

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie
und Pathologische Anatomie

**Die Evolution der in situ folliculären Neoplasie zum
t(14;18)-positiven aggressiven B-Zell-Lymphom**

Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Vogelsberg, Horst-Guenther Antonio

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. D. Schneidawind
3. Berichterstatter: Professor Dr. K. Sotlar

Tag der Disputation: 19.12.2022

Für W.B.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das folliculäre Lymphom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Histologie und Tumorbologie.....	1
1.1.3 Klinischer Verlauf	2
1.2 Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom	2
1.2.1 Epidemiologie und Histologie	2
1.2.2 Tumorbologie.....	3
1.2.3 Klinischer Verlauf	3
1.3 Die B-Zell Entwicklung	4
1.3.1 Die V(D)J-Rekombination.....	4
1.3.2 Die Keimzentrumsreaktion	5
1.4 Die Pathogenese des folliculären Lymphoms	7
1.4.1 Die Translokation t(14;18)(q32;q21).....	7
1.4.2 Das „Multi-Hit“ Modell der FL Entstehung	8
1.5 Die <i>in situ</i> folliculäre Neoplasie	10
1.6 Zielsetzung.....	11
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Auswahl des Patientenmaterials	14
2.2 Materialien	14
2.2.1 Geräte	14
2.2.2 Kits	15
2.2.3 Primer.....	15
2.2.4 Reagenzien	18
2.2.5 Chemikalien	19
2.2.6 Antikörper und FISH Sonden	19
2.2.7 Puffer.....	19
2.2.8 Verbrauchsmaterialien	20

2.2.9 EDV-Programme und Online-Software	20
2.2.10 Hersteller	21
2.3 Histologische und immunhistochemische Färbungen	22
2.4 Methoden zur DNA-Extraktion und -Aufreinigung	22
2.4.1 Anreicherung des Tumormaterials	22
2.4.1.1 Makrodissektion	22
2.4.1.2 Mikrodissektion	23
2.4.2 DNA-Extraktion mit dem Maxwell® 16 MDx Instrument	24
2.4.3 Phenol-Chloroform Extraktion	24
2.5 Methoden zur Bestimmung von DNA-Qualität und -Quantität	25
2.5.1 Messung mittels Spektrophoto- und Fluorometer	25
2.5.2 Einschätzung der DNA-Qualität	25
2.6 Methoden zum Nachweis chromosomaler Anomalien	27
2.6.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	27
2.6.2 PCR zum Nachweis eines <i>BCL2/IGH</i> -Rearrangements	27
2.7 Sanger Sequenzierung	29
2.7.1 HighPrep™ -Aufreinigung	29
2.7.2 Cycle Sequencing Reaktion und CleanSeq®-Aufreinigung	30
2.7.3 Kapillargelelektrophorese und Sequenzanalyse	31
2.8 Klonalitätsanalyse	31
2.8.1 Klonalitätsanalyse IGH	31
2.8.2 Klonalitätsanalyse der <i>IG-Kappa</i> -Leichtkette	33
2.8.3 Klonalitätsanalyse mit klonspezifischen Primern	33
2.9 Gezieltes Next-Generation Sequencing	34
2.9.1 Libraryerstellung	35
2.9.2 Libraryquantifizierung	37
2.9.3 Ion Chef™ und Sequenzierung auf dem Ion Torrent PGM™	38
2.9.4 Auswertung der Ion AmpliSeq™ Custom Panel	39
2.10 Validierung der NGS Ergebnisse	40
2.11 NGS mit dem LymphoTrack® IGH Assay	41
2.11.1 Durchführung des LymphoTrack® IGH Assays	41
2.11.2 Auswertung des LymphoTrack® IGH Assays	42
2.11.3 Erstellung phylogenetischer Stammbäume	43
3 Ergebnisse	44

3.1 Klinische Daten des Patientenkollektivs	44
3.2 Histologie und Immunhistochemie	46
3.3 Nachweis chromosomaler Aberrationen	48
3.3.1 Translokationsnachweis mittels FISH.....	48
3.3.2 Sequenzanalyse des <i>BCL2</i> /IGH-Rearrangements	50
3.4 Analyse der Immunglobuline	52
3.4.1 Traditionelle Klonalitätsanalyse	52
3.4.2 Klonalitätsanalyse mittels IGH-Sequenzierung	54
3.4.3 Nachweis von N-Glykosylierungsstellen und intraklonaler He- terogenität	56
3.5 Mutationsnachweis durch NGS	58
3.5.1 Mutationsprofil von ISFN, FL und aggressiven B-NHL Proben ..	58
3.5.2 Rekonstruktion der klonalen Evolution anhand privater und gemeinsamer Mutationen.....	63
3.6 Zusammenschau der Ergebnisse.....	64
4 Diskussion	65
4.1 Die ISFN – eine Vorläuferläsion t(14;18) ⁺ aggressiver B-NHL	65
4.2 Die klonale Dynamik t(14;18) ⁺ Lymphome	67
4.3 <i>BCL2</i> Mutationen als Indikator für prolongierte AID-Aktivität	69
4.3.1 Die Rolle der AID in der Pathogenese maligner Lymphome	70
4.3.2 N-Glykosylierungsstellen bieten einen entscheidenden Selektionsvorteil	71
4.4. Das Alterationsspektrum t(14;18) ⁺ Lymphome	72
4.4.1 Frühe Treibermutationen.....	72
4.4.2. Mit der aggressiven Transformation assoziierte Alterationen	76
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick	77
5 Zusammenfassung	81
6 Literaturverzeichnis	83
7 Erklärung zum Eigenanteil.....	97
8 Veröffentlichungen	99
9 Danksagung	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. PCR zur Einschätzung der DNA-Qualität.	26
Tabelle 2. PCR zur Detektion eines <i>BCL2</i> / <i>IGH</i> -Rearrangements.	28
Tabelle 3. PCR-Ansatz für den IdentiClone™ <i>BCL2</i> / <i>JH</i> Translocation Assay...28	
Tabelle 4. Cycle Sequencing Reaktion.....	30
Tabelle 5. Primer-Mixe für die FR2- und FR3-Klonalitätsanalyse.....	32
Tabelle 6. PCR für die <i>IGH</i> -Klonalitätsanalyse.....	32
Tabelle 7. PCR für die <i>IGK</i> -Klonalitätsanalyse.	33
Tabelle 8. Primer-Mixe für die <i>IGK</i> -Klonalitätsanalyse.	34
Tabelle 9. Ion AmpliSeq™ Custom Panel mit häufig mutierten Genen von FL und DLBCL.	35
Tabelle 10. PCR zur Erstellung der Amplikon-Bibliotheken.....	36
Tabelle 11. FuPa-Verdau der Amplikons.	36
Tabelle 12. Adapter-Ligation.	37
Tabelle 13. qPCR zur Quantifizierung der Amplikon-Bibliotheken.....	38
Tabelle 14. Einzelamplikon PCR nach der Ion Amplicon Library Preparation Fusion Methode.....	41
Tabelle 15. PCR-Ansatz für den LymphoTrack® <i>IGH</i> Assay.	42
Tabelle 16. Klinische Daten der Patienten mit ISFN und aggressivem B-NHL (modifiziert nach [95])......	45
Tabelle 17. Immunhistochemische Färbungen der FL und aggressiven B-NHL Proben (modifiziert nach [95]).	46
Tabelle 18. Chromosomale Alterationen (modifiziert nach [95]).	51
Tabelle 19. Übersicht über die Ergebnisse der Immunglobulinanalyse (modifiziert nach [95]).	55
Tabelle 20. Übersicht nicht-synonymer Varianten und Mutationen in Spleißstellen (modifiziert nach [95]).	60
Tabelle 21. Synonyme und 5'UTR Mutationen im <i>BCL2</i> -Gen (modifiziert nach [95])......	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Die B-Zell Entwicklung.	6
Abbildung 2. Das aktuelle Modell der Pathogenese des FL.	10
Abbildung 3. Exemplarische Darstellung von ISFN, FL und DLBCL.	47
Abbildung 4. Unterschiedliche immunhistochemische Expressionsmuster von p53.	48
Abbildung 5. <i>BCL2</i> -Translokationsnachweis mittels FISH.	49
Abbildung 6. Aberrante Muster in der FISH als Hinweis auf chromosomale Instabilität.	50
Abbildung 7. Sequenzierung des <i>BCL2</i> / <i>IGH</i> -Bruchpunktes.	52
Abbildung 8. Exemplarische Darstellung einer Klonalitätsanalyse (modifiziert nach [95]).	53
Abbildung 9. Vergleich der <i>IGH</i> -Sequenz zwei gepaarter Proben.	54
Abbildung 10. Phylogenetische Stammbäume von drei Fällen mit <i>de novo</i> aggressivem B-NHL (modifiziert nach [95]).	57
Abbildung 11. Phylogenetische Stammbäume von zwei Fällen mit intermediärem FL (modifiziert nach [95]).	58
Abbildung 12. Szenarien der klonalen Evolution basierend auf der Mutationsverteilung (modifiziert nach [95]).	63
Abbildung 13. Übersicht der Ergebnisse (übernommen aus [96]).	64

Abkürzungsverzeichnis

3'MBR	3' major breakpoint Region
3'UTR	3' untranslatierte Region
5'UTR	5' untranslatierte Region
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ABC	Aktivierte B-Zell-artig (<i>activated B-like</i>)
AG	Antigen
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
aSHM	Aberrante somatische Hypermutation
bp	Basenpaare
BCL2	B-cell Lymphoma 2
BCL6	B-cell Lymphoma 6
B-CLL	Chronisch lymphatische B-Zell Leukämie
BCR	B-Zell-Rezeptor
B-NHL	B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom
BTG1/2	B-cell Translocation Gene 1/2
BTLA	B- and T-Lymphocyte Attenuator
Ca.	Circa
CARD11	Caspase Recruitment Domain Family Member 11
CD	Cluster of Differentiation
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
cDNA	Komplementäre DNA
CDR	Komplementaritäts-bestimmende Region
CDS	Kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
CNV	Kopienzahlvariation (<i>copy number variation</i>)
COSMIC	Catalogue of somatic mutations
CODEX	Co-Detection by Indexing
CPC	Gemeinsamer Vorläuferklon (<i>common progenitor clone</i>)
CREBBP	CREB Binding Protein
CR	Komplettremission (<i>complete remission</i>)
C-Region	Konstante Region
CSR	Klassenwechsel (<i>class switch recombination</i>)
Ct-Wert	Cycle Threshold Wert
DC-SIGN	Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin
ddH2O	Doppelt destilliertes Wasser
D-Segment	Diversitäts-Segment
DGP	Deutsche Gesellschaft für Pathologie
d.h.	Das heißt
DH	Double-Hit

Abkürzungsverzeichnis

DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOD	An der Erkrankung verstorben (<i>died of disease</i>)
dNTP	Desoxynukleotide
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTCS	Dye Terminator Cycle Sequencing
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EBI	European Bioinformatics Institute
Engl.	Englisch
EP300	E1A Binding Protein p300
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
EZH2	Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	Follikuläres Lymphom
FLLC	FL-ähnliche Zellen (<i>follicular lymphoma like B-cells</i>)
FOXO1	Forkhead Box O1
FR	Framework
GC	Keimzentrum (<i>germinal center</i>)
GCB	Keimzentrums-B-Zell-artig (<i>germinal center B-like</i>)
GNA13	G Protein Subunit Alpha 13
h	Stunde
H3	Histon 3
H3K4	Histon 3 Lysin 4
H3K27	Histon 3 Lysin 27
HDAC3	Histon-Deacetylase 3
HDACI	Histon-Deacetylase-Inhibitoren
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hg19	Human Genome 19
HGBL	High-grade B-Zell-Lymphom
HGVS	Human Genome Variation Society
HIST1H1B	Histone Cluster 1, H1b
HIST1H1C	Histone Cluster 1, H1c
HIST1H1D	Histone Cluster 1, H1d
HIST1H1E	Histone Cluster 1, H1e
H-Kette	Schwere Kette
HVEM	Herpesvirus Entry Mediator
ICR	Intermediate Cluster Region
i.d.R.	In der Regel
IG	Immunglobulin
IGH	Immunglobulinschwerkettenlokus
IGK	Immunglobulinleichtkettenlokus <i>Kappa</i>

Abkürzungsverzeichnis

IGLL5	Immunoglobulin Lambda Like Polypeptide 5
IgM/D/E/A/G	Immunglobulin der Klasse M/D/E/A/G
IGV	Integrative Genomics Viewer
InDel	Insertion/Deletion
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
ISFN	<i>In situ</i> follikuläre Neoplasie
ISP	Ion Sphere™ Particle
J-Segment	Verbindungs-Segment (<i>joining</i>)
K2P	Kimura 2-parameter Modell
K2P+I	Kimura 2-parameter Modell + invariable Basenpositionen
Kb	Kilobase
Kde	<i>Kappa</i> deleting Element
KM	Knochenmark
KMT2D	Lysine Methyltransferase 2D
KRK	Kolorektales Karzinom
LK	Lymphknoten
L-Kette	Leichte Kette
M	Männlich
MBR	Major breakpoint Region
Mcr	Minor cluster Region
MEF2B	Myocyte Enhancer Factor 2B
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mo	Monate
Mono	Monoklonal
MYD88	Myeloid Differentiation Primary Response 88
N/A	Information nicht verfügbar; nicht beurteilbar wegen schlechter Fixierung
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	Nicht durchgeführt
NF-κB	Nuclear Factor ' <i>Kappa</i> -Light-Chain-Enhancer' of Activated B-cells
ng	Nanogramm
NGS	Next-Generation Sequencing
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NHLBI	National Heart Lung and Blood Institute
nm	Nanometer
NOS	Nicht anderweitig spezifiziert (<i>not otherwise specified</i>)
p	kurzer Arm des Chromosoms
P	Patient
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

PGM	Personal Genome Machine
PIM1	Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase Pim-1
pmol	Pikomol
Poly	Polyklonal
PRDM1	PR/SET Domain 1
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RAG1/2	Rekombinations-aktivierendes-Gen 1/2
R-CHOP	Rituximab mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSS	Rekombinationssignalsequenzen
s	Sekunde
SHM	Somatische Hypermutation
SLS	Sample Loading Solution
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
Tab.	Tabelle
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBL1XR1	Transducin Beta Like 1 X-Linked Receptor 1
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TH	Triple-Hit
TNFAIP3	Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3
TNFRSF14	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 14
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	Unter anderem
U/μl	Units pro Mikroliter
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VAF	Allelfrequenz der Variante (<i>variant allele frequency</i>)
V-Segment	Variables Segment
V-Region	Variable Region
W	Weiblich
WIFBM	Whitehead Institute for Biomedical Research
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
z.B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das folliculäre Lymphom

1.1.1 Epidemiologie

Unter dem Begriff der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) wird ein breites Spektrum lymphatischer Neoplasien zusammengefasst, die ihren Ursprung in verschiedenen Differenzierungsstadien von B- und T-Lymphozyten haben und sich hinsichtlich ihrer Tumorbilogie und ihrem klinischen Verlauf z.T. deutlich unterscheiden. Der häufigste Vertreter der indolenten (niedrigmalignen) NHL ist das folliculäre Lymphom (FL). Das FL macht ca. 20 % aller diagnostizierten Lymphome aus und hat in der westlichen Welt eine Inzidenz von etwa 3 auf 100.000 Einwohner [1]. Mit einem Häufigkeitsgipfel in der sechsten Lebensdekade ist das FL ein Tumor des fortgeschrittenen Erwachsenenalters [1].

1.1.2 Histologie und Tumorbilogie

Das FL ist eine B-Zell Neoplasie, die sich von Zentrozyten und Zentroblasten des Keimzentrums (GC, engl. *germinal center*) ableitet und sich primär nodal (in Lymphknoten, LK) manifestiert [1]. Dennoch kann, besonders im Verlauf, nahezu jede extranodale Lokalisation betroffen sein – am häufigsten Milz und Knochenmark (KM) [1,2]. Histologisch zeichnet sich das FL durch eine Expansion dicht gedrängter, neoplastischer Follikel aus, welche die Lymphknotenarchitektur destruieren [1]. Die Follikel zeigen sich dabei unscharf begrenzt mit reduzierter bzw. fehlender Mantelzone, einer aufgehobenen Polarisierung und einer meist geringen Proliferationsaktivität (weniger als 20 %), welche routinemäßig anhand der Expression des Ki-67 Proteins beurteilt wird [1,3]. Wie bei vielen soliden Tumoren und im Gegensatz zu den meisten Lymphomen kann beim FL ein Grading vorgenommen werden, wobei der Grad (1-3B) mit dem Zentroblastenanteil der neoplastischen Follikel steigt [1]. Dem Keimzentrumsursprung entsprechend exprimiert das FL u.a. die GC-Marker CD10 und BCL6 sowie den B-Zell-Marker CD20 [1]. Darüber hinaus kann üblicherweise die Expression des antiapoptotischen BCL2 Proteins beobachtet werden, was auf die Translokation t(14;18)(q32;q21) zurückzuführen ist, die das Markenzei-

chen des FL darstellt und in ungefähr 90 % der Fälle nachgewiesen werden kann [1,4].

1.1.3 Klinischer Verlauf

Klinisch kann sich das FL neben einer typischerweise schmerzlosen Lymphadenopathie u.a. durch B-Symptome, eine eingeschränkte Belastbarkeit oder auch etwaige Beschwerden durch extranodale Manifestationen bemerkbar machen [5]. Tatsächlich zeigen sich Patienten jedoch häufig lange symptomarm, so dass ein Großteil (ca. 70-80 %) bei Diagnosestellung bereits ein Stadium III-IV nach Ann-Arbor mit Beteiligung multipler Lymphknotenregionen und/oder einem disseminierten extranodalen Befall aufweist [1,6,7]. Obwohl bei asymptomatischen Patienten häufig eine „watch and wait“ Strategie verfolgt werden kann und das mediane Überleben insgesamt mehr als 10 Jahre beträgt, stellt das FL in fortgeschrittenen Stadien immer noch eine unheilbare Neoplasie dar, die sich durch wiederholte Rezidive auszeichnet [1,8-10]. Bei 25-35 % der Patienten, bzw. mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 3 % pro Jahr, kommt es außerdem zur histologischen Transformation in ein aggressives Lymphom, was mit einer signifikanten Verschlechterung der Prognose einhergeht [1,11].

1.2 Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom

1.2.1 Epidemiologie und Histologie

In der überwiegenden Mehrheit der Fälle resultiert die Transformation eines FL in einem diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL), welches sich histologisch durch ein diffuses Wachstum von Lymphomzellen mit zumeist zentro- oder immunoblastischer Morphologie auszeichnet, deren Nukleus mehr als doppelt so groß wie der von normalen Lymphozyten ist [1,12]. Das DLBCL NOS (engl. *not otherwise specified*) gehört zu den aggressiven (hochmalignen) B-Zell-NHL (B-NHL) und ist weltweit das Lymphom mit der höchsten Inzidenz. In den westlichen Ländern erkranken dabei ungefähr 4-7/100.000 Einwohner pro Jahr, mit einem medianen Erkrankungsalter in der siebten Lebensdekade [13-15]. Häufiger als durch die Transformation eines indolenten Lymphoms tritt das DLBCL allerdings *de novo* – d.h. ohne erkennbaren Vorläufer – auf [1].

1.2.2 Tumorbiologie

Das DLBCL ist eine heterogene Neoplasie, die durch Genexpressionsanalysen in zwei große Untergruppen eingeteilt werden kann, den aktivierte B-Zell-artigen (ABC) und den Keimzentrums-B-Zell-artigen (GCB) Subtyp [1,16,17]. Stellvertretend kann die Zuordnung immunhistochemisch erfolgen, z.B. nach dem Hans-Algorithmus mit der Färbung der Proteine CD10, BCL6 und MUM1 [18]. Beide Subtypen unterscheiden sich u.a. in ihrer mutmaßlichen Ursprungszelle, wobei das GCB-DLBCL, wie das FL, aus B-Zellen des GC hervorgeht und somit i.d.R. CD20, CD10 und BCL6 positiv ist [16,18]. Weitere Unterschiede finden sich beim Spektrum der genetischen Alterationen. So kann z.B. die *BCL2*-Translokation t(14;18) auch in ca. 40 % der *de novo* GCB-DLBCL nachgewiesen werden, wohingegen sie im ABC-Subtyp selten ist [1]. Tatsächlich haben rezente Studien gezeigt, dass sich DLBCL anhand ihres Alterationsprofils noch deutlich genauer subtypisieren lassen. So konnten (bisher) sieben molekulare Subgruppen identifiziert werden, die sich in ihrer Tumorbiologie signifikant unterscheiden, darunter z.B. der MCD- und N1-Subtyp, zu denen i.d.R. ABC-DLBCL gehören sowie der EZB-Subtyp, dem fast ausschließlich GCB-DLBCL zugeordnet werden können und welcher nahezu alle t(14;18)⁺ Fälle beinhaltet [17,19,20]. DLBCL die zusätzlich zur t(14;18) ein *MYC*- bzw. *MYC*- und *BCL6*-Rearrangement tragen, werden nach der aktuellen WHO-Klassifikation (engl. *World Health Organisation*) formal einer separaten Entität zugeordnet, dem high-grade B-Zell-Lymphom (HGBL) mit Double- bzw. Triple-Hit (DH/TH) [1].

1.2.3 Klinischer Verlauf

Das DLBCL hat eine hohe Proliferationsaktivität (i.d.R. >40 %) und fällt klinisch meist durch ein rasch progredientes LK- bzw. Tumorwachstum auf, wobei die initiale Manifestation in bis zu 40 % rein extranodal ist [1,21,22]. Auch wenn mit Immunchemotherapie, i.d.R. die Kombination des CD20-Antikörpers Rituximab mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison (R-CHOP), in ca. 60 % der Fälle eine Heilung erreicht wird, versterben die übrigen Patienten letztlich an Rezidiven oder therapierefraktären Verläufen [23,24]. Vor allem der ABC-Subtyp wird seit langem mit schlechteren Therapieerfolgen assoziiert [1,24]. Jedoch hat sich gezeigt, dass speziell t(14;18)⁺ GCB-DLBCL bzw. der

neuerdings definierte EZB-Subtyp ebenfalls ungünstigere Verläufe zeigen [17,19,25,26]. Der Nachweis eines DH oder TH geht dabei mit einer besonders geringen Lebenserwartung einher [1,19,27]. Um die Prognose von Patienten mit derartigen DLBCL sowie die Prognose des DLBCL insgesamt zu verbessern, sind Substanzen wie der Bruton-Tyrosin-Kinaseinhibitor Ibrutinib oder der BCL2 Inhibitor Venetoclax in Erprobung, die gezielt in im Tumor derangierte Signalkaskaden eingreifen [19,28,29].

1.3 Die B-Zell Entwicklung

Ein wichtiger Faktor für die Optimierung von Tumorthérapien, z.B. durch an die Tumorbioogie angepasste Therapeutika, ist das Entschlüsseln der zugrunde liegenden Pathogenese. Bei malignen Lymphomen ist dafür ein Verständnis der physiologischen B-Zell Entwicklung erforderlich, deren Ziel es ist, Plasmazellen mit antigenspezifischem Immunglobulin (IG) zu generieren (Abb. 1).

1.3.1 Die V(D)J-Rekombination

Das IG stellt das antigenerkennende Molekül des B-Zell-Rezeptors (BCR) dar und wird aus je zwei gleichartigen schweren (H-) und leichten (L-) Ketten gebildet, die wiederum aus variablen (V-) und konstanten (C-) Regionen bestehen. Die leichten Ketten können dabei den funktionell identischen Isotypen *Kappa* und *Lambda* zugeordnet werden. Anhand der Isotypen der H-Ketten, die sich aus ihrer C-Region ergeben, werden IG hingegen in Antikörperklassen (IgM, -D, -E, -A, -G) mit spezialisierten Effektorfunktionen eingeteilt [30]. Die Antigenbindung des IG kommt über die V-Region zustande, welche vier Gerüst- (FR) und drei, die Bindungsstellen darstellende, komplementaritäts-bestimmende Regionen (CDR) umfasst. Kodiert wird die V-Region von separaten V- (*variable*), D- (*diversity*), und J- (*joining*) Gensegmenten, die in der Keimbahn DNA jeweils in multiplen Kopien mit abweichenden Sequenzen vorliegen [30]. Erst im Rahmen der sogenannten V(D)J-Rekombination, die während der Differenzierung einer lymphatischen Vorläuferzelle zur naiven B-Zelle im KM stattfindet und durch einen Enzymkomplex katalysiert wird, in dem die Proteine RAG1 und RAG2 (rekombinations-aktivierendes-Gen 1/2) eine zentrale Rolle spielen, wird je ein V-, D- und J-Segment (für L-Ketten nur V- und J-Segmente) zur V-Region vereinigt

[30,31]. Dabei werden an den zu kombinierenden Segmenten im Bereich von Rekombinationssignalsequenzen (RSS) DNA-Doppelstrangbrüche eingeführt und diese anschließend durch eine nicht-homologe Endverknüpfung (NEHJ) verbunden [32]. Die Vielfalt möglicher Segmentkombinationen stellt die Basis der Antikörperdiversität dar. Darüber hinaus werden die Verknüpfungsstellen durch das Entfernen und Hinzufügen von Nukleotiden – Letzteres u.a. durch die Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) – modifiziert, sodass schließlich ein klonspezifisches IG mit individueller Sequenz entsteht [32,33].

1.3.2 Die Keimzentrumsreaktion

Diejenigen B-Zellen, die nach der Entwicklung im KM einen funktionstüchtigen, nicht autoreaktiven BCR tragen, wandern in periphere lymphatische Gewebe aus. Kommt es dort zur Bindung eines passenden Antigens (AG) und zur Stimulation durch eine antigenspezifische T-Zelle, findet eine Migration in einen primären Lymphfollikel statt, wo die klonale Expansion und Bildung eines GC erfolgt [30]. Das GC dient der Affinitätsreifung des IG und kann in eine helle und eine dunkle Zone unterteilt werden. Letztere wird von stark proliferierenden Zentroblasten gebildet, die dem AID- (Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase) vermittelten Prozess der somatischen Hypermutation (SHM) unterliegen [34]. Bei der SHM werden durch die Desaminierung von Cytidin zu Uracil und einen sich daran anschließenden Reparaturmechanismus Punktmutationen mit einer Rate von ca. $1:10^3$ Basenpaare (bp) in die V-Region, bzw. einen Bereich von etwa 2 kb 3' des IGV-Promotors, eingeführt, wobei vermehrt bestimmte Hotspot-Motive, wie z.B. WRCY/RGYW (W = Adenin/Thymin, R = Purinbase, C = Cytosin, Y = Pyrimidinbase, G = Guanin; der Hot-Spot ist unterstrichen), betroffen sind [35,36]. Im Anschluss wandern die B-Zellen als Zentrozyten in die helle Zone des GC, wo ihnen von follikulären dendritischen Zellen (FDC) abermals ihr AG präsentiert wird. Zentrozyten, bei denen die SHM zu einer gesteigerten Affinität zum AG geführt hat, werden positiv selektiert und können in die dunkle Zone rezirkulieren. Eine ineffiziente Bindung oder der Verlust eines strukturell intakten BCR führen hingegen zur Apoptose [30,34]. Durch mehrere solcher Runden von SHM und nachfolgender Selektion können affinitätssteigernde Mutationen in den CDR akkumuliert und ein hochaffines IG generiert

werden. Aufgrund der resultierenden Sequenzvariabilität werden die CDR auch als hypervariable Regionen bezeichnet, wobei sich die größte Vielfalt in der CDR3 findet, da sie als einzige nicht bereits vom V-Segment kodiert wird, sondern erst durch die V(D)J-Rekombination entsteht [30,33].

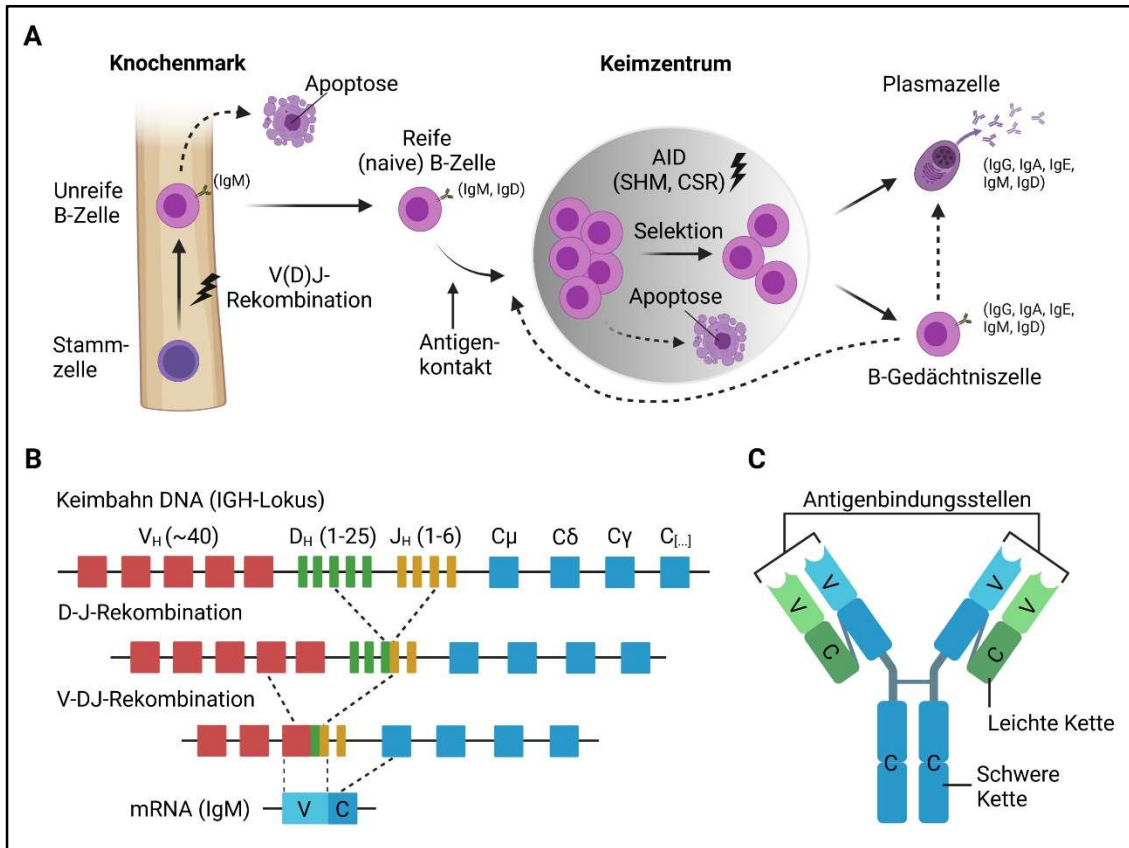


Abbildung 1. Die B-Zell Entwicklung.

A) Die Umlagerung der Gene für die schweren und leichten Ketten des Immunglobulins (IG) findet während der Entwicklung einer Stammzelle zur unreifen B-Zelle statt. Letztere exprimieren bereits einen funktionstüchtigen B-Zell-Rezeptor mit einem IG vom Typ IgM. Bevor sie jedoch das Knochenmark (KM) verlassen und als IgM/IgD-koexprimierende reife B-Zellen in sekundäre lymphatische Organe wandern, wird das IG auf Autoreaktivität überprüft. Autoreaktive B-Zellen werden i.d.R. eliminiert. Treffen reife B-Zellen auf ein passendes Antigen, können sie in die Keimzentrumsreaktion eintreten. Im Keimzentrum (GC) unterliegt das IG der somatischen Hypermutation (SHM), welche zum Zweck der Affinitätsreifung Mutationen in dessen variable (V-) Regionen einführt. B-Zellen, bei denen ein niedrigaffines oder funktionsuntüchtiges IG generiert wird, gehen in Apoptose. B-Zellen mit hochaffinem IG werden hingegen positiv selektiert und können sich im Anschluss entweder zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle oder zur B-Gedächtniszelle differenzieren. Vor dem Verlassen des GC kann es zusätzlich zu einem Wechsel der Antikörperklasse (CSR) von IgM und IgD zu IgG, IgA oder IgE kommen. B-Gedächtniszellen können sich bei erneutem Antigenkontakt ebenfalls zur Plasmazelle differenzieren oder ein weiteres Mal in das GC eintreten. **B)** Bei der V(D)J-Rekombination, hier am Immunglobulinschwerketten- (IGH) Locus dargestellt, wird je eines der in multiplen Kopien vorliegenden V-, D- und J-Segmente ausgewählt und diese zur V-Region zusammengefügt. Für die Expression von IgM oder IgD in naiven B-Zellen wird die V-Region entweder mit dem C_μ- oder durch alternatives Spleißen mit dem C_δ-Isotypen-Gen kombiniert. Die CSR stellt hingegen eine weitere irreversible Genumlagerung dar, bei der die Kombination der V-Region mit dem C_γ-, C_ε- oder C_α-Gen letztendlich durch die Deletion der dazwischen liegenden Isotypen-Gene zustande kommt. **C)** Das finale IG besteht aus jeweils zwei identischen schweren und leichten Ketten, die sich beide wiederum aus V- und C-Regionen zusammensetzen. Abkürzungen: AID, Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase. [Erstellt mit BioRender.com].

Bevor Zentrozyten schließlich das GC verlassen und sich zur Plasma- oder B-Gedächtniszelle differenzieren, kann mit dem Wechsel der Antikörperklasse (CSR, engl. *class switch recombination*) eine weitere durch die AID-Maschinerie katalysierte Modifikation des IG stattfinden [34]. Bei der CSR kommt es zum Austausch der initial koexprimierten C μ - (IgM) und C δ - (IgD) Isotypen-Gene gegen das C ϵ - (IgE), C α - (IgA) oder C γ - (IgG) Gen, was – ähnlich wie bei der V(D)J-Rekombination – durch die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen an sogenannten, den jeweiligen Isotypen-Genen vorgelagerten, Switch-Regionen und eine nachfolgende Verknüpfung der DNA-Enden erreicht wird [34,37].

1.4 Die Pathogenese des folliculären Lymphoms

Die während der B-Zell Entwicklung erfolgenden Eingriffe in das Genom sind für die adaptive Immunantwort unerlässlich; gleichzeitig stellen sie jedoch ein Risiko für den Erwerb pathogener Alterationen dar. So finden sich in Lymphomen z.B. häufig chromosomale Translokationen, die auf die fehlerhafte Reparatur von RAG1/2- und AID-vermittelten DNA-Doppelstrangbrüchen zurückzuführen sind, wobei es meist zur Rekombination eines der IG-Loci mit einem Onkogen kommt, welches daraufhin überexprimiert wird [1,38]. Außerdem kann die Dereglulation der AID zu Mutationen in einer Vielzahl von nicht IG-Genen führen, darunter u.a. *MYC* und *BCL6* [17,39,40].

1.4.1 Die Translokation t(14;18)(q32;q21)

Auch die Translokation t(14;18)(q32;q21) ist auf eine missglückte V(D)J-Rekombination zurückzuführen, bei der das *BCL2*- (engl. *B-cell Lymphoma 2*) Gen (18q21), eingeleitet durch ein RAG induziertes Bruchereignis, in den Immunglobulinschwerkettenloкус (IGH, 14q32) verlagert und mit einem J-Segment verknüpft wird [41,42]. Der Bruch in *BCL2* tritt dabei meist in charakteristischen Bereichen auf, wie der in ca. 60 % betroffenen major breakpoint Region (MBR), einem 150 bp langen Abschnitt in der 3' untranslatierten Region (3'UTR), oder den weiter 3' gelegenen 3' major breakpoint (3'MBR), minor cluster (MCR) und intermediate cluster (ICR) Regionen [43-45]. Als Folge gerät *BCL2* unter die transkriptionelle Kontrolle des IGH-Enhancers, was zu einer konstitutiven Expression des BCL2 Proteins führt, welches über eine Inhibition des intrinsischen

Apoptosesignalwegs, der z.B. bei schweren DNA-Schäden aktiviert wird, einen antiapoptotischen Effekt ausübt [46,47]. Von Bedeutung ist, dass $t(14;18)^+$ B-Lymphozyten trotz des Rearrangements einen funktionstüchtigen BCR tragen, da es bei einer unproduktiven Rekombination des ersten IGH-Alles zur Umlagerung des verbliebenen Lokus' kommt [30,48].

1.4.2 Das „Multi-Hit“ Modell der FL Entstehung

Die $t(14;18)$ gilt als Gründeralteration in der Pathogenese des FL [49,50]. Sie entfaltet ihr malignes Potential sobald ein naiver $t(14;18)^+$ B-Lymphozyt nach Antigenkontakt in das GC einwandert, wo BCL2 physiologisch supprimiert wird, um die Apoptose negativ selektierter Zentrozyten zu ermöglichen [51]. Dieser Prozess wird durch die aberrante Expression von BCL2 beeinträchtigt, so dass es zur Akkumulation langlebiger B-Gedächtniszellen mit niedrig-affinem BCR kommt, die in der Lage sind, erneut in die Keimzentrumsreaktion einzutreten [49,52]. Tatsächlich lassen sich solche $t(14,18)^+$ B-Gedächtniszellen, sogenannte FLLC (engl. *follicular lymphoma like B-cells*), mit sensitiven PCR-Techniken im peripheren Blut von ca. 60 % der Erwachsenen über 50 Jahren nachweisen [53,54]. Man geht davon aus, dass FLLC im Rahmen wiederholter Keimzentrumspassagen, jeweils einhergehend mit einer klonalen Expansion unter dem mutagenen Einfluss der AID, im Laufe von Jahr(zehnt)en zusätzliche Alterationen erwerben, die die maligne Transformation Schritt für Schritt herbeiführen (Abb. 2) [49,55]. So konnte gezeigt werden, dass FLLC Klone über Jahre persistieren, in unterschiedliche lymphatische Gewebe (re)zirkulieren und schließlich in ein FL übergehen können – Letzteres jedoch offenkundig nur in einem Bruchteil der betroffenen Individuen [55-57]. Dabei ist das Risiko der Entstehung eines FL bei einer Nachweisfrequenz von mehr als einer $t(14;18)^+$ Zelle pro 10.000 mononukleärer Zellen des peripheren Bluts signifikant erhöht [56].

Nach heutigem Wissensstand existiert keine feste Sequenz genetischer Veränderungen, die der Progression derartiger prämaligener $t(14;18)^+$ Vorläufer zum FL zugrunde liegt [58]. Nichtsdestotrotz konnten Alterationen identifiziert werden, denen eine zentrale Rolle in der Pathogenese zugeschrieben wird, wozu insbesondere Mutationen in epigenetischen Regulatoren, wie z.B. *CREBBP*,

EP300, *KMT2D* und *EZH2* gehören, von denen im FL i.d.R. mindestens eine nachweisbar ist [58,59]. Es wird angenommen, dass es u.a. als Resultat solcher Mutationen zum Differenzierungsarrest der Zellen mit einem „Einfrieren“ in dem für das FL typischen Keimzentrumsphänotyp kommt – ein Phänomen, welches bereits auf Stufe der FLLC demonstriert werden kann und welches infolge der damit einhergehenden konstitutiven BCL6- und AID-Expression eine zusätzliche genetische Instabilität mit sich bringt (Abschnitt 4.3.1) [49,60,61]. Ein weiteres Phänomen, das in nahezu allen FL beobachtet werden kann und durch das sich das FL von normalen B-Zellen abhebt, ist die SHM-bedingte Akquisition von N-Glykosylierungsstellen in den Antigenbindungsstellen des IG [62,63]. Dabei hat sich gezeigt, dass diese Glykosylierungsmotive überwiegend mit mannosereichen Oligosacchariden versehen werden, was für humane Glykoproteine atypisch ist [64,65]. Man geht jedoch davon aus, dass auf diese Weise die Interaktion mit Mannose-bindenden Lektinen des Mikromilieus, wie mit dem von FL- bzw. Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) exprimierten DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*), ermöglicht wird, wodurch es auch ohne konventionelle Antigenbindung zur Aktivierung der BCR-Signalkaskade und der damit verbundenen Überlebenssignale kommt [64-68]. Tatsächlich zeichnet sich das FL auch darüber hinaus durch ein vielschichtiges Wechselspiel mit seinem Mikromilieu aus, welches – obwohl immer noch Gegenstand aktueller Forschung – eine bedeutende Rolle in der Genese und Krankheitsprogression einzunehmen scheint [69-71]. Beteiligt sind daran neben TAM u.a. eine Vielzahl weiterer Immun- (z.B. folliculäre T-Helfer- und regulatorische T-Zellen) und Stromazellen (z.B. folliculäre dendritische Zellen), die über Rezeptor-Liganden-Interaktion und die Sekretion von Zytokinen und anderen Botenstoffen u.a. das Wachstum des FL stimulieren und die gegen die Tumorzellen gerichtete Immunantwort unterdrücken [72,73].

Vermutlich als Folge der langen Latenz und Dissemination der Vorläuferpopulation ist das FL außerdem durch eine komplexe klonale Evolution gekennzeichnet, bei der multiple Subklone entstehen, die sich häufig divergent voneinander entwickeln, dabei unterschiedliche Alterationen erwerben und sich zu einem gegebenen Zeitpunkt auf verschiedenen Stufen der malignen Progressi-

on befinden [55,74-76]. Durch die prolongierte AID-Aktivität lässt sich diese intraklonale Heterogenität mit einer Vielzahl von Subklonen auch auf Ebene des IG demonstrieren, wo jeder Subklon anhand seines SHM-Musters identifiziert werden kann [77,78].

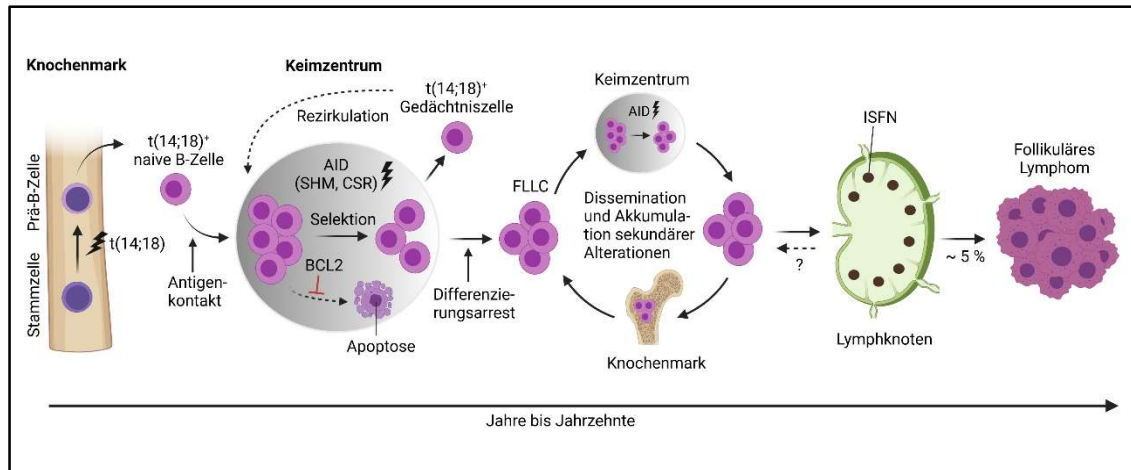


Abbildung 2. Das aktuelle Modell der Pathogenese des FL.

Die *BCL2*-Translokation $t(14,18)(q32;q21)$ entsteht durch eine fehlerhafte V(D)J-Rekombination im Knochenmark. Nach Kontakt mit einem passenden Antigen treten betroffene B-Zellen in die Keimzentrumsreaktion ein, wo die aberrante *BCL2*-Expression den Selektionsprozess beeinträchtigt. So entstehen $t(14,18)^+$ Gedächtniszellen mit niedrig-affinem B-Zell-Rezeptor, die wiederholt in das Keimzentrum eintreten können und im Rahmen der klonalen Expansion unter dem mutagenen Einfluss der Aktivierungs-induzierten Cytidin-Desaminase (AID) sekundäre Alterationen erwerben, die irgendwann zu einem Differenzierungsarrest in dem für das FL typischen Keimzentrumsphänotyp führen, welcher zusätzliche genetische Instabilität mit sich bringt. Diese nun als FL-ähnliche Zellen (FLLC, *follicular lymphoma like B-cells*) bezeichnete Population disseminiert im ganzen Körper und akkumuliert im Laufe weiterer Keimzentrums-passagen zusätzliche Alterationen, welche letztendlich die maligne Transformation zum FL verursachen. Dabei ist noch unklar, ob die *in situ* follikuläre Neoplasie (ISFN) eine weiter fortgeschrittene Läsion, als die zirkulierenden FLLC darstellt oder vielmehr ein temporärer Zustand ist, der sich auf einen immunologischen Stimulus bildet. Abkürzungen: CSR, Antikörperklassenwechsel; SHM, Somatische Hypermutation. [Erstellt mit BioRender.com].

1.5 Die *in situ* follikuläre Neoplasie

Die wahrscheinlich früheste morphologisch identifizierbare Vorläuferläsion des FL ist die sogenannte *in situ* follikuläre Neoplasie (ISFN) [1,79]. Die ISFN zeichnet sich durch eine Kolonisation von GC durch eine monoklonale Population $t(14,18)^+$ B-Zellen in ansonsten reaktiv erscheinendem lymphatischem Gewebe aus [79]. Betroffene GC können dabei immunhistochemisch anhand ihrer intensiven Expression von *BCL2* und *CD10* und gleichzeitig minimaler Proliferationsrate identifiziert werden [79]. Eine Störung der Lymphknotenarchitektur oder eine Ausbreitung der stark *BCL2*-positiven Zellen in die interfollikuläre Region, wie man es beim FL beobachten kann, finden sich nicht [79,80]. Wegen ihres asymptomatischen Verlaufs handelt es sich bei der ISFN meist um einen

Zufallsbefund in aus anderen Anlässen entfernten LK und kann in solchen mit einer Häufigkeit von 2-3 % detektiert werden [81-83]. Die Progressionsrate zum FL scheint auch bei der ISFN gering zu sein und liegt nach aktuellem Kenntnisstand im Bereich von 5 % [80,84]. Es ist unklar, ob die ISFN eine weiter fortgeschrittene Läsion als die zirkulierenden FLLC darstellt oder ob sie womöglich als deren gewebsgebundenes Gegenstück zu verstehen ist und sich als Antwort auf einen immunologischen Stimulus bildet; gleichwohl konnte gezeigt werden, dass beide Phänomene auf die gleiche Vorläuferpopulation zurückzuführen sind [55,85,86]. Demnach finden sich auch bei der ISFN Zeichen einer prolongierten AID-Aktivität im Sinne einer ausgeprägten intraklonalen Heterogenität des IG [60,87,88]. Dabei ist die ISFN offenbar ebenfalls kein strikt ortsbundener Prozess. So konnte eine Migration der ISFN-Zellen zwischen betroffenen GC aus z.T. unterschiedlichen LK demonstriert werden [87]. In der Vorarbeit zu dieser Studie hat sich gezeigt, dass die ISFN, passend zu ihrem Status als Vorläuferläsion, deutlich weniger Alterationen trägt als klonal verwandte FL [76,89]. Dennoch konnten insbesondere Mutationen epigenetischer Regulatoren – allen voran *CREBBP* – aber auch des immunmodulatorischen Oberflächenrezeptors *TNFRSF14* regelmäßig in den Vorläuferläsionen nachgewiesen und somit als potenzielle frühe Treibermutationen in der Pathogenese des FL identifiziert werden [76,89]. Auch die Akquisition von N-Glykosylierungsstellen ließ sich bereits in einigen ISFN Läsionen demonstrieren [87-89].

1.6 Zielsetzung

Die Erforschung prämaligener Vorläuferläsionen ermöglicht einen einzigartigen Einblick in die frühe Pathogenese und die klonale Evolution maligner Lymphome und hat das Potential verschiedenste Aspekte des klinischen Managements wie Therapie, Früherkennung und Nachsorge zu verbessern. Obwohl mittlerweile mehrere solcher Vorläufer identifiziert werden konnten, neben der ISFN z.B. die monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) für das multiple Myelom, ist der Nachweis einer vergleichbaren Läsion für das DLBCL bisher noch nicht gelungen [90]. Tatsächlich kann die ISFN neben einem syn- oder metachronen Auftreten mit dem FL ebenfalls mit dem DLBCL assoziiert sein und für diejenigen Fälle, die als Transformation aus einem FL entstanden

sind, ist eine klonale Verwandtschaft beider Läsionen anzunehmen – ein Sachverhalt, der bisher jedoch in keiner Studie systematisch untersucht worden ist [84,91]. Angesichts des häufigen Vorkommens der t(14;18)-Translokation im *de novo* DLBCL vom GCB-Subtyp, welches auch weitere phänotypische und molekulare Gemeinsamkeiten mit dem FL aufweist (Abschnitt 1.2.2), haben wir darüber hinaus die Hypothese aufgestellt, dass t(14;18)⁺ DLBCL auch ohne „intermediäres“ FL aus der ISFN entstehen können [1,17,92,93]. Ziel der vorliegenden Studie war es, syn- oder metachrone ISFN bei Patienten mit DLBCL zu identifizieren, um den Stellenwert der ISFN als Vorläuferläsion des DLBCL zu untersuchen und die Evolution der ISFN zum transformierten und – falls möglich – zum *de novo* DLBCL zu analysieren.

Die ISFN Läsionen sollten dabei mittels BCL2-Färbung reaktiver lymphatischer Gewebe detektiert und, wenn für die molekularen Analysen erforderlich, mittels lasergestützter Mikrodissektion angereichert werden. Die Translokation t(14;18) sollte sowohl über Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), als auch über die PCR-Amplifikation der *BCL2/IGH*-Bruchpunktregion nachgewiesen werden, wobei die amplifizierten Produkte zusätzlich nach Sanger sequenziert werden sollten, um über den Vergleich der Bruchpunktsequenzen gepaarter Proben eine Aussage über deren klonale Verwandtschaft machen zu können. Letzteres wird dadurch ermöglicht, dass die *BCL2/IGH*-Verknüpfungsstelle, analog zur physiologischen V(D)J-Rekombination durch das Einfügen von nicht kodierten Nukleotiden modifiziert wird und daher ebenfalls spezifisch für einen Klon ist [60,94]. Der Nachweis einer klonalen Verwandtschaft sollte außerdem über die vergleichende Klonalitätsanalyse der umgelagerten IG-Gene erfolgen. Ergänzend sollte das IGH-Gen mittels Next-Generation Sequencing (NGS) sequenziert werden; auch, um Aussagen über die potenzielle Akquisition von N-Glykosylierungsstellen und das Vorliegen intraklonaler Heterogenität des IG treffen zu können. Zum Nachweis sekundärer Alterationen sollten die Proben mittels FISH auf Rearrangements von *MYC* und *BCL6* sowie mittels NGS auf Mutationen von häufig in FL und DLBCL alterierten Genen untersucht werden. Durch die Klassifikation dieser Alterationen als gemeinsam oder privat, d.h. in den Vorläuferläsionen und den manifesten Lymphomen oder aber nur in jeweils einer

Komponente vorliegend, sollten dann Rückschlüsse auf den Zeitpunkt ihrer Akquisition und ihre Rolle in der Pathogenese gezogen werden. Darüber hinaus sollte die Verteilung der Alterationen genutzt werden, um die klonale Evolution der Fälle zu rekonstruieren.

Der Großteil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in der zugehörigen Originalpublikation (Vogelsberg *et al.*, *Haematologica* 2021) veröffentlicht [95]. Zusätzlich wurde die Arbeit als Kurzbeitrag im Verhandlungsband der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) publiziert, da sie im Rahmen der DGP Jahrestagung mit dem Promotions-Preis 2021 ausgezeichnet worden ist [96].

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl des Patientenmaterials

Für die Analysen wurde Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe verwendet. Dieses stammte aus den Archiven des Instituts für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen und der Abteilung für Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart, welche nach Patienten mit der Diagnose eines *de novo* oder eines aus einem FL hervorgegangenen DLBCL durchsucht worden sind, von denen zusätzlich zu einem beliebigen Zeitpunkt entnommenes, reaktives lymphatisches Gewebe zur Verfügung stand. Um potenzielle ISFN zu identifizieren, ist das reaktive Gewebe anschließend immunhistochemisch reevaluiert worden (Abschnitt 2.3). Bei Nachweis einer ISFN wurde von jeder vorhandenen Läsion (ISFN, FL, DLBCL) des jeweiligen Patienten mindestens eine Gewebeprobe in die Studie aufgenommen. Ein zusätzlicher gepaarter ISFN/DLBCL Fall war bereits im Vorfeld im Rahmen einer anderen Studie identifiziert worden (Schmidt *et al.*, Leukemia 2014) und ein weiterer wurde von Herrn Prof. Dr. M. A. Piris (Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid) zur Verfügung gestellt [76]. Alle Diagnosen wurden nach den aktuellen Richtlinien der WHO-Klassifikation für Tumore des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes gestellt [1].

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt (096/2016/B02).

2.2 Materialien

2.2.1 Geräte

Gerät:

Centrifuge/Vortex Combi-Spin FVL2400
HM 355S automatisches Mikrotom
Färbeautomat BenchMark ULTRA
Färbeautomat Tissue-Tek® Prisma®
Folieneindeckautomat Tissue-Tek® Film®
Vortexer
Mixer Uzusio VTX 3000L

Hersteller:

Peqlab
Thermo Scientific
Ventana Medical Systems
Sakura
Sakura
Biozym
LMS Consult

Heraeus Biofuge fresco	Thermo Scientific
Heraeus Multifuge 1L-R	Thermo Scientific
Axiovert 200M Microscope Laser	Zeiss
Thermomixer comfort	Eppendorf
NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific
Maxwell® 16 MDx Instrument	Promega
Qubit® 3.0 Fluorometer	Life Technologies
Waage	Sartorius
Spannungsgerät GPS 200/400	Pharmacia
Gelkammer	Peqlab
Geldokumentationssystem CN-300-WL/LC	Peqlab
GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System	Beckman Coulter
Magnetplatte Agencourt® SPRIplate® 96R ring	Beckman Coulter
Magnetplatte DynaMag™-96 Side	Thermo Scientific
Axio Imager.M2 mit ApoTome.2 System	Zeiss
Pipetboy	Brand
Pipetten	Eppendorf, Gilson
FlexCycler	Analytik Jena
Ion Chef™ Instrument	Life Technologies
Ion Torrent PGM™	Life Technologies
LightCycler® 480 Instrument	Roche

2.2.2 Kits

Kit:

Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit
Qubit® dsDNA HS Assay Kits
LymphoTrack® DX IGH FR1 Assay - PGM™ Kit
LymphoTrack® DX IGH FR2 Assay - PGM™ Kit
LymphoTrack® DX IGH FR3 Assay - PGM™ Kit
IdentiClone™ *BCL2/JH* Translocation Assay
GenomeLab™ DTCS - Quick Start Kit
Agencourt® CleanSEQ® Kit
Ion Library TagMan® Quantitation Kit
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0
Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit
Ion PGM™ Hi-Q™ View Chef Kit
Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit
Ion 318™ Chip Kit v2 BC

Hersteller:

Promega
Life Technologies
Invivoscribe Technologies
Invivoscribe Technologies
Invivoscribe Technologies
Invivoscribe Technologies
Beckman Coulter
Beckman Coulter
Life Technologies
Life Technologies
Life Technologies
Life Technologies
Life Technologies

2.2.3 Primer

Alle Primer sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Hinter Primern, die aus anderen Arbeiten übernommen worden sind, ist die entsprechende Referenz aufgeführt.

Alle anderen Primer sind mithilfe der Primer3web Software (Version 4.1.0) entworfen und über die Firma Sigma-Aldrich bestellt worden.

Primer für die Analyse der *BCL2*-Bruchpunktregion:

MBR_F	TTAGAGAGTTGCTTTACGTGGCCTG [97]
MCR_F	CGTGCTGGTACCACTCCTG [98]
MCR_2F	GAAATTAGCACTTTGGGTCTCG [76]
MCR_3F	CAAGCCTATGAAAATCACAAA [76]
MCR_4F	TGAATGCCATCTCAAATCCA [76]
MCR_5F	GCATCAGTTGGGAAAGGAAG [76]
MCR_6F	ACAATCTCATGCTGCAAACG [76]
MCR_7F	AATCTCAGCCTGCGTTTTT [76]
MCR_8F	AGGATGGAGTGACGTCATGG [76]
MCR_9F	CATTTGGGGTGGTTGTTCTT [76]
S-Icr	TCGTTCTCAGTAAGTGAGAGTGC [99]
JH-Konsensus	CTTACCTGAGGAGACGGTGACC [43]

Spezifische Primer für die Analyse der *BCL2*-Bruchpunktregion:

4776 t14_18 F	AACACAGACCCACCCAGAG
4776 t14_18 de novo R	ATACCGTACGTCCGAAAGCA
17330 t14_18 F	GCTTTCTCATGGCTGTCCTT
17330 t14_18 de novo R	GGGACCACATCGAGAAGC

Spezifische Primer für die Klonalitätsanalyse:

11895 IG F	ATGGAGTTGAGGAGGCTGAC
11895 D/F CDR3 D4 R	D4-GCCCCAGACGTCCATAACAT
18776 D IG F	GAATATGCTGCGTCGGTGAA
18776 D CDR3 D4 R	D4-TGTGGCTACGGACCTCTCTA

Primer für die Validierung auf dem Ion Torrent PGM™:

GNA13 Ex4 326 F	TCCCCACTGCTTAAGAGACG
GNA13 Ex4 326 R	TCCGTGTTGATAGCAGTGGT
TP53 Ex8 273 F	TTGCTTCTCTTTTCCTATCCTGA
TP53 Ex8 273 R	TCTTGCGGAGATTCTCTTCCT
CREBBP Ex7 551 F	TCCAATGAACATTCCAGCAGG
CREBBP Ex7 551 R	CAGGGTCTTACTTTGTGGCC
CREBBP Ex30 1680 F	CTTCCTCACCCCTCGCCAG
CREBBP Ex30 1680 R	ATGCAGAGCGTGGACCAC
KMT2D Ex31 2623 F	TGTCCCCACTACGCCCTC
KMT2D Ex31 2623 R	GATCGCTGTGAGGCTCCAT
KMT2D Ex22 1739 F	ACACTTCCGTTCTGTCCACA
KMT2D Ex22 1739 R	TCTTCTCATCCCCTTCAGCT
TP53 Ex5 150 F	GCCAAGACCTGCCCTGTG
TP53 Ex5 150 R	CATGTGCTGTGACTGCTTGT
BCL2 Ex2 101-113 F	ACCTGACCCTCCGCCA
BCL2 Ex2 101-113 R	GGTGAAGGGCGTCAGGT

BCL2 Ex2 33 F	CAGAGGGGCTACGAGTGG
BCL2 Ex2 33 R	GGGCTGGGAGGAGAAGATG
BCL2 Ex2 6 F	GCGAGAGGTGCCGTTG
BCL2 Ex2 6 R	ACTTCATCACTATCTCCCGGT
CREBBP Ex27 1503 F	ATTGCCACCCACCTGATCAA
CREBBP Ex27 1503 R	GGATGATCCGCTCTGCAAAC
CARD11 Ex20 871 F	AGGGCCTGACTGATTGATAAAT
CARD11 Ex20 871 R	CTGAAGGAGCTGGCCAAAA
TP53 Ex5 179 F	CAAGCAGTCACAGCACATGA
TP53 Ex5 179 R	CTGCTCACCATCGCTATCTG
BCL2 Ex2 20-43 F	CCCCGTTGCTTTTCTCTG
BCL2 Ex2 20-43 R	GGGCTGGGAGGAGAAGATG
CD79B Ex5 196 F	GATCTCCATCCCTCTCCGC
CD79B Ex5 196 R	CCCAACCACACCAGCAGATA
KMT2D Ex39 4473 F	GAACCAGCAACCACCTCCT
KMT2D Ex39 4473 R	AATGTGCCCGTTGATCTCAG
GNA13 Ex4 203 F	CGCATTACTTCGGGATTAATAGG
GNA13 Ex4 203 R	TCTGACCACCTACATCAACCA
TNFRSF14 Ex6 187 F	TGCCTCTCCCACGTCCTC
TNFRSF14 Ex6 187 R	TGTGGAGCAAACAATGACGA
CARD11 Ex23 1046 F	CTCAGAAGGCAGAAGACGGA
CARD11 Ex23 1046 R	CATCCAACCTCCCAGTCCC
CREBBP Ex27 1482 F	CCTGTCCTCCAAGTGAAGGA
CREBBP Ex27 1482 R	CAGTCGTTTTGGCTTGGGTA
BCL2 Ex2 79-90 F	CATCTTCTCCTCCCAGCCC
BCL2 Ex2 79-90 R	GTAGCGGCGGGAGAAGTC
PIM1 Ex1 1 F	TGCGCCGACATCCTGGA
PIM1 Ex1 1 R	TTGGTGGCGTGCAGGTC
KMT2D Ex10 468-477 F	GGAATCACCCACGTCCCC
KMT2D Ex10 468-477 R	AGGTGCAATGCCTCAGGA
GNA13 Ex1 53-54 F	TATGTGAAGCGGCTGGTGAA
GNA13 Ex1 53-54 R	TCCTGCCCGTGGATGATC
GNA13 Ex4 222 F	GAAGACCCACCAAAGGCATC
GNA13 Ex4 222 R	TCCTTTCTGATCTCTGACCACC
MEF2B Ex5 77 F	CCAACCGCCTCTTCCAGTAT
MEF2B Ex5 77 R	GAGGATGTCAGTGTTGGTGC
HIST1H1D Ex1 77 F	TCTGGCCGCGCTTAAGAAA
HIST1H1D Ex1 77 R	TTGAGGCCAAGCTTGATACG
EP300 Ex5 415 F	CTCGACAAATCATTTCACACTGG
EP300 Ex5 415 R	TCACTTACGCTGTTGATTTCTCT
BCL2 Ex2 76 F	CCCCATCCAGCCGCAT
BCL2 Ex2 76 R	TGGCGGAGGGTCAGGT
TNFRSF14 Ex1 12 F	TGCCGGTCTGAGCCTGAG
TNFRSF14 Ex1 12 R	AGCCTCAAGACGTCCGTTTT
TNFRSF14 Ex6 219 F	ATGGTGGTTTTCTCTCAGGGA
TNFRSF14 Ex6 219 R	CCCCTTGGCTTTTCTTTTCA
KMT2D Ex48 4987 F	CTCCTCGCCTCAAGAAATGG
KMT2D Ex48 4987 R	CTTCCCGCTCATCCTCCTG

EZH2 Ex16 646 F	TATTGCTGGCACCATCTGAC
EZH2 Ex16 646 R	TGAATACAGGTTATCAGTGCCTT
BCL2 Ex2 8 F	CTCTGGGAAGGATGGCGC
BCL2 Ex2 8 R	CACTCGTAGCCCCTCTGC
PIM1 Ex3 79 F	CGTGGAGAAGGACCGGATTT
PIM1 Ex3 79 R	CTCACCCCACCCACTCATC
TNFRSF14 Ex8 266 F	CACAGCGGAAAAGACAGGAG
TNFRSF14 Ex8 266 R	TCAGTGGTTTTGGGCTCCTC
BCL2 Ex2 10-11 F	CCGTTGCTTTTCTCTGGG
BCL2 Ex2 10-11 R	CATCTCCCGCATCCCCTC
CARD11 Ex5 250 F	GGAGGAGGAATGTAAGCTGGA
CARD11 Ex5 250 R	CCTTCTTGGGCCGATTTTCA
HIST1H1B Ex1 107 F	CTTCTAAGGAGCGCAATGGC
HIST1H1B Ex1 107 R	AGGCCGCCTTCTTGTTGA
BCL2 Ex2 135 F	TTCGCCGAGATGTCCAGC
BCL2 Ex2 135 R	CCGAACTCAAAGAAGGCCAC
KMT2D Ex10 831 F	CCTGTCTCCTGTGCCTGAG
KMT2D Ex10 831 R	TCAGGGGACAGATGCGATT

Adaptersequenzen für die Sequenzierung auf dem Ion Torrent PGM™:

A-Adapter	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
trP1-Adapter	CCTCTCTATGGGCAGTCGGT
Verbindungsequenz	GAT

2.2.4 Reagenzien

<i>Reagenz:</i>	<i>Hersteller:</i>
Glykogen 20 mg/ml	Roche
Proteinase K	Merck
GelRed® Nucleic Acid Stain	Biotium
6X DNA Loading Dye	Thermo Scientific
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
Desoxynukleotide (dNTP)	Thermo Scientific
10x Puffer I (mit 15 mM MgCl ₂)	Roche
10x Puffer II (ohne MgCl ₂)	Roche
25 mM MgCl ₂	Roche
AmpliTaq Gold® Polymerase	Life Technologies
Sample Loading Solution	Beckman Coulter
GenomeLab™ DNA Size Standard-400	Beckman Coulter
Mineralöl	Beckman Coulter
GenomeLab™ Separation Buffer	Beckman Coulter
HighPrep™ PCR Clean Up System	MagBio Genomics

2.2.5 Chemikalien

Chemikalie:

Xylol p.a.
Ethanol p.a.
LE Agarose
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
Chloroform p.a.
Isoamylalkohol p.a.
Lithiumchlorid

Hersteller:

VRW
Merck
Biozym
Carl Roth GmbH
VWR
AppliChem
Merck

2.2.6 Antikörper und FISH Sonden

Sonde:

Vysis LSI BCL2 Dual Color Break Apart
Rearrangement Probe
Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color Dual Fusion
Translocation Probe
Vysis LSI BCL6 (ABR) Dual Color
Rearrangement Probe
Vysis LSI MYC Dual Color
Rearrangement Probe
Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/CEP 17
SpectrumGreen Probe
ZytoLight® SPEC IGH Dual Color
Break Apart Probe

Hersteller:

Abbott Molecular

Abbott Molecular

Abbott Molecular

Abbott Molecular

Abbott Molecular

ZytoVision

Antikörper (Klon):

CD3 (SP7)
CD10 (56C6)
CD20 (L26)
BCL6 (GI191E/A8)
Ki-67 (MIB-1)
BCL2 (100/D5)
MUM1 (Mum1p)
C-MYC (y69)
P53 (DO-7)

Hersteller:

DCS
Novocastra
DAKO
Zytomed
DAKO
DCS
DAKO
Roche
Novocastra

2.2.7 Puffer

5x TBE-Puffer für die Gelelektrophorese:

Endkonzentration in 1 l

445 mM TRIS
445 mM Borsäure
12,5 mM EDTA

Hersteller

Sigma-Aldrich
Merck
AppliChem

P2-Lysepuffer (auf 50 ml auffüllen mit ddH₂O):

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>	<i>Hersteller</i>
10 mM TRIS	1 ml	Merck
1 mM EDTA	200 µl	Merck
1 % Natriumlaurylsulfat	10 ml	Merck

2.2.8 Verbrauchsmaterialien

Benutzt wurden Materialien der Firmen Corning Incorporated, Beckman Coulter, Eppendorf, Zeiss, Falcon, Sarstedt, Neolab, Carl Roth GmbH, Greiner Bio-One, Becton Dickinson und Biozym.

2.2.9 EDV-Programme und Online-Software

<i>Software:</i>	<i>Hersteller:</i>
PALM [®] RoboSoftware (Version 3.0)	Zeiss
NanoDrop [™] 2000/2000c Software (Version 1.4.1)	Thermo Fisher Scientific
GenomeLab [™] Genetic Analysis Software (Version 11.0)	Beckman Coulter
AxioVision Software (Version 4.8.2.)	Zeiss
LightCycler [®] 480 Software (Version 1.5)	Roche
Ion AmpliSeq [™] Designer	Life Technologies
Torrent Suite [™] Software (Version 5.6)	Life Technologies
Ion Reporter [™] Software (Version 5.6)	Thermo Scientific
Integrative Genomics Viewer (Version 2.3.94)	Broad Institute
Primer3web (Version 4.1.0)	WIFBM
Ensembl	EBI
SIFT	J. Craig Venter Institute
Polyphen-2	Harvard Medical School
Nucleotide Blast, IGBlast	NCBI
Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Version X)	S. Kumar, K. Tamura
Exome Variant Server	NHLBI
Catalogue of somatic mutations (COSMIC)	Welcome Trust Sanger
Microsoft Office	Microsoft Corporation
Adope Photoshop	Adobe Incorporated
EndNote X9	Thomson Reuters
IMG/TV-QUEST	Universität Montpellier
Lymphotrack [®] Dx Software – PGM [™]	Invivoscribe

2.2.10 Hersteller

Abbott Molecular	Wiesbaden, Deutschland
Analytik Jena	Jena, Deutschland
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Biotium	Hayward, CA, USA
Biozym	Oldendorf, Deutschland
Brand	Wertheim, Deutschland
Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Corning Incorporated	Amsterdam, Niederlande
DAKO	Hamburg, Deutschland
DCS Innovative Diagnostik Systeme	Hamburg, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Gilson	Middleton, WI, USA
Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Invivoscribe Technologies	San Diego, CA, USA
Jenoptik	Jena, Deutschland
Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
LMS Consult	Brigachtal, Deutschland
MagBio Genomics	Kraichtal, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Microm International GmbH	Walldorf, Deutschland
Neolab	Heidelberg, Deutschland
Novocastra (Leica Biosystems)	Wetzlar, Deutschland
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Pharmacia	Uppsala, Schweden
Promega	Mannheim, Deutschland
Roche	Penzberg, Deutschland
Sakura	Staufen, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Braunschweig, Deutschland
Ventana Medical Systems	Tucson, AZ, USA
VWR	Bruchsal, Deutschland
Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Zytomed	Berlin, Deutschland
ZytoVision GmbH	Bremershaven, Deutschland

2.3 Histologische und immunhistochemische Färbungen

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) sind am Färbeautomaten (Sakura) durchgeführt worden, nachdem das FFPE-Gewebe mit dem Mikrotom (Thermo Scientific) zu 2,5 µm dicken Gewebeschnitten verarbeitet worden ist. Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach Herstellerprotokollen am BenchMark ULTRA Färbeautomaten (Ventana Medical Systems) durchgeführt. Bei ISFN Proben wurden die Proteine BCL2 (1:20; DAKO), CD10 (1:100; Novocastra), CD20 (1:1000; DAKO) und Ki-67 (1:1000; DAKO) gefärbt. Bei FL und aggressiven B-NHL sind außerdem die Proteine CD3 (1:200 Verdünnung; DCS), BCL6 (1:50; Zytomed), MUM1 (1:400; DAKO), MYC (ready to use; Roche) und p53 (1:400; Novocastra) gefärbt worden. Die aggressiven B-NHL wurden nachfolgend anhand des Hans-Algorithmus in den GCB- oder ABC-Subtypen eingeteilt [18]. Die Bilddokumentation erfolgte mit dem Axioskop 2 Plus Mikroskop (Zeiss) und der ProgRes C10 Plus Kamera mit der zugehörigen Software (Jenoptik).

2.4 Methoden zur DNA-Extraktion und -Aufreinigung

2.4.1 Anreicherung des Tumormaterials

Auch bei manifesten Lymphomen kann der Tumoranteil verschiedener Gewebeblöcke sehr variabel sein, weswegen die Proben vor der DNA-Extraktion mittels Makrodissektion angereichert wurden. Hinsichtlich der ISFN Läsionen, deren Zellen z.T. nur einzelne GC besiedeln, ist für einige Fälle darüber hinaus eine Laser-Mikrodissektion durchgeführt worden, welche es ermöglicht, selbst kleinste Areale mit nur minimaler Verunreinigung aus dem umliegenden Gewebe zu isolieren [100].

2.4.1.1 Makrodissektion

Makrodisseziert wurden pro Fall ein bis zehn je 5 µm dicke Gewebeschnitte auf silanisierten Objektträgern. Dafür ist das Gewebe zuvor zur Entparaffinierung jeweils 5 Minuten in mit 100 % Xylol (VWR) gefüllte Färbeküvetten gestellt und luftgetrocknet worden. Im Anschluss erfolgte das Abkratzen des ausgewählten Bereichs mit einem sterilen Skalpell. Für die Zellyse mit dem Maxwell® 16

FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega) ist das Gewebe in ein mit 180 µl Inkubationspuffer (Promega) gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt worden. In dieses wurden zusätzlich 20 µl Proteinase K (Promega) gegeben. Das Ganze ist bei 70 °C über Nacht im Thermoschüttler (Eppendorf) mit 300 rpm inkubiert worden. Die nachfolgende Aufreinigung mit dem Maxwell® 16 MDx Instrument (Promega) ist unter Abschnitt 2.4.2 beschrieben.

2.4.1.2 Mikrodissektion

Für die Mikrodissektion wurden 5 µm dicke HE-gefärbte Gewebeschnitte in Serie auf membranbeschichtete Objektträger (MembraneSlide 1.0 PEN, Zeiss) aufgezogen. Zuvor wurden die Objektträger 30 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt, was die Haftung des Gewebes optimiert. Nach jeweils fünf HE Schnitten erfolgte außerdem eine BCL2-Färbung, welche als Orientierung diente und die Identifikation der ISFN auch in den tiefer liegenden Gewebeschichten gewährleistet hat. Die Laser-Mikrodissektion erfolgte am Axiovert 200M Microscope Laser (Zeiss) mithilfe der PALM® RoboSoftware (Version 3.0) von Zeiss. Dabei wurde das ausgewählte Areal mitsamt Membranen durch einen UV-Laser aus dem umliegenden Gewebe herausgetrennt und in den adhäsiven Deckel eines sich darüber befindenden 0,5 ml Reaktionsgefäßes (AdhesiveCap 500 opaque, Zeiss) katapultiert. Anschließend wurden die gesammelten Zellverbände mittels 300 µl P2-Lysepuffer (Abschnitt 2.2.7) vom Deckel gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Nachdem das Reaktionsgefäß auf Raumtemperatur abgekühlt war, sind nachfolgend 20 µl Proteinase K (Merck) hinzugegeben worden, um die Zellyse einzuleiten. Diese erfolgte über zwei Tage bei 56 °C und 500 rpm auf einem Thermoschüttler (Eppendorf), wobei am Morgen des zweiten Tages nach einer erneuten 10-minütigen Inkubation bei 95 °C im Thermoschüttler weitere 10 µl Proteinase K hinzugegeben wurden. Nachdem anschließend der vollständige Verdau des Gewebes optisch kontrolliert worden war, folgte die Phenol-Chloroform Extraktion wie unter Abschnitt 2.4.3 beschrieben.

2.4.2 DNA-Extraktion mit dem Maxwell® 16 MDx Instrument

Die Extraktion mit dem Maxwell® 16 MDx Instrument (Promega) basiert auf der Bindung der DNA an paramagnetische Partikel und erreicht auf diese Weise deren Isolation vom restlichen Lysat [101]. Die Zellyse nach Makrodissektion erfolgte dabei wie unter Abschnitt 2.4.1.1 beschrieben. Nachfolgend sind zu jeder Probe 400 µl Lyse Puffer (Promega) hinzugegeben worden. Das Beladen des Maxwell® 16 LEV Cartridge Racks (Promega), das Überführen der Proben in die entsprechenden Maxwell®-16-Kartuschen (Promega) und die Bedienung des Maxwell® 16 MDx Instruments (Promega) sind im Anschluss nach Herstellerangaben durchgeführt worden. Die erhaltene, in ddH₂O gelöste DNA, wurde bei -20 °C gelagert.

2.4.3 Phenol-Chloroform Extraktion

Um die Ausbeute an DNA zu maximieren, wurde bei mikrodisssezierten ISFN Proben die Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt [102]. Bei dieser macht man sich die Unterschiede in der Löslichkeit verschiedener Zellbestandteile zunutze, um die DNA aus dem Lysat zu isolieren. Zunächst wurde zum Lysat 1 Volumen (ca. 400 µl) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI; Carl Roth GmbH) zugeben, gemischt und das Ganze für 10 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch bilden sich 2 Phasen, eine obere wässrige, in der sich unter anderem die DNA befindet und eine untere organische Phase, die hydrophobe Substanzen, wie z.B. Lipide beherbergt. Proteine denaturieren durch die Behandlung und bilden eine weißliche Interphase. Die obere Phase wurde vorsichtig unter Ausschluss des Proteinpräzipitates in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In dieses wurde erneut ein Volumen PCI gegeben und die beschriebene Prozedur wiederholt. Im Anschluss ist ein Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, VWR, AppliChem) hinzugefügt, gemischt und erneut 10 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert worden. Dadurch bildeten sich wiederum zwei Phasen, wobei die obere ein weiteres Mal abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Zu diesem sind 40 µl einer 8 M Lithiumchloridlösung (Merck), 2 µl einer 20 mg/ml Glykogenlösung (Roche) und 1 ml 100 % Ethanol (Merck) gegeben worden, wobei alle drei Reagenzien das Ausfällen der DNA erleichtern. Gefällt

wurde über Nacht bei -20 °C. Am nächsten Morgen wurde die Probe für 30 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zum verbliebenen DNA-Pellet sind 200 µl -20 °C kaltes, 70 % Ethanol (Merck) zugegeben worden, um überschüssige Salze auszuwaschen. Die Probe wurde ein weiteres Mal bei 4 °C und 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und die DNA anschließend bei 37 °C auf dem Thermoschüttler (Eppendorf) getrocknet. Je nach Menge der getrockneten DNA wurde diese schließlich in 20-50 µl ddH₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.5 Methoden zur Bestimmung von DNA-Qualität und -Quantität

2.5.1 Messung mittels Spektrophoto- und Fluorometer

Ein Instrument zur quantitativen Einschätzung der DNA ist der Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific) mit der entsprechenden NanoDrop™ 2000/2000c Software (Version 1.4.1). Dieser macht sich das UV-Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren bei 260 nm zunutze, um die Konzentration dieser zu bestimmen. Außerdem lässt sich durch Bildung des A260/A280 Quotienten und der Betrachtung der Adsorption bei 230 nm eine Aussage über die Reinheit der Probe treffen [103]. Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben.

Zusätzlich ist das Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies) zum Einsatz gekommen. Dieses misst nach Anbringen eines fluoreszierenden Farbstoffs die Lichtemission der Probe. Im Unterschied zu der Messung mittels Nanodrop™ 2000, kann dabei unter Verwendung eines Farbstoffs, der sich selektiv an doppelsträngige DNA anlagert, eine DNA-Quantifizierung erfolgen, welche nicht durch einzelsträngige DNA-Fragmente oder Reste von RNA verfälscht wird, was für die nachfolgende Sequenzierung mittels Ion Torrent PGM™ (Life Technologies) von Bedeutung war. Die Messung erfolgte mittels Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers.

2.5.2 Einschätzung der DNA-Qualität

Die Einbettung von Gewebe in Paraffin kann unter anderem zu einer deutlichen Fragmentierung der DNA führen, weswegen zur qualitativen Einschätzung eine Fragmentlängenbestimmung vonnöten war [104]. Dies erfolgte durch eine Multi-

plex-PCR (Tab. 1) nach Vorlage des BIOMED-2 Protokolls, mit welcher verschiedene Bereiche bekannter Länge amplifiziert wurden, sowie eine sich daran anschließende Gelelektrophorese der amplifizierten Produkte [43]. Für die Gelelektrophorese sind 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl Loading Dye (Thermo Scientific) gemischt, in die Taschen eines 2 % Agarosegels pipettiert und bei 160 Volt (Spannungsgerät, Pharmacia) aufgetrennt worden. Durch den, in einer Konzentration von 7 µl/100 ml im Gel vorhandenen, Fluoreszenzfarbstoff GelRed® (Biotium), der die DNA interkaliert, konnten die PCR-Produkte anschließend mittels UV-Licht betrachtet werden (Geldokumentationssystem, Peqlab). Als Referenz diente ein 100 bp DNA-Marker (Thermo Scientific).

Tabelle 1. PCR zur Einschätzung der DNA-Qualität.

Primer-Mix		
<i>Vorwärts- und Rückwärtsprimer</i>	<i>Volumen [µl]</i>	<i>Endkonzentration</i>
AF4/X3U und AF4/X3L	5	2,5 pmol
AF4/X11U und AF4/X11L	2,5	1,25 pmol
PLZF/X1U und PLZF/X1L	2,5	1,25 pmol
RAG1/X2U und RAG1/X2L	2,5	1,25 pmol
TBXAS1/X9U und TBXAS1/X9L	2,5	1,25 pmol
auffüllen mit 170 µl ddH ₂ O		
PCR-Ansatz (25 µl)		
<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [µl]</i>	<i>Endkonzentration</i>
ddH ₂ O	16,8	
10x Puffer II (ohne MgCl ₂)	2,5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2	2 mM
dNTP (10 mM)	0,5	0,2 mM
Primer-Mix	2	s.o.
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2	0,04 U/µl
DNA (50 ng/µl)	1	50 ng
Thermocycler-Programm		
95 °C		7 min
35 Zyklen:		
95 °C		45 s
60 °C		45 s
72 °C		1 min
72 °C		4 min
16 °C		unendlich

2.6 Methoden zum Nachweis chromosomaler Anomalien

2.6.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die FISH zum Nachweis der t(14;18)(q32;q21)-Translokation wurde primär mit einer Break Apart Sonde (Vysis LSI BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe, Abbott Molecular) durchgeführt. Diejenigen Proben, bei denen sich auf diese Weise kein Bruch im *BCL2*-Gen bestätigen ließ, wurden zusätzlich mit der ZytoLight® SPEC IGH Dual Color Break Apart Sonde (ZytoVision) und der Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color Dual Fusion Translokationssonde (Abbott Molecular) untersucht, um potenzielle atypische Translokationsmuster aufzudecken. Alle aggressiven B-NHL und FL Proben sind darüber hinaus mit der Vysis LSI BCL6 (ABR) Dual Color Rearrangement Sonde (Abbott Molecular) und der Vysis LSI MYC Dual Color Rearrangement Sonde (Abbott Molecular) auf das Vorhandensein von *BCL6*- und *MYC*-Translokationen untersucht worden. Im Falle einer *BCL6*- und/oder *MYC*-Translokation wurde anschließend auch die zugehörige ISFN mit den entsprechenden Sonden analysiert. Proben, bei denen mittels NGS eine *TP53* Mutation nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 2.9), sind außerdem mit der Vysis LSI TP53 SpectrumOrange/CEP 17 Spectrum-Green Sonde (Abbott Molecular) hybridisiert worden, um sie auf eine Deletion bzw. einen Verlust des zweiten Allels zu untersuchen. Alle Hybridisierungen erfolgten nach Herstellerangaben und wurden mithilfe des Axio Imager.M2 mit integriertem ApoTome.2 System (Zeiss) ausgewertet. Die Bildokumentation wurde mit der zugehörigen AxioVision Software (Version 4.8.2) durchgeführt.

2.6.2 PCR zum Nachweis eines *BCL2*/*IGH*-Rearrangements

Der Bruch im *BCL2*-Gen kann, wie unter Abschnitt 1.4.1 beschrieben, neben der MBR auch die 3'MBR, MCR und ICR betreffen, weswegen zur Amplifikation der *BCL2*/*IGH*-Bruchpunktregion mehrere PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Vorwärtsprimern (Abschnitt 2.2.3) verwendet wurden, welche jeweils mit dem JH-Konsensus Primer kombiniert worden sind (Tab. 2). Fälle, bei denen auf diese Weise kein Bruchpunkt amplifiziert werden konnte, wurden darüber hinaus mit dem IdentiClone™ *BCL2*/*JH* Translocation Assay (Invivoscribe Tech-

nologies) analysiert, welches die unterschiedlichen Bruchpunktregionen ebenfalls mit drei separaten Primer-Mixen abdeckt (Tab. 3). Der Erfolg der Amplifikation wurde überprüft, indem jeweils 10 µl der PCR-Produkte wie unter 2.5.2 beschrieben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt worden sind. Banden waren nur dann sichtbar, wenn tatsächlich ein Bruchpunkt in der entsprechenden Region vorgelegen hat.

Tabelle 2. PCR zur Detektion eines *BCL2/IGH*-Rearrangements.

*Verwendet wurde jeweils der MBR_F, MCR_F, MCR_2F-9F oder S-Icr Primer. #Für den MCR_7F Primer wurden 3,0 µl MgCl₂ (25 mM) eingesetzt. *Für den MCR_6F und MCR_7F Primer ist die Annealing Temperatur auf 54 °C angepasst worden.

PCR-Ansatz (25 µl)		
Reagenz	Volumen [µl]	Endkonzentration
ddH ₂ O	17,25	
10x Puffer II (ohne MgCl ₂)	2,5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 [#]	2,0 mM
dNTP (10 mM)	1	0,4 mM
Vorwärtsprimer* (10 µM)	0,5	0,4 mM
JH-Konsensus Primer (10 µM)	0,5	0,4 mM
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25	1,25 U
DNA (50 ng/µl)	1	50 ng
Thermocycler-Programm		
95 °C		5 min
45 Zyklen:		
95 °C		45 s
57 °C (MBR) oder 56 °C (MCR und ICR)*		1 min
72 °C		1 min
72 °C		10 min
12 °C		unendlich

Tabelle 3. PCR-Ansatz für den IdentiClone™ *BCL2/JH* Translocation Assay.

PCR-Ansatz (25 µl)	
Reagenz	Volumen [µl]
Master Mix A/B/C	22,5
EagleTaq DNA polymerase (5 U/µl)	0,125
DNA 50 ng/µl	1
auffüllen mit ddH ₂ O auf 25 µl	
Thermocycler-Programm	
95 °C	7 min
35 Zyklen:	
95 °C	45 s
60 °C	45 s
72 °C	90 s
72 °C	10 min
15 °C	unendlich

Zum Nachweis der t(14;18) in den ISFN Proben von Fall 3 und Fall 9 mussten anhand der Bruchpunktsequenz der gepaarten aggressiven B-NHL klonsspezifische Primer entworfen werden. Verwendet wurde dafür die Primer3web Software (Version 4.1.0), wobei pro Fall jeweils ein Vorwärtsprimer für den translozierten Teil des *BCL2*-Gens und ein Rückwärtsprimer für die klonsspezifische Verknüpfungssequenz konzipiert worden ist (Abschnitt 2.2.3). Für die PCR sind lediglich die Annealingtemperaturen (54 °C für Fall 3 und 53 °C für Fall 9) angepasst worden. Die anschließende Gelelektrophorese wurde wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben durchgeführt, wobei eine erfolgreiche Amplifikation in den entsprechenden ISFN Proben als Beweis für das Vorhandensein des gleichen t(14;18)(q32;q21) Bruchpunktes angesehen worden ist. Um die Spezifität der Primer zu verifizieren sind klonal nicht verwandte t(14;18)⁺ Proben als Negativkontrolle verwendet und zusätzlich alle erhaltenen Produkte wie unter Abschnitt 2.7 beschrieben sequenziert worden.

2.7 Sanger Sequenzierung

2.7.1 HighPrep™ -Aufreinigung

Bei erfolgreicher Amplifikation wurden die PCR-Produkte für die nachfolgende Sequenzierung nach Sanger aufgereinigt [105]. Dabei werden unerwünschte Komponenten wie Primer oder freie dNTP entfernt. Die eingesetzte Menge des Produkts richtete sich nach Stärke der mittels Gelelektrophorese nachgewiesenen Bande (siehe Abschnitt 2.6.2). Bei kräftigen Banden wurden 10 µl PCR-Produkt verwendet. Für die Aufreinigung ist das Produkt mit der 1,8-fachen Menge HighPrep™ Beads (MagBio Genomics) in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend 2 Minuten in eine 96-Well Magnetplatte (Thermo Scientific) gestellt worden. Der Überstand wurde entnommen und die Beads nachfolgend mit 200 µl 80 % Ethanol (Merck) für 3 Minuten inkubiert. Anschließend ist das Ethanol ebenfalls verworfen und der Waschschrift wiederholt worden. Nach komplettem Entfernen des Ethanols und dem Trocknen der Beads, sind diese erneut je nach Bandenstärke in 30-40 µl ddH₂O eluiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden. Dies

ermöglichte das Lösen der DNA, die dann nach 2-minütiger Inkubation in der Magnetplatte mit dem Überstand entnommen werden konnte.

2.7.2 Cycle Sequencing Reaktion und CleanSeq®-Aufreinigung

Für die Kettenabbruch-Synthese sind abhängig von der Bandenstärke (Abschnitt 2.6.2) pro Ansatz 3-7 µl PCR-Produkt in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt worden. Dabei wurde für den Vorwärts- und Rückwärtsprimer je ein Ansatz erstellt, wofür das GenomeLab™ DTCS - Quick Start Kit (Beckman Coulter) und die Primer des jeweiligen *BCL2*-Bruchpunktes bzw. der JH-Konsensus Primer verwendet wurden (Tab. 4).

Tabelle 4. Cycle Sequencing Reaktion.

PCR-Ansatz (10 µl)		
Reagenz	Volumen [µl]	Endkonzentration
DCTS Quick Start Mix	2	
Vorwärts- oder Rückwärtsprimer (10 µM)	1	1 µM
Aufgereinigtes PCR-Produkt	3-7	
auffüllen mit ddH ₂ O auf 10 µl		
Thermocycler-Programm		
30 Zyklen:		
96 °C		20 s
50 °C		20 s
60 °C		4 min

Eine nachfolgende erneute Aufreinigung der Produkte erfolgte mittels Agencourt® CleanSEQ® Kit (Beckman Coulter). Es wurden 10 µl Sequenzierungsprodukt mit 10 µl CleanSEQ® Beads (Beckman Coulter) und 42 µl 85 % Ethanol (Merck) gemischt und 3 Minuten bei Raumtemperatur in einer 96-Ring Magnetplatte (Beckman Coulter) inkubiert. Der Überstand ist abgenommen und zu den Beads erneut 100 µl 85 % Ethanol gegeben worden. Nach 3-minütiger Inkubation und vollständigem Entfernen des Ethanols wurden die Beads zügig in 40 Sample Loading Solution (SLS, Beckman Coulter) resuspendiert und in eine 96-Well Probenplatte (Corning Incorporated) überführt. Die Probenplatte wurde auf die Magnetplatte gestellt, damit sich am Boden ein Pellet der Beads bildet. Jedes Well ist zusätzlich mit einem Tropfen Mineralöl (Beckman Coulter) überschichtet worden. Analog dazu ist eine 96-Well-Pufferplatte (Beckman Coulter) mit Separationspuffer (Beckman Coulter) befüllt worden.

2.7.3 Kapillargelelektrophorese und Sequenzanalyse

Die nachfolgende Kapillargelelektrophorese auf dem GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter) und die Auswertung mithilfe der GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis Software (Version 11.0) von Beckman Coulter sind nach Angaben des Herstellers durchgeführt worden. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den möglichen J_H-Gensegmenten (siehe Abschnitt 1.3.1) und der Sequenz des *BCL2*-Gens abgeglichen, um den Aufbau der klonspezifischen Bruchpunkte nachzuvollziehen und neu eingefügte Nukleotide (N-Nukleotide) zu identifizieren.

2.8 Klonalitätsanalyse

2.8.1 Klonalitätsanalyse IGH

Für die Klonalitätsanalyse zum Nachweis einer klonalen B-Zell-Population in den Proben sowie der klonalen Verwandtschaft gepaarter Proben untereinander, wurde zunächst der Bereich zwischen der FR2 bzw. FR3 und dem J-Segment der jeweiligen IGH-Gene amplifiziert, wofür zwei Primer-Mixe verwendet wurden, die alle möglichen Kombinationen der V(D)J-Rekombination abgedeckt haben (Tab. 5 und 6). Anschließend wurde eine Fragmentlängenanalyse der amplifizierten Produkte mittels Kapillargelelektrophorese durchgeführt. Vorlage war dabei erneut das BIOMED-2 Protokoll [43].

Alle Proben wurden im Doppelansatz mit 30 und 60 ng eingesetzter DNA (Messung mittels Nanodrop™ 2000) untersucht. Außerdem ist für jeden PCR-Mix sowohl eine Negativkontrolle (ddH₂O), als auch eine Positivkontrolle (Zelllinie Granta 519, Mantelzell-Lymphom) angesetzt worden (Tab. 6). Für die Kapillargelelektrophorese auf dem GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter) sind 2000 µl SLS (Beckman Coulter) mit 30 µl Size Standard (Beckman Coulter) versetzt worden. Davon sind 30 µl mit je 1 µl amplifizierter Probe in ein Well einer 96-Well Probenplatte (Corning Incorporated) gegeben und das Ganze mit einem Tropfen Mineralöl (Beckman Coulter) überschichtet worden. Eine 96-Well-Pufferplatte (Beckman Coulter) wurde wie unter Abschnitt 2.7.2 beschrieben vorbereitet. Die Kapillargelelektro-

phorese ist nach Herstellerangaben durchgeführt und mit der entsprechenden Software (Version 11.0) ausgewertet worden.

Tabelle 5. Primer-Mixe für die FR2- und FR3-Klonalitätsanalyse.

Primer-Mix B (FR2)		
<i>Primer</i>	<i>Volumen [µl]</i>	<i>Endkonzentration</i>
VH1-FR2	50	10 pmol/µl
VH2-FR2	50	10 pmol/µl
VH3-FR2	50	10 pmol/µl
VH4-FR2	50	10 pmol/µl
VH5-FR2	50	10 pmol/µl
VH6-FR2	50	10 pmol/µl
VH7-FR2	50	10 pmol/µl
auffüllen mit 150 µl ddH ₂ O		
Primer-Mix C (FR3)		
<i>Primer</i>	<i>Volumen [µl]</i>	<i>Endkonzentration</i>
VH1-FR3	50	10 pmol/µl
VH2-FR3	50	10 pmol/µl
VH3-FR3	50	10 pmol/µl
VH4-FR3	50	10 pmol/µl
VH5-FR3	50	10 pmol/µl
VH6-FR3	50	10 pmol/µl
VH7-FR3	50	10 pmol/µl
auffüllen mit 150 µl ddH ₂ O		

Tabelle 6. PCR für die IGH-Klonalitätsanalyse.

PCR-Ansatz (25 µl)		
<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [µl]</i>	<i>Endkonzentration</i>
10x Puffer I (mit 15 mM MgCl ₂)	2,5	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP (10 mM)	0,5	0,2 mM
Primer-Mix B oder C (10 µM/Primer)	0,5	0,2 µM je Primer
JH-Konsensus Primer (10 µM)	0,5	0,2 µM je Primer
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2	0,04 U/µl
DNA	x	30 oder 60 ng
auffüllen mit ddH ₂ O auf 25 µl		
Thermocycler-Programm		
95 °C		7 min
40 Zyklen:		
95 °C		30 s
60 °C		45 s
72 °C		45 s
72 °C		4 min
16 °C		unendlich

2.8.2 Klonalitätsanalyse der IG-Kappa -Leichtkette

Um die Sensitivität zu erhöhen, kann zusätzlich eine Klonalitätsanalyse der IG-Leichtketten-Gene durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde das IG-Kappa-Gen (IGK) nach Vorlage des BIOMED-2 Protokolls mit zwei verschiedenen Primer-Mixen amplifiziert (Tab. 7). Als Vorwärtsprimer dienen die familienspezifischen Primer der V-Region, sowie der INTR (IntronRSS) Primer (Tab. 8). Als Rückwärtsprimer fanden zwei Jk und der Kde (engl. *kappa deleting element*) Primer Verwendung [43]. Der restliche Versuchs- und Arbeitsablauf wurde wie unter Abschnitt 2.8.1 beschrieben durchgeführt.

2.8.3 Klonalitätsanalyse mit klonspezifischen Primern

Darüber hinaus sind für die ISFN Proben von Fall 6 und 10 mit Primer3web (Version 4.1.0) klonspezifische Primer (Abschnitt 2.2.3) entworfen worden. Als Basis diente die jeweilige IGH-Sequenz (siehe Abschnitt 2.11) des gepaarten DLBCL, wobei die Primerpaare so konzipiert wurden, dass der Vorwärtsprimer in der FR und der Rückwärtsprimer in der CDR3 gebunden hat. Letztere Primer wurden außerdem mit D4-Fluoreszenzfarbstoff (Sigma Aldrich) markiert, um eine Kapillargelelektrophorese, wie unter Abschnitt 2.8.1 beschrieben, zu ermöglichen.

Tabelle 7. PCR für die IGK-Klonalitätsanalyse.

PCR-Ansatz (25 µl)		
Reagenz	Volumen [µl]	Endkonzentration
10x Puffer I (mit 15 mM MgCl ₂)	2,5	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP (10 mM)	0,5	0,2 mM
Primer-Mix A oder B	0,5	0,2 µM/0,4 µM je Primer
Jk 1-4 Primer (mit Mix A)	0,5	1,8 µM
Jk 5 Primer (mit Mix A)	0,5	1,8 µM
Kde Primer (mit Mix B)	0,5	1,8 µM
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2	0,04 U/µl
DNA	x	30 oder 60 ng
auffüllen mit ddH ₂ O auf 25 µl		
Thermocycler-Programm		
95 °C		7 min
40 Zyklen:		
95 °C		30 s
60 °C		45 s
72 °C		45 s
72 °C		4 min
16 °C		unendlich

Tabelle 8. Primer-Mixe für die IGK-Klonalitätsanalyse.

Primer-Mix IGK _A		
Primer	Volumen [μ l]	Endkonzentration
VK1/6	50	10 pmol/ μ l
VK2	100	20 pmol/ μ l
VK3	50	10 pmol/ μ l
VK4	100	20 pmol/ μ l
VK5	100	20 pmol/ μ l
VK7	50	10 pmol/ μ l
auffüllen mit 50 μ l ddH ₂ O		
Primer-Mix IGK _B		
Primer	Volumen [μ l]	Endkonzentration
VK1/6	50	10 pmol/ μ l
VK2	100	20 pmol/ μ l
VK3	50	10 pmol/ μ l
VK4	100	20 pmol/ μ l
VK5	100	20 pmol/ μ l
VK7	50	10 pmol/ μ l
INTR	50	10 pmol/ μ l

Für die vorher durchgeführte PCR (Tab. 6) mit angepassten Annealingbedingungen (54 °C für Fall 6 und 53 °C für Fall 10) sind 100 ng (Messung mit Nanodrop™ 2000) der jeweiligen DNA verwendet worden. Um die klonspezifische Bindung der Primer zu verifizieren, wurden klonal unverwandte DLBCL Proben als Negativkontrollen genutzt. Analog zur IGH- und IGK-Klonalitätsanalyse nach dem BIOMED-2 Protokoll ist eine übereinstimmende Fragmentlänge in gepaarten Proben als Beweis für die klonale Verwandtschaft gewertet worden.

2.9 Gezieltes Next-Generation Sequencing

Um die Proben auf das Vorliegen somatischer Mutationen zu untersuchen, ist eine Sequenzierung auf dem Ion Torrent PGM™ (Life Technologies) durchgeführt worden. Im Vorfeld wurden dafür mithilfe des Ion AmpliSeq™ Designers (Life Technologies) drei Ion AmpliSeq™ Custom Panel (Life Technologies) mit häufig in DLBCL und FL mutierten Genen erstellt (Tab. 9), welche für die Analyse der Proben verwendet wurden. Dabei ist auch die Analyse der ISFN Läsionen zunächst an makrodisseziertem Gewebe durchgeführt worden. Im Falle einer Mikrodissektion (Abschnitt 2.4.1.2) wurden ISFN Proben ein weiteres Mal der Panel-Sequenzierung zugeführt, sowohl um die Sensitivität der

Methode zu erhöhen, als auch um vorher identifizierte Varianten zu validieren. Bei den aggressiven B-NHL kam außerdem das Ampliseq™ TP53 Panel (Thermo Fisher Scientific) zur Verwendung, welches den gesamten kodierenden Bereich des *TP53*-Gens abgedeckt hat. Bei einem Mutationsnachweis sind gepaarte FL und ISFN Proben anschließend mittels gezielter Einzelamplikon-Sequenzierung (Abschnitt 2.10) auf das Vorhandensein einer *TP53* Alteration untersucht worden.

2.9.1 Libraryerstellung

Im ersten Abschnitt der Panel-Analyse wurden die Amplikon-Bibliotheken mithilfe des Ion AmpliSeq™ Library Kits 2.0 (Life Technologies) erstellt, wobei zunächst die Amplifikation der Zielsequenzen stattfand (Tab. 10).

Tabelle 9. Ion AmpliSeq™ Custom Panel mit häufig mutierten Genen von FL und DLBCL. Aufgeführt sind die Gene, bzw. die Regionen des Genoms, die mit den Custom Panel abgedeckt wurden, inklusive der Anzahl dafür verwendeter Amplikons. Die tatsächliche Abdeckung der Regionen betrug dabei insgesamt 95.33 %. Abkürzungen: CDS, kodierende Sequenz.

Gen	Position (hg19)	Abdeckung	Amplikons
<i>BCL2</i>	chr18: 60,795,858 - 60,985,965	CDS	9
<i>BCL6</i>	chr3: 187,440,246 - 187,451,481	CDS	27
<i>BTG1</i>	chr12: 92,537,856 - 92,539,311	CDS	7
<i>BTG2</i>	chr1: 203,274,735 - 203,276,566	CDS	6
<i>CARD11</i>	chr7: 2,946,272 - 2,998,140	CDS	54
<i>CD79B</i>	chr17: 62,006,586 - 62,009,621	CDS	11
<i>CREBBP</i>	chr16: 3,777,719 - 3,929,917	CDS	96
<i>EP300</i>	chr22: 41,489,009 - 41,574,960	CDS	63
<i>EZH2</i>	chr7: 148,508,712 - 148,508,817	Exon 16	1
<i>FOXO1</i>	chr13: 41,133,660 - 41,240,349	CDS	10
<i>GNA13</i>	chr17: 63,010,375 - 63,052,711	CDS	8
<i>HIST1H1B</i>	chr6: 27,834,627 - 27,835,307	CDS	6
<i>HIST1H1C</i>	chr6: 26,056,015 - 26,056,656	CDS	6
<i>HIST1H1D</i>	chr6: 26,234,496 - 26,235,161	CDS	6
<i>HIST1H1E</i>	chr6: 26,156,619 - 26,157,278	CDS	5
<i>IGLL5</i>	chr22: 23,230,234 - 23,237,874	CDS	8
<i>KMT2D</i>	chr12: 49,415,563 - 49,449,107	CDS	120
<i>IRF4</i>	chr6: 393,153 - 407,598	CDS	18
<i>MEF2B</i>	chr19: 19,256,503 - 19,261,544	CDS	11
<i>MYD88</i>	chr3: 38,181,350 - 38,182,777	Exons 2-5	11
<i>PIM1</i>	chr6: 37,138,079 - 37,141,867	CDS	16
<i>PRDM1</i>	chr6: 106,534,429 - 106,555,361	CDS	29
<i>TBL1XR1</i>	chr3: 176,743,286 - 176,782,765	CDS	32
<i>TNFAIP3</i>	chr6: 138,192,365 - 138,202,456	CDS	29
<i>TNFRSF14</i>	chr1: 2,488,104 - 2,494,712	CDS	11

Tabelle 10. PCR zur Erstellung der Amplikon-Bibliotheken.

PCR-Ansatz (20 µl)	
Reagenz	Volumen [µl]
5x Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	4
2x Ion AmpliSeq™ Primer Pool	10
DNA 10 ng	≤ 6
auffüllen mit ddH ₂ O auf 20 µl	
Thermocycler-Programm	
99 °C	2 min
24 Zyklen:	
99 °C	15 s
60 °C	4 min
10 °C	über Nacht

Anschließend ist eine Behandlung der PCR-Produkte mit dem FuPa-Reagenz (Life Technologies) durchgeführt worden (Tab. 11). Dabei kommt es zu einem partiellen Verdau der Primer und zur Phosphorylierung der Amplikons, was das spätere Anbringen von Adapter/Barcode-Sequenzen ermöglicht, welche benötigt werden, um die nachfolgende klonale Amplifikation und Sequenzierung durchführen und die Sequenzen den entsprechenden Patienten zuordnen zu können.

Tabelle 11. FuPa-Verdau der Amplikons.

Primerverdau	
Reagenz	Volumen [µl]
Amplikons	22
FuPa Reagenz	2
Thermocycler-Programm	
50 °C	10 min
55 °C	10 min
60 °C	20 min
10 °C	bis zu 1 h

Die Kennzeichnung der einzelnen Proben mit diesen Adapter/Barcode-Sequenzen fand mit dem Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit (Life Technologies) statt, wofür zunächst die jeweiligen Barcode-Mixe hergestellt wurden, indem je 2 µl Ion P1 Adapter (Life Technologies) mit einem Ion Xpress™ Barcode (Life Technologies) und 4 µl ddH₂O gemischt worden sind. Die Ligation der Barcodes ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12. Adapter-Ligation.

Ligation	
<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [μl]</i>
Switch Solution	4
Barcode-Mix	2
DNA-Ligase	2
Verdaute Amplikons	22
Thermocycler-Programm	
22 °C	30 min
72 °C	10 min
10 °C	bis zu 1 h

Auch für die Sequenzierung auf dem Ion Torrent PGM™ (Life Technologies) war eine Aufreinigung der PCR-Produkte nötig. Dafür wurden 30 μl der Amplikon-Bibliotheken mit 54 μl HighPrep™ Beads (MagBio Genomics) in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss 2 Minuten in eine 96-Well Magnetplatte (Thermo Scientific) gestellt. Der Überstand wurde entnommen und 200 μl 80 % Ethanol (Merck) hinzugefügt. Das Ethanol wurde nach 30 Sekunden entnommen und der Waschschritt ein weiteres Mal wiederholt. Nach 5-minütigem Trocknen der Beads wurden sie in 35 μl Low TE-Puffer (Life Technologies) resuspendiert, 2 Minuten inkubiert und erneut in die 96-Well Magnetplatte gestellt. 30 μl des Überstandes wurden entnommen und der gesamte Waschvorgang wiederholt. Im Anschluss sind 30 μl der aufgereinigten Bibliotheken in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt worden. Zur nachfolgenden Quantifizierung wurde von jeder Bibliothek unter Zugabe von ddH₂O eine 1:500 Verdünnung hergestellt.

2.9.2 Libraryquantifizierung

Um die erfolgreiche Amplifikation der Zielsequenzen zu überprüfen, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) am LightCycler® 480 Instrument (Roche) durchgeführt, wobei das Ion Library TagMan® Quantitation Kit (Life Technologies) zum Einsatz gekommen ist. Das System basiert auf dem Anbringen von, mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehenen, Oligonukleotid-Sonden und der anschließenden Detektion des Fluoreszenzsignals, welches proportional zur amplifizierten DNA-Menge zunimmt. Dabei wurde die quantitative Einschätzung durch einen E. coli Standard ermöglicht. Ausgehend von dessen Stammlösung

(68 pM), sind jeweils 3 verschiedene Konzentrationen (6,8 pM, 0,68 pM und 0,068 pM) hergestellt und im Doppelansatz gemessen worden. Negativkontrolle (ddH₂O) und verdünnte Amplikon-Bibliotheken sind ebenfalls im Doppelansatz quantifiziert worden (Tab. 13). Jeder Ansatz wurde in ein Well einer 96-Well Probenplatte (Biozym) gegeben.

Tabelle 13. qPCR zur Quantifizierung der Amplikon-Bibliotheken.

qPCR am Lightcycler®	
Reagenz	Volumen [µl]
2x TaqMan™ MasterMix	5
2x Ion TaqMan™ Assay	0,5
Library (1:500) oder E.Coli Standard	4,5
Lightcycler®-Programm	
40 Zyklen:	
50 °C	2 min
95 °C	3 s
60 °C	30 s

Die Auswertung erfolgte mit der LightCycler® 480 Software (Version 1.5, Roche) nach Herstellerangaben. Dabei macht man sich die Ct-Werte (engl. *cycle threshold*) der Proben zunutze. Diese Werte kennzeichnen denjenigen Amplifikationszyklus, ab dem das jeweilige Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund tritt. Durch die Ct-Werte der Standards lässt sich eine Standardkurve erstellen, auf Basis derer man die Konzentrationen der Libraries bestimmen kann.

2.9.3 Ion Chef™ und Sequenzierung auf dem Ion Torrent PGM™

Das Vereinigen der verschiedenen Bibliotheken sowie die Vorbereitung des Ion Chef™ Instruments mit dem Ion PGM™ Hi-Q™ View Chef Kit (Life Technologies) sind nach Herstellerangaben durchgeführt worden. Das Ion Chef™ Instrument ermöglicht eine vollautomatische Template-Erstellung. Der erste Schritt beinhaltet dabei eine Emulsions-PCR, bei der die DNA-Fragmente mittels angebrachter Adapter-Sequenzen in einem Verhältnis von 1:1 an Ion Sphere™ Particles (ISP) binden und an diesen amplifiziert werden [106]. Zusätzlich werden die freien Enden der vervielfältigten Fragmente mit Biotin-Molekülen versehen, welche der anschließenden Anreicherung mittels magnetischer

Beads dienen, die über gekoppeltes Streptavidin an Biotin binden. Durch einen Magneten werden auf diese Weise nur diejenigen ISP angereichert, an denen tatsächlich eine Amplifikation stattgefunden hat. Im letzten Schritt ist ein Halbleiter-Chip (Ion 318™ Chip Kit v2 BC, Life Technologies) durch das Ion Chef™ Instrument mit den angereicherten ISP beladen worden. Dabei gelangt je ein ISP in eine Mikroreaktionskammer, in der die eigentliche Sequenzierung stattfindet. Für die Sequenzierung musste der Halbleiter-Chip zuerst auf den Ion Torrent PGM™ (Life Technologies) überführt werden, der zu diesem Zweck mithilfe des Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (Life Technologies) nach Herstellerangaben vorbereitet wurde. Die Ion Torrent™ Sequenzierung beruht auf einer Detektion von pH-Wert Änderungen, welche durch das Freiwerden von Protonen bei der Bindung eines neuen Nukleotids verursacht werden. Jede dieser Änderungen wird in ein elektrisches Signal umgewandelt, so dass es durch die zyklische Zugabe der einzelnen Nukleotide möglich ist, die Nukleotidabfolge zu bestimmen [107].

2.9.4 Auswertung der Ion AmpliSeq™ Custom Panel

Analysiert wurden die Daten mithilfe der Torrent Suite™ Software (Version 5.6.0) und nachfolgend anhand des Torrent Mapping Alignment Program Algorithmus mit dem humanen Genom (hg19) verglichen. Die Suche nach Varianten wurde durch die Ion Reporter™ Software (Version 5.6) jeweils mit dem auf die in den Ion AmpliSeq™ Custom Panel enthaltenen Gene abgestimmten Custom Workflow durchgeführt. Die gefundenen Varianten wurden im Anschluss mit dem Integrative Genomics Viewer (IGV, Version 2.3.94), einem Programm zur Darstellung von Sequenzierungsdaten, analysiert. Dabei musste sichergestellt werden, dass vermeintlich somatische Mutationen keine Artefakte waren. Typische Artefakte von FFPE-Material sind beispielsweise G>A und C>T Basenaustausche [104,108]. Zusätzlich stellen Homopolymer-Regionen, d.h. Abschnitte, in denen wiederholt das gleiche Nukleotid eingebaut wird, für das Halbleitersequenzierungsverfahren ein Problem dar und können zu Insertions- bzw. Deletionsartefakten führen [106]. Auch Varianten, die ausschließlich in einer Sequenzierungsrichtung aufgetreten sind, wurden als Artefakte gewertet. Alle Sequenzabschnitte, die in mindestens einer Probe eines Falles eine

Mutation aufwiesen, sind mit dem IGV auch in den gepaarten Proben explizit begutachtet worden, selbst wenn bei diesen durch die Ion Reporter™ Software keine Variante angezeigt wurde. Für den Fall, dass eine Mutation in einer gepaarten Probe nicht nachgewiesen werden konnte, die Abdeckung der jeweiligen Region jedoch <100 gelesener DNA-Sequenzen (Reads) betrug, wurde die Region mit bidirektionaler Einzelamplicon-Sequenzierung (Abschnitt 2.10) erneut sequenziert, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Durch die Analyse von (mindestens) zwei Gewebeproben je Patient, welche sich in ihrem Gehalt an (prä)neoplastischen Zellen i.d.R. deutlich unterschieden haben, konnten somatische Mutationen von Keimbahnmutationen/Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) abgegrenzt werden, da die Allelfrequenz der jeweiligen Variante (VAF, engl. *variant allele frequency*) bei letzteren unabhängig vom Tumorzellanteil war und je nachdem, ob es sich um hetero- oder homozygote Polymorphismen gehandelt hat, in beiden Proben im Bereich von 50 bzw. 100 % lag. Darüber hinaus wurde jede Variante mittels Online-Datenbanken, wie COSMIC, Ensembl und Exome Variant Server auf eine vorherige Publikation überprüft. Synonyme Varianten und Varianten der 5' untranslatierten Region (5'UTR) wurden lediglich beim *BCL2*-Gen berücksichtigt, um die klonale Evolution der einzelnen Fälle genauer nachvollziehen zu können. Für diejenigen Proben, bei denen wegen eingeschränkter DNA-Qualität eine Unterscheidung von somatischen Mutationen und Sequenzierungsartefakten erschwert war, lag der Fokus auf dem Identifizieren von Alterationen, die bereits aus gepaarten Fällen mit besserer DNA-Qualität bekannt waren.

2.10 Validierung der NGS Ergebnisse

Der Großteil der detektierten Varianten wurde im Rahmen einer zweiten Sequenzierung auf dem Ion Torrent PGM™ (Life Technologies) validiert. Diese Validierung erfolgte dabei entweder durch eine bidirektionale Einzelamplicon-Sequenzierung nach der Ion Amplicon Library Preparation Fusion Methode oder bei den mikrodissezierten ISFN Läsionen, wie unter Abschnitt 2.9 beschrieben, mit einer erneuten Panel-Sequenzierung. Im Falle einer Analyse mittels Einzelamplicons wurden zunächst die passenden Primer mit der Primer3web Software (Version 4.1.0) erstellt, welche dann nach Herstelleranga-

ben am 5'-Ende um die Barcode- und Adaptersequenzen (trP1 und A) verlängert wurden (Abschnitt 2.2.3). Für die Amplifikation der Zielsequenzen wurde unter Verwendung des Ion AmpliSeq™ Library Kits 2.0 (Life Technologies) jeweils ein Mix für die Vorwärts- und Rückwärtssequenzierung erstellt (Tab. 14).

Tabelle 14. Einzelamplikon PCR nach der Ion Amplicon Library Preparation Fusion Methode.

PCR-Ansatz (25 µl)	
Reagenz	Volumen [µl]
Platinum™ PCR Supermix High Fidelity	22,5
Vorwärts oder Rückwärtsprimer-Mix	0,5
DNA 12,5 ng/µl	2
Thermocycler-Programm	
94 °C	3 min
40 Zyklen:	
94 °C	30 s
58 °C	30 s
68 °C	1 min
4 °C	unendlich

Nach einer Aufreinigung mittels HighPrep™ Beads (MagBio Genomics) (Abschnitt 2.9.1) erfolgte die Quantifizierung der amplifizierten Produkte mit dem Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies) nach Herstellerangaben mit dem Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies). Durch Kenntnis der jeweils zu erwartenden Produktlänge konnte so die Molarität der amplifizierten Proben bestimmt werden. Um eine gleichmäßige Sequenzierung zu gewährleisten, ist anschließend jedes Einzelamplikon auf 5 pM verdünnt worden. Der restliche Arbeitsablauf entsprach dem der Ion AmpliSeq™ Custom Panel-Sequenzierung (Abschnitt 2.9.3).

2.11 NGS mit dem LymphoTrack® IGH Assay

2.11.1 Durchführung des LymphoTrack® IGH Assays

Für die Sequenzierung des IGH-Gens wurde das LymphoTrack® DX IGH (FR1/FR2/FR3) Assay - PGM™ Kit (Invivoscribe Technologies) eingesetzt. Der grundsätzliche Arbeitsablauf ähnelte dem der Einzelamplikon-Sequenzierung, wobei im ersten Schritt die Amplifikation der Zielsequenzen stattgefunden hat

(Tab. 15). Die nachfolgende Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mit HighPrep™ Beads (MagBio Genomics) durchgeführt (Abschnitt 2.9.1). Die aufgereinigten Produkte sind mit dem LightCycler® 480 Instrument (Roche) nach Herstellerangaben (Abschnitt 2.9.2) quantifiziert und anschließend auf jeweils 20 pM verdünnt worden. Der restliche Ablauf entsprach dem der Ion AmpliSeq™ Custom Panel-Sequenzierung (Abschnitt 2.9.3).

Tabelle 15. PCR-Ansatz für den LymphoTrack® IGH Assay.

PCR-Ansatz (52,2 µl)	
Reagenz	Volumen [µl]
Master Mix FR1, FR2 oder FR3	45
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2
DNA 10 ng/µl	5
Thermocycler-Programm	
95 °C	7 min
29 Zyklen:	
95 °C	45 s
60 °C	45 s
72 °C	90 s
72 °C	10 min
15 °C	unendlich

2.11.2 Auswertung des LymphoTrack® IGH Assays

Die Auswertung des LymphoTrack® IGH Assays erfolgte nach Herstellerangaben mit der LymphoTrack® Data Analysis und Visualization Software (Version 2.3.1, Invivoscribe Technologies), wodurch sich die in der Gewebeprobe enthaltenen IGH-Sequenzen darstellen lassen. Beim Nachweis eines monoklonalen Rearrangements wurde der dominante Klon anschließend mit den Online-Programmen IMGT/V-QUEST und IGBlast analysiert. Diese Programme ermöglichen u.a. eine Zuordnung der Sequenzabschnitte zu den FR und CDR und geben die dem Rearrangement am wahrscheinlichsten zugrunde liegenden V/D/J-Segmente an. Durch den Vergleich der jeweiligen CDR-Sequenzen konnte so eine zweifelsfreie Aussage über die klonale Verwandtschaft gepaarter Proben getroffen werden. Darüber hinaus konnte das IG der Proben auf die Akquisition von N-Glykosylierungsstellen untersucht werden, welche über die Konsensussequenz Asparagin-X-Serin/Threonin identifiziert wurden, wobei „X“ jede Aminosäure außer Prolin darstellen kann [109].

Eine fortlaufende AID-Aktivität bedingt, wie in Abschnitt 1.4.2 beschrieben, dass von einem gegebenen Klon bzw. klonalen Rearrangement oftmals eine Vielzahl von Subklonen mit leicht abweichender Basenabfolge existiert. Die Sequenzen solcher Subklone werden vom Lympho-Track[®] Assay ebenfalls aufgeführt, was dafür verwendet wurde, eine Aussage über das Ausmaß der intraklonalen Heterogenität der einzelnen Proben zu machen. Zu diesem Zweck sind die zehn prävalentesten Subklone durch den Vergleich ihrer Sequenz mit der des klonalen Rearrangements identifiziert und ihre Reads durch die Gesamtzahl aller klonspezifischen Reads geteilt worden. So ließ sich der prozentuale Anteil eines jeden Subklons bestimmen und ein Einblick in das Häufigkeitsverhältnis der verschiedenen Subklone zueinander gewinnen. Zunächst mussten dafür jedoch Sequenzabweichungen manuell korrigiert werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit auf Sequenzierungsartefakte zurückzuführen waren, also Insertionen/Deletionen (InDels) in Homopolymer-Regionen, InDels am Anfang der Sequenz oder Abweichungen des ersten Nukleotids. Kam es durch diese Korrektur zur Übereinstimmung vormals unterschiedlicher Sequenzen, wurden diese als ein einziger Subklon gewertet und die Anzahl der Reads addiert.

2.11.3 Erstellung phylogenetischer Stammbäume

Für fünf Fälle (Fall 1, 2, 4, 7 und 9) sind diese zehn prävalentesten Subklone jeder Läsion verwendet worden, um die klonale Evolution auf Ebene des IG mittels phylogenetischer Stammbäume zu beschreiben. Dazu wurde zunächst ein Alignment aller Sequenzen gepaarter Läsionen miteinander und zusätzlich mit der zugehörigen VDJ-Keimbahnsequenz durchgeführt, wozu das Programm Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA, Version X) und der MUSCLE Algorithmus verwendet worden sind [110,111]. Die Stammbäume wurden anschließend auf der Basis dieser Alignments mit der Maximum-Likelihood Methode und dem am besten passenden Substitutionsmodell konstruiert, wobei letzteres zuvor mit der MEGA Software bestimmt worden ist [112]. Dabei ergab sich für alle fünf Stammbäume das Kimura 2-parameter (K2P) Modell [113]. Bei Fall 4 ist zusätzlich von einigen invariablen Basenpositionen ausgegangen worden (K2P+I) [114]. Ansonsten sind sowohl für das initiale Alignment als auch für die Konstruktion die voreingestellten Parameter beibehalten worden.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten des Patientenkollektivs

Durch das Screening des lymphatischen Gewebes von insgesamt 51 Patienten konnten acht Patienten identifiziert werden, die zusätzlich zu einem DLBCL auch eine ISFN aufwiesen. Zusammen mit den extern bzw. im Vorfeld identifizierten ISFN/DLBCL-Paaren (Abschnitt 2.1), konnten somit zehn Fälle in die Studie eingeschlossen werden (Tab. 16). Davon handelte es sich bei sechs der aggressiven B-NHL um *de novo* Lymphome und bei vier um transformierte FL. Für zwei der vier transformierten Fälle (Fall 7 und 8) war das synchrone FL bereits diagnostiziert worden. Die FL Komponenten von Fall 9 und 10 wurden hingegen erst im Rahmen der immunhistochemischen Reevaluation assoziierter LK identifiziert, welche zuvor als reaktiv verändert gewertet worden waren. Bei keinem der sechs *de novo* DLBCL fand sich ein Anhalt für ein syn- oder metachron aufgetretenes FL. Dies beinhaltete, falls die entsprechenden Informationen vorlagen, auch den Nachbeobachtungszeitraum, welcher zwischen 7 und 54 Monaten betrug. Hinsichtlich anderer lymphatischer Neoplasien war lediglich Patient 3 vor der Diagnose des DLBCL an einer chronisch lymphatischen B-Zell Leukämie (B-CLL) erkrankt.

Alle FL und 7/10 ISFN fanden sich in LK in der Nähe des DLBCL. Letztere manifestierten sich in sechs Fällen primär nodal und bei den restlichen Patienten entweder im Gastrointestinaltrakt (Fall 6, 8 und 9) oder im paravertebralen Bindegewebe (Fall 4). In drei Fällen (4, 5 und 7) konnte die ISFN in LK identifiziert werden, welche bei chirurgischen Eingriffen bereits mehrere Jahre vor der Diagnose des DLBCL entnommen worden waren. Im Einzelnen wurden die LK bei Patient 5 während einer Operation zur Beseitigung einer intestinalen Obstruktion und bei den Patienten 4 und 7 im Rahmen der Behandlung und Ausbreitungsdiagnostik eines kolorektalen Adenokarzinoms bzw. malignen Melanoms entfernt. Insgesamt sind 24 Läsionen, davon 10 ISFN, 3 FL und 11 aggressive B-NHL (Fall 3 mit zwei verschiedenen DLBCL Proben) in die Studie aufgenommen worden. Von der FL Probe von Fall 8 stand kein Gewebe für weitere Analysen zur Verfügung.

Ergebnisse

Tabelle 16. Klinische Daten der Patienten mit ISFN und aggressivem B-NHL (modifiziert nach [95]). Angaben zum Tumorstadium beziehen sich auf die Ann-Arbor Klassifikation. Die Zusatzinformation „synchron“ signalisiert ein zeitgleiches Auftreten der ISFN mit dem aggressiven B-NHL. Abkürzungen: B-CLL, Chronisch lymphatische B-Zell Leukämie; CR, Komplettremission; DOD, An der Erkrankung verstorben; Geschl., Geschlecht; KRK, Kolorektales Karzinom; M, Männlich; Mo, Monate; N/A, Information nicht verfügbar; P., Patient; W, Weiblich. *Alter zum Zeitpunkt der Diagnose des aggressiven B-NHL. *Vom FL war kein Gewebe für weitere Analysen verfügbar.

P.	Alter*/ Geschl.	Diagnose	Lokalisation	Stadium	Zusatzinformationen	Nachbeobachtung
<i>De novo aggressive B-Zell-Lymphome</i>						
1	59/M	ISFN HGBL-TH	Mesenterialer LK Mesenterialer LK	IVA/IE	Synchron	CR - 7 Mo
2	61/W	ISFN DLBCL	Mesenterialer LK Mesenterialer LK	N/A	Synchron	N/A
3	64/M	ISFN	Axillärer LK	IIIA	Synchron, B-CLL	DOD
		DLBCL	Axillärer LK		Primäres DLBCL	
		DLBCL	Zervikaler LK		7 Monate nach primärem DLBCL	
4	76/W	ISFN	Mesenterialer LK	IIA	LK 159 Monate vor DLBCL Diagnose entfernt (KRK)	CR - 54 Mo
		DLBCL	Paravertebral			
5	67/M	ISFN	Mesenterialer LK	IIIA	LK 42 Monate vor DLBCL Diagnose entfernt (Ileus)	CR - 38 Mo
		DLBCL	Paraaortaler LK			
6	74/W	ISFN	Mesenterialer LK	N/A	Synchron	N/A
		DLBCL	Dünndarm			
<i>Transformierte folliculäre Lymphome</i>						
7	54/W	ISFN	Axillärer LK	IIIS	Sentinel LK für Melanom 116 Monate vor DLBCL Diagnose	CR - 54 Mo
		FL	Zervikaler LK		Synchron, Grad 1/2	
		DLBCL	Zervikaler LK			
8 ⁺	74/W	ISFN	Mesenterialer LK	IIA	Synchron	CR - 90 Mo
		FL	Mesenterialer LK		Synchron, Grad 1/2	
		HGBL-DH	Dünndarm			
9	64/M	ISFN	Mesenterialer LK	IVB	Synchron	CR - 133 Mo
		FL	Mesenterialer LK		Synchron, Grad 1/2	
		HGBL-DH	Dickdarm			
10	54/M	ISFN	Mesenterialer LK	IIA	Synchron	CR - 158 Mo
		FL	Mesenterialer LK		Synchron, Grad 1/2	
		DLBCL	Mesenterialer LK			

3.2 Histologie und Immunhistochemie

Alle ISFN Läsionen wiesen typische histologische und immunhistochemische Merkmale auf und fanden sich in vermeintlich reaktiven aber ansonsten strukturell intakten LK (Abb. 3). Involvierte GC zeigten eine intensive Expression von BCL2, eine ausgeprägte CD10-Positivität und eine stark eingeschränkte Proliferationsaktivität, welche mithilfe der MIB-1-Färbung dargestellt wurde. In den gepaarten FL Läsionen konnten jeweils durchschnittlich <15 Zentroblasten pro Gesichtsfeld (400x Vergrößerung) beobachtet werden, so dass eine Einordnung als FL Grad 1/2 erfolgte. Dabei zeigte sich stets eine erhaltene, wenn auch weniger intensive, BCL2-Positivität. Auch die DLBCL Proben waren ohne Ausnahme BCL2 positiv. Darüber hinaus fand sich bei allen aggressiven B-NHL eine Expression von CD10 und BCL6, so dass sie nach dem Hans-Algorithmus dem GCB-Subtyp zugeordnet werden konnten (Tab. 17).

Tabelle 17. Immunhistochemische Färbungen der FL und aggressiven B-NHL Proben (modifiziert nach [95]). Alle Angaben beziehen sich auf die Tumorzellen. Mit einer Expression von CD10 und BCL6 ergab sich für jedes aggressive B-NHL ein GCB-Subtyp. **Abkürzungen:** N/A, nicht beurteilbar wegen schlechter Fixierung; P., Patient. *Nur Proben mit einer intensiven Färbung von ≥ 20 % der Lymphomzellen wurden als positiv gewertet. #Kompletter Expressionsverlust. ^fFokal einige neoplastische Follikel mit einer Färbung von ca. 10 % der Zellen. ⁱIntensiv positiv. ^hHeterogen positiv. ^sSchwach positiv.

P.	Diagnose	CD10	BCL6	MUM1	BCL2	MIB-1	CD20	p53*	MYC
<i>De novo aggressive B-Zell-Lymphome</i>									
1	HGBL-TH	+	+	-	+	70 %	+	+	40 % ^s
2	DLBCL	+	+	-	+	40 %	+	-#	-
3	DLBCL	+	+	-	+	70 %	+	+	-
	DLBCL	+	+	-	+	70 %	+	+	-
4	DLBCL	+	+	-	+	70 %	+	-	30 % ^h
5	DLBCL	+	+	-	+	40 %	+	-	5 % ⁱ
6	DLBCL	+	+	-	+	30 %	+	-	-
<i>Transformierte folliculäre Lymphome</i>									
7	FL	+	+	- ^f	+	10 %	+	-	- ^f
	DLBCL	+	+	+	+	90 %	+	-	30 % ⁱ
8	HGBL-DH	+	+	-	+	80 %	+	-	60 % ⁱ
9	FL	+	+	-	+	5 %	+	-	-
	HGBL-DH	+	+	-	+	70 %	+	-	40 % ^h
10	FL	+	+	-	+	N/A	+	-	-
	DLBCL	+	+	-	+	50 %	+	-	15 % ⁱ

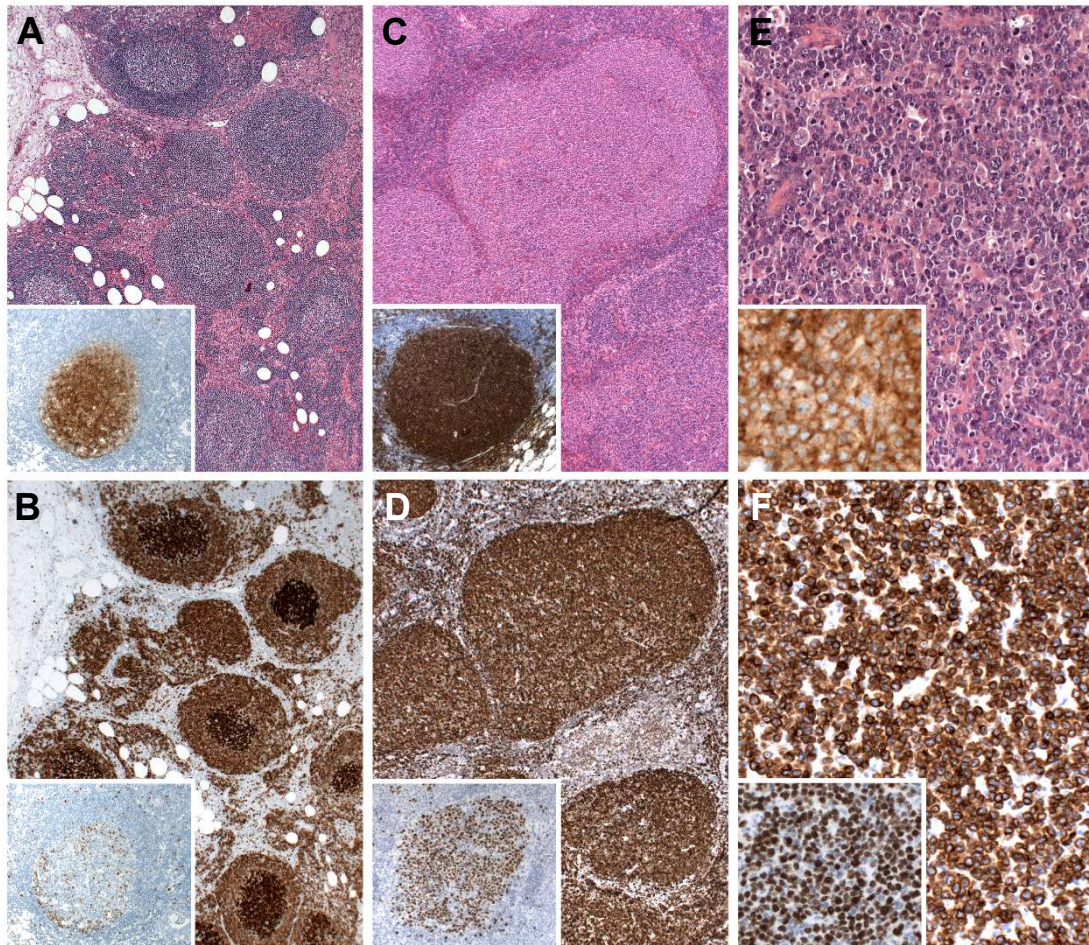


Abbildung 3. Exemplarische Darstellung von ISFN, FL und DLBCL.

A) Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) eines reaktiv erscheinenden Lymphknotens (LK) mit einigen unscheinbaren, allerdings von einer ISFN kolonisierten Keimzentren (GC). Einschub: Starke CD10-Expression eines betroffenen GC. (Ursprüngliche Vergrößerungen 25x und 100x). **B)** Die intensive BCL2-Färbung erlaubt eine Abgrenzung gegenüber nicht involvierten GC. Einschub: Mit der MIB-1-Färbung kann die geringe Proliferationsaktivität der ISFN demonstriert werden. (25x und 100x). **C)** HE-Färbung eines manifesten FL. Der LK ist durchsetzt von neoplastischen Follikeln unterschiedlicher Größe, die weder eine Polarisierung, noch eine erkennbare Mantelzone zeigen. Einschub: Auch das FL demonstriert eine intensive CD10-Expression. (50x und 100x). **D)** Die neoplastischen Follikel sind ebenfalls BCL2 positiv, im Vergleich zur ISFN jedoch weniger intensiv. Einschub: Die MIB-1-Färbung zeigt außerdem eine deutlich höhere Proliferation. (50x und 100x). **E)** Das DLBCL zeigt sich in der HE-Färbung als diffuses Infiltrat mittelgroßer bis großer Tumorzellen. Einschub: CD10-Expression der Tumorzellen. (200x und 400x). **F)** Auch im DLBCL ist die BCL2-Expression erhalten. Einschub: In der MIB-1-Färbung ist eine Proliferation von ca. 80 % der Lymphomzellen zu erkennen. (200x und 400x).

Eine Überexpression von p53, in dieser Arbeit als intensive Färbung von mindestens 20 % der neoplastischen Population definiert, konnte in den aggressiven B-NHL von Fall 1 und 3 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Tumorzellen des DLBCL von Fall 2 immunhistochemisch einen kompletten Expressionsverlust (Abb. 4). Alle drei Fälle erwiesen sich im Rahmen der NGS-Analyse als *TP53* mutiert (Abschnitt 3.5).

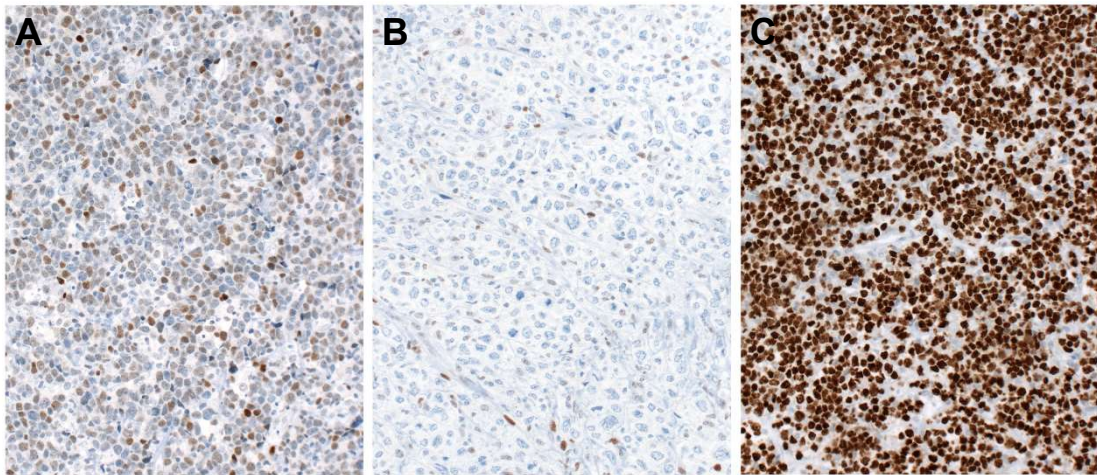


Abbildung 4. Unterschiedliche immunhistochemische Expressionsmuster von p53. **A)** Zu sehen ist das DLBCL von Fall 7, welches exemplarisch die heterogene p53-Expression der aggressiven B-NHL ohne *TP53* Mutation demonstriert. Ein derartiges Expressionsmuster, bei dem weniger als 20 % der Zellen eine starke Färbung aufweisen, ist im Rahmen dieser Arbeit als negativ gewertet worden. (Ursprüngliche Vergrößerung 200x). **B)** In der neoplastischen Population des DLBCL von Fall 2 fand sich ein kompletter Expressionsverlust von p53. Angefärbt sind lediglich Endothelzellen und Fibroblasten. In der nachfolgenden NGS-Analyse konnte eine Deletion im *TP53*-Gen identifiziert werden. (200x). **C)** Das aggressive B-NHL von Fall 1 imponierte hingegen durch eine intensive und homogene Expression von p53. Die NGS-Analyse zeigte eine *TP53* Punktmutation. (200x).

Die Expression von *MYC* unterlag größerer Variabilität und war nicht auf diejenigen Läsionen beschränkt, bei denen ein Rearrangement des *MYC*-Gens nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.3.1). Eine detaillierte Auflistung der immunhistochemischen Ergebnisse zeigt Tabelle 17.

3.3 Nachweis chromosomaler Aberrationen

3.3.1 Translokationsnachweis mittels FISH

Mithilfe der *BCL2* Dual Color Break Apart Sonde ließ sich bei den Läsionen von neun Fällen ein Bruch im *BCL2*-Gen demonstrieren, wodurch auf das Vorliegen der Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ geschlossen werden konnte (Tab. 18, Abb. 5A). Lediglich für ISFN und DLBCL von Fall 5 gelang auf diese Weise kein Translokationsnachweis. Auch die zusätzlich verwendete *IGH* Dual Color Break Apart Sonde erbrachte keinen Bruch im *IGH*-Gen. Erst mit der *IGH/BCL2* Dual Color Dual Fusion Sonde, welche im Falle eines traditionellen *BCL2*-Rearrangements zwei rot/grüne Fusionssignale und jeweils ein rotes und grünes Einzelsignal zeigt, ergab sich in beiden Proben ein atypisches 2R1G1F (zwei rote, ein grünes und ein Fusionssignal) Muster. Diese Konstellation wurde als Indiz für das Vorliegen einer kryptischen bzw. nicht-kanonischen *BCL2*-Translokation in beiden Proben gewertet (Abb. 5B).

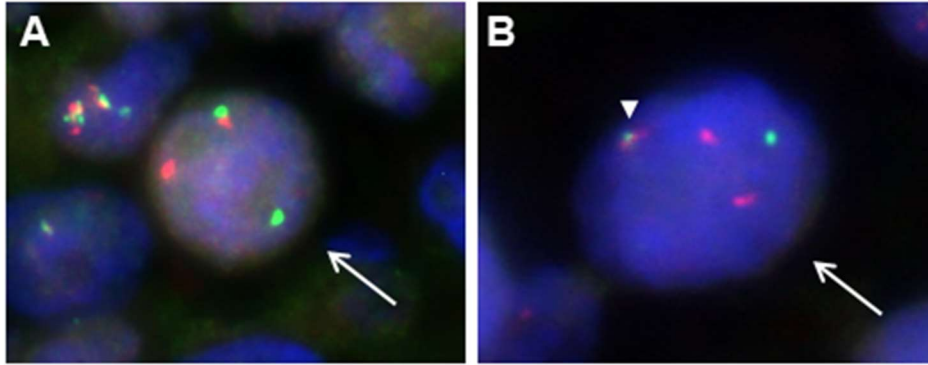


Abbildung 5. *BCL2*-Translokationsnachweis mittels FISH.

A) Zu sehen ist die Hybridisierung mit einer *BCL2* Dual Color Break Apart Sonde. Der weiße Pfeil zeigt auf einen Zellkern mit Translokation. Während auf dem nicht vom Rearrangement betroffenen Allel ein rot/grünes Fusionsignal zu sehen ist, zeigt das translozierte Allel zwei getrennte Fluoreszenzsignale. **B)** Dargestellt ist die Hybridisierung mit einer *IGH/BCL2* Dual Color Dual Fusion Sonde, welche ein atypisches Translokationsmuster mit zwei roten, einem grünen und einem Fusionsignal (Pfeilspitze) zeigt (2R1G1F). Ein nicht translozierter Zellkern würde ein 2R2G-Signal und eine klassische Translokation ein 1R1G2F-Muster ergeben.

Der Nachweis einer *MYC*-Translokation gelang für drei DLBCL (Fall 1, 8 und 9), wobei das DLBCL von Fall 1 zusätzlich einen Bruch in *BCL6* aufgewiesen hat, weswegen die entsprechenden Proben als HGBL mit DH bzw. TH klassifiziert werden konnten (Tab. 18). In den zugehörigen ISFN und FL Läsionen ließ sich keine dieser Translokationen verifizieren. Abgesehen von Rearrangements demonstrierten mehrere Proben weitere Anzeichen chromosomaler Anomalie in Form von zusätzlichen Fluoreszenzsignalen (Tab. 18). So zeigte das HGBL von Fall 1 mit der *MYC*-Sonde neben dem Bruch im *MYC*-Gen weitere rote Einzel-signale. In der *BCL6* FISH-Analyse des HGBL von Fall 8 konnte mit bis zu vier rot/grünen Fusionsignalen pro Zelle ein polysomer Chromosomensatz demonstriert werden. In Fall 7 fanden sich Hinweise für eine Zunahme der chromosomalen Instabilität vom FL zum DLBCL. Während das FL lediglich mit der *BCL6*-Sonde rote Zusatzsignale gezeigt hat, ließen sich beim DLBCL in allen drei FISH-Analysen zusätzliche Einzel- und/oder Fusions-signale nachweisen (Abb. 6).

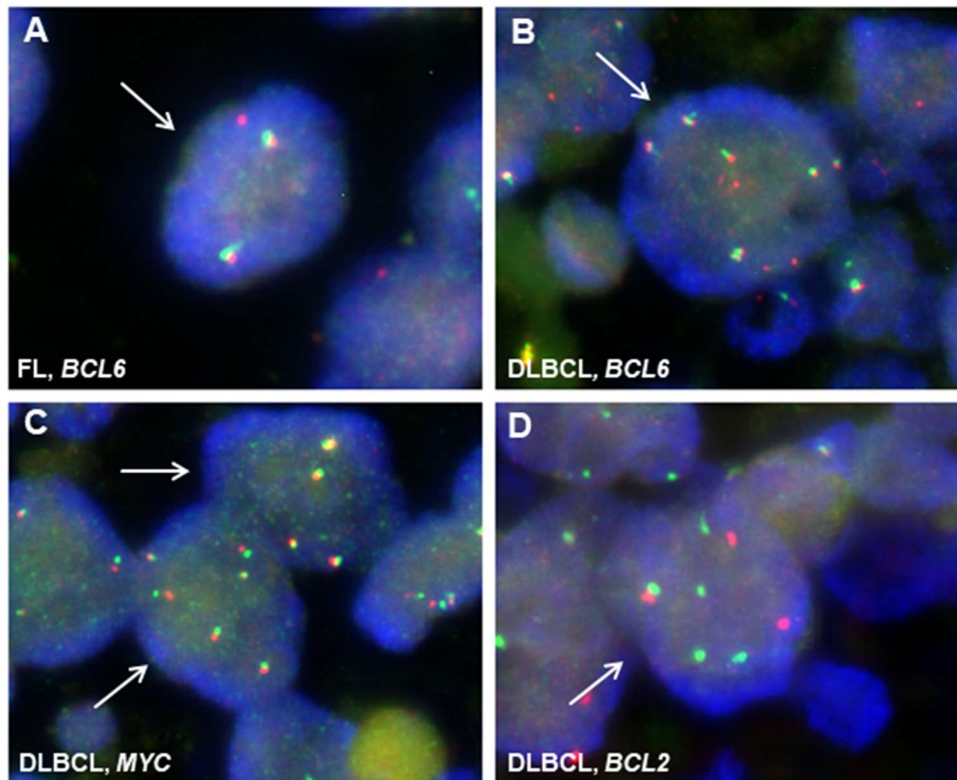


Abbildung 6. Aberrante Muster in der FISH als Hinweis auf chromosomale Instabilität. Dargestellt sind die Hybridisierungen des FL und DLBCL von Fall 7. Dabei sind für alle Gene Dual Color Break Apart Sonden verwendet worden. **A)** Eine Zelle mit zwei rot/grünen Fusionssignalen und einem zusätzlichen roten Einzelsignal. **B)** Ein großer, polysomer Zellkern mit sechs Fusionssignalen und mehreren zusätzlichen roten Einzelsignalen ohne Nachweis eines klassischen *BCL6*-Bruches. **C)** Zwei polysome Zellen mit multiplen rot/grünen Fusionssignalen. **D)** Eine Zelle mit einem Bruch im *BCL2*-Gen und zusätzlichen roten und grünen Einzelsignalen.

3.3.2 Sequenzanalyse des *BCL2/IGH*-Rearrangements

Die Amplifikation der *BCL2/IGH*-Bruchpunktregion und damit die zweifelsfreie Demonstration der Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ gelang für die Proben von insgesamt sieben Fällen (1, 3, 6, 7, 8, 9 und 10), wobei sechs der Brüche in der MBR lagen (Tab. 18). Lediglich die Proben von Fall 8 wiesen einen Bruchpunkt auf, der die 3'MBR des *BCL2*-Gens einbezog. In Fall 3 und 9 war der Nachweis mit dem MBR/JH-Konsensus-Primerpaar allerdings nur bei den aggressiven B-NHL und FL Proben möglich. Für die zugehörigen ISFN bedurfte es klonspezifischer Primer, die anhand der Bruchpunktsequenz der gepaarten DLBCL bzw. HGBL Proben entworfen worden waren (Abschnitt 2.6.2). Die Sanger Sequenzierung der amplifizierten Produkte bestätigte bei allen zusammengehörenden Proben die Existenz eines identischen *BCL2/IGH*-Rearrangements mit übereinstimmenden N-Nukleotiden. Auf diese Weise konnte die klonale Verwandtschaft

der ISFN und B-NHL Proben für die Fällen 1, 3, 6, 7, 8, 9 und 10 sicher bestätigt werden (Tab. 18, Abb. 7).

Tabelle 18. Chromosomale Alterationen (modifiziert nach [95]).

Aufgeführt sind die Ergebnisse der FISH und *BCL2*-Bruchpunktanalyse. Fälle bzw. Proben, deren klonale Verwandtschaft durch die Sequenzanalyse bestätigt werden konnte, sind fettgedruckt. **Abkürzungen:** JH, J-Segment des IGH-Gens; MBR, Major breakpoint region; n/d, Nicht durchgeführt; P., Patient. *Mit bruchpunktspezifischen Primern nachgewiesen. #Mit einer IGH/*BCL2* Fusionssonde nachgewiesen. †Zusätzliche Einzel- und/oder Fusionsignale.

P.	Diagnose	<i>BCL2</i> FISH	<i>BCL2</i> - Bruchpunkt	<i>MYC</i> FISH	<i>BCL6</i> FISH
<i>De novo aggressive B-Zell-Lymphome</i>					
1	ISFN	+	MBR-JH	-	-
	HGBL-TH	+	MBR-JH	+†	+
2	ISFN	+	-	n/d	n/d
	DLBCL	+	-	-	-
3	ISFN	+	MBR-JH*	n/d	n/d
	DLBCL	+	MBR-JH	-	-
	DLBCL	+	MBR-JH	-	-
4	ISFN	+	-	n/d	n/d
	DLBCL	+	-	-	-
5	ISFN	+ [#]	-	n/d	n/d
	DLBCL	+ [#]	-	-	-
6	ISFN	+	MBR-JH	n/d	n/d
	DLBCL	+	MBR-JH	-	-
<i>Transformierte folliculäre Lymphome</i>					
7	ISFN	+	MBR-JH	n/d	n/d
	FL	+	MBR-JH	-	-†
	DLBCL	+†	MBR-JH	-†	-†
8	ISFN	+	3'MBR-JH	-	n/d
	HGBL-DH	+	3'MBR-JH	+	-†
9	ISFN	+	MBR-JH*	-	n/d
	FL	+	MBR-JH	-	-
	HGBL-DH	+	MBR-JH	+	-
10	ISFN	+	MBR-JH	n/d	n/d
	FL	+	MBR-JH	-	-
	DLBCL	+	MBR-JH	-	-

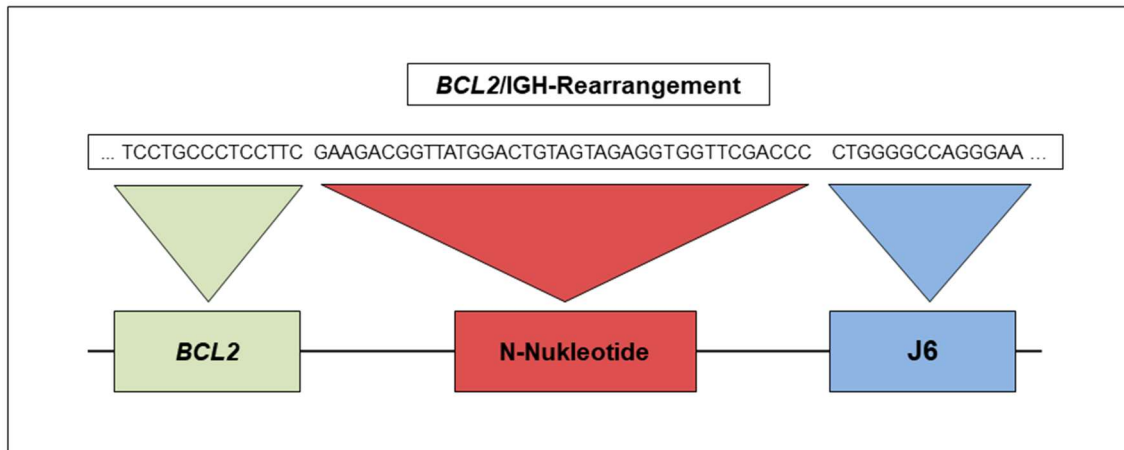


Abbildung 7. Sequenzierung des *BCL2*/IGH-Bruchpunktes.

Zu sehen ist ein Ausschnitt des nach Sanger sequenzierten, translozierten *BCL2*-Allels von ISFN, FL und DLBCL von Fall 7. Im Rahmen einer missglückten V(D)J-Rekombination, welche während der frühen B-Zell Entwicklung im Knochenmark stattfindet, fusioniert *BCL2* mit einem der sechs J-Segmente (hier J6) des IGH-Gens. Dabei fügt die Terminale Desoxynukleotidyltransferase zusätzlich nicht im Genom kodierte N-Nukleotide ein, wodurch sich für jeden Klon eine individuelle Bruchpunktsequenz ergibt und der Nachweis der gleichen Sequenz in unterschiedlichen Proben ein sicherer Beweis für deren klonale Verwandtschaft ist.

3.4 Analyse der Immunglobuline

3.4.1 Traditionelle Klonalitätsanalyse

Monoklonale PCR-Produkte gleicher Länge als Indiz für eine klonale Verwandtschaft konnten in der IGH- und/oder IGK-Klonalitätsanalyse der Proben von insgesamt 5 Fällen (1, 7, 8, 9 und 10) demonstriert werden (Tab. 19). So zeigten ISFN und HGBL von Fall 1 zwei klonale Produkte von 152 (IGK_A) und 279 (IGK_B) bp (Abb. 8). In ISFN, FL und DLBCL von Fall 7 konnten monoklonale Peaks von 152 und 160 bp im IGK_A-Ansatz demonstriert werden. Bei FL und DLBCL ließ sich zusätzlich mit dem FR2-Primermix ein klonales PCR-Produkt von 270 bp nachweisen. Das ISFN/HGBL-Paar von Fall 8 zeigte ebenfalls zwei monoklonale Peaks von 150 (IGK_A) und 230 (IGK_B) bp. Für ISFN, FL und HGBL von Fall 9 ließ sich ein monoklonales Produkt von 196 bp mit dem IGK_A-Primermix demonstrieren. In ISFN, FL und DLBCL von Fall 10 gelang die Amplifikation eines klonalen PCR-Produktes von 127 bp Länge hingegen unter Zuhilfenahme klonspezifischer Primer, die anhand der, mit dem Lymphotrack® Assay bestimmten, IGH-Sequenz des DLBCL konzipiert worden waren (Abschnitt 2.8.3). FL und DLBCL zeigten zusätzlich einen klonalen Peak von 298 bp im FR2-Ansatz.

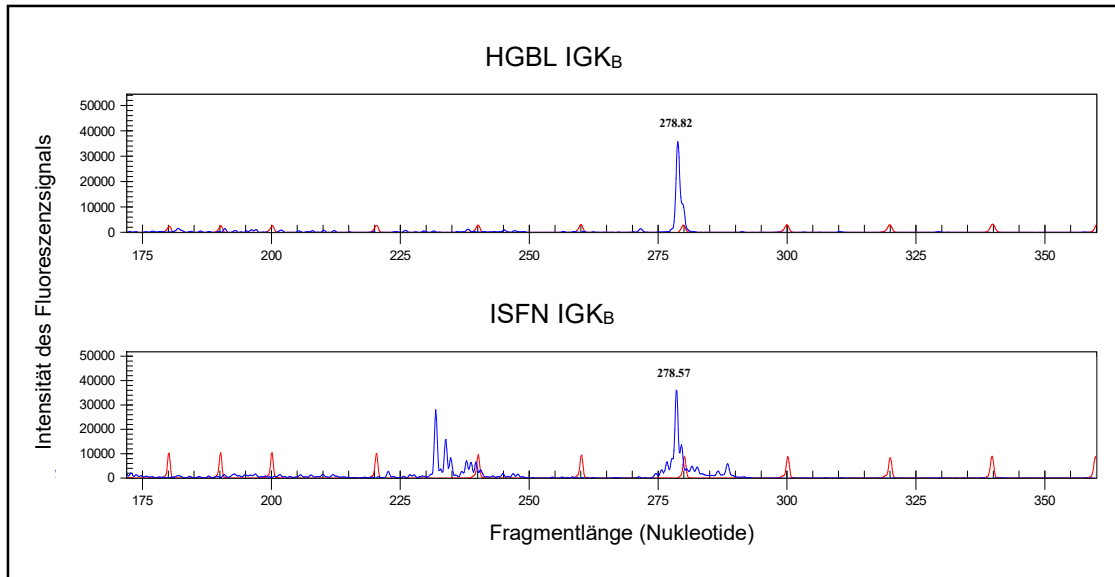


Abbildung 8. Exemplarische Darstellung einer Klonalitätsanalyse (modifiziert nach [95]). Zu sehen sind die Ergebnisse der IGK-Klonalitätsanalyse von HGBL und ISFN aus Fall 1, die beide im IGK_B-Ansatz ein klonales Produkt von 279 Nukleotiden gezeigt haben. Identische Peaks in der Klonalitätsanalyse sind als Indiz für das Vorliegen des gleichen V(D)J-Rearrangements und damit für die klonale Verwandtschaft der entsprechenden Läsionen zu werten. Grundlage der Analyse ist die Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer zur Amplifikation der Zielsequenz, in diesem Fall ein Abschnitt des *Kappa*-Leichtkettengens (IGK). Auf diese Weise können die PCR-Produkte, nachdem sie durch eine Kapillargelelektrophorese anhand ihrer Länge aufgetrennt worden sind, als blaue Fluoreszenzsignale in einem Elektropherogramm dargestellt werden. Rote Signale zeigen Standardfragmente bekannter Größe, die der Längenbestimmung dienen.

Bei den übrigen Fällen konnten mittels traditioneller Klonalitätsanalyse keine Belege für eine klonale Verwandtschaft der gepaarten Proben erbracht werden. Für ISFN und DLBCL von Fall 2 ließen sich zwar monoklonale Produkte nachweisen, doch fanden sich diese in unterschiedlichen Ansätzen. So zeigte die ISFN ein klonales PCR-Produkt von 115 bp mit dem FR3-Primermix, das DLBCL jedoch zwei klonale Peaks von 252 und 145 bp im FR2- bzw. IGK_A-Ansatz. Im Gegensatz dazu ergaben sich für die Proben von Fall 3, 5 und 6 lediglich polyklonale Muster. Was Fall 4 betrifft, sind die Analysen aufgrund der geringen Menge an Gewebe und DNA vom DLBCL zuerst in der zugehörigen ISFN durchgeführt worden. Nachdem sich dort kein klonaler Peak demonstrieren ließ, wurde auf die Analyse der gepaarten Probe verzichtet.

3.4.2 Klonalitätsanalyse mittels IGH-Sequenzierung

Durch die NGS-basierte Sequenzierung mit dem Lymphotrack® Assay konnten in den gepaarten Proben der Fälle 1, 2, 4, 7 und 9 übereinstimmende monoklonale V(D)J-Rearrangements demonstriert werden (Tab. 19). Grundsätzlich ist es auch für Fall 8 und 10 gelungen, das gleiche Rearrangement in der ISFN, dem aggressiven B-NHL und, wenn vorhanden, der FL Probe nachzuweisen. Jedoch hat das Rearrangement der ISFN in beiden Fällen nur 2 % aller Reads der Lymphotrack®-Analyse ausgemacht, wodurch die Monoklonalitätskriterien nicht erfüllt worden sind und eine Detektion nur durch den manuellen Abgleich mit der IGH-Sequenz der gepaarten Proben möglich war. Ausschlaggebend für die Entscheidung, ob zwei IG-Sequenzen auf dem gleichen Rearrangement basieren, war dabei insbesondere die Sequenzhomologie der CDR3 (Abb. 9).



Abbildung 9. Vergleich der IGH-Sequenz zwei gepaarter Proben.

Dargestellt sind die, von den jeweiligen V- und J-Segmenten flankierten, Komplementaritäts-bestimmenden Regionen 3 (CDR3) der IGH-Gene der ISFN und des DLBCL von Fall 4. Während eine senkrechte Verbindung zweier Basen deren Übereinstimmung signalisiert, sind ungleiche Basen in roter Farbe hervorgehoben. Durch die V(D)J-Rekombination während der B-Zell Entwicklung ergibt sich für jeden Klon eine spezifische CDR3 mit individueller Länge und Nukleotidabfolge, weswegen eine wie hier gezeigte Sequenzhomologie ein sicherer Beweis für die klonale Verwandtschaft der beiden Läsionen ist. Vorhandene Basenabweichungen lassen sich dabei auf die somatische Hypermutation zurückführen. Die Sequenzierung des IGH-Gens ist mithilfe des NGS-basierten Lymphotrack® Assays erfolgt.

In Fall 6 konnte lediglich beim DLBCL ein monoklonales Rearrangement demonstriert werden. Im Gegensatz zu Fall 8 und 10 gelang es jedoch nicht, die IG-Sequenz der ISFN in der polyklonalen Lymphotrack®-Analyse zu identifizieren. Auch die traditionelle Klonalitätsanalyse unter Verwendung klonspezifischer Primer, welche speziell für das Rearrangement des DLBCL konzipiert worden waren, erbrachte in der ISFN keinen klonalen Peak, obwohl die Verwandtschaft beider Läsionen durch die Analyse des *BCL2*/IGH-Rearrangements zweifelsfrei bestätigt werden konnte (Abschnitt 3.3.2).

Tabelle 19. Übersicht über die Ergebnisse der Immunglobulinanalyse (modifiziert nach [95]). In der Spalte „Klonalität“ sind die Ergebnisse der traditionellen IGH- und IGK-Klonalitätsanalyse zusammengefasst. Aufgeführt sind außerdem die Ergebnisse der NGS-basierten Sequenzierung mit dem Lymphotrack® Assay. Dafür ist auch der, auf die nächste ganze Zahl gerundete, prozentuale Anteil angegeben, den das jeweilige dominante Rearrangement an der Gesamtanzahl aller Reads hatte. Durch die Analyse der Sequenzen konnten die jeweils verwendeten V- und J-Segmente sowie N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden. Für letztere ist die Position und die Aminosäureabfolge im Einbuchstabencode angegeben. Fettgedruckt sind sowohl die Fälle bzw. Proben deren klonale Verwandtschaft bestätigt werden konnte, als auch die Methoden, mit denen der Nachweis erbracht wurde. Abkürzungen: bp, Basenpaare; FR2/3, Framework 2 bzw. 3 Region; P., Patient; Mono, Monoklonal; Poly, Polyklonal. *Nachgewiesen mit klonenspezifischen Primern. #Obwohl das Rearrangement nicht die Monoklonalitätskriterien erfüllt hat, konnte es durch den Abgleich mit der IGH-Sequenz der gepaarten Proben identifiziert werden. *An der Grenze der FR2 zur CDR2 kodiert.

P.	Diagnose	Klonalität [bp]	Lymphotrack	% der Reads	V/J-Segment	Glykosylierung Ort	Motiv
<i>De novo aggressive B-Zell-Lymphome</i>							
1	ISFN	152/279 (IGK)	Mono (FR2)	21	V3/J4	CDR3	NLS
	HGBL-TH	244 (FR2), 152/279 (IGK)	Mono (FR2)	83	V3/J4	CDR3	NLS
2	ISFN	115 (FR3)	Mono (FR3)	17	V2/J4	CDR3	NDS
	DLBCL	252 (FR2), 145 (IGK)	Mono (FR2)	63	V2/J4	CDR3	NTS
3	ISFN	Poly	Poly	—	—	—	—
	DLBCL	Poly	Poly	—	—	—	—
	DLBCL	Poly	Poly	—	—	—	—
4	ISFN	Poly	Mono (FR3)	13	V3/J6	CDR3	NAS
	DLBCL	n/d	Mono (FR3)	57	V3/J6	CDR3	NAS
5	ISFN	Poly	Poly	—	—	—	—
	DLBCL	Poly	Poly	—	—	—	—
6	ISFN	Poly	—	—	—	—	—
	DLBCL	Poly, 145*	Mono (FR2)	55	V3/J3	FR3	NLT
<i>Transformierte folliculäre Lymphome</i>							
7	ISFN	152/160 (IGK)	Mono (FR2)	39	V3/J6	CDR3	NLT
	FL	270 (FR2), 152/160 (IGK)	Mono (FR2)	68	V3/J6	CDR3	NLT
	DLBCL	270 (FR2), 152/160 (IGK)	Mono (FR2)	74	V3/J6	CDR3	NLT
8	ISFN	144 (FR3), 150/230 (IGK)	Poly#	2#	V3/J3	CDR2+	NIT
	HGBL-DH	150/230 (IGK)	Mono (FR1)	90	V3/J3	Keine	
9	ISFN	196 (IGK)	Mono (FR2)	19	V3/J4	CDR3	NCS
	FL	196 (IGK)	Mono (FR2)	14	V3/J4	CDR3	NCS
	HGBL-DH	261 (FR2), 196 (IGK)	Mono (FR2)	76	V3/J4	Keine	
10	ISFN	127*	Poly#	2#	V1/J6	CDR3	NFS
	FL	298 (FR2), 127*	Mono (FR2)	54	V1/J6	CDR3	NYS
	DLBCL	298 (FR2), 127*	Mono (FR2)	48	V1/J6	CDR3	NYS

3.4.3 Nachweis von N-Glykosylierungsstellen und intraklonaler Heterogenität

Unter den Proben, die erfolgreich mit dem LymphoTrack[®] Assay sequenziert worden sind, konnte bei 7/7 ISFN, 3/3 FL und 6/8 aggressiven B-NHL die Akquisition neuer, d.h. nicht von vornherein im jeweiligen V-Gen kodierter, N-Glykosylierungsstellen bestätigt werden, wobei sich diese fast ausschließlich in den CDR fanden (Tab. 19). In drei Fällen (Fall 1, 4 und 7) zeigten alle Proben identische Glykosylierungsstellen. Die ISFN von Fall 2 und 10 demonstrierten hingegen Motive, die an der gleichen Position lagen, sich jedoch in ihrer Sequenz von denen der klonal verwandten Proben unterschieden. So zeigte die ISFN von Fall 2 ein NDS (Asparagin-Aspartat–Serin) Motiv, während sich beim DLBCL eine NTS (Asparagin-Threonin–Serin) Konstellation ergab. In Fall 10 fand sich bei der ISFN eine NFS (Asparagin-Phenylalanin-Serin) Sequenz, wohingegen FL und DLBCL ein NYS (Asparagin-Tyrosin-Serin) Motiv zeigten. Bei zwei HGBL (Fall 8 und 9) fanden sich darüber hinaus keine Glykosylierungsstellen, obwohl in den klonal verwandten Proben entsprechende Motive nachgewiesen werden konnten.

Intraklonale Heterogenität in Form zusätzlicher subklonaler Sequenzen, die dem dominanten Rearrangement zugeordnet werden konnten, jedoch SHM-bedingte Sequenzabweichungen aufwiesen, konnte in allen Proben nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich gepaarter Läsionen zeigte sich allerdings, dass diese Heterogenität in den ISFN Proben stärker ausgeprägt war, da sich die Gesamtzahl klonspezifischer Reads gleichmäßiger auf die unterschiedlichen Subklone verteilt hat (Abb. 10 und 11). Die aggressiven B-NHL demonstrierten hingegen ein oder zwei dominante Sequenzen, die den Großteil aller klonspezifischen Reads ausgemacht haben. Zwei der FL Proben (Fall 7 und 10) zeigten ähnlich dominante Hauptklone wie die jeweiligen DLBCL, während die Heterogenität des FL von Fall 9 vergleichbar mit der der klonal verwandten ISFN war. Die phylogenetischen Stammbäume auf Basis der IG-Sequenzen zeigten komplexe Verteilungsmuster mit einer weitestgehend separaten Clusterbildung der ISFN- und DLBCL/HGBL-Sequenzen, was für eine divergente Evolution der entsprechenden Proben gesprochen hat (Abb. 10 und 11).

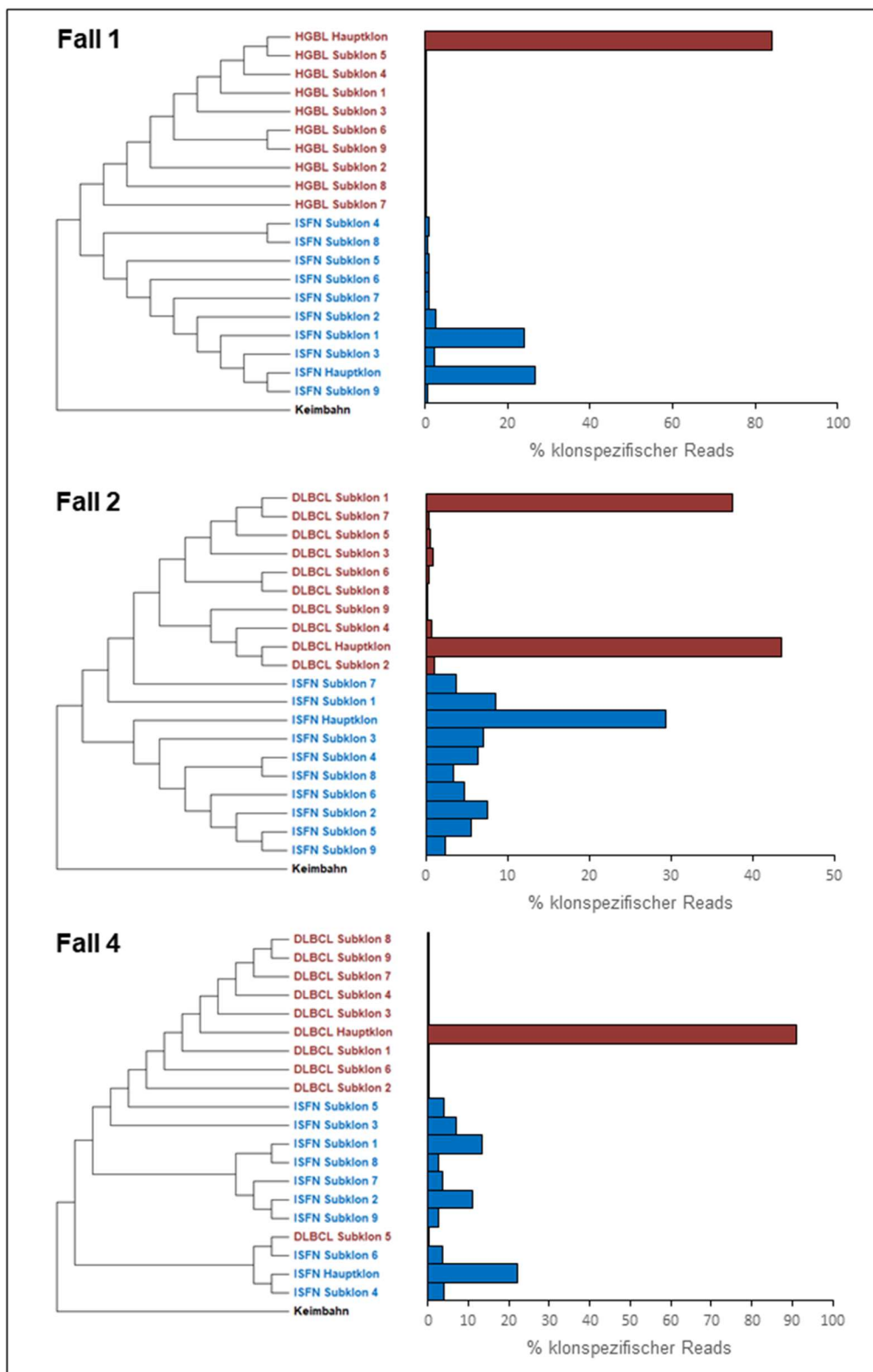


Abbildung 10. Phylogenetische Stammbäume von drei Fällen mit *de novo* aggressivem B-NHL (modifiziert nach [95]). Zur Konstruktion sind von jeder Probe die zehn prävalentesten Subklone sowie die dem jeweiligen Rearrangement zugrunde liegende VDJ-Keimbahnsequenz verwendet worden. Letztere diente als Wurzel der Stammbäume, wodurch nicht nur eine Aussage über die Beziehung der einzelnen Subklone zueinander, sondern auch über die Richtung der Evolution getroffen werden konnte. Jeder „innere Knoten“ in der Mitte einer Gabelung repräsentiert somit einen gemeinsamen Vorfahren, aus dem sich die distal der Wurzel gelegenen Sequenzen entwickelt haben. Die Balkendiagramme zeigen den Anteil jedes Subklons an der Gesamtheit klonenspezifischer Reads der Probe. Das Verteilungsmuster der Sequenzen mit weitestgehend separater Clusterbildung der ISFN und aggressiven B-NHL Subklone spricht jeweils für eine divergente Evolution der Proben.

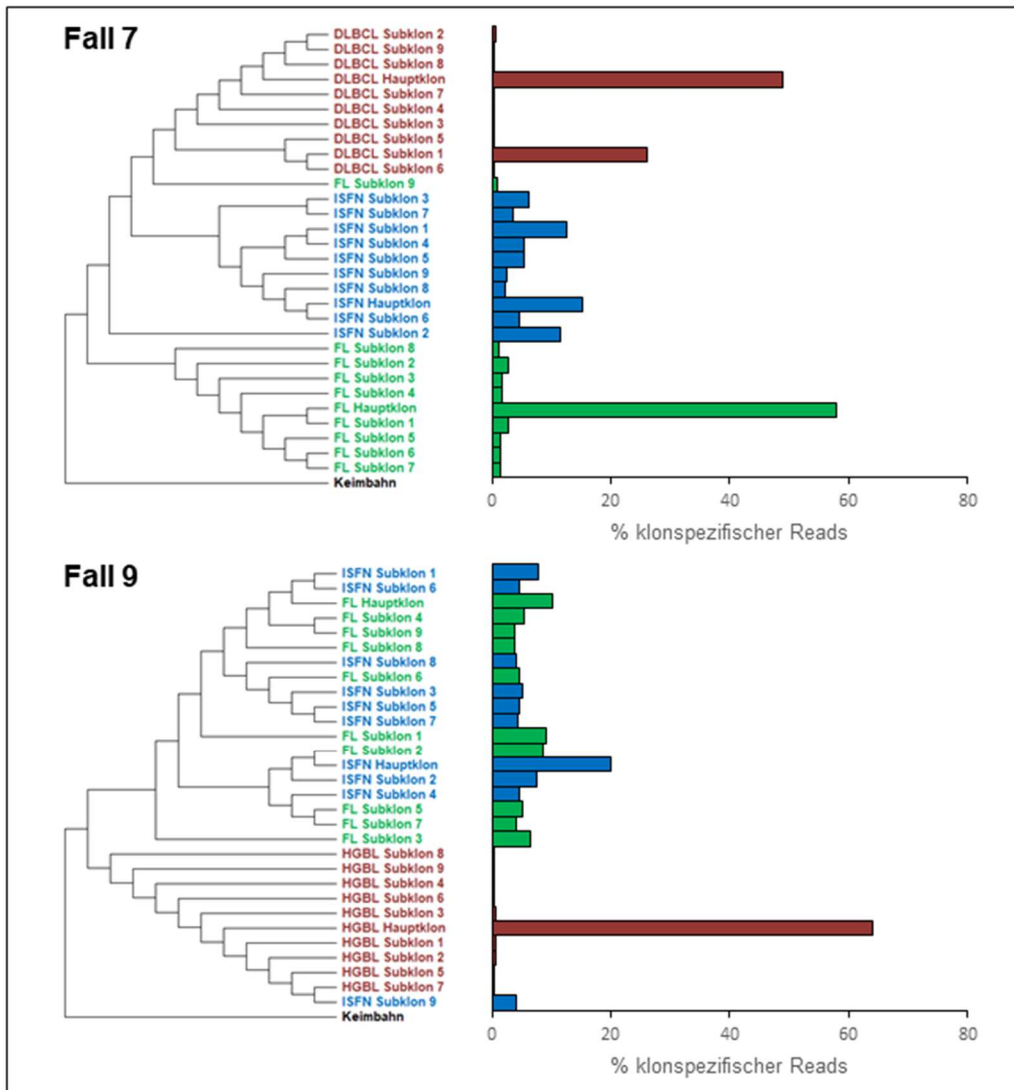


Abbildung 11. Phylogenetische Stammbäume von zwei Fällen mit intermediärem FL (modifiziert nach [95]). Bei diesen Fällen zeigt sich ebenfalls eine separate Clusterbildung der ISFN, aggressiven B-NHL und, in Fall 7, FL Subklone. In Fall 9 zeigt sich hingegen eine Durchmischung der ISFN und FL Subklone, was dafür spricht, dass sich die Läsionen aus evolutionärer bzw. genetischer Sicht näherstehen.

3.5 Mutationsnachweis durch NGS

3.5.1 Mutationsprofil von ISFN, FL und aggressiven B-NHL Proben

Durch die gezielte NGS-Analyse wurde *BCL2* als das insgesamt am häufigsten mutierte Gen identifiziert (Tab. 20 und 21). So konnte in jeder Probe mindestens eine nicht-synonyme, synonyme oder 5'UTR Mutation von *BCL2* nachgewiesen werden, wobei die meisten Proben mehrere Varianten trugen. Auch in 7/10 ISFN Läsionen konnte mehr als eine Mutation des *BCL2*-Gens demonstriert werden. Ebenfalls mehrfach mutiert waren *CREBBP* (11/24 Proben), *KMT2D* (11 Proben), *EZH2* (10 Proben), sowie *TNFRSF14*, *IGLL5*,

TP53, *GNA13*, *HIST1H1D*, *MEF2B*, *CARD11* und *EP300*. Mutationen von *CD79B* und *HIST1H1B* fanden sich hingegen nur in jeweils einer Probe. Zusammen mit *TP53* gehörten *CD79B* und *HIST1H1B* außerdem zu den Genen, die ausschließlich in aggressiven B-NHL mutiert waren. Die drei identifizierten *TP53* Mutationen zeigten dabei Allelfrequenzen zwischen 52 % und 84 %, was einen Verlust des zweiten Allels vermuten ließ. Für die Proben der Fälle 1 und 2 gelang es, dies mittels FISH zu bestätigen. Nur auf ISFN Läsionen bezogen waren – abgesehen von *BCL2 – CREBBP* (5 Proben), *KMT2D* (3 Proben), sowie *EZH2*, *TNFRSF14* und *IIGLL5* (jeweils 2 Proben) die am häufigsten mutierten Gene.

Mit Ausnahme von Fall 1 konnten in jedem der neun Fälle, für welche die klonale Verwandtschaft der jeweiligen Läsionen mittels *BCL2*-Bruchpunkt- und/oder IG-Analyse bestätigt worden war, gemeinsame Mutationen in ISFN und gepaarten Lymphomen nachgewiesen werden. Die Anzahl gemeinsamer Alterationen lag dabei zwischen eins und sechs. DLBCL und ISFN von Fall 4 trugen beispielsweise vier gemeinsame nicht-synonyme Mutationen von *BCL2*, *TNFRSF14*, *HIST1H1D* und *EP300*, obwohl die ISFN in einem LK identifiziert wurde, der bereits 159 Monate vor der Diagnose des aggressiven B-NHL entnommen worden war. Auch ISFN und DLBCL von Fall 5, bei denen weder das IG- noch das *BCL2*/*JH*-Rearrangement demonstriert werden konnten, zeigten gemeinsame *KMT2D* p.(Q4473*) und *IIGLL5* p.(C3S) Mutationen, wodurch auf die klonale Verwandtschaft beider Proben geschlossen werden konnte. Von den untersuchten FL zeigten alle Proben mehr als eine Variante, die sowohl mit der ISFN als auch mit dem aggressiven B-NHL geteilt wurde. Darüber hinaus trugen alle manifesten Lymphome, mit Ausnahme von einem FL (Fall 9), mehrere Mutationen, die nicht in der gepaarten ISFN Läsion identifiziert werden konnten. Sechs ISFN zeigten jedoch ebenfalls private Alterationen, u.a. von *BCL2* (ISFN 1, 2, 4, 5, 6 und 8), *CREBBP* (ISFN 5) und *CARD11* (ISFN 8). Die ISFN von Fall 6 demonstrierte die größte Anzahl privater Mutationen. So fand sich von insgesamt 13 nicht-synonymen Alterationen von *BCL2*, *KMT2D*, *CREBBP*, *GNA13*, *MEF2B*, *PIM1*, *TBL1XR1* und *IIGLL5*, sowie sechs synonymen und 5'UTR Varianten von *BCL2*, lediglich eine einzige *TBL1XR1* p.(L198*)

Ergebnisse

Mutation auch im klonal verwandten DLBCL. Die ISFN von Fall 6 war außerdem die einzige der ISFN Läsionen, die insgesamt mehr Mutationen zeigte, als das gepaarte aggressive B-NHL.

Tabelle 20. Übersicht nicht-synonymer Varianten und Mutationen in Spleißstellen (modifiziert nach [95]). Aufgeführt sind Mutationen, die innerhalb der kodierenden Bereiche oder in den Spleißstellen identifiziert wurden. Die Benennung der Mutationen folgt dabei den Regeln der HGVS (engl. *Human Genome Variation Society*). Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code abgekürzt. Fettgedruckte Alterationen wurden sowohl in der ISFN als auch im gepaarten FL und/oder aggressiven B-NHL nachgewiesen. Angegeben sind auch die Gen-Transkripte, auf die sich die Basen- und Proteinveränderungen beziehen. Abkürzungen: cDNA, komplementäre DNA; ND, Nicht durchgeführt; P., Patient; VAF, Allelfrequenz der Variante. †Einzelaamplikon-Sequenzierung.

P.	Läsion	Gen	Transkript-variante	Proteinveränderung	cDNA Veränderung	VAF (%)	Reads	Validierung	
<i>De novo aggressive B-Zell-Lymphome</i>									
1	ISFN	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.D31N	c.91G>A	15	3210	Bestätigt	
		HGBL-TH	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.T56S	c.166A>T	42	2427	ND
			<i>BCL2</i>	NM_000633	p.L86S	c.256_257delinsTC	45	2426	ND
			<i>TP53</i>	NM_000546	p.R273C	c.817C>T	52	8697	Bestätigt
			<i>GNA13</i>	NM_006572	p.L326R	c.977T>G	8	2322	Bestätigt
2	ISFN	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.G33R	c.97G>A	8	3266	Bestätigt	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.G101A	c.302G>C	7	7474	Bestätigt	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.A113G	c.338C>G	7	7482	Bestätigt	
		<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.S1680del	c.5039_5041del	28	588	Bestätigt	
	DLBCL	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.R6G	c.16A>G	20	2481	Bestätigt	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.G33R	c.97G>A	21	3097	Bestätigt	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.A113G	c.338C>G	22	6631	Bestätigt	
		<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.S1680del	c.5039_5041del	67	565	Bestätigt	
		<i>TP53</i>	NM_000546	p.T150fs	c.447_459del	52	9399	ND	
		<i>CARD11</i>	NM_032415	p.Q249P	c.746A>C	46	7624	Bestätigt	
3	ISFN	<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.Y1503D	c.4507T>G	16	1673	Bestätigt	
		<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.N1589fs	c.4767del	15	1171	ND	
	DLBCL	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.W214C	c.642G>T	51	32774	ND	
		<i>KMT2D</i>	NM_003482	p.I5455fs	c.16365_16371del	47	4421	ND	
		<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.Y1503D	c.4507T>G	26	8807	Bestätigt	
		<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.N1589fs	c.4767del	45	1983	ND	
	DLBCL	<i>TP53</i>	NM_000546	p.H179N	c.535C>A	83	3576	ND	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.W214C	c.642G>T	60	14102	ND	
		<i>KMT2D</i>	NM_003482	p.I5455fs	c.16365_16371del	28	491	ND	
		<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.Y1503D	c.4507T>G	21	1385	Bestätigt	
DLBCL	<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.N1589fs	c.4767del	42	1187	ND		
	<i>TP53</i>	NM_000546	p.H179N	c.535C>A	84	3949	ND		
	4	ISFN	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.A76D	c.227C>A	44	1015	Bestätigt
			<i>TNFRSF14</i>	NM_003820	p.W12Ter	c.35G>A	25 [†]	7259	Bestätigt
<i>HIST1H1D</i>			NM_005320	p.N77K	c.231C>G	31	6107	Bestätigt	
<i>EP300</i>			NM_001429	p.L415P	c.1244T>C	24	841	Bestätigt	
DLBCL	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.P59S	c.175C>T	24	5580	ND		
	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.A76D	c.227C>A	23	5649	Bestätigt		
	<i>KMT2D</i>	NM_003482	Splice site	c.10507+2T>C	18	3764	ND		
	<i>EZH2</i>	NM_004456	p.Y646N	c.1936T>A	32	2152	ND		
	<i>TNFRSF14</i>	NM_003820	p.W12Ter	c.35G>A	14	182	Bestätigt		
	<i>HIST1H1D</i>	NM_005320	p.N77K	c.231C>G	13	8350	Bestätigt		
5	ISFN	<i>EP300</i>	NM_001429	p.L415P	c.1244T>C	19	1200	Bestätigt	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.P53A	c.157C>G	28	2009	Bestätigt	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.R129C	c.385C>T	13	7370	Bestätigt	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.F153L	c.457T>C	8	8140	Bestätigt	
		<i>KMT2D</i>	NM_003482	p.Q4473*	c.13417C>T	24	702	Bestätigt	
	DLBCL	<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.V1371D	c.4112T>A	30	956	ND	
		<i>IGLL5</i>	NM_001256296	p.C3S	c.8G>C	25	1331	ND	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.P59S	c.175C>T	51	2893	ND	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.A82T	c.244G>A	50	3013	ND	
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.D102G	c.305A>G	40	8896	ND	
		<i>KMT2D</i>	NM_003482	p.Q4473*	c.13417C>T	30	4234	Bestätigt	
		<i>EZH2</i>	NM_004456	p.Y646F	c.1937A>T	27	10985	ND	
		<i>IGLL5</i>	NM_001256296	p.C3S	c.8G>C	54	1658	ND	
		<i>IGLL5</i>	NM_001256296	p.G13W	c.37G>T	66	1449	ND	
		<i>GNA13</i>	NM_006572	p.M68R	c.203T>G	34	18503	ND	
DLBCL	<i>GNA13</i>	NM_006572	p.D155A	c.464A>C	35	9386	ND		
	<i>GNA13</i>	NM_006572	p.T203A	c.607A>G	38	118	Bestätigt		
	<i>HIST1H1D</i>	NM_005320	p.T93S	c.278C>G	45	21464	ND		
	<i>MEF2B</i>	NM_001145785	p.R3M	c.8G>T	36	13251	ND		
	<i>CD79B</i>	NM_000626	p.Y196H	c.586T>C	38	5105	Bestätigt		

Ergebnisse

P.	Läsion	Gen	Transkript- variante	Proteinver- änderung	cDNA Veränderung	VAF (%)	Reads	Validierung
6	ISFN	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.G5V	c.14G>T	14	3104	Bestätigt
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.A42V	c.125C>T	15	8584	Bestätigt
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.S87R	c.261C>A	26	1338	Bestätigt
		<i>KMT2D</i>	NM_003482	p.S468Ter	c.1403C>A	13	9012	Bestätigt
		<i>KMT2D</i>	NM_003482	p.S477P	c.1429T>C	13	13514	Bestätigt
		<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.Y1503D	c.4507T>G	8	6881	Bestätigt
		<i>IGLL5</i>	NM_001256296	p.P19S	c.55C>T	16	694	ND
		<i>IGLL5</i>	NM_001256296	p.A30V	c.89C>T	26	702	ND
		<i>GNA13</i>	NM_006572	p.L54Ter	c.159_161delinsCTA	15	15333	Bestätigt
	<i>GNA13</i>	NM_006572	p.D222N	c.664G>A	17	695	Bestätigt	
	<i>MEF2B</i>	NM_001145785	p.E77A	c.230A>C	14	1248	Bestätigt	
	<i>TBL1XR1</i>	NM_024665	p.L198Ter	c.592_609delinsT	34	16045	ND	
	<i>PIM1</i>	NM_002648	p.M1I	c.3G>A	13	2241	Bestätigt	
	DLBCL	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.L86V	c.256C>G	12	1902	Bestätigt
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.P90S	c.268C>T	23	1911	Bestätigt
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.F153L	c.457T>C	12	14816	ND
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.V162D	c.485T>A	10	5631	ND
		<i>EZH2</i>	NM_004456	p.Y646C	c.1937A>G	27	2218	ND
<i>CREBBP</i>		NM_004380	p.Y1482S	c.4445A>C	15	6079	Bestätigt	
<i>MEF2B</i>		NM_001145785	p.D83V	c.248A>T	22	1813	ND	
<i>TBL1XR1</i>	NM_024665	p.L198Ter	c.592_609delinsT	23	10662	ND		
<i>Transformierte folliculäre Lymphome</i>								
7	ISFN	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.G8E	c.23G>A	12	1398	Bestätigt
		<i>KMT2D</i>	NM_003482	p.W4987*	c.14960G>A	9	7593	Bestätigt
		<i>TNFRSF14</i>	NM_003820	p.V219G	c.656T>G	15[†]	46363	Bestätigt
	FL	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.G8E	c.23G>A	23	1629	Bestätigt
		<i>KMT2D</i>	NM_003482	p.W4987*	c.14960G>A	25	12168	Bestätigt
		<i>EZH2</i>	NM_004456	p.Y646N	c.1936T>A	14	334	Bestätigt
		<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.C1237Y	c.3710G>A	24	5787	ND
		<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.K1586fs	c.4755delC	23	1718	ND
	<i>TNFRSF14</i>	NM_003820	p.V219G	c.656T>G	29	164	Bestätigt	
	DLBCL	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.G8E	c.23G>A	50	2590	Bestätigt
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.P75L	c.224C>T	62	1788	ND
		<i>KMT2D</i>	NM_003482	p.W4987*	c.14960G>A	48	19088	Bestätigt
		<i>TNFRSF14</i>	NM_003820	p.V219G	c.656T>G	70	107	Bestätigt
	<i>PIM1</i>	NM_002648	p.E79D	c.237G>C	32	4210	Bestätigt	
	ISFN	<i>EZH2</i>	NM_004456	p.Y646N	c.1936T>A	32	715	Bestätigt
		<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.L1499P	c.4496T>C	52 [†]	56313	Bestätigt
		<i>CARD11</i>	NM_032415	p.S250P	c.748T>C	23	9399	Bestätigt
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.D10A	c.29A>C	37	4171	Bestätigt
<i>BCL2</i>		NM_000633	p.N11D	c.31A>G	32	4766	Bestätigt	
HGBL-DH	<i>EZH2</i>	NM_004456	p.Y646N	c.1936T>A	56	21249	Bestätigt	
	<i>CREBBP</i>	NM_004380	p.L1499P	c.4496T>C	77	15559	Bestätigt	
	<i>TNFRSF14</i>	NM_003820	p.S171C	c.512C>G	68	5035	ND	
ISFN	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.L86F	c.256C>T	15	110	Bestätigt	
	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.E135D	c.405G>C	8	801	Bestätigt	
	FL	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.L86F	c.256C>T	25	301	Bestätigt
		<i>BCL2</i>	NM_000633	p.E135D	c.405G>C	18	887	Bestätigt
	HGBL-DH	<i>BCL2</i>	NM_000633	p.L86F	c.256C>T	55	2690	Bestätigt
		<i>EZH2</i>	NM_004456	p.Y646F	c.1937A>T	23	4420	Bestätigt
<i>HIST1H1B</i>	NM_005322	p.S107C	c.320C>G	32	1371	Bestätigt		
ISFN	<i>EZH2</i>	NM_004456	p.Y646F	c.1937A>T	9	357	Bestätigt	
	FL	<i>EZH2</i>	NM_004456	p.Y646F	c.1937A>T	52	409	Bestätigt
		<i>KMT2D</i>	NM_003482	p.S831*	c.2492C>A	13	505	Bestätigt
	DLBCL	<i>EZH2</i>	NM_004456	p.Y646F	c.1937A>T	40	1559	Bestätigt
<i>KMT2D</i>		NM_003482	p.S831*	c.2492C>A	21	1131	Bestätigt	

Ergebnisse

Tabelle 21. Synonyme und 5'UTR Mutationen im *BCL2*-Gen (modifiziert nach [95]). Aufgeführt sind *BCL2* Mutationen, die außerhalb des kodierenden Bereichs lagen oder nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz geführt haben, wobei das NM_000633 Transkript als Referenz diente. Die Benennung der Mutationen folgt den Regeln der HGVS (*engl. Human Genome Variation Society*). Fettgedruckte Mutationen wurden sowohl in der ISFN als auch im gepaarten FL und/oder aggressiven B-NHL nachgewiesen. **Abkürzungen:** 5'UTR, 5' untranslatierte Region; cDNA, komplementäre DNA; P., Patient; VAF, Allelfrequenz der Variante.

P.	Läsion	Proteinebene	cDNA Ebene	VAF (%)	Reads
<i>De novo aggressive B-Zell-Lymphome</i>					
1	HGBL-TH	ISFN	—	—	—
		5'UTR	c.1-18G>A	42	7049
		5'UTR	c.1-1G>A	42	7057
		Synonym	c.207C>T	44	2475
		Synonym	c.381G>A	30	27929
2	ISFN	5'UTR	c.1-2G>C	12	1516
	DLBCL	5'UTR	c.1-17C>T	20	2472
		5'UTR	c.1-2G>C	20	2478
3	ISFN	Synonym	c.67C>T	15	6895
	DLBCL	5'UTR	c.1-17C>G	47	5862
		Synonym	c.67C>T	50	6282
		Synonym	c.588T>C	48	18642
	DLBCL	5'UTR	c.1-17C>G	55	2601
		Synonym	c.67C>T	55	3771
Synonym	c.588T>C	58	8330		
4	ISFN	5'UTR	c.1-49G>C	9	1085
	DLBCL	5'UTR	c.1-1G>A	15	8031
5	ISFN	—	—	—	—
	DLBCL	Synonym	c.186C>T	51	2892
Synonym		c.261C>T	52	3191	
6	ISFN	5'UTR	c.1-1G>C	21	3096
		Synonym	c.67C>T	21	9335
		Synonym	c.291C>G	16	26582
		Synonym	c.355C>T	12	26894
		Synonym	c.438G>A	17	12968
		Synonym	c.456G>A	9	15227
	DLBCL	5'UTR	c.1-17C>T	26	5333
<i>Transformierte folliculäre Lymphome</i>					
7	ISFN	5'UTR	c.1-17C>A	11	1391
		Synonym	c.24G>A	12	1398
		Synonym	c.67C>T	11	1981
	FL	5'UTR	c.1-17C>A	22	1609
		Synonym	c.24G>A	23	1630
		Synonym	c.67C>T	24	2201
	DLBCL	5'UTR	c.1-17C>A	50	2574
		Synonym	c.67C>T	56	3402
		Synonym	c.354G>A	25	8459
		Synonym	c.408G>A	55	7506
	Synonym	c.447C>G	54	7523	
	8	ISFN	5'UTR	c.1-49G>C	29
5'UTR			c.1-17C>G	14	4215
HGBL-DH		5'UTR	c.1-49G>C	37	4151
		Synonym	c.426G>A	43	8014
9	ISFN	Synonym	c.66G>A	10	389
		Synonym	c.258C>T	16	109
		Synonym	c.357G>A	9	1637
	FL	Synonym	c.66G>A	23	618
		Synonym	c.258C>T	23	295
		Synonym	c.357G>A	13	1832
	HGBL-DH	Synonym	c.66G>A	46	5918
Synonym		c.93T>C	48	5722	
Synonym	c.258C>T	56	2682		
10	ISFN	5'UTR	c.1-63G>A	4	2232
	FL	5'UTR	c.1-63G>A	29	3562
		5'UTR	c.1-17C>T	29	3608
	DLBCL	5'UTR	c.1-63G>A	26	2970
5'UTR		c.1-17C>T	26	3013	

3.5.2 Rekonstruktion der klonalen Evolution anhand privater und gemeinsamer Mutationen

Basierend auf der Verteilung gemeinsamer und privater Mutationen ließen sich zwei verschiedene Szenarien der klonalen Evolution rekonstruieren (Abb.12). Bei acht Fällen konnte auf eine divergente Evolution geschlossen werden, bei der die ISFN und das aggressive B-Zell-Lymphom aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen waren, jedoch mit der Zeit unterschiedliche private Mutationen erworben haben (Abb. 12A). Die ISFN Läsionen der Fälle 7 und 9 waren darüber hinaus mutmaßlich direkte Vorläufer der jeweiligen FL (Abb. 12B). Die verfügbaren Daten der Fälle 3 und 10 ließen sich hingegen mit einer linearen Evolution vereinbaren, bei der das DLBCL durch den Erwerb zusätzlicher Alterationen aus der analysierten ISFN hervorgegangen war (Abb. 12C).

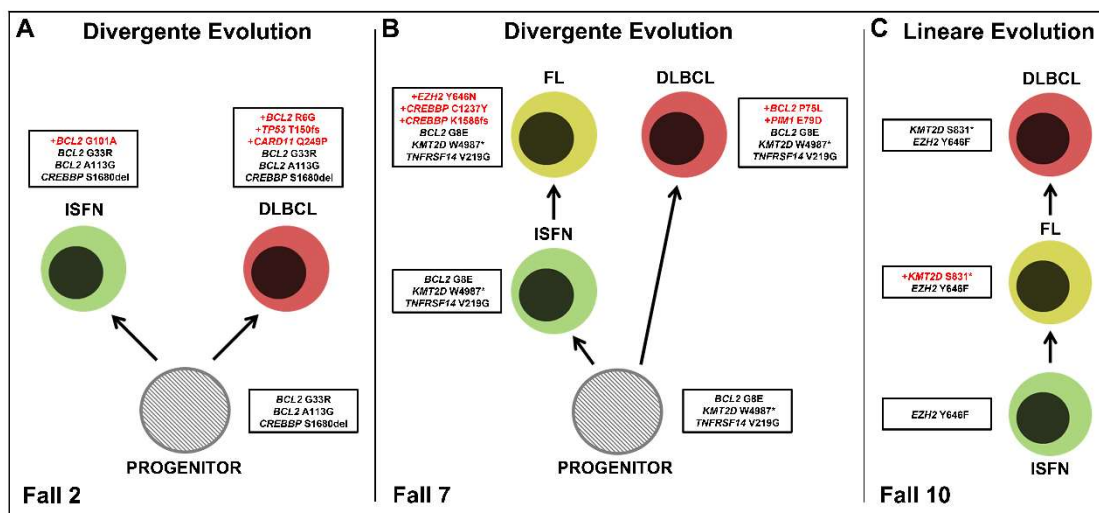


Abbildung 12. Szenarien der klonalen Evolution basierend auf der Mutationsverteilung (modifiziert nach [95]). Aufgeführt sind lediglich nicht-synonyme Mutationen, allerdings wurden auch synonyme und 5'UTR Varianten des *BCL2*-Gens für die Rekonstruktion herangezogen. Alle Mutationen sind auf Proteinebene beschrieben. Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code abgekürzt. In Rot hervorgehobene Mutationen wurden während der Evolution erworben. "Progenitoren" sind nicht direkt nachgewiesen worden, jedoch wurde ihre Existenz auf Basis der Verteilung der Mutationen angenommen. **A)** ISFN und DLBCL haben sich divergent aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt. **B)** ISFN und DLBCL haben sich divergent aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt, wobei aus der ISFN im Verlauf das FL hervorgegangen ist. **C)** DLBCL und FL haben sich direkt aus der ISFN entwickelt und dabei zusätzliche Alterationen erworben.

3.6 Zusammenschau der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte bei allen Proben eine *BCL2*-Translokation nachgewiesen werden. Drei aggressive B-NHL zeigten darüber hinaus Rearrangements von *MYC* (Fall 1, 8 und 9) bzw. *BCL6* (Fall 1). Die klonale Verwandtschaft von ISFN und gepaarten Lymphomen konnte für 9/10 Fälle über das IG (Fall 1, 2, 4, 7, 8, 9 und 10) und/oder den *BCL2*-Bruchpunkt (Fall 1, 3, 6, 7, 8, 9 und 10) bestätigt werden. Bei Fall 5 dienten hingegen die übereinstimmenden Mutationen von *KMT2D* und *IGLL5* sowie das identische atypische *BCL2* FISH Muster als Beweis für einen gemeinsamen klonalen Ursprung von ISFN und DLBCL. Neben *BCL2* waren *CREBBP*, *KMT2D*, *EZH2* und *TNFRSF14* die am häufigsten mutierten Gene, sowohl in den manifesten Lymphomen als auch in den ISFN Läsionen. Auf Basis gemeinsamer und privater Mutationen ließ sich für acht Fälle eine divergente klonale Evolution rekonstruieren (Abb. 13).

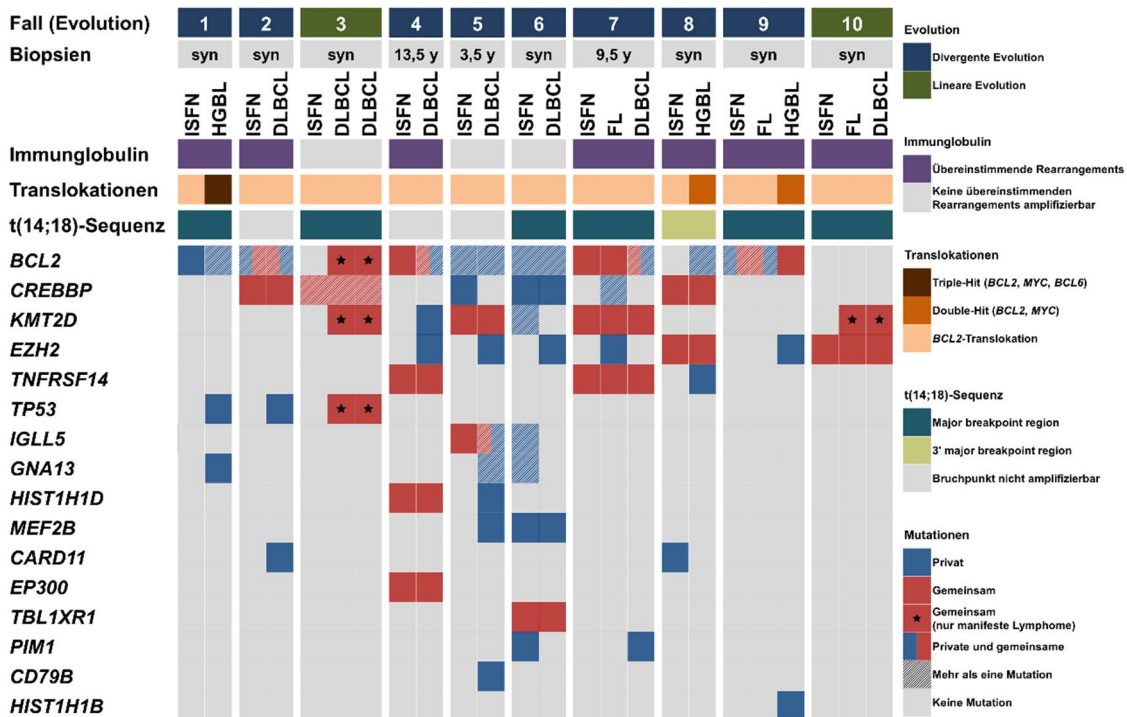


Abbildung 13. Übersicht der Ergebnisse (übernommen aus [96]).

Spalten repräsentieren eine Probe, wobei gepaarte Proben nebeneinander aufgeführt sind. Zeilen stehen für eine Analyse bzw. ein analysiertes Gen. Angegeben sind nur nicht-synonyme Mutationen und Varianten der Spleißstellen. "Biopsien" gibt die Zeitspanne zwischen dem Auftreten der ISFN und der Diagnose des aggressiven B-NHL in Jahren ("y") gerundet auf das nächste Halbjahr an, wobei "syn" für ein synchrones Auftreten steht. In Fall 4 beruht die Annahme einer divergenten Evolution auf einer nicht aufgeführten privaten 5'UTR Mutation des *BCL2*-Gens in der ISFN. Bei Fall 9 bedeutet „private und gemeinsame“ Mutationen von *BCL2*, dass ISFN und FL eine gemeinsame Mutation getragen haben, die nicht im HGBL nachgewiesen werden konnte, wohingegen eine weitere Variante in allen drei Proben vorkam.

4 Diskussion

Unter Verwendung von zehn Fällen mit gepaarten ISFN und DLBCL bzw. HGBL Proben, sowohl *de novo*, als auch mit intermediärem FL, haben wir in dieser Arbeit die Evolution $t(14;18)^+$ aggressiver B-NHL ausgehend von der ISFN als potenzielle Vorläuferläsion untersucht. Dabei konnte die klonale Verwandtschaft aller gepaarten Proben durch den Nachweis eines identischen IG- und/oder *BCL2*-Rearrangements und/oder gemeinsamer somatischer Mutationen bestätigt werden. Durch die Demonstration, dass *de novo* aggressive B-NHL ebenfalls aus der ISFN hervorgehen können, ist es somit erstmalig gelungen, eine prämaligne Vorläuferläsion derartiger Lymphome zu identifizieren. Darüber hinaus konnten unterschiedliche Wege der klonalen Evolution rekonstruiert werden, wobei das häufigste Szenario eines war, bei dem sich die ISFN und das aggressive B-NHL divergent aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt hatten.

4.1 Die ISFN – eine Vorläuferläsion $t(14;18)^+$ aggressiver B-NHL

Sowohl das Fortschreiten der ISFN zum FL als auch die Transformation des FL zum DLBCL oder HGBL sind etablierte Konzepte [1]. Die vorliegenden Daten erweitern das Verständnis dieser malignen Progression und legen nahe, dass $t(14;18)^+$ aggressive B-NHL auch direkt, d.h. ohne intermediäres FL, aus der ISFN hervorgehen können, was in Anbetracht der hohen Frequenz der $t(14;18)$ -Translokation im *de novo* DLBCL ein verbreitetes Phänomen sein könnte [1,59]. Wie bei jeder Neoplasie, bei der man von einer stufenweisen Entwicklung ausgeht, kann das Vorhandensein eines morphologisch und klinisch nicht detektierten („okkulten“) FL in den sechs als *de novo* klassifizierten Fällen nicht komplett ausgeschlossen werden. Jedoch wird unsere Schlussfolgerung auch durch die rezenten, deutlich größer angelegten Analysen der molekularen Landschaft *de novo* entstandener DLBCL gestützt (Abschnitt 1.2.2), die gezeigt haben, dass $t(14;18)^+$ *de novo* DLBCL bzw. DLBCL vom EZB-Subtyp ein Mutationsspektrum aufweisen, welches sich insbesondere hinsichtlich früher Treibermutationen signifikant mit dem des FL überschneidet, was die Existenz einer gemeinsamen Vorläuferpopulation nahelegt [17,19,20]. Eine alternative Erklärung wäre, dass

t(14;18)⁺ *de novo* DLBCL grundsätzlich okkult transformierte FL darstellen, was jedoch angesichts des unterschiedlichen klinischen Verlaufs beider Lymphome unwahrscheinlich ist [11,20].

Für ISFN und DLBCL von Fall 5 konnte kein traditioneller Nachweis einer klonalen Verwandtschaft erbracht werden, da weder das IG-Rearrangement noch der *BCL2*/JH-Bruchpunkt amplifiziert werden konnte. Dennoch zeigten beide Proben gemeinsame Mutationen von *KMT2D* und *IGLL5*, was ebenfalls als Beweis für einen gemeinsamen klonalen Ursprung gewertet werden kann. Darüber hinaus lag in beiden Läsionen eine *BCL2*-Translokation vor, welche sich mittels FISH nur unter Verwendung einer IGH/*BCL2* Dual Color Dual Fusion Sonde durch ein atypisches Translokationsmuster mit nur einem Fusionsignal demonstrieren ließ. Letzteres lässt sich vermutlich auf das Vorliegen eines kryptischen bzw. nicht-kanonischen *BCL2*-Rearrangements zurückführen, welche sich z.T. nicht nur der PCR, sondern auch der FISH mit Break Apart Sonden entziehen [115,116]. In der Literatur beschriebene atypische Translokationskonstellationen sind beispielweise Rearrangements mit einem IG-Leichtkettengen als Translokationspartner oder auch Insertionen des *BCL2*-Gens in den IGH-Lokus [17,115-117]. Speziell eine von Yamamoto *et al.* (2012) beschriebene interstitielle Insertion von *BCL2* in das IGH-Gen ließe sich mit dem Hybridisierungsergebnis der beiden Proben vereinbaren [115]. Eine genauere Charakterisierung wäre jedoch lediglich mit weiterführenden Analysen möglich, wie z.B. der FISH an Metaphase-Chromosomen, die uns wegen der Beschränkung auf archiviertes FFPE-Gewebe nicht zur Verfügung stand [115,116].

In der ISFN von Fall 6 ist es trotz Verwendung klonspezifischer Primer, die anhand der IG-Sequenz des klonal verwandten DLBCL konstruiert worden sind, nicht gelungen, das klonale IG-Rearrangement zu amplifizieren. Der wahrscheinlichste Grund – insbesondere im Kontext der Mutationsanalyse, welche in ISFN und DLBCL jeweils eine Vielzahl von privaten Mutationen demonstriert hat – ist eine sehr frühe Divergenz beider Subklone, die zu stark unterschiedlichen SHM-Signaturen auf den jeweiligen IG geführt hat. Tatsächlich sind Mutationen im Bereich der Primerbindungsstellen ein bekannter Fallstrick der Klonalitäts-

analyse von Lymphomen, welche die Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben [43,118]. Vor allem in Kombination mit eingeschränkter DNA-Qualität besteht die Gefahr falsch polyklonaler Ergebnisse [43,118]. So musste auch in Fall 10 letztendlich auf klonspezifische Primer zurückgegriffen werden, um in der ISFN und den manifesten Lymphomen übereinstimmende PCR-Produkte zu amplifizieren. Dass die Amplifikation initial einzig in der ISFN nicht gelungen ist, könnte in diesem Fall jedoch ebenso daran gelegen haben, dass aus technischen Gründen keine Mikrodissektion durchgeführt werden konnte, wodurch der Anteil reaktiver Zellen zu hoch war. Dafür spricht, dass das klonspezifische Rearrangement in der Lymphotrack[®] Analyse der ISFN zwar nachgewiesen werden konnte, die Monoklonalitätskriterien aber nicht erfüllt wurden.

Auch die Amplifikation des *BCL2*/IGH-Bruchpunktes kann durch Mutationen im Bereich der Primerbindungsstellen unterbunden werden, was eine mögliche Ursache dafür gewesen ist, dass der Nachweis in den ISFN von Fall 3 und 9 ebenfalls nur mit spezifischen Primern gelungen ist. Weitere Faktoren, die die Detektion mittels PCR verhindern können, sind neben nicht-kanonischen *BCL2*-Rearrangements insbesondere Brüche außerhalb der abgedeckten Regionen oder Primerbindungsstellen, die zu weit vom Bruchpunkt entfernt liegen, wodurch sich zu amplifizierende Sequenzen von einer Länge ergeben, die die Möglichkeiten der z.T. stark fragmentierten DNA aus FFPE-Gewebe übersteigen [43,99,104]. Aus diesen Gründen ist die FISH – wie auch in unserer Studie – insgesamt die sensitivere Methode zum Nachweis der t(14;18) [43,119,120].

4.2 Die klonale Dynamik t(14;18)⁺ Lymphome

Anhand der Mutationsdaten konnten wir demonstrieren, dass ISFN und klonal verwandte DLBCL/HGBL häufig Subklone darstellen, die sich divergent voneinander entwickelt haben. Auch die auf der IG-Sequenzierung basierenden phylogenetischen Stammbäume haben eine weitestgehend separate Clusterbildung der ISFN- und aggressiven B-NHL-Sequenzen demonstriert, was mit einem Evolutionsmodell zu vereinbaren ist, bei dem die jeweiligen Proben aus divergenten Subklonen hervorgegangen sind und im Laufe der Zeit abweichende SHM-Muster erworben haben [121]. Unklar bleibt, ob sich die für Fall 3 und 10

rekonstruierte lineare Evolution auch mit umfangreicheren Analysen bestätigt hätte. Im Einklang mit Studien an ISFN/FL-Paaren konnten die ISFN Läsionen dabei nicht nur vor der Diagnose eines klonal verwandten aggressiven B-NHL, sondern auch synchron mit diesen identifiziert werden [76,89,122]. Selbst eine Detektion Jahre nach Diagnose und Therapie des manifesten Lymphoms ist beschrieben [76,84]. Die klinische Relevanz solcher persistierender prämaligener Vorläufer, die vermutlich widerstandsfähiger gegenüber der Standardtherapie sind, liegt insbesondere in ihrem Potential an Krankheitsrückfällen beteiligt zu sein. Tatsächlich haben Untersuchungen von DLBCL- und FL-Rezidiven gezeigt, dass das primäre Lymphom und das Rezidiv häufig divergente Subklone repräsentieren, die unabhängig voneinander aus einem gemeinsamen Progenitor (CPC, engl. *common progenitor clone*) hervorgegangen sind [77,123,124]. Analoge Beobachtungen wurden für die Transformation des FL gemacht, bei der das transformierte FL bzw. DLBCL ebenfalls häufig divergent entsteht und nicht wie traditionell angenommen durch die Akquisition zusätzlicher Alterationen des primären Tumor(sub)klons [74,125]. Die Existenz einer solchen CPC-Population konnte auch in zwei Publikationen veranschaulicht werden, die das Auftreten eines FL- bzw. DLBCL-Paares in Spender und Empfänger Jahre nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation untersucht haben [126,127]. In beiden Studien ließen sich zusätzlich zur klonalen Verwandtschaft der jeweiligen Lymphome neben privaten auch multiple gemeinsame Alterationen demonstrieren, die demnach bereits in einem Vorläufer vorgelegen haben mussten, welcher im Rahmen der Stammzellspende übertragen worden war [126,127]. Für das FL-Paar konnte die vermutete CPC-Population als zirkulierende FLLC im peripheren Blut des Spenders identifiziert werden – eine Stellung, die FLLC angesichts unserer Daten auch für $t(14;18)^+$ DLBCL einnehmen können [55,85,127].

Die IGH-Sequenzdaten haben außerdem einen Einblick in den Prozess der klonalen Selektion gewährt. So lässt die ausgeglichene Verteilung der Subklone in den ISFN Läsionen vermuten, dass auf dieser Stufe der malignen Progression noch kein Subklon einen entscheidenden Selektionsvorteil erworben hat. Im Gegensatz dazu wiesen die aggressiven B-NHL ein oder zwei sehr do-

minante Subklone auf, die möglicherweise nach dem Erwerb entscheidender Alterationen entstanden sind, welche die klonale Fitness gesteigert und die Weichen für die (hoch)maligne Transformation gestellt haben.

4.3 *BCL2* Mutationen als Indikator für prolongierte AID-Aktivität

Die Frage, welche Alterationen einen solchen Selektionsvorteil mit sich bringen können, war ebenfalls ein zentraler Punkt dieser Arbeit. In unserem Kollektiv war *BCL2* das am häufigsten mutierte Gen und auch der Großteil der ISFN Läsionen demonstrierte gleich mehrere Varianten. Diese überdurchschnittliche Anzahl von Mutationen lässt sich auf die Verlagerung des *BCL2*-Gens in den Bereich des IGH-Lokus' und dessen Enhancers zurückführen, wodurch *BCL2* unter den Einfluss der AID gerät [35,77,128]. So wurde gezeigt, dass die Translokation t(14;18) signifikant mit Mutationen auf dem translozierten *BCL2*-Allel assoziiert ist und dass t(14;18)⁺ Lymphome eine deutlich höhere Anzahl von *BCL2* Mutationen tragen [128-130]. Die Beteiligung der SHM-Maschinerie konnte dabei aus typischen Charakteristika der AID-vermittelten Mutagenese abgeleitet werden, wie der Verteilung der Mutationen insbesondere in einem Bereich 3' der Promotorregion, der Präferenz bekannter Hotspot-Motive sowie dem überwiegenden Auftreten von Punktmutationen mit einem positiven Verhältnis von Transitionen zu Transversionen [128,129,131]. Auch die von uns analysierten Proben trugen vor allem Punktmutationen, die insgesamt ein positives Transitions/Transversions-Verhältnis gezeigt haben und vorrangig im Bereich des zweiten Exons – und damit näher am Promotor – aufgetreten sind. Auf eine weiterführende statistische Analyse ist allerdings verzichtet worden, da mit unserem Panel primär die kodierenden Bereiche von *BCL2* abgedeckt worden sind, wodurch sich die mit am stärksten betroffene Region 5' des zweiten Exons unserer Analyse entzogen hat und somit höchstwahrscheinlich nur ein Teil aller Mutationen nachgewiesen werden konnte [128,129]. Im FL ist der Nachweis von *BCL2* Mutationen darüber hinaus z.T. mit einer frühen Transformation zum DLBCL und einem aggressiveren klinischen Verlauf assoziiert worden [132,133]. Angesichts des häufigen Auftretens bereits in den Vorläuferläsionen, sind derartige Mutationen jedoch vermutlich primär als Indikator für die Aktivität der AID zu werten und bestätigen somit im Zusammenhang mit der

ausgeprägten intraklonalen Heterogenität des IGH-Gens und dem Nachweis neuer N-Glykosylierungsstellen in dessen V-Region die Annahme, dass die ISFN prolongierter AID-Aktivität unterliegt [69,77,87,89,134].

4.3.1 Die Rolle der AID in der Pathogenese maligner Lymphome

Die Aktivität der AID und die damit einhergehende genetische Instabilität gelten als wichtige Faktoren in der Pathogenese von lymphatischen Neoplasien und werden als Voraussetzung für die Entstehung von Lymphomen angesehen, die sich aus Keimzentrums-B-Zellen ableiten [77,135-137]. So kommt es durch die CSR und in geringerem Maße durch die SHM zu DNA-Doppelstrangbrüchen, die insbesondere als Basis onkogener Translokationen (siehe Abschnitt 1.4) aber auch von Amplifikationen und Deletionen einzelner Gene bzw. größerer Chromosomenabschnitte angesehen werden [48,74,77,138-140]. Solche Kopienzahlvariationen (CNV, engl. *copy number variation*) spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Progression maligner Lymphome und können in geringer Anzahl ebenfalls bereits in der ISFN nachgewiesen werden [17,76,141-143]. Darüber hinaus kann die AID auch zu Punktmutationen in Genen führen, die – in Abgrenzung gegenüber *BCL2* in $t(14;18)^+$ Lymphomen – nicht in den IG-Lokus verlagert worden sind [39]. Zielgene dieses Prozesses, der als aberrante somatische Hypermutation (aSHM) bekannt ist, sind z.B. *MYC* und *IRF4* [17,39,40]. Die Bedeutung der aSHM in der frühen Phase der Pathogenese ist jedoch nicht abschließend geklärt. So ist sie meist als spätes Phänomen beschrieben worden, welches vor allem beim DLBCL auftritt und beim FL mit der Transformation assoziiert ist [40,74,144]. Allerdings konnten Sungalee *et al.* (2014) in einem Mausmodell zeigen, dass langlebige *BCL2*-überexprimierende B-Zellen im Rahmen wiederholter GC-Passagen genomweit Punktmutationen erworben haben, deren Signatur auf eine AID-bedingte Mutagenese schließen ließ [55]. Bedenkt man, dass humane FLLC und ISFN der SHM in ähnlichem Maße ausgesetzt sind, was durch die Vielzahl von *BCL2* Mutationen weiter untermauert wird, liegt es nahe, dass diese Form der AID-vermittelten genetischen Instabilität ebenfalls schon in den Vorläuferläsionen eine Rolle spielt [49,55,60,87]. Dazu passend konnten auch Mutationen von *PIM1* und

IGLL5, weitere bekannte Ziele der aSHM, erstmalig in zwei ISFN Läsionen identifiziert werden [17,39,145].

4.3.2 N-Glykosylierungsstellen bieten einen entscheidenden Selektionsvorteil

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien konnten wir den Erwerb von Glykosylierungsstellen als frühes Ereignis in der Pathogenese bestätigen, wobei die Verteilung insbesondere auf die antigenbindenden CDR sowohl mit der Literatur als auch mit ihrer vermuteten Bedeutung für die Interaktion mit Lektinen des Mikromilieus im Einklang steht [62,67,87,88]. Der Nachweis abweichender Glykosylierungsmotive in den klonal verwandten Proben einiger Fälle ist dabei angesichts der prolongierten AID-Aktivität und der damit einhergehenden SHM, der die verschiedenen Läsionen ausgesetzt sind, wenig überraschend. Vielmehr unterstreicht die Tatsache, dass solche Glykosylierungsstellen trotz der SHM erhalten bleiben – selbst im Laufe einer langjährigen Evolution, wie es anhand der Fälle 4 und 7 demonstriert werden konnte – den mit ihnen verbundenen Selektionsvorteil. Odabashian *et al.* (2020) konnten bei sequenziell entnommenen FL Proben ebenfalls demonstrieren, dass einmal erworbene Glykosylierungsstellen einer positiven Selektion unterlagen und bei der überwiegenden Mehrheit der Subklone im Rezidiv und auch nach Transformation noch nachgewiesen werden konnten [146]. Subklone, bei denen es durch SHM nicht nur zu einer veränderten Aminosäurekomposition weiterhin bestehender Motive, sondern zu einem kompletten Verlust aller Glykosylierungsstellen gekommen war, wurden hingegen eliminiert [146]. Dennoch scheint es in den aggressiven B-NHL von Fall 8 und 9 zu einem solchen Verlust gekommen zu sein. Tatsächlich ist dabei jedoch nicht auszuschließen, dass die Proben zusätzliche Glykosylierungsstellen getragen haben, die sich lediglich unserer Sequenzierung entzogen haben, z.B. in den V-Regionen der IG-Leichtketten-Gene [62,146]. Vor dem Hintergrund, dass es sich bei beiden Läsionen um HGBL handelt, lässt sich alternativ vermuten, dass die durch Glykosylierungsstellen vermittelte BCR-Aktivierung aufgrund der *MYC*-Translokation nicht mehr zwingend benötigt wurde – insbesondere da *MYC* häufig ebenfalls in den IG-Lokus verlagert wird, was die Expression eines funktionellen IG in Lympho-

men, die bereits die t(14;18) tragen i.d.R. unterbinden sollte [1,17,147,148]. Auch dass MYC eines der nachgeschalteten Moleküle der BCR-Kaskade ist und dass Linley *et al.* (2015) zeigen konnten, dass FL-Zellen, anders als normale B-Lymphozyten, nach der Interaktion mit dem Lektin DC-SIGN vermehrt MYC exprimieren, würde zu dieser Annahme passen [67,149]. Letztendlich lässt sich über einen solchen Zusammenhang zum aktuellen Zeitpunkt angesichts des Mangels an entsprechenden Studien allerdings nur spekulieren.

4.4. Das Alterationsspektrum t(14;18)⁺ Lymphome

Das in unserem Kollektiv identifizierte Mutationsspektrum steht mit den publizierten Daten zum FL und t(14;18)⁺ DLBCL bzw. DLBCL vom EZB-Subtyp im Einklang. So konnte gezeigt werden, dass beide Lymphome besonders häufig Alterationen der epigenetischen Regulatoren *CREBBP*, *EZH2*, *KMT2D* und *EP300* sowie des Gens *TNFRSF14* tragen, welches für einen Rezeptor der Tumornekrosefaktor-Familie kodiert [17,19,20,59,74,125]. Dazu passend und in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien demonstrieren wir, dass Alterationen von *CREBBP* und in geringerem Maße auch von *EZH2*, *KMT2D*, *EP300* und *TNFRSF14* bereits in der ISFN detektiert werden können [76,89]. Erstmals in den Vorläuferläsionen nachgewiesen wurden neben Mutationen der bereits angesprochenen Gene *BCL2*, *PIM1* und *IGLL5* auch Alterationen von *CARD11*, *HIST1H1D*, *GNA13*, *MEF2B* und *TBL1XR1*. Mutationen von *IRF4*, *MYD88*, *TNFAIP3*, *BCL6*, *FOXO1*, *BTG1/2* und *HIST1H1C/E* fanden sich hingegen in keiner der analysierten Proben, was vermutlich auf die geringe Größe unseres Kollektivs zurückgeführt werden kann. So ist *FOXO1* beispielsweise nur in ca. 5-10 % aller FL mutiert [150,151]. Gene wie *MYD88*, *IRF4*, *TNFAIP3* und *BTG1/2* sind darüber hinaus insbesondere mit dem ABC-Subtyp des DLBCL assoziiert, weswegen eine zentrale Rolle in der Pathogenese t(14;18)⁺ aggressiver B-NHL nicht zu erwarten ist [17,20].

4.4.1 Frühe Treibermutationen

Alterationen von *CREBBP* (engl. *CREB Binding Protein*) und dem seltener betroffenen Gen *EP300* (*E1A Binding Protein P300*) finden sich im FL je nach Publikation in 33 bis 68 %, sowie in ca. 10 % [150,152]. Im DLBCL können sie

in 17 bis 29 % (*CREBBP*) und ebenfalls in ca. 10 % (*EP300*) aller Proben nachgewiesen werden [17,152]. Speziell in DLBCL vom EZB-Subtyp sind die Mutationsraten mit ca. 53 % bzw. 28 % jedoch deutlich höher [19]. Beide Gene sind i.d.R. von inaktivierenden Mutationen oder Deletionen betroffen und kodieren für Acetyltransferasen, die vor allem Lysinreste von Histonproteinen acetylieren, was durch die daraus resultierende offenere Chromatinstruktur die aktive Transkription genomweit begünstigt [153,154]. Darüber hinaus beeinflussen sie durch eine direkte Acetylierung eine Vielzahl von Proteinen [152,155]. Insbesondere *CREBBP* Mutationen werden allgemein hin als frühe Treiber angesehen, welche die Progression zu einem weiter fortgeschrittenen Klon begünstigen [75,77,89,150,152,156]. Diese Annahme stützend war *CREBBP* nach *BCL2* sowohl das Gen, das am häufigsten in der ISFN mutiert war, als auch das Gen, in dem die meisten gemeinsamen Mutationen zwischen ISFN und gepaarten manifesten Lymphomen gezeigt werden konnten. In den Proben von Fall 4 fand sich darüber hinaus eine gemeinsame Mutation von *EP300*. Wegen der engen funktionellen Verwandtschaft von *CREBBP* und *EP300* und der Tatsache, dass sich Mutationen in beiden Genen meist gegenseitig ausschließen, wird von einer analogen Rolle in der Pathogenese ausgegangen [59,152,157]. Ein zentraler Mechanismus ist dabei vermutlich die Dysregulation von *BCL6*, welches normalerweise über die Acetylierung durch *CREBBP* bzw. *EP300* inaktiviert wird [152,158]. *BCL6* gilt als Hauptregulator der Keimzentrumsreaktion und führt unter anderem zur Hochregulation der *AID*, zu einer für die Antikörperreifung benötigten gesteigerten Toleranz gegenüber DNA-Schäden und zur Inhibition der terminalen Differenzierung zur Plasmazelle [159,160]. Ein Funktionsverlust von *CREBBP* und *EP300* bewirkt außerdem einen Wegfall des aktivierenden Effekts auf den Tumorsuppressor *p53*, wodurch die zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden zusätzlich gestört wird [152,157,161].

Auch *KMT2D*, *TNFRSF14* und *EZH2* befanden sich unter den Genen, die mehrfach bereits in den ISFN Läsionen mutiert waren. Alterationen von *KMT2D* gehören zu den verbreitetsten genetischen Veränderungen in FL und EZB-DLBCL und zeigen sich in ca. 85 % bzw. 54 % der Fälle [1,19]. *TNFRSF14* ist mit einer Frequenz von 45 bis 65 % in FL und ca. 66 % in EZB-DLBCL Proben ähnlich

häufig von Mutationen und/oder Deletionen betroffen [1,19,162]. Darüber hinaus ist der Verlust von Teilen der chromosomalen 1p36 Region, welche unter anderem das *TNFRSF14*-Gen enthält, eine der prävalentesten CNV in FL und DLBCL [1,17,163,164]. *EZH2* Mutationen finden sich im FL in 20 bis 27 % und im EZB-DLBCL in ca. 44 % [19,125,165]. Im Gegensatz zu *CREBBP* sind Veränderungen in allen drei Genen jedoch sowohl als frühe Treiber als auch als spätere Akzeleratoren beschrieben worden [74,75,123,125,150,156]. Unsere Daten spiegeln diese Heterogenität wider: Wir bestätigen, dass Mutationen z.T. Jahre vor der malignen Transformation in den wahrscheinlich frühesten Stadien der Erkrankung auftreten und vermutlich als frühe Treiber agieren können [76,89]. Gleichzeitig fanden sich Mutationen von *KMT2D* und *EZH2* in jeweils 3/6 bzw. 5/7 Fällen nur in den manifesten Lymphomen, was nahelegt, dass sie erst später erworben wurden und den jeweiligen Subklon womöglich in Richtung der malignen Transformation befördert haben.

Sowohl *KMT2D* (engl. *Lysine Methyltransferase 2D*) als auch *EZH2* (*Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*) kodieren für Methyltransferasen, die das Histonprotein 3 (H3) an unterschiedlicher Stelle methylieren [59]. Dabei konnte die durch *KMT2D* auf Lysin 4 übertragene Methylgruppe (H3K4) mit einer aktiven Transkription assoziiert werden, wohingegen *EZH2* als Teil des Polycomb Repressive Complex 2 für die Trimethylierung von Lysin 27 (H3K27) verantwortlich ist, was eine Genrepression zur Folge hat [166,167]. *KMT2D* ist i.d.R. von inaktivierenden Alterationen betroffen, weswegen von einer Funktion als Tumorsuppressor ausgegangen wird [59]. Diese Annahme konnte durch zwei Mausmodelle gestützt werden, die gezeigt haben, dass der Verlust von *KMT2D* die Proliferation und das Überleben von Keimzentrums-B-Zellen begünstigt und die Differenzierung zur Plasmazelle beeinträchtigt [168,169]. *EZH2* Mutationen verursachen hingegen eine gesteigerte Trimethylierungsaktivität und finden sich dabei überwiegend in dem von uns sequenzierten Hotspot Tyrosin 646 [165]. Ähnlich wie *BCL6* fungiert *EZH2* als elementarer Regulator des Keimzentrumsphänotyps und unterdrückt als solcher u.a. die terminale Differenzierung und den Austritt aus der Keimzentrumsreaktion sowie die Expression verschiedener antiproliferativer Gene – darunter auch bekannte

Tumorsuppressoren wie *CDKN1A* [170,171]. Über die physiologische Funktion des vom *TNFRSF14*- (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 14*) Gen kodierten Rezeptors HVEM (*Herpesvirus Entry Mediator*) ist hingegen bisher wenig bekannt, jedoch geht man von einer Beteiligung an der Immunmodulation aus. So wurde gezeigt, dass abhängig vom Liganden sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auf T-Lymphozyten vermittelt werden können [172]. *TNFRSF14* wird die Rolle eines Tumorsuppressors zugesprochen [162,164]. Dazu passend konnte ein Funktionsverlust mit einer, durch den Wegfall der inhibitorisch wirkenden Bindung von BTLA (*B- and T-Lymphocyte Attenuator*) verursachten, vermehrten Aktivierung der BCR-Kaskade sowie der Induktion eines tumorfördernden Mikromilieus assoziiert werden [173].

Insbesondere bei Alterationen von *CREBBP*, *KMT2D* und *EZH2* geht man davon aus, dass sie eine zentrale Rolle für den Differenzierungsarrest der t(14;18)⁺ Zellen im Keimzentrumsprogramm spielen, welches durch die konstitutive Expression der AID und die gesteigerte Toleranz gegenüber DNA-Schäden die Akkumulation weiterer pathogener Veränderungen begünstigt [58,61,174,175]. Die Tatsache, dass die Mehrheit der FL und t(14;18)⁺ DLBCL, inklusive eines Großteils der Proben unseres Kollektivs, mindestens zwei Alterationen von Genen tragen, die an der Chromatinmodifikation beteiligt sind, lässt dabei eine wechselseitige Beeinflussung bzw. ein Zusammenspiel vermuten [17,19,150,174]. Über den Grund für das heterogene zeitliche Auftreten von *KMT2D* und *EZH2* Mutationen kann nach heutigem Wissensstand allerdings nur gemutmaßt werden. Denkbar und mit unseren Daten vereinbar wäre z.B., dass *CREBBP* Alterationen in der frühen Phase der Erkrankung den größeren Selektionsvorteil bieten. Kommt es in einem Subklon mit *CREBBP* Alteration daraufhin zu einer Mutation von *KMT2D* oder *EZH2*, könnte dies zu einer Konsolidierung des Keimzentrumsphänotyps und einer Akzeleration der malignen Progression führen. Die Stellung als früher Treiber nehmen beide Gene hingegen eventuell insbesondere in Abwesenheit einer vorher erworbenen *CREBBP* Alteration ein. Zweifelsohne spielen jedoch zahlreiche zusätzliche Faktoren eine Rolle, wie z.B. Gendosisveränderungen durch CNV oder Alterationen anderer Gene, die in dieses komplexe funktionelle Netzwerk eingreifen

[17,125]. So führen auch Mutationen des Transkriptionsfaktors MEF2B (engl. *Myocyte Enhancer Factor 2B*), die sich in drei unserer Proben inklusive der ISFN von Fall 6 gefunden haben, zu einer aberranten Expression des Keimzentrumsregulators BCL6 [125,176]. Bei Mutationen der Linker-Histon Gene *HIST1H1B-E* geht man ebenfalls von einer Interaktion mit Alterationen von *CREBBP/EP300*, *KMT2D* und *EZH2* aus – auch wenn ihre Auswirkung bisher nur unzureichend verstanden ist [17,174,177]. In der Tat gehörte *HIST1H1D* neben *EP300* in Fall 4 zu den Genen, in denen im DLBCL und im ca. 10 Jahre zuvor entnommenen divergenten ISFN Subklon eine gemeinsame Mutation gezeigt werden konnte, was den damit einhergehenden Selektionsvorteil unterstreicht.

In Fall 6 konnte von den zahlreichen Alterationen in ISFN und DLBCL, darunter Mutationen von *BCL2*, *CREBBP*, *KMT2D* und *EZH2*, überraschend nur eine einzige *TBL1XR1* Variante in beiden Komponenten nachgewiesen werden. Somit muss die Mutation bereits vor der Divergenz beider Subklone in einem vermeintlich sehr frühen Vorläufer erworben worden sein und hat wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle als Treiber eingenommen. Faktisch sind Alterationen von *TBL1XR1* (engl. *Transducin Beta Like 1 X-Linked Receptor 1*), das für einen nukleären Rezeptor kodiert, dem u.a. eine regulatorische Rolle im NF- κ B Signalweg zugeschrieben wird, als frühes klonales Ereignis in der Pathogenese des DLBCL beschrieben worden, jedoch insbesondere bei ABC-DLBCL, die molekular dem MCD-Subtyp zugeordnet werden können [17,19,20].

4.4.2. Mit der aggressiven Transformation assoziierte Alterationen

Die Transformation des FL zum DLBCL bzw. HGBL ist allgemein mit einer größeren genetischen Komplexität vergesellschaftet [74,125]. Analog zur frühen Pathogenese scheint es jedoch keine definierte Sequenz genetischer Veränderungen zu geben, die für den Übergang des FL in ein solches aggressives B-NHL verantwortlich ist [75,125]. Dennoch gibt es Alterationen, die einheitlich mit der aggressiven Phase der Erkrankung assoziiert werden konnten – darunter der häufig biallelische Funktionsverlust von p53 sowie das bereits angesprochene Rearrangement des Transkriptionsfaktors MYC (Abschnitt 4.3.2), dessen

daraus resultierende Überexpression eine Dysregulation des Zellzyklus' mit gesteigerter Proliferation zur Folge hat [1,74,149,178]. Auch in unserem Kollektiv konnten entsprechende Veränderungen nur in den aggressiven Komponenten nachgewiesen werden, wenngleich ein Vorliegen in sehr kleinen ISFN Subklonen, die sich selbst der hochsensitiven Einzelamplikon-Sequenzierung entzogen haben, nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Akquisition solcher Alterationen in einem $t(14;18)^+$ Vorläufer die maligne Transformation derart beschleunigt, dass die Stufe des indolenten Lymphoms „übersprungen“ wird und die Erkrankung sich primär als DLBCL oder HGBL manifestiert. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die meisten *MYC*-Translokationen durch die mutagene Aktivität der AID verursacht werden, weswegen das Potential für den Erwerb offenkundig schon in FLLC und der ISFN vorliegt und somit mutmaßlich ein Großteil der *de novo* HGBL mit *BCL2/MYC*-DH aus diesem Progenitorpool hervorgeht [1,137,179]. Auch das Vorliegen einer *BCL6*-Translokation konnte z.T. mit einer frühen Transformation zum DLBCL assoziiert werden [180,181]. Allerdings lassen sich derartige Rearrangements vergleichsweise häufig auch im nicht transformierten FL nachweisen, so dass sie, wenn überhaupt, einen weniger starken Treiber in Richtung high-grade Malignität darstellen – möglicherweise, da *BCL6* bzw. der durch *BCL6* vermittelte Keimzentrumsphänotyp schon frühzeitig durch andere Alterationen dysreguliert wird [1,181]. *CD79B*, ein Gen, das eine Untereinheit des BCR kodiert und dessen Mutationen vermutlich zu einer konstitutiven Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden beitragen, war in unserem Kollektiv ebenfalls nur in den aggressiven B-NHL alteriert [182]. In größer angelegten Studien zur Pathogenese des FL sind *CD79B* Mutationen jedoch als nicht phasenspezifisch bzw. teilweise sogar als frühes Ereignis beschrieben worden, so dass eine zentrale Rolle in der aggressiven Transformation $t(14;18)^+$ Lymphome insgesamt unwahrscheinlich ist [74,125].

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Studie ist es erstmalig gelungen, die Evolution $t(14;18)^+$ aggressiver B-NHL ausgehend von der ISFN zu analysieren und zu demonstrieren, dass auch *de novo* DLBCL und HGBL aus dieser Vorläuferpopulation

hervorgehen können. Dabei ließ sich nachweisen, dass es, analog zur klonalen Dynamik der Entstehung und Transformation des FL, häufig zum Auftreten divergenter Subklone mit abweichendem Alterationsmuster kommt. Unsere Ergebnisse unterstreichen, dass bereits die ISFN einer prolongierten AID-vermittelten Mutagenese unterliegt und zeigen darüber hinaus, dass ISFN Läsionen eine überraschende Anzahl sekundärer genetischer Veränderungen tragen können. Dies lässt vermuten, dass die morphologische Definition der ISFN ein Spektrum von Läsionen umfasst, die sich aus molekularer Sicht in unterschiedlichen Stadien der malignen Progression befinden. Somit ist die Identifikation prognostischer Marker, die eine individuellere Aussage über das bisher nur schlecht definierte Risiko einer Progression zum manifesten Lymphom erlauben, eine wichtige Aufgabe zukünftiger Studien, die jedoch vermutlich einer weitreichenderen genetischen und epigenetischen Charakterisierung bedarf. Angesichts seiner bedeutenden Rolle für die Pathogenese des FL scheint es dafür auch unerlässlich, das Mikromilieu von ISFN Läsionen zu analysieren und es mit dem der manifesten Lymphome zu vergleichen, beispielsweise mithilfe von Genexpressionsanalysen und/oder Multiplex-Gewebebildgebungsverfahren wie dem CODEX-System (engl. *Co-Detection by Indexing*) [73,183]. Außerdem muss der Fragestellung nachgegangen werden, welche Alterationen bzw. Umstände letztendlich eher zur Progression in Richtung FL oder „direkt“ zum aggressiven B-NHL führen und inwieweit bzw. ob sich Unterschiede zwischen beiden Szenarien bereits auf der Stufe der ISFN demonstrieren lassen. Am vorliegenden Kollektiv waren deutlich umfangreichere Analysen wegen der meist begrenzten Menge an Material der ISFN Proben kaum realisierbar. Dass wegen der Seltenheit identifizierbarer ISFN Läsionen z.T. auf älteres FFPE-Gewebe mit eingeschränkter DNA-Qualität zurückgegriffen werden musste, hat den Umfang durchführbarer Analysen weiter limitiert und wegen vermehrter Sequenzierungsartefakte auch die Detektionsschwelle für Mutationen in den NGS-Analysen erhöht. Nichtsdestotrotz ist es durch gezieltes Sequenzieren vermuteter früher Treiber und der in FL und DLBCL mit am häufigsten mutierten Gene sowie eine systematische

Validierung detektierter Varianten gelungen, entscheidende Erkenntnisse über die Pathogenese $t(14;18)^+$ aggressiver B-NHL zu gewinnen.

Angesichts ihres Potentials als Reservoir für Rezidive zu dienen, ist die erstmalige Identifikation und Charakterisierung einer derartigen Vorläuferpopulation für das DLBCL auch aus klinischer Sicht von großer Bedeutung und könnte dazu beitragen, das Langzeitüberleben von Patienten mit $t(14;18)^+$ DLBCL zu verbessern. Beim FL ist es bereits als wichtiger Aspekt zukünftiger Therapien anerkannt worden, auch diesen Vorläuferpool anzugehen – etwas, das mit aktuellen Therapieregimen nicht zu gelingen scheint [9,72,184,185]. Mutationen in epigenetischen Regulatoren gelten allgemein als aussichtsreiche Kandidaten für eine gezielte Therapie [72,125,152]. Der verminderten Acetylierung bzw. Methylierung in Folge von *CREBBP/EP300* und *KMT2D* Alterationen könnte beispielsweise mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACI) und H3K4-Demethylase-Inhibitoren begegnet werden [152,157,169]. Bei Patienten mit therapieresistentem oder relabiertem FL hat der pan-HDACI Abexinostat in einer Phase II Studie bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt, wobei sich Verträglichkeit und Effektivität womöglich durch Isoform-spezifische Inhibitoren noch verbessern lassen [174,186-188]. So konnte ein speziell gegen HDAC3 gerichteter Inhibitor den durch *CREBBP* Mutationen verursachten molekularen Phänotyp in einer DLBCL-Zelllinie rückgängig machen und das Tumorstadium in einem DLBCL-Xenograft-Mausmodell signifikant reduzieren [189]. Mit EZH2 Inhibitoren wie Tazemetostat konnten *in vitro* und in klinischen Studien u.a. an *EZH2*-mutierten, therapieresistenten FL ähnlich positive Resultate erzielt werden, so dass 2020 eine beschleunigte Zulassung durch die US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel erfolgt ist [190-193]. Es scheint also plausibel, durch die Gabe solcher Wirkstoffklassen, möglicherweise auch im Sinne einer Erhaltungstherapie, dem durch diese Alterationen induzierten epigenetischen Programm bereits in den Vorläufern entgegenwirken zu können und somit das Potential für die Akkumulation zusätzlicher Mutationen und folglich das Risiko für Rezidive zu reduzieren – angesichts unserer Daten nicht nur beim FL, sondern auch bei $t(14;18)^+$ DLBCL/HGBL [72,174].

Die Abhängigkeit von N-Glykosylierungsmotiven über lange Strecken der Evolution eröffnet mit der Inhibition der durch sie vermittelten Interaktion mit dem Mikromilieu einen weiteren vielversprechenden Therapieansatz [146,194]. Als potenzielle Strategien dafür gelten z.B. Kohlenhydratpolymere, die um die Bindung mit DC-SIGN konkurrieren, oder Mannose-spezifische Antikörper [58,184]. Beides ist für die Behandlung des Humanen Immundefizienz-Virus bereits in Erforschung und könnte in Zukunft womöglich mit den oben genannten Modalitäten kombiniert werden [195,196]. So ließe sich ggf. auch das Problem einer unzureichenden Wirksamkeit in divergenten Subklonen umgehen, welches bei einer alleinigen Therapie mit Substanzen, die gegen bestimmte Alterationen gerichtet sind angesichts der ausgeprägten intraklonalen Heterogenität dieser Vorläuferpopulation(en) aufkommen könnte. Eines Tages könnte es sogar realisierbar sein, derartige Therapien präventiv einzusetzen, um die maligne Transformation der Vorläuferläsionen zum FL oder DLBCL von vornherein zu verhindern.

5 Zusammenfassung

Die *in situ* folliculäre Neoplasie (ISFN) ist eine prämaligne Vorläuferläsion des folliculären Lymphoms (FL). Sie zeichnet sich durch eine Besiedlung von Keimzentren durch monoklonale B-Zellen in ansonsten unauffälligem reaktiven lymphatischen Gewebe aus und kann vor allem durch ihre intensive BCL2-Expression identifiziert werden – ein Umstand, der auf die für das FL charakteristische BCL2-Translokation t(14;18)(q32;q21) zurückzuführen ist. Das FL kann seinerseits in ein diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL) übergehen. Häufiger als durch die Transformation eines FL manifestiert sich das DLBCL allerdings *de novo*. Für derartige DLBCL konnte bisher keine Vorläuferläsion identifiziert werden. Angesichts der hohen Frequenz der t(14;18) nicht nur beim transformierten, sondern auch beim *de novo* DLBCL, insbesondere vom Keimzentrum-B-Zell-artigen (GCB) Subtyp, haben wir jedoch die Hypothese aufgestellt, dass letztere ebenfalls aus der ISFN hervorgehen können und uns zum Ziel gemacht, die klonale und genetische Evolution der ISFN zum DLBCL mit und – wenn möglich – ohne „intermediäres“ FL zu analysieren. Dafür wurde nach Patienten mit DLBCL gesucht, bei denen zusätzlich reaktives lymphatisches Gewebe vorhanden war, um dieses mittels BCL2-Färbung auf das Vorliegen einer ISFN zu untersuchen. Die klonale Verwandtschaft der Proben wurde über vergleichende Klonalitätsanalysen, den Abgleich der t(14;18)-Bruchpunktsequenzen und Next-Generation Sequencing (NGS) des Immunglobulinschwerkettengens (IGH) mit dem LymphoTrack® Assay analysiert. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und NGS wurden die Proben auf Rearrangements von BCL2, MYC und BCL6 sowie auf Alterationen von 26 in FL und DLBCL häufig mutierten Genen untersucht.

Insgesamt konnten zehn Fälle mit gepaarten ISFN und DLBCL Proben identifiziert werden, davon sechs *de novo* DLBCL und vier, die aus einem FL entstanden waren. Drei DLBCL zeigten zusätzlich zur Translokation t(14;18) ein MYC-Rearrangement und konnten somit als high-grade B-Zell-Lymphom (HGBL) klassifiziert werden. Die klonale Verwandtschaft von ISFN und DLBCL/HGBL ließ sich in allen zehn Fällen durch die Demonstration eines identischen Immun-

globulin- und/oder *BCL2*-Rearrangements und/oder gemeinsamer somatischer Mutationen bestätigen. Dabei waren die epigenetischen Regulatoren *CREBBP*, *KMT2D* und *EZH2*, der Oberflächenrezeptor *TNFRSF14* sowie *BCL2* diejenigen Gene, die insgesamt und auch speziell in der ISFN am häufigsten mutiert waren. Auch die für das FL typischen N-Glykosylierungsmotive in den variablen Regionen des Immunglobulins (IG), die eine Bindung von Lektinen des Mikromilieus und damit eine antigenunabhängige Aktivierung der B-Zell-Rezeptor Kaskade ermöglichen sollen, konnten regelmäßig bereits in der ISFN nachgewiesen werden. Basierend auf der Verteilung gemeinsamer und privater Mutationen in den gepaarten Proben ließen sich zwei Szenarien der klonalen Evolution rekonstruieren. In 8/10 Fällen hatten sich DLBCL/HGBL, ISFN und, falls vorhanden, FL divergent aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt, wohingegen die lineare Evolution der analysierten ISFN zum DLBCL selten war.

Mit dieser Studie ist es erstmals gelungen die Evolution $t(14;18)^+$ aggressiver B-NHL ausgehend von der ISFN zu analysieren und zu demonstrieren, dass *de novo* DLBCL/HGBL ebenfalls aus dieser Vorläuferläsion hervorgehen können, wobei es, analog zur Entstehung des FL, häufig zur divergenten Evolution unterschiedlicher Subklone kommt. Neben bereits in vorangegangenen Studien in der ISFN demonstrierten Alterationen, insbesondere von epigenetischen Regulatoren, die als Treibermutationen von FL und $t(14;18)^+$ DLBCL gelten, konnten erstmalig (meist multiple) *BCL2* Mutationen nachgewiesen werden. Letztere bestätigen, dass die Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID), die physiologisch für die Affinitätsreifung des IG verantwortlich ist, deren prolongierte Aktivität jedoch eine wichtige Ursache genetischer Instabilität in FL und DLBCL darstellt, schon in der ISFN dereguliert ist. Da persistierende Vorläufer – vermutlich widerstandsfähiger gegenüber der Standardtherapie – als Reservoir für Rezidive angesehen werden, ermöglicht die Identifikation und Charakterisierung einer solchen Läsion für das $t(14;18)^+$ DLBCL u.a. die Prognose betroffener Patienten durch die Entwicklung gezielter Therapien zu verbessern. Potenzielle Ansätze sind z.B. Substanzen, die der durch *CREBBP* Alterationen verursachten epigenetischen Umprogrammierung entgegenwirken oder die durch Glykosylierungsmotive vermittelte Interaktion mit dem Mikromilieu unterbinden.

6 Literaturverzeichnis

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Pileri SA, Jaffe ES, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017.
2. Klapper W, Wacker HH. Follikuläre Lymphome und Mantelzelllymphome. *Der Pathologe*. 2007;28(1):21-8.
3. Friedberg JW, Taylor MD, Cerhan JR, Flowers CR, Dillon H, Farber CM, et al. Follicular lymphoma in the United States: first report of the national LymphoCare study. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1202-8.
4. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1982;307(20):1231-6.
5. Schmidt C, Fingerle-Rowson G, Boehme A, Brendel K, Fischer R, Gonnermann M, et al. Changes in the diagnosis and treatment of patients with low grade lymphoma in Germany: years 2006-2009. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(3):694-702.
6. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89(11):3909-18.
7. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. 1971;31(11):1860-1.
8. Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, Holte H, Delabie J, Smeland EB, et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. *Br J Haematol*. 2012;156(2):225-33.
9. Tan D, Horning SJ, Hoppe RT, Levy R, Rosenberg SA, Sigal BM, et al. Improvements in observed and relative survival in follicular grade 1-2 lymphoma during 4 decades: the Stanford University experience. *Blood*. 2013;122(6):981-7.
10. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit einem follikulären Lymphom, Langversion 1.0, 2020, AWMF-Registernummer: 018/033OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/follikulaeres-lymphom/>. [Zugriff: 23.09.2020].
11. Wagner-Johnston ND, Link BK, Byrtek M, Dawson KL, Hainsworth J, Flowers CR, et al. Outcomes of transformed follicular lymphoma in the modern era: a report from the National LymphoCare Study (NLCS). *Blood*. 2015;126(7):851-7.
12. Flodr P, Latalova P, Tichy M, Kubova Z, Papajik T, Svachova M, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: the history, current view and new perspectives. *Neoplasma*. 2014;61(5):491-504.
13. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006;107(1):265-76.
14. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the

- Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2011;105(11):1684-92.
15. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010;116(19):3724-34.
 16. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
 17. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med*. 2018;24(5):679-90.
 18. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-82.
 19. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, Coulibaly ZA, Roulland S, Young RM, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell*. 2020;37(4):551-68 e14.
 20. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2018;378(15):1396-407.
 21. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2780-95.
 22. Weiss LM, Strickler JG, Medeiros LJ, Gerdes J, Stein H, Warnke RA. Proliferative rates of non-Hodgkin's lymphomas as assessed by Ki-67 antibody. *Hum Pathol*. 1987;18(11):1155-9.
 23. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015;125(1):22-32.
 24. Nowakowski GS, Czuczman MS. ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting. 2015:e449-57.
 25. Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Kendall SJ, Owen RG, Haynes AP, et al. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancer Res*. 2003;9(6):2133-9.
 26. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica*. 2013;98(2):255-63.
-

27. Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, Castillo JJ, Rajguru S, Yang DT, et al. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood*. 2014;124(15):2354-61.
 28. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2013;31(1):88-94.
 29. Zelenetz AD, Salles G, Mason KD, Casulo C, Le Gouill S, Sehn LH, et al. Venetoclax plus R- or G-CHOP in non-Hodgkin lymphoma: results from the CAVALLI phase 1b trial. *Blood*. 2019;133(18):1964-76.
 30. Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. 7th ed. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2014.
 31. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:495-527.
 32. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):251-63.
 33. Rosner K, Winter DB, Tarone RE, Skovgaard GL, Bohr VA, Gearhart PJ. Third complementarity-determining region of mutated VH immunoglobulin genes contains shorter V, D, J, P, and N components than non-mutated genes. *Immunology*. 2001;103(2):179-87.
 34. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):137-48.
 35. Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:1-22.
 36. Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF, et al. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:481-511.
 37. Chaudhuri J, Alt FW. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):541-52.
 38. Nussenzweig A, Nussenzweig MC. Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell*. 2010;141(1):27-38.
 39. Khodabakhshi AH, Morin RD, Fejes AP, Mungall AJ, Mungall KL, Bolger-Munro M, et al. Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma. *Oncotarget*. 2012;3(11):1308-19.
 40. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Kupperts R, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 2001;412(6844):341-6.
 41. Stamatopoulos K, Kosmas C, Belessi C, Papadaki T, Afendaki S, Anagnostou D, et al. t(14;18) chromosomal translocation in follicular lymphoma: an event occurring with almost equal frequency both at the D to J(H) and at later stages in the rearrangement process of the immunoglobulin heavy chain gene locus. *Br J Haematol*. 1997;99(4):866-72.
 42. Nambiar M, Raghavan SC. How does DNA break during chromosomal translocations? *Nucleic Acids Res*. 2011;39(14):5813-25.
-

43. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-317.
 44. Nambiar M, Raghavan SC. Mechanism of fragility at BCL2 gene minor breakpoint cluster region during t(14;18) chromosomal translocation. *J Biol Chem*. 2012;287(12):8688-701.
 45. Buchonnet G, Jardin F, Jean N, Bertrand P, Parmentier F, Tison S, et al. Distribution of BCL2 breakpoints in follicular lymphoma and correlation with clinical features: specific subtypes or same disease? *Leukemia*. 2002;16(9):1852-6.
 46. Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*. 1986;47(1):19-28.
 47. Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Hematol*. 2014;51(3):219-27.
 48. Kupperts R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 2001;20(40):5580-94.
 49. Roulland S, Faroudi M, Mamessier E, Sungalee S, Salles G, Nadel B. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. *Adv Immunol*. 2011;111:1-46.
 50. Ott G, Rosenwald A. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma. *Haematologica*. 2008;93(12):1773-6.
 51. Martinez-Valdez H, Guret C, de Bouteiller O, Fugier I, Banchereau J, Liu YJ. Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *J Exp Med*. 1996;183(3):971-7.
 52. Bende RJ, van Maldegem F, Triesscheijn M, Wormhoudt TA, Guijt R, van Noesel CJ. Germinal centers in human lymph nodes contain reactivated memory B cells. *J Exp Med*. 2007;204(11):2655-65.
 53. Dolken G, Dolken L, Hirt C, Fusch C, Rabkin CS, Schuler F. Age-dependent prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2008(39):44-7.
 54. Roulland S, Navarro JM, Grenot P, Milili M, Agopian J, Montpellier B, et al. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2006;203(11):2425-31.
 55. Sungalee S, Mamessier E, Morgado E, Gregoire E, Brohawn PZ, Morehouse CA, et al. Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression. *J Clin Invest*. 2014;124(12):5337-51.
 56. Roulland S, Kelly RS, Morgado E, Sungalee S, Solal-Celigny P, Colombat P, et al. t(14;18) Translocation: A predictive blood biomarker for follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1347-55.
-

57. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Heutte N, Nadel B, Gauduchon P. Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia*. 2006;20(1):158-62.
58. Kuppers R, Stevenson FK. Critical influences on the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood*. 2018;131(21):2297-306.
59. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011;476(7360):298-303.
60. Agopian J, Navarro JM, Gac AC, Lecluse Y, Briand M, Grenot P, et al. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2009;206(7):1473-83.
61. Rui L, Schmitz R, Ceribelli M, Staudt LM. Malignant pirates of the immune system. *Nat Immunol*. 2011;12(10):933-40.
62. McCann KJ, Johnson PW, Stevenson FK, Ottensmeier CH. Universal N-glycosylation sites introduced into the B-cell receptor of follicular lymphoma by somatic mutation: a second tumorigenic event? *Leukemia*. 2006;20(3):530-4.
63. Zhu D, McCarthy H, Ottensmeier CH, Johnson P, Hamblin TJ, Stevenson FK. Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood*. 2002;99(7):2562-8.
64. Radcliffe CM, Arnold JN, Suter DM, Wormald MR, Harvey DJ, Royle L, et al. Human follicular lymphoma cells contain oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B-cell receptor. *J Biol Chem*. 2007;282(10):7405-15.
65. Coelho V, Krysov S, Ghaemmaghami AM, Emara M, Potter KN, Johnson P, et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18587-92.
66. Khan WN. B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *J Immunol*. 2009;183(6):3561-7.
67. Linley A, Krysov S, Ponzoni M, Johnson PW, Packham G, Stevenson FK. Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood*. 2015;126(16):1902-10.
68. Amin R, Mourcin F, Uhel F, Pangault C, Ruminy P, Dupre L, et al. DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannosylated IgM B-cell receptor in follicular lymphoma. *Blood*. 2015;126(16):1911-20.
69. Fend F, Quintanilla-Martinez L. Assessing the prognostic impact of immune cell infiltrates in follicular lymphoma. *Haematologica*. 2014;99(4):599-602.
70. Smeltzer JP, Jones JM, Ziesmer SC, Grote DM, Xiu B, Ristow KM, et al. Pattern of CD14+ follicular dendritic cells and PD1+ T cells independently predicts time to transformation in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(11):2862-72.
71. Menter T, Tzankov A, Zucca E, Kimby E, Hultdin M, Sundstrom C, et al. Prognostic implications of the microenvironment for follicular lymphoma under immunomodulation therapy. *Br J Haematol*. 2020;189(4):707-17.

72. Carbone A, Roulland S, Gloghini A, Younes A, von Keudell G, Lopez-Guillermo A, et al. Follicular lymphoma. *Nature reviews Disease primers*. 2019;5(1):83.
73. Dobaño-López C, Araujo-Ayala F, Serrat N, Valero JG, Pérez-Galán P. Follicular Lymphoma Microenvironment: An Intricate Network Ready for Therapeutic Intervention. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4).
74. Pasqualucci L, Khiabanian H, Fangazio M, Vasishtha M, Messina M, Holmes AB, et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep*. 2014;6(1):130-40.
75. Kridel R, Chan FC, Mottok A, Boyle M, Farinha P, Tan K, et al. Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. *PLoS Med*. 2016;13(12):e1002197.
76. Schmidt J, Salaverria I, Haake A, Bonzheim I, Adam P, Montes-Moreno S, et al. Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from in situ to manifest t(14;18)-positive follicular lymphoma. *Leukemia*. 2014;28(5):1103-12.
77. Loeffler M, Kreuz M, Haake A, Hasenclever D, Trautmann H, Arnold C, et al. Genomic and epigenomic co-evolution in follicular lymphomas. *Leukemia*. 2015;29(2):456-63.
78. Ottensmeier CH, Thompsett AR, Zhu D, Wilkins BS, Sweetenham JW, Stevenson FK. Analysis of VH genes in follicular and diffuse lymphoma shows ongoing somatic mutation and multiple isotype transcripts in early disease with changes during disease progression. *Blood*. 1998;91(11):4292-9.
79. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood*. 2002;99(9):3376-82.
80. Jegalian AG, Eberle FC, Pack SD, Mirvis M, Raffeld M, Pittaluga S, et al. Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma. *Blood*. 2011;118(11):2976-84.
81. Carbone A, Gloghini A, Santoro A. In situ follicular lymphoma: pathologic characteristics and diagnostic features. *Hematol Oncol*. 2012;30(1):1-7.
82. Henopp T, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Adam P. Prevalence of follicular lymphoma in situ in consecutively analysed reactive lymph nodes. *Histopathology*. 2011;59(1):139-42.
83. Bermudez G, Gonzalez de Villambrosia S, Martinez-Lopez A, Batlle A, Revert-Arce JB, Cereceda Company L, et al. Incidental and Isolated Follicular Lymphoma In Situ and Mantle Cell Lymphoma In Situ Lack Clinical Significance. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(7):943-9.
84. Pillai RK, Surti U, Swerdlow SH. Follicular lymphoma-like B cells of uncertain significance (in situ follicular lymphoma) may infrequently progress, but precedes follicular lymphoma, is associated with other overt lymphomas and mimics follicular lymphoma in flow cytometric studies. *Haematologica*. 2013;98(10):1571-80.
85. Cheung MC, Bailey D, Pennell N, Imrie KR, Berinstein NL, Amato D, et al. In situ localization of follicular lymphoma: evidence for subclinical systemic disease with detection of an identical BCL-2/IGH fusion gene in blood and lymph node. *Leukemia*. 2009;23(6):1176-9.

86. Mamessier E, Broussais-Guillaumot F, Chetaille B, Bouabdallah R, Xerri L, Jaffe ES, et al. Nature and importance of follicular lymphoma precursors. *Haematologica*. 2014;99(5):802-10.
87. Kosmidis P, Bonzheim I, Dufke C, Colak S, Hentrich T, Schroeder C, et al. Next generation sequencing of the clonal IGH rearrangement detects ongoing mutations and interfollicular trafficking in in situ follicular neoplasia. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178503.
88. Mamessier E, Drevet C, Broussais-Guillaumot F, Mollichella ML, Garciaz S, Roulland S, et al. Contiguous follicular lymphoma and follicular lymphoma in situ harboring N-glycosylated sites. *Haematologica*. 2015;100(4):e155-7.
89. Schmidt J, Ramis-Zaldivar JE, Bonzheim I, Steinhilber J, Muller I, Haake A, et al. CREBBP gene mutations are frequently detected in in situ follicular neoplasia. *Blood*. 2018;132(25):2687-90.
90. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412-7.
91. Montes-Moreno S, Castro Y, Rodriguez-Pinilla SM, Garcia JF, Mollejo M, Castillo ME, et al. Intrafollicular neoplasia/in situ follicular lymphoma: review of a series of 13 cases. *Histopathology*. 2010;56(5):658-62.
92. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, Rosenwald A, Pickering DL, Dave B, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2004;165(1):159-66.
93. Aukema SM, Siebert R, Schuurung E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319-31.
94. Jager U, Bocskor S, Le T, Mitterbauer G, Bolz I, Chott A, et al. Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood*. 2000;95(11):3520-9.
95. Vogelsberg A, Steinhilber J, Mankel B, Federmann B, Schmidt J, Montes-Mojarro IA, et al. Genetic evolution of in situ follicular neoplasia to aggressive B-cell lymphoma of germinal center subtype. *Haematologica*. 2021;106(10):2673-81.
96. Vogelsberg A, Steinhilber J, Mankel B, Federmann B, Schmidt J, Montes-Mojarro IA, et al. Die genetische Evolution der in situ folliculären Neoplasie zum t(14;18)-positiven aggressiven B-Zell-Lymphom. *Der Pathologe*. 2021;42(2):122-8.
97. Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Cohen P, Cossman J. Detection of occult follicular lymphoma by specific DNA amplification. *Blood*. 1988;72(5):1822-5.
98. Gribben JG, Freedman A, Woo SD, Blake K, Shu RS, Freeman G, et al. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood*. 1991;78(12):3275-80.

99. Albinger-Hegyí A, Hochreutener B, Abdou MT, Hegyí I, Dours-Zimmermann MT, Kurrer MO, et al. High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas: improved polymerase chain reaction protocols for their detection. *Am J Pathol.* 2002;160(3):823-32.
100. Fend F, Kremer M, Specht K, Quintanilla-Martinez L. Laser microdissection in hematopathology. *Pathol Res Pract.* 2003;199(6):425-30.
101. Seiler C, Sharpe A, Barrett JC, Harrington EA, Jones EV, Marshall GB. Nucleic acid extraction from formalin-fixed paraffin-embedded cancer cell line samples: a trade off between quantity and quality? *BMC Clin Pathol.* 2016;16:17.
102. Sotlar K, Escribano L, Landt O, Mohrle S, Herrero S, Torrelo A, et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol.* 2003;162(3):737-46.
103. Gallagher SR. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Neurosci.* 2011;Appendix 1:Appendix 1K.
104. Wong SQ, Li J, Tan AY, Vedururu R, Pang JM, Do H, et al. Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. *BMC Med Genomics.* 2014;7:23.
105. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
106. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2013;6:287-303.
107. Merriman B, Ion Torrent R, Team D, Rothberg JM. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis.* 2012;33(23):3397-417.
108. Chen G, Mosier S, Gocke CD, Lin MT, Eshleman JR. Cytosine deamination is a major cause of baseline noise in next-generation sequencing. *Mol Diagn Ther.* 2014;18(5):587-93.
109. Berg DT, Grinnell BW. Pro to Gly (P219G) in a silent glycosylation site results in complete glycosylation in tissue plasminogen activator. *Protein Sci.* 1993;2(1):126-7.
110. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792-7.
111. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-9.
112. Yermanos AD, Dounas AK, Stadler T, Oxenius A, Reddy ST. Tracing Antibody Repertoire Evolution by Systems Phylogeny. *Front Immunol.* 2018;9:2149.
113. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980;16(2):111-20.

114. Steel M, Huson D, Lockhart PJ. Invariable sites models and their use in phylogeny reconstruction. *Syst Biol.* 2000;49(2):225-32.
 115. Yamamoto K, Okamura A, Inui Y, Yakushijin K, Murayama T, Matsuoka H, et al. Cryptic insertion of BCL2 gene into immunoglobulin heavy locus in follicular lymphoma with t(6;9)(p23;p13). *Leuk Res.* 2012;36(9):e202-5.
 116. Baro C, Espinet B, Salido M, Garcia M, Sanchez B, Florensa L, et al. Cryptic IGH/BCL2 rearrangements with variant FISH patterns in follicular lymphoma. *Leuk Res.* 2011;35(2):256-9.
 117. Bentley G, Palutke M, Mohamed AN. Variant t(14;18) in malignant lymphoma: a report of seven cases. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;157(1):12-7.
 118. Evans PA, Pott C, Groenen PJ, Salles G, Davi F, Berger F, et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia.* 2007;21(2):207-14.
 119. Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, Philippon K, Kleiverda K, Kluijn P. Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;27(1):85-94.
 120. Espinet B, Bellosillo B, Melero C, Vela MC, Pedro C, Salido M, et al. FISH is better than BIOMED-2 PCR to detect IgH/BCL2 translocation in follicular lymphoma at diagnosis using paraffin-embedded tissue sections. *Leuk Res.* 2008;32(5):737-42.
 121. Davis A, Gao R, Navin N. Tumor evolution: Linear, branching, neutral or punctuated? *Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer.* 2017;1867(2):151-61.
 122. Bonzheim I, Salaverria I, Haake A, Gastl G, Adam P, Siebert R, et al. A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma. *Blood.* 2011;118(12):3442-4.
 123. Jiang Y, Redmond D, Nie K, Eng KW, Clozel T, Martin P, et al. Deep sequencing reveals clonal evolution patterns and mutation events associated with relapse in B-cell lymphomas. *Genome Biol.* 2014;15(8):432.
 124. Juskevicius D, Lorber T, Gsponer J, Perrina V, Ruiz C, Stenner-Liewen F, et al. Distinct genetic evolution patterns of relapsing diffuse large B-cell lymphoma revealed by genome-wide copy number aberration and targeted sequencing analysis. *Leukemia.* 2016;30(12):2385-95.
 125. Okosun J, Bodor C, Wang J, Araf S, Yang CY, Pan C, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet.* 2014;46(2):176-81.
 126. Araf S, Wang J, Ashton-Key M, Korfi K, Di Bella D, Rio-Machin A, et al. Transmission of diffuse large B-cell lymphoma by an allogeneic stem-cell transplant. *Haematologica.* 2019;104(4):e174-e7.
 127. Weigert O, Kopp N, Lane AA, Yoda A, Dahlberg SE, Neuberg D, et al. Molecular ontogeny of donor-derived follicular lymphomas occurring after hematopoietic cell transplantation. *Cancer Discov.* 2012;2(1):47-55.
-

128. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, Scott DW, Tan K, Ben-Nierah S, et al. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2012;26(6):1383-90.
129. Saito M, Novak U, Piovan E, Basso K, Sumazin P, Schneider C, et al. BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(27):11294-9.
130. Tanaka S, Louie D, Kant J, Reed JC. Application of a PCR-mismatch technique to the BCL-2 gene: detection of point mutations in BCL-2 genes of malignancies with A t(14,18). *Leukemia*. 1992;6 Suppl 3:15s-9s.
131. Neuberger MS, Ehrenstein MR, Klix N, Jolly CJ, Yelamos J, Rada C, et al. Monitoring and interpreting the intrinsic features of somatic hypermutation. *Immunol Rev*. 1998;162:107-16.
132. Correia C, Schneider PA, Dai H, Dogan A, Maurer MJ, Church AK, et al. BCL2 mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2015;125(4):658-67.
133. Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, Knowles DM. Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood*. 1996;88(10):3937-44.
134. Aarts WM, Bende RJ, Steenbergen EJ, Kluin PM, Ooms EC, Pals ST, et al. Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. *Blood*. 2000;95(9):2922-9.
135. Greeve J, Philipsen A, Krause K, Klapper W, Heidorn K, Castle BE, et al. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003;101(9):3574-80.
136. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, Compagno M, Smith P, Muramatsu M, et al. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet*. 2008;40(1):108-12.
137. Ramiro AR, Jankovic M, Eisenreich T, Difilippantonio S, Chen-Kiang S, Muramatsu M, et al. AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell*. 2004;118(4):431-8.
138. Staszewski O, Baker RE, Ucher AJ, Martier R, Stavnezer J, Guikema JE. Activation-induced cytidine deaminase induces reproducible DNA breaks at many non-Ig Loci in activated B cells. *Mol Cell*. 2011;41(2):232-42.
139. Bross L, Fukita Y, McBlane F, Demolliere C, Rajewsky K, Jacobs H. DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation. *Immunity*. 2000;13(5):589-97.
140. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 2010;464(7289):704-12.
141. Bouska A, McKeithan TW, Deffenbacher KE, Lachel C, Wright GW, Iqbal J, et al. Genome-wide copy-number analyses reveal genomic abnormalities involved in transformation of follicular lymphoma. *Blood*. 2014;123(11):1681-90.
142. Høglund M, Sehn L, Connors JM, Gascoyne RD, Siebert R, Sall T, et al. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;39(3):195-204.

143. Mamessier E, Song JY, Eberle FC, Pack S, Drevet C, Chetaille B, et al. Early lesions of follicular lymphoma: a genetic perspective. *Haematologica*. 2014;99(3):481-8.
 144. Rossi D, Berra E, Cerri M, Deambrogi C, Barbieri C, Franceschetti S, et al. Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2006;91(10):1405-9.
 145. González-Rincón J, Méndez M, Gómez S, García JF, Martín P, Bellas C, et al. Unraveling transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212813.
 146. Odabashian M, Carlotti E, Araf S, Okosun J, Spada F, Gribben JG, et al. IGHV sequencing reveals acquired N-glycosylation sites as a clonal and stable event during follicular lymphoma evolution. *Blood*. 2020;135(11):834-44.
 147. Aukema SM, Kreuz M, Kohler CW, Rosolowski M, Hasenclever D, Hummel M, et al. Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica*. 2014;99(4):726-35.
 148. Pedersen MØ, Gang AO, Poulsen TS, Knudsen H, Lauritzen AF, Nielsen SL, et al. MYC translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with MYC-or double-hit MYC/BCL 2 translocations. *Eur J Haematol*. 2014;92(1):42-8.
 149. Klapproth K, Wirth T. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol*. 2010;149(4):484-97.
 150. Green MR, Kihira S, Liu CL, Nair RV, Salari R, Gentles AJ, et al. Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(10):E1116-25.
 151. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *The lancet oncology*. 2015;16(9):1111-22.
 152. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*. 2011;471(7337):189-95.
 153. Lunning MA, Green MR. Mutation of chromatin modifiers; an emerging hallmark of germinal center B-cell lymphomas. *Blood Cancer J*. 2015;5(10):e361.
 154. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 1996;87(5):953-9.
 155. Bedford DC, Kasper LH, Fukuyama T, Brindle PK. Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases. *Epigenetics*. 2010;5(1):9-15.
 156. Green MR, Gentles AJ, Nair RV, Irish JM, Kihira S, Liu CL, et al. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood*. 2013;121(9):1604-11.
-

-
157. Zhang J, Vlasevska S, Wells VA, Nataraj S, Holmes AB, Duval R, et al. The CREBBP Acetyltransferase Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in B-cell Lymphoma. *Cancer Discov.* 2017;7(3):322-37.
 158. Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet.* 2002;32(4):606-13.
 159. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):172-84.
 160. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature.* 2004;432(7017):635-9.
 161. Horton SJ, Giotopoulos G, Yun H, Vohra S, Sheppard O, Bashford-Rogers R, et al. Early loss of Crebbp confers malignant stem cell properties on lymphoid progenitors. *Nat Cell Biol.* 2017;19(9):1093-104.
 162. Launay E, Pangault C, Bertrand P, Jardin F, Lamy T, Tilly H, et al. High rate of TNFRSF14 gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis. *Leukemia.* 2012;26(3):559-62.
 163. Cheung KJ, Delaney A, Ben-Neriah S, Schein J, Lee T, Shah SP, et al. High resolution analysis of follicular lymphoma genomes reveals somatic recurrent sites of copy-neutral loss of heterozygosity and copy number alterations that target single genes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010;49(8):669-81.
 164. Cheung KJ, Johnson NA, Affleck JG, Severson T, Steidl C, Ben-Neriah S, et al. Acquired TNFRSF14 mutations in follicular lymphoma are associated with worse prognosis. *Cancer Res.* 2010;70(22):9166-74.
 165. Bodor C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O'Riain C, Tan K, et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood.* 2013;122(18):3165-8.
 166. Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, et al. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8695-700.
 167. Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 2006;439(7078):871-4.
 168. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, Lee JE, Holmes AB, Bansal M, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med.* 2015;21(10):1190-8.
 169. Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, Pan H, Jiang Y, Zhao C, et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat Med.* 2015;21(10):1199-208.
 170. Velichutina I, Shaknovich R, Geng H, Johnson NA, Gascoyne RD, Melnick AM, et al. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood.* 2010;116(24):5247-55.
 171. Beguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell.* 2013;23(5):677-92.
-

172. Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev.* 2011;244(1):169-87.
 173. Boice M, Salloum D, Mourcin F, Sanghvi V, Amin R, Oricchio E, et al. Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell.* 2016;167(2):405-18 e13.
 174. Green MR. Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma. *Blood.* 2018;131(6):595-604.
 175. Ranuncolo SM, Polo JM, Dierov J, Singer M, Kuo T, Greally J, et al. Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol.* 2007;8(7):705-14.
 176. Ying CY, Dominguez-Sola D, Fabi M, Lorenz IC, Hussein S, Bansal M, et al. MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1084-92.
 177. Li H, Kaminski MS, Li Y, Yildiz M, Ouillet P, Jones S, et al. Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood.* 2014;123(10):1487-98.
 178. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell.* 2012;149(1):22-35.
 179. Robbiani DF, Bothmer A, Callen E, Reina-San-Martin B, Dorsett Y, Difilippantonio S, et al. AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell.* 2008;135(6):1028-38.
 180. Kridel R, Mottok A, Farinha P, Ben-Neriah S, Ennishi D, Zheng Y, et al. Cell of origin of transformed follicular lymphoma. *Blood.* 2015;126(18):2118-27.
 181. Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood.* 2003;102(4):1443-8.
 182. Schneider C, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol.* 2011;28(2):167-77.
 183. Black S, Phillips D, Hickey JW, Kennedy-Darling J, Venkataramanan VG, Samusik N, et al. CODEX multiplexed tissue imaging with DNA-conjugated antibodies. *Nat Protoc.* 2021:1-36.
 184. Ghia P, Nadel B, Sander B, Stamatopoulos K, Stevenson FK. Early stages in the ontogeny of small B-cell lymphomas: genetics and microenvironment. *J Intern Med.* 2017;282(5):395-414.
 185. Green MR, Alizadeh AA. Common progenitor cells in mature B-cell malignancies: implications for therapy. *Curr Opin Hematol.* 2014;21(4):333-40.
 186. Evens AM, Balasubramanian S, Vose JM, Harb W, Gordon LI, Langdon R, et al. A Phase I/II Multicenter, Open-Label Study of the Oral Histone Deacetylase Inhibitor Abexinostat in Relapsed/Refractory Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(5):1059-66.
 187. Gryder BE, Sodji QH, Oyelere AK. Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. *Future Med Chem.* 2012;4(4):505-24.
-

188. Jiang Y, Ortega-Molina A, Geng H, Ying HY, Hatzi K, Parsa S, et al. CREBBP Inactivation Promotes the Development of HDAC3-Dependent Lymphomas. *Cancer Discov.* 2017;7(1):38-53.
189. Mondello P, Tadros S, Teater M, Fontan L, Chang AY, Jain N, et al. Selective Inhibition of HDAC3 Targets Synthetic Vulnerabilities and Activates Immune Surveillance in Lymphoma. *Cancer Discov.* 2020;10(3):440-59.
190. Morschhauser F, Tilly H, Chaidos A, Phillips T, Ribrag V, Campbell P, et al. Interim Update from a Phase 2 Multicenter Study of Tazemetostat, an Ezh2 Inhibitor, in Patients with Relapsed or Refractory Follicular Lymphoma. *Hematol Oncol.* 2019;37(S2):154-6.
191. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature.* 2012;492(7427):108-12.
192. Italiano A, Soria JC, Toulmonde M, Michot JM, Lucchesi C, Varga A, et al. Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2018;19(5):649-59.
193. U.S. Food & Drug Administration. FDA granted accelerated approval to tazemetostat for follicular lymphoma, <https://www.fda.gov/drugs/fda-granted-accelerated-approval-tazemetostat-follicular-lymphoma>. [Zugriff: 12.12.2021].
194. Roulland S. Sugar-coated BCR kept during FL clonal evolution. *Blood.* 2020;135(11):784-5.
195. Zhang Q, Collins J, Anastasaki A, Wallis R, Mitchell DA, Becer CR, et al. Sequence-controlled multi-block glycopolymers to inhibit DC-SIGN-gp120 binding. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013;52(16):4435-9.
196. Behrens AJ, Crispin M. Structural principles controlling HIV envelope glycosylation. *Curr Opin Struct Biol.* 2017;44:125-33.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Falko Fend durchgeführt, der die Studie zusammen mit Frau Prof. Dr. Leticia Quintanilla de Fend konzipiert hat.

Der Großteil der Arbeit wurde in der Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie des Departments für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Laser-Mikrodissektion wurde von mir am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen und am Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt durchgeführt.

Die Fallsuche wurde von mir mit Unterstützung durch Frau Ivonne A. Montes-Mojarro und Frau Dr. Birgit Federmann durchgeführt. Die potenziellen Fälle aus dem Archiv der Abteilung für Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart sowie die zugehörigen klinischen Daten wurden von Herrn Prof. Dr. German Ott und Frau Dr. Katrin Kurz (ehemals Hüttl) bereitgestellt. Frau Prof. Dr. María Rodríguez-Pinilla und Herr Prof. Dr. Miguel A. Piris der Abteilung für Pathologie des Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz in Madrid haben einen Fall inklusive klinischer Daten zur Verfügung gestellt.

Die histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden vom medizinisch-technischen Personal der Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie und Pathologische Anatomie angefertigt und von mir unter Supervision von Herrn Prof. Dr. Falko Fend ausgewertet. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen wurden von Frau Barbara Mankel angefertigt und von mir in Zusammenarbeit mit ihr ausgewertet. Die restlichen Versuche und die Auswertung der Daten wurden von mir nach Einarbeitung durch Frau Dr. Janine Schmidt und Frau Sema Colak und unter Supervision von Frau Dr. Irina Bonzheim und Frau Dr. Julia Steinhilber durchgeführt. Die Bedienung des Ion Chef™ und des Ion Torrent PGM™ Instruments wurde dabei von Frau Franziska Mihalik, Frau Rebecca Braun und Frau Isabell Haußmann übernommen.

Die zugehörige Originalpublikation wurde von mir in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Falko Fend verfasst und von allen Koautoren überarbeitet. Der zugehörige Kurzbeitrag wurde von mir verfasst und von allen Koautoren überarbeitet. Die phylogenetischen Stammbäume, die für die Originalpublikation in Abbildung 1 des Supplements verwendet wurden, haben Herr Dr. Praveen Basakaran und Herr Prof. Dr. Sven Nahnsen vom Zentrum für Quantitative Biologie (QBiC) der Universität Tübingen erstellt. Die restlichen Abbildungen der Originalpublikation, des Kurzbeitrags und dieses Manuskripts wurden von mir erstellt.

Ich versichere, dieses Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 13.02.2023

(Horst-Guenther Antonio Vogelsberg)

8 Veröffentlichungen

Publikationen

Der Großteil der Daten dieser Dissertationsschrift wurde bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Vogelsberg A, Steinhilber J, Mankel B, Federmann B, Schmidt J, Montes-Mojarro IA, et al. Genetic evolution of in situ follicular neoplasia to aggressive B-cell lymphoma of germinal center subtype. *Haematologica*. 2021;106(10):2673-81.

Vogelsberg A, Steinhilber J, Mankel B, Federmann B, Schmidt J, Montes-Mojarro IA, et al. Die genetische Evolution der in situ folliculären Neoplasie zum t(14;18)-positiven aggressiven B-Zell-Lymphom. *Der Pathologe*. 2021;42(2):122-8.

Kongressvorträge

Vogelsberg A, Steinhilber J, Bonzheim I, Schmidt J, Mankel B, Federmann B, et al. Genetic evolution of clonally related in situ follicular neoplasia to diffuse large B-cell lymphoma of germinal center subtype. 19th Meeting of the European Association for Haematopathology (EAHP), Edinburgh, Schottland. 2018.

Dieser Vortrag wurde von der Deutschen Gesellschaft für Pathologie mit dem Promotions-Preis 2021 ausgezeichnet:

Vogelsberg A, Steinhilber J, Mankel B, Federmann B, Schmidt J, Montes-Mojarro IA, et al. Genetic evolution of in situ follicular neoplasia to t(14;18)-positive aggressive B-cell lymphoma. Virtuelle Pathologietage der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP) 2021.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen und mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Falko Fend, der mir die Promotion am Institut für Pathologie ermöglicht und mich dabei über mehrere Jahre intensiv betreut hat.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Leticia Quintanilla de Fend, die bei fachlichen Fragen stets unterstützend zur Seite stand.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dr. Irina Bonzheim, Frau Dr. Julia Steinhilber und Frau Dr. Janine Schmidt für die exzellente Einarbeitung und Betreuung und auch dafür, immer Zeit und ein offenes Ohr gehabt zu haben.

Ganz herzlich möchte ich außerdem Frau Sema Colak, Frau Barbara Mankel, Frau Franziska Mihalik, Frau Rebecca Braun, Herrn Dennis Thiele, Frau Isabell Haußmann und Herrn Gerd Janke für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. German Ott, Frau Dr. Katrin Kurz, Herrn Prof. Dr. Miguel A. Piris und Frau Prof. Dr. María Rodríguez-Pinilla, die uns zusätzliche Fälle zur Verfügung gestellt haben, sowie Herrn Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann, Frau Prof. Dr. Sylvia Hartmann und Frau Julia Bein für Ihre Kooperation und technische Unterstützung bei den Mikrodissektionen.

Darüber hinaus möchte ich Ivonne Montes-Mojarro, Inga Müller und den anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe für die immer angenehme Arbeitsatmosphäre und moralische Unterstützung danken.