

Aus dem
Institut für Pathologie und Neuropathologie
Abteilung Allgemeine und Molekulare Pathologie und
Pathologische Anatomie

**Die Frequenz der *BCL2*-Translokation t(14;18)(q32;q21)
bei *BCL2*-positiven folliculären Lymphomen
und die Verlässlichkeit verschiedener FISH-Sonden
in der Detektion dieser Translokation**

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

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

**vorgelegt von
Nielsen, Floria Elisabeth**

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Bruckner

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Beschorner

Tag der Disputation: 01.04.2026

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Das follikuläre Lymphom	5
1.1.1 Epidemiologie, Inzidenz und Ätiologie	5
1.1.2 Pathogenese	7
1.1.3 Klinisches Bild	14
1.2 Diagnostik	19
1.2.1 Histologie	19
1.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	22
1.3 Fragestellung dieser Arbeit	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Studienkohorte	24
2.1.2 Antikörper Immunhistochemie	25
2.1.3 Sonden Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	26
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.5 Geräte	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung	28
2.2.2 Tissue Microarray	29
2.2.3 Immunhistochemie	29
2.2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	30
3 Ergebnisse	33
3.1 Eigenschaften des Studienkollektivs	33
3.2 Histologie und Immunhistochemie	34
3.2.1 Auswertung der Immunhistochemie	34
3.2.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	35
3.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	39
3.3.1 Auswertung der FISH	39

3.3.2	Ergebnisse der FISH	41
3.3.3	<i>BCL2</i> -Break apart Probe	44
3.3.4	<i>BCL6</i> -Break apart Probe	46
3.3.5	<i>IGH/BCL2</i> -Fusionssonde	47
4	Diskussion	47
4.1	Anwendung von FISH an TMA (Methoden)	48
4.2	Hintergründe der <i>BCL2</i> -Expression	49
4.2.1	Zusammenhang der Intensität der <i>BCL2</i> -Expression und dem Vorliegen einer <i>t(14;18)</i> -Translokation	51
4.3	Insgesamt eher niedrige Frequenz FISH-positiver Fälle	52
4.3.1	Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der <i>BCL2</i> -Translokation und dem Krankheitsstadium	54
4.3.2	Alternative Wege, die zur <i>BCL2</i> -Expression führen können	56
4.3.3	Das <i>t(14;18)</i> -negative FL im Spiegel aktueller Studien	58
4.4	Auffällige Diskrepanzen zwischen verschiedenen <i>BCL2</i> -Break-Apart-Sonden	59
4.4.1	Ergebnisse der <i>IGH/BCL2</i> -Fusionssonde	65
4.4.2	Einfluss des Materials auf das FISH-Resultat	68
4.5	Die Bedeutung der <i>BCL6</i> -Translokation – hohe Frequenz von gemeinsamem Auftreten von <i>BCL6</i> + <i>BCL2</i> -Translokationen	69
4.5.1	<i>BCL6</i> -Translokation und der histologische Grad	70
4.5.2	<i>BCL6</i> statt <i>BCL2</i> als Schritt in der Pathogenese mit Bezug auf das Stadium	72
4.6	Limitationen der Studie	75
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	76
5	Zusammenfassung	78
6	Literaturverzeichnis	80
7	Abbildungsverzeichnis	95
8	Tabellenverzeichnis	96
9	Appendix	97
9.1	Gesamtübersicht der Immunhistochemie-Ergebnisse	97
10	Erklärung zum Eigenanteil	99

11	Danksagung	100
----	------------	-----

Abkürzungsverzeichnis

AID	Activation-induced Cytidine-Deaminase
Ak	Antikörper
BA	Break-Apart (Sonde) = BAP
BAP	Break Apart Probe
BCL2	B-cell Lymphoma 2
BCL6	B-cell Lymphoma 6
CD10	Keimzentrumsmarker
CD20	B-Lymphozyten Antigen
CGP	Comprehensive genomic profiling
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
FDC	Follikuläre dendritische Zellen
FF	Fresh Frozen
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	Follikuläres Lymphom
FLBCL	Follicular large B-cell lymphoma
FLIPI	Follicular Lymphoma International Prognostic Index
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGB(C)L	High-Grade B-Cell Lymphoma
HPF	High-power field
ICC	International Consensus Classification
IG	Immunglobulin
IGH	Immunglobulinschwerkettenloкус
IGK	Immunglobulinleichtkettenloкус <i>Kappa</i>
IHC	Immunhistochemie
ISFN	in situ follikuläre Neoplasie
kb	Kilobase, Kilobasenpaar
LK	Lymphknoten
NGS	Next-Generation-Sequencing
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

PCR	Polymerase Chain Reaction
SHM	Somatische Hypermutation
TMA	Tissue Microarray
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)

1 Einleitung

1.1 Das folliculäre Lymphom

1.1.1 *Epidemiologie, Inzidenz und Ätiologie*

Das folliculäre Lymphom (FL) ist eine maligne Neoplasie des lymphatischen Systems und zählt als B-Zell-Lymphom zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Mit ca. 20% aller Lymphome ist das FL das häufigste indolente NHL (Teras et al. 2016, Swerdlow et al. 2016).

Altersstandartisiert beträgt die Inzidenz 2-4 Neudiagnosen pro 100.000 Personenjahre mit einer stetig steigenden Fallzahl zwischen dem 30. und 70. Lebensjahr. Im Durchschnitt wird die Diagnose im Alter von ca. 60 Jahren gestellt (Kridel, Sehn, and Gascoyne 2012).

Abhängig von der ethnischen Zugehörigkeit sowie der geographischen Lage zeigen sich abweichende Inzidenzen. Das FL tritt in Entwicklungsländern im Vergleich zu westlichen Ländern anteilmäßig seltener auf, und bei weißen Personen bis zu dreimal häufiger als bei people of colour (Cerhan 2020). Im Gegensatz zu den meisten anderen Lymphomen besteht ein weitgehend ausgeglichenes Geschlechterverhältnis bei den betroffenen Patient:innen (Linnet et al. 2014).

Die Ursache der Erkrankung ist weitgehend unbekannt. Umweltfaktoren wie der Kontakt mit Benzol, Herbiziden und Pestiziden dürften das Erkrankungsrisiko erhöhen. Weitere Risikofaktoren bei jungen Patient:innen sind Blutsverwandte, die auch von einem FL oder einer anderen hämatologischen Erkrankung betroffen waren und Adipositas. Besonders bei Frauen wurde ein Zusammenhang mit Zigarettenrauchen sowie dem Sjögren-Syndrom beobachtet (Linnet et al. 2014, Le et al. 2019, Cerhan 2020).

Die Inzidenz des FL stieg zwischen 1993 und 2008 z.B. in Japan signifikant an (Chihara et al. 2014). In westlichen Ländern wurde bereits in den 1980er und frühen 1990er-Jahren ein deutlicher Anstieg der Inzidenz von NHL, einschließlich des FL beobachtet. Als mögliche Erklärungen gelten verbesserte Diagnostik, demografische Entwicklungen sowie der verstärkte Einsatz immunsuppressiver

Therapien. Diese Faktoren erklären den Anstieg jedoch nicht vollständig (S3-Leitlinie Follikuläres Lymphom 2020, Shiels et al. 2013, Morton et al. 2006). Seit den 2000er-Jahren zeigen die Inzidenzraten in mehreren westlichen Ländern jedoch eine Stabilisierung (Shiels et al. 2013).

Es wird diskutiert, ob exogene Umweltfaktoren das Risiko für die Entstehung eines FL insgesamt beeinflussen können. In einer italienischen multizentrischen Fall-Kontroll-Studie war das Risiko für FL bei beruflicher Glyphosat-Exposition mit mittlerer bis hoher Expositionswahrscheinlichkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe um das Siebenfache erhöht (Meloni et al. 2021). Auch für bestimmte Insektizide wurde ein erhöhtes Risiko für NHL beschrieben, wobei die Datenlage für eine eindeutige Verbindung zum FL nicht ausreicht und weiterer Forschung bedarf (Kachuri et al. 2020).

Auch wenn derzeit kein eindeutiger konsistenter Beleg für einen kausalen Zusammenhang zwischen Umweltfaktoren und der FL-Entstehung vorliegt, bleibt dieser Forschungsansatz relevant. Es ist denkbar, dass Umweltfaktoren, je nach Art der Einwirkung, unterschiedliche pathogenetische Mechanismen im Immunsystem oder in regulatorischen Signalwegen beeinflussen. Solche Einflüsse könnten dazu beitragen, ob ein FL mit oder ohne t(14;18)-Translokation entsteht oder durch andere molekulare Alterationen gekennzeichnet ist. In diesem Zusammenhang gewinnen neben der klassischen Translokation auch epigenetische Deregulationen, Veränderungen in Signalwegen und die Interaktion mit der Tumormikroumgebung zunehmend an Bedeutung (Perrett, Edmondson, and Okosun 2022).

Die zunehmende molekulare Charakterisierung zeigt deutlich, dass es sich beim FL nicht um eine einheitliche Erkrankung handelt, sondern um ein Spektrum heterogener Subtypen. Diese Erkenntnis eröffnet wichtige Fragestellungen für künftige Studien, auch im Hinblick auf mögliche exogene Einflussfaktoren.

1.1.2 Pathogenese

Es wird angenommen, dass sich die FL-Zellen bzw. ihre Vorläufer schon früh in der Krankheitsentwicklung weit im Körper ausbreiten und dies auch ein Grund dafür sein könnte, wieso sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die Mehrheit der Patient:innen bereits in einem fortgeschrittenen klinischen Stadium befindet. Das FL entwickelt sich langsam über Jahren und durchläuft dabei unterschiedliche prä-maligne Entwicklungsstadien. Die *in situ* folliculäre Neoplasie (ISFN) ist wahrscheinlich die erste Vorstufe des FL, die sich nicht konventionell-morphologisch, sondern nur immunhistochemisch nachweisen lässt (Swerdlow et al. 2016, Laurent et al. 2023). Sie entwickelt sich nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit zum FL weiter und ist aufgrund der Symptomlosigkeit ein Zufallsbefund. Die ISFN ist charakterisiert durch die Besiedelung der Keimzentren durch eine monoklonale Population t(14;18)-positiver B-Zellen in sonst unauffälligem lymphatischem Gewebe. Diese Keimzentren können anhand ihrer gesteigerten Expression von CD10 nachgewiesen werden, im Gegensatz zu reaktiven Keimzentren wird BCL2 exprimiert. Eine Zerstörung der Lymphknotenarchitektur ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht gegeben (Cong et al. 2002). Bereits bei der ISFN sind sekundäre genetische Anomalien zusätzlich zu den *BCL2*-Umlagerungen vorhanden (Schmidt et al. 2014, Vogelsberg et al. 2021).

Zusätzliche Veränderungen und mutagene Ereignisse in den Lymphknoten (LK) sind für das Vollbild der Erkrankung nötig (Perrett, Edmondson, and Okosun 2022). Man weiß noch nicht genau, was die Progression der prä-malignen t(14;18)-positiven Vorläufer zum FL auslöst, es wurden aber Veränderungen, insbesondere Mutationen in epigenetischen Regulatoren identifiziert, denen dabei eine große Bedeutung zukommen dürfte (Küppers and Stevenson 2018). Durch diese Mutationen in epigenetischen Regulatoren wie beispielsweise *CREBBP* wird die Wirksamkeit von Tumorsuppressor-Genen wie TP53 eingeschränkt und dadurch die *BCL6*-Wirkung verstärkt, wodurch das Krankheitsgeschehen gefördert wird (Kridel et al. 2016, Araf et al. 2018, Küppers and Stevenson 2018, Zhu et al. 2019).

Über die lange Dauer der Krankheitsentwicklung in unterschiedlichen Lokalisationen entstehen häufig multiple Subklone, die verschiedene Alterationen aufweisen und sich auf unterschiedlichen Stufen der Progression befinden können (Pasqualucci et al. 2014, Kridel et al. 2016). Insgesamt spricht man vom Multi-Hit-Modell der FL-Entstehung. Durch intensive Forschung konnten in den letzten 15 Jahren wesentliche neue Einblicke in den schrittweisen Lymphom-Entstehungsprozess gewonnen werden, inklusive der (epi)genomischen Vielfalt und Plastizität der FL-Zellen und ihrer Abhängigkeit vom Tumormikroumfeld (Xu, Zheng, and Zhao 2023). Dieses trägt zur Immunevasion bei und weist unter anderem T-Helferzellen und folliculäre dendritische Zellen (FDC) auf, bei welchen es sich um spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen handelt (Kumar, Pickard, and Okosun 2021). Das komplexe Szenario, das sich dabei mit seiner großen klonalen und funktionellen Vielschichtigkeit abbildet, erschwert die Entdeckung prognostischer Biomarker und die Auswahl risikoadäquater Therapien (Xu, Zheng, and Zhao 2023, Milpied et al. 2021).

Eine detaillierte molekulare Charakterisierung von t(14;18)-negativen FL wurde von Nann et al. durchgeführt. Sie untersuchten 55 *BCL2*-negative FL mittels Sequenzierung und Kopienzahlanalyse und identifizierten mehrere molekulare Subgruppen. Sie zeigten, dass t(14;18)-negative FL eine genetisch heterogene Gruppe darstellen, deren Pathogenese sich vom *BCL2*-positiven FL unterscheidet (Nann et al. 2020a).

In einer umfassenden molekularen Analyse kamen Zamò et al. zu dem Schluss, dass t(14;18)-positive und -negative FL zwar unterschiedliche genetische Veränderungen aufweisen, aber überlappende Signalwege, also auch antiapoptotische Mechanismen, nutzen. Dies deutet auf eine konvergente Pathogenese der Subtypen hin (Zamò et al. 2018).

1.1.2.1 B-Zellen

B-Zellen haben die Funktion, die Immunantwort des Körpers zu modulieren. Dazu zählt die Produktion antigenspezifischer Immunglobuline (IG), sogenannten Antikörpern. Die Immunglobuline spielen eine zentrale Rolle bei der Abwehr von

Infektionen, indem sie Antigene, die beispielsweise von Bakterien oder Viren stammen, erkennen und spezifisch binden. IG-Moleküle weisen eine Y-förmige Struktur auf und sind aus vier Polypeptidketten zusammengesetzt, zwei schweren Ketten (H-Ketten) und zwei leichten Ketten (L-Ketten). Diese bestehen jeweils aus variablen (V-) und konstanten (C-) Regionen. Die variable Region wird von drei getrennten Gensequenzen kodiert, welche erst im Rahmen der Differenzierung einer lymphatischen Vorläuferzelle zur unreifen B-Zelle im Knochenmark zur V-Region zusammengesetzt wird. Dieser Vorgang wird als V(D)J-Rekombination bezeichnet (Murphy et al. 2014). Es konnte durch molekulare Analysen bei vier unabhängigen Fällen von FL nachgewiesen werden, dass die t(14;18)-Translokation während des VDJ-Verknüpfungsprozesses im Prä-B-Zell-Differenzierungsstadium passiert (Tsujimoto et al. 1985).

Während der B-Zell-Entwicklung erfolgen naturgemäß genetische Modifikationen, um eine passende Immunantwort sicherzustellen. Dieser Umstand bringt auch das Risiko krankhafter Veränderungen mit sich. Dazu zählen die häufigen chromosomalen Translokationen. Vielfach kommt es dabei zu einer Rekombination eines der IG-Loci mit einem Onkogen (Nussenzweig and Nussenzweig 2010, Swerdlow et al. 2016).

1.1.2.2 Die Translokation t(14;18)(q32;21) *IGH/BCL2*

In rund 80% der Fälle weist das FL die charakteristische Chromosomentranslokation t(14;18)(q32;21) auf (Ott et al. 2002, Leich et al. 2009, 2016). Sie ist allerdings nicht für das FL spezifisch, sondern tritt auch bei anderen hämatologischen Erkrankungen, wie beispielsweise dem DLBCL auf. Im Folgenden wird diese Chromosomentranslokation kurz als t(14;18)- bzw. *BCL2*-Translokation bezeichnet. Sie ist die häufigste unter den bekannten *BCL2*-Translokationen. Durch das Rearrangement wird das *BCL2*-Gen von Chromosom 18 neben die Enhancer-Sequenzen der Promotorregion des Immunglobulin-Schwerketten-Gens (*IGH*) auf Chromosom 14 verlegt. Dies führt in der Folge zur vermehrten Expression des BCL2-Proteins. Indem dieses Protein den programmierten Zelltod (Apoptose) auch der Lymphomzellen

verhindert, trägt es wesentlich zum Krankheitsgeschehen bei. Die Translokation wird als ein initialer Schritt in der Pathogenese des FL betrachtet (Leich et al. 2009, Roulland et al. 2014, Tellier et al. 2014).

Bei gesunden Erwachsenen lassen sich gelegentlich zirkulierende B-Zellen mit t(14;18)-Alteration nachweisen (Roulland et al. 2011). Die t(14;18)-Translokation wird physiologisch wirksam, wenn ein reifer t(14;18)-positiver B-Lymphozyt nach einem Antigenkontakt in das Keimzentrum einwandert. Durch die verstärkte Produktion von BCL2 kommt es zur Anreicherung langlebiger B-Gedächtniszellen, die neuerlich in die Keimzentrumsreaktion eintreten können (Roulland et al. 2011, Bende et al. 2007).

Etwa 20% aller FL weisen keine t(14;18)-Translokation auf, zeigen jedoch trotzdem ähnliche Symptome (Zhu et al. 2019). Die Pathogenese des FL mit und ohne *BCL2*-Rearrangement ist nach wie vor Gegenstand der Forschung.

Neuere Studien zeigen, dass t(14;18)-negative FL keine einheitliche Entität darstellen, sondern genetisch und biologisch heterogen sind. Leich et al. beobachteten bei diesen Fällen eine verminderte CD10-Expression, häufigere MUM1-Positivität sowie eine erhöhte Proliferation, was auf biologische Unterschiede zum klassischen, t(14;18)-positiven FL hinweist (Leich et al. 2016). Nann et al. konnten diese Heterogenität genetisch untermauern und identifizierten zwei genetisch unterschiedliche t(14;18)-negative Gruppen mit charakteristischen Mutationsprofilen, unter anderem mit häufigen *STAT6*-, *CREBBP*- und *TNFRSF14*-Veränderungen, bei gleichzeitigem Fehlen struktureller oder regulatorischer Veränderungen im *BCL2*-Gen, wie sie für t(14;18)-positive FL charakteristisch sind (Nann et al. 2020). Auch Salaverria et al. beschrieben t(14;18)-negative FL als genetisch vielgestaltige Krankheitsgruppe mit klar unterscheidbaren Subtypen, darunter nodale Varianten mit *STAT6*-Mutationen, extranodale Fälle mit abweichender Mutationssignatur sowie pädiatrische Subtypen (Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023).

Die beschriebenen molekularen und klinischen Unterschiede der t(14;18)-negativen Subtypen stützen die Annahme, dass die Abwesenheit der t(14;18)-Translokation mit alternativen pathogenetischen Mechanismen einhergeht.

1.1.2.1 Weitere Faktoren in der Krankheitsentwicklung

Abgesehen von der t(14;18)-Translokation können im *BCL2*-Gen selbst auch punktuelle Mutationen vorliegen. Es handelt sich dabei um das Ergebnis der somatischen Hypermutation (SHM). Die SHM ist ein zentraler Mechanismus der adaptiven Immunantwort, der in aktivierten B-Zellen innerhalb der Keimzentren stattfindet. Sie ermöglicht die Affinitätsreifung von Antikörpern und wird durch das Enzym activation-induced cytidine deaminase (AID) initiiert, das gezielte Punktmutationen in den variablen Regionen der Immunglobulin-Gene hervorruft, aber auch andere Gene in B-Zellen betreffen kann (Muramatsu et al. 2000).

Beim FL kommt es häufig zu Störungen in der Regulation der SHM. Dabei können auch andere Gene mutieren, darunter Onkogene und Tumorsuppressorgene wie *BCL6* und *MYC*. Dadurch kann es zur Transformation von B-Zellen und der Entstehung des FL kommen (Pasqualucci et al. 2014, Pasqualucci and Dalla-Favera 2015, Loeffler et al. 2015). Eine wichtige Untergruppe solcher Mutationen sind sogenannte Missense-Mutationen, bei denen ein einzelnes Nukleotid in der DNA verändert wird, was zu einer Austausch-Mutation einer Aminosäuresequenz des Proteins führt. Nicht alle Missense-Mutationen müssen funktionelle Konsequenzen haben.

Darüber hinaus spielen epigenetische Mechanismen eine zentrale Rolle in der Pathogenese des FL, wie die Modifikationen von Histonproteinen, welche die Chromatinstruktur und damit die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren regulieren. Mutationen in Histon-Modifikatoren wie *EZH2*, *KMT2D*, *CREBBP* sind im FL sehr häufig und gehören zu den frühesten genetischen Ereignissen in der Lymphomentwicklung. Sie schaffen ein epigenetisches Umfeld, das die Krankheitsentwicklung begünstigt (Okosun et al. 2014, Pasqualucci et al. 2014, Loeffler et al. 2015)

Neben diesen zellinternen Mechanismen stellt auch die Interaktion der malignen B-Zellen mit ihrer immunologischen Mikroumgebung einen weiteren wichtigen

Faktor in der Pathogenese des FL dar. Maligne B-Zellen sind stark auf den Austausch mit nicht-neoplastischen Zellen wie FDCs, follikulären T-Helferzellen, regulatorischen T-Zellen, Makrophagen und Stromazellen angewiesen. Diese Zelltypen fördern die Zellproliferation, unterdrücken die Apoptose und modulieren die Immunantwort zugunsten der Tumorzellen. Auf diese Weise unterstützt die Tumormikroumgebung (TME) das Überleben und die Persistenz der FL-Zellen (Perrett, Edmondson, and Okosun 2022, Nishikori 2024).

1.1.2.2 Weitere Translokationen (*BCL6*, *MYC*)

Neben der in der vorliegenden Untersuchung vorrangig behandelten t(14;18)-Translokation, sind weitere genomische Umlagerungen an der Entstehung und dem Fortschreiten des FL beteiligt. Eine davon betrifft das *BCL6*-Gen, das für den Transkriptionsfaktor kodiert, der essenziell für die Reifung und Selektion von Keimzentrums-B-Zellen ist (Falini & Mason 2002). *BCL6* fungiert dabei als zentraler Regulator der Keimzentrumsreaktion, indem es Gene unterdrückt, die an Apoptose, DNA-Schadensantwort und Differenzierung beteiligt sind. So können sich Keimzentrums-B-Zellen trotz starker Zellteilung und genetischem Stress weiter vermehren, ohne frühzeitig abzusterben oder zu differenzieren (Falini and Mason 2002, Hatzi and Melnick 2014).

Die aberrante Überexpression von *BCL6*, sei es durch Translokationen oder genomische Amplifikationen verursacht, trägt wesentlich zur Lymphomgenese bei, indem sie mehrere tumorbiologisch relevante Prozesse antreibt. Einerseits hemmt *BCL6* den programmierten Zelltod der B-Zellen, unter anderem durch Repression von Tumorsuppressoren wie *TP53*, was die Zellen unempfindlich gegenüber DNA-Schäden macht. Andererseits blockiert es die weitere Differenzierung der Keimzentrums-B-Zellen, insbesondere durch Unterdrückung von Transkriptionsfaktoren wie *PRMD1* (*BLIMP1*) und *IRF4*, die für den Austritt aus dem Keimzentrum und die Plasmazelldifferenzierung erforderlich sind. Darüber hinaus fördert eine anhaltend erhöhte *BCL6*-Aktivität die Proliferation der Lymphomzellen im Keimzentrumsstadium (Hatzi and Melnick 2014).

Durch dieses Zusammenwirken von Apoptosevermeidung, Differenzierungsblockade und Proliferationssteigerung wirkt *BCL6* als wichtiges

Onkogen in der Pathogenese des FL und ergänzt die durch *BCL2* vermittelte Überlebenssteigerung der Zelle (Hatzi and Melnick 2014).

In etwa 5-15% der FL-Fälle lassen sich *BCL6*-Rearrangements nachweisen, insbesondere in t(14;18)-negativen Subtypen oder in Fällen mit Transformation zu einem Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) (Kim et al. 2020, Ikoma et al. 2022, Leich et al. 2016, Wahlin et al. 2012). Interessanterweise können *BCL6*-Translokationen auch in Kombination mit *BCL2*-Rearrangements vorkommen, was oft mit einem ungünstigeren klinischen Verlauf assoziiert ist (Kim et al. 2020, Ikoma et al. 2022, Pasqualucci et al. 2014). In seltenen Fällen kann auch ein Triple-Hit-FL vorliegen, bei dem zusätzlich eine *MYC*-Translokation besteht, was eine noch schlechtere Prognose bedingt (Leich et al. 2016, Ikoma et al. 2022, Miyaoka et al. 2018).

BCL6-Rearrangements finden sich vermehrt in höhergradigen FL (insbesondere Grad 3A/3B). Studien belegen, dass *BCL6*-Translokationen bei FL Grad 3 signifikant häufiger auftreten, vor allem in t(14;18)-negativen Fällen (Ikoma et al. 2022, Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023). Auch eine Studie von Pan und Wang aus dem Jahr 2012 beschreibt eine Häufung dieser Umlagerungen in höhergradigen FL (Pan and Wang 2012). Darüber hinaus zeigte eine Studie von Díaz-Alderete et al. ebenfalls, dass *BCL6*-translozierte Fälle ohne *BCL2*-Translokation überwiegend bei höhergradigen FL zu finden waren, während doppelt positive Fälle mit *BCL2*- und *BCL6*-Translokationen meist bei niedriggradigen FL auftraten. Dies weist auf unterschiedliche pathogenetische Mechanismen hin (Díaz-Alderete et al. 2008).

Eine umfassende molekulare Analyse von t(14;18)-negativen FL ergab, dass *BCL6*-Translokationen als möglicher funktioneller Ersatz für *BCL2*-Umlagerungen dienen könnten (Nann et al. 2020, Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023). Diese Fälle zeigen häufig eine positive CD10- und *BCL6*-Expression, aber keine *BCL2*-Translokation. Histologisch entsprechen sie dennoch einem klassischen FL.

Zwei von Nann et al. beschriebene Subtypen (beide CD23+, *STAT6*-positiv und *BCL2*-negativ) mit den Clustern A1 (u.a. *STAT6*+/*TNFRSF14*-), B2 (u.a.

CREBBP+/STAT6-) und eine Gruppe mit *BCL6*-Translokation wurden in der Studie von Salaverria et al. aufgegriffen und in ein weiter gefasstes klinisch-molekulares Klassifikationsschema integriert (Nann et al. 2020, Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023).

Daneben lokalisierten Salaverria et al. in der Untergruppe der nodalen Fälle noch das FL mit *BCL6*-Rearrangement das klinisch dem *BCL2*-positiven FL ähnelt (Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023). Die *BCL6*-Translokation tritt einerseits vermehrt bei FL Grad 3B auf, welche in dieser Studie ausgeschlossen wurden, aber auch in etwa 20% der *t(14;18)*-negativen FL Grad 1-3A (Nann et al. 2020).

Diese Form zeigt eine klinische und histologische Nähe zum klassischen FL, ist jedoch genetisch eigenständig und weist meist keine *BCL2*-Expression auf (Nann et al. 2020, Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023). Daher ist davon auszugehen, dass auch solche Fälle in *BCL2*-expressionsfokussierten Studien, wie der hier vorgelegten Arbeit unterrepräsentiert sind (Zamò et al. 2018).

Auch *MYC*-Translokationen sind in FL nachgewiesen worden, wenn auch deutlich seltener. In einer groß angelegten Studie fanden Chaudhary et al. bei 10 von 522 FL-Fällen eine *MYC*-Umlagerung, ohne dass sich hier spezifische histologische Auffälligkeiten zeigen würden (Chaudhary et al. 2021). Diese *MYC*-positiven FL scheinen vor allem in fortgeschrittenen Stadien oder im Rahmen einer Transformation relevant zu sein (Zamò et al. 2018). Man geht davon aus, dass sie die Tumorentwicklung weiter vorantreiben (Leich et al. 2016). Im transformierten FL können *MYC*-Deregulationen Zellwachstum, Stoffwechsel und genomische Instabilität fördern und tragen so zur Progression bei (Devan, Janikova, and Mraz 2018, Ikoma et al. 2022).

1.1.3 Klinisches Bild

Indolente Lymphome wie das FL wachsen im Gegensatz zu den aggressiven Lymphomtypen überwiegend langsam, teils über Jahrzehnte. Da die Patient:innen meist sehr lange asymptomatisch sind und auch die klassische B-

Symptomatik nur selten beobachtet werden kann, ist das FL bei der Diagnosestellung häufig bereits in einem fortgeschrittenen Stadium und weit verbreitet in den Lymphknoten zu finden. Ein lokalisierter Befall liegt in lediglich 10-20% der Fälle vor (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project 1997, 1997, S3-Leitlinie Follikuläres Lymphom 2020).

Das klinische Erscheinungsbild ist variabel, wobei ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen klinischen Formen des follikulären Lymphoms und den verschiedenen, zugrundeliegenden genetischen Aberrationen gesehen wird (Pastore et al. 2015). Die Erkrankung präsentiert sich initial meist durch eine Lymphadenopathie, besonders im Hals- und Nackenbereich bzw. im Gastrointestinaltrakt, aber auch das Knochenmark, die Milz und Wirbelkörper können eine Beteiligung aufweisen und FL-Zellen enthalten. Deutlich seltener betroffen ist das periphere Blut (Freedman and Jacobsen 2020, Kukreti et al. 2004, Schmidt et al. 2015).

Wie bei den allermeisten Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen üblich, wird die Ausbreitung der FL mithilfe der Ann-Arbor-Klassifikation beschrieben. Es gibt die Stadien I-IV, die Einteilung beeinflusst die Prognose und Therapieplanung entscheidend. Zur Anwendung kommt eine Modifikation der Ann-Arbor-Klassifikation, die Lugano-Klassifikation (Cheson et al. 2016).

Etwa ein Drittel der FL transformiert im Krankheitsverlauf in eine aggressivere Form. Häufig treten dann rasches Tumorwachstum und B-Symptome wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust auf (Gribben 2015, Al-Tourah et al. 2008, Lossos and Gascoyne 2011). Meist handelt es sich dabei um eine Transformation zum DLBCL, seltener zu anderen aggressiven B-Zell-Lymphomen mit *MYC*-, *BCL2*- und/oder *BCL6*-Rearrangements und nur in Ausnahmefällen zum Hodgkin-Lymphom (Trecourt et al. 2022). Solche DLBCL mit *MYC*, *BCL2*- und/oder *BCL6*-Translokation wurden bisher als Double-Hit oder Triple-Hit-Lymphome bezeichnet und wird in den letzten Jahren als High-Grade B-Cell Lymphom (HGBL) in eine eigene Gruppe eingeordnet (Swerdlow et al. 2016).

Das Risiko einer Transformation liegt bei etwa 1-3% pro Jahr, insgesamt wird sie bei 10 bis 60% der Patient:innen beobachtet (Al-Tourah et al. 2008, Link et al.

2013). Zu den Risikofaktoren zählen genetische Veränderungen wie Mutationen in *TP53* oder *MYC* sowie ein unzureichendes Ansprechen auf die Erstlinientherapie und ein hoher FLIPI-Score (Lossos and Gascoyne 2011, Horn et al. 2018, Xerri et al. 2016). Die Transformation erfolgt meist innerhalb der ersten 2,5 bis 4 Jahre nach Diagnosestellung.

Zuverlässige prädiktive Marker, immunologischer oder genetischer Art, konnten bislang nicht etabliert werden. Im Fall einer Transformation zum DLBCL verschlechtert sich die Prognose deutlich, auch wenn sich das Gesamtüberleben durch moderne Immunchemotherapie verbessert hat (Casulo, Burack, and Friedberg 2015). Die Überlebensdauer nach Transformation liegt je nach Studie zwischen 1,2 und 1,8 Jahren (Al-Tourah et al. 2008, Kridel, Sehn, and Gascoyne 2012, Pasqualucci et al. 2014). Dabei zeigen Studien, dass ein späteres Auftreten der Transformation mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert ist (Link et al. 2013).

1.1.3.1 Therapie

Die Therapie richtet sich nach dem Stadium, dem Allgemeinzustand und den Komorbiditäten. Es kann eine Strahlentherapie, eine Systemtherapie mit Chemotherapeutika bzw. Immuntherapien eingesetzt werden. Eine autologe Stammzell-Transplantation wird in der Primärtherapie nicht empfohlen (Jacobsen 2022).

In Stadium I und II (lokalisiert) wird häufig eine Bestrahlung (ggf. mit zusätzlicher Gabe des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab) der betroffenen Lymphknotenregionen durchgeführt. Rituximab führt über die Bindung an das CD20-Antigen zum Zelltod der Tumorzellen sowie reifen B-Lymphozyten. (Jazirehi and Bonavida 2005). Die Kombination aus Chemotherapie und einem Anti-CD20-Antikörper führt in etwa 50% der Fälle zu einer Remission (Morschhauser et al. 2022). Darunter versteht man das Nachlassen oder Verschwinden der Symptome als Folge einer wirksamen Behandlung. Allerdings sind wiederholte Rezidive häufig. In den fortgeschrittenen Stadien ist bei asymptomatischen Patient:innen die aktive Überwachung („watch and wait“) das Vorgehen der Wahl. Eine medikamentöse Behandlung erfolgt nur beim Auftreten

klinischer Symptome (Brice et al. 1997). Auch bei älteren Patient:innen über 70 Jahren, die von niedriggradigen Lymphomen betroffen sind, wird im Fall eines asymptomatischen Verlaufs vorzugsweise eine „watch and wait“-Strategie verfolgt (Ardeshna et al. 2014, Brice et al. 1997). Bezüglich der Therapie von FL mit *BCL2*- und *MYC*-Rearrangement wurde hingegen auch bei niedriggradigen Fällen ein besseres Ansprechen auf vergleichsweise intensivierete Therapiestrategien beobachtet (Miao et al. 2016).

Im Behandlungsverlauf kann es zur Entwicklung von Resistenzen kommen oder sich über die Transformation eine aggressivere Variante entwickeln, sodass eine komplette Heilung bisher nicht möglich ist (Kridel, Sehn, and Gascoyne 2012, Casulo and Barr 2019). Durch die Therapiemöglichkeiten konnte das durchschnittliche Gesamtüberleben aber entscheidend verbessert werden.

1.1.3.2 Prognose

Zur Einstufung der Prognose des FL wird der FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index) verwendet (Solal-Celigny 2004). Es handelt sich dabei um eine Modifikation des Internationalen Prognostischen Index (IPI).

Gemäß dem FLIPI-Score gibt es fünf Faktoren, die mit einer schlechteren Prognose einhergehen: Alter über 60 Jahre, Hämoglobin unter 12 g/dL, erhöhtes Serum-LDH (Laktatdehydrogenase), Ann-Arbor Stadium III/IV (gestreute Krankheit im Lugano-System), und mehr als 4 betroffene Lymphknotenregionen. Je mehr dieser Faktoren in einem Fall vorhanden sind, desto schlechter ist die Prognose (Solal-Celigny 2004). Der FLIPI dient der Risikoeinschätzung, aber derzeit nur sehr eingeschränkt der Therapieentscheidung (Pastore et al. 2015).

Ein starker Hinweis auf eine mögliche schlechte Prognose scheint, neben allgemeinen Faktoren, eine frühe Progression der Erkrankung innerhalb von zwei Jahren nach einer Erstlinientherapie mit CHOP (Chemotherapieschema mit Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednisolon) plus Rituximab zu sein (Casulo et al. 2015).

Anhand von Daten aus mehreren deutschen Krebsregistern ergab sich Anfang der 2000er Jahre eine mittlere Fünfjahres-Überlebensrate von etwa 78% bei

Frauen und 76% bei Männern. Das Fünfjahres-Überleben zeigte sich in einer Studie auch abhängig vom histologischen Grad. Die Fünfjahresüberlebensrate betrug bei Patient:innen mit FL Grad 1 80%, 75% bei Grad 2 und 66% bei Grad 3 (Pulte et al. 2013).

Während Nastoupil et al. keine Vorteile einer frühzeitigen Behandlung von FL-Patient:innen im Stadium II-IV auf die Überlebenszeit feststellen konnten (Nastoupil et al. 2016), berichteten Link et al. gegenteilige Ergebnisse (Link et al. 2013). Eine systematische Analyse von Mozas et al. zeigte über vier Jahrzehnte hinweg eine stetige Verbesserung der Therapieergebnisse. Die komplette Remissionsrate stieg von 48 auf 70%, das 5-Jahres-Gesamtüberleben von 77 auf 86% (Mozas et al. 2020).

Inwieweit genomische Veränderungen, die Genexpression und immunhistochemische Marker für die Prognose herangezogen werden können, ist derzeit noch nicht eindeutig geklärt, eine umfassende Validierung steht noch aus. Auch ihr Einfluss auf Therapieentscheidungen bei einzelnen Kranken und außerhalb klinischer Studien ist bislang ungeklärt (Campo et al. 2022, Xerri et al. 2022).

Bei Patient:innen mit FL Grad 1-3A zeigt sich das klinische Outcome bei vergleichbaren Therapieregimen sehr ähnlich (Chau et al. 2003, Pham et al. n.d., Wahlin et al. 2012, Rimsza et al. 2018), weshalb auch die Patient:innenberatung hinsichtlich Prognose und Therapieoptionen nicht anhand des WHO-Grades orientiert werden soll, sondern eher an Faktoren wie Alter, LDH und dem bisherigen therapeutischen Vorgehen (Pham et al. n.d.).

Fälle von FL 3A mit t(14;18)(q32;21)-Translokation zeigten eine bessere Prognose als solche ohne die entsprechende Translokation. Hinweisend auf einen schlechteren Verlauf war hingegen das Auftreten von MYC-Translokationen (Koch et al. 2016). Hochgradige FL sind Laurent et al. zufolge morphologisch vielfältig und weisen eine Reihe von Veränderungen im Genom auf. Derartige FL wiesen ein schlechteres klinisches Outcome auf, als vergleichbare Fälle von FL Grad 1 oder 2 (Laurent et al. 2021).

In Bezug auf das klinische Stadium scheinen *BCL2*-positive und negative FL im fortgeschrittenen Stadium ein ähnliches Verhalten sowie Prognose zu zeigen (Zamò et al. 2018, Leich et al. 2016).

1.2 Diagnostik

Zur Routinediagnostik des FL zählt neben der klinischen Untersuchung, der Blutentnahme und der Knochenmarksuntersuchung auch die histologische Untersuchung meistens der Lymphknoten. Das Gewebe wird mittels Biopsie/Feinnadelaspiration und dieser folgend oder primär mittels LK-Exstirpation gewonnen. Die pathologische Analyse umfasst neben den Standardfärbungen einige histochemische sowie regelmäßig auch molekularpathologische Untersuchungen, auf welche in den folgenden Kapiteln sowie in der Abhandlung zur Durchführung weiter Bezug genommen wird.

1.2.1 Histologie

Das FL ist eine Neoplasie von Keimzentrums-B-Zellen, den Zentrozyten und ihrer Vorläufer, den Zentroblasten. Das Wachstum stellt sich typischerweise durch eine folliculäre Anordnung von neoplastischen Zellen dar. Es zeigen sich multiple, dicht benachbarte, nicht polarisierte Follikel aus Zentrozyten und Zentroblasten, und einigen reaktiven T-Zellen. Die Zentrozyten sind meist etwas größer als Lymphozyten und weisen einen gekerbten oder länglich geformten Zellkern auf. Das Zytoplasma ist eher spärlich und schwer zu erkennen, die Nucleoli sind meist nicht erkennbar. Die Zentroblasten sind bis zu dreimal so groß wie kleine Lymphozyten, die Zellkerne sind im Vergleich zu den Zentrozyten deutlich runder bis oval geformt mit peripher lokalisierten Nucleoli und aufgelockertem Kernchromatin (Xerri et al. 2016, Swerdlow et al. 2016). Auch folliculär dendritische Zellen können in den Follikeln gefunden werden, Mantelzonen sind kaum sichtbar (Xerri et al. 2016).

Die charakteristischen folliculären Ansammlungen ähneln histologisch den gutartigen Sekundärfollikeln, welche in den LK aus den Primärfollikeln entstehen

(Lossos and Gascoyne 2011). Die Diagnose wird anhand des histologischen Bildes gestellt. Keimzentren haben in der Regel viele Sternhimmelmakrophagen und Mitosen, beim FL fehlt dieses Bild. Dagegen breiten sich die Knoten beim FL häufig ins Fettgewebe und den LK herum aus, was reaktiv fast nicht vorkommt. Die Anteile von Zentrozyten und Zentroblasten können stark variieren, meist überwiegen die Zentrozyten deutlich. Auch Anteile von großen transformierten Zellen und einem wenigstens teilweise folliculären Wachstumsmuster sind beschrieben (Xerri et al. 2016).

Selten treten Fälle mit einem komplett diffusen Wachstumsmuster auf. Auch in diesen Fällen weisen die neoplastischen Zellen immer noch die morphologischen und immunphänotypischen Eigenschaften der Keimzentrums-B-Zellen auf. Morphologisch präsentiert das FL neben der Einwanderung der kleineren Zentrozyten und größeren Zentroblasten eine zerstörte Lymphknotenarchitektur (Adam et al. 2013).

Begleitend ist ein positives Bild in den immunhistochemischen Färbungen für Keimzentrumsmarker wie CD10 oder BCL6 zu erwarten. Die Expression der Keimzentrumsmarker ist vor allem außerhalb der Knoten pathologisch. Sollte vorerst kein folliculäres Wachstumsmuster erkennbar sein, kann dieses mit ergänzenden Markern, für FDC beispielsweise mittels CD23 oder CD21, zum Teil noch unterstützend dargestellt werden. Die FDC-Netzwerke sind beim FL eher irregulär expandiert, weniger kompakt als beim reaktiven Keimzentrum (Liu et al. 2013).

Histologisch werden traditionell die FL mit steigendem Anteil an Zentroblasten der neoplastischen Follikel in die Grade 1, 2, 3A und 3B eingeteilt (Swerdlow et al. 2016, Horn et al. 2018), wobei die FL Grad 3B große Unterschiede zeigten (Swerdlow et al. 2017).

Auch in dieser Arbeit wurde mithilfe dieser Einteilung gearbeitet und die Fälle entsprechend eingestuft. Diese Grad-Einteilung wird anhand der Anzahl an Zentroblasten pro high-power mikroskopischen Feld (HPF) mit einer Vergrößerung mittel x40 Objektiv, entsprechend 0,159mm² getroffen. Es ist nötig, die Maße des angewendeten HPF zu definieren, weil das tatsächliche HPF in

seiner Größe aufgrund von technischen Entwicklungen und unterschiedlichen Kombinationen von Linsen und Mikroskopen vom Modell abhängig ist (Metter et al. 1985, Cree et al. 2021). Dies hat eine große klinische Relevanz, da bei größeren HPF, und damit mehr sichtbaren Zentroblasten, ein Tumor potentiell als höhergradig eingestuft werden könnte (Cree et al. 2021). Darüber hinaus sind divergierende Zählmethoden sowie das große morphologische Spektrum von Zentroblasten zusätzlich erschwerend hinsichtlich der Vergleichbarkeit von Ergebnissen (Metter et al. 1985).

Grad 1 und 2, die niedriggradigen FL, zeigen vor allem Zentrozyten, mit 0-15 Zentroblasten (Grad 1: 0-5 sowie Grad 2: 6-15) pro HPF, während bei mehr als 15 Zentroblasten pro HPF von einem Grad 3A gesprochen wird, solange noch Zentrozyten vorhanden sind. Bei Grad 3B sind ausschließlich Zentroblasten zu sehen. Zudem wurde zusätzlich zwischen follikulärem und diffusem Wachstumsmuster differenziert. Im Fall eines diffusen Wachstums bei Grad 3B sollte die Diagnose eines DLBCL gestellt werden (Swerdlow et al. 2017).

FL Grad 1-3A sind in ihren Eigenschaften ähnlich, während Grad 3B sowohl klinisch, epidemiologisch als auch genetisch deutliche Unterschiede aufweist, sodass man sie in der Untersuchung klar abgrenzen sollte (Wahlin et al. 2012). Klinisch fraglich ist, ob 3A in Bezug auf Verlauf und Behandlung mehr zu niedriggradigen oder höhergradigen FL gezählt werden sollte (Kroft 2019). Ein gemeinsames Auftreten von FL Grad 3A und 3B im selben Gewebe ist sehr ungewöhnlich (Rimsza et al. 2018, Koch et al. 2016), auch jenes von 3B mit FL 1-2, während regelmäßig im selben Gewebe bei Grad 3A auch Bereiche mit FL 1-2 zu finden sind. Dahinter lässt sich eine unterschiedliche Pathogenese vermuten (Koch et al. 2016), welche die geno- und phänotypischen Unterschiede erklären könnte. So präsentieren FL 3B unregelmäßig *BCL2*- und *BCL6*-Translokationen, während FL 1-3A eher einheitliche Merkmale mit häufigen *BCL2*-Translokationen aufweisen (Horn et al. 2011).

1.2.1.1 Immunhistochemie (IHC)

Im Rahmen der Immunphänotypisierung kann die Expression zahlreicher Antikörper untersucht werden, welche im Gewebe oder durch Tumorentstehung

exprimiert werden. Sie ist ein wichtiger Bestandteil in der Diagnostik des FL. Oberflächenmarker sind stets Proteine, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden und als Erkennungsmerkmale für verschiedene Zelltypen dienen. Es werden dabei spezifische Oberflächenmarker verwendet, um bestimmte Zelltypen zu identifizieren. Sie können auch als Angriffspunkt für Therapien dienen oder als Messgröße für deren Erfolg.

Wichtige Marker, die bei der Diagnostik des FL eine bedeutende Rolle spielen, sind, neben BCL2 (B-cell lymphoma 2), die Keimzentrumsmarker CD10 und BCL6 und der B-Zell-Marker CD20 (Swerdlow et al. 2016).

BCL2 ist ein antiapoptotisches Protein, das eine zentrale Rolle in der Regulierung des Zellzyklus hat. Eine Überexpression hemmt den programmierten Zelltod – auch in malignen Zellen – und begünstigt so deren Überleben (Tsujimoto et al. 1984, Godon et al. 2003, Zhu et al. 2019). In der Immunhistochemie ermöglicht die BCL2-Positivität die Abgrenzung neoplastischer Follikel von reaktiven, da letztere typischerweise keine BCL2-Expression zeigen (Xerri et al. 2016, Béné et al. 2011). BCL2 wird in 85-90% der FL Grad 1 und 2 exprimiert (Marafioti et al. 2013) und stellt daher ein zentrales Kriterium in der histopathologischen Routinediagnostik des FL dar (Nann et al. 2020, Vaandrager et al. 2000). Mit zunehmendem histologischen Grad des FL nimmt die Expression von BCL2 allerdings ab (Horn et al. 2011, Wahlin et al. 2012).

1.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wird in der Routinediagnostik häufig verwendet, um genetische Umlagerungen nachzuweisen. Im Fall des FL wird diese Methode häufig zum Nachweis der t(14;18)-Translokation eingesetzt, insbesondere, wenn keine BCL2-Expression nachweisbar ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit drei *BCL2*-Sonden verschiedener Hersteller gearbeitet. Zudem wurde die *BCL6*-Translokation untersucht und zusätzlich die *IGH/BCL2*-Fusionsprobe angewendet.

Weiterführend kann bei starkem Verdacht auf ein in der FISH nicht erfasstes Rearrangement noch eine PCR oder, besonders in Studien, Next-Generation Sequencing (NGS) angewendet werden.

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

Die t(14;18)(q32;21)-Translokation ist in 65% bis zu 85% der Fälle des folliculären Lymphoms nachweisbar (Pezzella et al. 1990, Vaandrager et al. n.d., Masir et al. 2009, Leich et al. 2009). Dabei wird das *BCL2*-Gen vom Chromosom 18q21 an den Immunglobin-Schwerketten-Locus (*IGH*) auf Chromosom 14q32 verlagert. Infolge dieser genomischen Umlagerung gerät *BCL2* unter die Kontrolle regulatorischer Elemente des *IGH*-Locus, was zu einer anhaltenden Überexpression des antiapoptotischen Proteins BCL2 führt. Die daraus resultierende Überexpression hemmt die Apoptose und fördert damit das Überleben maligner Zellen (Tsujiimoto et al. 1984, Godon et al. 2003, Zhu et al. 2019).

Infolge dieser Zusammenhänge hat sich die immunhistochemische Bestimmung der BCL2-Expression als diagnostischer Standard etabliert (Nann et al. 2020, Vaandrager et al. 2000). Etwa 85-90% der FL zeigen eine deutliche Überexpression von BCL2, während sie in rund 10-15% der Fälle ausbleibt (Adam et al. 2013). Bei nahezu allen FL mit nachweisbarer t(14;18)-Translokation ist erwartungsgemäß auch eine BCL2-Überexpression vorhanden (Leich et al. 2009).

Allerdings zeigen bisherige Studien ein heterogenes Bild bezüglich des Auftretens der t(14;18)-Translokation in unterschiedlichen Krankheitsstadien sowie hinsichtlich der Korrelation mit der BCL2-Expression. Daraus ergibt sich die zentrale Fragestellung nach der Aussagekraft der BCL2-Immunhistochemie als verlässlichem Marker für die t(14;18)-Translokation.

Ziel dieser Arbeit ist es, die diagnostische Bedeutung der BCL2-Immunhistochemie im Hinblick auf das Vorliegen der t(14;18)(q32;21)-Translokation beim FL zu untersuchen und ihre Eignung als Biomarker kritisch

zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden FL-Fälle mit positiver BCL2-Immunreaktion mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf das Vorliegen der t(14;18)-Translokation bzw. eine *IGH/BCL2*-Fusion untersucht.

Ein ergänzendes Ziel bestand darin, die diagnostische Leistungsfähigkeit unterschiedlicher FISH-Sonden beim Nachweis der *IGH/BCL2*-Translokation vergleichend zu analysieren. Dazu wurden drei Break-Apart-Sonden und eine Dual-Fusionssonde hinsichtlich Sensitivität, Signalstärke und Anwendbarkeit im Routinelabor evaluiert.

Zusätzlich wurde die seltenere *BCL6*-Translokation untersucht, welche ähnlich der *BCL2*-Umlagerung, zur Lymphomgenese beitragen kann.

Ein vertieftes Verständnis der molekularen Veränderungen, allen voran der t(14;18)-Translokation, ist essenziell für das Verständnis der Pathogenese des FL. Ebenso bildet es die Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter Therapien, insbesondere mit Blick auf unterschiedliche Krankheitsstadien und molekulare Subtypen (Kridel, Sehn, and Gascoyne 2012, Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Studienkohorte

Voraussetzung für den Studieneinschluss waren die Verfügbarkeit mindestens eines kompletten Lymphknotenexzidates und das Vorliegen einer Einwilligungserklärung der Patient:innen. Stanzbiopsien wurden somit ausgeschlossen. Die Untersuchungen wurden ausschließlich an Lymphknoten durchgeführt, welche in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) wurden und sich im Archiv des Tübinger Instituts für Pathologie befanden.

Es handelte sich dabei alleinig um für die Routine-Diagnostik entnommene Präparate, die nicht mehr für weiterführende Diagnostik benötigt wurden. Die

Gewebeproben wurden hierbei nicht komplett verbraucht, da für die Untersuchungen ein Tissue Microarray (TMA) erstellt wurde.

Es wurden ausschließlich Gewebeproben von Patient:innen verwendet, bei denen bei der Routinediagnostik ein FL Grad 1-3A bereits festgestellt worden war.

Diejenigen Fälle, welche die zusätzlichen Diagnosen eines ISFN oder einer DLBCL aufwiesen, wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen. Auch FL mit einem diffusen Wachstum wurden nicht inkludiert. Außerdem mussten die vorliegenden Fälle eindeutig eine BCL2-Expression aufweisen.

Die Studie wurde der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen zur Prüfung vorgestellt und die Durchführung genehmigt (320/2019BO2).

2.1.2 Antikörper Immunhistochemie

Antikörper (Klon)	Hersteller	Protokoll	Verdünnung	Vorbehandlung
BCL2 (100/D5)	DCS, Hamburg, Deutschland	30	1:20	CC1 Std
BCL6 (G1191/A8)	Zytomed, Berlin, Deutschland	116	1:50	CC1 Mild
CD3 (2GV6)	Roche, Penzberg, Deutschland	72	rtu (ready to use)	CC1 Std
CD10 (56C6)	Novocastra, Wetzlar, Deutschland	38	1:100	CC1 Std
CD20 (L26)	DAKO, Hamburg, Deutschland	412	1:1000	CC1 Std

Tabelle 1: Antikörper der Immunhistochemie

In allen immunhistochemischen Färbungen wurde zur Vorbehandlung ULTRA Cell Conditioning Solution ULTRA CC1 (Ventana) und das OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana) als Detektionssystem eingesetzt.

2.1.3 Sonden Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Sonde		Hersteller
<i>BCL2</i> - Translokation	Vysis® LSI <i>BCL2</i> Dual Color Break Apart Rearrangement Probe	Abbott Molecular, Wiesbaden, Deutschland
<i>BCL2</i> - Translokation	ZytoLight® SPEC <i>BCL2</i> Dual Color Break Apart Probe	ZytoMed Systems, ZytoVision, Bremerhaven, Deutschland
<i>BCL2</i> - Translokation	MetaSystems® XL <i>BCL2</i> Break Apart Probe	MetaSystems Probes, Altlußheim, Deutschland
<i>BCL6</i> - Translokation	Vysis® LSI <i>BCL6</i> Dual Color Break Apart Rearrangement Probe	Abbott Molecular, Wiesbaden, Deutschland
<i>IGH/BCL2</i> - Fusionsprobe	Vysis® LSI <i>IGH/BCL2</i> Dual Color Dual Fusion Translocation Probe	Abbott Molecular, Wiesbaden, Deutschland

Tabelle 2: Sonden der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

2.1.3.1 Lokalisation der Signale

	Zentromer			3'	Region 18q21.33- q22.1	5'			Telomer
Vysis <i>BCL2</i> Break Apart Probe		Grüne Sonde ~854kb			<i>BCL2</i> -Gen		Lücke mit <i>FVT1</i> - Gen	Rote Sonde ~608kb	
MetaSystems <i>BCL2</i> Break Apart Probe		Rote Sonde 358kb					Lücke	Grüne Sonde 349kb	
ZytoLight <i>BCL2</i> Break Apart Probe		Grüne Sonde ~545kb	Lücke				Rote Sonde ~665kb		

Tabelle 3: Details zur Lokalisation der *BCL2*-BA-FISH-Sonden

In Tabelle 3 sind möglichst genau die Bereiche aufgezeigt, in denen die grüne und die rote Sonde der jeweiligen *BCL2* Break Apart Probe in der FISH zu einem Signal führen. Das *BCL2*-Gen liegt in der Region 18q21.33. Die Sonden setzen mit zwei verschiedenen Farben am 3' und 5' Ende des Gens an.

In Abbildung 1 bei 5' besteht zwischen dem *BCL2*-Gen und dem Beginn der Sonde noch eine kleine Lücke, bei 3' setzt die Sonde sehr knapp am Gen an. Die Länge des Bereichs, in dem eine Sonde ansetzt, variiert je nach Hersteller, und wird in kb (Kilobase) angegeben. (Eine kb entspricht 1000 Basenpaaren.) In

Abbildung 1 ist hier als bildhaftes Beispiel zur Veranschaulichung die Lokalisation der *BCL2* BA-Sonde von MetaSystems® (MetaSystems Probes, Altlußheim, Deutschland, im Folgenden kurz: MetaSystems) inkludiert.

(Vermerk: Leider wurde von den Herstellern der Vysis® (Abbott Molecular, Wiesbaden, Deutschland im Folgenden kurz: Vysis) sowie der ZytoLight®-Sonde (ZytoMed Systems, ZytoVision, Bremerhaven, Deutschland, im Folgenden kurz: ZytoLight) keine Erlaubnis zur Verwendung des Bildmaterials erteilt.)

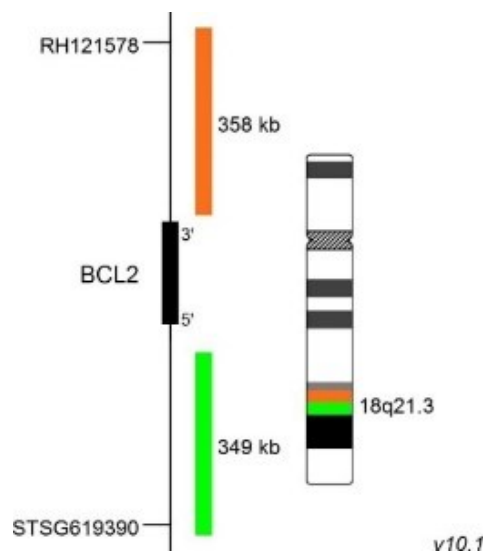


Abbildung 1: *BCL2* Break Apart-Sonde von MetaSystems, Probe Map

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Zur Anwendung kamen Materialien der Firmen *Eppendorf*, *Zeiss*, *Sigma Aldrich*, *PanReac*, *AppliChem*, *Roth*, *Abbot Molecular*, *Biozym*, *VWR*, *GFL*, *Menzel Gläser*, *Marabu*, *Peske*, *Sarstedt* und *Merck*.

2.1.5 Geräte

Gerät		Hersteller
Färbeautomat HE	Tissue-TEK-Prisma	Sakura
Eindeckautomat HE	Tissue-TEK-Glas	Sakura
Färbeautomat IHC	BenchMark ULTRA	Ventana Medical Systems
Eindeckautomat IHC	Microm CTM6	Thermo Scientific
Mikrotom	Microm HM355S	Thermo Scientific

TMA-Erstellung	Manueller Tissue Microarrayer	Beecher Instruments
Mikroskop/ Aufnahmen	Axioskop 2 Plus Mikroskop	Zeiss
Verwendete Objektive	Plan-Neofluar x1.25/0.035, x2.5/0.075, x10/0.30, x20/0.50 und x40/0.75	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.M2 mit ApoTome.2 System	Zeiss
Hybridisierung	ThermoBrite System	Vysis Instruments, Abbot Molecular

Tabelle 4: Verwendete Geräte

2.2 Methoden

Die Diagnose der ausgewählten Fälle wurde im Rahmen der Studie nochmals durch eine neuerliche Untersuchung frisch angefertigter HE-Schnitte und immunhistochemischer Färbungen (BCL2, BCL6, CD3, CD10 und CD20) überprüft und gesichert.

Anschließend wurden Tissue Microarrays erstellt, und auch hier die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt, sowie FISH mit der *BCL2* Break Apart-Sonde (Vysis), der *BCL6* Break Apart-Sonde und der *IGH/BCL2*-Fusionssonde erstellt. Ergänzend wurde die *BCL2* Break Apart Probe mittels zweier zusätzlicher *BCL2* Break Apart-Sonden von alternativen Herstellern (MetaSystems und ZytoLight) durchgeführt.

2.2.1 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Zur histologischen und zytologischen Beurteilung wird routinemäßig die HE-Färbung eingesetzt. Dazu werden FFPE-Schnitte mittels Mikrotom (Thermo Scientific) in einer Schnittdicke von 2,5µm erstellt, entparaffiniert und anschließend zuerst mit Mayers-Hämatoxylin und anschließend mit Eosin durch den Färbeautomaten (Sakura) gefärbt. Die basophilen Zellanteile wie die Zellkerne erscheinen blau, während die sauren Bestandteile wie das Zytoplasma rot gefärbt werden.

2.2.2 Tissue Microarray

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus den ausgewählten Fällen ein Tissue Microarray angefertigt. Mittels eines Tissue Microarray können auf einem einzigen Objektträger multiple Gewebeproben direkt miteinander verglichen werden. Es können auf diese Art sehr materialsparend und kostensparend mit vergleichsweise wenig Aufwand verschiedene Untersuchungen wie immunhistochemische Färbungen und FISH durchgeführt werden (Kononen et al. 1998, Hans 2004). In dieser Studie wurden für die 69 Fälle zwei TMAs erstellt, und in der Folge jede Untersuchung an Schnitten von diesen Blöcken durchgeführt.

An neu angefertigten HE-Schnitten jedes FFPE-Lymphknotens wurden vorab unter dem Mikroskop anhand der HE-Schnitte sowie der Schnitte mit BCL2-immunhistochemischer Färbung follikelreiche Bereiche identifiziert und markiert. Aus diesen Bereichen wurden pro Fall jeweils drei Stanzen von 0,6 µm Durchmesser entnommen und mittels einem manuellen Tissue Microarrayer in einem Raster mit einem Abstand von 1 mm in einen neuen Paraffinblock eingebettet. Begleitend wurde ein Raster erstellt, welches gewährleistet, dass man die Bereiche auf dem TMA den einzelnen Fällen zuordnen kann. Als Negativkontrolle wurde ein Bereich mit drei Stanzen aus Leberparenchym neben dem Raster miteingebettet, um nicht-lymphatisches Gewebe zur Kontrolle vergleichen zu können.

Das Risiko, durch die vergleichsweise kleinen Stanzen nicht den gewünschten Bereich abzubilden, wurde durch die vorhergehende Markierung minimiert. Indem jeweils drei Stanzen eines Falles von unterschiedlichen Stellen ausgewählt wurden, wurden Ausschnitte verschiedener Bereiche einer Gewebeprobe inkludiert.

2.2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine bewährte Methode in der pathologischen Diagnostik um antigene Strukturen, beispielsweise eines vom Tumor exprimierten Proteins durch die Behandlung mit einem spezifischen Antikörper

sichtbar zu machen. Diese Antikörper binden an diese gewünschte Struktur, sofern sie im Gewebe vorhanden ist, und färben ebendiese Bereiche ein, während Areale, in denen das Protein nicht vorhanden ist, blass bleiben. In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen für BCL2, BCL6, CD3, CD10 und CD20 sowohl an den Vollschnitten als auch an den TMAs durchgeführt.

Die histologischen und immunhistochemischen Färbungen erfolgten an 2,5 µm Schnitten nach standardisierten Protokollen entsprechend den Herstellerangaben mittels des automatisierten Benchmark Ultra Färbeautomaten (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Der Entparaffinierung folgte eine Vorbehandlung mit Ultra CC1 Cell Conditioning Lösung (OptiView, Ventana). Neben dem Aufbringen des Antikörpers in der empfohlenen Verdünnung erfolgte außerdem die Anwendung des Detektionssystems (OptiView, Ventana) sowie die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und die Nach-Gegenfärbung mittels Bluing. Die immunhistochemischen Färbungen wurden den allgemeinen Standards gemäß durchgeführt, wie es auch beispielsweise bei Schmidt et al. oder Nann et al. erfolgte (Nann et al. 2020, Schmidt et al. 2014).

Die jeweiligen Protokolle und zugehörigen Verdünnungen der einzelnen Antikörper sind unter Kapitel 2.1.2 aufgelistet.

2.2.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Zur Detektion von Translokationen wird auch in der Routinediagnostik regelmäßig bei diagnostischen Zweifeln eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung durchgeführt. In dieser Studie wurde zum Nachweis der t(14;18)(q32;21)-Translokation die *BCL2* Break Apart-Sonde (Vysis LSI *BCL2* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe, Abbott Molecular) angewendet. Um diese standardmäßig in der Diagnostik eingesetzte Sonde zu überprüfen und vergleichen zu können, wurde außerdem die SPEC *BCL2* Dual Color Break Apart Probe (ZytoLight) und die XL *BCL2* Break Apart Probe (MetaSystems) eingesetzt.

Um als Gegenprobe das typische, erwartete *IGH/BCL2*-Rearrangement sichtbar zu machen, wurde außerdem die *IGH/BCL2*-Fusionsprobe (Vysis LSI *IGH/BCL2* Dual Color Dual Fusion Translocation Probe) untersucht.

Ergänzend wurde außerdem zur Untersuchung einer *t(3;14)(q27;q32)*-Translokation die *BCL6* Break Apart-Sonde (Vysis LSI *BCL6* Break Apart Dual Color Rearrangement Probe) angewendet. Die *BCL6*-Translokation wird üblicherweise im Fall einer negativen *BCL2*-Translokation ergänzend untersucht.

Die durchgeführten FISH-Untersuchungen wurden mit drei Stansen aus Leberparenchym als Negativkontrolle verglichen, die in beiden TMA-Blöcken inkludiert wurden. Zur Kontrolle wurde außerdem die FISH mit den *BCL2* BA-Sonden von ZytoLight und MetaSystems noch an Vollschnitten wiederholt, um die Ergebnisse der TMAs zu überprüfen.

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierungen erfolgten mittels ThermoBrite-System an Schnitten der TMA Blöcke mit einer Schnittdicke von 3,5 µm gemäß den jeweiligen Herstellerangaben wie auch von Vogelsberg et al. angewendet (Vogelsberg et al. 2021). Die weiteren Details zu den eingesetzten FISH-Sonden sind unter 2.1.3 aufgelistet.

Durch die FISH können in Gewebeproben spezifische DNA-Sequenzen mit fluoreszenzmarkierten Sonden hybridisiert werden, welche für die Zielsequenz spezifisch sind und diese Zielsequenz unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen können.

Die Auswertung erfolgte am Axio Imager (Zeiss) mit den Vergrößerungen von 5x, 10x, 20x, 40x, 63x, 100x. Es wurden jeweils alle 3 Stansen jedes Falles analysiert und durch mehrere speziell geschulte Personen unabhängig ausgewertet und die Ergebnisse gegengeprüft. Bei divergierenden Auswertungsergebnissen kam es zu einer Konsensusbefundung.

Da diese Sonden regelmäßig zur Diagnostik eingesetzt werden, kam der hier üblicherweise angewandte Cut-off von 10% zur Anwendung. Der Cut-off-Wert beschreibt die Mindestanzahl von Zellen mit nachgewiesener Translokation bzw.

ihren prozentualen Anteil, ab dem ein Fall als positiv für eine Translokation gewertet werden kann.

2.2.4.1 Die Hybridisierung am Beispiel der Vysis *BCL2* Break Apart Probe
Zur Durchführung der FISH gemäß den Vorgaben des Herstellers wurden die 3,5 µm dicken TMA-Schnitte, welche mittels Xylol entparaffiniert wurden, auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend erfolgte die Dehydrierung durch ein Ethanolbad mit einer Konzentration von 100%. Es folgte die Trocknung und weitere Vorbehandlung mit Natriumcitrat bei 95,5°C sowie die Anwendung von Pepsin bei 37°C für 4 Minuten. Die Denaturierung wurde mit 70% Formamid-2xSSC-Arbeitslösung bei 73°C durchgeführt und mit 70% und 100% Alkohol Behandlung abgeschlossen. Nach einem weiteren Trocknungsschritt wurden 1,5 µl der Sonde aufgetragen, nachdem sie mit einem Hybridisierungspuffer gemischt und erwärmt wurden. Als nächster Schritt folgte die Abdichtung eines Deckglases mit Fixogum. Die Hybridisierung erfolgte daraufhin im ThermoBrite Inkubator bei 37°C für 6-16 h, üblicherweise über Nacht.

Am zweiten Tag erfolgte die sogenannte Waschung, hier kamen verschiedene Lösungen wie 2xSSC, sowie 2X SSC/0,3% NP-40 und Alkohol mit 70%, 85% und 100% Konzentration für je 1 Minute zum Einsatz. Als Gegenfärbung wurde Dapi I (Vysis) aufgebracht, bevor das Deckglas aufgesetzt wurde. Der gesamte Prozess sollte möglichst lichtgeschützt ablaufen und die Objektträger im Anschluss gekühlt gelagert werden.

Das Besondere an der Erstellung der Vysis *BCL2* BAP war, dass die Hybridisierung zweifach wiederholt wurde, um hier eine mögliche Fehlerquelle auszuschließen. Bei der 1. Wiederholung wurde die Vorbehandlung mit Pepsin für 7 Minuten verlängert und damit intensiviert, in der 2. Wiederholung für 10 Minuten (Vorgaben des Herstellers laut Vysis *BCL2* Break Apart FISH Probe Kit REF 5N51-20 49-5861/R1 B5N511).

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften des Studienkollektivs

Zur Durchführung dieser Studie wurde eine Kohorte von 100 Fällen angestrebt, schlussendlich erfüllten 69 Fälle aus den Jahren 2005 – 2014 die Einschlussbedingungen. Bei Diagnosestellung lag das Personenalter zwischen 39 und 88 Jahren. Das mediane Erkrankungsalter betrug 62,7 Jahre. 34 der Patient:innen waren weiblich, 35 männlich, es lag also ein sehr ausgeglichenes Verhältnis vor. Das durchschnittliche Alter (als arithmetisches Mittel berechnet) bei Diagnosestellung der Männer lag bei 64,1 Jahren, jenes der Frauen bei 61,3 Jahren.

60 dieser Patient:innen, also ein Anteil von 87%, wiesen ein FL Grad 1-2 auf. Nur 9 der Fälle (13%) zeigten ein FL Grad 3A, wie in Tabelle 5 ersichtlich.

Fallanzahl gesamt		69 Anzahl/Gesamtfälle (prozentueller Anteil)		Anzahl Frauen	Anzahl Männer
Geschlechterverteilung				34	35
Mittleres Erkrankungsalter In Jahren		62,7		61,3	64,1
Alter bei Diagnosestellung der FL Grad 3: In Jahren		59,2		54,5	63
FL Grad 1-2		60 (87%)		30	30
FL Grad 3A		9 (13%)		4	5
Krankheitsstadium nach Ann Arbor:					
Stadium I	Frühstadium	18	= 28 Fälle	9	9
Stadium II		10		6	4
Stadium III	Spätstadium	16	= 33 Fälle	8	8
Stadium IV		17		10	7
<i>Fehlend, nicht erhebbar</i>		8		1	7

Tabelle 5: Patient:innencharakteristika, FL = Follikuläres Lymphom

Fälle der Grade 1 und 2 wurden in einer gemeinsamen Gruppe betrachtet, da die Graduierung, wie im Kapitel 1.2.1 ausgeführt, sehr subjektiv ist und eine strenge Trennung nicht mehr durchgeführt wird. Sie machen den größten Anteil der FL aus und weisen einen ähnlichen Verlauf sowie eine vergleichbare Prognose auf.

Das Krankheitsstadium der Patient:innenfälle konnte nicht in jedem Fall retrospektiv erhoben werden, es war für 61 der 69 Fälle vorliegend, und fehlte bei 8 Fällen. Die Patient:innenfälle wiesen ein Stadium nach Ann-Arbor zwischen I und IV auf, Männer und Frauen wiesen sehr ausgeglichene Krankheitsstadien auf.

3.2 Histologie und Immunhistochemie

Die histologische Diagnose jedes inkludierten Falles wurde im Rahmen der Zusammenstellung des Studienkollektivs überprüft und gesichert. Dies erfolgte auch durch die neuerliche Auswertung der immunhistochemischen Merkmale.

Makroskopisch ließen sich bei den überwiegend follikulär gewachsenen FL auch mit freiem Auge zahlreiche, eng positionierte, ungeordnete und unregelmäßig geformte Follikel im oftmals vergrößerten LK erkennen. Auch eine Infiltration über die Kapsel hinaus konnte bei einigen Fällen beobachtet werden.

Unter dem Mikroskop ließ sich die von den neoplastischen Follikeln verdrängte ursprüngliche Architektur der Lymphknoten teils gut erkennen. Die neoplastischen Follikel bilden, wenn überhaupt, nur sehr reduzierte Mantelzonen, wohingegen sie bei Sekundärfollikeln typisch sind.

3.2.1 Auswertung der Immunhistochemie

Im Rahmen dieser Studie wurde an den TMAs die immunhistochemische Expression von BCL2, BCL6, CD3, CD10 und CD20 untersucht. Die Auswertung erfolgte unter Aufsicht von und in Rücksprache mit einem hämatopathologisch erfahrenen Facharzt und einem überaus erfahrenen internationalen Experten für

Hämatopathologie. In der Auswertung wurde die Expression als positiv gezählt, wenn sich die Mehrheit der Tumorzellen mit dem Antikörper angefärbt zeigten.

3.2.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

	Stark positive Expression Anzahl/Gesamtfälle (prozentueller Anteil)	Nicht-stark positive Expression Anzahl/Gesamtfälle (prozentueller Anteil)	Negative Expression Anzahl/Gesamtfälle (prozentueller Anteil)	Nicht auswertbar Anzahl/Gesamtfälle (prozentueller Anteil)
BCL2	52/69 (75,4%)	17/69 (24,6%)	/	/
BCL6	66/69 (95,7%)	/	3/69 (4,3%)	/
CD10	15/69 (21,7%)	53/69 (76,8%)	1/69 (1,4%)	/
CD20	63/69 (91,3%)	6/69 (8,7%)	/	/
	Viele angefärbte T-Zellen Anzahl/Gesamtfälle (prozentueller Anteil)	Wenige angefärbte T-Zellen Anzahl/Gesamtfälle (prozentueller Anteil)		
CD3	23/69 (33,3%)	44/69 (63,8%)	/	2/69 (2,9%)

Tabelle 6: Immunhistochemische Ergebnisse, alle Prozentangaben auf eine Dezimalstelle gerundet. Die ausführliche Übersicht der Ergebnisse ist im Appendix inkludiert. Unter „Stark positive Expression“ werden die Fälle mit starker Färbung (pp) gezählt, unter „Nicht-stark positive Expression“ werden sowohl die Fälle mit heterogen positiver Expression (hp), als auch mit schwacher (p) eindeutiger Expression und auch solche mit zahlreichen positiven Zellen (zp) zusammengefasst, wie in der Ergebnistabelle aufgelistet. Im Fall der CD3 Immunhistochemie wurde nach „Viele angefärbte T-Zellen“ und „Wenige angefärbte T-Zellen“ unterschieden.

Für die ausführlichen Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen ist die Tabelle 14 im Anhang beigefügt.

Die immunhistochemischen Ergebnisse der TMAs stimmten mit den zuvor festgestellten Ergebnissen an den Vollschnitten bis auf einzelne Ausnahmen an den TMAs überwiegend überein. In solchen Ausnahmefällen konnte beispielsweise eine regional inadäquate Fixation als Ursache gefunden werden.

Es wurden ausschließlich FL einbezogen, welche an den Vollschnitten eine BCL2-Positivität aufwiesen. Diese ließ sich an den TMAs wiederholen. 75,4% der Fälle wiesen hinsichtlich der Intensität der Färbung sowie der Verteilung ein eindeutiges und starkes Färbeergebnis auf und werden in dieser Arbeit unter „Stark positive Expression“ gezählt. Unter der Gruppe „Nicht-stark positive

Expression“ wurden 24,6% der Fälle zusammengefasst, welche eine eindeutige, jedoch in ihrer Intensität schwächere bzw. in ihrer Verteilung heterogene Färbung aufzeigten. BCL6 und CD10 zeigten als Keimzentrumsmarker bis auf einzelne Ausnahmen eine stark positive Färbung. In diesen Ausnahmen zeigten sich teils nur einzelne Zellen positiv oder ein heterogenes Bild in einer der Färbungen, der jeweils andere Marker war jedoch positiv. CD3 verlief an den Tumorzellen jeweils negativ und markierte kleine reaktive T-Zellen im Hintergrund. Auch die Färbung für CD20 ergab als B-Zell-Marker klar positive Ergebnisse in sämtlichen Fällen.

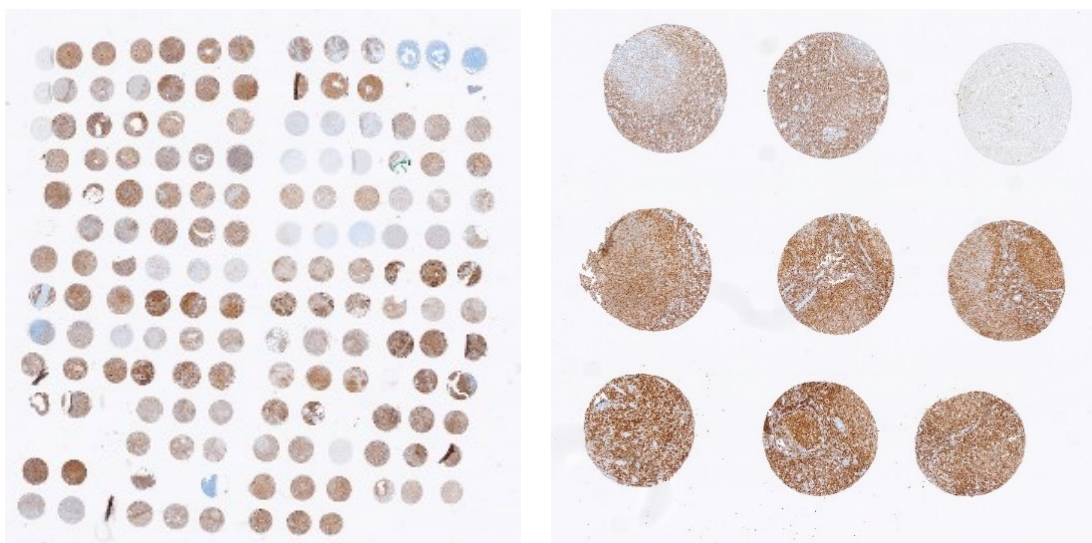


Abbildung 2: TMA-BCL2-Immunhistochemie

In Abbildung 2 ist ein TMA zu sehen, welches immunhistochemisch für BCL2 gefärbt wurde. Die bräunlichen Areale bedeuten eine positive BCL2-Expression, während in den hellen Regionen eine weniger deutliche oder fehlende Färbung erkennbar ist. Für diese Studie wurden ausschließlich Fälle ausgewählt, die zum Zeitpunkt der Diagnose immunhistochemisch BCL2-positiv waren. Zur Anwendung kam hier der gleiche BCL2-Antikörper wie er in der Routinediagnostik Verwendung findet. Einige der inkludierten Fälle zeigten bereits vorab eine heterogene Expression. Durch die Auswahl von drei einzelnen, kleinen Bereichen pro Fall kann daher ein Areal getroffen worden sein, welches weniger stark BCL2 exprimiert. Fallweise zeigt das eher ältere Blockmaterial eine geringere Reagibilität für die immunhistochemischen Färbungen.

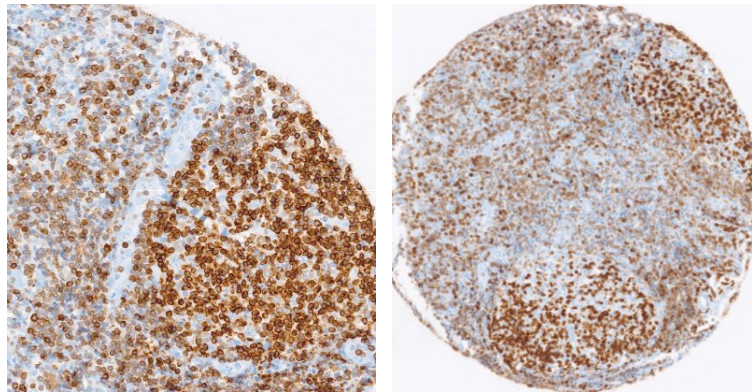


Abbildung 3: BCL2-Immunstochemie, stark positive Expression, Tissue Micro Array

In Abbildung 3 ist ein Ausschnitt der TMAs, bzw. eine ganze Stanze inkludiert, wo Areale von neoplastischen Follikeln mit starker BCL2-Expression erkennbar sind. In reaktiven Sekundärfollikeln wird das BCL2 im Gegensatz zu den neoplastischen Follikeln nicht exprimiert.

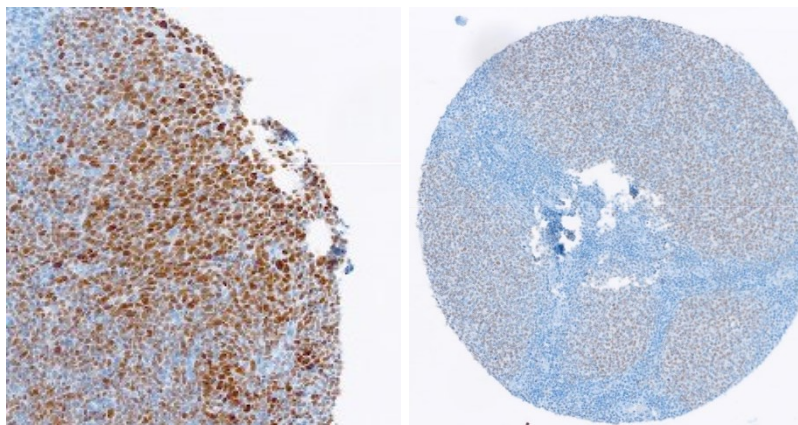


Abbildung 4: positive immunhistochemische BCL6-Expression, Tissue Micro Array

Die immunhistochemische Färbung mit dem Keimzentrumsmarker BCL6 zeigte in 95% der Fälle eine positive Expression, mit Fokus auf die folliculären Bereiche, teils mit unterschiedlich starker Ausprägung, wie in Abbildung 4 dargestellt.

Der T-Zellmarker CD3 wird gerne benutzt, um den Anteil und die Lokalisation von reaktiven T-Zellen im Umfeld der Tumorzellen darzustellen. Die angefärbten

Zellen befinden sich vor allem interfollikulär, also zwischen den neoplastischen Follikeln, wie in Abbildung 5 erkennbar.

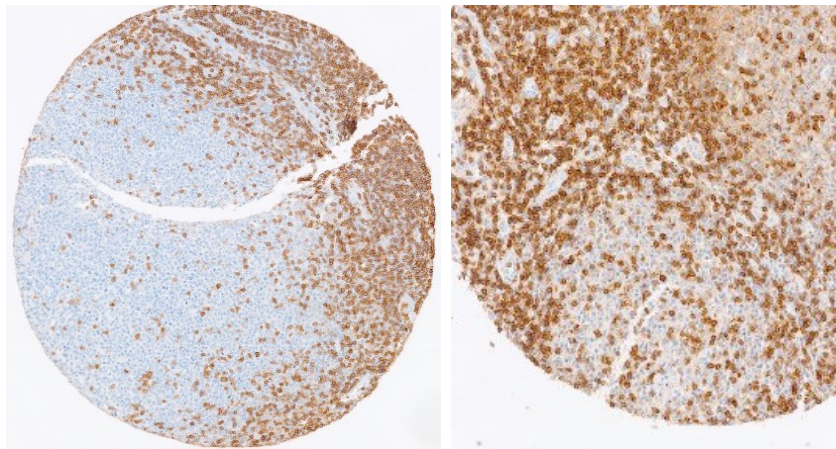


Abbildung 5: CD3-Expression, Tissue Micro Array

In Abbildung 6 ist die Expression des Keimzentrummarkers CD10 zu erkennen, welche deutlich von den Zellen der neoplastischen Follikel exprimiert wird. Im Umfeld der follikulären Zellansammlungen ist nur eine sehr geringe Anfärbung zu finden.

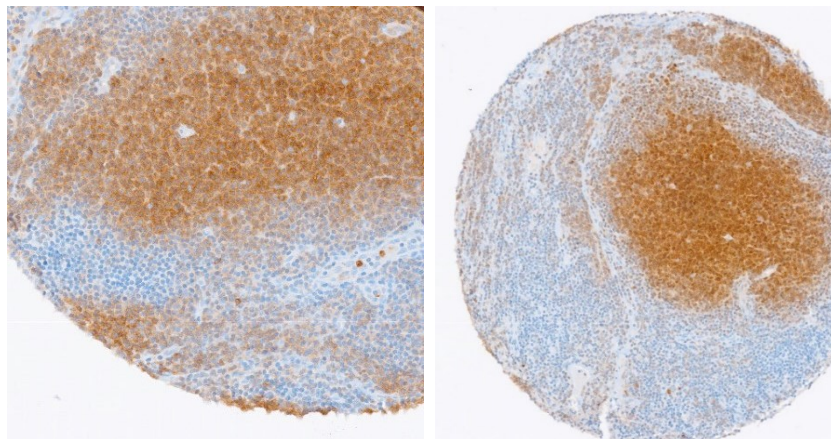


Abbildung 6: CD10-Expression, Tissue Micro Array

Sowohl nicht-tumorale B-Zellen, als auch die FL-Zellen werden durch den CD20-Marker angefärbt (Abbildung 7). Er wird eingesetzt, um nachzuweisen, dass B-Zellen bzw. eine von B-Zellen abstammende Neoplasie vorliegt. Häufig sind auch knotige Akzentuierungen der Tumorzellen zu erkennen.

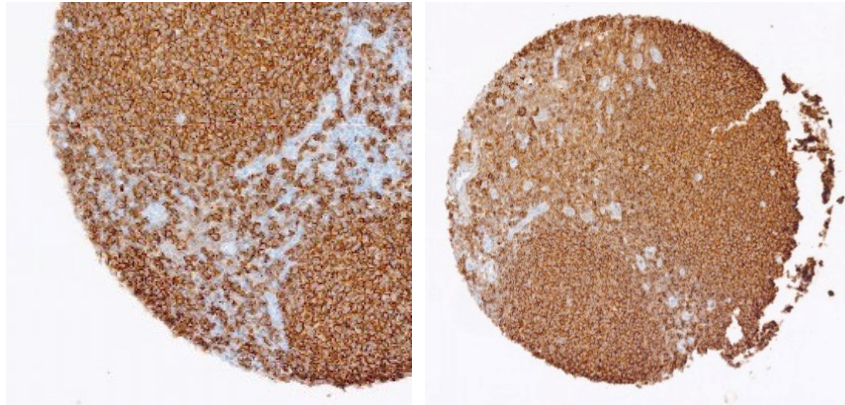


Abbildung 7: CD20-Expression, Tissue Micro Array

3.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

3.3.1 Auswertung der FISH

Die *BCL2* Vysis BA-Sonde hybridisiert mit dem grünen Signal am proximalen Ende des *BCL2*-Locus und mit dem roten Signal am distalen Ende der Region 18q21 auf Chromosom 18.

Die *BCL6* Vysis BA-Sonde hybridisiert mit dem grünen Signal proximal und mit dem roten Signal distal des *BCL6*-Gens, welches auf Chromosom 3 lokalisiert ist.

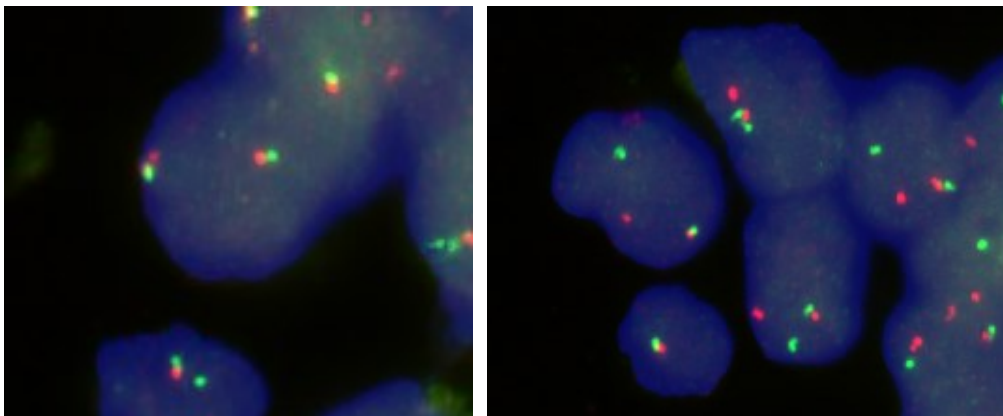


Abbildung 8: TMA FISH *BCL2*-BAP (2RG) Abbildung 9: TMA FISH *BCL2*-BAP (1R1G1RG)

Bei der Auswertung der FISH Dual Color BA Probe bei *BCL2* und *BCL6* werden demnach 4 Signale pro Zelle erwartet, je zwei grüne und zwei rote Signale. Liegen jeweils ein grünes (G) und ein rotes (R) Signal direkt nebeneinander, sodass sie unter Umständen auch gelb-orange erscheinen können, dann lässt sich keine Translokation nachweisen und die Zelle zählt als negativ (2RG)

(Abbildung 8). Findet sich nur ein einzelnes kombiniertes grün/rotes Signal und in der gleichen Zelle ein grünes und ein rotes Signal getrennt voneinander (siehe Abbildung 9), mit einem Abstand von mindestens zwei durchschnittlichen Signalen, kann auf diese Weise die Translokation nachgewiesen werden (1G1R1RG).

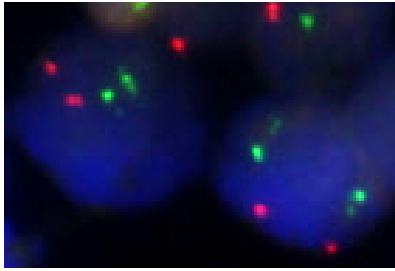


Abbildung 10: TMA FISH-IGH/BCL2 Fusionssonde (2R2G)

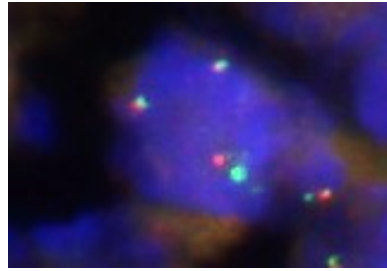


Abbildung 11: TMA FISH-IGH/BCL2 Fusionssonde (1R1G2F)

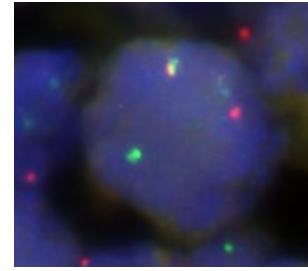


Abbildung 12: TMA FISH IGH/BCL2-Fusionssonde: kryptische Translokation

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der Auswertung der *IGH/BCL2*-Fusionssonde ein bunteres Bild. Diese Sonde funktioniert über Hybridisierung des grünen Signals an der Region 14q32 des Chromosom 14 im Bereich des *IGH*-Locus sowie der Hybridisierung des roten Signals an der Region 18q21 des Chromosom 18 im Bereich des *BCL2*-Gens. Das erwartete Muster in einer normalen Zelle zeigt zwei einzelne rote (R) und zwei grüne (G) Signale (2R2G) wie in Abbildung 10.

Trägt eine Zelle eine $t(14;18)(q32;q21)$ -Translokation, zeigt sich am häufigsten ein rotes, ein grünes, und zwei rot-grüne bis gelbe Fusionssignale (1R1G2F), siehe auch in Abbildung 11. Kommen beispielsweise nur ein rotes, ein grünes, und ein einzelnes Fusionssignal (F) vor, kann dies ein Hinweis auf eine kryptische Translokation sein (Abbildung 12), jedoch ließen sich solche Konstellationen in dieser Studie nicht eindeutig nachweisen. In dieser Arbeit wurden nur solche Zellen als positiv gewertet, welche zwei Fusionssignale aufwiesen.

3.3.2 Ergebnisse der FISH

Ein Überblick über die Auswertungsergebnisse der FISH ist in Tabelle 7 aufgelistet. Die sehr häufig im diagnostischen Bereich verwendete Vysis *BCL2* BA-Sonde zeigte an den TMAs in nur 17 Fällen (24,6%) eine Translokation, 50 Fälle (72%) waren negativ für die Translokation, und 2 Fälle (2,9%) waren nicht auswertbar. Diese Ergebnisse ließen sich bei zweifacher Wiederholung unzweifelhaft reproduzieren. Im Gegensatz dazu konnte nach Anwendung der zwei alternativen *BCL2* BA-Sonden (ZytoLight und MetaSystems) bei einem Anteil von 62,3% (43 der Fälle) eine Translokation klar nachgewiesen werden. In 3 Fällen ließ sich zwar mit Vysis eine Translokation nachweisen, welche aber bei ZytoLight und MetaSystems negativ blieb.

FISH-Sonde	Positive Fälle	Negative Fälle	Nicht auswertbar
	Anzahl/Gesamtfälle (prozentualer Anteil)	Anzahl/Gesamtfälle (prozentualer Anteil)	Anzahl/Gesamtfälle (prozentualer Anteil)
Vysis <i>BCL2</i> BAP	17/69 (24,6%)	50/69 (72,5%)	2/69 (2,9%)
ZytoLight <i>BCL2</i> BAP	43/69 (62,3%)	24/69 (34,8%)	2/69 (2,9%)
MetaSystems <i>BCL2</i> BAP	43/69 (62,3%)	24/69 (34,8%)	2/69 (2,9%)
Vysis <i>BCL6</i> BAP	11/69 (15,9%)	58/69 (84,0%)	/
Vysis <i>IGH/BCL2</i> - Fusionsprobe	12/69 (17,4%)	57/69 (82,6%)	/

Tabelle 7: Ergebnisse der FISH-Untersuchungen, Übersicht, alle Prozentangaben auf eine Dezimalstelle gerundet

In Zusammenschau und Vergleich der Ergebnisse aller drei eingesetzten *BCL2* BA-Sonden ließ sich bei insgesamt 46 Fällen (66,7%) eine t(14;18)-Translokation nachweisen (Tabelle 8). Bei 2 Fällen war ausschließlich die *BCL6* BAP positiv.

In insgesamt 21 Fällen waren sämtliche ausgewertete FISH-Untersuchungen negativ. In 4 Fällen waren nicht alle FISH-Sonden auswertbar. 11 dieser 21 FISH-negativen Fälle wiesen ein früheres Stadium auf (Stadium I und II) während 7 dieser Fälle ein fortgeschrittenes Stadium (Stadium III und IV) zeigten, in 3 der Fälle war das Stadium nicht erhebbar.

69 Gesamtfälle	BCL2-BAP	IGH/BCL2-Fusionsprobe	BCL6-BAP
46 Fälle (66,7%): t(14;18)-Translokation nachgewiesen Anzahl/ 69 Gesamtfälle (prozentualer Anteil) - Krankheitsstadium: 16 Fälle Stadium I und II (34,8%), 25 Fälle Stadium III und IV (54,3%), (5 Fälle: Stadium nicht erhebbar (10,9%))	+ bei 46/46	+ bei 12/46	+ bei 9/46
2 Fälle (2,9%): nur bei BCL6-BAP positiv	-	-	+
21 Fälle (30,4%): negativ in allen FISH Anzahl/ 69 Gesamtfälle (prozentueller Anteil) - Krankheitsstadium: 11 Fälle Stadium I und II (52,4%), 7 Fälle Stadium III und IV (33,3%), (3 Fälle: Stadium nicht erhebbar (14,3%)) - Verteilung nach Geschlecht: 9 Fälle: Pat. weiblich (42,8%), 12 Fälle: Pat. männlich (57,1%) <i>Anmerkung: bei 4 Fällen war eine oder mehrere FISH nicht auswertbar</i>	-	-	-

Tabelle 8: Gruppierete Auflistung der FISH-Ergebnisse, alle Prozentangaben auf eine Dezimalstelle gerundet, (+) bedeutet Translokation nachgewiesen, (-) bedeutet keine Translokation nachgewiesen

3.3.2.1 Gesamtübersicht der FISH-Ergebnisse

Fallnummer	Grad	Stadium [nach Ann Arbor]	Vysis BCL2 BAP	Vysis IGH/BCL2-Fusion	Vysis BCL6 BAP	ZytoLight BCL2 BAP	MetaSystems BCL2 BAP	in allen FISH negativ
1	1	Nicht erhebbar	T+	T-	T+	T+	T+	
2	2	Nicht erhebbar	T-	T-	T-	T+	T+	
3	2	1	T-	T-	T-	T-	T-	x
4	1	4	T+	T-	T-	T+	T+	
5	1	Nicht erhebbar	T-	T-	T-	T+	T+	
6	3	Nicht erhebbar	T-	T-	T-	T-	T-	x
7	2	2	T+	T-	T+	T+	T+	
8	2	2	T+	T-	T-	T+	T+	

9	2	Nicht erhebbar	T+	T-	T-	T+	T+	
10	2	3	T+	T-	T-	T+	T+	
11	2	3	T-	T-	T-	T-	T-	x
12	3	4	T+	T-	T-	T+	T+	
13	1-2	1	T-	T-	T-	T+	T+	
14	2	1	T-	T+	T+	T+	T+	
15	2	1	T-	T-	T-	T-	T-	x
16	2	1	T-	T-	T-	T-	T-	x
17	2	4	T-	T-	T-	nicht auswertbar	nicht auswertbar	
18	2	4	T-	T-	T-	T+	T+	
19	3	4	T+	T+	T-	T+	T+	
20	1	Nicht erhebbar	T-	T-	T-	T+	T+	
21	1	3	T-	T-	T+	T-	T-	
22	1	1	T-	T-	T-	T-	T-	x
23	1	4	T-	T+	T-	T+	T+	
24	1	1	T-	T-	T-	T-	T-	x
25	1	4	T-	T-	T-	T-	T-	x
26	1	Nicht erhebbar	T-	T-	T-	T-	T-	x
27	1	Nicht erhebbar	T-	T-	T-	nicht auswertbar	nicht auswertbar	
28	1-2	1	T-	T-	T-	T+	T+	
29	2	4	T-	T-	T-	T-	T-	x
30	1-2	1	T-	T-	T+	T-	T-	
31	1	3	T-	T-	T-	T-	T-	x
32	3	1	T+	T-	T+	T-	T-	
33	3	2	T+	T+	T-	T+	T+	
34	1-2	2	T-	T-	T-	T-	T-	x
35	1-2	2	T+	T+	T-	T+	T+	
36	1-2	2	T-	T-	T-	T+	T+	
37	1-2	1	T-	T-	T-	T-	T-	x
38	1-2	3	T+	T-	T+	T-	T-	
39	1-2	4	T-	T-	T-	T-	T-	x
40	1-2	1	T-	T-	T-	T+	T+	
41	1-2	2	T-	T-	T-	T-	T-	x
42	3	3	T+	T+	T-	T+	T+	
43	1	4	T+	T-	T+	T-	T-	
44	1-2	4	T-	T-	T-	T+	T+	
45	1-2	3	T+	T+	T-	T+	T+	
46	1	4	T-	T+	T-	T+	T+	
47	1-2	4	T-	T+	T-	T+	T+	
48	1	1	T-	T-	T-	T-	T-	x
49	1-2	3	T-	T-	T-	T+	T+	
50	1-2	4	T-	T-	T-	T+	T+	
51	1-2	3	T-	T-	T-	T+	T+	
52	3	1	T-	T+	T-	T+	T+	

53	1-2	3	nicht auswertbar	T+	T+	T+	T+	
54	3	1	T-	T-	T-	T+	T+	
55	1-2	1	T-	T-	T-	T+	T+	
56	1-2	2	T-	T-	T-	T+	T+	
57	3	2	T-	T-	T-	T-	T-	x
58	1-2	3	T-	T-	T-	T+	T+	
59	1-2	3	nicht auswertbar	T-	T+	T+	T+	
60	1-2	1	T-	T-	T-	T+	T+	
61	1-2	4	T-	T-	T+	T+	T+	
62	1-2	3	T-	T-	T-	T+	T+	
63	1-2	3	T-	T-	T-	T+	T+	
64	1-2	4	T+	T+	T-	T+	T+	
65	1-2	2	T-	T-	T-	T-	T-	x
66	1-2	3	T-	T-	T-	T+	T+	
67	1-2	4	T-	T-	T-	T-	T-	x
68	1-2	1	T-	T-	T-	T+	T+	
69	1-2	3	T+	T-	T-	T+	T+	

Tabella 9: Gesamtübersicht FISH-Ergebnisse, T+ = Translokation nachgewiesen, T- = keine Translokation nachgewiesen

3.3.3 BCL2-Break apart Probe

FISH-Sonde	Positive Fälle Anzahl/ 69 Gesamtfälle (prozentualer Anteil)	Negative Fälle Anzahl/ 69 Gesamtfälle (prozentualer Anteil)	Nicht auswertbar Anzahl/ 69 Gesamtfälle (prozentualer Anteil)
Vysis BCL2-BAP	17 (24,6%)	50 (72,4%)	2 (2,9%)
	3 (4,3%) davon bei ZytoLight und MetaSystems negativ		
ZytoLight BCL2-BAP	43 (62,3%)	24 (34,8%)	2 (2,9%)
MetaSystems BCL2-BAP	43 (62,3%)	24 (34,8%)	2 (2,9%)

Tabella 10: BCL2-BAP Ergebnisse, alle Prozentangaben auf eine Dezimalstelle gerundet

Mit der Verwendung der beiden Sonden MetaSystems und ZytoLight wurde ein identisch anderes Ergebnis erzielt als mit der Break Apart-Sonde von Vysis (siehe Tabelle). Die Ergebnisse der BCL2-BA-Sonden wurden an einer Stichprobe von ausgewählten Fällen an Vollschnitten zur Kontrolle wiederholt. Diese Stichprobe umfasste Fälle, welche bei den BCL2-Break Apart-Sonden von MetaSystems und ZytoLight negativ waren, sowie auch solche die hier positive Ergebnisse zeigten, jedoch bei der Vysis BCL2-Break Apart Probe negativ

waren. Diese Kontrollen an den Vollschnitten bestätigten klar die Ergebnisse, welche an den TMAs von MetaSystems und ZytoLight *BCL2*-BAP erhoben worden waren. Es lässt sich also darauf schließen, dass die Ergebnisse der FISH an den TMAs verlässlich zu beurteilen waren.

Der Anteil an nachweisbaren Translokationen unterschied sich bei der Vysis *BCL2*-BAP im Vergleich zur MetaSystems und ZytoLight *BCL2*-BAP unerwartet eklatant. Angesichts dieser Ergebnisse wurde die Erstellung der *BCL2*-Break Apart von Vysis, wie unter 2.2.4.1 beschrieben, zweimalig wiederholt und die Vorbehandlung mit Pepsin intensiviert. Durch diese Schritte konnten jedoch keine verbesserten Ergebnisse der Vysis *BCL2*-BA-Sonde erzielt werden.

3.3.3.1 *BCL2*-BAP und *BCL2*-Immunhistochemie

Ergebnis der <i>BCL2</i> - Immunhistochemie	Anzahl Fälle Anzahl/ 69 Gesamtfälle (prozentualer Anteil)	<i>BCL2</i> -BAP Translokationsstatus	
		Positiv	Negativ
Stark positive Expression	52 (75,4%)	43 (82,7%)	9 (17,3%)
Nicht-stark positive Expression	17 (24,6%)	3 (17,6%)	14 (82,4%)

Tabelle 11: BCL2-BAP-FISH-Translokationsstatus im Zusammenhang mit der Ausprägung der immunhistochemischen BCL2-Expression. Die 3 BCL2 BA-Sonden wurden hier als positiv gewertet, wenn mindestens 1 oder mehr der 3 BAP positiv ausgewertet wurden. Unter „Stark positive Expression“ werden die Fälle mit starker (pp) Färbung gezählt, unter „Nicht-stark positive Expression“ werden sowohl die Fälle mit heterogen positiver (hp), als auch mit schwacher (p) eindeutiger Expression und solche mit zahlreichen positiven Zellen (zp) zusammengefasst, wie in der Ergebnistabelle aufgelistet.

Die 17 Fälle mit schwach oder heterogen positiver Expression der *BCL2*-immunhistochemischen Färbungen, wie in Tabelle 10 unter „Nicht-stark positive Expression“ dargestellt, zeigten zu 82,4% ein negatives Ergebnis in allen 3 der *BCL2*-BAP-FISH Untersuchungen, in 17,6% konnte eine Translokation nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten über 82,7% der 52 Fälle mit starker *BCL2*-Expression in den *BCL2*-BAP-FISH Untersuchungen eine t(14;18)-Translokation, bei 9 Fällen konnte keine *BCL2*-BAP-Translokation nachgewiesen werden.

3.3.4 BCL6-Break apart Probe

FISH-Sonde	Positive Fälle	Anzahl/ 69 Gesamtfälle (prozentualer Anteil)			Negative Fälle	Anzahl/ 69 Gesamtfälle (prozentualer Anteil)
BCL6-BAP	11 (15,9%)				58 (84%)	
Details	2 (18,2%) - mit allen anderen FISH-Proben negativ					
	9 (81,8%) - mit BCL2 BAP auch positiv: Stadium der BCL2 und BCL6 positiven Fälle:					
	<ul style="list-style-type: none"> - I/II: 3 Fälle (33,3%) - III/IV: 5 Fälle (55,6%) - Nicht vorliegend: 1 Fall 					
	3 (33,3%): auch bei Vysis positiv	3 (33,3%): bei allen drei BCL2 BAP positiv	3 (33,3%): bei MetaSystems und ZytoLight positiv			
Grad						
1-2:	10 (90,1%)					
3:	1 (9,1%)					
Stadium						
I/II:	4 (36,4%)					
III/IV:	6 (54,5%)					
	Nicht vorliegend: 1					

Tabelle 12: BCL6-BAP Ergebnisse, alle Prozentangaben auf eine Dezimalstelle gerundet

Bei der Auswertung der BCL6 Break Apart Probe zeigten sich 11 der Fälle (15,9%) transloziert. In 2 dieser Fälle war keine BCL2-Translokation nachweisbar. In 9 der BCL6-positiven Fälle war auch mindestens eine der BCL2-BAP positiv, somit konnten hier 9 Fälle mit Rearrangement von BCL2 und BCL6 gefunden werden. Nur einer der BCL6-positiven Fälle war im Vorfeld Grad 3 zugeordnet, die restlichen 10 Fälle gehörten zur Gruppe der FL Grad 1-2.

3.3.5 IGH/BCL2-Fusionssonde

FISH-Sonde	Positive Fälle	Negative Fälle
	Anzahl/ 69 Gesamtfälle (prozentualer Anteil)	Anzahl/ 69 Gesamtfälle (prozentualer Anteil)
IGH/BCL2-Fusionsprobe	12 (17,4%)	57 (82,6%)
Details zu den positiven Fällen:	6 (50%) – für alle <i>BCL2</i> -BAP positiv	
	6 (50%) – für Vysis negativ, positiv für ZytoLight/MetaSystems	

Tabelle 13: IGH/BCL2-Fusionsprobe-Ergebnisse, alle Prozentangaben auf eine Dezimalstelle gerundet

In dieser Studie zeigten 12 Fälle ein positives *IGH/BCL2*-Fusionsmuster. Jeder dieser Fälle zeigte auch in mindestens einer *BCL2* BA-Sonde einen Translokationsnachweis. Die Hälfte dieser Gruppe, also 6 Fälle, wiesen auch in der Vysis *BCL2* BAP ein positives Signal auf, die anderen 6 mit positivem Fusionsignal waren nur bei den alternativen *BCL2* BA-Sonden positiv. In den restlichen 34 Fällen, in welchen eine Translokation nachgewiesen werden konnte, war jedoch kein Fusionsignal in der *IGH/BCL2*-Fusionssonde zu erkennen. Insgesamt gestaltete sich die Auswertung dieser FISH-Sonde als schwierig, da die Färbung, ähnlich der Vysis *BCL2* BAP nur schwache Signale zeigte.

4 Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurden Lymphknotenproben von Patient:innen mit follikulärem Lymphom, die immunhistochemisch eine positive *BCL2*-Expression aufwiesen, mittels der in der Routinediagnostik etablierten Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf das Vorliegen chromosomaler Umlagerungen untersucht. Der Schwerpunkt lag auf der t(14;18)(q32;21)-Translokation, welche zur *IGH/BCL2*-Fusion führt und eine Überexpression des anti-apoptischen Proteins *BCL2* verursacht. Ergänzend wurde auch die *BCL6*-Translokation erfasst.

Ein zusätzliches Ziel der Untersuchung bestand darin, die diagnostische Leistungsfähigkeit verschiedener FISH-Sondensysteme beim Nachweis der

IGH/BCL2-Translokation vergleichend zu analysieren. Dabei kamen sowohl Break-Apart- als auch Dual-Fusions-Sonden zum Einsatz, um Unterschiede hinsichtlich der praktischen Anwendbarkeit im Routinelabor und Sensitivität zu testen. Fälle mit histologisch gesichertem Grad 3B wurden aufgrund ihrer distinkten biologischen Eigenschaften von der Studie ausgeschlossen. Für den Großteil der eingeschlossenen Fälle lag das Ann-Arbor-Stadium zum Zeitpunkt der Diagnose vor (61 von 69 der Fälle).

4.1 Anwendung von FISH an TMA (Methoden)

In der Diagnostik des FL kommen üblicherweise sowohl immunhistochemische Untersuchungen als auch FISH-Analysen an histologischen Schnitten ganzer LK zum Einsatz. In dieser Arbeit wurden aus formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Lymphknoten gezielt Stenzen entnommen und rasterförmig in einem neuen Paraffinblock in Form eines Tissue Microarray angeordnet. Dadurch lassen sich die Proben aller eingeschlossenen Fälle auf einem Schnitt gleichzeitig untersuchen und direkt vergleichen.

Der Einsatz von TMAs zur kompakten Darstellung eines ganzen Patient:innenkollektivs bei der Durchführung von Studien, auch unter Verwendung von FISH, ist weit verbreitet (Leich et al. 2016, Korenberg, Farinha, and Gascoyne n.d., 2007, Kim et al. 2020).

Die Interphase-FISH auf FFPE-Gewebeschnitten ist eine etablierte und robuste Methode zur Detektion chromosomaler Umlagerungen und eignet sich auch für den Einsatz an älterem Archivmaterial (Muñoz-Mármol et al. 2013). *BCL2*-Translokationen können damit sensitiv erfasst werden, allerdings erlaubt die Verwendung von Break-Apart-Sonden keine genaue Aussage über die beteiligte Partnerregion (Magnoli et al. 2023).

Auch die immunhistochemischen Färbungen wurden an den TMAs erneut durchgeführt. Die histologischen und immunhistochemischen Befunde entsprachen den Erwartungen und bestätigten in allen Fällen die gestellte Diagnose, sowohl in den Vollschnitten der Lymphknotenpräparate als auch in

den TMAs. Durch die Stenzen der TMAs ist pro Fall nur ein begrenzter Ausschnitt der jeweiligen betroffenen LK abgebildet, diese Ausschnitte zeigen jedoch das typische Bild. Das FL zeigt im Allgemeinen typischerweise eine positive Reaktion auf Färbungen für BCL2, BCL6, CD10 und CD20. CD10 und BCL6 sind Keimzentrumsmarker, CD20 ist ein B-Zellmarker und CD3 ein T-Zellmarker, welcher also die T-Zellen im LK, aber nicht die FL-Zellen anfärbt (Swerdlow et al. 2016, Xerri et al. 2016).

Die Verwendung nur einer oder weniger Biopsien pro Fall stellt dabei eine gewisse Limitierung dar, da auf diese Weise nur ein Teil des biologischen Spektrums innerhalb eines Patienten erfasst werden kann (Perrett, Edmondson, and Okosun 2022).

4.2 Hintergründe der BCL2-Expression

In der Erklärung der Pathogenese des FL spielt die t(14;18)-Translokation eine wichtige Rolle, ebenso wie die damit im Zusammenhang stehende verstärkte Expression von BCL2. In der Literatur gibt es über einen Zeitraum von mittlerweile mehr als 30 Jahren eine große Anzahl von Untersuchungen, die sich diesen beiden für die FL wesentlichen Faktoren in unterschiedlicher Weise annähern (Pezzella et al. 1990, Ott et al. 2002, Horsman et al. 2003, Leich et al. 2016, Zamò et al. 2018). Der Umstand, dass bei ca. 70 bis 85% der FL die t(14;18)-Translokation vorliegt und mehr als 85% der FL BCL2 exprimieren, könnte zur naheliegenden Annahme führen, dass eines mit dem anderen einhergeht, dies ist aber zu kurz gegriffen.

Ausgehend von den erwarteten Resultaten von Leich et al. im Jahr 2016, wonach in der verwendeten Gruppe der FL im Stadium I und II 47% t(14;18)-negativ waren, davon aber dennoch 69% verstärkt BCL2 exprimierten, war es auch eine Zielsetzung dieser Arbeit, anhand eines möglichst umfangreichen Patient:innenkollektivs noch einmal gezielt die Frage zu untersuchen, inwieweit das Auftreten einer BCL2-Expression im Rahmen der standardmäßigen immunhistochemischen Untersuchungen tatsächlich auch den Rückschluss auf das Vorliegen einer t(14;18)-Translokation zulässt (Leich et al. 2016). Dies ist

relevant, weil das Wissen um eine vorliegende *BCL2*-Translokation einerseits bei der genauen Diagnosestellung eine Rolle spielt und andererseits Konsequenzen für Prognose und Therapie nach sich ziehen kann. Diese Zusammenhänge sind allerdings noch nicht ausreichend analysiert und werden durch die biologische Vielfältigkeit des FL erschwert.

Die meisten, aber nicht alle t(14;18)-positiven FL zeigen auch eine *BCL2*-Expression. Etwa 10-15% der FL im Frühstadium zeigen eine immunhistochemische Negativität für *BCL2*. Bei einem Teil dieser *BCL2*-negativen Fälle konnte die t(14;18)-Translokation dennoch mittels FISH nachgewiesen werden (Masir et al. 2010, Adam et al. 2013), was auf eine Diskrepanz zwischen genetischer und immunhistochemischer Diagnostik hinweist. Eine mögliche Erklärung dafür ist die sogenannte Pseudonegativität, die durch Missense-Mutationen im *BCL2*-Gen verursacht wird. Diese führen zu strukturellen Veränderungen im *BCL2*-Protein, welche die Bildung des Standardantikörpers (Klon 100/D5) beeinträchtigen und somit eine vorhandene Expression immunhistochemisch maskieren können (Schraders et al. 2005, Adam et al. 2013, Bonzheim et al. 2011). In solchen Fällen kann die Anwendung alternativer Antikörper wie E17 oder SP66, die andere Epitope erkennen, zu einer korrekten Detektion führen. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch ausschließlich Fälle mit klar nachweisbarer *BCL2*-Expression durch den Standardantikörper eingeschlossen wurden, ist der Aspekt der Pseudonegativität nicht weiter Gegenstand dieser Analyse.

Adam et al. fanden, dass sich 43% der *BCL2*-negativen Fälle auch nicht mit den alternativen Antikörpern anfärben ließen. Diese Fälle wiesen keine Mutationen im *BCL2*-Gen auf, ebensowenig konnte eine erhöhte *BCL2*-mRNA-Expression nachgewiesen werden, was auf eine transkriptionelle Inaktivität oder einen Allelverlust des *BCL2*-Gens hinweist (Adam et al. 2013).

Es gibt auch FL-Subtypen, die eine andere pathogenetische Basis aufweisen, t(14;18)-negativ sind und *BCL2* nur schwach oder gar nicht exprimieren. Diese werden auch in späteren Studien als eigenständige molekulare Gruppen weiter charakterisiert, so etwa durch *IGH/BCL6*-Translokationen, Mutationen in *STAT6*

oder andere molekulare Veränderungen (Nann et al. 2020, Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023, Leich et al. 2016).

Die Überexpression von BCL2 ist ein potenzieller therapeutischer Ansatzpunkt. Es kommen Medikamente zum Einsatz, eines davon beispielsweise Venetoclax. Durch derartige Therapieoptionen kann die Funktion von BCL2 gehemmt werden und so das Absterben der Krebszellen gefördert werden (Davids et al. 2017).

4.2.1 Zusammenhang der Intensität der BCL2-Expression und dem Vorliegen einer t(14;18)-Translokation

Es traten im untersuchten Probenmaterial vornehmlich Fälle mit starker Expression des BCL2-Markers auf, in 17 Fällen zeigte sich die Expression zwar auch eindeutig positiv, jedoch mit einer schwächeren Intensität oder mit einer heterogenen Verteilung der immunhistochemischen Expression.

Während die Fälle mit heterogen oder schwacher positiver BCL2-Expression zu 82,4% ein negatives Ergebnis in allen 3 der BCL2-BAP-FISH-Untersuchungen zeigten, war in über 75% der Fälle mit starker BCL2-Expression in den BCL2-BAP-FISH-Untersuchungen eine t(14;18)-Translokation nachzuweisen.

Diese erkennbare Korrelation zwischen der Intensität der BCL2-Färbung und dem Anteil der mittels FISH nachgewiesenen t(14;18)-Translokationen zeigt in Ansätzen Parallelitäten zu den Ergebnissen der bereits zitierten Studie aus Norditalien aus 2013. In der Arbeit von Magnoli et al. war die Hälfte der Fälle, welche moderat und ein Viertel der Fälle, welche stark immunhistochemisch BCL2 exprimierten, FISH-negativ. Magnoli et al. untersuchten 76 Fälle von FL aus den Jahren 2013 bis 2016. Von diesen Proben waren 86,8% der Fälle in der immunhistochemischen Untersuchung BCL2-positiv. Die Autor:innen beobachteten eine starke positive Korrelation zwischen dem Anteil BCL2-positiver Tumorzellen und der Intensität der Immunfärbung. Sie konnten jedoch keine statistisch signifikante Beziehung zwischen dem histologischen Grad und der BCL2-Expression feststellen (Magnoli et al. 2023).

Die Studienautor:innen stellten weiter fest, dass 90% der FL mit schwacher immunhistochemischer BCL2-Färbung FISH-negativ waren und daher eine schwache BCL2-Expression keinesfalls als Indikator für eine *BCL2*-Translokation gewertet werden kann. Eine interessante Beobachtung betraf die beiden immunhistochemisch negativen Fälle mit einer durch FISH nachgewiesenen *BCL2*-Translokation. Diese waren dann immunhistochemisch positiv, wenn sie mit dem SP66-Antikörper, statt Klon 124 getestet wurden (Magnoli et al. 2023).

Im Unterschied dazu stellten Leich et al. hinsichtlich der Intensität der BCL2-Färbung zwischen t(14;18)-positiven und t(14;18)-negativen FL (gemessen im Vergleich zu begleitenden T-Zellen) keine signifikanten Unterschiede fest (Leich et al. 2016).

4.3 Insgesamt eher niedrige Frequenz FISH-positiver Fälle

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt deutlich weniger *BCL2*-Translokationen nachgewiesen, als auf Grundlage der bisherigen Literatur zu erwarten gewesen wäre. Schließlich hatten alle Fälle immunhistochemisch eine BCL2-Expression aufgewiesen.

In nur 46 der 69 Fälle (66,7%) konnte eine Translokation mit mindestens einer der eingesetzten *BCL2*-FISH-Sonden nachgewiesen werden. 2 weitere Fälle wiesen nur in der Analyse mit der *BCL6*-FISH eine Translokation auf. 21 der Fälle, also 30,4% zeigten in keiner einzigen der untersuchten FISH-Sonden ein positives Translokationsergebnis, wobei in 4 dieser Fälle nicht alle FISH auswertbar waren.

Es gibt in der Literatur einige Arbeiten zu finden, die zu vergleichbaren Resultaten gekommen waren. So fanden auch Leich et al., dass in der Gruppe von BCL2-exprimierenden FL ein relevanter Anteil nicht die t(14;18)-Translokation aufweist (Leich et al. 2016). Eine rezente retrospektive Studie, die in Südkorea ebenfalls FISH zur Analyse von u.a. *BCL2*- und *BCL6*-Rearrangements bei einem Studienkollektiv von 105 FL-Fällen, ungeachtet ihrer BCL2-Expression, verwendet hatte, fand in 72,7% der Fälle *BCL2*-Translokationen und in 15,9% der

Fälle *BCL6*-Translokationen. Dies kann, auch wenn die Ausgangslage nicht präzise übereinstimmt, als einigermaßen vergleichbares Teilergebnis interpretiert werden. Kim et al. konnten die *BCL2*-Expression in 90,5% der FL-Fälle ohne *BCL2*-Translokation nachweisen, was ebenfalls die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bestätigt (Kim et al. 2020).

Auch die Resultate der Studie von Magnoli et al. entsprechen, wie bereits oben angeführt, ansatzweise den Ergebnissen der hier vorgelegten Arbeit. Sie berichten, dass 50% der Fälle, die moderat, und 25% der Fälle die stark immunhistochemisch *BCL2* exprimierten, FISH-negativ waren (Magnoli et al. 2023).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Translokation im Laufe der Pathogenese erst in späteren Stadien in hohen Anteilen nachgewiesen werden kann. In fortgeschrittenen Stadien werden hier 85-95% beschrieben, in beginnenden Stadien der Erkrankung aber nur 42-50% (Weinberg et al. 2007, Leich et al. 2016, Los-de Vries et al. 2022). Dies spiegelt sich auch in dieser Arbeit wider, unter den FL mit Translokation waren 54,3% im fortgeschrittenen Stadium, aus der Gruppe der 21 Fälle ohne nachgewiesene Translokation zeigten sich 52,4% in einem frühen Krankheitsstadium.

Mehrere Studien zeigen, dass die Nachweisrate der *t(14;18)*-Translokation beim FL auch von der primären Lokalisation abhängt. Während klassische nodale FL typischerweise eine Rate von 85-90% aufweisen, finden sich in bestimmten Regionen, insbesondere in der Leiste, gehäuft *t(14;18)*-negative Fälle (Menter and Quintanilla-Martinez 2023). Salaverria et al. klassifizierten *t(14;18)*-negative FL entsprechend ihrer Lokalisation in nodale, extranodale und pädiatrische Subtypen und betonen, dass insbesondere *t(14;18)*-negative nodale FL, häufig inguinal lokalisiert, eine eigene molekulare Kategorie darstellen (Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023). Genetische Daten belegen dabei eine enge Assoziation von CD23-Positivität, *STAT6*-Mutationen und *t(14;18)*-Negativität bei diesen inguinalen FL (Nann et al. 2020).

Es konnte auch eine variierende Häufigkeit der *t(14;18)(q32;21)*-Translokation nach geographischen Unterschieden durch mehrere Studien belegt werden. In

den meisten Studien aus den USA und Westeuropa wurde die Translokation in etwa 85-90% der FL-Fälle nachgewiesen (Leich et al. 2016, Kim et al. 2020, Bosch-Schips et al. 2024). Demgegenüber berichteten Magnoli et al. aus Nordwestitalien über eine deutlich niedrigere Nachweisrate von nur 51,3%. Die Autor:innen weisen darauf hin, dass vergleichbar niedrige Raten auch aus ostasiatischen Ländern, sowie einzelnen Regionen Europas gemeldet wurden (Magnoli et al. 2023). Auch in Studien aus Japan wurde berichtet, dass die Häufigkeit der t(14;18)-Translokation im Vergleich zu westlichen Ländern zunächst deutlich geringer war, jedoch über die letzten Jahrzehnte angestiegen ist, möglicherweise infolge veränderter Umweltbedingungen oder Lebensstile (Ikoma et al. 2022). Diese geographischen Unterschiede deuten darauf hin, dass neben genetischen Faktoren auch ethnische und umweltassoziierte Faktoren Einfluss auf das molekulare Profil von FL nehmen könnten, beispielsweise ob ein FL mit oder ohne t(14;18)-Translokation entsteht.

4.3.1 Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der *BCL2*-Translokation und dem Krankheitsstadium

Von den insgesamt 69 untersuchten Fällen dieser Arbeit lag für 61 das Krankheitsstadium nach Ann-Arbor-Klassifikation vor. In Bezug auf diese 61 Fälle und ihr jeweiliges Stadium konnte die t(14;18)-Translokation bei 16 von 28 Fällen (57% entsprechend) im Frühstadium (Stadium I/II) und bei 25 von 33 Fällen (76% entsprechend) im fortgeschrittenen Stadium (Stadium III/IV) nachgewiesen werden. Diese Befunde weisen auf eine zunehmende Nachweisbarkeit der *BCL2*-Translokation im fortgeschrittenen Krankheitsstadium hin.

Dies entspricht näherungsweise den Ergebnissen von Leich et al., in deren Studie 53% der FL-Fälle im Frühstadium und 86% der FL im Spätstadium einen chromosomalen Bruch im *BCL2*-Lokus aufwiesen, entweder eine klassische t(14;18)-Translokation oder seltener, eine andere, nicht-*IGH*-vermittelte Translokation. Bemerkenswert ist zudem, dass unter den t(14;18)-negativen Fällen dennoch 69% der Frühstadium-FL und 86% der Spätstadium-FL eine *BCL2*-Expression in der Immunhistochemie zeigten (Leich et al. 2016).

Auch Adam et al. berichteten von einem sehr hohen Anteil t(14;18)-positiver FL in fortgeschrittenen Stadien. In einer Kohorte von 240 Patient:innen, die sich überwiegend im Stadium III befanden, war die Translokation nur in 4% der Fälle nicht nachweisbar (Adam et al. 2013). In dieses Bild passen auch die Ergebnisse von Magnoli et al., die sowohl die BCL2-Positivität, als auch das Vorliegen der BCL2-Translokation signifikant häufiger bei Patient:innen im Spätstadium beobachteten (Magnoli et al. 2023).

Los de Vries et al. kommen in ihrer Arbeit zu dem Ergebnis, dass das FL im Stadium I genetisch heterogen ist und offenbar anderen pathogenetischen Mechanismen unterliegt als in fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Sie untersuchten 83 Patient:innen mit Stadium I und 139 mit Stadium III/IV und stellten dabei signifikante Unterschiede im molekularen Profil fest. Nur 59% der Stadium-I-Fälle wiesen eine BCL2-Translokation auf, verglichen mit 91% im Stadium III/IV. Abhängig vom Krankheitsstadium konnten die Autoren unterschiedliche molekulare Cluster identifizieren. Für Stadium I beschrieben sie u.a. einen spezifischen Cluster ohne die t(14;18)-Translokation, mit häufigen Mutationen in CREBBP (95%), STAT6 (64%), EZH2 (50%) und TNFRSF14 (50%) und der gleichzeitig keine BCL6-Translokationen aufwies. Im Gegensatz dazu war der t(14;18)-negative Cluster im Stadium III/IV häufiger durch BCL6-Translokationen (64%) geprägt, während Mutationen des Stadium-I-Clusters dort deutlich seltener auftraten. Die übrigen Cluster in beiden Stadiengruppen wiesen überwiegend das klassische t(14;18)-positive Profil auf. Daraus leiten die Autor:innen die Hypothese ab, dass stadienabhängig unterschiedliche genetische Ereignisse die Krankheitsentwicklung antreiben könnten (Los-de Vries et al. 2022). In der Patient:innenkohorte der vorliegenden Untersuchung sind diese Subgruppen vermutlich kaum vertreten. BCL6-Translokationen wurden hier vor allem im Rahmen von einer ebenfalls vorliegenden BCL2-Translokation beobachtet. Aufgrund des Studiendesigns wurden nur BCL2-immunohistochemisch positive FL in die Analyse eingeschlossen.

In anderen Arbeiten fallen die Unterschiede der Nachweisraten im Zusammenhang mit dem Stadium weniger stark aus. In der Untersuchung von Kim et al. zeigt sich nur ein leicht verstärktes Auftreten der BCL2-Translokation

in den höheren Stadien (Kim et al. 2020). Auch Ikoma et al. berichteten, dass t(14;18)-negative FL-Fälle etwas häufiger im frühen Stadium auftreten. In ihrer Auswertung lag die Nachweisrate im Stadium I/II bei 78%, während sie im Stadium III/IV auf 86% anstieg. Zusammengenommen sprechen diese Daten dafür, dass die t(14;18)-Translokation im Verlauf der Krankheitsentwicklung zunehmend häufiger wird (Ikoma et al. 2022).

4.3.2 Alternative Wege, die zur BCL2-Expression führen können

Aufgrund der hohen Anzahl an FL-Fällen ohne *BCL2*-Translokation, auch in diesem Patient:innenkollektiv, ist die Schlussfolgerung unausweichlich, dass die *BCL2*-Überexpression in diesen Fällen nicht durch die t(14;18)-Translokation verursacht sein kann, sondern durch alternative Mechanismen ausgelöst worden sein muss. Zu dieser Erkenntnis kamen in ähnlichem Zusammenhang auch schon andere Autor:innen (Leich et al. 2016, Zamò et al. 2018, Magnoli et al. 2023), wobei Leich et al. in ihrer 2016 veröffentlichten Studie vermuteten, dass der Nachweis von *BCL2*-Expression in t(14;18)-negativen FL auch auf Fortschritte in der Immunhistochemie zurückzuführen sein könnte, die es erlauben, die *BCL2*-Expression nun auch in Fällen nachzuweisen, in denen dies früher nicht möglich war (Leich et al. 2016). Dies könnte eine Erklärung für die Abweichungen im Vergleich zu älteren Studien darstellen (Leich et al. 2009, Horsman et al. 2003, Vaandrager et al. 2000).

Wiederholt wurde der Versuch unternommen, zu klären, wie es dazu kommt, dass t(14;18)-negative FL zum Teil immunhistochemisch positiv auf *BCL2* getestet werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen dafür sind jedoch noch nicht abschließend verstanden. Zamò et al. stellten fest, dass t(14;18)-negative FL eine genetisch heterogene Gruppe darstellen, bei der verschiedene molekulare Signalwege die Pathogenese beeinflussen und sich möglicherweise auch auf die Regulation der *BCL2*-Expression auswirken (Zamò et al. 2018). Es werden neben der t(14;18)-Translokation weitere regulatorische Faktoren vermutet (Leich et al. 2009, 2016) und kryptogene *BCL2*-Aberrationen als mögliche Ursache diskutiert (Vaandrager et al. 2000, Ott et al. 2002).

So identifizierten Zamò et al. in BCL2-positiven, t(14;18)-negativen FL Mutationen in *MAPK8*, *PPP2R4/PTPA* und *ASH1L*, die entweder die BCL2-Expression direkt beeinflussen oder funktionell alternative anti-apoptotische Signalwege aktivieren könnten (Zamò et al. 2018). In ihrer Kohorte zeigten 70% der t(14;18)-negativen FL eine positive BCL2-Expression. Zudem fanden sie in diesen Fällen vermehrt Mutationen in Genen, die Immunreaktionen und der N-Glykolysierung assoziiert sind. Gleichzeitig wurden dort deutlich weniger neue N-Glykolysierungsstellen in den Immunglobulinen entdeckt als bei t(14;18)-positiven FL. Die Autor:innen formulieren die Hypothese, dass dies auf einen weniger spezifischen, aber verstärkten Austausch mit dem Mikroumfeld hinweisen könnte, möglicherweise als Austausch für das Fehlen typischer Glykolysierungsmuster (Zamò et al. 2018).

Nann et al. identifizierten bei t(14;18)-negativen FL eine molekulare Subgruppe mit häufigen *STAT6*-Mutationen (57%), die oft gemeinsam mit *CREBBP*- und *TNFRSF14*-Mutationen auftraten. Viele dieser Fälle zeigten eine positive BCL2-Färbung, es wurde allerdings kein direkter funktioneller Zusammenhang zu den identifizierten Mutationen nachgewiesen. Dies legt nahe, dass bei t(14;18)-negativen FL alternative Signalwege zur Aktivierung von anti-apoptotischen Mechanismen führen könnten. Zudem zeigten die FL Anzeichen fortlaufender somatischer Hypermutation, was einen Ursprung in Keimzentrums-B-Zellen nahelegt (Nann et al. 2020).

Weitere mögliche Ursachen für eine BCL2-Überexpression in t(14;18)-negativen Fällen sind Kopienzahlvariationen (Copy Number Gains) des *BCL2*-Gens (*BCL2*-gain oder Amplifikation), wie sie mehrfach beschrieben wurden (Schraders et al. 2005; Masir et al. 2010, 2012; Kim et al. 2020), ebenso wie Chromosom-18-Amplifikationen, die den *BCL2*-Lokus einschließen (Falini & Mason 2002; Horsman et al. 2003).

Einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der t(14;18)-unabhängigen BCL2-Expression liefert auch die Studie von Kim et al. Sie untersuchten 105 FL anhand von FISH an TMA auf Translokationen und Kopienzahlvariationen im Hinblick auf ihre prognostische Relevanz. Die *BCL2*-Translokation wurde dabei

in 72,7%, die *BCL6*-Translokation in 15,9% der Fälle nachgewiesen. Kopienzahlvariationen in *BCL2* fanden sich in 26,1% der Fälle, und traten deutlich häufiger bei *BCL2*-negativen als bei *BCL2*-positiven FL auf. Wie schon bei Leich et al. zeigen sich auch in der Arbeit von Kim et al. in der Mehrzahl der *BCL2*-negativen Fälle eine positive *BCL2*-Immunhistochemie, ein Hinweis auf die Relevanz von regulatorischen Mechanismen wie Kopienzahlvariationen (Leich et al. 2016, Kim et al. 2020).

In der Zusammenschau bestätigen diese Befunde, dass die Expression von *BCL2*, unabhängig vom Vorliegen der klassischen t(14;18)-Translokation, ein wesentlicher Bestandteil der Pathogenese vieler FL ist, wenngleich es auch FL-Formen gibt, bei denen weder die *BCL2*-Expression noch die *BCL2*-Translokation vorliegen (Leich et al. 2016).

4.3.3 Das t(14;18)-negative FL im Spiegel aktueller Studien

Beim Versuch den hohen Anteil an t(14;18)-negativen FL einzuordnen, stößt man in der jüngeren Literatur auf zahlreiche Hinweise, die alternative pathogenetischen Mechanismen in diesen Fällen beleuchten und in einen umfassenderen biologischen Zusammenhang stellen.

Burkhard et al. untersuchten mittels direkter Sequenzierung das *BCL2*-Mutationsspektrum in verschiedenen reifen B-Zell-NHL, insbesondere im FL. Ziel war es unter anderem, besser zu verstehen, welche Rolle *BCL2*-Mutationen, auch unabhängig von der klassischen t(14;18)-Translokation bei der Pathogenese des FL spielen könnten. Sie zeigten, dass *BCL2*, wenn auch deutlich seltener, auch bei t(14;18)-negativen FL ein Ziel sogenannter aberranter somatischer Hypermutation (ASHM) sein kann. So wurden *BCL2*-Mutationen in 71% der t(14;18)-positiven FL, aber auch in 13% der t(14;18)-negativen FL identifiziert (Burkhard et al. 2015).

Diese Erkenntnisse zeigen, dass verschiedene genetische Mechanismen zur *BCL2*-Deregulation beitragen können, entweder direkt durch Mutation oder indirekt über assoziierte Signalwege. Angesichts dessen ist es besonders

interessant, dass Bosch-Schips et al. beobachteten, dass sich t(14;18)-negative FL nicht nur genetisch, sondern auch biologisch grundlegend von klassischen FL unterscheiden. Ihre Genexpression- und MikroRNA-Profile ähneln stärker denen Postkeimzentrums-B-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass t(14;18)-negative FL auf einer späteren Stufe der B-Zell-Differenzierung entstehen könnten, als klassische t(14;18)-positive FL, was vielleicht ihre geringere Abhängigkeit von BCL2-vermittelten Überlebenssignalen erklären könnte (Bosch-Schips et al. 2024).

Diese Annahme wird durch weitere genomische Daten gestützt. So berichten Magnoli et al., dass *BCL2*-negative FL häufig alternative genetische Aberrationen aufweisen, darunter *IGH*- oder *BCL6*-Translokationen sowie Deletionen in *1p36* und *TP53* (Magnoli et al. 2023).

Zusammenfassend verdeutlichen diese Studien, dass t(14;18)-negative FL genetisch und biologisch eigenständige Subgruppen bilden, die eine alternative Pathogenese aufweisen. Im Folgenden soll nun untersucht werden, inwieweit sich diese Heterogenität auch auf die diagnostische Erfassbarkeit der t(14;18)-Translokation mittels verschiedener FISH-Sonden, vor allem der Break-Apart-Sonden auswirkt.

4.4 Auffällige Diskrepanzen zwischen verschiedenen *BCL2*-Break-Apart-Sonden

Um zu überprüfen, ob *BCL2*-BA-Sonden unterschiedlicher Hersteller zu vergleichbaren Ergebnissen führen, wurden Sonden von drei verschiedenen Anbietern eingesetzt und deren Signalbilder miteinander verglichen. Da sich das Design und die Entwicklung von FISH-Sonden je nach Hersteller unterscheiden, hybridisieren die Sonden an unterschiedlich großen oder leicht versetzten Bereichen rund um das Zielgen. Dennoch gelten die *BCL2*-BA-Sonden der verschiedenen Hersteller allgemein als funktionell gleichwertig und weitgehend austauschbar. Konkrete Informationen zur exakten Bindungsregion der jeweiligen Sonden wurden von den Herstellern auch auf Anfrage nicht zur Verfügung gestellt.

Überraschend und unerwartet zeigen sich die Ergebnisse der ersten FISH-Untersuchungen mit der *BCL2*-BA-Sonde von Vysis. Hier ließ sich trotz zweimaliger Wiederholung, um ein technisches Versagen der Durchführung auszuschließen, nur bei 17 Fällen, also in 24,6% eine Translokation nachweisen. Interessanterweise waren darunter 5 Fälle, bei denen auch eine *BCL6*-Translokation nachgewiesen werden konnte. In 3 dieser 17 Fälle war Vysis die einzige Sonde, mit der sich die *BCL2*-Translokation zeigte.

Als zum Vergleich die *BCL2*-BA-Sonden von MetaSystems und ZytoLight angewendet wurden, zeigte sich ein komplett anderes Bild. Hier konnten bei jeweils den exakt gleich 43 Fällen, also bei 62,3%, die *BCL2*-Translokation gezeigt werden.

Diesen unterschiedlichen Resultaten könnte zugrunde liegen, dass die TMAs nur einen sehr begrenzten Ausschnitt eines LK widerspiegeln. Das Material durchläuft einige Bearbeitungsschritte, die natürlich die Sondeneffektivität beeinflussen können. Auch das relativ alte Probenmaterial (das Gewebe stammte aus den Jahren 2005 bis 2014), das zum Einsatz kam, könnte einen Einfluss auf das Signalbild haben. Jedoch muss man diesen Überlegungen gegenüberstellen, dass die zwei alternativen Sonden sehr gut funktionierten und zum einen ein identisches und zum anderen auch annähernd das initial erwartete Ergebnis zeigten, weshalb man davon ausgehen darf, dass der Versuchsaufbau generell angemessen war.

Auch andere Studien, die FISH an TMA durchführten, berichten von weitgehend übereinstimmenden Ergebnissen und stützen damit die Annahme, dass das Verfahren prinzipiell zuverlässig ist, sofern geeignete Sonden eingesetzt werden (Marino et al. 2021, Muñoz-Mármol et al. 2013).

Die FISH mit den *BCL2*-BA-Sonden von MetaSystems und ZytoLight wurden stichprobenartig an ganzen Schnitten der LK wiederholt, um durch eine Gegenprobe die Ergebnisse zu überprüfen und auszuschließen, dass die Hybridisierung an den TMA zu anderen Ergebnissen führen könnte. In allen fünf Kontroll-FISH stimmten die Resultate mit denen der TMAs überein. Dies wurde insbesondere zur Überprüfung der beiden ergänzenden *BCL2*-BA-Sonden

durchgeführt, da diese in der Routinediagnostik nicht gebräuchlich waren, während die Vysis-Sonde im Institut regelmäßig im Alltag angewendet wird.

In der Literatur ließen sich keine vergleichbaren Abweichungen zwischen verschiedenen Sonden finden. In der Arbeit von Marino et al. stimmten die Ergebnisse der Dual *BCL2/BCL6*-FISH-Sonde vollständig mit jenen der klassischen Einzel-BA-FISH-Analysen (es kamen kommerzielle ZytoLight Break-Apart-Sonden zum Einsatz) überein (Marino et al. 2021). Dieses Resultat steht in starkem Widerspruch zu den in der vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnissen, in denen schon eine von drei vergleichend verwendeten BA-Sonden ein komplett abweichendes Ergebnis lieferte und auch die Resultate der verwendete Dual-Fusionssonde mit keiner der verwendeten BA-Sonden ganz oder auch nur weitgehend übereinstimmte.

In einer Studie von Menke et al., in deren Fokus primär der Vergleich verschiedener zytologischer und chirurgischer Probenotypen auf die Ergebnisse von FISH-Analysen von *MYC*, *BCL2* und *BCL6* stand, wurden außerordentlich konsistente Ergebnisse erzielt. In den sechs beteiligten medizinischen Zentren konnten in der FISH auch mit verschiedenen *MYC*-, *BCL2*- und *BCL6*-Sonden sehr übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. Es wurden für die Untersuchung allerdings Proben vom DLGCL und HGBCL herangezogen. An FFPE-Gewebeschnitten wurden im Vorfeld zytogenetisch gesicherte Fälle mittels BA-FISH-Sonden der Firmen ZytoLight und Vysis eingesetzt. Insbesondere auch für die t(14;18)-Translokation konnte mit *BCL2*-Sonden eine äußerst hohe Übereinstimmung zwischen verschiedenen Proben- und Sondenarten erreicht werden. Damit konnten in dieser Untersuchung alle eingesetzten Sonden hinsichtlich der Vergleichbarkeit und Verlässlichkeit beim Nachweis dieser Translokation überzeugen. Es wurde allerdings auch in dieser Arbeit betont, dass die Wahl der Sonden und die Probenqualität die Sensitivität des Ergebnisses beeinflussen können (Menke et al. 2024).

Cassidy et al. wiederum verglichen, ebenfalls am DLBCL, die Ergebnisse zum Nachweis von *MYC*, *BCL2* und *BCL6* mittels FISH und CGP (comprehensive genomic profiling). Für den Nachweis von *BCL2*-Rearrangements kamen Dual-

Fusion-Sonden von Vysis zum Einsatz, als Material wurden, die auch in der vorliegenden Arbeit, FFPE-Gewebeschnitte verwendet. Insgesamt wiesen 17% der Fälle diskrepante CGP- und FISH-Ergebnisse auf, wobei für *IGH/BCL2*-Translokationen CGP eine höhere Sensitivität aufwies als FISH (100% vs. 86%) (Cassidy et al. 2020).

Yajid et al. konnten nachweisen, dass ein abweichendes Protokoll bei der Hybridisierung und dem FISH-Prozess die Sensitivität von Sonden erheblich verändern kann. Es wurden FFPE-Gewebeschnitte von synovialen Sarkomen verwendet und die Analyse mit der SYT-SSX-BA-Sonde von Cytocell durchgeführt. Die Hybridisierung und der FISH-Prozess wurden mit zwei unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. Erst mit dem optimierten Protokoll konnten entsprechende Signale nachgewiesen werden. Daraus kann gefolgert werden, dass dieses modifizierte FISH-Protokoll für die Anwendung an FFPE-Gewebe in diesem konkreten Anwendungsfall besser geeignet war als das Cytocell FISH Protokoll (Yajid et al. 2020).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Hybridisierungsvorgang mit Vysis zweimal wiederholt und leicht modifiziert, jedoch konnten dadurch die Ergebnisse der anderen *BCL2*-BA-Sonden nicht erreicht werden. Möglicherweise wäre dies mit einem in ähnlicher Form speziell angepassten Protokoll noch optimierbar gewesen.

Muñoz-Mármol et al. untersuchten den *MYC*-Status bei aggressiven B-Zell-Lymphomen ebenfalls an FFPE-Material mit verschiedenen FISH-Sonden (zwei BA-Sonden und eine Dual-Fusion-Sonde). Die *IGH-MYC*-Translokationen konnten mit allen drei Sonden gleichermaßen identifiziert werden. Bei den non-*IGH-MYC*-Translokationen hingegen wurden mit den verschiedenen Sonden zum Teil unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Als Ursache wurde von den Autor:innen vermutet, dass es sich teilweise um Translokationen handelte, die außerhalb der Reichweite einzelner Sonden lagen. In weiteren Fällen wiesen einige Sonden sehr schwache Signale auf, die leicht zu übersehen waren. Es zeigt sich also in dieser Studie, dass die Sonden unterschiedliche Sensitivitäten für bestimmte Rearrangements haben. Bei der Interpretation von FISH-

Ergebnissen müssen somit die diesbezüglichen Limitationen der Sonden als relevanter Faktor in Betracht gezogen werden (Muñoz-Mármol et al. 2013).

Im Gegensatz dazu fanden Magnoli et al. bei ihren Analysen zur *BCL2*-Translokation bei FL bei vergleichender Anwendung von *IGH*-Break-Apart-Sonden und *BCL2*-spezifischen Sonden in den meisten Fällen den Erwartungen entsprechend eine klassische *IGH/BCL2*-Translokation. In einer untersuchten Subkohorte von *IGH*-rearrangierten, *BCL2*-immunhistochemisch negativen Fällen konnte sie bei etwa der Hälfte der Fälle eine *BCL2*-Translokation nachweisen. Eine Untergruppe dieser Fälle wurde an einem anderen Institut mit einer alternativen *BCL2*-BA-Sonde erneut getestet, die Befunde konnten bestätigt werden, was für die Zuverlässigkeit der Methodik spricht (Magnoli et al. 2023).

In der hier vorgelegten Arbeit konnte mit der Dual-Fusion-Sonde lediglich in 12 Fällen die typische *t(14;18)*-Translokation nachgewiesen werden. Interessanterweise fielen jeweils sechs dieser zwölf Dual-Fusion-positiven Fälle zum einen auf die Gruppe mit positivem Nachweis durch die Vysis-Sonde oder zum anderen auf diejenige Gruppe, bei der die beiden anderen BA-Sonden (ZytoLight bzw. MetaSystems) die Translokation detektiert hatte.

Daraus könnte man schließen, dass jede BA-Sonde den typischen *IGH-BCL2*-Bruchpunkt erkennt, darüber hinaus aber auch unterschiedliche, alternative Bruchpunktregionen erfasst, und dass vielleicht gerade diese im untersuchten Probenmaterial häufiger vertreten waren.

Da alternative Translokationspartner von *BCL2* selten sind, erscheint eine Häufung dieser Varianten in unserem Kollektiv jedoch unwahrscheinlich (Lin et al. 2008, Zamò et al. 2018).

Unterschiedliche FISH-Sonden haben eine unterschiedliche Sensitivität für den Nachweis verschiedener Translokationsbruchpunkte. Das gilt insbesondere für Bruchpunkte, die dem Zentromer näher liegen (ausführlich dargestellt für *MYC*) (Cassidy et al. 2020). Zwar sollen Break-Apart-Sonden theoretisch nahezu alle Bruchpunkte stromaufwärts und stromabwärts des *BCL2*-Gens erfassen können

und somit Translokationen weitgehend unabhängig vom Partnerlokus erfassen können (Magnoli et al. 2023). In der Praxis zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der Detektionsleistung. Vysis und die *IGH/BCL2*-Fusionssonde verfehlten in zahlreichen Fällen den Nachweis, der mit den anderen BA-Sonden eindeutig gelang.

Dieser Unterschied könnte auf spezifische Eigenschaften der eingesetzten Sonden zurückzuführen sein. Zwar nutzen alle Break-Apart-Sonden dasselbe Prinzip, jedoch unterscheiden sie sich hinsichtlich der Größe und Lage ihrer Hybridisierungsbereiche, wie auch unter 2.1.3.1. ersichtlich. Die *BCL2*-BA-Sonde von Vysis deckt deutlich größere Zonen neben dem *BCL2*-Gen ab, während die MetaSystems- und ZytoLight-Sonde im Vergleich mit kleineren Abschnitten hybridisiert und dort zu einem Signal führt.

Hypothetisch könnten kleinere Hybridisierungsregionen bei der Detektion bestimmter Umlagerungen Vorteile bieten, insbesondere wenn der Bruchpunkt sehr nahe am Gen liegt oder strukturelle Veränderungen durch komplexe Rekombinationen auftreten. Ebenso könnten Variationen im exakten Bruchpunkt oder aberrante Translokationen eine Rolle spielen, die zu unerwarteten FISH-Signalmustern führen.

Denkbar ist, dass Faktoren wie das Alter des Materials und Unterschiede in der Gewebeaufbereitung die Fähigkeit der Sonden, insbesondere der Vysis-Sonde die Zielsequenz zu markieren, beeinträchtigt haben könnten. Tatsächlich können Fixierungsart und Lagerungsdauer die FISH-Signale beeinflussen (Yajid et al. 2020), wenngleich die Diskrepanzen in unserer Untersuchung nicht primär in älteren Proben auftraten.

Angesichts der Ergebnisse scheint die *BCL2*-BA-Sonde von Vysis, die im Pathologischen Institut Tübingen eingesetzt wird, möglicherweise an TMAs eine geringere Detektionsleistung zu zeigen. Diese Annahme sollte in weiterführenden Untersuchungen systematisch überprüft werden, indem alle drei *BCL2*-BA-Sonden nochmals an Vollschnitten angewendet werden. In der gegenständlichen Untersuchung wurde die vergleichende Betrachtung der Resultate an den TMAs und an den entsprechenden Vollschnitten

stichprobenartig nur für die beiden alternativen BA-Sonden durchgeführt. In allen fünf Fällen (darunter t(14;18)-positive und -negative Fälle) stimmten die Resultate überein.

Eine zusätzliche Sequenzierung der Bruchpunkte mittels PCR könnte die FISH-Ergebnisse weiter absichern und die exakten Umlagerungsregionen identifizieren. Dies könnte wertvolle Hinweise liefern, welche spezifischen Bruchpunktvariationen möglicherweise für die unterschiedlichen FISH-Befunde verantwortlich sind.

Im Moment lässt der Umstand, dass zwei der Sonden nahezu identische Ergebnisse lieferten den Schluss zu, dass die Methode an sich verlässlich ist, wenn sie auf den gleichen biochemischen Mechanismus abzielt. Die Vergleichbarkeit der Sonden untereinander ist hingegen offenbar nicht ohne weiteres gegeben. Mit der *BCL2*-BA-Sonde von Vysis wurden weniger (3) Translokationen entdeckt, die bei den alternativen Break-Apart-Sonden nicht gefunden wurden. Dies spricht dafür, dass mit der Anwendung verschiedener Sonden, die auf unterschiedliche Sequenzen abzielen, mehr Translokationen detektiert werden können. Die Ergebnisse könnten auch als weiteres Indiz dafür interpretiert werden, dass es bei der Gruppe der *BCL2*-exprimierenden FL verschiedene molekularbiologische Ursachen für diese Expression geben könnte.

4.4.1 Ergebnisse der *IGH/BCL2*-Fusionssonde

Mit der *IGH/BCL2*-Fusionssonde, die ebenso ein deutlich abweichendes Ergebnis zeigte, konnten hingegen keine zusätzlichen Translokationen gefunden werden. Bei der Anwendung der *IGH/BCL2*-Fusionssonde wird an sich von einem mit der *BCL2*-BA-Sonde übereinstimmenden Ergebnis ausgegangen, da im Falle einer Translokation des *BCL2*-Gens ein positives Signal der stattgehabten *IGH/BCL2*-Fusion zu erwarten ist.

In der hier durchgeführten FISH zeigten lediglich 12 Fälle ein positives Fusionsmuster. Tatsächlich zeigte die Fusionssonde in keinem Fall zusätzliche

Translokationen, die nicht bereits durch eine der eingesetzten BA-Sonden detektiert worden wären.

In sechs der zwölf Fälle, bei denen die *IGH/BCL2*-Dual-Fusion-Sonde ein positives Signal zeigte, war die Translokation auch mit allen drei *BCL2*-BA-Sonden nachweisbar. Die übrigen sechs Fälle blieben in der Vysis-Sonde negativ, zeigten jedoch ein klares Signal mit den BA-Sonden von MetaSystems und ZytoLight.

Insgesamt konnten in 46 Fällen *BCL2*-Translokationen durch mindestens eine der drei BA-Sonden nachgewiesen werden. Von diesen 46 Fällen zeigten 34 (entspricht 49,3% aller untersuchten Fälle) kein Fusionsmuster mit der Dual-Fusion-Sonde.

Dies ist vermutlich teilweise auf das generell schwache Signalmuster dieser Färbung zurückzuführen. Dennoch blieben die Ergebnisse der Dual-Fusion-Sonde, ähnlich den Ergebnissen der Vysis-BA-Sonde, insgesamt deutlich unter den Erwartungen und wichen erheblich von den robusteren Signalmustern durch MetaSystems und ZytoLight ab.

In einer älteren französischen Studie untersuchten Belaud-Rotureau et al. die Sensitivität von FISH im Vergleich zu PCR bei insgesamt 51 FL-Fällen mit FFPE-LK-Material. Dabei kam ebenfalls die *IGH/BCL2*-Dual-Fusionssonde von Vysis zum Einsatz. Es konnte, unabhängig vom Probenotyp, in 47 von 51 Fällen (92%) eine t(14;18)-Translokation nachgewiesen werden. Zudem wurde bei 22 FISH-positiven Fällen ergänzend eine Split-Signal-Sonde für *BCL2* (Dako) eingesetzt, die in allen Fällen die Translokation ebenfalls nachweisen konnte (Belaud-Rotureau et al. 2007).

Im Gegensatz dazu zeigte die FISH-Analyse mit der *IGH/BCL2*-Dual-Fusionssonde von Vysis in der Studie von Maeshima et al., insbesondere bei *BCL2*-negativen oder schwach positiven FL-Fällen hingegen nur eine Nachweisrate von 16%. Besonders bei schwach *BCL2*-positiven Fällen war kein einziger Fall FISH-positiv. Die Autor:innen kommen daher zur Schlussfolgerung, dass die FISH in diesen Fällen häufig falsch-negativ sein kann und stets im

Kontext weiterer morphologischer und molekularer Befunde interpretiert werden sollte (Maeshima et al. 2023).

FISH-Sonden sind dafür ausgelegt, Genumlagerungen zu erkennen, erreichen dabei aber, im Vergleich zu molekularen Verfahren eine deutlich geringere Auflösung. Allerdings können damit viele Translokationen mit sehr heterogenen Bruchpunkten abgedeckt werden, da mit einer geeigneten Sondengestaltung eine große Region potenzieller Umlagerungen, typischerweise mehrere hundert Kilobasen bis etwa eine Megabase, abgedeckt werden kann. Komplexe strukturelle Veränderungen innerhalb der Sondenregion können aber wiederum zu schwer interpretierbaren oder irreführenden Signalen führen. So wurde etwa in der Arbeit von Geiersbach et al. eine scheinbare Umlagerung mit einer kommerziellen SS18-Break-Apart-Sonde beobachtet, die in Wahrheit auf eine partielle Deletion im Bereich der Sondenbindung zurückzuführen war. Erst eine begleitende Mikroarray-Analyse ermöglichte die korrekte Einordnung als falsch-positives Ergebnis (Geiersbach et al. 2011).

Vergleicht man aber die Ergebnisse von Magnoli et al. mit den hier vorgelegten, spricht einiges dafür, dass die schwache Nachweisrate der *IGH/BCL2*-Fusion mittels der Vysis Dual-Fusion-Sonde in der eigenen Untersuchung weniger auf biologische Ursachen als vielmehr auf methodische Einschränkungen zurückzuführen ist. Als mögliche Fehlerquellen könnten Probenalter, -konservierung, -aufbereitung oder die technische Durchführung der FISH-Analyse in Frage kommen. Hinweise auf eine erhöhte Frequenz alternativer Bruchpunkte, die eine unzureichende Detektion durch die verwendete Fusionssonde erklären könnten, finden sich in der Literatur nicht (Magnoli et al. 2023).

Magnoli et al. untersuchten in ihrer Studie 76 Fälle von FL, wobei sie sowohl *BCL2*- als auch *IGH*-Rearrangements mittels BA-Sonden analysierten. In 87% der Fälle waren entweder beide Translokationen vorhanden oder beide fehlten, was die hohe Übereinstimmung bei der klassischen t(14;18)(q32;21)-Translokation widerspiegelt. Andere Translokationen, bei denen das *BCL2*-Gen mit den Immunglobulin-Kappa (2p11)- oder -Lambda (22q11)-Leichtkettengenen

fusioniert, sind selten (Lin et al. 2008). Auch unter den 10 Fällen mit diskordanten Ergebnissen (entweder *IGH*+/*BCL2*- oder umgekehrt) konnten bei 4 Fällen mit auffälliger Signalverteilung durch zusätzliche FISH-Analysen mittels einer *IGH/BCL2*-Fusionssonde eindeutige *IGH/BCL2*-Fusionen bestätigt werden (Magnoli et al. 2023).

Dennoch konnten Magnoli et al. in ihrer Versuchsreihe 9 Fälle mit *IGH*-Rearrangements identifizieren, bei denen keine oder nur sehr schwache *BCL2*-Translokationssignale vorlagen. Diese Beobachtung legt nahe, dass auch andere genetische Mechanismen ohne direkte Beteiligung von *BCL2* zur Aktivierung des *IGH*-Lokus beitragen könnten, und das FL auch durch andere genetische Umlagerungen als *IGH-BCL2* getrieben sein kann (Magnoli et al. 2023).

4.4.2 Einfluss des Materials auf das FISH-Resultat

Marino et al., die in ihrer Studie ebenfalls unterschiedliche Sonden verglichen hatten und dabei zu sehr konsistente Ergebnisse erzielten, hatten auch TMA und FFPE verwendet, allerdings was das Material in dieser Untersuchung maximal etwas über zwei Jahre alt, im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung mit einem Probenalter zwischen 5 und 14 Jahre alt (Marino et al. 2021). Jedoch konnte in der Ergebnisanalyse kein vermehrtes Auftreten der FISH-negativen Fälle unter den älteren Proben festgestellt werden. Der eher geringe Anteil an FISH-positiven Fällen lässt sich also nicht ausschließlich durch das Gewebealter herleiten.

Magnoli et al. verglichen die FISH-Ergebnisse zwischen FFPE-Gewebeproben und frischen (FF) Gewebeproben an einer Untermenge von 32 Fällen, dabei traten Einschränkungen der FISH-Analyse an Archivmaterial zutage. Die FISH-Resultate an den frischen Gewebeproben stimmten mit jenen überein, die an den jeweiligen FFPE-Zellkernen erzielt wurden, mit Ausnahme von 3 Fällen. Diese waren t(14;18)-negativ auf FFPE, aber positiv auf gefrorenem Gewebe. In zwei Fällen könnte das auf genetische Heterogenität zurückzuführen sein, da auf den gefrorenen Proben ein geringer Anteil translozierter Zellkerne nachweisbar waren. Im dritten Fall hatte es sich hingegen um eine „kryptische“ *BCL2*-

Translokation mit atypischem Bruchpunkt gehandelt, die sich in FFPE-Proben schwer nachweisen lassen. Diese Ergebnisse belegen, dass insbesondere kleine neoplastische Klone oder ungewöhnliche Bruchpunkte in Archivmaterial unter Umständen nicht zuverlässig erfasst werden können (Magnoli et al. 2023).

Auch Belaud-Rotureau et al. führten FISH sowohl an FFPE- als auch an gefrorenem Lymphknotengewebe aus Biopsien von neu diagnostizierten Patient:innen durch. Die Methode erwies sich dabei unabhängig vom Materialtyp als zuverlässig und sensitiv für den Nachweis der *IGH/BCL2*-Fusion. Dies zeigt, dass bei optimaler Durchführung und geeigneter Materialqualität hohe Nachweisraten auch mit Dual-Fusionssonden erzielbar sind (Belaud-Rotureau et al. 2007).

4.5 Die Bedeutung der *BCL6*-Translokation – hohe Frequenz von gemeinsamem Auftreten von *BCL6* + *BCL2*-Translokationen

In der vorliegenden Untersuchung wiesen von insgesamt 69 untersuchten Fällen 11 eine *BCL6*-Translokation auf. Davon zeigten zwei Fälle ausschließlich eine *BCL6*-Translokation, während die übrigen neun Fälle zusätzlich eine *BCL2*-Translokation aufwiesen. Das gehäufte gemeinsame Auftreten von *BCL2*- und *BCL6*-Translokationen war insofern bemerkenswert, als es bislang nur in wenigen Studien systematisch untersucht wurde. Eine aktuelle Übersichtsarbeit hebt ebenfalls hervor, dass entsprechende Befunde bislang möglicherweise unterschätzt wurden (Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023).

In der Diagnostik wird eine *BCL6*-Translokation insbesondere dann erwogen, wenn sich ein FL immunhistochemisch *BCL2*-negativ oder *CD10*-negativ präsentiert. Besonders bei FL Grad 3B oder bei transformierten FL wird bei fehlendem Nachweis einer *t(14;18)*-Translokation ergänzend eine Analyse auf *BCL6*- oder *MYC*-Rearrangements mittels FISH empfohlen (Swerdlow et al. 2016).

In der Literatur wird das Auftreten von *BCL6*-Translokationen bei *t(14;18)*-negativen FL mit einer Häufigkeit von etwa 20% beschrieben. Ähnlich wie in der

vorliegenden Arbeit, in der bei zwei von 23 *BCL2*-negativen Fällen eine *BCL6*-Translokation nachgewiesen werden konnte, fand auch die Studie von Magnoli et al. zu FL-Fällen aus Norditalien nur einen entsprechenden Fall unter insgesamt 37 analysierten *BCL2*-negativen FL-Fällen. Während sich Magnoli et al. ausschließlich auf *BCL2*-negative Konstellationen konzentrierten und mögliche Fälle mit *BCL2*- und *BCL6*-Translokation nicht erfassten, ermöglicht die vorliegende Analyse eine umfassendere Betrachtung sowohl isolierter *BCL6*-Translokationen als auch kombinierter *BCL2/BCL6*-Rearrangements. Der insgesamt seltene Nachweis einer *BCL6*-Translokation in *BCL2*-negativen FL unterstreicht die Bedeutung weiterer pathogenetischer Mechanismen in dieser Subgruppe (Magnoli et al. 2023).

4.5.1 *BCL6*-Translokation und der histologische Grad

Mehrere Studien zeigen, dass *BCL6*-Genumlagerungen (Translokationen am Locus 3q27) insbesondere bei FL ohne die typische t(14;18)-Translokation gehäuft auftreten und mit charakteristischen klinisch-pathologischen Merkmalen einhergehen.

Gu et al. analysierten 142 FL-Fälle, darunter 63 t(14;18)-negative FL, mittels FISH und zeigten, dass *BCL6*-Umlagerungen bei t(14;18)-negativen FL häufiger vorkommen als bei t(14;18)-positiven FL (26% vs. 19%), ein Umstand, der sich in der gegenständlichen Untersuchung nicht wiederfindet. Hier waren nur 2 der *BCL6*-positiven Fälle (18,2%) *BCL2*-negativ, der Großteil der *BCL6*-positiven Fälle zeigte auch eine *BCL2*-Translokation. Auffällig bei Gu et al. war die Häufung in höheren Graden, in 60% der Grad 3-Fälle ohne die *BCL2*-Translokation konnte eine *BCL6*-Translokation nachgewiesen werden. Besonders bemerkenswert war zudem die häufigere Beteiligung alternativer Bruchpunkte in der t(14;18)-negativen Gruppe. Gu et al. schlussfolgerten, dass *BCL6*-Translokationen ein wichtiges genetisches Ereignis bei t(14;18)-negativen FL darstellen, vor allem in höheren Graden, und empfahlen daher bei diesen Fällen gezielte FISH-Analysen für *BCL6*-Umlagerungen (Gu et al. 2009).

Auch Gagyi et al. berichteten über *BCL6*-Umlagerungen in t(14;18)-negativen, *BCL2*-negativen FL (überwiegend Grad 3A) mit hoher Proliferation und aktiver somatischer Hypermutation der Immunglobulin-Gene. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass *BCL6*-Veränderungen einen alternativen molekularen Weg in der Entwicklung von FL ohne t(14;18) darstellen (Gagyi et al. 2008).

Die klinisch-pathologischen Auswirkungen von *BCL6*-Translokationen in Abhängigkeit vom *BCL2*-Status wurden von Gollub et al. analysiert. Ihre Studie an 102 FL zeigte, dass *BCL6*-Umlagerungen vor allem dann den Tumorphänotyp beeinflussen, wenn keine *BCL2*-Translokation vorliegt. Insbesondere waren *BCL2*-negative/*BCL6*-translozierte FL signifikant häufiger histologisch Grad 3, zeigten seltener ein positives Ergebnis für den Keimzentrumsmarker CD10 und wiesen geringere Raten an Knochenmark- und Kapselinfiltration auf, was auf einen distinkten biologischen Subtyp hinweisen könnte (Gollub et al. 2009).

Im Einklang damit fanden auch Díaz-Alderete et al. deutliche Zusammenhänge zwischen Translokationsstatus und histologischem Grad, wobei auch hier speziell das Auftreten einer *BCL6*-Translokation in Abwesenheit der *BCL2*-Translokation mit einem höheren histologischen Grad einherzugehen schien (Díaz-Alderete et al. 2008).

Dies konnte mit der vorliegenden Untersuchung nicht reproduziert werden, unter den *BCL6*-positiven FL zählte nur ein Fall zu den Grad 3-FL, dieser ergab jedoch auch ein positives Ergebnis in der Vysis *BCL2*-FISH. Allerdings ist die Fallzahl zu gering für eine aussagekräftige Beurteilung.

Unter den Fällen mit *BCL2*- und *BCL6*-Translokation waren 8 von 9 Fälle Grad 1-2 zuzuordnen. Auch Díaz-Alderete et al. fanden das gleichzeitige Auftreten beider Translokationen vornehmlich bei FL mit histologisch niedrigem Grad (Díaz-Alderete et al. 2008).

Neuere Untersuchungen erweitern das molekulare Verständnis t(14;18)-negativer FL. Nann et al. analysierten 55 t(14;18)-negative FL hinsichtlich ihres genetischen Profils. Es zeigten sich *BCL6*-Translokationen in etwa 22% der

Fälle, häufig in Verbindung mit FL Grad 3A, verminderter CD10- und fehlender BCL2-Expression sowie hoher Proliferationsrate. Die molekulare Klassifikation dieser Fälle war heterogen, was auf eine morphologisch ähnliche, aber genetisch diverse Untergruppe schließen lässt (Nann et al. 2020).

In einer geographisch eingegrenzten Kohorte aus Norditalien fanden Magnoli et al. eine hohe Rate von *BCL2*-negativen FL (ca. 49%), darunter einen erheblichen Anteil von Fällen mit *BCL6*-Translokationen. Diese Fälle zeigten gehäuft Grad 3A/3B, diffuse Wachstumsarchitektur und Expression von BCL6 und MUM1, was eine funktionelle Parallele zur *BCL2*-Translokation nahelegt. Die Ergebnisse deuten auf alternative pathogenetische Mechanismen in t(14;18)-negativen FL hin, die mit einer genetischen Heterogenität und Merkmalen eines potenziell aggressiveren Verlaufs assoziiert sein können (Magnoli et al. 2023).

4.5.2 *BCL6* statt *BCL2* als Schritt in der Pathogenese mit Bezug auf das Stadium

In mehreren Studien zeigt sich, dass *BCL6*-Translokationen bei FL nicht nur in Bezug auf den *BCL2*-Status oder den histologischen Grad, sondern auch abhängig vom Krankheitsstadium unterschiedlich verteilt auftreten. Ikoma et al. untersuchten 140 FL-Fälle mittels FISH auf *BCL2*-, *BCL6*- und *MYC*-Umlagerungen und fanden bei 11,4% Konstellationen mit *BCL2*- und *BCL6*-Translokationen. Dieser Anteil ist vergleichbar mit den in der hier vorliegenden Arbeit beobachteten 13% ist. Die Autor:innen interpretierten die *BCL6*-Umlagerung in diesen Fällen als möglichen Second Hit, den die neoplastischen Zellen während ihrer Reifung im Keimzentrum erwerben (Ikoma et al. 2022). Auffällig war, dass Patient:innen mit isolierter *BCL6*-Translokation seltener in einem fortgeschrittenen klinischen Stadium diagnostiziert wurden (47%), als Patient:innen in den *BCL2*-, oder *BCL2*- und *BCL6* translozierten Gruppen (75%). Auch eine Knochenmarksinfiltration war in der *BCL6*-Translokationsgruppe mit nur 13% deutlich seltener als in den *BCL2*- und doppelt translozierten Gruppen (55-67%) (Ikoma et al. 2022).

Demgegenüber berichteten Nann et al., dass 56% der t(14;18)-negativen FL mit *BCL6*-Rearrangement erst im Stadium III/IV diagnostiziert wurden, ein Wert der mit den Angaben von Los-de Vries et al. vergleichbar ist, wo in einer genetisch definierten Subkohorte 64% der t(14;18)-negativen FL mit *BCL6*-Umlagerung im fortgeschrittenen Stadium vorlagen (Nann et al. 2020, Los-de Vries et al. 2022).

In der hier vorliegenden Arbeit lagen für 10 der 11 Fälle mit *BCL6*-Translokation Informationen zum Krankheitsstadium vor. Davon waren 36% dem Stadium I-II zuzuordnen, und 54% dem Stadium III-IV. Von den 9 DH-Fällen gehörten 3, also 33,3% der Fälle zu den Stadien I oder II und 5 bzw. 55,6% zu Stadium III oder IV, in einem Fall war das Stadium nicht bekannt.

Zusätzlich zeigen neuere molekulare Studien, dass sich t(14;18)-negative FL im frühen klinischen Stadium (I/II) häufiger durch *STAT6*-Mutationen, im Stadium III/IV dagegen eher durch *BCL6*-Translokationen auszeichnen. Die *BCL6*-dominierten Fälle ähneln in ihrem molekularen Profil stärker dem klassischen t(14;18)-positiven FL (Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023).

Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass in verschiedenen Stadien der Erkrankung unterschiedliche molekulare Ereignisse eine wesentliche Rolle für die Pathogenese und das Fortschreiten des follikulären Lymphoms spielen könnten (Los-de Vries et al. 2022).

4.5.2.1 *BCL6*-translozierte FL als eigene Subgruppe

Mehrere Studien sprechen dafür, dass FL mit *BCL6*-Translokation, aber ohne *BCL2*-Translokation eine eigenständige biologische Subgruppe darstellen könnten. Díaz-Alderete et al. und Ikoma et al. ordnen FL-Fälle mit gleichzeitiger *BCL2*- und *BCL6*-Translokation der klassischen, *BCL2*-dominierten Gruppe zu, während FL mit isolierter *BCL6*-Translokation als klinisch und pathologisch distinkte Entität gelten (Díaz-Alderete et al. 2008, Ikoma et al. 2022).

Nann et al. berichten, dass 22% der t(14;18)-negativen FL eine *BCL6*-Translokation aufwiesen, meist assoziiert mit höherem klinischem Stadium (56%), komplexerer genetischer Architektur und einer genetischen Nähe zum klassischen FL (Nann et al. 2020). Ähnliche Einschätzungen finden sich auch bei

Salaverria et al., die in ihrer Übersichtsarbeit molekulare und klinische Subgruppen von t(14;18)-negativen FL differenzieren. Die Autor:innen berichten, dass *BCL6*-Translokationen überwiegend in späteren Krankheitsstadien auftreten und molekular dem klassischen FL näherstehen, während *STAT6*-dominierte Subtypen häufiger in Stadium I/II vorkommen. Diese Differenzierung unterstreicht die Heterogenität t(14;18)-negativer FL und stützt die Einordnung *BCL6*-positiver Fälle als potenziell eigenständige Subgruppe (Salaverria, Weigert, and Quintanilla-Martinez 2023).

Auch Menter und Quintanilla-Martinez beschreiben ein gehäuftes Auftreten von t(14;18)-negativen, *BCL6*-dominierten FL in der Inguinalregion mit CD23-Positivität und spezifischem molekularem Profil, was als weiteres Argument für eine eigenständige Subgruppe (Menter and Quintanilla-Martinez 2023) sprechen könnte.

Die Übersichtsarbeit von Enemark et al. liefert eine systematische Analyse von Studien der letzten vier Jahrzehnte zu molekularen Markern bei FL und HGBL. Die Autor:innen kommen zu dem Ergebnis, dass *BCL6*-Translokationen sowohl im t(14;18)-positiven als auch -negativen Kontext mit einem erhöhten Risiko für eine Transformation assoziiert sein können, ihre prognostische Bedeutung jedoch nicht einheitlich bewertet wird. Die Analyse legt nahe, dass die prognostische Bedeutung von *BCL6*-Rearrangements davon abhängen kann, ob eine t(14;18)-Translokation vorliegt. Während die t(14;18)-Translokation typischerweise als früher krankheitsinitiierendes Ereignis gilt, wird die *BCL6*-Translokation häufiger als spätere (Second-Hit-)Veränderung beschrieben, insbesondere in t(14;18)-positiven Fällen. In t(14;18)-negativen Konstellationen hingegen weist die *BCL6*-Translokation auf eine eigenständige pathogenetische Rolle hin. Allerdings betonen Enemark et al., dass die prognostische Bewertung von *BCL6*-Umlagerungen in der bisherigen Literatur insgesamt uneinheitlich ausfällt, das auf die biologische Heterogenität dieser Veränderungen und die unterschiedliche Zusammensetzung der Studienkohorten zurückgeführt wird (Enemark et al. 2024).

Künstner et al. zeigen anhand von genomweiten Analysen im Kontext von Lymphomen mit *BCL2*-, *MYC*- und/oder *BCL6*-Translokationen, dass *BCL6*-Translokationen mit spezifischen molekularen Profilen einhergehen, darunter insbesondere Veränderungen im *E2F*-Signalweg, welcher die Zellzyklusregulation beeinflusst. Diese genetischen Muster unterscheiden sich deutlich von denen *t(14;18)*-assoziiierter Fälle und deuten auf eine eigenständige molekulare Entwicklungslinie *BCL6*-rearrangierter FL hin (Künstner et al. 2021).

In der Gesamtschau ergibt sich damit das Bild einer molekular und klinisch heterogenen Gruppe von FL mit *BCL6*-Translokation, deren biologische Relevanz und prognostische Bedeutung kontextabhängig ist, aber klare Hinweise auf eine potenzielle Sonderstellung *t(14;18)*-negativer, *BCL6*-dominierter FL liefert.

4.6 Limitationen der Studie

Die für diese Untersuchung verwendeten Lymphknotenpräparate stammten aus den Jahren 2005 bis 2014. Ein Einfluss des Probenalters auf die Auswertbarkeit kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings zeigte sich bei keiner der vier eingesetzten FISH-Sonden ein Zusammenhang zwischen dem Gewebealter und der Nachweisrate der *t(14;18)*-Translokation, die positiven Befunde waren über alle Jahrgänge hinweg gleichmäßig verteilt.

Das Studienkollektiv von 69 Fällen ermöglicht zwar eine gründliche Analyse, bildet jedoch nur einen begrenzten Ausschnitt des gesamten FL-Spektrums ab und erlaubt daher keine endgültigen Rückschlüsse.

Auch eine unterschiedliche Eignung der Sonden für die Anwendung an TMA-Material erscheint möglich, wurde im Rahmen dieser Studie jedoch nicht untersucht. Zur Verifizierung der FISH-Ergebnisse an den TMA wurden lediglich fünf Fälle an Vollschnitten überprüft, diese stimmten allerdings alle aus vergleichsweise jüngeren Präparaten. Ergänzend könnte in weiterführenden Studien beispielsweise noch ein direkter Vergleich der Vysis *BCL2*-BA-Sonde mit der Dual-Fusionssonde erfolgen.

Bezüglich der Methodik muss hervorgehoben werden, dass die Auswertung der FISH ein hohes Level an Erfahrung erfordert und die Vergleichbarkeit unter mehreren Untersuchern nicht selbstverständlich gegeben ist.

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen deutlich, dass aus dem immunhistochemischen Nachweis einer BCL2-Expression nicht zuverlässig auf das Vorliegen einer t(14;18)-Translokation geschlossen werden kann.

Als Ursache für die BCL2-Expression bei fehlender t(14;18)-Translokation können kryptogene *BCL2*-Aberrationen in Frage kommen (Vaandrager et al. 2000a, Ott et al. 2002). So konnten in BCL2-positiven, t(14;18)-negativen FL Genmutationen identifiziert werden, welche direkt mit *BCL2* assoziiert sind, wie beispielsweise *MAPK8*, welche die BCL2-Expression verursachen könnten (Zamò et al. 2018).

Weitere Analysemethoden wie FISH oder PCR sind in der Routinediagnostik zur effektiven Identifikation von Translokationen und anderen genetischen Abweichungen auch aus klinischer Sicht notwendig und sinnvoll, da sich daraus unterschiedliche Therapieansätze ergeben können, wie beispielsweise spezifische BCL2- und BCL6-Inhibitoren (Cardenas et al. 2016, Zhu et al. 2019).

Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse erscheint eine gezielte Vergleichsstudie sinnvoll, in der verschiedene Sondentypen an neuem FFPE-Gewebematerial untersucht werden, um festzustellen, ob die unterschiedlichen Ansatzpunkte der Sonden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können, wie die vorliegende Untersuchung nahelegt.

Idealerweise würde diese Folgeuntersuchung sowohl an Vollschnitten als auch an TMAs der gleichen Gewebeproben durchgeführt, um auch einem möglichen Einfluss durch diese Aufbereitungsform systematisch auf den Grund zu gehen.

In den vergangenen Jahren und Jahrzehnten konnte zunehmend Einblick in die biologischen Faktoren, die zur Pathogenese der FL beitragen, gewonnen

werden. Aufgrund der Vielschichtigkeit im Zusammenwirken der unterschiedlichen Faktoren sprechen Milpied et al. in ihrer Analyse von einem „(epi)genomischen Landschaftsbild von FL-Zellen“, in dem auch das Tumormikroumfeld eine bedeutsame Rolle spielt (Milpied et al. 2021). Angesichts der biologischen Komplexität und Heterogenität des FL wird eine kombinierte Anwendung verschiedener diagnostischer Verfahren zunehmend unverzichtbar, um ein möglichst umfassendes Bild der Erkrankung zu erhalten und damit auch zu individuell bestmöglichen Antworten in der Behandlung der Betroffenen zu kommen.

Für die klinische Praxis wäre es beispielsweise hilfreich, Erkrankungsfälle anhand prognostischer Kriterien, Schlüsselmutationen und Biomarkern, insbesondere solcher, die auf ein erhöhtes Transformationsrisiko hinweisen, besser bewerten zu können. In künftigen Therapieansätzen sollten dabei nicht nur genetische Veränderungen, sondern auch epigenetische Mechanismen berücksichtigt werden (Enemark et al. 2024, Perrett, Edmondson, and Okosun 2022, Burkhard et al. 2015).

Vor dem Hintergrund dieser multiplen Einflussfaktoren erscheint es zunehmend plausibel, dass sich die Pathogenese des follikulären Lymphoms nicht als statisches Modell abbildet, sondern vielmehr als dynamischer Prozess, der durch genetische, epigenetische, immunologische und möglicherweise auch umweltbedingte Einflüsse kontinuierlich beeinflusst wird. Es ist vorstellbar, dass sich unter bestimmten Bedingungen neue molekulare Konstellationen herausbilden, die bislang nicht als eigenständige Subtypen beschrieben wurden. In diesem Zusammenhang könnten neue Aspekte der Krankheitsentstehung schrittweise aufgedeckt werden, beispielsweise durch Veränderungen in der Interaktion zwischen Tumorzellen und der Mikroumgebung oder durch das Auftreten bislang unbeachteter Mutationsmuster. Eine fortlaufende molekulare und epidemiologische Charakterisierung erscheint daher entscheidend, um die biologische Vielfalt des FL besser zu verstehen und zukünftig gezielter adressieren zu können.

5 Zusammenfassung

Das folliculäre Lymphom (FL) ist das zweithäufigste Non-Hodgkin-Lymphom. In etwa 80% der Fälle liegt die charakteristische Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ vor, die zu einer Verlagerung des *BCL2*-Gens und zur Überexpression des anti-apoptischen Proteins BCL2 führt, und so eine wichtige Rolle in der Pathogenese darstellt (Tsujimoto et al. 1984, Godon et al. 2003, Zhu et al. 2019).

Das Vorhandensein dieser Translokation ist nicht nur diagnostisch bedeutsam, sondern könnte zukünftig auch für die Therapieplanung des FL an Relevanz gewinnen. Die immunhistochemische Untersuchung der BCL2-Expression gehört daher zur Standarddiagnostik des FL (Nann et al. 2020, Vaandrager et al. 2000). Jedoch zeigen neuere Studien, dass auch $t(14;18)$ -negative FL in hohem Anteil BCL2-positiv sein können, teils bis zu 86%, was die diagnostische Aussagekraft der BCL2-Immunhistochemie bezüglich ihrer Vorhersage einer $t(14;18)$ -Translokation infrage stellt (Leich et al. 2016).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die diagnostische Aussagekraft der immunhistochemisch nachgewiesenen BCL2-Expression im Hinblick auf das tatsächliche Vorliegen einer $t(14;18)$ -Translokation zu evaluieren. Untersucht wurden 69 FL-Fälle aus dem Blockarchiv eines Referenzzentrums für Hämatopathologie, die allesamt immunhistochemisch BCL2-positiv waren. Das Kollektiv bestand überwiegend aus niedriggradigen FL (87%) und zeigte sich in Bezug auf Geschlechterverteilung und Patientenalter sehr ausgeglichen.

Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde das Vorhandensein einer *BCL2*-Translokation bzw. einer *IGH/BCL2*-Fusion analysiert. Darüber hinaus wurden alle Fälle auch auf das Vorliegen einer *BCL6*-Translokation untersucht. Die Bestimmungen erfolgten an Tissue Microarrays, wobei insgesamt fünf verschiedene FISH-Sonden zum Einsatz kamen. Die Gesamt-Nachweisrate der *BCL2*-Translokation lag bei 66,7% und damit leicht unter den Erwartungen. Eine *BCL6*-Translokation wurde in 16% der Fälle festgestellt, in 13% lagen beide Translokationen vor. Auffällig war, dass sowohl mit der häufig verwendeten Vysis-*BCL2*-Break-Apart-Sonde als auch mit der *IGH/BCL2*-Fusionssonde die Nachweisrate (25% bzw. 17%) deutlich niedriger ausfielen als erwartet. Die

beiden alternativen BA-Sonden anderer Hersteller erzielten hingegen bei identischem Probenmaterial konsistente Nachweise in 43 von 69 Fällen. Die Resultate konnten stichprobenartig an Vollschnitten validiert werden.

Diese Ergebnisse werden Fragen zur Sensitivität bestimmter FISH-Sonden sowie zum Einfluss präanalytischer Faktoren wie Gewebealter und TMA-Format auf. Eine gezielte Folgestudie unter kontrollierten Bedingungen, beispielsweise unter Verwendung frischen Materials sowie direktem Vergleich von TMA und Vollschnitt, erscheint zur weiteren Klärung dieser Aspekte sinnvoll.

Die generelle Annahme, dass ein Großteil der BCL2-positiven FL auch die charakteristische t(14;18)-Translokation aufweist, konnte somit erst durch den Einsatz alternativer *BCL2*-BA-Sonden bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen einmal mehr die ausgeprägte biologische Vielfalt und molekulare Heterogenität des FL. Sie zeigen, dass für eine differenzierte Diagnostik und eine individuell angepasst Therapie der kombinierte Einsatz verschiedener diagnostischer Verfahren unverzichtbar ist, um den Krankheitsverlauf umfassend beurteilen und therapeutische Entscheidungen gezielt treffen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Bücher:

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Pileri SA, Jaffe ES, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017; 266.

Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 7th ed. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2014.

Artikel:

Adam, P., Baumann, R., Schmidt, J., Bettio, S., Weisel, K., Bonzheim, I., Fend, F., and Quintanilla-Martínez, L. (2013) 'The BCL2 E17 and SP66 Antibodies Discriminate 2 Immunophenotypically and Genetically Distinct Subgroups of Conventionally BCL2-“Negative” Grade 1/2 Follicular Lymphomas'. *Human*

Al-Tourah, A.J., Gill, K.K., Chhanabhai, M., Hoskins, P.J., Klasa, R.J., Savage, K.J., Sehn, L.H., Shenkier, T.N., Gascoyne, R.D., and Connors, J.M. (2008) 'Population-Based Analysis of Incidence and Outcome of Transformed Non-Hodgkin's Lymphoma'. *Journal of Clinical Oncology* [online] 26 (32), 5165–5169. available from <<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2008.16.0283>> [1 June 2024]

Araf, S., Wang, J., Korfi, K., Pangault, C., Kotsiou, E., Rio-Machin, A., Rahim, T., Heward, J., Clear, A., Iqbal, S., Davies, J.K., Johnson, P., Calaminici, M., Montoto, S., Auer, R., Chelala, C., Gribben, J.G., Graham, T.A., Fest, T., Fitzgibbon, J., and Okosun, J. (2018) 'Genomic Profiling Reveals Spatial Intra-Tumor Heterogeneity in Follicular Lymphoma'. *Leukemia* 32 (5), 1261–1265

Ardeshtna, K.M., Qian, W., Smith, P., Braganca, N., Lowry, L., Patrick, P., Warden, J., Stevens, L., Pocock, C.F.E., Miall, F., Cunningham, D., Davies, J., Jack, A., Stephens, R., Walewski, J., Ferhanoglu, B., Bradstock, K., and Linch, D.C. (2014) 'Rituximab versus a Watch-and-Wait Approach in Patients with Advanced-Stage, Asymptomatic, Non-Bulky Follicular Lymphoma: An Open-Label Randomised Phase 3 Trial'. *The Lancet Oncology* 15 (4), 424–435

Belaud-Rotureau, M.-A., Parrens, M., Carrere, N., Turmo, M., Ferrer, J., De Mascarel, A., Dubus, P., and Merlio, J.-P. (2007) 'Interphase Fluorescence in Situ Hybridization Is More Sensitive than BIOMED-2 Polymerase Chain Reaction Protocol in Detecting IGH-BCL2 Rearrangement in Both Fixed and Frozen Lymph Node with Follicular Lymphoma'. *Human Pathology* 38 (2), 365–372

- Bende, R.J., Van Maldegem, F., Triesscheijn, M., Wormhoudt, T.A.M., Guijt, R., and Van Noesel, C.J.M. (2007) 'Germinal Centers in Human Lymph Nodes Contain Reactivated Memory B Cells'. *The Journal of Experimental Medicine* 204 (11), 2655–2665
- Béné, M.C., Nebe, T., Bettelheim, P., Buldini, B., Bumbea, H., Kern, W., Lacombe, F., Lemez, P., Marinov, I., Matutes, E., Maynadié, M., Oelschlagel, U., Orfao, A., Schabath, R., Solenthaler, M., Tschurtschenthaler, G., Vladareanu, A.M., Zini, G., Faure, G.C., and Porwit, A. (2011) 'Immunophenotyping of Acute Leukemia and Lymphoproliferative Disorders: A Consensus Proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10'. *Leukemia* 25 (4), 567–574
- Bonzheim, I., Salaverria, I., Haake, A., Gastl, G., Adam, P., Siebert, R., Fend, F., and Quintanilla-Martinez, L. (2011) 'A Unique Case of Follicular Lymphoma Provides Insights to the Clonal Evolution from Follicular Lymphoma in Situ to Manifest Follicular Lymphoma'. *Blood* 118 (12), 3442–3444
- Bosch-Schips, J., Parisi, X., Climent, F., and Vega, F. (2024) 'Bridging Clinicopathologic Features and Genetics in Follicular Lymphoma: Towards Enhanced Diagnostic Accuracy and Subtype Differentiation'. *Human Pathology* 105676
- Brice, P., Bastion, Y., Lepage, E., Brousse, N., Haïoun, C., Moreau, P., Straetmans, N., Tilly, H., Tabah, I., and Solal-Céligny, P. (1997) 'Comparison in Low-Tumor-Burden Follicular Lymphomas between an Initial No-Treatment Policy, Prednimustine, or Interferon Alfa: A Randomized Study from the Groupe d'Etude Des Lymphomes Folliculaires. Groupe d'Etude Des Lymphomes de l'Adulte.' *Journal of Clinical Oncology* 15 (3), 1110–1117
- Burkhard, R., Bhagat, G., Cogliatti, S.B., Rossi, D., Gaidano, G., Pasqualucci, L., and Novak, U. (2015) '*BCL2* Mutation Spectrum in B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas and Patterns Associated with Evolution of Follicular Lymphoma: *BCL2* Mutations in B-Cell Lymphomas'. *Hematological Oncology* 33 (1), 23–30
- Campo, E., Jaffe, E.S., Cook, J.R., Quintanilla-Martinez, L., Swerdlow, S.H., Anderson, K.C., Brousset, P., Cerroni, L., De Leval, L., Dirnhofer, S., Dogan, A., Feldman, A.L., Fend, F., Friedberg, J.W., Gaulard, P., Ghia, P., Horwitz, S.M., King, R.L., Salles, G., San-Miguel, J., Seymour, J.F., Treon, S.P., Vose, J.M., Zucca, E., Advani, R., Ansell, S., Au, W.-Y., Barrionuevo, C., Bergsagel, L., Chan, W.C., Cohen, J.I., d'Amore, F., Davies, A., Falini, B., Ghobrial, I.M., Goodlad, J.R., Gribben, J.G., Hsi, E.D., Kahl, B.S., Kim, W.-S., Kumar, S., LaCasce, A.S., Laurent, C., Lenz, G., Leonard, J.P., Link, M.P., Lopez-Guillermo, A., Mateos, M.V., Macintyre, E., Melnick, A.M., Morschhauser, F., Nakamura, S., Narbaitz, M., Pavlovsky, A., Pileri, S.A., Piris, M., Pro, B., Rajkumar, V., Rosen, S.T., Sander, B., Sehn, L.,

- Shipp, M.A., Smith, S.M., Staudt, L.M., Thieblemont, C., Tousseyn, T., Wilson, W.H., Yoshino, T., Zinzani, P.-L., Dreyling, M., Scott, D.W., Winter, J.N., and Zelenetz, A.D. (2022) 'The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: A Report from the Clinical Advisory Committee'. *Blood* 140 (11), 1229–1253
- Cardenas, M.G., Yu, W., Beguelin, W., Teater, M.R., Geng, H., Goldstein, R.L., Oswald, E., Hatzi, K., Yang, S.-N., Cohen, J., Shaknovich, R., Vanommeslaeghe, K., Cheng, H., Liang, D., Cho, H.J., Abbott, J., Tam, W., Du, W., Leonard, J.P., Elemento, O., Cerchietti, L., Cierpicki, T., Xue, F., MacKerell, A.D., and Melnick, A.M. (2016) 'Rationally Designed BCL6 Inhibitors Target Activated B Cell Diffuse Large B Cell Lymphoma'. *Journal of Clinical Investigation* 126 (9), 3351–3362
- Cassidy, D.P., Chapman, J.R., Lopez, R., White, K., Fan, Y.-S., Casas, C., Severson, E.A., and Vega, F. (2020) 'Comparison Between Integrated Genomic DNA/RNA Profiling and Fluorescence In Situ Hybridization in the Detection of MYC, BCL-2, and BCL-6 Gene Rearrangements in Large B-Cell Lymphomas'. *American Journal of Clinical Pathology* 153 (3), 353–359
- Casulo, C. and Barr, P.M. (2019) 'How I Treat Early-Relapsing Follicular Lymphoma'. *Blood* 133 (14), 1540–1547
- Casulo, C., Burack, W.R., and Friedberg, J.W. (2015) 'Transformed Follicular Non-Hodgkin Lymphoma'. *Blood* 125 (1), 40–47
- Casulo, C., Byrtek, M., Dawson, K.L., Zhou, X., Farber, C.M., Flowers, C.R., Hainsworth, J.D., Maurer, M.J., Cerhan, J.R., Link, B.K., Zelenetz, A.D., and Friedberg, J.W. (2015) 'Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study'. *Journal of Clinical Oncology* 33 (23), 2516–2522
- Cerhan, J.R. (2020) 'Epidemiology of Follicular Lymphoma'. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 34 (4), 631–646
- Chau, I., Jones, R., Cunningham, D., Wotherspoon, A., Maisey, N., Norman, A.R., Jain, P., Bishop, L., Horwich, A., and Catovsky, D. (2003) 'Outcome of Follicular Lymphoma Grade 3: Is Anthracycline Necessary as Front-Line Therapy?' *British Journal of Cancer* 89 (1), 36–42
- Chaudhary, S., Brown, N., Song, J.Y., Yang, L., Skrabek, P., Nasr, M.R., Wong, J.T., Bedell, V., Murata-Collins, J., Kochan, L., Li, J., Zhang, W., Chan, W.C., Weisenburger, D.D., and Perry, A.M. (2021) 'Relative Frequency and Clinicopathologic Characteristics of MYC-Rearranged Follicular Lymphoma'. *Human Pathology* 114, 19–27

- Cheson, B.D., Ansell, S., Schwartz, L., Gordon, L.I., Advani, R., Jacene, H.A., Hoos, A., Barrington, S.F., and Armand, P. (2016) 'Refinement of the Lugano Classification Lymphoma Response Criteria in the Era of Immunomodulatory Therapy'. *Blood* 128 (21), 2489–2496
- Chihara, D., Ito, H., Matsuda, T., Shibata, A., Katsumi, A., Nakamura, S., Tomotaka, S., Morton, L.M., Weisenburger, D.D., and Matsuo, K. (2014) 'Differences in Incidence and Trends of Haematological Malignancies in Japan and the United States'. *British Journal of Haematology* 164 (4), 536–545
- Cong, P., Raffeld, M., Teruya-Feldstein, J., Sorbara, L., Pittaluga, S., and Jaffe, E.S. (2002) 'In Situ Localization of Follicular Lymphoma: Description and Analysis by Laser Capture Microdissection'. *Blood* 99 (9), 3376–3382
- Cree, I.A., Tan, P.H., Travis, W.D., Wesseling, P., Yagi, Y., White, V.A., Lokuhetty, D., and Scolyer, R.A. (2021) 'Counting Mitoses: Significant Matters!' *Modern Pathology* 34 (9), 1651–1657
- Davids, M.S., Roberts, A.W., Seymour, J.F., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Wierda, W.G., Puvvada, S., Kipps, T.J., Anderson, M.A., Salem, A.H., Dunbar, M., Zhu, M., Peale, F., Ross, J.A., Gressick, L., Desai, M., Kim, S.Y., Verdugo, M., Humerickhouse, R.A., Gordon, G.B., and Gerecitano, J.F. (2017) 'Phase I First-in-Human Study of Venetoclax in Patients With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma'. *Journal of Clinical Oncology* 35 (8), 826–833
- Devan, J., Janikova, A., and Mraz, M. (2018) 'New Concepts in Follicular Lymphoma Biology: From BCL2 to Epigenetic Regulators and Non-Coding RNAs'. *Seminars in Oncology* 45 (5–6), 291–302
- Díaz-Alderete, A., Doval, A., Camacho, F., Verde, L., Sabin, P., Arranz-Sáez, R., Bellas, C., Corbacho, C., Gil, J., Perez-Martín, M., Ruiz-Marcellán, M., Gonzalez, L., Montalbán, C., Piris, M., and Menarguez, J. (2008) 'Frequency of BCL2 and BCL6 Translocations in Follicular Lymphoma: Relation with Histological and Clinical Features'. *Leukemia & Lymphoma* 49 (1), 95–101
- Enemark, M.H., Hemmingsen, J.K., Jensen, M.L., Kridel, R., and Ludvigsen, M. (2024) 'Molecular Biomarkers in Prediction of High-Grade Transformation and Outcome in Patients with Follicular Lymphoma: A Comprehensive Systemic Review'. *International Journal of Molecular Sciences* 25 (20), 11179
- Falini, B. and Mason, D.Y. (2002) 'Proteins Encoded by Genes Involved in Chromosomal Alterations in Lymphoma and Leukemia: Clinical Value of Their Detection by Immunocytochemistry'. *Blood* 99 (2), 409–426

- Freedman, A. and Jacobsen, E. (2020) 'Follicular Lymphoma: 2020 Update on Diagnosis and Management'. *American Journal of Hematology* 95 (3), 316–327
- Gagyi, E., Balogh, Z., Bodor, C., Timar, B., Reiniger, L., Deak, L., Csomor, J., Csernus, B., Szepesi, A., and Matolcsy, A. (2008) 'Somatic Hypermutation of IGVH Genes and Aberrant Somatic Hypermutation in Follicular Lymphoma without BCL-2 Gene Rearrangement and Expression'. *Haematologica* 93 (12), 1822–1828
- Geiersbach, K., Rector, L.S., Sederberg, M., Hooker, A., Randall, R.L., Schiffman, J.D., and South, S.T. (2011) 'Unknown Partner for USP6 and Unusual SS18 Rearrangement Detected by Fluorescence in Situ Hybridization in a Solid Aneurysmal Bone Cyst'. *Cancer Genetics* 204 (4), 195–202
- Godon, A., Moreau, A., Talmant, P., Baranger-Papot, L., Geneviève, F., Milpied, N., Zandecki, M., and Avet-Loiseau, H. (2003) 'Is t(14;18)(Q32;Q21) a Constant Finding in Follicular Lymphoma? An Interphase FISH Study on 63 Patients'. *Leukemia* 17 (1), 255–259
- Gollub, W., Stassek, B., Huckhagel, T., Bernd, H.-W., Krokowski, M., Merz, H., Feller, A.C., and Thorns, C. (2009) 'BCL6-Translocations Affect the Phenotype of Follicular Lymphomas Only in the Absence of t(14;18)IgH/BCL2'. *ANTICANCER RESEARCH*
- Gribben, J.G. (2015) 'XV. Clinical Aspects of Transformed Lymphoma'. *Hematological Oncology* 33 (S1), 80–83
- Gu, K., Fu, K., Jain, S., Liu, Z., Iqbal, J., Li, M., Sanger, W.G., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Aoun, P., Dave, B.J., and Chan, W.C. (2009) 'T(14;18)-Negative Follicular Lymphomas Are Associated with a High Frequency of BCL6 Rearrangement at the Alternative Breakpoint Region'. *Modern Pathology* 22 (9), 1251–1257
- Hans, C.P. (2004) 'Confirmation of the Molecular Classification of Diffuse Large B-Cell Lymphoma by Immunohistochemistry Using a Tissue Microarray'. *Blood* 103 (1), 275–282
- Hatzi, K. and Melnick, A. (2014) 'Breaking Bad in the Germinal Center: How Deregulation of BCL6 Contributes to Lymphomagenesis'. *Trends in Molecular Medicine* 20 (6), 343–352
- Horn, H., Kohler, C., Witzig, R., Kreuz, M., Leich, E., Klapper, W., Hummel, M., Loeffler, M., Trümper, L., Spang, R., Rosenwald, A., Ott, G., and for the Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas (MMML) Network Project (2018) 'Gene Expression Profiling Reveals a Close Relationship between Follicular Lymphoma Grade 3A and 3B, but Distinct Profiles of Follicular Lymphoma Grade 1 and 2'. *Haematologica* 103 (7), 1182–1190

- Horn, H., Schmelter, C., Leich, E., Salaverria, I., Katzenberger, T., Ott, M.M., Kalla, J., Romero, M., Siebert, R., Rosenwald, A., and Ott, G. (2011) 'Follicular Lymphoma Grade 3B Is a Distinct Neoplasm According to Cytogenetic and Immunohistochemical Profiles'. *Haematologica* 96 (9), 1327–1334
- Horsman, D.E., Okamoto, I., Ludkovski, O., Le, N., Harder, L., Gesk, S., Siebert, R., Chhanabhai, M., Sehn, L., Connors, J.M., and Gascoyne, R.D. (2003) 'Follicular Lymphoma Lacking the t(14;18)(Q32;Q21): Identification of Two Disease Subtypes'. *British Journal of Haematology* 120 (3), 424–433
- Ikoma, H., Miyaoka, M., Hiraiwa, S., Yukie Kikuti, Y., Shiraiwa, S., Hara, R., Kojima, M., Ohmachi, K., Ando, K., Carreras, J., and Nakamura, N. (2022) 'Clinicopathological Analysis of Follicular Lymphoma with BCL2, BCL6, and MYC Rearrangements'. *Pathology International* 72 (6), 321–331
- Jacobsen, E. (2022) 'Follicular Lymphoma: 2023 Update on Diagnosis and Management'. *American Journal of Hematology* 97 (12), 1638–1651
- Jazirehi, A.R. and Bonavida, B. (2005) 'Cellular and Molecular Signal Transduction Pathways Modulated by Rituximab (Rituxan, Anti-CD20 mAb) in Non-Hodgkin's Lymphoma: Implications in Chemosensitization and Therapeutic Intervention'. *Oncogene* 24 (13), 2121–2143
- Kachuri, L., Beane Freeman, L.E., Spinelli, J.J., Blair, A., Pahwa, M., Koutros, S., Hoar Zahm, S., Cantor, K.P., Weisenburger, D.D., Pahwa, P., Dosman, J.A., McLaughlin, J.R., Demers, P.A., and Harris, S.A. (2020) 'Insecticide Use and Risk of non-Hodgkin Lymphoma Subtypes: A Subset Meta-analysis of the North American Pooled Project'. *International Journal of Cancer* 147 (12), 3370–3383
- Kim, M., Hwang, H.S., Son, E.M., Cho, H., Yoon, D.H., Suh, C., Park, C.S., Go, H., and Huh, J. (2020) 'Clinicopathological and Prognostic Significance of BCL2, BCL6, MYC, and IRF4 Copy Number Gains and Translocations in Follicular Lymphoma: A Study by FISH Analysis'. *Leukemia & Lymphoma* 61 (14), 3342–3350
- Koch, K., Hoster, E., Ziepert, M., Unterhalt, M., Ott, G., Rosenwald, A., Hansmann, M.L., Bernd, W., Stein, H., Pöschel, V., Dreyling, M., Trümper, L., Löffler, M., Schmitz, N., Hiddemann, W., Pfreundschuh, M., and Klapper, W. (2016) 'Clinical, Pathological and Genetic Features of Follicular Lymphoma Grade 3A: A Joint Analysis of the German Low-Grade and High-Grade Lymphoma Study Groups GLSG and DSHNHL'. *Annals of Oncology* 27 (7), 1323–1329
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallionimeni, A., Bärlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G., and Kallionimeni, O.-P. (1998) 'Tissue Microarrays for High-Throughput Molecular Profiling of Tumor Specimens'. *Nature Medicine* 4 (7), 844–847

- Korenberg MJ, Farinha P, Gascoyne RD. Predicting survival in follicular lymphoma using tissue microarrays. *Methods Mol Biol.* 2007;377:255-68. doi: 10.1007/978-1-59745-390-5_16. PMID: 17634622.
- Kridel, R., Chan, F.C., Mottok, A., Boyle, M., Farinha, P., Tan, K., Meissner, B., Bashashati, A., McPherson, A., Roth, A., Shumansky, K., Yap, D., Ben-Neriah, S., Rosner, J., Smith, M.A., Nielsen, C., Giné, E., Telenius, A., Ennishi, D., Mungall, A., Moore, R., Morin, R.D., Johnson, N.A., Sehn, L.H., Tousseyn, T., Dogan, A., Connors, J.M., Scott, D.W., Steidl, C., Marra, M.A., Gascoyne, R.D., and Shah, S.P. (2016) 'Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study'. *PLOS Medicine* 13 (12), e1002197
- Kridel, R., Sehn, L.H., and Gascoyne, R.D. (2012) 'Pathogenesis of Follicular Lymphoma'. *Journal of Clinical Investigation* 122 (10), 3424–3431
- Kroft, S.H. (2019) 'Stratification of Follicular Lymphoma: Time for a Paradigm Shift?' *American Journal of Clinical Pathology* 151 (6), 539–541
- Kukreti, V., Petersen, P., Pintilie, M., Tsang, R., Crump, M., and Gospodarowicz, M. (2004) 'Extranodal Follicular Lymphoma - a Retrospective Review and Comparison with Localized Nodal Follicular Lymphoma.' *Blood* 104 (11), 1375–1375
- Kumar, E., Pickard, L., and Okosun, J. (2021) 'Pathogenesis of Follicular Lymphoma: Genetics to the Microenvironment to Clinical Translation'. *British Journal of Haematology* 194 (5), 810–821
- Künstner, A., Witte, H.M., Riedl, J., Bernard, V., Stölting, S., Merz, H., Olschewski, V., Peter, W., Ketzer, J., Busch, Y., Trojok, P., Bubnoff, N.V., Busch, H., Feller, A.C., and Gebauer, N. (2021) 'Mutational Landscape of High-Grade B-Cell Lymphoma with *MYC*-, *BCL2* and/or *BCL6* Rearrangements Characterized by Whole-Exome Sequencing'. *Haematologica* 107 (8), 1850–1863
- Küppers, R. and Stevenson, F.K. (2018) 'Critical Influences on the Pathogenesis of Follicular Lymphoma'. *Blood* 131 (21), 2297–2306
- Laurent, C., Adélaïde, J., Guille, A., Tesson, B., Gat, E., Evrard, S., Escudié, F., Syrykh, C., Canioni, D., Fabiani, B., Meignin, V., Chassagne-Clement, C., Dartigues, P., Traverse-Glehen, A., Parrens, M., Huet, S., Copie-Bergman, C., Salles, G., Birnbaum, D., Brousset, P., Morschhauser, F., and Xerri, L. (2021) 'High-Grade Follicular Lymphomas Exhibit Clinicopathologic, Cytogenetic, and Molecular Diversity Extending Beyond Grades 3A and 3B'. *American Journal of Surgical Pathology* 45 (10), 1324–1336
- Laurent, C., Cook, J.R., Yoshino, T., Quintanilla-Martinez, L., and Jaffe, E.S. (2023) 'Follicular Lymphoma and Marginal Zone Lymphoma: How Many

Diseases?' *Virchows Archiv* [online] 482 (1), 149–162. available from <<https://link.springer.com/10.1007/s00428-022-03432-2>> [20 June 2024]

- Le, M., Ghazawi, F.M., Alakel, A., Netchiporouk, E., Rahme, E., Zubarev, A., Powell, M., Moreau, L., Roshdy, O., Glassman, S.J., Sasseville, D., Popradi, G., and Litvinov, I.V. (2019) 'Incidence and Mortality Trends and Geographic Patterns of Follicular Lymphoma in Canada'. *Current Oncology* 26 (4), 473–481
- Leich, E., Hoster, E., Wartenberg, M., Unterhalt, M., Siebert, R., Koch, K., Klapper, W., Engelhard, M., Puppe, B., Horn, H., Staiger, A.M., Stuhlmann-Laeisz, C., Bernd, H.W., Feller, A.C., Hummel, M., Lenze, D., Stein, H., Hartmann, S., Hansmann, M.L., Möller, P., Hiddemann, W., Dreyling, M., Ott, G., and Rosenwald, A. (2016) 'Similar Clinical Features in Follicular Lymphomas with and without Breaks in the BCL2 Locus'. *Leukemia* 30 (4), 854–860
- Leich, E., Salaverria, I., Bea, S., Zettl, A., Wright, G., Moreno, V., Gascoyne, R.D., Chan, W.-C., Braziel, R.M., Rimsza, L.M., Weisenburger, D.D., Delabie, J., Jaffe, E.S., Lister, A., Fitzgibbon, J., Staudt, L.M., Hartmann, E.M., Mueller-Hermelink, H.-K., Campo, E., Ott, G., and Rosenwald, A. (2009) 'Follicular Lymphomas with and without Translocation t(14;18) Differ in Gene Expression Profiles and Genetic Alterations'. *Blood* 114 (4), 826–834
- Lin, P., Jetly, R., Lennon, P.A., Abruzzo, L.V., Prajapati, S., and Medeiros, L.J. (2008) 'Translocation (18;22)(Q21;Q11) in B-Cell Lymphomas: A Report of 4 Cases and Review of the Literature'. *Human Pathology* 39 (11), 1664–1672
- Linnet, M.S., Vajdic, C.M., Morton, L.M., de Roos, A.J., Skibola, C.F., Boffetta, P., Cerhan, J.R., Flowers, C.R., de Sanjose, S., Monnereau, A., Cocco, P., Kelly, J.L., Smith, A.G., Weisenburger, D.D., Clarke, C.A., Blair, A., Bernstein, L., Zheng, T., Miligi, L., Clavel, J., Benavente, Y., and Chiu, B.C.H. (2014) 'Medical History, Lifestyle, Family History, and Occupational Risk Factors for Follicular Lymphoma: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project'. *JNCI Monographs* 2014 (48), 26–40
- Link, B.K., Maurer, M.J., Nowakowski, G.S., Ansell, S.M., Macon, W.R., Syrbu, S.I., Slager, S.L., Thompson, C.A., Inwards, D.J., Johnston, P.B., Colgan, J.P., Witzig, T.E., Habermann, T.M., and Cerhan, J.R. (2013) 'Rates and Outcomes of Follicular Lymphoma Transformation in the Immunochemotherapy Era: A Report From the University of Iowa/Mayo Clinic Specialized Program of Research Excellence Molecular Epidemiology Resource'. *Journal of Clinical Oncology* 31 (26), 3272–3278
- Liu, Q., Salaverria, I., Pittaluga, S., Jegalian, A.G., Xi, L., Siebert, R., Raffeld, M., Hewitt, S.M., and Jaffe, E.S. (2013) 'Follicular Lymphomas in Children and

Young Adults: A Comparison of the Pediatric Variant With Usual Follicular Lymphoma'. *American Journal of Surgical Pathology* 37 (3), 333–343

Loeffler, M., Kreuz, M., Haake, A., Hasenclever, D., Trautmann, H., Arnold, C., Winter, K., Koch, K., Klapper, W., Scholtysik, R., Rosolowski, M., Hoffmann, S., Ammerpohl, O., Szczepanowski, M., Herrmann, D., Küppers, R., Pott, C., Siebert, R., and on behalf of the HaematoSys-Project (2015) 'Genomic and Epigenomic Co-Evolution in Follicular Lymphomas'. *Leukemia* 29 (2), 456–463

Los-de Vries, G.T., Stevens, W.B.C., Van Dijk, E., Langois-Jacques, C., Clear, A.J., Stathi, P., Roemer, M.G.M., Mendeville, M., Hijmering, N.J., Sander, B., Rosenwald, A., Calaminici, M., Hoster, E., Hiddemann, W., Gaulard, P., Salles, G., Horn, H., Klapper, W., Xerri, L., Burton, C., Tooze, R.M., Smith, A.G., Buske, C., Scott, D.W., Natkunam, Y., Advani, R., Sehn, L.H., Raemaekers, J., Gribben, J., Kimby, E., Kersten, M.J., Maucort-Boulch, D., Ylstra, B., and De Jong, D. (2022) 'Genomic and Microenvironmental Landscape of Stage I Follicular Lymphoma, Compared with Stage III/IV'. *Blood Advances* 6 (18), 5482–5493

Lossos, I.S. and Gascoyne, R.D. (2011) 'Transformation of Follicular Lymphoma'. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 24 (2), 147–163

Maeshima, A.M., Taniguchi, H., Furukawa, H., Hattori, D., Sasaki, H., Makita, S., Iwaki, N., Fukuhara, S., Munakata, W., and Izutsu, K. (2023) 'Diagnostic Clues of BCL2-Negative, Faint, or Controversial Follicular Lymphomas: A Study of 103 Cases'. *Human Pathology* 135, 84–92

Magnoli, F., Marchiori, D., Facchi, S., Martin, V., Campiotti, L., Merli, M., Sessa, F., Tibiletti, M.G., and Uccella, S. (2023) 'High Frequency of BCL2 Gene Rearrangement-Negative Follicular Lymphoma in Northwestern Italy'. *Cancer Genetics* 274–275, 1–9

Marafioti, T., Copie-Bergman, C., Calaminici, M., Paterson, J.C., Shende, V.H., Liu, H., Baia, M., Ramsay, A.D., Agostinelli, C., Brière, J., Clear, A., Du, M., Piccaluga, P.P., Masir, N., Nacheva, E.P., Sujobert, P., Shanmugam, K., Grogan, T.M., Brooks, S.P., Khwaja, A., Ardesna, K., Townsend, W., Pileri, S.A., Haioun, C., Linch, D., Gribben, J.G., Gaulard, P., and Isaacson, P.G. (2013) 'Another Look at Follicular Lymphoma: Immunophenotypic and Molecular Analyses Identify Distinct Follicular Lymphoma Subgroups'. *Histopathology* 62 (6), 860–875

Marino, F.Z., Aquino, G., Brunelli, M., Scognamiglio, G., Pedron, S., Ronchi, A., Cozzolino, I., Sparano, L., Botti, G., Panico, L., De Chiara, A., Franco, R., and on behalf of the Gruppo Ematopatologia Campano (2021) 'High Performance of Multiplex Fluorescence in Situ Hybridization to Simultaneous Detection of BCL2 and BCL6 Rearrangements: Useful Application in the Characterization of DLBCLs'. *Virchows Archiv* 479 (3), 565–573

- Masir, N., Campbell, L.J., Goff, L.K., Jones, M., Marafioti, T., Cordell, J., Clear, A.J., Lister, T.A., Mason, D.Y., and Lee, A.M. (2009) 'BCL2 Protein Expression in Follicular Lymphomas with t(14;18) Chromosomal Translocations'. *British Journal of Haematology* 144 (5), 716–725
- Masir, N., Campbell, L.J., Jones, M., and Mason, D.Y. (2010) 'Pseudonegative BCL2 Protein Expression in a t(14;18) Translocation Positive Lymphoma Cell Line: A Need for an Alternative BCL2 Antibody'. *Pathology* 42 (3), 212–216
- Meloni, F., Satta, G., Padoan, M., Montagna, A., Pilia, I., Argiolas, A., Piro, S., Magnani, C., Gambelunghe, A., Muzi, G., Ferri, G.M., Vimercati, L., Zanotti, R., Scarpa, A., Zucca, M., De Matteis, S., Campagna, M., Miligi, L., and Cocco, P. (2021) 'Occupational Exposure to Glyphosate and Risk of Lymphoma: Results of an Italian Multicenter Case-Control Study'. *Environmental Health* 20 (1), 49
- Menke, J.R., Aypar, U., Bangs, C.D., Cook, S.L., Gupta, S., Hasserjian, R.P., Kong, C.S., Lin, O., Long, S.R., Ly, A., Menke, J.A.S., Natkunam, Y., Ruiz-Cordero, R., Spiteri, E., Ye, J., Zadeh, S.L., and Gratzinger, D.A. (2024) 'Performance of MYC, BCL2, and BCL6 Break-Apart FISH in Small Biopsies with Large B-Cell Lymphoma: A Retrospective Cytopathology Hematopathology Interinstitutional Consortium Study'. *Frontiers in Oncology* 14, 1408238
- Menter, T. and Quintanilla-Martinez, L. (2023) 'CD23-positive, BCL2-Rearrangement-negative Keimzentrumslymphome'. *Die Pathologie* 44 (S3), 160–163
- Metter, G.E., Nathwani, B.N., Burke, J.S., Winberg, C.D., Mann, R.B., Barcos, M., Kjeldsberg, C.R., Whitcomb, C.C., Dixon, D.O., and Miller, T.P. (1985) 'Morphological Subclassification of Follicular Lymphoma: Variability of Diagnoses among Hematopathologists, a Collaborative Study between the Repository Center and Pathology Panel for Lymphoma Clinical Studies.' *Journal of Clinical Oncology* 3 (1), 25–38
- Miao, Y., Hu, S., Lu, X., Li, S., Wang, W., Medeiros, L.J., and Lin, P. (2016) 'Double-Hit Follicular Lymphoma with MYC and BCL2 Translocations: A Study of 7 Cases with a Review of Literature'. *Human Pathology* 58, 72–77
- Milpied, P., Gandhi, A.K., Cartron, G., Pasqualucci, L., Tarte, K., Nadel, B., and Roulland, S. (2021) 'Follicular Lymphoma Dynamics'. in *Advances in Immunology* [online] vol. 150. Elsevier, 43–103. available from <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006527762100016X>> [14 June 2024]
- Miyaoka, M., Kikuti, Y.Y., Carreras, J., Ikoma, H., Hiraiwa, S., Ichiki, A., Kojima, M., Ando, K., Yokose, T., Sakai, R., Hoshikawa, M., Tomita, N., Miura, I.,

- Takata, K., Yoshino, T., Takizawa, J., Bea, S., Campo, E., and Nakamura, N. (2018) 'Clinicopathological and Genomic Analysis of Double-Hit Follicular Lymphoma: Comparison with High-Grade B-Cell Lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 Rearrangements'. *Modern Pathology* 31 (2), 313–326
- Morschhauser, F., Nastoupil, L., Feugier, P., Schiano De Colella, J.-M., Tilly, H., Palomba, M.L., Bachy, E., Fruchart, C., Libby, E.N., Casasnovas, R.-O., Flinn, I.W., Haioun, C., Maisonneuve, H., Ysebaert, L., Bartlett, N.L., Bouabdallah, K., Brice, P., Ribrag, V., Le Gouill, S., Daguindau, N., Guidez, S., Pica, G.M., García-Sancho, A.M., López-Guillermo, A., Larouche, J.-F., Ando, K., Gomes Da Silva, M., André, M., Kalung, W., Sehn, L.H., Izutsu, K., Cartron, G., Gkasiamis, A., Crowe, R., Xerri, L., Fowler, N.H., and Salles, G. (2022) 'Six-Year Results From RELEVANCE: Lenalidomide Plus Rituximab (R²) Versus Rituximab-Chemotherapy Followed by Rituximab Maintenance in Untreated Advanced Follicular Lymphoma'. *Journal of Clinical Oncology* 40 (28), 3239–3245
- Morton, L.M., Wang, S.S., Devesa, S.S., Hartge, P., Weisenburger, D.D., and Linet, M.S. (2006) 'Lymphoma Incidence Patterns by WHO Subtype in the United States, 1992-2001'. *Blood* 107 (1), 265–276
- Mozas, P., Nadeu, F., Rivas-Delgado, A., Rivero, A., Garrote, M., Balagué, O., González-Farré, B., Veloza, L., Baumann, T., Giné, E., Delgado, J., Villamor, N., Campo, E., Magnano, L., and López-Guillermo, A. (2020) 'Patterns of Change in Treatment, Response, and Outcome in Patients with Follicular Lymphoma over the Last Four Decades: A Single-Center Experience'. *Blood Cancer Journal* 10 (3), 31
- Muñoz-Mármol, A.M., Sanz, C., Tapia, G., Marginet, R., Ariza, A., and Mate, J.L. (2013) 'MYC Status Determination in Aggressive B-cell Lymphoma: The Impact of FISH Probe Selection'. *Histopathology* 63 (3), 418–424
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000) 'Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme'. *Cell* 102 (5), 553–563
- Nann, D., Ramis-Zaldivar, J.E., Müller, I., Gonzalez-Farre, B., Schmidt, J., Egan, C., Salmeron-Villalobos, J., Clot, G., Mattern, S., Otto, F., Mankel, B., Colomer, D., Balagué, O., Szablewski, V., Lome-Maldonado, C., Leoncini, L., Dojcinov, S., Chott, A., Copie-Bergman, C., Bonzheim, I., Fend, F., Jaffe, E.S., Campo, E., Salaverria, I., and Quintanilla-Martinez, L. (2020a) 'Follicular Lymphoma t(14;18)-Negative Is Genetically a Heterogeneous Disease'. *Blood Advances* 4 (22), 5652–5665
- Nastoupil, L.J., Sinha, R., Byrtek, M., Ziemiecki, R., Zhou, X., Taylor, M., Friedberg, J.W., Link, B.K., Cerhan, J.R., Dawson, K., and Flowers, C.R. (2016) 'Outcomes Following Watchful Waiting for Stage II – IV Follicular

Lymphoma Patients in the Modern Era'. *British Journal of Haematology* 172 (5), 724–734

Nishikori, M. (2024) 'Recent Advances in Understanding the Biology of Follicular Lymphoma'. *International Journal of Hematology* [online] available from <<https://link.springer.com/10.1007/s12185-024-03764-6>> [26 November 2024]

Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M.C. (2010) 'Origin of Chromosomal Translocations in Lymphoid Cancer'. *Cell* 141 (1), 27–38

Okosun, J., Bödör, C., Wang, J., Araf, S., Yang, C.-Y., Pan, C., Boller, S., Cittaro, D., Bozek, M., Iqbal, S., Matthews, J., Wrench, D., Marzec, J., Tawana, K., Popov, N., O'Riain, C., O'Shea, D., Carlotti, E., Davies, A., Lawrie, C.H., Matolcsy, A., Calaminici, M., Norton, A., Byers, R.J., Mein, C., Stupka, E., Lister, T.A., Lenz, G., Montoto, S., Gribben, J.G., Fan, Y., Grosschedl, R., Chelala, C., and Fitzgibbon, J. (2014) 'Integrated Genomic Analysis Identifies Recurrent Mutations and Evolution Patterns Driving the Initiation and Progression of Follicular Lymphoma'. *Nature Genetics* 46 (2), 176–181

Ott, G., Katzenberger, T., Lohr, A., Kindelberger, S., Rüdiger, T., Wilhelm, M., Kalla, J., Rosenwald, A., Müller, J.G., Ott, M.M., and Müller-Hermelink, H.K. (2002) 'Cytomorphologic, Immunohistochemical, and Cytogenetic Profiles of Follicular Lymphoma: 2 Types of Follicular Lymphoma Grade 3'. *Blood* 99 (10), 3806–3812

Pan, Y. and Wang, H. (2012) 'Frequencies of BCL2 and BCL6 Translocations in Representative Chinese Follicular Lymphoma Patients: Morphologic, Immunohistochemical, and FISH Analyses'. *Diagn Mol Pathol* 21 (4)

Pasqualucci, L. and Dalla-Favera, R. (2015) 'The Genetic Landscape of Diffuse Large B-Cell Lymphoma'. *Seminars in Hematology* 52 (2), 67–76

Pasqualucci, L., Khiabanian, H., Fangazio, M., Vasishtha, M., Messina, M., Holmes, A.B., Ouillette, P., Trifonov, V., Rossi, D., Tabbò, F., Ponzoni, M., Chadburn, A., Murty, V.V., Bhagat, G., Gaidano, G., Inghirami, G., Malek, S.N., Rabadan, R., and Dalla-Favera, R. (2014) 'Genetics of Follicular Lymphoma Transformation'. *Cell Reports* 6 (1), 130–140

Pastore, A., Jurinovic, V., Kridel, R., Hoster, E., Staiger, A.M., Szczepanowski, M., Pott, C., Kopp, N., Murakami, M., Horn, H., Leich, E., Moccia, A.A., Mottok, A., Sunkavalli, A., Van Hummelen, P., Ducar, M., Ennishi, D., Shulha, H.P., Hother, C., Connors, J.M., Sehn, L.H., Dreyling, M., Neuberg, D., Möller, P., Feller, A.C., Hansmann, M.L., Stein, H., Rosenwald, A., Ott, G., Klapper, W., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Gascoyne, R.D., Weinstock, D.M., and Weigert, O. (2015) 'Integration of Gene Mutations in Risk Prognostication for Patients Receiving First-Line Immunochemotherapy for Follicular Lymphoma: A Retrospective Analysis

of a Prospective Clinical Trial and Validation in a Population-Based Registry'. *The Lancet Oncology* 16 (9), 1111–1122

Perrett, M., Edmondson, C., and Okosun, J. (2022) 'Biology of Follicular Lymphoma: Insights and Windows of Clinical Opportunity'. *Hematology* 2022 (1), 688–694

Pezzella, F., Ralfkiaer, E., Gatter, K.C., and Mason, D.Y. (1990) 'The 14;18 Translocation in European Cases of Follicular Lymphoma: Comparison of Southern Blotting and the Polymerase Chain Reaction'. *British Journal of Haematology* 76 (1), 58–64

Pham, R., Gooley, T., Keeney, G., Press, O., Pagel, J., Greisman, H., Bensinger, W., Holmberg, L., Petersdorf, S., Maloney, D., and Gopal, A. (n.d.) 'The Impact of Histologic Grade on the Outcome of High-Dose Therapy and Autologous Stem Cell Transplantation for Follicular Lymphoma'. *Bone Marrow Transplantation* 6

Pulte, D., Jansen, L., Gondos, A., Emrich, K., Holleczeck, B., Katalinic, A., Brenner, H., and for the Gekid Cancer Survival Working Group (2013) 'Survival of Patients with Non-Hodgkin Lymphoma in Germany in the Early 21st Century'. *Leukemia & Lymphoma* 54 (5), 979–985

Rimsza, L.M., Li, H., Brazier, R.M., Spier, C.M., Persky, D.O., Dunlap, J., LeBlanc, M., Bartlett, N., Leonard, J.P., Smith, S.M., Press, O.W., and Friedberg, J.W. (2018) 'Impact of Histological Grading on Survival in the SWOG S0016 Follicular Lymphoma Cohort'. *Haematologica* 103 (4), e151–e153

Roulland, S., Faroudi, M., Mamessier, E., Sungalee, S., Salles, G., and Nadel, B. (2011) 'Early Steps of Follicular Lymphoma Pathogenesis'. in *Advances in Immunology* [online] vol. 111. Elsevier, 1–46. available from <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123859914000015>> [9 June 2024]

Roulland, S., Kelly, R.S., Morgado, E., Sungalee, S., Solal-Celigny, P., Colombat, P., Jouve, N., Palli, D., Pala, V., Tumino, R., Panico, S., Sacerdote, C., Quirós, J.R., Gonzáles, C.A., Sánchez, M.-J., Dorronsoro, M., Navarro, C., Barricarte, A., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Canzian, F., Kaaks, R., Boeing, H., Drogan, D., Nieters, A., Clavel-Chapelon, F., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Lagiou, P., Bueno-de-Mesquita, H.B., Peeters, P.H.M., Vermeulen, R., Hallmans, G., Melin, B., Borgquist, S., Carlson, J., Lund, E., Weiderpass, E., Khaw, K.-T., Wareham, N., Key, T.J., Travis, R.C., Ferrari, P., Romieu, I., Riboli, E., Salles, G., Vineis, P., and Nadel, B. (2014) 'T(14;18) Translocation: A Predictive Blood Biomarker for Follicular Lymphoma'. *Journal of Clinical Oncology* 32 (13), 1347–1355

S3-Leitlinie Follikuläres Lymphom (2020) 181

- Salaverria, I., Weigert, O., and Quintanilla-Martinez, L. (2023) 'The Clinical and Molecular Taxonomy of t(14;18)-Negative Follicular Lymphomas'. *Blood Advances* 7 (18), 5258–5271
- Schmidt, C., Fingerle-Rowson, G., Boehme, A., Brendel, K., Fischer, R., Gonnermann, M., Höhler, T., Kegel, T., Kellermann, L., Nusch, A., Pönisch, W., Wendtner, C., and Dreyling, M. (2015) 'Changes in the Diagnosis and Treatment of Patients with Low Grade Lymphoma in Germany: Years 2006–2009'. *Leukemia & Lymphoma* 56 (3), 694–702
- Schmidt, J., Salaverria, I., Haake, A., Bonzheim, I., Adam, P., Montes-Moreno, S., Piris, M.A., Fend, F., Siebert, R., and Quintanilla-Martinez, L. (2014) 'Increasing Genomic and Epigenomic Complexity in the Clonal Evolution from in Situ to Manifest t(14;18)-Positive Follicular Lymphoma'. *Leukemia* 28 (5), 1103–1112
- Schraders, M., De Jong, D., Kluin, P., Groenen, P., and Van Krieken, H. (2005) 'Lack of Bcl-2 Expression in Follicular Lymphoma May Be Caused by Mutations in the *BCL2* Gene or by Absence of the t(14;18) Translocation'. *The Journal of Pathology* 205 (3), 329–335
- Shiels, M.S., Engels, E.A., Linet, M.S., Clarke, C.A., Li, J., Hall, H.I., Hartge, P., and Morton, L.M. (2013) 'The Epidemic of Non-Hodgkin Lymphoma in the United States: Disentangling the Effect of HIV, 1992–2009'. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 22 (6), 1069–1078
- Solal-Celigny, P. (2004) 'Follicular Lymphoma International Prognostic Index'. *Blood* 104 (5), 1258–1265
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., and Jaffe, E.S. (2016) 'The 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid Neoplasms'. *Blood* 127 (20), 2375–2390
- Tellier, J., Menard, C., Roulland, S., Martin, N., Monvoisin, C., Chasson, L., Nadel, B., Gaulard, P., Schiff, C., and Tarte, K. (2014) 'Human t(14;18)Positive Germinal Center B Cells: A New Step in Follicular Lymphoma Pathogenesis?' *Blood* 123 (22), 3462–3465
- Teras, L.R., DeSantis, C.E., Cerhan, J.R., Morton, L.M., Jemal, A., and Flowers, C.R. (2016) '2016 US Lymphoid Malignancy Statistics by World Health Organization Subtypes'. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66 (6), 443–459
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997) 'A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma'. *Blood* 89 (11), 3909–3918

- Trecourt, A., Mauduit, C., Szablewski, V., Fontaine, J., Balme, B., Donzel, M., Laurent, C., Sesques, P., Ghesquières, H., Bachy, E., Salles, G., Emile, J.-F., Chassagne-Clément, C., Genestier, L., Copie-Bergman, C., and Traverse-Glehen, A. (2022) 'Plasticity of Mature B Cells Between Follicular and Classic Hodgkin Lymphomas: A Series of 22 Cases Expanding the Spectrum of Transdifferentiation'. *American Journal of Surgical Pathology* 46 (1), 58–70
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984) 'Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B Cells with the t(14;18) Chromosome Translocation'. *Science* 226 (4678), 1097–1099
- Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. (1985) 'The t(14;18) Chromosome Translocations Involved in B-Cell Neoplasms Result from Mistakes in VDJ Joining'. *Science* 229 (4720), 1390–1393
- Vaandrager, J.-W., Schuurin, E., Philippo, K., and Kluin, P.M. (2000a) 'V(D)J Recombinase-Mediated Transposition of the BCL2 gene to the IGH Locus in Follicular Lymphoma'. *Blood* 96 (5), 1947–1952
- Vaandrager, J.-W., Schuurin, E., Raap, T., Philippo, K., Kleiverda, K., and Kluin, P. (2000b) 'Interphase FISH Detection of BCL2 Rearrangement in Follicular Lymphoma Using Breakpoint-Flanking Probes'. *Genes, Chromosomes and Cancer* 27 (1), 85–94
- Vogelsberg, A., Steinhilber, J., Mankel, B., Federmann, B., Schmidt, J., Montes-Mojarro, I.A., Hüttl, K., Rodriguez-Pinilla, M., Baskaran, P., Nahsen, S., Piris, M.A., Ott, G., Quintanilla-Martinez, L., Bonzheim, I., and Fend, F. (2021) 'Die genetische Evolution der in situ follikulären Neoplasie zum t(14;18)-positiven aggressiven B-Zell-Lymphom'. *Der Pathologe* 42 (S2), 122–128
- Wahlin, B.E., Yri, O.E., Kimby, E., Holte, H., Delabie, J., Smeland, E.B., Sundström, C., Christensson, B., and Sander, B. (2012) 'Clinical Significance of the WHO Grades of Follicular Lymphoma in a Population-Based Cohort of 505 Patients with Long Follow-up Times: Clinical Significance of Grading Follicular Lymphoma'. *British Journal of Haematology* 156 (2), 225–233
- Weinberg, O.K., Ai, W.Z., Mariappan, M.R., Shum, C., Levy, R., and Arber, D.A. (2007) '"Minor" BCL2 Breakpoints in Follicular Lymphoma'. *The Journal of Molecular Diagnostics* 9 (4), 530–537
- Xerri, L., Dirnhofer, S., Quintanilla-Martinez, L., Sander, B., Chan, J.K.C., Campo, E., Swerdlow, S.H., and Ott, G. (2016) 'The Heterogeneity of Follicular Lymphomas: From Early Development to Transformation'. *Virchows Archiv* 468 (2), 127–139

- Xu, T., Zheng, Z., and Zhao, W. (2023) 'Advances in the Multi-Omics Landscape of Follicular Lymphoma'. *International Journal of Biological Sciences* 19 (6), 1955–1967
- Yajid, A.I., Mohd Nafi, S.N., Salehan, N.A., and Tuan Sharif, S.E. (2020) 'Exploring Two Protocols of FISH Using Cytocell SYT-SSX Probe on Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissue Sections'. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 21 (5), 1241–1245
- Zamò, A., Pischmarov, J., Schlesner, M., Rosenstiel, P., Bomben, R., Horn, H., Grieb, T., Nedeva, T., López, C., Haake, A., Richter, J., Trümper, L., Lawrenz, C., Klapper, W., Möller, P., Hummel, M., Lenze, D., Szczepanowski, M., Flossbach, L., Schreder, M., Gattei, V., Ott, G., Siebert, R., Rosenwald, A., and Leich, E. (2018) 'Differences between BCL2-Break Positive and Negative Follicular Lymphoma Unraveled by Whole-Exome Sequencing'. *Leukemia* 32 (3), 685–693
- Zhu, Z., Li, T., Zhang, X., Zhang, Z., Zhu, D., Lin, P., Tu, S., and Ren, W. (2019) 'Molecular and Clinical Progress in Follicular Lymphoma Lacking the t(14;18) Translocation (Review)'. *International Journal of Oncology* [online] available from <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2019.4917>> [22 February 2022]

Internetquellen:

- MetaSystems XL BCL2 BA Break Apart Probe. Probe map. Accessed 20.06.2024. <https://metasystems-probes.com/en/probes/xl/d-6018-100-og/>
- Xerri L., Medeiros LJ., Klapper W., et al. Follicular lymphoma. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Haematolymphoid tumours [Internet; beta version ahead of print]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022. Accessed 17.02.2023. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: BCL2 Break Apart-Sonde von MetaSystems, Probe Map	27
Abbildung 2: TMA-BCL2-Immunhistochemie.....	36
Abbildung 3: BCL2-Immunstochemie, stark positive Expression.....	37
Abbildung 4: positive immunhistochemische BCL6-Expression.....	37
Abbildung 5: CD3-Expression.....	38
Abbildung 6: CD10-Expression.....	38

Abbildung 7: CD20-Expression.....	39
Abbildung 8: TMA FISH <i>BCL2</i> -BAP (2RG).....	39
Abbildung 9: TMA FISH <i>BCL2</i> -BAP (1R1G1RG).....	39
Abbildung 10: TMA FISH <i>IGH/BCL2</i> -Fusionssonde (2R2G).....	40
Abbildung 11: TMA FISH <i>IGH/BCL2</i> -Fusionssonde (1R1G2F).....	40
Abbildung 12: TMA FISH <i>IGH/BCL2</i> -Fusionssonde: kryptische Translokation..	40

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper der Immunhistochemie	25
Tabelle 2: Sonden der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	26
Tabelle 3: Details zur Lokalisation der <i>BCL2</i> BA FISH-Sonden	26
Tabelle 4: Verwendete Geräte.....	28
Tabelle 5: Patient:innencharakteristika.....	33
Tabelle 6: Immunhistochemische Ergebnisse	35
Tabelle 7: Ergebnisse der FISH-Untersuchungen, Übersicht	41
Tabelle 8: Gruppierte Auflistung der FISH-Ergebnisse.....	42
Tabelle 9: Gesamtübersicht FISH-Ergebnisse	42
Tabelle 10: <i>BCL2</i> -BAP Ergebnisse	44
Tabelle 11: <i>BCL2</i> -BAP-FISH-Translokationsstatus.....	45
Tabelle 12: <i>BCL6</i> -BAP-Ergebnisse.....	46
Tabelle 13: <i>IGH/BCL2</i> -Fusionsprobe-Ergebnisse.....	47
Tabelle 14: Gesamtübersicht der Immunhistochemie-Ergebnisse	97

9 Appendix

9.1 Gesamtübersicht der Immunhistochemie-Ergebnisse

Fallnummer	Grad	Stadium [nach Ann- Arbor]	BCL2	BCL6	CD3	CD10	CD20
1	1	Nicht erhebbar	pp	p	hp	zp	pp
2	2	Nicht erhebbar	pp	pp	zp	hp	pp
3	2	1	hp	p	pp	zp	pp
4	1	4	pp	p	zp	hp	pp
5	1	Nicht erhebbar	pp	p	hp	hp	pp
6	3	Nicht erhebbar	pp	p	p	zp	pp
7	2	2	pp	p	zp	zp	pp
8	2	2	pp	p	p	zp	pp
9	2	Nicht erhebbar	pp	pp	zp	pp	pp
10	2	3	pp	pp	hp	pp	pp
11	2	3	pp	pp	hp	pp	pp
12	3	4	hp	p	p	zp	hp
13	1-2	1	pp	p	pp	hp	pp
14	2	1	pp	p	zp	pp	pp
15	2	1	hp	p	p	zp	pp
16	2	1	p	n	zp	hp	pp
17	2	4	hp	p	p	zp	pp
18	2	4	pp	p	hp	zp	pp
19	3	4	pp	p	zp	hp	pp
20	1	Nicht erhebbar	pp	p	hp	pp	pp
21	1	3	p	p	zp	hp	pp
22	1	1	pp	p	zp	hp	pp
23	1	4	pp	p	zp	p	pp
24	1	1	hp	p	nicht auswertbar	zp	hp
25	1	4	p	p	p	zp	pp
26	1	Nicht erhebbar	pp	p	hp	pp	pp
27	1	Nicht erhebbar	hp	p	zp	zp	pp
28	1-2	1	pp	n	p	hp	pp
29	2	4	hp	p	zp	n	pp
30	1-2	1	pp	zp	pp	hp	pp
31	1	3	pp	zp	pp	hp	hp
32	3	1	pp	p	p	zp	pp
33	3	2	p	pp	zp	p	pp
34	1-2	2	p	p	hp	pp	pp
35	1-2	2	pp	p	pp	hp	pp
36	1-2	2	pp	p	hp	pp	pp
37	1-2	1	p	zp	pp	hp	pp
38	1-2	3	pp	pp	zp	p	pp
39	1-2	4	pp	p	zp	pp	pp
40	1-2	1	pp	n	zp	hp	hp
41	1-2	2	pp	p	hp	hp	pp

42	3	3	pp	p	hp	zp	pp
43	1	4	pp	p	zp	zp	pp
44	1-2	4	pp	p	pp	hp	pp
45	1-2	3	pp	p	zp	pp	pp
46	1	4	pp	p	zp	zp	pp
47	1-2	4	pp	zp	hp	zp	pp
48	1	1	p	p	pp	zp	pp
49	1-2	3	pp	p	pp	zp	pp
50	1-2	4	pp	p	pp	hp	pp
51	1-2	3	pp	zp	pp	hp	pp
52	3	1	hp	zp	pp	hp	pp
53	1-2	3	pp	zp	zp	hp	pp
54	3	1	pp	p	hp	hp	pp
55	1-2	1	pp	zp	hp	hp	pp
56	1-2	2	pp	zp	zp	zp	pp
57	3	2	p	pp	zp	zp	pp
58	1-2	3	pp	pp	p	hp	pp
59	1-2	3	pp	pp	hp	hp	pp
60	1-2	1	pp	p	nicht auswertbar	zp	pp
61	1-2	4	pp	p	hp	pp	pp
62	1-2	3	pp	p	zp	hp	pp
63	1-2	3	pp	zp	zp	pp	pp
64	1-2	4	pp	pp	p	zp	pp
65	1-2	2	hp	p	hp	zp	hp
66	1-2	3	pp	p	hp	hp	pp
67	1-2	4	pp	zp	hp	hp	pp
68	1-2	1	pp	p	p	zp	pp
69	1-2	3	pp	zp	hp	zp	hp

Tabelle 9: Gesamtübersicht der Immunhistochemie-Ergebnisse, pp = stark positiv, p = schwach aber eindeutig positiv, hp = heterogen positiv, zp = zahlreich positive Zellen

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie der Universität Tübingen unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Falko Fend, ärztlicher Direktor des Instituts für Pathologie am UKT durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Falko Fend in Zusammenarbeit mit Dr. Jakob Milla, Facharzt für Pathologie am UKT.

Die Fallsuche wurde von mir mit Unterstützung durch Dr. Jakob Milla und PD Dr. rer. nat. Irina Bonzheim, Leitung der Molekularpathologischen Diagnostik des Instituts für Pathologie durchgeführt.

Sämtliche histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden vom medizinisch-technischen Personal der Abteilung für Allgemeine und Molekulare Pathologie angefertigt, insbesondere von Frau Karen Greif, medizinisch-technische Assistentin im Institut für Pathologie. Die Auswertung erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Falko Fend und Dr. Jakob Milla.

Die Erstellung der TMAs erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Christine Beschorner, medizinisch-technische Assistentin im Institut für Pathologie. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen wurden von Frau Barbara Mankel, medizinisch-technische Assistentin im Institut für Pathologie angefertigt und von mir in Zusammenarbeit mit ihr ausgewertet. Alle Fotografien wurden nach Einarbeitung durch Frau Barbara Mankel von mir erstellt.

Für Inputs zur sprachlichen Verbesserung wurde für einzelne Passagen das Programm ChatGPT 4.o (Version 13.06.2025) herangezogen. Ich versichere, dass ich den Output des KI-Tools [ChatGPT 4.o] sorgfältig geprüft und angepasst habe, bevor eine alternative Formulierung übernommen wurde. Mein gestalterischer Einfluss wurde dadurch nicht beeinträchtigt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Beratung durch Dr. Jakob Milla unter Supervision von Herrn Prof. Dr. Falko Fend verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 27.12.2025

Floria Nielsen

11 Danksagung

Mein herzlichster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Falko Fend der mir die Promotion am Institut für Pathologie ermöglicht hat und Dr. Jakob Milla für die Betreuung und fortwährende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiters möchte ich mich bei allen beteiligten Mitarbeitenden des Instituts für Pathologie für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Frau Karen Greif, Frau Christine Beschorner und Frau Barbara Mankel.

Besonders möchte ich auch meiner Familie von Herzen für die Unterstützung und stete Ermutigung danken.