammenhang mit der *Myd88*^{p.L252P}-Variante beobachtet werden (zwei von zwölf Tieren mit B-Zell-Tumor), jedoch exprimierte nur eins der Tiere die *Myd88*^{p.L252P}-Variante (Schmidt et al., 2020). Nachfolgende Studien mit dem hier vorgestellten konditionalen Allel mit höheren Fallzahlen bestätigten, dass *Myd88*-mutierte Tiere eine verkürzte Lebensdauer im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen haben, und dass sich ein Lymphom mit geringer Penetration manifestiert (Flümann et al., 2021).

Bei den zitierten Mausmodellen zeigte sich eine eindruckliche Ausdehnung des Plasmazellpopulation in Milz und Knochenmark, die mit erhöhten IgM-Spiegeln einherging (Schmidt et al., 2020; Sewastianik et al., 2019). Insgesamt entwickelte die Mehrheit der Versuchstiere eine nicht-klonale lymphoproliferative Erkrankung, die in einigen Charakteristika an das lymphoplasmozytische Lymphom – MW erinnerte (Schmidt et al., 2020; Sewastianik et al., 2019). Eine Tendenz zur Expansion des Plasmazellpopulation wurde ebenfalls bei Flümann et al. beschrieben, jedoch nicht in vergleichbarem Ausmaß.

Auf den ersten Blick ist es etwas überraschend, dass sich in unseren Versuchstieren durch die Expression von *MYD88*^{p.L252P} das DLBCL anstelle des MW manifestiert, bei dem die *MYD88* L265P-Mutation mit einer Häufigkeit von rund 90% vorkommt (Treon et al., 2012). Die Betrachtung der jeweiligen Inzidenzen liefert dafür eine plausible Erklärung, wie bereits durch Dr. G. Knittel in seiner Dissertation vorgetragen. Im Vergleich zum MW (0,35/100.000) tritt das DLBCL mit einer Inzidenz von 7,1/100.000 etwa 20-mal häufiger auf (Morton et al., 2006). Schon allein aufgrund dieser Tatsache ist die Wahrscheinlichkeit, dass unsere Mäuse ein DLBCL entwickeln, rein statistisch gesehen deutlich höher. Eine Häufigkeit der *MYD88* L265P Mutation von etwa 90% in MW und ungefähr 20% in DLBCL bedeutet im Umkehrschluss, dass etwa 80% aller B-Zell-Tumore mit *MYD88* L265P DLBCL-Fälle sind. Um in diesem Punkt Gewissheit zu erlangen, untersuchten wir das Knochenmark der Mäuse auf eine Beteiligung des Knochenmarks, die Voraussetzung für die Diagnose des MW. Ein Befall des Knochenmarks konnte bei unseren Versuchstieren jedoch nicht nachgewiesen werden (Anhang Abb. 3 (Knittel et al., 2016)). Für die Beantwortung der Frage, ob das hier präsentierte Modell mit niedriger Frequenz auch eine WM-ähnliche Erkrankung entwickelt, wäre die Beobachtung einer weitaus größeren Kohorte notwendig.

Eine weitere mögliche Erklärung für die bevorzugte Entwicklung eines DLBCL in unserer Studie könnte der genetische Hintergrund des verwendeten Mausstammes C57BL/6 sein, welcher die Mäuse zu Produktion von höherem Niveau an IgG prädisponiert, im Gegensatz zur IgM-Vermehrung, die für das MW typisch ist (Yu et al., 2018). Ebenfalls können die Versuchsbedingungen, wie die Unterbringung der Mäuse, eine Rolle gespielt haben, indem bestimmte Antigene aus der Umgebung den TLR-Signalweges zusätzlich aktiviert haben könnten. Nicht zu vernachlässigen sind mögliche Unterschiede bedingt durch die Verwendung eines murinen Systems. So konnte in der Arbeit von Sewastianik et al. unter Verwendung des humanen *MYD88*-Proteins ein LPL-ähnlicher Phänotyp beobachtet werden (Sewastianik et al., 2019).

Die lange Latenzzeit bis zur Tumorbildung in unseren Versuchstieren deutet darauf hin, dass *Myd88* L252P allein für die Lymphomagenese nicht ausreichend ist und zusätzlich akquirierte Mutationen vonnöten sind. Unsere Beobachtungen stehen im Einklang mit anderen

Ergebnissen aus vergleichbaren Transgen-Studien (Schmidt et al., 2020; Sewastianik et al., 2019). Wie bereits durch andere Studien beschrieben, scheint die L265P-Mutation ein frühes Ereignis in der Entwicklung des DLBCL zu sein (Chapuy et al., 2018). Eine Sequenzierung des Tumormaterials wäre interessant, um weitere Drivermutationen zu identifizieren. In nachfolgenden Studien unserer Arbeitsgruppe wurde eine Exom-Sequenzierung am Lymphommaterial von MBC-Tieren durchgeführt. Das Mutationsprofil, darunter genetische Aberrationen von *Pim1*, *Myc*, *Kmt2d*, *Nfkb1a* und *Stat3*, ähnelte dem des humanen DLBCL (Flümann et al., 2021).

Um zu untersuchen, welche weiteren onkogenen Mechanismen im humanen DLBCL involviert sind, sequenzierten wir das Tumormaterial einer Kölner DLBCL-Kohorte. In der untersuchten Kohorte fanden wir fünf *MYD88*^{L265P}-mutierte Fälle, die allesamt dem ABC-Subtyp zugeordnet werden konnten. In unserer Kohorte korrelierte *MYD88* L265P mit *CD79B*-Mutationen, was bereits aus anderen Studien bekannt ist (Chapuy et al., 2018; Schmitz et al., 2018). Darüber hinaus fand sich bei allen fünf Tumoren eine Amplifikation des 18q Lokus und in der ABC-DLBCL Gruppe konnte immunhistochemisch eine erhöhte BCL2-Expression gezeigt werden. Die Aushebelung des intrinsischen Apoptoseweges durch Überexpression von BCL2 ist ein geläufiger pathogenetischer Mechanismus in der Tumorgenese des ABC-DLBCL (Chapuy et al., 2018; Monni et al., 1999; Monni et al., 1997; Wright et al., 2020). Umgekehrt zeigen *in vitro* Experimente, dass *MYD88* L265P-stimulierte Proliferation durch negative regulatorische Kontrollmechanismen des NF- κ B-Signalweges durch Tnfr1 sowie Bcl2/Bim-regulierte Apoptose gehemmt wird (Wang, Jeelall, Beutler, et al., 2014). Diese Erkenntnisse bestätigen erneut, dass *MYD88* L265P allein für die Entwicklung einer malignen Erkrankung nicht ausreichend ist, und schützende regulatorischen Mechanismen der Zelle durch weitere Mutationen umgangen werden müssen.

Die ermittelten Daten gaben Anlass zur Generierung eines weiteren Mausmodells, das die Kooperation zwischen der *Myd88*-Mutation und *BCL2*-Überexpression widerspiegelt (*Cd19*^{Cre/wt};*Rosa26*^{LSL.BCL2.IRES.GFP/wt};*Myd88*^{c-p.L252P/wt} – Mäuse (M-B-Cd19)) (Knittel et al., 2016). Die doppelmutierten Tiere zeigten eine wesentlich kürzere Überlebensdauer bei höherer Lymphompenetranz (83% bei MBC-Mäusen gegenüber ca. 1/3 in M-Aid und 1/3 M-Cd21-Tieren), wodurch das Modell für weitere Experimente im Hinblick auf die Pathogenese und die Therapie des ABC-DLBCL besser geeignet ist (Flümann et al., 2021). Das hier vorgestellte *Myd88*^{p.L252P}-Modell stellt jedoch ein wunderbares Instrument dar, um die Physiologie der B-Zelle und im Detail die konkreten Auswirkungen der onkogenen *Myd88*-Mutation auf die folglich hyperaktivierte TLR-Signalkaskade und die Formierung des neu identifizierten My-T-BCR-Superkomplexes und deren Bedeutung für die Differenzierung, Aktivität und Proliferation der B-Zellen zu untersuchen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G.,...Staudt, L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(6769), 503-511. <https://doi.org/10.1038/35000501>
- Avbelj, M., Wolz, O.-O., Fekonja, O., Benčina, M., Repič, M., Mavri, J., Krüger, J., Schärfe, C., Delmiro Garcia, M., Panter, G., Kohlbacher, O., Weber, A. N. R., & Jerala, R. (2014). Activation of lymphoma-associated MyD88 mutations via allosterically-induced TIR-domain oligomerization. *Blood*, 124(26), 3896-3904. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-573188>
- Baldwin, A. S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *Journal of Clinical Investigation*, 107(3), 241-246. <https://doi.org/10.1172/jci11991>
- Bertin, J., Wang, L., Guo, Y., Jacobson, M. D., Poyet, J.-L., Srinivasula, S. M., Merriam, S., Distefano, P. S., & Alnemri, E. S. (2001). CARD11 and CARD14 Are Novel Caspase Recruitment Domain (CARD)/Membrane-associated Guanylate Kinase (MAGUK) Family Members that Interact with BCL10 and Activate NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11877-11882. <https://doi.org/10.1074/jbc.m010512200>
- Boudesco, C., Verhoeyen, E., Martin, L., Chassagne-Clement, C., Salmi, L., Mhaidly, R., Pangault, C., Fest, T., Ramla, S., Jardin, F., Wolz, O.-O., Weber, A. N. R., Garrido, C., & Jegou, G. (2018). HSP110 sustains chronic NF- κ B signaling in activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma through MyD88 stabilization. *Blood*, 132(5), 510-520. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-819706>
- Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R., & Tonegawa, S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*, 15(1), 1-14. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90078-8)
- Calado, D. P., Zhang, B., Srinivasan, L., Sasaki, Y., Seagal, J., Unitt, C., Rodig, S., Kutok, J., Tarakhovskiy, A., Schmidt-Supprian, M., & Rajewsky, K. (2010). Constitutive Canonical NF- κ B Activation Cooperates with Disruption of BLIMP1 in the Pathogenesis of Activated B Cell-like Diffuse Large Cell Lymphoma. *Cancer Cell*, 18(6), 580-589. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.024>
- Campbell, K. S., & Cambier, J. C. (1990). B lymphocyte antigen receptors (mlg) are non-covalently associated with a disulfide linked, inducibly phosphorylated glycoprotein complex. *Embo j*, 9(2), 441-448. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08129.x>
- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19), 5019-5032. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-293050>
- Cattoretti, G., Pasqualucci, L., Ballon, G., Tam, W., Nandula, S. V., Shen, Q., Mo, T., Murty, V. V., & Dalla-Favera, R. (2005). Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell*, 7(5), 445-455. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.03.037>
- Cerhan, J. R., Berndt, S. I., Vijai, J., Ghesquières, H., McKay, J., Wang, S. S., Wang, Z., Yeager, M., Conde, L., De Bakker, P. I. W., Nieters, A., Cox, D., Burdett, L., Monnereau, A., Flowers, C. R., De Roos, A. J., Brooks-Wilson, A. R., Lan, Q., Severi, G.,...Chanock, S. J. (2014). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for diffuse large B cell lymphoma. *Nature Genetics*, 46(11), 1233-1238. <https://doi.org/10.1038/ng.3105>
- Cerhan, J. R., Krickler, A., Paltiel, O., Flowers, C. R., Wang, S. S., Monnereau, A., Blair, A., Maso, L. D., Kane, E. V., Nieters, A., Foran, J. M., Miligi, L., Clavel, J., Bernstein, L., Rothman, N., Slager, S. L., Sampson, J. N., Morton, L. M., & Skibola, C. F. (2014). Medical History, Lifestyle, Family History, and Occupational Risk Factors for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *JNCI Monographs*, 2014(48), 15-25. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgu010>

- Chapuy, B., Stewart, C., Dunford, A. J., Kim, J., Kamburov, A., Redd, R. A., Lawrence, M. S., Roemer, M. G. M., Li, A. J., Ziepert, M., Staiger, A. M., Wala, J. A., Ducar, M. D., Leshchiner, I., Rheinbay, E., Taylor-Weiner, A., Coughlin, C. A., Hess, J. M., Peadarallu, C. S.,...Shipp, M. A. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nature Medicine*, 24(5), 679-690. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0016-8>
- Cheong Tan, L. H. (2009). A practical approach to the understanding and diagnosis of lymphoma: an assessment of the WHO classification based on immunoarchitecture and immuno-ontogenic principles. *Pathology*, 41(4), 305-326. <https://doi.org/10.1080/00313020902884501>
- Choi, J.-W., Kim, Y., Lee, J.-H., & Kim, Y.-S. (2013). MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma. 44(7), 1375-1381. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.10.026>
- Coffman, R. L., & Weissman, I. L. (1981). B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature*, 289(5799), 681-683. <https://doi.org/10.1038/289681a0>
- Coiffier, B., Thieblemont, C., Van Den Neste, E., Lepage, G., Plantier, I., Castaigne, S., Lefort, S., Marit, G., Macro, M., Sebban, C., Belhadj, K., Bordessoule, D., Fermé, C., & Tilly, H. (2010). Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*, 116(12), 2040-2045. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276246>
- Compagno, M., Lim, W. K., Grunn, A., Nandula, S. V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R., & Pasqualucci, L. (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 459(7247), 717-721. <https://doi.org/10.1038/nature07968>
- Crump, M., Kuruvilla, J., Couban, S., MacDonald, D. A., Kukreti, V., Kouroukis, C. T., Rubinger, M., Buckstein, R., Imrie, K. R., Federico, M., Di Renzo, N., Howson-Jan, K., Baetz, T., Kaizer, L., Voralia, M., Olney, H. J., Turner, A. R., Sussman, J., Hay, A. E.,...Shepherd, L. E. (2014). Randomized comparison of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin versus dexamethasone, cytarabine, and cisplatin chemotherapy before autologous stem-cell transplantation for relapsed and refractory aggressive lymphomas: NCIC-CTG LY.12. *J Clin Oncol*, 32(31), 3490-3496. <https://doi.org/10.1200/jco.2013.53.9593>
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49-63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- Czuczman, M. S., Trněný, M., Davies, A., Rule, S., Linton, K. M., Wagner-Johnston, N., Gascoyne, R. D., Slack, G. W., Brousset, P., Eberhard, D. A., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., Salles, G., Witzig, T. E., Zinzani, P. L., Wright, G. W., Staudt, L. M., Yang, Y., Williams, P. M., Lih, C.-J.,...Lewis, I. D. (2017). A Phase 2/3 Multicenter, Randomized, Open-Label Study to Compare the Efficacy and Safety of Lenalidomide Versus Investigator's Choice in Patients with Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 23(15), 4127-4137. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-2818>
- Dalporto, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular Immunology*, 41(6-7), 599-613. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.04.008>
- Davids, M. S., Roberts, A. W., Seymour, J. F., Pagel, J. M., Kahl, B. S., Wierda, W. G., Puvvada, S., Kipps, T. J., Anderson, M. A., Salem, A. H., Dunbar, M., Zhu, M., Peale, F., Ross, J. A., Gressick, L., Desai, M., Kim, S. Y., Verdugo, M., Humerickhouse, R. A.,...Gerecitano, J. F. (2017). Phase I First-in-Human Study of Venetoclax in Patients With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 35(8), 826-833. <https://doi.org/10.1200/jco.2016.70.4320>
- Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U., & Staudt, L. M. (2001). Constitutive Nuclear Factor κ B Activity Is Required for Survival of Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 194(12), 1861-1874. <https://doi.org/10.1084/jem.194.12.1861>

- Davis, R. E., Ngo, V. N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R. M., Romesser, P. B., Kohlhammer, H., Lamy, L., Zhao, H., Yang, Y., Xu, W., Shaffer, A. L., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Jiang, J.-K., Thomas, C. J., Rosenwald, A., Ott, G.,...Staudt, L. M. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, *463*(7277), 88-92. <https://doi.org/10.1038/nature08638>
- De Groen, R. A. L., Schrader, A. M. R., Kersten, M. J., Pals, S. T., & Vermaat, J. S. P. (2019). MYD88 in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications. *Haematologica*, *104*(12), 2337-2348. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.227272>
- Di Noia, J., & Neuberger, M. S. (2002). Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature*, *419*(6902), 43-48. <https://doi.org/10.1038/nature00981>
- Dreyer, W. J., & Bennett, J. C. (1965). The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *54*(3), 864-869. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.3.864>
- Eisenbeis, C. F., Singh, H., & Storb, U. (1995). Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev*, *9*(11), 1377-1387. <https://doi.org/10.1101/gad.9.11.1377>
- Falini, B., Fizzotti, M., Pucciarini, A., Bigerna, B., Marafioti, T., Gambacorta, M., Pacini, R., Alunni, C., Natali-Tanci, L., Ugolini, B., Sebastiani, C., Cattoretti, G., Pileri, S., Dalla-Favera, R., & Stein, H. (2000). A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*, *95*(6), 2084-2092.
- Fernández-Rodríguez, C., Bellosillo, B., García-García, M., Sánchez-González, B., Gimeno, E., Vela, M. C., Serrano, S., Besses, C., & Salar, A. (2014). MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, *28*(10), 2104-2106. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.184>
- Fitzgerald, K. A., & Kagan, J. C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*, *180*(6), 1044-1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
- Flenghi, L., Ye, B. H., Fizzotti, M., Bigerna, B., Cattoretti, G., Venturi, S., Pacini, R., Pileri, S., Lo Coco, F., Pescarmona, E., & et al. (1995). A specific monoclonal antibody (PG-B6) detects expression of the BCL-6 protein in germinal center B cells. *Am J Pathol*, *147*(2), 405-411.
- Flümann, R., Nieper, P., Reinhardt, H. C., & Knittel, G. (2020). New murine models of aggressive lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, *61*(4), 788-798. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1691200>
- Flümann, R., Rehkämper, T., Nieper, P., Pfeiffer, P., Holzem, A., Klein, S., Bhatia, S., Kochanek, M., Kisis, I., Pelzer, B. W., Ahlert, H., Hauer, J., Da Palma Guerreiro, A., Ryan, J. A., Reimann, M., Riabinska, A., Wiederstein, J., Krüger, M., Deckert, M.,...Knittel, G. (2021). An Autochthonous Mouse Model of Myd88- and BCL2-Driven Diffuse Large B-cell Lymphoma Reveals Actionable Molecular Vulnerabilities. *Blood Cancer Discovery*, *2*(1), 70-91. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.bcd-19-0059>
- Gaide, O., Martinon, F., Micheau, O., Bonnet, D., Thome, M., & Tschopp, J. (2001). Carma1, a CARD-containing binding partner of Bcl10, induces Bcl10 phosphorylation and NF- κ B activation1. *FEBS Letters*, *496*(2-3), 121-127. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02414-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02414-0)
- Gazumyan, A., Reichlin, A., & Nussenzweig, M. C. (2006). Ig beta tyrosine residues contribute to the control of B cell receptor signaling by regulating receptor internalization. *J Exp Med*, *203*(7), 1785-1794. <https://doi.org/10.1084/jem.20060221>
- Gerondakis, S., Grumont, R. J., & Banerjee, A. (2007). Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunology & Cell Biology*, *85*(6), 471-475. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100097>
- Gisselbrecht, C., Glass, B., Mounier, N., Singh Gill, D., Linch, D. C., Trneny, M., Bosly, A., Ketterer, N., Shpilberg, O., Hagberg, H., Ma, D., Brière, J., Moskowitz, C. H., & Schmitz, N. (2010). Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*, *28*(27), 4184-4190. <https://doi.org/10.1200/jco.2010.28.1618>

- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B.,...Stratton, M. R. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446(7132), 153-158. <https://doi.org/10.1038/nature05610>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hans, C. P. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1), 275-282. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1545>
- Hardiman, G., Rock, F. L., Balasubramanian, S., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (1996). Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. *Oncogene*, 13(11), 2467-2475.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell*, 132(3), 344-362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- Hockenbery, D., Nuñez, G., Millman, C., Schreiber, R. D., & Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348(6299), 334-336. <https://doi.org/10.1038/348334a0>
- Hombach, J., Leclercq, L., Radbruch, A., Rajewsky, K., & Reth, M. (1988). A novel 34-kd protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells. *Embo j*, 7(11), 3451-3456. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03219.x>
- Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., & Reth, M. (1990). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature*, 343(6260), 760-762. <https://doi.org/10.1038/343760a0>
- Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Tagawa, H., Nakamura, S., Morishima, Y., & Seto, M. (2009). TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *114*(12), 2467-2475. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-194852>
- Hultmark, D. (1994). Macrophage Differentiation Marker MyD88 Is a Member of the Toll/IL-1 Receptor Family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 199(1), 144-146. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1206>
- Imbruvica. (2021, 27/08/2021). European Medicines Agency. Retrieved 14.01.2022 from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imbruvica#authorisation-details-section>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2010). Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science*, 327(5963), 291-295. <https://doi.org/10.1126/science.1183021>
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., & Weiss, U. (1991). Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*, 354(6352), 389-392. <https://doi.org/10.1038/354389a0>
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1, 1-13. <https://doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>
- Jost, P. J., & Ruland, J. R. (2007). Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*, 109(7), 2700-2707. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-025809>
- Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y., Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M.,...Ogawa, S. (2009). Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*, 459(7247), 712-716. <https://doi.org/10.1038/nature07969>
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., & Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11(1), 115-122. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80086-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80086-2)
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), 373-384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>

- Kitamura, D., Roes, J., Kühn, R., & Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature*, 350(6317), 423-426. <https://doi.org/10.1038/350423a0>
- Klien, U., Goasens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K., & Kuppers, R. (1998). Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunological Reviews*, 162(1), 261-280. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1998.tb01447.x>
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275(5303), 1132-1136. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1132>
- Knies, N., Alankus, B., Weilemann, A., Tzankov, A., Brunner, K., Ruff, T., Kremer, M., Keller, U. B., Lenz, G., & Ruland, J. (2015). Lymphomagenic CARD11/BCL10/MALT1 signaling drives malignant B-cell proliferation via cooperative NF- κ B and JNK activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(52), E7230-E7238. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507459112>
- Knittel, G., Liedgens, P., Korovkina, D., Seeger, J. M., Al-Baldawi, Y., Al-Maarri, M., Fritz, C., Vlantis, K., Bezhanova, S., Scheel, A. H., Wolz, O.-O., Reimann, M., Möller, P., López, C., Schlesner, M., Lohneis, P., Weber, A. N. R., Trümper, L., Staudt, L. M.,...Reinhardt, H. C. (2016). B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood*, 127(22), 2732-2741. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-684183>
- Kraan, W., Horlings, H. M., Van Keimpema, M., Schilder-Tol, E. J. M., Oud, M. E. C. M., Scheepstra, C., Kluin, P. M., Kersten, M. J., Spaargaren, M., & Pals, S. T. (2013). High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer Journal*, 3(9), e139-e139. <https://doi.org/10.1038/bcj.2013.28>
- Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N., & Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell*, 117(6), 787-800. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.014>
- Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M. L., & Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, 341(20), 1520-1529. <https://doi.org/10.1056/NEJM199911113412007>
- Küppers, R., Rajewsky, K., & Hansmann, M.-L. (1997). Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *European Journal of Immunology*, 27(6), 1398-1405. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270616>
- Lam, L. T., Wright, G., Davis, R. E., Lenz, G., Farinha, P., Dang, L., Chan, J. W., Rosenwald, A., Gascoyne, R. D., & Staudt, L. M. (2008). Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 111(7), 3701-3713. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-111948>
- Lee, J.-H., Jeong, H., Choi, J.-W., Oh, H., & Kim, Y.-S. (2017). Clinicopathologic significance of MYD88 L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01998-5>
- Leitlinienprogramm Onkologie. (Oktober 2022). *Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Erwachsene Patient*innen mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom und verwandten Entitäten*. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. Retrieved 10.07.2024 from https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/DLBCL/Version_1/LL_DLBCL_Langversion_1.0.pdf
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge für erwachsene Patient*innen mit einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom und verwandten Entitäten, Langversion 1.0, 2022, AWMF-Registernummer: 018/038OL. (2022). <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/dlbcl/>

- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), 973-983. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80172-5)
- Lennert, K., Stein, H., & Kaiserling, E. (1975). Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer Suppl*, 2, 29-43.
- Lenz, G., Davis, R. E., Ngo, V. N., Lam, L., George, T. C., Wright, G. W., Dave, S. S., Zhao, H., Xu, W., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B.,... Staudt, L. M. (2008). Oncogenic CARD11 Mutations in Human Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Science*, 319(5870), 1676-1679. <https://doi.org/10.1126/science.1153629>
- Lenz, G., Nagel, I., Siebert, R., Roschke, A. V., Sanger, W., Wright, G. W., Dave, S. S., Tan, B., Zhao, H., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Gascoyne, R. D., Campo, E., Jaffe, E. S., Smeland, E. B., Fisher, R. I., Kuehl, W. M., Chan, W. C., & Staudt, L. M. (2007). Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*, 204(3), 633-643. <https://doi.org/10.1084/jem.20062041>
- Lenz, G., Wright, G., Dave, S. S., Xiao, W., Powell, J., Zhao, H., Xu, W., Tan, B., Goldschmidt, N., Iqbal, J., Vose, J., Bast, M., Fu, K., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Armitage, J. O., Kyle, A., May, L., Gascoyne, R. D.,... Staudt, L. M. (2008). Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 359(22), 2313-2323. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0802885>
- Li, S., Young, K. H., & Medeiros, L. J. (2018). Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*, 50(1), 74-87. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.09.006>
- Lin, S.-C., Lo, Y.-C., & Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*, 465(7300), 885-890. <https://doi.org/10.1038/nature09121>
- Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J.,... Thompson, C. B. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*, 6(6), 1389-1399. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00136-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00136-2)
- Liu, M., Duke, J. L., Richter, D. J., Vinuesa, C. G., Goodnow, C. C., Kleinstein, S. H., & Schatz, D. G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature*, 451(7180), 841-845. <https://doi.org/10.1038/nature06547>
- Lucas, P. C., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, L. M., Abazeed, M. E., Chen, F. F., Yamaoka, S., Seto, M., & Nunez, G. (2001). Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem*, 276(22), 19012-19019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009984200>
- Manček-Keber, M., Lainšček, D., Benčina, M., Chen, J. G., Romih, R., Hunter, Z. R., Treon, S. P., & Jerala, R. (2018). Extracellular vesicle-mediated transfer of constitutively active MyD88L265P engages MyD88wt and activates signaling. *Blood*, 131(15), 1720-1729. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-805499>
- Mandelbaum, J., Bhagat, G., Tang, H., Mo, T., Brahmachary, M., Shen, Q., Chadburn, A., Rajewsky, K., Tarakhovskiy, A., Pasqualucci, L., & Dalla-Favera, R. (2010). BLIMP1 Is a Tumor Suppressor Gene Frequently Disrupted in Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*, 18(6), 568-579. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.030>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397. <https://doi.org/10.1038/41131>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., & Janeway, C. A. (1998). MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling

- Pathways. *Molecular Cell*, 2(2), 253-258. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80136-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80136-7)
- Meyer, S. N., Koul, S., & Pasqualucci, L. (2021). Mouse Models of Germinal Center Derived B-Cell Lymphomas [Review]. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.710711>
- Mittrücker, H. W., Matsuyama, T., Grossman, A., Kündig, T. M., Potter, J., Shahinian, A., Wakeham, A., Patterson, B., Ohashi, P. S., & Mak, T. W. (1997). Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science*, 275(5299), 540-543. <https://doi.org/10.1126/science.275.5299.540>
- Monni, O., Franssila, K., Joensuu, H., & Knuutila, S. (1999). BCL2 Overexpression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 34(1-2), 45-52. <https://doi.org/10.3109/10428199909083379>
- Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K., Klefstrom, J., Alitalo, K., & Knuutila, S. (1997). BCL2 Overexpression Associated With Chromosomal Amplification in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood*, 90(3), 1168-1174. <https://doi.org/10.1182/blood.v90.3.1168>
- Morin, R. D., Mungall, K., Pleasance, E., Mungall, A. J., Goya, R., Huff, R. D., Scott, D. W., Ding, J., Roth, A., Chiu, R., Corbett, R. D., Chan, F. C., Mendez-Lago, M., Trinh, D. L., Bolger-Munro, M., Taylor, G., Hadj Khodabakhshi, A., Ben-Neriah, S., Pon, J.,...Marra, M. A. (2013). Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood*, 122(7), 1256-1265. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-483727>
- Morton, L. M., Wang, S. S., Devesa, S. S., Hartge, P., Weisenburger, D. D., & Linet, M. S. (2006). Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*, 107(1), 265-276. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2508>
- Motshwene, P. G., Moncrieffe, M. C., Grossmann, J. G., Kao, C., Ayaluru, M., Sandercock, A. M., Robinson, C. V., Latz, E., & Gay, N. J. (2009). An Oligomeric Signaling Platform Formed by the Toll-like Receptor Signal Transducers MyD88 and IRAK-4. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25404-25411. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.022392>
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., & Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102(5), 553-563. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00078-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00078-7)
- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O., & Honjo, T. (1999). Specific Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26), 18470-18476. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18470>
- Muzio, M., Bertilaccio, M. T. S., Simonetti, G., Frenquelli, M., & Caligaris-Cappio, F. (2009). The role of Toll-like receptors in chronic B cell malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, 50(10), 1573-1580. <https://doi.org/10.1080/10428190903115410>
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., & Dixit, V. M. (1997). IRAK (Pelle) Family Member IRAK-2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 Signaling. *Science*, 278(5343), 1612-1615. <https://doi.org/10.1126/science.278.5343.1612>
- Nagler, A., Perriello, V. M., Falini, L., & Falini, B. (2023). How I treat refractory/relapsed diffuse large B-cell lymphomas with CD19-directed chimeric antigen receptor T cells. *Br J Haematol*, 201(3), 396-410. <https://doi.org/10.1111/bjh.18724>
- Ngo, V. N., Davis, R. E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., Lenz, G., Lam, L. T., Dave, S., Yang, L., Powell, J., & Staudt, L. M. (2006). A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *441(7089)*, 106-110. <https://doi.org/10.1038/nature04687>
- Ngo, V. N., Young, R. M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K.-H., Kohlhammer, H., Xu, W., Yang, Y., Zhao, H., Shaffer, A. L., Romesser, P., Wright, G., Powell, J., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Ott, G., Gascoyne, R. D., Connors, J. M.,...Staudt, L. M. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470(7332), 115-119. <https://doi.org/10.1038/nature09671>

- Noia, J. M. D., & Neuberger, M. S. (2007). Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 1-22. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740>
- Nussenzweig, A., & Nussenzweig, M. C. (2010). Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell*, 141(1), 27-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.016>
- O'Carroll, A., Chauvin, B., Brown, J. W. P., Meagher, A., Coyle, J., Schill, J., Bhumkhar, A., Hunter, D. J. B., Ve, T., Kobe, B., Sierceki, E., & Gambin, Y. (2018). Pathological mutations differentially affect the self-assembly and polymerisation of the innate immune system signalling adaptor molecule MyD88. *BMC Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0611-7>
- Oltvai, Z. N., Millman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4), 609-619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90509-o](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-o)
- Pasare, C., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*, 6(15), 1382-1387. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.018>
- Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H. C., 3rd, Nussenzweig, M. C., & Dalla-Favera, R. (2008). AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet*, 40(1), 108-112. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.35>
- Pasqualucci, L., & Dalla-Favera, R. (2018). Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 131(21), 2307-2319. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-764332>
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R. S. K., Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K., & Dalla-Favera, R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: Evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11816-11821. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11816>
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S. K., Küppers, R., & Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, 412(6844), 341-346. <https://doi.org/10.1038/35085588>
- Pelanda, R., Braun, U., Hobeika, E., Nussenzweig, M. C., & Reth, M. (2002). B cell progenitors are arrested in maturation but have intact VDJ recombination in the absence of Ig-alpha and Ig-beta. *J Immunol*, 169(2), 865-872. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.865>
- Phelan, J. D., Young, R. M., Webster, D. E., Roulland, S., Wright, G. W., Kasbekar, M., Shaffer, A. L., Ceribelli, M., Wang, J. Q., Schmitz, R., Nakagawa, M., Bachy, E., Huang, D. W., Ji, Y., Chen, L., Yang, Y., Zhao, H., Yu, X., Xu, W.,... Staudt, L. M. (2018). A multiprotein supercomplex controlling oncogenic signalling in lymphoma. *Nature*, 560(7718), 387-391. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0290-0>
- Prof. Dr. med. M. Pfreundschuh, P. D. m. L. T., Kompetenznetz Maligne Lymphome e.V. (2023, 19.07.2023). *Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom*. Retrieved 19.07.2023 from <https://lymphome.de/diffus-grosszelliges-b-zell-lymphom/>
- Project, T. N.-H. s. L. C. (1997). A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, 89(11), 3909-3918. <https://doi.org/10.1182/blood.v89.11.3909>
- Rabbitts, T. H., & Forster, A. (1978). Evidence for noncontiguous variable and constant region genes in both germ line and myeloma DNA. *Cell*, 13(2), 319-327. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90200-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90200-3)
- Rada, C., Williams, G. T., Nilsen, H., Barnes, D. E., Lindahl, T., & Neuberger, M. S. (2002). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol*, 12(20), 1748-1755. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01215-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01215-0)
- Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., & Nussenzweig, M. C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell*, 118(4), 431-438. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.006>

- Rawlings, D. J., Saffran, D. C., Tsukada, S., Largaespada, D. A., Grimaldi, J. C., Cohen, L., Mohr, R. N., Bazan, J. F., Howard, M., Copeland, N. G., & et al. (1993). Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science*, 261(5119), 358-361. <https://doi.org/10.1126/science.8332901>
- Reddy, A., Zhang, J., Davis, N. S., Moffitt, A. B., Love, C. L., Waldrop, A., Leppä, S., Pasanen, A., Meriranta, L., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Nørgaard, P., Pedersen, M., Gang, A. O., Høgdall, E., Heavican, T. B., Lone, W., Iqbal, J., Qin, Q., Li, G.,... Dave, S. S. (2017). Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell*, 171(2), 481-494.e415. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.027>
- Reichlin, A., Hu, Y., Meffre, E., Nagaoka, H., Gong, S., Kraus, M., Rajewsky, K., & Nussenzweig, M. C. (2001). B cell development is arrested at the immature B cell stage in mice carrying a mutation in the cytoplasmic domain of immunoglobulin beta. *J Exp Med*, 193(1), 13-23. <https://doi.org/10.1084/jem.193.1.13>
- Robbiani, D. F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D. J., Chen, H. T., Corcoran, A. E., Nussenzweig, A., & Nussenzweig, M. C. (2008). AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell*, 135(6), 1028-1038. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.062>
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Giltnane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Powell, J.,... Staudt, L. M. (2002). The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 346(25), 1937-1947. <https://doi.org/10.1056/nejmoa012914>
- Rovira, J., Karube, K., Valera, A., Colomer, D., Enjuanes, A., Colomo, L., Martínez-Trillos, A., Giné, E., Dlouhy, I., Magnano, L., Delgado, J., Martínez, A., Villamor, N., Campo, E., & López-Guillermo, A. (2016). MYD88 L265P Mutations, But No Other Variants, Identify a Subpopulation of DLBCL Patients of Activated B-cell Origin, Extranodal Involvement, and Poor Outcome. *Clinical Cancer Research*, 22(11), 2755-2764. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-1525>
- Sanchez, M., Misulovin, Z., Burkhardt, A. L., Mahajan, S., Costa, T., Franke, R., Bolen, J. B., & Nussenzweig, M. (1993). Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. *J Exp Med*, 178(3), 1049-1055. <https://doi.org/10.1084/jem.178.3.1049>
- Sanderson, R. D., Lalor, P., & Bernfield, M. (1989). B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul*, 1(1), 27-35. <https://doi.org/10.1091/mbc.1.1.27>
- Schmidt, K., Sack, U., Graf, R., Winkler, W., Popp, O., Mertins, P., Sommermann, T., Kocks, C., & Rajewsky, K. (2020). B-Cell-Specific Myd88 L252P Expression Causes a Premalignant Gammopathy Resembling IgM MGUS. *Front Immunol*, 11, 602868. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.602868>
- Schmitz, R., Wright, G. W., Huang, D. W., Johnson, C. A., Phelan, J. D., Wang, J. Q., Roulland, S., Kasbekar, M., Young, R. M., Shaffer, A. L., Hodson, D. J., Xiao, W., Yu, X., Yang, Y., Zhao, H., Xu, W., Liu, X., Zhou, B., Du, W.,... Staudt, L. M. (2018). Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, 378(15), 1396-1407. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801445>
- Seda, V., & Mraz, M. (2015). B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *European Journal of Haematology*, 94(3), 193-205. <https://doi.org/10.1111/ejh.12427>
- Sehn, L. H., & Salles, G. (2021). Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 384(9), 842-858. <https://doi.org/10.1056/nejmra2027612>
- Sewastianik, T., Guerrero, M. L., Adler, K., Dennis, P. S., Wright, K., Shanmugam, V., Huang, Y., Tanton, H., Jiang, M., Kofides, A., Demos, M. G., Dalgarno, A., Patel, N. A., Nag, A., Pinkus, G. S., Yang, G., Hunter, Z. R., Jarolim, P., Munshi, N. C.,... Carrasco, R. D. (2019). Human MYD88L265P is insufficient by itself to drive neoplastic transformation in mature mouse B cells. *Blood Advances*, 3(21), 3360-3374. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000588>

- Shaffer, A. L., 3rd, Young, R. M., & Staudt, L. M. (2012). Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol*, 30, 565-610. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075027>
- Shaffer, A. L., Rosenwald, A., & Staudt, L. M. (2002). Lymphoid Malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 2(12), 920-933. <https://doi.org/10.1038/nri953>
- Shen, H. M. (1998). Mutation of BCL-6 Gene in Normal B Cells by the Process of Somatic Hypermutation of Ig Genes. *Science*, 280(5370), 1750-1752. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1750>
- Sommer, K., Guo, B., Pomerantz, J. L., Bandaranayake, A. D., Moreno-García, M. E., Ovechkina, Y. L., & Rawlings, D. J. (2005). Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity*, 23(6), 561-574. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.014>
- Staudt, L. M. (2010). Oncogenic Activation of NF- κ B. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), a000109-a000109. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000109>
- Stavnezer, J., Jeroen E.J. Guikema, & Schrader, C. E. (2008). Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annual Review of Immunology*, 26(1), 261-292. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248>
- Stein, H., Lennert, K., & Parwaresch, M. R. (1972). Malignant lymphomas of B-cell type. *Lancet*, 2(7782), 855-857. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(72\)92215-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(72)92215-5)
- Sukswai, N., Lyapichev, K., Khoury, J. D., & Medeiros, L. J. (2020). Diffuse large B-cell lymphoma variants: an update. *Pathology*, 52(1), 53-67. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.08.013>
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127(20), 2375-2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
- Takahashi, K., Kozono, Y., Waldschmidt, T. J., Berthiaume, D., Quigg, R. J., Baron, A., & Holers, V. M. (1997). Mouse complement receptors type 1 (CR1;CD35) and type 2 (CR2;CD21): expression on normal B cell subpopulations and decreased levels during the development of autoimmunity in MRL/lpr mice. *J Immunol*, 159(3), 1557-1569.
- Tilly, H., Morschhauser, F., Sehn, L. H., Friedberg, J. W., Trněný, M., Sharman, J. P., Herbaux, C., Burke, J. M., Matasar, M., Rai, S., Izutsu, K., Mehta-Shah, N., Oberic, L., Chauchet, A., Jurczak, W., Song, Y., Greil, R., Mykhalska, L., Bergua-Burgués, J. M.,... Salles, G. (2022). Polatuzumab Vedotin in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, 386(4), 351-363. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2115304>
- Tomasetti, C., Li, L., & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355(6331), 1330-1334. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>
- Treon, S. P., Xu, L., Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Sheehy, P., Manning, R. J., Patterson, C. J., Tripsas, C., Arcaini, L., Pinkus, G. S., Rodig, S. J., Sohani, A. R., Harris, N. L., Laramie, J. M., Skifter, D. A., Lincoln, S. E., & Hunter, Z. R. (2012). MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *New England Journal of Medicine*, 367(9), 826-833. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1200710>
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., & Croce, C. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228(4706), 1440-1443. <https://doi.org/10.1126/science.3874430>
- Tsujimoto, Y., Finger, L., Yunis, J., Nowell, P., & Croce, C. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226(4678), 1097-1099. <https://doi.org/10.1126/science.6093263>
- Vermaat, J. S., Somers, S. F., De Wreede, L. C., Kraan, W., De Groen, R. A. L., Schrader, A. M. R., Kerver, E. D., Scheepstra, C. G., Berenschot, H., Deenik, W., Wegman, J., Broers, R., De Boer, J.-P. D., Nijland, M., Van Wezel, T., Veelken, H., Spaargaren, M., Cleven, A. H., Kersten, M. J., & Pals, S. T. (2020). MYD88 mutations identify a molecular subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with an unfavorable prognosis. *Haematologica*, 105(2), 424-434. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.214122>

- Vollbrecht, C., Mairinger, F. D., Koitzsch, U., Peifer, M., Koenig, K., Heukamp, L. C., Crispatzu, G., Wilden, L., Kreuzer, K. A., Hallek, M., Odenthal, M., Herling, C. D., & Buettner, R. (2015). Comprehensive Analysis of Disease-Related Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia by Multiplex PCR-Based Next Generation Sequencing. *PLoS One*, *10*(6), e0129544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129544>
- Wang, J. Q., Jeelall, Y. S., Beutler, B., Horikawa, K., & Goodnow, C. C. (2014). Consequences of the recurrent MYD88L265P somatic mutation for B cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, *211*(3), 413-426. <https://doi.org/10.1084/jem.20131424>
- Wang, J. Q., Jeelall, Y. S., Ferguson, L. L., & Horikawa, K. (2014). Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00367>
- Weber, A. N. R., Cardona Gloria, Y., Çinar, Ö., Reinhardt, H. C., Pezzutto, A., & Wolz, O.-O. (2018). Oncogenic MYD88 mutations in lymphoma: novel insights and therapeutic possibilities. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *67*(11), 1797-1807. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2242-9>
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, *292*(5517), 727-730. <https://doi.org/10.1126/science.1059108>
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., & Cao, Z. (1997). MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. *Immunity*, *7*(6), 837-847. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80402-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80402-1)
- Wijdenes, J., Vooijs, W. C., Clément, C., Post, J., Morard, F., Vita, N., Laurent, P., Sun, R. X., Klein, B., & Dore, J. M. (1996). A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol*, *94*(2), 318-323. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1811.x>
- Wilson, T. M., Vaisman, A., Martomo, S. A., Sullivan, P., Lan, L., Hanaoka, F., Yasui, A., Woodgate, R., & Gearhart, P. J. (2005). MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase eta, suggesting a role for A:T mutations in antibody genes. *J Exp Med*, *201*(4), 637-645. <https://doi.org/10.1084/jem.20042066>
- Wilson, W. H., Wright, G. W., Huang, D. W., Hodgkinson, B., Balasubramanian, S., Fan, Y., Vermeulen, J., Shreeve, M., & Staudt, L. M. (2021). Effect of ibrutinib with R-CHOP chemotherapy in genetic subtypes of DLBCL. *Cancer Cell*, *39*(12), 1643-1653.e1643. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.10.006>
- Wilson, W. H., Young, R. M., Schmitz, R., Yang, Y., Pittaluga, S., Wright, G., Lih, C.-J., Williams, P. M., Shaffer, A. L., Gerecitano, J., De Vos, S., Goy, A., Kenkre, V. P., Barr, P. M., Blum, K. A., Shustov, A., Advani, R., Fowler, N. H., Vose, J. M., ... Staudt, L. M. (2015). Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nature Medicine*, *21*(8), 922-926. <https://doi.org/10.1038/nm.3884>
- Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, E. H., Wiestner, A., & Staudt, L. M. (2003). A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(17), 9991-9996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732008100>
- Wright, G. W., Huang, D. W., Phelan, J. D., Coulibaly, Z. A., Roulland, S., Young, R. M., Wang, J. Q., Schmitz, R., Morin, R. D., Tang, J., Jiang, A., Bagaev, A., Plotnikova, O., Kotlov, N., Johnson, C. A., Wilson, W. H., Scott, D. W., & Staudt, L. M. (2020). A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell*, *37*(4), 551-568.e514. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.015>
- Yamanashi, Y., Kakiuchi, T., Mizuguchi, J., Yamamoto, T., & Toyoshima, K. (1991). Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science*, *251*(4990), 192-194. <https://doi.org/10.1126/science.1702903>
- Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Xu, L., Cao, Y., Manning, R. J., Patterson, C. J., Buhrlage, S. J., Gray, N., Tai, Y.-T., Anderson, K. C., Hunter, Z. R., & Treon, S. P. (2013). A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of

- Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 122(7), 1222-1232. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-475111>
- Younes, A., Sehn, L. H., Johnson, P., Zinzani, P. L., Hong, X., Zhu, J., Patti, C., Belada, D., Samoilova, O., Suh, C., Leppä, S., Rai, S., Turgut, M., Jurczak, W., Cheung, M. C., Gurion, R., Yeh, S.-P., Lopez-Hernandez, A., Dührsen, U.,...Wilson, W. (2019). Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 37(15), 1285-1295. <https://doi.org/10.1200/jco.18.02403>
- Young, R. M., Phelan, J. D., Wilson, W. H., & Staudt, L. M. (2019). Pathogenic B-cell receptor signaling in lymphoid malignancies: New insights to improve treatment. *Immunological Reviews*, 291(1), 190-213. <https://doi.org/10.1111/imr.12792>
- Young, R. M., Shaffer, A. L., Phelan, J. D., & Staudt, L. M. (2015). B-Cell Receptor Signaling in Diffuse Large B-Cell lymphoma. *Seminars in Hematology*, 52(2), 77-85. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2015.01.008>
- Yu, S., Luo, H., Pan, M., Palomino, L., Song, X., Wu, P., Huang, J. M., & Zhang, Z. (2017). High frequency and prognostic value of MYD88 L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma with R-CHOP treatment. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7472>
- Yu, X., Li, W., Deng, Q., Li, L., Hsi, E. D., Young, K. H., Zhang, M., & Li, Y. (2018). MYD88 L265P Mutation in Lymphoid Malignancies. *Cancer Research*, 78(10), 2457-2462. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-0215>
- Zhan, C., Qi, R., Wei, G., Guven-Maiorov, E., Nussinov, R., & Ma, B. (2016). Conformational dynamics of cancer-associated MyD88-TIR domain mutant L252P (L265P) allosterically tilts the landscape toward homo-dimerization. *Protein Engineering Design and Selection*, 29(9), 347-354. <https://doi.org/10.1093/protein/gzw033>