

**Follikuläre Lymphome Grad I/II, die sich
immunhistochemisch als „BCL2-negativ“ darstellen,
beinhalten zwei immunphänotypisch und genetisch
unterschiedliche Subgruppen**

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

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

**vorgelegt von
Schäbs, Ajoua Rosalie
geb. Baumann**

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Professorin Dr. L. Quintanilla de Fend

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Bleif

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 B-Zelllymphome – Neoplasien normaler B-Zellen und Ätiologie	1
1.1.1 B-Zellreifung.....	2
1.1.1.1 Die Rekombination der IgH-Gensegmente und die Entstehung des B-Zellrezeptors.....	4
1.1.1.2 Somatische Hypermutation.....	6
1.1.2 Keimzentren – Risikozonen mit Entartungspotenzial.....	7
1.2 Klassifikation der B-Zell-Lymphome	8
1.3 Das folliculäre Lymphom – Charakteristika und BCL2	9
1.3.1 Klinische Merkmale und Verlauf.....	9
1.3.1.1 Stadieneinteilung nach Ann-Arbor und Prognoseeinschätzung nach FLIPI.....	11
1.3.1.2 Histologische Gradeinteilung der folliculären Lymphome.....	12
1.3.2 Morphologie.....	13
1.3.3 Genetik und Immunphänotyp.....	14
1.3.3.1 Abgrenzung zum Marginalzonenlymphom.....	15
1.3.4 Therapie.....	15
1.3.5 Diagnostik und BCL2.....	16
1.3.5.1 FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung).....	18
1.3.5.2 Immunhistochemie und Verfügbarkeit neuer Antikörper.....	19
1.3.5.3 Somatische Mutationen bei t(14;18)-Translokationen.....	20
1.3.6 BCL2-negative Lymphome.....	21
2. Problemstellung und Ziel der Studie	23
3. Material und Methoden	25
3.1 Auswahl der Studienfälle und Zusammenstellung der Gruppen BCL2-negativer FL	25
3.2 Reagenzien	27

3.3 Geräte	37
3.4 Methoden	39
3.4.1 Immunhistochemische Untersuchung.....	39
3.4.2 Untersuchte Oberflächenproteine der Studienfälle.....	39
3.4.3 Immunhistochemische Vorgehensweise im Rahmen der Studie.....	40
3.5 FISH-Analyse	40
3.5.1 FISH-Vorgehensweise.....	41
3.5.1.1 Entparaffinierung.....	41
3.5.1.2 Waschung, Denaturierung und Dehydrierung.....	41
3.5.1.3 Hybridisierung.....	42
3.5.1.4 Post-Hybridisierungswaschung.....	42
3.6 Sequenzanalyse	42
3.6.1 DNA-Isolation.....	43
3.6.1.1 Entparaffinierung bei Gewebeschnitten auf Objektträgern.....	43
3.6.1.2 Entparaffinierung der Gewebeschnitte in Reaktionsgefäßen...	43
3.6.1.3 Zellyse.....	43
3.6.1.4 Phenol/Chloroform-Aufreinigung.....	44
3.6.2 PCR zur Analyse der DNA-Qualität.....	45
3.6.2.1 Gelelektrophoretisches Auftrennen der PCR-Produkte.....	46
3.6.3 BCL2-PCR.....	47
3.6.4 Aufreinigung der PCR-Produkte mit Agencourt®AMPure® XP.....	48
3.6.5 Kettenabbruchsynthese.....	49
3.6.6 Aufreinigung mit Agencourt®CleanSeq®.....	50
3.7 BCL2-Expression (RNA-Ebene)	51
3.7.1 RNA-Isolation.....	51
3.7.2 Real-Time Quantitative PCR.....	52
3.8 Klonalitätsanalyse	54
3.8.1 Monoklonalität als Malignitätsmerkmal.....	54
3.8.2 Vorgehensweise bei der Klonalitätsanalyse.....	54

4. Ergebnisse	56
4.1 Gruppenzuordnungen nach Immunhistochemie und FISH	56
4.2 Gruppe 1: BCL2-negative FL Grad I/II mit t(14;18)-Translokation	57
4.2.1 Immunhistochemische Untersuchung.....	57
4.2.2 FISH-Untersuchung.....	60
4.2.3 Geschlechterverteilung.....	60
4.2.4 Altersverteilung.....	61
4.2.5 Lokalisation der entnommenen Lymphknoten.....	61
4.2.6 Ann-Arbor-Stadium bei Diagnosestellung.....	62
4.2.7 Sequenzanalyse.....	63
4.3 Gruppe 2: BCL2-negative FL Grad I/II ohne t(14;18)-Translokation ..	66
4.3.1 Immunhistochemie.....	66
4.3.2 FISH-Untersuchung.....	69
4.3.3 Geschlechterverteilung.....	70
4.3.4 Altersverteilung.....	70
4.3.5 Lokalisation der Lymphknotenregion.....	71
4.3.6 Ann-Arbor-Stadium bei Diagnosestellung.....	71
4.3.7 Sequenzanalyse.....	72
4.3.8 Klonalitätsanalyse.....	73
4.3.9 RT-qPCR.....	76
4.4 Gruppe 3: BCL2-positive Fälle ohne t(14;18)	77
5. Diskussion	78
5.1 Inzidenzvergleich	78
5.2 Auftrennung in verschiedene Subgruppen	79
5.3 Korrelation der FISH mit der E17/SP66-Färbung	79
5.4 Vergleich der FL-Subgruppen	81
5.4.1 Morphologie und Immunhistochemie.....	81
5.4.2 Geschlechterverteilung.....	82
5.4.3 Altersverteilung.....	83

5.4.4 Lokalisation der pathologischen Lymphknoten.....	83
5.5 Bewertung der Ergebnisse der Sequenzanalyse.....	84
5.6 BCL2-Positivität und Proliferation.....	86
5.7 BCL2-Genmutationen und klonale Evolution.....	87
5.8 BCL2-positive FL ohne t(14;18).....	88
5.9 Schlussfolgerung und Ausblick.....	89
6. Zusammenfassung.....	91
7. Literaturverzeichnis.....	94
8. Tabellenverzeichnis und Tabellenanhang.....	104
8.1 Tabellenverzeichnis.....	104
8.2 Tabellenanhang.....	106
8.2.1 Übersichtstabelle der Fälle mit t(14;18)-Translokation.....	106
8.2.2 Übersichtstabelle der Fälle ohne t(14;18)-Translokation.....	107
9. Abbildungsverzeichnis.....	108
10. Veröffentlichungen.....	111
11. Erklärung zum Eigenanteil.....	112
12. Erklärung.....	114
13. Danksagung	
14. Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

A	ohne Allgemeinsymptome
Abb.	Abbildung
AID	Activation-induced-Deaminase
AK	Antikörper
ASK1	Apoptosis-signal-regulating-kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
B	mit Begleitsymptomen
BALT	Bronchial-associated-lymphatic-tissue
BCL2	B-cell-Lymphoma 2
BCL6	B-cell-Lymphoma 6
BH-Domäne	BCL2-homologe-Domäne
bp	Basenpaar
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
Chr.	Chromosom
CTP	Cytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E17	aus embryonalen Zellen gewonnener monoklonaler Kaninchen-BCL2-Antikörper
ED	Erstdiagnose
ERK	extracellular signal-regulated kinase
F	Frauen

FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	follikuläres Lymphom
FLIPI	Follicular Lymphoma International Prognostic Index
FR	Frameworkregion
GALT	Gut-associated-lymphatic-tissue
GTP	Guanosintriphosphat
HGAL	Human germinal-center-associated-Lymphoma-Protein
HV	hypervariable Region
ICD	International classification of diseases
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulinschwerkettenloкус
JNK1	Januskinase 1
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilo-Dalton
LE	low electroendosmosis
LK	Lymphknoten
LMO2	LIM-only-Transkriptionsfaktor-2
M	je nach Kontext: Männer bzw. Mol
m	männlich
MALT	Mucosa-associated-lymphatic-tissue
ml/μl	Milliliter/Mikroliter
mRna	Messenger-Ribonukleinsäure
MSH	Mismatchrepair-Protein (mutS homolog 2)
Neg.	Negativität

NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NTP	Nukleosidtriphosphat
PCR	Polymerase-chain-reaction / Polymerasekettenreaktion
PKC	Protein Kinase C
RAG	Recombination-activating-gene
R.E.A.L.	<u>R</u> evised <u>E</u> uropean <u>A</u> merican Classification of <u>L</u> ymphoid Neoplasms
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
RSS	Recombination-Signal-Sequence
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SLS	sample loading solution
SP66	Synthetic Peptide 66 (Anti-BCL2-alpha-Antikörper)
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBP	TATA-box binding protein
TM	Transmembrandomäne
TTP	Thymidintriphosphat
VH	variable Region der schweren Ig-Kette
w	weiblich
WHO	World-Health-Organisation

1. Einleitung

1.1 B-Zelllymphome – Neoplasien normaler B-Zellen und Ätiologie

„Es ist nichts furchtbarer anzuschauen als gränzenlose Thätigkeit ohne Fundament“ (J. W. v. Goethe, [1]). Bei der Entstehung pathologischer Neoplasien kommt jedoch ein solch unsinniges grenzenloses Tun zur Anwendung. Zu viel Gewebe, das zudem auch noch autonom unkontrolliert am falschen Ort wächst, ohne sich an Differenzierungsvorgaben oder Apoptosevorgänge zu halten, kann für den Organismus tödlich sein. Lymphome sind Neoplasien, die aus Lymphozyten als Ursprungszelle entstehen [2-5]. Lymphozyten finden sich dabei in den primär zentralen lymphatischen Organen, dem Thymus und dem Knochenmark, aber auch in den sogenannten sekundär peripher lymphatischen Organen, wozu Lymphknoten, Milz, Waldeyer-Rachenring, Appendix, die bronchienassoziierten (BALT) und die darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT), die insgesamt als mucosaassoziierte lymphatische Gewebe (MALT) zusammengefasst werden [6, 7]. Die millimetergroßen Lymphknoten bilden Antigenfilterstationen der Lymphflüssigkeit und gliedern sich histologisch in eine kortikale, parakortikale und medulläre Zone [8]. Die Rinde enthält die B-Follikel, die aus Ansammlungen von B-Zellen bestehen und entspricht der B-Zone. Die Parakortikalzone entspricht der T-Zone, da sich hier die meisten T-Lymphozyten befinden. In den Lymphknoten bekommen die Lymphozyten zum ersten Mal Kontakt mit einem Antigen. Bis dahin sind sie funktionslos. Durch den Antigenkontakt werden sie zur Proliferation und zur Differenzierung angeregt [9]. Jeder Lymphozyt exprimiert einen Antigen-Rezeptor auf der Zelloberfläche, der jeweils ein Antigen spezifisch erkennt. Nur aus der Physiologie der Lymphozyten heraus lässt sich die Entstehung von Lymphomen richtig verstehen. Die meisten Lymphome entstehen nach aktuellem Stand der Wissenschaft als Folge der Akkumulation verschiedener Genaberrationen [10, 11].

Das folliculäre Lymphom, um das es im Weiteren gehen soll, zeigt verschiedene rekurrente Mutationen, deren onkogenes Potential aber bisher weitgehend ungeklärt ist [12-14]. Inwiefern die Veränderungen auf molekularer Ebene im folliculären Lymphom eine Folge ätiologischer Einflüsse sind, ist bislang nicht bekannt. Es wurden wenig überzeugende Zusammenhänge mit chronischen Entzündungen, Immunsuppression, Lösungsmitteln, Strahlungen und weiteren Umweltnoxen hergestellt [4].

1.1.1 B-Zellreifung

Da sich die Fragestellung der Studie auf eine B-Zellneoplasie bezieht, soll im Folgenden nur auf die Reifungsschritte der B-Zellen eingegangen werden [15, 16]. B-Zellen differenzieren im Knochenmark aus Stammzellen und durchlaufen im Anschluss eine Vielzahl an Entwicklungsstufen. Ziel des komplizierten Reifungsprozesses ist die Bildung hochspezifischer Antikörper, die durch Genumlagerungen für eine Vielzahl möglicher Antigene passend gemacht werden [9]. Die zentrale antigenunabhängige B-Zellreifung an Knochenmarkstromazellen führt die B-Zellen über das Stadium der frühen Pro-B-Zellen zu späten Pro-B-Zellen, welche sich über frühe Prä-B-Zellen hin zu späten Prä-B-Zellen mit B-Zellrezeptor entwickeln [17]. Nach Durchlaufen verschiedener Kontrollpunkte bezüglich der Immunglobulinketten und ihrer Qualität, gelangen sie als reife, naive B-Zellen ins Blut und bekommen in den peripheren lymphatischen Organen erstmals Kontakt mit einem Antigen. Die Antigenbindung ist das Reizsignal, welches die Proliferation einer Effektorzelle anregt, also einer ausdifferenzierten B-Zelle, die zur Antikörperbildung befähigt ist und die daraufhin viele Klone hervorbringt, was auch als „klonale Selektionstheorie“ bezeichnet wird und die Grundlage der adaptiven Immunantwort bildet [18, 19]. Lymphozyten, die eine hohe Affinität zu ihrem Antigen aufweisen, erhalten ein Überlebenssignal und werden herausgefiltert, während B-Zellen, die Autoantigene erkennen, in den peripheren Organen eliminiert werden [20]. Die Elimination erfolgt dabei durch Apoptose. Die Antigen-aktivierten B-Lymphozyten reifen zu Gedächtnis- und Plasmazellen aus, welche lösliche Antikörper produzieren. Man teilt die Antikörper in

verschiedene Klassen ein, die sich beispielsweise in ihrem Molekulargewicht und ihrem F_c -Fragment (fragment crystallizable), das für die unterschiedlichen Funktionen der Subtypen zuständig ist, unterscheiden [21]. Im Gegensatz zum F_{ab} -Fragment (fragment antigen-binding) dient diese F_c -Region nicht der Antigenbindung. B-Zellen können nicht nur Antigenteile, sondern das gesamte Antigen binden. Antikörper selbst sind die lösliche Form des B-Zellrezeptors. Das IgH-Schwerkettengenrearrangement, das jeder Zelle eigen ist, sorgt dafür, dass der Körper jederzeit in der Lage ist, einen passenden Antigenrezeptor zu haben. Antikörper bestehen aus leichten und schweren Polypeptidketten, wobei die leichten Ketten jeweils eine konstante und eine variable Region aufweisen. Die konstante COOH-terminale Region bestimmt dabei den Isotyp des Antikörpermoleküls und kann durch Klassenwechsel geändert werden. Jedes Antikörpermolekül besitzt zwei identische Bindungsstellen, womit die Antigene erkannt werden können [9]. Durch kovalente Disulfidbrücken sind die schweren und die beiden leichten Ketten miteinander verbunden. Die variablen V-Regionen sind für die Antigenbindung zuständig und erlangen durch das Phänomen der somatischen Hypermutation eine noch größere Affinität zu ihrem Antigen. Unter den leichten Ketten werden jeweils κ - und λ -Ketten unterschieden, die jedoch niemals in einem Antikörpermolekül miteinander kombiniert werden. Im menschlichen Organismus liegen die Ketten κ zu λ im Verhältnis 2:1 vor. Abweichungen dieses Verhältnisses können Hinweis auf einen λ -Ketten proliferierenden B-Zellklon sein. Um eine so reiche Antikörpervielfalt (10^8 bis 10^9 unterschiedliche Immunglobuline) zu ermöglichen, geschehen in den Lymphknoten komplexe Vorgänge, innerhalb derer eine hochspezifische Anpassung auf mögliche Antigene stattfindet. Die Grundlage dafür bietet die Rekombination der IgH-Gensegmente.

1.1.1.1 Die Rekombination der IgH-Gensegmente und die Entstehung des B-Zell-Rezeptors

Die schwere Kette des Immunglobulinmoleküls besteht aus einer variablen (V-) Region, einer „diversity“ (D-), einer verbindenden (J (joining)-) und einer konstanten (C-)Region. Diese Regionen werden auf Keimbahnebene von Gruppen von Gensegmenten kodiert (Abb. 1) [19]. Das *IgH*-Gen enthält 70 V-, 27 D-, 6 J-, und 3 C-Segmente. Während der B-Zell-Entwicklung wird jeweils eine V-, ein D-, ein J- und ein C-Segment verknüpft, was über DNA-spezifische Doppelstrangbruchenzyme und durch die Enzyme RAG1 und RAG2 (recombination-activating gene) vermittelt wird, die sogenannte RSSs (recombination signal sequences) erkennen [22, 23]. Der gesamte Komplex der beteiligten Enzyme wird als VDJ-Rekombinase bezeichnet [24, 25]. Drei Bereiche der V-Regionen weisen ein besonders großes Potential an Variabilitäten auf und werden deshalb auch hypervariable Regionen HV1, HV2 und HV3 genannt. An diesen drei Regionen bekommt das Antigen Kontakt zu seinem Rezeptor. HV3 ist die Verbindungsstelle zwischen dem V-, dem D-, und dem J-Segment und stellt den variabelsten Teil dar. Die eigentliche Vielfalt der Antikörper entsteht durch Einfügen bzw. Deletieren von Nukleotiden (N- und P-Nukleotidadditionen) zwischen dem D- und dem J-Segment. Die Wahrscheinlichkeit für ein Auftreten zwei identisch umgelagerter *IgH*-Gene ist damit praktisch ausgeschlossen. Zwischen HV-Regionen liegen vier β -Faltblatt-Strukturen, die auch Frameworkregionen genannt werden: FR1, FR2, FR3 und FR4. Nach Umlagerung der Gensegmente während der B-Zellentwicklung wird das rekombinierte Gen transkribiert und in das Immunglobulin-schwerkettenprotein translatiert, das einen Teil des B-Zellrezeptors darstellt. Die Organisation und Rekombination der Leichtkettengene ähnelt derjenigen des IgH-Lokus, findet aber erst zu einem späteren Schritt im Reifungsprozess der B-Zelle statt (Abb. 2). Die Immunglobulin-Leichtkettengene enthalten ausschließlich V- und J-Segmente und keine D-Segmente [9].

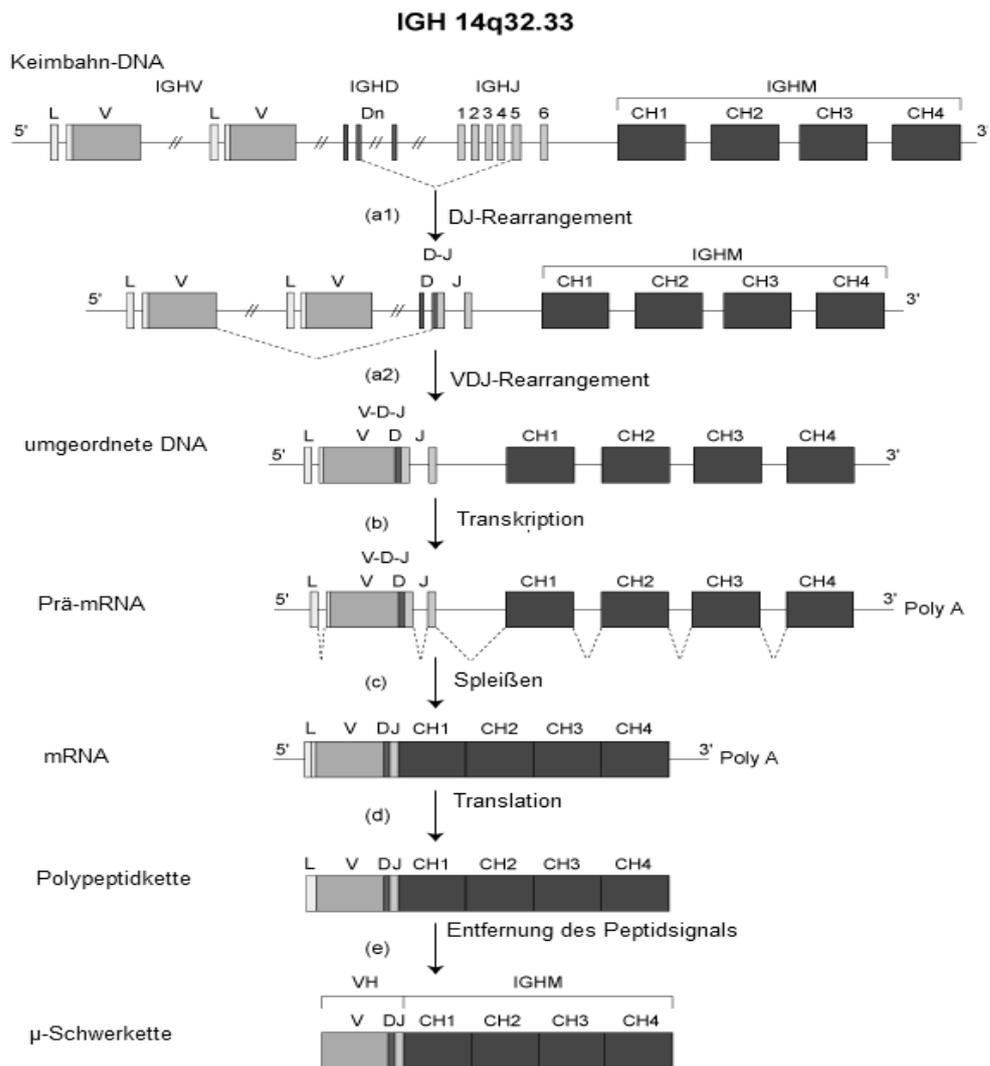


Abbildung 1. Darstellung des IgH-Rearrangements von der Keimbahn-DNA bis zur Schwereketten des IgH-Rezeptors über wahllose Zusammensetzung der VDJ-Segmente mit anschließendem Spleißen und Translation der mRNA in eine Polypeptidkette.

Quelle: modifiziert nach: IMGT®, the international ImMunoGeneTics informationsystem® <http://www.imgt.org> (founder and director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France)

Ein weiteres Charakteristikum der verschiedenen B-Zell-Reifungsstadien ist das jeweilige Gefüge der Oberflächenmarker, welches sich im Laufe des Reifungsprozesses wandelt, was zur Lymphomdiagnostik herangezogen werden kann. Die reife B-Zelle exprimiert IgD und IgM auf ihrer Oberfläche und verlässt nach eingehender Prüfung auf Autoantigenerkennung das Knochenmark [9].

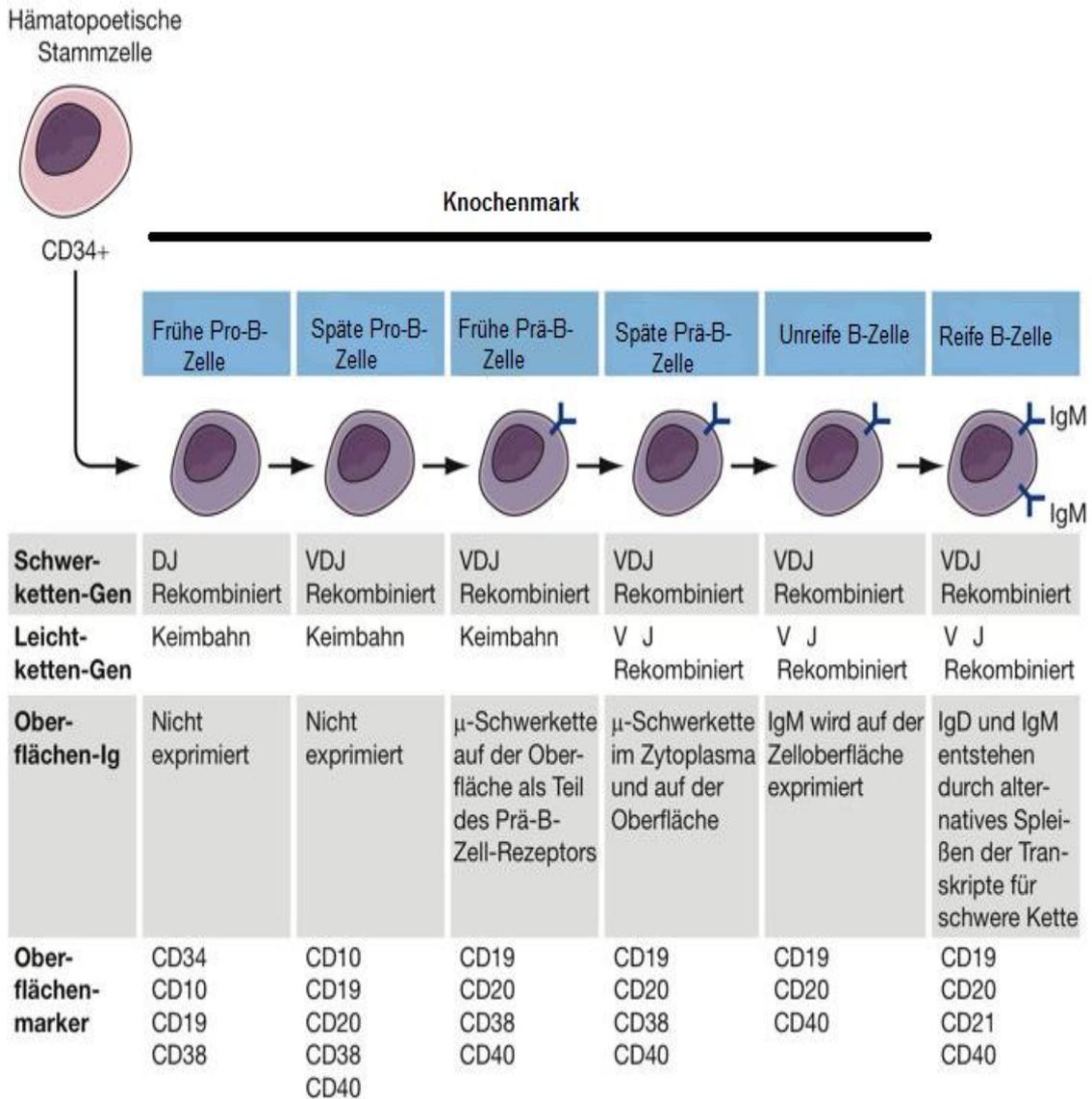


Abbildung 2. **Reifungsschritte der B-Zellen im Knochenmark bis zur Ausschwemmung ins Blut mit entsprechendem Immunglobulinketten-Rearrangement** und zugehöriger Oberflächenproteinexpression im Verlauf.

Quelle: modifiziert nach Harrisons Innere Medizin, 18. Auflage; © 2012, ABW Wissenschaftsverlag GmbH [26]

1.1.1.2 Somatische Hypermutation

Um das Antikörperrepertoire weiter zu erhöhen und die Antigenpezifität zu verbessern, erfahren die Immunglobulingene nach T-Zell-abhängigem Antigenkontakt der B-Zelle zur weiteren Adaption an das Antigen, während der klonalen Expansion im Keimzentrum, somatische Hypermutationen [27].

Hierunter versteht man Mutationen meist im Bereich der hypervariablen „komplementär determinierenden Regionen“, die sich meistens als einzelne Nukleotidsubstitutionen bemerkbar machen und dazu führen, dass die Vielfalt und letztlich auch die Affinität der Antikörper vergrößert wird. Die somatische Hypermutation wird durch eine Umwandlung der Cytidinbasen in Uracilbasen durch die Cytidin-Deaminase AID (Activation-induced cytidine deaminase), welche zu einer Guanin-Uracil-Fehlpaarung führt, eingeleitet [28]. Prinzipiell besteht nun die Möglichkeit der Replikation. Allerdings kommen Uracil-Basen üblicherweise in genomischer DNA nicht vor, so dass dies als Fehler erkannt wird. Es wird davon ausgegangen, dass Mutationen bei C:G Basenpaarungen daraufhin durch Fehler bei der Basen-Exzisions-Reparatur aus der Entstehung einer abasischen Stelle durch die Uracil-N-Glykosylase und daraus resultierenden Transitionen und Transversionen hervorgehen. Mutationen bei A:T Paarungen scheinen hingegen durch eine fehlerhafte Mismatch-Reparatur durch die Mismatchrepair-Proteine MSH2 und MSH6 zu entstehen [29].

1.1.2 Keimzentren – Risikozonen mit Entartungspotenzial

Maligne B-Zell-Lymphome können prinzipiell aus jeder Reifungsstufe der B-Zellen gebildet werden. Eigenschaften und Verlauf der Tumorerkrankung stehen dabei in starkem Zusammenhang mit der Stufe, auf der die Reifung arretiert. Nach abgelaufenen reaktiven Veränderungen werden Primärfollikel zu Sekundärfollikeln und weisen als solche auch ein Keimzentrum auf [8]. Im Inneren des Keimzentrums befinden sich Zentroblasten, also B-Zellen, die bereits Antigenkontakt hatten und vermehrungsfähig sind. Erkennbar sind sie an einem großen runden oder ovalen chromatinarmen Kern mit randständigen Nucleolen. Im Verlauf der B-Zell-Differenzierung wandern diese in die äußere Zone und werden somit zu Zentrozyten, relativ kleine Zellen mit einem kleinen langgezogenen, oft eingekerbten, chromatinreichen Kern. Keimzentren bergen immer ein gewisses Risikopotential für eine Entartung, da hier die Proliferation der B-Zellen stattfindet, weshalb sie auch als „Risikozonen“ bezeichnet werden [30]. Ein Reifungsarrest während der B-Zellentwicklung verhindert eine weitere

Ausdifferenzierung hin zur reifen B-Zelle und gilt immer als Malignitätsmerkmal. In jeder Reifungsstufe exprimieren die Zellen unterschiedliche Oberflächenproteine. Je nachdem auf welcher Stufe die Reifung im Verlauf der Lymphomgenese arretiert, zeigt die entsprechende Lymphomentität den zugehörigen B-Zell-Phänotyp der sogenannten korrespondierenden Normalzelle. Im Falle des FL handelt es sich dabei um eine ausdifferenzierte Keimzentrums-B-Zelle. Dieses Konzept der korrespondierenden nicht-neoplastischen Zelle wird auch zur Lymphomklassifikation herangezogen.

1.2 Klassifikation der B-Zell-Lymphome

Um Prognose und Verlauf abschätzen bzw. eine Therapie anordnen zu können, werden Lymphome seit den 1970er Jahren geeigneten Gruppen zugeordnet. Diese Klassifikation wurde seither stetig nach aktuellen Kriterien und Erkenntnissen überarbeitet. Je nach Vorhandensein sogenannter Hodgkin-, bzw. Reed-Sternberg-Zellen werden lymphatische Neoplasien in Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphome unterteilt. Da das folliculäre Lymphom der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome angehört, sollen im Folgenden nur diese genauer betrachtet werden. Je nachdem von welcher Zelle die Entartung ausgeht, werden die Non-Hodgkin-Lymphome weiterhin in B-, T-, oder NK-Zell-Lymphome unterteilt und nach morphologischen, klinischen, genetischen und immunphänotypischen Gesichtspunkten subklassifiziert [2]. So umfassen die B-Zellneoplasien die unterschiedlichsten Krankheitsbilder wie beispielsweise das Mantelzelllymphom, die Haarzelleukämie, die chronisch lymphatische Leukämie, das plasmablastische Lymphom und das Burkittlymphom. Je mehr Erkenntnisse durch morphologische und molekulare Methoden über Lymphome gewonnen werden, umso öfter erfordert dies eine Überarbeitung bereits bestehender Klassifikationen. Dabei werden hohe Anforderungen an eine geeignete Einteilung gestellt. Sie sollte auf jeden Fall eine Relevanz für den klinischen Verlauf und mögliche Therapieansätze besitzen, dem Arzt und dem Patienten auch die Möglichkeit einer Prognoseeinschätzung übermitteln, reproduzierbar sein, das heißt auf einem evidenzbasierten Gerüst stehen und

dabei die morphologisch biologischen und histologischen Besonderheiten der einzelnen Lymphomklassen nicht vernachlässigen. Nach jahrzehntelangen Unstimmigkeiten mehrerer nebeneinander bestehender Einteilungen lag 1998 mit der ersten WHO-Klassifikation erstmals eine einheitliche Ordnung vor. Die momentan aktuelle Klassifikation ist die WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2008, die auf der revidierten Kielklassifikation, der sogenannten R.E.A.L-Klassifikation (Revised-European-American-Classification of Lymphoid Neoplasms), basiert [2]. Eine Einteilung der Entitäten erfolgt dabei in erster Linie nach der korrespondierenden nicht-neoplastischen Zelle. Follikuläre Lymphome werden den indolenten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zugeordnet und sind nach den diffus großzelligen Lymphomen die zweithäufigsten Non-Hodgkin-Lymphome mit einer Inzidenz von 12 Personen pro 100.000 Einwohner und einem Geschlechterverhältnis 1 (männlich) zu 1,7 (weiblich) [2, 31]. Im ICD-0 Code besitzen die follikulären Lymphome die Nummer 9690/3, wobei erwähnt werden muss, dass sich diese Nummer je nach Stadium des tumorösen Geschehens ändert [2]. Das follikuläre Lymphom ist auch unter anderen Namen, die das Vorkommen spezifischer Zellen mehr in den Mittelpunkt rücken, bekannt. So wurden niedrigmaligne follikuläre Lymphome Grad I nach der Kielklassifikation auch als zentroblastische-zentrozytische Lymphome bezeichnet [32, 33], hochmaligne follikuläre Lymphome hingegen als zentroblastische Lymphome.

1.3 Das follikuläre Lymphom – Charakteristika und BCL2

1.3.1 Klinische Merkmale und Verlauf

Bei jedem diagnostizierten fünften Lymphom handelt es sich statistisch gesehen um ein follikuläres Lymphom [34]. Follikuläre Lymphome sind Lymphome des fortgeschrittenen Alters, mit dem Häufigkeitsgipfel in der sechsten Lebensdekade [35, 36]. Die höchste Inzidenz ist hierbei in den USA und in Westeuropa zu finden [37, 38]. Weltweit können große regionale Unterschiede festgestellt werden. So ist in den asiatischen Ländern die Inzidenz maligner Lymphome generell vergleichsweise niedrig [39].

Bei den meisten Patienten ist die Krankheit zum Zeitpunkt der Diagnose schon recht weit fortgeschritten und wird erst in Stadium III oder IV nach der sogenannten Ann-Arbor-Klassifikation, eine Einteilung, welche die Ausbreitung betroffener Lymphknoten entlang der Zwerchfellachse und der Sagittalebene des Körpers in den Blick nimmt, entdeckt [40, 41]. Dies mag wohl unter anderem auch an den oft sehr unspezifischen Krankheitssymptomen liegen. Typische Symptome sind dabei beispielsweise: Fatigue, Leistungsknick, Infektanfälligkeit durch Bildung funktionsloser Antikörper, vergrößerte tastbare Lymphknoten, die gut verschieblich, von derber Konsistenz und nicht druckdolent sind und durch eine vermehrte B-Zellansammlung zustande kommen, Luftnot (oft aufgrund einer Splenomegalie und vergrößerter mediastinaler Lymphknoten) und Knochenschmerzen durch eine Knochenmarksinfiltration [15, 42]. Prognostisch ungünstig ist das Auftreten einer sogenannten B (= Begleit)-Symptomatik, eines Ikterus durch Kompression des Ductus choledochus oder eine gesteigerte Blutungsneigung. Nur die Histologie kann die Diagnose sichern und die anderen Differenzialdiagnosen einer Lymphadenopathie ausschließen. Die Biopsie erfolgt dabei meistens aus einem peripher vergrößerten Lymphknoten und, bei Verdacht auf eine Knochenmarksinfiltration, aus einer Beckenkammstanze. Eine Feinnadelaspiration ist allerdings nicht ausreichend [36, 40, 43]. Die Inzidenz einer Knochenmarksinfiltration steigt mit sinkender Mortalität. Bei der Biopsie sollte beachtet werden, dass Lymphknoten aus der Axilla, der Leistengegend und unterhalb der Mandibula oft nur unspezifische reaktive Veränderungen aufweisen und nur selten aufgrund eines malignen Wachstums entartet sind. Paraaortal vergrößerte Lymphknoten sprechen dabei sehr stark gegen eine reaktive Veränderung. Es muss an dieser Stelle allerdings angemerkt werden, dass folliculäre Lymphome auch andere Strukturen des lymphatischen Systems und nicht nur die Lymphknoten befallen können [44]. Diese extranodalen Manifestationen sind jedoch seltener [15]. Die lymphatische Leukämie und das Lymphom sind verschiedene Manifestationen derselben Grunderkrankung, wobei zu erwähnen wäre, dass es auch bei jedem Lymphom zu einem leukämischen Verlauf kommen kann [45].

1.3.1.1 Stadieneinteilung nach Ann-Arbor und Prognoseeinschätzung nach FLIPI

Um das Befallsmuster prognostisch einordnen zu können, wird die sogenannte Ann-Arbor-Klassifikation herangezogen [43] (Tab. 1).

Tabelle 1. **Stadieneinteilung der Lymphome nach Ann-Arbor**

Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Befall einer Lymphknotenregion oder eines einzigen lokalisierten extranodalen Herdes	Befall von mindestens zwei Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells oder extranodale lokalisierte Herde mit Lymphknotenbefall auf einer Seite des Zwerchfells	Befall von mindestens zwei Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells oder Vorliegen von lokalisierten extranodalen Herden und Befall mindestens einer Lymphknotenregion mit Beteiligung beider Seiten des Zwerchfells	Vorliegen eines disseminierten Befalls extralymphatischen Gewebes (Leber- und Knochenmarkbefall zählt immer als Stadium IV)
		Stadium III₁ Befall subphrenischer lymphatischer Strukturen oberhalb des Truncus coeliacus	
		Stadium III₂ Befall subphrenischer Strukturen unterhalb des Truncus coeliacus	
Zusätzlich kann durch Hinzufügen des Buchstabens B das Vorliegen einer B-Symptomatik angedeutet werden. Wird ein A an das Stadium angehängt, fehlt diese Symptomatik.			

Um die Prognose der Rezidivwahrscheinlichkeit oder des Gesamtüberlebens besser einschätzen zu können, werden für das folliculäre Lymphom bestimmte Risikofaktoren erstellt, mittels derer ein Index errechnet werden kann [42].

Schlechte prognostische Faktoren sind dabei Alter ≥ 60 Jahre, Hb $< 12\text{g/dl}$, Ann-Arbor-Stadium $> \text{II}$, Befall > 4 LK-Regionen und eine LDH-Erhöhung [42].

Ein niedriges Risiko ein Rezidiv zu erleiden oder eine gute Gesamtüberlebenszeit aufzuweisen, entspricht einer FLIPI-Punktekonstellation (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) von 0-1 Punkten, ein intermediäres Risiko besteht ab 2-3 Punkten und von einem hohen Risiko spricht man ab einem Wert > 3 Punkten [40, 46]. Eine Anwendung des FLIPI kann dabei sowohl bei indolenten, als auch bei aggressiv wachsenden Lymphomen erfolgen.

1.3.1.2 Histologische Gradeinteilung der folliculären Lymphome

Je nach Anteil der Zentroblasten im Infiltrat werden die folliculären Lymphome in drei Malignitätsgrade unterteilt [2, 35, 47] (Tab. 2).

Tabelle 2. **Histologische Gradeinteilung der folliculären Lymphome** nach Zentroblastenanteil. hpf = high power field

Stadium	Anzahl der Zentroblasten/hpf
Stadium I	0-5
Stadium II	6-15
Stadium III	>15

Stadium I und II können oft nur schwer voneinander getrennt werden, weshalb man mittlerweile diese Stadien zu Stadium I/II zusammenfasst. Die Anzahl der Zentroblasten/hpf umfasst in diesem Fall 0-15 Zentroblasten. Bei Stadium III gibt es auch noch eine weitere Unterteilung in IIIa und IIIb. In Stadium IIIa sind auch Zentrozyten nachweisbar, im Stadium IIIb kommen massive Flächen an Zentroblasten vor [35]. Inwieweit sich diese Unterteilung auch auf klinische und biologische Unterschiede auswirkt, ist nach wie vor fraglich. Folliculäre Lymphome zeigen die Tendenz zur Transformation in ein diffus großzelliges Lymphom [40, 48, 49]. Mehr als 15 Zentroblasten pro hpf und eine diffuse Ausbreitung dieser Gebiete innerhalb des LK lassen eine erfolgte Transformation erahnen.

1.3.2 Morphologie

Follikuläre Lymphome sind kleinzellige Keimzentrumslymphome, da sie den Keimzentrumszellen entstammen [2, 42]. Normale Keimzentren bilden sogenannte Follikelmäntel, was bei den entarteten Zentren nicht mehr der Fall ist. Die klare Zonierung ist aufgehoben. Entartete Lymphozyten sind von Antigenstimuli unabhängig und bleiben beim follikulären Lymphom im Keimzentrum bestehen. Es werden Pseudofollikel ausgebildet, die zu einer Aufhebung der physiologischen Lymphknotenstruktur führen (Abbildung 3) [2, 50]. Zwischen den Follikeln liegende Tumorzellen sind meist kleiner als die Follikelzellen. Nach der WHO-Klassifikation des Jahres 2008 unterscheidet man vier verschiedene Wachstumsmuster: rein follikulär, follikulär und diffus, fokal-follikulär bei weniger als 25 % follikulärem Muster und das selten vorkommende rein diffuse Wachstumsmuster [2, 51].

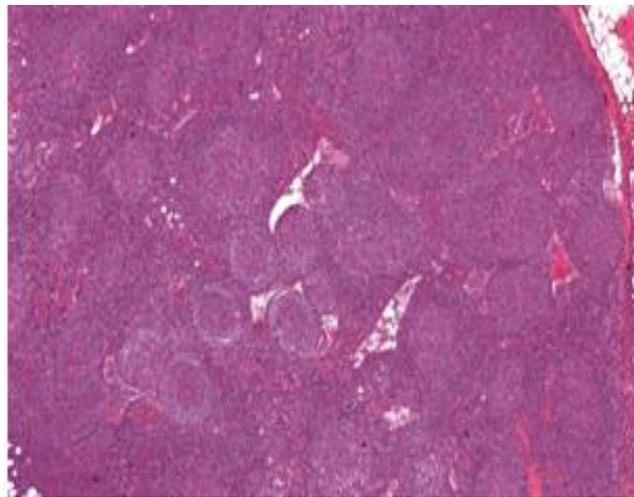


Abbildung 3. **Histologischer Schnitt zur Darstellung der Imitation von Keimzentren durch das follikuläre Lymphom** unter Aufhebung der ursprünglichen Lymphknotenarchitektur [52].

1.3.3 Genetik und Immunphänotyp

Follikuläre Lymphome sind typischerweise durch die reziproke Translokation $t(14;18)(q32;q21)$, die sich in 85-90 % der FL nachweisen lässt, charakterisiert [15, 53-56]. Bei dieser somatischen Mutation fusioniert das *BCL2*-Gen von Chromosom 18 mit dem *IgH*-Gen auf Chromosom 14 ($t(14;18)(q32;q21)$ IgH-BCL2) (Abb. 4). Diese Fusion führt zu einer BCL2-Überexpression, einem antiapoptotischen Protein der äußeren Mitochondrienmembran, das die Freisetzung von Cytochrom C verhindert, einem Protein, welches entscheidend für die Initiierung der apoptotischen Signalkaskade ist [53, 57].

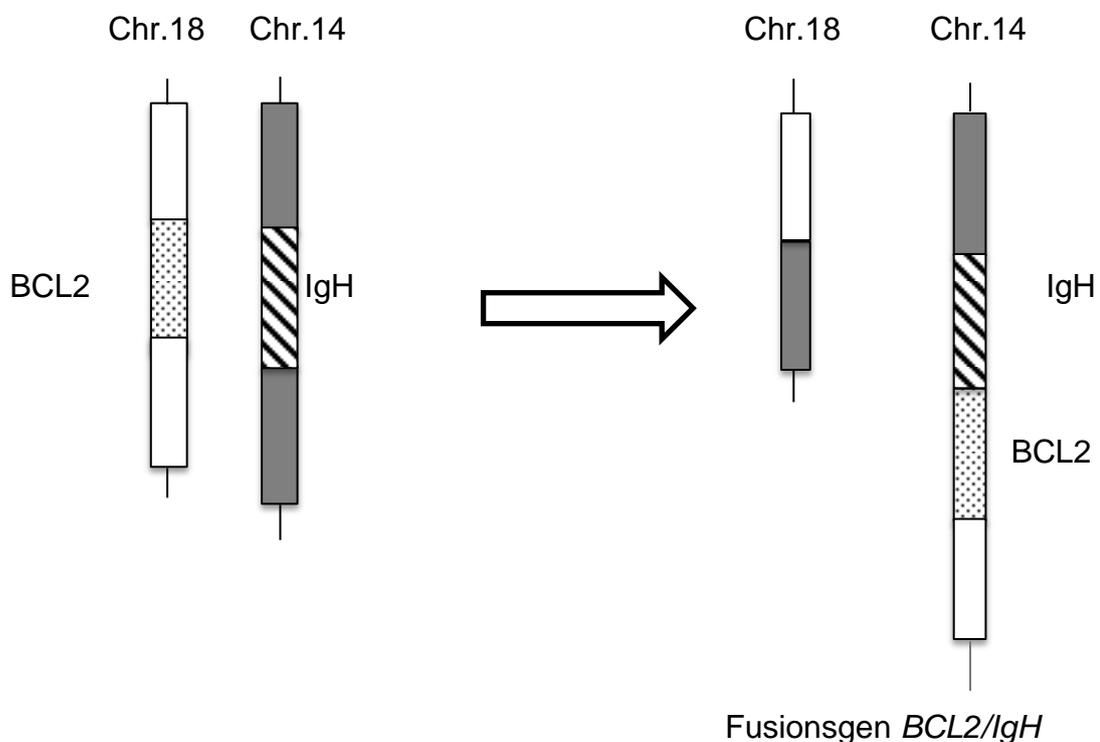


Abbildung 4: **Schematische Darstellung der $t(14;18)$ -Translokation.** Im Schema ist die Region des *BCL2*-Gens auf Chromosom 18 und die Region von *IgH* auf Chromosom 14 schwarz-weiß dargestellt. Durch eine reziproke Translokation fusionieren das *BCL2*-Gen und *IgH* auf Chromosom 14 zu *BCL2/IgH*, während auf Chromosom 18 die *BCL2*-Sequenz fehlt. Anliegende Gensequenzen sind einfarbig grau oder weiß dargestellt.

Die entarteten Zellen weisen einen spezifischen Phänotyp an Keimzentrums-assoziierten B-Zell-Markern auf: CD20-positiv, CD10-positiv, BCL2-positiv, BCL6-positiv, CD19-positiv, CD22-positiv, CD45RA-positiv, CD79a-positiv, BCL6-positiv, CD5-negativ, CD23-negativ, CD43-negativ [2, 42].

1.3.3.1 Abgrenzung zum Marginalzonenlymphom

Die Negativität für CD5 und CD43 ist bedeutsam im Hinblick auf die Abgrenzung zum nodalen Marginalzonen- und Mantelzelllymphom. Dies ist nicht immer einfach, da besonders die Marginalzonenlymphome einen ähnlichen Immunphänotyp wie die folliculären Lymphome aufweisen, und sogar einige folliculäre Lymphome eine partielle Marginalzonedifferenzierung zeigen [51, 58]. Sie sind jedoch typischerweise negativ für CD10 und CD23, können aber in manchen Fällen CD41c positiv sein [59]. Die Zellen exprimieren IgM, weisen aber allenfalls eine schwache Expression des IgD-Proteins auf. Insgesamt handelt es sich um eine sehr heterogene Zellpopulation mit sehr verschiedenartigen genetischen Aberrationen. Typisch für das MALT-Lymphom, welches die extranodale Variante des Marginalzonenlymphoms darstellt, ist die t(11;18)(q21;q21)-Translokation, wobei auch Trisomien wie Trisomie 3 und 18 vorkommen können [60, 61]. Die Diagnose eines Marginalzonenlymphoms kann nur durch Ausschlussverfahren gestellt werden.

1.3.4 Therapie

Das Verhältnis indolenter zu aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome liegt neuen Studien zufolge bei sieben zu drei [35]. Niedriggradige folliculäre Lymphome weisen ein indolentes Wachstum auf, was chemotherapeutische Behandlungsoptionen erschwert, da diese hauptsächlich an sich teilenden Zellen wirken [40]. Charakteristisch für den klinischen Verlauf ist eine langsame Wachstumsrate mit einer hohen Rezidivwahrscheinlichkeit. Im Gegensatz dazu nehmen hochmaligne Lymphome ohne zeitige Therapie einen dramatischen Verlauf, sind dann jedoch meistens mit einer geeigneten Chemotherapie gut angreifbar und gelten deshalb als „potentiell kurabel“ [62]. Aufgrund der Strahlensensibilität des folliculären Lymphoms kann eine Radionuklidtherapie sogar einen kurativen und nicht nur palliativen therapeutischen Nutzen haben [63, 64]. Bei Rezidiven wird regelhaft die Erstlinientherapie angewendet [36]. Auch eine autologe Stammzelltransplantation kommt in Betracht. Während ursprünglich das therapeutische Ziel nur auf möglichst langen Erhalt einer

hohen Lebensqualität über eine prolongierte Zeit abzielte, konnte mit der Einführung von Rituximab, einem chimären monoklonalen Antikörper, der gegen das Oberflächenprotein CD20 gerichtet ist und eine selektive Depletion dieser Zellen auslöst, auch eine signifikante Verlängerung des medianen progressionsfreien Intervalls erreicht werden [40, 65]. Zum heutigen Zeitpunkt zeigen statistische Werte eine mediane Überlebenszeit von acht bis zehn Jahren nach Erstdiagnosestellung an [41]. Nach dem Auftreten eines Rezidivs geht man von einer mittleren Überlebenszeit von circa fünf Jahren aus.

1.3.5 Diagnostik und BCL2

In B-Lymphozyten ist die Expression des *IgH*-Gens konstitutionell aktiviert. Wird über den Promotor dieses Gens ein Proliferationsprotoonkogen, wie *BCL2* (B-cell-Leukemia 2) kontrolliert (siehe 1.3.3.), so führt die daraus resultierende Fehlregulation im Ablauf des programmierten Zelltods zu einem neoplastischen Wachstum und einer unvollständigen Differenzierung [66, 67]. Interessanterweise fällt die *BCL2*-Expression trotz identischer Translokation in diesen Tumoren sehr heterogen aus, was unter Umständen auch an einer Herunterregulation der *BCL2*-Expression bei proliferierenden Zellen liegen könnte. Dies liegt nahe, da die *BCL2*-Expression invers mit der Zellproliferation korreliert, was auch das schlechte Ansprechen der Translokations-positiven Lymphome gegenüber Kortikosteroiden und Zytostatika erklären könnte [68, 69]. Zur *BCL2*-Proteinfamilie werden um die 20 Mitglieder gezählt, die nochmals in drei Subgruppen unterteilt werden können. Eine Gruppe umfasst die Proteine mit antiapoptotischer Aktivität, die anderen beiden Gruppen werden von proapoptotischen Proteinen gebildet [70]. Das *BCL2*-Gen weist bis zu vier konservierte homologe Domänen BH1-BH4 auf (Abb. 5 und Abb. 6).

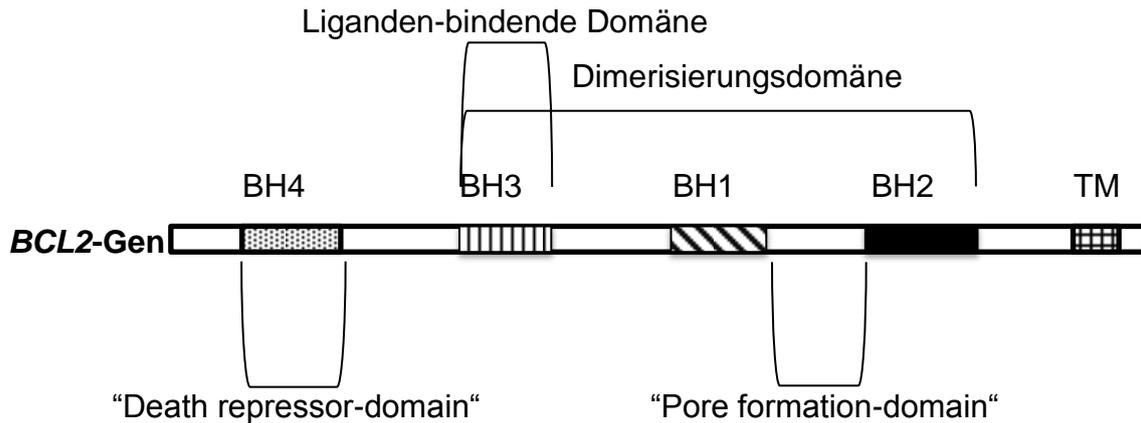


Abbildung 5. **Schematische Darstellung der Lokalisation der homologen Domänen und ihrer jeweiligen Funktion auf dem *BCL2*-Gen.** TM steht für Transmembrandomäne. BH4 umfasst die Aminosäuren 7-33, BH3 die Aminosäuren 93-107, BH1 reicht von den Aminosäuren 136-155 und BH2 von den Aminosäuren 188-202.

Neben den drei Exons und den zwei Introns, beinhaltet das Gen zwei Promotorregionen, die eine Starterfunktion für die Transkription übernehmen. Das BCL2-Protein liegt in zwei Isoformen vor. Die größere α -Isoform des *BCL2*-Genproduktes besitzt ein Molekulargewicht von 26 kDa, die kleinere β -Isoform ein Gewicht von 22 kDa [71]. Das BCL2-Protein ist typischerweise in der äußeren Mitochondrienmembran [57, 67], dem endoplasmatischen Retikulum und der intrazellulären Membran der Kernhülle lokalisiert. Durch die BCL2-Aktivierung erfolgt eine Modifizierung des Proteins über eine Phosphorylierungsreaktion durch ASK1/JNK1, ERKs, PKC oder mittels Stress aktivierte Kinasen. Den Namen verdankt das Protein seiner Entdeckung im Rahmen der B-Zelllymphome [72].

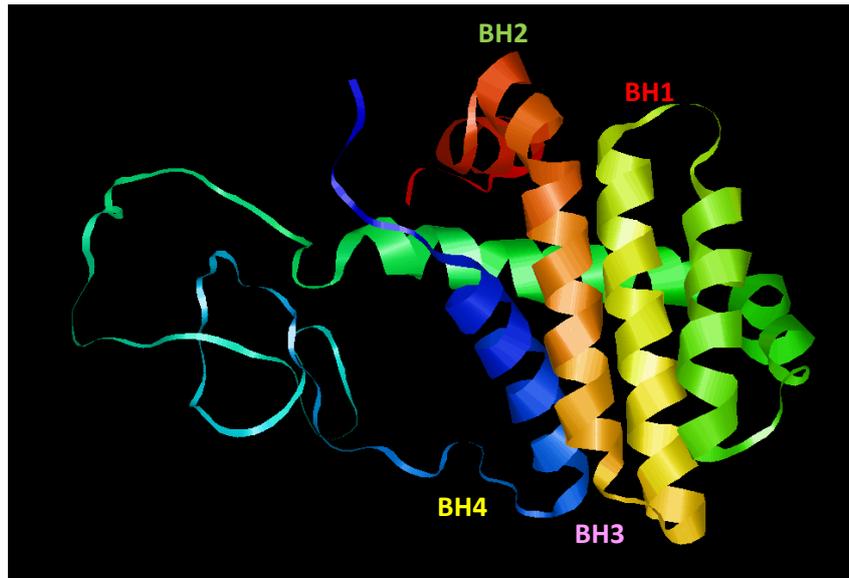


Abbildung 6: **Dreidimensionale Molekülstruktur des BCL2-Proteins mit den entsprechenden BH-Domänen** [52]. Das Protein weist neben vier amphipathischen Helices auch zwei zentral liegende hydrophobe Helices auf [73].

Das BCL2-Protein hat Einfluss auf die Membranpermeabilität. Eine Inaktivierung des BCL2-Proteins bewirkt eine zytoplasmatische Freisetzung von Cytochrom C, das zusammen mit dem Apaf 1-Protein (Apoptotic Protease activating Factor 1) das sogenannte Apoptosom bildet, welches über Kaspasenaktivierung die Apoptose in Gang setzt [57].

1.3.5.1 FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)

Wie bereits erwähnt, führt eine Translokation, die das *BCL2*-Gen in Juxtaposition zum IgH-Schwerkettenloкус bringt, zu einer Überexpression des BCL2-Proteins (siehe 1.3.3.) [49]. Studien zufolge tragen 85-90 % der folliculären Lymphome die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ [49, 55], die über Fluoreszenz-markierte Sonden im Rahmen einer FISH nachgewiesen werden kann. Mit diesen Sonden werden die beiden den Bruchpunkt flankierenden Abschnitte zweifarbig markiert [74]. Eine Sonde hybridisiert dabei vom Bruchpunkt aus in Richtung Telomer, die andere bindet komplementär an eine zentromerwärts des Bruchpunktes gelegene Gensequenz.

Unter dem Mikroskop ist dies bei normalen Chromosomen als rot-grünes Doppelsignal erkennbar. Im Falle einer vorliegenden Translokation ist dieses Doppelsignal unter dem Fluoreszenz-Mikroskop gesplittet. Rote und grüne Signale liegen nun nicht mehr nebeneinander, sondern werden getrennt voneinander wahrgenommen. Meistens häufen sich die Bruchpunkte im Bereich des Exon 3 3`-Endes des *BCL2*-Gens (3`*BCL2*) oder in der 3`-untranslatierten Genregion des Chromosoms 18 [49, 75-77], innerhalb derer die 279 bp lange AT-reiche MBR (Major Breakpoint Region) liegt, welche sich 200 kb vom Promotor entfernt befindet und eine wichtige Funktion im Rahmen der Transkriptionsregulation übernimmt. Auch in der MCR (Minor Cluster Region) des *BCL2*-Gens können häufig Brüche festgestellt werden [78, 79]. In neueren Studien konnten außerdem zwei weitere Bruchpunkte detektiert werden, nämlich im Bereich der 5`MCR und der ICR (Imprinting Control Region) [78].

1.3.5.2 Immunhistochemie und Verfügbarkeit neuer Antikörper

Um die Expression des BCL2-Proteins semiquantitativ zu visualisieren, findet der BCL2-Antikörper Klon 100/D5 Anwendung. Es handelt sich dabei um einen monoklonalen IgG₁-Mausantikörper, dessen Immunogen die Peptidsequenz GAAPAPGIFSSQPG bildet (Abb. 7). Mittlerweile ist ein weiterer monoklonaler Primärantikörper erhältlich, der anti-BCL2-Kaninchenantikörper E17 des Isotyps IgG. Kreuzreaktionen zu anderen Mitgliedern der BCL2-Familie sind keine bekannt. E17 bindet an die zwischen BH3 und BH4 liegenden Aminosäuren 61-74 (Abb. 7). Diese beiden BCL2-Antikörper sowie der dritte, SP66, detektieren B-Zellen der Mantelzone und Zellen der T-Zellzone. Auch bei SP66 handelt es sich um einen monoklonalen Kaninchenantikörper, der gegen den N-Terminus des BCL2- α -Proteins gerichtet ist. Nahezu 70 % der folliculären Lymphome exprimieren zudem LMO2 (LIM-only-Transkriptionsfaktor-2). Da Mantelzelllymphome keine Expression des LMO2-Proteins aufweisen, kann die immunhistochemische Färbung mit dem monoklonalen LMO2-Kaninchenantikörper, der auch als „SP51-Antikörper“ bezeichnet wird, zur Differenzierung zwischen Mantelzelllymphomen und folliculären Lymphomen

herangezogen werden. Eine niedrigere Expression in folliculären Lymphomen mit diffusem Wachstumsmuster oder folliculären Lymphomen Grad IIIa und IIIb ist bisher nicht bekannt. Ein Vorteil des LMO2-Antikörpers liegt darin, dass das immunhistochemische Färbesignal durch die hauptsächlich nukleäre Expression von LMO2 eine leichtere Interpretation des Ergebnisses ermöglicht als es bei zytoplasmatisch exprimierten Markern der Fall ist [80]. Die größte Spezifität für die immunhistochemische Diagnostik des folliculären Lymphoms bietet jedoch der murine Primärantikörper HGAL (MRQ-49), der das "Human Germinal Center-associated Lymphoma-Protein" detektiert [51, 81-83].

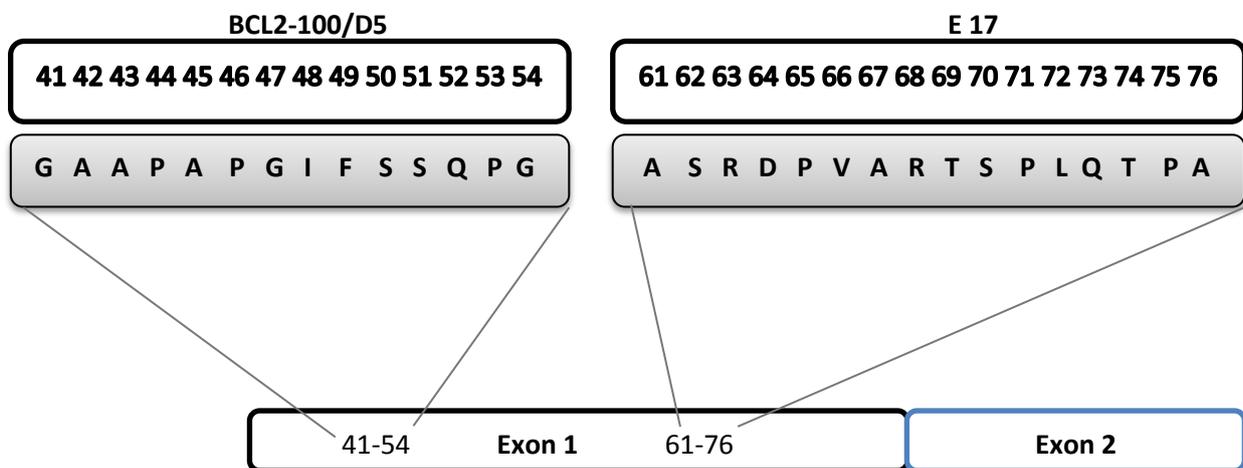


Abbildung 7. Schematische Darstellung der Bindungsstellen der beiden Antikörper BCL2-100/D5 und BCL2-E17 des *BCL2*-Gens [52].

1.3.5.3 Somatische Mutationen bei t(14;18)-Translokationen

Zur Entstehung eines folliculären Lymphoms ist die t(14;18)-Translokation alleine nicht ausreichend [84]. Weitere genetische Alterationen in anderen Genen sind für ein neoplastisches Wachstum erforderlich [49, 71, 85, 86]. Nach einer Studie von Matolcsy et al. ist die morphologische Umwandlung des folliculären Lymphoms hin zum diffus großzelligen Lymphom auch mit somatischen Mutationen des translozierten *BCL2*-Gens assoziiert [49].

Studienergebnissen an diffus großzelligen Lymphomen zufolge dominieren diese als Punktmutationen im Bereich des offenen Leserasters zwischen 40 und 221 bp. Ein Vorliegen der Mutationen setzt jedoch ein Vorhandensein der t(14;18)-Translokation voraus [53]. Auch in FL können solche Punktmutationen gefunden werden. Dies kann mittels Sequenzanalyse geschehen [53]. Die Sequenzanalyse ist ein Verfahren, das die Möglichkeit bietet, die Basenabfolge bestimmter Genabschnitte festzustellen und sie mit der Wildtyp-Gensequenz zu vergleichen, um eventuelle Mutationen zu detektieren. Bisher durchgeführte Sequenzanalysen bestimmter Regionen des *BCL2*-Gens bei t(14;18)-positiven FL im Bereich der Aminosäuren 26-91 brachten in Studien von Masir et al. Punktmutationen an neun Aminosäurebereichen zutage [68]. Detektiert werden konnten Missense-Mutationen im Bereich der Aminosäuren 28 (A→T), 46 (CC→GT), 48 (T→G), 49 (T→G), 58 (T→G), 59 (C→T) und 60 (G→A) und stumme Mutationen, die also zu keinem Aminosäureaustausch führen, im Bereich der Aminosäuren 71 (G→A) und 72 (G→A). Auch im Bereich des *BCL6*-Gens können bei t(14;18)-positiven FL somatische Mutationen nachgewiesen werden, welche sich in den Genbereichen 106-127 bp und 420-435 bp häufen.

1.3.6 BCL2-negative Lymphome

Nodale folliculäre Lymphome, die in der immunhistochemischen Färbung keine Positivität für das BCL2-Protein aufweisen, werden als BCL2-negative Lymphome bezeichnet und sind bisher kaum charakterisiert. Aufgrund ihrer Morphologie, der fehlenden Marginalzonenproliferation und ihrer Genetik scheinen sie jedoch tumorbiologisch eher der Gruppe der folliculären Lymphome als den Mantelzelllymphomen anzugehören und sind wohl ihrem Phänotyp nach einem späten Stadium der Keimzentrumsdifferenzierung der B-Zellen zuzuordnen. Da die t(14;18)-Translokation zu einer Überexpression des BCL2-Proteins führt, ist anzunehmen, dass BCL2-negative Lymphome ein Fehlen dieser Translokation zeigen. Klar davon abzugrenzen sind nämlich sogenannte pseudonegative FL, die sich zwar durch ein negatives Ergebnis in

der immunhistochemischen Färbung mit dem Standardantikörper BCL2-Klon 100/D5 erkenntlich machen, bei Färbungen mit dem E17-Antikörper jedoch als deutlich BCL2-positiv zu werten sind und tatsächlich eine t(14;18)-Translokation tragen. Studien von Masir et al. und Schraders et al. vermuten die Ursache für die fehlende BCL2-Detektion im Nichtvorhandensein der t(14;18)-Translokation oder in Mutationen im *BCL2*-Gen, wodurch die Standardantikörperbindung verhindert wird [87, 88]. BCL2-negative folliculäre Lymphome ohne t(14;18) weisen unter Umständen eine andere Mutation auf. So konnten beispielsweise Studien von Guo et al. eine erhöhte Expression von BCL6 oder TP53 in BCL2-negativen folliculären Lymphomen im Vergleich mit t(14;18)-positiven FL nachweisen, wobei die Expression von BCL6 und TP53 invers miteinander korreliert [69, 89]. Ebenso sind auch Translokationen in 3q27 und Trisomien häufiger bei BCL2-negativen FL zu finden [90, 91]. Auch die Expression an IRF4/MUM1 (Interferon Regulatory Factor 4 / Multiple Myeloma Oncogene 1) scheint in BCL2-negativen FL erhöht zu sein [92]. Nach Studien von Leich et al. wird CD10 nur bei ca. zwei Dritteln der Lymphome exprimiert [93, 94]. Amplifikationen im Bereich 18q11.2q21 konnten im Gegensatz zu t(14;18) positiven Lymphomen, bei denen Mutationen in diesem Bereich in ca. 30 % der Fälle vorkommen, bisher noch nicht detektiert werden. Welche molekularen Trigger bei t(14;18)-negativen FL zur Lymphomentstehung führen, ist bisher noch unklar.

2. Problemstellung und Ziel der Studie

Nach der WHO-Klassifikation und verschiedenen Studien, beträgt die Rate an folliculären Lymphomen, die immunhistochemisch eine BCL2-Überexpression aufweisen, 85-90 % [2, 35, 42, 53, 77]. Dies führt zu der Fragestellung, inwiefern 10-15 % der folliculären Lymphome keine Überexpression dieses antiapoptotischen Proteins zeigen und sich immunhistochemisch mit der Standardantikörperfärbung als BCL2-negativ darstellen [69]. Fraglich ist, ob die BCL2-Negativität auf ein Fehlen der Translokation t(14;18) zurückzuführen ist, welches eine vollkommen unterschiedliche Pathogenese der folliculären Lymphome mit und ohne Nachweis einer t(14;18)-Translokation voraussetzt und was anhand unterschiedlicher genetischer Alterationen der beiden Gruppen schon teilweise aufgezeigt wurde [93]. Interessant ist dabei das Auftreten sogenannter „pseudonegativer folliculärer Lymphome“, die sich nur mit dem Antikörper BCL2-Klon 100/D5 als „BCL2-negativ“ darstellen, während sie in der immunhistochemischen Färbung mit dem relativ neuen Antikörper E17 (Bereich der Aminosäuren 61-76) und dem SP66-Antikörper (gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet) als deutlich BCL2-positiv zu werten sind und einen beträchtlichen Anteil der fraglichen 10-15 % der angeblich BCL2-negativen folliculären Lymphome ausmachen. Eventuell könnte dies auf eine Mutation im Bereich des *BCL2*-Gens, der für die Bindungsstelle des Standardantikörpers Klon 100/D5 kodiert, zurückzuführen sein, so dass BCL2-Protein zwar vorhanden ist, sich aber mit diesem Antikörper nicht nachweisen lässt, da die veränderte Proteinstruktur eine Bindung des Antikörpers Klon 100/D5, nicht jedoch die Bindung der Antikörper E17 und SP66 verhindert, oder es könnte die t(14;18)-Translokation fehlen. [87, 88] Wie oft ein solches Phänomen jedoch tatsächlich nachgewiesen werden kann, ist vollkommen unbekannt. Bisher wurde noch keine systematische Analyse über die Zusammenhänge zwischen der t(14;18)-Translokation und den in der immunhistochemischen BCL2-Standardantikörperfärbung „BCL2-negativ“ erscheinenden folliculären Lymphomen, den *BCL2*-Genmutationen und den Antikörperbindungen vorgelegt. Deshalb soll es das Ziel der Studie sein, neben der Ermittlung der

Inzidenz BCL2-negativer Lymphome mit der Standardantikörperfärbung (Klon 100/D5) und der tatsächlichen Inzidenz nach Herausnahme der pseudonegativen follikulären Lymphome auch deren Korrelation einer immunhistochemisch dargestellten BCL2-Negativität mit einem Fehlen der t(14;18)-Translokation in Verbindung zu bringen. Weiterhin soll zusätzlich zur Bestimmung des Translokationsstatus t(14;18) in BCL2-negativen Fällen eine Sequenzanalyse des relevanten Abschnitts in Exon 1 des *BCL2*-Gens erfolgen, um eventuelle Mutationen im Bereich der Bindungsstelle des Standardantikörpers zu detektieren.

3. Material und Methoden

3.1 Auswahl der Studienfälle und Zusammenstellung der Gruppen BCL2-negativer FL

Der Großteil der verwendeten Präparate stammt aus dem Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen. Vier der Studienfälle wurden aus auswärtigen Pathologien zum Konsil in das Institut Tübingen eingesandt, darunter folgende Institute:

- das Pathologische Universitätsinstitut der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität in Salzburg
- das Pathologische Institut in Sindelfingen
- das Konsultations- und Referenzzentrum für Lymphknotenpathologie in Würzburg
- das Pathologische Institut der Universitätsklinik in Innsbruck

Insgesamt wurden 240 Fälle follikulärer Lymphome mithilfe der Software „NEXUS/PAS-NET“ (NEXUS AG, 60314 Frankfurt am Main / Deutschland) einem digitalen Material- und Fallerfassungs- sowie Befundungsprogramm im Archiv in Tübingen ermittelt. Dabei wurden alle Fälle innerhalb des Zeitraums Januar 2005 bis August 2011 und ein einzelner Fall aus dem Jahr 2012, der nachträglich hinzukam, berücksichtigt. Von diesen Fällen wurden anhand der vorhandenen Befundakten all diejenigen ausgesucht, die sich mit der Standardantikörperfärbung (Klon 100/D5; DAKO, Hamburg, Deutschland) als „BCL2-negativ“ darstellen ließen. Die Fallzahl belief sich nun auf 43 Präparate, von denen daraufhin die bereits vorhandenen histologischen Schnitte zusammengetragen wurden oder auch neu angefertigt werden mussten. In allen Fällen wurden die HE-gefärbten Präparate berücksichtigt, um die Diagnose eines „Follikulären Lymphoms“ und das Tumorstadium im mikroskopischen Bild zu überprüfen. Weiterhin wurden zur Diagnoseüberprüfung, zur Feststellung des Proliferationsgrads und der immunphänotypischen Ausprägung der B-Zell-spezifischen Oberflächen-

proteine auch die immunhistochemischen Färbungen der Proteine CD3, CD5, CD10, CD20, CD23, CD30, BCL6, MUM1, Cyclin D1, Giemsa und Mib1 herangezogen. Die Gradeinteilung erfolgte nach den Richtlinien der "WHO-Klassifikation der Tumore hämatopoetischer und lymphoider Gewebe" aus dem Jahr 2008 [95]. Da folliculäre Lymphome Grad III häufig t(14;18)-negativ sind und stattdessen andere Translokationen zeigen, wurden nur FL Grad I/II berücksichtigt [96]. Dies führte jedoch zu einer weiteren Dezimierung, da sich einige der Läsionen entweder als höhergradige Lymphome, bzw. als mittlerweile in diffus großzellige B-Zelllymphome transformiert, erwiesen. Für die Studie kam daher eine Gruppe von 23 Fällen in Betracht, von denen einer der Fälle jedoch aufgrund zu schlechter DNA-Qualität nicht weiter verwendet werden konnte und daher von der Studie ausgeschlossen werden musste. Im Folgenden wurden in der Studie zwei unterschiedliche Fallgruppen untersucht. Die eine Gruppe bildeten all diejenigen Fälle, die sich im immunhistochemischen Bild tatsächlich mit dem Standardantikörper (Klon 100/D5) und E17/SP66-Antikörpern als BCL2-negativ darstellten und die zweite Gruppe bildeten die sogenannten „pseudonegativen folliculären Lymphome“, welche sich mit Klon 100/D5 BCL2-negativ und mit den E17/SP66 - Antikörpern als BCL2-positiv zeigten. Beide Gruppen wurden nun mit jeweils unterschiedlichen Methoden unter verschiedenen Fragestellungen näher untersucht. Hierauf soll im weiteren Verlauf der Dissertation noch genauer eingegangen werden.

Nebenbei soll erwähnt werden, dass im Laufe der Präparatzusammenstellung eine dritte Gruppe von vier Fällen ins Auge fiel, die sich immunhistochemisch mit dem Standardantikörper (Klon 100/D5) und den E17/SP66-Antikörpern zwar als BCL2-positiv darstellen ließen, aber trotzdem keine t(14;18)-Mutation aufwiesen. Diese Fälle wurden ausgeschlossen.

Die Studie wurde vom lokalen Ethik-Komitee genehmigt.

ANTRAGSNUMMER: 300/2010BO1

3.2 Reagenzien

Tabelle 3. Auflistung der verwendeten Reagenzien

Immunhistochemie	
BCL2-Onkoprotein-Antikörper Klon 100/D5	DAKO, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:50
BCL2-Onkoprotein-Antikörper Klon E17	Zytomed, Berlin, Deutschland; Verdünnung 1:50
BCL2-Onkoprotein-Antikörper Klon SP66	Cell Marque, Rocklin, CA, USA; Verdünnung 1:100
HGAL-Antikörper	Zytomed, Berlin, Deutschland; Verdünnung 1:400
LMO2-Antikörper Klon 1A9-1	Ventana Roche, Tucson, AZ, USA
BCL6	Zytomed, Berlin, Deutschland; Verdünnung 1:25
CD3	DCS, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:100
CD5	BIOZOL, Eching, Deutschland
CD10	Novocastra, Berlin, Deutschland; Verdünnung 1:30
CD20	DAKO, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:500

CD23	Novocastra, Berlin, Deutschland; Verdünnung 1:30
CD43	Novocastra, Berlin, Deutschland
Mib1	Ki-67; DAKO, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:200
MUM1	DAKO, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:200
FISH	
Dual Color Break Apart-Sonde/ BCL2 (Vysis LSI BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe)	Abott Molecular, Wiesbaden, Deutschland
Dual Color Break Apart-Sonde/ BCL6 (Vysis LSI BCL6 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe)	Abott Molecular, Wiesbaden, Deutschland
Dual Color Break Apart-Sonde/ IgH (Vysis LSI IgH Dual Color Break Apart Rearrangement Probe)	Abott Molecular, Wiesbaden, Deutschland
Xylol	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Ethanol in verschiedenen Verdünnungen, Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumcitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland				
Pepsin-Puffer	0,9 % NaCl (mit 1 N HCl auf pH 2,0 einstellen) + Pepsin: 1:60.000 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA				
Denaturierungslösung	70 % Formamid + 2x SSC (pH 5,3) mit dH ₂ O einstellen auf pH 7.0 - 8.0				
Fixogum	Marabu, Tamm, Deutschland				
20x SSC	<ul style="list-style-type: none"> • tri-Natriumcitrat Dihydrat 99 % Carl Roth GmbH+ Co. KG, Karlsruhe, Deutschland • Natriumchlorid Merck, Darmstadt, Deutschland Herstellung von 20x SSC: <table border="1" data-bbox="748 1218 1243 1317"> <tr> <td>NaCl</td> <td>3 M</td> </tr> <tr> <td>NaCitrat</td> <td>340 mM</td> </tr> </table>	NaCl	3 M	NaCitrat	340 mM
NaCl	3 M				
NaCitrat	340 mM				
Post-Hybridisierungspuffer	20x SSC + 0,3 % NP-40 + dH ₂ O mit 1 N NaOH auf pH 7.0-7.5 einstellen				
NP-40	Vysis, Abbott Molecular, USA				
Vysis DAPI I Counterstain	Vysis, Abbott Molecular, USA				

DNA/RNA-Extraktion							
SDS-Lysepuffer	<p>Herstellung des 1x SDS-Lysepuffer:</p> <table border="1"> <tr> <td>TRIS</td> <td>5 mM</td> </tr> <tr> <td>EDTA</td> <td>0,1 mM</td> </tr> </table> <p>+ 2 % SDS + RNase/DNase freies Wasser</p>	TRIS	5 mM	EDTA	0,1 mM		
TRIS	5 mM						
EDTA	0,1 mM						
TE-Puffer (DNA-Isolation)	<p>Herstellungsweise:</p> <table border="1"> <tr> <td>TRIS</td> <td>50 mM</td> </tr> <tr> <td>EDTA</td> <td>1 mM</td> </tr> <tr> <td>Tween20</td> <td>0,5 %</td> </tr> </table> <p>pH-Wert auf 8.5 einstellen</p>	TRIS	50 mM	EDTA	1 mM	Tween20	0,5 %
TRIS	50 mM						
EDTA	1 mM						
Tween20	0,5 %						
EDTA	AppliChem-BioChemica, Chemica Synthesis Services, Darmstadt, Deutschland						
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA						
Tween20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA						
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland						
TRIS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA						
Proteinase K	Carl Roth, GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland						
Glykogen	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Darmstadt, Deutschland Roche Applied Science, Mannheim bzw. Penzberg, Deutschland						

RNase/DNase freies Wasser	GIBCO®/ Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Aqua Phenol	→ zur DNA-Isolierung PCI (Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol 25:24:1) Merck, Darmstadt, Deutschland → zur RNA-Isolierung Roti®Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform / IAA	→ zur DNA-Isolierung Merck, Darmstadt, Deutschland → zur RNA-Isolierung Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	AppliChem - BioChemica, Chemica Synthesis Services, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Lithiumchlorid	AppliChem - BioChemica, Chemica Synthesis Services, Darmstadt, Deutschland

PCR, Aufreinigung und Sequenzierung	
AmpliTaq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA bzw. Darmstadt, Deutschland; Roche Applied Science, Mannheim bzw. Penzberg, Deutschland
dNTP-Mix	Fermentas, Burlington, Canada; St. Leon-Rot, Deutschland (Lösung von dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer jeweiligen Endkonzentration von 10 mM)
Primer-Mix für die Qualitäts-PCR	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA AF4/X3U GGAGCAGCATTCCATCCAGC AF4/X3L CATCCATGGGCCCGACATAA AF4/X11U CCGCAGCAAGCAACGCAACC AF4/X11L GCTTTCCTCTGGCGGCTCC PLZF/X1U TGCGATGTGGTCATCATGGTG PLZF/X1L CGTGTCATTGTCTGCTGAGGC RAG1/X2U TGTTGACTCGATCCACCCCA RAG1/X2L TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA TBXAS1/X9U GCCCGACATTCTGCAAGTCC TBXAS1/X9L GGTGTTGCCGGGAAGGGTT
BCL2b-f-Primer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA 5'-GAGTGGGATGCGGGAGAT-3'
BCL2b-r-Primer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA 5'-GGTCAGGTGGACCACAGGT-3'

LE Agarose	Biozym Scientific GmbH Hess. Oldendorf; Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Österreich						
TBE-Puffer	Herstellung von 10x TBE-Puffer: <table border="1"> <tr> <td>TRIS</td> <td>0,89 M</td> </tr> <tr> <td>Borsäure</td> <td>0,89 M</td> </tr> <tr> <td>EDTA-Na₂</td> <td>0,02 M</td> </tr> </table>	TRIS	0,89 M	Borsäure	0,89 M	EDTA-Na ₂	0,02 M
TRIS	0,89 M						
Borsäure	0,89 M						
EDTA-Na ₂	0,02 M						
Gel-Red™ Nucleic Acid Stain	Biotium, Hayward, CA, USA						
Loading Dye	Fermentas, Burlington, Canada						
GeneRuler™, 1kb DNA-ladder, ready to use	Fermentas, Burlington, Canada						
GeneRuler™, 100 bp DNA-ladder	Fermentas, Burlington, Canada						
50 bp DNA-ladder	Biolabs®, New England						
Genome Lab DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter, Brea, CA, USA; Krefeld, Deutschland						
Agencourt®Clean-Seq®	Beckman Coulter, Brea, CA, USA; Krefeld, Deutschland						
Agencourt® AMPure® XP	Beckman Coulter, Brea, CA, USA; Krefeld, Deutschland						

Phusion Hot Start-DNA-Polymerase	Finnzymes, Woburn, MA, USA
Size Standard 400	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
SLS (sample loading solution)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA; Krefeld, Deutschland
Separation Gel	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Mineralöl für Sequencer	Beckman Coulter, Brea, CA, USA; Krefeld, Deutschland
Uracil-DNA Glykosylase	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; Darmstadt, Deutschland
Primer für BCL2 10x Assay	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BCL2_F 5'- CCTGTGGATGACTGAGTACCTGAA-3'	Herstellung von 10x Assay
BCL2_R 5'-AGGCCGCATGCTGGG-3'	
TBP 10x Assay	
Sonde TBP-I(95) FAMTAMRA 5'-ATCCCAAGCGGTTTGCTGCGG-3'	
TBP-1F(93) 5'-GCCCGAAACGCCGAATAT-3'	
TBP-2R(94) 5'-CCGTGGTTCGTGGCTCTCT-3'	

Reagenz	Konzentration
Sonde	2 µM
F-Primer	9 µM
R-Primer	9 µM

Sonde für BCL2 10x Assay	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; Darmstadt, Deutschland
6-FAM-	
TGGATCCAGGATAACGGA-	
mgb	
Light Cycler®480 Probes	Roche Applied Science, Mannheim bzw. Penzberg, Deutschland
Master	
JH-Primer (10 pmol/µl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Primermix für Klonalitätsanalyse

Mix 1: Tube B + JH Consensus (IRD700 5'CTTACCTGAGGAGACGGTGACC 3')

Mix 2: Tube C + JH Consensus (IRD700 5'CTTACCTGAGGAGACGGTGACC 3')

Zusammensetzung Mix Tube B (500 µl)

	eingesetztes Volumen	End- konzentration	Primer
VH1-FR2 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' CTG GGT GCG ACA GGC CCC TGG ACA A 3'
VH2-FR2 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' TGG ATC CGT CAG CCC CCA GGG AAG G 3'
V31-FR2 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' GGT CCG CCA GGC TCC AGG GAA 3'
VH4-FR2 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG G 3'
VH5-FR2 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' GGG TGC GCC AGA TGC CCG GGA AAG G 3'
VH6-FR2 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' TGG ATC AGG CAG TCC CCA TCG AGA G 3'
VH7-FR2 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' TTG GGT GCG ACA GGC CCC TGG ACA A 3'
H ₂ O	150 µl	10 pmol/µl	

Gesamtprimerkonzentration im Mix: 70 pmol/µl

Zusammensetzung Mix Tube C (500 µl)

	eingesetztes Volumen	End- konzentration	Primer
VH1-FR3 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' TGG AGC TGA GCA GCC TGA GAT CTG A 3'
VH2-FR3 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' CAA TGA CCA ACA TGG ACC CTG TGG A 3'
VH3-FR3 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' TCT GCA AAT GAA CAG CCT GAG AGC C 3'
VH4-FR3 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' GAG CTC TGT GAC CGC CGC GGA CAC G 3'
VH5-FR3 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' CAG CAC CGC CTA CCT GCA GTG GAG C 3'
VH6-FR3 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' GTT CTC CCT GCA GCT GAA CTC TGT G 3'
VH7-FR3 (100 pmol/µl)	50 µl	10 pmol/µl	5' CAG CAC GGC ATA TCT GCA GAT CAG 3'
H ₂ O	150 µl	10 pmol/µl	
Gesamtprimerkonzentration im Mix:			70 pmol/µl

3.3 Geräte

Tabelle 4. Auflistung der verwendeten Geräte und Systeme

Gerätekategorie	Gerät/System	Hersteller
Immunfärbeautomat	Immunostainer BenchMark XT	Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA
Cycler	LightCycler 480 Probes Master	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
	Thermocycler ABI 9700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Spektrometer	Nano Drop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Heizblock	Thriller®Thermo-Inkubationsmischer	PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Hybridisierungsgerät	HYBrite™	Vysis, Abbott Molecular, USA
UV-Bestrahlungsgerät	HERAsafe®	Thermo Scientific/Dharmacon, Lafayette, CO, USA
Pipetten	Pipetman Gilson	Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen	Safe Seal Tips	Biozym Scientific GmbH Hess. Oldendorf; Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, Österreich
Zentrifugen	Biofuge 13R	Thermo Fisher Scientific/Dharmacon, Lafayette, CO, USA
	COMBI-SPIN FVL-2400	PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Minizentrifuge	neoLab, Heidelberg, Deutschland
	Vortex-2-Genie®	Scientific Industries, Inc. Bohemia, NY, USA
	Zentrifuge 5402	Eppendorf, Köln/Wesseling, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5 ml + 0,5 ml Eppendorfcups	Eppendorf, Köln/Wesseling, Deutschland
Deckgläser	Deckgläser	Stärke 1, Durchmesser 7 mm, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pufferplatte	96 well buffer plate	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
	96 well Sampleplate	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Magnetplatte	Agencourt SPRIPlate SP 384 MagnetPlate	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
PC-Systeme	GenomeLab GeXP Genetic Analysis System	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
	GenomeLab GeXP Software 10.2	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
	Nexus/PAS-NET	NEXUS AG, Frankfurt am Main, Deutschland

3.4 Methoden

3.4.1 Immunhistochemische Untersuchung

Anhand einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines histologischen Schnittes ist bei hämatopathologischen Erkrankungen oft noch keine Diagnose festzumachen. Die Immunhistochemie ist entscheidend. Dabei beruht die Methode auf einer Erkennung bestimmter Proteinstrukturen durch eigens dafür hergestellte, enzymgekoppelte Antikörper. Häufig wird das Enzym Meerrettichperoxidase in Kombination mit dem Substrat Diaminobenzidin verwendet, dessen Oxidation zu einer braunen Färbung führt. Die Verwendung von Alkalischer Phosphatase hingegen kann zu einer blauen Färbung führen. Die farblich umgesetzten Substrate fallen dabei an ihrem Entstehungsort aus und lassen sich nicht mehr lösen [19].

3.4.2 Untersuchte Oberflächenproteine der Studienfälle

Monoklonale Antikörper eignen sich hervorragend, um bestimmte Gewebe auf ihre Oberflächenproteinexpression hin zu untersuchen. Das folliculäre Lymphom weist typischerweise ein spezifisches Arrangement an Oberflächenproteinen auf. Immunphänotypische Oberflächenmarker werden aufgrund funktioneller oder biochemischer Gemeinsamkeiten zu Gruppen zusammengefasst und in ihrer Gesamtheit als "Cluster of Differentiation" bezeichnet, wobei die einzelnen Moleküle mit Nummern und der Nomenklatur CD bezeichnet werden. Die für die Studie verwendeten Fälle folliculärer Lymphome wurden auf die Expression folgender Oberflächenproteine hin überprüft: CD3 (DCS, Hamburg, Deutschland), CD10 (Novocastra, Berlin, Deutschland), CD20 (DAKO, Hamburg, Deutschland), CD23 (Novocastra, Berlin, Deutschland), CD5 und CD43. Um auch die Proliferation beurteilen zu können, wurde auch eine Färbung mit einem Ki-67-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) vorgenommen. Weiterhin erfolgten Giemsa-Färbungen und zum Ausschluss eines Mantelzelllymphoms teilweise Cyclin D1- und BCL6-Färbungen.

3.4.3 Immunhistochemische Vorgehensweise im Rahmen der Studie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden formalinfixierte Gewebeschnitte mit 0,4 µm Dicke auf Objektträgern verwendet, die alle mittels Mikrotom von in Paraffin eingebetteten Lymphknoten gewonnen wurden. Die Färbungen wurden mit Hilfe eines Immunfärbeautomaten laut vorgegebenem Protokoll nach Angaben des Herstellers angefertigt (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Zur primären Detektion des BCL2-Proteins wurde der herkömmliche zytoplasmatische BCL2-Antikörper (Klon 100/D5; DAKO, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:50 verwendet). Der Antikörper bindet komplementär an die Aminosäurereste 41-54 des *BCL2*-Gens. Fälle, die sich mit dem herkömmlichen BCL2-Onkoprotein-Antikörper (Klon 100/D5; DAKO, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:50) als negativ darstellten, wurden anschließend mittels des 26 kD schweren monoklonalen Kaninchenantikörpers E17 (Zytomed, Berlin, Deutschland; Verdünnung 1:50) und dem neuen SP66-Antikörper (Cell Marque, Rocklin, CA, USA; Verdünnung: 1:100) gefärbt. Auch bei SP66 handelt es sich um einen monoklonalen Kaninchenantikörper, der gegen den N-Terminus des BCL2-alpha-Proteins gerichtet ist. Präparate, die sich mit allen drei Antikörpern als BCL2-negativ erwiesen, wurden mit den hochsensitiven HGAL- (Zytomed, Berlin, Germany; Verdünnung: 1:400) und LMO2-Antikörpern (Klon 1A9-1; Ventana Roche, Tucson, AZ, USA) gefärbt. Für das folliculäre Lymphom weist HGAL die höchste Spezifität vor allen anderen Markern auf [51, 81-83].

3.5 FISH-Analyse

Zur Detektion der t(14;18)-Translokation wurde eine Dual Color Break Apart-Sonde (Vysis LSI BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe, Abbott Molecular, Wiesbaden, Deutschland) verwendet. Fälle, in denen sich keine Translokation, mit dieser Sonde detektieren ließ, wurden anschließend mit einer anderen Sonde (Vysis LSI IgH Dual Color Break Apart Rearrangement Probe, Abbott Molecular, Wiesbaden, Deutschland) hybridisiert, um einen eventuellen Bruch im Immunglobulin-Schwerkettenloкус auszuschließen. All diejenigen

Fälle, die auch in der IgH-FISH keine genetische Veränderung aufwiesen, wurden zusätzlich mit einer BCL6-Sonde (Vysis LSI BCL6 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe, Abbott Molecular, Wiesbaden, Deutschland) auf Brüche im *BCL6*-Gen hin untersucht [89, 91, 96-98].

3.5.1 FISH-Vorgehensweise

3.5.1.1 Entparaffinierung

Um das Gewebe den FISH-Sonden zugänglich zu machen, wurden die Schnitte zuerst entparaffiniert. Dafür wurden diese im Zehn-Minutentakt durch drei Xylobäder geschleust und anschließend zwei Mal für jeweils fünf Minuten in 100 % Ethanol inkubiert, bevor sie für weitere fünf Minuten getrocknet wurden.

3.5.1.2 Waschung, Denaturierung und Dehydrierung

Die Schnitte wurden 40 Minuten lang in einem Deckelglas mit einer chaotropen Lösung aus Natriumcitrat in ein 95 °C heißes Wasserbad gelegt. In einem 37 °C temperierten Wasserbad wurde nun eine Lösung aus 1 ml 0,9 % NaCl mit einem pH-Wert von 2.0 und 10 µl Pepsin-Stock (25 mg/ml) auf die Schnitte gegeben und diese zum Trocknen auf die HYBrite™ (Abott Molecular, USA) gelegt. Für den Fall, dass kein Pepsin benutzt wurde, wurden die Schnitte direkt aus dem Wasserbad in die Denaturierungslösung gegeben. Zehn Minuten lang wurde das Gewebe in einer Lösung aus 70 % FA 2x SSC in einem 72 °C warmen Wasserbad denaturiert, bevor es für zwei Minuten zuerst in 70%igen und anschließend in 100%igem Ethanol dehydriert wurde. Es folgte eine Trocknungszeit von fünf Minuten.

3.5.1.3 Hybridisierung

Unter Raumtemperatur wurde die zuvor bei -20 °C gelagerte Sonde für zehn Minuten unter Abdunkelung aufgetaut. Das Gewebe auf den Objektträgern wurde 5 min bei 74 °C im Wasserbad denaturiert. Anschließend wurde 1 µl der Sonde mit 7 µl Hybridisierungspuffer und 2 µl H₂O gemischt und davon 1,2 µl auf die Objektträger im markierten Tumorbereich, der durch Beurteilung des HE-Schnittes festgestellt wurde, aufgetragen. Vorsichtig wurde nun ein Deckglas auf die Schnitte gelegt, bevor diese für die Fixierung mit Fixogum ummantelt werden konnten. Für die Hybridisierung wurden die Schnitte für mindestens 15 Stunden in der HYBrite™ (Abott Molecular, USA) belassen.

3.5.1.4 Post-Hybridisierungswaschung

Bevor das Deckglas wieder entfernt werden konnte, wurde mittels eines Glasschneiders auf der Rückseite des Objektträgers die Deckglaslage markiert. Alle folgenden Schritte sollten nun unbedingt im Dunkeln erfolgen. Für zehn Minuten wurden die Schnitte in 2x SSC gelegt und danach für fünf Minuten in 2x SSC/0,3 % NP-40 bei 72 °C getaucht, bevor sie zehn Minuten lang in raumtemperiertem SSC gewaschen wurden. Nun wurden die Schnitte für jeweils eine Minute einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70 %, 85 % und 100 % Ethanol unterzogen und anschließend mindestens 15 Minuten lang trocknen gelassen. Mit 3,2 µl Dapi-Lösung (Vysis, Wiesbaden, Deutschland) wurde das Material gegengefärbt. Nach weiteren 20 Minuten Trocknungszeit wurden die Schnitte mit einem 18x18 Deckglas versehen.

3.6 Sequenzanalyse

Zur Analyse der genomischen BCL2-Sequenz, die für den Bereich des Proteins kodiert, an den der BCL2-Standardantikörper (Klon 100/D5) bindet, wurde die DNA aus den Zellen der Gewebeschnitte isoliert und quantifiziert sowie ihre

Integrität analysiert. Der *BCL2*-Genabschnitt wurde mittels PCR amplifiziert und mit einer Sanger Sequenzierung analysiert.

3.6.1 DNA-Isolation

Das Ausgangsmaterial für die DNA-Isolation bildeten je nach Verfügbarkeit 4 - 10 µm dicke Schnitte auf silanisierten Objektträgern oder 10 µm dicke Schnitte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen.

3.6.1.1 Entparaffinierung bei Gewebeschnitten auf Objektträgern

Für die Entparaffinierung wurden die Objektträger mit den Schnitten jeweils zehn Minuten in zwei Küvetten mit Xylol inkubiert. Nachdem sie bei Raumtemperatur ausreichend getrocknet waren, wurde das Gewebe mit einem Skalpell von den Objektträgern geschabt und in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde das Ethanol mit einer Pipette entfernt und das Gewebe in einem Heizblock bei 37 °C trocknen gelassen (weiter 3.6.1.3).

3.6.1.2 Entparaffinierung der Gewebeschnitte in Reaktionsgefäßen

Zu den Paraffinschnitten im 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde 1 ml Xylol gegeben, der Ansatz mit dem Vortexer gemischt und die Proben anschließend fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Xylol wurde mit Hilfe einer Pipette entfernt, erneut 1 ml Xylol zugegeben und die vorherigen Schritte wiederholt. Anschließend wurde die Prozedur zwei Mal mit 100%igem Ethanol wiederholt. Das Ethanol wurde mit einer Pipette entfernt und das Gewebe in einem Heizblock bei 37 °C trocknen gelassen.

3.6.1.3 Zellyse

Für die anschließende Zellyse wurde in jedes 1,5 ml Reaktionsgefäß 300 µl Lyse-Puffer hinzugefügt und die Proben für zehn Minuten in einem 95 °C heißen Heizblock inkubiert. Danach wurden 30 µl Proteinase K (Roth,

Karlsruhe) hinzugegeben. Für mindestens 18 Stunden wurde das Gewebe bei 56 °C bei 500 rpm über Nacht im Thermoschüttler lysiert. Am nächsten Tag wurde überprüft, ob das Gewebe vollständig verdaut war. War dies nicht der Fall, wurden erneut 10 µl Proteinase K hinzugegeben und die Ansätze für mindestens 30 weitere Minuten verdaut.

3.6.1.4 Phenol/Chloroform-Aufreinigung

Nun wurden für jede Probe drei neue 1,5 ml Reaktionsgefäße vorbereitet, in welche jeweils 1x 400 µl PCI, 1x 400 µl Chloroform/IAA und 1x 40 µl Lithiumchlorid vorgelegt wurde. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde 400 µl PCI zum Lysat gegeben, welches anschließend zur Phasentrennung bei 13.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert wurde. Danach wurde die wässrige obere Phase vorsichtig abgenommen und in das Reaktionsgefäß mit dem bereits vorgelegten PCI gegeben. Nach kurzem Mischen im Vortexer erfolgte eine fünf-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm. Auch hier wurde die obere Phase abgenommen und nun in das Reaktionsgefäß mit Chloroform/IAA überführt, im Vortexer gemischt und bei 4 °C für erneut 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Abnehmen der oberen Phase wurde diese zu dem Reaktionsgefäß mit Lithiumchlorid gegeben. Um nun die DNA zu fällen wurde 1 ml 100 % Ethanol hinzugefügt. Nun brach eine Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur an, bevor die Proben für mindestens 30 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen und 200 µl 70 % Ethanol (-20 °C) zugegeben. Nach kurzer Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm wurde der Überstand erneut abpipettiert und das Pellet im Thermoschüttler bei 37 °C getrocknet. Die DNA-Pellets wurden in 50-200 µl ddH₂O 30 Minuten eluiert und anschließend die DNA-Konzentration im NanoDrop2000 (Spectrometer, Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA) gemessen.

3.6.2 PCR zur Analyse der DNA-Qualität

Eine anschließende Amplifikation verschieden großer Genprodukte diente dazu, die Qualität der DNA abzuschätzen (Tab. 5), was entscheidend für den weiteren Verlauf der Sequenzanalyse war.

Tabelle 5. **Reagenzien für die Qualitäts-PCR.** Endkonzentration: 25 μ l
Primer-Mix: 4F4/X3 2,5 μ M, alle anderen 1,25 μ M

PCR 25 μ l Ansatz:

Reagenz	Maßangabe	Endkonzentration
• ddH ₂ O	• 16,8 μ l	
• 10xPCR-Puffer II (Life Technologies)	• 2,5 μ l	1x
• MgCl ₂ 25 mM (Life Technologies)	• 2 μ l	2 mM
• dNTP 10 mM (Fermentas, Burlington)	• 0,5 μ l	0,2 mM
• Primer-Mix (siehe oben)	• 2 μ l	AF4/3 U/L 0,2 μ M andere 0,1 μ M
• Taq-Polymerase (AmpliTaq® Gold, Life Technologies)	• 0,3 μ l	0,06 U/ μ l

Gesamtkonzentration: 24 μ l

Die isolierte DNA wurde auf 100 ng/ μ l eingestellt und jeweils 1 μ l davon zusammen mit 24 μ l der vorgemischten PCR-Reagenzien (Tab. 5) in 0,2 ml

PCR-Reaktionsgefäße überführt. Die PCR erfolgte mit 35 Zyklen bei folgenden Einstellungen im Thermocycler (Tab. 6).

Tabelle 6. **Einstellung der Cyclercyclen für die Qualitäts-PCR**

Zeit	Temperatur
7 Minuten	95 °C
45 Sekunden	95 °C
45 Sekunden	60 °C
90 Sekunden	72 °C
10 Minuten	72 °C
Hold	12 °C

} 35 Zyklen

3.6.2.1 Gelelektrophoretisches Auftrennen der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in einem 2%igen-Agarosegel über 45 Minuten bei 140 Volt aufgetrennt. Für das Agarosegel wurden 2 g LE-Agarose (Biozym Scientific GmbH®, Wien) in 100 ml 1x TBE-Puffer aufgeköcht und mit 10 µl GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium®, Hayward) versetzt. Das Gel wurde in eine entsprechende Vorrichtung gegossen, aushärten gelassen und in die Elektrophoresekammer platziert. Die PCR-Produkte wurden mit Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen überführt, wobei die erste Tasche jeweils mit einem Basenpaar-Längenmarker (Gene Ruler 100 bp DNA-ladder, Fermentas®, Burlington, Canada) beladen wurden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels eines Geldokumentationssystems (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) fotografisch festgehalten.

3.6.3 BCL2-PCR

Um den relevanten Abschnitt des *BCL2*-Gens zu analysieren, wurde dieser mittels PCR amplifiziert (Tab. 7). Die dabei abgedeckte Sequenz umfasst einen 204 bp-langen Bereich (5`-3`):

GAGTGGGATGCGGGAGATGTGGGCGCCGCGCCCCGGGGGCCGCCCC
 GCGCCGGGCATCTTCTCCTCGCAGCCCGGGCACACGCCCCATACAGCCG
 CATCCCGGGACCCGGTCGCCAGGACCTCGCCGCTGCAGACCCCGGCTGC
 CCCC GGCGCCGCGGGGCCTGCGCTCAGCCCGGTGCCACCTGTGGT
CCACCTGACC

Die Primer wurden mit dem Programm Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) designt:

Forward-Primer 5`-GAGTGGGATGCGGGAGAT-3`

Reverse Primer 5`-GGTCAGGTGGACCACAGGT-3`

Tabelle 7. **Reagenzien für die BCL2-PCR.** BCL2-PCR-Endvolumen: 25 µl

Reagenz	Maßangabe	Endkonzentration
• ddH ₂ O	• 16,25 µl	
• 10xPCR-Puffer (Roche, Mannheim)	• 2,5 µl	1x
• MgCl ₂ (25 mM, Roche, Mannheim)	• 1,5 µl	1,5 mM
• dNTP (Fermentas, Burlington, jeweils 10 mM)	• 1,0 µl	0,4 µM
• pos. F-Primer (10 µM)	• 1,25 µl	0,5 µM
• pos. R-Primer (10 µM)	• 1,25 µl	0,5 µM
• Taq-Polymerase (AmpliTaq® Gold, Roche, Mannheim)	• 0,25 µl	0,05 U/µl

Gesamtkonzentration: 24 µl

Zur Durchführung der PCR wurden die Reagenzien als Mix für die entsprechende Anzahl an Proben angesetzt, jeweils 24 µl Mix in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt und 1 µl (100 ng) DNA-Template zugegeben. Die PCR erfolgte nach initialer Denaturierung (95 °C 5 min) bei 45 Zyklen aus 1 Minute 95 °C, 1 Minute 60 °C, 45 Sekunden bei 72 °C, gefolgt von einer finalen Elongation bei 72 °C für 7 min. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch in einem 2%igen Agarosegel (siehe 3.6.2.1) aufgetrennt und anhand des mitgeführten 50 bp Längenmarkers (Biolabs®, New England) bezüglich ihrer zu erwartenden Länge von 204 bp überprüft.

3.6.4 Aufreinigung der PCR-Produkte mit Agencourt®AMPure® XP

Die Aufreinigung der PCR-Produkte diente der Entfernung überschüssiger Primer oder Desoxynukleotide und erfolgte mit Hilfe des AMPure Reagenz (Agencourt®AMPure® XP, Beckman Coulter, MA, USA). Die darin enthaltenen paramagnetischen Beads haben die Eigenschaft PCR-Produkte binden zu können. Diese Eigenschaft beruht auf einem Carboxylmantel, der die Magnethülle und einen Kern aus Polystyrol umgibt. Werden die Beads nun in eine Lösung aus NaCl und Polyethylenglykol gegeben, bindet die Carboxylgruppe die negativ-geladene DNA des PCR-Produktes, was als SPRI-Technik (Solid Phase Removal Immobilization) bezeichnet wird. Zu 15 µl PCR-Produkt wurde jeweils 27 µl AMPure Lösung zugegeben und die Ansätze wurden für 30 Sekunden mit dem Vortexer gemischt. Anschließend wurde das Produkt mit der Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktionsgefäße danach für 10 Minuten auf eine Magnetplatte gestellt, wodurch die Beads der AMPure-Lösung magnetisch angezogen wurden und sich als basal-lateralen Magnetring ablagerten. Der klare Überstand wurde abgenommen ohne den Magnetring zu zerstören. Für die Aufreinigung der PCR-Produkte, durch welche die Beads und PCR-Produkte von möglichen Kontaminationen gelöst werden sollten, wurden jeweils 200 µl frisch hergestelltes 70 % Ethanol, das aus 100 % Ethanol und der entsprechenden Menge H₂O gewonnen worden war, zu den Reaktionsgefäßen mit dem

Magnetring, gegeben. Danach wurde dieses wieder vorsichtig abgenommen um die Prozedur erneut zu wiederholen. Nach diesen Waschschrritten wurde der Inhalt der Reaktionsgefäße für etwa 10 Minuten an der Raumluft getrocknet bis alle Flüssigkeit verdunstet war. Pro Gefäß wurde nun 35 µl ddH₂O hinzugefügt und die Mischung 30 Sekunden mit dem Vortexer gemischt. Um nun die Beads im Reaktionsgefäß zurückzubehalten und dabei den Überstand, der das aufgereinigte PCR-Produkt enthielt, in ein neues Gefäß zu pipettieren, wurden nun die kleinen Reaktionsgefäße an die Magnetplatte gehalten, so dass sich die magnetischen Beads nach unten hin absetzten. Zur Aufbewahrung wurden die aufgereinigten PCR-Produkte in einem Gefrierschrank bei einer Temperatur von -20 °C gelagert (Abbildung 8).

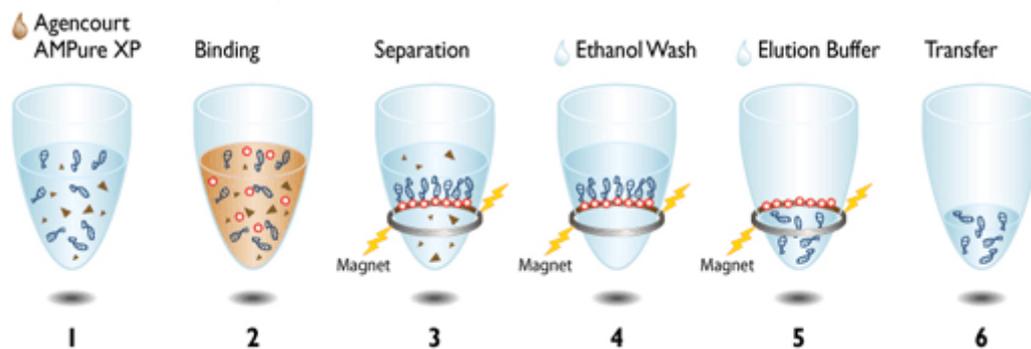


Abbildung 8. Darstellung der einzelnen Schritte bei der Aufreinigung mit Agencourt®AMPure®.

Quelle: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/nucleic-acid-sample-preparation/agencourt-ampure-xp-pcr-purification/index.htm>

3.6.5 Kettenabbruchsynthese

Bei der Sequenzanalyse wurde nach der von Frederick Sanger entwickelten Kettenabbruchmethode vorgegangen. Dazu werden zur Markierung des Abbruchpunktes die ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoffen versetzt, auch Dye-Terminatoren genannt, was eine direkte Sequenzierung ermöglicht. Das Prinzip der Kettenabbruchmethode beruht auf dem zufälligen Einbau von Didesoxynukleotiden, anstelle von Desoxynukleotiden, was zu einem Abbruch der Synthese führt, da den ddNTPs die 3'-Hydroxygruppe fehlt, welche für den Anbau an die Phosphatgruppe eines anderen Nukleotids vonnöten ist.

Das Verhältnis dNTPs zu ddNTPs sorgt dafür, dass diese Abbrüche sich über die gesamte Länge des zu sequenzierenden DNA-Strangs verteilen. Durch Markierung der ddNTPs mittels Fluoreszenzfarbstoffen können die einzelnen Basen unterschieden werden und die Basenabfolge, nach elektrophoretischer Längenauftrennung, rückverfolgt werden. In die Kettenabbruchsynthese wurden 0,5 µl (10 µM) des PCR-Forward- oder Reverse-Primer und 4 µl DTSC-Mix, bestehend aus einem bestimmten Verhältnis an dNTPs und markierten ddNTPS, die zum Kettenabbruch führen sollen, Polymerase und Puffer (DTSC Quick Start Kit® von Beckman Coulter, Brea, CA, USA), eingesetzt. Pro Ansatz wurde 13 ng aufgereinigtes PCR-Produkt/Reaktion eingesetzt und ddH₂O für ein Endvolumen von 10 µl zugegeben. Im Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurde das Programm für 30 Zyklen mit 20 Sekunden auf 96 °C, 20 Sekunden bei 50 °C und 4 Minuten bei 60 °C eingestellt. Bis zur Sequenzierung wurden die Proben bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

3.6.6 Aufreinigung mit Agencourt®CleanSeq®

Um überschüssige ddNTPS und Primer zu entfernen, erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Kettenabbruchsyntheseprodukte mittels CleanSeq-Reagenz (Agencourt®CleanSeq®, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) (Abb. 9), was auf der bereits oben genannten SPRI-Technik (Solid Phase Removal Immobilization) basiert (siehe 3.6.4). Hierfür wurde zu den 10 µl Cycling Sequencing Produkt 10 µl Clean Seq-Reagenz und jeweils 42 µl frisch angesetztes 85 % Ethanol zugegeben. Nach gutem Mischen wurden die Produkte in Reaktionsgefäßen auf eine Magnetplatte gestellt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde, ohne den Magnetring zu berühren, abgenommen. Nach Zugabe von 100 µl 85 % Ethanol, erfolgte nochmals eine drei-minütige Inkubationszeit. Daraufhin wurde der Überstand vollständig abgenommen und die Beads trocknen gelassen, um die Kettenabbruchsyntheseprodukte daraufhin in 40 µl SLS (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) zu eluieren.

Für die Sequenzanalyse wurden die Proben in eine 96-Well-Platte überführt und mit Mineralöl (Beckman Coulter, Brea, CA) überschichtet.

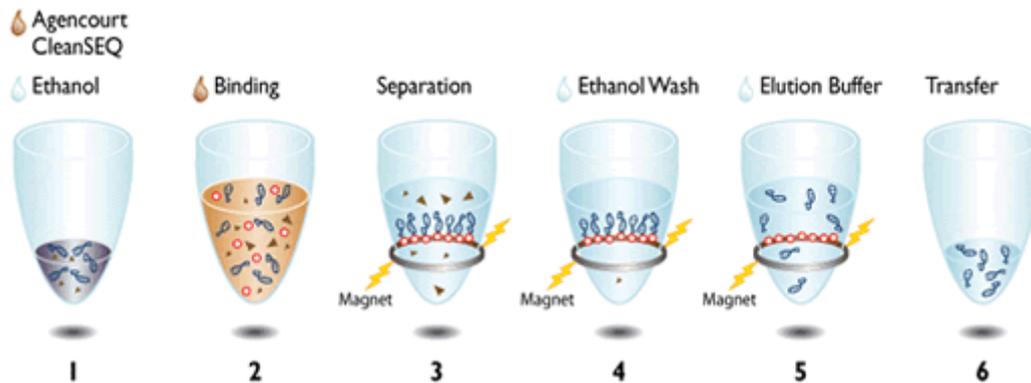


Abbildung 9. **Darstellung der einzelnen Schritte bei der Aufreinigung mit Agencourt®CleanSeq®.**

Quelle: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/nucleic-acid-sample-preparation/agencourt-cleanseq-dye-terminator-removal/index.htm>

Die Sequenzanalyse erfolgte nun mit dem GeXP-Sequenzierer, einem 8 Kapillar-Sequenziergerät, nach Angaben des Herstellers. Anhand der Rohdaten ließ sich über die Software GeXP 10.2 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) ein Elektropherogramm erstellen, mit dessen Hilfe sich Mutationen anhand des Vergleichs mit der Wildtypsequenz detektieren ließen und sich der Mutationsstatus des *BCL2*-Gens im Bereich c.121G-c.249G, entsprechend der Aminosäuren 41-83, feststellen ließ.

3.7 BCL2-Expression (RNA-Ebene)

3.7.1 RNA-Isolation

In Fällen, deren Translokationsstatus negativ ausfiel, und die weder in der Standardantikörperfärbung noch in der E17-Färbung eine Überexpression an BCL2 aufwiesen, wurde zusätzlich RNA isoliert, um eine Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR) durchzuführen. Die RNA-Isolation erfolgte aus jeweils drei Gewebeschnitten à 10 µm, die in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurden.

Zur Entparaffinierung wurde zwei Mal RNase/DNase freies Xylol zugegeben, im Vortexer gemischt und die Ansätze 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte einer absteigenden Ethanolreihe unterzogen (2x 100 %,1x 90 %,1x 70 %,1x 50 %) mit jeweiliger 5-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min. Zuletzt wurde das Ethanol abgenommen und das Gewebe getrocknet. In jedes Reaktionsgefäß wurde nun jeweils 1 ml RNase/DNase freies Wasser gegeben und das Gewebe darin für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und 200 µl SDS-Lysepuffer und je nach Pelletgröße zwischen 10 und 20 µl Proteinase K hinzugefügt, bevor die Proben bei 60 °C über Nacht bei 50 rpm im Heizschüttler inkubiert wurden. Bei vollständigem Verdau wurden daraufhin je 20 µl 3 M NaAc mit pH 5,2 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 200 µl Aqua Phenol mit pH 4,5-5 (Roth®, Karlsruhe, Deutschland) und 100 µl Chlorophorm/IAA (Roth®, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 2 µl Glycogen (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) und 1 V Isopropanol hinzugefügt. Nun erfolgten eine 2-stündige Inkubationszeit bei -20 °C und eine anschließende Zentrifugation für 45 Minuten. Ließ sich dann ein Pellet erkennen, wurde dieses mit 300 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl DNase/RNase freiem Wasser gelöst. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die isolierte RNA bei -70 °C gelagert. Die Vermessung der RNA-Konzentration und der Reinheit (Ratio 260/280 nm) der Probe wurde am NanoDrop2000 durchgeführt. Bei RNA wird der Quotient einer ausreichenden Ratio (260/280) mit 2,0 angegeben.

3.7.2 Real-Time Quantitative PCR

Die quantitative PCR ist eine Methode, die es ermöglicht die Menge an vorhandenem DNA-Template, während der Amplifikation über eine Echtzeit-Messung anhand von Fluoreszenzfarbstoffen in jedem PCR-Zyklus zu messen. Für die RT-qPCR zur Quantifizierung der BCL2-RNA wurde zuerst mittels der SuperScript®II Reversen Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

aus der isolierten RNA cDNA synthetisiert, indem ein zur einsträngigen RNA komplementärer DNA-Strang gebildet wurde und dieser zu einem Doppelstrang synthetisiert wurde. Für die RT-qPCR wurde ein Mix aus 3,8 µl DNase freiem H₂O, 0,2 µl Uracil-DNA-Glykosylase, 2 µl BCL2-PCR-Assay (Sonde von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA und Primer von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 10 µl Probes Master (Light Cycler®480 Probes Master, Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) hergestellt. Zu 16 µl Mix wurden 4 µl cDNA in eine 96 Well-Platte zugegeben. Analog dazu wurde die RT-qPCR zur Amplifikation der TBP cDNA als Referenzgen angesetzt. Die RT-qPCR wurde im LightCycler®480 (Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland) nach folgendem Programm durchgeführt (Tab. 8):

Tabelle 8. **RT-qPCR**

Temperatur	Zeit
40 °C	10 Minuten
95 °C	10 Minuten
95 °C	15 Sekunden
60 °C	1 Minute

} 55 Zyklen

Die Analyse erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta CP}$ -Methode, eine Methode, mit der die relativen BCL2-mRNA-Level verschiedener Proben untereinander im Vergleich bestimmt werden, nachdem die Amplifikationsdaten anhand des Referenzgens TBP (TATA box binding protein) normalisiert wurden [99]. Diese Quantifizierung basiert auf der Erfassung der CP-Werte (Crossing point), die den PCR-Zyklus angeben, in dem das Fluoreszenzsignal, dessen Intensität die Menge an amplifiziertem Produkt widerspiegelt, den Schwellenwert überschreitet.

Die $2^{-\Delta\Delta CP}$ -Methode basiert für jede zu analysierende Probe auf folgender Berechnung, wobei der Kalibrator die Probe darstellt, zu der die zu analysierenden Proben in Bezug gesetzt werden sollen:

$$\Delta CP = CP_{BCL2} - CP_{TBP}$$

$$\Delta\Delta CP = \Delta CP - \Delta CP_{\text{Kalibrator}}$$

$$\text{x-facher RNA-Level} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

3.8 Klonalitätsanalyse

Um die Diagnose eines malignen Lymphoms zu bestärken, wurde in den t(14;18)-Translokations-negativen Fällen zusätzlich eine Klonalitätsanalyse durchgeführt.

3.8.1 Monoklonalität als Malignitätsmerkmal

Die Klonalitätsanalyse dient unter anderem der Abgrenzung maligner Neoplasien von reaktiven entzündlichen Veränderungen. Monoklonalität wird als Malignitätsmerkmal angesehen und ist darauf zurückzuführen, dass die Tumorzellen das identische monoklonale Rearrangement des Antigenrezeptors besitzen, da sie alle von der gleichen Ursprungszelle abstammen [100].

3.8.2 Vorgehensweise bei der Klonalitätsanalyse

Die Klonalitätsanalyse beruht auf einer Amplifikation der VJ-Region durch eine PCR [101]. Wird eine polyklonale Zellpopulation analysiert, resultiert die PCR in Produkten unterschiedlicher Basenpaarlängen nach der Gauß-Normalverteilung. Im Falle der Analyse einer klonalen Zellpopulation zeigen alle PCR-Produkte die gleiche Basenpaarlänge. Die PCR-Produkte werden mittels Kapillarelektrophorese im GenomeLabSystem (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) aufgetrennt, mit welcher Einbasenpaarunterschiede detektiert werden können. Die zuvor isolierte DNA (siehe 3.6.1) wurde in zwei Reaktionen zur Analyse der Framework2- und Framework3-Regionen vermehrt. Pro Fall wurden jeweils zwei PCR-Ansätze amplifiziert, davon enthielt ein Reaktionsansatz eine Menge von 50 ng und der andere eine Menge von 200 ng DNA. Zusätzlich wurden jeweils als Positiv-Kontrolle DNA der Zelllinie Granta (50 ng) und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 25 µl, das sich aus 1 µl DNA und aus den in Tab. 9 genannten Reagenzien zusammensetzte:

Tabelle 9. **PCR-Zusammensetzung für die Klonalitätsanalyse.** Endvolumen: 25 µl.

Reagenz	Maßangabe	Endkonzentration
H ₂ O	16,75 µl	
5x GC Puffer + 7,5 mM MgCl ₂	5,0 µl	1x/1,5 MM MgCl ₂
dNTPs (5 mM)	1,0 µl	0,2 mM
Primer-Mix B oder C (10 µM je Primer)	0,5 µl	0,2 µM je Primer
JH-consensus Primer (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Phusion Hot Start High Fidelity DNA-Polymerase	0,25 µl	0,02 U/µl

Die PCR erfolgte im Thermocycler ABI 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) unter folgenden Bedingungen: 30 Sek 98 °C, dann 40 Zyklen mit 10 Sekunden bei 98 °C, 30 Sekunden 60 °C und 30 Sekunden 72 °C. Nach 7 Minuten bei 72 °C wurden die Proben auf 12 °C abgekühlt. Das PCR-Produkt wurde dann einer Fragmentlängen-GeneScan-Analyse im GeXP-Sequencer zugeführt. Hierfür wurde 1 ml SLS (sample loading solution) (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) mit 15 µl Size Standard 400 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) versetzt und dies mit dem Vortexer gemischt. In eine 96 Well-Proben-Platte wurden nun pro PCR-Produkt 30 µl SLS-Standard-Mix in ein Well vorgelegt und jeweils 1 µl PCR-Produkt hinzugefügt. Nach Mischen der Ansätze wurden die befüllten Wells mit einem Tropfen Mineralöl überbeschichtet. Der Probenplatte entsprechend, wurden die Wells der Pufferplatte mit Separation Buffer gefüllt. Die Kapillarelektrophorese erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Detektion der Produkte der FR2-PCR (Tube B) war der Bereich zwischen 250-295 bp und für die Produkte der FR3-PCR (Tube C) zwischen 100-170 relevant. Die Analyse der kapillarelektrophoretischen Auftrennung erfolgte dabei mit Hilfe der GenomeLabGeXP Software 10.2 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Gruppenzuordnungen nach Immunhistochemie und FISH

Nach Datenerhebung anhand des Datenbefundsystems Nexus/PAS-NET, der histologischen Begutachtung und der immunhistochemischen Färbung und Analyse mit BCL2-100/D5 konnten aus einer Gesamtheit von 240 FL 22 FL Grad I/II als BCL2-negativ selektioniert werden (Abbildung 10). Untersuchungen mit FISH Dual Color Break Apart-Sonden führten innerhalb dieser 22 Fälle zu einer weiteren Unterteilung in zwei Untergruppen. Unter Gruppe 1 wurden alle Fälle zusammengefasst, die BCL2-negativ mit t(14;18) waren und zu Gruppe 2 alle diejenigen immunhistochemisch BCL2-negativen Fälle, bei denen keine Translokation nachgewiesen werden konnte. Da bei der Zusammenstellung der Studienfälle noch eine weitere Gruppe mit untypischer Konstellation auftauchte, wurden alle diese FL einer dritten Gruppe zugeordnet. Trotz BCL2-Positivität mit BCL2-100/D5 und BCL2-E17/SP66, konnte bei diesen keine t(14;18)-Translokation nachgewiesen werden (Abb. 10).

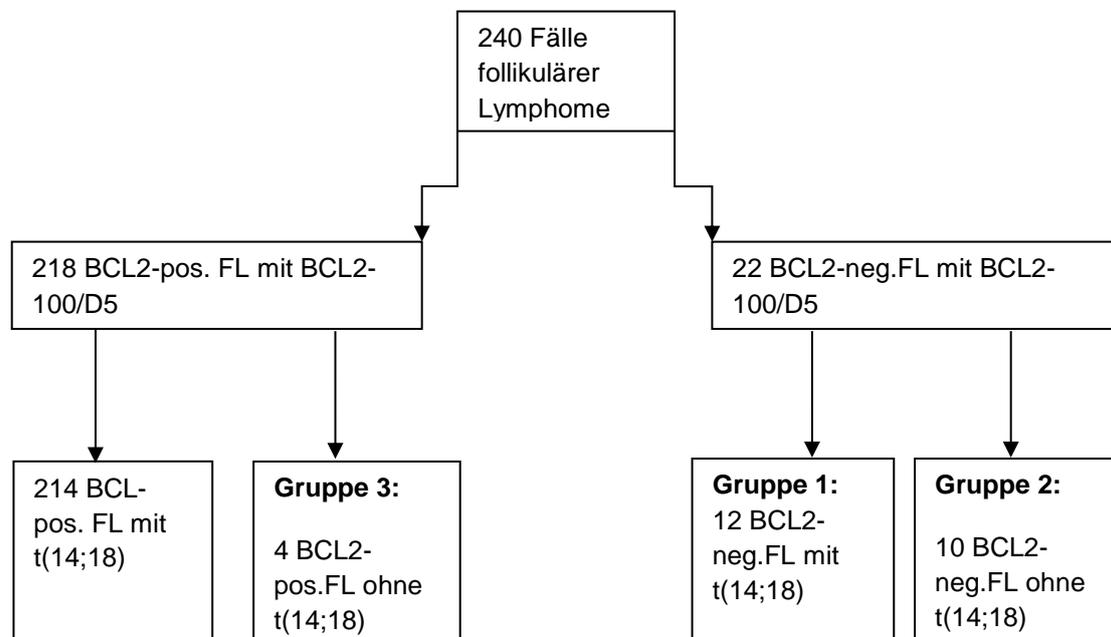


Abbildung 10. Schematische Darstellung der Selektion der Studienfälle und der Gruppenzuordnung als Flussdiagramm

Die Ergebnisse der Studie sollen im Folgenden gruppenspezifisch dargestellt werden.

4.2 Gruppe 1: BCL2-negative FL Grad I/II mit t(14;18)-Translokation

Nach den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen und der FISH wurden dieser Gruppe zwölf der 22 Studienfälle zugeordnet. Im mikroskopischen Bild ließ sich durchweg eine klare Aufhebung der Lymphknotenarchitektur durch eine Infiltration von Follikeln mit reduzierter oder verschwommener Mantelzone erkennen (Abb. 11).

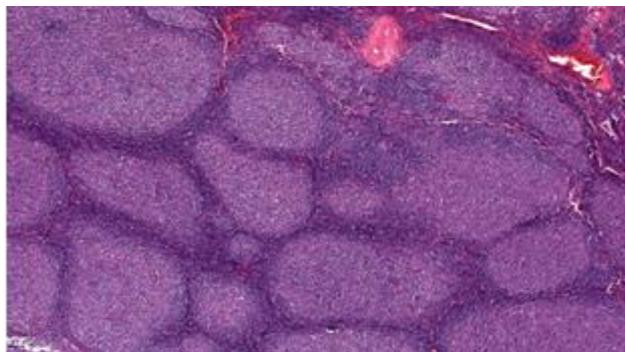


Abbildung 11. Exemplarisches Beispiel eines Lymphknotens mit Aufhebung der physiologischen Mantelzone durch ein follikulär wachsendes lymphoides Infiltrat [52].

4.2.1 Immunhistochemische Untersuchung

Alle zwölf Fälle wiesen einen für FL charakteristischen Immunphänotyp auf (Tab. 10): eine deutliche Positivität für CD10 (Abb.12), CD20 und BCL6 (Abb.13), sowie eine CD23-Negativität in den Tumorzellen (Abb. 14).

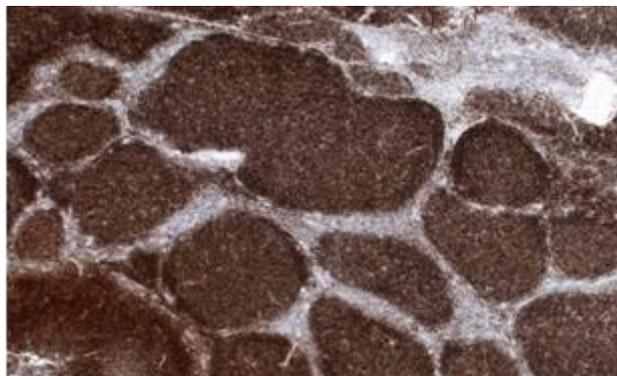


Abbildung 12. Exemplarisches Beispiel eines FL mit kräftiger CD10-Expression. Diese ließ sich in allen zwölf Fällen nachweisen und ist ein Zeichen der malignen Entartung [52].

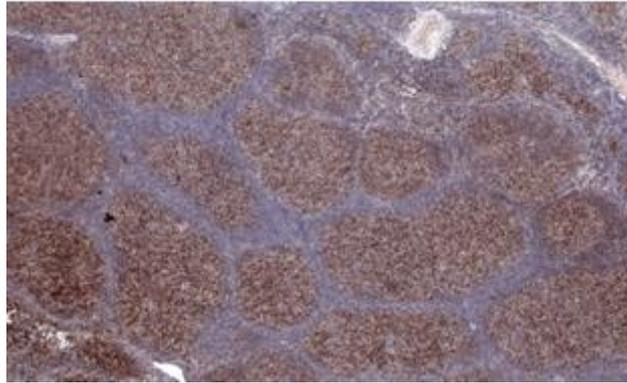


Abbildung 13. Exemplarisches Beispiel eines Falles mit Positivität für das BCL6-Protein [52].

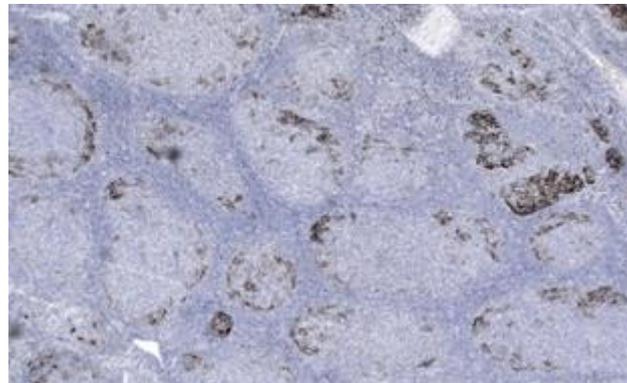


Abbildung 14. In der immunohistochemischen Färbung zeigen sich die Tumorzellen CD23-negativ [52].

Die Mib1-Färbung ließ auf eine niedrige Proliferationsrate schließen (Abb.15).

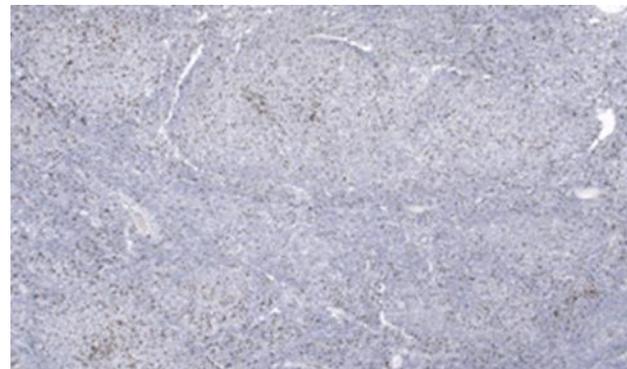


Abbildung 15. In der Färbung mit Mib1 zeigt der vorliegende Fall eine sehr geringe Proliferationsrate von 5 % [52].

Die BCL2-Expression, nach der immunhistochemischen Färbung mit BCL2-100/D5 war entsprechend der Gruppenzuordnung negativ (Abb. 16).

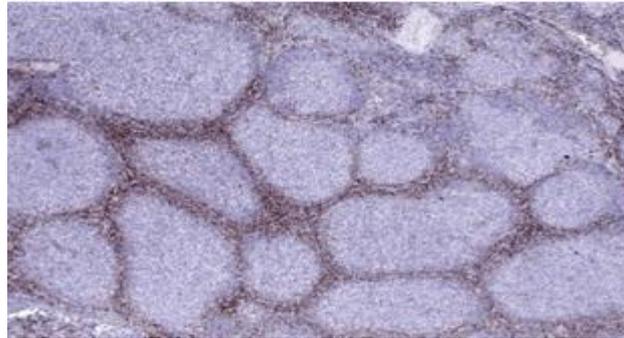


Abbildung 16. Die immunhistochemische Färbung mit dem BCL2-Standardantikörper zeigt ein negatives Ergebnis [52].

Interessanterweise zeigten elf der zwölf Fälle mit dem BCL2/E17 Antikörper eine Überexpression des BCL2-Proteins, trotz negativer 100/D5-Färbung (Abb. 17). Fall 2 zeigte als einziger auch mit dem E17/SP66-Antikörper keine BCL2-Positivität und wies im Verhältnis zu den anderen Fällen eine erstaunlich hohe Proliferationsrate auf. Die Positivität für CD10 stützt jedoch die Diagnose eines follikulären Lymphoms (Abb. 12).

Tabelle 10. **Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Gruppe 1-Fälle.** Negativität: -; Positivität: +; starke Positivität: ++

Fall	BCL2 100/D5	BCL2 E17/SP66	CD10	BCL6	CD23	Mib1 (%)	BCL2- BAP
1	-	+	++	+	-	5	+
2	-	-	++	+	-	80	+
3	-	+	++	+	-	20	+
4	-	+	++	+	-	30	+
5	-	+	++	+	-	20	+
6	-	+	++	+	-	5	+
7	-	+	++	+	-	40	+
8	-	+	++	+	-	15	+
9	-	+	++	++	-	30	+
10	-	+	+	+	-	5	+
11	-	+	++	+	-	20	+
12	-	+	++	+	-	20	+

4.2.2 FISH-Untersuchung

Die Hybridisierung der Dual Color Break Apart-Sonden zeigte durchweg in allen Fällen gesplittete Doppelsignale, was auf einen Bruch im *BCL2*-Gen zurückschließen lässt (Abb. 17).

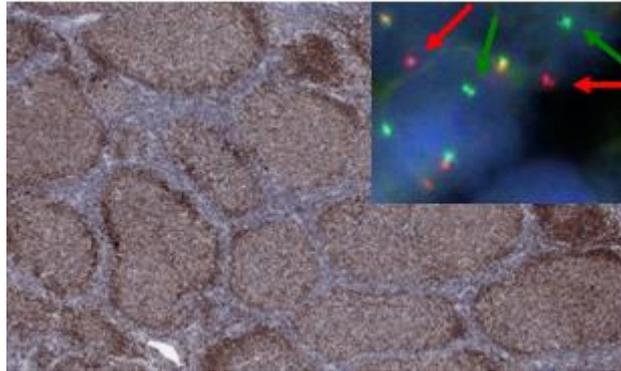


Abbildung 17. Die immunhistochemische Färbung mit dem alternativen E17-AK ergibt ein positives Ergebnis der *BCL2*-Proteinexpression. In der FISH Analyse zeigen sich unter der Benutzung einer *BCL2*-Break Apart Sonde eindeutig gesplittete Doppelsignale [52].

4.2.3 Geschlechterverteilung

Eine Auswertung der Geschlechterdaten der Patienten dieser Gruppe, ergab ein sehr unausgeglichenes Verhältnis mit einem höheren Anteil an männlichen Patienten von zehn Männern zu zwei Frauen, entsprechend dem Verhältnis M:F = 5:1. Das entsprach einem prozentualen Anteil von 16,66 % weiblichen zu 83,33 % männlichen Patienten (Abbildung 18).

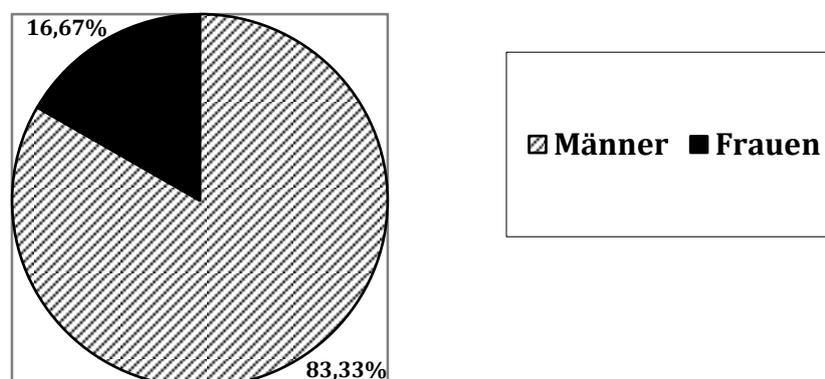


Abbildung 18. Die **Geschlechterverteilung des Kollektivs aus Gruppe 1** fiel sehr unausgeglichenes aus. Der Anteil an männlichen Patienten war fünffach erhöht gegenüber der Anzahl an Frauen.

4.2.4 Altersverteilung

Das mittlere Erkrankungsalter betrug in dieser Gruppe 60 Jahre, bei einem medianen Erkrankungsalter von 63 Jahren (Spannbreite 39-76). Dies bedeutet, dass 50 % der Patienten ein jüngeres Erkrankungsalter als 63 Jahre aufwiesen und die restlichen 50 % über diesem Wert lagen. Mit dem größten Abstand zur restlichen Patientengruppe war Fall vier anzusiedeln, da hier das Erkrankungsalter von 39 Jahren 24 Jahre unter dem Median lag. Der älteste Patientenfall wies mit 76 Jahren ein um dreizehn Jahre über dem Median liegendes Alter auf (Abb. 19).

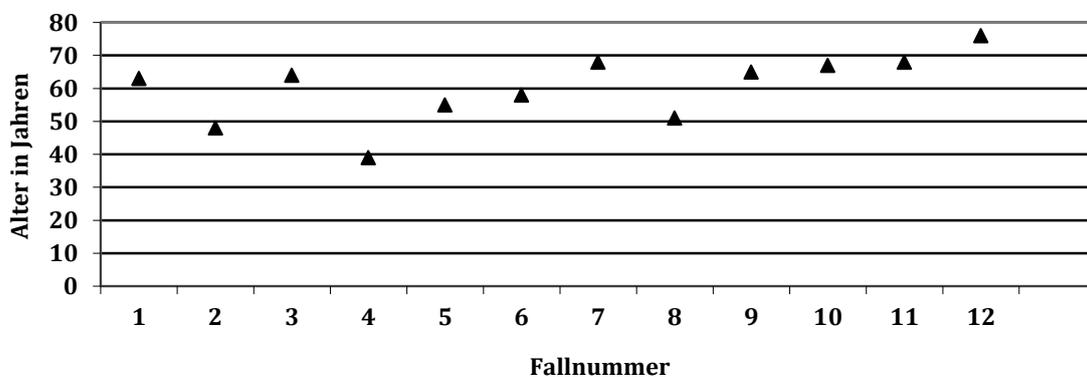


Abbildung 19. Altersverteilung der Studienfälle aus Gruppe 1.

4.2.5 Lokalisation der entnommenen Lymphknoten

Beim Vergleich der Region, aus der die pathologischen Lymphknoten entnommen wurden, fiel eine Häufung der zervikalen Lymphknoten auf, was jedoch nur mit Vorsicht beurteilt werden sollte, da sich in allen Fällen bei denen die Lymphknotenentnahme zervikal stattfand, auch schon vergrößerte Lymphknoten paraaortal oder iliakal nachweisen ließen. Lymphknoten im Bereich des Thorax oder des Abdomens wurden kaum entnommen. In vier der zwölf Fälle wurde ein vergrößerter Lymphknoten aus den zervikalen Leveln entnommen und einer aus der supraklavikulären Region. In einem der Fälle fand sich der Ort der Primärmanifestation in einer Tonsilla palatina. Aus dem Bereich des Thorax wurde nur in einem Fall ein axillärer Lymphknoten

entnommen. Retroperitoneal und mesenterial wurde jeweils einmal ein Lymphknoten entfernt. Inguinale Lymphknoten dienten in zwei der Fälle als Grundlage für die diagnostischen Untersuchungen. Zu einem der Lymphknoten konnte im Nachhinein keine genaue Lokalisationsangabe erfolgen (Tab. 11).

Tabelle 11. **Lokalisation der Lymphknotenregion der Gruppe 1-Fälle** aus der die vergrößerten Lymphknoten zur Diagnostik entnommen wurden.

Region	Lokalisation	Anzahl der Fälle mit entsprechender LK-Entnahme	Manifestation bei Erstdiagnose
Kopf-Halsbereich	zervikal	4	zervikal, nuchal, paraaortal, inguinal, supraklavikulär
	supraklavikulär	1	supraklavikulär
	tonsillär	1	Tonsilla palatina
Thorax	axillär	1	axillär
Abdomen	mesenterial	1	mesenterial
	retroperitoneal	1	paraaortal
	inguinal	2	inguinal

4.2.6 Ann-Arbor-Stadium bei Diagnosestellung

Bei der Auswertung des Ann-Arbor-Stadiums fiel eine Häufung des fortgeschrittenen Stadiums III₁ auf, was einen Befall auf beiden Seiten des Zwerchfells oberhalb des Truncus coeliacus anzeigt. In sechs der insgesamt zwölf Fälle (50 %) ließ sich Stadium III diagnostizieren. Stadium IV wurde bei keinem der Fälle diagnostiziert. Da Stadium I nur den Befall eines einzigen Lymphknotens oder einer einzigen Lymphknotenregion beschreibt, dies jedoch nur mit Vorbehalt diagnostiziert werden sollte, wurde dieses Stadium als Stadium I/II zusammengefasst. Darunter fielen insgesamt nur drei Fälle. Weitere drei Fälle konnten sicher als Stadium II diagnostiziert werden (Tab. 12).

Tabelle 12. **Stadieneinteilung der BCL2-neg. FL mit t(14;18) nach Ann-Arbor.**

Ann-Arbor-Stadium	Fallanzahl
I/II	2
II	4
III₁	5
III₂	1
IV	0

4.2.7 Sequenzanalyse

Alle Fälle aus Gruppe 1 wurden einer *BCL2*-Gen-Sequenzanalyse zur Detektion von Mutationen im Bereich der Antikörperbindungsstellen der Antikörper BCL2-100/D5 und E17/SP66 zugeführt. Zusätzlich wurden zehn Fälle mit immunhistochemisch nachgewiesener BCL2-Positivität und vorliegender (14;18)-Translokation als Kontrollgruppe sequenziert. In der Sequenzanalyse der zwölf Fälle mit t(14;18)-Translokation ließ sich in neun der zehn analysierbaren Fälle mindestens jeweils eine Mutation im Bereich der Antikörperbindungsstelle (Klon 100/D5) nachweisen. Der Hotspot lag dabei eindeutig im Bereich des Codons 144. Interessanterweise handelte es sich bei dem einzigen Fall mit Wildtypsequenz um den bereits oben erwähnten Fall 2. Hier ließen sich in der FISH eindeutig gesplittete Signale nachweisen, obwohl in der Färbung mit E17/SP66 eine BCL2-Negativität gezeigt werden konnte. Zwei der restlichen neun analysierbaren Fälle zeigten jeweils drei Mutationen im Bereich der Aminosäuren 48-76 (Abb. 20). In drei weiteren Fällen ließen sich zwei Mutationen nachweisen. Eine Mutation in einem dieser Fälle ruft jedoch als stille Mutation keine Änderung der Proteinstruktur hervor.

Deutlich stach die Mutation p.I48M hervor, die sich in drei Fällen nachweisen ließ und mit einem Austausch von Cytosin durch Guanin im Basentriplett ATC einherging (Tab. 13).

Tabelle 13. **Ergebnisse der Sequenzanalyse** mit Auflistung der Mutationen und ihrer Lokalisation (siehe auch Anhang 8.2.1).

Fall	Mutation auf Protein-ebene	Mutation auf cDNA-Ebene	mutiertes Basentriplett
1	p.I48M	c.144C>G	ATC →ATG
	p.P53T	c.157C>A	CCC→ACC
	p.A76T	c.226G>A	GCT→ACT
2	WT	WT	-
3	p.G47D	c.140G>A	GGC→GAC
	p.I48M	c.144C>G	ATC→ATC
4	p.F49S	c.146T>C	TTC→TCC
5	-	-	-
6	p.G47A	c.140G>C	GGC→GCC
	p.Q52H	c.156G>C	CAG→CAC
7	p.P46S	c.136C>T	CCG→TCG
8	p.P46A	c.136C>T	CCG→GCG
9	p.P46S	c.136C>T	CCG→TCG
	p.(=)	c.207C>G	ACC→ACG
10	-	-	-
11	p.I48M	c.144C>G	ATC→ATG
	p.P53T	c.157C>A	CCC→ACC
	p.A76T	c.226G>A	GTC→ATC
12	p.I48M	c.144C>G	ATC→ATG

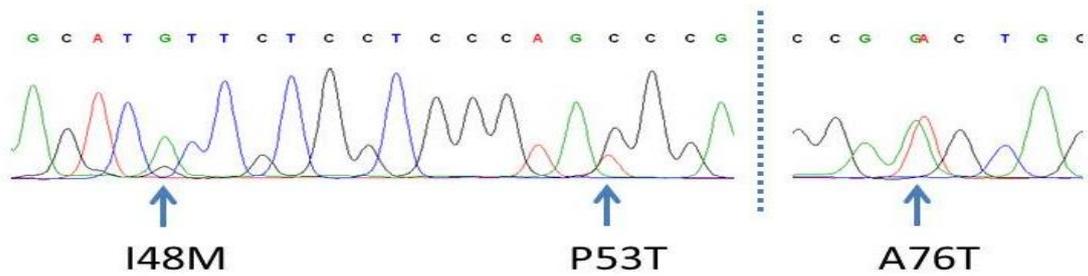


Abbildung 20. **Beispielsequenzanalyse zur Demonstration der drei am häufigsten detektierten Mutationen im Bereich der Aminosäuren 48, 53 und 76** (c.144C>G, p.I48M ATC-ATG; c. 157 C>A, p.P53T CCC-ACC, c.226G>A, p.A76T GCT-ACT) [52].

I48M

I48M P53T A76T

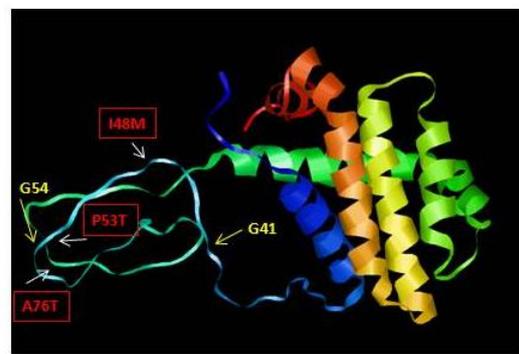
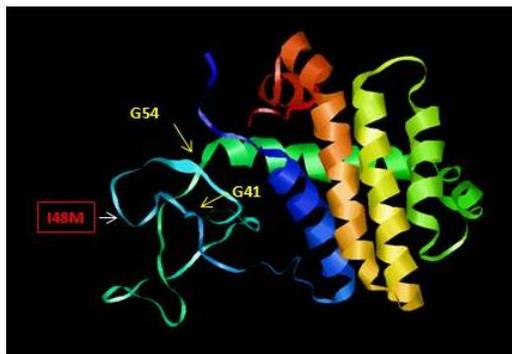


Abbildung 21. **Dargestellt ist die dreidimensionale Struktur des BCL2-Proteins mit den am häufigsten detektierten Mutationen.** Die Veränderung der Proteinstruktur betrifft jedoch keine der Regionen der homologen Domänen [52].

Um die Hypothese auch tatsächlich stützen zu können, ist es in einer wissenschaftlichen Arbeit unbedingt erforderlich, die Ergebnisse der Zielgruppe mit einer Kontrollgruppe zu vergleichen. In unserer Studie wurden als Kontrollen zehn immunhistochemisch BCL2-positive, t(14;18)-Translokation tragende, folliculäre Lymphome verwendet. Wie angenommen, zeigten sieben dieser Fälle keine Mutation. In einem der Kontrollfälle ließ sich eine stumme Mutation in Codon 207 nachweisen, die nicht zu einer Veränderung der entsprechenden Aminosäure an Stelle 74 führte. Kontrolle II wies eine Mutation auf, die zum Austausch der Aminosäure A60 führt, sich somit aber nicht auf die Antikörperbindung von BCL2-100/D5 auswirkte (Tabelle 14).

Tabelle 14. **Ergebnisse der Sequenzanalyse der Kontrollfälle.** Auflistung der Mutationen und ihrer Lokalisation. WT = Wildtyp

Kontrollfälle I-X	Mutation auf Proteinebene	Mutation auf cDNA-Ebene	mutiertes Basentriplett
I	p.(=)	c.222C>T	ACC→ACT
II	p.A60V	c.179C>T	GCC→GTC
III	WT	WT	-
IV	WT	WT	-
V	WT	WT	-
VI	WT	WT	-
VII	WT	WT	-
VIII	WT	WT	-
IX	WT	WT	-
X	WT	WT	-

4.3 Gruppe 2: BCL2-negative FL Grad I/II ohne t(14,18)-Translokation

4.3.1 Immunhistochemie

Alle Fälle fielen durch einen sehr heterogenen Immunphänotyp auf (Tab.15). Auch wenn die BCL6-Expression in allen Fällen einheitlich positiv war, unterlag die CD10- Expression großen Schwankungen. Drei der zehn Fälle zeigten eine komplette Negativität für dieses Oberflächenprotein. Die Proliferationsrate war gegenüber Gruppe 1 erhöht und wies eine große Bandbreite auf. Da zwei der Fälle allerdings eine sehr ausgeprägte Proliferation (Mib1) aufwiesen, wurde das Gewebe immunhistochemisch bezüglich der Expression der beiden Proteine LMO2 und HGAL untersucht, um die Diagnose eines folliculären Lymphoms zu sichern. Wie erwartet, zeigten alle Fälle eine starke Proteinexpression mit beiden Antikörpern.

Tabelle 15. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung und der FISH der Gruppe 2-Fälle.

Fall	BCL2 100/D5	BCL2 E17/SP66	CD10	BCL6	CD23	Mib1 (%)	BCL2- BAP	BCL6- BAP
13	-	-	+	++	-	15	-	+
14	-	-	++	++	-	15	-	
15	-	-	++	+	+	10	-	
16	-	-	++	+	+	10	-	
17	-	-	-	+	-	10	-	
18	-	-	+	+	-	25	-	+
19	-	-	-	+	-	80	-	
20	-	-	-	+	-	70	-	
21	-	-	+	+	-	30	-	
22	-	-	+	+	+	30	-	

Im Folgenden sind die mikroskopischen Schnitte mit den jeweiligen immunhistochemischen Färbungen als repräsentative Fallbeispiele aus der Gruppe der BCL2-neg. FL ohne t(14;18) abgebildet. Sie sollen noch einmal die Charakteristika des immunphänotypischen Erscheinens verdeutlichen (Abb. 22-26).

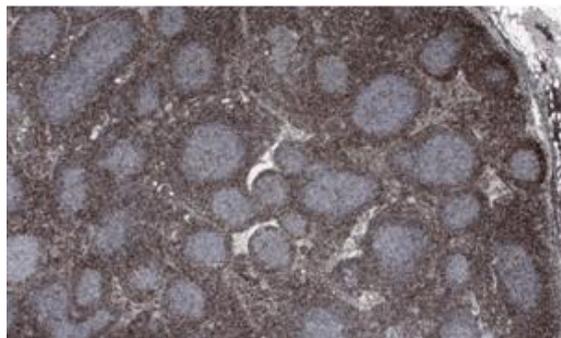


Abbildung 22. In der immunhistochemischen Färbung mit dem Standardantikörper BCL2-Klon 100/D5 zeigen die Tumorzellen keine Positivität für das BCL2-Protein [52].

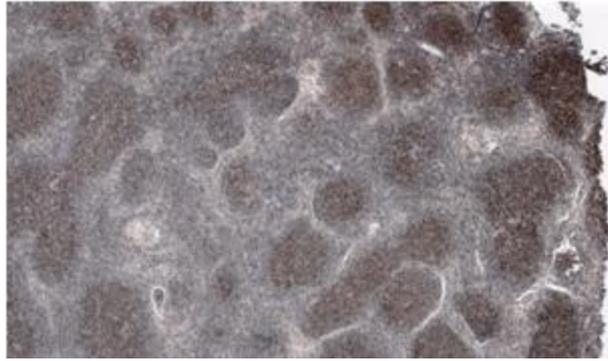


Abbildung 23. Die Tumorzellen exprimieren deutlich BCL6 [52].

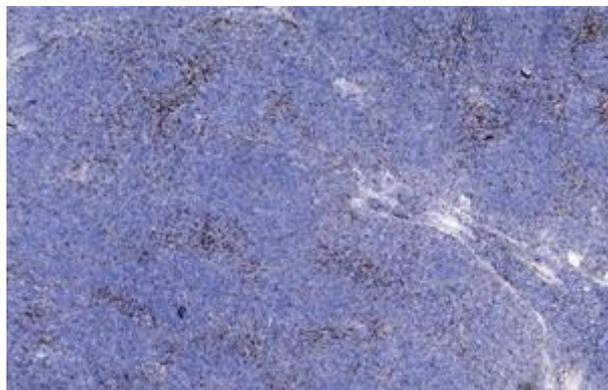


Abbildung 24. **Interessanterweise zeigen 30 % der Fälle aus Gruppe 2 keine CD10-Expression**, wie es der oben abgebildete histologische Schnitt darstellt [52].



Abbildung 25. **Exemplarisches Beispiel eines Falles mit deutlicher CD23-Expression** [52].

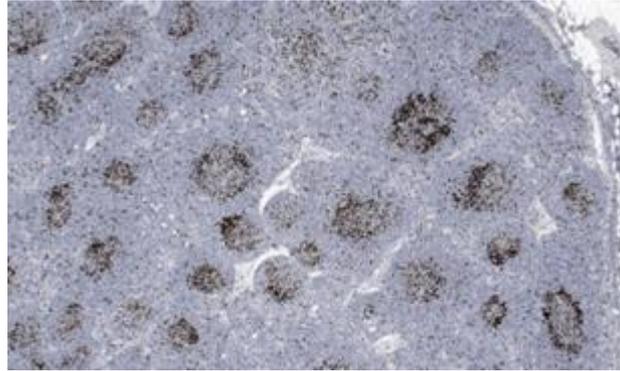


Abbildung 26. Die Tumorzellen zeigen eine Proliferationsrate von 30 % in der immunhistochemischen Färbung mit Mib1 [52].

4.3.2 FISH-Untersuchung

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der Fälle follikulärer Lymphome, die sich sowohl in der BCL2-100/D5 Färbung negativ darstellten, als auch in der BCL2-E17/SP66-Färbung keine Überexpression des BCL2-Proteins zeigten, fiel das Ergebnis durchweg negativ aus. In keinem der Fälle ließ sich eine t(14;18)-Translokation nachweisen. Im Anschluss an die BCL2-FISH wurden alle Fälle mit einer BCL6-Sonde hybridisiert. Hier zeigte sich ein Bruch in Fall 13 und in Fall 18 (Tab. 15).

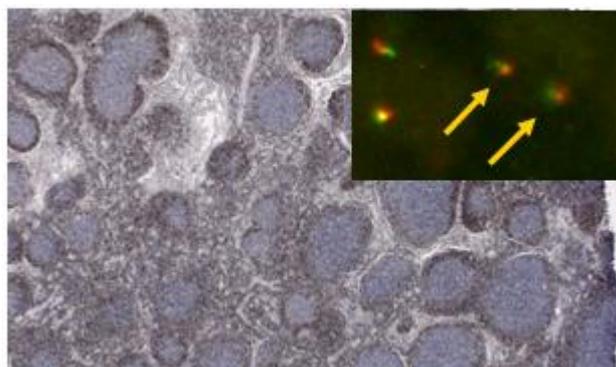


Abbildung 27. Bei fehlender BCL2-Proteinexpression mit immunhistochemischer Färbung mit dem alternativen E17-Antikörper zeigen sich in der FISH Analyse keine gesplitteten Doppelsignale [52].

4.3.3 Geschlechterverteilung

Interessanterweise erkrankten in Gruppe 2 Frauen 2,3x häufiger als Männer derselben Gruppe (M:F= 1:2,33) (Abb. 28).

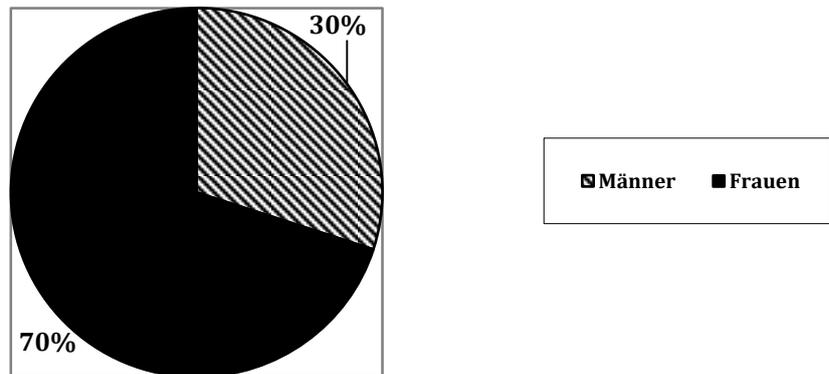


Abbildung 28. Graphische Darstellung der Geschlechterverteilung der BCL2-neg. FL Grad I/II ohne t(14;18).

4.3.4 Altersverteilung

Die Altersverteilung verlief in Gruppe 2 von 48 bis 83 Jahren. Der mediane Altersgipfel lag bei 70 Jahren und das mittlere Erkrankungsalter bei 67 Jahren (Abb. 29).

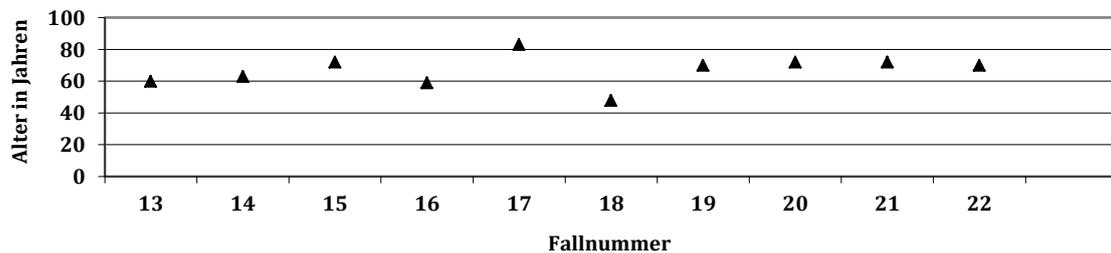


Abbildung 29. Graphische Darstellung der Altersverteilung der Studienfälle aus Gruppe 2.

4.3.5 Lokalisation der Lymphknotenregion

In insgesamt drei der Fälle erfolgte die Diagnostik anhand eines Lymphknotens aus dem Kopf-Hals-Bereich. Der größte Anteil der pathologischen Lymphknoten dieser Gruppe stammte jedoch aus der Axillaregion. Bei einem der Fälle konnte kein Rückschluss auf die Lokalisation erfolgen (Tab. 16).

Tabelle 16. **Lokalisation der Lymphknotenregion der Gruppe 2-FL**, aus der die vergrößerten Lymphknoten zur Diagnostik entnommen worden waren.

Region	Lokalisation	Anzahl pathologischer Lymphknoten
Kopf-Halsbereich	zervikal	2
	submandibulär	1
Thorax	axillär	6
Abdomen	retroperitoneal	0
	inguinal	0

4.3.6 Ann-Arbor-Stadium bei Diagnosestellung

Im Rahmen der Untersuchung der Stadieneinteilung bei Erstdiagnose fiel ein gleich häufiges Vorkommen des Stadiums I/II und Stadiums III₁ auf. In einem der Fälle konnte Stadium I relativ eindeutig diagnostiziert werden. Stadium I/II wurde ebenso wie Stadium III₁ in vier Fällen festgelegt (Tab. 17). Für einen Fall traf Stadium II zu. Die Stadien III₂ und IV wurden in keinem der Fälle diagnostiziert.

Tabelle 17. **Stadieneinteilung der BCL2-neg. FL ohne t(14;18) nach Ann-Arbor**

Ann-Arbor-Stadium	Fallanzahl
Stadium I	1
Stadium I/II	4
Stadium II	1
Stadium III1	4
Stadium III2	0
Stadium IV	0

4.3.7 Sequenzanalyse

Unter den zehn FL, in denen keine t(14;18)-Translokation nachgewiesen werden konnte, die allerdings auch keine Positivität für BCL2 mit dem E17/SP66-Antikörper zeigten, wurde in allen analysierbaren Fällen die Wildtypsequenz festgestellt. In vier der insgesamt zehn Fälle war die DNA-Menge für eine Sequenzanalyse nicht ausreichend (Tab. 18).

Tabelle 18. **Ergebnisse der Sequenzanalyse der t(14;18)-neg. FL.**
WT= Wildtyp (siehe auch Anhang 8.2.2).

Fall	BCL2-Region c.121-228	mutierte DNA	mutiertes Basentriplett
13	kein Material	-	-
14	WT	WT	-
15	kein Material	-	-
16	WT	WT	-
17	WT	WT	-
18	WT	WT	-
19	kein Material	-	-
20	kein Material	-	-
21	WT	WT	-
22	WT	WT	-

4.3.8 Klonalitätsanalyse

Da die Fälle aus Gruppe 2 in vielen Bereichen dem typischen Erwartungsbild eines folliculären Lymphoms nicht zu entsprechen schienen, wurde in diesen Fällen zusätzlich eine Klonalitätsanalyse durchgeführt, um eine rein reaktive Veränderung auszuschließen [102]. Alle analysierbaren Fälle zeigten in der Framework2-PCR ausnahmslos ein monoklonales Produkt im Bereich zwischen 252 bp und 291 bp (Tab. 19). In der Framework3-PCR konnte jedoch nur in drei der analysierbaren Fälle ein monoklonales Produkt detektiert werden, alle anderen Fälle zeigten das Muster eines polyklonalen Rearrangements. Zwei der Fälle konnten in FR2 und FR3 aufgrund zu schlechter DNA-Qualität nicht analysiert werden. Die drei Fälle, die sich auch in der Framework3-PCR monoklonal zeigten, wiesen einen Peak im Bereich zwischen 115 bp und 119 bp auf (Tab. 19).

Tabelle 19. **Ergebnis der Klonalitätsanalyse der BCL2-negativen FL ohne t(14;18)**. Für die Fälle, die monoklonale Resultate zeigten, sind die detektierten Basenpaarlängen der Produkte angegeben. Dem stehen die polyklonalen Ergebnisse bei Detektion eines Musters nach Gaußverteilung gegenüber.

Fallnummer	FR2-PCR	FR3-PCR
13	263 bp	polyklonal
14	266 bp	polyklonal
15	261 bp	119 bp
16	291 bp	polyklonal
17	260 bp	118 bp
18	252 bp	115 bp
19	264 bp	polyklonal
20	-	-
21	283 bp	polyklonal
22	-	-

Im Folgenden sind zwei Fallbeispiele dargestellt, in dem ein Fall in zwei DNA-Verdünnungsstufen sowohl in FR2 als auch in FR3 ein monoklonales Amplifikat zeigt und der andere Fall nur in FR2 einen monoklonalen Peak aufweist, sich in FR3 hingegen polyklonal erweist (Abbildung 30 und 31).

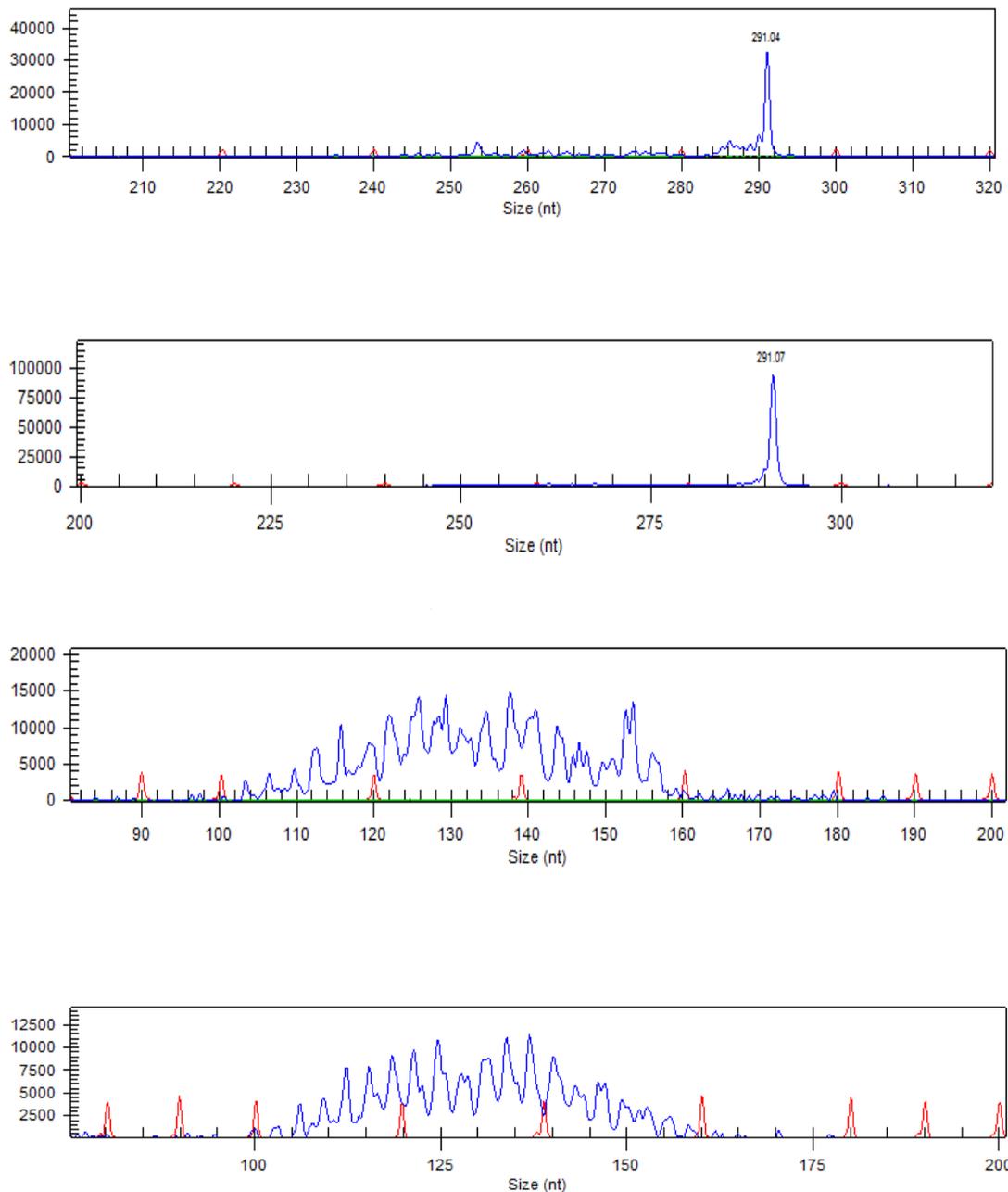


Abbildung 30. **Exemplarische Darstellung einer Klonalitätsanalyse.** In diesem Beispiel handelt es sich um einen Fall, der sich in FR2 monoklonal (obere zwei Elektropherogramme) und in FR3 (untere zwei Elektropherogramme) polyklonal zeigt.

Ergebnisse

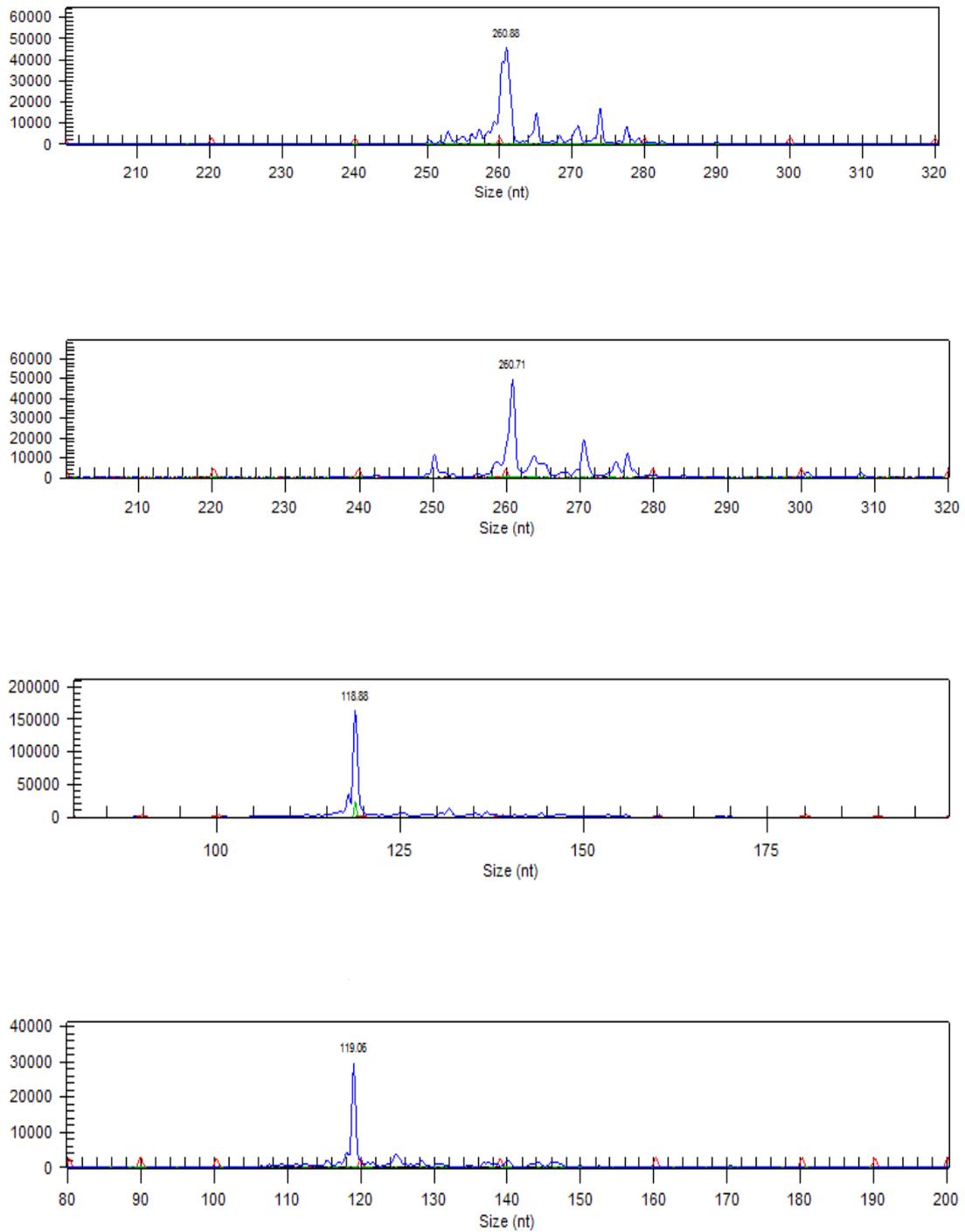


Abbildung 31. **Exemplarische Darstellung einer Klonalitätsanalyse.** In diesem Beispiel handelt es sich um einen Fall, der sich sowohl in FR2 (obere zwei Elektropherogramme) als auch in FR3 (untere zwei Elektropherogramme) monoklonal zeigt.

4.3.9 RT-qPCR

Um die BCL2-mRNA der Studienfälle aus Gruppe 2 zu quantifizieren, wurde eine RT-qPCR durchgeführt und physiologische Lymphknoten als Vergleichskontrolle verwendet. Ein erhöhtes BCL2-mRNA-Transkript-Level ließ sich in keinem der analysierten Fälle ohne t(14;18)-Translokation ausmachen. Da Fall 2 aus Gruppe 1 mit seiner hohen Proliferationsrate der Tumorzellen und einer t(14;18)-Translokation bei fehlender BCL2-Proteinexpression, sowohl bei Färbungen mit dem BCL2-100/D5-Antikörper als auch mit dem E17-Antikörper, aus der Reihe fiel, wurde dessen mRNA ebenfalls quantifiziert. Im Vergleich zu den t(14;18)-negativen Fällen war hier die detektierte BCL2-mRNA-Menge geringfügig erhöht (Abb. 32).

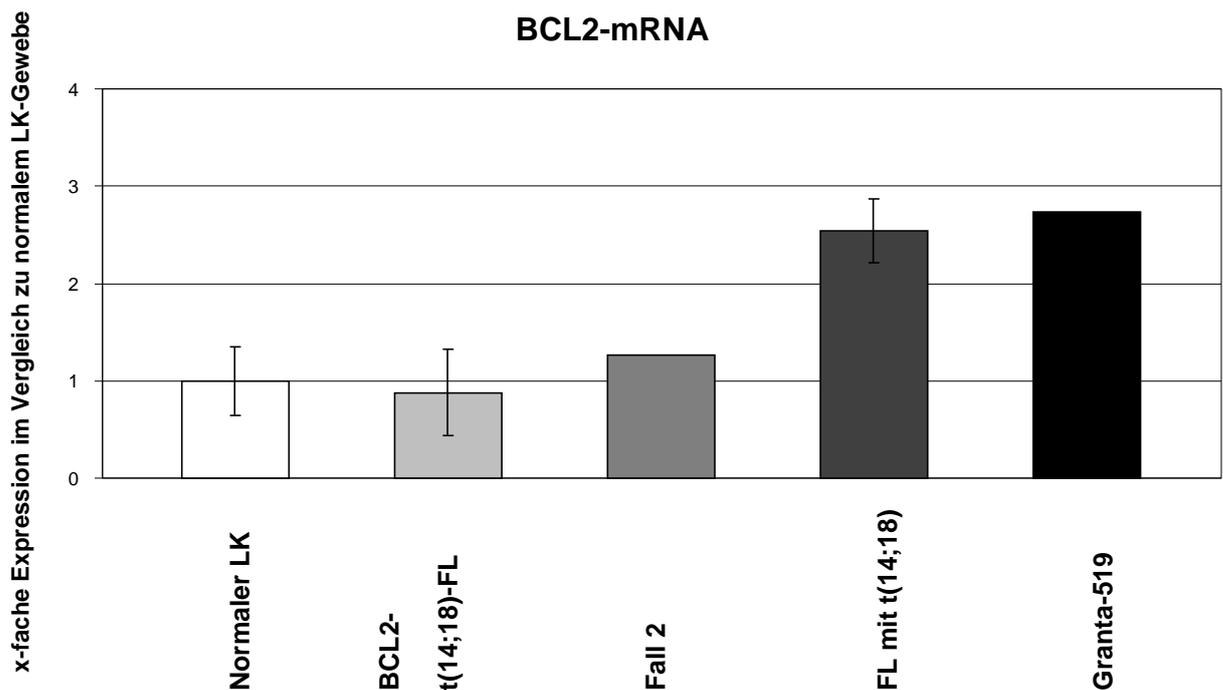


Abbildung 32. Graphische Darstellung des prozentualen BCL2-mRNA-Anteils der BCL2-negativen FL ohne t(14;18)-Translokation im Vergleich zu den BCL2-mRNA-Leveln physiologischer Lymphknoten (Granta-519: Mantelzelllymphom-Zelllinie mit BCL2-Überexpression) [52].

4.4 Gruppe 3: BCL2-positive Fälle ohne t(14;18)

Bei der Selektion der BCL2-negativen Lymphome aus einer Gesamtheit von insgesamt 240 follikulären Lymphomen fiel eine kleine Gruppe von vier Fällen auf, die sich keiner der übrigen Gruppen zuordnen ließen. Die Fälle zeigten durchweg eine BCL2-Positivität mit dem Standardantikörper BCL2-100/D5. Ebenso ließ auch die BCL2-E17/SP66 Färbung auf eine Überexpression an BCL2-Protein schließen. Erstaunlicherweise konnte aber in der FISH keine Translokation des *BCL2*-Gens nachgewiesen werden (Tab. 20).

Tabelle 20. **Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen und der FISH der BCL2-positiven FL ohne t(14;18)**

Fallnummer	BCL2-100/D5	BCL2-E17/SP66	BCL2-BAP
23	+	+	-
24	+	+	-
25	+	+	-
26	+	+	-

Im Rahmen dieser Studie wurden keine weiteren Untersuchungen zu Gruppe 3 durchgeführt, da sich die Fragestellung auf BCL2-negative FL bezieht.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit beschäftigten wir uns mit der Frage, weshalb sich in 10-15 % der Fälle aller FL mit dem Standardantikörper Klon 100/D5 keine BCL2-Überexpression nachweisen ließ [69, 88, 94, 103]. Wie wir durch die Ergebnisse der Studie feststellen konnten, muss ein beträchtlicher Prozentanteil der Inzidenz dieser angeblich BCL2-negativen FL abgezogen werden, da es sich um pseudonegative FL handelt. Anhand unserer Studienfälle konnten wir diese tatsächliche Inzidenz BCL2-negativer FL abschätzen.

5.1 Inzidenzvergleich

Die Ergebnisse der Studie bezüglich der Inzidenz BCL2-negativer FL nach Färbung mit dem Standardantikörper BCL2-Klon 100/D5 halten einem Vergleich mit bisherigen Studienergebnissen durchaus stand. Literaturangaben aus publizierten Studienergebnissen geben Werte von 10-15 % FL mit BCL2-Negativität vor [88, 93, 103]. Unsere Studie umfasst zwar eine Gesamtzahl von 240 follikulären Lymphomen Grad I-IIIb, da jedoch nur Grad I und II in die Inzidenzberechnung mit eingeschlossen werden sollten, wurde bei dieser Berechnung von einer Gesamtfallzahl von 187 FL ausgegangen. Bei 22 Fällen von FL, die sich mit dem Standardantikörper BCL2-Klon 100/D5 als BCL2-negativ darstellten, ergab sich deshalb eine Inzidenz von 11,76 %. Dies entspricht in vollem Umfang den Literaturangaben [88]. Allerdings muss dabei die Einschränkung getroffen werden, dass bei diesen Inzidenzberechnungen keine Unterscheidung in pseudonegative und „tatsächlich“ BCL2-negative FL vorgenommen wurde. Werden pseudonegative FL aus der Berechnung ausgeschlossen, ergibt sich eine stark reduzierte Inzidenz von 5,35 %. Die beträchtlichen Unterschiede in den Inzidenzangaben mit und ohne Einberechnung der pseudonegativen FL zeigen deutlich die Notwendigkeit mit der eine Unterscheidung der BCL2-negativen FL in pseudonegative und wirklich BCL2-negative FL unternommen werden sollte.

5.2 Auftrennung in verschiedene Subgruppen

In unserer Studie wurde zunächst eine Gruppenzuordnung nach Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen mit BCL2-Klon 100/D5 und einer FISH vorgenommen. So konnten wir in unserer Studie 22 Fälle BCL2-negativer FL mit BCL2-Klon 100/D5 über immunhistochemische Färbungen und FISH-Untersuchungen in zwei Gruppen einteilen. Die Tatsache, dass die FISH in allen Fällen pseudonegativer FL eine Translokation zeigte, in den Fällen mit tatsächlich vorliegender BCL2-Negativität jedoch kein Translokationsnachweis mit BCL2 Break Apart-Sonden erfolgen konnte, verdeutlicht, dass die FISH mit zur Trennung BCL2-positiver FL und echten BCL2-negativen FL herangezogen werden kann. Sie ist jedoch nicht in der Lage allein eine Unterscheidung zwischen BCL2-positiven und pseudonegativen FL zu liefern, sondern nur in Kombination mit den immunhistochemischen Antikörperfärbungen. Wie die Auswertung von Gruppe 3 der Studienfälle zeigt, lässt sich in diesen Fällen nämlich trotz immunhistochemischem BCL2-Nachweis keine t(14;18)-Translokation in der FISH erkennen, was bei alleiniger Betrachtung der FISH zu einer Zuordnung der Fälle zu den BCL2-negativen FL führen würde. Unter Hinzunahme der Ergebnisse der Klon 100/D5- und der E17/SP66-Färbungen, lassen sich diese FL jedoch klar davon abgrenzen.

5.3 Korrelation der FISH mit der E17/SP66-Färbung

Inwieweit korreliert nun jedoch der Translokationsnachweis in der FISH mit der E17/SP66-Färbung? Schon die Arbeitsgruppe um Pezzella et al. hatte sich mit der Frage beschäftigt, ob die BCL2-Proteinexpression immer mit einer t(14;18)-Translokation einhergeht [104]. Von 19 Fällen mit BCL2-positiv nodulärem Färbemuster konnte in zwölf Fällen eine Translokation nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten elf von 17 Fällen mit positiv diffusem Färbeverhalten eine Translokation. Bei FL mit BCL2-negativem Status konnte in keinem der Fälle eine Translokation nachgewiesen werden. Auch in unserer Studie ließ sich feststellen, dass alle BCL2-Klon E17/SP66-negativen Fälle keine t(14;18)-Translokation zeigten. Da eine t(14;18)-Translokation zu einer BCL2-

Überexpression führt, ist eine solche bei Fehlen der Mutation eigentlich nicht zu erwarten, weshalb diese Feststellung sich gut mit den Erwartungen und bisherigen Forschungsergebnissen bezüglich der Auswirkung einer t(14;18)-Translokation auf die BCL2-Proteinexpression decken lässt [105, 106]. Die FL aus Gruppe 1, bestehend aus zwölf Fällen, in denen sich durchweg eine Translokation in der FISH nachweisen ließ, zeigten allerdings nur in elf Fällen ein positives Ergebnis in der E17/SP66-Färbung. Fall 2 blieb mit allen getesteten Antikörpern BCL2-negativ. Da dies eine gänzlich unerwartete Konstellation ist, soll hierauf im weiteren Verlauf der Diskussion noch eingegangen werden. Eine weitere Einschränkung der Annahme einer E17/SP66-Positivität bei vorhandener t(14;18)-Translokation, erfährt diese wiederum, durch die FL aus Gruppe 3, bei welchen zwar eine BCL2-Positivität mit E17/SP66 besteht, aber dennoch keine t(14;18)-Translokation in der FISH nachzuweisen war. Auch hierauf soll zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal zurückgegriffen werden. Was die Studienergebnisse von Pezzella et al. betrifft, so muss man unbedingt anmerken, dass die Translokationsdetektion bei Pezzella et al. nicht über eine FISH, sondern über eine PCR und Southern Blot-Analyse lief, deren Sensitivität nicht an die der FISH heranreicht und man deshalb mit einer höheren Rate falsch negativer Fälle rechnen muss [104, 105, 107]. Interessanterweise hatte die Arbeitsgruppe allerdings schon mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen BCL2 gearbeitet, von dem der eine dem Epitop des BCL2-Standardantikörpers BCL2 100/D5 entsprach und der andere Antikörper ein Immunogen im Bereich der Aminosäuren 61-76 erkannte, was deckungsgleich mit der Bindungsstelle des E17-Antikörpers ist. Die Arbeitsgruppe Schraders et al. machte in ihren Studien die Entdeckung, dass in Fällen ohne Bruch im *BCL2*-Gen auch keine BCL2-Expression mit allen drei Antikörpern nachweisbar ist, was sich gut mit unseren Studienergebnissen deckt [108].

5.4 Vergleich der FL-Subgruppen

5.4.1 Morphologie und Immunhistochemie

Wie wir feststellen konnten, unterschieden sich die Gruppen morphologisch kaum voneinander und lieferten das typische Bild eines folliculären Lymphoms mit Aufhebung der Lymphknotenarchitektur, einer diffusen Infiltration von Follikeln mit reduzierter Mantelzone und Imitation reaktiver Keimzentren ohne klare Zonierung, bei einem Vorherrschen von Zentrozyten [2]. In den immunhistochemischen Färbungen ließen sich dann jedoch durchaus klare Unterschiede erkennen. Die t(14;18)-positiven Fälle zeigten durchweg eine deutliche CD10-Expression. Diese war in den Fällen ohne Translokation teils deutlich schwächer oder sogar ganz aufgehoben, was für folliculäre Lymphome sehr untypisch ist, da die Überexpression des BCL2-Proteins mit gleichzeitigem Auftreten von CD10 als ein Kriterium für Malignität herangezogen werden kann [42]. Schon Leich et al. hatte beschrieben, dass BCL2-negative Lymphome eine heterogenere CD10-Expression zeigen, als es BCL2-positive FL tun [92, 93]. Wie es bereits in Studien von Gollub et al. beschrieben wurde, exprimieren vor allem FL mit Translokation im BCL6-Gen in großem Maße CD10 [109]. In unserer Studie zeigten zwei der Fälle ohne t(14;18)-Translokation eine Translokation mit BCL6-Break Apart-Sonden. Beide Fälle wiesen eine deutliche CD10-Expression auf, was sich mit den Literaturangaben deckt [93]. Marafioti et al. teilen die Lymphome nach der BCL2-Expression und der CD10 Expression in insgesamt vier Untergruppen ein: BCL2-positiv/CD10-positiv, BCL2-positiv/CD10-negativ, BCL2-negativ/CD10-positiv, BCL2-negativ/CD10-negativ [110]. Auch die von uns untersuchten FL ließen sich diesen vier Untergruppen zuordnen. Mit insgesamt 30 % machte die Gruppe der CD10-negativen/BCL2-negativen FL den kleinsten Anteil aus [109, 110]. Laut Studien von Pan et al. wird ein starker Zusammenhang zwischen der BCL2-Translokation und der CD10- und Ki-67-Expression gesehen [111]. Keiner unserer Studienfälle zeigte bei positivem Translokationsstatus eine fehlende CD10-Expression. Das Fehlen einer CD10-Expression spricht üblicherweise eher für das Vorliegen eines Mantelzelllymphoms [112], was jedoch bei allen Studienfällen mit fehlender

CD10-Expression durch mangelnde Cyclin D1-Expression ausgeschlossen werden konnte [113]. Dafür zeigten 30 % dieser Fälle eine Positivität für CD23, was bei den t(14;18)-positiven FL in keinem der Fälle nachweisbar war. CD23 ist ein Protein, das von B-Zellen exprimiert wird und das entscheidende Bedeutung für Differenzierungs- und Wachstumsvorgänge der B-Zellen besitzt und sogar eine wichtige Funktion in der Regulierung der IgE-Produktion einnimmt. In löslicher Form hat es mitogene Eigenschaften [114-116].

5.4.2 Geschlechterverteilung

Eine Unterschiedlichkeit der beiden Gruppen war auch in der Geschlechterverteilung zu finden. Die Geschlechterverteilung unter den BCL2-negativen FL Grad I/II mit t(14;18) steht nicht in Kongruenz zur bisherigen Studienlage, nach der FL nur ein geringfügig erhöhtes Auftreten beim weiblichen Geschlecht zeigen (M:F = 1:1,7) [2, 36, 79, 108, 117]. Es lässt sich eindeutig eine höhere Anzahl FL bei Männern feststellen, mit einer fünffach erhöhten Inzidenz gegenüber Frauen, was einer starken Abweichung von bisherigen Studienergebnissen entspricht [2]. Da es sich bei den BCL2-negativen FL mit t(14;18) um pseudonegative FL handelt, die eigentlich BCL2-positiv sind, das Protein jedoch vom Standardantikörper BCL2-100/D5 aufgrund von Mutationen im Bereich der Antikörperbindung nicht erkannt werden kann, wirft das Ergebnis auf jeden Fall die Frage auf, ob Mutationen im Bereich der Antikörperbindungsstelle unter Umständen auch durch geschlechtsspezifische Faktoren hervorgerufen werden könnten, mit einer Präferenz für das männliche Geschlecht, was sich bisher jedoch noch in keiner Studie nachweisen ließ und deshalb auch nicht ausreichend diskutiert werden kann. In der Gruppe der BCL2-negativen FL ohne t(14;18) waren mehr Frauen betroffen, was die Unterschiedlichkeit der beiden Studiengruppen bestärkt. Unsere Ergebnisse aus dieser Gruppe lieferten ein Verhältnis von M:F = 1:2,33, was sich mit den bisherigen Studien gut vereinbaren lässt [2].

5.4.3 Altersverteilung

Das mediane Überlebensalter liegt anderen Studien zufolge in der sechsten Lebensdekade [2, 117]. Die Auswertung der Daten aus der Gruppe der BCL2-negativen FL mit t(14;18)-Translokation ergab eine medianes Überleben von 63 Jahren. Dies entspricht den Ergebnissen aus anderen Studien [118]. In Gruppe 2 lag der mediane Altersgipfel bei 70 Jahren, was etwas über dem in der Literatur genannten Altersgipfel liegt, jedoch trotzdem keinen Widerspruch dazu bildet, da folliculäre Lymphome eher eine Erkrankung des älteren Menschen sind. Der etwas höher gelegene Altersdurchschnitt in der Gruppe der BCL2-negativen FL ohne t(14;18)-Translokation lässt auf jeden Fall die Interpretation offen, durch den längeren Zeitraum bis zur Erstdiagnose auch eine längere Latenzzeit mit einem gänzlich verschiedenen Pathomechanismus anzunehmen.

5.4.4 Lokalisation der pathologischen Lymphknoten

Die Ergebnisse zur Entnahmestelle der vergrößerten Lymphknoten lassen sich nur bedingt auswerten, da fast ausnahmslos alle Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits an mehreren Lokalisationen im Körper vergrößerte Lymphknoten aufwiesen. Die Entscheidung über den Entnahmeort wurde anhand des am besten geeigneten operativen Zugangswegs oder anhand der Größe der pathologischen LK gefällt. So erweist sich die Entnahme abdomineller Lymphknoten schon allein aus anatomischen Gegebenheiten heraus sehr viel komplizierter, als die Entnahme von Lymphknoten im Kopf-Hals-Bereich. Auf die Entnahme inguinaler Lymphknoten wird generell eher verzichtet, da hier auch sehr oft vergrößerte Lymphknoten aufgrund reaktiver Veränderungen zu finden sind [119]. Interessanterweise wurde in Gruppe 1 mehr als die Hälfte der Lymphknoten aus dem Kopf-Hals-Bereich entnommen, wohingegen in Gruppe 2 vor allem vergrößerte Lymphknoten aus dem Bereich der Axilla (67 %) zur Diagnostik herangezogen wurden. Bei einer axillären Lokalisation pathologisch vergrößerter Lymphknoten ist ein malignes Geschehen häufig, ebenso bei supraclavikulär vergrößerten LK [120].

In Gruppe 1 stammte nur einer der auffälligen LK aus dem axillären Kompartiment. Diese Beobachtung erhärtet den Verdacht, dass es sich unter Umständen bei dem Pathomechanismus der beiden Gruppen um gänzlich verschiedene handelt und dass BCL2-negative FL sich eventuell sogar in prognostischen, als auch in klinischen Merkmalen von den BCL2-positiven FL unterscheiden. Dies hätte zur Folge, dass Zuordnungen nach immunhistochemischen Merkmalen bei FL auch Auswirkungen auf Prognose und Therapie haben könnten und dementsprechend von großer Wichtigkeit für das einzelne Individuum wären.

5.5 Bewertung der Ergebnisse der Sequenzanalyse

Wie bereits oben genannt, sollte in der vorliegenden Dissertation vor allem auf die Frage eingegangen werden, weshalb eine gewisse Anzahl follikulärer Lymphome in der immunhistochemischen Färbung mit dem BCL2-Antikörper Klon 100/D5 eine fehlende BCL2-Überexpression zeigen, obwohl diese Fälle bei Färbungen mit E17/SP66 eine deutliche Positivität für dieses Protein aufweisen. Schon vorhergehende Studien haben sich mit dieser oder ähnlichen Fragestellungen beschäftigt. Studien von Schraders et al. und Masir et al. vermuteten dahinter mögliche Mutationen im Bereich der Antikörperbindungsstelle des BCL2-Klons 100/D5, die eine Bindung des Antikörpers verhinderten [87, 88]. In der Studie von Schraders et al. wurden fünf pseudonegative FL untersucht, von denen drei tatsächlich Mutationen in diesem Bereich aufwiesen [88]. Die zwei übrigen Fälle zeigten jedoch die Wildtypsequenz. Masir et al. untersuchte sieben pseudonegative FL, wovon in vier der Fälle Mutationen im Bereich der Antikörperstelle detektiert wurden, wohingegen die übrigen Fälle die Wildtypsequenz aufwiesen [68]. Eine mögliche Erklärung wurde in konformationsändernden Mutationen außerhalb der Antikörperbindungsstelle gesehen, die sich aber so auf diesen Bereich auswirken müssten, dass eine Bindung des Antikörpers dennoch nicht möglich sei. Um diesen Hypothesen nachzugehen, wurden hier die zwölf Fälle mit t(14;18)-Translokation diesbezüglich untersucht. Bei ausnahmslos allen E17/SP66-positiven Fällen wurden Mutationen im *BCL2*-Gen, das für den

Bereich des Epitops des Standardantikörpers Klon 100/D5 kodiert, detektiert. Einzige Ausnahme bot Fall 2, der eine besondere Konstellation aufwies, indem bei gleichzeitiger Negativität mit E17/SP66 dennoch eine Translokation nachgewiesen werden konnte. Dieser Fall trug keine Mutationen im Epitopbereich des Standardantikörpers, sondern wies die Wildtypsequenz auf. Auch wenn es sich nur um einen einzigen Fall handelt, so spricht die Ergebnislage nichtsdestotrotz gegen die Hypothese von Masir et al., auch Mutationen außerhalb des Epitops könnten zu Konformationsänderungen führen, die die Antikörperbindung verhinderten [87]. Selbst Missensemutationen die die peripheren Enden des E17-Epitops betreffen, konnten eine Antikörperbindung nicht verhindern. Folglich sollte man wohl eher eine andere Erklärung für mögliche Gründe, weshalb FL mit Wildtypsequenz und t(14;18)-Translokation keine Überexpression an BCL2-Protein aufweisen, finden. Möglicherweise wird das BCL2-Protein durch eine genetische Fortentwicklung des malignen Klons inaktiviert, wie es der Verlust der ansteigenden BCL2-Expression nahelegt. Mutationen in Exon 1 des BCL2-Gens werden nur in Fällen mit t(14;18)-Translokation nachgewiesen, was dafür spricht, dass es sich bei den Mutationen um nach dem Translokationsereignis erworbene Veränderungen handelt. Vermutlich stehen diese Mutationen sogar in Zusammenhang mit der somatischen Hypermutation des *IgH*-Gens [71]. Die in unserer Studie detektierten Mutationen scheinen sich um den Hotspot des Codons 144 zu häufen. Dieses Codon betrifft die Aminosäure Isoleucin. Durch einen Austausch der Base Cytosin durch Guanin wird daraus die Aminosäure Methionin. Keine der gefundenen Mutationen betraf jedoch Bereiche homologer Domänen im *BCL2*-Gen. Dabei werden die konservierten alpha-helikalen Domänen für die antiapoptotischen Fähigkeiten des integralen Mitochondrienmembranmoleküls verantwortlich gemacht, weshalb davon auszugehen ist, dass eine Einschränkung des antiapoptotischen Potenzials des Moleküls bei Mutationen außerhalb dieser Bereiche nicht zu erwarten ist [121]. Mutationen in BH-Bereichen bieten letztendlich keinen Selektionsvorteil für den malignen Klon, weshalb nicht anzunehmen ist, dass eine Progression follikulärer Lymphome hin zu DLBCL über Mutationen in kodierenden Regionen

des *BCL2*-Gens erfolgt [121]. Feststellen lässt sich auf jeden Fall, dass Mutationen betreffs Exon 1 des *BCL2*-Gens wahrscheinlich keinen Einfluss auf die initiale klonale Expansion besitzen. Am ehesten sind diese Mutationen auf Ereignisse im Rahmen der somatischen Hypermuation zurückzuführen und betreffen nur das translozierte Allel.

5.6 BCL2-Positivität und Proliferation

Typischerweise zeigen BCL2-positive FL eine eher niedrige Proliferationsrate, was darin begründet liegt, dass die BCL2-Expression invers mit der Proliferationsrate korreliert [68, 69, 122]. Dies bestätigen auch die Ergebnisse unserer Studie. Von elf BCL2-positiven Fällen mit t(14;18)-Translokation wiesen acht Fälle eine Proliferationsrate unter 25 % auf. Bei drei Fällen lag die Proliferationsrate entweder bei 30 oder bei 40 %. Der einzige Fall, der eine hohe Proliferationsrate (80 %) aufwies, war Fall 2, der wie bereits oben erwähnt, keine BCL2-Überexpression bei vorhandener t(14;18)-Translokation zeigte. Die mittlere Proliferationsrate der Fälle aus Gruppe 1 lag bei 23 %. Interessanterweise entsprachen die Ergebnisse der BCL2-negativen FL-Fälle ohne t(14;18) nur in geringem Maße den Erwartungen. Bei fehlender BCL2-Expression lag die Proliferationsrate in acht von zehn unserer Studienfälle nicht über 30 %, sondern eher zwischen zehn und fünfzehn Prozent. Nur zwei der Fälle schienen der bisherigen Studienlage zu entsprechen, da hier die Proliferationsrate bei 70, bzw. 80 % lag. Insgesamt war die mittlere Proliferationsrate mit 30 % nur unwesentlich höher, als es bei den FL aus Gruppe 1 der Fall war. Es muss an dieser Stelle jedoch unbedingt erwähnt werden, dass der Mib1-Marker, der gegen das Ki-67-Antigen gerichtet ist, welches eine wichtige Rolle im Zellzyklus einnimmt und als Proliferationsmarker verwendet werden kann, nur eine relative Größe ist [123]. Die Mib1-Expression darf nicht allein zur Zuordnung „indolentes“ oder „aggressives“ Lymphom führen, sondern nur auf dem Hintergrund verschiedener Gesichtspunkte, wie histologisches Bild, Grading, usw. beurteilt werden. Ein hoher Ki-67-Index schließt die Diagnose eines indolenten FL nämlich nicht aus [124].

5.7 *BCL2*-Genmutationen und klonale Evolution

Nach dem 1976 veröffentlichten theoretischen Modell der klonalen Evolution von Nowell ist davon auszugehen, dass zur Tumorentstehung mehrere Schritte notwendig sind, bei denen veränderte Klonzellen einen gewissen Wachstumsvorteil gegenüber vorhergehenden Klonzellen oder Zellen mit niedrigerem Mutationsstatus besitzen, was sich durch Rückgang der Apoptose oder vermehrter Teilung bemerkbar macht [122]. Was Fall 2 betrifft, so nimmt dieser eine ganz spezielle Rolle ein. Trotz nachgewiesener t(14;18)-Translokation, lässt sich in der immunhistochemischen Färbung mit BCL2-Klon 100/D5 und E17/SP66 keine vermehrte BCL2-Proteinexpression feststellen. Auffällig ist weiterhin das gegenüber t(14;18)-negativen FL erhöhte BCL2-mRNA-Level, welches für ein t(14;18)-tragendes FL aber dennoch eher im unteren Bereich anzusiedeln ist. Das BCL2-mRNA-Level ist typischerweise während der Prä-B-Zellentwicklung, dem Stadium in welchem die t(14;18)-Translokation auftaucht, erhöht und flacht im Laufe der Reifung ab [75]. Translokationstragende FL haben meist ein deutlich über dem unveränderter Lymphknoten liegendes BCL2-mRNA-Level. Die BCL2-mRNA-Menge korreliert dabei in hohem Maße positiv mit der BCL2-Proteinexpression. Eine erhöhte BCL2-Expression geht also mit einem erhöhten BCL2-mRNA-Level einher. [125-128] In der Sequenzanalyse zeigte sich in Fall 2 die Wildtypsequenz, weshalb eine Pseudonegativität aufgrund einer mutierten Antikörperbindungsstelle ausgeschlossen werden konnte. Warum FL mit unverändertem BCL2-Mutationsstatus und vorhandener t(14;18)-Translokation keine BCL2-Überexpression aufweisen, konnte bisher leider noch nicht ausreichend geklärt werden. Wie bereits oben erwähnt, greifen mögliche Ansätze auf Inaktivierungen oder Verluste des translozierten *BCL2*-Gens im Rahmen der genetischen Evolution zurück. Es ist wohl davon auszugehen, dass die BCL2-Expression auch auf posttranskriptionellem Level reguliert wird und die BCL2-Genmutation Teil der klonalen Evolution ist [94, 128]. Dazu lässt sich nämlich interessanterweise in Fall 12 der pseudonegativen FL die Beobachtung machen, dass sich hier deutlich erkennbare Veränderungen klonaler Evolution

eines follikulären Lymphoms in-situ hin zu einem manifesten Lymphom abspielen. Der Fall entstammte einem Patienten, bei dem ein gleichzeitiges Vorliegen eines FL-in-situ und ein manifestes FL diagnostiziert werden konnte. Beide Läsionen zeigten eine t(14;18)-Translokation und den identischen monoklonalen Peak. Auch eine Sequenzanalyse des BCL2-Bruchpunktes konnte die klonale Identität nur stärken. Im Gegensatz zum FL-in-situ wurden im manifesten FL jedoch noch weitere sekundäre Alterationen entdeckt, wie bspw. die oben erwähnte Mutation im Bereich des Codons 144. Diese Feststellungen führten zu der Annahme, dass FL-in-situ eine sehr frühe Läsion innerhalb der Entwicklung des manifesten FL sind, für deren Transformation jedoch noch weitere genetische Alterationen folgen müssen, was bereits im Jahr 2011 zur Publikation des Falles im Blood-Journal führte [129-131].

5.8 BCL2-positive FL ohne t(14,18)-Translokation

Die Ergebnisse der Studie reichen nicht aus, um eine Erklärung für das Phänomen zu liefern, dass ein gewisser Anteil FL trotz nachweisbarer BCL2-Positivität keine t(14;18)-Translokation aufweist. Deshalb soll an dieser Stelle ein Hinweis auf eventuelle weiterführende Studien bezüglich dieses Themas erfolgen. Mögliche Hypothesen für diese Konstellation wären beispielsweise die noch unbekannte BCL2-Regulierung über weitere Mechanismen, wie z.B. eine andere Translokation des *BCL2*-Gens, das unter die Kontrolle eines Promotors gebracht wird, wie es bei der t(14;18)(q32;q21)-Translokation der Fall ist. In seltenen Fällen kann eine BCL2-Überexpression auch durch t(2;18) oder t(18;22)-Translokationen verursacht sein, was es hier auf jeden Fall auszuschließen gilt [69]. Einer Studie von Pezzella et al. zufolge ist ein Vorhandensein des BCL2-Proteins nicht notwendigerweise an ein Vorliegen der t(14;18)-Translokation gebunden. So konnte seine Studiengruppe nachweisen, dass sich BCL2-Protein zu einem gewissen Grad auch in physiologischen B- und T-Lymphozyten oder zahlreichen anderen neoplastischen Veränderungen ohne t(14;18)-Translokation nachweisen lässt [66, 73], weshalb sich das BCL2-Protein nicht als Marker für t(14;18)-tragende Lymphome eignet, was auch zum bereits oben Genannten passen würde, dass eine BCL2-Produktion auch durch

andere genetische Alterationen hervorgerufen werden kann [104]. Was die BCL2-Proteinexpression in physiologischen lymphatischen Geweben angeht, so folgerte die Arbeitsgruppe um Ngan et al. aus ihren Ergebnissen bezüglich einer möglichen BCL2-Expression ohne Vorhandensein einer t(14;18)-Translokation, dass es in normalem lymphatischem Gewebe keine BCL2-Expression gibt [132]. Pezzella et al. führten dieses Ergebnis auf eine unzureichende Markierungstechnik zurück, wodurch nur Zellen mit hohem BCL2-Proteinlevel detektiert wurden, während Zellen mit niedrigem Level durch Hintergrundrauschen nicht-lymphoider Zellen oder interzellulärer Färbung als BCL2-negativ gewertet wurden [104]. Zu diesem Punkt muss man jedoch sagen, dass BCL2-Level in physiologischen lymphatischen Geweben deutlich niedriger sind als dies in entarteten Geweben der Fall ist und die Fälle aus Gruppe 3 alle eine sehr erhebliche BCL2-Proteinexpression zeigen und deshalb klar als entartet anzusehen sind [133].

5.9 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit den Antikörpern E17/SP66 eine klare Unterscheidung in zwei immunhistochemisch und genetisch verschiedene Subgruppen BCL2-negativer follikulärer Lymphome Grad I/II getroffen werden kann. FL, die sich mit dem BCL2-Antikörper Klon 100/D5 BCL2-negativ darstellen, sollten künftig mit den E17/SP66-Antikörpern nachgefärbt werden, um eine eventuelle Pseudonegativität auszuschließen. Weiterhin lässt sich feststellen, dass die Positivität für E17/SP66 auch in hohem Maße mit dem Vorhandensein der t(14;18)-Translokation korreliert. In Fällen mit E17/SP66-Positivität ist grundsätzlich eine t(14;18)-Translokation zu erwarten. Zudem liefert die Färbung mit E17/SP66 in pseudonegativen Fällen den Hinweis auf Gen-Mutationen im Bereich der Aminosäuren 41-54 in Exon 1 des *BCL2*-Gens. Welche molekularpathologischen Ereignisse jedoch zur Entstehung der BCL2-negativen FL ohne t(14;18)-Translokation führen, bleibt noch zu erforschen [93]. Einen Hinweis auf mögliche ethnische oder ernährungsbedingte Ursachen liefert die Tatsache, dass der Anteil an t(14;18)-

negativen FL unter der asiatischen Bevölkerung deutlich höher ist, als in westlichen Gebieten dieser Erde [69, 111]. Wie wir in unserer Studie ebenfalls feststellen konnten, unterscheidet sich der Großteil der BCL2-negativen FL auch im Phänotyp von BCL2-positiven FL, indem die CD10-Expression herunter-, die CD23-Expression jedoch hochreguliert ist [111]. Was die tatsächlich BCL2-negativen FL angeht, so gibt es noch vieles zu erforschen. Die Arbeitsgruppe um Matolcsy et al. griff bereits 2008 die Frage auf, ob es sich bei den BCL2-negativen FL ohne t(14;18) wirklich um folliculäre Lymphome handelt, oder ob man hier nicht schon bereits von einer bisher nicht beschriebenen Lymphomentität mit eigenen biologischen Charakteristika sprechen sollte [27]. Fraglich ist auch, ob die phänotypischen Unterschiede, bezüglich der Proteinexpression, eine Auswirkung auf die Prognose der Tumorerkrankung und die klinische Manifestation haben, was sich bisher noch nicht ausreichend belegen ließ, auch wenn die Arbeitsgruppe um Weinberg et al. bereits herausfinden konnte, dass der Translokationsstatus eine größere prognostische Aussagekraft habe, als der nodale bzw. extranodale Ursprung des FL [134]. Neue Erkenntnisse über die Pathomechanismen, die zur Entstehung eines malignen Klons in BCL2-negativen Lymphomen führen, könnten unter Umständen bei der Entwicklung weiterführender Therapien genutzt werden. Offen bleibt auch nach wie vor die Frage, weshalb eine gewisse Anzahl folliculärer Lymphome trotz immunhistochemisch nachweisbarer BCL2-Überexpression in der FISH keine Translokation im *BCL2*-Gen zeigt.

Insgesamt betrachtet lässt sich feststellen, dass die Fülle der Fragen angesichts der Komplexität oft nur umso größer wird, je mehr Einblicke man in die Tiefen der menschlichen Materie erhält und am Ende nur zu sagen bleibt:

„Ach, wenn Adams Fall nicht alles verderbt hätte, wie eine schöne, herrliche Kreatur Gottes wäre doch der Mensch, geziert mit allerlei Erkenntniß und Weisheit.“ (Martin Luther, [135])

6. Zusammenfassung

Follikuläre Lymphome zählen mit einer Häufigkeit von über 20 Prozent, nach den diffus großzelligen Lymphomen, zu der zweithäufigsten Entität der Non-Hodgkin-Lymphome. Sie sind typischerweise durch eine t(14;18)(q32;q21)-Translokation charakterisiert, bei der das *BCL2*-Gen von Chromosom 18 mit dem Schwerkettenloкус auf Chromosom 14 fusioniert. Unter dem Einfluss des IgH-Promotors wird das antiapoptotische Protein BCL2 in den Tumorzellen hochreguliert, was mit einer Zellakkumulation einhergeht. Interessanterweise weisen 10-15 % der follikulären Lymphome Grad I/II keine (14;18)-Translokation auf und zeigen sich in der immunhistochemischen BCL2-Färbung mit dem Antikörper Klon 100/D5 als BCL2-negativ. Immunhistochemische Untersuchungen mit den relativ neuen Antikörpern E17 und SP66 verringern allerdings die Inzidenz dieser BCL2-negativen Fälle deutlich, da sich einige der Fälle als pseudonegative follikuläre Lymphome herausstellen. Nach bisherigen Studien könnte dies auf eine Mutation im Bereich der Standardantikörperbindung zurückzuführen sein, die zu einem Aminosäureaustausch und somit zur Strukturveränderung des Proteins führt, so dass der Antikörper an seiner Proteinbindung gehindert wird.[68, 87, 88]

Ausgehend von dieser Hypothese ergaben sich verschiedene Fragestellungen, denen in dieser Studie nachgegangen werden sollte:

- 1) Wie verändert sich die Inzidenz der BCL2-negativen Lymphome Grad I/II, wenn man einen zweiten Antikörper zur Nachtestung verwendet?
- 2) Wie steht es mit dem Translokationsstatus in BCL2-negativen follikulären Lymphomen unter Anwendung einer FISH-Analyse?
- 3) Inwieweit korrelieren t(14;18)-Translokation und BCL2-Expression?
- 4) Von welchem Mutationsstatus von Exon 1 des *BCL2*-Gens in t(14;18) positiven und negativen Fällen kann man ausgehen?

Um auf die tatsächliche Inzidenz der BCL2-negativen t(14;18)-follikulären Lymphome schließen zu können, wurden alle Studienfälle mit drei Antikörpern BCL2 gefärbt und anschließend mittels FISH auf mögliche Translokationen und

deren Korrelation mit der BCL2-Expression hin untersucht. Um die Hypothese einer möglichen Mutation im Bereich der Standardantikörperbindung zu verifizieren, wurde von allen Studienfällen, die sich in der Standardantikörperfärbung als BCL2-negativ, aber E17- und FISH-positiv zeigten, eine Sequenzanalyse des entscheidenden Bereichs im Exon 1 des *BCL2*-Gens durchgeführt.

Von einer Gesamtfallzahl von 187 FL Grad I/II ausgehend, zeigten sich 22 Fälle in der Färbung mit Klon 100/D5 als BCL2-negativ, was einem prozentualen Anteil von 11,76 % entspricht. Mittels der FISH-Analyse konnte anhand gesplitteter Doppelsignale in zwölf der Fälle (55 %) auf eine vorhandene Translokation geschlossen werden. Zehn der Fälle (45 %) zeigten sich t(14;18)-negativ. Die Färbung mit den neuen Antikörpern E17 und SP66 zeigte eine Korrelation mit dem Vorliegen der t(14;18)-Translokation. Fälle, die keine Translokation aufwiesen, zeigten sich immunhistochemisch als E17/SP66 negativ. Von den Fällen mit t(14;18)-Translokation blieb nur einer trotz vorhandener Translokation auch in der Antikörperfärbung negativ. Auf eine Gesamtzahl von 187 FL Grad I/II bezogen, verringerte sich die Inzidenz von ursprünglich 11,76 % auf einen prozentualen Anteil von 5,347 % FL Grad I/II, die sowohl Translokations-negativ als auch in den immunhistochemischen Antikörperfärbungen mit E17/SP66 und BCL2 keine Positivität aufwiesen. Wie hypothetisch bereits angenommen, konnten in neun von zehn analysierbaren t(14;18)-negativen folliculären Lymphomen Mutationen im Epitopbereich der Standardantikörperbindung im *BCL2*-Gen detektiert werden, die nach Strukturvorhersagen zu Proteinstrukturveränderungen führen. Alle analysierbaren Fälle mit nachgewiesener Translokation und E17/SP66-Positivität wiesen im Gegensatz dazu die Wildtypsequenz auf. Aus der Reihe fiel ein E17/SP66-negativer Fall, der entgegen den Erwartungen eine t(14;18)-Translokation aufwies.

Durch die Ergebnisse der Studie konnte dargelegt werden, dass sich die Inzidenz, der in der Standardantikörperfärbung als BCL2-negativ erweisenden Lymphome, deutlich verringert, wenn die Proben mit einem der beiden Antikörper E17 oder SP66 nachgefärbt werden, da in diesen Fällen eine

Mutation im Bereich der Standardantikörperbindung im *BCL2*-Gen eine Interaktion des Antikörpers mit dem BCL2-Protein verhindert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der fehlende Nachweis einer t(14;18)-Translokation auch mit einer fehlenden BCL2-Überexpression einhergeht. Festzuhalten ist, dass die beiden Antikörper E17 und SP66 die BCL2-negativen follikulären Lymphome Grad I/II in zwei, auf immunhistochemischer und genetischer Ebene, klar unterscheidbare Subgruppen unterteilen.

7. Literaturverzeichnis

1. Goethe, J.W.v., Böhlau, H., *Maximen und Reflexionen über Literatur und Ethik, Kunst, Natur und Wissenschaft*. Abt.I, Bd.42² ed 1907. 109-252.
2. Swerdlow, S.H., Campo E, Harris NL, et al., *WHO Classification of Tumors of Haematopoetic and Lymphoid Tissues*, 2008.
3. Bhatt, V., et al., *The Promising Impact of Ibrutinib, a Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor, for the Management of Lymphoid Malignancies*. *Pharmacotherapy*, 2014. **34**(3): p. 303-14.
4. Zeeb, H. and M. Blettner, *[Increasing incidence and mortality of non-Hodgkin lymphomas. An epidemiological review of recent studies on risk factors for non-Hodgkin lymphoma]*. *Med Klin*, 2001. **96**(2): p. 87-100.
5. Holte, H., et al., *[Molecular diagnosis of malignant lymphomas]*. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2009. **129**(22): p. 2352-6.
6. Cesta, M.F., *Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue*. *Toxicol Pathol*, 2006. **34**(5): p. 599-608.
7. Kuper, C.F., *Histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue*. *Toxicol Pathol*, 2006. **34**(5): p. 609-15.
8. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. 2. Auflage ed, ed. G.T.V. Stuttgart 2006. 301-309.
9. P, J.A.T., *Janeway's Immunologie*, ed. S.A. Verlag1997. 597.
10. Navarro, A., et al., *Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: new perspectives and challenges with clinical implications*. *Semin Hematol*, 2011. **48**(3): p. 155-65.
11. Greiner, A., *[Pathogenesis of MALT-type lymphoma]*. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 2002. **86**: p. 145-52.
12. Green, M.R., et al., *Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma*. *Blood*, 2013. **121**(9): p. 1604-11.
13. Morin, R.D., et al., *Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma*. *Nature*, 2011. **476**(7360): p. 298-303.
14. Pasqualucci, L., et al., *Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma*. *Nature*, 2011. **471**(7337): p. 189-95.
15. Freedman, A., *Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management*. *Am J Hematol*, 2014. **89**(4): p. 429-36.
16. Leich, E., G. Ott, and A. Rosenwald, *Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011. **24**(2): p. 95-109.

17. Garcia Munoz, R. and L. Llorente, *Chronic lymphocytic leukemia (CLL): Could tolerance mechanisms be the origin of lymphoid neoplasms?* Immunology, 2014. **20**(10): p. 12285.
18. Hodgkin, P.D., *Concepts for the development of a quantitative theory of clonal selection and class regulation using lessons from the original.* Immunol Cell Biol, 2008. **86**(2): p. 161-5.
19. Murphy K, T.P., Walport M, *Janeway's Immunobiology*, ed. S.A. Verlag 2007: Mahlke K.
20. Wardemann, H., et al., *Predominant autoantibody production by early human B cell precursors.* Science, 2003. **301**(5638): p. 1374-7.
21. Hernandez-Pando, R. and N. Olivares, *[Glycosylation of antibodies and their pathogenic effect.]* Rev Invest Clin, 2013. **65**(6): p. 515-523.
22. Gellert, M., *Recent advances in understanding V(D)J recombination.* Adv Immunol, 1997. **64**: p. 39-64.
23. Fanning, L.J., A.M. Connor, and G.E. Wu, *Development of the immunoglobulin repertoire.* Clin Immunol Immunopathol, 1996. **79**(1): p. 1-14.
24. Han, S., et al., *V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes.* Science, 1997. **278**(5336): p. 301-5.
25. Han, S., et al., *Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells.* Science, 1996. **274**(5295): p. 2094-7.
26. Dietel M, S.N., Zeitz M, Möckel M, *Harrisons Innere Medizin*, 18. Auflage; ABW Wissenschaftsverlag GmbH, © 2012; 2883
27. Gagyí, E., et al., *Somatic hypermutation of IGVH genes and aberrant somatic hypermutation in follicular lymphoma without BCL-2 gene rearrangement and expression.* Haematologica, 2008. **93**(12): p. 1822-8.
28. Li, Z., et al., *The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination.* Genes Dev, 2004. **18**(1): p. 1-11.
29. Teng, G. and F.N. Papavasiliou, *Immunoglobulin somatic hypermutation.* Annu Rev Genet, 2007. **41**: p. 107-20.
30. Abe, M., *[Cellular origin of human B-cell neoplasms and Hodgkin's disease based on analysis of somatic hypermutations in the immunoglobulin variable region genes].* Rinsho Byori, 2001. **49**(8): p. 779-87.
31. Nimmagadda, R.B., et al., *Histopathological pattern of lymphomas and clinical presentation and outcomes of diffuse large B cell lymphoma: A multicenter registry based study from India.* Indian J Med Paediatr Oncol, 2013. **34**(4): p. 299-304.
32. Katzenberger, T., et al., *[Genetic and biological features define two types of follicular non-Hodgkin grade 3 lymphoma].* Verh Dtsch Ges Pathol, 2000. **84**: p. 153-61.

33. Armitage, J.O. and D.D. Weisenburger, *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): p. 2780-95.
34. *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): p. 3909-18.
35. Harris NL, S.S., Jaffe ES, Ott G, Nathwani BN, et al. Follicular lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, et al., *Follicular lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, et al. World Health Organization Classification of Tumours. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.*, 2008.
36. Gribben, J.G., *How I treat indolent lymphoma.* Blood, 2007. **109**(11): p. 4617-26.
37. Klapper, W., *Pathobiology and diagnosis of follicular lymphoma.* Semin Diagn Pathol, 2011. **28**(2): p. 146-60.
38. Katzenberger, T., et al., *A distinctive subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36.* Blood, 2009. **113**(5): p. 1053-61.
39. Huh, J., *Epidemiologic overview of malignant lymphoma.* Korean J Hematol, 2012. **47**(2): p. 92-104.
40. Hitz, F., et al., *Diagnosis and treatment of follicular lymphoma.* Swiss Med Wkly, 2011. **4**(141): p. 13247.
41. Relander, T., et al., *Prognostic factors in follicular lymphoma.* J Clin Oncol, 2010. **28**(17): p. 2902-13.
42. Freedman, A., *Follicular lymphoma: 2011 update on diagnosis and management.* Am J Hematol, 2011. **86**(9): p. 768-75.
43. Hiddemann, W., M. Dreyling, and R.A. Stahel, *Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of newly diagnosed follicular lymphoma.* Ann Oncol, 2005. **16**(1): p. i56-7.
44. Ferreri, A.J., *Risk of CNS dissemination in extranodal lymphomas:* Lancet Oncol. 2014 Apr;15(4):e159-e169. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70568-0.
45. Al-Nawakil, C., et al., *Leukemic phase of follicular lymphomas: an atypical presentation.* Leuk Lymphoma, 2011. **52**(8): p. 1504-8.
46. Solal-Celigny, P., *Follicular Lymphoma International Prognostic Index.* Curr Treat Options Oncol, 2006. **7**(4): p. 270-5.
47. Gaman, A.M., *Follicular non-Hodgkin's lymphoma: correlation between histology, pathophysiology, cytogenetic, prognostic factors, treatment, survival.* Rom J Morphol Embryol, 2013. **54**(1): p. 71-6.

48. Pasqualucci, L., et al., *Genetics of follicular lymphoma transformation*. Cell Rep, 2014. **6**(1): p. 130-40.
49. Matolcsy, A., et al., *Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene*. Blood, 1996. **88**(10): p. 3937-44.
50. Fend, F. and L. Quintanilla-Martinez, *Assessing the prognostic impact of immune cell infiltrates in follicular lymphoma*. Haematologica, 2014. **99**(4): p. 599-602.
51. Younes, S.F., et al., *Immunoarchitectural patterns in follicular lymphoma: efficacy of HGAL and LMO2 in the detection of the interfollicular and diffuse components*. Am J Surg Pathol, 2010. **34**(9): p. 1266-76.
52. Adam, P., et al., *The BCL2 E17 and SP66 antibodies discriminate 2 immunophenotypically and genetically distinct subgroups of conventionally BCL2-"negative" grade 1/2 follicular lymphomas*. Hum Pathol, 2013. **44**(9): p. 1817-26.
53. Tanaka, S., et al., *Frequent incidence of somatic mutations in translocated BCL2 oncogenes of non-Hodgkin's lymphomas*. Blood, 1992. **79**(1): p. 229-37.
54. Hockenbery, D., et al., *Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death*. Nature, 1990. **348**(6299): p. 334-6.
55. Horsman, D.E., et al., *Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma*. Am J Clin Pathol, 1995. **103**(4): p. 472-8.
56. Kridel, R., L.H. Sehn, and R.D. Gascoyne, *Pathogenesis of follicular lymphoma*. J Clin Invest, 2012. **122**(10): p. 3424-31.
57. Yang, J., et al., *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1129-32.
58. Vitolo, U., A.J. Ferreri, and S. Montoto, *Follicular lymphomas*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. **66**(3): p. 248-61.
59. Dyhdalo, K.S., et al., *Immunoarchitectural patterns of germinal center antigens including LMO2 assist in the differential diagnosis of marginal zone lymphoma vs follicular lymphoma*. Am J Clin Pathol, 2013. **140**(2): p. 149-54.
60. Park, J.B. and J.S. Koo, *infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*: World J Gastroenterol. 2014 Mar 21;20(11):2751-2759.
61. Kominato, S., et al., *Characterization of chromosomal aberrations in thymic MALT lymphoma*. Pathol Int, 2012. **62**(2): p. 93-8.
62. Wilson, W.H., et al., *Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas*. Blood, 1997. **89**(2): p. 601-9.

63. Wilder, R.B., et al., *Long-term results with radiotherapy for Stage I-II follicular lymphomas*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **51**(5): p. 1219-27.
64. Mac Manus, M.P. and R.T. Hoppe, *Is radiotherapy curative for stage I and II low-grade follicular lymphoma? Results of a long-term follow-up study of patients treated at Stanford University*. J Clin Oncol, 1996. **14**(4): p. 1282-90.
65. Nastoupil, L.J., et al., *The use and effectiveness of rituximab maintenance in patients with follicular lymphoma diagnosed between 2004 and 2007 in the United States*. Cancer, 2014. **25**(10): p. 28659.
66. Hanada, M., et al., *Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 11962-9.
67. Zutter, M., et al., *Immunolocalization of the Bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms*. Blood, 1991. **78**(4): p. 1062-8.
68. Masir, N., et al., *BCL2 protein expression in follicular lymphomas with t(14;18) chromosomal translocations*. Br J Haematol, 2009. **144**(5): p. 716-25.
69. Hoeller, S., et al., *Molecular and immunohistochemical characterization of B-cell lymphoma-2-negative follicular lymphomas*. Hum Pathol, 2012. **43**(3): p. 405-12.
70. Olsson Akefeldt, S., et al., *Targeting BCL2 family in human myeloid dendritic cells: a challenge to cure diseases with chronic inflammations associated with bone loss*. Clin Dev Immunol, 2013. **701305**(10): p. 22.
71. Reed, J.C. and S. Tanaka, *Somatic point mutations in the translocated bcl-2 genes of non-Hodgkin's lymphomas and lymphocytic leukemias: implications for mechanisms of tumor progression*. Leuk Lymphoma, 1993. **10**(3): p. 157-63.
72. Reed, J.C., *Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3322-30.
73. Petros, A.M., et al., *Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3012-7.
74. Vaandrager, J.W., et al., *Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **27**(1): p. 85-94.
75. Graninger, W.B., et al., *Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells*. J Clin Invest, 1987. **80**(5): p. 1512-5.
76. Bakhshi, A., et al., *Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(8): p. 2396-400.

77. Cleary, M.L. and J. Sklar, *Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(21): p. 7439-43.
78. Weinberg, O.K., et al., *"Minor" BCL2 breakpoints in follicular lymphoma: frequency and correlation with grade and disease presentation in 236 cases*. J Mol Diagn, 2007. **9**(4): p. 530-7.
79. Lopez-Guillermo, A., et al., *Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma*. Blood, 1999. **93**(9): p. 3081-7.
80. Natkunam, Y., et al., *The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1636-42.
81. Natkunam, Y., et al., *Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein, a new marker of germinal center B-cell derivation*. Blood, 2005. **105**(10): p. 3979-86.
82. Natkunam, Y., et al., *Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein identifies a subset of classic Hodgkin lymphoma of germinal center derivation and improved survival*. Blood, 2007. **109**(1): p. 298-305.
83. Higgins, R.A., J.E. Blankenship, and M.C. Kinney, *Application of immunohistochemistry in the diagnosis of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma*. Arch Pathol Lab Med, 2008. **132**(3): p. 441-61.
84. Seto, M., K. Honma, and M. Nakagawa, *Diversity of genome profiles in malignant lymphoma*. Cancer Sci, 2010. **101**(3): p. 573-8.
85. Hoglund, M., et al., *Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **39**(3): p. 195-204.
86. Roulland, S., et al., *Early steps of follicular lymphoma pathogenesis*. Adv Immunol, 2011. **111**: p. 1-46.
87. Masir, N., et al., *Pseudonegative BCL2 protein expression in a t(14;18) translocation positive lymphoma cell line: a need for an alternative BCL2 antibody*. Pathology, 2010. **42**(3): p. 212-6.
88. Schraders, M., et al., *Lack of Bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the BCL2 gene or by absence of the t(14;18) translocation*. J Pathol, 2005. **205**(3): p. 329-35.
89. Guo, Y., et al., *Bcl2-negative follicular lymphomas frequently have Bcl6 translocation and/or Bcl6 or p53 expression*. Pathol Int, 2007. **57**(3): p. 148-52.

90. Belaud-Rotureau, M.A., et al., *Interphase fluorescence in situ hybridization is more sensitive than BIOMED-2 polymerase chain reaction protocol in detecting IGH-BCL2 rearrangement in both fixed and frozen lymph node with follicular lymphoma*. Hum Pathol, 2007. **38**(2): p. 365-72.
91. Horsman, D.E., et al., *Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes*. Br J Haematol, 2003. **120**(3): p. 424-33.
92. Karube, K., et al., *CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features*. Blood, 2007. **109**(7): p. 3076-9.
93. Leich, E., et al., *Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations*. Blood, 2009. **114**(4): p. 826-34.
94. Leich, E., et al., *MicroRNA profiles of t(14;18)-negative follicular lymphoma support a late germinal center B-cell phenotype*. Blood, 2011. **118**(20): p. 5550-8.
95. Organization, W.H., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues 2008*.
96. Katzenberger, T., et al., *Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component*. Am J Pathol, 2004. **165**(2): p. 481-90.
97. Ott, G., et al., *Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3806-12.
98. Jardin, F., et al., *Follicular lymphoma without t(14;18) and with BCL6 rearrangement: a lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics*. Leukemia, 2002. **16**(11): p. 2309-17.
99. Quintanilla-Martinez, L., et al., *NPM-ALK-dependent expression of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma*. Blood, 2006. **108**(6): p. 2029-36.
100. Teixeira, M.R. and S. Heim, *Cytogenetic analysis of tumor clonality*. Adv Cancer Res, 2011. **112**: p. 127-49.
101. Trainor, K.J., et al., *Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction*. Blood, 1991. **78**(1): p. 192-6.
102. Berget, E., et al., *Detection of clonality in follicular lymphoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples and BIOMED-2 immunoglobulin primers*. J Clin Pathol, 2011. **64**(1): p. 37-41.
103. Bende, R.J., L.A. Smit, and C.J. van Noesel, *Molecular pathways in follicular lymphoma*. Leukemia, 2007. **21**(1): p. 18-29.

104. Pezzella, F., et al., *Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation*. Am J Pathol, 1990. **137**(2): p. 225-32.
105. Espinet, B., 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): p. 737-42.
106. Grigore, R., S.V. Bertesteanu, and C.A. Mogoanta, *Immunologic and cytogenetic markers expressed in non-Hodgkin lymphoma of head and neck*. Rom J Morphol Embryol, 2012. **53**(1): p. 99-104.
107. Baro, C., et al., *Cryptic IGH/BCL2 rearrangements with variant FISH patterns in follicular lymphoma*. Leuk Res, 2011. **35**(2): p. 256-9.
108. Federico, M., et al., *Prognosis of follicular lymphoma: a predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases*. Intergruppo Italiano Linfomi. Blood, 2000. **95**(3): p. 783-9.
109. Gollub, W., et al., *BCL6-translocations affect the phenotype of follicular lymphomas only in the absence of t(14;18)IgH/BCL2*. Anticancer Res, 2009. **29**(11): p. 4649-55.
110. Marafioti, T., et al., *Another look at follicular lymphoma: immunophenotypic and molecular analyses identify distinct follicular lymphoma subgroups*. Histopathology, 2013. **62**(6): p. 860-75.
111. Pan, Y., et al., *Frequencies of BCL2 and BCL6 translocations in representative Chinese follicular lymphoma patients: morphologic, immunohistochemical, and FISH analyses*. Diagn Mol Pathol, 2012. **21**(4): p. 234-40.
112. Pittaluga, S., et al., *Mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 55 cases*. Histopathology, 1995. **26**(1): p. 17-24.
113. Iova, A., et al., *Difficulty in classifying a B cell chronic lymphoproliferative disorder CD5+*. Rom J Intern Med, 2012. **50**(4): p. 309-12.
114. Bonnefoy, J.Y., et al., *Structure and functions of CD23*. Int Rev Immunol, 1997. **16**(1-2): p. 113-28.
115. Punnonen, J., et al., *Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3730-4.
116. Yu, P., et al., *Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23*. Nature, 1994. **369**(6483): p. 753-6.
117. Zhang, W., et al., *[Analysis of clinical features and prognostic factors in 59 cases of follicular lymphoma]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2013. **21**(6): p. 1448-53.
118. Nabhan, C., et al., *The impact of race, age, and sex in Follicular Lymphoma: A comprehensive SEER analysis across consecutive treatment eras*. Am J Hematol, 2014. **14**(10): p. 23708.

119. Thorns, C., et al., *Significant high expression of CD23 in follicular lymphoma of the inguinal region*. *Histopathology*, 2007. **50**(6): p. 716-9.
120. Ferrer, R., *Lymphadenopathy: differential diagnosis and evaluation*. *Am Fam Physician*, 1998. **58**(6): p. 1313-20.
121. Lohr, J.G., et al., *Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(10): p. 3879-84.
122. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. *Science*, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
123. Razavi, S.M., et al., *A comparative immunohistochemical study of Ki-67 and Bcl-2 expression in solid ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor*. *Dent Res J*, 2012. **9**(2): p. 192-7.
124. Louissaint, A., Jr., et al., *Pediatric-type nodal follicular lymphoma: an indolent clonal proliferation in children and adults with high proliferation index and no BCL2 rearrangement*. *Blood*, 2012. **120**(12): p. 2395-404.
125. Akagi, T., E. Kondo, and T. Yoshino, *Expression of Bcl-2 protein and Bcl-2 mRNA in normal and neoplastic lymphoid tissues*. *Leuk Lymphoma*, 1994. **13**(1-2): p. 81-7.
126. Chleq-Deschamps, C.M., et al., *Topographical dissociation of BCL-2 messenger RNA and protein expression in human lymphoid tissues*. *Blood*, 1993. **81**(2): p. 293-8.
127. Kondo, E., et al., *Detection of bcl-2 protein and bcl-2 messenger RNA in normal and neoplastic lymphoid tissues by immunohistochemistry and in situ hybridization*. *Blood*, 1992. **80**(8): p. 2044-51.
128. Shen, Y., et al., *BCL2 protein expression parallels its mRNA level in normal and malignant B cells*. *Blood*, 2004. **104**(9): p. 2936-9.
129. Bonzheim, I., et al., *A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma*.
130. Henopp, T., et al., *Prevalence of follicular lymphoma in situ in consecutively analysed reactive lymph nodes*. *Histopathology*, 2011. **59**(1): p. 139-42.
131. Jegalian, A.G., et al., *Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma*. *Blood*, 2011. **118**(11): p. 2976-84.
132. Ngan, B.Y., et al., *Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation*. *N Engl J Med*, 1988. **318**(25): p. 1638-44.
133. Chen-Levy, Z., J. Nourse, and M.L. Cleary, *The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation*. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(2): p. 701-10.

134. Weinberg, O.K., et al., *Low stage follicular lymphoma: biologic and clinical characterization according to nodal or extranodal primary origin*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(4): p. 591-8.
135. Martin Luther, J.G.H., *Die Weisheit des Martin Luther's. Aequae pauperibus-locupietibus aequae.*, Lechner, Editor 1816. p. 130.

8. Tabellenverzeichnis und Tabellenanhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Nummerierung	Kurztitel	Seite
Tabelle 1	Stadieneinteilung der Lymphome nach Ann-Arbor	11
Tabelle 2	Histologische Gradeinteilung der folliculären Lymphome	12
Tabelle 3	Auflistung der verwendeten Reagenzien	27-36
Tabelle 4	Auflistung der verwendeten Geräte und Systeme	37-38
Tabelle 5	Reagenzien für die Qualitäts-PCR.	45
Tabelle 6	Einstellung der Cyclercyclen für die Qualitäts-PCR	46
Tabelle 7	Reagenzien für die BCL2-PCR.	47
Tabelle 8	RT-qPCR	53
Tabelle 9	PCR-Zusammensetzung für die Klonalitätsanalyse.	55
Tabelle 10	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Gruppe 1-Fälle.	59
Tabelle 11	Lokalisation der Lymphknotenregion der Gruppe 1-Fälle	62
Tabelle 12	Stadieneinteilung der BCL2-neg. FL mit t(14;18) nach Ann-Arbor	63
Tabelle 13	Ergebnisse der Sequenzanalyse	64
Tabelle 14	Ergebnisse der Sequenzanalyse der Kontrollfälle.	66
Tabelle 15	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung und der FISH der Gruppe 2-Fälle	67
Tabelle 16	Lokalisation der Lymphknotenregion der Gruppe 2-FL	71
Tabelle 17	Stadieneinteilung der BCL2-neg. FL ohne t(14;18) nach Ann-Arbor	72

Tabelle 18	Ergebnisse der Sequenzanalyse der t(14;18)-neg. FL.	72
Tabelle 19	Ergebnis der Klonalitätsanalyse der BCL2-negativen FL ohne t(14;18).	73
Tabelle 20	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung und der FISH der BCL2-positiven FL ohne t(14;18)	77

8.2 Tabellenanhang

8.2.1 Übersichtstabelle der Fälle mit t(14;18)-Translokation

Fall	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Ann- Arborstadium bei ED	Mutierte Aminosäure	BCL2 E17/SP66	Mib1 (%)
1	m	63	tonsillär	II	p.I48M p.P53T p.A76T	+	5
2	m	48	-	II	WT	-	80
3	m	64	axillär	IIIa	p.G47D p.I48M	+	20
4	w	39	zervikal	IIIb	p.F49S	+	30
5	m	55	mesenterial	IIb	-	+	20
6	m	58	zervikal	I/II	p.G47A	+	5
7	w	68	zervikal	IIIa	p.Q52H	+	40
8	m	51	inguinal	IIIa	p.P46A	+	15
9	m	65	zervikal	IIIa	p.P46S p.T69T	+	30
10	m	67	retroperitoneal	IIIa	-	+	5
11	m	68	inguinal	II	P.I48M p.P53T p.A76T	+	20
12	m	76	supraklavikulär	I/II	p.I48M	+	20

8.2.2 Übersichtstabelle der Fälle ohne t(14;18)-Translokation

Fall	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Ann-Arborstadium bei ED	Mutierte Aminosäure	BCL2 E17/SP66	Mib1(%)
13	w	60	axillär	IIIa	-	-	15
14	w	63	axillär	I/II	WT	-	15
15	w	72	axillär	IIIa	-	-	10
16	w	59	zervikal	I/II	WT	-	10
17	w	83	-	I/II	WT	-	10
18	m	48	submandibulär	I	WT	-	25
19	w	70	axillär	IIIa	-	-	80
20	w	72	axillär	IIIa	-	-	70
21	m	72	zervikal	II	WT	-	30
22	m	70	axillär	I/II	WT	-	30

9. Abbildungsverzeichnis

Nummerierung	Kurztitel	Seite
Abbildung 1	Darstellung des IgH-Rearrangements von der Keimbahn-DNA bis zur Schwereketten des IgH-Rezeptors	5
Abbildung 2	Reifungsschritte der B-Zellen im Knochenmark bis zur Ausschwemmung ins Blut mit entsprechendem Immunglobulinketten-Rearrangement	6
Abbildung 3	Histologischer Schnitt zur Darstellung der Imitation von Keimzentren durch das folliculäre Lymphom	13
Abbildung 4	Schematische Darstellung der t(14;18)-Translokation.	14
Abbildung 5	Schematische Darstellung der Lokalisation der homologen Domänen und ihrer jeweiligen Funktion auf dem <i>BCL2</i> -Gen.	17
Abbildung 6	Dreidimensionale Molekülstruktur des BCL2-Proteins mit den entsprechenden BH-Domänen.	18
Abbildung 7	Schematische Darstellung der Bindungsstellen der beiden Antikörper BCL2 100/D5 und BCL2-E17 des <i>BCL2</i> -Gens	20
Abbildung 8	Darstellung der einzelnen Schritte bei der Aufreinigung mit Agencourt®AMPure®.	49
Abbildung 9	Darstellung der einzelnen Schritte bei der Aufreinigung mit Agencourt®Clean-Seq®.	51
Abbildung 10	Schematische Darstellung der Selektion der Studienfälle und der Gruppenzuordnung als Flussdiagramm	56
Abbildung 11	Exemplarisches Beispiel eines Lymphknotens mit Aufhebung der physiologischen Mantelzone durch ein folliculär wachsendes lymphoides Infiltrat.	57
Abbildung 12	Exemplarisches Beispiel eines FL mit kräftiger CD10-Expression.	57

Abbildung 13	Exemplarisches Beispiel eines Falles mit Positivität für das BCL6-Protein.	58
Abbildung 14	In der immunhistochemischen Färbung zeigen sich die Tumorzellen CD23-negativ.	58
Abbildung 15	In der Färbung mit Mib1 zeigt der vorliegende Fall eine sehr geringe Proliferationsrate von 5 %.	58
Abbildung 16	Die immunhistochemische Färbung mit dem BCL2-Standardantikörper zeigt ein negatives Ergebnis.	59
Abbildung 17	Die immunhistochemische Färbung mit dem alternativen E17-AK ergibt ein positives Ergebnis der BCL2-Proteinexpression.	60
Abbildung 18	Geschlechterverteilung des Kollektivs aus Gruppe 1	60
Abbildung 19	Altersverteilung der Studienfälle aus Gruppe 1	61
Abbildung 20	Beispielsequenzanalyse zur Demonstration der drei am häufigsten detektierten Mutationen im Bereich der Aminosäuren 48, 53 und 76	65
Abbildung 21	Dargestellt ist die dreidimensionale Struktur des BCL2-Proteins mit den am häufigsten detektierten Mutationen.	65
Abbildung 22	In der immunhistochemischen Färbung mit dem Standardantikörper BCL2-Klon 100/D5 zeigen die Tumorzellen keine Positivität für das BCL2-Protein.	67
Abbildung 23	Die Tumorzellen exprimieren deutlich BCL6.	68
Abbildung 24	Interessanterweise zeigen 30 % der Fälle aus Gruppe 2 keine CD10-Expression	68
Abbildung 25	Exemplarisches Beispiel eines Falles mit deutlicher CD23-Expression.	68
Abbildung 26	Die Tumorzellen zeigen eine Proliferationsrate von 30 % in der immunhistochemischen Färbung mit Mib1.	69
Abbildung 27	Bei fehlender BCL2-Proteinexpression mit immunhistochemischer Färbung mit dem alternativen E17-Antikörper zeigen sich in der FISH-Analyse keine gesplitteten Doppelsignale.	69

Abbildung 28	Graphische Darstellung der Geschlechterverteilung der BCL2-neg. FL Grad I/II ohne t(14;18).	70
Abbildung 29	Graphische Darstellung der Altersverteilung der Studienfälle aus Gruppe 2.	70
Abbildung 30	Exemplarische Darstellung einer Klonalitätsanalyse.	74
Abbildung 31	Exemplarische Darstellung einer Klonalitätsanalyse.	75
Abbildung 32	Graphische Darstellung des prozentualen BCL2-mRNA-Anteils der BCL2 negativen FL ohne t(14;18)-Translokation	76

10. Veröffentlichungen

Bestimmte Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Adam P, Baumann R, Schmidt J, Bettio S, Weisel K, Bonzheim I, Fend F, Quintanilla-Martínez L.

The BCL2 E17 and SP66 antibodies discriminate 2 immunophenotypically and genetically distinct subgroups of conventionally BCL2-„negative“ grade 1/2 follicular lymphomas

Hum Pathol.2013 Sep;44 (9):1817-26. doi: 10.1016/j.humpath.2013.02.004. Epub 2013 May.

11. Erklärung zum Eigenanteil

Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Erklärung über den Eigenanteil an den veröffentlichten wissenschaftlichen Schriften, die im Zusammenhang mit der Dissertationsschrift stehen, gemäß § 6 Abs. 2 Satz 7 der Promotionsordnung

- 1 Name:** Schäbs, Ajoua Rosalie; geb. Baumann
- Institut:** Institut für Pathologie Tübingen
- Studienfach:** Humanmedizin
- Thema:** BCL2-negative folliculäre Lymphome

2 Eingereichte Schrift:

- 1. Titel:** The BCL2 E17 and SP66 antibodies discriminate 2 immunphenotypically and genetically distinct subgroups of conventionally BCL2-“negative” grade I/II follicular lymphomas.
- 2. Autoren:** Patrick Adam, Rosalie Baumann, Janine Schmidt, Sabrina Bettio, Katja Weisel, Irina Bonzheim, Falko Fend, Leticia Quintanilla- Martínez.
- 3. Veröffentlichung:** Hum Pathol 2013 Sep;44(9):1817-26.
doi:10.1016/j.humpath.2013.02.004. Epub 2013 May 2.

3 Darlegung des eigenen Anteils an dieser Schrift:

Die oben genannte Publikationsschrift ist ein Gemeinschaftswerk, an dem verschiedene Menschen ihren Teil dazu beigetragen haben. Mein Anteil an der Entstehung der Publikationsschrift ertrug sich hauptsächlich auf die Zusammenstellung der Fälle, dem Zusammentragen der klinischen Daten, der überwiegenden Durchführung der experimentellen Laborarbeiten zur Datenerhebung, sowie auf die Beteiligung an der Ergebnisdiskussion.

Frau Prof. Dr. med. Quintanilla de Fend hatte die Gesamtleitung des Projektes inne. Ihr oblag die Hauptverantwortung und Prüfung. Zusammen mit Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend übernahm sie die Konzeption der Studie, evaluierte die Resultate und schrieb das Paper.

Herr Prof. Dr. med. Falko Fend war an der Konzeption der Studie beteiligt und evaluierte die Resultate.

Herr Dr. med. Patrick Adam war mitbeteiligt an der Verfassung des Papers und evaluierte die Resultate.

Frau Dr. rer. nat. Irina Bonzheim stellte die Abbildungen zur Verfügung, interpretierte die molekularen Daten, designte und bearbeitete Teile der experimentellen Arbeiten und evaluierte die Resultate.

Frau Janine Schmidt führte Teile der experimentellen Arbeiten durch.

Frau Sabrina Bettio übernahm Teile der Fallzusammenstellung.

Die Autoren geben keinen Interessenskonflikt an.

12. Erklärung

Ajoua Rosalie Schäbs; geb. Baumann

geb.am 14.11.1988

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation „Follikuläre Lymphome Grad I/II, die sich immunhistochemisch als „BCL2-negativ“ darstellen, beinhalten zwei immunphänotypisch und genetisch unterschiedliche Subgruppen“

Sehr geehrte Damen und Herren!

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst habe und keine weiteren, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Wörtliche oder inhaltliche Stellen, die anderen Quellen entstammen, wurden als solche gekennzeichnet.

Die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wurden gemäß der Promotionsordnung der Eberhard-Karls-Universität Tübingen uneingeschränkt eingehalten.

Ich versichere, dass Dritte keinerlei Geldwerte von mir bekommen haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde in keinem anderen, weder im Inland noch im Ausland, als diesem Promotionsverfahren eingereicht.

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Von Herzen möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie in Tübingen bedanken, die mich über den Promotionszeitraum hinweg so gut betreut haben. Danke für alle Geduld und für alles Erklären!

Ganz besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend und Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla de Fend für die gute Konzeption, Leitung der Studie und die Hilfe bei der Evaluierung der Ergebnisse und Herrn Dr. med. Patrick Adam für die Hilfe beim Zusammentragen der klinische Daten.

Ein herzliches Dankeschön gebührt Frau Dr. rer. nat. Irina Bonzheim, die mich mit Ihrer zuverlässigen Betreuung unterstützt, sich außerordentlich gut um mich gekümmert hat und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat! Vielen Dank!

Frau Sabine Schäfer, Frau Dipl. Biol. Barbara Mankel, Frau Janine Schmidt und Frau Sema Colak möchte ich für ihre treue Hilfe bei den experimentellen Arbeiten im Labor danken.

Außerdem gilt mein riesengroßer Dank meiner Familie, meinen Großeltern Herrn und Frau Rolf und Gertrud Baumann, meiner Mama Britt Baumann und ganz besonders meinem wunderbaren Verlobten Dominik Schaebs, der mich immer wieder so lieb ermutigt und mir beigestanden hat.

Danken möchte ich auch all meinen Freunden, die mich während der Zeit umsorgt und begleitet haben.

Vor allem möchte ich aber meinem treuen Heiland und Herrn Jesus Christus danken, der mir seine Hilfe bis zum heutigen Tag erwiesen hat!

14. Lebenslauf

Stammdaten	
Name	Ajoua Rosalie Schäbs; geb. Baumann
Geburtsdatum	14.11.1988
Geburtsort	VS-Villingen
Familienstand	verheiratet
Nationalität	deutsch
Schulbildung	
1995-1999	Grundschule Aldingen
1999-2008	Gymnasium Trossingen
2008	Abitur
Studium	
WS 2008/2009	Studienbeginn an der Eberhard Karls Universität Tübingen
15.09.2010	„Physikum“ / 1. Ärztliche Prüfung
April 2011	Promotionsbeginn am Pathologischen Institut Tübingen zum Thema „Follikuläre Lymphome Grad I/II, die sich immunhistochemisch als „BCL2- negativ“ darstellen, beinhalten zwei immunphänotypisch und genetisch unterschiedliche Subgruppen“
August 2013	PJ-Beginn am Klinikum Sigmaringen
12.11.2014	„Hammerexamen“ / 2.+3.Ärztliche Prüfung
14.11.2014	Erhalt der Approbation
Famulaturen	
21.02.11-14.03.11	Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin am Schwarzwald-Baar-Klinikum-Schwenningen
20.02.12-12.03.12	Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie am Klinikum Tuttlingen
14.03.12-03.04.12	Gynäkologische Abteilung am Klinikum Tuttlingen
20.08.12-18.09.12	Kardiologische Abteilung am Schwarzwald-Baar-Klinikum-Villingen
20.02.13-22.03.13	Allgemeinmedizin und Diabetologische Beratung in einer Gemeinschaftspraxis in Herrenberg
Profession	
07.01.2015	Beginn einer Assistenzarztstelle in der Medizinischen Klinik Sigmaringen