

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

**Molekulargenetische Analysen zur Genese
Follikulärer Lymphome**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanwissenschaften

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

Vorgelegt von

Kosmidis, Perikles

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Fend

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Ossowski

Tag der Disputation: 24.06.2019

"Es ist nicht die stärkste Spezies die überlebt, auch nicht die intelligenteste, es ist diejenige, die sich am ehesten dem Wandel anpassen kann."

Charles R. Darwin, 1809-1882

Ἄνδρα μοι ἔννεπε, Μοῦσα, πολύτροπον, ὃς μάλα πολλὰ...

Ὀδύσσεια-Ὅμηρος

(Start des Epos Odyssee, Homer vor ca. 2800 Jahren)

Die Dissertation widme ich meiner

Familie

I. Inhaltsverzeichnis:		Seite
I.	Inhaltsverzeichnis	1
II.	Abkürzungsverzeichnis	3
III.	Vorwort - Prolegomena zu Lymphomen	9
1.	Einleitung und Definition maligner Lymphome	10
1.1	Follikuläres Lymphom (FL) und indolente Lymphome	10
1.2	FL und die t(14;18)(q32;q21) Translokation	11
1.3	Tumorentwicklung und -evolution bei FL	13
1.4	BCL2 negative follikuläre Lymphome	14
1.5	Frühe Läsionen: Follikuläres Lymphoma in Situ / In Situ Follikuläre Neoplasie (ISFN)	15
1.6	B-Zellen-Entwicklung und Reifung	17
1.6.1	Somatische Rekombination, VDJ Rekombination	19
1.6.2	Somatische Hypermutations (SHM)	21
1.7	B-Zellen Aktivierung	23
1.8	Lymphknoten und das Mikromilieu	24
1.9	Follikuläre dendritische Zellen (FDC)	25
1.10	Hochendotheliale Venolen (HEV)	27
1.11	Ziel der Dissertation	28
2	Ergebnisse	29
2.1	Publikation 1: Next generation sequencing of the clonal IGH rearrangement detects ongoing mutations and interfollicular trafficking in in situ follicular neoplasia	31
2.1.1	Supporting Information	49

Inhalts- und Abkürzungsverzeichnis

2.2	Publikation 2: Lack of t(14;18) translocation in non-lymphoid bystander cells and preserved mantle zones of follicular lymphoma	57
3	Diskussion	64
4.	Zusammenfassung	72
5.	Literaturverzeichnis	73
6.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	84
6.1	Tabellenverzeichnis	84
6.2	Abbildungsverzeichnis	84
7.	Erklärung zu den Anteilen der Autoren in die Veröffentlichung	86
8.	Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation.	90
9.	Danksagung	91

II. Abkürzungsverzeichnis

A (Nukleotid)	Adenin
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
α -, β -, γ -, d-Chemokin	α -, β -, γ -, d-chemokines
ADP	Adenosin- D iphosphat
ATP	Adenosin- T riphosphat
AID	a ctivation- i nduced d eaminase (Aktivierungsinduzierte Deaminase)
ALL	Akute L ymphoblastische L eukämie
Asn-X-Ser/Thr	N-Glykosylierung, Erkennungssequenz
B-CLL	B -cell c hronic l ymphocytic leukemia (B-Zell chronische lymphatische Leukämie)
B-PLL	B -cell p rolymphocytic leukemia (B-Zell prolymphozytische Leukämie)
BCL2	B -cell lymphoma 2 Protein
BCL6	B -cell lymphoma 6 Protein
BCR	B -cell r eceptor (B-Zell Rezeptor)
BH	B CL2- h omologe-Domäne
BNLI-Kriterien	B ritish N ational L ymphoma I nvestigation
bp	b ase p air (Basenpaar)
B-Zellen	B -Lymphozyt
C (Nukleotid)	Cytosin
CD	C luster of D ifferentiation (Differenzierungsmerkmal)

Inhalts- und Abkürzungsverzeichnis

CGH	Comperative Genomic Hybridization (vergleichende Genomhybridisierung)
CLL	chronische lymphatische Leukämie
C-Segment	constant-segment (konstantes Segment des Immunglobulins)
CXC	chemokine receptors
CXCL13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13
CXCR5	chemokine receptor type 5
Cy2, Cy3	Cyaninfarbstoffe
D-Segment	diversity segment (Diversitätssegment des Immunglobulins)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCS	dendritic cell sarkoma
DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	deoxyribonucleic acid (DNS=Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleinsäure-Nukleosid-Triphosphat
DZ	Dendritische Zellen
EBF	early B cell factor
E μ	Enhancer μ des Immunglobulin-Schwerkettengens
E17	aus embryonalen Zellen gewonnener monoklonaler KaninchenBCL2-Antikörper
FDC	follikuläre dendritische Zellen
FICTION	Fluorescence immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasms
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Inhalts- und Abkürzungsverzeichnis

FL	Follikuläres Lymphom
FLIPI	Follicular Lymphoma Prognosis Index
FLIS	Follikuläres Lymphom in situ
Foll.	Follikeln
FR	Frame (reading frame = Leseraster)
G1-G11	Gruppe 1 bis Gruppe 11
GC	Guanin-Cytosin Gehalt
GELF	Groupe D Étude des Lymphomes Folliculaires
H	Histon
HBL1	human-specific long noncoding RNA, Heart Brake LncRNA 1
HCL	Hairy cell leukemia (Haarzell-Leukämie)
HE	Haematoxylin Eosin Färbung
Hep.-C	Hepatitis C
HEV	High endothelial venules
HPF	high power Field (mikroskopisches Gesichtsfeld)
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
Ig	Immunglobulin (Protein)
IG	Immunglobulin (Gen)
IgA, -D, -E, -G, -M	Immunglobulin Klasse A, -D, -E, -G, -M
IgD+	Immuglobulin D positive Zellen
IgH	Immunglobulin heavy chain (Immunglobulin Schwerketten, Protein)

Inhalts- und Abkürzungsverzeichnis

IGH	I mmunoglobulin h eavy chain g ene (Immunglobulin Schwerketten-Gen)
IMGT/V-QUEST	Sequenzierungs-Alignment-Software
Igκ	I mmunoglobulin-Leichtkette κ appa
Igλ	I mmunoglobulin-Leichtkette λ ambda
IL7	I nterleukin 7
ISFN	I n S itu F ollicular N eoplasia (I n- S itu folliculäre Neoplasie)
J-Segment	j oining- s egment (verbindendes Segment des Immunglobulins)
JH	J oining and H eavy-gene segments
Ki67	Ki-67 Antigen
LN/LK	L ymph n ode/ L ymphknoten
LT	L ymphotoxin
LTbR	L ymphotoxin b eta r eceptor
mAb	m onoclonal a ntibody (Monoklonaler Antikörper)
MIB-1	Proliferationsmarker MIB-1
MALT	M ucosa-associated L ymphoid T issue (Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe)
mbr	m ajor b reak point r egion (große Bruchpunktregion)
MCL	M antelzell- L ymphom
MCLIS	M antel- Z ell- L ymphoma- I n- S itu
NGS	N ext g eneration s equences
NHL	N on H odgkin L ymphoma
MHS	m ultipotente h ämatologische S tammzelle

Inhalts- und Abkürzungsverzeichnis

mRNA	m essenger R ibonucleic acid (Boten RNA)
N-Terminal	aminoterminales Ende
nM	N anomolar
NP-40	Nonoxinol 40 (nichtionisches Detergenz)
N-x-s/T	asparagine-X-serine/threonine (NXS/T) motif
MW	M akroglobulinämie W aldenström
MYC	myc -proto-oncogen
MZL	M arginalzonen- L ymphom
NHL	N on-Hodgkin Lymphom
NK-Zellen	natürliche K illerzellen
OHS	o ligopotente h ämatologische S tammzelle
PCR	p olymerase c hain r eaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	P robenentnahme
R.E.A.L-Klassifikation	R evised E uropean- A merican C lassification of L ymphoid Neoplasms (revidierte europäische-amerikanische Klassifikation lymphoider Neoplasien)
RKI	R obert- K och- I nstitut
RNA	R ibonukleinsäure
Seq	S equenzierung
SHM	S omatische H ypermutation
SNP	S ingle N ukleotid P olymorphismen (Einzelbasenpolymorphismus)
ss	single strand (Einzelstrang)
SSC-Puffer	s aline- s odium c itrate buffer (Natriumcitrat Kochsalz)

Inhalts- und Abkürzungsverzeichnis

SLO	sekundäres lymphatisches Gewebe
T (Nukeotid)	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-Borat-Saline
TdT	Terminale Desoxynukleodyltransferase
t	Translokation
t-FL	transformiertes Follikuläres Lymphom
TLO	tertiäres lymphatisches Gewebe
TNF	tumor necrosis factor
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TP53	tumor protein 53
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
T-Zellen	T-Lymphozyten
U (Nukleotid)	Uracil
V-Segment	variable-segment (variables Gensegment des Immunglobulins)
V(D)J-Umlagerung	Umlagerungsprozess bei Schwerketten und Leichtketten
WGA	whole genome amplification (Gesamt-Genom-Amplifikation)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

„... und an der Brust sahen wir häufig Tumoren, die der Gestalt eines Krebses sehr ähnlich waren. So wie die Beine des Tieres an beiden Seiten des Körpers liegen, so verlassen die Venen den Tumor, der seiner Form nach dem Krebskörper gleicht.“ (Galenos von Pergamon, um 129 - 200 n. Chr.)

Vorwort - Prolegomena zu Lymphomen:

Tumore, die in Lymphknoten zu einer Schwellung und Vergrößerung führen, nennt man im allgemeinen Lymphome. Zellen, die ihren Ursprung im lymphatischen System haben, können sich bösartig entwickeln und zu malignen Lymphomen entarten [1,2].

Obwohl der Anatom Marcello Malpighi (1628-1694) in seiner Schriften von 1666 *„De viscerum structura exercitatio anatomica= Die anatomische Struktur der inneren Organe“* wahrscheinlich ein Lymphom beschrieb [3], fallen die ersten spezifischen Begriffe wie „malignes Lymphom“ erst im 19. Jahrhundert von Rudolf Virchow (1821-1902) und Sir Thomas Hodgkin (1798-1866). So beschrieb Hodgkin 1832 in seiner Arbeit *„On the morbid appearances of the Adsorbent Glands and Spleen“* über Krankheitsfälle an den lymphatischen Organen wohl ein Lymphom [4].

Krebs und Geschwüre sind keine Neuerscheinung unserer Tage. Die ersten Erwähnungen findet man schon vor über 2500 Jahren und die Begriffe (Καρκίνος =Karkinos=Krebs), Krebs und Geschwür waren bereits im antiken Griechenland bekannt [5]. In den Zeiten von Hippokrates von Kos (460 v.Chr. - 370 v.Chr.), Aristoteles (384 v. Chr. - 322 v. Chr.) und Galenos von Pergamon (129 n. Chr. - 200 n. Chr.) wurde oftmals das oberflächliche Erscheinungsbild auf der Haut und der Mamma beobachtet und wegen der Ähnlichkeit mit dem Krebs mit dessen Namen bezeichnet.

1. Einleitung und Definition maligner Lymphome

Maligne Lymphome sind bösartige Erkrankungen, die von Lymphknoten oder extranodalen lymphatischen Gewebe ausgehen [6,22]. Laut der aktuellen Fassung der WHO-Klassifikation von 2016 werden maligne Lymphome in B-Zell-, T-Zell- und Hodgkin Lymphome sowie einige kleinere Entitäten (z.B. NK-Zell-Lymphome) eingeteilt [7].

1.1 Follikuläres Lymphom (FL) und indolente Lymphome

Das FL, früher auch als centrozytisch-centroblastisches Lymphom oder auch seltener als Bryll-Symmers-Krankheit bekannt, ist eines der am häufigsten auftretenden NHL [8]. Immunhistochemisch sind die FL-Zellen üblicherweise positiv für CD19, CD20 und CD22 und den Keimzentrumsmarker CD10 [8]. BCL6 wird zumeist koexprimiert [8]. Im Gegensatz zu reaktiven Keimzentren wird in den follikulären Strukturen des FL auch BCL2 exprimiert. Die Kombination eines Keimzentrumsmarkers wie CD10/BCL6 mit Coexpression von BCL2 ist somit diagnostisch für ein FL. Auf der Zelloberfläche werden die Immunglobuline IgM in über die Hälfte der Fälle, aber auch IgD und weniger häufig IgG und IgA gefunden [2].

Histologisch deutet sich das FL durch zwei charakteristische Muster auf. Die Zentrozyten im Keimzentrum dominieren gegenüber den Zentroblasten, andererseits ahmen Pseudofollikeln die physiologische Lymphknotenstruktur nach. Darüber hinaus ist oftmals ein diffuser Tumorzellrasen zu finden [6]. Als Malignitätskriterium ist ein Befall der interfollikulären Region. In seltenen Fällen weisen die Tumorzellen eine Marginalzonenzell- oder eine plasmazelluläre Differenzierung auf [2]. Eingeführt seit 1996 von Rappaport et al. [6,9] und gemäß der WHO-Klassifikation von 2008 [2] wird das FL in drei Grade (Grading 1-3) unterteilt. Abhängig von der Anzahl der Zentroblasten bei der mikroskopischen Auswertung und mit einer 40X-fache Vergrößerung pro Gesichtsfeld (HPF) von Bedeutung. 10 verschiedene Areale werden ausgezählt, die dann durch die Zahl 10 dividiert werden. Grad 3 wird wiederum in zwei Untergruppen geteilt, in 3A sind die Zentrozyten noch nachweisbar sowie den Grad 3B womit wir es hier mit einem Rasen von Zentroblasten ohne Zentrozyten zu tun haben.

FL mit Grad 3B werden wie das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) behandelt, da es in die Kategorie der aggressiven Lymphome eingestuft wird [10,11]. Bei Fällen in dem beide Lymphomentitäten vorkommen wird eine prozentuelle Erwähnung beide Zellarten aufgeführt. Die allgemeine FL-Graduierung bringt einige wesentlichen Nachteile mit sich. Die Grade 1 und 2 zeigen untereinander keinen biologischen noch klinischen Unterschied, noch ist die Einteilung reproduzierbar und in den Grad 3B Fällen fehlt sehr oft das CD10 und die BCL-2 Expression. Deswegen wurden neben der Differenzierung des 3B Grades, die Grade 1 und 2 zusammengefasst [10,11]. Wiederum lässt sich durch negative Reaktion mit den Antikörper CD5 und CD43 das FL gut sich von anderen Lymphomen differenzieren wie z.B. das CLL, das Mantelzelllymphom, oder auch das Marginalzellen-Lymphom. Das niedrige Vorkommen an Ki67 und Cyclin D1 Expression ist ein gutes Indiz für ein FL, obwohl auch wenn selten FL-Fälle mit einem hohen Ki67-Index vorkommen [8,26].

Auf ihrer Oberfläche werden öfters bei FL die Immunglobuline IgM über die Hälfte der Fälle, aber auch IgD und weniger IgG und IgA gefunden. Bei den NHL sind einige chromosomale Aberrationen in Form oftmals von Translokationen oder auch in Deletionen zu finden [11]. Dabei ist es auffallend das der IG Locus das auf dem q-Arm des Chromosoms 14 sitzt, in denen als zugefügtes Teil des Translokationsmechanismus involviert ist. So sind exemplarisch die wichtigsten zu nennen wie z.B. bei Mantelzelllymphomen über 95% der Fälle mit der t(11;14)(q13;q32) Translokation indem Cyclin D1 als involviertes Gen fungiert [24]. Bei allen Fällen vom Burkitt Lymphom dass das Gen MYC sich beteiligt findet man nach einer zytogenetischer Analyse die t(8;14)(q24;q32) Translokation. Ein weiteres Beispiel ist das lymphomplasmotisches Lymphom, das die Hälfte ihrer Fälle mit den t(9;14)(p13)(q32) Translokationen führt in dem das Gen PAX5 zu finden ist [23].

1.2 FL und die t(14;18)(q32;q21) Translokation

Das charakteristische genetische Merkmal einer FL ist die rekurrente chromosomale Translokation t(14;18)(q32;q21) [16,17,18]. Diese kommt in über 85-90% der FL aber auch in etwa 30% der DLBCL-Fälle [12-15] vor. Dabei wird der *BCL2* Gen-Lokus vom Chromosom 18 an die *IgH* Region des Chromosoms 14 transloziert und unter der

Einleitung

Regulation des aktiven Enhancers (E μ) gebracht und konsekutiv dauerexprimiert [14]. BCL2 gehört zu den Proto-Onkogenen, die bei der Apoptose eine antagonistische Rolle spielt [19,20]. Eine Überexpression von BCL2 deaktiviert das Cytochrom C Protein in den Mitochondrien und somit wird der programmierte Zelltod verhindert [32,34]. Das bringt die neoplastischen B-Zellen dazu, sich in den Keimzentren des Lymphknotens anzureichern und die physiologischen B-Zellen zu verdrängen.

Interessanterweise finde sich auch bei gesunden Menschen B-Zellen mit einer t(14;18) Translokation, ohne dass eine Anamnese eines oder gar ein manifestes FL vorlägen [21]. Diese Zellen werden mit zunehmendem Lebensalter in zunehmender Inzidenz beobachtet. Offenbar sind daher weitere Faktoren nötig um ein manifestes FL entstehen zu lassen (s.a. nächstes Kapitel-Tumorentwicklung und -evolution beim FL).

Tabelle 1: WHO Einteilung nach der Revision 2016

B-Zell-Lymphome	T-Zell-Lymphome	Hodgkin Lymphome
Chronische Lymphatische Leukämie (B-CLL)	T-Lymphoblastisches Lymphom	Klassisches Hodgkin Lymphom
Prolymphozytenleukämie (B-PLL)	Prolymphozytenleukämie (T-PLL)	Nodulär-sklerosierendes Hodgkin Lymphom Hodgkin Lymphom vom Mischtyp
Haarzell-Leukämie (HCL)	T-CLL mit großen granulierten Lymphozyten (LGL)	Lymphozyten-reiches Hodgkin Lymphom
Nodales Marginalzonen-Lymphom	NK-Zell-Leukämie	Lymphozyten-armes Hodgkin Lymphom
Splenisches Marginalzonen-Lymphom	Adulte T-Zell-Leukämie (HTLV1+)	Lymphozyten-prädominantes Hodgkin Lymphom (noduläres Paragranulom)
Lymphoplasmazytisches Lymphom	Mycosis fungoides	
Waldenström Makroglobulinämie	Sézary-Syndrom	
Schwerketten-Krankheit	Primär kutanes großzelliges anaplastisches Lymphom (CD30+)	
Plasmazell-Myelom	Lymphomatoide Papulose (CD30+)	
Marginalzonen B-Zell-Lymphom vom MALT-Typ (mucosa-associated lymphatic tissue, schleimhautverbundenes Lymphgewebe)	Extranodales NK-/T-Zell-Lymphom vom nasalen Typ	
Folikuläres Lymphom	Enteropathie-assoziiertes T-Zell Lymphom	POSTTRANSPLANTATIONSASSOZIIERTE LYMPHOPROLIFERATION (PTLD)
Mantelzell-Lymphom (MCL)	Hepatosplenisches T-Zell-Lymphom	Frühe Läsionen Plasmazytische Hyperplasie n Infektiöse mononukleoseartige PTLD
Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom	Subkutanes T-Zell-Lymphom vom Pannikulitis-Typ	Polymorphe PTLD
Intravaskuläres großzelliges B-Zell-Lymphom	Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom (AITL)	Monomorphe PTLD (B- und T-NK-Zelltypen)
ALK positives großzelliges B-Zell-Lymphom	Peripheres T-Zell-Lymphom, nicht weiter spezifiziert	Klassisches Hodgkin-Lymphom, PTLD-Typ
Plasmoblastisches Lymphom	Lennert-Lymphom	
Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom	Anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL), ALK-positiv	
Burkitt-Lymphom	Anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL), ALK-negativ	
Primäres Erguss-Lymphom	Primäres kutanes gamma-delta T-Zell-Lymphom	

1.3 Tumorentwicklung und -evolution bei FL

Die Entstehung eines Tumors folgt dem Model der klonalen Evolution wie es von 1976 von Nowell beschrieben wurde [25]. Hierbei durchläuft der Tumor mehrere Schritte. Eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des FL spielt das Protoonkogen BCL2, das - bedingt durch die t(14;18) Translokation- nicht mehr herunterreguliert werden kann. Eine erhöhte BCL2-Genexpression führt zu einer erhöhten BCL2 mRNA-Konzentration [27]. Die Beseitigung „fehlerhafter“ B-Zellen wird außer Kraft gesetzt und es kommt zu einer Vermehrung dieser B-Zellen im Keimzentrum mit gleichzeitiger Verdrängung der physiologischen Keimzentrums-B-Zellen.

Bei einer weiteren Expansion des malignen Klons (z.B. bei einer Aktivierung der neoplastischen Zelle durch einen Antigenkontakt) kann der programmierte Zelltod (Apoptose) nicht mehr eingeleitet werden und die neoplastischen Zellen akkumulieren.

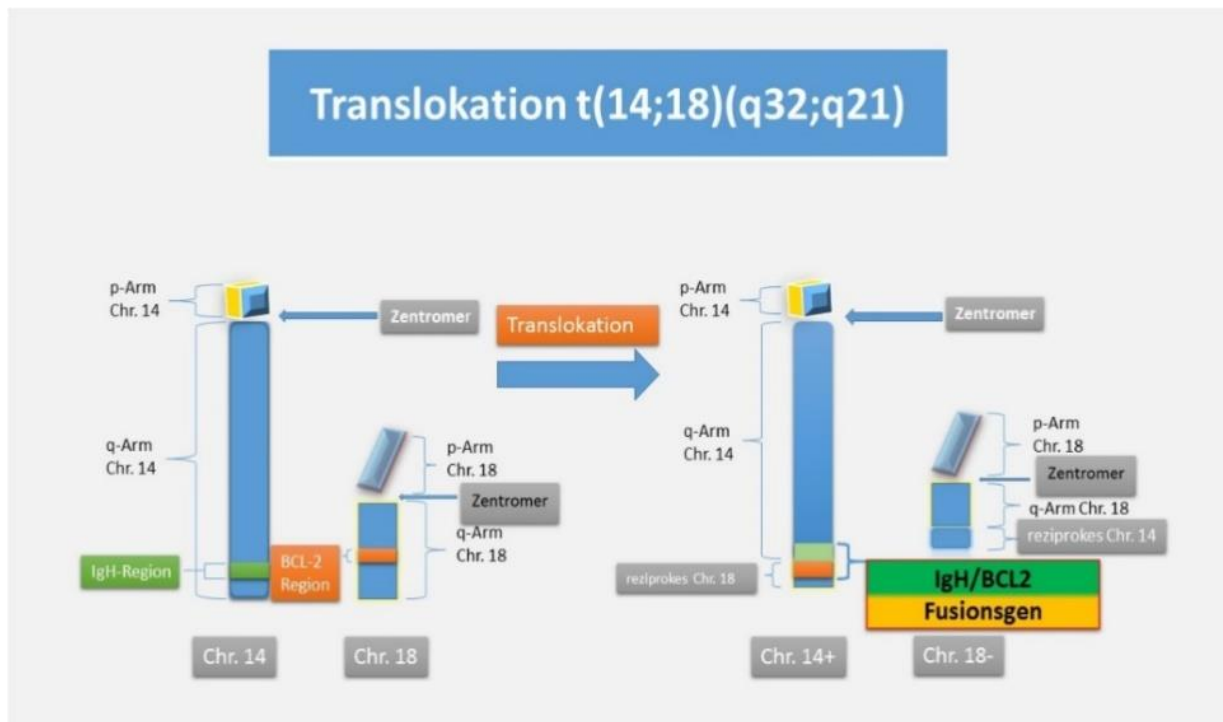


Abbildung 1: Schematische Darstellung der t(14;18)(q32;q21) Translokation.

1.4 BCL2 negative folliculäre Lymphome

Bis zu 90% der FL Fälle weisen die Translokation t(14;18)(q32;q21) auf, die zu einer Überexpression von BCL2 führt [7]. Diese BCL2-Überexpression kann mittels eines gegen das BCL2 Protein gerichteten Antikörpern nachgewiesen werden. Der üblicherweise verwendete Antikörper ist der Klon 100/D5, ein synthetisierter monoklonaler anti-Human Antikörper, der den Aminosäurebereich aa 41-54 des BCL2 abdeckt, bekannt auch als Klon 124 [35]. Durch somatische Mutationen in diesem Bereich (aa 41-54) [33,34], kann das resultierende Protein so verändert werden, dass es von diesem Antikörper nicht mehr erkannt wird und ein negativer Reaktionsausfall in der immunhistochemischen Färbung hervorruft [32]. Bei solchen „pseudo-negativen“ FL Fälle können zwei alternative Antikörper als Ergänzung für die BCL2 Detektion verwendet werden: Klon E17, der den Aminosäurebereiche von aa 61-76 [34] erkennt und der SP66 Antikörpers, ein synthetisches Peptid, das den N-Terminus des humanen BCL2 alpha Proteins erkennt. Eine Studie aus unserem Institut konnte zeigen, dass „pseudo-negative“ FL, die die Translokation t(14;18) tragen, durch die alternativen Antikörper E17/SP66 erkannt werden [36]. Dennoch existiert eine Subgruppe ansonsten typischer FL, die in sämtlichen immunhistochemischen und zytogenetischen Untersuchungen keine t(14;18) aufweisen. Inwieweit sich diese Gruppe klinisch oder prognostisch von den t(14;18)-positiven FL unterscheidet ist noch nicht abschließend geklärt.

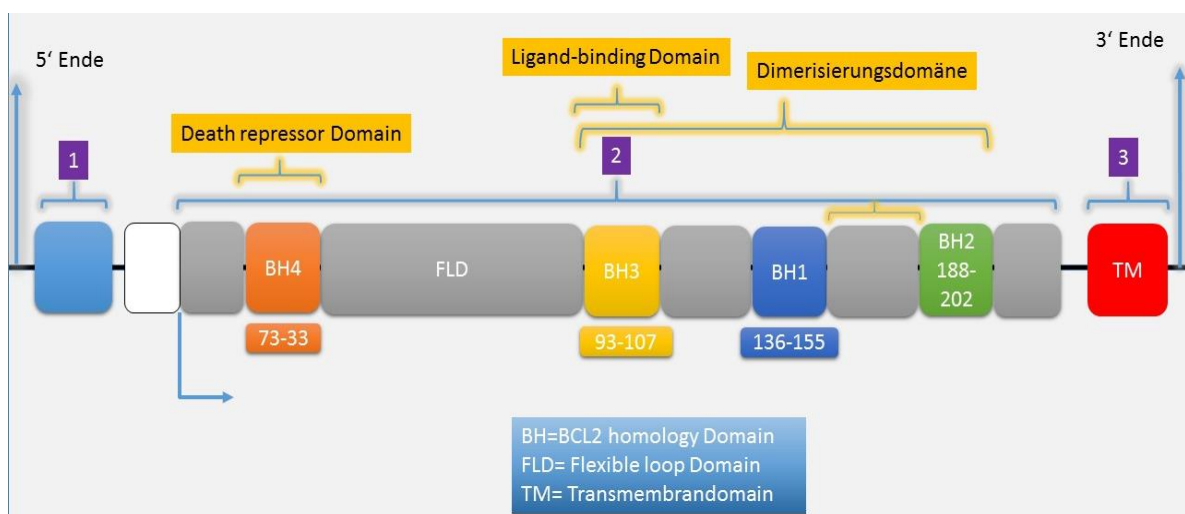


Abbildung 2: Schematische Darstellung des BCL2-Gens mit den homologen Domänen.

Modifiziert nach Reedd J.C.

1.5 Frühe Läsionen: Follikuläres Lymphoma in Situ / In Situ Follikuläre Neoplasie (ISFN)

Eine spezielle Frühform des FL, die u.a. 2002 von Cong et al [37,38,39] beschrieben wurde und von der WHO in die Klassifikation der Lymphome 2008 aufgenommen [40,41], ist wegen ihrer streng auf präexistente Keimzentren beschränkte Lokalisation bei zum manifesten FL identischen immunphänotypischen und genetischen Muster als „In-Situ-FL“ oder auch früher als Follikuläres Lymphom in situ (FLIS) bekannt [38,39].

Die ISFN ist durch die t(14;18) positive Population definiert mit einer starken BCL2 Expression klonaler B-Zellen mit strikter Beschränkung auf die Keimzentrumsstrukturen reaktiver Lymphknoten [8]. Neben der starken BCL2 Ansammlung wird auch CD10 exprimiert.

In ihrer 2016 publizierten Fassung [7] revidierte die WHO den Begriff des Follikulären Lymphoma in Situ und empfiehlt diese Bezeichnung in „in situ follicular neoplasia= In Situ Follikuläre Neoplasie“ (ISFN) abzuwandeln, da möglicherweise den diagnostischen Begriff eines Lymphoms nicht gerechtfertigt [7]. ISFN zeigen durchwegs eine niedrige Proliferationsrate und wurden teils zeitlich vor oder auch synchron zu einem manifesten FL, teils aber auch in Patienten ohne Anamnese eines FL und auch ohne manifestes FL im Beobachtungszeitraum detektiert [40,41]. Die klinische Relevanz dieser Läsion ist noch nicht abschließend geklärt, es scheint aber so zu sein, dass die deutliche Mehrzahl der ISFN Läsionen ohne Assoziation zu einem manifesten FL keine Progression zu einem invasiven Tumor zeigt [7].

Immunhistochemisch zeigt die ISFN oftmals mit einer unauffälligen Mantelzone, seltener ergibt sich das Bild einer Expansion oder gar einer Abschwächung [41,42,43]. Neben der starken CD10 und BCL2 Erscheinung, sind BCL6 und CD 20 mit einer normaler Anfärbung, während der Ki67-Antikörper eine eher niedrige Proliferationsrate zeigt. Die neoplastischen Zellen sind in einen guten Zustand so wie auch die Morphologie des LN. Die Keimzentren sind gut definiert mit einer normalen Größe und scharf abgegrenzt. ISFN führen eine niedrige Progressionsrate und wurden vor einem FL-Verlauf oder auch parallel dazu [40,41] detektiert. Solche intrafollikulären Neoplasien zeigen im Gegensatz zu reaktiven Lymphknoten eine CD10 klonale

Expansion mit gleichzeitiger BCL2 Expression ihrer B-Zellen und eine t(14;18) Translokation wie beim manifesten FL [38,39]. Darüber hinaus ist ihre Proliferationsrate (MIB1) bei ISFN-Zellen stark gesenkt [1,37,44-46]. Fälle haben gezeigt, dass neben der ISFN der Patient parallel ein manifestes FL führen kann, dabei können synchrone oder auch metachrone ISFN und FL Fälle miteinander verwandt sein und somit kann das ISFN als Vorläuferläsion eines FL angesehen werden [47]. Wiederum wurden Fälle berichtet das FLIS FL-artige-B-Zellen aufweisen aber kein manifestes FL bilden kann [48]. Aber auch Fälle von ISFN wurden parallel zu und/oder mit anderen hämatolymphoide Erkrankungen berichtet [37,46,49-54]. Öfters wurden Fälle beschrieben, dass in nicht neoplastischen Zellen ein IgH/BCL2 Rearrangement stattfindet ohne ein Anzeichen eines manifestierten FL [55-65). Deshalb ist die klinische Relevanz noch ungewiss. Da man keine Vorhersagen machen kann über das Maß dieser In Situ-Läsionen ob sie zu einem offensichtlichen manifestierten Lymphom führen können ist es sicherlich von Vorteil die novellierte Bezeichnung Neoplasie zu führen [7].

Klonale Veränderungen, die schon in der Frühphase des IFSN beobachtet wurden, können von Pestiziden aber auch Hep.-C Viren nach einer antiviralen Therapie hervorgerufen werden [66]. Im Verhältnis zu einer manifestierten FL führt das ISFN weniger chromosomale Anomalien. Dabei sticht die BCL2 Veränderung wie bei der manifestierten FL auch bei dieser frühen Form die der t(14;18) Translokation heraus [67,68]. Diesbezüglich sollte erwähnt werden das bei erhöhten Werten von zirkulierenden Lymphozyten die eine t(14;18) Translokation führen ein höheres Risiko haben an FL zu erkranken [69]. Untersuchung in den letzten Jahren haben gezeigt, dass die Entwicklung von einer ISFN zu einem manifesten FL eher ein seltenes Ereignis ist [41].

Neueste Erkenntnisse von der Forschungsgruppe Nybakken et al. [70] der Stanford Universität zeigten, dass von sieben Fällen mit Zentroblasten angereicherten Follikeln und negativer BCL Anfärbung bei vier Fällen eine klonale B-Zell Proliferation in mitten von polyklonalen B-Zell Populationen ergaben. Alle Fälle waren ohne t(14;18) Translokation und mit negativer BCL2 Expression. Parallel entdeckte man bei drei Patientinnen ein synchrones Auftreten eines invasiven Brustkarzinoms. Keines dieser Fälle wurde auch nach 44 Monaten nach der Diagnose mit einem manifestierten FL in

Verbindung gebracht. Damit stellte sich die Frage ob solch eine starke Anreicherung an Zentroblasten und/oder ohne BCL2 Expression noch Teil eines reaktiven Lymphknotens oder schon eine FL Vorläufer-Läsion ist [70]. Ihre Untersuchungen führten zu der Hypothese ob solche starke Anreicherung von Zentroblasten sich zu einer späteren Form eines FL Grad 3A oder 3B führen kann.

In einer Studie [71] von 341 untersuchten LK davon 201 Fälle mit Kolorektalkarzinom betroffen sowie 140 Fälle mit Brustkarzinom wurden 11 Patienten, ein Anteil von 2,23% mit isolierten ISFN ermittelt sowie 2 mit MCLIS (einer Vorläuferstufe des Mantelzelllymphoms). Keines dieser Fälle manifestierte sich zu einem Lymphom auch nach medianen 54 Monaten Dauer (7 bis 187 Monate Dauer im Durchschnitt). Jedoch zeigten 75% der Fälle einen klinischen Verdacht auf eine lymphoproliferative Störung in Verbindung oder in Kombination von ISFN (oder MCLIS) mit anderen lymphatischen Neoplasien wie z.B. FL, Hodgkin-Lymphom, multiples Myelom, Marginalzonenlymphom, in verschiedenen LN oder auch im gleichen Sample. Die Altersverteilung dieser Proben lag im Durchschnitt wie bei den FL-Patienten. Dabei kam es statistisch betrachtet zu einem 1000mal häufigeren Vorkommen eines ISFN wie die des manifestierten FL. Dies könnte ein Indiz auf das FL Gegenstück sein dass mit bis zu 50% Anteil bei gesunden Individuen und bis 14% von reaktiven LK die t(14;18) Translokation zu finden ist [72]. ISFN könnte somit die risikoarme Vorstufe einer späteren manifestierten FL im Blut sein [40,41,47,73].

1.6 B-Zellen - Entwicklung und Reifung

Um sich gegen das breite Spektrum von Pathogenen zu wehren, hat sich in der Entwicklungsphase des Immunsystems von Vertebraten eine sehr hohe Variabilität an sogenannten Antigenrezeptoren der B- und T-Zellen etabliert. Beide Immunzellarten stehen für die erworbene, oder auch adaptive Immunantwort genannt, da. Diese zusammen mit der angeborenen Immunantwort gehören zu den Abwehrpfeilern jedes Individuums und sind evolutionstechnisch seit mindestens 500 Millionen Jahren, wie Max-Planck-Forscher aus Freiburg, am primitiven Neunauge identifiziert haben [100] existent. Ihren „Geburtsort“ haben beide Zellarten, B- sowie T-Zellen, im Knochenmark, das „B“- stand ursprünglich für das Bursa fabricii Organ, ein

sackförmiges lymphatisches Bildungsorgan [101] wie man es bei Vögeln findet. Später wurde es umbenannt nach dem englischen Wort für Knochenmark „bone marrow“ (Medulla ossium) wegen ihrem Ursprungsort beim Menschen und anderen Wirbeltieren. Während ihrer Lymphopoese der T-Zellen im Thymus sich weiterentwickeln, bilden sich B-Zellen im Knochenmark weiter [102].

Um die Bildung der hochspezifischen Antigenrezeptoren zur ermöglichen ist eine Reihe von Vorgängen und Zwischenstadien nötig, die ihre Abfolge weiter unten ausführlich beschrieben werden. Darüber hinaus wird der hervorgehende Antigenrezeptor auf seine Spezifität und Affinität auf körpereigene Liganden überprüft [102].

Man spricht von einer positiven Selektion im Falle der Übernahme solcher Immunzellen im Abwehrsystem und von einer negativen Selektion, wenn Immunzellen eine Autoimmunreaktion hervorheben.

Die B-Zellen Entwicklung muss durch drei Stadien. Zu Beginn wurden in den B-Zellen die Immunglobuline umgelagert. Dies geschieht noch im Knochenmark und ist antigenunabhängig. IgM-Rezeptoren entstehen bei dieser Phase an der Oberfläche des unreifen B-Zelltyps. Hier können Reaktionen und Antigenwirkungen aus der Umgebung auftreten. Sind solche Wechselwirkungen zu stark werden diese unreifen B-Zellen inaktiviert vernichtet. In der letzten Entwicklungsphase kommen alle unreifen B-Zellen, die überlebt haben, in die Peripherie und reifen zu IgD- und IgM- exprimierende Zellen heran [102]. Die Reaktion mit Fremdkörpern bzw. Antigenen formen sie zu Plasmazellen. In dieser Phase sezernieren sie Antikörper. All dies geschieht in den sekundären lymphatischen Organen wie dem Lymphfollikel (Folliculi lymphatici) bzw. Lymphknoten (Noduli lymphatici), die Milz (Splen, Lien), dem Wurmfortsatz (Appendix vermiformis), die Tonsillen (Gaumentonsillen = Tonsilla palatinata) aber auch den Peyer-Plaques (Folliculi lymphatici aggregati), die im Ileum hauptsächlich zu finden sind.

B-Zellen zeichnen sich durch ihre humorale Immunantwort aus. Bis sie diese Phase erreichen, werde sie in einer Reihe von Reifungsabfolgen gebracht. Dies geschieht mit vielen Wechselwirkungen meistens auf der Oberfläche der unreifen B-Zellen. Sogenannte Stromazellen spielen eine wichtige Rolle für die B-Zell Differenzierung. Die Wechselwirkungen zwischen den multipotenten Vorläuferzellen und der

Stromazellen beginnen im Endosteum und setzen ihre Interaktion bis zum zentralen Sinus der Knochenmarkshöhle zu. Aus der Urzelle der multipotenten Stammzelle (MHS) wird durch den Stimulus von Transkriptionsfaktoren wie FU1 und IKAROS die wiederum eine Rezeptortyrosinkinase FLT3 auf der Oberfläche dieser Urzellen exprimiert. FLT3 bindet mit dem entsprechenden FLT3-Liganden, der sich wiederum auf der Oberfläche von Stromazellen befindet. Sobald von der Stromazelle Interleukin 7 (IL-7) produziert wird, wandelt sich die Vorläuferzelle in die eigentliche B-Zell Linie ein. IL-7 mit Hilfe von E2A helfen die Vorläuferzelle sich weiter zu differenzieren in dem es den early B cell factor (EBF) exprimiert. In diesem Zustand entwickelt sich die gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle auch als Pro-B-Zelle benannt. Dies ist der Beginn aller B-Zellen Teilung.

Parallel zur lymphatischen Reifung beginnt die myeloische Reifungsreihe, die mit der MHS auch durch den Einfluss von Zytokinen oligopotenten hämatologischen Stammzellen (OHS) die myeloischen Stammzellen hervorbringt.

Der Reifungsprozess der B-Zelle verläuft sich nach der frühen Pro-B-Zelle, über die Stadien der späten Pro-B-Zelle, der großen Prä-B-Zelle, der kleinen Prä-B-Zelle bis hin zur reifen B-Zelle. Zugleich beginnt bei jeder Reifung der B-Zelle eine Strukturierung und Bildung der sogenannten Immunglobulinsegmente. Die Interaktion in der Entwicklungsphase der B-Zellen mit der Stromazelle endet bei der Reifung der Prä-B-Zelle.

1.6.1 Somatische Rekombination, VDJ Rekombination

Schon seit Lederberg [103] ist bekannt, dass bei den Antikörpern die Diversifizierung nicht durch eine Keimzelle von Generation zu Generation vererbt wird, sondern dies in spezialisierten Körperzellen geschieht, also somatisch bedingt sind [103-105]. Die Entstehung der Codierung von V-Genen wird andererseits von vererbten Gensegmenten und somit keimbahngesteuert weitergegeben [102].

Mitte der 1970 Jahre ging der Japaner Tonegawa die Frage nach, wie die enorme Vielfalt der Antikörper-Moleküle synthetisiert [106-108] wird. Dabei stieß er aufgrund seiner Ergebnisse an den λ -leichten-Ketten von Mäusen. Das Gen für die λ -leichte-Kette

bei der Maus kommt nicht häufiger vor wie das einmalige vorkommende Gen der β -Globin [107]. Darüber hinaus entdeckte er u.a. den Prozess der DNA-Umlagerung bei der Antikörperbildung indem er erkannte, dass die Gensegmente für die Umlagerung in der B-Zelle sehr dicht beisammen drängt als bei nicht lymphoiden Zellen [108]. 1987 bekam er von der Königlichen Schwedischen Akademie der Wissenschaften den Nobelpreis für Medizin „für seine Entdeckung der genetischen Grundlage für das Entstehen des Variationsreichtums der Antikörper“ [109]. Diesbezüglich besteht die somatische Rekombination der variablen Region eines Antikörpers aus der zufälligen Kombinationsmöglichkeit die sich ergibt vom dem verfügbaren genetischen Material von 51 (**V**)ariable Genen, 27 (**D**)iversity Genen und schließlich aus 6 verschiedenen (**J**)oining Genen, den sogenannten **VDJ**-Segmenten.

Im Gegensatz zu den schweren Ketten beinhalten die zwei leichten Ketten, κ - und λ -Ketten, eines Immunglobulins die Gene von VJ-Segmenten. Diese bestehen für die κ -Ketten aus 40 V und 5 J Variationen und bei den λ -Ketten aus 29 V und 4 J verschiedenen Clustern. Die Rekombination bei den B-Zellen startet immer mit der Umlagerung von schweren Ketten und führen anfänglich zwei Isotypen μ - und δ -. Somit startet jede Antikörperproduktion mit der Herstellung von IgM und IgD das später durch den Klassenwechsel-Mechanismus zu anderen Ig-Isotypen umwandelt. Die Information für die Kodierung, der drei verschiedene Clustern der schweren Ketten, κ -, λ - liegen verstreut in den Chromosomen. Der Locus für die schweren Ketten (IgH-Lokus) liegen auf dem Chromosom 14, die der λ -Lokus der leichten Ketten auf dem Chromosom 22 und die der κ -Lokus der leichten Ketten auf das Chrom. 2.

Zu Beginn der Rekombination kommen separate D_H und J_H Segmente im Zufallsprinzip zusammen, eines der V_H -Varianten koppelt sich folglich mit dazu zum DJ Komplex und es bildet sich das VDJ. Dabei werde alle nicht benötigten Teile, der DNA-Segmente, die nicht in dem Prozess der somatischen Rekombination teilgenommen haben, wie z.B. die Introns, rausgeschnitten und entfernt. Ein komplettes V_H -Exon entsteht.

Zusammengeführt werden Leader Peptid, VDJ gebildetes Konstrukt, sowie die drei Exons der konstanten Region der schweren Ketten mittels Spleißvorganges. Der Rekombinationsvorgang schließt ab mit der Entfernung des Leader-Peptids und die der Bildung von Disulfidbrücken. Um in den Rekombinationsprozess eventuelle Verbindungen der gleichen Variante zu umgehen gibt es in unmittelbarer Nähe der

erfolgten Rekombinationsstelle Sequenzen, die das steuern. Diese so genannten RSS (Rekombinationssequenzen) bestehen aus Heptamere eine Nukleotidensequenz die direkt nach der Segmentkopplung andockt. Die RSS bildet ein Teil eines größeren RSS-Spacer-Nonamer Systems. Die Spacermodule sind in 12bp oder 23bp (Basenpaare) Anordnung zu finden und fungieren als Abstandshalter, während das Nonamer aus der ACAAAAACC Sequenz besteht.

Der Mensch hat die Möglichkeit bis zu 10^{11} verschiedene Antikörpermoleküle zu kreieren. Aus den Kombinationsmöglichkeiten der VDJ Genen ergeben sich eine Zahl von ca. $2,6 \times 10^6$ verschiedene Antikörper. Der Mechanismus der somatischen Hypermutation zusammen mit dem Isotypenwechsel ergab eine Vervielfältigung um den Faktor 5.

1.6.2 Somatische Hypermutation (SHM)

Nach ihrer Entwicklung und Reifung bekommen B-Zellen und sobald sie das Keimzentrum erreicht haben, parallel zu ihren Isotypenwechsel (auch als Immunglobulinklassenwechsel bekannt), eine 1×10^4 bis 1×10^6 erhöhte Mutationsrate an ihrer variablen Region der schweren Ketten. Es kommen pro Basenpaar und Generation in diesem Segment eine Anordnung von ca. 10^{-3} (10,11) bis 10^{-4} [110] zustande. Wegen ihren enormen vorkommenden Mutationsrate im Vergleich zur natürlichen somatischen Zelle im Körper wird dieses Phänomen somatische Hypermutation genannt. Zur Hypermutation kommt es nach dem Kontakt der B-Zelle mit dem Antigen. Im Gegensatz zum Klassenwechsel sind die Promotoren und die C-Region diesmal nicht betroffen. Es handelt sich um Veränderungen einzelner Basen an der VDJ-Region [101, 102,110,111]. Hier kommt es zu einem biochemischen Abbau durch Deaminierung des Cytidins zu Uracil mittels des Enzyms AID (Activation Induced Cytidine Deaminase). Anstatt der vorgesehenen Cytidin-Guanin Verbindung, kommt es bei der Umwandlung der Base Uracil mit der Base Adenin zusammen. Somit ändert sich in diesen „Punkt“ die Sequenz, es kommt zu einer Punktmutation. Die Forschungsgruppe von Tasuku Honjo brachte 1999 zum Vorschein, dass für die Prozesse des Isotypen Klassenwechsels und die der somatischen Hypermutation vom gleichen Enzym, sprich über das AID, gesteuert werden [113-116]. AID wirkt nur an Einzelstrang-DNA.

Deswegen findet dieser Mechanismus an B-Zellen statt, die aktiv transkribiert werden ins besonders an den umgeordneten variablen Regionen [102]. Die davon abgeleitete Sequenz-Motiven in diesen Fall auch als hotspot-Motive bekannt liegen meist in der Form von DGYW/WRCH und WA/TC vor [117-120]. Dabei stehen laut IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) [121-123] für die entsprechenden Sequenzsymbole:

Tabelle 2: Symbolemotive nach IUPAC Nomenklatur

Sequenzmotiv und Symbole	Mögliche beinhaltete Basen
D	Guanin, Adenin Cytosin (oder Uracil)
G	Guanin
Y	Die Pyrimidinbasen Cytosin oder Thymin
W	Adenin und Thymin mit den schwachen Wasserstoffbrücken
C	Cytosin
H	Adenin, Cytosin oder Thymin (bzw. Uracil)

Basenpaarsubstitutionen von SHM führen zu einem Frameshift der Codierung die selten in Form von Deletionen und Insertionen hervorgerufen werden [124].

Neben dem Isotypen-Klassenwechsel, der somatischen Hypermutation regelt AID die Konversion der Antikörpergene (z.B. bei Hühnern). Es wird vermutet das AID bei Lymphomen Gene aktiviert und durch eine unregelte Expression T-Lymphozyten zu T-Zell-Lymphomen verändert [125] oder sich bei Hautkrebs beteiligt [126]. Erhöhte Expression des AID wurde in mehreren Entitäten beobachtet wie auch in Lymphomfälle berichtet [127]. Es wird vermutet, dass es eine protoonkogene Rolle bzw. als Onkogen seine Wirkung auf c-myc Translokationen ausübt wie beim Burkitt-Lymphom [128-132]. Andererseits wenn AID im Körper fehlt kommt es zu schweren Immundefekten durch die autosomal-rezessive Form des Hyper-IgM Syndroms vom Typ II.

Hauptsächlich findet die somatische Hypermutation in den Keimzentren der SLO statt. Die aktivierten zentroblastischen B-Zellen beginnen in den dunklen Zonen des

Keimzentrums ihre Proliferation und wandern danach als Zentrozyten in den hellen Zonen wo es von follikulären dendritischen Zellen und T_H -Zellen umgeben sind. Kommt es zu einer positiven Selektion wandert die B-Zelle außerhalb des Keimzentrums und wandeln sich entweder zu Plasmazelle oder zu B- Gedächtniszelle um. Unter bestimmten Bedingungen kann es auch außerhalb dieser Zentren zu einer Hypermutation kommen, indem aktive T-Zellen mit Hilfe von Cytokinen und CD40 an den B-Zell-Rezeptoren wirken [102].

SHM verändert die variable Region der VDJ stark. Es entstehen innerhalb einer Basenlänge von insgesamt ca. 150 bp vielfältige neue Sequenzen, die den Prozess der Antikörperbildung einzigartig machen. Die SHM endet kurz vor dem Intron Enhancer E_{μ} [133-136]. E_{μ} und Ig-Promotor bilden wichtige Grundbausteine der SHM. Versuche haben gezeigt, dass die Position dieser und weniger ihre Sequenz zum Vorteil einer SHM wirken [137-140].

Die somatische Hypermutation verschafft den Organismus eine viel höhere Antikörperaffinität zu den Erregern bzw. Antigenen aufzubauen. B-Zellen die einen niedrigaffinen Immunglobulin aufweisen werden aussortiert und eliminiert. Dieser Ablauf der Veränderungen führt die B-Zelle zur ihrer speziellen Form, die der Affinitätsreifung.

1.7 B-Zellen Aktivierung

B-Zellen starten ihre Entwicklung im Knochenmark, dort kommen sie nach einer erfolgreichen Umordnung ihrer VDJ-Rekombination als naive B-Zellen in die Blutbahn. Sie zirkulieren in der Peripherie oder kommen im lymphatischen Gewebe vor. Von ihrem Aufbau her können sie direkt mit Toxinen, Virusantigene oder auch Bakterienstrukturen sich verbinden, man spricht hier von einer T-Zell unabhängige Aktivierung, oder aber auch durch ein Signalsystem mittels T_H -Helferzellen in Kombination mit den MHC-II Molekülen und den follikulären dendritischen Zellen, der sogenannten T-Zell vermittelnde Aktivierung. Erst in ihrer ausgereiften und ausgeprägten Form, der Plasmazelle, sezernieren die reifen B-Zellen die hochspezifischen Immunglobuline. Bis dorthin müssen die Zellen eine Reihe von

Aktivierungen und Signale aufnehmen. Kommt eine B-Zelle in Kontakt mit einem fremden Antigen das gleichzeitig mit einer T_H-Helferzelle interagiert, strömt der ganze Komplex im Verbund in einem Keimzentrum. Diese haben ihren Sitz in Lymphknoten (LK) oder der Milz.

1.8 Lymphknoten und das Mikromilieu

Als offenes System erlaubt das Lymphgefäßsystem einen fortlaufenden Austausch mit seiner Umgebung. Durch ihre speziellen Filterstationen liegt das Arsenal mit über 600 Lymphknoten im ganzen Körper verteilt und hat ein erhöhtes Aufkommen an der Leisten- und Halsregion sowie am Mediastenum und den Mesenterien. Mit ihren sogenannten Wächter Lymphknoten (sentinel lymph node) überwacht und schützt das System an „markanten“ Positionen den Zustrom z.B. bei Infektionen oder freien nicht gebundenen Mikroorganismen aber auch vor Entzündungsmediatoren und bösartigen Tumoren. Im Normalfall haben die bohnenförmigen LKs eine Größe von 2-20 mm und werden von einer äußeren Hülle der Bindegewebskapsel umschlossen. Histologisch ist der Lymphknoten in einer inneren Region der Medula und einer äußeren Region dem Cortex aufgebaut [101,102]. Die Begrenzung der zwei Regionen ist unscharf. Während das Innere des Lymphknotens auf einem retikulären Bindegewebe aufbaut, sammeln sich die B-Zell-Population im Cortex und bilden das Primärfollikel. Dieses beherbergt B-Zellen in ihrer zwar ausgereiften Form aber noch naiven Phase ohne jemals mit einem Erreger oder einem Antigenkontakt gekommen zu sein. Etwas tiefer des Primärfollikels in der parafollikulären Zone und näher der Medulla hin bilden sich die parakortikalen T-Zell Regionen. Kommt es zur Aktivierung von B-Zellen wird das Primär- zum Sekundärfollikel umgewandelt in denen Plasmazellen auf ihre Oberfläche IgM- und IgD- Immunglobuline führen. Sekundärfollikel bilden in ihrer Peripherie einen charakteristischen dichten Wall den sogenannten Follikelmantel, wo ruhende naive B-Zellen im Inneren des Sekundärfollikels weiterhin von fibroblastischen Retikulum und den retikulären Fasern aufrechterhalten wird. Trifft man eine hellere Region des Keimzentrums, wo B-Zellen mittels Selektionierung und durch Hypermutationen ihre hohe Antigenaffinität erreichen, kommt es in dieser Phase der B-Zell Differenzierung zu einer Fehlentwicklung und es sterben letztere. Das

Keimzentrum wiederum enthält ein dunkleres Areal wo sich relativ große B-Zellen innerhalb von 4 Tagen sich zu differenzierte Zentroblasten ausbilden in dem sie im Primärfollikel nach einem Antigenkontakt einwandern. Die hellere Zone wiederum enthält eine Ansammlung von weiterentwickelnden Zentroblasten den etwas Kleineren mit eingekerbtem Kern und kleinen Zellfortsätzen den Zentrozyten. Diese führen auf ihre Oberfläche Immunglobuline. Im Zusammenspiel mit den FDC binden die Zentrozyten das präsentierte Antigen. 9 von 10 Zentrozyten sterben in dieser Phase ab, weil die Antigen-Verbindung schwach oder gar nicht vorhanden ist und werden von den Makrophagen des Keimzentrums verdaut. Die Zentrozyten, die es überlebt haben, führen eine starke Antigenaffinität und wandeln sich zu langlebigen Plasmazellen oder zu Gedächtnis-B-Zellen um. Neben den erwähnten Subgruppen der B-Zellen, den FDC und den Makrophagen sind CD4-positive T_{H2} Helferzellen zu finden. Diese interagieren mit den B-Zellen und sind für die Weiterentwicklung letzterer verantwortlich.

Im Primärfollikel sind neben den naiven B-Zellen auch folliculäre dendritische Zellen, die mit ihren Desmosomen verbunden sind sowie auch fibroblastische Retikulumzellen, zu finden [141]. Die Lymphknoten eines Individuums spiegeln die akuten und zurückliegenden Krankheiten wieder. Zuführende (afferente) sowie abführende (efferente) Lymphgefäße umschließen die Filterstation. Mittels der afferenten Lymphgefäße gelangen die Krankheitserreger und antigentragende Zellen ins Innere des LK. Lymphozyten aber auch dendritische Zellen werden durch den Einfluss von Chemokinen parallel ins Innere des LK gesteuert. Dabei durchwandern die Lymphozyten die HEV-Blutgefäße (high endothelial venules).

1.9 Follikuläre dendritische Zellen - FDC

FDC sind spezialisierte Zelltypen im Zentrum von Lymphknotenfollikeln. Sie bilden mit ihren langen Zellfortsätzen ein dichtes Netzwerk, das ruhende B-Zellen umschließt. Sie ermöglichen durch ihr spezielles Langzeit Antigen-Depot auf ihrer Oberfläche eine effiziente und hochaffine Antikörperantwort. Ihre Einzigartigkeit erhalten sie, indem sie natives Antigen über längere Zeit binden können. Sie spielen somit eine wichtige Rolle bei der B-Zell Aktivierung und Affinitätsreifung von Antikörpern. 1965 berichteten Mitchell und Abbot zum ersten Mal über die folliculären dendritischen Zellen, die in

Lymphknoten vorkommen [141]. In situ sind FDC nur auf ultrastrukturelle Ebene nachweisbar oder mit anti-FDC Markern sichtbar zu machen. Da es lichtmikroskopisch sehr schwer ist die FDC Zellen morphologisch zu identifizieren, wurden deren Antigenrezeptoren speziell mittels Elektronenmikroskopie und hochauflösender Autoradiographie untersucht. FDC können nicht phagozytieren [141,142,143] und behalten die Antigene auf ihrer Oberfläche. Letztendlich führte Chent et al. nach einer Reihe von detaillierten anatomischen und funktionellen Studien [144] den Namen FDC für diese spezielle Zellart ein, auch wenn es manchmal zu Verwechslungen zu mit den klassischen dendritischen Zellen (DZ) kommt. FDC besitzen kleine Zellkörper, haben einen irregulären großen Kern mit wenig Heterochromatin sowie wenige Organellen. Ihr charakteristisches morphologisches Merkmal sind ihre fadenförmigen ausgedehnten dendritischen Ausläufer, die ein starkes Netzwerk miteinander in den Primärfollikeln [145] sowie in den hellen Zonen der Keimzentren von LK bilden [144,146].

FDC Zellen stammen von Stromazellen ab [147,148] (d.h. es sind Zellen aus einem nicht hämatopoetischen System) und sind für die Entwicklung und Instandhaltung der sekundären und tertiären lymphatischen Organe unentbehrlich. Sie bilden zusammen mit den B-Zellen eine zentrale Komponente in den Follikeln der Lymphknoten und auch in der Milz und kommen auch in isolierten Follikeln des Darms vor [149]. FDC kommen auch in bestimmten chronischen Entzündungen in nicht-lymphatischem Gewebe vor. So wurden z.B. bei einer rheumatoiden Arthritis [150-153] oder auch bei Hepatitis C- Infektionen [154,155] FDC in tertiären lymphatischen Geweben (TLO) in dem auch T- und B-Zellareale, die voneinander kompartimentiert lagen, nachgewiesen [149,150,156,157].

Analysen haben gezeigt, dass FDC-Zellen wichtige Funktionen bei der B-Zellen Immunantwort steuern. So wurde nachgewiesen, dass die Freisetzung des Chemokins CXCL13 im Zusammenspiel mit Chemokin CXCR5 die B-Zellen in die Follikel attrahieren [158]. Zwischen den B-Zellen und den FDC gibt es eine offenbar eine gegenseitige Abhängigkeit. Fehlen B-Zellen in der Umgebung lassen sich auch keine FDC-Zellen identifizieren [159]. Das Lymphotoxin (LT) und der Tumor-Necrosis-Faktor (TNF) haben ihren Ursprung von den B-Zellen und agieren auf die entsprechenden Rezeptoren LTbR und TNFR1 auf der Oberfläche von FDC-Zellen und

ihren Vorläufern. Letztendlich handeln diese als potentielle Antreiber der FDC Reifung [159-166].

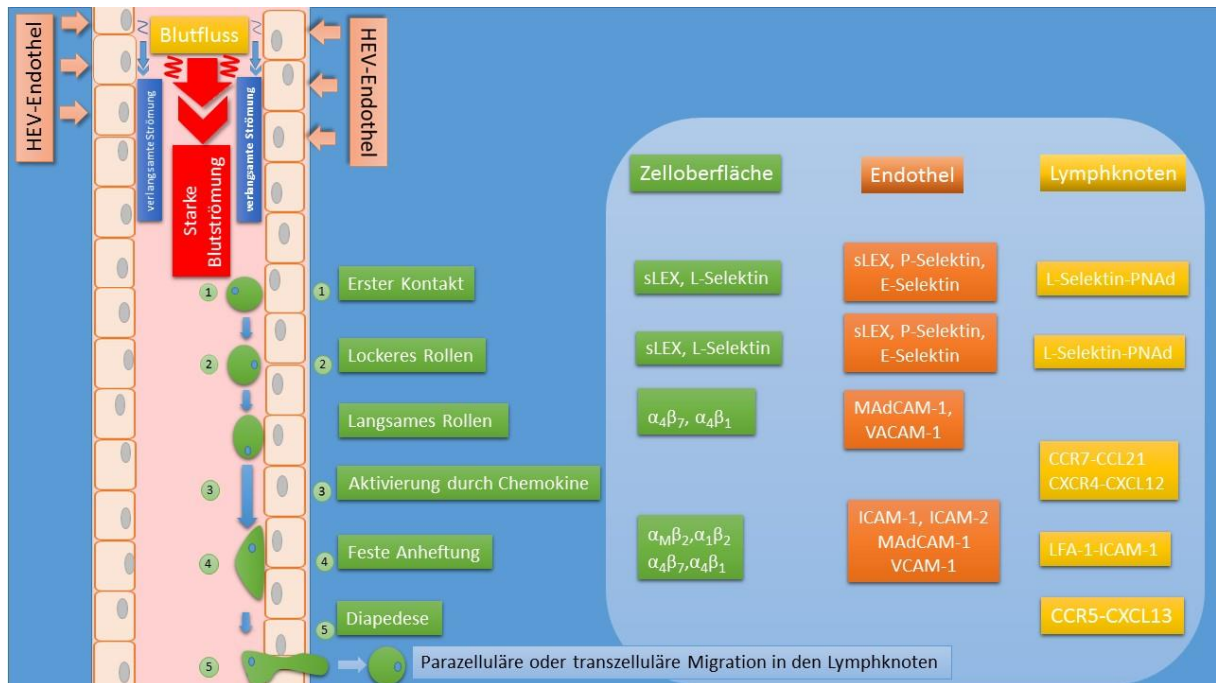


Abbildung 3: Extravasation und Homing in die peripheren Lymphknoten (Modifiziert kombinierte Abbildung nach v. Andrian und Mackay; und Cambell und Butcher;)

1.10 Hochendotheliale Venolen (HEV)

Zusammen mit den Lymphgefäßen bilden die HEV eine essentielle Struktur des Immunsystems, indem sie die Kommunikation zwischen der Blutbahn und dem Lymphknoten erlauben [167]. Das Phänomen der Diapedese, durch das Lymphozyten gezielt in den HEV den Blutstrom verlassen und in das Innere der SLO Organe gelangen können, auch „Homing“ genannt, wird durch eine Reihe von Cytokinen ermöglicht [168,169]. Cytokine sind Signalmoleküle, die die Immunantwort effektiv beeinflussen. Laut Definition sind Cytokine Proteine, die von verschiedenen Zellen (d.h. keinen spezialisierten Drüsenzellen) produziert werden können und über spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran Signale von oder auf Zellen des Immunsystems übertragen [101]. Mittels zielgerichteter Chemotaxis gelangen die

Immunzellen an ihrem Bestimmungsort im LK. Dabei werden sie von einer Art Leitsystem, den Chemokinen gesteuert, die eine Gruppe der Cytokine sind. Die aus über fünfzig Chemokinen und ihren Rezeptoren bestehenden Substanzen teilen sich in zwei Hauptgruppen, α - oder auch CXC-Chemokine und β - oder auch CC-Chemokine genannt. Darüber hinaus gibt es eine Verwandtschaft mit den γ -Chemokinen und seinen Vertretern XCL1 und XCL2 sowie das δ -Chemokin mit dem CX3CL1. Bei den Chemokinen gibt es keine enge Liganden-Rezeptor Paarung wie bei anderen Cytokinen. Es können verschiedene Chemokine an mehreren Rezeptoren binden
Funktionspezifisch bedingt splitten sich Chemokine in zwei Kategorien:
Homöostatische Chemokine können verschiedene Zellarten des Immunsystems im LK zusammenbringen, inflammatorische Cytokine leiten Lymphozyten aus der Blutbahn zu einem entzündlichen Geschehen.

1.11 Ziel der Dissertation

Ziel dieser Dissertation war zum einen die molekulare Analyse der Ausbreitung und der klonalen Evolution des „in situ folliculären Lymphoms“ als früheste mikroskopisch nachweisbare Entwicklungsstufe des FL mittels Klonalitätsanalyse, Fluoreszenz- in situ-Hybridisierung (FISH) und der FICTION Methode sowie Next Generation Sequenzierung.

Zum anderen wurde der Frage nachgegangen, inwieweit Zellen des Mikromilieus des FL, speziell die Endothelien der HEV und die FDC Teil des Tumorklons oder durch den Tumor rekrutierte reaktive Zellen sind.

2. Ergebnisse:

Titel 1: Next generation sequencing of the clonal IGH rearrangement detects ongoing mutations and interfollicular trafficking in in situ follicular neoplasia

Autoren: Perikles Kosmidis, Irina Bonzheim, Claudia Dufke, Sema Colak, Thomas Hentrich, Christopher Schroeder, Peter Bauer, Patrick Adam und Falko Fend

Veröffentlicht in PlosOne am 22 Juni 2017:

PLoS One. 2017 Jun 22;12(6):e0178503. doi: 10.1371/journal.pone.0178503.
eCollection 2017.

Abstract:

Das folliculäre Lymphom (FL) ist genetisch durch eine signifikante intraklonale Diversität von rearrangierten Immunglobulin-Schwerketten- (IGH-) Genen und eine wesentliche Zellmigrationsaktivität (follikulärer Transport) gekennzeichnet. Kürzlich wurden in situ folliculäre Neoplasien (ISFN), die durch Ansammlungen immunhistochemisch stark BCL2-positiver t (14; 18)+ klonaler B-Zellen charakterisiert sind, die in reaktiven Lymphknoten auf Keimzentren beschränkt sind, als Vorstufen-Läsion von FL mit niedrigen Werten identifiziert Risiko der Progression zu manifestem FL. Das Ausmaß der fortschreitenden somatischen Hypermutation neu arrangierter IGH-Gene und des interfollikulären Traffickings von ISFN ist nicht bekannt. In dieser Studie haben wir eine detaillierte Analyse der klonalen Evolution und Zellmigrationsmuster in einem Fall von reinem ISFN mit multiplen Lymphknoten durchgeführt. Mittels Laser-Mikrodissektion und Next-Generation-Sequenzierung (NGS) konnten wir eine signifikante intraklonale Diversität des umgelagerten IGH-Gens und eine ausgedehnte interfollikuläre Migration zwischen Keimzentren desselben Lymphknotens sowie zwischen verschiedenen Lymphknoten nachweisen. Darüber hinaus identifizierten wir N-Glycosylierungsmotive, die für FL in der CDR3-Region charakteristisch sind.

Titel 2: Lack of t(14;18) translocation in non-lymphoid bystander cells and preserved mantle zones of follicular lymphoma

Autoren: Perikles Kosmidis, Barbara Mankel, Falko Fend, Patrick Adam

Veröffentlicht in Diagnostic Pathology am 02 Mai 2018:

Diagnostic Pathology 2018 13:25 <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0703-2>

Abstract:

Die t(14;18)(q32;q21) Translokation ist das genetische Kennzeichen des folliculären Lymphoms (FL) und kann in 85-90% der Fälle beobachtet werden. Ob die Translokation auf Zellen mit Keimzentrums-B-Zell-Phänotyp beschränkt ist oder in anderen Zelltypen der Mikroumgebung beobachtet werden kann, bleibt umstritten. Von Interesse ist, dass Fälle von assoziierten histiozytischen und dendritischen Zellsarkomen, die im Hintergrund von FL auftreten, klonal verwandt sind und die t(14;18) Translokation tragen, was auf eine "Transdifferenzierung" des malignen FL-Klons in ein Neoplasma einer anderen hämatopoetischen Linie hindeutet. In dieser Studie wurde das Vorhandensein der t(14;18)(q32;q21) Translokation als Ersatzmarker für den malignen Klon in Zellen der FL-Mikroumgebung unter Verwendung von kombinierter Fluoreszenz-Immunphänotypisierung und Interphase-Zytogenetik, die auf den BCL2-Genlocus abzielte, analysiert. Zusätzlich zu den nicht-lymphoiden Zellen in FL analysierten wir FL mit konservierten IgD+ Mantelzellen und Fälle von in-situ folliculären Neoplasien (ISFN), um zu untersuchen, ob Zellen des nicht-germinalen Zentrums B-Zell-Phänotyp Teil des malignen Klons sind. Sechs (40%) von 15 manifesten FL-Fällen mit intakten IgD+ Mantelzellen beherbergten nicht die t(14;18)(q32;q21) Translokation. In allen t(14;18)+ FL-Fällen fehlte bei den folliculären dendritischen Zellen und Endothelzellen die t(14;18) Translokation. 2 von 9 FL-Fällen zeigten t(14;18)- IgD+ Mantelzone B-Zellen. In den sieben ISFN-Fällen war die Translokation von t(14;18) streng auf die Keimzentrumszellen beschränkt. Dies alles führt zur der Aussage, dass die t(14;18) Translokation beim folliculären Lymphom auf B-Zellen beschränkt ist. Der Ursprung von IgD+ Mantelzellen ist heterogen, in den meisten Fällen gehört es zum neoplastischen Klon, während eine Minderheit der Fälle von manifestem FL nicht-neoplastische Mantelzellen aufweist, ähnlich ist wie bei der ISFN.



RESEARCH ARTICLE

Next generation sequencing of the clonal *IGH* rearrangement detects ongoing mutations and interfollicular trafficking in *in situ* follicular neoplasia

OPEN ACCESS

Citation: Kosmidis P, Bonzheim I, Dufke C, Colak S, Hentrich T, Schroeder C, et al. (2017) Next generation sequencing of the clonal *IGH* rearrangement detects ongoing mutations and interfollicular trafficking in *in situ* follicular neoplasia. *PLoS ONE* 12(6): e0178503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178503>

Editor: Yolande Richard, Institut Cochin, FRANCE

Received: February 3, 2016

Accepted: March 28, 2017

Published: June 22, 2017

Copyright:© 2017 Kosmidis et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Detailed sequencing data is available from the European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena>), Study PRJEB12901.

Funding: This work was supported by the IZKF fortune program (F14.63209), University of Tu"bingen (PA, <https://www.medizin.uni-tuebingen.de/Forschung/Forschungsf%C3%B6rderung/Interne+Forschungsf%C3%B6rderung/Junior+Academy/fort%C3%BCne.html>). PK and PA were in part supported by the Karl-Thiemig-Stiftung.

Perikles Kosmidis¹, **Irina Bonzheim**¹*, **Claudia Dufke**², **Sema Colak**¹, **Thomas Hentrich**², **Christopher Schroeder**², **Peter Bauer**², **Patrick Adam**¹‡, **Falko Fend**¹‡

1 Institute of Pathology and Neuropathology, Eberhard Karls University of Tu"bingen and Comprehensive Cancer Center, University Hospital Tu"bingen, Tu"bingen, Germany, **2** Institute of Medical Genetics and Applied Genomics, University Hospital Tu"bingen, Tu"bingen, Germany

☞ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* irina.bonzheim@med.uni-tuebingen.de

Abstract

Follicular lymphoma (FL) is characterized genetically by a significant intraclonal diversity of rearranged immunoglobulin heavy chain (*IGH*) genes and a substantial cell migration activity (follicular trafficking). Recently, *in situ* follicular neoplasia (ISFN), characterized by accumulations of immunohistochemically strongly BCL2-positive, t(14;18)+ clonal B cells confined to germinal centers in reactive lymph nodes, has been identified as a precursor lesion of FL with low risk of progression to manifest FL. The extent of ongoing somatic hypermutation of rearranged *IGH* genes and interfollicular trafficking in ISFN is not known. In this study we performed an in depth analysis of clonal evolution and cell migration patterns in a case of pure ISFN involving multiple lymph nodes. Using laser microdissection and next generation sequencing (NGS) we documented significant intraclonal diversity of the rearranged *IGH* gene and extensive interfollicular migration between germinal centers of the same lymph node as well as between different lymph nodes. Furthermore, we identified N-glycosylation motifs characteristic for FL in the CDR3 region.

Introduction

Follicular lymphoma (FL) is genetically characterized by the recurrent chromosomal translocation t(14;18)(q32;q21), present in the majority of cases [1]. The germinal center

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

(GC) B-cell of origin of FL is subjected to ongoing somatic hypermutation (SHM) which results in an intraclonal sequence heterogeneity of neoplastic clones [2]. FL develops in the lymph node and infiltrates the bone marrow at an early time point of disease. Further migration of neoplastic cells between lymph nodes and bone marrow arises in both directions [3]. Due to the continuous exposure to the GC microenvironment and constitutive induced cytidine deaminase

(AID) activity, a proportion of FL show increasing intraclonal diversity of rearranged immunoglobulin heavy chain (*IGH*) genes over time as evidence of SHM, whereas a second group of cases lacks intraclonal diversity compatible with clonal outgrowth [4]. Using *IGH* subclones as markers, cellular trafficking and dissemination based on phylogenetic relationships can be documented in FL. Substantial cell migration activity (follicular trafficking) has been described as a further hallmark of this lymphoma entity [3, 5–7].

In situ follicular neoplasia (ISFN) according to the recent update of the WHO classification, previously designated follicular lymphoma *in situ* (FLIS), is defined as a population of t(14;18) +, strongly BCL2 expressing clonal B cells strictly confined to germinal center structures of reactive lymph nodes [1]. ISFN was first described as *in situ* localization of follicular lymphoma in 2002 and can be identified as accumulations of strongly BCL2-protein and CD10 expressing B-cells with low proliferation rate in germinal centers of morphologically reactive lymph nodes, without alteration of architecture or extrafollicular spread neoplastic cells. These cells are clonal by immunoglobulin gene rearrangement analysis and carry the t(14;18)(q32; q21) translocation, the hallmark of manifest FL. Although ISFN may involve several lymph nodes as in the present case, it needs to be discerned from FL with partial involvement of lymph nodes, which shows at least focal disruption of architecture and extrafollicular spread of neoplastic cells and has a much higher frequency of progression than ISFN [8]. Similarly, ISFN in association with manifest FL does not simply represent initial involvement of germinal centers by the fully developed malignant clone. In summary, ISFN is thought to represent a putative precursor lesion for FL with low propensity for development of clinically manifest FL [9, 10]. We have recently corroborated this assumption, demonstrating through genetic analysis that (1) ISFN and matched manifest FL from the same patients were always clonally related and (2) that ISFN cells show significantly less secondary numerical aberrations as compared to manifest FL [10]. Although systematic studies are lacking, it is likely that only a minor part of the ISFN lesions progress to a manifest FL [11, 12]. In a recent study we detected prototypic ISFN lesions with a prevalence of 2.3% in reactive lymphoid tissues of individuals without a history or simultaneous presence of a manifest FL [13]. In part of these patients, ISFN lesions involved multiple adjacent germinal centers of the same node or even several lymph nodes without progressing to manifest FL [13]. This is in line with other studies demonstrating that for the majority of ISFN cases no evidence of FL was found at diagnosis or during follow-up [11, 14]. ISFN may represent an intermediate stage between manifest FL and rare t(14;18) positive B-cells which can be identified in the peripheral blood of approximately 50% of healthy adult individuals [15–17]. The prevalence of these cells increases with age, and individuals carrying a higher load of circulating t(14;18)+ have a 23-fold increased risk for the development of manifest FL [18, 19].

Although the role of ISFN as precursor lesion of FL with low incidence of transformation to manifest FL seems well established, the presence of intraclonal diversity and follicular trafficking, hallmarks of manifest FL, have not been investigated so far in ISFN lesions.

The goal of our study was therefore to use a next generation sequencing (NGS) approach to analyse the extent of SHM and migration patterns in a case of ISFN manifested in multiple germinal centers of several lymph nodes in an individual without history or presence of a manifest FL.

Material and methods

Case description

In a recent screening study we have identified cases of pure ISFN involving multiple lymph nodes (LN) without manifest FL by immunohistochemical staining reactive lymph nodes from unselected consecutive surgical specimens of patients without history of malignant lymphoma

[13]. The case used for this study was one of the three identified ISFN cases in the previous study and derived from a 69-year-old man, who had undergone lobectomy for non-small cell lung cancer.

Laser microdissection

For laser microdissection, 8 μ m thick serial sections from each selected lymph node were cut. The first and every sixth slide were immunostained for the BCL2 protein to localize the ISFN lesions. The sections in between were H&E stained and not coverslipped for microdissection. Microdissection was performed using a Zeiss Axiovert 200 microscope and the P.A.L.M. system (Palm@Robo software V2.2; Zeiss Oberkochen, Germany). Only follicles with complete involvement by strongly BCL2 expressing B-cells were dissected and the laser beam was directed along the inner border of the germinal center, thus precluding contamination by reactive cells as much as possible.

Polymerase chain reaction (PCR) of *IGH* rearrangements

DNA was extracted using proteinase K digestion followed by standard phenol/chloroform purification procedures [20]. Whole tissue sections without microdissection and microdissected samples with sufficient available DNA were subjected to a comparative clonality analysis. PCR for *IGH* framework 2 (FR2) gene rearrangements was performed as previously described using 0,5 U Phusion Hot Start DNA Polymerase (Finnzymes, Woburn, MA, USA) to detect the clonal nature of the ISFN lesion [21]. Modified amplification conditions were carried out with an initial denaturation step of 98°C (30 seconds), 40 cycles (98°C 10 seconds, 60°C 30 seconds, 72°C 30 seconds) and a final step of 10 minutes. The JH primer was modified with D4 fluorescent dyes (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For Genescan analysis 0.5 μ l of the PCR products were mixed with sample loading solution containing 0.24 μ l DNA size standard 400 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The products were separated by capillary electrophoresis on the GenomeLab GeXP Genetic Analysis System and analyzed by the GenomeLab GeXP software 10.2 (Beckman Coulter, Brea, CA,

USA). Additionally, single reactions with the respective V primer were performed to identify the rearranged V gene family. To confirm the rearranged V gene family, unlabelled PCR product (using the FR1 primer [21]) of the respective clonal population was enriched by agarose gel excision according to the base pair length, sequenced as previously described [22] and analyzed using IMGT-V-Quest [23].

PCR products for next generation sequencing (NGS) analysis from microdissected follicles were generated using FR2 VH3 primers according to the modified BIOMED-2 protocol described for the GeneScan analysis above [21]. ISFN manifestations were dissected from serial sections of single follicles of one lymph node showing the most prominent lesions (eight samples), from multiple germinal centers of a region from the same lymph node pooled together (four samples) as well as from different single follicles of four further lymph nodes (four samples), resulting in altogether 16 samples.

Preparation of samples for next generation sequencing on the Illumina Genome Analyzer IIx

PCR products of the 16 samples mentioned above were purified using AMPureXP magnetic beads (Beckman Coulter). In order to introduce Illumina Sequencing Adaptors as well as individual barcodes for each sample, a two-step PCR protocol was used. In the first PCR reaction the specific PCR products were re-amplified using composed primer pairs. The forward primer encompassed at the 5' end the Illumina TruSeq Multiplexing specific adaptor sequence (containing the binding sequence for TruSeq read 1 sequencing primer) and at the 3' end the VH3 FR2 primer sequence. The reverse primer consisted at the 5' end of the Illumina Tru Seq multiplexing reverse adaptor sequence (containing the sequence for TruSeq multiplexing index-read and read 2 primers) and at the 3' end of the JH consensus primer sequence. These adaptor primers were attached following a 10 cycle protocol at an annealing temperature of 60°C using Fast Start High Fidelity PCR System (Roche). Resulting PCR-products of expected fragment length were purified with AMPureXP as described above. P5 and P7 Sequences as well as barcodes for each sample were attached in a second PCR step. Since the Illumina multiplexing system provided 12 different barcode sequences, 4 barcode sequences had to be assigned twice. The barcode addition step was carried out using Phusion High Fidelity HF PCR MasterMix (New England Biolabs). In order to purify PCR products and completely deplete the samples from primer dimers, a stringent protocol for AMPureXP was used, removing fragments shorter than 300bp. For this purpose the barcoded PCR-products were mixed with an equal volume of AMPureXP.

Quantification and quality control of the samples was monitored on a DNA 100 Chip (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent). Concentrations of the samples varied from 2.7 nM to 23.4 nM. Since four barcodes had been assigned to two samples each, two pools of samples had to be prepared. Pool #1, containing barcoded samples 1–12 was equimolar pooled to a concentration of 4 nM. Pool #2, containing samples 13–16 which were altogether higher in concentration (with barcodes 2, 4, 6 and 12) was equimolar pooled to 10nM. Following the Illumina Sequencing protocol, pools were denatured with 2 N NaOH, diluted to 6 pM and loaded on a flowcell in two different lanes. Cluster generation on the cBot (Illumina) as well

as the 2x112bp +7 PE Sequencing run on the Genome Analyzer II (GAII, Illumina) was carried out according to manufacturer's instructions. Coverage (total reads) per sample was between 143.320 and 30.528.

Sequencing data analysis

After de-multiplexing of all samples with CASAVA v1.8 (Illumina), in-house scripts were used for primer trimming and quality filtering (mandatory per base quality above 20 on a "phredlike" scale for each base). High quality reads were converted to fasta-format and unique reads with a frequency below 0.1% were considered as noise and omitted. In order to bridge the gap in the FR3 part of the sequences arising through the determined read length from forward and reverse, 44 "N" bases were introduced. These unique sequences for each sample were submitted to IMGT/V-QUEST, an integrated alignment tool for nucleotide sequences of immunoglobulins and T-cell receptors [24]. The output format included the annotation of the V-, J and D-genes and alleles, functionality, percentage of V-region identity, D- region reading frame, the amino acid sequence of the junction and the junction frame. The annotated unique sequences were then discriminated according to their similarity with the monoclonal reference sequence of the patient. Sequences differing profoundly with respect to V-, J- and D-genes and alleles as well as the junction were omitted from further analysis.

To further illustrate the genomic landscape, the selected unique sequences were submitted to ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/) for phylogenetic analysis.

Validation analyses of clonal *IGH* rearrangements

To validate sequencing of the clonal ISFN cells, six independently microdissected samples were analyzed (Foll. 1–26, Foll. 27–29, Foll. 30, LN14, LN15 and LN19) using a refined PCR approach in the NGS workflow (S1 File). In addition to evaluate the occurrence of potential PCR- or sequencing introduced errors, the diffuse large B cell lymphoma cell line HBL1 was sequenced using NGS. HBL1 was provided by Alexander Weber (Interfaculty Institute for Cell Biology, University of Tübingen, Germany), cultured [25] and processed to a formalin-fixed paraffin embedded cell block [26] as recently described. DNA isolation and NGS was performed the same way as with the ISFN samples obtained for validation.

Ethical approval

The study was approved by the Local Ethics Committee of the Eberhard-Karls-University, Tübingen (300/210B01). The need for written informed consent from the patient was waived by the local Ethics Committee since the material was obtained more than five years ago.

Results

Histological and immunohistochemical findings

All 27 lymph nodes removed for staging of non-small lung cancer were morphologically free of carcinoma infiltrates and showed a normal architecture with variable amounts of reactive germinal centers, without evidence for FL (12). Immunostaining for BCL2 protein performed on all the nodes showed extensive ISFN lesions with typical intense positive staining of germinal centers of normal size with intact mantle zones in 16 of the 27 excised staging lymph nodes, without evidence for progression to manifest FL in any of the nodes. These germinal centers additionally showed strong CD10 positivity and a low proliferation rate in MIB1 staining. Fluorescence in situ hybridization demonstrated the presence of a break in the BCL2 locus indicative of a BCL2 translocation. The extension of the ISFN lesions ranged from single, isolated to several adjacent germinal centers per lymph node. Five of the 16 lymph nodes with the highest burden of ISFN cells were used for laser microdissection.

Samples obtained for NGS

In the first step, 16 DNA samples were obtained by microdissection for NGS analysis. Eight samples resulted from microdissection of single follicles (Foll. 30, Foll. 31, Foll. 35, Foll. 36; Foll. 37, Foll. 38, Foll. 39 and Foll. 40). Eight additional samples were gained either by pooling of several single microdissected follicles (Foll. 1–26, Foll. 27–29, Foll. 32–33 and Foll. 41–43) from lymph node 16, or all available ISFN-containing follicles of a single node were pooled in one sample (LN 9, 14, 15 and 19) ([Fig 1](#)).

Sequencing results of single follicles 30, 31, 35 and 36, pooled follicles 1–26, 27–29, and 41–43 (LN16), LN14, LN15 and LN19 were suitable for further analyses (see below), whereas single follicles 37, 38, 39, 40, pooled 32–33 and LN9 were excluded from further investigations as detailed below.

Identification of the clonal *IGH* sequence

PCR based amplification of the *IGH* VDJ rearrangement using FR2 region primers and a JH primer from the whole tissue sections resulted in a reproducible peak of 268 bp with prominent polyclonal background in the GeneScan analysis ([Fig 2A](#)). The analysis of the microdissected tissue yielded a double peak of 265 and again 268 base pairs length. Sanger sequencing of the clonal product identified a productive V3-23 *IGH* gene rearrangement (D2-21/J4; [S1 Fig](#)). This sequence was subsequently identified in next generation sequencing (NGS) as read id 24. Eight of the ten additionally analyzed microdissected specimens with sufficient DNA for comparative clonality analysis showed a clonal product of 268 base pairs. In two of the

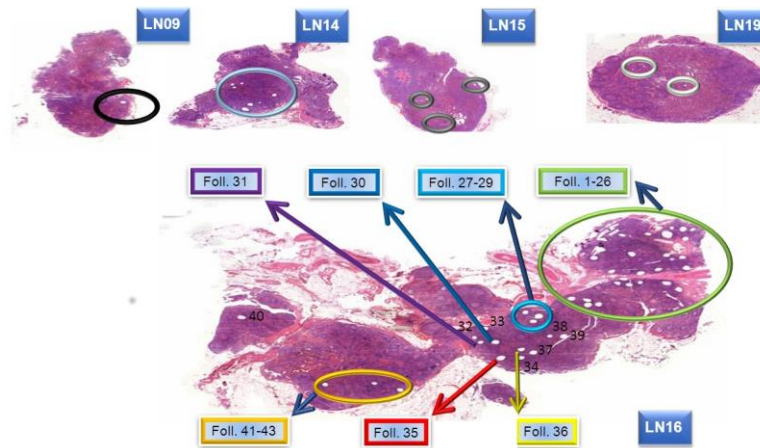


Fig 1. Overview of sample collection. H&E stained lymph nodes 9, 14, 15, 16 and 19 after microdissection with the highlighted areas from which the microdissections of ISFN-containing follicles were performed. The holes caused by microdissection are in part clearly visible.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178503.g001>

evaluable specimens products of different length were detected, probably derived from contaminating B-cells (Fig 2B).

NGS of the clonal *IGH* rearrangement

Deep sequencing and filtering of low-quality sequences of the 16 samples yielded from 13351 to 143320 sequence reads/sample, respectively (Fig 3A). Unique sequences were filtered according to the similarity of their CDR3-region compared to the monoclonal reference sequence (S1 Fig) previously generated by Sanger Sequencing of pooled DNA from all available microdissected follicles and were designated as clone-specific reads, comprising 25.4% of all specific *IGH* FR2 reads. Altogether 97 unique clone-specific sequences with similar CDR3 regions (S2 Fig) were available for characterization of the ISFN lesions. These amino acid sequence sequences showed very similar sequence motifs in their CDR3 regions (S3 Fig). The remaining 74.6% of total read sequences resembled productive *IGH* rearrangements, but CDR3 nucleotide and amino acid sequences did not show any similarity from the reference sequence and thus were regarded as being derived from contaminating reactive B-cells. The latter group of sequences was omitted from further analysis. The ISFN-specific reads showed a significant rate of point mutations (up to 12.7%) with clustering in the CDR2 and CDR3 region (S2 Fig).

Five of 16 samples were considered not evaluable concerning the clonal *IGH* rearrangements, since no ISFN-specific reads were detectable (samples from the single follicles, 38, 39 and 40, from the pooled follicles 32–33 and from the adjacent lymph node 9). One follicle (follicle 37) yielded only 645 (0.4%) ISFN-related reads (data not shown) and was also excluded from further analysis. The remaining 10 specimens contained between 3.4% and 85.6% clonal reads of the ISFN sequence, consisting of productive and unproductive rearrangements (0–

19.7% unproductive rearrangements respectively) (Fig 3A and 3B).

The yield of reads corresponding to the clonal ISFN population varied considerably and showed an inverse correlation to the amount of dissected and pooled tissue, e.g. the single microdissected follicle 35 contained 46.7% relevant reads, whereas the analysis of follicles 1–26 pooled into a single sample yielded only 4.2% relevant reads, indicating a higher percentage of contaminating B-cells as could be expected (Fig 3B).

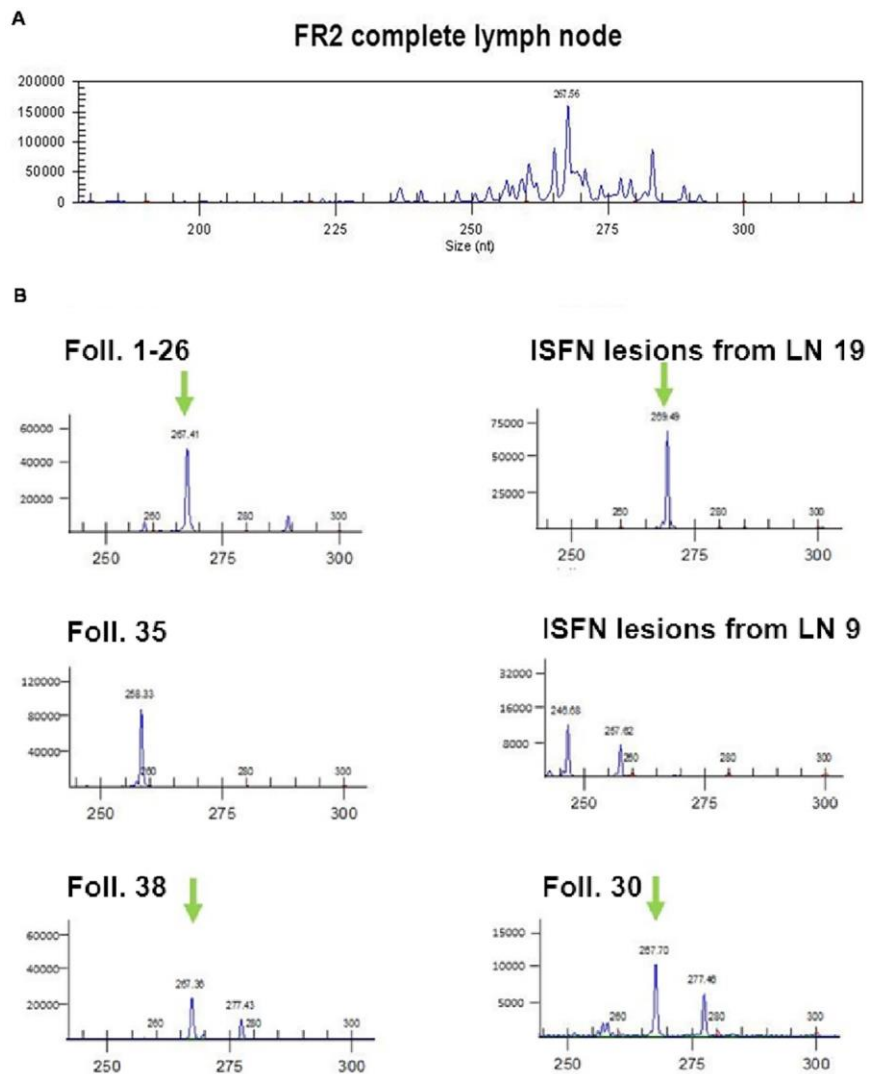


Fig 2. *IGH* clonality analysis of analysed follicles. A) Electropherograms of VDJ rearrangement clonality analysis using the framework 2 (FR2) primer set show a clonal product of 268 base pairs size. DNA from complete lymph node section. B) Electropherograms of six microdissected samples containing single or pooled ISFN lesions which showed products by fragment analysis based PCR amplification. Green arrows indicate the clonal 268 base pair products.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178503.g002>

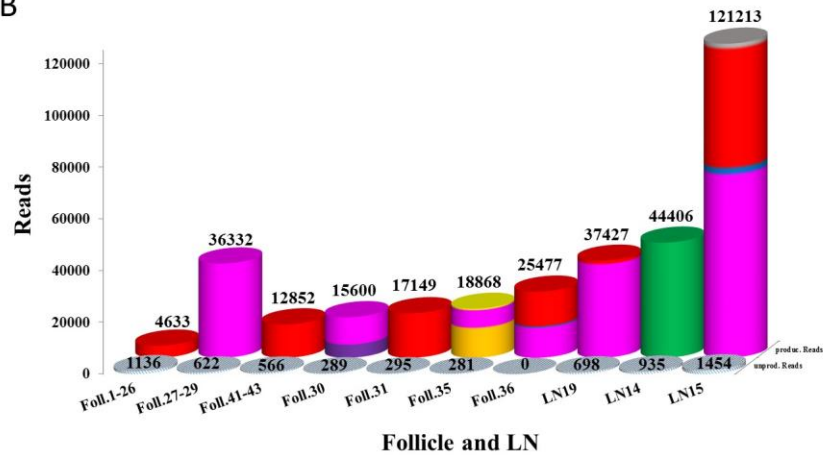
ISFN cells show ongoing somatic hypermutation and signs of antigen selection

The ISFN-specific sequences showed significant variations as evidence of ongoing somatic hypermutation. To follow interfollicular trafficking and dissemination of ISFN cells a phylogenetic tree was calculated based on the amino acid sequence similarities of the CDR3 region. The 95 relevant sequences could be assigned to eleven groups (G1-G11: 1–31 sequences per group) ([Fig 3C](#)), with three reads from follicle 37 not closely related to the eleven groups. The phylogenetic tree illustrates that the G3 group is genetically closest to the germ line sequence (alleles IGH V3-23, D2-21, J4) and therefore represents the origin of the genealogical tree of the tumor clone. The increasing number of additional mutations (V region identity/variation to germline sequence of the Sanger sequence: 87,5% ([S1 Fig](#)); spectrum of variations between

A

Foll./LN	Total Reads	% of specific Reads	% of unrelated Reads	Groups
Foll. 1-26	137410	3.37	0.83	1
Foll. 27-29	74506	48.76	0.83	2
Foll. 41-43	30528	42.10	1.85	1
Foll. 30	56243	27.74	0.51	2+3
Foll. 31	68648	24.98	0.43	1
Foll. 35	40993	46.03	0.69	4+2+5
Foll. 36	68218	37.35	0.00	2+1+6
LN 19	13351	28.07	0.50	1+2
LN 14	87133	4.21	1.07	7
LN 15	143320	84.58	1.01	2+1+8+6

B



C

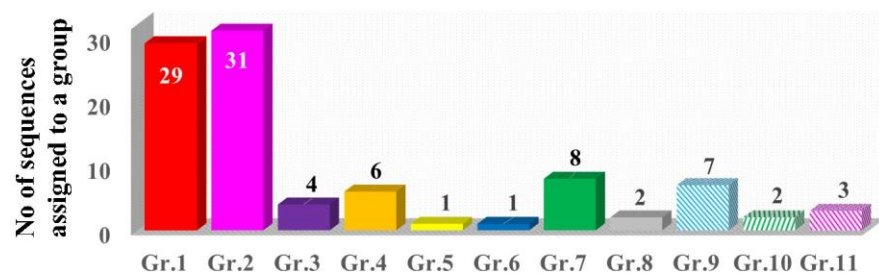


Fig 3. Identification of ISFN-associated reads and read groups. A) Table of the samples according to their total reads, percentage of specific and nonspecific reads and their groups. B) Numbers of specific reads which were identified in the different samples. Productive rearrangements are depicted as coloured bars indicating the assignment to the cluster groups; grey bars indicate unproductive rearrangements. In five samples no specific reads were identified. C) All specific reads clustered into 11 groups of identical CDR3 amino acid sequence based on sequence similarities. Columns indicate the number of respective sequences which are assigned to a group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178503.g003>

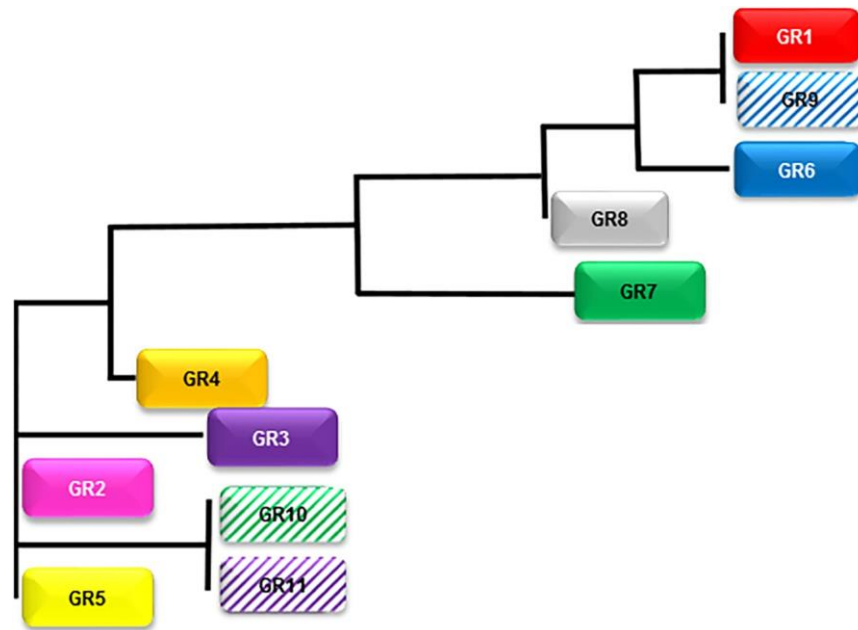


Fig 4. Phylogenetic tree of the eleven sequence groups. Spatial distance of the groups corresponds to the number of diverging base pairs. Dotted line indicates further distant relation to the three single sequences, which could not be assigned to the eleven groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178503.g004>

Sanger sequence and ISFN-related reads 0,5–30% (1–55 mutations)) allowed the description of the genetic distance of the different groups of the phylogenetic tree and identified follicle 37 as being farthest from the ancestral clone (Fig 4, S3 and S4 Figs).

To exclude that the variations of the clonal ISFN sequence were due to PCR- or sequencing-introduced errors, validation was performed by sequencing independent microdissected samples. Of eight analyzed samples, in three an accumulation of clonal reads of G1 (24%, 94%) and G2 (14%) were detected (data not shown). The remaining samples only contained nonrelated sequences attributed to contaminating reactive B-cells. Additionally, NGS of DNA obtained from the formalin-fixed and paraffin-embedded HBL1 cell line resulted in 135928 reads which clustered in 9 read groups. 78% of reads showed an identical sequence, whereas the other 8 groups were separated only by single nucleotide substitutions (S5 Fig).

To see whether the ISFN cells showed signs of antigen selection, R/S mutation ratios were determined for the complete sequence between the CDR1 region and the JH segment obtained by Sanger sequencing derived from the whole section. The ratio of R/S mutations was 11 in the CDR regions, whereas in FR regions the ratio was 1.8 (data not shown). In addition, the eight NGS sequence groups showing productive rearrangements contained the previously described structural feature of FL cells, a sequence motif which acts as acceptor sites for N-addition of glycan chains (Asn-X-Ser/Thr) (S6 Fig) [27].

ISFN cells show significant interfollicular migration

Topographic allocation of sequence cluster groups to the dissected follicle structures exhibited significant interfollicular trafficking. Representatives of the different sequence cluster groups were detected with varying frequency not only in adjacent follicular structures but also in different lymph nodes, with G2 followed by G1 detected with the highest frequency. Reads of both clusters were found in adjacent follicles as well as in different lymph nodes, whereas clusters G5, G6 and G8 were restricted to a sole localization.

Discussion

As a germinal center neoplasm, FL is subjected to ongoing somatic hypermutation of the rearranged immunoglobulin genes, which can be used to delineate clonal evolution and migration patterns of neoplastic cells. In this study of a case of ISFN with multiple involved lymph nodes, we demonstrate that the hallmarks of FL, ongoing somatic hypermutation and interfollicular trafficking are readily detectable in this pre-clinical stage of a genetically less advanced FL precursor.

These data corroborate the hypothesis that ISFN is the first identifiable FL precursor lesion in tissue context and represents the putative link with clonal B-lymphocytes carrying the chromosomal translocation t(14;18)(q32;q21) in the peripheral blood of healthy adult individuals. Although these cells were originally believed to belong to the naïve B cell subset, it was demonstrated more recently, that in fact the t(14;18) translocation is carried by low-affinity memory B cells of GC origin, sharing genotypic and phenotypic features with FL and prone to constitute a premalignant FL niche [28, 29]. It was suggested that these t(14;18)-positive cells proliferate in response to antigens and that persistent antigenic stimulus is necessary for maintenance of these clones, requiring repeated cycles of GC re-entry. In addition to continuous BCR signalling, the acquisition of acceptor sites for N-addition of glycan chains (Asn-X-Ser/ Thr) could result in alternative mechanisms of survival signalling through lectin-mediated interactions with the local environment or bacterial antigens [27, 30–32]. However, experimental evidence from tissue-based studies supporting this hypothesis have been largely lacking so far.

In our study, using a combination of conventional sequencing for identification of the dominant clonal *IGH* rearrangement, next generation sequencing to track somatic hypermutation, and microdissection to analyse topographically distinct regions we were able to document significant clonal evolution, as well as trafficking of ISFN cells between involved nodes. “Ongoing” mutations served to perform a phylogenetic analysis. The detected ISFN *IGVH* sequences clustered in eight genetic clusters with productive rearrangements and 3 clusters with unproductive rearrangements consisting each of 1–33 different sequences detected with different incidence rates in the eleven samples analyzed. Since we worked with routinely formalin-fixed and paraffin-embedded archival tissues, demonstration that the observed variability of the clonal sequence truly represents clonal evolution rather than technical artifacts is of crucial importance. We therefore used two different strategies for validation of our results. Firstly, by performing NGS of the rearranged *IGH* gene of the DLBCL cell line HBL1 lacking ongoing mutations for comparison, we could demonstrate that even after paraffin embedding only very few single substitutions arise in a

minority of reads which probably represent artifacts. As mainly G>A or C>T transitions were detected, it can be assumed that these artifacts are the result of formalin fixation which promotes deamination of cytosine residues [33]. Since the frequency of base changes observed in the ISFN was several-fold higher compared to the HBL1 cell line, we assume that at least the majority of them represent true clonal evolution. Furthermore, sequencing of independently microdissected involved follicles again identified the most prominent read groups G1 and G2, confirming the dissemination of the clonal ISFN cells, and validated the detection of ongoing mutations. As expected, unproductive clonally related reads were also identified in the different samples, albeit at lower numbers, possibly reflecting a disadvantage for the B-cell carrying this V_H sequence. By mapping the different sequences back to the microdissected areas, we were able to show a significant amount of migration between different follicles and lymph nodes.

These findings have several implications for our understanding of the precursor stages of FL. In line with a case report which demonstrated clonal relationship between circulating FL-like B-cells and ISFN in a single patient [34], our finding of clonal B-cells with an identical or closely related position on the genealogical tree in different lymph nodes support the notion that ISFN cells can migrate and thus alternate between tissue and peripheral blood. This indicates that ISFN is not a locally restricted clonal expansion, but rather a tissue stage of preneoplastic t(14;18)+ B-cells possibly induced to accumulate locally by an antigenic stimulus [12, 34]. On the other hand, the varying proportions of different sequence groups in the investigated areas, with some clones restricted to a single area may indicate that single colonized germinal centers in ISFN seeded by circulating FL-like B-cells may exhibit local clonal expansions not apparent in other areas, although our study is probably not extensive enough to reveal the full scope of clonal evolution and interfollicular and internodal trafficking. Nonetheless, the presence of significant follicular trafficking in ISFN is similar to manifest FL [5], whereas the lymphocyte migration rate between different germinal centers is low under physiological conditions in non-neoplastic lymph nodes [35].

Another interesting finding of our study is the fact that all eight cluster groups showing the same productive CDR3 amino acid sequences also contained the sequence motif N-X-S/T, which previously had been shown as a characteristic of FL, which can serve as glycosylation sites [27, 30–32, 36]. This finding is in line with a recent case study of ISFN and clonally related manifest FL, which identified N-glycosylation motifs in the rearranged sequence, indicating that already at this early stage of FL development, mechanisms to bypass the need of a high affinity BCR are already active and may secure the long-term survival of the clone [37]. This further supports the active role of the germinal center microenvironment in the preservation and perhaps expansion of the premalignant clone and could indicate that immune processes resulting in the formation of reactive germinal centers in regional nodes may provide a homing ground for circulating t(14;18)+ cells.

Although we were not able to sequence the whole rearranged *IGHV* sequence from the microdissected follicles for technical reasons, NGS analysis detected an accentuation of point mutations in the CDR2 and CDR3 regions with a lower mutation rate in the FR regions as an indication for antigen selection. The same was true when we analyzed the whole *IGVH* sequence obtained from Sanger sequencing of enriched, but not laser-microdissected ISFN.

In addition, similar to previous investigations of manifest FL, the R/S ratio in the FR regions was below 2.845, which is the inherent mean value of the R/S ratio for human germline V_H genes [38]. This indicates that the structure of the BCR is preserved irrespective of the total number of somatic mutations and suggests that a functional BCR has been important for cell survival during the early stages of clonal evolution [2]. Another potential selection mechanism discussed by Zuckerman et al. is selection of mutated IGV sequences towards preservation of the structural integrity rather than specific antigen binding [36].

In summary, our study documents for the first time significant intraclonal diversity and extensive interfollicular and internodal migration of preneoplastic precursor cells of FL on the tissue level and indicates, that the mechanisms of clonal evolution of the rearranged V_H gene are already active in ISFN. Further studies are warranted to elucidate the mechanisms of progression of ISFN on the genetic level.

Supporting information

S1 Fig. Sanger sequencing of the clonal ISFN *IGH* product. DNA of microdissected follicles was amplified using V_{H3} -FR1 and J_H consensus primers as previously described [21] and subjected to Sanger sequencing to confirm the clonal V3 rearrangement detected by GeneScan analysis. A productive *IGH* rearrangement V3-23/D2-21/J4 was identified using IMGT/V-QUEST [24].

(TIF)

S2 Fig. Alignment of all ISFN-specific reads. First sequence is the Sanger sequence of pooled DNA from all available follicles, which was used to identify specific reads. Framed nucleotides indicate somatic hypermutations. (TIF)

S3 Fig. Phylogenetic tree of sequence groups based on amino acid sequence similarities of the CDR3 region. Phylogenetic tree of the eleven sequence groups showing the amino acid sequence of the CDR3 regions (calculated amino acids sequences are modified from IMGT/V-QUEST [24]). Colored labels were assigned to each group and groups of unproductive rearrangements labels are striped. (TIF)

S4 Fig. Phylogenetic tree of read sequences of the ISFN clone. Phylogenetic tree of the 97 specific read sequences. Colored labels were assigned to each group and groups of unproductive rearrangements are shaded. Double crosses indicate further distant relations. (TIF)

S5 Fig. Alignment of *IGH* rearrangement sequences of the cell line HBL1. NGS of the HBL1 cell line yielded 135928 reads which clustered in 9 read groups. A minority of sequences (22%) from eight groups showed single substitutions in comparison to the first group of identical sequences (78%). (TIF)

S6 Fig. Identification of glycosylation sites. Amino acid sequences of the CDR3 region of the eight cluster groups which were composed of productive rearrangements. The frame indicates the sequence motif which acts as acceptor site for N-addition of glycan chains (Asn-X-Ser/ Thr).

(TIF)

S1 File. Supporting methods. (DOCX)

Author Contributions

Conceptualization: FF PA PB.

Data curation: CD CS PK IB.

Formal analysis: CD IB.

Funding acquisition: PA.

Investigation: PK IB CD CS SC.

Methodology: PB CD CS IB.

Project administration: FF PA PB.

Resources: FF PB.

Software: CS TH.

Supervision: FF PA IB PB.

Validation: PK IB CS CD.

Visualization: PK CD CS.

Writing – original draft: PK IB.

Writing – review & editing: PA FF CD CS.

References

1. Swerdlow S.H. CE, Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. (Eds.). World Health Organization Classification of Tumours. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2008.
2. Aarts WM, Bende RJ, Steenbergen EJ, Kluin PM, Ooms EC, Pals ST, et al. Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. *Blood*. 2000; 95(9):2922–9. PMID: [10779440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10779440/).
3. Wartenberg M, Vasil P, zum Bueschenfelde CM, Ott G, Rosenwald A, Fend F, et al. Somatic hypermutation analysis in follicular lymphoma provides evidence suggesting bidirectional cell migration between lymph node and bone marrow during disease progression and relapse. *Haematologica*. 2013; 98 (9):1433–41. Epub 2013/04/16. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.074252> PMID: [23585531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23585531/); PubMed Central PMCID: PMC3762101.
4. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007; 21 (1):18–29. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404426> PMID: [17039231](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17039231/).
5. Adam P, Schoof J, Hartmann M, Schwarz S, Puppe B, Ott M, et al. Cell migration patterns and ongoing somatic mutations in the progression of follicular lymphoma. *Cytogenet Genome Res*. 2007; 118(2– 4):328–36. Epub 2007/11/15. <https://doi.org/10.1159/000108317> PMID: [18000387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18000387/).
6. Bahler DW, Levy R. Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(15):6770–4. PMID: [1495966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1495966/).
7. Cleary ML, Meeker TC, Levy S, Lee E, Trela M, Sklar J, et al. Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. *Cell*. 1986; 44(1):97–106. PMID: [3079673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3079673/).

8. Adam P, Katzenberger T, Eifert M, Ott MM, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, et al. Presence of preserved reactive germinal centers in follicular lymphoma is a strong histopathologic indicator of limited disease stage. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29(12):1661–4. Epub 2005/12/06. PMID: [16327439](#).
9. Bonzheim I, Salaverria I, Haake A, Gastl G, Adam P, Siebert R, et al. A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma *in situ* to manifest follicular lymphoma. *Blood*. 2011; 118(12):3442–4. Epub 2011/09/24. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07368944> PMID: [21940830](#); PubMed Central PMCID: PMC3179408.
10. Schmidt J, Salaverria I, Haake A, Bonzheim I, Adam P, Montes-Moreno S, et al. Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from *in situ* to manifest t(14;18)-positive follicular lymphoma. *Leukemia*. 2014; 28(5):1103–12. Epub 2013/10/25. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.307> PMID: [24153014](#).
11. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES. *In situ* localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood*. 2002; 99(9):3376–82. Epub 2002/04/20. PMID: [11964306](#).
12. Montes-Moreno S, Castro Y, Rodriguez-Pinilla SM, Garcia JF, Mollejo M, Castillo ME, et al. Intrafollicular neoplasia/*in situ* follicular lymphoma: review of a series of 13 cases. *Histopathology*. 2010; 56 (5):658–62. Epub 2010/05/13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03529.x> PMID: [20459579](#).
13. Henopp T, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Adam P. Prevalence of follicular lymphoma *in situ* in consecutively analysed reactive lymph nodes. *Histopathology*. 2011; 59(1):139–42. Epub 2011/07/21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03897.x> PMID: [21771030](#).
14. Jegalian AG, Eberle FC, Pack SD, Mirvis M, Raffeld M, Pittaluga S, et al. Follicular lymphoma *in situ*: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma. *Blood*. 2011; 118 (11):2976–84. Epub 2011/07/20. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-355255> PMID: [21768298](#); PubMed Central PMCID: PMC3175777.
15. Dolken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol*. 1996; 14(4):1333–44. Epub 1996/04/01. PMID: [8648392](#). <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.4.1333>
16. Schuler F, Hirt C, Dolken G. Chromosomal translocation t(14;18) in healthy individuals. *Semin Cancer Biol*. 2003; 13(3):203–9. Epub 2003/09/10. PMID: [12959351](#).
17. Roulland S, Navarro JM, Grenot P, Milili M, Agopian J, Montpellier B, et al. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2006; 203 (11):2425–31. <https://doi.org/10.1084/jem.20061292> PMID: [17043145](#); PubMed Central PMCID: PMC2118129.
18. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(19):8910–4. Epub 1994/09/13. PMID: [8090743](#); PubMed Central PMCID: PMC44716.
19. Roulland S, Kelly RS, Morgado E, Sungalee S, Solal-Celigny P, Colombat P, et al. t(14;18) Translocation: A predictive blood biomarker for follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014; 32(13):1347–55. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.52.8190> PMID: [24687831](#).
20. Sotlar K, Escribano L, Landt O, Mohrle S, Herrero S, Torrelo A, et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *The American journal of pathology*. 2003; 162(3):737–46. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63870-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63870-9) PMID: [12598308](#); PubMed Central PMCID: PMC1868096.
21. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17(12):2257–317. Epub 2003/12/13. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202> PMID: [14671650](#).
22. Adam P, Baumann R, Schmidt J, Bettio S, Weisel K, Bonzheim I, et al. The BCL2 E17 and SP66 antibodies discriminate 2 immunophenotypically and genetically distinct subgroups of conventionally BCL2-"negative" grade 1/2 follicular lymphomas. *Hum Pathol*. 2013. Epub 2013/05/07. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.02.004> PMID: [23642737](#).

23. http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/.
24. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(Web Server issue):W503–8. Epub 2008/05/27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn316> PMID: 18503082; PubMed Central PMCID: PMC2447746.
25. Anastasov N, Bonzheim I, Rudelius M, Klier M, Dau T, Angermeier D, et al. C/EBPbeta expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica.* 2010; 95(5):760–7. Epub 2009/12/18. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.014050> PMID: 20015877; PubMed Central PMCID: PMC2864382.
26. Koch I, Slotta-Huspenina J, Hollweck R, Anastasov N, Hofler H, Quintanilla-Martinez L, et al. Real-time quantitative RT-PCR shows variable, assay-dependent sensitivity to formalin fixation: implications for direct comparison of transcript levels in paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol.* 2006; 15(3):149–56. Epub 2006/08/26. <https://doi.org/10.1097/01.pdm.0000213450.99655.54> PMID: 16932070.
27. Stevenson FK, Stevenson GT. Follicular lymphoma and the immune system: from pathogenesis to antibody therapy. *Blood.* 2012; 119(16):3659–67. Epub 2012/02/18. <https://doi.org/10.1182/blood-201111-367730> PMID: 22337721.
28. Roulland S, Faroudi M, Mamessier E, Sungalee S, Salles G, Nadel B. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. *Adv Immunol.* 2011; 111:1–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385991-4.00001-5> PMID: 21970951
29. Sungalee S, Mamessier E, Morgado E, Gregoire E, Brohawn PZ, Morehouse CA, et al. Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression. *J Clin Invest.* 2014; 124(12):5337–51. <https://doi.org/10.1172/JCI72415> PMID: 25384217; PubMed Central PMCID: PMC4348942.
30. Schneider D, Duhren-von Minden M, Alkhatib A, Setz C, van Bergen CA, Benkisser-Petersen M, et al. Lectins from opportunistic bacteria interact with acquired variable-region glycans of surface immunoglobulin in follicular lymphoma. *Blood.* 2015; 125(21):3287–96. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11609404> PMID: 25784678; PubMed Central PMCID: PMC4482265.
31. Zhu D, McCarthy H, Ottensmeier CH, Johnson P, Hamblin TJ, Stevenson FK. Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood.* 2002; 99(7):2562–8. Epub 2002/03/16. PMID: 11895794.
32. Coelho V, Krysov S, Ghaemmaghami AM, Emara M, Potter KN, Johnson P, et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(43):18587–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009388107> PMID: 20937880; PubMed Central PMCID: PMC2972945.
33. Spencer DH, Sehn JK, Abel HJ, Watson MA, Pfeifer JD, Duncavage EJ. Comparison of clinical targeted next-generation sequence data from formalin-fixed and fresh-frozen tissue specimens. *J Mol Diagn.* 2013; 15(5):623–33. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.05.004> PMID: 23810758; PubMed Central PMCID: PMC2972945.
34. Cheung MC, Bailey D, Pennell N, Imrie KR, Berinstein NL, Amato D, et al. In situ localization of follicular lymphoma: evidence for subclinical systemic disease with detection of an identical BCL-2/*IGH* fusion gene in blood and lymph node. *Leukemia.* 2009; 23(6):1176–9. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.9> PMID: 19212334.
35. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature.* 1991; 354(6352):389–92. Epub 1991/12/05. <https://doi.org/10.1038/354389a0> PMID: 1956400.
36. Zuckerman NS, McCann KJ, Ottensmeier CH, Barak M, Shahaf G, Edelman H, et al. Ig gene diversification and selection in follicular lymphoma, diffuse large B cell lymphoma and primary central nervous system lymphoma revealed by lineage tree and mutation analyses. *International immunology.* 2010; 22 (11):875–87. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq441> PMID: 21059768.

37. Mamessier E, Drevet C, Broussais-Guillaumot F, Mollicella ML, Garciaz S, Roulland S, et al. Contiguous follicular lymphoma and follicular lymphoma *in situ* harboring N-glycosylated sites. *Haematologica*. 2015; 100(4):e155–7. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.115782> PMID: [25527563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25527563/); PubMed Central PMCID: PMC4380740.
38. Chang B, Casali P. A sequence analysis of human germline Ig VH and VL genes. The CDR1s of a major proportion of VH, but not VL, genes display a high inherent susceptibility to amino acid replacement. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995; 764:170–9. PMID: [7486517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7486517/).

2.1.1 Supporting information

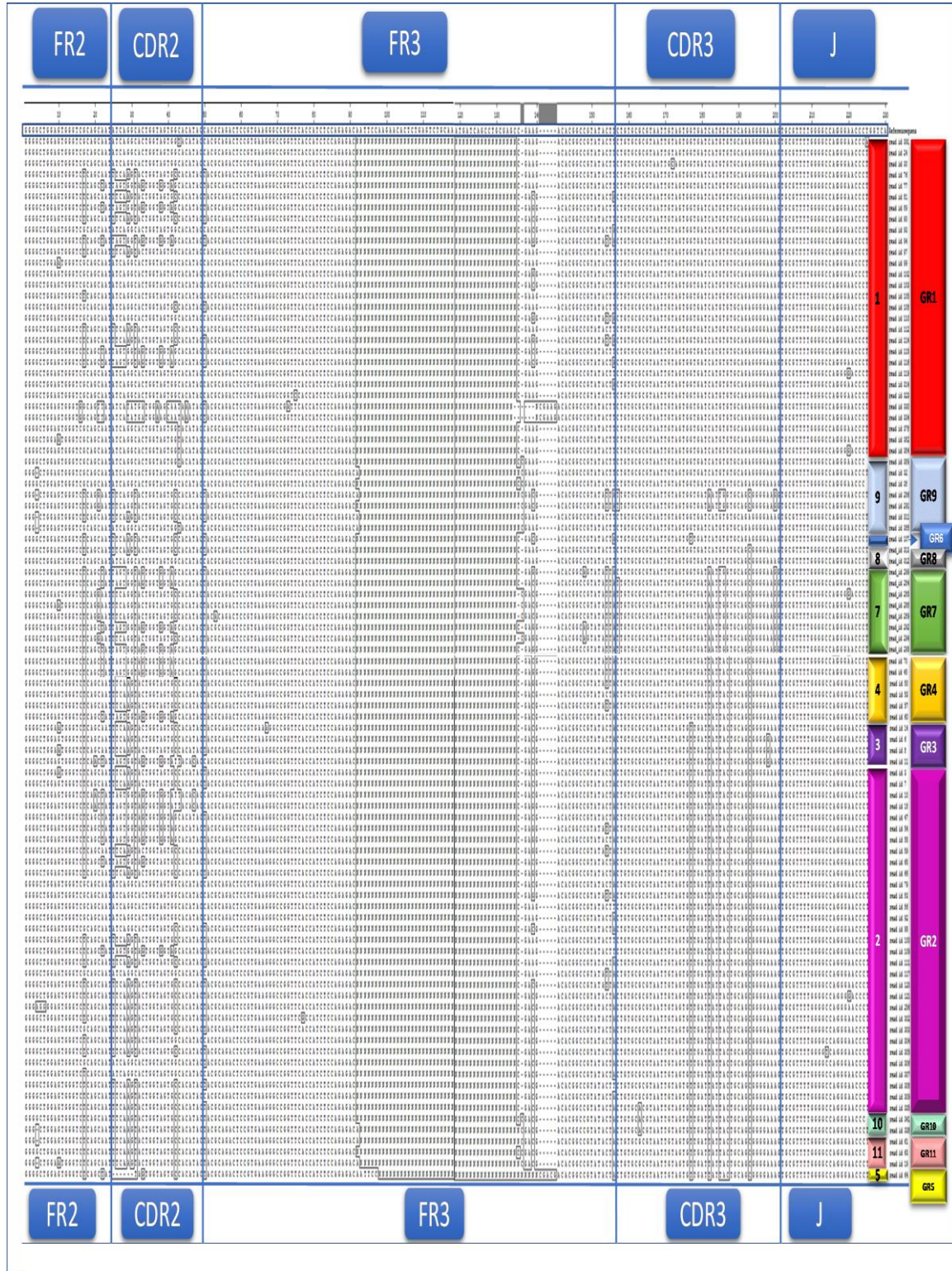
S1 Fig. Sanger sequencing of the clonal ISFN IGH product. DNA of microdissected follicles was amplified using V_H3-FR1 and J_H consensus primers as previously described [21] and subjected to Sanger sequencing to confirm the clonal V3 rearrangement detected by GeneScan analysis. A productive *IGH* rearrangement V3-23/D2-21/J4 was identified using IMGT/V-QUEST [24].

>Seq

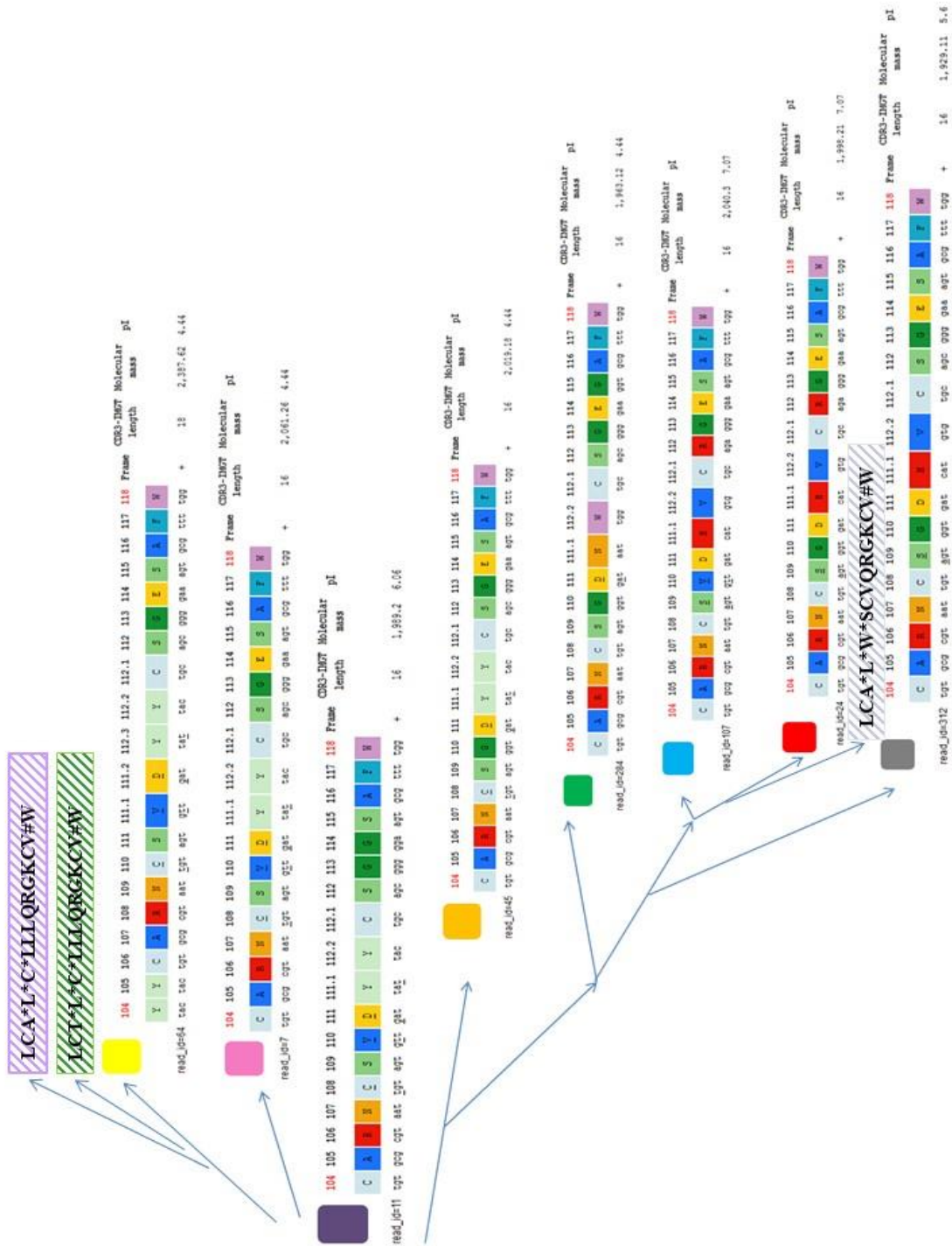
```
catatttaaaactttgcatgaagtgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtg
ggtcgcagcaatatcaggcactggtagtggcacataccacgcagactccgtgaagggccg
gttcaccatctccagagacaattccaagaacactctgagtctgcaaatgatcagcctgcg
agcccgaagacacggccgtatacttctgtgcgcgtaattgtagtggtgatcatgtgtgcag
aggggaaagtgcgttttggggccaggaaccctggtcaccgtctcctcaggt
```

Result summary:	Productive IGH rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	Homsap IGHV3-23*05 F	score = 801	identity = 87.50% (182/208 nt)
J-GENE and allele	Homsap IGHJ4*02 F	score = 150	identity = 79.17% (38/48 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	Homsap IGHD2-21*01 F	D-REGION is in reading frame 2	
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[X.17.38.11]	[6.8.16]	CARNCSGDHVCRGESAFW

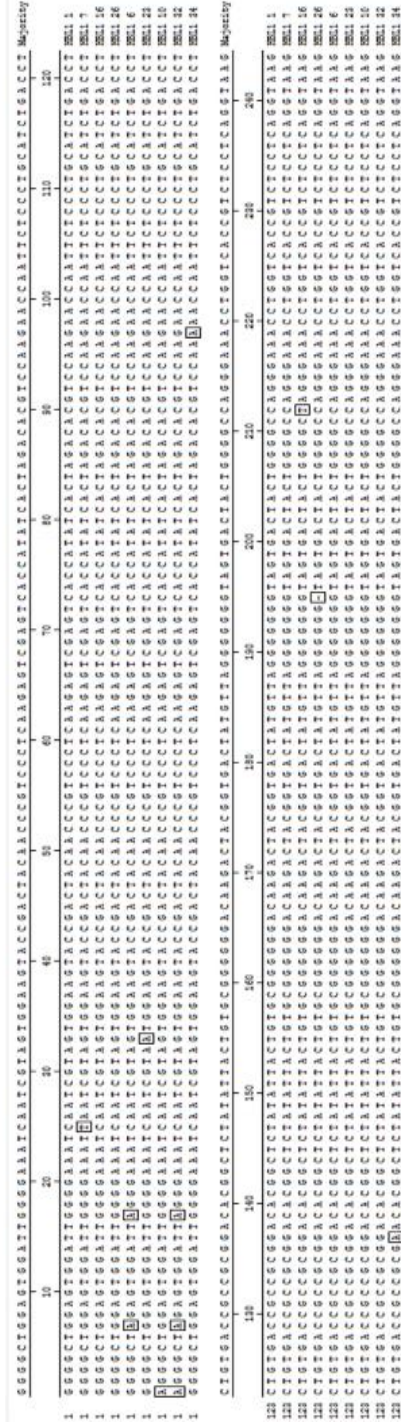
S2 Fig. Alignment of all ISFN-specific reads. First sequence is the Sanger sequence of pooled DNA from all available follicles, which was used to identify specific reads. Framed nucleotides indicate somatic hypermutations.



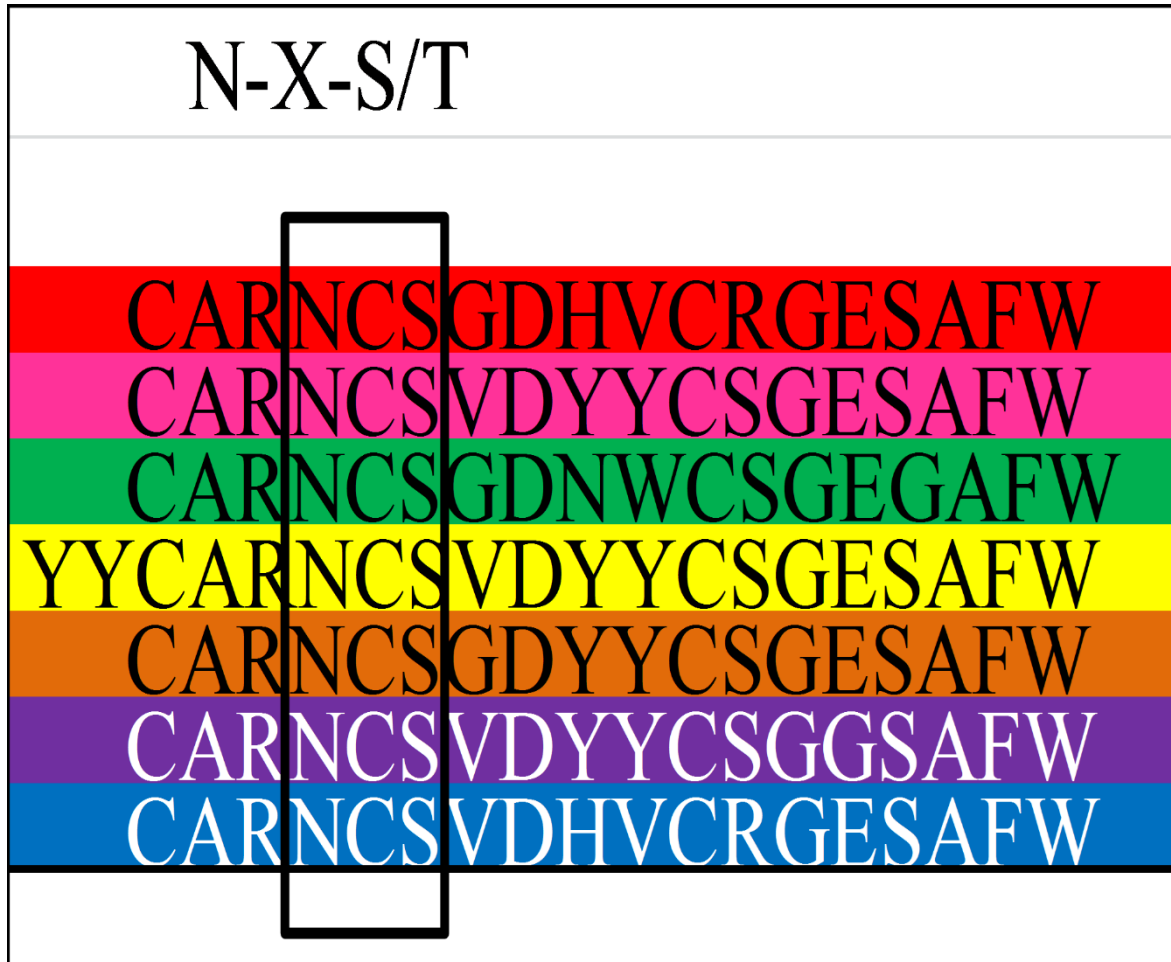
S3 Fig. Phylogenetic tree of sequence groups based on amino acid sequence similarities of the CDR3 region. Phylogenetic tree of the eleven sequence groups showing the amino acid sequence of the CDR3 regions (calculated amino acid sequences are modified from IMGT/ V-QUEST [24]). Colored labels were assigned to each group and groups of unproductive rearrangements labels are striped.



S5 Fig. Alignment of *IGH* rearrangement sequences of the cell line HBL1. NGS of the HBL1 cell line yielded 135928 reads which clustered in 9 read groups. A minority of sequences (22%) from eight groups showed single substitutions in comparison to the first group of identical sequences (78%).



S6 Fig. Identification of glycosylation sites. Amino acid sequences of the CDR3 region of the eight cluster groups which were composed of productive rearrangements. The frame indicates the sequence motif which acts as acceptor site for N-addition of glycan chains (Asn-X-Ser/Thr).



Supporting Information

S1 File: Supporting methods

Validation analyses of clonal *IGH* rearrangements

PCR products of *IGH* rearrangements of eight independently microdissected samples (Foll. 1-26, Foll. 27-29, Foll. 30, Foll.32-33, Foll. 40, LN14, LN15 and LN19) were generated using Fluidigm-tailed primers (Fluidigm_F: 5'-ACACTGACGACATGGTTCTACA-3' and Fluidigm_R: 5'-TACGGTAGCAGAGACTTGGTCT-3') with the BIOMED-2 protocol [1]. PCR products were subsequently purified using Agencourt AMPure XP reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) according to the manufacturer's manual. In a second PCR step NGS sequencing adapters and barcodes (Barcode Sequences for Access Array Barcode Library for Illumina 'Sequencers- 384, Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) were added to the PCR products. PCR was performed using 1 µl of 1:10 diluted first PCR product in a final volume of 20 µl with 0.2 µM of each primer, 0,2 mM dNTPs, 1.8 mM MgCl₂ and one Unit Fast Start High Fidelity Enzyme Blend (Roche, Rotkreuz, Schweiz). Cycling conditions entailed an initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 10 cycles of denaturation (95°C for 15 sec), annealing (60°C for 30 sec) and elongation (72°C for 60 sec), with a final elongation at 72°C for 3 min. PCR products were purified a second time using Agencourt AMPure XP reagent. Using different barcodes the samples were equimolarly pooled to 14 nM.

Sequencing was performed on a MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) in paired-end mode according to the manufacturer's protocol (MiSeq V2 chemistry 400 cycles). Sequencing data analysis was done as described in the methods part of the article.

S1 Fig:

Sanger sequencing of the clonal ISFN *IGH* product.

DNA of microdissected follicles was amplified using V_H3-FR1 and J_H consensus primers as previously described [1] and subjected to Sanger sequencing to confirm the clonal V3 rearrangement detected by GeneScan analysis. A productive *IGH* rearrangement V3-23/D2-21/J4 was identified using IMGT/V-QUEST® [2].

S2 Fig:

Alignment of all ISFN-specific reads.

First sequence is the Sanger sequence of pooled DNA from all available follicles, which was used to identify specific reads. Framing of nucleotides indicate somatic hypermutations.

S3 Fig:

Phylogenetic tree of sequence groups based on amino acid sequence similarities of the CDR3 region.

Phylogenetic tree of the eleven sequence groups showing the amino acid sequence of the CDR3 regions (calculated amino acids sequences are modified from IMGT/V-QUEST® [2]). Colored labels were assigned to each group and groups of unproductive rearrangements labels are striped.

S4 Fig:

Phylogenetic tree of read sequences of the ISFN clone.

Phylogenetic tree of the 97 specific read sequences. Colored labels were assigned to each group and groups of unproductive rearrangements are shaded. Double crosses indicate further distant relations.

S5 Fig:

Identification of glycosylation sites.

Amino acid sequences of the CDR3 region of the eight cluster groups which were composed of productive rearrangements. Framing indicates the sequence motif which acts as acceptor site for N-addition of glycan chains (Asn-X-Ser/Thr).

1. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-317. Epub 2003/12/13. doi: 10.1038/sj.leu.2403202

2403202 [pii]. PubMed PMID: 14671650.

2. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):W503-8. Epub 2008/05/27. doi: gkn316 [pii]

10.1093/nar/gkn316. PubMed PMID: 18503082; PubMed Central PMCID: PMC2447746.

RESEARCH

Open Access



The t(14;18) translocation is absent from endothelial and follicular dendritic cells of follicular lymphoma (FL) and shows heterogeneous presence in preserved FL mantle zones

Perikles Kosmidis, Barbara Mankel, Falko Fend[†] and Patrick Adam^{**}

Abstract

Background: The translocation t(14;18)(q32;q21) is the genetic hallmark of follicular lymphoma (FL) and can be observed in 85–90% of cases. Whether the translocation is restricted to cells with germinal center B-cell phenotype or can be observed in other cell types of the microenvironment remains debated. Of interest, cases of associated histiocytic and dendritic cell sarcomas arising in the background of FL have been shown to be clonally related and carry the t(14;18), suggesting a “transdifferentiation” of the malignant FL clone into a neoplasm of a different hematopoietic lineage.

Methods: We analyzed the presence of the t(14;18)(q32;q21) as a surrogate marker of the malignant clone in cells of the FL microenvironment using combined fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics targeting the BCL2 gene locus. In addition to non-lymphoid cells in FL, we analysed FL with preserved IgD⁺ mantle zones and cases of in situ follicular neoplasia (ISFN) to investigate whether cells of non-germinal center B-cell phenotype are part of the malignant clone.

Results: Six (40%) of 15 manifest FL cases with preserved IgD⁺ mantle zones did not harbour the t(14;18)(q32;q21) translocation. In all t(14;18) + FL cases, follicular dendritic cells and endothelial cells lacked the t(14;18) translocation. 2/9 FL revealed t(14;18)- IgD⁺ mantle zone B-cells. In the seven ISFN cases, the t(14;18) translocation was strictly confined to germinal center cells.

Conclusions: The t(14;18) translocation in follicular lymphoma is limited to B-cells. The origin of IgD⁺ mantle cells is heterogeneous, in the majority of cases belonging to the neoplastic clone, whereas a minority of cases of manifest FL show nonneoplastic mantle zones, similar to ISFN.

Keywords: T(14;18), Microenvironment cells, Follicular lymphoma

* Correspondence: patrick.adam@uni-tuebingen.de

[†]Equal contributors

Institute of Pathology and Neuropathology and Comprehensive Cancer Center (CCC), Eberhard-Karls-University Tübingen, Liebermeisterstr. 8, 72076 Tübingen, Germany



Background

Follicular lymphoma (FL) is characterized in the majority of cases by the recurrent chromosomal translocation t(14;18)(q32;q21), which brings the BCL2 gene on chromosome 18 under the influence of the IgH promoter on chromosome 14, resulting in a constitutive overexpression of the antiapoptotic BCL2 protein [1]. Although this genetic hallmark of FL is known for decades, it is still a matter of debate whether the translocation resides in cells other than the neoplastic population with a germinal center B-cell phenotype.

The observation of non-lymphoid neoplasms, e.g. tumors of dendritic cells occurring in patients with follicular lymphoma sharing the chromosomal translocation t(14;18)(q32;q21), the genetic hallmark of FL, suggested a “transdifferentiation” of the malignant FL clone into a neoplasm of a different lineage or origin of the two neoplasms from a single precursor cell [2]. This and subsequent observations provided evidence for a common clonal origin of FL and dendritic cell neoplasms and it has been concluded that some sort of “lineage plasticity” may also occur in mature lymphoid neoplasms. This concept was further supported by the observation of clonal gene rearrangements of the immunoglobulin heavy or light chain gene in nearly half of the cases of sporadic histiocytic/dendritic cell sarcomas [3]. In the same study, one of the 23 cases analyzed, also harbored the t(14;18).

Also in the setting of a transformation of FL into a diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) repeatedly a syn- or metachronous manifestation of a histiocytic / dendritic cell sarcoma (H/DCS) has been observed [4]. Again, in these cases the t(14;18) could be detected in the DLBCL, in the H/DCS transformed cell population, as well as in the underlying FL component. Interestingly, very recently, the spectrum of transdifferentiation has been expanded again by the observation of two cases of clonally related FL and Langerhans cell neoplasms [5]. Also in these cases, immunoglobulin gene and BCL2 rearrangement analyses confirmed the clonal relationship between the FL and the Langerhans cell neoplasm.

An alternative explanation for transdifferentiation is the origin of these neoplasms from a common pluripotent progenitor cell. In a study of B-cell lymphomas, among them 14 FL, the lymphoma-specific recurrent genetic imbalances were detected by FISH in the endothelial cells of the tumor-associated vascular structures [6]. In all of the 14 FL cases, the t(14;18)(q32;q21) and in some cases further aberrations like trisomy 5 and/or 7 were detected with an incidence rate between 18 and 80% in endothelial cells [6]. Although cytogenetic abnormalities in tumor-associated endothelial cells have also been reported for other tumor types, the occurrence of lymphoma-specific translocations in stromal cells is still controversial [7, 8].

A related question is, whether the t(14;18) translocation occurs in FL only in B-cells of germinal center phenotype or can also be identified in other B-cells within involved nodes. In the earliest morphological detectable stage of FL, the so-called “in situ follicular neoplasia” (ISFN), defined as immunohistochemically detectable strongly BCL2 expressing B-cells within the germinal center structures of otherwise reactive lymph nodes, it is assumed that only the BCL2+ GC cells carry the translocation. Therefore, the aims of this study were 1) to determine the presence of the t(14;18) in the adjacent mantle zone of ISFN and manifest FL with detectable IgD+ mantle zone cells, and 2) to analyze the presence of the t(14;18) in endothelial and follicular dendritic cells of manifest FL using combined immunofluorescence and FISH (FICTION).

Methods

Case selection

Sixteen FL cases (WHO grade 1/2) with intact mantle zones identifiable in routine H&E staining and seven ISFN cases from the archives of the Institute of Pathology of the University of Tübingen, Germany, from which sufficient tissue was available, were included in the study. Cases were re-evaluated using H&E and Giemsa stains and standard diagnostic immunohistochemistry. The grading of FL was performed following the recommendations of the 2016 update World Health Organization (WHO) classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [1]. The study was approved by the local ethics committee.

Immunohistochemical analysis

All FL cases were stained for CD20 (DAKO, Hamburg, Germany; dilution 1:500), CD10, CD23 (both Novocastra, Berlin, Germany; both dilution 1:30) CD3 (DCS, Hamburg, Germany; dilution 1:100), BCL6 (Zytomed, Berlin, Germany; dilution 1:25), MIB1 (Ki67; DAKO, Hamburg, Germany; dilution 1:200) and BCL2 (clone 100/D5 against residues aa 41–54; DAKO, Hamburg, Germany; dilution 1:50). Cases that were negative in the staining with BCL2 (100/D5) were additionally stained with the two alternative BCL2 antibodies clone E17 (Zytomed, Berlin, Germany; dilution 1:50, against residues aa 61–76) and SP66 (Cell Marque, Rocklin, California, USA; dilution 1:100, against the N-terminal portion of the protein). Cases of “in situ follicular neoplasia” (ISFN) were stained with BCL2 (100/D5) and MIB1. Immunohistochemical staining was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections on an automated immunostainer (Ventana Medical Systems®, Tucson AZ, USA) following the manufacturer’s protocols.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

In all FL and ISFN cases, the presence of the chromosomal translocation t(14;18) (q32;q21) was analyzed by

fluorescence in situ hybridization (FISH), using a breakapart probe for the BCL2 gene locus (Vysis LSI BCL2 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe, Abbott Molecular, Wiesbaden, Germany), according to manufacturer's instructions. A detailed description of the FISH and data analysis is given in the FICTION method part below.

Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for the investigation of neoplasms (FICTION)

In this study, FICTION, used as a combination of immunohistochemistry for the cell typing and FISH (fluorescence in situ hybridization) for the detection of the t(14; 18), was carried out on 4- μ m-thick paraffin sections. For the identification of mantle zone B-cells, endothelial cells and follicular dendritic cells, we used IgD (DAKO, FLEX polyclonal Rabbit Anti-Human IgD, Cat.-No.: A0093), CD34 (Clone DBEnd-10, DAKO Denmark, Code M7165), and clusterin antibodies (Apolipoprotein J) (Novocastra™/LEICA MICROSYSTEMS, Newcastle, UK).

Paraffin sections were de-waxed (3 \times times for 10 min in Xylene) and rehydrated (2 \times times for 5 min in ethanol). Endogenous peroxidase activity was blocked using 3% H₂O₂ for 10 min. After antigen retrieval by pressure cooking in sodium citrate buffer (pH 6.0) for 3.5 min and rinsing with TBS (pH 7.4), the slides were incubated for 3 min at 37 °C with 250 μ l/ml Pepsin (Sigma-Aldrich/ Merck, Sant-Louis/Missouri, Cat. No.: P6887, Pepsin stock solution 25 mg/ml, pepsin final working solution 250 μ g/ml diluted in 37 °C pre-heated sodium chloride). After treatment with blocking solution for 15 min primary antibody incubation for 60 min at room temperature was performed. All antibody mixes, including the secondary antibodies, were diluted with

For IgD staining, a dilution of 1: 400 was used for the preparation of the antibody mix and a total volume of 800 μ l was applied per slide. Thus, 2 μ l of IgD antibody plus 798 μ l of antibody diluent were used for the IgD mix.

For the clusterin staining a dilution of 1: 30, for the CD34 staining a dilution of 1: 50 was used. The secondary antibodies were labelled with Cy™2 and Cy™3 antibodies. The dilution of the Rabbit Anti-Mouse Cy™3 antibody was 1: 25 and the Goat Anti-Mouse Cy™2 and Cy™3-labelled antibodies were used in a 1: 50 dilution (Table 1).

After incubation of the secondary antibody, the slides were washed in graded alcohol series and dried on air. Before the application of the Vysis LSI BCL2 dual color break apart rearrangement probe (Abbott Molecular/ Vysis, Illinois/USA, Cat. No.: 05 N51-020) was denatured for 5 min at 73 °C. After applying the probe and sealing the coverglass with Fixogum, a rubber cement special adhesive (Fixogum, Tamm/Germany, Cat. No. 290117000), the mixture was incubated in a humid chamber (ThermoBrite from Abbott Molecular/Vysis, Cat. No. 07 J91-020) for 17 h at 37 °C. On the second day, adhesive and coverglass were carefully removed and the slides were washed with 2xSSC at room temperature for 5 min. After an additional wash step with the detergent 0.3% NP-40 at 73 °C in a 2xSSC solution, a final washing with pure 2xSSX was carried out for 5 min to remove the non-(specific)-bound probe. After quick dehydration series in ethanol and air-dried the fluorescence dye DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, component of the BCL2 probe kit from Abbott/Vysis) was used for counter-staining.

Appropriate positive controls from FL and negative controls from hyperplastic tonsils were evaluated simultaneously. In a translocation negative cell the expected signal pattern is two orange/green (yellow) fusion signals.

Primary Ab	Source	Dilution	Incubation Time	Secondary Ab	Source	Dilution	Incubation Time	Conjugated with
Polyclonal Ab Rabbit anti-Human IgD Code: A0093	DAKO/Agilent Technolo.	1:400	60 min/RT	Goat anti Rabbit IgG (H + L)	Jackson ImmunoResearch (Dianova distrib.)	1:25	60 min/RT	Cy™3, Code:111-165-144
mAb Mouse anti-Human CD34 Class II Clone QBEnd-10 Code: M7165	DAKO/Agilent Technolo.	1:50	60 min/RT	Goat anti Mouse IgG (H + L)	Jackson ImmunoResearch (Dianova distrib.)	1:50 1:25 1:50	60 min/RT	Cy™2, Code:115-228-003 Cy™3, Code:115-165-003 Alexa Flour ^o 488, Code: 115-545-003
mAb Mouse anti-Human IgG1 kappa Clusterin (Apolipoprotein J) Code: NCL-CLUSTERIN	Novocastra (LEICA distribut.)	1:30	60 min/RT	Goat anti Mouse IgG (H + L)	Jackson ImmunoResearch (Dianova distrib.)	1:50 1:25 1:50	60 min/RT	Cy™2, Code:115-228-003 Cy™3, Code:115-165-003 Alexa Flour ^o 488, Code: 115-545-003

Table 1 Primary and secondary antibodies for the FICTION method

the ready to use Antibody Diluent from DAKO/Agilent Technologies (Cat. No. S0809).

Translocation positive cells showed one separated orange and

green signal pair in addition to an intact fusion signal of the second allele.

The cut-off value for the presence of the t(14;18) was calculated with 10%. The evaluation of the signals was carried out using a Zeiss Axio Scope A1 microscope (HXP 120C) (Zeiss, Oberkochen, Germany). The fluorescence filters used for the two signals from the FISH for spectrum green and orange were Cyanine Cy™2 (excitation = 493 nm / emission = 519 nm), Indocarbocyanine Cy™3 dye (excitation = 550 nm / emission = 570 nm) and DAPI (excitation = 350 nm / emission = 470 nm).

For the evaluation as a first step the intensity of the immunostaining of the respective case was compared to the controls. Several high power fields (600× magnification) were screened and the IgD-, CD34- and clusterinpositive cells, respectively were evaluated. A total of at least 100 positively stained cells containing both signal types and a DAPI stained cell nucleus were evaluated per case. Analyses of all cases were performed in triplicates.

For photo documentation the supplied Zeiss software and the Zeiss Monochromator camera (Zeiss, Oberkochen, Germany) were used.

Results

Fifteen cases of FL grade 1/2 with a predominant follicular growth pattern and morphologically and phenotypically detectable IgD+ mantle zone structures without IgD expression in the neoplastic germinal centers were included in the analysis (Fig. 1a-c). Of these 15 cases, 6 (=40%) cases were immunohistochemically negative for BCL2 and did not harbour the t(14;18) in the FISH analysis. The remaining 9 FL cases and seven additional cases of “in situ” follicular neoplasia (ISFN) are the group of interest in this study. FISH

analysis using a BCL2 break-apart probe demonstrated a BCL2 break in these 9 cases and in all seven ISFN cases. The cases had the characteristic FL phenotype with positivity for CD20, CD10 and BCL6. CD23 staining showed only the disrupted networks of follicular dendritic cells but was negative in the tumor cells.

FICTION analysis of mantle zones in “in situ” follicular neoplasia (ISFN)

All seven ISFN cases showed clearly detectable breaks in the BCL2 gene locus in the FISH analysis (Fig. 1f). These breakage events were strictly confined to the neoplastic cells inside the germinal center structures and matched the pattern of distribution of immunohistochemically strongly BCL2 protein expressing Bcells (Fig. 1e). The cells of the mantle zone only showed fused signals, indicating intact BCL2 gene loci without evidence of a t(14;18).

FICTION analysis of t(14;18) + positive FL cases with preserved mantle zones

The FICTION analysis allowed a very precise definition of IgD positive mantle zone cells. These cells showed a split with the dual color BCL2 gene locus probe in seven of the nine cases evaluated (=78%), indicating a BCL2 gene break in these cells as a surrogate marker for the t(14;18) (Fig. 2a, b). In contrast, in the remaining two cases IgD+ mantle cells showed only fused signal pairs, thus indicating intact BCL2 gene loci in contrast to the IgD- B-cells of the neoplastic germinal centers.

Absence of BCL breaks in non-lymphoid cells of FL

CD34 staining decorated endothelial structures of which mostly the small calibre vessels (high endothelial venules)

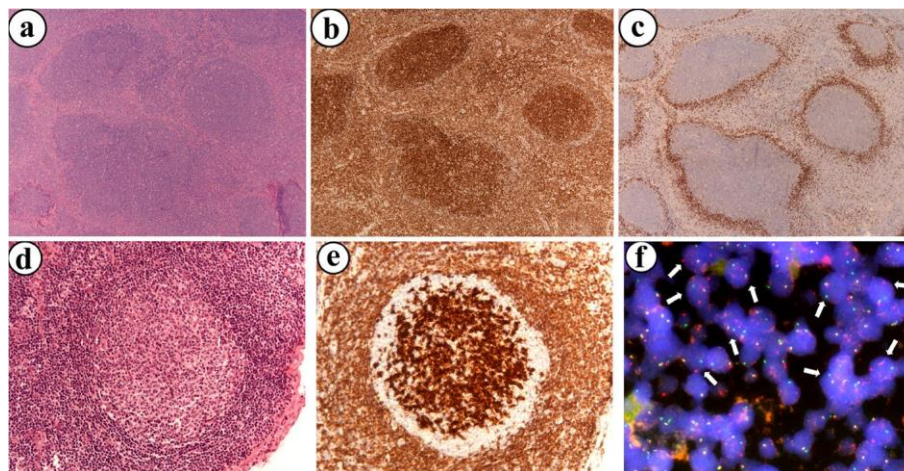


Fig. 1 Follicular lymphoma case for representative demonstration (a-c) with H&E staining (a), BCL2 (b) and IgD (c) staining, respectively (Original magnification × 400). Representative morphologic and immunohistochemical findings of the in situ neoplasia case (c-e): Haematoxylin & Eosin (H&E) staining (d) and BCL2 immunohistochemistry (e) Original magnification × 400). The chromosomal translocation t(14;18) was detectable in the in situ neoplasia cells using the FICTION technique (f) Original magnification × 1000)

were evaluable. In all cases analysed, these cells did not show any breaks in the BCL2 gene locus (Fig. 2c, d).

Staining for clusterin allowed for the identification of follicular dendritic cells. Again, none of these cells showed a signal splitting indicative for the presence of the t(14;18) translocation (Fig. 2e, f).

Discussion

The presence of the t(14;18) translocation in nonlymphoid cells in FL has been described more than a decade ago, using a similar technical approach as our study [6]. This finding,

microenvironment in FL. Our study indicates that the t(14;18) translocation is confined to B-cells and usually does not occur in stromal cells of involved lymph nodes. In addition, we demonstrate that IgD+ follicle mantle cells in a minority of manifest FL cases are non-neoplastic B-cells, similar to the situation in ISFN.

Using the FICTION approach we were able to simultaneously identify the lineage of the respective cells by fluorescence immunohistochemistry and the presence of a break in the BCL2 gene locus, indicative for a t(14;18) by fluorescence in situ hybridization (FISH) [10, 11]. FICTION

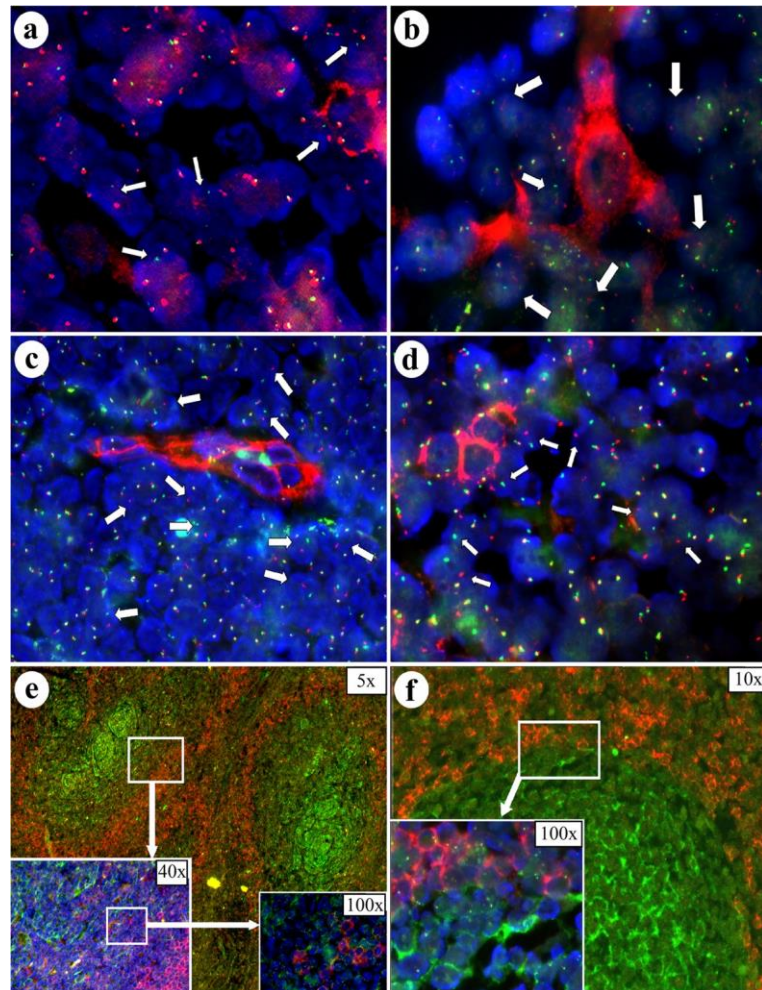


Fig. 2 a, b FICTION technique: FISH method in combination with immunohistochemical IgD staining. Well identifiable hybridization signals in the IgD+ cells as well as in the IgD- neighborhood, here with t(14;18) translocations (arrows) (Original magnification $\times 1000$ a,b). c FICTION with t(14;18) translocations (arrows) in the vicinity of single or clusters of CD34 stained cells, each without translocation t(14;18) (Original magnification $\times 600$ (c,d)). e, f Combined FICTION method of simultaneously stained IgD (red) and clusterin (green) cells f) Original magnification: $\times 200/\times 1000$ (e,f) each). Arrows show translocated signals

however, has to our knowledge not been addressed further by other groups. The more recent description of clonally related cases of histiocytic and dendritic cell neoplasms in patients with follicular lymphoma sharing the t(14;18) translocation [2, 5, 9] has prompted us to re-evaluate the presence of the t(14;18) translocation in non-lymphoid cells of the

is a powerful technique [12–14], which has been used extensively in haematopoietic malignancies, e.g. to identify BCL6 imbalances in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma [15] or 14q32 chromosomal rearrangements in multiple myeloma [16].

Given the fact that several cases of FDC sarcomas with t(14;18) translocation in FL patients have been described, we used clusterin as selective and effective marker for FDCs [11] in our analysis. While the surrounding FL cells clearly showed the characteristic split signals, the clusterin positive follicular dendritic cells only harboured fused signal pairs, indicating intact BCL2 gene loci. This finding indicates that FDC are not normally part of the malignant clone but are recruited by the neoplastic germinal center B-cells. For cases with clonally related dendritic cell neoplasms, one can hypothesize that either true transdifferentiation occurs, or that both FDC sarcoma and FL arise from a common progenitor cell carrying the t(14;18) translocation.

In the study mentioned above, not only dendritic cells, but also endothelial cells were found to carry the t(14; 18) translocation in all of the 14 included FL cases, with a frequency between 18 and 80% of cells [6]. However, using FICTION with an anti-CD34 staining to detect endothelial cells within the neoplastic follicles, we again were not able to identify BCL2 gene locus breaks in these cells. The reason for this discrepancy is not clear, but case selection or technical aspects such as superimposed B-cells or section artefacts may play a role.

A second question addressed in our study was the extent to which B-cells with a non-germinal center phenotype in FL are part of the malignant clone. In order to select cases with clearly discernible separate B-cell populations, we identified cases of manifest FL with partially preserved IgD+ follicle mantle zones. As controls, we used cases of ISFN, which are regarded as a precursor lesion consisting of t(14;18)+, BCL2-expressing B-cells restricted to germinal centers of morphologically reactive lymph nodes. In concordance with this definition, we did not find B-cells with BCL2 breaks in the mantle zones of the 7 cases of ISFN studied in our series.

Of interest, 6 of 15 (40%) FL cases with morphologically intact IgD+ mantle zones were immunohistochemically negative for the BCL2 protein and also did not harbour the t(14;18) in the FISH analysis, a negativity rate higher than expected for conventional FL grade 1/2, with a 10–15% reported in the literature [10], although we took care to exclude FL mimics, such as nodal marginal zone lymphoma. In the remaining 9 cases of manifest FL with t(14;18) translocation, the FICTION analysis allowed a precise identification of the mantle zone cells by their distinctive IgD positivity in the immunofluorescence staining (Fig. 2a, b). In 7 of 9 cases, the IgD+ mantle zone cells harboured a t(14;18) and therefore were part of the tumor clone.

In two of nine IgD+ cases the cells of the mantle zone only showed fused signal pairs, thus indicating intact BCL2 gene loci without evidence of a t(14;18), similar to the situation in ISFN. Although there was no obvious morphological or phenotypical difference between the cases with t(14;18)-

positive and negative mantle zone cells, our findings indicate that both mantle zone B-cell-like differentiation, as well as preservation of preexistent non-neoplastic mantle zones can occur in FL.

Conclusions

In summary, our data do not provide evidence for the frequent presence of the t(14;18) in non-lymphoid cells of FL. Whereas mantle zone cells in ISFN usually are reactive B-cells, and the BCL2 translocation is restricted to germinal center B-cells, IgD+ mantle cells in manifest FL usually, but not always are part of the malignant clone.

Abbreviations

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma; FDC: Follicular dendritic cell; FICTION: Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for the investigation of neoplasms; FISH: Fluorescence in situ hybridization; FL: Follicular lymphoma; H/DCS: Histiocytic / dendritic cell sarcoma; ISFN: In situ follicular neoplasia

Funding

P.K. was supported through a grant from the IZKF FORTÜNE Program (Project 1927–0–0), of the University of Tübingen.

P.A. was supported by the Karl-Thiemig-Stiftung. FF was supported by the DFG, grant FE 597/4–1.

Availability of data and materials

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

PK performed the FICTION analyses, interpreted the results and was a major contributor in writing the manuscript. BM performed the FISH analyses and interpreted the results. PA and FF performed the histological examination of the cases, made the tumor diagnoses and designed the study. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the local ethics committee (Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, project number 300/2010B01).

Informed consent was not required for this retrospective study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 20 January 2018 Accepted: 18 April 2018

Published online: 02 May 2018

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. World Health Organization classification of Tumours. In: WHO classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2008.
2. Feldman AL, Arber DA, Pittaluga S, et al. Clonally related follicular lymphomas and histiocytic/dendritic cell sarcomas: evidence for transdifferentiation of the follicular lymphoma clone. *Blood*. 2008;111:5433–9.

3. Chen W, Lau SK, Fong D, et al. High frequency of clonal immunoglobulin receptor gene rearrangements in sporadic histiocytic/dendritic cell sarcomas. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:863–73.
4. Wang E, Papalas J, Hutchinson CB, et al. Sequential development of histiocytic sarcoma and diffuse large b-cell lymphoma in a patient with a remote history of follicular lymphoma with genotypic evidence of a clonal relationship: a divergent (bilineal) neoplastic transformation of an indolent B-cell lymphoma in a single individual. *Am J Surg Pathol*. 2011;35:457–63. Zhang D, McGuirk J, Ganguly S, Persons DL Histiocytic/dendritic cell sarcoma arising from follicular lymphoma involving the bone: a case report and review of literature *Int J Hematol* 89: 529–532, 2009
5. West DS, Dogan A, Quint PS, et al. Clonally related follicular lymphomas and Langerhans cell neoplasms: expanding the spectrum of transdifferentiation. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:978–86.
6. Streubel B, Chott A, Huber D, et al. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2004; 351:250–9.
7. Akino T, Hida K, Hida Y, et al. Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors. *Am J Pathol*. 2009;175:2657–67.
8. Hida K, Hida Y, Amin DN, et al. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res*. 2004;64:8249–55.
9. Vasef MA, Zaatari GS, Chan WC, Sun NC, Weiss LM, Brynes RK. Dendritic cell tumors associated with low-grade B-cell malignancies. Report of three cases. *Am J Clin Pathol*. 1995;104:696–701.
10. Adam P, Baumann R, Schmidt J, et al. The BCL2 E17 and SP66 antibodies discriminate 2 immunophenotypically and genetically distinct subgroups of conventionally BCL2-"negative" grade 1/2 follicular lymphomas. *Hum Pathol*. 2013;44:1817–26.
11. Grogg KL, Lae ME, Kurtin PJ, Macon WR. Clusterin expression distinguishes follicular dendritic cell tumors from other dendritic cell neoplasms: report of a novel follicular dendritic cell marker and clinicopathologic data on 12 additional follicular dendritic cell tumors and 6 additional interdigitating dendritic cell tumors. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:988–98.
12. Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Muller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem*. 1992;40:171–5.
13. Weber-Matthiesen K, Muller-Hermelink A, Deerberg J, Scherthan H, Schlegelberger B, Grote W. Discrimination of distinct subpopulations within a tumor with combined double immunophenotyping and interphase cytogenetics. *J Histochem Cytochem*. 1993;41:1641–4.
14. Gatta LB, Incardona P, Cadei M, Grigolato P, Simoncelli S, Balzarini P. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and Her-2/neu genotyping (FICTION) in breast carcinoma candidates to target therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20:413–20.
15. Bakhirev AG, Vasef MA, Zhang QY, Reichard KK, Czuchlewski DR. Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics (FICTION) detects BCL6 abnormalities, including gene amplification, in most cases of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138:538–42.
16. Abaza HM, Youssef SR, Saad AA, et al. Detection of 14q32 rearrangements in multiple myeloma, using simultaneous FISH analysis combined with immunofluorescence. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2015;8:56–63.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



3. Diskussion

Follikuläre Lymphome (FL), eine der größten Gruppen der malignen Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe, sind auf molekularer Ebene gekennzeichnet durch eine signifikante intraklonale genetische Diversität der rearrangierten Immunglobulin-Schwerketten-Gene (IGH) und eine substantielle interfollikuläre Zellmigration. Auf molekularer Ebene sind FL charakterisiert durch die rekurrente chromosomale Translokation t(14;18)(q32;q21), die in der Mehrzahl der Fälle vorliegt [180]. In den vergangenen Jahren wurde als früheste Manifestation der FL die „in situ follikuläre Neoplasie“ (ISFN) definiert [180]. Diese ist die erste immunphänotypisch identifizierbare Vorläuferläsion des follikulären Lymphoms mit einer offenbar geringen assoziierten Progressionsneigung zu einem manifesten FL [43,64]. Obwohl belastbare Studien bisher fehlen, scheint es so zu sein, dass nur ein kleiner Teil der ISFN-Läsionen einen Progress zu einem manifesten FL zeigen [33,42]. ISFN scheinen daher ein Zwischenstadium zwischen einem manifesten FL und t(14;18)-positiven B-Zellen zu sein, die im peripheren Blut von bis zu 50% gesunder Erwachsener beobachtet werden können [44,53,146]. Die Prävalenz dieser Zellen steigt mit zunehmendem Alter und Individuen, die eine höhere Zahl t(14,18)-positiver Zellen in ihrem peripheren Blut haben, tragen ein bis 23-fach erhöhtes Risiko, ein manifestes FL zu entwickeln [65,147].

Obwohl die Bedeutung der ISFN als definierte Vorläuferläsion des FL daher als etabliert gelten kann [180,33,39], ist bisher nur spärliche Informationen über die Ausprägung der tumortypischen Eigenschaften des manifesten FL wie der intraklonalen Evolution und der interfollikulären Migration im Bezug zur ISFN. Fälle haben gezeigt, dass neben der ISFN der Patient parallel ein manifestes FL führen kann, dabei können synchrone oder auch metachrone ISFN und FL Fälle miteinander verwandt sein und somit kann das ISFN als Vorläuferläsion eines FL angesehen werden [43]. Im Gegensatz zu einer manifestierten FL zeigt sich die ISFN mit weniger Anomalien der chromosomalen Kopienzahl [39,364,180]. Ein höheres Level von zirkulierenden t(14;18)+ B-Zellen tendieren zu einem erhöhten FL Risiko hin [65]. Die Hälfte aller ISFN-Zellen zeigen in Durchflußzytometrischen Studien B-Zellen mit einem FL-typischen Phenotyp [37].

Das Ziel des ersten Teils der hier vorliegenden Untersuchungen war daher, mit Hilfe eines Next-Generation-Sequenzierungs- (NGS)- Ansatzes das Ausmaß der somatischen Hypermutation und der interfollikulären Migration in einem ISFN-Fall zu untersuchen, der sich in **verschiedenen** Keimzentren **mehrerer** Lymphknoten **eines Patienten** manifestiert hatte, ohne dass der Patient eine Anamnese eines oder ein derzeit manifestes FL hatte. Es handelt sich um einen Patienten, dessen Lymphknoten im Rahmen einer Lungen-Lobektomie wegen eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms entfernt worden waren. Wir konnten zeigen, dass die Charakteristika von FLs, fortlaufende somatische Hypermutation und eine ausgeprägte interfollikuläre Migration bereits in diesem vorklinischen Stadium einer auch genetisch noch nicht weit fortgeschrittenen Vorläuferläsion nachweisbar sind.

Unsere Untersuchungen stützen weiter die Hypothese, dass ISFN die erste im Gewebe detektierbare Manifestation des FL ist und somit auch ein Bindeglied zwischen klonalen B-Zellen im peripheren Blut ansonsten gesunder Menschen und einem manifesten FL darstellt [7,33,36,37]. Von den genannten klonalen B-Zellen ist bekannt, dass sie bereits die chromosomale Translokation t(14;18) tragen, mit zunehmendem Lebensalter in steigender Prävalenz vorhanden sind und - obwohl ursprünglich den naiven B-Zellen zugerechnet - eher niedrigaffinen Gedächtnis-B-Zellen aus dem Keimzentrum entsprechen [155,156].

In der vorliegenden Studie haben wir nach Identifikation des dominanten klonalen IGH-Rearrangements durch konventionelle Sequenzierung mittels einer Kombination aus topographisch orientierter Mikrodisektion am Gewebeschnitt und Next Generation Sequencing nicht nur die klonale Evolution der neoplastischen B-Zellen auf molekularer Ebene, sondern auch eine ausgeprägte Migration der ISFN-Zellen zwischen den Keimzentren **eines** Lymphknotens, aber auch zwischen **verschiedenen** Lymphknoten nachvollziehen können.

Interessanterweise zeigten alle acht Cluster-Gruppen, die dieselben produktiven CDR3 Aminosäuresequenzen aufwiesen, auch das für FL charakteristische Sequenzmotiv N-X-S/T, das als Glykosylierungsstelle dienen kann. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Mechanismen, die die Notwendigkeit eines hochaffinen B-Zell-Rezeptors umgehen und

für ein Langzeitüberleben des Klons wichtig sind, bereits in diesem frühen Stadium der FL-Entwicklung wirksam sind.

Solcher Evolutionsschritt, den Erwerb von N-Glykosilierungsstellen während der somatischen Mutation, tritt in den Vorläufer der Lymphomzellen in ihrer Differenzierungsfrühphase auf [159].

Unsere Daten bestätigen die Hypothese, dass ISFN die erste identifizierbare FL Vorläuferläsion im Gewebekontext ist und die mutmaßliche Verbindung mit klonalen B-Lymphozyten darstellt, die die chromosomale Translokation t (14;18) (q32;q21) im peripheren Blut von gesunden erwachsenen Individuen tragen . Obwohl angenommen wurde, dass diese Zellen zur naiven B-Zell-Untergruppe gehören, wurde kürzlich gezeigt, dass die t (14;18) -Translokation tatsächlich von Gedächtnis-B-Zellen mit niedriger Affinität mit GC-Ursprung getragen wird, die genotypische und phänotypische Merkmale teilen mit FL und anfällig für eine prämaligene FL-Nische [155,156]. Es wurde vorgeschlagen, dass diese t (14;18) -positiven Zellen als Antwort auf Antigene proliferieren und dass ein anhaltender antigener Stimulus für die Aufrechterhaltung dieser Klone notwendig ist, was wiederholte Zyklen des Wiedereintritts von GC erfordert. Zusätzlich zur kontinuierlichen BCR-Signalgebung könnte der Erwerb von Akzeptorstellen für die N-Addition von Glykanketten (Asn-X-Ser / Thr) zu alternativen Überlebensmechanismen durch Lektin-vermittelte Interaktionen mit der lokalen Umgebung oder bakteriellen Antigenen führen [157,158,159]. Experimentelle Belege aus gewebebasierten Studien, die diese Hypothese stützen, fehlen jedoch bisher weitgehend.

Dennoch scheint - unabhängig von der Frequenz der somatischen Mutationen - die strukturelle Integrität des B-Zell-Rezeptors bewahrt zu werden, woraus eine wesentliche Rolle eines intakten B-Zell-Rezeptors für das Überleben des Zellklons in diesem Stadium der Evolution abgeleitet werden kann.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Studie haben verschiedene Implikationen auf unser Verständnis der frühen Entwicklungsstadien des FL: Der Nachweis genetisch sehr nah verwandter klonaler B-Zellen in verschiedenen Follikeln verschiedener benachbarter Lymphknoten legt nahe, dass die ISFN-Zellen zwischen peripherem Blut und Gewebe migrieren können. Dies bedeutet aber, dass die ISFN-Zellen nicht eine lokal begrenzte

Expansion eines Tumorklons sind, sondern vielmehr die momentane Gewebemanifestation präneoplastischer t(14;18)-positiver B-Zellen, die z.B. durch einen definierten Antigenstimulus akkumulieren [42,47].

Die signifikante interfollikuläre Migration, die wir beobachten konnten, ist sehr ähnlich zu den Befunden bei manifesten FL, während der interfollikuläre Lymphozytenaustausch zwischen den einzelnen Keimzentren unter physiologischen Bedingungen in einem reaktiven Lymphknoten wesentlich niedriger ist [162].

Ein weiterer interessanter Befund der vorliegenden Arbeit ist die Feststellung, dass die nachgewiesenen Punktmutationen vermehrt in den antigenerkennenden CDR2- und CDR3-Regionen und nicht so sehr in den strukturellen („framework“) Regionen des B-Zell-Rezeptor-Gens nachweisbar waren. Dies weist auf eine Selektion bezüglich einer intakten B-Zell-Rezeptor-Struktur hin und bedeutet, dass die Integrität des B-Zell-Rezeptors unabhängig von der Gesamtzahl der stattfindenden somatischen Mutationen aufrechterhalten wird. Offenbar hat die Funktionsfähigkeit des B-Zell-Rezeptors somit eine zentrale Bedeutung für das Zellüberleben zumindest in der frühen Phase der klonalen Expansion des FL [140].

Zusammengefasst konnten wir zum ersten Mal eine signifikante intraklonale Diversität und eine ausgeprägte Migration der (prä) neoplastischen Zellen eines FL belegen, woraus zu folgern ist, dass die aus manifesten FL bekannten Mechanismen der klonalen Evolution der rearrangierten Immunglobulin-Schwerkettengene bereits im Stadium der ISFN wirksam sind.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob und wenn ja, welche Zellpopulationen des Tumor-Mikromilieus Teil des neoplastischen Klons des FL sind. In der Literatur gibt es zum einen Hinweise darauf, dass nicht nur B-Zellen die chromosomale Translokation t(14;18) tragen, sondern diese auch in Endothelien nachgewiesen werden könnte [170]. Zum anderen wurde in Einzelfallberichten ein synchrones Auftreten eines FL mit anderen, zumeist myeloischen Tumoren, wie z.B. Sarkomen der follikulären dendritischen Zellen oder histiozytären Sarkomen berichtet [166,168]. Kürzlich wurde das Spektrum der assoziierten Neoplasien noch um zwei

Fälle von Langerhans-Zell-Neoplasien erweitert [169]. In all den genannten Fällen legten das Vorhandensein einer chromosomalen Translokation t(14;18) und eines Immunglobulin-Gen-Rearrangements in der jeweiligen nicht-lymphozytären Neoplasie einen klonale Zusammenhang mit dem FL nahe.

Neben der Möglichkeit einer „Transdifferenzierung“ des neoplastischen FL- Klons wäre als alternative Erklärung in den beobachteten Fällen auch ein gemeinsamer Ursprung der jeweiligen beiden Tumoren aus einer gemeinsamen (pluri-/oligopotenten?) Ursprungszelle zu diskutieren.

Daneben ist die Frage von Interesse, ob die für die neoplastischen Zellen des FL charakteristische chromosomale Translokation t(14;18) ausschließlich in B-Zellen mit Keimzentrumsphänotyp vorhanden ist, oder auch in anderen B-Zell-Subpopulationen innerhalb der befallenen Lymphknoten nachgewiesen werden kann. Speziell ist die früheste detektierbare Gewebemanifestation des FL, die ISFN definiert als streng auf präexistente Keimzentrumsstrukturen beschränkte, immunhistochemisch stark BCL2-exprimierende, t(14;18)-positive B-Zellen.

Daher waren die Ziele des zweiten Teils der hier vorgelegten Arbeit zum einen der Nachweis der chromosomalen Translokation t(14;18) in der die Follikelstrukturen umgebenden Mantelzone in Fällen von ISFN und manifesten FL mit erhaltener Mantelzone. Daneben wollten wir die assoziierten follikulären dendritischen Zellen und die Endothelien innerhalb der Infiltrate manifester FL als mögliche Zellpopulation aus der assoziierte nicht-lymphatische Neoplasien hervorgehen könnten bezüglich des Vorhandenseins einer t(14;18) als Hinweis auf einen gemeinsamen klonalen Ursprung mit dem FL untersuchen.

Mittels der FICTION-Technik (*Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for the investigation of neoplasms*) konnten wir gleichzeitig die betreffende Zellpopulation fluoreszenzmikroskopisch markieren und den Status des BCL2-Genlokus als Hinweis auf eine Translokation t(14;18) überprüfen. Im Falle der follikulären dendritischen Zellen (FDC) wurde Clusterin als ein sehr selektiver und effektiver FDC-Marker verwendet [174]. Die Frage nach einem stattgehabten Bruchereignis im BCL2-Genlokus wurde dann analog zum Vorgehen bei einer Standard- Fluoreszenz in situ -Hybridisierung (FISH) mittels zweier den Genlokus nach

zentromerisch bzw. nach telomerisch flankierenden, unterschiedlich gefärbten Gensonden geklärt: Eine Ko-Lokalisierung je zweier Sondenpaare (bei diploidem Chromosomensatz) pro Zelle zeigte jeweils einen intakten *BCL2*-Genlokus an. Ein Auseinanderweichen eines der beiden Sondenpaare signalisierte ein stattgehabtes Bruchereignis im *BCL2*-Genlokus als Surrogatmarker für eine in dieser Zelle vorliegende chromosomale Translokation t(14;18). Die FICTION-Methode erlaubte dabei eine sehr präzise Lokalisation und Analyse der auswertbaren Zellpopulation bezüglich ihres *BCL2*- Translokationsstatus

In allen hier untersuchten Fällen zeigte sich ein intakter *BCL2*-Genlokus in den mittels Clusterin-Färbung identifizierten folliculären dendritischen Zellen, so dass wir in unserer Studie keinen Hinweis auf eine entsprechende präexistente, im Tumorklon bereits vorhandene nicht-lymphatische Zellpopulation fanden. Ob die in Einzelfallberichten dargestellten synchronen Neoplasien daher eine echte „Transdifferenzierung“ darstellen oder z.B. aus einer gemeinsamen t(14;18)-positiven Vorläuferzelle entstanden sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Die im Tumordinfiltrat enthaltenen Endothelstrukturen wurden mittels einer CD34-Immunfluoreszenzfärbung identifiziert. Dabei konnten speziell auch die kleinkalibrigen Gefäße, die sogenannten hochendothelialen Venolen ausgewertet werden. In allen hier untersuchten Fällen zeigten die CD34-positiven Endothelien keine Bruchereignisse im Genlokus und daher keinen Hinweis auf eine primär im Tumor vorhandene, zum Tumorklon gehörige Zellpopulation mit endothelialer Differenzierung.

Als weiteren Aspekt haben wir in dieser Studie die Frage untersucht, ob und in wie weit außer den genannten nicht-lymphatischen Zellen auch B-Zellen mit nicht-Keimzentrums-Phänotyp am Beispiel der Zellen der Mantelzone Teil des Tumorklons sind. Mit dem gleichen methodischen Ansatz wurden hier in FL-Fällen mit morphologisch erhaltenen Mantelzonenstrukturen um die neoplastischen Follikel Zellen der Mantelzone mittels IgD-Färbung identifiziert und auf das Vorhandensein eines *BCL2*-Bruchereignisses hin überprüft.

Zusätzlich wurden Fälle von ISFN, bei denen die t(14;18)-positiven Zellen in der immunhistochemischen Färbung streng auf die Keimzentrumsstrukturen beschränkt sind, in die Analyse mit einbezogen. In Übereinstimmung mit diesem Konzept fanden wir in

den untersuchten ISFN-Fällen keine Bruchereignisse in den Zellen der Mantelzone, während die immunhistochemisch BCL2-positiven B-Zellen in den Keimzentren auch ein entsprechendes Bruchereignis als Hinweis auf eine t(14;18) zeigten.

Interessanterweise waren sechs der untersuchten 15 (40%) FL-Fälle mit morphologisch erhaltenen Mantelzonenstrukturen BCL2 negativ, ein Anteil, der deutlich höher ist, als in der Literatur beschrieben (10-15%). Die theoretische Möglichkeit eines versehentlichen Einschlusses anderer Lymphomentitäten, die FLs bekanntermaßen ähneln können, aber keine Translokation t(14;18) aufweisen (z.B. nodale Marginalzonenlymphome), wurde dabei durch sorgfältige Re-Evaluierung ausgeschlossen.

Von den übrigen neun Fällen zeigten die Zellen der Mantelzone in zwei Fällen intakte *BCL2*-Genloci und in sieben Fällen teilweise ein Bruchereignis im *BCL2*-Gen. Daraus ergibt sich, dass beim FL sowohl eine partielle Mantelzonendifferenzierung des Tumorklons, als auch eine Rekrutierung erhaltener nicht-neoplastischer Mantelzonenstrukturen beobachtet werden kann.

Zusammenfassend kann aus den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass die tumorassoziierte chromosomale Translokation t(14;18), die in der Mehrzahl der Fälle von FLs vorliegt und der eine wesentliche Rolle bei der Evolution und Expansion des malignen Klons zukommt, nicht in nicht-lymphoiden Zellen des Tumor-Mikromilieus nachgewiesen werden kann. Vielmehr werden diese Zellen offenbar zur Aufrechterhaltung dieses überlebenswichtigen Mikromilieus vom Tumorklon rekrutiert. In den aus der Literatur bekannten Fällen von klonal mit dem FL verwandten Sarkomen der dendritischen Zellen oder der Langerhanszellen wäre zu vermuten, dass es sich wirklich um eine Art „Transdifferenzierung“ handelt. Alternativ könnte auch eine Evolution der beiden unterschiedlich differenzierten Tumore aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle angenommen werden, die bereits die chromosomale Translokation t(14;18) aufgewiesen haben müsste. Diese konkrete Fragestellung wäre in weiteren Untersuchungen zu klären.

Bezüglich der Zugehörigkeit der Mantelzone zum malignen Klon konnten wir in Übereinstimmung mit dem aktuellen Konzept der „in situ folliculären Neoplasie (ISFN)“ feststellen, dass in dieser Läsion die Zellen mit Mantelzonendifferenzierung

durchweg reaktive B-Zellen sind. Die Zellen des malignen Klons sind hier streng auf das Keimzentrum ansonsten erhaltener reaktiver Follikel beschränkt.

Im Gegensatz dazu weisen die IgD+ Zellen der Mantelzone in manifesten FLs häufig, aber nicht immer eine Translokation t(14;18) auf und sind somit in diesen Fällen Teil des Tumorklons. Es scheint also, dass manifeste FL zum Teil eine Mantelzonendifferenzierung ausbilden können. Warum dies nur in einem Teil der Fälle von FLs nachweisbar ist und auch nur ein Teil der FLs überhaupt erkennbare (oder immunhistochemisch nachweisbare) Mantelzonenstrukturen aufweisen, während andere Fälle nur aus dicht gedrängten neoplastischen Keimzentren bestehen, wäre in weiteren Untersuchungen zu klären.

4. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem folliculären Lymphom, einem der häufigsten Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe. In zwei getrennten Studien wurden zwei für die Genese und die Expansion des malignen Klons wichtige Aspekte bearbeitet:

Im ersten Teil haben wir uns mit der „In situ folliculären Neoplasie“ beschäftigt, die als früheste im Gewebe detektierbare (und wohl noch „präneoplastische“) Manifestation des FL anzusehen ist. Mittels einer Kombination aus konventioneller Sequenzierung, „Next Generation“ Sequenzierung und Gewebe-Mikrodissektion konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass die aus manifesten folliculären Lymphomen bekannten Mechanismen der fortlaufenden Hypermutation der Immunglobulin-Schwerkettengene und eine intensive Migration zwischen einzelnen Follikeln, aber auch zwischen verschiedenen Lymphknoten bereits in dieser Frühform nachzuweisen sind.

Im zweiten Teil konnten wir mit Hilfe einer kombinierten Fluoreszenz-immunhistochemischen und In situ-Hybridisierungstechnik (FICTION) zeigen, dass die in der Literatur mehrfach berichteten synchron auftretenden FL und nicht-lymphatische Tumoren (histiozytäre Sarkome und Sarkome der folliculären dendritischen Zellen), die jeweils beide eine rekurrente chromosomale Translokation t(14;18) aufweisen, nicht aus primär im malignen Klon enthaltenen Zell-Subpopulationen zu entstehen scheinen, sondern entweder in Folge einer echten Transdifferenzierung oder aus einer gemeinsamen t(14;18)-positiven Vorläuferzelle, was in weiteren Arbeiten zu prüfen sein wird. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass in FL mit morphologisch erhaltenen Mantelzonenstrukturen teils eine Mantelzonedifferenzierung auftreten kann, teils aber auch erhaltene reaktive Mantelzonenstrukturen vom FL rekrutiert werden können.

Beide Teile der Arbeit tragen wichtige neue Aspekte für das Verständnis einerseits der sehr frühen Lymphomentstehung, andererseits der Expansion und Ausbreitung des FL bei und liefern Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen.

5. Literaturhinweis:

1. Campo, E., Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H., Jaffe, E.S. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019-32. doi: 10.1182/blood-2011-01-293050. Epub 2011 Feb 7.
2. Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Isaacson, P.G. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4384-99. doi: 10.1182/blood-2008-07-077982.
3. Fink, M.P., Hayes, M., Soni, N. *Classic Papers in Critical Care*. Springer Verlag. 2008 Auflage: 2nd ed. (30. Juli). [ISBN-13: 978-1848001442]
4. Hodgkin, T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Medico-Chirurgical Transactions, London*, 1832;17, S. 68-114 PMID 4630498
5. Steudel. J. Woher kommt der Name Krebs? *Deutsche medizinische Wochenschrift* 1953 ;78, S. 1574.
6. Rappaport, H., Winter, W.J., Hicks E.B. Follicular lymphoma. A re-evaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma based on a survey of 253 cases. 1956 *Cancer*. Jul-Aug;9(4): 792-821.
7. Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Lee Harris, N., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Galles, G.A., Zelenetz, A.D., and Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms *Blood*. May 19;127(20): 2016 2375-90.
8. Buske, C., Mahlmann, S. *Indolente Lymphome: Pathophysiologie, Prognosefaktoren und aktuelle Therapieempfehlungen (Reihe Onkologie)*. 2011
9. Rappaport, H. *Tumors of the hematopoietic system*. Armed forces institute of pathology (U.S.). Washington, D.C. Serien: Atlas of tumor pathology, 1966 1st Series, Section III, fasc. 8.
10. Bosga-Bouwer, A.G., Imhoff van, G.W., Boonstra, R., van der Veen, A., Haralambieva, E., van den Berg, A., de Jong, B., Krause, V., Palmer, M.C., Coupland, R., Kluin, P.M., van den Berg, E., Poppema S. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood* 2003;101(3):1149-1154.
11. Ott, G., Katzenberger, T., Lohr, A., Kindelberger, S., Rüdiger, T., Wilhelm, M., Kalla, J., Rosenwald, A., Müller, J.G., Ott, M.M., Müller-Hermelink, H.K. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 2002;99(10):3806-3812.
12. Aamot, H.V., Torlakovic, E.E., Eide, M.B., Holte, H., Heim, S. Non-Hodgkin lymphoma with t(14;18): clonal evolution patterns and cytogenetic-pathologic-clinical correlations. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007 Jul;133(7):455-70. Epub 2007 Jan 18.
13. Biagi, J.J., Seymour, J.F. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood*. 2002 Jun 15;99 (12):4265-75.
14. Kupperts, R., Dalla-Favera, R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 2001;20(40): 5580-5594.
15. Schuetz, J.M., Johnson, N.A., Morin, R.D., et al. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2012 Jun;26(6):1383-90. doi: 10.1038/leu.2011.378. Epub 2011 Dec 22.
16. Yunis, J.J., Frizzera, G., Oken, M.M., McKenna, J., Theologides, A., Arnesen, M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med* 1987; 316: 79–84.
17. Weiss, L.M., Warnke, R.A., Sklar, J., Cleary, M.L. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987; 317: 1185–1189.

18. Jacobson, J.O., Wilkes, B.M., Kwaiatkowski, D.J., Medeiros, L.J., Aisenberg, A.C., Harris, N.L. BCL-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer* 2003; 72: 231–236.
19. Jerry, M., Adams, S.C. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science* 28 Aug 1998: Vol. 281, Issue 5381, pp. 1322-1326. DOI: 10.1126/science.281.5381.1322
20. Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., Andrews, D.W. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013;5(4), a008714. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714>
21. Schraders, M., de Jong, D., Kluin, P., Groenen, P., van Krieken, H. Lack of Bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the BCL2 gene or by absence of the t(14;18) translocation. *J Pathol.* 2005 Feb;205(3):329-35
22. Scholz, C., Eucker, J. Non-Hodgkin-Lymphome. Possinger K, Regierer A.C (Herausgeber), *Facharztwissen Hämatologie Onkologie* 2015. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 3 (16. Februar 2015)
23. Iida, S., Rao, P.H., Nallasivam, P., Hibshoosh, H., Butler, M., Louie, D.C., Dyomin, V., Ohno, H., Chaganti, R.S., Dalla-Favera, R. The t(9;14)(p13;q32) chromosomal translocation associated with lymphoplasmacytoid lymphoma involves the PAX-5 gene. *Blood.* 1996 Dec 1;88(11):4110-7.
24. Yatabe, Y., Suzuki, R., Tobinai, K., Matsuno, Y., Ichinohasama, R., Okamoto, M., Yamaguchi, M., Tamaru, J., Uike, N., Hashimoto, Y., Morishima, Y., Suchi, T., Seto, M., Nakamura, S.. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* 2000 95:2253-2261;
25. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976 Oct 1;194(4260): 23-8.
26. Freedman, A. Follicular lymphoma: 2011 update on diagnosis and management. *Am J Hematol*, 2011;86(9): p. 768-75.
27. Shen, Y., Iqbal, J., Huang, J.Z., Zhou, G., Chan, W.C. BCL2 protein expression parallels its mRNA level in normal and malignant B cells. *Blood.* 2004 Nov 1;104(9):2936-9. Epub 2004 Jul 8.
28. Masir, N., Campbell, L.J., Jones, M., Mason, D.Y. Pseudonegative BCL2 protein expression in a t(14;18) translocation positive lymphoma cell line: a need for an alternative BCL2 antibody. *Pathology* 2010; 42: 212-216.
29. Schraders, M., de Jong, D., Kluin, P., Groenen, P., van Krieken, H. Lack of Bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the BCL2 gene or by absence of the t(14;18) translocation. *J Pathol.* Feb; 2005; 205(3): 329-35
30. Masir, N., Campbell, L.J., Goff, L.K., Jones, M., Marafioti, T., Cordell, J., Clear, A.J., Lister, T.A., Mason, D.Y., Lee, A.M. BCL2 protein expression in follicular lymphomas with t(14;18) chromosomal translocations. *Br J Haematol* 144: 2009; 716-725.
31. Pezzella, F., Tse, A.G., Cordell, J.L., Pulford, K.A., Gatter, K.C., Mason, D.Y. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol.* 1990 Aug;137(2): 225-32.
32. Adam, P., Baumann, R., Schmidt, J., Bettio, S., Weisel, K., Bonzheim, I., Fend, F., Quintanilla-Martínez, L. The BCL2 E17 and SP66 antibodies discriminate 2 immunophenotypically and genetically distinct subgroups of conventionally BCL2-"negative" grade 1/2 follicular lymphomas. *Hum Pathol.* 2013 Sep;44(9): 1817-26.
33. Cong, P., Raffeld, M., Teruya-Feldstein, J., Sorbara, L., Pittaluga, S., Jaffe, E.S. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood.* 2002 May 1;99(9):3376-82.
34. Dürkop, H., Foss, H.D., Stein, H. 2008-WHO-Klassifikation der malignen Lymphome im Jahr 2011. *Neue Erkenntnisse und praktische Anwendung. Onkologie* 2011; 17:769–788 · DOI 10.1007/s00761-011-2.126-5.

35. Quintanilla-Martínez, L., Adam, P., & Fend, F. „In-situ-Lymphome“und andere Frühstadien maligner Non-Hodgkin-Lymphome. *Pathologie* 2013; 34: 244-253
36. Jegalian, A.G., Eberle, F.C., Pack, S.D., et al. Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma. *Blood*. (2011)118(11): 2976-2984.
37. Pillai R.K., Surti, U., Swerdlow, S.H. Follicular lymphoma-like B cells of uncertain significance (in situ follicular lymphoma) may infrequently progress, but precedes follicular lymphoma, is associated with other overt lymphomas and mimics follicular lymphoma in flow cytometric studies. *Haematologica*. 2013; 98(10): 1571-1580.
38. Fend, F., Cabecadas, J., Gaulard, P., et al. Early lesions in lymphoid neoplasia: conclusions based on the Workshop of the XV. Meeting of the European Association of Hematopathology and the Society of Hematopathology, in Uppsala, Sweden. *J Hematop*. 2012;5: 169-199;
39. Mamessier, E., Broussais-Guillaumot, F., Chetaille, B., Bouabdallah, R., Xerri, L., Jaffe, E.S., Nadel, B. Nature and importance of follicular lymphoma precursors. *Haematologica*. 2014; 99:802–810.
40. Carbone, A., Tibiletti, M.G., Canzonieri, V., Rossi, D., Perin, T., Bernasconi, B., Gloghini, A. In situ follicular lymphoma associated with nonlymphoid malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2012 Apr;53(4):603-8
41. Henopp T, Quintanilla-Martínez L, Fend F, Adam P. Prevalence of follicular lymphoma in situ in consecutively analysed reactive lymph nodes. *Histopathology*. 2011 Jul;59(1):139-42
42. Montes-Moreno, S., Castro, Y., Rodríguez-Pinilla, S.M., García, J.F., Mollejo, M., Castillo, M.E., Bas-Vernal, A., Barrionuevo-Cornejo, C., Sanchez-Verde, L., Menarguez, J., Cigudosa, J.C., Piris, M.A. Intrafollicular neoplasia/in situ follicular lymphoma: review of a series of 13 cases. *Histopathology*. 2010 Apr;56(5):658-62
43. Bonzheim, I., Salaverria, I., Haake, A., Gastl, G., Adam, P., Siebert, R., Fend, F., Quintanilla-Martínez, L. A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma. *Blood*. 2011 Sep 22;118(12):3442-4
44. Roulland, S., Navarro, J.M., Grenot, P., Milili, M., Agopian, J., Montpellier, B., Gauduchon, P., Lebailly, P., Schiff, C., Nadel, B. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2006 Oct 30;203(11):2425-31
45. Sotomayor, E.A., Shah, I.M., Sanger, Mark, H.F. In situ follicular lymphoma with a 14;18 translocation diagnosed by a multimodal approach. *Exp Mol Pathol*. 2007 Oct;83(2):254-8
46. Handa, T., Maki, K., Segawa, A., Masawa, N., Mitani, K. In situ follicular lymphoma associated with progressive transformation of germinal centers. *Int J Surg Pathol*. 2011 Aug;19(4):521-3
47. Cheung, M.C., Bailey, D., Pennell, N., Imrie, K.R., Berinstein, N.L., Amato, D., Ghorab, Z. In situ localization of follicular lymphoma: evidence for subclinical systemic disease with detection of an identical BCL-2/IGH fusion gene in blood and lymph node. *Leukemia*. 2009 Jun;23(6):1176-9
48. Roullet, M.R., Martinez, D., MaL, Fowler, M.H, McPhail, E.D., Judkins, A., Arber, D.A., Bagg, A. Coexisting follicular and mantle cell lymphoma with each having an in situ component: A novel, curious, and complex consultation case of coincidental, composite, colonizing lymphoma. *AmJClinPathol*. 2010; 133(4): 584–591
49. Carbone, A., Della Libera, D., Zannier, L., Selva, A., Ceolin, P., Gualeni, A., Canal, B., Gloghini, A. In situ follicular lymphoma associated with overt B- or T-cell lymphomas in the same lymphnode. *Am J Hematol*. 2011;86(12): E66-70

50. Carbone, A., Gloghini, A. Coexisting follicular and mantle cell lymphoma with each having an in situ component. *Am J Clin Pathol.* 2011 Sep;136(3):481-3 with nonlymphoid malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2012 Apr;53(4):603-8
51. Bell, D.A., Liu, Y., Cortopassi, G.A. Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Feb 1;87(3):223-4
52. Dölken, G., Dölken, L., Hirt, C., Fusch, C., Rabkin, C.S., Schüler, F. Age-dependent prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2008;(39):44-7
53. Dölken, G., Illerhaus, G., Hirt, C., Mertelsmann, R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol.* 1996 Apr;14(4):1333-44
54. Ji, W., Qu, G.Z., Ye, P., Zhang, X.Y., Halabi, S., Ehrlich, M. Frequent detection of bcl-2/JH translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay. *Cancer Res.* 1995 Jul 1;55(13):2876-82
55. Ladetto, M., Drandi, D., Compagno, M., Astolfi, M., Volpato, F., Voena, C., Novarino, A., Pollio, B., Addeo, A., Ricca, I., Falco, P., Cavallo, F., Vallet, S., Corradini, P., Pileri, A., Tamponi, G., Palumbo, A., Bertetto, O., Boccadoro, M., Tarella, C. PCR-detectable nonneoplastic Bcl-2/IgH rearrangements are common in normal subjects and cancer patients at diagnosis but rare in subjects treated with chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2003 Apr 1;21(7):1398-403
56. Limpens, J., de Jong, D., van Krieken, J.H., Price, C.G., Young, B.D., van Ommen, G.J., Kluin, P.M. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene.* 1991 Dec;6(12):2271-6
57. Limpens, J., Stad, R., Vos, C., de Vlaam, C., de Jong, D., van Ommen, G.J., Schuurin, E., Kluin, P.M. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood.* 1995 May 1;85(9):2528-36
58. Liu, Y., Hernandez, A.M., Shibata, D., Cortopassi, G.A. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 Sep 13;91(19):8910-4
59. Schmitt, C., Balogh, B., Grundt, A., Buchholtz, C., Leo, A., Benner, A., Hensel, M., Ho, A.D., Leo, E. The bcl-2/IgH rearrangement in a population of 204 healthy individuals: occurrence, age and gender distribution, breakpoints, and detection method validity. *Leuk Res.* 2006 Jun;30(6):745-50
60. Schüler, F., Dölken, L., Hirt, C., Kiefer, T., Berg, T., Fusch, G., Weitmann, K., Hoffmann, W., Fusch, C., Janz, S., Rabkin, C.S., Dölken, G. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int J Cancer.* 2009 Feb 15;124(4):958-63
61. Summers, K.E., Goff, L.K., Wilson, A.G., Gupta, R.K., Lister, T.A., Fitzgibbon, J. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):420-4
62. Zignego, A.L., Ferri, C., Giannelli, F., Giannini, C., Caini, P., Monti, M., Marrocchi, M.E., Di Pietro, E., La Villa, G., Laffi, G., Gentilini, P. et al. Prevalence of bcl-2 rearrangement in patients with hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia with or without B-cell lymphomas. *Ann Intern Med.* 2002 Oct 1;137(7):571-80
63. Mamessier, E., Song, J.Y., Eberle, F.C., Pack, S., Drevet, C., Chetaille, B., Abdullaev, Z., Adelaïde, J., Birnbaum, D., Chaffanet, M., Pittaluga, S., Roulland, S., Chott, A., Jaffe, E.S., Nadel, B. Early lesions of follicular lymphoma: a genetic perspective. *Haematologica.* 2014;99(3): 481-488.
64. Schmidt, J., Salaverria, I., Haake, A., Bonzheim, I., Adam, P., Montes-Moreno, S., Piris, M.A., Fend, F., Siebert, R., Quintanilla-Martinez, L. Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from in situ to manifest t(14;18)-positive follicular lymphoma. *Leukemia* 2014;28(5):1103-1112.

65. 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., Dorransoro, 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., 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., Nadel, B. t(14;18) Translocation: A predictive blood biomarker for follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2014 May 1;32(13):1347-55
66. Nybakken, G.E, Bala, R., Gratzinger, D., Jones, C.D., Zehnder, J.L., Bangs, C.D., Cherry, A., Warnke, R.A., Natkunam, Y. Isolated Follicles Enriched for Centroblasts and Lacking t(14;18)/BCL2 in Lymphoid Tissue: Diagnostic and Clinical Implications. *PLoS One.* 2016 Mar 18;11(3):e0151735
67. Bermudez, G., González de Villambrosía, S., Martínez-López, Batlle, A., Revert-Arce, J.B., Cereceda, Company. L., Ortega Bezanilla, C., Piris, M.A., Montes-Moreno, S.. Incidental and Isolated Follicular Lymphoma In Situ and Mantle Cell Lymphoma In Situ Lack Clinical Significance. *Am J Surg Pathol.* 2016 Jul;40(7):943-9
68. Tellier, J., Menard, C., Roulland, S., Martin, N., Monvoisin, C., Chasson, L., Nadel, B., Gaulard, P., Schiff, C., Tarte, K. Human t(14;18)positive germinal center B cells: a new step in follicular lymphoma pathogenesis? *Blood.* 2014 May 29;123(22):3462-5
69. Morita, K., Nakamine, H., Nakai, T., Takano, M., Takeda, M., Enomoto, Y., Yoshii, Y., Kanno, M., Ohbayashi, C. A retrospective study of patients with follicular lymphoma (FL): identification of in situ FL or FL-like B cells of uncertain significance in lymph nodes resected at the time of previous surgery for carcinomas. *J Clin Pathol.* 2015 Jul;68(7):541-6
70. Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Hess, I., Rode, I., Netuschil, N., Tay, B.H., Venkatesh, B., Yu, J.K., Kaltenbach, S.L., Holland, N.D., Diekhoff, D., Happe, C., Schorpp, M., Boehm, T. Evolution of Genetic Networks Underlying the Emergence of Thymopoiesis in Vertebrates. *Cell*, Online-Vorabpublikation 25. Juni 2009, DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.017
71. Rink, L., Kruse, A., Haase, H. *Immunologie für Einsteiger.* Verlag: Springer Spektrum; (2015) Auflage: 2 (12. März). [ISBN-13: 978-3662448427]
72. Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M. *Janeway Immunologie.* 2014 Auflage: 7 (24. September), Berlin Heidelberg, Verlag: Springer Spektrum; [ISBN-13: 978-3662442272]
73. Lederberg, J. Genes and antibodies. *Science* 19 Jun 1959: Vol. 129, Issue 3364, pp. 1649-1653 DOI: 10.1126/science.129.3364.1649
74. Jerne, N.K. The somatic generation of immune recognition. *Eur J Immunol.* 1071 Jan; 1(1):1-9
75. Cohn, M., Blomberg, B., Geckeler, W., et al. First order considerations in analyzing the generation of diversity. E. Sercarz (Ed.), et al., *The Immune System: Genes, Receptors, Signals*, Academic Press, New York (1974), pp. 89–117
76. Tonegawa, S., Steinberg, C., Dube, S., Bernardini, A. Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974 Oct;71(10):4027-31.
77. Tonegawa, S. Reiteration frequency of immunoglobulin light chain genes: further evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976 Jan;73(1):203-7.
78. Hozumi, N., and Tonegawa, S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976 Oct; 73(10): 3628–3632.
79. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1987/tonegawa-facts.html

80. Berek, C., Milstein, C. The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol Rev.* 1988 Oct; 105:5-26.
81. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Moch, H. Pathologie Gebundene Ausgabe-Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 4 (22. September 2008). ISBN-13: 978-3437423826
82. Welsch, U., Kummer, w., Deller, T. Lehrbuch Histologie Gebundene Ausgabe-19. September 2014. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 4. ISBN-13: 978-3437444333
83. Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., Honjo, T. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem.* 1999 Jun 25;274(26):18470-6
84. Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 2000 Sep 1;102(5):553-63.
85. Muto, T., Muramatsu, M., Taniwaki, M., Kinoshita, K., Honjo, T. Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics.* 2000 Aug 15;68(1):85-8.
86. Honjo, T., Kinoshita, K., and Muramatsu, M. 2002. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 20:165–196.
87. Rogozin, I.B., Diaz, M. Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol.* 2004 Mar 15;172(6):3382-4.
88. Rogozin, I.B., Kolchanov, N.A. Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Nov 15;1171(1):11-8.
89. Milstein, C., Neuberger, M.S., Staden, R. Both DNA strands of antibody genes are hypermutation targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8791-4.
90. Rogozin, I.B., Pavlov, Y.I., Bebenek, K., Matsuda, T., Kunkel, T.A. Somatic mutation hotspots correlate with DNA polymerase eta error spectrum. *Nat Immunol.* 2001 Jun;2(6):530-6.
91. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *Biochemical Journal* Jul 15, 1985, 229 (2) 281-286;
92. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *Eur J Biochem.* 1985 Jul 1;150(1):1-5.
93. Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2nd edition, Portland Press, 1992. Edited C Liébecq. [ISBN 1-85578-005-4]
94. Wilson, P.C., de Bouteiller, O., Liu, Y.J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J.D., Pascual, V. Somatic Hypermutation Introduces Insertions and Deletions into Immunoglobulin V Genes. *J Exp Med.* 1998 Jan 5;187(1):59-70.
95. Komeno, Y., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Kato, N., Oki, T., Nakahara, F., Harada, Y., Harada, H., Shinkura, R., Nagaoka, H., Hayashi, Y., Honjo, T., Kitamura, T. AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia.* 2010 May;24(5):1018-24
96. Nonaka, T., Toda, Y., Hiai, H., Uemura, M., Nakamura, M., Yamamoto, N., Asato, R., Hattori, Y., Bessho, K., Minato, N., Kinoshita, K. Involvement of activation-induced cytidine deaminase in skin cancer development. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1367-82.

97. Rogozin, I.B., Lada, A.G., Goncareenco, A., Green, M.R., De, S., Nudelman, G., Panchenko, A.R., Koonin, E.V., Pavlov, YI. Activation induced deaminase mutational signature overlaps with CpG methylation sites in follicular lymphoma and other cancers. *Sci Rep.* 2016 Dec 7; 6:38133.
98. Wilmore, J.R., Asito, A.S., Wei, C., Piriou, E., Sumba, P.O., Sanz, I., Rochford, R. AID expression in peripheral blood of children living in a malaria holoendemic region is associated with changes in B cell subsets and Epstein-Barr virus. *Int J Cancer.* 2015 Mar 15;136(6):1371-80
99. Molyneux, E.M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., Harrison, C.J., Israels, T., Bailey, S. Burkitt's lymphoma. *Lancet* 2012; 379: 1234-44.
100. Erikson, J., ar-Rushdi, A., Drwinga, H.L., Nowell, P.C., Croce, C.M. Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in burkitt lymphoma. *Proc Natl AcadSci USA* 1983; 80:820-4.
101. Lombardi, L., Newcomb, E.W., Dalla-Favera, R. Pathogenesis of Burkitt lymphoma: expression of an activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts. *Cell* 1987; 49: 161-70
102. Greeve, J., Philipsen, A., Krause, K., Klapper, W., Heidorn, K., Castle, B.E., Janda, J., Marcu, K.B., Parwaresch, R. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2003; 101:3574-80
103. Lebecque, S.G., Gearhart, P.J. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1717-27.
104. Rada, C., Di Noia, J.M., Neuberger, M.S. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell.* 2004 Oct 22;16(2):163-71.
105. Rogerson, B.J. Mapping the upstream boundary of somatic mutations in rearranged immunoglobulin transgenes and endogenous genes. *Mol Immunol.* 1994 Feb;31(2):83-98.
106. Rada, C., Milstein, C. The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *EMBO J.* 2001 Aug 15;20(16):4570-6.
107. Fukita, Y., Jacobs, H., Rajewsky, K. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity.* 1998 Jul;9(1):105-14.
108. Peters, A., Storb, U. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity.* 1996 Jan;4(1):57-65.
109. Betz, A.G., Milstein, C., González-Fernández, A., Pannell, R., Larson, T., Neuberger, M.S. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell.* 1994 Apr 22;77(2):239-48.
110. Yélamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y.L., González Fernández, A., Pannell, R., Neuberger, M.S., Milstein, C. Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature.* 1995 Jul 20;376(6537):225-9.
111. Mitchell, J., & Abbot, A. Ultrastructure of the Antigen-retaining Reticulum of Lymph Node Follicles as shown by High-resolution Autoradiography. 1965 *Nature* 208, 500-502 (30 October);
112. Nossal, G.J., Abbot, A., Mitchell, J., Lummus, Z. Antigens in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles. *J Exp Med* 1968;127(2): 277-90.
113. Szakal, A.K., Hanna, M.G., Jr. The ultrastructure of antigen localization and virus like particles in mouse spleen germinal centers. *Exp Mol Pathol* 1968;8(1):75-89.
114. Chen, L.L., Adams, J.C., Steinman, R.M. Anatomy of germinal centers in mouse spleen, with special reference to "follicular dendritic cells". *J Cell Biol* 1978;77(1): 148-64.

115. Allen, C.D., Cyster, J.G. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* 2008; 20(1):14-25.
116. Chen, L.L., Frank, A.M., Adams, J.C., Steinman, R.M. Distribution of horseradish peroxidase (HRP)-anti-HRP immune complexes in mouse spleen with special reference to follicular dendritic cells. *J Cell Biol* 1978;79(1): 184-99.
117. Humphrey, J.H., Grennan, D., Sundaram, V. The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on them. *Eur J Immunol* 1984;14(9): 859-64.
118. Yoshida, K., Kaji, M., Takahashi, T., van den Berg, T.K., Dijkstra, C.D. Host origin of follicular dendritic cells induced in the spleen of SCID mice after transfer of allogeneic lymphocytes. *Immunology* 1995;84(1): 117-26.
119. Aloisi, F., Pujol-Borrell, R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2006;6(3): 205-17.
120. Randen, I., Mellbye, O.J., Forre, O., Natvig, J.B. The identification of germinal centres and follicular dendritic cell networks in rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol* 1995;41(5):481-6.
121. Takemura, S., Braun, A., Crowson, C., Kurtin P.J., Cofield, R.H., O'Fallon, W.M., Goronzy, J.J., Weyand, C.M. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 2001;167(2): 1072-80.
122. Young, C.L., Adamson, T.C. III., Vaughan, J.H., Fox, R.I. Immunohistologic characterization of synovial membrane lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1984;27(1): 32-9.
123. Manzo, A., Paoletti, S., Carulli, M., Blades, M.C., Barone, F., Yanni, G., Fitzgerald, O., Bresnihan, B., Caporali, R., Montecucco, C., Uguccioni, M., Pitzalis, C. Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis. *Eur J Immunol* 2005;35(5): 1347-59.
124. Mosnier, J.F., Degott, C., Marcellin, P., Hénin, D., Erlinger, S., Benhamou, J.P. The intraportal lymphoid nodule and its environment in chronic active hepatitis C: an immunohistochemical study. *Hepatology* 1993;17(3): 366-71.
125. Murakami, J., Shimizu, Y., Kashii, Y., Kato, T., Minemura, M., Okada, K., Nambu, S., Takahara, T., Higuchi, K., Maeda, Y., Kumada, T., Watanabe, A. Functional B-cell response in intrahepatic lymphoid follicles in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1999;30(1):143-50.
126. Dieu-Nosjean, M.C., Goc, J., Giraldo, N.A., Sautès-Fridman, C., Fridman, W.H. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Trends Immunol* 2014;35(11): 571-80.
127. Neyt, K., Perros, F., Geurtsvan Kessel, C.H., Hammad, H., Lambrecht, B.N. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol* 2012;33(6): 297-305.
128. Cyster, J.G., Ansel, K.M., Reif, K., Ekland, E.H., Hyman, P.L., Tang, H.L., Luther, S.A., Ngo, V.N. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* 2000;176: 181-93.
129. Futterer, A., Mink, K., Luz, A., Kosco-Vilbois, M.H., Pfeffer, K. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 1998;9(1):59-70.
130. Fu, Y.X., Chaplin, D.D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 1999;17: 399-433.
131. Koni, P.A., Sacca, R., Lawton, P., Browning, J.L., Ruddle, N.H., Flavell, R.A. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity* 1997;6(4): 491-500.
132. De Togni, P., Goellner, J., Ruddle, N.H., Streeter, P.R., Fick, A., Mariathasan, S., Smith, S.C., Carlson, R., Shornick, L.P., Strauss-Schoenberger, J. et al. Abnormal

- development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 1994;264(5159): 703-7.
133. Fu, Y.X., Molina, H., Matsumoto, M., Huang, G., Min, J., Chaplin, D.D. Lymphotoxin-alpha (LTalpha) supports development of splenic follicular structure that is required for IgG responses. *J Exp Med* 1997;185(12): 2111-20.
134. Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996;184(4): 1397-411.
135. Le Hir, M., Bluethmann, H., Kosco-Vilbois, M.H., Müller, M., di Padova, F., Moore, M., Ryffel, B., Eugster, H.P. Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling. *J Exp Med* 1996;183(5): 2367-72.
136. Marino, M.W., Dunn, A., Grail, D., Inglese, M., Noguchi, Y., Richards, E., Jungbluth, A., Wada, H., Moore, M., Williamson, B., Basu, S., Old, L.J. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(15): 8093-8.
137. Gowans, J.L., Knight, E.J. The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc Series B* 1964; 159:257-82; <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1964.0001>
138. Girard, J.P., Moussion, C., Forster, R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2012;12: 762-73.
139. Masopust, D., Schenkel, J.M. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol* 2013;13: 309-20.
140. Aarts, W.M., Bende, R.J., Steenbergen, E.J., Kluin, P.M., Ooms, E.C., Pals, S.T., van Noesel, C.J. Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. *Blood*. 2000; 95(9):2922–9. PMID: 10779440
141. Wartenberg, M., Vasil, P., zum Bueschenfelde, C.M., Ott, G., Rosenwald, A., Fend, F., Kremer, M. Somatic hypermutation analysis in follicular lymphoma provides evidence suggesting bidirectional cell migration between lymph node and bone marrow during disease progression and relapse. *Haematologica*. 2013; 98 (9):1433–41. Epub 2013/04/16. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.074252> PMID: 23585531; PubMed Central PMCID: PMC3762101.
142. Bende, R.J., Smit, L.A., van Noesel, C.J. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007; 21 (1):18–29. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404426> PMID: 17039231
143. Adam, P., Schoof, J., Hartmann, M., Schwarz, S., Puppe, B., Ott, M., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K. Cell migration patterns and ongoing somatic mutations in the progression of follicular lymphoma. *Cytogenet Genome Res*. 2007; 118(2–4):328–36. Epub 2007/11/15. <https://doi.org/10.1159/000108317> PMID: 18000387
144. Bahler, D.W., Levy, R. Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(15):6770–4. PMID: 1495966
145. Cleary, M.L., Meeker, T.C., Levy, S., et al. Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. *Cell*. 1986; 44(1):97–106. PMID: 3079673.
146. Schuler, F., Hirt, C., Dolken, G. Chromosomal translocation t(14;18) in healthy individuals. *Semin Cancer Biol*. 2003; 13(3):203–9. Epub 2003/09/10. PMID: 12959351

147. Liu, Y., Hernandez, A.M., Shibata, D. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(19):8910–4. Epub 1994/09/13. PMID: 8090743; PubMed Central PMCID: PMC44716.
148. Sotlar, K., Escribano, L., Landt, O., Möhrle, S., Herrero, S., Torrelo, A., Lass, U., Horny, H.P., Bültmann, B. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *The American journal of pathology*. 2003; 162(3):737–46. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63870-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63870-9) PMID: 12598308; PubMed Central PMCID: PMC1868096.
149. van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Bruggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., García-Sanz, R., van Krieken, J.H., Droese, J., González, D., Bastard, C., White, H.E., Spaargaren, M., González, M., Parreira, A., Smith, J.L., Morgan, G.J., Kneba, M., Macintyre, E.A. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003; 17(12):2257–317. Epub 2003/12/13. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403202> PMID: 14671650.
150. http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/.
151. Brochet, X., Lefranc, M.P., Giudicelli, V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36(Web Server issue):W503–8. Epub 2008/05/27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn316> PMID: 18503082; PubMed Central PMCID: PMC2447746.
152. Anastasov, N., Bonzheim, I., Rudelius, M., Klier, M., Dau, T., Angermeier, D., Duyster, J., Pittaluga, S., Fend, F., Raffeld, M., Quintanilla-Martinez, L. C/EBPbeta expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica*. 2010; 95(5):760–7. Epub 2009/12/18. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.014050> PMID: 20015877; PubMed Central PMCID: PMC2864382.
153. Koch, I., Slotta-Huspenina, J., Hollweck, R., Anastasov, N., Hofler, H., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F. Real-time quantitative RT-PCR shows variable, assay-dependent sensitivity to formalin fixation: implications for direct comparison of transcript levels in paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol*. 2006; 15(3):149–56. Epub 2006/08/26. <https://doi.org/10.1097/01.pdm.0000213450.99655.54> PMID: 16932070.
154. Stevenson, F.K., Stevenson, G.T. Follicular lymphoma and the immune system: from pathogenesis to antibody therapy. *Blood*. 2012; 119(16):3659–67. Epub 2012/02/18. <https://doi.org/10.1182/blood-201111-367730> PMID: 22337721.
155. Roulland, S., Faroudi, M., Mamessier, E., Sungalee, S., Salles, G., Nadel, B. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. *Adv Immunol*. 2011; 111:1–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385991-4.00001-5> PMID: 21970951
156. Sungalee, S., Mamessier, E., Morgado, E., Grégoire, E., Brohawn, P.Z., Morehouse, C.A., Jouve, N., Monvoisin, C., Menard, C., Debroas, G., Faroudi, M., Mechin, V., Navarro, J.M., Drevet, C., Eberle, F.C., Chasson, L., Baudimont, F., Mancini, S.J., Tellier, J., Picquenot, J.M., Kelly, R., Vineis, P., Ruminy, P., Chetaille, B., Jaffe, E.S., Schiff, C., Hardwigsen, J., Tice, D.A., Higgs, B.W., Tarte, K., Nadel, B., Roulland, S. Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression. *J Clin Invest*. 2014; 124(12):5337–51. <https://doi.org/10.1172/JCI72415> PMID: 25384217; PubMed Central PMCID: PMC4348942.
157. Schneider, D., Dühren-von Minden, M., Alkhatib, A., Setz, C., van Bergen, C.A., Benkíßer-Petersen, M., Wilhelm, I., Villringer, S., Krysov, S., Packham, G., Zirlik, K., Römer, W., Buske, C., Stevenson, F.K., Veelken, H., Jumaa, H. Lectins from

- opportunistic bacteria interact with acquired variable-region glycans of surface immunoglobulin in follicular lymphoma. *Blood*. 2015; 125(21):3287–96. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11609404> PMID: 25784678; PubMed Central PMCID: PMC4482265.
158. Zhu, D., McCarthy, H., Ottensmeier, C.H., Johnson, P., Hamblin, T.J., Stevenson, F.K. Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood*. 2002; 99(7):2562–8. Epub 2002/03/16. PMID: 11895794.
159. Coelho, V., Krysov, S., Ghaemmaghami, A.M., Emara, M., Potter, K.N., Johnson, P., Packham, G., Martinez-Pomares, L., Stevenson, F.K. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(43):18587–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009388107> PMID: 20937880; PubMed Central PMCID: PMCPMC2972945.
160. Spencer, D.H., Sehn, J.K., Abel, H.J., Watson, M.A., Pfeifer, J.D., Duncavage, E.J. Comparison of clinical targeted next-generation sequence data from formalin-fixed and fresh-frozen tissue specimens. *J Mol Diagn*. 2013; 15(5):623–33. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.05.004> PMID: 23810758; PubMed Central PMCID: PMCPMC4912568.
161. Cheung, M.C., Bailey, D., Pennell, N., Imrie, K.R., Berinstein, N.L., Amato, D., Ghorab, Z. In situ localization of follicular lymphoma: evidence for subclinical systemic disease with detection of an identical BCL-2/IGH fusion gene in blood and lymph node. *Leukemia*. 2009; 23(6):1176–9. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.9> PMID: 19212334.
162. Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., Weiss, U. Intracлонаl generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*. 1991; 354(6352):389–92. Epub 1991/12/05. <https://doi.org/10.1038/354389a0> PMID: 1956400.
163. Zuckerman, N.S., McCann, K.J., Ottensmeier, C.H., Barak, M., Shahaf, G., Edelman, H., Dunn-Walters, D., Abraham, R.S., Stevenson, F.K., Mehr, R. Ig gene diversification and selection in follicular lymphoma, diffuse large B cell lymphoma and primary central nervous system lymphoma revealed by lineage tree and mutation analyses. *International immunology*. 2010; 22 (11):875–87. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq441> PMID: 21059768.
164. Mamessier, E., Drevet, C., Broussais-Guillaumot, F., Mollichella, M.L., Garciaz, S., Roulland, S., Benchetrit, M., Nadel, B., Xerri, L. Contiguous follicular lymphoma and follicular lymphoma in situ harboring N-glycosylated sites. *Haematologica*. 2015; 100(4):e155–7. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.115782> PMID: 25527563; PubMed Central PMCID: PMC4380740.
165. Chang, B., Casali, P. A sequence analysis of human germline Ig VH and VL genes. The CDR1s of a major proportion of VH, but not VL, genes display a high inherent susceptibility to amino acid replacement. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995; 764:170–9. PMID: 7486517
166. Feldman, A.L., Arber, D.A., Pittaluga, S., Martinez, A., Burke, J.S., Raffeld, M., Camos, M., Warnke, R., Jaffe, E.S. Clonally related follicular lymphomas and histiocytic/dendritic cell sarcomas: evidence for transdifferentiation of the follicular lymphoma clone. *Blood*. 2008;111: 5433-9.
167. Chen, W., Lau, S.K., Fong, D., Wang, J., Wang, E., Arber, D.A., Weiss, L.M., Huang, Q. High frequency of clonal immunoglobulin receptor gene rearrangements in sporadic histiocytic/dendritic cell sarcomas. *Am J Surg Pathol*. 2009;33: 863-73.
168. Wang, E., Papalás, J., Hutchinson, C.B., Kulbacki, E., Huang, Q., Sebastian, S., Rehder, C., Silbermins, D., Moore, J., Datto, M. Sequential development of histiocytic sarcoma and diffuse large b-cell lymphoma in a patient with a remote history of

- follicular lymphoma with genotypic evidence of a clonal relationship: a divergent (bilineal) neoplastic transformation of an indolent B-cell lymphoma in a single individual. *Am J Surg Pathol.* 2011;35: 457-63. Zhang D, McGuirk J, Ganguly S, Persons DL Histiocytic/dendritic cell sarcoma arising from follicular lymphoma involving the bone: a case report and review of literature *Int J Hematol* 89: 529–532, 2009
169. West, D.S., Dogan, A., Quint, P.S., Tricker-Klar, M.L., Porcher, J.C., Ketterling, R.P., Law, M.E., McPhail, E.D., Viswanatha, D.S., Kurtin, P.J., Dao, L.N., Ritzer, R.D., Nowakowski, G.S., Feldman, A.L. Clonally related follicular lymphomas and Langerhans cell neoplasms: expanding the spectrum of transdifferentiation. *Am J Surg Pathol.* 2013;37: 978-86.
 170. Streubel, B., Chott, A., Huber, D., Exner, M., Jäger, U., Wagner, O., Schwarzingler, I. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 2004; 351:250-9.
 171. Akino, T., Hida, K., Hida, Y., Tsuchiya, K., Freedman, D., Muraki, C., Ohga, N., Matsuda, K., Akiyama, K., Harabayashi, T., Shinohara, N., Nonomura, K., Klagsbrun, M., Shindoh, M. Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors. *Am J Pathol.* 2009;175: 2657-67.
 172. Hida, K., Hida, Y., Amin, D.N., Flint, A.F., Panigrahy, D., Morton, C.C., Klagsbrun, M. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res.* 2004;64: 8249-55.
 173. Vasef, M.A., Zaatari, G.S., Chan, W.C., Sun, N.C., Weiss, L.M., Brynes, R.K. Dendritic cell tumors associated with low-grade B-cell malignancies. Report of three cases. *Am J Clin Pathol.* 1995;104: 696-701
 174. Grogg, K.L., Lae, M.E., Kurtin, P.J., Macon, W.R. Clusterin expression distinguishes follicular dendritic cell tumors from other dendritic cell neoplasms: report of a novel follicular dendritic cell marker and clinicopathologic data on 12 additional follicular dendritic cell tumors and 6 additional interdigitating dendritic cell tumors. *Am J Surg Pathol.* 2004;28: 988-98.
 175. Weber-Matthiesen, K., Winkemann, M., Muller-Hermelink, A., Schlegelberger B., Grote, W. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem.* 1992;40: 171-5.
 176. Weber-Matthiesen, K., Muller-Hermelink, A., Deerberg, J., Scherthan, H., Schlegelberger, B., Grote, W. Discrimination of distinct subpopulations within a tumor with combined double immunophenotyping and interphase cytogenetics. *J Histochem Cytochem.* 1993;41: 1641-4.
 177. Gatta, L.B., Incardona, P., Cadei, M., Grigolato, P., Simoncelli, S., Balzarini, P. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and Her-2/neu genotyping (FICTION) in breast carcinoma candidates to target therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012;20: 413-20.
 178. Bakhirev, A.G., Vasef, M.A., Zhang, Q.Y., Reichard, K.K., Czuchlewski, D.R. Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics (FICTION) detects BCL6 abnormalities, including gene amplification, in most cases of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138: 538-42.
 179. Abaza, H.M., Youssef, S.R., Saad, A.A., Kamal, G.M., Hegazy, M.G., Ibrahim, R.I., Annaka, L.M. Detection of 14q32 rearrangements in multiple myeloma, using simultaneous FISH analysis combined with immunofluorescence. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2015;8: 56-63.
 180. Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., Jaffe, E.S. The 2016 revision

of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016
May 19;127(20):2375-90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569

6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabellennummer	Kurztitel	Seite
Tabelle 1:	WHO Einteilung nach der Revision 2016	12
Tabelle 2:	Symbolmotive nach IUPAC Nomenklatur	22
Tabelle 3:	Table 1 aus Diagnostic Pathology Publikation Primary and secondary antibodies for the FICTION method	59

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.-Nr.	Kurztitel	Seite
Abb. 1	Schematische Darstellung der t(14;18)(q32;q31) Translokation	13
Abb. 2	Schematische Darstellung der BCL2-Gens mit den homologen Domänen. Modifiziert nach Reed J.C.	14
Abb. 3	Extravasation und Homing in die peripheren Lymphknoten (Modifiziert kombinierte Abbildung nach v. Andrian und Mackay; und Cambell und Butcher;)	27
Abb. 4:	Fig.1 aus PloSOne Publikation: Overview of sample collection. H&E stained lymph nodes 9, 14, 15, 16 and 19 after Microdissection	37
Abb. 6	Fig.2 aus PloSOne Publikation: <i>IGH</i> clonality analysis of analysed follicles.	38

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abb.7	Fig.3 aus PloSOne Publiktion: Identification of ISFN-associated reads and read groups.	40
Abb.8	Fig.4 aus PloSOne Publikation: Phylogenetic tree of the eleven sequence groups.	41
Abb. 9	S1 aus supporting Information der PloSOne Publikation: Sanger sequencing of the clonal ISFN IGH product.	49
Abb.10	S2 aus supporting Information der PloSOne Publikation; Alignment of all ISFN-specific reads.	50
Abb.11	S3 aus supporting Information der PloSOne Publikation: Phylogenetic tree of sequence groups based on amino acid sequence similarities of the CDR3 region.	51
Abb.12	S4 aus supporting Information der PloSOne Publikation: Phylogenetic tree of read sequences of the ISFN clone.	52
Abb 13	S5 aus supporting Information der PloSOne Publiktion: Alignment of <i>IGH</i> rearrangement sequences of the cell line HBL1.	53
Abb. 14	S6 aus supporting Information der PloSOne Publikation: Identification of glycosylation sites.	54
Abb 15	Fig.1 aus der Diagnostic Pathology Publikation: Follicular lymphoma case for representative demonstration	60
Abb. 16	Fig.2 aus der Diagnostic Pathology Publikation: a, b FICTION Technique	61

7. Erklärung zu den Anteilen der Autoren an der Veröffentlichung

Für die Veröffentlichung „*Next generation sequencing of the clonal IGH rearrangement detects ongoing mutations and interfollicular trafficking in in situ follicular neoplasia*“ die im Open-Access-Journal PLoS One 2017 Jun 22;12(6) publiziert wurde, haben folgende Personen mitgewirkt: Kosmidis Perikles¹, Bonzheim Irina¹, Dufke Claudia², Colak Sema¹, Hentrich Thomas², Schroeder Christopher², Bauer Peter², Adam Patrick¹, Fend Fend¹. Die mit „¹“ markierten Personen waren zum Zeitpunkt der Durchführung Mitarbeiter des Instituts für Pathologie und Neuropathologie Tübingen, die mit einer „²“ Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Genetik und angewandte Genomik, Tübingen.

Die Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Adam, Herrn Prof. Dr. Fend und Fr. Dr. Bonzheim durchgeführt. Die Betreuung in der medizinischen Genetik hatte Prof. Dr. Bauer übernommen.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Fend und Herrn Prof. Adam in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Bauer.

Folgende Versuche wurden nach Einarbeitung durch Fr. Colak und Fr. Dr. Bonzheim von mir eigenständig durchgeführt (hierbei sollte erwähnt werden dass es eine jahrelange Erfahrung in den Techniken und im Labor der Pathologie meinerseits bestand):

- Selektion des Probenmaterials durch Laser-Mikrodissektionsverfahren, nach Auswahl des Gewebes, Vorbereitung und Durchführung
- Verdau der Zellsuspension
- DNA-Extraktion durch Phenol/Chloroform Aufreinigung
- Qualitäts- und Quantitäts-Überprüfung der gewonnenen DNA
- Komparative Genomanalyse
- PCR für IGH-Framework 2 (FR2)-Gen-Rearrangement
- Elektrophorese der Proben, Vorbereitung, Ausführung sowie Auswertung und Dokumentation

Erklärung zu den Anteilen der Autoren an der Veröffentlichung

- Analyse der JH Primern mittels D4-Fluoreszenzmarker
- Trennung der Produkte durch Kapillarelektrophorese auf dem GenomeLab GeXP Genetic Analysis System
- Analyse der Ergebnisse mittels GenomeLab GeXP Software 10.2
- Bestätigung der umgeordnete V-Genfamilie durch unmakiertes PCR-Produkt (mit FR1-Primer)
- Anreicherung der klonalen Population durch Agarosegelexzision
- IMGT-/V-Quest Auswertung
- Vorbereitung der Proben für die NGS (next generation sequencing). PCR mit FR2/VH3 Primern

Für Optimierungsschritte, der oben genannten Versuche, standen mir Fr. Colak und Fr. Dr. Bonzheim zur Seite.

Neben den oben genannten Laborschritten war ich bei der Validierung und Visualisierung der Ergebnisse beteiligt. So sind die Figuren 1,2,3 und 4 sowie die Abbildungen 2,3 und 4 des Anhangs (s. supporting Information) von mir selbst.

NGS der Produkte wurde in Zusammenarbeit im Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik und von Fr. Dr. Claudia Dufke durchgeführt.

Die Rohdaten der NGS wurden in der Medizinischen Genetik von Fr. Dr. Dufke, Herrn Hentrich sowie Herrn Dr. Schroeder analysiert. Die Interpretation der Ergebnisse wurden durch Zusammentreffen aller Beteiligten mehrmals besprochen. Die statistische Auswertung wurde von mir in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. Dufke und Fr. Dr. Bonzheim durchgeführt.

Im allgemeinen gelten für diese Publikation die Autorenbeiträge wie sie in der Veröffentlichung aufgelistet worden sind. D.h.:

Konzeptualisierung: FF PA PB. Datensicherung: CD CS **PK** IB.

Formale Analyse: CD IB. Finanzierungserwerb: PA.

Untersuchung: **PK** IB CD CS SC. Methodik: PB CD CS IB.

Erklärung zu den Anteilen der Autoren an der Veröffentlichung

Projektverwaltung: FF PA PB. Ressourcen: FF PB. Software: CS TH.

Aufsicht: FF PA IB PB. Validierung: **PK** IB CS CD. Visualisierung: **PK**
CD CS.

Schreiben - Originalentwurf: **PK** IB.

Schreiben - Rezension und Bearbeitung: PA FF CD CS.

Fr. Dr. Bonzheim und ich sind Erstautoren.

Das Manuscript “*The t(14;18) translocation is absent from in non-lymphoid bystander cells of follicular lymphoma (FL) and shows heterogeneous presence in preserved FL mantle zones*” wurde in der Zeitschrift Diagnostic Pathology 2018 publiziert. Folgende Personen haben diesbezüglich mitgewirkt. Fr. Dipl. Biol. Barbara Mankel, Herr Prof. Dr. Falko Fend und Herr Prof. Dr. Patrick Fend. Alle Personen waren zum Zeitpunkt der Durchführung Mitarbeiter des Instituts der Pathologie und Neuropathologie Tübingen.

Die Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Adam und Prof. Dr. Fend durchgeführt. Fr. Mankel hat bei der Validierung und Überprüfung des Verfahrens und der Ergebnisse mitgewirkt.

Alle Versuche wurden von mir eigenhändig durchgeführt. Diese enthielten komplett alle Arbeitsschritte von der Planung der Methodik bis zum Verfassen der Publikation.

Im Einzelnen sind zu erwähnen:

- Planung der Methodik
- Bestellung von Lösungen und Antikörpers
- Herstellung der Puffersysteme
- Vorversuche der FICTION mittels Kontrollen
- Ermittlung des Cut-Offs Levels

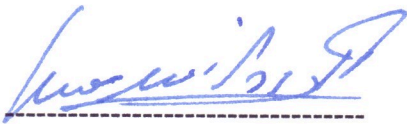
Erklärung zu den Anteilen der Autoren an der Veröffentlichung

- Etablierung und Justierung der FICTION Methode für die FL-Fälle
- Mikroskopieren der Fälle
- Durchführung der FISH und FICTION Methode am Material
- Auswertung der FISH und FICTION Fälle
- Interpretation der Ergebnisse
- Wiederholung der Methode durch randomisierte einfachblinde Proben
- Fotografie und Dokumentation der Ergebnisse
- Verfassung und Publikation, Literaturrecherche

Fr. Mankel hat die Überprüfung der Ergebnisse mittels randomisierten einfachblinden Proben an Einzelfällen durchgeführt. Diese wurden danach mit meinen ermittelten Ergebnissen des jeweiligen Falls überprüft und validiert.

Ich versichere, die Manuskripte selbstständig und nach Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Adam, Herrn Prof. Dr. Fend und Fr. Dr. Bonzheim verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen-Bühl, den 23-09-2018



Perikles Kosmidis

8. Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation „Molekulargenetische Analysen zur Genese Follikulärer Lymphome“

Sehr geehrte Damen und Herren!

Hiermit erkläre ich, Perikles Kosmidis, geboren am 30-01-1969, in Thessaloniki (Griechenland), dass ich die Dissertation selbstständig verfasst habe und keine weiteren, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Wörtliche oder inhaltliche Stellen, die anderen Quellen entstammen, wurden als solche gekennzeichnet.

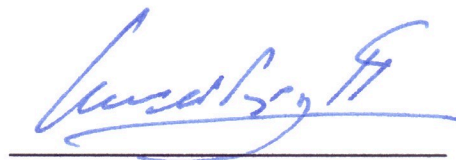
Die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wurden gemäß der Promotionsordnung der Eberhard-Karls-Universität Tübingen uneingeschränkt eingehalten.

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

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

Tübingen-Bühl, den 23-09-2018

Ort, Datum



Unterschrift

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich an allen den Menschen bedanken die mir während der Zeit der Dissertationsarbeit zu Seite standen, mich unterstützt haben und mit mir viel Geduld aufbrachten.

In erster Linie bedanke ich mich an meinen Betreuern die Herren Professoren Patrick Adam und Falko Fend die nicht nur meine Dissertation ermöglichten, sondern mir auch die Chance gaben vertieft in die Materie der Follikulären Lymphomen zu forschen. Durch ihre gute Konzeption und Leitung der Studie gaben sie mir die wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

An drei kompetente Personen des Instituts bedanke ich mich ganz besonders in dem sie mir wertvolle Unterstützung und stets sehr gute Laborbetreuung gaben, Fr. Dr. Irina Bonzheim, Fr. Sema Colak und Fr. Dipl. Biol. Barbara Mankel. Durch ihr fundiertes Wissen und große Laborerfahrung gaben sie mir gute Tipps und Lösungen bei Problemen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes der Genetik Tübingen und speziell bei Fr. Dr. Claudia Dufke, Herrn Dr. Christopher Schroeder, Herrn Dr. Thomas Hentrich und natürlich an Herrn Prof. Dr. Peter Bauer in dem sie mit ihrer Hilfe die Vertiefung und den daraus gewonnenen Rohdaten zu weiteren Erkenntnissen brachten.