

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Pathologie und Neuropathologie

Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und
Pathologische Anatomie

**Analyse der im folliculären Lymphom (FL) häufig mutierten
Gene im t(14;18) negativen FL mittels Next Generation
Sequencing**

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

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

vorgelegt von

Mattern, Sven Thomas

2020

Dekan (komm.): Professor Dr. D. Wallwiener
1. Berichterstatter: Professorin Dr. L. Quintanilla Martinez de Fend
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

Tag der Disputation: 30.04.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungen.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Das folliculäre Lymphom	1
1.1.1 Klinisches Bild	1
1.1.2 Diagnostik	2
1.1.3 Prognose	12
1.1.4 Therapie.....	13
1.2 Stellenwert und Techniken der molekularen Diagnostik	14
1.2.1 Sequenzierung nach Sanger	15
1.2.2 Next Generation Sequencing.....	16
1.3 Ziel der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Auswahl der Fälle.....	21
2.1.2 Geräte	21
2.1.3 Kits	23
2.1.4 Primer	24
2.1.5 Enzyme.....	27
2.1.6 Reagenzien	28
2.1.7 Chemikalien	28
2.1.8 Puffer.....	29
2.1.9 EDV.....	29
2.1.10 Websites	29
2.1.11 Hersteller	30
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 DNA Extraktion	31
2.2.2 Gelelektrophorese in 2%igem Agarosegel.....	34
2.2.3 Qubit Fluorometrie.....	36
2.2.4 Next Generation Sequencing.....	36
2.2.5 Überprüfung der Varianten bezüglich des vorhergesagten malignen Potentials ...	43
2.2.6 Validierung der Ergebnisse mittels Sequenzierung nach Sanger.....	43
2.3 Statistische Analyse	49
3 Ergebnisse.....	50
3.1 Patientenkollektiv	50
3.2 Amplifizierbarkeit der DNA.....	51
3.3 Ergebnisse der NGS-Analyse.....	52
3.4 Überprüfung der detektierten Mutationen hinsichtlich ihres potenziell malignen Potentials.....	54
3.5 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung	55
3.6 Spektrum der Detektierten und validierten Mutationen	57
4 Diskussion.....	61
4.1 Patientenbezogene Ergebnisse.....	61
4.2 Vergleich der Ergebnisse von NGS und Sanger-Sequenzierung.....	61

4.2.1	Mögliche Fehlerquellen beim NGS.....	61
4.2.2	Vergleich NGS und Sanger-Sequenzierung.....	62
4.3	Untersuchte Gene und ihre Funktion	63
4.3.1	CREBBP und EP300.....	63
4.3.2	KMT2D (MLL2).....	66
4.3.3	TNFRSF14	67
4.3.4	EZH2	68
4.3.5	FOXO1	69
4.3.6	Histon Cluster Gene: HIST1H1B, 1C, 1D und 1E.....	70
4.3.7	GNA13	71
4.3.8	MEF2B.....	72
4.4	Unterschiede der untersuchten t(14;18)-negativen FL und der allgemeinen Studienlage.....	73
4.5	Mögliche klinische Implikationen	74
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	75
5	Zusammenfassung	78
6	Literaturverzeichnis	79
7	Erklärung zum Eigenanteil.....	91
	Danksagung.....	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassisches folliculäres Wachstumsmuster des FL (HE, 50x Vergrößerung).....	4
Abbildung 2: Immunhistochemisches Profil des klassischen FL.....	5
Abbildung 3: Die Translokation t(14;18)(q32;21) (nach Godon et al., 2003[47]).....	7
Abbildung 4: Exemplarische Darstellung unterschiedlicher Wachstumsmuster der folliculären Lymphome (HE) (aus Siddiqi et al., 2016 [73]).	10
Abbildung 5: Darstellung der beschriebenen Mutationen in STAT6 (aus Zamo et al., 2018 [87])	11
Abbildung 6: Struktur einer Reaktionskammer auf einem Halbleiter-Chip. Darstellung der freiwerdenden Wasserstoff-Ionen während der Synthese (aus Mardis, 2013)[109].	18
Abbildung 7: Schematische Darstellung der vorbereiteten Templates mit an die Microbeads ligierten Zielsequenzen.	18
Abbildung 8: Analyse mittels Nanodrop.....	33
Abbildung 9: Gelelektrophorese zur Ermittlung der Produktlängen nach PCR zur Testung der Amplifizierbarkeit der DNA-Proben.....	51
Abbildung 10: Graphische Darstellung mittels IGV.....	52
Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung anhand FL1 bei <i>TNFRSF14</i> (c.71T>A, p.V24E).	55
Abbildung 12: Aufstellung der mittels Sanger-Sequenzierung bestätigten Varianten.....	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grading der Follikulären Lymphome anhand der Zentroblastenzahl pro HPF[4]	3
Tabelle 2: Klassifikation der Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome nach Ann-Arbor (aus Onkopedia Leitlinie [11]).....	12
Tabelle 3: Risikogruppen (nach Nooka et al., 2013[90]).....	13
Tabelle 4: Ansatz für die PCR zur Testung der Amplifizierbarkeit.....	34
Tabelle 5: Thermocyclereinstellungen für die PCR zur Testung der Amplifizierbarkeit.....	34
Tabelle 6: Aufstellung der mittels NGS untersuchten Exons bzw. Hot-Spot-Regionen	37
Tabelle 7: Ansatz für die PCR für die Quantifizierung der extrahierten DNA	38
Tabelle 8: Lightcyclereinstellungen für die Quantifizierung der extrahierten DNA	38
Tabelle 9: Ansatz für die PCR zur Amplifizierung der genomischen DNA-Zielsequenzen.....	39
Tabelle 10: Thermocyclereinstellungen zur Amplifikation der genomischen DNA-Zielsequenzen.....	39
Tabelle 11: Thermocyclereinstellungen für den partiellen Verdau der Primer-Sequenzen	40
Tabelle 12: Thermocyclereinstellungen für die Ligation der Adapter-Sequenzen	40
Tabelle 13: Thermocyclereinstellungen für die Quantifizierung der Library	42
Tabelle 14: Ansatz für die Primertest-PCR.....	45
Tabelle 15: Thermocyclereinstellungen für die Primertest-PCR	45
Tabelle 16: Änderung der PCR-Zusammensetzung und der Thermocycler-Konditionen gegenüber dem in Tabelle 14 und Tabelle 15 festgelegten Standard.....	46
Tabelle 17: Ansatz für die PCR der Cyler Sequencing Reaktion.....	48
Tabelle 18: Thermocyclereinstellungen für die Cyler Sequencing Reaktion.....	48
Tabelle 19: Darstellung des Patientenkollektivs bezüglich Geschlecht, Alter, Lokalisation der Probenentnahme und Art der Diagnose (Initialdiagnose oder Rezidiv).....	50
Tabelle 20: Zusammenfassende Darstellung der NGS Ergebnisse	53
Tabelle 21: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse nach Validierung mittels Sanger-Sequenzierung	56

Abkürzungen

Bezeichnung	Bedeutung
AF4	ALL1-fused gene from chromosome 4
APC	Adenomatous-polyposis-coli
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCL6	B-cell lymphoma 6
bp	Basenpaare
BRCA1/2	BReast CAncer 1 bzw. 2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CREB	cAMP response element-binding protein
CREBBP	CREB-Bindeprotein
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Desoxyadenosintriphosphat, -cytidintriphosphat, - guanosintriphosphat, -thymidintriphosphat
ddH ₂ O	Double distilled H ₂ O
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyadenosintriphosphat
dsDNA	Double-stranded deoxyribonucleic acid
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EP300	E1A (Adenovirus early region 1A) – associated pro- tein p300
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin Embedded
FL	Follikuläres Lymphom
FOXO1	Forkhead box protein O1
GNA13	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13

HAT	Histone acetyltransferase
IGH	Immunoglobulin heavy chain
IGV	Integrative Genomics Viewer
ISP	Ion sphere particle
JÜR	Jahresüberlebens Rate
KAT3	Lysin (K) Acetyltransferase 3
LDH	Lactatdehydrogenase
MEF2B	Myocyte enhancer factor 2B
MHC	Major histocompatibility complex
MML2/KMT2D	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2/ Histone-lysine N-methyltransferase 2D
MYC	MYeloCytomatosis
NGS	Next Generation Sequencing
NHL(s)	Non Hodgkin Lymphom(e)
NRID	Nuclear-receptor interaction domain
NRID	Nuclear-receptor interaction domain
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFS	Progression-free survival
PLZF	Promyelocytic leukaemia zinc finger protein
RAG1	Recombination activating gene 1
RNA	Ribonucleic acid
RRAGC	Ras-related GTP binding C
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SNP	Single-nucleotide polymorphism
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
TAZ	Transcription Adaptor putative Zinc finger
TBXAS1	Thromboxane A synthase 1
TMAP	Torrent Mapping Alignment Program
TNFRSF14	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14
TP53	Tumor protein p53
UV	Ultraviolett

WHO

World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Das folliculäre Lymphom

Das folliculäre Lymphom macht mit etwa 20-40% nach dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom den größten Teil aller non-Hodgkin Lymphome aus und ist damit das häufigste der indolenten Lymphome [1]. Es handelt sich primär um eine Erkrankung des höheren Lebensalter, deren mittleres Erkrankungsalter um das 60. Lebensjahr liegt [1]. Die Inzidenz in westlichen Ländern ist mit 3,18/100000 im Vergleich zum z.B. asiatischen Kontinent deutlich erhöht [2, 3]. Das Verhältnis von Männern zu Frauen zeigt sich bei 1:1,7 [4]. Charakterisiert wird das FL durch die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$, welche in bis zu 90% der Fälle detektiert werden kann und zur Überexpression des anti-apoptotischen BCL2 führt [4-6].

1.1.1 Klinisches Bild

Die Diagnosestellung des folliculären Lymphoms erfolgt in 75 bis 80% der Fälle erst in einem fortgeschrittenem Stadium (III oder IV); dies liegt zum einen an den nur geringen Symptomen, zum anderen daran, dass diese bei Auftreten sehr unspezifisch sind, also sich nicht unmittelbar der Erkrankung zuordnen lassen [7]. Hierzu zählen beispielsweise Abgeschlagenheit, petechiale (flohstichartige) Einblutungen, erhöhte Infektanfälligkeit oder Allgemeinsymptome [4]. Die meist schmerzlosen Lymphknotenschwellungen können auch retroperitoneal liegen und sind somit von außen nicht erkennbar [8]. Auch laborchemisch zeigen sich meist keine oder nur unspezifische Veränderungen [9]. Obwohl die Diagnosestellung in vielen Fällen erst erfolgt nachdem die Erkrankung bereits weit im Körper fortgeschritten ist, liegt das mittlere Überleben bei bis zu 15 Jahren, was einem indolenten Verlauf entspricht [7].

1.1.2 Diagnostik

Sofern möglich sollte eine Lymphnodektomie (diagnostische Lymphknotenentfernung) zur histologischen Untersuchung gewonnen werden. Eine Feinnadelbiopsie wird als nicht ausreichend zur sicheren Diagnosestellung angesehen. Nach Diagnosesicherung sind ein initiales Staging mittels CT sowie eine Knochenmarksbiopsie zur Feststellung einer Infiltration und damit dem Vorliegen eines fortgeschrittenen Stadiums Mittel der Wahl [10].

Aufgrund möglicher therapieassoziierten Nebenwirkungen sowie Komplikationen im Krankheitsverlauf sollte zudem die funktionelle Diagnostik der Lunge sowie der Herzaktion erfolgen; ebenso wird eine Untersuchung des Blutbildes und der laborchemischen Parameter wie beispielsweise BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit), Gesamteiweiß, Transaminasen, Nierenfunktionswerte und Immunglobuline als obligat angesehen [11].

1.1.2.1 Zytologie

Die histologische Gradeinteilung erfolgt an einem Lymphknotenbiopsat oder besser – exzidat nach der absoluten Anzahl an Zentroblasten (Tabelle 1) [4].

Es sollten mindestens 10 repräsentative Follikel in einer 40-fachen Vergrößerung beurteilt werden. Die Grade 1 und 2 zeigen eine Prädominanz von Zentrozyten und werden häufig aufgrund der fehlenden klinischen Relevanz als kombinierte Diagnose Grad 1-2 angegeben. Ab >15 Zentroblasten wird das FL als Grad 3 eingeteilt. Abhängig davon, ob noch Zentrozyten nachweisbar sind, erfolgt die Unterteilung in die Subgruppen A und B [4].

Bei fehlendem Zentrozytennachweis erfolgte die Klassifikation als Grad 3B, diese FLs verhalten sich klinisch eher wie DLBCLs und haben vermutlich auch eine andere Tumorgenese [12].

Tabelle 1: Grading der Follikulären Lymphome anhand der Zentroblastenzahl pro HPF[4]

Grad	
Grad 1	0-5 Zentroblasten/ Gesichtsfeld
Grad 2	6-15 Zentroblasten/ Gesichtsfeld
Grad 3	>15 Zentroblasten/ Gesichtsfeld
Grad 3A	noch Zentrozyten nachweisbar
Grad 3B	ausschließlich Zentroblasten

1.1.2.2 Histologie

Das follikuläre Lymphom wird zu den kleinzelligen Lymphomen gezählt, da die Lymphomzellen dem Reifungsgrad von Keimzentrumszellen entsprechen [13].

Die klassische Zonierung von Keimzentren wird jedoch von den malignen Zellen nicht mehr aufrecht erhalten und es kommt unabhängig von Antigenstimuli zur Ausbildung von entarteten Keimzentren mit fehlenden Mantelzonen [14, 15]. Diese Pseudofollikelbildung führt zur Aufhebung der klassischen Lymphknotenstruktur [4].

Neben den in Follikeln angeordneten Tumorzellen gibt es zudem diffus verteilte Tumorzellen, diese zeigen sich meist kleiner als die in den Follikeln befindlichen Zellen [16].

Die WHO unterscheidet 4 Wachstumsmuster des FL abhängig vom Anteil an follikulärem Wachstum innerhalb des Tumors [4].

Follikulär	>75% follikuläres Wachstumsmuster
Follikulär und diffus	25-75% follikuläres Wachstumsmuster
Fokal-follikulär	<25% follikuläres Wachstumsmuster
Diffus	0% follikuläres Wachstumsmuster

Abbildung 1 zeigt ein FL mit follikulärem Wachstumsmuster.

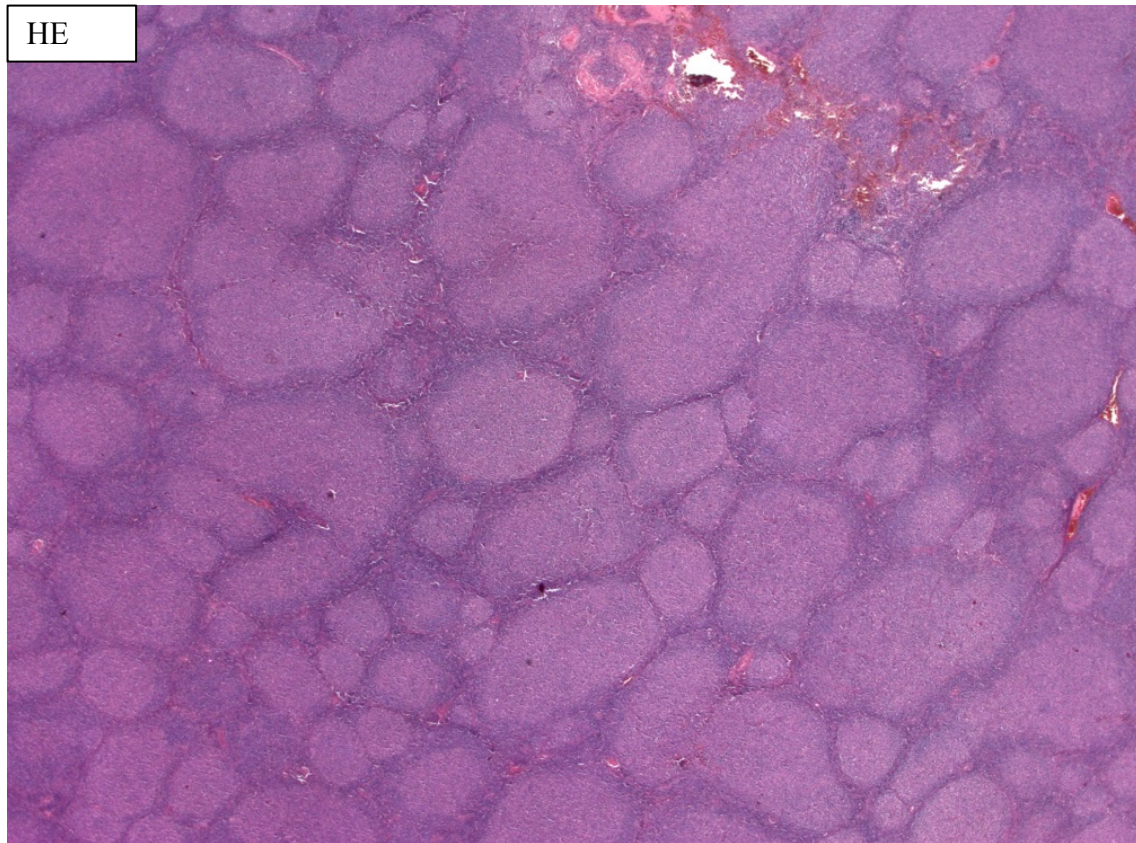


Abbildung 1: Klassisches follikuläres Wachstumsmuster des FL (HE, 50x Vergrößerung)

1.1.2.3 Immunhistochemische Diagnostik

Die Tumorzellen zeigen eine Positivität für Oberflächen-Immunglobuline (am häufigsten IgM) und exprimieren Antigene, welche der B-Zell Linie zuzuordnen sind [17]. So zeigen sich die Zellen positiv für CD19, CD20, CD22 und CD79a [4, 18, 19]. Die Zellen sind zudem häufig positiv für das anti-apoptotische BCL2, den Transkriptionsfaktor BCL6 und CD10; dessen genaue Funktion nicht eindeutig geklärt ist, welches jedoch u.a. in frühen B-Zell Stadien und verschiedenen hämatologischen Erkrankungen beschrieben wurde [20-25]. Die Tumorzellen haben ein negatives Färbemuster für CD5 (einem Mitglied der Scavenger Rezeptor Superfamilie, welches sich positiv in T-Zellen, T-Zell-Lymphomen, bei chronisch lymphatischer Leukämie und einigen Low-Grade B-Zell Lymphomen zeigt) und dem T-Zell-Marker CD43, welcher sich auch Malignomen der B-Zell-Linie positiv zeigen kann [26-32].

Höhergradige Neoplasien zeigen häufig ein schwächeres Färbeverhalten oder eine Negativität für CD10 [19, 33].

Die in Follikeln angeordneten Tumorzellen sind stärker positiv für CD10 als die diffus zwischen den Follikeln angeordneten Zellen [16].

BCL2 zeigt sich in 85-90% der Fälle der Grad 1 und 2 Lymphome positiv, während deutlich weniger Grad 3 FLs hier ein positives Färbeverhalten zeigen [16, 34].

Abbildung 2 zeigt das klassische immunhistochemische Profil eines BCL2-positiven FLs.

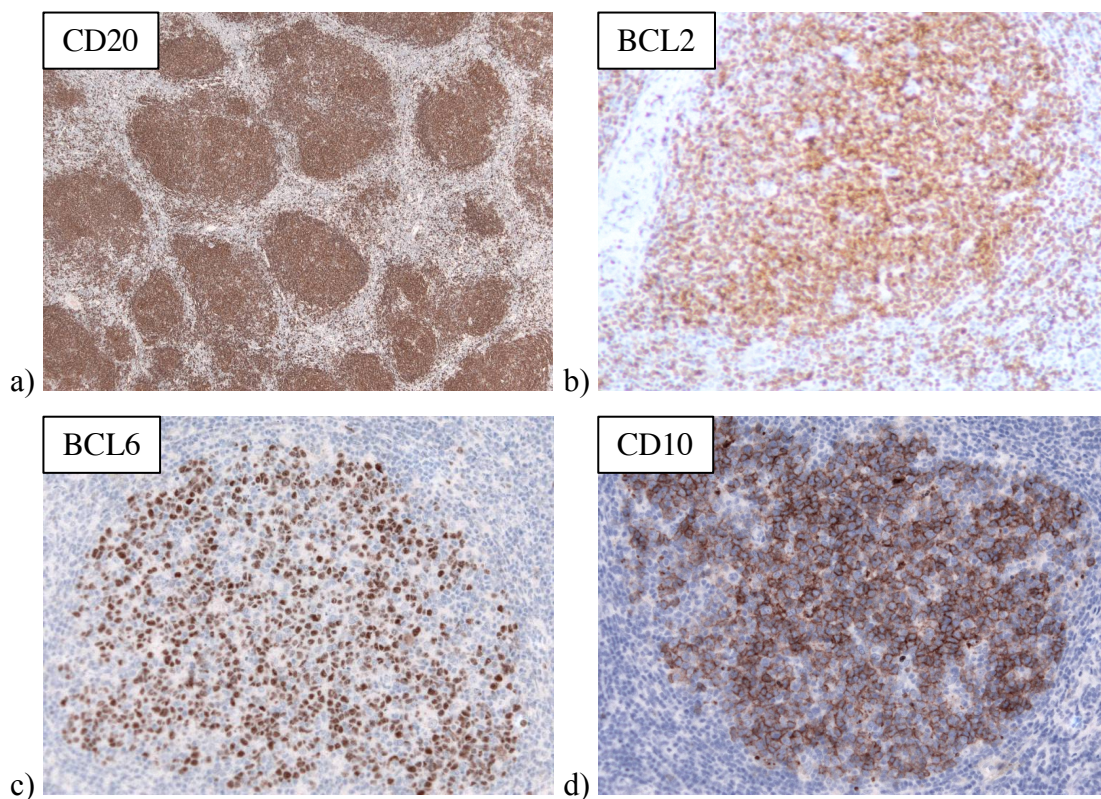


Abbildung 2: Immunhistochemisches Profil des klassischen FL

a) CD20 färbt die B-Lymphozyten (CD20, 50x Vergrößerung)

b) BCL2 zeigt eine erhöhte Expression in den Keimzentren (BCL2, 200x Vergrößerung)

c) BCL6 zeigt eine positive Expression (BCL6, 200x Vergrößerung)

d) CD10 zeigt eine positive Expression (CD10, 200x Vergrößerung)

Einige FLs zeigen sich trotz erhöhter Expression von BCL2 in der immunhistochemischen Färbung negativ. Dies liegt an einer somatischen Mutation im translozierten *BCL2*-Gen, welche eine Bindung des in der Diagnostik eingesetzten Antikörpers verhindert und so zu einem negativen Färbeverhalten führt. Diese Fälle lassen sich jedoch mit Antikörpern, welche gegen andere Epitope des BCL2s gerichtet sind, anfärben. Au-

ßerdem lässt sich in diesen Fällen die Translokation t(14;18) mittels FISH-Analyse nachweisen. Diese Fälle werden als pseudonegative FLs bezeichnet [35-37].

Neben diesen pseudonegativen Fällen gibt es auch Fälle bei denen keine Translokation stattgefunden hat. Ein Fehlen dieser Translokation ist jedoch kein Kriterium für das nicht Vorhandensein bzw. die Diagnosestellung eines FLs, weshalb diese Fälle als BCL2-negative bzw. t(14;18)-negative FLs bezeichnet werden [4, 38].

Eine Gruppe der t(14;18)-negativen FLs exprimiert dennoch BCL2; die genauen Mechanismen welche zu dieser Überexpression führen sind unklar, diskutiert werden beispielsweise eine Duplikation von Chromosom 18 [39, 40].

1.1.2.4 Genetische Veränderungen im FL

1.1.2.4.1 Biologie der Translokation t(14;18)(q32;q21) und deren Relevanz für BCL2

85-90% der folliculären Lymphome zeigen die Translokation t(14;18)(q32;q21) (Abbildung 3) [4, 41]. Diese Mutation führt zu einer Dysregulation des anti-apoptotischen *BCL2*-Gens, indem es unter die Regulation des Immunglobulin Heavy Chain (IGH) Enhancers auf Chromosom 14 gestellt und durch dessen hohe Aktivität damit deutlich überexprimiert wird [42-44].

Die Translokation entsteht wohl in einem frühen Entwicklungsstadium der B-Zelle bereits im Knochenmark und tritt hier im Rahmen der physiologischen V(D)J-Rekombination auf. Hier kommt es durch eine fehlerhafte Reparatur der DNA zur typischen Translokation [6, 45, 46].

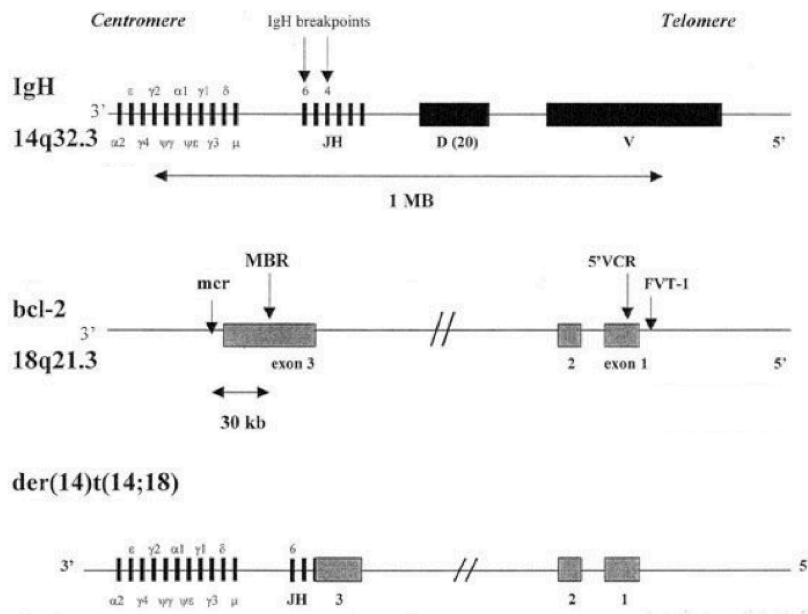


Abbildung 3: Die Translokation t(14;18)(q32;q21) (nach Godon et al., 2003[47])
 Darstellung der Translokation von *BCL2* mit Bruch an der MBR (major breakpoint region) auf Chromosom 14, unter die Kontrolle des IGH enhancers.

BCL2 ist ein anti-apoptotisches Gen, welches gemeinsam mit anderen Genen der *BCL2*-Familie den intrinsischen Weg der Apoptose reguliert. Bei Stress wird physiologischerweise durch BAX und BAK, ebenfalls Gene der *BCL2*-Genfamilie, aus der äußeren Mitochondrienmembran Cytochrom C freigesetzt. Dies führt, über die Aktivierung von Caspasen, zunächst zum Untergang der Organellen und dann der Zelle. *BCL2* unterbricht diesen geregelten Zelltod [5, 48].

Diese Translokation allein ist allerdings nicht ausreichend um eine Transformation in ein follikuläres Lymphom zu gewährleisten und findet sich auch in gesunden Individuen [49]. Beschrieben wird ein Anstieg der Häufigkeit des Auftretens mit zunehmendem Alter. So wird die Anzahl der Translokationsträger bei den unter 20-jährigen mit 14% angegeben, während es in der Altersgruppe der über 60-jährigen 60% sind [50].

Ebenso ist die t(14;18)-Translokation, obgleich sie ein früher Schritt in der Tumorgene-
 se ist, nicht obligat, sodass es auch *BCL2*-negative follikuläre Lymphome gibt [51].
BCL2-pseudonegative FLs (siehe 1.1.2.3) müssen von den tatsächlich negativen FLs
 unterschieden werden [37].

1.1.2.4.2 Häufige genetische Veränderungen des Follikulären Lymphoms

Die Translokation t(14;18) ist wie bereits beschrieben allein nicht ausreichend für die Entstehung eines FLs, sodass bei dieser Entität eine Tumorgenese durch eine mehrzeitige Akkumulation von genetischen Alterationen angenommen wird [51].

Die häufigsten genetischen Alterationen der follikulären Lymphome sind Mutationen in epigenetisch relevanten Genen [52]. Diese Gene sind beispielsweise „Histon-Modifizier“ wie *CREBBP* und *EZH2* oder Histon Cluster Gene [51, 53-55]. Diese Veränderungen haben Einfluss auf die Chromatinstruktur und somit die transkriptionale Aktivität der betroffenen Zellen [52].

Frühe Mutationen, welche die Tumorgenese selbst vorantreiben und das akquirieren weiterer Mutationen ermöglichen, werden als Treibermutationen (*engl. driver mutations*) bezeichnet während Mutationen, bei denen die Tumorgenese beschleunigt wird, als Akzelerator-Mutationen bezeichnet werden [56].

In den letzten Jahren wurde das Mutationsspektrum des FLs in einer Vielzahl an Studien untersucht [51, 52, 57]. Vor allem vergleichende Analysen mit der Vorstufe der in situ follikulären Neoplasie sollen Erkenntnisse über den frühen und späten Zugewinn verschiedener Mutationen bringen und somit über deren Rolle in der Onkogenese [58].

Veränderungen im *CREBBP*, welche als frühe Ereignisse in der Tumorgenese und somit als Treibermutationen angesehen werden, sind in 32 bis 75% der Fälle beschrieben [51, 59, 60]. Mutationen im *EP300*, dessen Genprodukt große Ähnlichkeit zu dem des *CREBBP* zeigt, ist in 9 bis 14% der Fälle mutiert [59, 60].

Mutationen im *KMT2D* treten in 50-89% der Fälle auf; hier bleibt Aufgrund des zeitlichen Auftretens unklar, ob es sich um eine Treiber- oder Akzelerator-Mutation handelt [51].

Die in etwa 20% auftretenden Mutationen in *GNAI3* werden vor allem bei Transformationen beobachtet, ebenso wie die in 6-52% auftretenden Mutationen im *FOXO1* [61-65].

Mutationen in Histon Cluster Genen sind in bis zu 27% der Fälle beschrieben und sind alleine nicht ausreichend für die Tumorgenese [53].

„Gain of Function“ Mutationen in *EZH2* werden mit 7-60% angegeben [66, 67]. Mutationen im *MEF2B* zeigen sich in 13,4% der FLs [68].

Andere Alterationen treten beispielsweise in den Regionen bzw. Chromosomen 1p, 6, 7, 8, 10q, 12q, 17p und 18p sowie X auf [69-71]. Die häufigsten dieser Veränderungen treten in der Region 1p36 auf, hier liegt das *TNFRSF14* [11, 72, 73]. *TNFRSF14* wird aufgrund seines späten Auftretens in der Tumorgenese als Akzelerator gewertet und in 25-44% der Fälle beobachtet [4, 51, 74].

In 17% wurden aktivierende Mutationen in *RRAGC* beschrieben [75].

Inaktivierende Mutationen in *TP53*, *CDKN2A* sowie aktivierende Mutationen in *MYC* werden bei Transformationen in ein DLBCL beschrieben [65, 76].

Selten wird die Translokation t(8;14)(q24,q32) beobachtet [77, 78]. Hier handelt es sich um eine aktivierende Mutation des *MYC*-Gens, die typischerweise bei Burkitt-Lymphomen beobachtet wird [79]. Wenn diese Mutation in High-Grade Lymphomen zusammen mit der t(14;18) auftritt, wird von einem double-hit Lymphom gesprochen [80, 81].

1.1.2.5 Das t(14;18)-negative Follikuläre Lymphom

Wie bereits erwähnt zeigen etwa 10% der FLs keine t(14;18)-Translokation [4]. Die Detektion weiterer Unterschiede zwischen t(14;18)-positiven und negativen FLs ist Inhalt aktueller Forschung.

In der initialen Diagnosestellung liegt häufiger ein niedrigeres Tumorstadium bei den t(14;18)-negativen FLs vor [82].

Die Datenlage bezüglich der Häufigkeit von Low- und High-Grade t(14;18)-negativen FLs zeigt ein vermehrtes Auftreten von High-Grade FLs in dieser Subpopulation. Ein Grund hierfür ist, dass die Grad 3B FLs, welche sich klinisch und biologisch eher wie DLBCLs verhalten, sich ebenfalls *BCL2*-negativ zeigen und diese häufig in der Statistik mit aufgeführt werden [34, 83].

T(14;18)-negative FLs zeigen zudem eine erhöhte proliferative sowie apoptotische Aktivität [82]. Bei den t(14;18)-negativen FLs zeigt sich eine reduzierte Expression von CD10 [82]. Außerdem wurde die erhöhte Expression von BCL6 beschrieben [84].

Die Ratio von erkrankten Männern zu Frauen beträgt 1:2,5 und ist somit im Vergleich zu den *BCL2*-positiven FLs etwas vermehrt Richtung weiblicher Betroffener verschoben.

ben [4, 37]. Leiche et al. konnten diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FLs feststellen [82]

Eine Subpopulation der BCL2-negativen FL stellt das inguinalen folliculäre Lymphomen mit prädominant diffusem Wachstumsmuster dar. Dieses zeigte eine erhöhte Expression von CD23, außerdem wurde bei dieser Entität ein Verlust des kurzen Armes von Chromosom 1 beschrieben (del(1p36)).[85]

Unterschiedliche Ausprägungen eines diffusen Wachstumsmusters sind in Abbildung 4 dargestellt [73].

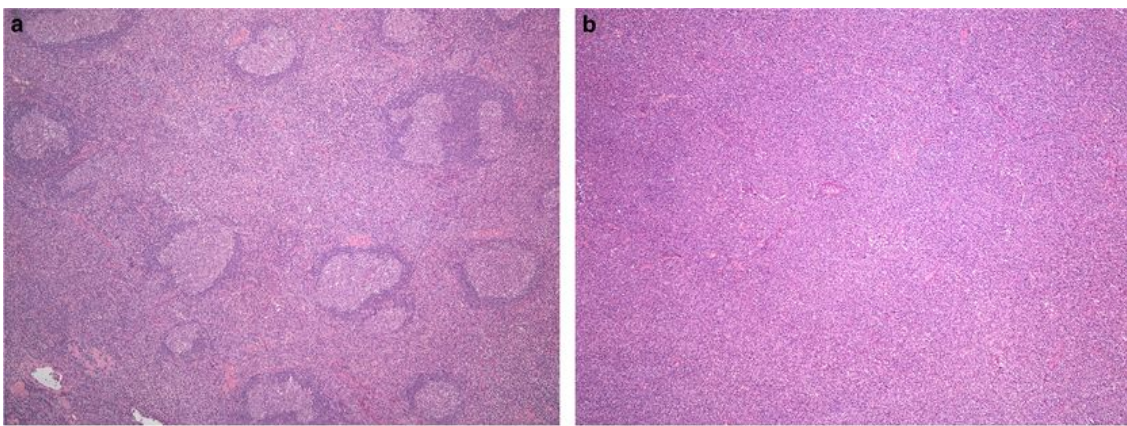


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung unterschiedlicher Wachstumsmuster der folliculären Lymphome (HE) (aus Siddiqi et al., 2016 [73]).

**(a) Darstellung von residuell erhaltenen Follikelstrukturen
(b) im Vergleich zu vollständig diffusem Wachstum**

Von Siddiqi et al. konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die t(14;18)-negativen FLs mit diffusem Wachstumsmuster gehäuft Mutationen im STAT6, einem Transkriptionsaktivator, zeigen [73, 86]. Weitere Arbeiten bestätigten dieses Ergebnis und ein Hotspot für diese Mutationen konnte an Position p.D419 (Abbildung 5) detektiert werden [87, 88].

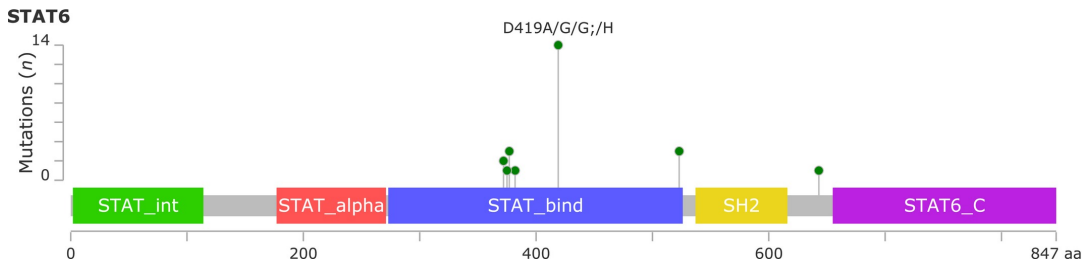


Abbildung 5: Darstellung der beschriebenen Mutationen in STAT6 (aus Zamo et al., 2018 [87])

1.1.2.6 Staging

Das FL wird nach aktueller deutscher Leitlinie nach Ann-Arbor klassifiziert (Tabelle 2). Diese Klassifikation wurde ursprünglich für Hodgkin Lymphome entwickelt, findet heute aber auch Anwendung in der Stadieneinteilung von NHL. Eine andere Klassifikation ist die Lugano-Klassifikation, eine Modifikation der Klassifikation nach Ann-Arbor ohne den Einbezug des klinischen Beschwerdebilds [4].

Die Hauptstadien nach Ann-Arbor werden primär nach Lokalisation der befallenen Lymphknoten und ihrer Verteilung im Bezug auf das Zwerchfell bestimmt, während das Stadium IV auch den diffusen Befall von extralymphatischem Gewebe beschreibt. Durch den Zusatz verschiedener Ergänzungen ist eine Spezifizierung des Stadiums gewährleistet. So steht beispielsweise ein A für ein Fehlen von Allgemeinsymptomen, wobei ein B das klassische Bild der B-Symptome beschreibt:

- Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$
- Nachtschweiß
- unbeabsichtigter Gewichtsverlust von $>10\%$ innerhalb eines halben Jahres [11]

Zusätzlich zu den Allgemeinsymptomen dient der Buchstabencode auch zur genaueren Beschreibung des Befallsmusters. E steht für eine Beteiligung extranodaler (nicht Lymphknoten) Organe, während S (Splen) speziell den Befall der Milz kennzeichnet. Ein X wird verwendet um besonders große Tumordurchmesser zu beschreiben [11].

Tabelle 2: Klassifikation der Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome nach Ann-Arbor (aus Onkologia Leitlinie [11])

Stadium	
I	Befall einer Lymphknotenregion (I/N) oder Vorliegen eines einzigen oder lokalisierten extranodalen Herdes (I/E)
II	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/N) oder Vorliegen eines extranodalen Herdes (II/E) und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/N/E)
III	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III/N) oder Befall von lokalisierten extranodalen Herden und Lymphknotenbefall, so dass ein Befall auf beiden Seiten des Zwerchfells vorliegt (III/E oder III/N/E)
III 1	Subphrenische Lokalisation, beschränkt auf Milz, zöliakale und/oder portale Lymphknoten allein oder gemeinsam
III 2	Subphrenische Lokalisation mit Beteiligung paraportaler, mesenterialer, iliakaler und/oder inguinaler Lymphknoten allein oder gemeinsam
IV	Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall von Lymphknoten

1.1.3 Prognose

Die Prognose ist allerdings nicht rein vom Zeitpunkt der Diagnosestellung abhängig. Der FLIP-Index (Follicular Lymphoma International Prognostic Index), welcher zusätzlich auch patientenspezifische Parameter erfasst, stellt ein wichtiges Werkzeug zur Ermittlung von Risikogruppen dar. Die Risikostratifizierung erlaubt sowohl eine Aussage über das Rezidivrisiko als auch über die 10-Jahres-Überlebensrate, wie in Tabelle 3 dargestellt [89].

Risikofaktoren zur Ermittlung des FLIP-Index (nach Solal-Celigny et al., 2004 [89]):

- Patientenalter >60 Jahre
- Fortgeschrittene Erkrankung (III oder IV)
- Hämoglobin <12 g/dl
- LDH-Erhöhung
- Anzahl befallener Lymphknoten >4

Tabelle 3: Risikogruppen (nach Nooka et al., 2013[90])

Risiko Gruppe	Risikofaktoren	10-JÜR in %
niedrig	0-1	62- 71
intermediär	2	48- 51
hoch	3-5	34- 36

Das Follikuläre Lymphom zeigt wie oben beschrieben primär einen indolenten Verlauf, der sich durch ein langsames und schmerzloses Fortschreiten der Erkrankung charakterisieren lässt. Bei 30 – 60% der Patienten kann es im Laufe der Erkrankung zu einem aggressiven Erkrankungsverlauf kommen, welcher auch eine prognostisch ungünstige Situation für den Patienten darstellt [91]. Zu dieser aggressiven Transformation kann es sowohl bei der initialen Erkrankung sowie auch beim Rezidiv kommen, weshalb auch im zuletzt genannten Fall immer eine erneute Histologiegewinnung zur Bestätigung sowie eine ausführliche Diagnostik erfolgen sollte [11, 71].

1.1.4 Therapie

Bei den unterschiedlichen Stadien der Erkrankung haben sich verschiedene Therapieoptionen bewährt.

Während in den Stadien I sowie II durch eine lokale Bestrahlung (involved field) ein Progress der Erkrankung für lange Zeit verhindert werden oder sogar eine Heilung erreicht werden kann, so ist die Therapie in den fortgeschrittenen Stadien deutlich komplexer [11].

Bei fehlender Symptomatik ist eine „watch & wait“-Strategie ratsam, da es keinen Hinweis auf eine bessere Prognose der Patienten gibt, die in absoluter Symptombfreiheit behandelt wurden. Sollte dies keine Option darstellen, so ist für das weitere Vorgehen sowohl das Alter als auch der Allgemeinzustand des Patienten entscheidend [11].

Bei Patienten die sich ansonsten in einer guten klinischen Verfassung befinden, ist eine altersadaptierte Immun-Chemo-Therapie die aktuelle Erstleitlinientherapie. Die zur Therapie zugelassenen Substanzen sind Bendamustin, Chlorambucil, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Fludarabin, Idelalisib, Mitoxantron, Obinutuzumab, Prednisolon, Rituximab, Vincristin und ⁹⁰Yttrium-Ibritumomab-Tiuxetan [11].

Nach erfolgreicher Remission sollte die Therapie durch eine Erhaltungstherapie mittels Rituximab (einem chimären, monoklonalen Antikörper, welcher gegen CD20 gerichtet ist) unterstützt werden [11, 92].

Sollte der Allgemeinzustand des Patienten zu stark eingeschränkt sein, so ist eine Therapie mit Einzelmedikamenten indiziert [11].

Histologische Grad 3B folliculäre Lymphome, die als aggressive Lymphome klassifiziert werden, sollten analog zum diffus großzelligen B-Zell-Lymphom behandelt werden [11].

1.2 Stellenwert und Techniken der molekularen Diagnostik

In immer mehr medizinischen Fachgebieten gewinnt die genetische Analyse von Tumoren an Bedeutung. Doch nicht nur um den Ursprung einer Erkrankung zu identifizieren oder um die Risiken Verwandter zu ermitteln, sondern auch mit der Aussicht auf therapeutische Konsequenzen [93]. Ebenso lässt sich das Auftreten oder der Verlauf einzelner Erkrankung durch genetische Analysen vorhersagen [94]. All dies hat dazu geführt, dass immer mehr Untersuchungen auf molekularer Ebene durchgeführt werden [95].

So haben die Ergebnisse genetischer Untersuchungen einen Stellenwert sowohl als prognostischer [96] als auch als prädiktiver Marker bei Tumorerkrankungen [97]. Durch die immer sensitiver werdenden Methoden sind in diesem Kontext auch neue Untersuchungsmethoden wie beispielsweise die Liquid Biopsie etabliert worden [98]. Hierbei werden geringste Mengen frei im Blut zirkulierende Tumor-DNA analysiert [99].

Die genetische Diagnostik hat jedoch nicht nur einen Stellenwert bei bestehenden malignen Erkrankungen. Anlageträger bestimmter Mutationen in beispielsweise den *BRCA1/BRCA2*-Genen oder Patienten, bei denen im Rahmen einer FAP eine Mutation im *APC*-Gen auftritt, erhalten im Vergleich zur Normalbevölkerung eine intensiviertere Vorsorge oder die Möglichkeiten präventiver Maßnahmen [94, 100-103].

1.2.1 Sequenzierung nach Sanger

Seit Entwicklung der DNA-Sequenzierung durch Sanger 1977 hat sich der Bedarf an Analysen des genetischen Codes extrem gesteigert. Sowohl in der Diagnostik als auch in der Forschung ist das Wissen um Mutationen, sei es zur Sicherung von Diagnosen, zum Treffen von Therapieentscheidungen oder als prognostische Marker, unerlässlich. Auch in der Grundlagenforschung, z.B. im Rahmen der Klärung der Onkogenese haben Analysen der DNA einen hohen Stellenwert [95].

Da die Sequenziermethode nach Sanger bis in die letzten Jahre noch als Goldstandard galt, soll sie hier im Kurzen erläutert werden.

Bei der Sequenzierung nach Sanger wird das zu untersuchende DNA-Fragment zunächst mittels einer PCR amplifiziert. In einem weiteren Schritt findet an den Einzelsträngen der amplifizierten Produkte durch Zugabe eines einzelnen Primers eine komplementäre Synthese des Stranges statt. Der Ansatz wird zusätzlich zu den zur Kettenverlängerung notwendigen dNTPs mit 2', 3'-Dideoxyribonucleosidtriphosphaten (ddNTPs) versetzt. Da sich an diesen keine freien Hydroxylgruppen befinden, die für ein Fortschreiten der Reaktion notwendig sind, endet die Kette an diesem Punkt, falls statt der dNTP ein ddNTP eingebaut wird [104].

In früheren Jahren mussten für jede Base (Adenin, Thymin, Cytosin, Guanin) ein eigener Ansatz erstellt werden, der basenspezifische Ergebnisse lieferte, die aber an jedem Punkt der Sequenz auftreten konnten an dem die ansatzspezifische Base auftaucht. In einem weiteren Schritt wurden die Ansätze mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die unterschiedlich langen Fragmente durch radioaktive Markierung der ddNTPs sichtbar gemacht, um anhand des Bandenmusters die Sequenz zu erhalten [104]. Später war es dann möglich die ddNTPs, zunächst mit einem Farbstoff, später jedoch mit unterschiedlichen Farben für jedes Nucleotid, Fluoreszenz zu markieren. Dies ermöglichte

es, die Analyse mit lediglich einem Ansatz durchzuführen und mittels anschließender Kapillarelektrophorese und Laserdetektion diesen Prozess zu vereinfachen und zu beschleunigen [105].

1.2.2 Next Generation Sequencing

Obgleich die Sequenzierung nach Sanger bis vor wenigen Jahren als Goldstandard der molekularen Diagnostik galt und auch heute noch in der Diagnostik eingesetzt wird, zeigt sich das Verfahren durch den immer größer werdenden Bedarf und den geringen Probendurchsatz bei gleichzeitig relativ hohem zeitlichem Aufwand immer mehr mit seinen Limitationen konfrontiert.

Im Laufe der Jahre entwickelten sich durch diese Limitationen immer neue Ansätze um das Sequenzieren effizienter zu gestalten. Bei den NGS-Verfahren ist es möglich, eine deutlich höhere Anzahl an Proben zeitgleich zu untersuchen. Nicht nur quantitative Vorteile ergeben sich mit den neuen Verfahren, auch die Sensitivität zeigt sich im Vergleich zum etablierten Verfahren erhöht. Auch finden sich immer neue Anwendungen für die Analysemethoden, sodass beispielweise Bruchpunktanalysen bei Translokationen nun auch mittels NGS detektierbar sind [106].

Beim NGS handelt es sich aber technisch nicht um ein einzelnes Verfahren sondern um eine Gruppe von neuen Analysemethoden, die sich alle dadurch auszeichnen, besonders schnell und damit deutlich kostengünstigere Ergebnisse zu liefern [107].

Den Verfahren ist dabei gemeinsam, dass diese die DNA auf Einzelstrangebene im Hochdurchsatzverfahren analysieren. Dies bedeutet, dass hunderte bzw. tausende Gene parallel sequenziert werden [108, 109].

Hier sollen die beiden aktuell marktführenden Technologien erläutert werden.

1.2.2.1 Illumina Technologie

Eine Methode des NGS ist die Brückensynthese wie sie beispielsweise bei der Technologie der Firma Illumina eingesetzt wird.

Hier werden die zu untersuchenden DNA-Fragmente, die als sogenannte DNA-Library vorliegen, auf eine Trägerplatte aufgetragen und bindet dort mittels einer zuvor angehängten Adapter-Sequenz an bestimmte Arealen, wo zunächst eine Amplifikation stattfindet. Auf der Trägerplatte bilden sich durch diesen Vorgang sogenannte Cluster, welche aus klonal amplifizierten Kopien des jeweiligen Ursprungsfragments bestehen. Dieser Schritt ist notwendig, um beim weiteren Vorgehen ein ausreichend starkes Signal zu erzeugen und detektieren zu können [109].

Die Platte wird mit fluoreszenzmarkierten Basen geflutet, die beim Einbau in den DNA-Strang Licht von entsprechender Wellenlänge emittieren. Dieses Licht wird direkt detektiert (Sequencing by Synthesis) und prozessiert. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt und verwendet ein Verfahren welches als „Reverse Dye Termination“ bezeichnet wird. Hierbei sind die einzubauenden Nukleotide mit einer OH-Gruppe am 3'-Ende versehen, welche ein Fortlaufen der Synthese verhindert, bis diese vor dem nächsten Zyklus enzymatisch entfernt wurde [108, 109].

Die Daten werden aufgezeichnet und der Vorgang solange wiederholt, bis die gewünschte Länge des „Reads“ erreicht wird. Die gewonnenen Daten können bioinformatisch aufgearbeitet und so in ein universell verwendbares Format überführt werden.

1.2.2.2 Ion Torrent Technologie

Eines der neueren Verfahren zur Sequenzanalyse von DNA ist das der Halbleiterssequenzierung. Hier werden im Gegensatz zu den anderen, sowohl altbewährten wie auch neuen Methoden, keine Lichtsignale detektiert sondern Änderungen des pH-Werts innerhalb einer Reaktionseinheit als elektrisches Signal erfasst. Dies ist ohne weitere Modifikation der dNTPs möglich, da physiologischerweise beim Einbau eines dNTP ein Proton (sowie ein Pyrophosphat) frei wird, welches zu einem kurzzeitigen Absinken des pH-Werts führt (Abbildung 6) [109].

Die vorbereiteten DNA-Fragmente werden mittels einer Adaptersequenz an Microbeads gebunden. Bei diesen Microbeads handelt es sich um kleine (im μm -Bereich) sphärische Kunststoffpartikel (Ion SphereTM Particles =ISP), die mit den jeweiligen komplementären Sequenzen der zuvor an die DNA-Fragmente angehängten Adapter beschichtet sind,

die zusätzlich als Primersequenzen für die ablaufende PCR genutzt werden können [109].

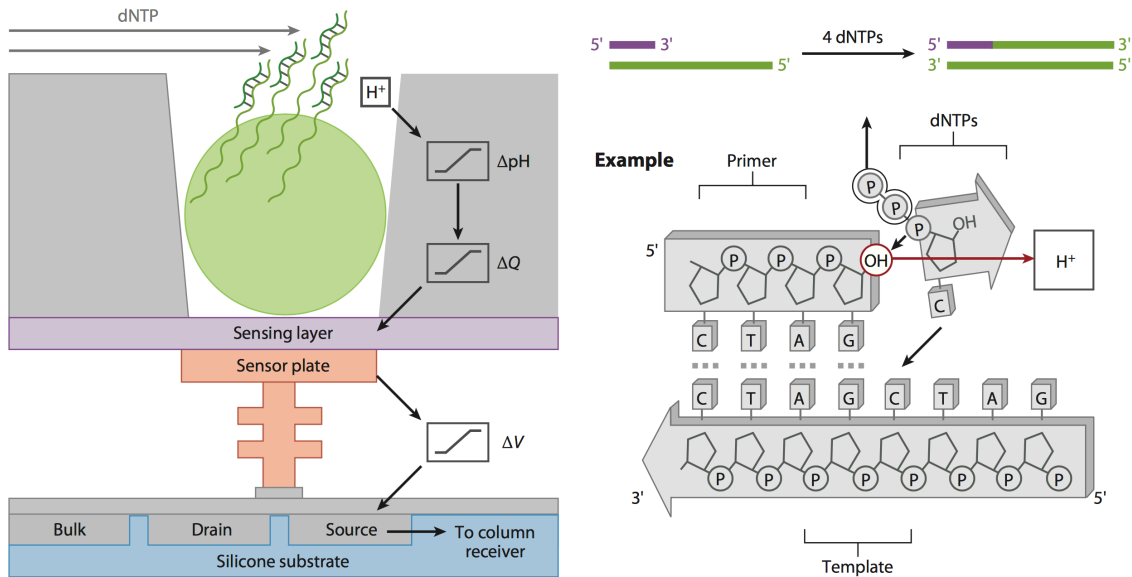


Abbildung 6: Struktur einer Reaktionskammer auf einem Halbleiter-Chip. Darstellung der freiwerdenden Wasserstoff-Ionen während der Synthese (aus Mardis, 2013)[109].

Öl wird zu den DNA-Fragmenten und den Beads gegeben, die Konzentration dieser Komponenten wird hierbei bewusst so gering gehalten, dass sich in den sich bildenden Tröpfchen jeweils genau ein Microbead und ein DNA-Fragment befinden. Die Ziel-DNA wird innerhalb dieser Tröpfchen mittels einer Emulsions-PCR (PCR in Öl) an den Beads zur Signalverstärkung klonal amplifiziert (Abbildung 7). Die Sequenzierung selbst erfolgt nach der Amplifikation auf einem Halbleiter-Chip, auf welchem sich mehreren Millionen Reaktionskammern befinden. Dabei befindet sich jeweils ein Bead in einer Reaktionskammer [109].

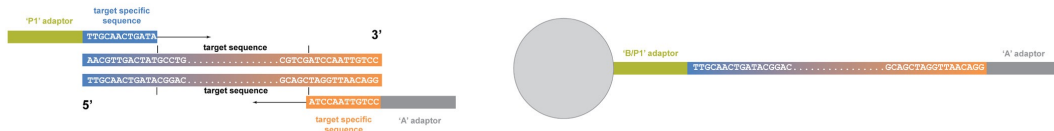


Abbildung 7: Schematische Darstellung der vorbereiteten Templates mit an die Microbeads ligierten Zielsequenzen.

Used with permission of Thermo Fisher Scientific.

Durch die klonale Amplifikation der Zielsequenzen an den Beads werden so viele Protonen zeitgleich frei, dass eine pH-Wert-Veränderung messbar wird. Durch einen unterhalb der Reaktionskammer befindlichen pH-Wert Sensor wird ein elektrisches Signal erzeugt, welches proportional zur freiwerdenden Anzahl an Protonen und damit den eingebauten Nukleotiden ist. So ist es auch möglich den Einbau von mehreren gleichartigen Nukleotiden zu detektieren. Bei diesem Verfahren kann, anders als z.B. bei der Kettenabbruchmethode, ein fortlaufender DNA-Strang synthetisiert werden, da die Detektion der Basenabfolge bereits während der Synthese erfolgt. Zur Bestimmung der Sequenz werden bei diesem Verfahren die Reaktionsgefäße bzw. der gesamte Chip zyklisch mit dATP, dCTP, dTTP, dGTP geflutet [110, 111].

Die aus dieser PCR gewonnenen Daten werden bioinformatisch prozessiert und in ein Standard-Format gebracht, welches mittels herkömmlichen Auswertungsprogrammen gelesen werden kann [111, 112].

1.3 Ziel der Arbeit

Wie bereits beschrieben sind folliculäre Lymphome die häufigsten der indolenten Lymphome. Die Translokation t(14;18) wird gemeinhin als relevantes und frühes Ereignis in Entstehung der FLs angesehen. Da es aber auch gesunde Individuen mit dieser genetischen Alteration gibt, die kein Lymphom entwickeln und ebenso Patienten mit diagnostizierten FLs existieren, in denen diese Alteration nicht nachweisbar ist, liegt nahe, dass weitere Veränderungen für die Genese des FLs notwendig sind.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der molekulargenetischen Unterschiede zwischen dem Gesamtkollektiv der folliculären Lymphome und der Subpopulation der BCL2-negativen FLs.

Beantwortet werden sollten damit folgende Fragestellungen:

1. Welche im Gesamtkollektiv der FLs beschriebenen Mutationen treten auch im t(14;18)-negativen FL auf?
2. Unterscheiden sich diese Mutationen im Hinblick auf die Häufigkeit des Auftretens?
3. Unterscheiden sich diese Mutationen im Hinblick auf die Lokalisation im der genetischen Alterationen in den betroffenen Genen?

Zu diesem Zweck wurden bekannte, bereits in der Literatur gehäuft beobachtete Mutationen in FLs in einem Kollektiv von BCL2-negativen folliculären Lymphomen mittels Next Generation Sequencing untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Auswahl der Fälle

Die Auswahl der Fälle erfolgte aus dem Archiv des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Tübingen, mit Fällen von 2007 bis zum Jahr 2013. FL1, FL7 und FL10 sind Fälle, die entweder im Rahmen von konsiliarischen Gutachten oder für die Forschung von externen Einsendern dem (Forschungs-)Archiv des Pathologischen Instituts, zur Verfügung gestellt wurden.

Kriterien zur Auswahl waren neben der feststehenden Diagnose eines folliculären Lymphoms, der immunhistochemische Ausschluss einer BCL2-Expression ebenso wie der Ausschluss der Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ in der FISH-Analyse. Fälle bei denen ein aggressiv verlaufendes Lymphom (Grad 3B) zu erkennen war sowie pädiatrische Lymphome wurde ausgeschlossen.

Für die Durchführung dieser Arbeit lagen die bereits im Vorfeld erteilten positiven Vota der Ethik-Kommission (300/2010/BO1 und 219/2012/BO2) vor.

2.1.2 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Vortexer	Biozym
FVL-2400N Combi Spin Minizentrifuge/- Vortex	Biosan
PerfectSpin Mini	Peqlab
Thermo Scientific™ Heraeus™ Biofuge Fresco	Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific)
Heizblock	Peqlab
Thermomixer comfort	Eppendorf
VTX-3000L Mixer Uzusio	LMS
Microfuge 16	Beckman Coulter

Thriller® Thermo-Inkubationsmischer	Peqlab
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Qubit® Fluorometer	Life Technologies
GeneTouch Thermal Cycler	Biozym
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystem
Lightcycler 480 II	Roche
Magnetplatte Agencount SPRIPlate 96R ring	Beckman Coulter
Spannungsgerät GPS 200/400	Pharmacia
Gelkammer	Peqlab
Gel-Dokumentationssystem CN-300-WL/LC	Peqlab
Pipetten	Gilson, Eppendorf
Pipetboy	Integra, Brand
Waage	Sartorius
Step OneTouch™ Real-Time PCR System	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Ion OneTouch™ Instrument	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Ion OneTouch™ ES	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Ion Torrent PGM™	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)

2.1.3 Kits

Kitbezeichnung	Hersteller
QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Agencourt® AMPure® XP-Kit	Beckman Coulter
Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Starter Kit	AB SCIEX
Agencourt® CleanSEQ® Kit	Beckman Coulter
Ion AmpliSeq Library Kit 2.0	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Ion PGM™ Template OT2 200 Kit	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Ion Sphere™ Quality Control Kit	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
ION PGM™ Sequencing 200 Kit v2	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)
Ion 318™ Chip Kit	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)

2.1.4 Primer

2.1.4.1 Primer für die Testung der Amplifizierbarkeit (nach van Dongen, et al., 2003)[113]

Primer	Sequenz
AF4 (Exon 3), F	GGAGCAGCATTCCATCCAGC
AF4 (Exon 3), R	CATCCATGGGCCGGACATAA
AF4 (Exon 11), F	CCGCAGCAAGCAACGAACC
AF4 (Exon 11), R	GCTTTCCTCTGGCGGCTCC
PLZF (Exon 1), F	TGCGATGTGGTCATCATGGTG
PLZF (Exon 1), R	CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC
RAG1 (Exon 1), F	TGTTGACTCGATCCACCCCA
RAG1 (Exon 1), R	TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA
TBXAS1 (Exon 9), F	GCCCGACATTCTGCAAGTCC
TBXAS1 (Exon 9), R	GGTGTTGCCGGGAAGGGTT

2.1.4.2 M13 Primer für die Sequenzierung nach Sanger

Primer	Sequenz
M13, Forward	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13, Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

2.1.4.3 Primer für Überprüfung der NGS Ergebnisse mittels Sequenzierung nach Sanger (mit M13 Anhang)

Primer	Sequenz
TNFRSF14_AMPL7153185565_F	TGTAAAACGACGGCCAGTCTCTGGGCGG CAGGTTAT
TNFRSF14_AMPL7153185565_R	CAGGAAACAGCTATGACGAGAGAGGGTG CAGGGTG
TNFRSF14_AMPL7153160548_F	TGTAAAACGACGGCCAGTAGAGGGGAGAT

	TCAGGCTGTG
TNFRSF14_AMPL715316054_R	CAGGAAACAGCTATGACCAAGAGTGTCT GCCCTCGG
TNFRSF14_Ex5_M13_F2	TGTAAAACGACGGCCAGTCTCCCTGAGG CTGAGTGAAC
TNFRSF14_Ex5_M13_R2	CAGGAAACAGCTATGACTGGCAATTCAT TTCCAATCA
KMT2D_AMPL7153080420_F	TGTAAAACGACGGCCACTAACCATTCT GTGCCCTAA
KMT2D_AMPL7153080420_R	CAGGAAACAGCTATGACAGGGGAGGCCA GAGAAGATA
KMT2D_AMPL7153087179_F	TGTAAAACGACGGCCAGTCACCACTGCC ACTCTCTGAT
KMT2D_AMPL7153087179_R	CAGGAAACAGCTATGACGAGTCAGGGAT GTCAGGCAA
KMT2D_AMPL7153087718_F	TGTAAAACGACGGCCAGTCCTATGAGGT GCTGTTCCCA
KMT2D_AMPL7153087718_R	CAGGAAACAGCTATGACTCCAGACCCTT TTCCTTCCC
KMT2D_AMPL7153087054_F	TGTAAAACGACGGCCAGTCTGGTGTGT GGGAGAGAGT
KMT2D_AMPL7153087054_R	CAGGAAACAGCTATGACCTTGGAGCCTG AGACCCAC
KMT2D_AMPL7153087701_F	TGTAAAACGACGGCCAGTCTTTGACACC GAAGCCCAAG
KMT2D_AMPL7153087701_R	CAGGAAACAGCTATGACAGTTCAAACC TGCAGCGTT
KMT2D_AMPL7153087803_F	TGTAAAACGACGGCCAGTGCTACTCCGG GCAAAGAATG
KMT2D_AMPL7153087803_R	CAGGAAACAGCTATGACGACCCAGGCTC ACTCATTCT
KMT2D_AMPL7153086240_F	TGTAAAACGACGGCCAGTGAATCACCCA

	CGTCCCCA
KMT2D_AMPL7153086240_R	CAGGAAACAGCTATGACGGAGACAAGGG CGACTCC
KMT2D_AMPL7153622676_F	TGTAAAACGACGGCCAGTGCTATCACAG AAGCCCATGG
KMT2D_AMPL7153622676_R	CAGGAAACAGCTATGACCTCTAGCCTCA GTGCCATT
HIST1H1E_AMPL7153622676_F	TGTAAAACGACGGCCAGTCGTCGGGTTC CTTCAAATC
HIST1H1E_AMPL7153622676_R	CAGGAAACAGCTATGACGCTTCTTCGCCT TCTTTGGG
HIST1H1D_AMPL7153985773_F	TGTAAAACGACGGCCAGTCTGCTGGGAC CAAGAAAGTG
HIST1H1D_AMPL7153985773_R	CAGGAAACAGCTATGACGTCCCGCCAGT TTCATTTT
FOXO1_AMPL7153088819_F	TGTAAAACGACGGCCAGTTGCCCCAGAT GCCTATACAA
FOXO1_AMPL7153088819_R	CAGGAAACAGCTATGACGTTATGAGATG CCTGGCTGC
FOXO1_AMPL7153088747_F	TGTAAAACGACGGCCAGTCTCAGGTGGT GGAGATCGAC
FOXO1_AMPL7153088747_R	CAGGAAACAGCTATGACCAGGTTGCTCA TGAAGTCGG
EP300_AMPL7153091747_F	TGTAAAACGACGGCCAGTTCCTGGACAG CAGATTGGAG
EP300_AMPL7153091747_R	CAGGAAACAGCTATGACATCAATTTAGG CTCCTAGTGGG
CREBBP_AMPL7153985798_F	TGTAAAACGACGGCCAGTCCAGCTTTGT GGGCATTCAT
CREBBP_AMPL7153985798_R	CAGGAAACAGCTATGACCGCCTTGTTCA GCATCTTTT
CREBBP_AMPL7153334334_F	TGTAAAACGACGGCCAGTACTGTTGTGCT

	TTGCCCAC
CREBBP_AMPL7153334334_R	CAGGAAACAGCTATGACGCAATGGAGCT CAGAGAAGG
CREBBP_AMPL7153334324_F	TGTAAAACGACGGCCAGTGAATAAAGCC CCTCCTCTCC
CREBBP_AMPL7153334324_R	CAGGAAACAGCTATGACACTCGTTGCAG GTGTAGACA
CREBBP_AMPL7153985800_F	TGTAAAACGACGGCCAGTCCTGAGTTAA ACATGTGCCTCC
CREBBP_AMPL7153985800_R	CAGGAAACAGCTATGACCAAACACTCACCC TAATTTCTTCACATACTCT
EZH2_M13_F	TGTAAAACGACGGCCAGTTTTGTCCCCAG TCCATTTTC
EZH2_M13_F	CAGGAAACAGCTATGACTGGCAATTCAT TTCCAATCA

2.1.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Phusion Hot Start High Fidelity DNA Polymerase	Biozym
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)

2.1.6 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
GelRed Nucleic Acid Stain	Biotium
Loading Dye (6x)	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)
dNTPs	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)/ Roche
HF-Puffer (5x)	Biozym
50mM MgCl ₂	Biozym
25mM MgCl ₂	Roche
Puffer II (ohne MgCl ₂) (10x)	Roche
Sample Loading Solution (SLS)	AB SCIEX
Mineralöl	Beckman Coulter
Seperation Buffer	AB SCIEX

2.1.7 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Xylol	VWR
Ethanol	Merck
Tween 20	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Borsäure	Merck
EDTA	AppliChem
Seakem LE Agarose	Lonza

2.1.8 Puffer

TBE-Puffer	Endkonzentration
Tris	445 mM
Borsäure	445 mM
EDTA	12,5 mM

2.1.9 EDV

Programm	Hersteller
Integrative Genomic Viewer (IGV)	Broad Institute
Microsoft Office	Microsoft
EndNote X8	Thomson Reuters
Torrent Suite™ Software (Version 3.6)	Thermo Fisher Scientific
GenomeLab	AB SCIEX
Ion Reporter Software	Thermo Fisher Scientific

2.1.10 Websites

Adresse	Anbieter
https://www.ensembl.org/index.html	WTSI/ EBI
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	NCBI
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore	NCBI
https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic	Welcome Trust Sanger Institute
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/	NCBI
https://ampliseq.com	Thermo Fisher Scientific
https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm	NGRL Manchester
http://primer3.ut.ee	Whitehead Institute for Biomedical Research
http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml	Biobyte Solutions
http://provean.jcvi.org/index.php	J. Craig Venter Institute

2.1.11 Hersteller

Hersteller	Firmensitz
AB SCIEX	Wiesbaden, Deutschland
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Broad Institute	Cambridge, Massachusetts
Biosan	Riga, Lettland
Biozym	Oldendorf, Deutschland
Brand	Wertheim, Deutschland
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Gilson	Middleton, Wisconsin
Integra	Bieberbach, Deutschland
LMS	Brigachtal, Deutschland
Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien
Lonza	Köln, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Pharmacia	Uppsala, Schweden
Qiagen	Hilden, Deutschland
Roche	Penzberg, Deutschland
Sartorius	Goettingen, Deutschland
Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Braunschweig, Deutschland
VWR	Bruchsal, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 DNA Extraktion

Für die nachgeschalteten Methoden war es notwendig möglichst reine DNA zu verwenden und diese weitestgehend von störenden anderen Zellbestandteilen oder Konservierungssubstanzen zu befreien.

Zur Isolation von genomischer DNA aus FFPE (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) - Gewebe ist es notwendig das Gewebe zunächst vom Paraffin zu befreien.

Hierzu wurden Gewebeprobe in ein Reaktionsgefäß gegeben und zunächst mit 1 ml Xylol versetzt. Dieses Gemisch wurde dann bei 13000 rpm zentrifugiert und vom Überstand befreit. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal durchgeführt.

Zu dem verbliebenen Gewebe wurde 1 ml 100%iges Ethanol hinzugegeben, erneut bei 13000 rpm zentrifugiert und wiederum der Überstand entfernt. Auch diese Schritte wurden wiederholt und das so entstandene Pellet bei 50 °C im Thermoschüttler getrocknet.

Zur Zelllyse wurde das Pellet mit 180 µl ATE-Puffer und 20 µl Proteinase K resuspendiert und bei 56 °C über Nacht inkubiert. Da nach Ablauf der angesetzten Zeit (über Nacht, ca. 12 h) einige Proben noch nicht ausreichend lysiert waren, wie für die weiteren Schritte notwendig, wurde zu diesen zusätzlich 10 µl Proteinase K gegeben und anschließend, nach weiteren 4 h bei 56 °C, für 1 h bei 90 °C inkubiert.

Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 2 µl RNase A versetzt wurden, wurde 200 µl AL-Puffer sowie 200 µl Ethanol zugegeben.

2.2.1.1 Aufreinigung der DNA

Das gesamte Lysat wurde dann in die QIAmp MinElute Säulen gegeben, die zuvor in ein 2 ml Reaktionsgefäß gesteckt wurden.

Diese Proben wurden bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Säule wurde zunächst mit 500 µl AW1-Puffer versetzt, erneut bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert und das Gefäß mit dem Durchfluss verworfen und die Säule erneut in

ein 2 ml Gefäß überführt. Dieser Schritt wurde anschließend mit 500 µl AW2 -Puffer wiederholt.

Bei allen bisherigen Schritten, bei denen die Proben sich in den QIAmp Säulen befanden, wurden die Proben erneut bei höheren Drehzahlen zentrifugiert, falls noch Flüssigkeit in der Säule erkennbar war.

Nachdem die Waschvorgänge mit beiden Puffern abgeschlossen waren, wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 3 Minuten zentrifugiert, sodass die Membran vom verbleibenden Ethanol befreit und getrocknet wurde.

Die so getrocknete Säule wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überbracht, mit 50 µl ATE Puffer versetzt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert, da dies den gesamt Ertrag an DNA erhöht.

Nach der Inkubation wurden die Proben bei voller Geschwindigkeit (13.000 rpm) für 1 min zentrifugiert und diesmal die in den Säulen befindlichen Rückstände verworfen, der Durchfluss (mit der gelösten DNA) wurde aufbewahrt.

2.2.1.2 DNA-Quantifizierung mittels Nanodrop

Bei der Quantifizierung der DNA mittels Nanodrop-Spectrophotometer werden kleinste Volumina von Flüssigkeit (1 µl) zwischen zwei Flächen aufgespannt und bilden so eine optische Faser, durch welche die Extinktion der Flüssigkeit bestimmt werden kann.

DNA hat ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm (Abbildung 8) Das Maß der Absorbanz korreliert hierbei mit der Konzentration an gelöster DNA in der eingesetzten Probe. Da andere Moleküle ihr Absorptionsmaximum in anderen Wellenlängen Bereichen haben (z.B. Proteine bei 280 nm) , kann zusätzlich anhand der Relation der Absorption von z.B. 260 nm zu 280 nm bzw. 230 nm (Verunreinigung mittels Phenol oder Urea) das Ausmaß der Verunreinigung der Probe festgestellt werden [114, 115].

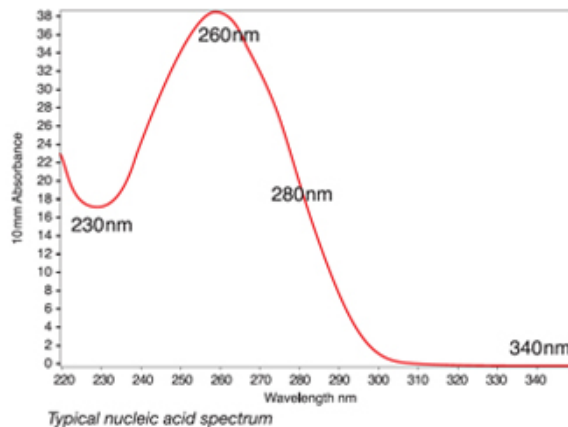


Abbildung 8: Analyse mittels Nanodrop.

Beispielhafte Darstellung der Absorbanz von DNA. Anhand der Quotienten A_{260}/A_{230} bzw. A_{260}/A_{280} lässt sich das Ausmaß der Verunreinigung der DNA darstellen (aus Desjardins et al., 2010[116])

2.2.1.3 Testung der Amplifizierbarkeit

Da die Messergebnisse des Nanodrop-Spectrophotometers das Ausmaß der Verunreinigungen anzeigen kann, nicht aber wie sich die Qualität der gewonnenen DNA im Hinblick auf die Fragmentierung darstellt, wurde eine PCR zur Analyse der Amplifizierbarkeit in fünf unterschiedlichen Fragmentlängen durchgeführt. Dieser Schritt ist notwendig, da für die weiteren Analysen eine Länge von >100 bp Voraussetzung ist.

Die Zielsequenzen der Primer dieser PCR liegen in den Genen AF4 (Exon 3), AF4 (Exon 11), PLZF (Exon 1), RAG1 (Exon 1), TBXAS1 (Exon 9) [113].

Für die PCR wurden die Proben auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l verdünnt und 2 μ l in die PCR eingesetzt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Ansatz für die PCR zur Testung der Amplifizierbarkeit

	Volumen/ Ansatz	Endkonzentration
ddH ₂ O	15,7 µl	
10x Puffer II (ohne MgCl ₂)	2,5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	2 µl	2 mM
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM
Primer Mix	2 µl	
AmpliTaQ Gold DNA Polymerase	0,3 µl	0,06 U/µl
Gesamtmenge	25 µl	

Die PCR erfolgte im Thermocycler entsprechend der Einstellungen welche Tabelle 5 zu entnehmen sind.

Tabelle 5: Thermocyclereinstellungen für die PCR zur Testung der Amplifizierbarkeit

Temperatur	Dauer	
95°C	7 min	
95°C	45 sec	35 Zyklen
60°C	45 sec	
72°C	1 min 30 sec	
72°C	7 min	
12°C	hold	

2.2.2 Gelelektrophorese in 2%igem Agarosegel

Um die Produkte der mittels PCR amplifizierten DNA ihrer Qualität, sprich Produktlängen, entsprechend beurteilen zu können wurde eine Gelelektrophorese in 2%igem Agarosegel durchgeführt.

Bei diesem Verfahren erfolgt die Auftrennung der zuvor amplifizierten DNA-Fragmente abhängig von ihrer Länge durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Agarose bildet, abhängig von der Konzentration, eine Gitterstruktur mit unterschiedlich großen

Poren. Je kleiner das Fragment, desto schneller wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente zum Plus-Pol. Ein in die DNA interkalierender Stoff wird bereits zur Herstellung des Gels hinzugegeben und sorgt später dafür, dass die Nukleinsäuren unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können.

Neben der DNA werden ein DNA-Längenstandard, als Größenreferenz für die DNA-Fragmente sowie eine Negativkontrolle eingesetzt. Letztere wird bereits in Rahmen der vorgeschalteten PCR hergestellt, indem ddH₂O zu den eingesetzten PCR-Reagenzien gegeben wird. Dies erlaubt es mögliche Verunreinigungen in diesem Schritt detektieren zu können.

2.2.2.1 Herstellung des Gels (2%)

Zur Herstellung des Gels wurden 5 g Agarose in 250 ml TBE-Puffer gelöst, indem das Gemisch mehrmals in der Mikrowelle erhitzt wird, bis dies gerade zu kochen beginnt. Zusätzlich wurden 17,5 µl GelRed zu dem so entstandenen Ansatz gegeben. Dieser Stoff ist ein Fluorophor und interkaliert in DNA, welche so bei UV-Lichtexposition fluoresziert.

Das noch flüssige Gel wurde in eine Form gegossen, in welche ein Kamm eingespannt wurde. Dieser Kamm dient als Negativ für die entstehenden Aussparungen (Taschen) in welche im nächsten Schritt das PCR-Produkt gefüllt wurde.

2.2.2.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Jeweils 2 µl loading dye wurden mit 10 µl des PCR-Produktes versetzt und in die entsprechenden Taschen des Agarosegels gefüllt. Als Referenz wurde eine 100 bp-Längenstandard verwendet. Nachdem die Elektrophorese bei 140 V für 20 Minuten durchgeführt wurde, wurde das Gel mit den durch UV-Bestrahlung sichtbar gemachten Banden fotodokumentarisch festgehalten.

2.2.3 Qubit Fluorometrie

Für die Quantifizierung im Rahmen der NGS-Analyse sollte der genaue Gehalt an intakter doppelsträngiger DNA (dsDNA) detektiert werden. Ein allgemeines Absorptionsverfahren wie es beim Nanodrop-Spectrophotometer zum Einsatz kommt ist hierfür nicht ausreichend, da sowohl einzelsträngige DNA (ssDNA) als auch RNA ihre Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von 260 nm haben.

Zur Konzentrationsbestimmung der dsDNA wurde das Qubit[®]-Fluorometer eingesetzt. Verwendet wurde hierbei das Qubit dsDNA BR Assay Kits nach Angaben des Herstellers.

Hierbei wurden 2 µl DNA auf ein Gesamtvolumen von 200 µl, mit Qubit[®] Working Solution, aufgefüllt. Der in dem Kit enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff emittiert nur dann Licht wenn er an dsDNA gebunden ist. Das von den Proben emittierte Licht wurde anhand einer zuvor ermittelten Standardgeraden, welche mittels E. coli DNA mit bekannter Konzentration erstellt wurde, evaluiert und so deren Konzentration bestimmt.

Durch diese spezifische Reaktion ist dieses Verfahren genauer als z.B. die Absorptionsmessung des Nanodrop-Spectrophotometers.

2.2.4 Next Generation Sequencing

Ein Teil der NGS Analyse wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Weichert am Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Heidelberg durchgeführt, da zu gegebenem Zeitpunkt im Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen noch keine Geräte für die NGS-spezifischen Arbeitsschritte zur Verfügung standen.

2.2.4.1 Vorbereitung der Ion AmpliSeq Bibliothek

Für die Sequenzierung der Zielregionen der zu untersuchenden Gene war bereits im Vorfeld ein Primer-Panel designiert worden. Das Primerdesign erfolgte mittels des Programms Ion AmpliSeq Designer, das humane Genom hg19 diente als Referenz. Die

Abdeckung des erstellten 2 Pool-Designes betrug 96%. Die untersuchten Exons bzw. Hot Spot Regionen werden in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Aufstellung der mittels NGS untersuchten Exons bzw. Hot-Spot-Regionen

Gen	Chromosom	Genomische Position	Exon	Anz. Amplifikons
CREBBP	16	3,790,330 – 3,790,620	24	2
CREBBP	16	3,789,509 – 3,789,795	25	2
CREBBP	16	3,788,490 – 3,788,743	26	2
CREBBP	16	3,786,581 – 3,786,886	27	2
CREBBP	16	3,785,967 – 3,786,274	28	2
CREBBP	16	3,781,123 – 3,781,544	30	3
EP300	22	41,486,614 – 41,578,081	alle	63
KMT2D	12	49,410,758 – 49,451,107	alle	120
TNFRSF14	1	2,485,805 – 2,497,267	alle	11
EZH2	7	148,508,677 – 148,508,812	16	1
FOXO1	13	41,127,801 – 41,242,734	alle	10
HIST1H1B	6	27,832,570 – 27,837,359	alle	6
HIST1H1C	6	26,053,963 – 26,058,699	alle	6
HIST1H1D	6	26,232,440 – 26,237,216	alle	6
HIST1H1E	6	26,154,559 – 26,159,343	alle	5
GNA13	17	63,003,407 – 63,054,920	alle	8
MEF2B	19	19,254,376 – 19,283,098	alle	11

Die Vorbereitung der Bibliothek wird im Folgenden geschildert.

2.2.4.1.1 Quantifizierung der Proben

Jede DNA-Probe wurde 1:100 sowie 1:500 mit ddH₂O verdünnt. Im Folgenden wurde ein Mastermix (Tabelle 7) für die beiden Verdünnungsreihen mit je drei Ansätzen pro Probe sowie die Standard-Kurvenreaktionen und Negativkontrollen angesetzt:

(Anzahl der Proben * 2 Verdünnungsreihen * 3 Ansätze) + 21 Standard-Kurven-Reaktionen + 3 NTC- Reaktionen.

Tabelle 7: Ansatz für die PCR für die Quantifizierung der extrahierten DNA

	Volumen/ Ansatz
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) Probes Master	10 µl
20X RNase P Primer Probe mix	1,0 µl
nukleasefreies Wasser	6,5 µl
Gesamtmenge	17,5 µl

Für jede Reaktion wurden 17,5 µl des Mastermix in eine Vertiefung einer 96-well Platte pipettiert. In jeweils drei der „Wells“ (Triplikate) wurden 2,5 µl einer Verdünnung (1:100 bzw. 1:500) einer DNA-Probe gegeben. Ebenso wurde mit der entsprechend anderen Verdünnungsreihen, dem nukleasefreien Wasser bei den NTC-Reaktion sowie für die sieben Kontroll-DNA-Proben, mit definierter Konzentration, bei den Reaktionen für die Standard-Kurve verfahren. Die Platte wurde mit Adhäsionsfolie verschlossen, gevortext und dann zentrifugiert um die Flüssigkeit am Boden der „Wells“ zu sammeln. Die Realtime-PCR erfolgte mit den Einstellungen der folgenden Tabelle 8 im Lightcycler 480.

Tabelle 8: Lightcyclereinstellungen für die Quantifizierung der extrahierten DNA

Temperatur	Dauer	
40°C	10 min	
95°C	10 min	
95°C	15 sec	55 Zyklen
60°C	1 min	

Die Konzentration der Probe-DNAs wurde ermittelt, indem die Kontroll-DNA-Proben in einem Graph (CT-Wert gegen Konzentration) aufgetragen und eine Standardgerade erstellt wurde. Anhand der Durchschnitts-CT-Werte der Proben-DNAs konnte so, mit Hilfe der Standardgerade, die Konzentration dieser Proben ermittelt werden.

2.2.4.1.2 Amplifikation der genomischen DNA Zielsequenzen/ Libraryerstellung

Anhand der vorausgegangenen Konzentrationsbestimmung wurden die benötigten Volumina für die folgenden PCRs bestimmt (Volumina jeweils entsprechend 10 ng DNA). Die für die PCR verwendeten Reagenzien und deren Volumina (pro Ansatz) sind der unterstehenden Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Ansatz für die PCR zur Amplifizierung der genomischen DNA-Zielsequenzen

	Volumen/ Ansatz	Endkonzentration
5X Ion AmpliSeq HiFi Mix	4 µl	1x
2X Ion AmpliSeq Primer Pool	10 µl	1x
gDNA (10 ng)	Y µl	
Nuklease-freies Wasser	(6-Y) µl	
Gesamtmenge	20 µl	

Die Reaktion erfolgte unter unten stehenden Einstellungen (Tabelle 10) im Thermocycler.

Tabelle 10: Thermocyclereinstellungen zur Amplifikation der genomischen DNA-Zielsequenzen

Temperatur	Dauer	
99°C	2 min	
99°C	15 sec	21 Zyklen
60°C	4 min	
10°C	hold	

2.2.4.1.3 Partiieller Verdau der Primer-Sequenzen (Partially digest primer sequences)

Zu den amplifizierten Proben aus dem vorherigen Schritt wurden jeweils 2 μ l FuPa-Reagenz gegeben, sodass sich in den Reaktionsgefäßen jeweils ein Volumen von 22 μ l befand. Anschließend erfolgte eine PCR mit den Einstellungen aus Tabelle 11 im Thermocycler.

Tabelle 11: Thermocyclereinstellungen für den partiellen Verdau der Primer-Sequenzen

Temperatur	Dauer
50°C	10 min
55°C	10 min
60°C	20 min
10°C	hold

2.2.4.1.4 Ligation der Adapter an die Amplikons sowie deren Aufreinigung

Zu den PCR-Produkten des vorausgegangenen Schrittes wurden jeweils 4 μ l Switch Solution, 2 μ l des gelösten Barcodemixes (hier Barcode 1 bis Barcode 11), sowie 2 μ l DNA Ligase gegeben, sodass sich in den Vertiefungen je 30 μ l befanden. Im Thermocycler erfolgte die PCR unter den in Tabelle 12 aufgeführten Bedingungen.

Tabelle 12: Thermocyclereinstellungen für die Ligation der Adapter-Sequenzen

Temperatur	Dauer
22°C	30 min
72°C	10 min
10°C	hold

2.2.4.1.5 Aufreinigung der DNA-Library

Je 45 µl des Agencourt AMPure XP Reagenz wurden zu jedem PCR-Produkt des vorherigen Schrittes gegeben und suspendiert. Diese Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Die 96-well Platte wurde in einem magnetischen Rack platziert und erneut für weitere 2 Minuten inkubiert. Während der Inkubation bildete sich in jeder Vertiefung ein Pellet. Der Überstand wurde jeweils mit einer Pipette entfernt und verworfen, wobei die Pellets in der Platte belassen wurden. Zu jedem Pellet wurden 150 µl (frisch angesetztes) 70%iges Ethanol gegeben und die Position der Platte in Relation zum Magneten verändert. Der Überstand wurde erneut verworfen und dieser Schritt wiederholt. Nachdem alle Ethanol-Reste von den Pellets entfernt wurden, wurden die Pellets für 5 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Die Platte wurde aus dem magnetischen Rack entfernt sowie zu jedem Pellet 50 µl Low TE-Puffer gegeben um die DNA von den Beads zu lösen. Die Platte wurde erneut in dem Magnetrack platziert und nach 2 Minuten Inkubationszeit der Überstand jeder Vertiefung abgenommen und mit nucleasefreiem Wasser 1:100 verdünnt.

2.2.4.1.6 Quantifizierung der Library mittels qPCR

Zunächst wurde, aus der dem Ion Library Quantitation Kit (einem Teil des Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0) beiliegende E. coli Ion Control Library, eine Verdünnungsreihe mit 3 Stufen (1:10, 1:100, 1:1000) angefertigt, die bei der Analyse als Referenz verwendet wurden. Für jede Probe wurden 20 µl des 2X TaqMan Mastermix mit 2 µl des 20X Ion TaqMan Assay vermischt und, da für jeder Probe zwei Reaktionen vorbereitet wurden, jeweils 11 µl in die Vertiefung einer 96-well Platte gegeben. In die so vorbereiteten „Wells“ wurden je 9 µl der zuvor verdünnten Control Library, ddH₂O (für die Negativkontrollen) bzw. der, aus dem vorherigen Schritt gewonnenen 1:100 verdünnten, DNA gegeben. In jeder Vertiefung befand sich ein Reaktionsvolumen von 20 µl. Die Real-Time-PCR erfolgte unter den Tabelle 13 aufgeführten Bedingungen.

Tabelle 13: Thermocyclereinstellungen für die Quantifizierung der Library

Temperatur	Dauer	
50°C	2 min	
95°C	20 sec	
95°C	1 sec	40 Zyklen
60°C	20 sec	

Die durchschnittliche Konzentration der Proben wurde mit Hilfe der durch die „Control Library“ ermittelten Standardgeraden bestimmt. Da die Proben im Vorfeld 1:100 verdünnt wurden, mussten die Ergebnisse jeweils mit 100 multipliziert werden. Für die weiteren Schritte wurden die Proben auf eine Konzentration von je 100 pM verdünnt.

2.2.4.2 Sequenzierung mittels Ion Torrent Plattform

Die Proben wurden zur Sequenzierung in das Pathologische Institut nach Heidelberg versandt, da sich zum Zeitpunkt der Durchführung keine Ion Torrent Plattform im Pathologischen Institut in Tübingen befand. Die prinzipiellen Abläufe der Sequenzierung mittels Halbleiterverfahren sind unter dem Abschnitt 1.2.2.2 bereits erläutert worden.

Die klonale Amplifikation erfolgte als Emulsions-PCR mittels des Ion PGMTM Template OT2 200 Kits an den Microbeads. Die Templateerstellung wurde automatisch am Ion OneTouchTM Instrument durchgeführt.

Die beladenen ISPs wurden einer Qualitätskontrolle mittels Ion SphereTM Quality Control Kit unterzogen, verwendet wurde das Qubit[®] 2.0 Fluorometer. Unter Verwendung des Ion OneTouchTM ES wurden die mit der Template-DNA beladenen Beads angereichert.

Die eigentliche Sequenzierung wurde mit dem Ion PGMTM Sequencing 200 Kit v2 und dem Ion 318TM Chip Kit durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten hierbei nach den Angaben des Herstellers.

Die ermittelten Daten wurden mittels Torrent SuitTM Software analysiert und durch den TMAP (Torrent Mapping Alignment Program) Algorithmus gegenüber dem Referenzgenom (hg19) verglichen.

2.2.5 Überprüfung der Varianten bezüglich des vorhergesagten malignen Potentials

Die ermittelten Missense-Varianten wurden mit den beiden frei zugänglichen Online-Tools PolyPhen-2 und SIFT bezüglich ihres malignen Potentials hin untersucht. Frameshift-Mutationen wurden mittels des Provean-Tools untersucht. SIFT und Provean wurden gemeinsam über die Website (<http://provean.jcvi.org/index.php>) abgerufen.

Zur Überprüfung verwenden diese Programme Algorithmen, welche sowohl die Basenfolge als auch mögliche Konsequenzen des Aminosäureaustauschs für die Struktur der betroffenen Gene analysieren und diese mit bekannten Varianten abgleichen um so Vorhersagen treffen zu können [117-121].

Varianten mit vorzeitigen Stopp-Codons sowie solche mit Frameshift-Mutationen wurden als schädlich gewertet [122].

2.2.6 Validierung der Ergebnisse mittels Sequenzierung nach Sanger

Die Ergebnisse des Next-Generation-Sequencing (NGS) bzw. die mittels Ion Reporter Software gecallten Varianten lagen in tabellarischer Form vor. Jede Variante wurde mittels Integrative Genomics Viewer (IGV) visuell auf ihre Korrektheit überprüft, d.h. Panel-spezifische Sequenzierungsartefakte konnten damit ausgeschlossen werden. Eine Klassifizierung der verbliebenen Varianten in somatischen Mutationen oder Einzelnukleotid-Polymorphismen („Single Nucleotide Polymorphisms“ =SNPs) erfolgte danach anhand der Datenbanken ensembl und COSMIQ.

Die bekannten SNPs wurden als genetische Alteration ohne Krankheitswert nicht weiter untersucht.

Varianten, die mit über 95% Mutationsreads detektiert wurden, wurden als homozygote bzw. Varianten mit einer Allelfrequenz von 50% (+/- 3%) als potenzielle heterozygote Keimbahnmutationen gewertet und, sofern als benigne beschrieben, von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Da es sich bei Varianten mit unter 50 Mutationsreads bzw. einer Allelfrequenz von unter 5% um Fehldetektionen und damit Artefakte handeln kann, erfolgte in diesen Fällen auch keine weitere Untersuchung.

Nicht alle diese Kriterien fanden bei dem FL9 Anwendung. Hier wurden auch Mutationen mit <50 Reads ausgewählt, wenn die anderen Kriterien erfüllt waren, da sich v.a. bei *KMT2D* aufgrund der verminderten DNA-Qualität insgesamt nur eine reduzierte Anzahl an Reads generieren lies.

Die verbleibenden Varianten wurden zu einer Validierung mittels der Sequenziermethode nach Sanger (siehe 1.2.1) ausgewählt. Die Sequenzierung nach Sanger galt noch bis in die letzten Jahre als Goldstandard in der molekularen Diagnostik und stellt ein optisches Verfahren dar, wodurch sich, durch den Einsatz verschiedener Ansätze der Sequenzanalyse, zusätzliche Sicherheit in der Validierung ergab.

2.2.6.1 Primerdesign

Die Primer wurden mittels des open-source Programms Primer3web entworfen. Die Parameter bezüglich Primerlänge (ca. 200 bp), Schmelztemperatur und GC-Gehalt wurden entsprechend der Standardeinstellungen beibehalten. Die vorgeschlagenen Primer wurden im ebenfalls frei zugänglichen Programm SNPCheck auf das Vorliegen von SNPs in den Sequenzen hin überprüft um eine suffiziente Bindung zu gewährleisten.

In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die Forward als auch Reverse Primer um eine M13-Sequenz am 5'- bzw. 3'- Ende verlängert. Dies ermöglicht im weiteren Verlauf einen erleichterten Arbeitsablauf, da für die Sequenzierungsreaktion identische Primer eingesetzt werden können.

2.2.6.2 Primertest

Die Primer, welche wie oben (2.2.6.1) beschrieben entworfen wurden, wurden vor dem Einsatz zur Validierung der Varianten zunächst mittels Test-PCR getestet. Bei der hier eingesetzten DNA handelt es sich um eine Referenz-DNA, bei der bereits im Vorfeld nachgewiesen wurde, dass diese keine Mutationen in den Sequenzen aufweist an welche die Primer binden. Nachdem der Ansatz wie unter Tabelle 14 aufgeführt vorbereitet wurde, erfolgte die PCR mit den in Tabelle 15 dargestellten Parametern.

Tabelle 14: Ansatz für die Primertest-PCR

	Volumen/ Ansatz	Endkonzentration
ddH ₂ O	17,25 µl	
5x HF-Puffer	5 µl	1x
Forward Primer	0,5 µl	0,2 µM
Reverse Primer	0,5 µl	0,2 µM
dNTPs 10mM	0,5 µl	200 µM
Phusion	0,25 µl	0,02 U/µl
DNA	1 µl	50 ng
Gesamtmenge	25 µl	

Tabelle 15: Thermocyclereinstellungen für die Primertest-PCR

Temperatur	Dauer	
98°C	30 sec	
98°C	10 sec	40 Zyklen
56°C	45 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	
12°C	hold	

Mit den PCR-Produkten wurde eine Gelelektrophorese in 2%igem Agarosegel (wie beschrieben unter 2.2.2) durchgeführt.

Da sich die Bandenstärken bzw. die mittels der PCR erstellten Fragmentlängen einiger Primer beim Einsetzen der zu amplifizierenden DNA-Fragmente auf ein nicht zufriedenstellend Ergebnis hindeutete wurden die PCRs dieser Proben mit anderen Konstellationen der Reagenzien und/ oder der Cyclyer-Parameter wiederholt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Änderung der PCR-Zusammensetzung und der Thermocycler-Konditionen gegenüber dem in Tabelle 14 und Tabelle 15 festgelegten Standard

Primer	Änderung gegenüber Tabelle 14 und Tabelle 15
TNFRSF14_AMPL7153185565 (FL 2)	17 µl ddH ₂ O, 0,25 MgCl ₂ (0,5 mM) zusätzlich, 57°C Annealingtemperatur, 38 Zyklen
TNFRSF14_AMPL7153185565 (FL 9)	17 µl ddH ₂ O, 0,25 MgCl ₂ (0,5 mM) zusätzlich, 57°C Annealingtemperatur, 42 Zyklen
TNFRSF14_AMPL7153160548	17 µl ddH ₂ O, 0,25 MgCl ₂ (0,5 mM) zusätzlich, 57°C Annealingtemperatur, 38 Zyklen
TNFRSF14_Ex5 F. E11_14071108Z4/8	17,75 µl ddH ₂ O, 0,5 µl DNA (50 ng) (andere Verdünnung, selbe Endkonzentration)
KMT2D_AMPL7153080420	Keine Änderung
KMT2D_AMPL7153087179	17 µl ddH ₂ O, 0,25 MgCl ₂ (0,5 mM) zusätzlich, 57°C Annealingtemperatur, 42 Zyklen
KMT2D_AMPL7153087718	17 µl ddH ₂ O, 0,25 MgCl ₂ (0,5 mM) zusätzlich, 57°C Annealingtemperatur, 42 Zyklen
KMT2D_AMPL7153087054	16,25 µl ddH ₂ O, 0,5 µl MgCl ₂ (1,0 mM) zusätzlich, 45 Zyklen
KMT2D_AMPL7153087701	Keine Änderung
KMT2D_AMPL7153087803	17 µl ddH ₂ O, 0,25 MgCl ₂ (0,5 mM) zusätzlich, 57°C Annealingtemperatur, 45 Zyklen
KMT2D_AMPL7153086240	Keine Änderung
KMT2D_AMPL7153622676	Keine Änderung
HIST1H1E_AMPL7153622676	Keine Änderung
HIST1H1D_AMPL7153985773	57°C Annealingtemperatur, 45 Zyklen
FOXO1_AMPL7153088819	Keine Änderung
FOXO1_AMPL7153088747	Keine Änderung
EP300_AMPL7153091747	Keine Änderung
CREBBP_AMPL7153985798	57°C Annealingtemperatur, 45 Zyklen
CREBBP_AMPL7153334334	57°C Annealingtemperatur, 45 Zyklen
CREBBP_AMPL7153334324	57°C Annealingtemperatur, 45 Zyklen

CREBBP_AMPL7153985800	Keine Änderung
EZH2_M13	Keine Änderung

2.2.6.3 AMPure-Aufreinigung des PCR Produkts bei Amplikongrößen >150bp

10 µl des PCR-Produktes aus dem vorherigen Schritt wurden mit 10 µl AMPureBeads in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß vermischt und 5 Minuten inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden in eine Magnetplatte platziert und nachdem sich die Beads an einem Punkt gesammelt hatten die Flüssigkeit abgenommen und verworfen. Jede Probe wurde mit 200 µl 70%igem Ethanol versetzt, 3 Minuten inkubiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt und, nachdem kleinste Ethanolreste entfernt wurden, die Beads trocknen gelassen. Je nach Bandenstärke in der vorangegangenen Gelelektrophorese wurden die Beads in 30 bzw. 40 µl ddH₂O resuspendiert und für 5 Minuten inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden so auf der Magnetplatte platziert, dass sich die Beads in der Spitze der Reaktionsgefäße sammelten. Der Überstand wurde abgenommen und für die Cycler Sequencing Reaktion verwendet, die Reaktionsgefäße mit den Beads verworfen.

2.2.6.4 Cycler Sequencing Reaktion mit GenomeLab DTCS-Quick Starter Kit (10 µl Gesamtvolumen)

Für jede im vorherigen Schritt aufgereinigte Probe wurden zwei Reaktionen angesetzt, je eine mit Forward- und eine mit Reverse-Primer. Da alle Proben im Vorfeld mit einem identischen M13-Anhang versehen wurden konnte jeweils derselbe Forward- bzw. Reverse-Primer verwendet werden. Die Volumina der verwendeten Reagenzien sowie die Konditionen des Thermocyclers sind den unterstehenden Tabellen (Tabelle 17 und Tabelle 18) zu entnehmen.

Tabelle 17: Ansatz für die PCR der Cyclers Sequencing Reaktion

	Volumen/ Ansatz
ddH ₂ O	3 µl
DTCS-Mix	2 µl
Primer	1 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	4 µl
Gesamtmenge	10 µl

Tabelle 18: Thermocyclereinstellungen für die Cyclers Sequencing Reaktion

Temperatur	Dauer	
96°C	20 sec	30 Zyklen
50°C	20 sec	
60°C	4 min	

2.2.6.5 CleanSeq-Aufreinigung und Sequenzierung

10 µl von jedem PCR-Produkt aus dem vorausgegangenen Schritt wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß mit jeweils 10 µl CleanSeq sowie 42 µl 85%igem Ethanol vermischt. Die Reaktionsgefäße wurden auf einer Magnetplatte platziert und für drei Minuten inkubiert, sodass sich die Beads sammelten. Der Überstand wurde entfernt und 100 µl 85%iges Ethanol in die Reaktionsgefäße gegeben. Auch dieser Überstand wurde verworfen, kleinste Reste wurden mittels 10 µl-Pipette entfernt. Zügig wurden 40 µl SLS-Puffer zu den vom Alkohol befreiten Beads gegeben und außerhalb der Magnetplatte resuspendiert. Die Reaktionsgefäße wurden so auf der Magnetplatte platziert, dass die Beads in den Spitzen Pellets bildeten. Jeder so vorbereitete Ansatz wurde mit einem Tropfen Öl überschichtet und zur Sequenzanalyse mittels Kapillarelektrophorese gegeben.

Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels der GenomeLab Software.

2.3 Statistische Analyse

Die geringe Anzahl an untersuchten Geweben macht es schwer eine valide Aussage bezüglich der tatsächlichen Häufigkeit der gefundenen Mutationen zu treffen.

Es erfolgte die Bestimmung der Konfidenzintervalle für die pro Gen detektierten Veränderungen. Die verwendete Methode ist die Berechnung des Clopper-Pearson-Intervalls.

Als Konfidenzniveau wurden 95% verwendet. Dies bedeutet, dass 95% der ermittelten Konfidenzintervalle den jeweiligen wahren Wert beinhalten.

Hierbei handelt es sich um ein so genanntes exaktes Verfahren, welches auf Schätzungen verzichtet, dies hat zur Folge, dass die ermittelten Werte häufig konservativ sind und daher das Intervall größer angenommen wird als tatsächlich notwendig.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Bei allen Fällen, mit einer uns angegebenen Lokalisation, handelt es sich um Lymphknotenbiopsien bzw. -exstirpationen. Untersucht wurden sowohl zervikale, axilläre als auch inguinale Lymphknoten. Soweit bekannt handelt es sich jeweils um die Biopsien, die im Rahmen der initialen Diagnosestellung bzw. zur Sicherung von Rezidiven gewonnen wurden (Tabelle 19).

Tabelle 19: Darstellung des Patientenkollektivs bezüglich Geschlecht, Alter, Lokalisation der Probenentnahme und Art der Diagnose (Initialdiagnose oder Rezidiv)

*Erhöhter Blastengehalt bei ungewöhnlicher Morphologie

Fall	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Initialdiagnose/ Rezidiv	Grad
FL1	weiblich	k. A.	inguinal	k. A.	k. A.
FL2	männlich	70 Jahre	axillär	Rezidiv	-*
FL3	weiblich	53 Jahre	inguinal	Initialdiagnose	1 – 2
FL4	weiblich	71 Jahre	axillär	Initialdiagnose	1 – 2
FL5	weiblich	65 Jahre	axillär	Initialdiagnose	1 – 3
FL6	weiblich	60 Jahre	axillär	Initialdiagnose	1
FL7	weiblich	k. A.	inguinal	k. A.	k. A.
FL8	männlich	47 Jahre	zervikal	Initialdiagnose	1 – 2
FL9	weiblich	71 Jahre	axillär	Initialdiagnose	3A
FL10	weiblich	84 Jahre	k. A.	k. A.	1 – 2
FL11	männlich	73 Jahre	zervikal	Rezidiv	1 – 2

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten zeigte sich 1:2,3. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 66 Jahren. Bei einem Fall lagen keine Informationen bzgl. des Alters bei Diagnosestellung vor.

Bei fünf der Fälle (45,45%) wurde die Diagnose an axillären Lymphknoten gestellt, während die Diagnosestellung bei 27,72% an inguinalen und bei 18,18% an zervikalen Proben erfolgte.

Sieben der elf FLs (63,64%) wurden mit Grad 1-2 diagnostiziert, wobei es sich bei einem dieser Fälle um ein Rezidiv handelt. Insgesamt zwei der Fälle waren FL Rezidive (18,18%) wobei bei drei Fällen keine Angaben bezüglich des Vorliegens einer Initialdiagnose oder eines Rezidivs vorlagen.

3.2 Amplifizierbarkeit der DNA

Da Formalin-fixiertes Gewebe eine starke DNA-Fragmentierung aufweist und die untersuchten Genabschnitte für die weiteren Schritte eine Länge von mindestens 150 bis 200 bp haben mussten, wurde mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese die maximale Amplifizierbarkeit der einzelnen Proben bestimmt (Abbildung 9). Dazu wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt, die je nach Fragmentierung der DNA fünf verschieden lange Produkte (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp und 600 bp) amplifiziert.

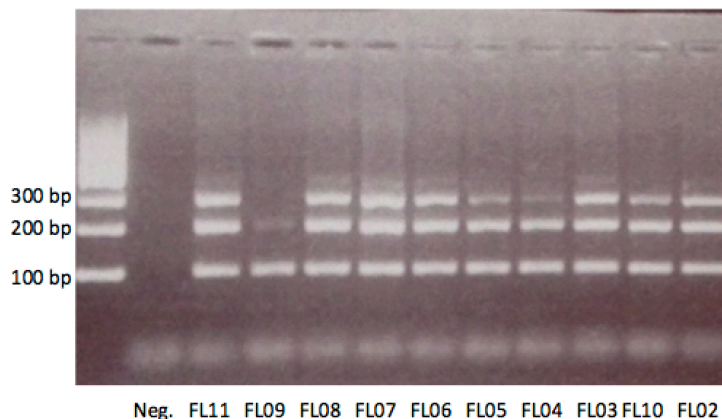


Abbildung 9: Gelelektrophorese zur Ermittlung der Produktlängen nach PCR zur Testung der Amplifizierbarkeit der DNA-Proben

In der ersten, beschrifteten Spalte wurde der DNA-Längenstandard eingesetzt, welcher als Referenz zur Beurteilung der Fragmentlängen der Proben fungiert. Die mit Neg. beschriftete Spalte zeigt die Negativkontrolle. In diese wird, neben den benötigten Reagenzien zur PCR, lediglich ddH₂O hinzugefügt, dies dient dazu ggf. vorliegende Verunreinigungen zu detektieren.

In den mit FL beschrifteten Spalten lief sich das jeweilige PCR Produkt der zu untersuchenden FL-Fälle, die Banden zeigen die Fragmentlänge an und lassen sich anhand des Längenstandards beurteilen und geben so Hinweis auf die Qualität der DNA.

Abkürzungen: bp =Basenpaare

In 6 der 11 Proben (54,54%) konnten PCR-Produkte mit bis zu 400 bp amplifiziert werden. 36,36% der Produkte zeigten eine Länge von 300 bp. Ein Amplifikat (FL9) (9,1%)

zeigte eine lediglich eine starke Bande, die einer Länge von 100 bp entspricht, und eine deutlich schwächere Bande bei einer Produktlänge von 200 bp.

3.3 Ergebnisse der NGS-Analyse

Insgesamt wurden 11 Fälle mittels NGS unter Verwendung des FL-Panels untersucht. In den untersuchten Fällen konnten 28 Varianten in 9 Fällen detektiert werden. Alle detektierten Mutationen wurden zunächst graphisch, wie exemplarisch in Abbildung 10, dargestellt und mit Hilfe des Computerprogramms IGV validiert.

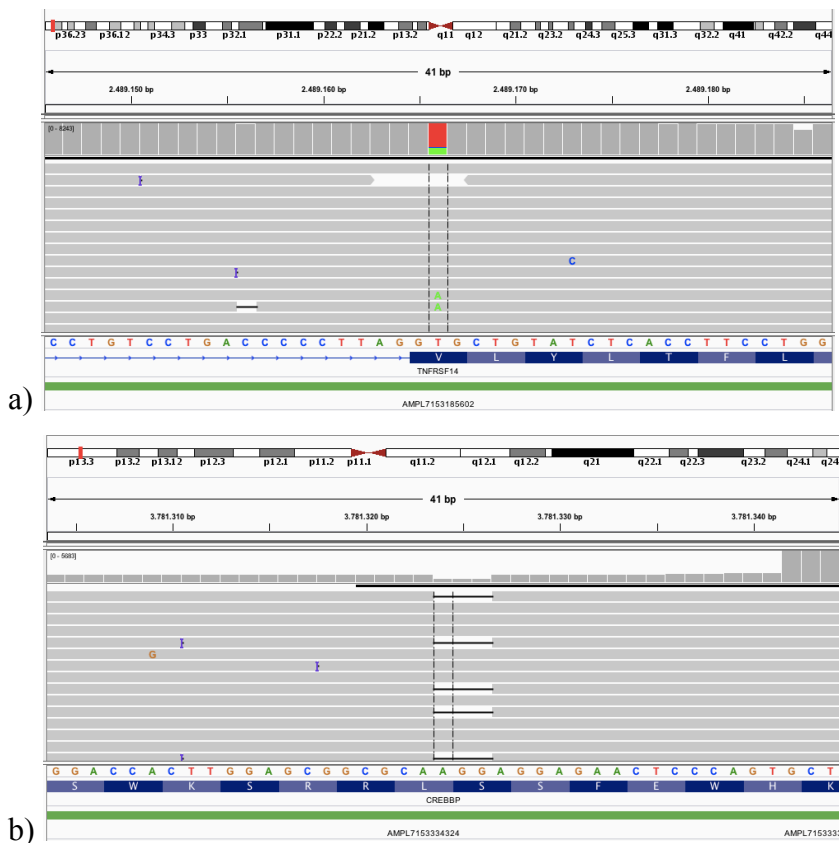


Abbildung 10: Graphische Darstellung mittels IGV

Exemplarische Darstellung anhand des Beispiels von FL1.

a) Basenaustausch von Thymin zu Adenosin im *TNFRSF14* (c.71T>A, p.V24E; Allelfrequenz: 23,1%)

b) Deletion von drei Basenpaaren (im abgebildeten Beispiel eine Deletion mit Verlust von Serin) im *CREBBP* (c.5036_5038del, p.S1680del; Allelfrequenz: 49,8%)

Zwei der elf untersuchten Fälle zeigte im NGS keine Mutation die als valide gewertet wurde.

Die Coverage (die gesamte Anzahl an erzeugten Reads an der untersuchten Position) der festgestellten und als valide gewerteten Varianten betrug zwischen 114 und 7714 Reads.

Die durchschnittliche Anzahl an Mutationsreads betrug 154 in der zum 3'-Ende ablaufenden Reaktion (+) und 143 in der Reaktion die zum 5'-Ende führt (-).

Nichteinberechnet hierbei sind Insertionen und Deletionen. Lediglich ein Fall zeigte eine Insertion, diese mit 888 Reads. Die Anzahl an Deletionsreads betrug in 3 Fällen von 179 bis 3597. Die Allelfrequenz der Varianten schwankte von 12,6% bis 71,4%.

Die mittels NGS festgestellten Varianten sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Zusammenfassende Darstellung der NGS Ergebnisse
k.M. = keine Mutation

Fall	Gen	Mutation (Protein)	Mutationen (c.DNA)	Coverage	Mutations-Reads	Allelfrequenz [%]
FL1	CREBBP	p.S1680del	c.5039_5041del	1292	542 del	49,8
	EZH2	p.Y646F	c.1937T>A	910	57+/75-	14,5
	TNFRSF14	p.V24E	c.71T>A	7714	235+/ 213-	23,1
	TNFRSF14	p.P167fs	c.500_501insC	2858	888 ins	31,1
FL2	FOXO1	p.R21H	c.62C>T	518	163+/82-	45
	HIST1H1D	p.K185T	c.554T>G	188	51+/71-	46,2
	TNFRSF14	p.K92 *	c.274A>T	4562	755+/670-	71,4
FL3	FOXO1	p.W25R	c.73A>T	993	95+/79-	17,5
FL4	CREBBP	p.R1446P	c.4337C>G	350	108+/97-	58,1
	KMT2D	p.Q3401*	c.10201G>A	367	66+/53-	32,4
FL5	CREBBP	p.D1505V	c.4514T>A	114	40+/24-	56,1
	KMT2D	p.E490*	c.1468C>A	1156	228+/267-	42,8
	TNFRSF14	p.C57S	c.169T>A	3849	144+/107-	12,6
FL6	CREBBP	p.D1480del	c.4436_4438del	5878	3597 del	60
	KMT2D	p.L4483fs	c.13448del	614	179 del	21,9
FL7	CREBBP	p.A1473T	c.4417C>T	5057	216+/268-	24,2
	FOXO1	p.P26A	c.77G>C	1392	146+/111-	18,4
	KMT2D	p.R4536*	c.13606G>A	1873	196+/227-	22,6

	EZH2	p.Y646N	c.1936A>T	827	83+/79-	19,3
	HIST1H1E	p.A144V	c.431C>T	786	25+/ 291-	41,1
FL8	EP300	p.M289V	c.865A>G	1623	381+/421-	49,4
FL9	FOXO1	p.G450R	c.1348C>T	136	19+/16-	25,7
	KMT2D	p.E1765K	c. 5293C>T	219	20+/18-	17,4
	KMT2D	p.E4836K	c.14506C>T	218	28+/17-	20,6
	KMT2D	p.D5462N	c.16385C>T	162	8+/ 24-	19,6
	KMT2D	p.R5500Q	c.16499C>T	148	22+/15-	24,7
	HIST1H1E	p.P118S	c.352C>T	2735	497+/123-	31,2
	TNFRSF14	p.C93F	c. 278G>T	1628	115+/ 101-	13,3
FL10	k. M.					
FL11	k. M.					

3.4 Überprüfung der detektierten Mutationen hinsichtlich ihres potenziell malignen Potentials

Mittels der Online-Tools PolyPhen-2 und SIFT wurden die Punktmutationen mit Aminosäureaustausch auf ihr vorhergesagtes malignes Potential hin überprüft. Für Inframe-Deletionen wurde das Tool Provean verwendet. Der vorzeitige Einbau eines Stoppcodons und Frameshift-Mutationen wurden unabhängig von der Bewertung als schädliche Mutationen gewertet.

15 der 20 untersuchten Punktmutationen mit Aminosäureaustausch wurden mittels PolyPhen-2 als „Probably Damaging“ oder „Possibly Damaging“ bewertet.

Ebenfalls 75% der Punktmutationen mit Aminosäureaustausch wurden mittels SIFT als schädlich bewertet.

Eine Diskrepanz zeigte sich in zwei der Untersuchten Varianten. Die Mutation p.E4836K im *KMT2D* wurde von PolyPhen-2 als potenziell schädlich eingestuft wobei der Algorithmus von SIFT diese Mutation für tolerabel hält. Ebenfalls diskrepanz zeigte sich die Einstufung der Mutation p.W25R im *FOXO1*. Hier jedoch wurde die Mutation von SIFT als „Damaging“ bewertet während PolyPhen-2 die Mutation als benigne einstuft.

Die Inframe-Deletion in *CREBBP* wurde als schädliche Variante klassifiziert.

Eine Aufstellung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 21.

3.5 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung

Mittels Sanger-Sequenzierung konnten 23 der 28 festgestellten Varianten bestätigt, wie in Abbildung 11 exemplarisch dargestellt, und methodische Artefakte des NGS somit ausgeschlossen werden. (Tabelle 21)

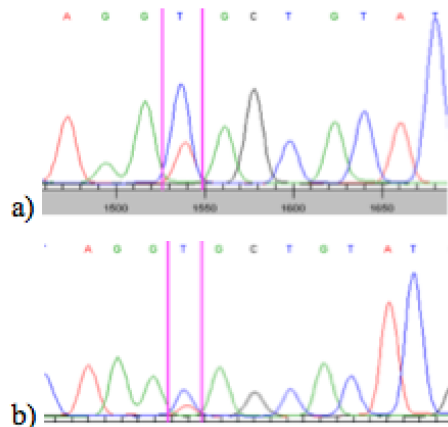


Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung anhand FL1 bei *TNFRSF14* (c.71T>A, p.V24E).

a) Forward, b) Reverse

Die Amplitude entspricht der detektierten Fluoreszenz. Der pink gekennzeichnete Bereich zeigt jeweils 2 Peaks, dies entspricht dem detektierten Basenaustausch T(blau) > A(rot).

CREBBP zeigte mit fünf Missense-Mutationen die meisten genetischen Alterationen. Zwei Varianten wurden in *EZH2* detektiert, beide davon Missense-Mutationen an der Position Y646. In *TNFRSF14* konnten vier Missense-Varianten festgestellt werden, eine davon zeigte eine Alteration in ein Stoppcodon. *TNFRSF14* zeigt zusätzlich eine Frameshift-Mutation durch die Insertion eines Cytosins. Eine Missense-Variante wurde im *HIST1H1D* detektiert. Ebenso wurden zwei Missense-Mutationen in *HIST1H1E* detektiert. In *FOXO1* konnten drei Missense-Mutationen festgestellt werden. *EP300* zeigte eine Missense-Variante. Vier Missense-Mutationen konnten in *KMT2D* nachgewiesen werden, drei dieser Varianten zeigten eine Veränderung in ein Stoppcodon, außerdem ließ sich hier eine Frameshift-Mutation nachweisen.

Tabelle 21: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse nach Validierung mittels Sanger-Sequenzierung

*: keine Aussage bezüglich des Vorliegens einer als maligne bewerteten Variante in PolyPhen-2 oder SIFT. Bewertung als „Deleterious“ mit dem Provean-Tool.

Fall	Gen	Mutation (Protein)	Mutationen (c.DNA)	Validierung	PolyPhen2	SIFT
FL1	CREBBP	p.S1680del	c.5039_5041del	bestätigt	-*	-*
	EZH2	p.Y646F	c.1937A>T	bestätigt	Probably Damaging	Damaging
	TNFRSF14	p.V24E	c.71T>A	bestätigt	Probably Damaging	Damaging
	TNFRSF14	p.P167fs	c.500_501insC	bestätigt	-	-
FL2	FOXO1	p.R21H	c.62G>A	bestätigt	Probably Damaging	Damaging
	HIST1H1D	p.K185T	c.554A>C	bestätigt	Possibly Damaging	Damaging
	TNFRSF14	p.K92 *	c.274A>T	bestätigt	-	-
FL3	FOXO1	p.W25R	c.73T>A	bestätigt	Benign	Damaging
FL4	CREBBP	p.R1446P	c.4337G>C	bestätigt	Probably Damaging	Damaging
	KMT2D	p.Q3401*	c.10201C>T	bestätigt	-	-
FL5	CREBBP	p.D1505V	c.4514A>T	bestätigt	Probably Damaging	Damaging
	KMT2D	p.E490*	c.1468G>T	bestätigt	-	-
	TNFRSF14	p.C57S	c.169T>A	bestätigt	Probably Damaging	Damaging
FL6	CREBBP	p.D1480del	c.4436_4438del	bestätigt	-	-
	KMT2D	p.L4483fs	c.13448del	bestätigt	-	-
FL7	CREBBP	p.A1473T	c.4417G>A	bestätigt	Probably Damaging	Damaging
	FOXO1	p.P26A	c.77C>G	bestätigt	Possibly Damaging	Damaging
	KMT2D	p.R4536*	c.13606C>T	bestätigt	-	-
	EZH2	p.Y646N	c.1936T>A	bestätigt	Probably Damaging	Damaging
	HIST1H1E	p.A144V	c.431C>T	bestätigt	Benign	Tolerated
FL8	EP300	p.M289V	c.865A>G	bestätigt	Benign	Tolerated
FL9	FOXO1	p.G450R	c.1348G>A	nicht bestätigt	Benign	Tolerated

	KMT2D	p.E1765K	c. 5293G>A	nicht bestätigt	Probably Damaging	Damaging
	KMT2D	p.E4836K	c.14506G>A	nicht bestätigt	Probably Damaging	Tolerated
	KMT2D	p.D5462N	c.16385G>A	nicht bestätigt	Probably Damaging	Damaging
	KMT2D	p.R5500Q	c.16499G>A	nicht bestätigt	Probably Damaging	Damaging
	HIST1H1E	p.P118S	c.352C>T	bestätigt	Benign	Tolerated
	TNFRSF14	p.C93F	c. 278G>T	bestätigt	Probably Damaging	Damaging

3.6 Spektrum der Detektierten und validierten Mutationen

FL1 zeigt eine Inframe-Deletion in *CREBBP*, die zu einem Verlust von Serin führt. Aufgrund der Allelfrequenz (49,8%) ist hier auch eine Keimbahnmutation bzw. das Vorliegen eines SNP möglich. Diese Variante wurde mittels Provean-Tool analysiert und als „Deleterious“ bewertet. Eine sichere Beurteilung, die auf der Allelfrequenz beruht ist nicht möglich, da hier keine Erkenntnisse über mögliche Veränderungen in der Kopienanzahl vorliegen. Bei der Mutation in *EZH2* und einer Mutationen im *TNFRSF14* handelt es sich jeweils um einen Basenaustausch. Die Mutation in *TNFRSF14* lies mit höherer Allelfrequenz (14,5% zu 23,1%) als die Mutation in *EZH2* detektieren, sodass evtl. ein Subklon mit beiden Mutationen vorliegt. Zudem wurde noch eine Insertion, welche zu einem Frameshift führt, im *TNFRSF14* (in 31,1%) detektiert. Alle in FL1 detektierten Mutationen wurden als dysfunktional für die Proteinfunktion bewertet.

Die Mutationen, welche in FL2 detektiert wurden, konnten alle mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Es ist jedoch zu erwähnen, dass die Mutationen in *FOXO1* und *HIST1H1D* insgesamt deutlich weniger Reads zeigten als die in *TNFRSF14* (n=4562). Ebenfalls zu berücksichtigen ist die Diskrepanz der Mutations-Reads in diesen Fällen von Forward zu Reverse und dass es sich bei der Mutation im *FOXO1* um eine Substitution handelt, wie sie auch im Rahmen von Desaminierungsartefakten auftreten kann. Durch die Bestätigung mittels Sanger-Sequenzierung erscheint

das Vorliegen eines Artefakts jedoch als unwahrscheinlich. Die Mutation in *TNFRSF14* führt zu einem vorzeitigen Einbau eines Stoppcodons. Alle Mutationen, welche in FL2 festgestellt wurden, wurden als schädlich bewertet.

Eine Missense-Variante in *FOXO1* mit einer Frequenz von 17,5% war die einzige in FL3 detektierte Mutation. Die Mutation in FL3 zeigt unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Einschätzung ihres schädlichen Charakters.

Die Mutation in *KMT2D* im Fall FL4 zeigte ebenfalls eine Mutation wie sie durch Desaminierungsartefakte entstehen kann, da diese Mutation mittels eines methodisch anderen Verfahrens bestätigt wurde, ist dies auszuschließen. Der Basenaustausch führt zu einem verfrühten Stoppcodon in der Aminosäuresequenz. Die Coverage zeigte sich vergleichbar mit der ebenfalls in diesem Fall detektierten Mutation in *CREBBP*. Die Mutationsreads zeigen einen geringeren Anteil in *KMT2D* (32,4%) im Vergleich zu *CREBBP* (58%). Hier ist neben einer artifiziellen Veränderung auch das Vorliegen einer Subpopulation diskutieren. Die detektierten Mutationen sind als dysfunktionale Mutationen bewertet worden.

In FL5 wurden 3 Varianten detektiert. Die Veränderungen in *KMT2D* zeigt eine Missense-Mutation mit dem vorzeitigen Auftreten eines Stoppcodon, die Allelfrequenz dieser Veränderung lag bei 42,8%. Die Mutation in *CREBBP* ist ebenfalls eine Missense-Mutation, diese jedoch mit einer deutlich niedrigeren Coverage (n=114) sowie einer Diskrepanz in den Forward- zu Reverse-Reads (n(+)=40 zu n(-)=24)). Trotz dieser Diskrepanz konnte die Mutation auch in der Sanger-Sequenzierung nachgewiesen und somit validiert werden.

Das es sich bei der Missense-Mutation im *TNFRSF14* um einen Subklon (mit lediglich 12,6%) handelt, erscheint angesichts der Allelfrequenz (12,6% zu 56,1% bzw. 42,8) wahrscheinlich. Allen festgestellten Varianten wurde eine schädliche Wirkung zugeschrieben.

Beide in FL6 detektierten und bestätigten Varianten zeigten Deletionen. Eine Variante zeigte eine Inframe-Deletion von 3bp, die andere in diesem Fall detektierte Variante

welche bestätigt wurde, war eine Frameshift-Mutation (fs) mit dem Verlust eine Thymin. Auffällig ist, dass sich in diesem Fall zwei Mutationen zeigten, bei denen es sich in beiden Fällen um Deletionen handelt. Die festgestellten Varianten zeigen einen schädlichen Charakter.

Im Fall FL7 zeigten drei der fünf detektierten und bestätigten Mutationen Alterationen wie sie prinzipiell im Rahmen des Fixationsprozesses entstehen können, auch hier erscheint das Vorliegen von Artefakten bei Bestätigung der Mutation mit einem anderen Nachweisverfahren als unwahrscheinlich. Sowohl die niedrigste (n=786) als auch die höchste (n=5057) Coverage in diesem Fall zeigten sich bei diesen Mutationen. Bis auf die Mutation in *HISTIHIE* (mit 41% Mutationsreads) zeigten alle Mutationen in diesem Fall eine Mutationsrate um etwa 20%. Bei der Mutation in *HISTIHIE* zeigte sich zudem eine deutliche Diskrepanz in der Anzahl an Forward-(n=25) zu Reverse-(n=291) Reads. Da die Alteration Cytosin in Thymin selbstverständlich auch im Rahmen einer tatsächlich stattgehabten Mutation und nicht nur artifiziell auftreten kann und die Frequenz der detektierten Mutationen bis auf *HISTIHIE* alle um etwa 20% lagen, ist hier anzunehmen, dass es sich um einen Klon handelt, welcher alle diese Mutationen aufweist.

Die Mutation in *HISTIHIE* wurde als benigne bewertet, die anderen festgestellten Varianten als schädlich.

FL8 ist der einzige Fall welcher eine Mutation im *EP300* zeigte. Zudem zeigte der Fall auch nur diese Mutation, bei welcher es sich um einen Basenaustausch handelt, der zu einer Missense-Mutation führt. Sowohl die Coverage als auch die Reads zeigten zufriedenstellende hohe Werte und in den Forward- und Reverse-Reads zeigte sich kein relevanter Unterschied. Die Allelfrequenz lag bei 49,4%. Hier ist zu diskutieren ob die Mutation als Keimbahnmutation oder ob ein Tumorzellgehalt von nahezu 100% vorliegt, vor allem da diese Mutation als benigne eingestuft wird.

Alle nicht validierten Mutationen in dem Fall FL9 zeigten einen Austausch von Cytosin zu Thymin. Auch eine der bestätigten Mutationen in diesem Fall im *HISTIHIE* zeigte einen Austausch von Cytosin zu Thymin. Hier zeigt sich jedoch im Vergleich eine deut-

lich höhere Coverage. Unter Berücksichtigung der eingeschränkten Qualität, sowohl im Hinblick auf Fragmentierung und v.a. das wahrscheinliche Vorliegen von Desaminierungsartefakten handelt es sich bei den nicht validierten Mutationen vermutlich um Artefakte. Die Mutation in FL9 *HIST1H1E* wurde trotz der besseren Coverage ebenfalls mit Vorsicht gewertet, auch im Hinblick auf die Diskrepanz in den Forward (n=497) zu den Reverse (n=123) detektierten Reads. Es ist durchaus möglich, dass diese Alteration durch Desaminierungsartefakte entstanden ist und diese lediglich in einem besser erhaltenen Fragment lagen.

Lediglich die Mutationen in *FOXO1* sowie in *HIST1H1E* wurden als benigne bewertet. Die anderen detektierten Mutationen sind als schädlich eingestuft.

In Abbildung 12 sind alle bestätigten Varianten graphisch dargestellt.

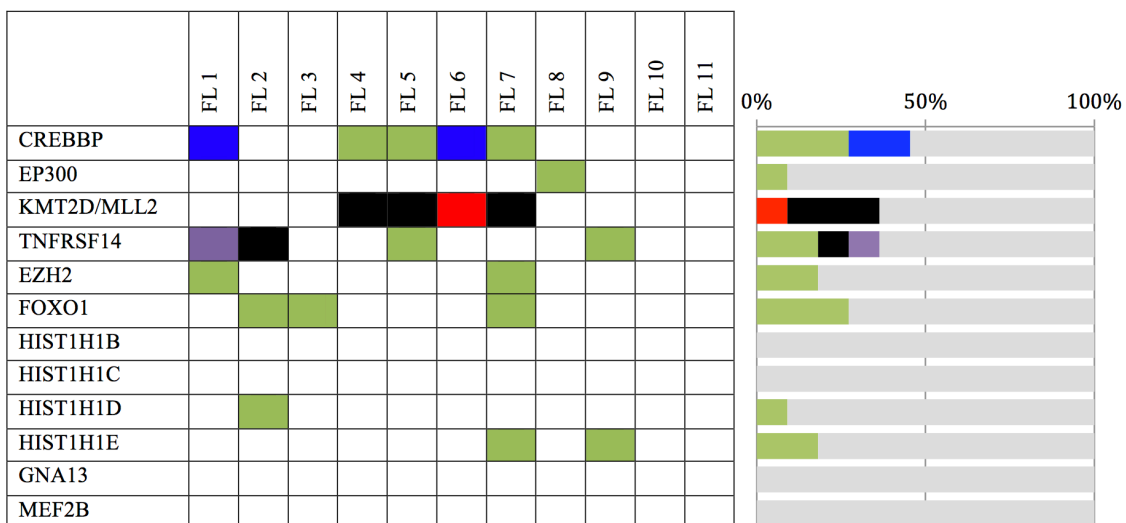


Abbildung 12: Aufstellung der mittels Sanger-Sequenzierung bestätigten Varianten.

■: Punktmutation mit Aminosäureaustausch.

■: Inframe-Deletion.

■: Frameshift-Mutation.

■: Punktmutation mit vorzeitigem Stoppcodon.

■: Zwei detektierten Mutationen: eine Punktmutation mit Aminosäureaustausch sowie einer Frameshift-Mutation durch Insertion.

Das Balkendiagramm zeigt die Häufigkeit der unterschiedlich gekennzeichneten Mutationsarten im jeweiligen Gen im Kollektiv.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 11 Fälle von t(14;18)-negativen FLs hinsichtlich des Auftretens von Mutationen in epigenetisch wirksamen Genen, welche in der Gesamtheit der FLs häufig beschriebenen sind, hin untersucht.

4.1 Patientenbezogene Ergebnisse

Das mittlere Erkrankungsalter der untersuchten Patienten liegt bei 66 Jahren, was mit den Angaben der Literatur bzgl. des Erkrankungsalters bei der Gesamtheit der FLs (in der 6. Lebensdekade) übereinstimmt [1].

In 45% der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gewebe handelt es sich um axilläre Lymphknoten. Dies zeigt sich im Gegensatz zum Subtyp der BCL2-negativen FLs mit diffusem Wachstumsmuster. Bei letzterem zeigte sich in 83% der Fälle ein primärer Befall der inguinalen Lymphknoten [85].

Die untersuchten Fälle zeigten in 64% der Fälle ein Low-Grade (1 oder 2) FL und lediglich 1 Fall zeigte ein Grad 3A-FL. Hier zeigt sich ein anderes Bild, als es z.B. von Guo et al. beschrieben wurde. In deren Kohorte lediglich 6 von 28 t(14;18)-negativen FL ein Grad 2 aufwiesen und sich kein FL mit Grad 1 zeigte [34]. Ausgeschlossen wurden Grad 3B Lymphome, da diese einen aggressiveren klinischen Verlauf zeigen welcher dem eines DLBCLs entspricht [12].

4.2 Vergleich der Ergebnisse von NGS und Sanger-Sequenzierung

4.2.1 Mögliche Fehlerquellen beim NGS

Zwei der 11 Untersuchten Fälle zeigen keine Mutation in den untersuchten Genen.

Die Panelanalyse kann aufgrund der Vielzahl der eingesetzten Primer und der möglichen Interaktionen dieser miteinander häufig nicht den gesamten Zielbereich abdecken. Somit konnten einzelne Bereiche der Gene, bei denen die komplette kodierende Sequenz untersucht werden sollte, im Design nicht abgedeckt werden. Es ist somit mög-

lich, dass Mutationen in diesen nicht abgebildeten Sequenzen vorliegen und nicht detektiert werden konnten.

Bekannte Schwachstellen bei der Halbleitermethode sind die „homopolymer stretches“. Die Genauigkeit der Sequenzierung vieler gleicher Basen hintereinander nimmt mit steigender Anzahl ab. Beim Fluten der „Wells“ mit den dNTPs wird eine fehlerhaft hohe Anzahl an Wasserstoffionen detektiert und somit von zu vielen gleichartigen Basen nacheinander im synthetisierten Strang ausgegangen. Diese Fehlerart ist ein der Ergebniserzeugung bei der Halbleitermethode geschuldeter und spezifischer Fehler dieses Verfahrens [123, 124].

Diese Art des Fehlers zeigte sich in keiner im NGS validierten aber nicht mittels Sanger-Sequenzierung bestätigten Mutation.

4.2.2 Vergleich NGS und Sanger-Sequenzierung

82,1% der mittels NGS detektierten Mutationen konnte mit der Sequenzierung nach Sanger bestätigt werden.

Die Mutationen, die nicht bestätigt werden konnten traten in lediglich einem Fall auf (FL9). Dieser Fall zeigte bereits im Vorfeld eine mangelnde Qualität. In der Testung der Amplifizierbarkeit der DNA zeigten sich maximal 200 bp lange Produkte.

Alle diese nicht bestätigten Mutationen zeigten zudem, im Vergleich zum Großteil der bestätigten Fälle, eine reduzierte Coverage von 136 Reads im *FOXO1* bzw. 146 bis 219 Reads im *KMT2D*. Lediglich ein anderer Fall (FL5) zeigte in einer Variante von *CREBBP* eine ähnlich niedrige Coverage (114 Reads) mit < 50 Mutationsreads.

Trotz der insgesamt sehr ähnlichen Ergebnisse von Sanger-Sequenzierung und NGS-Analyse bleibt festzuhalten, dass die erhöhte Sensitivität, wie sie die neuen Verfahren zeigen, auch eine erhöhte Gefahr für die Detektion von artifiziellen Veränderungen besteht.

Es ist bekannt, dass die NGS Verfahren auch bei niedrigeren Allelfrequenzen noch valide Ergebnisse liefern können, bei denen sie Sanger-Sequenzierung nicht sensitiv genug ist [125]. Die niedrigste Allelfrequenz der mittels Sanger-Sequenzierung untersuchten und validierten Mutationen betrug 12,6%, die Varianten die nicht bestätigt werden

konnten zeigen alle eine höhere Frequenz, sodass die mangelnde Sensitivität der Methodik keine Begründung für die Diskrepanz der Ergebnisse ist.

Ein Beispiel für Fehldetektionen durch mangelnde Qualität kann jedoch theoretisch auch in beiden Verfahren zum selben falschen Ergebnis führen. So wie beispielsweise ein Basenaustausch von Cytosin in Thymin bzw. Uracil durch eine Desaminierung der Ursprungsbase, wie sie im Rahmen des Fixationsprozesses auftreten kann. Bei Nachweis der Mutation in beiden Strängen in zwei unterschiedlichen Sequenzierungsverfahren ist jedoch davon auszugehen, dass es sich nicht um Artefakte handelt [126].

Die erhöhte Sensitivität bietet aber auch Möglichkeiten. Mutationen die früher aufgrund der geringen Allelfrequenz ($> 15\%$) im untersuchten Material nicht detektiert werden konnten sind nun auffindbar [127, 128]. Daher ist eine hohe Sorgfalt in der Auswertung solcher Fälle notwendig, damit nicht fälschlicherweise (möglicherweise therapie-relevante) Mutationen angegeben werden, bei denen es sich jedoch nur um Artefakte handelt. Ebenso dürfen Mutationen von beispielsweise einem ggf. prognoseführenden Subklon aufgrund der geringen Allelfrequenz in der Analyse (z.B. durch Tumorerheterogenität) nicht übersehen bzw. als Artefakt klassifiziert werden.

4.3 Untersuchte Gene und ihre Funktion

4.3.1 CREBBP und EP300

Die Daten zur Häufigkeit des Auftretens von Mutationen in *CREBBP* in BCL2-positiven FLs sind nicht eindeutig, so schwanken die Zahlen zwischen 32 und 75% [51, 59, 60]. Bei 45,5% gefundenen Mutationen zeigt sich hier somit kein Unterschied zur Literatur (95%-KI 16,7 – 76,6%).

Funktionell sowie strukturell hat *EP300* eine starke Ähnlichkeit zu *CREBBP* weshalb es im selben Abschnitt behandelt wird.

Eine Mutation in *EP300* tritt in ca. 9 bis 14% der Fälle auf [59, 60]. In den hier untersuchten Fällen zeigte ein Fall eine Mutation (9,1%; 95%-KI 0,2 - 42,3%) in *EP300*. Aufgrund der geringen Fallzahl zeigt sich eine konkrete Aussage bzgl. der tatsächlichen

Häufigkeit erschwert. Die Angaben aus der Literatur befindet sich jedoch im ermittelten Konfidenzintervall.

Die Gesamtheit der Mutationen in *CREBBP* und *EP300* wird aber mit einem Auftreten von mindesten 41% angegeben und trat in den hier untersuchten t(14;18)-negativen FLS mit einer Häufigkeit von 54,5% (95%-KI 23,4 – 83,3%) auf [51, 60].

Beim *CREBBP* handelt es sich wie auch beim *EP300* um eine Histon Acetyltransferase, die physiologischerweise die Histone H3 sowie H4 und weitere nicht-histonassoziierte Gene acetyliert. Eine Mutation, welche die Funktion dieses Proteins einschränkt, führt zum Ausbleiben der Acetylierung und damit zum veränderten Verhalten der Zielgene. *CREBBP* fungiert physiologischerweise als Tumorsuppressor [129].

Durch die Acetylierung wird die Ladung der Aminosäure Lysin neutralisiert, weshalb diese beiden Gene als Lysine (K) Acetyltransferasen bezeichnet und im speziellen der KAT3- Familie zugeordnet werden [59, 130].

Die Neutralisation der Ladung führt zu einer Öffnung der Chromatinstruktur und damit zu einer erleichterten Rekrutierung von, für die Transkription notwendigen, Cofaktoren [59, 130].

Neben der Acetylierung von Histonen werden auch Lysinreste von anderen Proteinen von *CREBBP* (und *EP300*) in ihrer Ladung und damit Funktionalität alteriert. So ist ein Ziel das *MHCII*-Gen. Durch die Veränderung des Verhaltens dieses Gens wird die Antigenexpression reduziert, dies führt zu einer Immunevasion der Tumoren [61].

Die Mutation in S1680 (Inframe-Deletion von 3bp mit Verlust von Serin) wurde bereits im Zusammenhang mit Lymphomerkrankungen beschreiben [60].

Die Mutation in R1446 liegt in der HAT-Domän des Proteins (Position 1323 – 1700) und ist ebenfalls im Kontext von Lymphomen und Leukämien beschrieben [60, 131, 132]. Bei der HAT-Domäne handelt es sich um die katalytisch aktive und konservierte Einheit der Proteine [133].

Auch die anderen gefundenen Mutationen (D1505V, G1479D, A1473T) liegen in der HAT-Domäne [130, 132, 134]. Diese sind bisher nicht im Rahmen von Malignomerkrankungen beschrieben, es liegt aber Nahe, dass auch andere Alterationen in dieser hochenzymatisch aktiven Domäne, ähnliche Effekte wie die bereits beschriebenen Mutationen zeigen könnten. Alle der im Rahmen dieser Arbeit detektierten *CREBBP* Varianten sind als schädlich eingestuft.

Die Mutation M289V in *EP300* wurde bisher nicht im Rahmen von Lymphomen beschrieben, liegt aber in der Nähe der Zinkfingerdomäne, dem mit der DNA interagierende Anteil des Genproduktes [135, 136]. Es wurden bereits Mutationen zwischen TAZ (Transcription Adaptor putative Zinc finger) und NRID (nuclear-receptor interaction domain) bei Follikulären Lymphomen beschrieben [137]. Mutationen in der HAT-Domäne von *EP300* (Position 1195 – 1673) wurden in den, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, Fällen nicht detektiert, finden sich aber beispielsweise in DLBCLs [138, 139].

Die Mutation in *EP300* wurde (entsprechend des freizugänglichen Online-Archivs ClinVar) beispielsweise bei Patienten mit Colonkarzinom beschrieben oder bei Patienten mit einem Rubinstein-Taybi-Syndrom (entsprechend ClinVar), aber auch bei gesunden Individuen und wurde jeweils als Keimbahnmutation sowie (anhand der Kriterien der AMCG-Leitlinie von 2015 bzw. der Arbeit von Nykamp et al. und in der Überprüfung mittels PolyPhen-2 und SIFT) als benigne gewertet [140-143]. Auch zeigt sich eine Häufigkeit dieser Variante von nahezu 50%, sodass auch hier das Vorliegen eines SNP wahrscheinlich ist.

Andere Zielgene dieser Acetyltransferasen sind unter anderem *BCL6*, *FOXO1* und *p53* [144, 145]. Bei *BCL6* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der besonders in der Keimzentrumsentwicklung eine wichtige Rolle spielt [146]. Eine Acetylierung führt hier zu einer Inaktivierung [144]. Eine Mutation in den für die Acetylierung verantwortlichen Genen führt somit zu einer konstitutiven Aktivität von *BCL6*, dies hat eine verminderte Differenzierung der betroffenen Zellen sowie eine erhöhte Toleranz und somit Akkumulation von DNA-Schäden zur Folge. Dies führt somit wahrscheinlich auch zum typischen Phänotyp des FL [147].

FOXO1 wird in einem gesonderten Abschnitt (4.3.5) behandelt.

Mutation in den Genen der KAT3-Familie scheinen zudem zu einer erhöhten proliferativen Aktivität der Zellen zu führen und somit insgesamt einen Proliferationsvorteil zu liefern [129].

4.3.2 KMT2D (MLL2)

Bei KMT2D handelt es sich um eine Methyltransferase, die vornehmlich Histon H3 methyliert. Eine Mutation in dem kodierenden Gen ist in 50 bis zu 89% der BCL2-positive FLs beschrieben [51, 59, 60, 68, 148]. In dieser Arbeit zeigten vier Fälle (36,4%, 95%-KI 10,9 – 69,2%) eine Mutation in diesem Gen. Das Konfidenzintervall zeigt etwas niedrigere Werte als die in der Literatur beschriebenen Angaben. Mutationen im KMT2D können u.a. zu einer erhöhten Expression von BCL2 führen, weshalb evtl. t(14;18)-negative FLs aufgrund einer durch andere Mechanismen hervorgerufenen Überexpression von BCL2 im Vorfeld dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden und daher der prozentuale Anteil an *KMT2D*-mutierten FLs fälschlicherweise zu niedrig ermittelt wurde [149]. Andere mögliche Gründe für ein Abweichen der Häufigkeit kann die geringe Stichprobengröße sein oder, dass die Abdeckung des Panels (mit ca. 96%) evtl. vorliegende Mutationen nicht erfasst.

KMT2D wird in allen Stadien der B-Zellentwicklung exprimiert, lediglich Plasmazellen zeigen keine Expression dieses Gens [150]. KMT2D ist notwendig für die globale H3K4-Monomethylierung, welche eine wichtige Rolle für die Funktion von u.a. Enhancer-Elementen oder Stressantwortgenen spielt [151, 152].

Ein Verlust der Funktion des Proteins führt zur Proliferation und einem gesteigerten Überleben der betroffenen Zellen, u.a. durch eine erhöhte Expression von BCL2 [149]. Die Datenlage zum zeitlichen auftreten dieser Mutationen ist uneinheitlich. So wird sie von manchen Autoren als sehr frühes Ereignis in der Tumorgenese angesehen, während andere Autoren angeben, dass es sich hierbei am ehesten um eine Mutation handelt, welche im Krankheitsverlauf zusätzlich akquiriert wird und die sie daher als Akzelerator ansehen [51, 149]. In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fällen zeigt sich *KMT2D* nur gemeinsam mit Mutationen im CREBBP und stets mit einer geringeren Allelfrequenz. Veränderungen im CREBBP werden als Treibermutationen angesehen, sodass dies die Annahme bestätigt, dass es sich bei KMT2D um einen Akzelerator handelt.

Neben Histon H3 methyliert KMT2D auch andere Tumorsuppressorgene. Ein Zielgen dieses veränderten Ableseverhaltens stellt z.B. das *TNFRSF14*-Gen dar, dieses wird in einem eigenen Abschnitt (4.3.3) behandelt [150].

„Loss of Function“ Mutationen in *KMT2D* sind auch bei anderen Tumorentitäten wie beispielsweise dem kleinzelligen Bronchialkarzinom und dem Nierenzellkarzinom beschrieben. *KMT2D* wird eine Rolle als Tumorsuppressorgen zugeschrieben [68, 153, 154]. Bei den gefundenen und bestätigten Mutationen zeigten sich entweder ein verfrühtes Stoppcodon oder eine Frameshift-Mutation, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich auch bei den hier detektierten Mutationen um „Loss of Function“ Mutationen handelt. Die detektierten Mutationen sind als potenziell maligne zu bewerten auch wenn die genauen Lokalisationen bisher nicht beschrieben sind.

4.3.3 TNFRSF14

TNFRSF14 wird generell eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben und das Auftreten einer Mutation im FL wird in der Literatur mit 25% bis zu 44% angegeben [51, 74]. In dieser Arbeit konnten Mutationen in diesem Gen in 4/11 Fällen (36,4%, 95%-KI 10,9 – 69,2%) detektiert werden. Wie bereits beschrieben sind die Konfidenzintervalle konservativ bestimmt, sodass ähnliche Werte wie in der Gesamtheit der FLs anzunehmen sind.

Bei der Mutation des *TNFRSF14*-Gens handelt es sich um eine Akzeleratormutation, d.h. ein späteres Ereignis, dass den Krankheitsverlauf beschleunigt [60].

In den Fällen FL1 und FL5 bei welchen zusätzlich zur Mutation im *TNFRSF14* noch Veränderungen im *CREBBP* auftreten, bei welchen es sich bekannterweise um eine Driver-Mutation handelt, zeigt sich die Allelfrequenz des *TNFRSF14* jeweils niedriger als die des *CREBBP* (23,1%/31,1% zu 49,8% bzw. 12,6% zu 56,1 %) [51]. Dies ist als Bestätigung der beschriebenen zeitlichen Abfolge zu werten, da ein Subklon mit beiden Mutationen sich a. E. erst im Verlauf entwickelt hat.

Das Protein ist Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie und wird physiologischerweise in B-Zellen des Keimzentrums nicht exprimiert [155, 156].

Eine Rolle in der Aktivierung der B-Zellen ist für dieses Gen beschrieben, welches physiologischerweise von B-Zellen in der Mantel- und Marginalzone sowie von T-Helferzellen des Keimzentrums exprimiert wird [155, 157, 158].

Die Mutationen liegen vornehmlich in der extrazellulären Domäne des Proteins, dies führt zu einer reduzierten Oberflächenexpression [74, 159]. Die Mittels SIFT und PolyPhen-2 überprüften Varianten wurden als dysfunktional eingestuft.

Die gefundene Mutation in V24E wurde bereits bei pädiatrischen FLs beschrieben und liegt in einer Betafaltblattstruktur, welche mit dem Bindungszentrum der extrazellulären Domäne interagiert [72, 160]. Auch die zweite in FL1 detektierte Mutation mit einer Frameshift-Mutation, durch eine Insertion an Position 167, liegt in der extrazellulären Domäne [74]. Frameshift-Mutation in der Nähe dieser Region wurden bereits im Zusammenhang mit MALT-Lymphomen beschrieben [159]. Durch die veränderte Aminosäuresequenz erscheint eine regelrechte Funktionserfüllung des Proteins als unwahrscheinlich.

Auch wurden in adulten follikulären Lymphomen Mutationen in frühen (N-terminalen) Regionen beschrieben [161]. Die Mutation in K92 führt zum verführten Kettenabbruch und somit zu einer reduzierten Funktion des Proteins.

C57S sowie die fragliche Mutation C93F (FL9) liegen direkt vor bzw. in einem Loop [162]. Dieser Loop ist verantwortlich für die korrekte dreidimensionale Anordnung dieses transmembranären Proteins und Mutationen in dieser Region führen somit wahrscheinlich ebenfalls zu einer reduzierten Funktion oder einem Funktionsverlust.

4.3.4 EZH2

Bei EZH2 handelt es sich wie bei KMT2D um eine Methyltransferase deren Ziel Histon H3 ist, eine Mutation in diesem Gen tritt in 7% bis etwa $\frac{1}{4}$ der FL auf [55, 59].

Mutationen im EZH2-Gen wurden im Rahmen dieser Arbeit bei 18,2% (95%-KI 2,3 – 51,8%) der untersuchten t(14;18)-negativen FLs festgestellt. Trotz der starken Schwankungsbreite des in der Literatur beschriebenen Auftretens dieser Mutation scheint die Mutationsfrequenz der BCL2-positiven und negativen Fälle übereinzustimmen. Zwei Fälle zeigten eine Mutation im *EZH2*, wobei beide Fälle ebenfalls Mutationen im *CREBBP* aufwiesen. In FL1 war die Allelfrequenz von *EZH2* deutlich geringer als die des *CREBBP* (48,8% zu 14,5%), im anderen Fall (FL7) waren die Mutationen mit ähnlicher Häufigkeit zu detektieren (24,2% zu 19,3%). Es erscheint als handle es sich beim EZH2 eher um eine Akzeleratormutation, was vor allem durch die Allelfrequenzen in

FL1 unterstützt wird [163]. Die ähnliche Häufigkeit aller in FL7 detektierten Mutationen könnte auf das Vorliegen eines (Sub-)Klons im Untersuchungsmaterial mit allen detektierten Mutationen hinweisen (siehe 3.6).

Die Expression des Gens schwankt im Verlauf der B-Zell-Entwicklung. Während naive B-Zellen keine Expression zeigen, so kommt es bei Eintritt in das Keimzentrum zu einer massiven Expression die mit zunehmender Reife wieder abnimmt [164, 165]. Zusätzlich spielt EZH2 auch eine Rolle für die Bildung von Keimzentren [166]. Bei vorliegender Mutation verbleiben die Zellen im Keimzentrumsstadium und führen so wahrscheinlich zum klassischen Phänotyp der folliculären Lymphome [166].

Die gefundene Mutation p.Y646F ist, ebenso wie die Mutation p.Y646N, eine bekannte „Gain of Function“ Mutation [55, 167]. Beide Varianten an Y646 wurden als „damaging“ eingestuft. Das mutierte EZH2 weist im Gegensatz zum Wildtyp eine erhöhte Tri-Methylierungsaktivität auf [67, 168]. Es kommt somit zu einer globalen Erhöhung von H3K27me₃, dies ist vergesellschaftet mit einer Überexpression des anti-apoptotischen BCL2 oder einem Verlust des p53 [68]. Eine Acetylierung hat genau die entgegengesetzte Wirkung und somit ist EZH2 antagonistisch zur Wirkung von CREBBP/EP300 [169].

Mutationen im EZH2 stellen ein vielsprechendes Ziel für eine zielgerichtete Therapie dar und so zeigten EZH2 Inhibitoren bereits Erfolge in der Therapie von DLBCLs und FLs [170]. Auch bei anderen Tumorentitäten wie z.B. bei Blasenkarzinomen konnte eine Wachstumshemmung durch Reduktion der EZH2 Expression gezeigt werden [171].

4.3.5 FOXO1

Es konnte bereits gezeigt werden, dass FOXO1 in Hodgkin-Lymphomen eine tumor-suppressive Wirkung hat [62].

In 3 von 11 Fällen (27,3%; 95-KI 6,0% – 60,9%) wurden Mutationen in FOXO1 detektiert, sodass die im Rahmen von Untersuchungen BCL2-positiver FLs festgestellten Werte mit ca. 6% bis maximal 52,4% sich hier im Konfidenzintervall befinden [61, 62]. Die Datenlage ist relativ gering, wie sich an der starken Diskrepanz der in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten zeigt. Es konnte aber von Green et al. gezeigt werden, dass

transformierte FLs, also solche mit einem Progress in ein DLBCL häufiger Mutationen in FOXO1 zeigen (15,6% zu 0% in der untersuchten Kohorte) [61].

Bei FOXO1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der in der Entwicklung der B-Zellen eine essentielle Rolle spielt [172]. FOXO1 ist u.a. für die V(D)J-Rekombination verantwortlich, diese ist notwendig für die Variabilität des B-Zellrezeptors [173, 174]. Auch ist FOXO1 essentiell für die Entwicklung und Polari-tätsausrichtung der Keimzentren [175].

Alle der festgestellten Mutation (p.R21H, p.W25R, p.P26A) zeigten sich in der N-terminalen Region von FOXO1 und dort nahe der T24 Phosphorylierungsstelle. Die Varianten R21H und P26A sind sowohl mittels SIFT als auch mit PolyPhen-2 als schädlich eingestuft, während die Mutation W25R von SIFT als „Damaging“ und bei PolyPhen-2 als benigne bewertet wird.

Mutationen an T24 sind bei DLBCLs beschrieben und führen über verschiedene Prozesse zu einer erhöhten Präsenz von FOXO1 im Zellkern [176]. Für die suffiziente Erfüllung der transkriptionalen Funktionen dieses Proteins scheint es aber notwendig, dass sich dieses frei zwischen Zellkern und Cytoplasma bewegen kann [177, 178].

Aufgrund der Lokalisation der nicht eindeutig bewerteten Mutation liegt es nahe, dass es sich auch bei W25R um eine schädliche Variante handelt.

FOXO1 ist zudem ein Ziel für die Acetylierung durch zwei weitere untersuchte Gene. Eine verminderte Acetylierung durch Mutation von *FOXO1* oder der acetylierenden Proteine (z.B. CREBBP und EP300) führt ebenfalls zu einer Veränderten nukleären Präsenz von FOXO1 [145, 179]. Eine verminderte Expression von CD20 bei mutiertem *FOXO1* ist beschrieben, dies ist potenziell von therapeutischer Relevanz bei Rituximab als Standardtherapeutikum [180].

4.3.6 Histon Cluster Gene: HIST1H1B, 1C, 1D und 1E

Die Gene der Histon-Proteine *HIST1H1D* und *HIST1H1E* werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit in einem gemeinsamen Abschnitt behandelt. Mutationen in den Histon Cluster Genen der H1 Familie werden in bis zu 27% der FLs beschrieben [53, 59].

Insgesamt wurden in drei der untersuchten Fälle Mutationen in den Histon Cluster Genen detektiert (27,3%; 95-KI 6,0% – 60,9%), sodass hier zumindest eine ähnliche Verteilung wie in der Literatur beschrieben angenommen werden kann.

Physiologischerweise haben die Produkte dieser Gene Funktionen in der Kompaktierung von Chromatin, in der Regulation von Methylierungsleveln einzelner Regionen und der Genexpression sowie der Regulation einzelner Entwicklungskontrollgene [181, 182].

Die genauen Effekte einzelner Mutationen konnten bisher nicht gezeigt werden. Es wurden aber verschiedene Mutationen dieser Gene in NHLs beschrieben. Ob diese Veränderungen in diesen hochkonservativen Genabschnitten weitreichendere epigenetische Konsequenzen haben bleibt unklar [183].

So konnte gezeigt werden, dass eine Mutationen in einem der Histon Cluster Gene nur geringe Effekte in der Genexpression betroffener Zellen zeigt, während sich jedoch beim Vorliegen mehrere Mutationen (im Mausmodell) eine deutliche Veränderung der Chromatinstruktur zeigte [53, 184].

Beide der detektierten Mutationen in *HIST1H1E* wurden sowohl in der Überprüfung mittels SIFT als auch in PolyPhen-2 als benigne gewertet, während die Variante von *HIST1H1D* als schädlich bewertet wurde. In wie weit die Mutationen in *HIST1H1E* bei einem gemeinsamen Auftreten mit zusätzlichen Veränderungen der Histon Cluster Gene einen malignen Charakter zeigen lässt sich ohne weitere Überprüfungen nicht ermitteln. Die Gene *HIST1H1B* und *HIST1H1C* gehören ebenfalls zu den Histon Cluster Genen, die im Zusammenhang mit FLs beschrieben werden [53]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Mutation in diesen Genen gefunden werden.

4.3.7 GNA13

In dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kollektiv zeigte sich keine Mutation im *GNA13*. Bei der geringen Fallzahl entspricht dies einem 95%-Konfidenzintervall von 0% bis 28,5%, sodass der fehlende Nachweis in diesen Fällen nicht bedeuten muss, dass bei t(14;18)-negativen FLs diese Mutation generell nicht vorzufinden ist. Die Angaben der Literatur mit 16,5 – 21% können demnach auch für die hier untersuchte Subpopulation in ihrer Gesamtheit zutreffend sein [64, 65]. Auch ist zu berücksichtigen, dass bei

einer Abdeckung des Panels von <100% evtl. vorhandene Mutationen methodisch bedingt nicht detektiert werden können.

GNAI3 kodiert für eine alpha-Untereinheit eines G-Proteins. G-Proteine sind Transmembranproteine welche physiologischerweise eine Rolle in der Kommunikation von Zellen spielen. Dabei bindet die aktivierte Untereinheit GTP und dissoziiert von der beta- und gamma-Untereinheit. Für die Zeit in der das GTP gebunden ist werden intrazelluläre Effektoren aktiviert. Die alpha-Untereinheit hat eine intrinsische GTPase-Aktivität und ist somit selbstlimitierend. Ein Effektor des Genproduktes von *GNAI3* ist Rho. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass diese GTPase relevant für eine normale B-Zellfunktion ist [185, 186].

Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesem Gen zu einer veränderten transkriptionalen Aktivität der Zelle führt [187, 188].

Eine veränderte Expression dieses Gens wurde in diversen Tumorentitäten beschrieben, u.a. in Karzinomen des Pankreas, der Mamma oder der Prostata [189-191]. Sie führt zu einem erhöhten Zellwachstum, einer Zunahme der Migration und zu vermehrter Invasion [192]. Auch eine Zunahme der Metastasierung bei mutierten Fällen wird berichtet, wahrscheinlich durch die Interaktion mit E-Cadherin (einem für die Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten notwendigen Protein) [193, 194].

Mutationen in diesem Gen sind bei NHLs mit einer schlechteren Prognose assoziiert, sowohl im Gesamtüberleben als auch im progressionsfreien Überleben [64]. Bei FLs wurden Mutationen in diesem Gen v.a. in Assoziation mit Transformationen beschrieben [63].

4.3.8 MEF2B

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fälle zeigten keine Alteration in diesem Gen. Auch hier gilt, wie unter 4.3.7 bereits erläutert, dass dies nicht bedeutet, dass kein t(14;18)-negatives FL diese Mutation aufweist, lediglich dass die gewählte Stichprobe zu klein ist um repräsentativ die wahre Häufigkeit der Mutationen abbilden zu können. Das *MEF2B-Gen* ist in 13,4% der FL mutiert [68]. Dieser Transkriptionsfaktor ist u.a. relevant für die Entwicklung von Lymphozyten [195]. Mutationen in diesem Gen führen beispielweise zu einer Reduktion der Hemmung der Chemotaxis [196]. MEF2B (co-

)reguliert zudem die Expression von *BCL6* und Mutationen wurde auch bereits im Zusammenhang mit dem Auftreten von DLBCLs beschrieben [197]. Die Datenlage bezüglich der Konsequenz von diesen Mutationen ist uneinheitlich, so sind sowohl Fälle von einer erhöhten als auch einer verminderten Expression von *BCL6* beschrieben [196, 198]. Entsprechend der Funktion von *BCL6* ist jedoch zu vermuten, dass eine „Gain of Function“ im *MEF2B*, sofern für die Entstehung eines Malignoms relevant, als wahrscheinlicher anzusehen ist.

4.4 Unterschiede der untersuchten t(14;18)-negativen FL und der allgemeinen Studienlage

Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Fällen ist kein signifikantes Ergebnis zu erzielen, jedoch stellen diese Ergebnisse, auch im Hinblick auf die Seltenheit der *BCL2*-negativen FLs einen ersten Einblick in das molekulare Profil dieser Entität dar.

Da die Erkrankung trotz Fehlen der Alteration in dem *BCL2*-Gen auftritt und sich phänotypisch von den positiven Varianten nicht unterscheidet, scheint wie bereits mehrfach gezeigt wurde, dass das Vorliegen der Mutation weder für die Entstehung noch für die Aufrechterhaltung eines follikulären Lymphoms erforderlich ist. Auch ist das Vorliegen der Mutation im *BCL2* und damit die Immortalisierung der Lymphozyten auf diesem Weg nicht für die Entstehung der Erkrankung ausreichend [49]. Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Ergebnisse bestätigen dies und zeigen ferner, dass auch genetisch keine relevanten Unterschiede zwischen den *BCL2*-positiven und -negativen FLs besteht.

Das Vorliegen der Mutation im *BCL2*-Gen ist jedoch, durch die längere Überlebensdauer der Lymphozyten und damit einer prinzipiellen erhöhten Anzahl an akquirierten Mutation, der Lymphomentstehung als zuträglich zu werten.

Der Großteil der festgestellten Mutationen befindet sich in Genen, die im Weiteren zu epigenetischen Veränderungen führen und beispielsweise das Ableseverhalten weiterer Gene verändern.

So betreffen die Mutationen beispielweise Histone selbst oder, wie beim *EZH2* Methyltransferasen welche an Histonen wirksam sind und somit auch die Kompaktierung der DNA beeinflussen.

Andere Mutationen beeinflussen die transkriptionale Aktivität der betroffenen Proteine selbst bzw. der in der Kaskade nachgeschalteten Proteine.

Weitere Untersuchungen, v.a. der Genprodukte der Zielgene entsprechend Quantität und Funktionalität müssten durchgeführt werden, um eine konkrete Aussage bzgl. der tatsächlichen Tragweite der Alterationen festmachen zu können.

4.5 Mögliche klinische Implikationen

Ein Unterschied im Gesamtüberleben zwischen BCL2-positiven und BCL2-negativen FLs zeigt sich nicht, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Diagnosestellung in t(14;18)-negativen Fällen häufig in früheren Krankheitsstadien erfolgt [82].

Die t(14;18)-negativen FLs zeigen häufiger eine extranodales Manifestation, wie beispielweise kutane Läsionen [199]. Auch sind die betroffenen Lymphknoten, zumindest in Subpopulationen der t(14;18)-negativen FLs, häufiger inguinal anzutreffen [73]. Dies könnte eine Erklärung für eine frühere Diagnosestellung sein.

Ein erhöhter Proliferationsindex in den t(14;18)-negativen Fällen konnte bereits mehrfach gezeigt werden, ebenso wie eine erhöhte apoptotische Aktivität [82, 200, 201]. Dies könnte, gerade unter dem Aspekt der fehlenden Apoptoseresistenz durch die fehlende Überexpression von BCL2, auf eine raschere Entstehung der FLs hinweisen, da die notwendigen Mutationen zur Lymphomgenese in kürzerer Zeit akquiriert werden müssen.

Interessanter Weise zeigt sich, trotz der beschriebenen häufig früheren Diagnosestellung, kein Überlebensunterschied der Patienten ohne Translokation des *BCL2*-Gens, sodass eine vergleichbare Dynamik bzw. ein vergleichbares Therapieansprechen der Subpopulationen anzunehmen ist [82].

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Hinblick auf die gefundenen Mutationen ist die funktionale Relevanz dieser von Bedeutung. So zeigen sich viele der gefundenen Mutationen in hoch aktiven und/oder konservativen Regionen von Genen, die entweder direkt oder indirekt Einfluss auf die Ausreifung und Differenzierung von Zellen haben [146, 162, 166, 176]. Hier ist sicher interessant wie sich diese Mutationen tatsächlich funktionell auswirken und ob den gefunden, bisher nicht beschriebenen Mutationen, eine relevante Rolle in der Karzinogenese zugeschrieben werden kann. Vor allem im Hinblick darauf, dass einzelne der hier mutierten Gene bereits als Targets in der zielgerichteten Therapie auch therapeutisch relevant sind [170, 171].

Da die FLs ohne die Translokation des *BCL2*-Gens häufiger in früheren Tumorstadien entdeckt werden und hier eine Vielzahl an Therapieoptionen bis hin zur watch and wait-Strategie in Frage kommen, wäre im Rahmen dessen auch eine Untersuchung bezüglich des therapiespezifischen Überlebens im Vergleich zu den t(14;18)-positiven FLs interessant [82]. Hier vor allem im Hinblick auf ggf. notwendige Anpassungen der Therapie, auch unter Berücksichtigung der beschriebene erhöhte Proliferationsrate [82].

Insgesamt lässt sich auch bei dieser relativ geringen Stichprobe zeigen, dass das t(14;18)-negative Follikuläre Lymphom ein heterogenes Muster an Mutationen zeigt, die jedoch unter Berücksichtigung der Funktionen der einzelnen Gene, zumindest theoretisch, ähnliche Effekte auf die Zellreifung und -differenzierung zeigen. Interessant sind sicher auch die Fälle, bei denen sich keine Mutation zeigte, da hier auch andere Ursachen für die Entstehung diskutiert werden müssen. Sind beispielsweise epigenetische Veränderungen, wie Acetylierung und Methylierung alleine (ohne Mutation der, die Alterationen durchführenden, Proteine wie beispielsweise EZH2) ausreichend für die Entstehung eines FLs [55]? Hier könnten z.B. Untersuchungen des Methylierungsstatus bekannter Zielgene in Zusammenschau mit einer Mutationsanalyse der methylierenden Gene Aufschluss sowohl über die Relevanz der Mutation als auch über mögliche epigenetische Alterationen geben.

Auch ist zu eruieren ob es in vermeintlich gesunden Individuen Vorläufermutationen gibt, andere als die t(14;18), welche das Auftreten eines Lymphoms vorhersagen können [49].

Untersucht wurden lediglich bereits in der Literatur im Kontext der FLs beschriebene Mutationen bzw. Gene. Eine Whole Exome Analyse der Fälle könnte evtl. neue bisher noch nicht dokumentierte Mutationen in diesen Fällen zeigen.

Auch wurden hier weder Introns, Alterationen in der Kopienzahl der Gene (Copy Number Variations = CNVs) noch alternative Splicevarianten untersucht, sodass Untersuchungen dieser wie beispielsweise mittels Whole Genome Analysen oder Microarray Analysen interessante neue Schlüsse erlauben würde.

Bei einer größer Angelegten prospektiven Studie wäre zudem die Überprüfung der klinischen Parameter im Verlauf (bzgl. Therapieansprechen, Verlauf und Rezidivrisiko) sowie im Rahmen der initialen Diagnostik, hier gerade im Hinblick auf die Lokalisation und das Initialstadium von Interesse. So ließ sich hierdurch zeigen durch welchen Mechanismus, sei es eine auffälligere Primärlokalisation oder verstärkte Symptomatik, die frühere Diagnosestellung der t(14;18)-negativen FLs zu erklären ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit einen Einblick in die diagnostischen Möglichkeiten gibt die, durch die quantitativ immer besser und zudem immer sensitiver werdenden Analyseverfahren der genetischen Diagnostik, zur Verfügung stehen. Die Subpopulation der t(14;18)-negativen FLs zeigt sich bereits in dieser kleinen Stichprobe mit einem heterogenen Mutationsmuster. Auch im Hinblick auf die immer neuen Therapieoptionen, die z.T. auch hier gefundene Gene betreffen, ist sicher auch zu klären ob andere in der Kaskade befindliche Mutationen durch zielgerichtete Therapie eines evtl. nicht-mutiert vorliegenden Zielgens zu behandeln sind.

Ebenfalls sollte, sofern möglich, in weiteren Untersuchungen dieser Art zusätzlich Blut oder anderes Material der Patienten auf die gleiche Art untersucht werden, um Keimbahnmutationen mit Sicherheit ausschließen zu können.

Sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie ergeben sich somit immer neue Optionen und Möglichkeiten, aber auch Fragen.

Nach der Beendigung der Laborarbeit im Rahmen dieser Arbeit konnte wie bereits beschrieben von Siddiqi et al. gezeigt werden, dass sich *STAT6* in *BCL2*-negativen FLs mit 82% deutlich höher als im konventionellen FL (11%) mutiert zeigt [73]. In unserer Arbeitsgruppe wurden auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fälle diesbezüglich untersucht und zeigten mit einer Veränderung in 5 der 11 Fälle ebenfalls ein erhöhtes Auftreten von Alterationen im *STAT6*, was die Ergebnisse von Siddiqi et al. unter-

stützt. 4 dieser Mutationen zeigten sich in der beschriebenen Hotspot-Region p.D419 [87].

5 Zusammenfassung

Das folliculäre Lymphom (FL) ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters und macht den zweitgrößten Anteil der non-Hodgkin-Lymphome aus. Aufgrund der unspezifischen Beschwerden wird diese Erkrankung häufig erst in fortgeschrittenen Tumor-Stadien entdeckt. Mit einer mittleren Überlebensrate von bis zu 15 Jahren ist das FL somit das häufigste der indolenten Lymphome. Die häufigste genetische Veränderung dieser Entität ist die Translokation t(14;18). Diese gewährt den betroffenen Zellen, durch eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen BCL2, einen Überlebensvorteil. Etwa 5-10% der Fälle zeigen jedoch keinen Nachweis dieser Veränderung. Während in den letzten Jahren eine Vielzahl an Studien weitere genetischen Veränderungen des konventionellen FLs untersucht haben, wurde dem den t(14;18)-negativen FL bislang weniger Beachtung geschenkt.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der molekulargenetischen Unterschiede zwischen dem Gesamtkollektiv der folliculären Lymphome und dieser Subgruppe. Zu diesem Zweck wurden bekannte, bereits in der Literatur beschriebene und vor allem epigenetisch wirksame Mutationen in 11 Fällen von t(14;18)-negativen FLs untersucht (*CREBBP*, *EP300*, *KMT2D*, *TNFRSF14*, *EZH2*, *FOXO1*, *GNA13* und *MEF2B* sowie Histon-Cluster-Gene (*HIST1H1B*, *1C*, *1D* und *1E*)).

Es konnte gezeigt werden, dass sich BCL2-negative FLs in den untersuchten Genen nicht relevant von den t(14;18)-positiven FLs unterscheiden. Auch konnten bereits favorisierte Zuordnungen einzelner Varianten als Treiber bzw. Akzeleratoren bestätigt werden. All dies bestätigt nunmehr, dass die Translokation t(14;18) alleine nicht für das Auftreten eines folliculären Lymphoms ausreichend ist, zum anderen zeigt sich hierdurch, dass der Phänotyp des FLs auch nicht von dieser Translokation abhängt und es sich trotz des Fehlens dieser Mutation um sehr ähnliche Krankheitsbilder, wenn nicht gar die gleiche Erkrankung handelt.

Auch bezogen auf die Therapie zeigen diese Ergebnisse interessante Implikationen im Hinblick auf neue Medikamente wie EZH2-Inhibitoren oder die potenziell eingeschränkte Wirksamkeit von Standardtherapien in bestimmten Konstellationen.

6 Literaturverzeichnis

1. *A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma.* Blood, 1997. **89**(11): p. 3909-18.
2. Morton, L.M., et al., *Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001.* Blood, 2006. **107**(1): p. 265-76.
3. Huh, J., *Epidemiologic overview of malignant lymphoma.* Korean J Hematol, 2012. **47**(2): p. 92-104.
4. Swerdlow, S.H., et al., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th Edition).* IARC: Lyon, 2017.
5. Czabotar, P.E., et al., *Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(1): p. 49-63.
6. Tsujimoto, Y., et al., *The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining.* Science, 1985. **229**(4720): p. 1390-1393.
7. Tan, D., et al., *Improvements in observed and relative survival in follicular grade 1-2 lymphoma during 4 decades: the Stanford University experience.* Blood, 2013. **122**(6): p. 981-7.
8. Chen, L.L., et al., *Hematologic malignancies with primary retroperitoneal presentation - Clinicopathologic study of 32 cases.* Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2005. **129**(5): p. 655-660.
9. Cetin, G., et al., *Treatment modalities of non-Hodgkin lymphoma patients over 65 years of age: A two-center experience.* J Oncol Pharm Pract, 2019: p. 1078155219839460.
10. Gribben, J.G., *How I treat indolent lymphoma.* Blood, 2007. **109**(11): p. 4617-26.
11. Buske, C., et al., *Follikuläres Lymphom- Leitlinie.* <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/follikulaeres-lymphom/@@guideline/html/index.html> DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., Januar 2017 (Zugriff: 05.05.2019).
12. Vaidyanathan, G. and M.S. Czuczman, *Follicular lymphoma grade 3: review and updates.* Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2014. **14**(6): p. 431-5.
13. Freedman, A., *Follicular lymphoma: 2011 update on diagnosis and management.* Am J Hematol, 2011. **86**(9): p. 768-75.
14. Sachen, K.L., et al., *Self-antigen recognition by follicular lymphoma B-cell receptors.* Blood, 2012. **120**(20): p. 4182-90.
15. Choi, S.M., B.L. Betz, and A.M. Perry, *Follicular Lymphoma Diagnostic Caveats and Updates.* Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2018. **142**(11): p. 1330-1340.
16. 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.
17. Stevenson, F.K. and G.T. Stevenson, *Follicular lymphoma and the immune system: from pathogenesis to antibody therapy.* Blood, 2012. **119**(16): p. 3659-67.

18. Grant, B.W., et al., *A phase 2 trial of extended induction epratuzumab and rituximab for previously untreated follicular lymphoma: CALGB 50701*. *Cancer*, 2013. **119**(21): p. 3797-804.
19. Ray, S., F.E. Craig, and S.H. Swerdlow, *Abnormal patterns of antigenic expression in follicular lymphoma: a flow cytometric study*. *Am J Clin Pathol*, 2005. **124**(4): p. 576-83.
20. Moreau, I., et al., *Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B-lymphoid cells*. *blood*, 1993. **82**(8): p. 2396-405.
21. Bachelard-Cascales, E., et al., *The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells*. *Stem Cells*, 2010. **28**(6): p. 1081-8.
22. Lee, K.W., et al., *CD10 expression is enhanced by Twist1 and associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma with facilitating tumorigenicity in vitro and in vivo*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(2): p. 310-21.
23. Reed, J.C., *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death*. *J Cell Biol*, 1994. **124**(1-2): p. 1-6.
24. van den Brand, M., et al., *Immunohistochemical differentiation between follicular lymphoma and nodal marginal zone lymphoma--combined performance of multiple markers*. *Haematologica*, 2015. **100**(9): p. e358-60.
25. Allman, D., et al., *BCL-6 expression during B-cell activation*. *Blood*, 1996. **87**(12): p. 5257-68.
26. Rassidakis, G.Z., et al., *Diagnosis and subclassification of follicle center and mantle cell lymphomas on fine-needle aspirates: A cytologic and immunocytochemical approach based on the Revised European-American Lymphoma (REAL) classification*. *Cancer*, 1999. **87**(4): p. 216-23.
27. Modak, M., et al., *Engagement of distinct epitopes on CD43 induces different co-stimulatory pathways in human T cells*. *Immunology*, 2016. **149**(3): p. 280-296.
28. Treasure, J., et al., *CD43 expression in B cell lymphoma*. *J Clin Pathol*, 1992. **45**(11): p. 1018-22.
29. Brossard, C., et al., *CD5 inhibits signaling at the immunological synapse without impairing its formation*. *J Immunol*, 2003. **170**(9): p. 4623-9.
30. Went, P., et al., *Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(16): p. 2472-9.
31. Miyaoka, M., et al., *Composite Follicular Lymphoma and CD5-Positive Nodal Marginal Zone Lymphoma*. *J Clin Exp Hematop*, 2016. **56**(1): p. 55-8.
32. Hallek, M., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines*. *Blood*, 2008. **111**(12): p. 5446-56.
33. Horn, H., et al., *Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles*. *Haematologica*, 2011. **96**(9): p. 1327-34.
34. Guo, Y., et al., *Low-grade follicular lymphoma with t(14;18) presents a homogeneous disease entity otherwise the rest comprises minor groups of heterogeneous disease entities with Bcl2 amplification, Bcl6 translocation or other gene aberrances*. *Leukemia*, 2005. **19**(6): p. 1058-63.

35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Jiang, W.Q. and H.Q. Huang, *Guidelines for the diagnosis and treatment of follicular lymphoma in China*. Cancer Biol Med, 2013. **10**(1): p. 36-42.
39. Leich, E., et al., *Similar clinical features in follicular lymphomas with and without breaks in the BCL2 locus*. Leukemia, 2016. **30**(4): p. 854-60.
40. 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.
41. Freedman, A., *Follicular lymphoma: 2014 update on diagnosis and management*. Am J Hematol, 2014. **89**(4): p. 429-36.
42. Duan, H., C.A. Heckman, and L.M. Boxer, *The immunoglobulin heavy-chain gene 3' enhancers deregulate bcl-2 promoter usage in t(14;18) lymphoma cells*. Oncogene, 2007. **26**(18): p. 2635-41.
43. Duan, H., et al., *Functional long-range interactions of the IgH 3' enhancers with the bcl-2 promoter region in t(14;18) lymphoma cells*. Oncogene, 2008. **27**(53): p. 6720-8.
44. Heemann, L.M., et al., *Cytotoxic and Apoptotic Activity of Majoranolide from Mezilaurus crassiramea on HL-60 Leukemia Cells*. Evid Based Complement Alternat Med, 2019. **2019**: p. 3464237.
45. Kridel, R., L.H. Sehn, and R.D. Gascoyne, *Pathogenesis of follicular lymphoma*. Journal of Clinical Investigation, 2012. **122**(10): p. 3424-3431.
46. Roulland, S., et al., *t(14;18) Translocation: A predictive blood biomarker for follicular lymphoma*. J Clin Oncol, 2014. **32**(13): p. 1347-55.
47. Godon, A., et al., *Is t(14;18)(q32;q21) a constant finding in follicular lymphoma? An interphase FISH study on 63 patients*. Leukemia, 2003. **17**(1): p. 255-9.
48. Lee, E.F., et al., *BCL-XL and MCL-1 are the key BCL-2 family proteins in melanoma cell survival*. Cell Death Dis, 2019. **10**(5): p. 342.
49. Schuler, F., C. Hirt, and G. Dolken, *Chromosomal translocation t(14;18) in healthy individuals*. Semin Cancer Biol, 2003. **13**(3): p. 203-9.
50. Ji, W., et al., *Frequent detection of bcl-2/JH translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay*. Cancer Res, 1995. **55**(13): p. 2876-82.
51. 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.
52. Korfi, K., et al., *Follicular lymphoma, a B cell malignancy addicted to epigenetic mutations*. Epigenetics, 2017. **12**(5): p. 370-377.

53. Li, H., et al., *Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma*. *Blood*, 2014. **123**(10): p. 1487-98.
54. Herviou, L., et al., *EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies*. *Oncotarget*, 2016. **7**(3): p. 2284-96.
55. Bodor, C., et al., *EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma*. *Blood*, 2013. **122**(18): p. 3165-8.
56. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
57. Asmann, Y.W., et al., *Genetic diversity of newly diagnosed follicular lymphoma*. *Blood Cancer J*, 2014. **4**: p. e256.
58. Schmidt, J., et al., *CREBBP gene mutations are frequently detected in in situ follicular neoplasia*. *Blood*, 2018. **132**(25): p. 2687-2690.
59. Lunning, M.A. and M.R. Green, *Mutation of chromatin modifiers; an emerging hallmark of germinal center B-cell lymphomas*. *Blood Cancer J*, 2015. **5**: p. e361.
60. Pasqualucci, L., et al., *Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma*. *Nature*, 2011. **471**(7337): p. 189-95.
61. Green, M.R., et al., *Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(10): p. E1116-25.
62. Xie, L., et al., *FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2012. **119**(15): p. 3503-11.
63. Kridel, R., et al., *Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study*. *PLoS Med*, 2016. **13**(12): p. e1002197.
64. Shimono, J., et al., *Analysis of GNA13 Protein in Follicular Lymphoma and its Association With Poor Prognosis*. *Am J Surg Pathol*, 2018. **42**(11): p. 1466-1471.
65. Pasqualucci, L., et al., *Genetics of follicular lymphoma transformation*. *Cell Rep*, 2014. **6**(1): p. 130-40.
66. Huet, S., et al., *EZH2 alterations in follicular lymphoma: biological and clinical correlations*. *Blood Cancer J*, 2017. **7**(4): p. e555.
67. Yap, D.B., et al., *Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation*. *Blood*, 2011. **117**(8): p. 2451-9.
68. Morin, R.D., et al., *Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma*. *Nature*, 2011. **476**(7360): p. 298-303.
69. Horsman, D.E., et al., *Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18)*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. **30**(4): p. 375-82.
70. Viardot, A., et al., *Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(23): p. 4523-30.
71. Lossos, I.S. and R.D. Gascoyne, *Transformation of follicular lymphoma*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011. **24**(2): p. 147-63.
72. Schmidt, J., et al., *Genome-wide analysis of pediatric-type follicular lymphoma reveals low genetic complexity and recurrent alterations of TNFRSF14 gene*. *Blood*, 2016. **128**(8): p. 1101-11.

73. Siddiqi, I.N., et al., *Characterization of a variant of t(14;18) negative nodal diffuse follicular lymphoma with CD23 expression, 1p36/TNFRSF14 abnormalities, and STAT6 mutations*. *Mod Pathol*, 2016. **29**(6): p. 570-81.
74. Launay, E., et al., *High rate of TNFRSF14 gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis*. *Leukemia*, 2012. **26**(3): p. 559-62.
75. Okosun, J., et al., *Recurrent mTORC1-activating RRAGC mutations in follicular lymphoma*. *Nat Genet*, 2016. **48**(2): p. 183-8.
76. Schiefer, A.I., et al., *Impact of Single or Combined Genomic Alterations of TP53, MYC, and BCL2 on Survival of Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphomas: A Retrospective Cohort Study*. *Medicine (Baltimore)*, 2015. **94**(52): p. e2388.
77. Knezevich, S., et al., *Concurrent translocation of BCL2 and MYC with a single immunoglobulin locus in high-grade B-cell lymphomas*. *Leukemia*, 2005. **19**(4): p. 659-63.
78. Yano, T., et al., *MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas*. *Blood*, 1992. **80**(3): p. 758-67.
79. Angi, M., et al., *The t(8;14)(q24.1;q32) and its variant translocations: A study of 34 cases*. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2017. **10**(3): p. 126-134.
80. Friedberg, J.W., *How I treat double-hit lymphoma*. *Blood*, 2017. **130**(5): p. 590-596.
81. Aukema, S.M., et al., *Double-hit B-cell lymphomas*. *Blood*, 2011. **117**(8): p. 2319-31.
82. 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.
83. Maeshima, A.M., et al., *Prognostic implications of histologic grade and intensity of Bcl-2 expression in follicular lymphomas undergoing rituximab-containing therapy*. *Hum Pathol*, 2013. **44**(11): p. 2529-35.
84. 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.
85. 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.
86. Villarino, A.V., et al., *Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease*. *J Immunol*, 2015. **194**(1): p. 21-7.
87. Zamo, A., et al., *The exomic landscape of t(14;18)-negative diffuse follicular lymphoma with 1p36 deletion*. *Br J Haematol*, 2018. **180**(3): p. 391-394.
88. Yildiz, M., et al., *Activating STAT6 mutations in follicular lymphoma*. *Blood*, 2015. **125**(4): p. 668-79.
89. Solal-Celigny, P., et al., *Follicular lymphoma international prognostic index*. *Blood*, 2004. **104**(5): p. 1258-65.
90. Nooka, A.K., et al., *Examination of the follicular lymphoma international prognostic index (FLIPI) in the National LymphoCare study (NLCS): a*

- prospective US patient cohort treated predominantly in community practices.* Ann Oncol, 2013. **24**(2): p. 441-8.
91. Gonzalez-Rincon, J., et al., *Unraveling transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma.* PLoS One, 2019. **14**(2): p. e0212813.
 92. Salles, G., et al., *Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience.* Adv Ther, 2017. **34**(10): p. 2232-2273.
 93. Muller, E., et al., *Genetic profiles of cervical tumors by high-throughput sequencing for personalized medical care.* Cancer Med, 2015. **4**(10): p. 1484-93.
 94. Sample, D.C., et al., *Variables affecting penetrance of gastric and duodenal phenotype in familial adenomatous polyposis patients.* BMC Gastroenterol, 2018. **18**(1): p. 115.
 95. Stephens, Z.D., et al., *Big Data: Astronomical or Genomical?* PLoS Biol, 2015. **13**(7): p. e1002195.
 96. Cristescu, R., et al., *Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes.* Nat Med, 2015. **21**(5): p. 449-56.
 97. Lee, D.H., *Treatments for EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC): The road to a success, paved with failures.* Pharmacol Ther, 2017. **174**: p. 1-21.
 98. Dahl, E., et al., *[Chances and risks of blood-based molecular pathological analysis of circulating tumor cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) in personalized cancer therapy: positional paper from the study group on liquid biopsy of the working group for molecular pathology in the German Society of Pathology (DGP)].* Pathologe, 2015. **36**(1): p. 92-7.
 99. Mathai, R.A., et al., *Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology.* J Clin Med, 2019. **8**(3).
 100. Hanley, G.E., et al., *Selected medical interventions in women with a deleterious BRCA mutation: a population-based study in British Columbia.* Curr Oncol, 2019. **26**(1): p. e17-e23.
 101. Willoughby, A., P.R. Andreassen, and A.E. Toland, *Genetic Testing to Guide Risk-Stratified Screens for Breast Cancer.* J Pers Med, 2019. **9**(1).
 102. Ludwig, K.K., et al., *Risk reduction and survival benefit of prophylactic surgery in BRCA mutation carriers, a systematic review.* Am J Surg, 2016. **212**(4): p. 660-669.
 103. Vasen, H.F., et al., *Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP).* Gut, 2008. **57**(5): p. 704-13.
 104. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
 105. Metzker, M.L., *Emerging technologies in DNA sequencing.* Genome Res, 2005. **15**(12): p. 1767-76.
 106. Clark, B.E., et al., *Next-generation sequencing as a tool for breakpoint analysis in rearrangements of the globin gene clusters.* Int J Lab Hematol, 2017. **39** **Suppl 1**: p. 111-120.
 107. Liu, L., et al., *Comparison of next-generation sequencing systems.* J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 251364.

108. Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 387-402.
109. Mardis, E.R., *Next-generation sequencing platforms*. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 2013. **6**: p. 287-303.
110. Rothberg, J.M., et al., *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 348-52.
111. Pant, S., R. Weiner, and M.J. Marton, *Navigating the rapids: the development of regulated next-generation sequencing-based clinical trial assays and companion diagnostics*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 78.
112. Grada, A. and K. Weinbrecht, *Next-generation sequencing: methodology and application*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(8): p. e11.
113. van Dongen, J.J., et al., *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2257-317.
114. Gallagher, S.R. and P.R. Desjardins, *Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy*. Curr Protoc Mol Biol, 2006. **Appendix 3**: p. Appendix 3D.
115. Gill, S.C. and P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, 1989. **182**(2): p. 319-26.
116. Desjardins, P. and D. Conklin, *NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids*. J Vis Exp, 2010(45).
117. Ramensky, V., P. Bork, and S. Sunyaev, *Human non-synonymous SNPs: server and survey*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(17): p. 3894-900.
118. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nat Methods, 2010. **7**(4): p. 248-9.
119. Adzhubei, I., D.M. Jordan, and S.R. Sunyaev, *Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2*. Curr Protoc Hum Genet, 2013. **Chapter 7**: p. Unit7 20.
120. Choi, Y., et al., *Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46688.
121. Kumar, P., S. Henikoff, and P.C. Ng, *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. Nat Protoc, 2009. **4**(7): p. 1073-81.
122. Raes, J. and Y. Van de Peer, *Functional divergence of proteins through frameshift mutations*. Trends Genet, 2005. **21**(8): p. 428-31.
123. Feng, W., et al., *Improving alignment accuracy on homopolymer regions for semiconductor-based sequencing technologies*. BMC Genomics, 2016. **17 Suppl 7**: p. 521.
124. Bragg, L.M., et al., *Shining a light on dark sequencing: characterising errors in Ion Torrent PGM data*. PLoS Comput Biol, 2013. **9**(4): p. e1003031.
125. Arsenic, R., et al., *Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer*. BMC Clin Pathol, 2015. **15**: p. 20.
126. Do, H. and A. Dobrovic, *Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization*. Clin Chem, 2015. **61**(1): p. 64-71.

127. MacConaill, L.E., *Existing and emerging technologies for tumor genomic profiling*. J Clin Oncol, 2013. **31**(15): p. 1815-24.
128. Bar-Eli, M., et al., *Analysis of N-RAS exon-1 mutations in myelodysplastic syndromes by polymerase chain reaction and direct sequencing*. Blood, 1989. **73**(1): p. 281-3.
129. Zhang, J., et al., *The CREBBP Acetyltransferase Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in B-cell Lymphoma*. Cancer Discov, 2017. **7**(3): p. 322-337.
130. Chan, H.M. and N.B. La Thangue, *p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 13): p. 2363-73.
131. Mullighan, C.G., et al., *CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia*. Nature, 2011. **471**(7337): p. 235-39.
132. Hu, G., et al., *Functional Analysis of Human Hub Proteins and Their Interactors Involved in the Intrinsic Disorder-Enriched Interactions*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(12).
133. Park, S., et al., *Role of the CBP catalytic core in intramolecular SUMOylation and control of histone H3 acetylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(27): p. E5335-E5342.
134. Malinowska-Ozdowy, K., et al., *KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2015. **29**(8): p. 1656-67.
135. Dancy, B.M. and P.A. Cole, *Protein lysine acetylation by p300/CBP*. Chem Rev, 2015. **115**(6): p. 2419-52.
136. Yang, X.J. and E. Seto, *Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications*. Mol Cell, 2008. **31**(4): p. 449-61.
137. Ogura, M., et al., *A multicentre phase II study of vorinostat in patients with relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma*. Br J Haematol, 2014. **165**(6): p. 768-76.
138. Bordoli, L., et al., *Functional analysis of the p300 acetyltransferase domain: the PHD finger of p300 but not of CBP is dispensable for enzymatic activity*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(21): p. 4462-71.
139. Haery, L., et al., *Histone acetyltransferase-deficient p300 mutants in diffuse large B cell lymphoma have altered transcriptional regulatory activities and are required for optimal cell growth*. Mol Cancer, 2014. **13**(29): p. 29.
140. Peterlongo, P., et al., *Germline Variation in Cancer-Susceptibility Genes in a Healthy, Ancestrally Diverse Cohort: Implications for Individual Genome Sequencing*. PLoS ONE, 2014. **9**(4): p. e94554.
141. Nykamp, K., et al., *Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria*. Genet Med, 2017. **19**(10): p. 1105-1117.
142. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
143. Landrum, M.J., et al., *ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D980-5.
144. Bereshchenko, O.R., W. Gu, and R. Dalla-Favera, *Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6*. Nat Genet, 2002. **32**(4): p. 606-13.

145. Matsuzaki, H., et al., *Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(32): p. 11278-83.
146. Cardenas, M.G., et al., *The Expanding Role of the BCL6 Oncoprotein as a Cancer Therapeutic Target*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(4): p. 885-93.
147. Basso, K. and R. Dalla-Favera, *Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells*. Immunol Rev, 2012. **247**(1): p. 172-83.
148. Green, M.R., *Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma*. Blood, 2018. **131**(6): p. 595-604.
149. Zhang, J., et al., *Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis*. Nat Med, 2015. **21**(10): p. 1190-8.
150. Ortega-Molina, A., et al., *The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development*. Nat Med, 2015. **21**(10): p. 1199-208.
151. Guo, C., et al., *KMT2D maintains neoplastic cell proliferation and global histone H3 lysine 4 monomethylation*. Oncotarget, 2013. **4**(11): p. 2144-53.
152. Nadal-Ribelles, M., et al., *H3K4 monomethylation dictates nucleosome dynamics and chromatin remodeling at stress-responsive genes*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(10): p. 4937-49.
153. Pleasance, E.D., et al., *A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure*. Nature, 2010. **463**(7278): p. 184-90.
154. Dalgliesh, G.L., et al., *Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes*. Nature, 2010. **463**(7279): p. 360-3.
155. Steinberg, M.W., T.C. Cheung, and C.F. Ware, *The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation*. Immunol Rev, 2011. **244**(1): p. 169-87.
156. M'Hidi, H., et al., *High expression of the inhibitory receptor BTLA in T-follicular helper cells and in B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia*. Am J Clin Pathol, 2009. **132**(4): p. 589-96.
157. Cai, G. and G.J. Freeman, *The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 244-58.
158. Llinas, L., et al., *Expression profiles of novel cell surface molecules on B-cell subsets and plasma cells as analyzed by flow cytometry*. Immunol Lett, 2011. **134**(2): p. 113-21.
159. Boice, M., et al., *Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells*. Cell, 2016. **167**(2): p. 405-418 e13.
160. Connolly, S.A., et al., *Structure-based mutagenesis of herpes simplex virus glycoprotein D defines three critical regions at the gD-HveA/HVEM binding interface*. Journal of Virology, 2003. **77**(14): p. 8127-8140.
161. Kotsiou, E., et al., *TNFRSF14 aberrations in follicular lymphoma increase clinically significant allogeneic T-cell responses*. Blood, 2016. **128**(1): p. 72-81.
162. Compaan, D.M., et al., *Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the BTLA-HVEM complex*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39553-61.

163. Berg, T., et al., *A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis*. *Blood*, 2014. **123**(25): p. 3914-24.
164. Raaphorst, F.M., et al., *Cutting edge: polycomb gene expression patterns reflect distinct B cell differentiation stages in human germinal centers*. *J Immunol*, 2000. **164**(1): p. 1-4.
165. Velichutina, I., et al., *EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis*. *Blood*, 2010. **116**(24): p. 5247-55.
166. Beguelin, W., et al., *EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(5): p. 677-92.
167. Souroullas, G.P., et al., *An oncogenic Ezh2 mutation cooperates with particular genetic alterations to induce tumors in mice and redistributes H3K27 trimethylation throughout the genome*. *Nat Med*, 2016. **6**(22): p. 632-40.
168. Ryan, R.J., et al., *EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28585.
169. Pasini, D., et al., *Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(15): p. 4958-69.
170. McCabe, M.T., et al., *EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations*. *Nature*, 2012. **492**(7427): p. 108-112.
171. Wang, Y., et al., *Methyl jasmonate sensitizes human bladder cancer cells to gambogic acid-induced apoptosis through down-regulation of EZH2 expression by miR-101*. *Br J Pharmacol*, 2014. **171**(3): p. 618-35.
172. Srinivasan, L., et al., *PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival*. *Cell*, 2009. **139**(3): p. 573-86.
173. Lin, Y.C., et al., *A global network of transcription factors, involving E2A, EBF1 and Foxo1, that orchestrates B cell fate*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(7): p. 635-43.
174. Cabrera-Ortega, A.A., et al., *The Role of Forkhead Box 1 (FOXO1) in the Immune System: Dendritic Cells, T Cells, B Cells, and Hematopoietic Stem Cells*. *Crit Rev Immunol*, 2017. **37**(1): p. 1-13.
175. Dominguez-Sola, D., et al., *The FOXO1 Transcription Factor Instructs the Germinal Center Dark Zone Program*. *Immunity*, 2015. **43**(6): p. 1064-74.
176. Trinh, D.L., et al., *Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma*. *Blood*, 2013. **121**(18): p. 3666-74.
177. Frescas, D., L. Valenti, and D. Accili, *Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(21): p. 20589-95.
178. Tzivion, G., M. Dobson, and G. Ramakrishnan, *FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(11): p. 1938-45.
179. Daitoku, H., J. Sakamaki, and A. Fukamizu, *Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(11): p. 1954-60.

180. Pyrzynska, B., et al., *FOXO1 promotes resistance of non-Hodgkin lymphomas to anti-CD20-based therapy*. *Oncoimmunology*, 2018. **7**(5): p. e1423183.
181. Godde, J.S. and K. Ura, *Cracking the enigmatic linker histone code*. *J Biochem*, 2008. **143**(3): p. 287-93.
182. Siriaco, G., et al., *A novel approach for studying histone H1 function in vivo*. *Genetics*, 2015. **200**(1): p. 29-33.
183. Yang, S.M., et al., *H1 linker histone promotes epigenetic silencing by regulating both DNA methylation and histone H3 methylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(5): p. 1708-13.
184. Fan, Y., et al., *Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation*. *Cell*, 2005. **123**(7): p. 1199-212.
185. Muppidi, J.R., et al., *Loss of signalling via Galpha13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma*. *Nature*, 2014. **516**(7530): p. 254-8.
186. Zhang, S., et al., *RhoA of the Rho family small GTPases is essential for B lymphocyte development*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33773.
187. Kreutz, B., et al., *Distinct regions of Galpha13 participate in its regulatory interactions with RGS homology domain-containing RhoGEFs*. *Cell Signal*, 2007. **19**(8): p. 1681-9.
188. Kozasa, T., et al., *Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13*. *J Biochem*, 2011. **150**(4): p. 357-69.
189. Kelly, P., et al., *A role for the G12 family of heterotrimeric G proteins in prostate cancer invasion*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(36): p. 26483-26490.
190. Gardner, J.A., et al., *The gep proto-oncogene Galpha13 mediates lysophosphatidic acid-mediated migration of pancreatic cancer cells*. *Pancreas*, 2013. **42**(5): p. 819-28.
191. Rasheed, S.A., et al., *MicroRNA-31 controls G protein alpha-13 (GNA13) expression and cell invasion in breast cancer cells*. *Mol Cancer*, 2015. **14**: p. 67.
192. Zhang, Z., et al., *GNA13 promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating CXC chemokines via the NF-kappaB signaling pathway in colorectal cancer cells*. *Cancer Med*, 2018. **7**(11): p. 5611-5620.
193. Zhang, J.X., et al., *MiR-29c mediates epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal carcinoma metastasis via PTP4A and GNA13 regulation of β -catenin signaling*. *Annals of Oncology*, 2014. **25**(11): p. 2196-2204.
194. Meigs, T.E., et al., *G alpha(12) and G alpha(13) negatively regulate the adhesive functions of cadherin*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(27): p. 24594-24600.
195. Potthoff, M.J. and E.N. Olson, *MEF2: a central regulator of diverse developmental programs*. *Development*, 2007. **134**(23): p. 4131-40.
196. Pon, J.R., et al., *MEF2B mutations in non-Hodgkin lymphoma dysregulate cell migration by decreasing MEF2B target gene activation*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 7953.
197. El Jamal, S.M., et al., *MEF2B is a member of the BCL6 gene transcriptional complex and induces its expression in diffuse large B-cell lymphoma of the germinal center B-cell-like type*. *Lab Invest*, 2019. **99**(4): p. 539-550.

198. Ying, C.Y., et al., *MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 1084-92.
199. Goodlad, J.R., et al., *BCL2 gene abnormalities define distinct clinical subsets of follicular lymphoma*. Histopathology, 2006. **49**(3): p. 229-41.
200. Hoeller, S., et al., *Molecular and immunohistochemical characterization of B-cell lymphoma-2-negative follicular lymphomas*. Hum Pathol, 2012. **43**(3): p. 405-12.
201. 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.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie und Neuropathologie unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Quintanilla Martinez de Fend durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch die Arbeitsgruppe (AG) Fend.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Frau Dr. Janine Allison Schmidt) von mir eigenständig durchgeführt. Die Next Generation Sequencing-Analyse erfolgte im Pathologischen Institut der Universität Heidelberg.

Die statistische Auswertung erfolgte (eigenständig) durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig (nach Anleitung durch die AG Fend und im Besonderen Frau Dr. rer. nat. Irina Bonzheim) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Danksagung

Ein großer Dank geht an die gesamte AG Fend. Vor allem möchte ich in diesem Zuge Frau Prof. Dr. med. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend und Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend als Initiatoren des Projektes, in dessen Rahmen die Arbeit entstanden ist, danken.

Des Weiteren geht ein großes Dankeschön an Frau Dr. rer. nat. Irina Bonzheim für die hervorragende Betreuung und die Durchsicht der Dissertationsschrift.

Frau Dr. rer. nat. Janine-Alison Schmidt, welche mittlerweile nicht mehr Teil der AG Fend ist, mich jedoch bei der Versuchsdurchführung jeder Zeit mit Rat und Tat unterstütze soll hier auch Erwähnung finden.

Danke auch an Frau Colak für die technische Unterstützung.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern und meiner Schwester für die Unterstützung während der gesamten Zeit des Promotionsverfahren danken.