

**Molekulare Charakterisierung lokalisierter und
systemischer Follikulärer Lymphome:
Neue Einblicke in die Pathogenese und
Identifizierung potentieller therapeutischer Zielgene**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
M. Sc. Sabrina Kalmbach
aus Heilbronn

Tübingen
2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

15.12.2023

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Matthias Schwab

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. German Ott

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen.....	V
Zusammenfassung.....	X
Summary.....	XII
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Follikuläre Lymphom.....	1
1.2. Pathogenese und Manifestation des FL.....	2
1.3. Epidemiologie und klinische Merkmale.....	3
1.4. Diagnostik und Therapiemöglichkeiten des FL.....	5
1.5. IFL und sFL unterscheiden sich auf genetischer Ebene.....	8
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden.....	11
2.1. Materialien.....	11
2.1.1. Reagenzien.....	11
2.1.2. Geräte.....	13
2.1.3. Kits.....	14
2.1.4. Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.5. Antikörper (AK).....	14
2.1.6. Hergestellte Puffer und Medien.....	15
2.1.7. Oligonukleotide.....	15
2.2. FL-Kohorten und Probengewinnung.....	16
2.3. DNA-Extraktion aus FFPE-Blöcken und Frischgewebe.....	16
2.4. Qualitätskontrollen der extrahierten DNA-Proben.....	17
2.4.1. Qualitäts-PCR mit Oligonukleotiden des <i>hemoglobin subunit beta (HBB)</i> Gens.....	17
2.4.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	18
2.4.3. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) des <i>Ferritin Heavy Chain 1 (FTH1)</i> -Gens.....	18

2.4.4.	Qualitätsanalyse mittels Illumina Infinium QC FFPE Kit.....	20
2.5.	Detektion von <i>BCL2</i> -Translokationen mittels FISH und delta-PCR.....	20
2.6.	Der OncoScan CNV Assay.....	21
2.7.	Datenauswertung der CNA-Analyse.....	24
2.7.1.	Bioinformatische Einzelfallanalyse der CNA-Daten	24
2.7.2.	Identifikation frequenter und signifikanter CNA mittels Genomic Identification of Significant Targets in Cancer (GISTIC) 2.0.....	24
2.8.	Quantitative PCR (qPCR) und FISH zur Validierung der identifizierten CNA im FL	25
2.8.1.	Herstellung spezifischer FISH-Sonden aus BAC-Klonen.....	25
2.8.2.	Metaphasen- und FFPE-FISH.....	27
2.8.3.	qPCR zur Validierung spezifischer Zugewinne und Verluste mittels SYBRgreen-Technologie.....	28
2.9.	Gesamt-Exom Sequenzierung der FL-Fälle	29
2.10.	Validierung der identifizierten somatischen Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung.....	29
2.11.	Analyse der Genexpression ausgewählter Zielgene mittels RT-PCR	31
2.12.	Chromatin Accessibility Assay.....	32
2.13.	Viabilitätsassay ausgewählter B-Zelllinien (ZL).....	33
2.14.	Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot.....	35
2.15.	Immunhistochemische (IHC) Färbungen	37
2.16.	Herstellung von FFPE-Zellblöcken kombinierter B-ZL	37
2.17.	Analysen zur Korrelation spezifischer Mutationen und Aberrationen mit dem Progressionsfreien Überleben (PFS).....	38
3.	Ergebnisse.....	39
3.1.	Probenaufarbeitung.....	39
3.1.1.	Qualitätsanalysen der isolierten FL-DNAs	39
3.1.2.	Nachweis der <i>BCL2</i> -Translokation mittels FISH und delta-PCR.....	41
3.2.	Identifikation von CNA und Mutationen in FL.....	42
3.2.1.	Detektion von CNA und Identifikation neuer Zielgene in IFL und sFL	42
3.2.2.	GISTIC-basierte Identifikation signifikanter CNA in IFL und sFL.....	45
3.2.3.	Identifikation von rekurrenten somatischen Mutationen in FL	50

3.2.4.	Vergleichende Analyse von CNA- und Mutationsprofilen in IFL und sFL	53
3.2.5.	Mutationsprofile unterscheiden sich nur marginal in IFL und sFL.....	54
3.3.	Unterschiede und Gemeinsamkeiten <i>BCL2</i> -Translokations-positiver (<i>BCL2</i> +) und – negativer (<i>BCL2</i> -) IFL	56
3.3.1.	Unterschiede auf CNA-Ebene	56
3.3.2.	Unterschiede auf Mutationsebene	57
3.4.	Validierung der neu identifizierten CNA mittels FISH ist der qPCR-vermittelten Verifizierung überlegen	59
3.5.	Mittels Sanger-Sequenzierung können nur klonale Mutationen validiert werden	64
3.6.	Die Genexpression identifizierter Kandidatengene korreliert mit dem CNA-Status .	66
3.7.	Neu identifizierte putative Zielgene <i>IKZF1</i> , <i>FCRL5</i> und <i>ETS-1</i> werden auch auf Proteinebene exprimiert	68
3.7.1.	Immunhistochemische Färbungen von FL.....	68
3.7.2.	Western Blot zur Analyse der Proteinexpression in Zelllinien verschiedener B- Zell-Lymphome	69
3.8.	B-Zell-Lymphom-ZL zeigen ein differentielles Ansprechen auf <i>IKZF1</i> - und <i>ETS1</i> - Inhibitoren	71
3.9.	Verminderte <i>IKZF1</i> -Expression infolge der Lenalidomid-Behandlung in B-Zell- Lymphom-ZL mit <i>IKZF1</i> -Zugewinn	74
3.10.	Weiterführende Analysen	75
3.10.1.	Untersuchung möglicher funktioneller Konsequenzen von Mutationen in CMG mittels Chromatin Accessibility Assay.....	75
3.10.2.	Untersuchung des möglichen Einflusses von Mutationen in Spleißstellen auf die Genexpression	77
3.10.3.	Analyse der Auswirkungen von <i>STAT6</i> -Mutationen und CNA auf die GE von pro- und anti-apoptotischen Proteinen	79
3.10.4.	<i>BCL2</i> -Zugewinne beeinflussen das progressionsfreie Überleben der Patienten mit IFL	80
4.	Diskussion.....	81
4.1.	Probengewinnung, Qualitätskontrolle und Charakterisierung der FL-Fälle	81
4.2.	Identifikation von genetischen Aberrationen und Mutationen in verschiedenen klinischen Stadien des FL.....	82

4.3. Vergleichende Analysen verschiedener FL-Subkohorten	84
4.4. Die neu identifizierten aberranten Regionen enthalten Gene, die an der Pathogenese des FL beteiligt sein können.....	88
4.5. Weiterführende Untersuchungen der neu identifizierten aberranten Gene zeigen potentielle therapeutische Indikationen.....	90
4.6. B-Zell-Lymphom-ZL mit Zugewinnen in 11q24 und 7p12 zeigen ein differentielles Ansprechen auf <i>ETS-1</i> - und <i>IKZF1</i> -Inhibitoren.....	92
4.7. Weiterführende Analysen und Perspektiven.....	95
Abbildungen	97
Tabellen	103
Referenzen.....	105
Danksagung	124
Anhang.....	125
R-Code EaCoN Package	125

Abkürzungen

A	Adenin
Abb	Abbildung
ABC-DLBCL	Aktiviertes B-Zell-DLBCL
<i>ABL2</i>	<i>ABL proto-oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase</i>
aCGH	Array-based Comparative Genomic Hybridization
<i>ADAM</i>	<i>ADAM metallopeptidase domain</i>
AF	Allelfrequenz
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
APT	Analysis Power Tool
<i>ARID1A</i>	<i>AT-rich interaction domain 1A</i>
ASCAT	allele-specific copy number analysis of tumors
ATP	Adenosin-Triphosphat
AZ	Allgemeinzustand
BAC	Bacterial artificial chromosome
BAF	B-Allele frequency
<i>BCL</i>	<i>B Cell Lymphoma</i>
<i>BCL2</i>	<i>BCL2 apoptosis regulator</i>
<i>BCL11A</i>	<i>BCL11 transcription factor A</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
BSC	Best Supportive Care
BZR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CAR	Chimeric antigen receptor
<i>CARD11</i>	<i>caspase recruitment domain family member 11</i>
CCF	Cancer Cell Fraction
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CGH	Comparative genomic hybridization
ChAS	Chromosome Analysis Suite
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
CMG	Chromatin-modifizierende Gene
CN	Copy number
CNA	Copy number alteration
CNN-LOH	Copy number neutral-loss of heterozygosity
CNV	Copy number variation
Cq	Quantifizierungszyklus
CR	Complete Remission
<i>c-RAF</i>	<i>Cellular Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
<i>CREBBP</i>	<i>CREB binding protein</i>
<i>CRLF2</i>	<i>cytokine receptor like factor 2</i>
<i>CSF2RA</i>	<i>colony stimulating factor 2 receptor subunit alpha</i>
Ct	Cycle threshold

Abkürzungen

CVP	Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison
<i>DDX11L16</i>	<i>DEAD/H-box helicase 11 like 16</i>
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelstängige DNA
EaCoN	Easy Copy Number
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EP300</i>	<i>E1A binding protein p300</i>
<i>ERK= MAPK1</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
<i>ETS-1</i>	<i>ETS proto-oncogene 1, transcription factor</i>
<i>EZH2</i>	<i>enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2</i>
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
<i>FCRL5</i>	<i>Fc receptor like 5</i>
FCS	fetal calf serum
FDR	False Discovery Rate
FE	Fold enrichment
FF	Fresh frozen
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FL	Follikuläres Lymphom
<i>FLI1</i>	<i>Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor</i>
FLIPI	Follicular Lymphoma International Prognostic Index
FOR	Forward
<i>FOXO1</i>	<i>forkhead box O1</i>
<i>FRMPD3</i>	<i>FERM and PDZ domain containing 3</i>
<i>FTH1</i>	<i>ferritin heavy chain 1</i>
g	Gramm
G	Guanin
<i>GAPDH</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GE	Genexpression
Ggf.	gegebenenfalls
GISTIC	Genomic Identification of Significant Targets in Cancer
GLA	German Lymphoma Alliance
GLSG	German Low Grade Lymphoma Study Group
Granta	Granta519
h	Stunden
<i>HBB</i>	<i>hemoglobin subunit beta</i>
HLA	human leukocyte antigen
HR	Hazard Ratio
IG	Immunglobulin
IGH	Immunglobulin H
<i>IGLL5</i>	<i>immunoglobulin lambda like polypeptide 5</i>
IHC	Immunhistochemisch
<i>IKZF1</i>	<i>IKAROS family zinc finger 1</i>

Abkürzungen

<i>IL9R</i>	<i>interleukin 9 receptor</i>
<i>ITAM</i>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
<i>ITIM</i>	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
kbp	kilo base pair
<i>KIR3DL1</i>	<i>killer cell immunoglobulin like receptor, three Ig domains and long cytoplasmic tail 1</i>
<i>KMT2D</i>	<i>lysine methyltransferase 2D</i>
L	Liter
IFL	lokalisiertes Follikuläres Lymphom
LK	Lymphknoten
LINC	long intergenic non-protein coding RNA
LLMPP	Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project
L+R	Lenalidomid plus Rituximab
M	Molar/ Mol
mA	Milliampere
MACS	Magnetic Cell Separation
MAR	Minimal amplifizierte Region
Mb	Megabasen
MDR	Minimal deletierte Region
<i>MEF2B</i>	<i>myocyte enhancer factor 2B</i>
<i>MEK</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
MIP	Molecular inversion probe
MIR	Mabthera involved-field
ML	Maligne Lymphome
mL	Milliliter
mM	Millimol
MM	Multiplres Myelom
MSV	Multi sample viewer
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MUT	Mutation
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
<i>c-Myc</i>	<i>MYC proto-oncogene</i>
n.a.	nicht auswertbar
ng	Nanogramm
nm	nanomolar
n.s.	nicht signifikant
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>NFκB</i>	<i>Nuclear factor-kappa-B</i>
<i>NGFR</i>	<i>nerve growth factor receptor</i>
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
OT	Objektträger
O3	OciLy3
O10	OciLy10
<i>PAPOLG</i>	<i>poly(A) polymerase gamma</i>

Abkürzungen

PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFS	Progressions-freies Überleben
<i>PHB</i>	<i>prohibitin</i>
Pmol	Picomol
<i>POLR2B</i>	<i>RNA polymerase II subunit B</i>
PR	Partial Remission
<i>PRPS1</i>	<i>phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1</i>
<i>PRXL2B</i>	<i>peroxiredoxin like 2B</i>
<i>PUS10</i>	<i>pseudouridine synthase 10</i>
QC	Quality check
qPCR	Quantitative PCR
R-CHOP	Rituximab-Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
<i>REL</i>	<i>REL proto-oncogene, NF-kB subunit</i>
REV	Reverse
RF	Risikofaktoren
rLK	reaktiver Lymphknoten
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Radiotherapie
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sek	Sekunden
<i>SESN1</i>	<i>Sestrin 1</i>
sFL	systemisches Follikuläres Lymphom
SG	Spektrum-Grün
siRNA	Small interfering RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SO	Spektrum-Orange
<i>SPRY3</i>	<i>sprouty RTK signaling antagonist 3</i>
SSC	saline sodium citrate
<i>STAT6</i>	<i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
s.u.	Siehe unten
SU6	SUDHL6
SU10	SUDHL10
T	Thymin
<i>TAP2</i>	<i>transporter 2, ATP binding cassette subfamily B member</i>
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMA	Tissue micro array
<i>TMEM2</i>	<i>(=CEMIP2) cell migration inducing hyaluronidase 2</i>
<i>TNFRSF14</i>	<i>TNF receptor superfamily member 14</i>
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53</i>
<i>TSC22D3</i>	<i>TSC22 domain family member 3</i>
TZG	Tumorzellgehalt
V	Volt
V	Version

Abkürzungen

v.a.	Vor allem
VAMP7	<i>vesicle associated membrane protein 7</i>
V-, D-, J-Gene	V – variable; D – diversifying; J – joining
VENTXP1	<i>VENT homeobox pseudogene 1</i>
WASIR1	<i>WASH and IL9R antisense RNA 1</i>
WB	Western Blot
WES	Whole exome sequencing
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
ZL	Zelllinie
ZNF	<i>zinc finger</i>
%	Prozent

Zusammenfassung

Das Follikuläre Lymphom (FL) ist ein Lymphom, das sich von B-Zellen ableitet. Klinisch wird es nach seiner Ausbreitung in vier klinische Stadien unterteilt. Es zählt zu den häufigsten indolenten B-Zell-Lymphomen. Aufgrund dieses indolenten klinischen Verlaufs wird die überwiegende Mehrheit der FL erst in systemischen klinischen Stadien (III und IV; sFL) diagnostiziert, weshalb auch bisherig erhobene molekularbiologische Charakteristika überwiegend auf den Daten der sFL basieren. Entsprechende Daten FL lokalisierter klinischer Stadien (I und II; IFL) existieren bislang kaum. Da der klinische Verlauf des FL stark unterschiedlich sein kann und erste Hinweise auf biologische Unterschiede zwischen den IFL und sFL bzw. FL mit (*BCL2+*) und ohne (*BCL2-*) charakteristischer t(14;18)-Translokation des *BCL2*-Gens gefunden wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine große Kohorte an IFL und sFL molekularbiologisch charakterisiert. Hierfür wurden die Kopienzahlveränderungen (CNA) und somatischen Mutationen der Tumoren detektiert und analysiert. Ein Vergleich der molekularbiologischen Profile von IFL und sFL ergab erstaunlicherweise keine großen Unterschiede. Bei den IFL und sFL zeigten sich lediglich unterschiedliche Frequenzen in Zugewinnen in den Chromosomen 17, 18 und X bzw. der Mutationen des Gens *ARID1A*, mit jeweils häufigerem Auftreten in den sFL, signifikant. Des Weiteren konnten Spleißstellenmutationen von *KMT2D*- bzw. *CREBBP*- ausschließlich in IFL identifiziert werden. Vergleichende Analysen der *BCL2+* und *BCL2-* FL ergaben keine signifikanten Unterschiede in ihrem CNA-Profil, zeigten aber signifikante Unterschiede auf Basis der somatischen Mutationen. Hierbei traten *STAT6*-Mutationen signifikant häufiger in *BCL2-* FL auf, während *BCL2+* signifikant häufiger Mutationen in *BCL2*, *KMT2D*, *ABL2* und *IGLL5* aufwies. Ergänzend zu den detektierten Unterschieden zwischen den Subkohorten wurden bisher für das FL noch nicht beschriebene CNA und Mutationen identifiziert. Sowohl für IFL als auch sFL wurden signifikante Zugewinne in einzelnen interessanten Zielgenen in 1q23.1 (*FCRL5*), 6p21.32, 7p12.2 (*IKZF1*) sowie 11q24.3 (*ETS-1*) nachgewiesen. Signifikant auftretende Verluste wurden in 8p11.22 identifiziert. Eine erhöhte Proteinexpression in Fällen mit Zugewinn konnte für *IKZF1* beobachtet werden. Viabilitätsassays an Zelllinien (ZL) mit und ohne Zugewinnen in *ETS-1* bzw. *IKZF1*, die mit den bereits verfügbaren spezifischen Inhibitoren YK-4-279 (*ETS-1*) bzw. Lenalidomid (*IKZF1*) behandelt wurden, ergaben ein differentielles Ansprechen der ZL. Einen Einfluss der neu identifizierten Aberrationen bzw. spezifischen Mutationen auf die Genexpression von Apoptose-assoziierten Proteinen konnte nicht beobachtet werden. Allerdings zeigte sich ein Zugewinn von *BCL2* als signifikant mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert und bildet damit den ersten prognostischen molekularbiologischen Marker im IFL. Die neu identifizierten, rekurrenten Aberrationen sollen in weiterführenden Analysen systematisch charakterisiert werden, um

potentielle neue Zielstrukturen für therapeutische Ansätze im FL zu definieren und die Risikostratifizierung von Patienten mit FL zu optimieren.

Summary

Follicular Lymphoma (FL) is subdivided into four clinical stages and is among the most common indolent B cell lymphomas. Due to a late onset of symptoms, the majority of FL cases is diagnosed in the systemic clinical stages III and IV (sFL) compared to the localized clinical stages I and II (IFL). So far, most of the data characterizing FL are derived from sFL and only less is known about molecular biological features of IFL. However, first comparing analysis of IFL and sFL, as well as FL harboring (*BCL2*+) or FL lacking (*BCL2*-) the characteristic *BCL2*-translocation, showed differences in their genetic profiles. This is of special interest, since the clinical course of FL is very heterogeneous, but only little is known about the underlying genetic features. Based on a large cohort of IFL and sFL, copy number alterations (CNA) and somatic mutations were detected and analyzed for comprehensive genomic profiling of FL. Unexpectedly, comparing the profiles of IFL and sFL only few differences were seen. Gains in chromosomes 17, 18 and X were significantly enriched in sFL as well as mutations affecting *ARID1A*. Moreover, splice site mutations in *CREBBP* and *KMT2D* were exclusively found in IFL. Based on the CNA profiling of *BCL2*+ and *BCL2*- IFL, no significant differences were detected. In contrast, *STAT6* mutations occurred more frequently in *BCL2*- FL, while *KMT2D*, *ABL2* and *IGLL5* were more frequently mutated in *BCL2*+ FL. Additionally, novel significant gains were detected in IFL and sFL affecting target genes in 1q23.1 (*FCRL5*), 6p21.32, 7p12.2 (*IKZF1*) as well as 11q24.3 (*ETS-1*). Significant accumulation of losses was seen in 8p11.22. Increased *IKZF1* protein expression was observed for cases harboring gains in 7p12.2. Cell viability assays were performed using cell lines with and without gains in either *IKZF1* or *ETS-1*. Treatment of cell lines with the specific *IKZF1*-inhibitor lenalidomide or the *ETS-1* inhibitor YK-4-279 showed differential responses to the inhibitor. Very interestingly, gains in *BCL2* were associated with an inferior progression-free survival in patients with IFL and thus providing the first prognostic molecular marker in IFL. The novel identified aberrations in specific target genes can further be used for intensified characterization and to possibly identify potential new target genes in FL therapies or risk stratification.

1. Einleitung

1.1. Das Follikuläre Lymphom

Das follikuläre Lymphom (FL) ist den malignen B-Zell-Lymphomen zugeordnet und gehört damit zu den nicht-soliden Tumoren des blutbildenden Systems. Erhebungen der Daten maligner Lymphome (ML) aus Deutschland zeigen eine standardisierte Neuerkrankungsrate von 11,7 bzw. 17,6/100.000 für Frauen und Männer für das Jahr 2017 und prognostizieren einen weiteren Anstieg bis zum heutigen Zeitpunkt¹.

ML entstammen aus Lymphozyten und ihren Vorläufern und betreffen B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Das B-Zell-Lymphom ist mit einer Häufigkeit von 90% das häufigste Lymphom in der westlichen Hemisphäre und wird derzeit in rund 40 verschiedene Entitäten unterteilt. Grundsätzlich können maligne Neoplasien des lymphatischen Systems in jedem Stadium der Lymphozytenreifung auftreten, was sich in der Vielfalt maligner Lymphome widerspiegelt (Abb.1). Innerhalb der B-Zell-Lymphome ist das FL nach dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) die zweithäufigste Neoplasie und zählt im Unterschied zum DLBCL zu den indolenten Lymphomen². Dieser Subtyp geht mit einem deutlich weniger aggressiven Verlauf einher und zeichnet sich durch eine niedrige Proliferation aus.

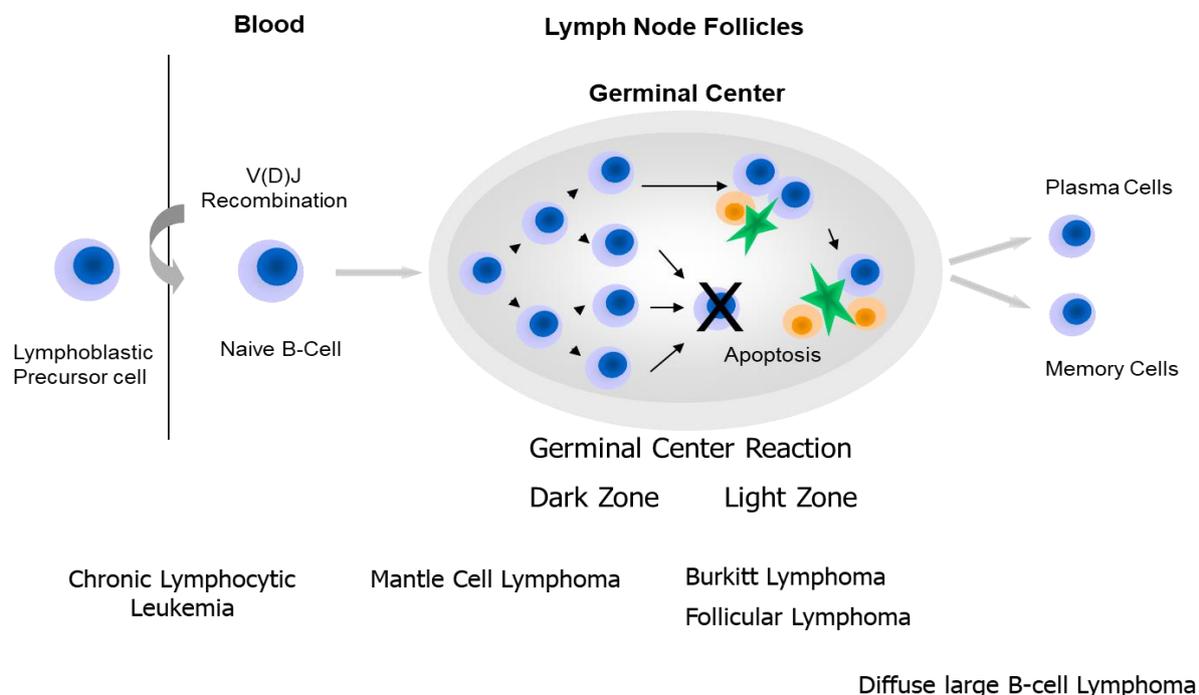


Abbildung 1: Schematische Darstellung der B-Zell-Reifung und der zahlreichen Möglichkeiten zur Entartung. Die B-Zelle (blau) entwickelt sich vom lymphoiden Vorläufer zur differenzierten Zelle. Ein Großteil der Entwicklungsschritte findet dabei im Lymphknoten statt. Die Manifestation des FL geschieht im Keimzentrum.

Das FL manifestiert sich im Keimzentrum des Lymphknotens. Mikroskopisch zeigt sich das FL als eine charakteristische follikuläre Struktur des Keimzentrums und setzt sich aus einer

diffusen Verteilung aus Centrozyten und Centroblasten zusammen. Es exprimiert typische B-Zell-Marker wie CD19, CD20 und CD22. Immunhistochemische (IHC) Färbungen zeigen zusätzlich eine deutliche Expression der Keimzentrumsmarker BCL6 und CD10 sowie –in den meisten Fällen - die pathologische Überexpression von BCL2.

1.2. Pathogenese und Manifestation des FL

Das FL entwickelt sich aus einer lymphoiden Vorläuferzelle in einem komplexen Reifungsprozess. Die Entwicklung beginnt im Knochenmark als lymphoblastische Vorläuferzelle. Bereits in diesem Stadium tritt die für das FL charakteristische Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ auf, die als initiale genetische Aberration zur Entstehung des FL angesehen wird³. Hierbei findet die Translokation zwischen dem *B cell lymphoma 2 (BCL2)* Gen (Chromosom 18q21) und dem *Immunoglobulin heavy chain (IGH)* Gen statt. Der Einfluss des *IGH-E μ* Enhancer auf *BCL2* führt schließlich zu dessen konstitutiver Überexpression⁴. Dieser weitreichende Fehler tritt bereits früh in der Entwicklung während der *VDJ*-Rekombination im Knochenmark auf. Die Umlagerung der *V*-, *D*-, und *J*-Gene ermöglicht bei einer normalen B-Zelle die Generierung Antigen-adaptierter B-Zell-Rezeptoren (BZR), bietet aber auch Angriffsfläche für pathogene DNA-Veränderungen⁵. Im Fall des FL wird aufgrund des überexprimierten anti-apoptotischen *BCL2* die Apoptose verhindert^{6,7}. Durch diesen anti-apoptotischen Effekt verlängert sich der Lebenszyklus der Zelle signifikant, wodurch sich weitere Aberrationen manifestieren können⁸.

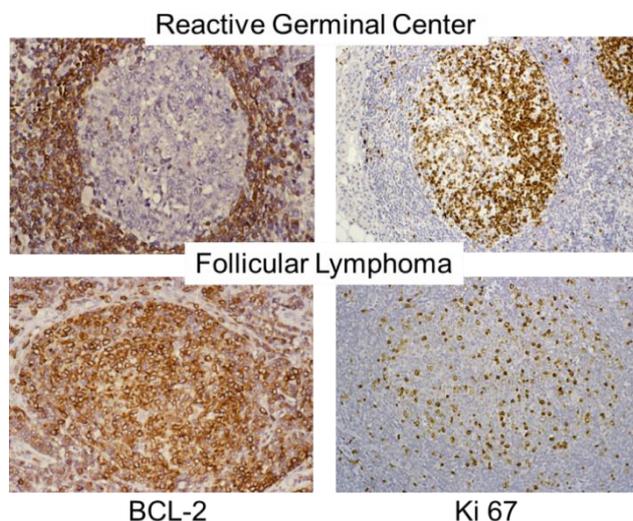


Abbildung 2: IHC-Färbungen von Keimzentren benigener reaktiver Lymphknoten (rLK) (oben) und eines FL (unten) mit BCL2 und Ki67. Braune Färbung zeigt die Expression der verschiedenen Marker. Beim rLK ist BCL2 kaum exprimiert, im FL hingegen stark. Der Proliferationsmarker Ki67 ist im rLK stark, im FL jedoch nur schwach exprimiert.

Im Gegensatz zu schnell proliferierenden benignen Keimzentrums-B-Zellen exprimiert das FL den Proliferationsmarker Ki67 nur gering und ist demnach nicht durch eine hohe Proliferation,

sondern durch die fehlende Apoptose der Keimzentrumszellen, bedingt durch die BCL2-Überexpression, charakterisiert (Abb.2)⁹.

Die Translokation des *BCL2*-Gens wird in ca. 85% der FL beschrieben und gilt als die primäre genetische Aberration im FL¹⁰. Allerdings wird diese auch in einem geringen Anteil an zirkulierenden B-Zellen in gesunden Organismen beobachtet und verdeutlicht die Notwendigkeit zusätzlicher Aberrationen, die zur Entwicklung eines manifesten FL beitragen¹¹⁻¹³. Zahlreiche sekundäre Aberrationen, welche im Prozess der FL-Entwicklung akkumulieren, wurden bereits identifiziert. Zu den häufigsten Aberrationen zählen hierbei insbesondere Mutationen der *CREB binding protein (CREBBP)* und *Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)* Gene, die bereits zu einem frühen Zeitpunkt auftreten¹⁴⁻¹⁶. Mutationen der Gene *tumor necrosis factor receptor superfamily member 14 (TNFRSF14)* und *lysine methyltransferase 2D (KMT2D)* kommen hingegen erst im späteren Verlauf dazu^{16,17}. Zusätzlich zu den beschriebenen Mutationen treten chromosomale Aberrationen auf. Unter den häufigsten Aberrationen finden sich vor allem Verluste in 1p36 und 6q sowie Zugewinne in den Chromosomen 7 und 18¹⁸⁻²⁰. Neben den genetischen Merkmalen des Tumors selbst spielt im FL zudem das umliegende Mikromilieu eine zentrale Rolle²¹, welches die Entwicklung und das Fortschreiten der Erkrankung fördern kann²².

1.3. Epidemiologie und klinische Merkmale

Das FL gilt als das weltweit am häufigsten vorkommende indolente Lymphom und umfasst etwa 22% aller Lymphome der westlichen Welt²³. Dabei war innerhalb der letzten zwei Dekaden ein Anstieg der Inzidenz im Westen zu erkennen²⁴. Die Inzidenz in Europa liegt bei 2,2 und ist somit niedriger als die Inzidenz in den USA mit 2,6^{25,26}. Das FL tritt gehäuft im fortgeschrittenen Alter mit einem mittleren Erkrankungsalter von 64 Jahren auf. Während die Erkrankung in Europa etwas mehr Frauen als Männer betrifft, ist es in den USA, Australien und Japan umgekehrt²⁵. Aufgrund des indolenten Verlaufs des FL liegt das 5-Jahres-Überleben in den USA bei 90,2% (2012-2018) sowie im europäischen Raum bei 90%²⁶⁻²⁸.

Die Risikoeinschätzung des FL erfolgt anhand verschiedener Kriterien, die das Tumorstadium und den Grad der Erkrankung sowie die Verfassung der Patienten berücksichtigen. Das FL wird in vier klinische Stadien unterteilt, wobei die Stadien I und II zu den lokalisierten (IFL) und die Stadien III und IV zu den systemischen FL (sFL) zählen. Die Einteilung in das entsprechende Stadium erfolgt anhand der Lugano Klassifikation, die sich aus dem ursprünglichen Modell, der Ann-Arbor-Klassifikation, entwickelt hat. Im Stadium I begrenzt sich die Erkrankung auf nur einen einzelnen Lymphknoten, ein einzelnes lymphatisches Organ, wie z.B. die Milz oder auf einen extranodalen Bereich. Sobald ein weiteres befallenes Organ hinzukommt, handelt es sich bereits um Stadium II, solange alle betroffenen Stellen auf einer

Seite des Diaphragmas lokalisiert sind. Hat sich die Erkrankung bereits auf beiden Seiten des Diaphragmas manifestiert, so wird das FL mindestens in Stadium III eingeordnet. Stadium IV beinhaltet ein diffuses Tumorwachstum auf beiden Seiten des Diaphragmas mit zusätzlichem extranodalen Befall. Eine weitere Präzisierung des Stadiums erfolgt durch die zusätzliche Kategorisierung der Stadiums in A und B, wobei A das Fehlen und B das zusätzliche Auftreten von Symptomen bezeichnet²⁹ (Abb.3).

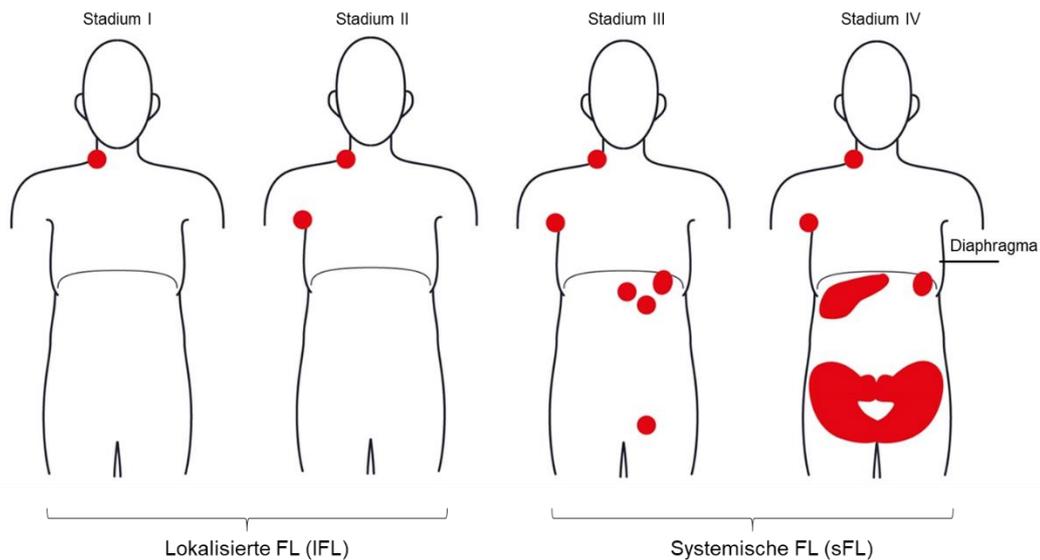


Abbildung 3: Einteilung des FL in die verschiedenen Stadien I-IV. Rote Bereiche kennzeichnen schematisch die Lokalisation der Tumoren³⁰.

Der klinische Verlauf des FL ist sehr heterogen und die Prognose für den Patienten ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Zur Vereinheitlichung der Prognostik wurde der Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) entwickelt³¹, später erweitert und ergänzt. Der ursprüngliche FLIPI erfasst fünf klinische Parameter (Alter des Patienten, Befall des Knochenmarks, Hämoglobinwert, Durchmesser des größten involvierten LK und den $\beta 2$ – Mikroglobulin-Wert im Serum) und berechnet anhand derer eine Gruppierung der Patienten in eine von drei Risikogruppen. Die modifizierte Variante – der „molekulare“ FLIPI oder mFLIPI – schließt über die bisherigen Faktoren hinaus auch biologische Merkmale des FL mit ein. Hierzu gehört der Mutationsstatus der Gene *EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP* und *CARD11*³². Zusätzlich fließt die körperliche Verfassung der Patienten mit in die Risikostratifizierung ein, die mit Hilfe des Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Schemas bewertet wird³³. Die Einteilung erfolgt schließlich in die Gruppen „high-risk“ und „low-risk“, welche das Risiko für ein 5-Jahres-Überleben ohne Neuaufreten des Tumors angeben³².

Eine histomorphologische Graduierung des FL erfolgt nicht mehr obligatorisch, da sich weder der klinische Verlauf noch die Therapie zwischen den Graden 1, 2 und 3A und damit auch der Anteil an Centroblasten im FL wesentlich unterscheiden^{34,35}. Alle drei Grade werden in der neuesten Fassung der *World Health Organization* (WHO) Klassifikation lymphatischer

Neoplasien zu den sogenannten klassischen FL gezählt, Grad 3B hingegen ist den follikulär wachsenden großzelligen B-Zell-Lymphomen zugeordnet¹⁰.

1.4. Diagnostik und Therapiemöglichkeiten des FL

Die verschiedenen Parameter zur Kategorisierung des FL spiegeln bereits die Heterogenität dieses Tumors wider. Dementsprechend gibt es verschiedene therapeutische Strategien zur Behandlung des FL; eine kurative Therapie existiert zumindest für die sFL bisher allerdings nicht. Ein Fortschreiten der Erkrankung (Progression) bzw. die Transformation in ein aggressives Lymphom sind möglich. Die Diagnosestellung impliziert zunächst eine Biopsie eines betroffenen Lymphknotens oder Areals; diese wird dann histopathologisch untersucht. Hierbei wird neben der Sicherstellung der Entität auch das Stadium und ggf. der Grad des FL bestimmt³⁶. Um weitere mögliche Tumorherde zu identifizieren, erfolgen in der Regel eine Computertomographie des Nackens, Thorax und Abdomens zur Stadieneinteilung sowie ggf. eine Knochenmarks-Biopsie²⁹.

Den wichtigsten Parameter zur Therapieentscheidung stellt das Stadium des FL zum Diagnosezeitpunkt dar. Bereits hier unterscheiden sich die möglichen Therapien, da Patienten mit IFL in kurativer Intention behandelt werden können, während das sFL weiterhin als unheilbar gilt³⁶. Des Weiteren spielen insbesondere die Symptomatik sowie der physische Zustand des Patienten eine Rolle, die den klinischen Verlauf und das Fortschreiten der Erkrankung beeinflussen (Abb.4)^{37,38}. Lediglich 20-30% der diagnostizierten Fälle befinden sich zum Diagnosezeitpunkt noch im lokalisierten Stadium³⁹. Asymptomatische Patienten mit niedriger Tumorlast und Wohlbefinden erhalten überwiegend keine Behandlung, sondern fallen in die Kategorie „*Watch-and-wait*“. Hierbei werden die Patienten engmaschig beobachtet und auf das Fortschreiten des FL untersucht⁴⁰. Treten beim IFL trotz niedriger Tumorlast Symptome wie Fieber, Lymphadenopathie, Gewichtsverlust oder Splenomegalie auf, ist eine therapeutische Intervention geboten. Hierbei hat sich insbesondere die Radiotherapie (RT) etabliert^{41,42}. Eine Kombination aus RT und der Verabreichung eines CD20-Antikörpers Rituximab hat den Zeitraum des progressionsfreien Überlebens zusätzlich verlängert^{43,44}, wobei die Wahrscheinlichkeit für ein längeres Überleben bei Patienten mit IFL grundsätzlich hoch ist⁴⁵. Bei hoher Tumorlast wird das IFL nach den Richtlinien des sFL behandelt und erfordert eine systemische Therapie. Trotz des kurativen Ansatzes mittels RT zeigt sich in etwa 50% der Patienten mit FL eine Rezidivbildung außerhalb der bestrahlten Region, was darauf hindeutet, dass eine okkulte Erkrankung bereits vorhanden ist, welche die lokale Bestrahlung überdauert⁴⁶.

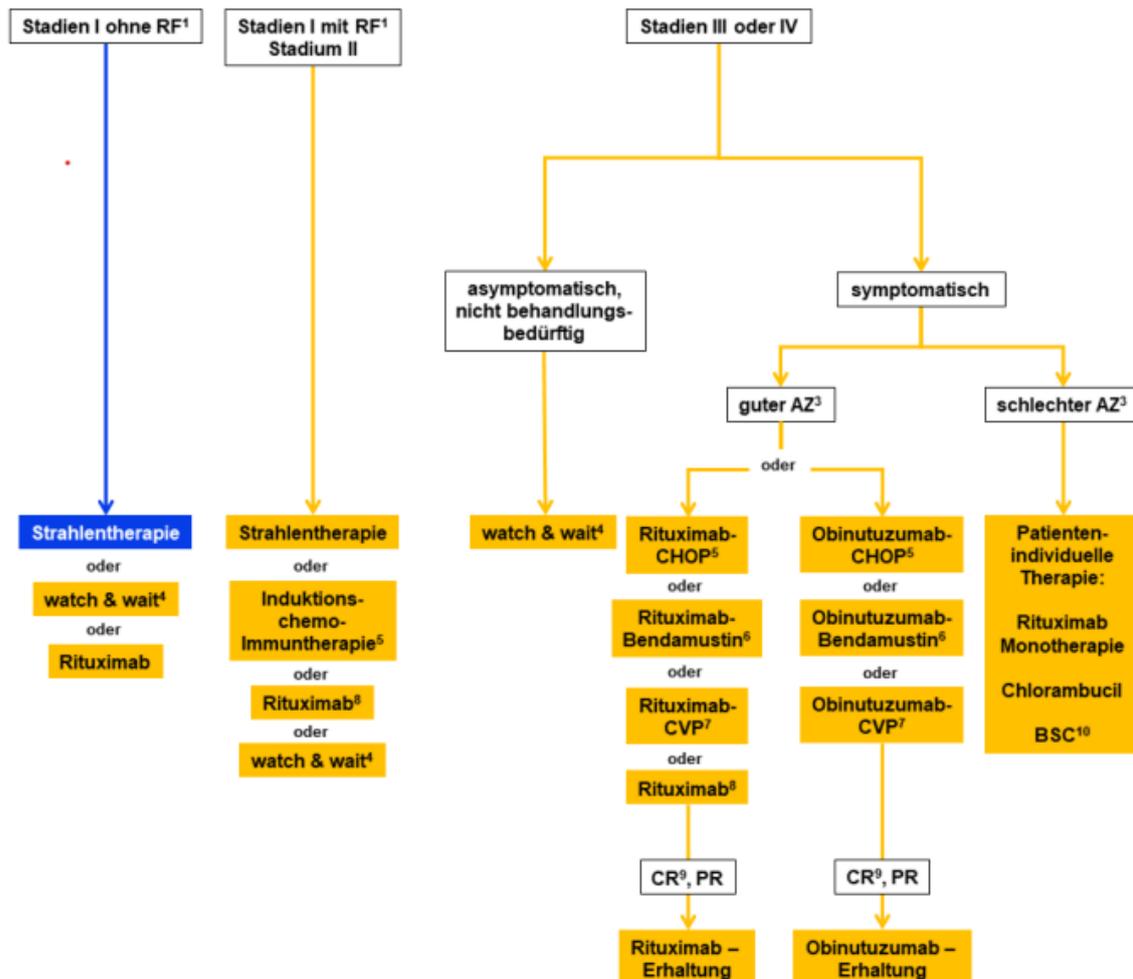


Abbildung 4: Schema zur Therapieentscheidung bei einer FL-Diagnose⁴⁷.

Eine Chemotherapie kommt als Erstlinientherapie nur bei den systemischen Stadien zum Einsatz, also in etwa 70-80% der Fälle. Hierbei wird initial die Chemotherapie in Kombination mit Rituximab verabreicht. Anwendung finden hierbei Bendamustin oder CHOP als Chemotherapeutikum. Diese CHOP-Therapie setzt sich aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison zusammen^{48,49}. Alternativ wird statt Rituximab auch Obinutuzumab als monoklonaler CD20-Antikörper in Kombination zur Chemotherapie eingesetzt. Dieser zeigte zwar keine Verbesserung im Gesamtüberleben der Patienten aber doch ein verlängertes progressionsfreies Intervall⁵⁰. Anhand dieser Therapiemöglichkeiten konnte das Überleben der Patienten im Median auf über 20 Jahre gesteigert werden^{51,52}. Ein großes Problem bleibt dennoch das Risiko eines Rezidivs oder der Transformation in eine aggressivere Form des B-Zell-Lymphoms^{53,54}.

Bei Patienten mit sFL tritt in etwa bei 20% der Patienten eine frühe Progression der Erkrankung auf⁵⁵. Für diese Patienten sind eine optimierte Risikostratifizierung und individualisierte Therapie von essentieller Bedeutung. Nach initialer R-CHOP-Therapie erfolgt somit beim Rezidiv häufig die Anwendung von Bendamustin und umgekehrt³⁶. Auch eine Rituximab-Monotherapie gehört zum Beispiel im Falle einer niedrigen Tumorlast zur

Behandlungsstrategie⁵⁶. Innerhalb der letzten Dekade starteten zunehmend Studien mit innovativen Therapieansätzen für die Zweitlinien-Behandlung von Patienten mit FL. Hierbei standen vor allem Inhibitoren der B-Zell-Signalkaskade, wie z.B. ein *phosphoinositide 3 kinases (PI3K)*-Inhibitor^{57,58}, und eine Behandlung mit Chimeric-antigen-receptor (CAR) T-Zellen im Fokus⁵⁹. Zudem gibt es Studien, die auf die Modifizierung epigenetischer Faktoren abzielen, da im FL gehäuft Mutationen der Histon-modifizierenden Gene auftreten^{60–62}. Eine weitere Möglichkeit zur Zweitlinientherapie besteht in der kombinierten Verabreichung von Rituximab und dem Immunmodulator Lenalidomid^{63,64}. Eine optimierte Risikostratifizierung und eine angepasste Therapie setzen voraus, dass die zugrundeliegende Tumorerkrankung bestmöglich molekularbiologisch charakterisiert ist und dass insbesondere die Hochrisiko-Patienten in der Gruppe der IFL und sFL bereits zum Diagnosezeitpunkt identifiziert werden können. Problematisch ist jedoch, dass die überwiegende Mehrheit der FL-Studien auf Daten basiert, die von Patienten mit sFL erhoben wurden. Das molekulare Make-up der IFL ist noch weitestgehend ungeklärt; umfassende Daten größerer Fallkollektive existieren bislang nicht.

1.5. IFL und sFL unterscheiden sich auf genetischer Ebene

Wie bereits beschrieben ist die Pathogenese des FL ein multifaktorieller Prozess, der sowohl durch genetische und epigenetische aber auch durch Faktoren des Mikromilieus beeinflusst wird⁶⁵. Die daraus resultierende Heterogenität innerhalb des FL äußert sich besonders im unterschiedlichen klinischen Verlauf bei allerdings auch zahlreichen Therapievarianten. *Abbildung 5* stellt die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit FL im Verlauf der Krankheit dar. Hier zeigt sich, dass – bei insgesamt kontinuierlicher Absterberate - einige Patienten nach kurzer Zeit versterben, andere jedoch über 15 Jahre nach der Diagnosestellung noch leben⁶⁶.

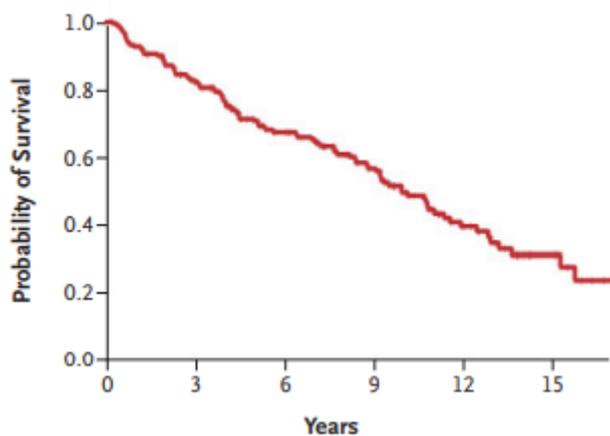


Abbildung 5: Darstellung der Wahrscheinlichkeit des Überlebens mit FL ab der Diagnosestellung in Jahren⁶⁶.

Die Mehrheit der Patienten mit FL befindet sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits im systemischen Stadium der Erkrankung³⁹, wodurch sich Studien vor allem auf Daten der sFL stützen. Auch die Risikostratifizierung der FL, insbesondere die Identifizierung von Patienten, die frühzeitig progredient werden, basiert bisher überwiegend auf Daten der sFL^{31,32}. Da sich jedoch bei der genetischen Analyse kleinerer IFL-Kohorten erste Hinweise auf Unterschiede im Vergleich zu den sFL ergaben, liefert dies eine mögliche Erklärung für die Heterogenität des FL und die unterschiedlichen klinischen Verläufe. Ein signifikanter Unterschied zwischen den IFL und sFL ist z.B. das Auftreten der charakteristischen *BCL2*-Translokation $t(14;18)(q32;q21)$. Während diese bei ca. 90% der sFL auftritt, kann sie nur bei ca. 50% der IFL nachgewiesen werden (*Abb.6a*)⁶⁷.

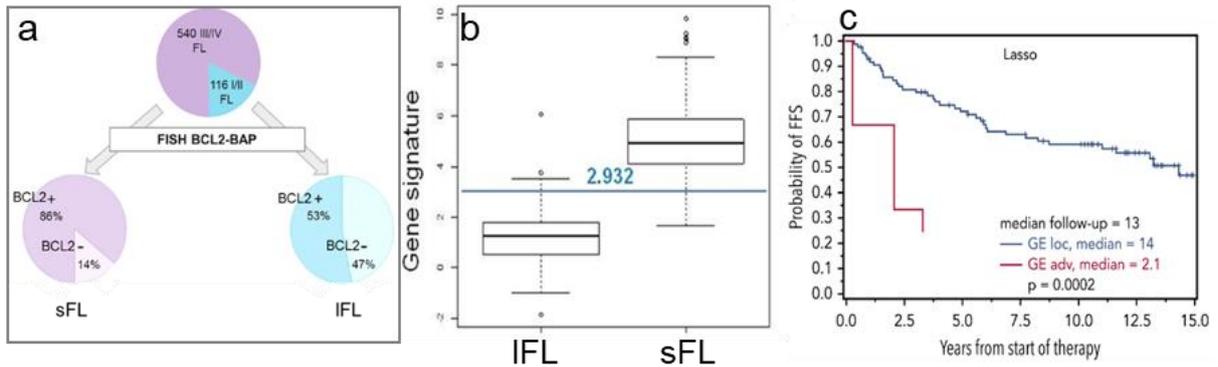


Abbildung 6: a: Mittels Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde die *BCL2*-Translokation in knapp 90% der sFL aber nur in ca. 50% der IFL detektiert⁶⁷. b: Anhand der Genexpression konnte gezeigt werden, dass sich die Gensignaturen zwischen IFL und sFL unterscheiden. c: Patienten mit IFL, die eine sFL-ähnliche Gensignatur aufweisen, haben einen schlechteren klinischen Verlauf als „klassische“ IFL.

Des Weiteren ergaben sich differentielle Genexpressionsprofile beim Vergleich der IFL und sFL (Abb.6b). Mithilfe solcher Gensignaturen ist es außerdem möglich Patienten mit IFL zu identifizieren, deren Genexpression (GE) eher mit der von sFL-Tumoren vergleichbar ist. Diese Patienten zeigten im Vergleich zum „klassischen“ IFL einen deutlich ungünstigeren klinischen Verlauf (Abb.6c)⁶⁸.

Auch anhand unterschiedlicher N-Glykosylierungsmuster lassen sich Subgruppen innerhalb des FL erkennen. So findet man Mutationen in N-Glykosylierungs-assoziierten Genen häufiger, und entsprechend weniger neu erworbene N-Glykosylierungsstellen in *BCL2* Translokations-negativen FL, die wiederum in den IFL angereichert sind⁶⁹.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die Heterogenität des FL bezüglich seiner Biologie spiegelt sich sowohl in den klinischen Verläufen als auch der Risikostratifizierung und unterschiedlichen Therapieansätzen wider. Hierbei wurden speziell Unterschiede zwischen IFL und sFL beschrieben, die jedoch aufgrund der eher geringen Anzahl und Größe an IFL-Kohorten bisher zu wenig aussagekräftig sind.

Deshalb war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Erstellung eines umfassenden, gesamtgenomischen Profils einer großen Kohorte von IFL und sFL, um mögliche biologische Unterschiede zwischen IFL und sFL herauszufinden und noch besser zu charakterisieren und somit die molekularbiologische Risikostratifizierung zu optimieren. Eine weitere Differenzierung sollte anhand der Kopienzahlveränderungen (copy number alterations: CNA) und Mutationsdaten auch zwischen FL mit und ohne *BCL2*-Translokation erfolgen. Darüber hinaus sollen bisher nicht beschriebene, häufig auftretende Aberrationen im FL identifiziert werden, die prospektiv als Biomarker oder therapeutische Ziele genutzt werden können. Ergänzend dazu sollten potentiell neu identifizierte Zielgene validiert werden und deren Interaktionen durch *in-vitro* Versuche detailliert untersucht werden.

Im Rahmen dieser Zielsetzung wurden innerhalb klinischer Studienkohorten der German Lymphoma Alliance (GLA) zunächst Gewebe von lokalisierten (IFL) und systemischen (sFL) FL gesammelt, das mittels referenzpathologischer Begutachtung eindeutig als FL diagnostiziert wurde. Nach erfolgten Qualitätskontrollen der Proben wurden der OncoScan CNV Assay zur Detektion von CNA sowie eine Gesamt-Exom-Sequenzierung (whole-exome sequencing: WES) zur Identifizierung von somatischen Mutationen durchgeführt. Nach der bioinformatischen Verarbeitung erfolgte die Auswertung der Daten und Analyse der CNA und Mutationen für die Kohorten der IFL und sFL. Im Anschluss daran erfolgten Validierungen der identifizierten CNA mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) und real-time PCR (RT-PCR) und der somatischen Mutationen durch Sanger-Sequenzierung. Des Weiteren wurden GE-Analysen der mutierten bzw. aberranten Fälle durchgeführt, um die Auswirkungen der Genveränderungen auf RNA-Ebene zu untersuchen. Effekte auf Protein-Ebene wurden zum einen mittels Western Blot und zum anderen durch IHC-Färbungen ermittelt. Da im FL zahlreiche Mutationen Chromatin-modifizierender Gene auftreten, wurden individuelle Fälle anhand eines Chromatin Accessibility Assays analysiert. Für *in-vitro* Versuche wurden ausgewählte B-Zell-Lymphom-ZL mit identifizierten CNA verwendet und Viabilitäts-Assays durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Reagenzien

1 kb-Marker PEQLAB	VWR, Radnor USA
1x TAE-Puffer	Roth, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; AppliChem, Darmstadt
10% Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
100 bp Ladder	Norgen Biotek, Thorold, ON, Canada,
100% Ethanol	Merck, Darmstadt
100%-, 96%- und 70%-iges Ethanol	SAV Liquid Production Service, Flintsbach a. Inn
10x PBS	Merck, Darmstadt
10x PCR buffer	Qiagen, Hilden
20% SDS	Roth, Karlsruhe
20x SSC	Sigma Aldrich, St. Louis USA
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT-Reagenz)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
30% Acrylamid-Mix	Bio-Rad, Hercules, USA
3 M Natriumacetat (pH 5,2)	Merck, Darmstadt
5 mM dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AB Taqman Gene Expression Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ADAM32 TaqMan Assay (Hs00991935_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agarose	AppliChem, Darmstadt
BAC-Klone	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bax TaqMan Assay (Hs00180269_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BCL2 TaqMan Assay (Hs01048932_g1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BCL11A TaqMan Assay (Hs00256254_m1)	
BCL2L1 TaqMan Assay (Hs00236329_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bradford Reagenz	Serva, Heidelberg
Bovine Serum Albumine (BSA)	
CD20 FITC Antikörper	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD20 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Chloramphenicol 12,5 µg/µl	Roth, Karlsruhe
CREBBP TaqMan Assay (Hs00932878_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO	Th.Geyer, Renningen
dUTP-Spectrum Green	Enzo Life Sciences, Lausen
dUTP-Spectrum Orange	Enzo Life Sciences, Lausen
EDTA-Lösung p.H 8	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid 0,025%	Roth, Karlsruhe
ETS-1 TaqMan Assay (Hs00428293_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FBS Superior	Sigma-Aldrich, Darmstadt
FCRL5 TaqMan Assay (Hs01070204_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FLI1 TaqMan Assay (Hs00956709_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Formalin	
FTH1TaqMan Assay (Hs01694011_s1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Hämatoxylin	Waldeck GmbH, Münster
HCl	Th. Geyer, Renningen
Hybridisierungspuffer	Fluka, St. Gallen; Sigma Aldrich, St. Louis USA
<i>IKZF1</i> TaqMan Assay (Hs00958474_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>KMT2D</i> TaqMan Assay (Hs00912419_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ladepuffer	Sigma Aldrich, St. Louis USA, AppliChem, Darmstadt
LB-Medium, Luria Broth	Sigma Aldrich, St. Louis USA
Lenalidomid	Selleckchem, Houston, USA
Magermilchpulver	Millipore, Burlington, USA
Metaphasen-Objektträger	Abbott Molecular, Chicago USA
Nonidet-P40	Roche, Basel
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
NuSieve GTG Agarose	Lonza, Rockland, USA
Oligonukleotide	Eurofins Genomics, Ebersberg
Pepsin	Sigma Aldrich, St. Louis USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, St. Louis USA
<i>POLR2B</i> TaqMan Assay (Hs00265358_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ponceau-Lösung	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, St. Louis USA
Protein Assay Reagenz	
<i>REL</i> TaqMan Assay (Hs00968440_m1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPML-Medium 1640	Bio&Sell, Feucht
Sephadex G50 Fine	Cytiva, Schwerte
Spectra™ multicolor broad range protein ladder	Merck, Darmstadt
SuperSignal™ West Pico PLUS	
Chemilumineszenz-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SYBRgreen Master Mix (#4309155)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden
TEMED	Sigma-Aldrich, Darmstadt
TRIS/EDTA	Roth, Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame USA
Vysis LSI BCL2- Dual-Color Break-Apart-Sonde	Abbott Molecular, Illinois, USA
Xylol	SAV Liquid Production, Flintsbach
YK-4-279	Selleckchem, Houston, USA

2.1.2. Geräte

7500 Fast Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AB Sequenziersystem 3500 Dx Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AB Veriti Thermal Cycler 96 well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Affymetrix Gene Chip Fluidics Station 450	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Affymetrix Gene Chip Scanner 300 7G	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Affymetrix Hybridization Oven 645	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Autostainer LabVision 720	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
BD FACSLyric Flow Cytometry Systems	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Brutschrank New Brunswick Galaxy 170S	Eppendorf, Hamburg
CCD Kamera Stella3200	Raytest, Straubenhardt
E-Box 1000 UV detection	Vilber, Collégien, France
Elektrophorese-Kammer	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Fluoreszenzmikroskop DMRA	Leica, Wetzlar
Gelelektrophoresekammer	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Heizplatte VHP-C10	VWR, Radnor USA
High Speed Zentrifuge Sorvall Superspeed RC2-B	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Illumina HiSeq PE150	Illumina, San Diegao, USA
Inkubator	Heraeus, Hanau
Inkubator Heratherm	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Lichtmikroskop Leica CTR 6000	Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop Olympus CKX31	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
Mikrotom RM2255	Leica Microsystems, Wetzlar
Nanodrop-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Netzteil Elektrophorese	Bio-Rad, Hercules, USA
Qubit Fluorometer 2.0	Invitrogen, California, USA
Reax top vortex-mixer	Heidolph, Schwabach
Schnellkochtopf	Schulte-Ufer KG, Sundern
Shaker Titramax	Heidolph, Schwabach
Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge LSE™ Mini	Corning, Corning USA
Ultraschallgerät Bioruptor	Diagenode, Seraing, Belgien
Vakuum Station Vac Man®	Promega, Madison USA
Victor Nivo Multimode Plate Reader	PerkinELmer, Waltham, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industires,, New York, USA
Wärmeschrank New Brunswick™ Innova® 42/42R	Eppendorf , Hamburg
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich, Tuttlingen

2.1.3. Kits

AB High Capacity cDNA RT Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Abcam Chromatin Accessibility Assay Kit	Abcam, Cambridge, UK
Agilent SureSelect Human All Exon V6 Kit	Agilent, Santa Clara, USA
Allprep DNA/RNA FFPE Kit	Qiagen, Hilden
Big Dye Terminator (V3.1) Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
BioPrime DNA Labelling System	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Illumina Infinium QC FFPE Kit	Leica Microsystems, Wetzlar
OncoScan CNV FFPE Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Promega PureYield Plasmid Midiprep System Kit	Promega, Madison USA
Qiagen AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Life technologies, California, USA

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

0,2/1,5/2 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
15/50 mL Reaktionsgefäße	Corning, Corning, USA Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich;
96-well Reaktionsplatten	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Deckgläser	VWR, Radnor USA Sigma-Aldrich, Darmstadt; Corning, Corning, USA
Einwegpipetten	Marabu, Tamm
Fixogum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MicroAmp Optical clear 96-well reaction plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Marienfeld
Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare, Chicago, USA
OncoScan CNV Array (Cat. No. 902694)	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Pipetboy	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Pipetten	Rainin, Columbus USA
Pipettenspitzen	Rainin, Columbus USA
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.5. Antikörper (AK)

Anti-CD307e / FcRL5	Biomol, Hamburg
ETS1 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (JM92-32)	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Ikaros (D6N9Y) Rabbit mAb #14859	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076	Cell Signaling, Danvers, USA
GAPDH (D16H11) XP® Rabbit mAb #5174	Cell Signaling, Danvers, USA
α-Tubulin (DM1A) Mouse mAb #3873	Cell Signaling, Danvers, USA

2.1.6. Hergestellte Puffer und Medien

AddR	100ml Penicillin/Streptomycin, 100ml Mercaptoethanol (10-4M), 100ml 1M Hepespuffer (pH: 7,29), 100ml Natriumpyruvat, 100ml L-Glutamin*, 60ml Non. Essential. – Aminosäuren, 20ml Asparagin (10mg/ml)
Annexin-Bindepuffer	400 mL dH2O, 500 µL 1M HEPES-Puffer, 40,908 g NaCl, 1,84 g CaCl ₂ , ad dH2O 500 mL
MACS-Puffer	450 mL 1xPBS, 50 mL 5%BSA, 2mL 500 mM EDTA
MTT-Lysepuffer	125 mL Dimethylformamid, 125 mL dH2O, 750 mL 20% SDS, pH 4.5
Essigsäure	
Protein-Lysepuffer	3,49 g TRIS-HCl pH 7,6, 7,3g NaCl, 0,73g 5mM EDTA, 500 µL 0,1% Triton X-100, ad dH2O 500 mL
Laemmli-Puffer	4 ml 1M Tris-HCl pH 6,8, 10ml Glycerol, 5 ml β-Mercaptoethanol, 2g 10% SDS, 1 mL 1% Bromphenolblau
10x TBS	88 g NaCl, 24 g Tris Base, 900 mL dH2O, einstellen pH-Wert auf 7.6 mit HCl, ad dH2O 1 L
1xTBS-T	100 mL 10x TBS Puffer, 1mL Tween20, ad dH2O 1 L
1,5 M Tris-HCl, pH:8	69,03 g Tris-Base, 28,40 g Tris-HCl, ad dH2O 500 mL
10x Elektrophoresepuffer	720 g Glycin, 150 g Tris Base, 250 mL 20% SDS, ad dH2O 5 L
Transfer-Puffer	29 g Tris Base, 14,6 g Glycin, 1 L Ethanol, 9,25 mL 20% SDS, ad dH2O 5L
Zellkulturmedium	29 mL AddR, 66,125 mL FCS, 250 mL RPMI1680 oder 29 mL AddR, 50 mL FCS, 500 mL RPMI1680

2.1.7. Oligonukleotide

	Oligonukleotid-Sequenz FOR (5' – 3')	Oligonukleotid-Sequenz REV (5' – 3')
<i>ABL2</i>	GAGCTTTGCACAGAGGAACC	TGCCATCCTATCCTGCTCTG
<i>BCL7A</i>	GTGAGAGTGCGAGTGCTGT	CCGCCATGACCCTCTTGATA
<i>STAT6</i>	CCTGTCCTCACCTCTTCAG	CTGTTCCCTCCAACTCCAGG
<i>FCRL5</i>	CCAAGGAGAGAGAGTGACCC	CCTGGCATCTGTACTCTCCA
<i>IKZF1</i>	TACATGCATCTAGGGCGGAG	GGACGATCCCAAAGGCTCTA
<i>KIR3DL1</i>	TCTTCGGTGTCACTATCGTCA	TGAGAAGCCCAGCGGAAAG
<i>BCL11A</i>	GGAAAGAACATCACTGGGCG	GCTGTGATTGTCTGTTCTGATG
<i>ADAM32</i>	GCGTTGAATGTAGGCCGAAA	ATCATGGCAGTCTCCGTCAT
<i>TMEM2</i>	GCTTACAGGGTGGTGTTC	GGATCAGGATGTAATGAGTC
<i>EZH2</i>	TCAGCAGCTTTCACGTTGAC	CAGATGGTGCCAGCAATAGA
<i>ETS-1</i>	CAACGCCTTCTCCTACACAG	AGGGGAGAAGATTGTGTGGG

2.2. FL-Kohorten und Probengewinnung

Um eine möglichst große Fallzahl, insbesondere an IFL, bereitzustellen, wurden die FL-Proben aus verschiedenen Studienkohorten der German Lymphoma Alliance (GLA), internationalen Kooperationen und internen Beständen des Pathologischen Instituts des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart gewonnen. Alle Proben waren referenzpathologisch begutachtet und anhand der aktuellen WHO-Richtlinien⁹ klassifiziert worden. Eingeschlossen wurden hierbei FL der klinischen Stadien I-IV und der Grade 1-3A. Die Mehrzahl der IFL stammte aus den Studienkohorte der GLA und wurde im Rahmen von prospektiven, randomisierten Studien gesammelt. Diese Kohorten umfassen Patientengruppen mit unterschiedlichen Therapieformen, die zum einen mit RT⁷⁰ (n=321, RT-Studie) und zum anderen mit kombinierter Radio- und Immuntherapie⁴⁴ (n=85, MIR-Studie) behandelt wurden. Extranodale IFL waren in diesen Studien ausgeschlossen. IFL aus internen Beständen (Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart) und internationalen Kooperationen (Universitätsklinikum Oslo, Norwegen) stammen von Patienten mit unterschiedlichen Therapien, die aus operativer Entfernung des Tumors, RT und engmaschiger Beobachtung bestanden (n=80). Auch eine niedrige Fallzahl an sFL konnte aus internen Beständen des Robert-Bosch-Krankenhauses gesammelt werden (n=24); der Großteil der sFL stammte aus der GLSG2000 Studie der GLA⁴⁹ (n=1223).

Das zur Verfügung stehende Material bestand zum einen aus Formalin-fixiertem in Paraffin eingebetteten (FFPE)-Gewebe, zum anderen aus tiefgefrorenem Frischgewebe (fresh frozen: FF). Für die IFL waren 139 Fälle als FFPE-Blöcke der RT-Studie, 47 FFPE-Blöcke der MIR-Studie und 46 Fälle aus FFPE-Gewebe aus internen Beständen vorhanden. Frischgewebe konnte von 33 internen Fällen genutzt werden. Von den sFL standen 546 FFPE-Blöcke zur Verfügung. Alle Studien wurden gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt und waren durch die jeweils zuständigen Ethikkomiteen genehmigt. Dies trifft auch auf die Verwendung der Fälle aus eigenen Beständen zu.

2.3. DNA-Extraktion aus FFPE-Blöcken und Frischgewebe

Für die DNA-Extraktion wurden von den FFPE-Blöcken zunächst drei bis fünf 10 µM dicke Gewebeschnitte pro Block mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Für die Entparaffinierung wurde zu den Gewebeschnitten jeweils 1 mL Xylol gegeben und die Proben auf einem Schüttler für 15 min bei 750 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 3 min bei 1300 rpm zentrifugiert und der Xylol-Überstand abgenommen. Dieser Schritt der Entparaffinierung mit Xylol wurde daraufhin wiederholt, wonach die Zugabe von 1 mL 100% Ethanol folgte. Einer Inkubation von 10 min auf einem Schüttler bei 750 rpm schloss sich eine Zentrifugation von 3 min bei 1300 rpm und die Entfernung des Ethanols an, bevor auch die Aufreinigung mit Ethanol einmalig wiederholt

wurde. Alle bisher genannten Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die entparaffinierten Proben wurden danach für zwei Stunden bei 37°C getrocknet und bis zur DNA-Extraktion bei -20°C gelagert. Die Extraktion der DNA und RNA der entparaffinierten Proben wurde mittels Allprep DNA/RNA FFPE Kit anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt. Das Elutionsvolumen betrug 50 µL für DNA und 30 µL für RNA.

Die DNA- und RNA-Extraktion des Frischmaterials erfolgte anhand des Qiagen AllPrep DNA/RNA Mini Kits nach Herstellerangaben.

Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA erfolgte mittels Qubit Fluorometer 2.0 und dem Qubit dsDNA HS Assay Kit gemäß Herstellerprotokoll. Die Konzentrationen der RNAs wurden mit dem Nanodrop 1000 anhand des Protokolls bestimmt.

Isolierte RNA wurde anschließend bei -80°C und DNA bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.4. Qualitätskontrollen der extrahierten DNA-Proben

Für die Durchführung des OncoScan CNV Assay und der WES unterliegen die DNA-Proben bestimmten Qualitätskriterien. Um Proben, die diese Anforderungen nicht erfüllen, auszuschließen, wurden Versuche zur Bestimmung der DNA-Qualität der FFPE-Proben durchgeführt. Da bei FF-Gewebe von einer sehr guten Qualität auszugehen ist, wurde hierfür keine Qualitätskontrolle durchgeführt:

2.4.1. Qualitäts-PCR mit Oligonukleotiden des *hemoglobin subunit beta (HBB)* Gens
Für die Qualitäts-PCR wurden drei verschiedene Oligonukleotid-Kombinationen verwendet, die jeweils unterschiedlich lange Amplikons erzeugten und damit Rückschlüsse auf den Degradierungsgrad der DNA zuließen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Oligonukleotid-Sequenzen sowie die Produktgrößen der PCR.

Tabelle 1: Oligonukleotid-Sequenzen der *HBB*-Oligonukleotid-Kombinationen für die Qualitäts-PCR

Oligonukleotid-Sequenz FOR (5' – 3')	Oligonukleotid-Sequenz REV (5' – 3')	Amplikongröße
GGCACTGACTCTCTCTGC	GGTCCAAGGGTAGACCAC	75 bp
CTGATAGGCACTGACTCTC	CTTGAGGTTGTCCAGGTG	198 bp
CTGATAGGCACTGACTCTC	GAGACTTCCACACTGATGC	411 bp

Für jede DNA-Probe wurden drei Reaktionsansätze mit jeweils einer Oligonukleotid-Kombination vorbereitet. Das Pipettierschema der Reaktion ist nachfolgend dargestellt.

Tabelle 2: Pipettierschema für die Zubereitung der Qualitäts-PCR

Reagenz	Volumen [μL]
10x PCR buffer	2.7
5 mM dNTP-Mix	1.0
10 pmol/ μL Oligonukleotid 5'-3'	2.6
10 pmol/ μL Oligonukleotid 3'-5'	2.6
Taq Polymerase	0.1
Nuklease-freies Wasser	11

20 μL des Reaktionsansatzes wurden für jede Oligonukleotid-Kombination in ein 200 μL Reaktionsgefäß gegeben und 25 ng DNA hinzupipettiert. Dafür wurden die DNAs jeweils auf 5ng/ μL vorverdünnt. Der Reaktionsansatz wurde daraufhin durch Pipettieren gemischt, abzentrifugiert und die PCR in einem Thermocycler unter folgenden Reaktionsbedingungen gestartet:

Tabelle 3: Bedingungen der PCR

Temperatur	Zeit	
95°C	15 min	
5°C	30 sek	35 Zyklen
60°C	30 sek	
72°C	30 sek	
72°C	7 min	
4°C	∞	

2.4.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Amplikongröße der angesetzten PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde ein 2%-iges Agarosegel hergestellt, indem 2g Agarose in 100 mL 1xTAE-Puffer gelöst und 3 Tropfen Ethidiumbromidlösung hinzugegeben wurden. Nach Aushärtung des Gels bei Raumtemperatur wurden in jede Tasche eine Mischung aus 9 μL PCR-Produkt und 1 μL Ladepuffer gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 30 min durchgeführt. Die Detektion der Banden erfolgte mittels UV-Detektion.

2.4.3. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) des *Ferritin Heavy Chain 1 (FTH1)*-Gens

Eine weitere Methode zur Qualitätsbestimmung der FFPE-DNA wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Diese dient zur Quantifizierung der generierten Amplikons, da die Kopienzahl der Amplikons mit dem Grad der Degradation sinkt. Dies wird durch *Abbildung 7* schematisch dargestellt.

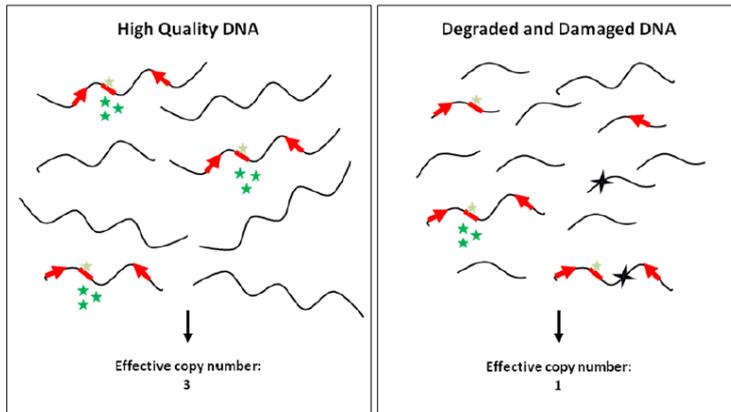


Abbildung 7: Schematische Darstellung unterschiedlich degradiert DNA-Fragmente und die daraus resultierende Anzahl an erzeugten Amplikons⁷¹

Die auf einem TaqMan-Assay basierende Chemie ermöglicht die Bestimmung der Amplikonzahl durch die Anlagerung einer zielspezifischen fluoreszierenden Sonde an jedes neu generierte Amplikon. Hierbei findet eine proportionale Zunahme der Fluoreszenz zur Kopienzahl statt, die nach jedem Amplifikationszyklus gemessen wird. *FTH1* hat sich hierbei als Standard-Gen zur Qualitätsanalyse von DNA etabliert und wurde in diesem Projekt verwendet. *FTH1*-Amplikons sind mit einer Größe von 180 bp ideal zur Qualitätsanalyse von FFPE-DNA⁷².

Zur Bestimmung der Amplikonzahl wird eine Standardkurve benötigt. Hierfür wurden unterschiedliche DNA-Konzentrationen mit korrespondierender bekannter Amplikonzahl nach Herstellerangaben eingesetzt. Die zur DNA-Menge proportionale Kopienzahl ist in *Tabelle 4* aufgelistet. Für die Standardkurve wurde FFPE-DNA eines reaktiven Lymphknotens (rLK) eingesetzt und eine Verdünnungsreihe von 48,8-0,38 hergestellt.

Tabelle 4: Menge eingesetzter DNA und entsprechende Amplikonzahl

DNA-Menge [ng]	Amplikons pro μL
48,8	16267
24,4	8133
12,2	4067
6,1	2033
3,05	1015
1,53	511
0,76	253
0,38	127

Dieser Assay wurde für alle FFPE-DNAs durchgeführt. Das Pipettierschema für jeweils einen Reaktionsansatz kann *Tabelle 5* entnommen werden.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine RT-PCR für *FTH1*

Reagenz	Volumen [μL]
AB Taqman Gene Expression Master Mix	5,5
<i>FTH1</i> TaqMan Gene expression assay	0,55
Nuklease-freies Wasser	4,45

10,5 μL des Reaktionsansatzes wurde jeweils in eine Vertiefung einer 96-well Platte gegeben und 2 μL auf 5ng/ μL vorverdünnter DNA hinzugefügt. Die Analyse wurde jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt und die PCR unter folgenden Bedingungen auf einem 7500 Fast Real-Time PCR Systems Gerät gestartet:

Tabelle 6: PCR-Bedingungen des *FTH1*-Taqman Assays

Temperatur	Zeit	
50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	15 sek	40 Zyklen
60°C	1 min	

Die bioinformatische Auswertung der gemessenen FFPE-DNA, normalisiert auf die Standardkurve, erfolgte mit der Geräte-assoziierten 7500 Software V2.3.

2.4.4. Qualitätsanalyse mittels Illumina Infinium QC FFPE Kit

Die Qualitätskontrolle (QC) der DNAs für die WES wurde unter Verwendung des Illumina Infinium QC FFPE Kits nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.5. Detektion von *BCL2*-Translokationen mittels FISH und delta-PCR

Der *BCL2*-Translokationsstatus war für die meisten IFL bereits bekannt^{18,67}. Fälle mit unbekanntem Translokationsstatus wurden entweder mit Hilfe einer FISH oder einer sogenannten delta-PCR analysiert⁷³. Die FISH wurde auf 4 μM -Gewebeschnitten durchgeführt, wobei das Gewebe entweder als einzelner Gewebeschnitt oder in Form eines Tissue Microarray (TMA) vorlag. Für die Hybridisierung wurde die Vysis LSI *BCL2*- Dual-Color Break-Apart-Sonde verwendet und das Gewebe wie bereits publiziert hybridisiert⁷⁴. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops bei 100-facher Vergrößerung. Fälle, deren Gewebeschnitte nicht verfügbar waren bzw. bei denen die Hybridisierung nicht auswertbare Ergebnisse lieferte, wurden mittels delta-PCR auf ihren Translokationsstatus hin untersucht. Hierbei wurden mit Multiplex-Oligonukleotiden verschiedene Bruchstellen der *IgH*- und *BCL2*-Gene abgedeckt und amplifiziert⁷³. Für einige Fälle der internen Bestände lagen Ergebnisse der Chromosomen-Bänderung inklusive *BCL2*-Translokationsstatus vor.

2.6. Der OncoScan CNV Assay

CNA sind bei zahlreichen malignen Erkrankungen maßgeblich an deren Entstehung beteiligt, weshalb es zur Detektion von CNA eine Vielzahl an Methoden gibt⁷⁵. Während die FISH als gezielte Methode zur Detektion einzelner Aberrationen schon lange genutzt wird, haben sich gesamt-genomische SNP Arrays (single nucleotide polymorphism arrays) und aCGH Arrays (array comparative genomic hybridization array) erst etwas später etabliert⁷⁶. Allerdings sind diese Techniken entweder in der Anzahl an parallel identifizierbaren CNA (FISH) oder der Sensitivität (SNP Array und aCGH) eingeschränkt⁷⁷. Eine weitere Hürde stellt die Analyse von FFPE-Gewebe dar, welches eine erhöhte Fragmentierung der genomischen DNA und niedrigere DNA-Konzentrationen mit sich bringt⁷⁸. Der OncoScan CNV Assay ermöglicht die genomweite Detektion von CNA in FFPE-Gewebe, basierend auf der Technologie der Molekularen Inversionssonde (molecular inversion probe: MIP)⁷⁹.

Eine MIP dient zur Identifikation von Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms: SNPs). Sie besteht aus zwei gegenüberliegenden homologen Regionen mit einer jeweiligen Länge von 20 bp. Die homologen Regionen der MIP sind jeweils einzigartig und für eine definierte Zielsequenz spezifisch⁸⁰. Lagert sich die Sonde an die Zielsequenz an, entsteht eine zirkuläre Form und es bleibt an der zu untersuchenden SNP-Position eine Lücke von exakt einer Base, die im Prozess des Arrays in zwei verschiedenen Ansätzen mit dem komplementären Nukleotid gefüllt wird und eine Bestimmung der Sequenz ermöglicht. Hierbei werden in einen Ansatz A- und T-Nukleotide gegeben und in einen zweiten G- und C-Nukleotide. Nach dem Auffüllen des komplementären Nukleotids wird die zirkuläre Form der Sonde enzymatisch wieder aufgelöst und liegt nun allerdings in umgekehrter Richtung vor, sodass Oligonukleotid-Bindungsstellen zugänglich werden. Bei der folgenden Amplifikation werden nun ausschließlich diejenigen Sonden vervielfältigt, deren komplementäres Nukleotid aufgefüllt wurde. Die PCR Produkte, die während der Amplifikation mit Biotin markiert wurden, werden schließlich mit Hilfe einer für jede Sonde einzigartigen Identifizierungssequenz auf einen Chip hybridisiert und gefärbt. Das fluoreszierende Signal kann dann mit Hilfe eines Scanners detektiert werden (Abb.8)⁸¹. Der OncoScan CNV Assay beinhaltet ca. 220 000 dieser einzigartigen MIPs für jeweils individuelle Zielsequenzen, die über das gesamte Genom verteilt sind. Durch die geringe Größe der Sonde und der kurzen homologen Sequenzen eignet sich der Assay insbesondere für die Anwendung an fragmentierter DNA, die vor allem in FFPE-Gewebe vorliegt. Die detektierbare Größe der CNA liegt zwischen 50 und 300 kb. Neben der Identifizierung von chromosomalen Zugewinnen und Verlusten, können auch Kopienzahl-neutrale Verluste der Heterozygotie (*copy number neutral loss of heterozygosity: CNN-LOH*) erkannt werden. Auch die benötigte Menge DNA, die für den Assay benötigt wird, ist mit 80 ng für FFPE-Gewebe angepasst⁷⁹.

Alle DNAs mit ausreichender Qualität wurden in die CNA-Analysen mittels OncoScan CNV Assay eingeschlossen. Die Kriterien hierfür waren eine Kombination aus mindestens 80 *FTH1*-Amplikons pro μL aus der RT-PCR-Analyse und ein mindestens 198 bp großes Amplikon in der Qualitäts-PCR mit *HBB*-Oligonukleotiden. Die zu analysierenden DNAs mit ausreichender Qualität wurden auf eine Konzentration von 12 ng/ μL verdünnt, um die im Herstellerprotokoll vorgesehene Menge von 40-80 ng DNA einzusetzen.

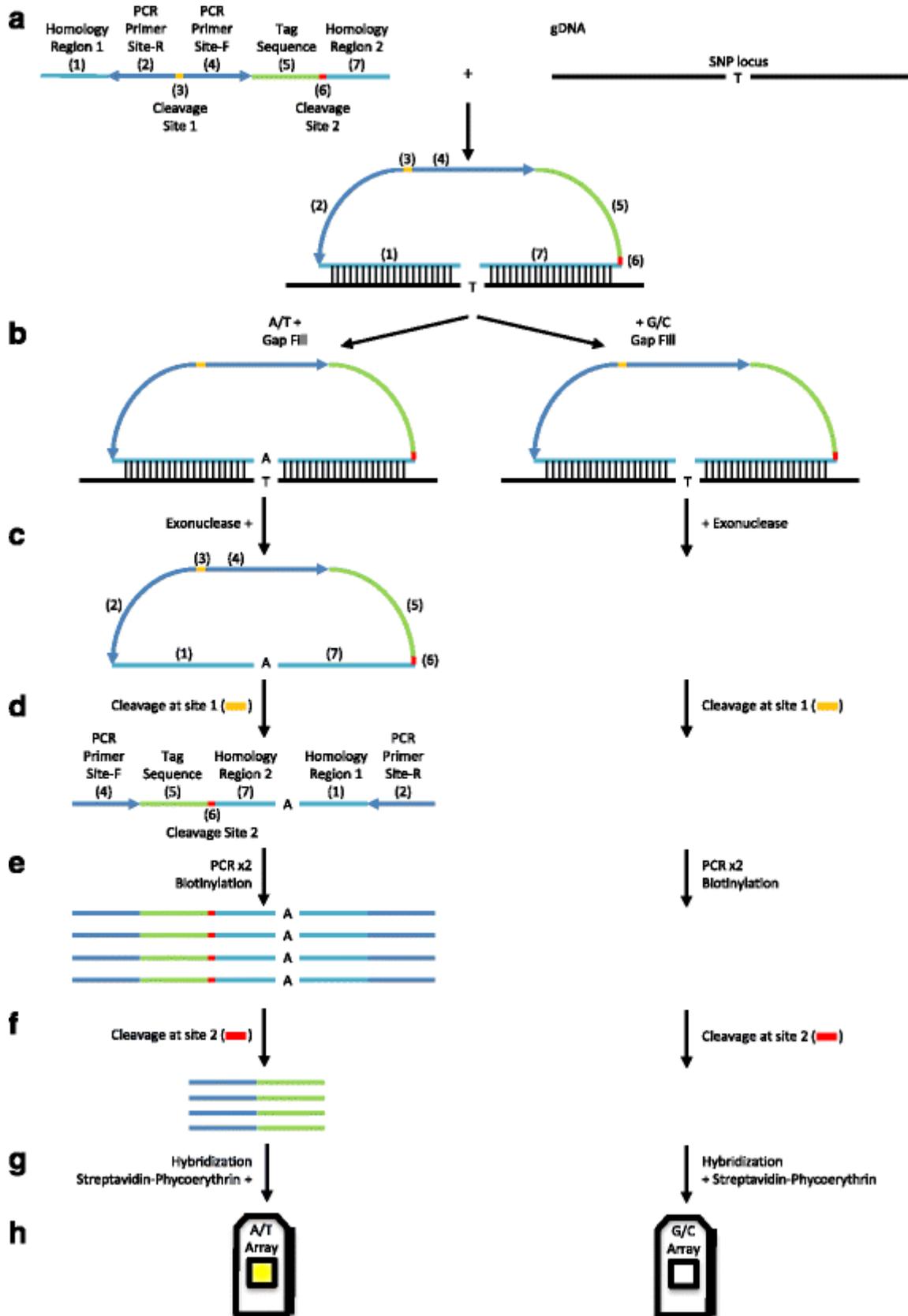


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs des OncoScan CNV Assay. a: Aufbau einer MIP zur Detektion von SNPs in linearer und zirkulärer Form nach Bindung an die Zielsequenz. b: Aufteilen der Ansätze und Auffüllen der 1bp-Lücke mit dem komplementären Nukleotid. c: Enzymatische Auftrennung der zirkulären Form. d: Die MIP liegt in umgekehrter Richtung vor und kann amplifiziert werden. e: PCR und Biotin-Einbau. f: Separierung der Markierungssequenz zur Identifikation. g: Hybridisierung der Markierungssequenz auf den Chip und Färbung. h: Die Chips sind bereit zum Scannen⁸².

2.7. Datenauswertung der CNA-Analyse

2.7.1. Bioinformatische Einzelfallanalyse der CNA-Daten

Nach dem Scannen der OncoScan CNV-Chips wurden die Rohdaten als CEL-Dateien erhalten, welche die Fluoreszenzintensitäten enthielten. Mit Hilfe der Chromosome Analysis Suite Software (ChAS, V4.1.0.90) wurden die CEL-Dateien in OSCHP-Dateien transformiert, die schließlich die CNA-Informationen enthielten und für die weitere Auswertung verwendet wurden. Für die Umwandlung der Intensitätsdaten in CNA wird das Verhältnis der detektierten Kopienzahl einer Region zu der Kopienzahl einer Referenzdatenbank berechnet. Die Referenzdaten stammen aus einer Kohorte von über 400 unauffälligen Proben verschiedener Gewebe, Alter und Ethnien und sind Teil der OncoScan-Plattform⁸³. Das Ergebnis der Berechnung des Verhältnisses aus detektierter und Referenz-Kopienzahl wird anschließend Log₂-transformiert. ChAS visualisiert die Kopienzahl (*copy-number*: CN) der einzelnen Proben zur Identifizierung chromosomaler Zugewinne und Verluste. Diese werden anhand der Log₂-Ratio und der B-Allel-Frequenz (BAF) bestimmt⁸⁴. CNA wurden als solche definiert, sofern sie eine Größe von mindestens 100 kbp aufwiesen und die Region mindestens durch 15 (Verluste) bzw. 20 (Zugewinne) Markersonden abgedeckt war. Zudem wurden Zugewinne nur als solche identifiziert, sofern sie eine Log₂-Ratio >0,30 und Verluste von <-0,25 aufwiesen. Abweichend davon implizierten die Kriterien für die Identifikation von CNN-LOHs eine Größe von 5000 kbp⁸⁵. Zur Analyse und Darstellung der häufigsten CNA einer Kohorte wurde der Multi Sample Viewer (MSV, V1.0.0.144) verwendet. Die Signifikanzberechnung der vergleichenden Analysen erfolgte mittels exaktem Fisher-Test und wurde durch die Benjamini-Hochberg-Methode korrigiert⁸⁶. Das Signifikanzniveau wird anhand der q-Werte angegeben.

2.7.2. Identifikation frequenter und signifikanter CNA mittels Genomic Identification of Significant Targets in Cancer (GISTIC) 2.0

Zusätzlich zur Detektion der Aberrationen mittels ChAS wurde eine weitere bioinformatische Methode angewandt, die neben der Frequenz der CNA auch die Signifikanz der einzelnen Aberrationen innerhalb der Kohorte berechnet⁸⁷. Die Frequenz und Amplitude der einzelnen Aberrationen werden dabei in einen G-Score umgerechnet und die Signifikanz einer aberranten Region anhand des q-Werts angegeben⁸⁸. Die CNA-Analyse mittels GISTIC 2.0 (V2.0.23) basiert auf der initialen Unterteilung des Genoms einer Probe in verschiedene Segmente, deren Kopienzahlen dann berechnet werden können. Dies erfolgt auf Basis der erhaltenen CEL-Dateien mit dem allele-specific copy number analysis of tumors (ASCAT) Algorithmus⁸⁹. Nach der Segmentierung durch ASCAT können die Daten mittels GISTIC 2.0 weiterverarbeitet und die CNA ermittelt werden.

Die Segmentierung der CNA-Daten der sFL für die Durchführung des GISTIC 2.0 Algorithmus erfolgte mit Hilfe des Easy Copy Number (EaCoN) Pakets⁹⁰ in R (V3.6.6). Die detaillierte

Befehlskette kann dem Anhang entnommen werden. Für die Annotation wurde das Genom hg38 NA36 verwendet. Die Normalisierung der Rohdaten erfolgte mittels Analysis Power Tool (APT, V2.4.0, Affymetrix) und ermöglichte die Berechnung der Log2Ratio und der BAF. Anschließend wurden die Daten durch ASCAT segmentiert und die CNA definiert. Das generierte Segmentierungs-File konnte anschließend direkt für die Browser-basierte Durchführung von GISTIC 2.0 verwendet werden und enthielt für jedes erzeugte Segment entlang des Genoms die Bezeichnung des FLs, die exakte chromosomale Position, die Anzahl der im Segment verteilten Marker und die für das Segment definierte Kopienzahl. Ein weiteres generiertes File umfasste die über das Genom verteilten Markerpositionen. Hierfür wurden alle Marker verwendet, deren Bezeichnung und chromosomale Position in ChAS angegeben wurden. Für die Anwendung des Algorithmus mussten zahlreiche Eingangsparameter festgelegt werden, die in verschiedenen Kombinationen getestet wurden. Für die finale Analyse wurden die Schwellenwerte für die Definition von Zugewinnen bei einer Log2Ration von >0.3 und von Verlusten bei <-0.25 festgelegt. Das Konfidenzniveau wurde auf 0,9 gesetzt und mit der Aktivierung des „arm peel“-Parameters Artefakte reduziert. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,1 festgelegt. Die übrigen Parameter wurden in ihrer Standardeinstellung übernommen.

Die GISTIC 2.0-Analyse der IFL wurde von der Bioinformatik-Abteilung des Universitätsklinikums Münster (Myroslav Zapukhlyak und Michael Grau) durchgeführt. Signifikanzen sind mittels q-Werten angegeben.

2.8. Quantitative PCR (qPCR) und FISH zur Validierung der identifizierten CNA im FL

2.8.1. Herstellung spezifischer FISH-Sonden aus BAC-Klonen

Die Validierung der identifizierten CNA erfolgte zum einen mittels FISH und zum anderen mittels qPCR. Für die FISH wurden zunächst für das Zielgen spezifische und fluoreszierende Sonden hergestellt. Mit Hilfe der NCBI-Datenbank „Genome data viewer“ wurden Klone von bakteriell artifizierten Chromosomen (BAC) ausgesucht, die jeweils ein spezifisches Gen abdecken und zur Hybridisierung verwendet werden konnten. Die kommerziell erworbenen BAC-Klone wurden nach Herstellerangaben kultiviert und DNA der BAC-Klone mittels Midi-Prep-Verfahren extrahiert. Das Promega PureYield Plasmid Midiprep System Kit wurde hierbei für die Bearbeitung verwendet und die Extraktion vollständig nach Angaben des Herstellers mittels Vakuum-Extraktion durchgeführt. Nach der Extraktion der Plasmid-DNA wurde eine PCR mit für die Zielgen-DNA spezifischen Oligonukleotiden zum Nachweis der Spezifität des gewählten Klons angesetzt. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Datenbanken „NCBI Blast“, „NCBI Gene“ und „Ensembl“ entworfen und über Eurofins Genomics erworben. Die gelieferten Oligonukleotide wurden zunächst auf ihre optimale Annealing-Temperatur im

Rahmen einer Gradienten-PCR getestet, deren Bedingungen der PCR aus *Tabelle 3* entsprechen. Abweichend davon wurde der Schritt 60°C für 30 sek durch vier verschiedene Temperaturen in vier verschiedenen Zonen des Thermocyclers ersetzt. Es wurden die Annealing-Temperaturen 56°C, 58°C, 60°C und 62°C getestet. Für die DNA eines rLK wurden somit für jede Oligonukleotid-Kombination vier verschiedene Reaktionen zur Testung der einzelnen Temperaturen angesetzt. Die Zielgene können *Tabelle 7* entnommen werden. Die zur PCR genutzten Reagenzien und Pipettierolumina wurden analog der PCR in *Tabelle 2* verwendet und jeweils 25 ng DNA eingesetzt. Die Agarose-Gelelektrophorese zur Detektion der Amplikon-Qualität der jeweiligen Temperaturstufen wurde wie in 2.3.2 durchgeführt und detektiert.

Tabelle 7: Zuordnung der gewählten BAC-Klone zu den Zielgenen

Zielgen	BAC-Klon	Locus
ETS-1	RP11-629A20	11q24.3
IKZF1	RP11 673F7	7p12.2
FCRL5	RP11 933C1	1q23.1
BCL11A	RP11-1023M9	2p16.1
ADAM32	RP11-953P9	8p11.22

Nach dem Auswählen der für die zu den Zielgenen spezifischen Annealing-Temperaturen der Oligonukleotid-Kombinationen, wurde die Validierungs-PCR der BAC-Klon-DNA angesetzt. 30-50 ng der BAC-Klon-DNAs wurden mit der jeweiligen Oligonukleotid-Kombination und der zuvor identifizierten idealen Annealing-Temperatur amplifiziert. Die PCR-Bedingungen aus *Tabelle 3* wurden dafür angewandt.

Die validierte DNA musste für die Verwendung als Sonde zunächst fluoreszenz-markiert werden. Diese Random-Priming-Reaktion sorgt für die Inkorporation des Fluoreszenz-Farbstoffs in die DNA, wofür das BioPrime DNA Labelling System verwendet wurde. Jeweils 500 ng DNA wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll, wobei als Fluoreszenzfarbstoff entweder Spectrum-Orange (SO) oder Spectrum-Grün (SG) eingesetzt wurde. Der fertige Reaktionsansatz wurde 72 h lichtgeschützt bei 37°C und 300 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert und nach je 24 h und 48 h jeweils 1 µL zusätzliches Klenow-Fragment zugegeben. Vor der Fällung der markierten DNA wurde der korrekte Einbau des Fluoreszenzfarbstoffs kontrolliert. Hierfür wurde ein 1%-iges Agarose-Gel hergestellt. 0,8 g Agarose wurden in 80 mL 1xTAE-Puffer gelöst und zur Aushärtung in einen Gelschlitten gegeben. Für jeden Ansatz wurden 1 µL Ladepuffer, 8 µL Wasser und 1 µL der Random-Priming-Reaktion gemischt und in eine Tasche des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung der detektierten Banden wurde ein 1 kb-Marker verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 30 min. Bei vollständigem Einbau des Farbstoffs in die DNA konnte diese DNA gefällt werden. 40 ng BAC-Klon-DNA aus dem Random-Priming-

Ansatz wurden dazu in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und 0,4 µL 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben. Der Ansatz wurde mit 8 µL 100%-igem Ethanol aufgefüllt und durch Pipettieren gemischt. Es folgte eine Inkubation bei -20°C für 30 min, bevor der Überstand nach einer Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 13000 rpm abgenommen wurde. Das übrige Pellet wurde mit 100 µL 70%-igem Ethanol gewaschen und der Ethanol-Überstand nach 5 min Zentrifugieren bei 4°C und 13000 rpm verworfen. Bis zur vollständigen Trocknung des Pellets wurde dieses bei 56°C aufbewahrt und daraufhin in 10 µL Hybridisierungspuffer aufgenommen. Zur Homogenisierung wurde das Gemisch bei 37°C und 300 rpm in einem Thermoschüttler für 2 h inkubiert. Die fertigen Sonden wurden bis zur Anwendung bei -20°C gelagert.

2.8.2. Metaphasen- und FFPE-FISH

Ein weiterer Validierungsschritt der Sondenherstellung umfasste die Anwendung auf Metaphasen-Nuklei, deren mikroskopische Betrachtung die spezifische Bindung der Sonden an die entsprechende chromosomale Region sicherstellte. Die kommerziellen Objektträger (OT) mit Metaphasen-Nuklei wurden auf Raumtemperatur erwärmt und nacheinander für jeweils 3 min in 70%-, 96%- und 100%-iges Ethanol getaucht. Nach der anschließenden Trocknung der OT wurden diese in einer Pepsinlösung für 2 min bei 37°C inkubiert. Hierfür wurden 5 mg Pepsin in 80 mL 0,01 M Salzsäure gelöst und auf 37°C erwärmt. Zur Abkühlung der OT wurden diese für 10 min in 1x PBS gestellt und daraufhin erneut für jeweils 3 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe inkubiert. Die Trocknung der OT erfolgte bei 37°C. 5 µL der jeweiligen Sonde wurden auf das Gewebe der OT gegeben und entweder mit 5 µL einer andersfarbig markierten Sonde oder Hybridisierungspuffer kombiniert. Der Sondenmix wurde mit einem Deckglas geschützt und mit Fixogum luftdicht verschlossen. Auf einer 80°C warmen Heizplatte erfolgte die Denaturierung für 10 min, bevor die OT zur Hybridisierung in einer 37°C warmen feuchten Hybridisierungskammer über Nacht inkubiert wurden. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde das Deckglas entfernt und der OT gewaschen. Der Waschpuffer wurde aus 100 mL 2xSSC-Puffer und 300 µL Nonidet-P40 hergestellt und im Wasserbad auf 73°C erhitzt. Bei dieser Temperatur erfolgte das Waschen für 4 min, worauf eine erneute Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe wie bereits beschrieben erfolgte. Wiederum schloss sich zunächst eine Trocknungsphase der OT und die Auftragung von 20 µL Vectashield auf das Gewebe an, wonach ein Deckglas aufgelegt wurde.

Für die Hybridisierung wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 4 µM-Schnitte von FFPE-Blöcken der FL-Fälle angefertigt und auf Objektträgern fixiert. Die Hybridisierung der FFPE-Schnitte erfolgte analog zur Metaphasen-Hybridisierung, vor dem Pepsin-Verdau musste aber zunächst das Paraffin entfernt werden. Die OT mit FFPE-Gewebe wurden zur Paraffinentfernung zunächst für 10 min auf eine 80°C warme Heizplatte gelegt und das geschmolzene Paraffin anschließend durch ein Xylolbad vollständig entfernt. Daraufhin

wurden die OT für je 3 min in 100%-, 96%- und 70%-iges Ethanol und Wasser gestellt, wonach das Gewebe für 10 min in 100°C heißem Tris/EDTA-Puffer gekocht wurde, um die Formalin-bedingte Quervernetzung der Proteine zu lösen. Die Abkühlung erfolgte in destilliertem Wasser für 3 min bei Raumtemperatur, woraufhin der Pepsinverdau bei 37°C durchgeführt wurde. Die Verdauzeit wurde zwischen 6 und 12 min gewählt und war abhängig von der Gewebedicke und –größe. Die übrigen Schritte erfolgten analog zur Metaphasen-FISH.

Die Auswertung der Signalkonstellationen der Gewebeschnitte wurde im Anschluss an die FISH mit Hilfe eines Leica Fluoreszenz-Mikroskops durchgeführt. Mit Hilfe der verschiedenen Farbfilter erfolgte die Auswertung bei 100-facher Vergrößerung. Zur Ermittlung der Eignung einer FISH zur Detektion von fokalen CNA wurden für jedes Gen die Sensitivität und Spezifität berechnet. Die entsprechenden Formeln sind im Folgenden definiert.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtig positiv}}{\text{richtig positiv} + \text{falsch negativ}} \times 100\%$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtig negativ}}{\text{richtig negativ} + \text{falsch positiv}} \times 100\%$$

2.8.3. qPCR zur Validierung spezifischer Zugewinne und Verluste mittels SYBRgreen-Technologie

Ausgewählte FL-Proben, die im OncoScan CNV Assay einen Zugewinn oder Verlust aufwiesen, wurden mittels qPCR unter Verwendung der SYBRgreen-Technologie validiert. Zielgen-spezifische Oligonukleotide standen bereits aus der Validierung der FISH-Sonden zur Verfügung. Für jede FL-Probe wurde ein dreifacher Reaktionsansatz vorbereitet. Das Pipettierschema ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 8: Pipettierschema zur Herstellung eines einfachen Ansatzes des qPCR Mastermixes

Reagenz	Volumen [µL]
SYBRgreen Master Mix	6,25
3pmol/µL Oligonukleotid 5'-3'	1,25
3pmol/µL Oligonukleotid 3'-5'	1,25
Wasser	2,5

Pro Ansatz wurden 11,25 µL Mastermix in eine Vertiefung einer 96-well Reaktionsplatte gegeben und 1 µL verdünnter DNA (5ng/µL) hinzugefügt. Die PCR wurde auf einem 7500 Fast Real-Time PCR Systems Gerät durchgeführt und mittels 7500 Software (V2.3) ausgewertet. Die PCR-Bedingungen sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 9: PCR-Bedingungen der qPCR mittels SYBRgreen-Technologie

Temperatur	Zeit	
95°C	10 min	
95°C	30 sek	40 Zyklen
60°C	1 min	
72°C	15 sek	
95°C	15 sek	
60°C	1 min	Schmelzkurve
95°C	15 sek	

Die Quantifizierung erfolgte entweder anhand einer Standardkurve oder durch die Anwendung der delta-delta Ct Methode⁹¹. Als konstitutiv exprimiertes Referenzgen wurde *TMEM2* (= *CEMIP2*) verwendet.

2.9. Gesamt-Exom Sequenzierung der FL-Fälle

Für die Detektion somatischer Mutationen wurden ausschließlich Fälle verwendet, die gemäß des Illumina Infinium QC FFPE Kits eine ausreichende Qualität aufwiesen. Die Präparation der genomischen DNAs erfolgte mit dem Agilent SureSelect Human All Exon V6 Kit, wobei Fälle sowohl aus FFPE-Gewebe als auch Frischgewebe verwendet wurden. Für die spätere Annotation wurden ebenso normale Keimbahnproben und tumorfrees Lymphknoten-Gewebe von Patienten mit FL prozessiert und sequenziert. Die Sequenzierung wurde auf einem Illumina HiSeq PE150 Gerät durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung der Sequenzier-Daten erfolgte vollständig durch die Bioinformatik-Abteilung des Universitätsklinikums Münster (MZ und MG).

2.10. Validierung der identifizierten somatischen Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung

Gene, bei denen in der FL-Kohorte besonders häufig Mutationen identifiziert wurden, wurden zunächst anhand der Datenbank NCBI auf ihr onkogenes Potential überprüft. Häufig mutierte Gene, die potentiell an der Lymphomentstehung beteiligt sein könnten, wurden ausgewählt, um die detektierten Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung zu überprüfen. Die Amplikon-spezifischen Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Datenbanken „NCBI Blast“, „NCBI Gene“ und „Ensembl“ bzw. der Primer3 Software generiert und bei Eurofins Genomics erworben.

Zu sequenzierende DNA-Abschnitte wurden initial durch eine PCR vervielfältigt, deren Reaktionsschema und Bedingungen den *Tabellen 2 und 3* entnommen werden können. Die Auswertung der PCR erfolgte wie in 2.3.2 beschrieben durch Agarose-Gelelektrophorese. Wurde keine spezifische Amplikon-Bande detektiert, folgte die Durchführung einer Nested-

PCR, um das erhaltene PCR-Produkt erneut zu amplifizieren. Das Schema des einfachen Reaktionsansatzes ist nachfolgend tabellarisch dargestellt.

Tabelle 10: Pipettierschema zur Durchführung der PCR im Rahmen einer Sanger-Sequenzierung

Reagenz	Volumen [μL]
10x PCR buffer	2
5 mM dNTP-Mix	0,64
10 pmol/ μL Oligonukleotid 5'-3'	0,4
10 pmol/ μL Oligonukleotid 3'-5'	0,4
Taq Polymerase	0.1
Nuklease-freies Wasser	14,46

Der Mastermix wurde anschließend auf 0,2 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und jeweils 2 μL des PCR-Produkts aus der vorherigen PCR zugegeben. Die PCR-Bedingungen richteten sich nach *Tabelle 3*. Eine erneute Gelanalyse mittels Elektrophorese wurde gemäß Kapitel 2.3.2 durchgeführt. Bei erfolgreicher und detektierbarer Amplifikation des neuen PCR-Produkts schloss sich dessen Aufreinigung an. Hierfür wurde das Kit ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent verwendet und die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde für die Sequenzierung markiert. Hierfür wurde für jede Probe eine Reaktion in 5'-3'- und in 3'-5'-Richtung angesetzt. Unter Anwendung des Big Dye Terminator (V3.1) Cycle Sequencing Kit wurde die Reaktion durchgeführt. Das Schema für die Zubereitung eines Reaktionsansatzes ist darunter abgebildet.

Tabelle 11: Pipettierschema zum Ansetzen einer Sequenzier-PCR

Reagenz	Volumen [μL]
5x Big Dye Sequencing Buffer	1
Cycle Mix v3.1	2
1 pmol/ μL Oligonukleotid 5'-3' oder 3'-5'	1,6
PCR-Produkt	5,4

Die Reaktion wurde in 0,2 mL Gefäßen angesetzt und in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen gestartet:

Tabelle 12: PCR-Bedingungen für die Sequenzier-PCR

Temperatur	Zeit	25 Zyklen
96°C	1 min	
96°C	10 sek	
50°C	5 sek	
60°C	4 min	
12°C	∞	

Vor der endgültigen Sanger-Sequenzierung wurde die Reaktion ein weiteres Mal aufgereinigt. Hierfür wurde die Methode mittels Sephadex-Säule gewählt. Die Sephadex-Säulen wurden hierbei selbst hergestellt, indem eine 100 µL-Pipettenspitze mit Filter in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß befestigt wurde und die Spitze mit 350 µL Sephadex-Suspension befüllt wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm. Der Durchfluss, der sich im Reaktionsgefäß angesammelt hatte, wurde verworfen und die Sephadex-Säule nun auf ein neues Reaktionsgefäß geschraubt. Die kompletten 10 µL des Produkts aus der Sequenzier-PCR wurden auf die Säule aufgetragen und für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das im Reaktionsgefäß gesammelte Produkt wurde anschließend mit 15 µL Wasser aufgefüllt und das Gemisch in eine Reaktionsplatte überführt.

Die Reaktion wurde in eine 96-well Platte pipettiert und mit dem Programm AB Short Read Assay sequenziert. Für die Durchführung wurde das AB Sequenziersystem 3500 Dx genutzt. Zur Auswertung der Sequenzen wurde die Software Chromas Lite (V2.6.6) verwendet.

2.11. Analyse der Genexpression ausgewählter Zielgene mittels RT-PCR

Um potentielle Downstream-Effekte der identifizierten CNA und somatischen Mutationen zu untersuchen, wurde basierend auf der TaqMan-Technologie eine GE-Analyse durchgeführt. Dafür wurde in einem ersten Schritt cDNA aus RNA ausgewählter FL-Proben und rLK synthetisiert. Die cDNA-Synthese wurde anhand des AB High Capacity cDNA RT Kit durchgeführt. Für die Herstellung von 20 ng cDNA wurden jeweils 1000 ng RNA eingesetzt. Für die GE-Analyse wurden pro Reaktion 20 ng synthetisierte cDNA eingesetzt und die Analyse erfolgte für jede Probe in Dreifachbestimmung in einer 96-Well Reaktionsplatte. Das Pipettierschema einer einzelnen Reaktion ist nachfolgend dargestellt.

Tabelle 13: Reaktionsschema der GE-Analyse mittels TaqMan Assay

Reagenz	Volumen [µL]
AB TaqMan Gene Expression Master Mix	5,5
Genspezifischer TaqMan Assay	0,55
Wasser	4,45

Tabelle 6 zeigt die PCR-Bedingungen der GE-Analyse, welche auf einem 7500 Fast Real-Time PCR Systems Gerät durchgeführt wurde. Die Berechnung der GE erfolgte mittels delta-delta Ct-Wert⁹¹ in Relation zu dem konstitutiv exprimierten Gen *POLR2B*. Die Signifikanzberechnung wurde entweder mittels Welch's t-Test oder Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wird anhand der p-Werte angegeben.

2.12. Chromatin Accessibility Assay

Im FL wurden bislang insbesondere somatische Mutationen von Chromatin-modifizierenden Genen (CMG) beschrieben^{9,15,17}. Die Form und Zugänglichkeit des Chromatins haben großen Einfluss auf die epigenetischen Akteure wie z.B. Transkriptionsfaktoren und spielen auch in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen eine Rolle^{92,93}. Mit Hilfe des Chromatin Accessibility Assays sollte daher die Chromatinzugänglichkeit verschiedener Gene in FL-Proben und B-Zell-Lymphom-ZL getestet werden. Hierfür wurde das Abcam Chromatin Accessibility Assay Kit verwendet, welches auf einem Chromatinverdau basiert, dessen Umfang anschließend mittels qPCR detektiert wurde. Das Chromatin der zu analysierenden Proben wurde zunächst aus frischem Gewebe oder kultivierten Zellen isoliert und dann in zwei Ansätzen weiterverarbeitet. Während in einen Ansatz ein Nukleasemix für den Verdau des Chromatins gegeben wurde, enthielt der zweite keine Nukleasen. Die Auswertung der qPCR der beiden zu vergleichenden Ansätze lieferte das Ergebnis eines offenen oder geschlossenen Chromatins im untersuchten Gen. Da die DNA im Heterochromatin nicht zugänglich ist, kann hierbei kein Verdau durch Nukleasen stattfinden und die Ct-Werte der verdauten und unverdauten Proben in der qPCR zeigen keinen relevanten Unterschied. Im Euchromatin hingegen ist der Zugang für Nukleasen zur DNA gegeben und ein Verdau möglich. Dies verhindert die anschließende PCR der verdauten Probe und ein deutlicher Unterschied der Ct-Werte ist sichtbar⁹⁴. Für die Unterscheidung zwischen Eu- und Heterochromatin wird das „Fold Enrichment“ (FE) berechnet, wofür die Ct-Werte der verdauten und unverdauten Proben verwendet wurden. Die Formel ist nachfolgend dargestellt.

$$FE = 2^{\frac{(Ct \text{ verdaut} - Ct \text{ unverdaut})}{-1}} \times 100\%$$

Während das FE bei Heterochromatin <400% ist, liegt der Wert für Proben mit Euchromatin >1600%.

Für die Analyse von B-Zell-Lymphom-ZL wurden jeweils 1×10^6 Zellen verwendet und die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Abweichend davon wurden aus technischen Gründen die Temperaturbedingungen der PCR geringfügig geändert und sind in *Tabelle 14* dargestellt. Die Quantifizierung wurde durch die Verwendung der SYBRgreen-Technologie durchgeführt und die qPCR auf einem Fast Real-Time PCR Systems Gerät gestartet. Als Zielgen für primäre Analysen wurde *GAPDH* verwendet.

Tabelle 14: Temperaturbedingungen der qPCR des Chromatin Accessibility Assays

Temperatur	Zeit	
50°C	2 min	
95°C	7 min	
95°C	10 sek	45 Zyklen
60°C	30 sek	
72°C	10 sek	
72°C	1 min	
95°C	15 sek	Schmelzkurve
60°C	1 min	
95°C	30 sek	
60°C	15 sek	

Der Chromatin Accessibility Assay kann nicht an FFPE-Gewebe angewendet werden, weshalb nur FL-Fälle analysiert werden konnten, die als Frischgewebe eingefroren zur Verfügung standen. Um für die Analyse der FL-Proben einen möglichst hohen Tumorzellgehalt (TZG) zu erhalten, wurden die normalen Zellen des Frischgewebes zunächst mittels CD20-MACS-MicroBeads-Technologie (Miltenyi Biotec) von den Tumorzellen separiert. Die Separation wurde anhand des Herstellerprotokolls mit Säulen für maximal 2×10^8 Zellen durchgeführt. Für den Nachweis der erfolgreichen Zellseparation in Tumorzellen (CD20+) und normalen Zellen (CD20-) wurde einmalig eine Messung der Proben mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) angeschlossen.

Für die Messung wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen verwendet. Das entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und eine Zentrifugation für 5 min bei 1400 rpm gestartet. Der Überstand wurde verworfen, 1 mL Bindepuffer zugegeben und die Suspension resuspendiert. Es folgte eine zweite Zentrifugation unter gleichen Bedingungen, bevor erneut 1 mL Bindepuffer zugegeben und resuspendiert wurde. Der Überstand wurde nach einer Zentrifugation nochmals abgenommen und das Zellpellet in 100 µL Bindepuffer resuspendiert. Zusätzlich wurden 2 µL CD20-FITC-Antikörper hinzupipettiert und das Gemisch für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 400 µL Bindepuffer wurden 10.000 Zellen mittels FACS analysiert. Hierfür wurde die BD FACSLyric Flow Cytometry Systems Technologie verwendet.

2.13. Viabilitätsassay ausgewählter B-Zelllinien (ZL)

Zur weiteren Untersuchung möglicher Auswirkungen der neu identifizierten CNA wurden B-Zell-Lymphom-ZL kultiviert und mit CNA-spezifischen Inhibitoren behandelt. Anschließend wurde das Ansprechen der Inhibitoren mittels Viabilitätsassay überprüft. Hierfür wurden die B-Zell-Lymphom-ZL zunächst auf Aberrationen mittels OncoScan CNV Assay analysiert. Die DNAs der ZL wurden dabei wie in Kapitel 2.5. beschrieben prozessiert und ausgewertet. Stabil

kultivierte ZL mit und ohne die spezifischen CNA wurden mit jeweils einem spezifischen Inhibitor behandelt und inkubiert. Die Quantifizierung lebender Zellen erfolgte durch einen MTT Tetrazolium Reduktions Assay. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) weist eine positive Ladung auf und kann somit in lebende Zellen eindringen. Metabolisierende Zellen reduzieren MTT zu einem violetten Formazanprodukt, welches in saurem Medium gelöst wird. Dieser Farbumschlag kann schließlich mittels Absorptionsmessung bei 550 nm detektiert werden und gibt Aufschluss über die Anzahl der viablen Zellen⁹⁵.

Alle verwendeten ZL waren als eingefrorenes Material verfügbar. Die ZL wurden direkt bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 1400 rpm, bevor der Überstand verworfen wurde. Das Zellpellet wurde anschließend in 10 mL RPMI-Medium (10-20% FCS) gelöst und in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierungsbedingungen umfassten die Lagerung bei 37°C und 5% CO₂. Nach einer ersten 24 h Kultivierung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dieser wurde analog zum Auftauen der Zellen beginnend mit einer Überführung der Zellen in ein 50 mL Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils in einer Menge von 5x10⁶ kultiviert und nach 72-96 h erneut auf 5x10⁶ reduziert. Für die Vorbereitung des Viabilitätassays wurden die Zellen zunächst auf eine Menge von ca. 15x10⁶ vermehrt und in ein 50 mL Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 1400 rpm wurde der Medium-Überstand abgegossen und das Pellet in 10 mL frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer in einer 1:5- oder 1:10-Verdünnung. Die Berechnung erfolgte anhand folgender Formel:

Zellzahl x10⁴ pro ml = gezählte Zellzahl : Anzahl gezählter Quadrate x Verdünnungsfaktor

Für die Inhibitor-Behandlung wurden jeweils 50.000 Zellen in Vertiefungen einer 96-Well Reaktionsplatte gegeben. Für den *ETS-1* Inhibitor YK-4-279 wurden die Konzentrationen 0,5 - 1 - 2,5 - 5 µM und für den *IKZF1*-Inhibitor Lenalidomid zunächst 0,1 - 1 - 10 - 100 µM und 0,1 - 1 - 5- 10 µM getestet. Zu den Zellen wurden die jeweiligen Mengen an Inhibitor gegeben, der zuvor jeweils in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst wurde. Das Zell-Inhibitor-Gemisch wurde anschließend mit RPMI-Medium auf ein Gesamtvolumen von 100 µL aufgefüllt. Jede Verdünnungsstufe wurde in sechsfachem Ansatz vorbereitet. Die Plattenbelegung ist *Abbildung 9* zu entnehmen.

Nach jeweils 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch die Zugabe des MTT-Reagenz. 1 g MTT (50 mg/mL) wurde hierfür in 20 mL DMSO gelöst, in 1 mL-Portionen aufgeteilt und schließlich durch Zugabe von jeweils 10 mL PBS auf 5 mg/mL verdünnt. 10 µL der MTT-Gebrauchslösung wurden mittels Achtkanal-Pipette in jede Vertiefung gegeben und resuspendiert. Es folgte eine erneute Inkubation von 2 h bei 37°C.

Zur Freisetzung der gebildeten Formazan-Kristalle wurde Lysepuffer in die Vertiefungen gegeben. Für die Herstellung des Lysepuffers wurden zuerst jeweils 125 mL Wasser und eine Dimethylformamid-Lösung gemischt und diese Mischung dann zu 750 mL 20% SDS-Lösung gegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
B	Medium	Zellen in Medium	Zellen +DMSO	Zellen +Inhibitor Konz. #1	Zellen +Inhibitor Konz. #2	Zellen +Inhibitor Konz. #3	Zellen +Inhibitor Konz. #4	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
C	Medium	Zellen in Medium	Zellen +DMSO	Zellen +Inhibitor Konz. #1	Zellen +Inhibitor Konz. #2	Zellen +Inhibitor Konz. #3	Zellen +Inhibitor Konz. #4	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
D	Medium	Zellen in Medium	Zellen +DMSO	Zellen +Inhibitor Konz. #1	Zellen +Inhibitor Konz. #2	Zellen +Inhibitor Konz. #3	Zellen +Inhibitor Konz. #4	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
E	Medium	Zellen in Medium	Zellen +DMSO	Zellen +Inhibitor Konz. #1	Zellen +Inhibitor Konz. #2	Zellen +Inhibitor Konz. #3	Zellen +Inhibitor Konz. #4	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
F	Medium	Zellen in Medium	Zellen +DMSO	Zellen +Inhibitor Konz. #1	Zellen +Inhibitor Konz. #2	Zellen +Inhibitor Konz. #3	Zellen +Inhibitor Konz. #4	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
G	Medium	Zellen in Medium	Zellen +DMSO	Zellen +Inhibitor Konz. #1	Zellen +Inhibitor Konz. #2	Zellen +Inhibitor Konz. #3	Zellen +Inhibitor Konz. #4	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
H	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Plattenbelegung für den Viabilitätsassay mit vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Der pH-Wert wurde mittels 80%-iger Essigsäure auf 4,5 eingestellt. 90 µL des hergestellten Lysepuffers wurde in jedes Well gegeben und die Reaktionsplatte für weitere 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 150 rpm inkubiert. Die Messung wurde auf einem Victor Nivo Multimode Plate Reader gestartet.

Die Anzahl lebender Zellen wurde mit nachfolgender Formel berechnet.

$$\text{Viabilität \%} = \frac{[(\text{Messwert Probe } n) - (\text{Blindwert})] * 100}{\text{Messwert Kontrolle} - \text{Blindwert}}$$

2.14. Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot

Auf Basis der Ergebnisse der CNA-Analyse von B-Zell-Lymphom-ZL wurden einige dieser ZL zur Herstellung von Zellpellets für die Durchführung eines Western Blots (WB) ausgewählt. Zum einen wurden unbehandelte ZL verwendet, zum anderen wurden die Zellen zunächst wieder mit einem Inhibitor behandelt. 5×10^6 Zellen wurden in eine T25-Zellkulturflasche gegeben und Inhibitor für eine Zielkonzentration von 10 µM für Lenalidomid hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation von 72 h bei 37°C. Zur Herstellung der Pellets wurde die Zellsuspension in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Das überschüssige Medium wurde verworfen und das Pellet mit 5 mL 1xPBS gewaschen. Es folgte erneut ein Zentrifugationsschritt mit denselben Bedingungen und das Absaugen des PBS-

Überstands. Das Pellet wurde daraufhin in ein 2 mL-Reaktionsgefäß gegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Reaktionsgefäß mit Pellet direkt in flüssigem Stickstoff gefroren.

Zur Proteinaufreinigung wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und in 50-600 µL Lysepuffer resuspendiert. Daraufhin wurden die Pellets in einem Ultraschallbad zweimal für je 30 sek homogenisiert und für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und anschließend mittels Bradford-Assay die Proteinkonzentration bestimmt. Für die Vorbereitung der Standardreihe zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Protein Assay Reagenz hergestellt, indem 5x Bradford-Reagenz mit Wasser 1:5 verdünnt wurde. Zu 1 mL 1x Protein Assay Reagenz wurde für die Standardreihe jeweils 1, 2, 4, 6 und 8 µg/µL bovines Serumalbumin (BSA) gegeben. Vor der Messung der Probenkonzentration erfolgte die Zugabe von 1 µL Protein zu 1 mL 1x Protein Assay Reagenz, wonach die Absorption bei 595 nm gemessen wurde.

Zur Auftrennung des Gesamtproteins wurde zunächst eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Das dafür notwendige Polyacrylamid-Gel, bestehend aus Sammel- und Trenngel, wurde wie in *Tabelle 15* dargestellt, vorbereitet.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Polyacrylamid-Gels für SDS-PAGE

Reagenz	Volumen für Sammelgel	Volumen für Trenngel
Destilliertes Wasser	6,1 mL	9,95 mL
30% Acrylamid-Mix	1,35 mL	8,3 mL
1,5 M Tris-HCl, pH:8	-	6,22 mL
0,5 M Tris-HCl, pH:6,8	2,5 mL	-
10% SDS	0,1 mL	0,25 mL
10% APS	0,1 mL	0,25 mL
TEMED	0,01 mL	0,025 mL

30 µg Protein wurden jeweils mit Laemmli-Puffer in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Jeweils 30 µL des Protein-Puffer Gemischs wurden auf das Gel aufgetragen und zusätzlich Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder als Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte anschließend bei 90 V für zunächst 15 min und wurde dann mit 150 V für 55 min weitergeführt.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels Nass-Blotten auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dies erfolgte bei konstanten 400 mA für 1 h. Eine Färbung der Membran mit Ponceau-Lösung wurde zur Verifizierung des Transfers durchgeführt, bevor die Membran in einer Lösung aus 5%-igem Magermilchpulver in 1x TBS-T für 1 h geblockt wurde. Die Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran drei Mal für 15 min in 1x TBS-T-Puffer

gewaschen, bevor die Inkubation mit einem Sekundärantikörper für 1 h durchgeführt wurde. Es folgte ein weiterer Waschschrift, bevor die Detektion gestartet wurde. Die Membran wurde hierfür mit der SuperSignal™ West Pico PLUS Chemilumineszenz-Lösung für 5 min behandelt und anschließend das Protein mit Hilfe der CCD Kamera Stella3200 detektiert. Eine semi-quantitative Auswertung der Proteinexpression wurde mittels ImageJ Software durchgeführt⁹⁶.

2.15. Immunhistochemische (IHC) Färbungen

3 µm-FFPE-Schnitte von FL-Fällen bzw. rLK wurden für die IHC-Färbung vorbereitet. Die Färbungen selbst wurden durch die Pathologie des RBK' auf dem Färbeautomaten Autostainer LabVision 720 durchgeführt. Die Intensität der Färbung und damit die Proteinexpression wurde anschließend mittels Lichtmikroskopie bei 20-facher Vergrößerung begutachtet. Zur Gewährleistung der spezifischen Färbung wurden die erworbenen AK zunächst auf geeigneten Positivkontrollen getestet. Hierbei wurden sowohl verschiedene pH-Werte als auch unterschiedliche Verdünnungen der AK getestet. Färbungen wurden für die Gene *ETS-1*, *IKZF1* und *FCRL5* und *CREBBP* angefertigt. Als verstärkt exprimiert wurden Fälle bewertet, die eine Färbung in $\geq 30\%$ der Zellen zeigten. Die gewählten AK-Verdünnungen und entsprechenden pH-Werte sind *Tabelle 16* zu entnehmen.

Tabelle 16: Präparation der AK zur IHC-Färbungen von FL und rLK

Zielgen	pH-Wert	Verdünnung
<i>IKZF1</i>	9,0	1:500
<i>ETS-1</i>	6,0	1:150
<i>FCRL5</i>	9,0	1:300
<i>CREBBP</i>	6,0	1:150

2.16. Herstellung von FFPE-Zellblöcken kombinierter B-ZL

Die zuverlässige Identifikation von CNA durch FISH und qPCR ist nur begrenzt möglich und hängt stark vom TZG der Probe ab⁹⁷. Für die Definition eines TZG, der für die Detektion von CNA in einer FISH bzw. qPCR erforderlich ist, wurden Zellblöcke verschiedener B-Zell-Lymphom-ZL hergestellt. Jeweils zwei ZL wurden in unterschiedlichem prozentualen Anteil in einem Zellblock fixiert. Die Kombination der zwei ZL wurde dabei so gewählt, dass die nachzuweisende Aberration in jeweils einer der ZL im OncoScan CNV Assay nachgewiesen wurde und die andere ZL eine für diesen Locus normale Kopienzahl aufwies. Für die Herstellung der Zellblöcke wurden 20-30 $\times 10^6$ Zellen kultiviert und mittels Zentrifugation für 5 min bei 1400 rpm pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Pellet mit 10 mL 1xPBS gewaschen und das PBS erneut durch Zentrifugation als Überstand entfernt. Zum

Pellet wurden 5 mL eisgekühltes 70%-iges Ethanol gegeben und gemischt. Mit einer weiteren Zentrifugation wurde das Ethanol entfernt, worauf zwei Waschschrte mit jeweils 5 mL 100%-igem Ethanol folgten. Das Ethanol wurde bei einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1400 rpm entfernt, bevor 10-20 µL Hämatoxylin zugegeben wurde und dies vorsichtig unter das Pellet gemischt wurde. Das nun angefärbte Pellet wurde anschließend langsam auf ein Filterpapier transferiert und dieses in eine Einbettkapsel gelegt. Zur Fixierung wurde das Pellet in 4%-iges Formalin gebettet. Die Einbettung in Paraffin wurde durch die Pathologie übernommen. Zur Detektion des minimal erforderlichen TZG wurden jeweils zwei Pellets verschiedener ZL in einem Block eingebettet. Die prozentualen Anteile der jeweiligen ZL sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 17: Anteile der in den Zellblöcken fixierten ZL

RL	OciLy10
100%	0%
80%	20%
60%	40%
50%	50%
40%	60%
0%	100%

Die Zellblöcke wurden zum einen für die Herstellung von Gewebeschnitten zur Durchführung einer FISH und zum anderen für eine qPCR verwendet. Die Herstellung der Gewebeschnitte sowie die nachfolgende FFPE-FISH erfolgte wie in Kapitel 2.7.2. beschrieben. Die Isolierung der DNA aus FFPE-Blöcken wurde analog zu Kapitel 2.2. durchgeführt. Die qPCR erfolgte ebenfalls wie in Kapitel 2.7.3. beschrieben. Als konstitutiv exprimiertes Referenzgen wurde *TMEM2* verwendet.

2.17. Analysen zur Korrelation spezifischer Mutationen und Aberrationen mit dem Progressionsfreien Überleben (PFS)

Die Korrelation des PFS mit diversen Mutationen bzw. Aberrationen erfolgte mittels univariater Analyse. Die Erstellung der Kaplan-Meier-Kurven erfolgte durch das Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München⁹⁸. Die prognostische Relevanz der verschiedenen genetischen Aberrationen in IFL wurde für die stetigen Variablen mittels Mann-Whitney-U-Test und für die kategorischen Variablen mittels χ^2 -Test berechnet. Time-to-event Variablen wurden mit der Cox Proportional Hazards Regression berechnet und für die Bestimmung der Regressions-Koeffizienten erfolgte mittels Wald-Test. P-Werte, die in den Kaplan-Meier-Plots dargestellt sind, wurden mittels Log-Rank Test bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1. Probenaufarbeitung

3.1.1. Qualitätsanalysen der isolierten FL-DNAs

Die Konzentrationen der isolierten DNAs wurden mittels Qubit Assay gemessen und die Konzentrationen der RNAs mittel NanoDrop-Technologie bestimmt. Die Anzahl der zur Verfügung stehenden FFPE-Blöcke bzw. FF-Fälle ist in *Tabelle 18* aufgelistet.

Tabelle 18: Aufstellung der zur Verfügung stehenden Fälle für die genomische Charakterisierung

Kohorte	RT	MIR	Intern FFPE	Intern FF	GLSG2000	Intern FF
Fälle	139	47	46	30	546	24
			IFL			sFL

Nach der Quantifizierung wurden die DNAs für die weiterführenden CNA-Untersuchungen hinsichtlich ihrer Qualität getestet. Die Auswertung der Qualitäts-PCR der *HBB*-Amplikons erfolgte durch die UV-Detektion des Agarose-Gels, wobei die QC mittels PCR nur für FFPE-DNAs durchgeführt wurde. Mit Hilfe eines Markers wurden die Größen der einzelnen Amplikons bestimmt. Abhängig vom Fragmentierungszustand der DNAs, wurden Amplikons mit einer Größe von 75 bp, 198 bp oder 411 bp generiert. Innerhalb der IFL-Fälle (RT, MIR, Intern FFPE) wurden 72 DNAs (31%) mit einer Bande bei 411 bp, 95 DNAs (41%) mit einer Bande bei 198 bp und 55 DNAs (24%) mit einer Bande bei 75 bp identifiziert. 10 DNAs (4%) zeigten keine Amplifikation. Von 546 sFL-FFPE-Proben (GLSG2000) zeigten 108 DNAs (20%) Banden bei 411 bp, 200 DNAs (37%) bei 198 bp und 212 DNAs (39%) bei 75 bp. 26 DNAs (5%) wiesen keine Bande und somit keine Amplifikation auf. Die Ergebnisse der Qualitäts-PCR für die jeweilige Kohorte sind in *Tabelle 19* dargestellt.

Tabelle 19: Ergebnisse der QC der FL-Fälle für die jeweiligen Kohorten

Kohorte	RT	MIR	Intern FFPE	GLSG2000
Qualitäts-PCR	Anzahl der Fälle			
411 bp	31	22%	21	45%
198 bp	60	43%	18	38%
75 bp	41	29%	7	15%
n.a	7	5%	1	2%
qPCR				
≥ 80 Amplikons	84	60%	37	79%
< 80 Amplikons	34	24%	8	17%
n.a	21	15%	2	4%

Die Auswertung der Daten der qPCR für das *FTH1*-Gen erfolgte mittels 7500 Software (V2.3). Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen und das Ergebnis aus dem Median der quantifizierten Amplikons gebildet. Die Quantifizierung wurde mittels Standardkurve durchgeführt, wobei der Schwellenwert für eine ausreichende Qualität auf ≥ 80 Amplikons definiert wurde. 133/232 IFL FFPE-DNAs (57%) wiesen ≥ 80 *FTH1*-Amplikons auf. 49 DNAs (21%) erfüllten die Kriterien nicht und bei 50 DNAs (22%) war aufgrund der fehlenden Amplifikation keine Auswertung möglich. Für die sFL-DNAs lag die Anzahl der Fälle mit ≥ 80 Amplikons bei 334 von 546 Fällen (61%) und 107 Fälle (20%) wiesen weniger als 80 Amplikons auf. 105 DNAs (19%) zeigten keinerlei Amplifikation. Für die jeweilige Studienkohorte sind die Ergebnisse der qPCR in *Tabelle 18* aufgeschlüsselt. Fälle mit Amplikongrößen von mindestens 200 bp und ≥ 80 *FTH1*-Amplikons wurden in die Untersuchungen eingeschlossen.

Zur QC für die WES wurde das Illumina Infinium QC FFPE Kit verwendet. Insgesamt wurden 172 IFL-Fälle für diese QC berücksichtigt. Die Analyse der Qualität erfolgte anhand einer qPCR, bei der eine im Kit enthaltene Normalprobe als Standard diente. Für jede Probe wurde die Abweichung des Cq-Wertes (Cq: Quantifizierungszyklus) vom Standard nach Angaben des Protokolls berechnet (delta-Cq-Wert). Lag der delta-Cq-Wert höher als 3,0, wurde die DNA-Qualität als nicht ausreichend definiert. 135 der 172 IFL-Fälle (78%) wiesen hierbei einen Wert $< 3,0$ auf.

Die Kombination der Ergebnisse aller drei Methoden zur QC wurde schließlich für die weitere Verwendung der Proben berücksichtigt. Für die WES wurden insgesamt 140 IFL (140/232, 60%) und 24 sFL (FF) verwendet. Für die Analyse der CNA-Daten konnten 147 IFL (147/232, 63%) und 122 sFL (FFPE, nur R-CHOP-behandelt) eingesetzt werden. Innerhalb der IFL gab es 132 Fälle, die sowohl CNA- als auch WES-Daten lieferten. Von 15 IFL gab es ausschließlich CNA-Daten, wobei von acht IFL lediglich WES-Daten existierten (Abb.10). Für die sFL gab es keine Fälle, die sowohl in der CNA- als auch in der WES-Analyse verwendet wurden.

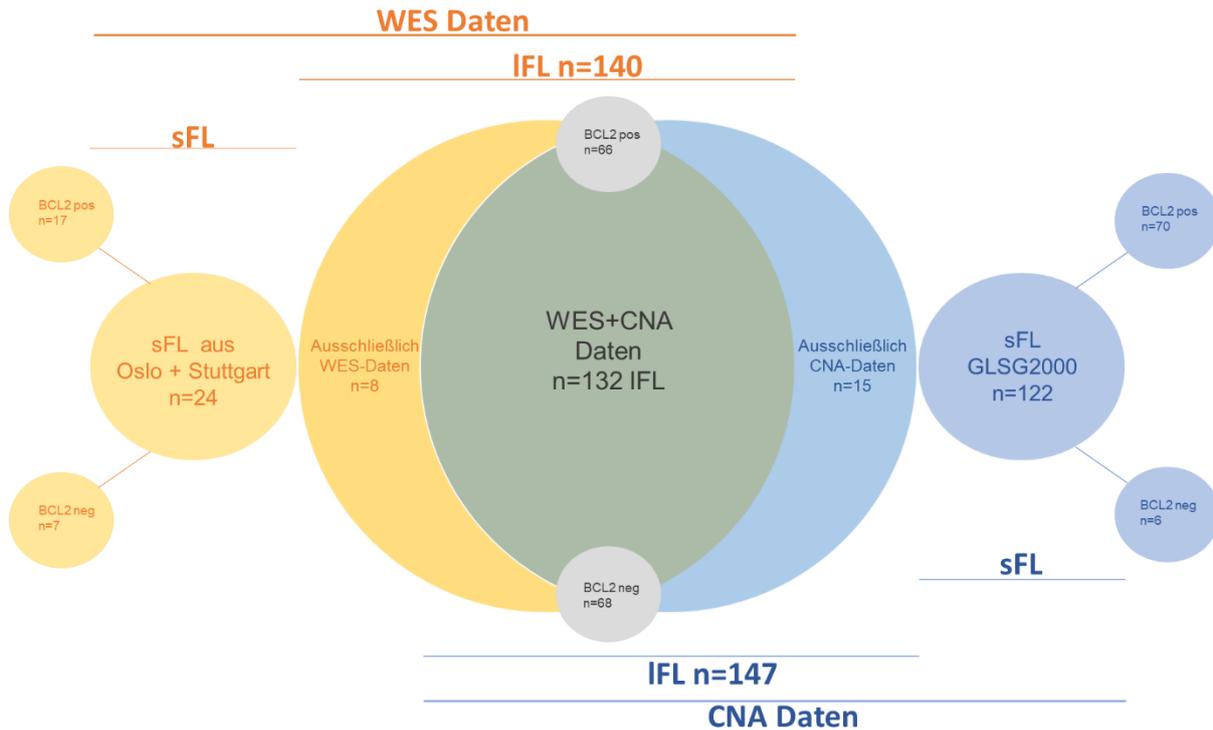


Abbildung 10: Aufstellung der FL-Fälle, die in die CNA- und WES-Analysen eingeschlossen wurden. Abgebildet ist auch der Anteil der Fälle mit und ohne *BCL2*-Translokation⁹⁹.

3.1.2. Nachweis der *BCL2*-Translokation mittels FISH und delta-PCR

Der *BCL2*-Translokationsstatus der meisten Fälle war bereits bekannt^{18,67}. Fälle mit unbekanntem *BCL2*-Translokationsstatus wurden entweder mittels FISH unter Verwendung einer *BCL2*-Break-Apart-Sonde (bei vorhandenem FFPE-Gewebe) oder mittels delta-PCR untersucht, wenn lediglich die genomische DNA der Fälle verfügbar war. Von FL aus internen Beständen lagen teils Ergebnisse auch aus Chromosomen-Bänderungen vor. Abschließend stand von insgesamt 140 IFL der *BCL2*-Translokationsstatus zur Verfügung. 47,1% (66/140) der IFL wiesen die Translokation auf, während in 48,6% (68/140) der IFL keine *BCL2*-Translokation nachgewiesen wurde. Für 4,3% (6/140) der Fälle war keine Auswertung möglich. sFL aus internen Beständen, für die eine WES durchgeführt wurde, zeigten in 70,8% (17/24) der Fälle eine Translokation, während bei 29,2% (7/24) keine Translokation nachgewiesen wurde. Innerhalb der GLSG2000-Studie konnten 76 sFL auf ihren Translokationsstatus untersucht werden. 92,1% (70/76) sFL-Fälle, die mittels OncoScan CNV Assay analysiert wurden, wiesen eine *BCL2*-Translokation auf, während in 7,9% (6/76) keine Translokation detektiert werden konnte.

Zur Überprüfung der Ergebnis-Korrelation bei der Verwendung der FISH und der delta-PCR, wurden 20 IFL-Fälle mit beiden Methoden auf die *BCL2*-Translokation untersucht. 70% (14/20) der Fälle zeigten übereinstimmende Ergebnisse zwischen FISH und delta-PCR. 25% (5/20) der Fälle wurden bei den FISH-Analysen als transloziert identifiziert, bei der delta-PCR jedoch

als nicht-transloziert. 5% (1/20) der FL zeigten in der delta-PCR ein positives Ergebnis, waren in der FISH aber als negativ identifiziert worden (Abb.11).

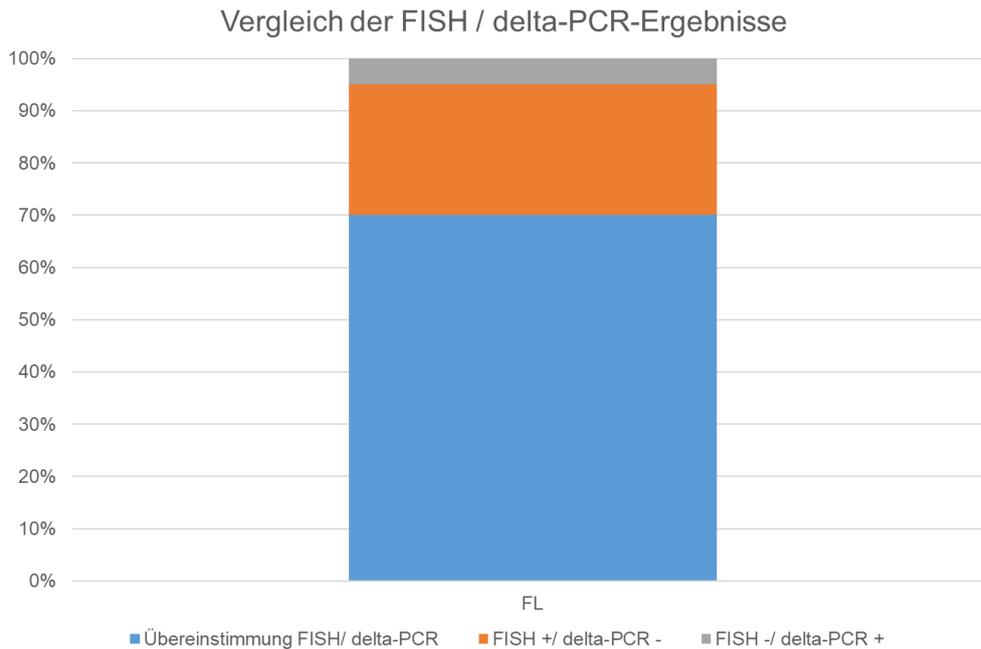


Abbildung 11: Übereinstimmung der FISH- und delta-PCR-Ergebnisse. Der prozentuale Anteil übereinstimmender Ergebnisse ist in blau dargestellt, der Anteil mit positivem FISH- aber negativem delta-PCR-Ergebnis in orange und der Anteil an negativer FISH aber positiver delta-PCR in grau.

3.2. Identifikation von CNA und Mutationen in FL

3.2.1. Detektion von CNA und Identifikation neuer Zielgene in IFL und sFL

Die Auswertung der CNA-Daten der FL mittels OncoScan CNV Assay basierte zum einen auf der Frequenz der Aberrationen aller Einzelfälle anhand der ChAS-/MSV-Analyse zur graphischen Darstellung und zum anderen auf der Frequenz und Signifikanz der Aberrationen in Bezug auf die Gesamtkohorte durch den GISTIC 2.0 Algorithmus. Insgesamt wurden 147 IFL und 122 sFL auf CNA-Ebene untersucht (Abb.10). Zu den häufigsten Aberrationen mit einer Frequenz von $\geq 15\%$ zählten insbesondere im FL bereits beschriebene CNA^{20,100-102}. Hierzu gehörten Zugewinne in 1q, 2p, 7, 8, 12q, 18q und X, sowie Verluste in 1p36, 6q, 10q, 13p und 17p in beiden Kohorten.

CNA in IFL

19,0% (28/147) der IFL wiesen Zugewinne in 1q21.2-q23.3 (149.843.728-161.339.786) auf. In 2p16.1-p15 (57.671.313-64.433.078) zeigten 32,7% (48/147) der IFL einen Zugewinn. Des Weiteren wurden über das Chromosom 7 verteilt in 25,9% (38/147) der IFL Zugewinne detektiert. In 8q24.12-q24.3 (120.964.751-139.887.797) zeigten 15,6% (23/147) der IFL Zugewinne und 25,2% (37/147) der IFL wiesen Zugewinne in einer minimal amplifizierten Region (MAR) in 12q14.1-q15 (57.880.580-68.813.318) auf. Innerhalb des X-Chromosoms traten in 16,3% (24/147) der IFL Zugewinne auf.

Verluste innerhalb der IFL wurden in 16,3% (24/147) in 1p36.33-p36.31 (2.041.607-6.935.668) und in 15,0% (22/147) in 6q23.3-q24.1 (136.511.632-138.337.923) identifiziert. CNN-LOHs der IFL wurden in 22,4% (33/147) in 1p36.33-p36.1 (860.593-17.624.614) und in 19,7% (29/147) in 6p25.3-p21.31 (43.536-33.730.545) nachgewiesen. Zudem zeigten 16,3% (24/147) der IFL CNN-LOHs in 16p13.3-p12.2 (16.918-21.774.496).

CNA in sFL

Die sFL zeigten rekurrente Zugewinne in 28,7% (35/122) in 2p16.1-p15 (57.997.386-61.888.851) und in 27,9% (34/122) über das gesamte Chromosom 7 verteilt. In 8q22.1-q24.3 (96.540.258-145.113.178) wiesen 20,5% (25/122) der sFL Zugewinne auf. Weitere Zugewinne innerhalb der MAR in 12q13.11 (46.546.134-48.160.959) zeigten 19,7% (24/122) der sFL. Chromosom 18 (1-63.445.873) war in 36,1% (44/122) von Zugewinnen in sFL betroffen. Ein Zugewinn im X-Chromosom wurde in 38,5% (47/122) der sFL detektiert.

Zu den häufigsten Verlusten der sFL zählten CNA in 1p36.33-p36.23 (806.937-8.805.248) in 25,4% (31/122). Chromosom 6 wies zwei Regionen mit Verlusten in mehr als 15% der sFL auf. Hierzu gehörten Verluste in 28,7% (35/122) in 6q12-q21 (64.657.883-108.146.480) und in 16,4% (20/122) in 6q23.3-q24.1 (137.637.888-141.654.185).

Die häufigsten CNN-LOHs betrafen sFL in 27,0% (33/122) der Fälle in 1p36.33-p35.2 (778,029-31,162,871). Zudem zeigten 21,3% (26/122) der sFL CNN-LOHs in 6p25.3-p21.2 (211.821-36.815.766). In 16p13.3-p11.2 (6.661 - 29.278.971) wurden in 26,3% (32/122) der sFL CNN-LOHs detektiert. Die Frequenzen der bisher bekannten CNA sind nachfolgend in *Tabelle 20* dargestellt.

Es konnten keine CNA nachgewiesen werden, die ausschließlich in IFL oder sFL auftraten. Die Verteilung der CNA in IFL und sFL war hingegen sehr ähnlich, wie in Kapitel 3.2.4. detailliert erläutert wird.

Tabelle 20: Darstellung bereits bekannter CNA im IFL, die mit Frequenzen >15% in einer Kohorte auftraten

	IFL	sFL
Zugewinne		
1q21.2-q23.3	19,0%	<15%
2p16.1-p15	32,7%	28,7%
7	25,9%	27,9%
8q24	15,6%	20,5%
12q	25,2%	19,7%
18	<15%	36,1%
X	16,3%	38,5%
Verluste		
1p36	16,3%	25,4%
6q12-q21	<15%	28,7%
6q25.3-q24.1	15,0%	16,4%
CNN-LOHs		
1p36	22,4%	27,0%
6p25	19,7%	21,3%
16p13.3	16,3%	26,2%

Neu-identifizierte CNA in IFL und sFL

Sowohl in IFL als auch sFL wurden neben den bisher bekannten und häufig nachgewiesenen CNA Regionen gefunden, in denen bislang Zugewinne und Verluste nicht rekurrent beschrieben waren. Hierzu zählen fokale Zugewinne in 6p21.32 (chr6:32.324.665-33.154.852) in jeweils 19,0% (28/147) der IFL und in 18,0% (22/122) der sFL. Innerhalb dieser Region liegen zahlreiche *HLA*-Gene sowie das Gen *TAP2*, welches für einen ATP-Transporter kodiert. 21,1% (31/147) der IFL und 15,6% (19/122) der sFL zeigten zudem fokale Zugewinne in 11q24.3 (chr11:128.150.539-128.763.670), worin die tumorassoziierten Gene *ETS-1* und *FLI1* lokalisiert sind und die bislang im Burkitt-Lymphom eher als Verlustregion beschrieben wurde^{103,104}. Eine neu identifizierte Region mit häufigen Zugewinnen im sFL umfasste zusätzlich 17q21.32-q24.1 (chr17:46.981.750-65.047.552), welche in 18,9% (23/122) betroffen war und 166 Gene betraf. Weiterhin wurde 8p11.22 (chr8:39.359.327-39.605.840) sowohl in den IFL als auch den sFL als fokale Verlustregion identifiziert. 21,1% (31/147) der IFL und 26,2% (32/122) der sFL wiesen solche CNA auf, wobei hier nahezu gleich viele hemi- und homozygote Verluste innerhalb der IFL auftraten (41,9% bzw. 58,1%), aber vermehrt homozygote Verluste innerhalb der sFL zu beobachten waren (62,5% bzw. 37,5%). Innerhalb der Verlustregion waren die Metallopeptidasen *ADAM18* und *ADAM32* von Verlusten in IFL und sFL betroffen (*ADAM32*: 15 sFL, 13 IFL; *ADAM18*: 16 sFL, 20 IFL).

Tabelle 21: Neu identifizierte, häufig aberrante Regionen in IFL und sFL

	IFL	sFL	betroffene Gene
Zugewinne			
6p21.32	19,0%	18,0%	<i>HLA, TAP2</i>
11q24.3	21,1%	15,6%	<i>ETS-1, FLI1</i>
17q21.32-q24.1	<15%	18,9%	166 Gene
Verluste			
8p11.22	21,1%	26,2%	<i>ADAM32, ADAM18</i>

3.2.2. GISTIC-basierte Identifikation signifikanter CNA in IFL und sFL

Ergänzend zur Analyse der CNA mittels ChAS, wurden CNA der FL-Kohorte mit Hilfe des GISTIC 2.0 Algorithmus auch auf ihre Signifikanz analysiert. Sowohl für IFL als auch sFL wurden zahlreiche genomische Regionen identifiziert, die durch ihr CNA-Profil als signifikant eingestuft wurden (Abb.12+13). Bei der Analyse der Daten konnten sowohl signifikante Zugewinne als auch Verluste identifiziert werden. Basierend auf den zuvor mittels ChAS identifizierten Regionen, welche eine Aberrationsfrequenz von $\geq 15\%$ aufwiesen, konnten durch die Anwendung des GISTIC 2.0 Algorithmus die aberranten Regionen in IFL und sFL auf ihre signifikanten Loci weiter eingegrenzt werden⁹⁹.

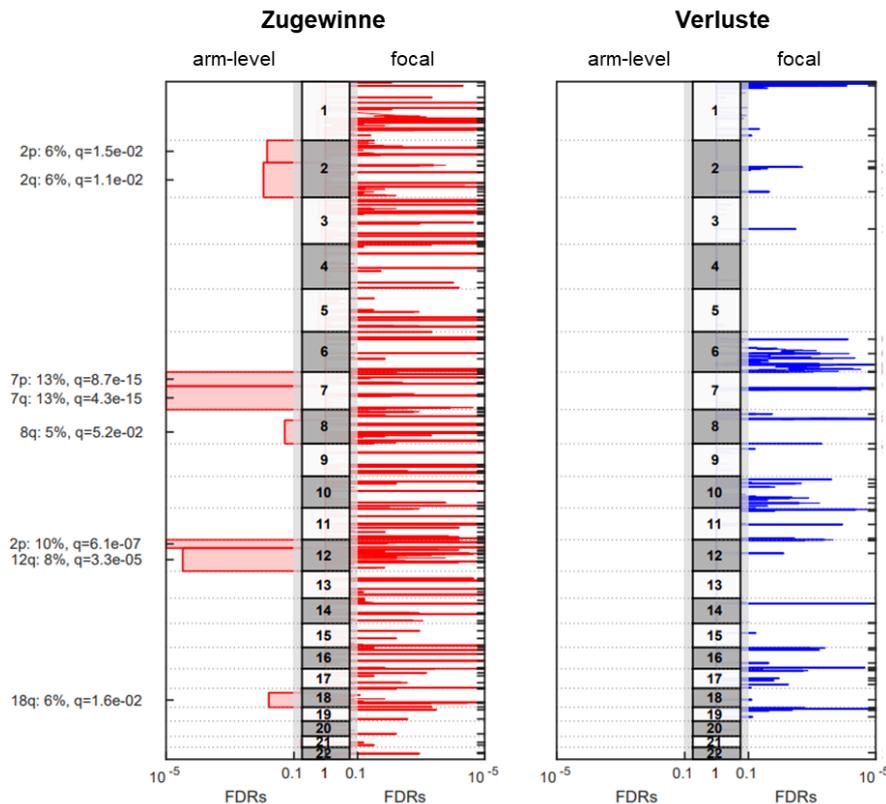


Abbildung 12: Zugewinne und Verluste der IFL wurden mittels GISTIC 2.0 weiter eingegrenzt. Zugewinne sind in rot abgebildet, Verluste in blau. FDR-Werte sind unter der Grafik angegeben. Auf der linken Seite sind Arm-level Aberrationen dargestellt, die entsprechenden Chromosomen sind in der Mitte der Grafik angegeben und rechts die als aberrant identifizierten fokalen Regionen.⁹⁹

Zu den häufig aberranten Regionen in IFL, welche mittels ChAS identifiziert wurden, zählte die Zugewinn-Region 1q21.2-q23.3, welche 392 Gene umfasst. Innerhalb dieser Region wurden mittels GISTIC 2.0 zwei signifikante Regionen ermittelt. 1q23.1 (chr1:157476105-157855986; $q=6,8274E-35$) beinhaltet lediglich *FCRL5* als einzelnes Gen. Auch 1q23.3 (chr1:160236604-161771484) zeigte eine sehr hohe Signifikanz ($q=8,2439E-22$) und umfasste die Gene *LY9* und *SLAMF7*. Weiter eingegrenzt wurde auch die Region 2p16.1-p15. Die MAR 2p16.1 (chr2:59732711-61111627) erstreckte sich hierbei auf nur noch auf die drei Gene *LINC01185*, *PAPOLG* und *REL*. Während Chromosom 7 im Rahmen der Einzelfallanalyse im Gesamten häufig zugewonnen war, ließen sich die signifikanten Regionen auf zwölf eingrenzen, die jeweils zwischen einem und elf Gen(e) umfassten (Tab.22).

Tabelle 22: Chromosom 7 enthielt zahlreiche signifikante einzelne Regionen, die mittels GISTIC 2.0 identifiziert wurden. Die Regionen sind mit den zugehörigen q-Werten und den inkludierten Genen aufgelistet.

Region	q-Wert	Inkludierte Gene
7p12.3	0,0061161	C7orf57, SUN3
7p13	0,0038574	COA1, HECW1, STK17A
7p15.3	3,8356E-07	CCDC126, IGF2BP3, TRA2A
7p21.3	1,0406E-12	GLCCI1, ICA1, LOC100505921, UMAD1
7p22.3	0,0061161	CHST12, EIF3B, GRIFIN, MAD1L1, MIR6836, MRM2, NUDT1, SNX8
7q21.3	0.0016485	BET1
7q22.1	3,7562E-08	C7orf43, CASTOR3, CNPY4, GAL3ST4, GPC2, LAMTOR4, MBLAC1, MIR4658, PVRIG, STAG3, TAF6
7q36.1	0,0085487	LOC100289561, LOC100630923, MIR5480, ORAI2, PRKRIP1, SPDYE6
7q36.2	0,000022813	GIMAP1, GIMAP1-GIMAP5, GIMAP2, GIMAP4, GIMAP5, GIMAP6, GIMAP7, GIMAP8
7q36.3	0,0026928	HTR5A-AS1, PAXIP1, PAXIP1-AS1

Das mit Abstand höchste Signifikanzniveau aller detektierten signifikanten Regionen innerhalb der IFL ($q=7,9917E-37$) wurde in 7p12.2 (chr7:50130814-50440165) ermittelt, worin nur das Gen *IKZF1* lokalisiert ist und von dessen Zugewinn 35,0% der IFL betroffen waren. Die übrigen in Chromosom 7 als signifikant erkannten Zugewinn-Regionen und die inkludierten Gene sind in Tabelle 22 aufgelistet. 108 inkludierte Gene lieferte die ChAS-Auswertung der häufig zugewonnenen Region 8q24.12-q24.3. Diese Region wurde durch die GISTIC 2.0 Analyse auf zwei signifikante Loci eingegrenzt. Hierbei wurden 8q24.21 (chr8: 129841201-130453476; $q=2,5796E-06$) mit den beiden Genen *ASAP1* und *ASAP1-IT1* und 8q24.22 (chr8:132628076-133632300; $q=7,5626E-10$) mit vier lokalisierten Genen *MIR7848*, *PTCSC1*, *SLA* und *TG* detektiert. Die neu identifizierte Zugewinn-Region 11q24.3 (chr11: 128155371-128798945) umfasste im Rahmen der ChAS-Analyse drei Gene, während die signifikante Region durch GISTIC 2.0 als größer berechnet wurde und die sechs Gene *ETS-1*, *FLI1*, *LOC101929517*, *LOC101929538*, *MIR6090* und *SENCR* enthielt. Das Signifikanzniveau lag bei $q=1,3481E-27$.

Durch die Anwendung von GISTIC 2.0 wurde auch die zugewonnene Region 12q14.1-q15 bestätigt. Als signifikant wurde hierbei die Region 12q14.1 (chr12:58205634-65143890; q=0,000022813) gewertet und die Anzahl der lokalisierten Gene betrug 26.

Eine weitere Eingrenzung der häufig aberranten Gene konnte auch für die Verlustregionen durchgeführt werden. Während die Einzelfallanalyse die Region 1p36.33-p36.31 umfasste und 67 Gene betraf, identifizierte GISTIC 2.0 die beiden Loci 1p36.32 (chr1:1-8474469; q=3,3983E-15) und 1p36.23 (chr1:2459149-8509847; q=5,8048E-14) als signifikant. 1p36.32 umfasste hierbei die zehn Gene *FAAP20*, *HES5*, *MORN1*, *PANK4*, *PEX10*, *PLCH2*, *PRKCZ*, *PRKCZ-AS1*, *RER1* und *SKI*, während 1p36.23 die Gene *CAMTA1* und *LOC102725193* enthält. Die Region 8p11.22 wurde ebenfalls mittels GISTIC 2.0 als signifikant aberrant identifiziert und beinhaltet das Gen *LOC100130964*.

Tabelle 23: Mittels GISTIC 2.0 konnten die häufig aberranten Regionen der IFL auf die signifikantesten Gene eingegrenzt werden.

	Region ChAS	# Gene	Region GISTIC	# Gene	
Zugewinne	1q21.2-q23.3	392	1q23.1	1	
			1q23.3	2	
	chr7	2p16.1-p15	23	2p16.1	3
				7p12.2	1
				7p12.3	2
				7p13	3
				7p15.3	3
				7p21.3	4
				7p22.3	8
				7q21.3	1
				7q22.1	11
				7q22.1	6
	8q24.12-q24.3	108	7q36.1	8	
			7q36.2	3	
			7q36.3	2	
11q24.3	3	8q24.21	2		
		8q24.22	4		
12q14.1-q15	67	11q24.3	6		
Verluste	1p36.33-p36.31	67	12q14.1	26	
			1p36.32	10	
	8p11.22	4	1p36.23	2	
			8p11.22	1	

Innerhalb der sFL-Kohorte konnten unter den signifikanten Zugewinnen häufig auftretende CNA aus der ChAS-Auswertung bestätigt werden (Abb.13). Diese beinhalteten zum einen 2p16.1 (q=1,87E-11) und zum anderen 6p21.32 (q=7,85E-11). Chromosom 7 war von zahlreichen Zugewinnen betroffen und konnte mittels GISTIC 2.0 auf die signifikante Region 7p12.2 minimiert werden. 11q24.3 (q=1,96E-13) wurde ebenso wie die Regionen 17q21.33

($q=0,022731$) und 18q21.33 ($q=0,051552$) als signifikant bewertet. Auch auf dem X-Chromosom wurden insgesamt fünf Loci mit signifikanten Zugewinnen identifiziert. Hierzu gehörten Xp22.33 ($q=5,41E-07$), Xq22.3 ($q=6,89E-06$), Xq28 ($q=0,002$), Xp21.3 (0,006) und Xp11.4 (0,0251). Innerhalb der signifikanten Region 2p16.1 (chr2:60720743-60947098) konnten die drei Gene *REL*, *PAPOLG* und *PUS10* und die nicht-kodierende RNA *LINC01185* detektiert werden. Die signifikante Zugewinnregion 6p21.32 (chr6:32559970-32703521) enthält fünf Gene, die allesamt zu den *HLA*-genen zählen. Der signifikante Bereich in 7p12.2 (chr7:50266268-50319941) umfasste das einzelne Gen *IKZF1*. Drei Gene hingegen liegen innerhalb der signifikanten Region 11q24.3 (chr11:128459510-128676953), zu denen *ETS-1*, *LOC101929517* und *MIR6090* zählen. Auch 17q21.33 wurde als signifikante Region definiert (chr17:49350150-49536842) und umfasst die Gene *NGFR*, *PHB* und *ZNF652*, sowie die nicht-kodierenden RNAs *LOC100288866*, *LOC101927207*, *LOC102724596* und die Micro-RNA *MIR6165*.

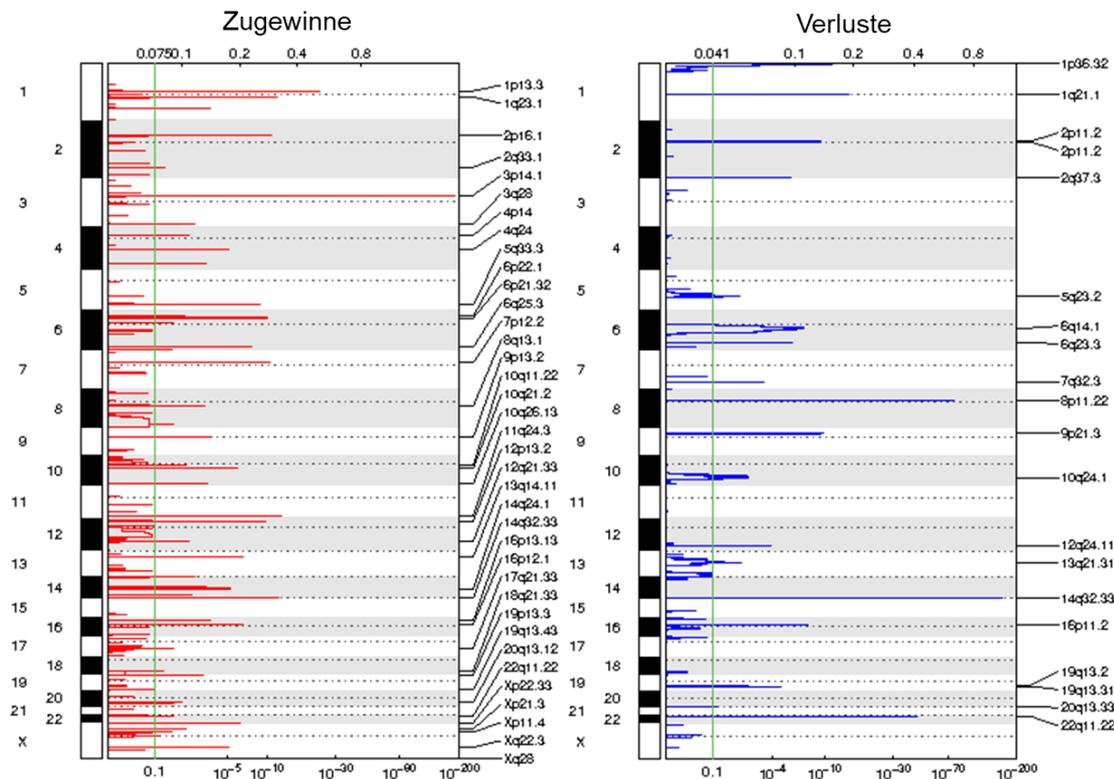


Abbildung 13: Signifikante Zugewinn- und Verlustregionen der sFL. Zugewinne sind in rot, Verluste in blau dargestellt. FDR-Werte sind unter der Grafik angegeben, G-Werte, welche die Amplitude und Frequenz der Aberration angeben, stehen über der Grafik. Auf der linken Seite sind die Chromosomen angegeben, rechts die identifizierten Regionen.

Wiederum je ein einzelnes Gen beinhalten die signifikanten Regionen 18q21.33 (chr18:63221569-63322788), welches *BCL2* enthält, sowie 18q21.32 (chr18:58671465-58754477) mit *MALT1*. Alle fünf als signifikant bewerteten Regionen in X enthalten je ein bis fünf Gene. Während in Xp21.3 (chrX:26768820-27047639) lediglich das Pseudogen *VENTXP1* lokalisiert ist und Xp11.4 (chrX:39777405-39999405) die Mikro-RNA *MIR1587*

einschließt, liegen in Xp22.33 (chrX:1110376-1277149) die Gene *CSF2RA* und *CRLF2*. Die vier Gene in Xq22.3 (chrX:107497969-107732739) umfassen *TSC22D3*, *PRPS1*, *FRMPD3*, sowie die nicht-kodierende RNA *FRMPD3-AS1*. In Xq28 (chrX:155699752-156040895) liegen die Gene *IL9R*, *VAMP7*, *SPRY3*, *DDX11L16* und *WASIR1*.

Zu den identifizierten Verlustregionen zählten 1p36.32 ($q=5,1559E-17$), 6q14.1 ($q=1,25E-07$) und 6q23.3 ($q=1,62E-05$). Auch die neu identifizierte Region 8p11.22 wurde als signifikant gewertet ($q=1,78E-77$). Innerhalb der signifikanten Region 1p36.32 (chr1:2542228-2597752) sind vier Gene lokalisiert, zu welchen *TNFRSF14* und *PRXL2B*, sowie die beiden nicht-kodierenden RNAs *LOC115110* und *LOC100996583* zählen. Wesentlich umfangreicher war die signifikante Region 6q14.1 (chr6:73178729-82906802), welche insgesamt 41 Gene umfasst. Innerhalb der zweiten signifikanten Region in Chromosom 6q23.3 (chr6:137039847-138697891) sind 14 Gene lokalisiert. Für 8p11.22 wurde der signifikante Bereich auf zwei Gene reduziert, zu denen zum einen das Pseudogen *ADAM3A* und zum anderen die nicht-kodierende RNA *LOC100130964* zählen.

Des Weiteren wurde 16p11.2 mittels GISTIC 2.0 als signifikante Verlustregion determiniert ($q=3,17E-08$), die im Rahmen der ChAS-Analyse als Region für häufig auftretende CNN-LOHs ermittelt wurde. 13 Gene konnten innerhalb der signifikanten Region 16p11.2 (chr16:32126645-34962823) detektiert werden, wovon sechs dieser Gene der Familie der TP53 Zielgene zugeordnet werden konnten (*TP53TG3*, *TP53TG3C*, *TP53TG3D*, *TP53TG3B*, *TP53TG3E*, *TP53TG3F*).

Tabelle 24 zeigt die identifizierten Regionen mittels ChAS und GISTIC 2.0 und die Anzahl der Gene in den Regionen, die durch GISTIC 2.0 als signifikant eingegrenzt wurden.

Tabelle 24: Mittels GISTIC 2.0 können die frequent aberranten Regionen der sFL auf die signifikantesten Regionen eingegrenzt werden.

	Region ChAS	# Gene	Region GISTIC	# Gene
Zugewinne	2p16.1-p15	20	2p16.1	4
	6p21.32	26	6p21.32	5
	7		7p12.2	1
	11q24.3	2	11q24.3	3
	17q21.32-q24.1	166	17q21.33	7
	18p11.32-q21.33	351	18q21.33	1
			18q21.32	1
			Xp11.4	1
	X		Xp21.3	1
			Xp22.33	2
		Xq22.3	4	
		Xq28	5	
Verluste	1p36.33-p36.23	145	1p36.32	4
	6q12-q21	165	6q14.1	41
	6q23.3-q24.1	22	6q23.3	14
	8p11.22	2	8p11.22	2

Die Auswertung der CNA von IFL und sFL lieferte zunächst Einblicke in bereits bekannte häufig auftretende Aberrationen. Insgesamt konnten sowohl für IFL als auch sFL mehr Zugewinne als Verluste identifiziert werden, wobei keine Aberration ausschließlich in IFL oder sFL auftrat. Die Analysen mittels ChAS und GISTIC zeigten übereinstimmende Ergebnisse und ermöglichten eine Eingrenzung der betroffenen Loci auf die signifikanten Gene. Hierbei wurden sowohl für IFL als auch für sFL bisher unbeschriebene häufig auftretende CNA identifiziert. Signifikante Zugewinne der neu identifizierten CNA betrafen insbesondere die Regionen 1q23.1, 7p12.2, 11q24.3 und 18q21.32-33. Signifikante Verluste wurden in den Regionen 1p36 und 8p11.22 neu beobachtet.

3.2.3. Identifikation von rekurrenten somatischen Mutationen in FL

Zur Identifikation somatischer Mutationen wurden 140 IFL und 24 sFL analysiert. FF-Gewebe lag von 29 IFL und 24 sFL vor, die übrigen 111 Proben lagen als FFPE-Gewebe vor. Rekurrente somatische Mutationen wurden mittels MutSig2CV-Algorithmus identifiziert und die häufigsten signifikanten Mutationen ($q < 0,1$) sind nachfolgend für IFL ($\geq 7,5\%$) und für sFL ($\geq 10\%$) dargestellt (Abb.14). Die Analyse ergab einen medianen Wert von 81,64 Mutationen pro Fall und einen Wert von 1,35 Mutationen pro Fall und Megabase für die Gesamtkohorte der IFL und sFL.

Zu den häufigsten, von somatischen Mutationen betroffenen, Genen in IFL zählen *CREBBP* und *KMT2D* (je 41,4%), sowie *BCL2* und *MUC4* (je 37,1%), gefolgt von *TNFRSF14* (35,0%) und *IGLL5* (30,7%). Des Weiteren wurden Mutationen in *ANKRD30BL* (29,3%), *STAT6* (27,9%), *EZH2* (22,9%), *ABL2* und *MUC19* (je 20,7%) identifiziert. Ebenfalls betroffen waren

die Gene *MEF2B* (17,9%), *KIR3DL1* (14,3%), *TTN* (14,3%), *BCL7A*, *MUC16* und *MUC22* (je 13,6%). Weitere somatische Mutationen konnten in *IRF8*, *MAGEC1* (je 12,9%), *GBP7* (12,1%) und *EP300* (11,4%) detektiert werden. *CCDC40*, *PIM1* und *SOCS1* zeigten in 10,7% der IFL Mutationen, während 10,0% der Fälle Mutationen in *HIST1H1E* bzw. *MAP7D1* aufwiesen. 9,3% der IFL zeigten somatische Mutationen in den Genen *BCR*, *POU2F2* und *USH2A*. *FLG*, *FOXO1*, *LOC646652* und *POU2AF1* waren in 8,6% der IFL von Mutationen betroffen. Ebenfalls mutiert waren die Gene *ACTB*, *BTG1* und *LRP1B* in 7,9% der Fälle⁹⁹.



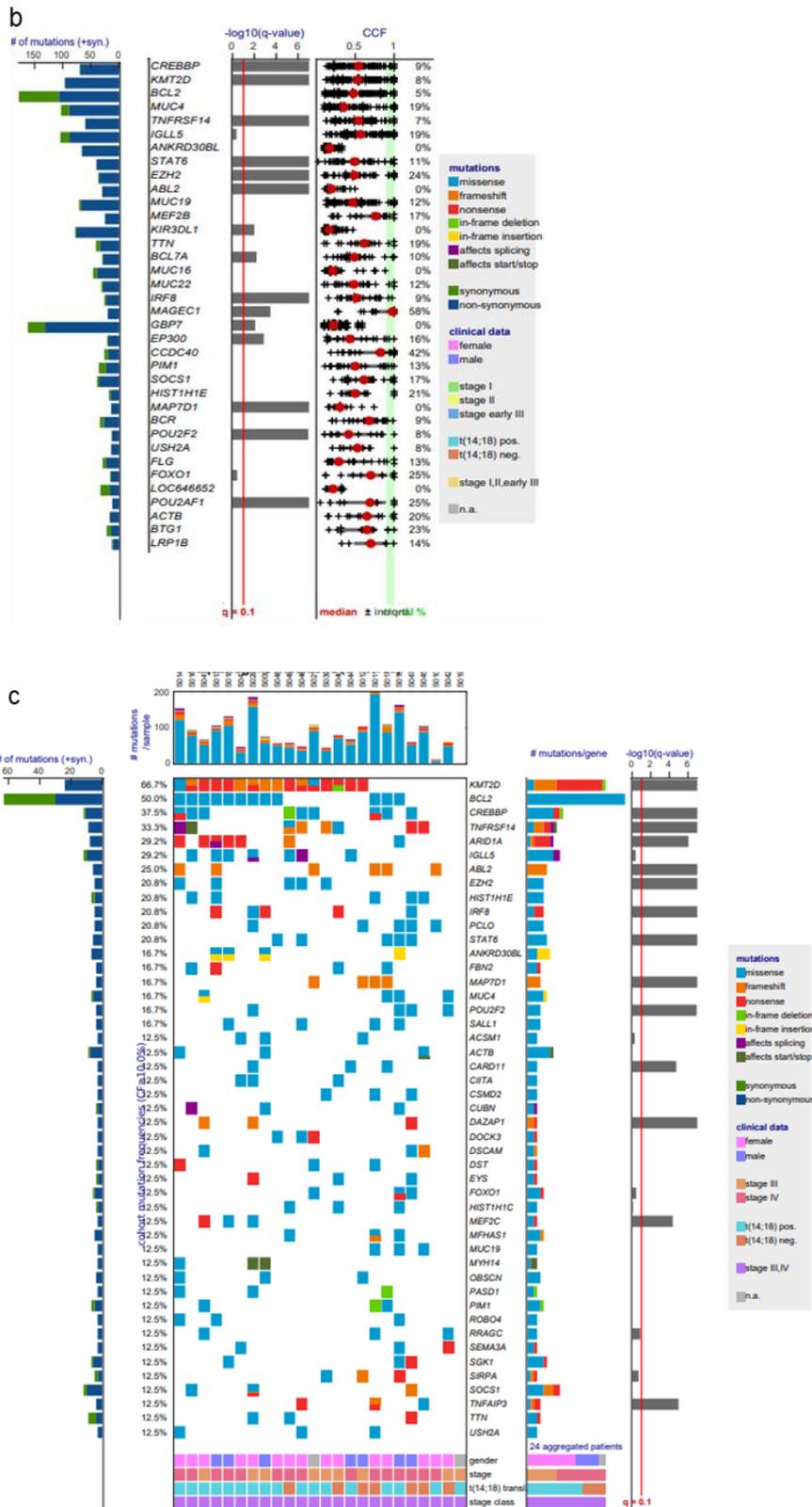


Abbildung 14: a: Somatische Mutationen der IFL. Dargestellt sind die Mutationen pro Fall als farbiges Quadrat. Die farbliche Kodierung entspricht unterschiedlichen Mutationstypen. Die Gene mit entsprechendem Mutationsprofil sind nach absteigender Frequenz aufgelistet. Im unteren Bereich der Grafik sind weiterhin farblich das Geschlecht der Patienten (gender), das klinische Stadium (stage), das Auftreten der t(14;18)-Translokation und die Zugehörigkeit zu den IFL oder sFL (stage class) abgebildet. b: Des Weiteren sind die logarithmierten q-Wert der Mutation und die *Cancer Cell Fraction* (CCF) für die IFL abgebildet. Links ist die Verteilung der synonymen und nicht-synonymen Mutationen, sowie rechts die Farbcodierung zu erkennen. c: Somatische Mutationen der sFL⁹⁹.

Die sFL wiesen ein dem IFL ähnliches Mutationsmuster auf. Hierbei waren die häufigsten Mutationen in *KMT2D* (66,7%), *BCL2* (50,0%) und *CREBBP* (37,5%) zu finden. Außerdem waren die Gene *TNFRSF14* (33,3%), *ARID1A* und *IGLL5* (je 29,2%) sowie *ABL2* (25,0%) von zahlreichen Mutationen betroffen. 20,8% der sFL zeigten Mutationen in *EZH2*, *HIST1H1E*, *IRF8*, *PCLO* oder *STAT6* und 16,7% der sFL waren von Mutationen in *ANKRD30BL*, *FBN2*, *MAP7D1*, *MUC4*, *POU2F2* oder *SALL1* betroffen. Die Gene *ACSM1*, *ACTB*, *CARD11*, *CIITA*, *CSMD2*, *CUBN*, *DAZAP1*, *DOCK3*, *DSCAM*, *DST*, *EYS*, *FOXO1*, *HIST1H1C*, *MEF2C*, *MFHAS1*, *MUC19*, *MYH14*, *OBSCN*, *PASD1*, *PIM1*, *ROBO4*, *PRAGC*, *SEMA3A*, *SGK1*, *SIRPA*, *SOCS1*, *TNFAIP3*, *TTN* und *USH2A* waren in 12,5% der Fälle mutiert.

In IFL wurden am häufigsten Mutationen in *CMG* identifiziert. Zudem waren die Gene *BCL2* und *TNFRSF14* in hoher Frequenz mutiert. Diese Ergebnisse entsprechen bisher bekannten Daten im sFL.

3.2.4. Vergleichende Analyse von CNA- und Mutationsprofilen in IFL und sFL

Mit Hilfe von ChAS wurden 1.468 CNA in IFL und 1.252 CNA in sFL identifiziert. Bei den IFL wurden 732 Zugewinne, 521 Verluste und 216 CNN-LOHs nachgewiesen. Innerhalb der IFL-Kohorte standen 90 FL im Stadium I und 46 FL im Stadium II zur Verfügung. Die durchschnittliche Anzahl an CNA pro Fall betrug 9,3 für die FL im Stadium I und 11,3 für die FL im Stadium II. Abgesehen von der leicht variierenden Anzahl der CNA pro Fall, gab es kaum Unterschiede zwischen den CNA-Profilen der FL I und FL II. Lediglich die Frequenzen der Aberrationen unterschieden sich geringfügig in wenigen Regionen. Signifikante Unterschiede waren nicht vorhanden (Abb.15).

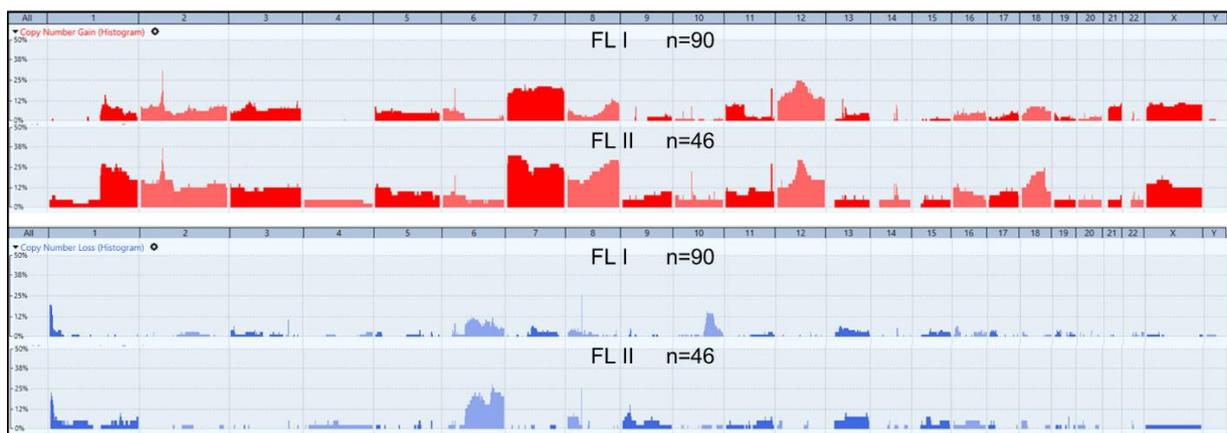


Abbildung 15: MSV-Darstellung der CNA von FL I und FL II. Zugewinne sind rot und Verluste blau dargestellt. Der prozentuale Anteil der Aberrationen entlang der Chromosomen (X-Achse) ist auf der Y-Achse dargestellt.

Bei den sFL traten ebenso am häufigsten Zugewinne auf (572), zudem konnten 449 Verluste und 231 CNN-LOHs detektiert werden. Die durchschnittliche Anzahl an CNA pro Fall lag für die IFL bei 10,0 (0-54) und für die sFL nur geringfügig höher bei 10,3 (1-39).

Wie in *Abbildung 16* dargestellt ist, unterschieden sich die CNA der IFL und sFL in ihrem Aberrationsmuster nicht grundlegend. Es wurden allerdings drei chromosomale Regionen identifiziert, die signifikante Unterschiede in den Frequenzen von IFL und sFL erkennen ließen. Dabei handelte es sich um die Zugewinnregionen in den Chromosom 17q21, 18 und X. IFL wiesen in 6,1% (9/147) und sFL in 18,9% (23/122) der Fälle Zugewinne in 17q21 auf ($q=0,0084$). 14,3% (21/147) der IFL aber 36,1% (44/122) der sFL wiesen einen Zugewinn in Chromosom 18 auf ($q=0,0002967$). Ein signifikanter Unterschied wurde auch im X-Chromosom detektiert. Hier wurden 16,3% (24/147) der IFL und 38,5% (47/122) der sFL mit einem Zugewinn identifiziert ($q=0,000576$).



Abbildung 16: MSV-Darstellung der CNA von IFL und sFL. Zugewinne sind rot und Verluste blau dargestellt. Der prozentuale Anteil der Aberrationen entlang der Chromosomen (X-Achse) ist auf der Y-Achse dargestellt.

3.2.5. Mutationsprofile unterscheiden sich nur marginal in IFL und sFL

Im Rahmen der Mutationsanalysen wurde die mediane Variantenzahl pro Fall und Mb bestimmt und lag bei 1,36 für IFL und 1,53 für sFL. Insgesamt wurden 13.389 nicht-synonyme Mutationen identifiziert, wobei durchschnittlich 80,1 Mutationen pro Fall für IFL und 90,6 für sFL detektiert wurden. Missense-Mutationen lagen mit einer Anzahl von 10.035 am häufigsten vor, gefolgt von Leseraster- (*Frameshift*, 1415) und Nonsense-Mutationen (636). *Abbildung 14* zeigt die beiden Mutationsprofile von IFL und sFL. Ein ähnliches Ergebnis lieferte auch der Vergleich der FL der klinischen Stadien I und II. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede gesehen.

Trotz der überwiegenden Ähnlichkeiten zwischen IFL und sFL gab es einige Unterschiede, die sowohl das Mutationsmuster als auch die Frequenz der Mutationen betrafen. Mutationen in *ARID1A* traten mit Frequenzen von 29,2% (7/24) in den sFL und mit 5,7% (8/140) in den IFL auf und zeigten somit einen signifikanten Unterschied in ihrer Frequenz (*ARID1A*: $q=0,0041$). Auch *KMT2D* war in den sFL mit 66,7% (16/24) deutlich häufiger von Mutationen betroffen als in den IFL (41,4%; 58/140, n.s.). Hingegen wiesen IFL häufiger Mutationen in *MUC4* und *KIR3DL1* auf: *MUC4* trat in 37,1% (52/140) der IFL und in 16,7% (4/24) der sFL auf ($q=0,5519$),

während *KIR3DL1* in 15,0% (21/140) der IFL mutiert war ($q=0,5519$). sFL hingegen wiesen keine *KIR3DL1*-Mutationen auf. (Abb.17).

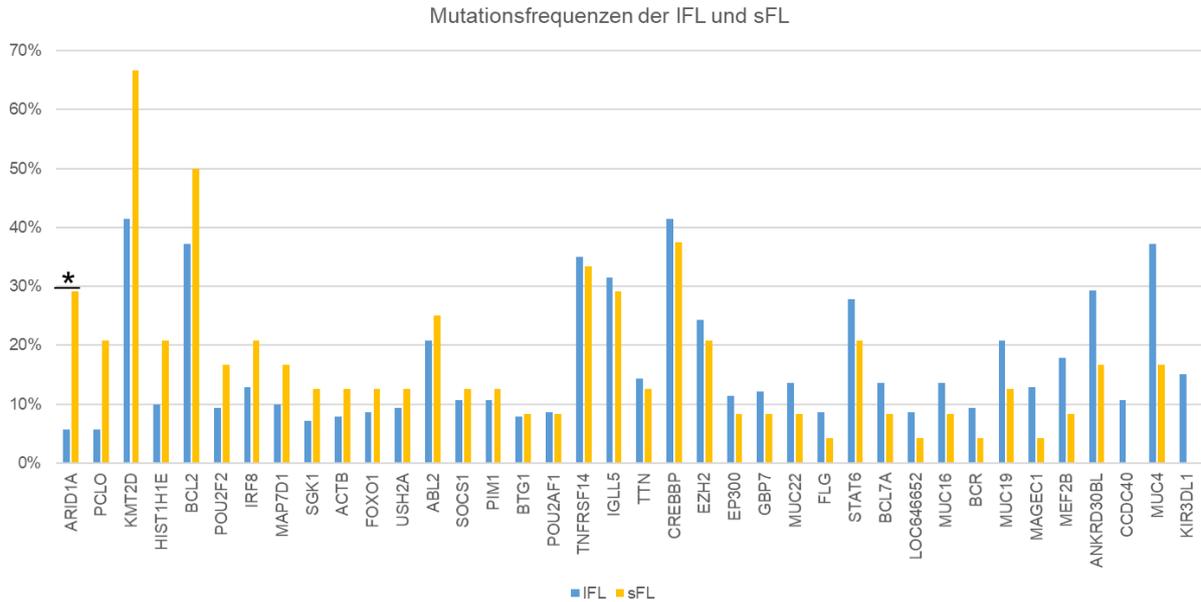


Abbildung 17: Frequenzen der häufigsten Mutationen in IFL (blau) und sFL (gelb). Gene, deren Frequenzen sich in IFL und sFL signifikant unterscheiden, sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Frequenzen unterschied sich auch der Mutationstyp spezifischer Gene zwischen IFL und sFL. Obwohl *CREBBP* und *KMT2D* zu den in IFL und sFL am häufigsten mutierten Genen zählten, waren Spleißstellen-Mutationen in *CREBBP* ($n=11$ vs. $n=0$) und *KMT2D* ($n=7$ vs. $n=0$) ausschließlich in IFL zu finden (Abb.18).

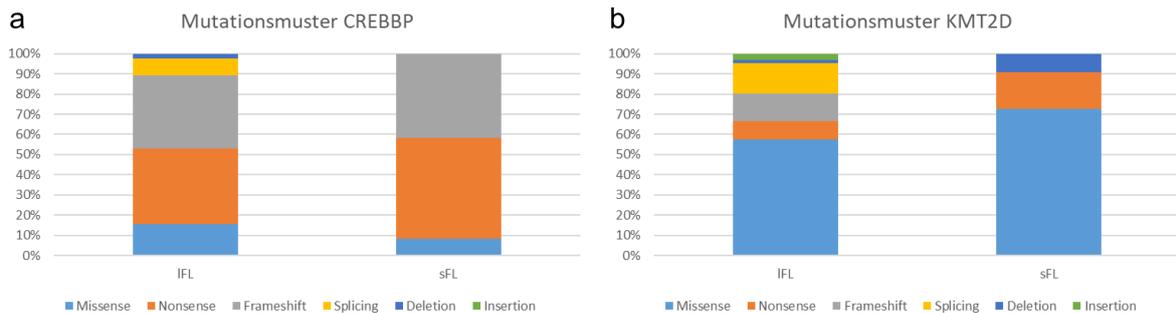


Abbildung 18: IFL und sFL wiesen unterschiedliche Mutationsmuster in den Genen *CREBBP* und *KMT2D* auf. Die Grafik zeigt die relativen Anteile der verschiedenen Mutationsarten. Missense- (hellblau), Nonsense- (orange), Frameshift- (grau), Spleißstellenmutationen (*Splicing*, gelb), Deletionen (dunkelblau) und Insertionen (grün) sind dargestellt.

Der Vergleich der CNA- und Mutationsprofile zeigte nur einige wenige Unterschiede zwischen IFL und sFL. Im Vergleich zu den IFL wurden signifikant häufiger Zugewinne in den Chromosomen 17q21, 18 und X identifiziert. Auch die Anzahl der Mutationen pro Fall lag bei den sFL geringfügig höher als den IFL (80 vs. 91). Mutationen in *ARID1A* traten signifikant häufiger in sFL auf, wohingegen *KIR3DL1* ausschließlich in IFL mutiert war.

3.3. Unterschiede und Gemeinsamkeiten *BCL2*-Translokations-positiver (*BCL2*+) und –negativer (*BCL2*-) IFL

Neben molekularen Unterschieden zwischen den klinischen Stadien wurden bisher vor allem auch Unterschiede zwischen FL mit und ohne charakteristische *BCL2*-Translokation beobachtet^{67,69,105}. Diese tritt signifikant weniger häufig in IFL als in sFL auf⁶⁷. Des Weiteren wurden Mutationen in N-Glykosilierungs-assoziierten Genen häufiger in *BCL2*- FL beobachtet⁶⁹. Um mögliche Unterschiede der *BCL2*+ und *BCL2*- FL auch in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, wurden *BCL2*+ und *BCL2*- FL anhand ihrer CNA- und Mutationsprofile vergleichend analysiert⁹⁹.

3.3.1. Unterschiede auf CNA-Ebene

Für einen Großteil der IFL war der *BCL2*-Translokationsstatus bekannt. Anhand dieser Daten wurden auf Basis der ChAS-Analyse die CNA-Profile von *BCL2*+ (n=66) und *BCL2*- IFL (n=68) verglichen. *Abbildung 19* zeigt die Frequenzen der CNA für *BCL2*+ und *BCL2*- IFL. Sowohl bei den Zugewinnen als auch bei den Verlusten konnten sehr ähnliche Aberrationsmuster bei *BCL2*+ und *BCL2*- IFL identifiziert werden; die Frequenzen einzelner Aberrationen wiesen jedoch Unterschiede von >10% auf. Zugewinne in 1q31.1-q31.2 (188.600.000-194.750.000) wurden in 19,1% (13/68) der *BCL2*- und in 7,6% (5/66) der *BCL2*+ IFL detektiert (n.s.). In 2p16.1 (60.850.000-61.000.000) zeigten 23,5% (16/68) der *BCL2*- und 34,8% (23/66) der *BCL2*+ IFL Zugewinne (n.s.).



Abbildung 19: MSV-Darstellung der CNA von *BCL2*+ und *BCL2*- IFL. Die Frequenz der Zugewinne ist in rot und die der Verluste in blau abgebildet. Die Frequenz wird auf der y-Achse gezeigt und die x-Achse zeigt die Chromosomen.

Mit einem Anteil von 11,8% (8/68) zeigten *BCL2*- IFL eine niedrigere Frequenz an Zugewinnen in 6p21.32 (32.575.000-33.150.000) als *BCL2*+ IFL mit 24,2% (16/66; n.s.). 32,4% (22/68) der *BCL2*- IFL wiesen Zugewinne in 12q14.1-q15 (57.900.000-68.750.000) auf. 18,2% (12/66) der *BCL2*+ IFL zeigten ebenfalls Zugewinne in dieser Region (n.s.). Auch das Profil der chromosomalen Verluste wies drei Regionen auf, welche sich in ihrer CNA-Frequenz um mehr als 10% unterschieden. Verluste in 1p36.33-p36.32 (1-5.220.442) konnten in 10,3% (7/68) der

BCL2- IFL und in 21,2% (14/66) der *BCL2*+ IFL identifiziert werden (n.s.). Weitere Unterschiede wurden in 6q23.1-q24.3 (130.556.653-143.184.372) (*BCL2*- 5/68, 7,4% vs. *BCL2*+ 13/66, 19,7%; n.s.) und in 10q23.1-q24.2 (84.245.703-98.321.112) (*BCL2*- 4/68, 5,9% vs. *BCL2*+ 11/66, 16,7%; n.s.) nachgewiesen, wobei die Verluste in *BCL2*- IFL jeweils in geringerer Frequenz auftraten. *Tabelle 25* fasst die unterschiedlichen Frequenzen der aberranten Regionen für *BCL2*+ und *BCL2*- IFL zusammen.

Tabelle 25: Frequenzunterschiede der CNA in *BCL2*- und *BCL2*+ IFL

	<i>BCL2</i> -	<i>BCL2</i> +
Zugewinne		
1q31.1-q31.3	19,1%	7,6%
2p16.1	23,5%	34,8%
6p21.32	11,8%	24,2%
12q14.1-q15	32,4%	18,2%
Verluste		
1p36.33-p36.32	10,3%	21,2%
6q23.1-q24.3	7,4%	19,7%
10q23.1-q24.2	5,9%	16,7%

3.3.2. Unterschiede auf Mutationsebene

Neben geringfügig differentiellen CNA-Profilen wurden auf Mutationsebene größere Unterschiede identifiziert. Diese bezogen sich insbesondere auf die Mutationsfrequenzen zwischen *BCL2*+ und *BCL2*- FL. *STAT6*-Mutationen wurden in 13,4% (9/67) der *BCL2*+ und in 39,7% (29/73) der *BCL2*- FL identifiziert ($q=0,0095$). Die *BCL2*+ FL hingegen wiesen signifikant höhere Mutations-Frequenzen in *BCL2*, *KMT2D*, *ABL2*, *IGLL5* und *ARID1A* auf. *BCL2*-Mutationen konnten in 65,7% (44/67) der *BCL2*+ aber nur in 16,4% (12/73) der *BCL2*- FL nachgewiesen werden ($q=1.2E-07$). 62,7% (42/67) *BCL2*+ FL zeigten Mutationen in *KMT2D*, wohingegen *BCL2*- FL in 31,5% (23/73) der Fälle Mutationen aufwiesen ($q=0,0011$). *BCL2*+ FL waren in 31,3% (21/67) in *ABL2* mutiert ($q=0,0084$) und *BCL2*- in 9,6% (7/73). *IGLL5* war in 43,3% (29/67) der *BCL2*+ und in 19,2% (14/73) der *BCL2*- FL mutiert ($q=0,0084$). Zudem zeigten 16,4% (11/67) der *BCL2*+ und 4,1% (3/73) der *BCL2*- Fälle Mutationen in *ARID1A* ($q=0,0584$). Die Frequenzen der unterschiedlichen Mutationen für *BCL2*+ und *BCL2*- FL sind in *Abbildung 20* dargestellt.

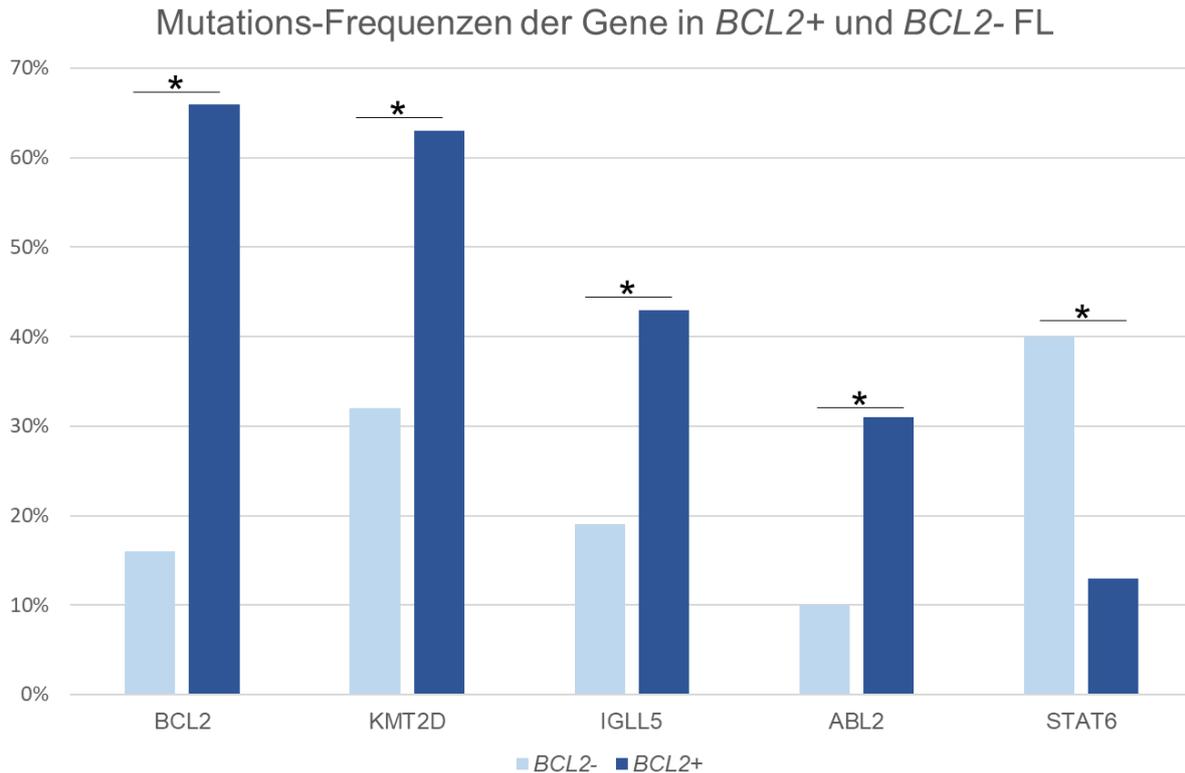


Abbildung 20: Frequenzen der Mutationen der *BCL2*+ (dunkelblau) und *BCL2*- FL. Signifikant unterschiedliche Frequenzen zwischen den *BCL2*+ und *BCL2*- FL sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Bei einer Betrachtung der unterschiedlichen Profile zwischen *BCL2*-mutierten (*BCL2*-MUT) und *BCL2*-Wildtyp (*BCL2*-WT) Fällen innerhalb der *BCL2*- FL traten Mutationen in *STAT6* ausschließlich in *BCL2*-WT Fällen auf (47,5%; 29/61; $q=0,044$). Signifikant häufigere Mutationen in *BCL2*-MUT FL wurden hingegen in *BCL7A* detektiert. 50% (6/12) der *BCL2*-MUT aber nur 3,3% (2/61) der *BCL2*-WT FL zeigten diese Mutationen ($q=2,3E-05$).

Mit der Auswertung der CNA- und Mutationsdaten konnte erstmals eine umfangreiche vergleichende Analyse von IFL und sFL, sowie von *BCL2*+ und *BCL2*- IFL durchgeführt werden. Ein Vergleich der Stadien I und II lieferte weder im Bereich der CNA noch der somatischen Mutationen signifikante Unterschiede. Unterschiede hingegen zeigten sich beim Vergleich der IFL und sFL, sowohl im Rahmen der CNA-Analysen, als auch der WES. Signifikant häufiger wurden Zugewinne der Chromosomen 17, 18 und X im sFL detektiert. Hierbei wurde keine deutliche Häufung an *BCL2*+ oder *BCL2*- FL in den verschiedenen Loci beobachtet. Ebenfalls traten *ARID1A*-Mutationen in Patienten mit sFL signifikant häufiger als in Patienten mit IFL auf. Ein weiterer Unterschied wurde im Mutationsmuster der CMG *CREBBP* und *KMT2D* detektiert. Hierbei waren Spleißstellenmutationen beider Gene ausschließlich im IFL nachweisbar. *BCL2*+ und *BCL2*- FL wiesen wiederum keine signifikant unterschiedlichen CNA-Profile auf, zeigten aber signifikante Unterschiede beim Auftreten spezifischer somatischer Mutationen. *STAT6* war signifikant häufiger in *BCL2*- FL mutiert,

Mutationen in *BCL2*, *KMT2D*, *ABL2* und *IGLL5* waren hingegen signifikant häufiger in *BCL2*+ FL nachweisbar⁹⁹.

3.4. Validierung der neu identifizierten CNA mittels FISH ist der qPCR-vermittelten Verifizierung überlegen

Für die Validierung der am häufigsten und als signifikant identifizierten CNA auf DNA-Ebene wurden FISH und qPCR an verschiedenen FL durchgeführt. Sowohl bei den Gewebeschnitten für die FISH, als auch bei den DNAs für die qPCR war der Tumorzellgehalt (TZG) der FL-Proben unbekannt, ein hoher Anteil an normalen Zellen in einer Probe kann jedoch das Ergebnis maßgeblich beeinflussen^{97,106}. Dies ist insbesondere bei einem heterogenen Tumor wie dem FL zu berücksichtigen^{7,14}. Um zu ermitteln welche der beiden Methoden zur Detektion von genspezifischen CNA besser geeignet ist, wurden von Zelllinien mit bekannten zugrundeliegenden CNA Verdünnungen mit unterschiedlichem TZG hergestellt. Die Zellen dieser Verdünnungen wurden einerseits Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet um Material für die FISH zu gewinnen, andererseits wurde aus den Zellen DNA für die anschließende qPCR gewonnen. Die Erstellung der CNA-Profile beider verwendeten ZL erfolgte zuvor mittels OncoScan CNV Assay. In der OciLy10-ZL konnte ein Zugewinn in 2p16.1 (*BCL11A*) nachgewiesen werden, während die RL-ZL für diesen Locus eine normale Kopienzahl (CN=2) aufwies. Umgekehrt zeigten die RL-Zellen einen 11q24.3-Zugewinn (*ETS-1*) und dienten für diesen Locus als Positivkontrolle, während der Zugewinn bei der OciLy10-ZL nicht detektiert wurde. Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels delta-delta-Ct-Wert-Bestimmung. Hierbei wurde zunächst die Normierung der Rohdaten am Referenzgen *TMEM2* durchgeführt, bevor die Relativierung an tumorfreiem rLK erfolgte. In *Abbildung 21* sind die Ergebnisse der qPCR für die verschiedenen zusammengesetzten Proben der ZL dargestellt. Zu sehen ist die Ratio der Zielgene im Vergleich zum Referenzgen und der tumorfreien Kontrolle. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

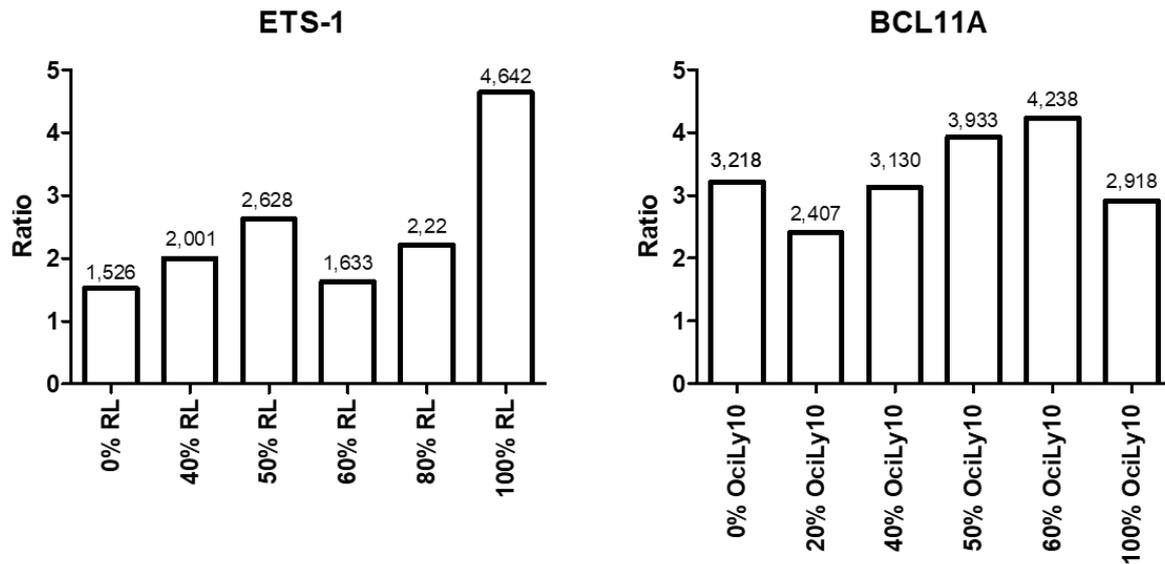


Abbildung 21: Relative Quantifizierung der Kopienzahl von *ETS-1* und *BCL11A* in den B-Zell-Lymphom-ZL RL und OciLy10 mittels qPCR.

Sowohl bei der RL-ZL, welche den *ETS-1*-Zugewinn trägt, als auch bei der OciLy10-ZL mit *BCL11A*-Zugewinn war eine erhöhte Ratio (Zielgen/Kontrollgen) zu sehen. Für die RL-ZL mit Zugewinn in *ETS-1* wurde bei einer 100%-igen RL-Probe der größte Wert (*ETS-1:TMEM2*=4,642) detektiert. Der niedrigste Wert für *ETS-1:TMEM2* lag mit 1,562 bei der Probe ohne RL-Anteil und erhöhte sich zunächst mit steigendem RL-Anteil (2,001 bei 40% RL und 2,682 bei 50% RL), fiel bei 60% RL-Anteil aber zunächst wieder auf 1,633 ab. Zellen mit 80%-igem RL-Gehalt wiesen einen Wert von 2,22 auf. Während also ein *ETS-1* Zugewinn in 100%-igem RL-Anteil gut nachweisbar war, konnte eine proportionale Abnahme der Ratio bei abnehmendem Anteil an RL-Zellen nicht erkannt werden.

Für die OciLy10-ZL mit *BCL11A*-Zugewinn wurde bei einem Anteil an 20%-60% OciLy10-Zellen steigende *BCL11A:TMEM2*-Ratios (20%=2,407; 40%=3,130; 50%=3,933; 60%=4,238) berechnet. Für die Probe ohne OciLy10-Anteil lag der Wert bei 3,218 und für die Probe mit 100%-igem OciLy10-Gehalt bei 2,918. Ein Zugewinn des *BCL11A*-Gens konnte in der Kontrollprobe mit 100% OciLy10-Zellen nicht gezeigt werden. Entsprechend ermöglichten auch die unterschiedlich verdünnten Zelllinien keine Rückschlüsse auf einen *BCL11A*-Zugewinn.

Mittels Schmelzkurvenanalyse wurde zusätzlich die Spezifität der generierten Oligonukleotide analysiert. *Abbildung 22* zeigt die Schmelzkurven der *BCL11A*- und *ETS1*-Amplifikationen. Die Schmelzkurve für *BCL11A* zeigt eine deutliche Spezifität der Oligonukleotide (Abb.22a). Auch bei der Schmelzkurve von *ETS-1* ist eine spezifische Amplifikation erkennbar, sie zeigt jedoch auch eine unspezifische Produktbildung bei niedrigeren Temperaturen (Abb.22b).

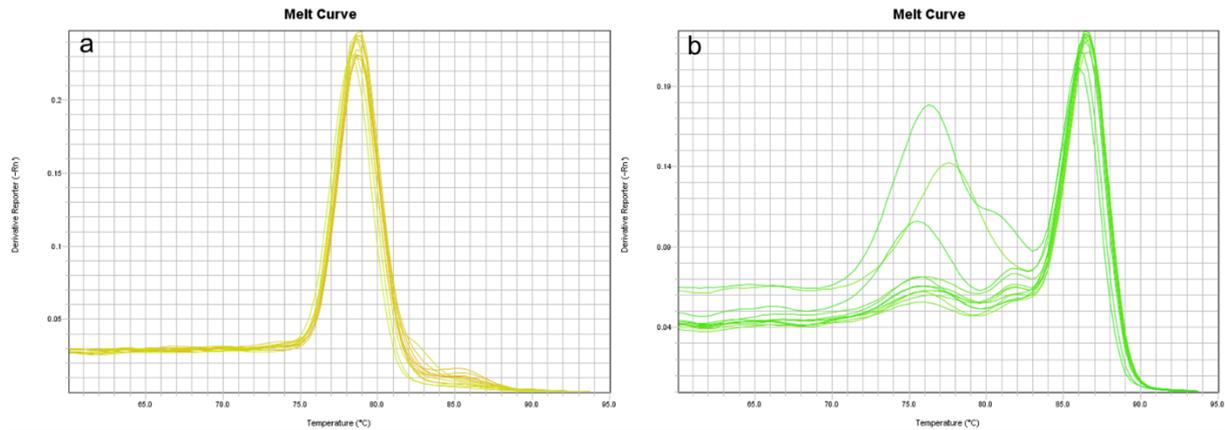


Abbildung 22: Schmelzkurven der Amplifikation von *BCL11A* (a) und *ETS-1* (b). Die logarithmierte Fluoreszenz (Y-Achse) ist in Abhängigkeit der Temperatur (X-Achse) dargestellt.

Von den kombinierten Zellblöcken, welche für die qPCR verwendet wurden, wurden zusätzlich Gewebeschnitte für eine FISH hergestellt. Die Hybridisierung erfolgte mit fluoreszierenden Sonden, die spezifisch für *ETS-1* (11q24.3, SO-markiert) und *BCL11A* (2p16.1, SG-markiert) waren. Eine Signalkonstellation von jeweils zwei roten (*ETS-1*-SO) bzw. zwei grünen (*BCL11A*-SG) Signalen pro Nukleus ließ auf eine Kopienzahl von CN=2 schließen. Bei mehr als zwei roten bzw. grünen Signalen pro Nukleus wurden mehr als zwei Kopien des jeweiligen Gens detektiert. *Abbildung 24c* zeigt die Aufnahme eines Gewebeschnitts mit 80%-igem Anteil an OciLy10-Zellen (*BCL11A*-Zugewinn). Zellen mit mehr als zwei grünen Signalen (>2n) wiesen einen Zugewinn von *BCL11A* auf (weiße Pfeile). Zellen mit mehr als zwei roten Signalen (*ETS-1*) waren hier nicht zu sehen.

Für die Auswertung der FISH wurden die Signalkonstellationen von 100 Zellen pro ZL-Kombination analysiert. Für beide ZL waren die meisten Zugewinne im Gewebeschnitt mit jeweils 100%-igem Anteil zu sehen. Für die RL-ZL waren im Gewebeschnitt mit 100%-igem RL-Gehalt in 74% der Zellen mehr als zwei rote Signale (>2n, *ETS1*-Zugewinn) erkennbar. Bei einem Anteil von 50% RL-Zellen und 50% OciLy10-Zellen (ohne *ETS-1*-Zugewinn) konnten in 62% der Zellen mehr als zwei rote Signale detektiert werden. Bei 0%-igem RL-Anteil und damit 100% OciLy10-Zellen (*BCL11A*-SG) waren keine Zellen mit mehr als zwei roten Signalen zu erkennen (*Abb.23*). Für die OciLy10-ZL waren bei 100%-igem Gehalt in 67% der Zellen eine Konstellation von mehr als zwei grünen Signalen (*BCL11A*-Zugewinn) zu erkennen. Keine Zellen mit mehr als zwei grünen Signalen waren bei einem 0%-igem OciLy10-Anteil zu sehen (*Abb.23*).

Im Gegensatz zur qPCR konnte also mittels FISH in unverdünnten ZL-Proben der entsprechende Zugewinn von *ETS-1* oder *BCL11A* valide nachgewiesen werden. Mit abnehmendem Anteil der ZL mit entsprechender Aberration in den Zellblöcken, konnte jeweils eine geringere Frequenz an Zugewinn-Signalen detektiert werden.

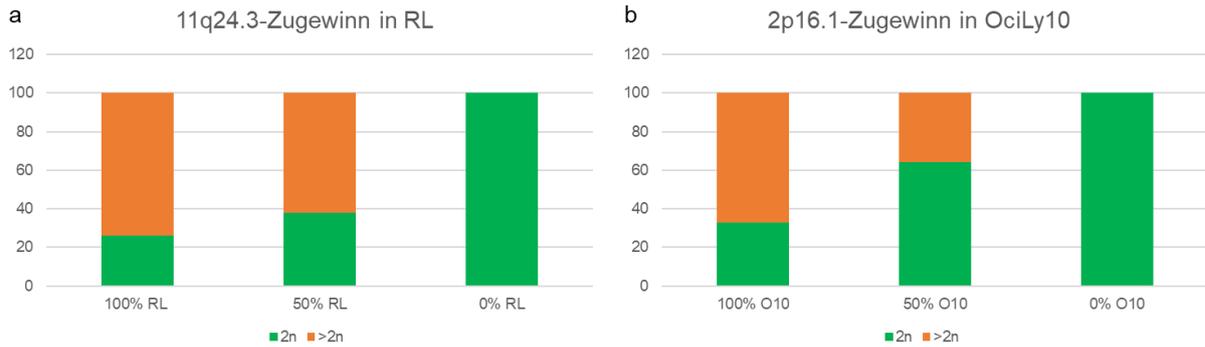


Abbildung 23: Zellblöcke mit verschiedenen Anteilen an RL- (*ETS1*-Zugewinn) und OciLy10-Zellen (*BCL11A*-Zugewinn) wurden hybridisiert und ihre Signalkonstellation untersucht. a: Die RL-ZL wurde in drei verschiedenen prozentualen Anteilen hybridisiert. 100% RL-Zellen, die Kombination aus 50% RL- und 50% OciLy10-Zellen und 0% RL (100% OciLy10). Der Anteil an gezählten Zellen, welcher mehr als zwei rote Signale aufwies, ist in orange dargestellt, der Anteil mit nur zwei Signalen in grün. b: Die OciLy10-ZL wurde in drei verschiedenen prozentualen Anteilen hybridisiert. 100% OciLy10-Zellen, die Kombination aus 50% OciLy10- und 50% RL-Zellen und 0% OciLy10 (100% RL). Der Anteil an gezählten Zellen, welcher mehr als zwei grüne Signale aufwies, ist in orange dargestellt, der Anteil mit nur zwei Signalen in grün.

Da die FISH deutlich aussagekräftigere Ergebnisse lieferte, wurde für die weiteren Validierungen der Zugewinne und Verluste ausschließlich die FISH durchgeführt. Für die Validierung wurden acht bis zwölf Fälle pro Locus (1q23.1-Zugewinn, 2p16.1-Zugewinn, 7p12.2-Zugewinn und 8p11.22-Deletion) ausgewertet. Hierbei wurde ausgehend von den OncoScan CNA-Daten ein Teil der Fälle mit Aberration und der andere Teil ohne Aberration ausgewählt. Als Referenz wurden die Daten aus der ChAS-Auswertung verwendet. **Abbildung 24a** zeigt die Auswertung der FISH für die genannten Regionen. Für die Region 1q23.1 wurde in drei von vier Fällen der Zugewinn mittels FISH bestätigt und sechs von sechs Fälle ohne Zugewinn als solche identifiziert. Dies ergab eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 100% (Abb.24b). Neun von zehn Fällen mit Zugewinn der Region 2p16.1 wurden mit Hilfe der FISH erfolgreich validiert. Die zwei mittels FISH analysierten Fälle ohne 2p16.1-Zugewinn konnten ebenfalls bestätigt werden. Daraus resultierte eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 100%. In der Region 7p12.2 wurden Zugewinne in zwei von drei Fällen durch die FISH bestätigt. Alle fünf Fälle ohne Zugewinne in 7p12.2 wurden mittels FISH ohne Zugewinn bestätigt. Die Sensitivität lag für diese Region bei 75% und die Spezifität bei 100%. Für die Verlust-Region 8p11.22 konnten sowohl alle Fälle mit Zugewinn, als auch alle Fälle ohne Zugewinn (jeweils vier) mittels FISH bestätigt werden. Die Region 11q24.3 zeigte eine Sensitivität von 90%, da neun von zehn Zugewinne mittels FISH bestätigt werden konnten. Die Spezifität lag bei 100%, da alle fünf Fälle ohne Zugewinn auch dementsprechend beurteilt wurden.

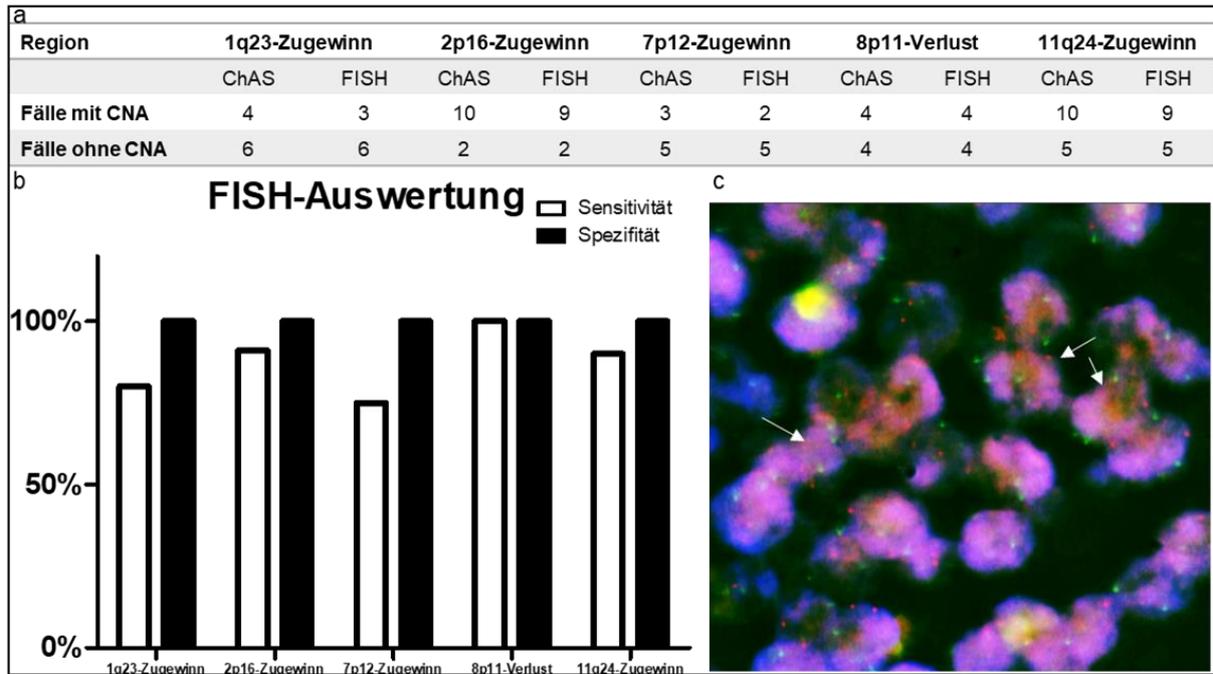


Abbildung 24: a: Ergebnisse der Validierung der CNA ausgewählter Regionen. Für die jeweilige Region wurde die Anzahl der mittels ChAS bzw. FISH analysierten Fälle mit bzw. ohne Aberration dargestellt. b: Darstellung der Sensitivität und Spezifität der FISH-Validierung für die Regionen 1q23, 2p16, 7p12, 8p11 und 11q24.3. c: Mikroskopische Aufnahme eines Gewebeschnitts bei 100-facher Vergrößerung. Die Nuklei sind blau gefärbt, rote und grüne Signale zeigen die Anzahl der Kopien des jeweiligen Gens. Rote Signale kennzeichnen das *ETS-1*-Gen und grüne Signale *BCL11A*. Die weißen Pfeile markieren Nuklei, die mehr als zwei grüne Signale aufweisen und daher einen Zugewinn für *BCL11A* abbilden.

Aus bereits publizierten FISH-Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe für zahlreiche FL-Fälle dieser Kohorte konnten ebenfalls Daten zur vergleichenden Analyse der CNA-Ergebnisse herangezogen werden¹⁸. Für die Verlust-Regionen 1p, 6q und 17p13 konnten die Ergebnisse verwendet werden¹⁸. Die Region 1p umfasste hierbei die Loci 1p36.1 und 1p36.2. In 76,3% (58/76) der untersuchten Fälle konnte eine Übereinstimmung zwischen den CNA-Ergebnissen aus ChAS und FISH in 1p gefunden werden. Für die Verlust-Region 6q wurden FISH-Analysen für die Subregionen 6q21, 6q25.1 und 6q25.3 evaluiert. Für die Region 6q konnten 76,3% (58/76) der CNA-Ergebnisse bestätigt werden. Innerhalb der Region 17p wurden die Loci 17p13.1 und 17p13.3 untersucht. Hierbei wurde eine Übereinstimmung der Ergebnisse in 69,6% (51/73) der Fälle detektiert (Abb.25).

Anhand von ZL mit bekanntem CNA-Profil konnte für die Validierung der identifizierten CNA die FISH als deutlich geeignetere Methode im Vergleich zur qPCR ermittelt werden. Die Anwendung der FISH ermöglichte im Anschluss die Validierung von Zugewinnen in 1q23, 2p116, 7p12 und 11q24.3 sowie von Verlusten in 1p, 6q, 8p11 und 17p innerhalb der IFL-Kohorte.

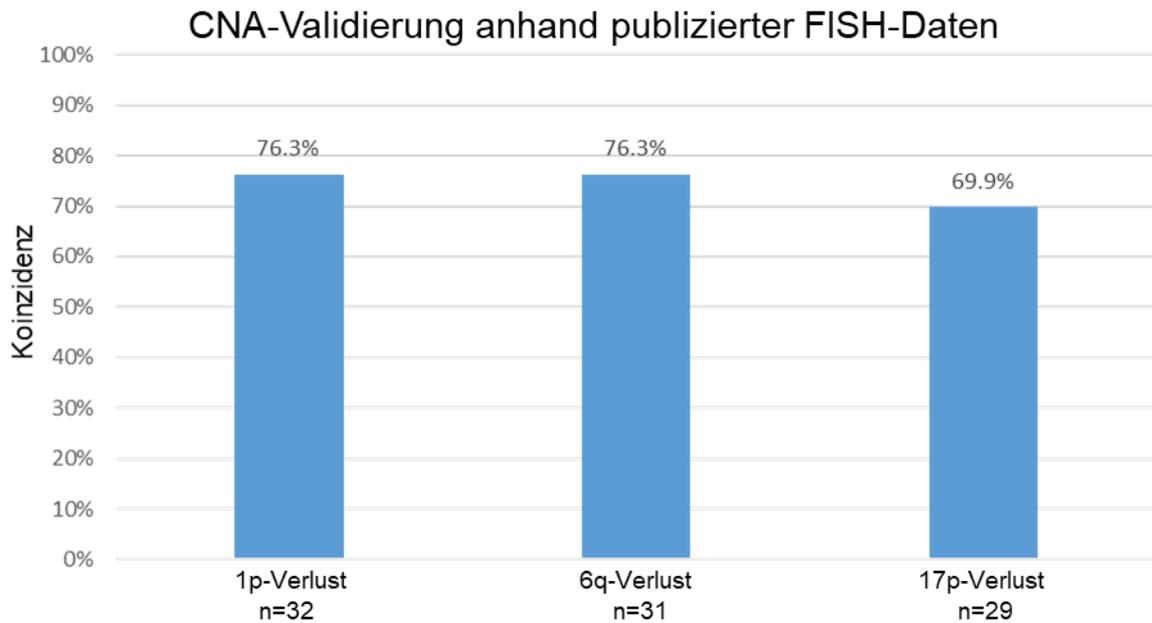


Abbildung 25: Die Validierung der CNA-Ergebnisse erfolgte zusätzlich anhand bereits publizierter FISH-Daten für die Verlust-Regionen 1p, 6q und 17p. Dargestellt ist die Übereinstimmung der CNA-Ergebnisse mit den FISH-Resultaten (Koinzidenz).

3.5. Mittels Sanger-Sequenzierung können nur klonale Mutationen validiert werden

Ausgewählte Mutationen, die im Rahmen der WES nachgewiesen wurden, wurden in einigen betroffenen FL-Proben mittels Sanger-Sequenzierung validiert. Im Rahmen der Sanger-Sequenzierung wurden zum einen für das FL bekannte mutierte Gene (*BCL7A*, *EZH2* und *STAT6*) und zum anderen die neu identifizierten Mutationen in *ABL2* und *KIR3DL1* untersucht. Die Anzahl der überprüften Fälle pro Gen betrug zwischen sieben und zehn. Für *STAT6* wurden insgesamt zehn Fälle auf vorhandene Mutationen in Exon 12 untersucht. Hierbei wurden neun FL-Proben auf die Variante p.D419 (Abb.26a) und ein Fall auf die Variante p.N417 getestet. Alle zehn Mutationen wurden durch die Sanger-Sequenzierung bestätigt. Für das Gen *EZH2* wurde ausschließlich die Variante p.Y641F in Exon 16 untersucht. In 90% (9/10) der Fälle konnte diese mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden (Abb.26b). Die Validierung der *BCL7A*-Mutationen erfolgte an sieben FL-Fällen mit unterschiedlichen Mutationen in Exon 1. In 71,4% (5/7) der Fälle wurden die entsprechenden Mutationen erfolgreich validiert (p.V6A, p.K15*, p.D17G, p.D16E, p.R4Sfs*11, Abb.26c), während bei zwei Fällen die Mutationen (p.D16E, p.M22R) nicht nachgewiesen werden konnten. Acht Fälle wurden für die Validierung der *KIR3DL1*-Mutationen sequenziert, für die jeweils eine bis sechs Varianten (p.N81I, p.S83G, p.T87P, p.N92T, p.T94R, p.P103L) im dritten Exon mittels WES identifiziert wurden. Keine der Mutationen wurde in der Sanger-Sequenzierung wiedergefunden. Die für *ABL2* am häufigsten identifizierte Mutation entsprach der Leseraster-Verschiebung p.S717Gfs*15. Bei neun untersuchten FL konnte in keinem Fall die angegebene

Mutation detektiert werden. Allerdings wurden in Exon 11 unterschiedliche Varianten für p.G742, p.G743 und p.G744 identifiziert (Abb.26d).

Somit konnten die Mutationen in *BCL7A*, *EZH2* und *STAT6* mittels Sanger-Sequenzierung validiert werden, die Mutationen in *KIR3DL1* und *ABL2* hingegen nicht.

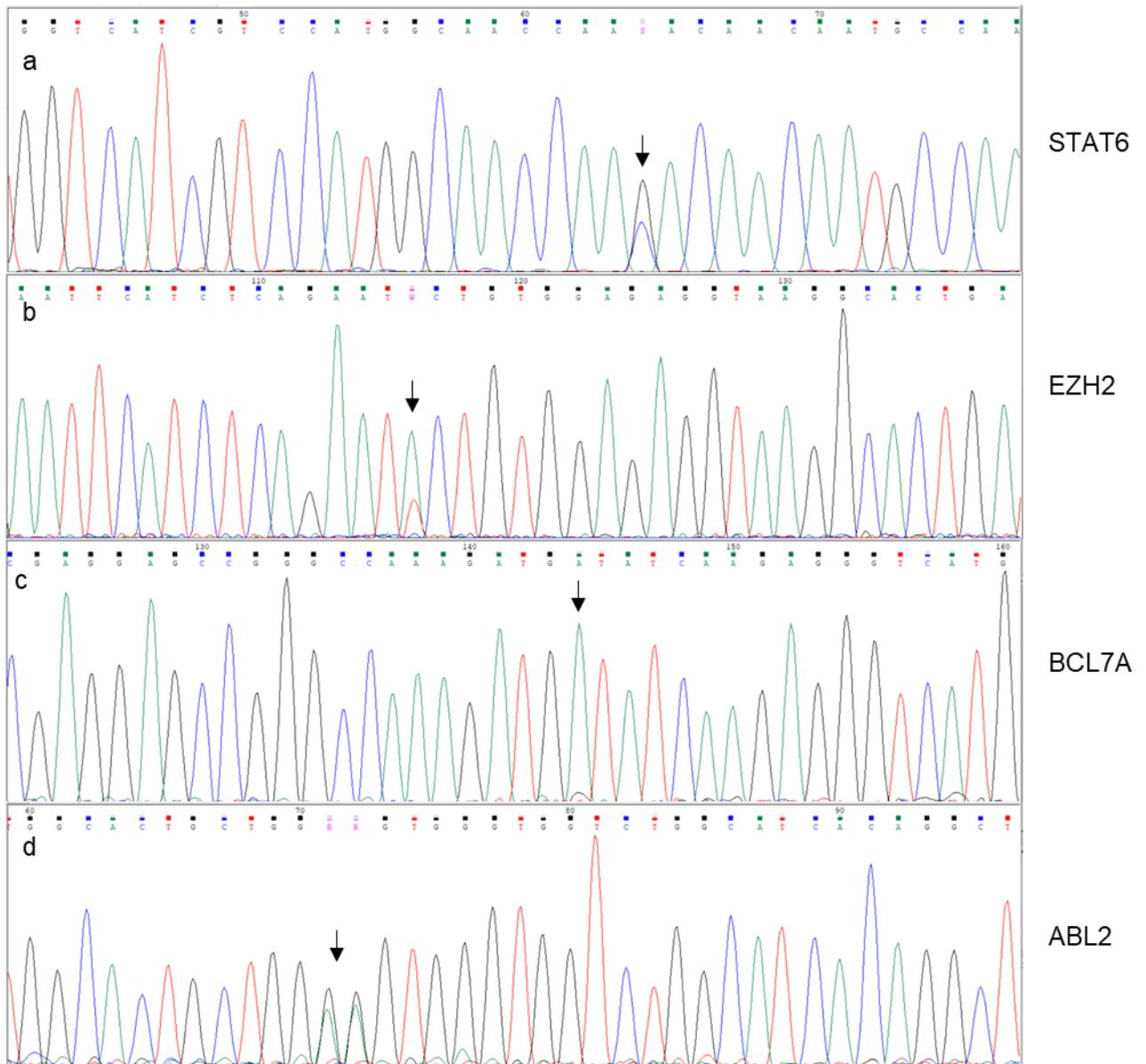


Abbildung 26: Sequenzen der mittels Sanger-Sequenzierung validierten Gene *STAT6*, *EZH2*, *BCL7A* und *ABL2*. Die schwarzen Pfeile weisen jeweils auf die Mutationen der Gene hin a: Die Sequenz zeigt eine Missense-Mutation der Variante p.D419H in Exon 12 des *STAT6*-Gens. b: Dargestellt ist ein Ausschnitt des Exons 16 von *EZH2* mit der Missense-Mutation als Variante p.Y641F. c: Der Ausschnitt einer Sequenz von *BCL7A* zeigt die Missense-Mutation in Exon 1 mit der Variante p.D17G. d: Innerhalb der *ABL2*-Sequenz sind zwei Mutationen zu erkennen, welche die Varianten p.G742G und p-G743S darstellen.

3.6. Die Genexpression identifizierter Kandidatengene korreliert mit dem CNA-Status

Um potentielle Effekte der CNA auf der Genexpressionsebene zu untersuchen, wurde die GE für definierte Zielgene, welche in den häufig bzw. signifikant aberranten Regionen lokalisiert waren, in publizierten FL-Kohorten analysiert. Hierbei konnte auf einen GE-Datensatz eines LLMPP-Projekts⁶⁶ zugegriffen werden. Aus diesem Datensatz wurden Gene für die identifizierten Zugewinn- und Verlustregionen ausgewählt (Tab.26).

Tabelle 26: Zuordnung der Gene zu ihrem Locus und der Art der Aberration, welche im LLMPP-Projekt auf ihre Expression hin untersucht wurden.

Gen	Region	CNA
<i>ETS-1</i>	11q24.3	Zugewinn
<i>BCL11A</i>	2p16.1	Zugewinn
<i>IKZF1</i>	7p12.2	Zugewinn
<i>FCRL5</i>	1q23.1	Zugewinn
<i>TP53</i>	17p13.1	Verlust
<i>SESN1</i>	6q21	Verlust
<i>TNFRSF14</i>	1p36.32	Verlust
<i>ADAM18</i>	8p11.22	Verlust

Die GE selektiver Gene ist nachfolgend abgebildet. Eine erhöhte GE konnte in Genen aus Zugewinn-Regionen nachgewiesen werden: die höchste GE konnte für *ETS-1* detektiert werden. Auch für *BCL11A* und *IKZF1* wurde eine deutlich erhöhte GE beobachtet, während die GE für *FCRL5* nur geringfügig erhöht war. Niedrigere GE wiesen die Gene in den Verlustregionen auf. Hierzu zählten *TP53*, *SESN1* und *TNFRSF14*. Die geringste GE zeigte hierbei *ADAM18* (Abb.27).

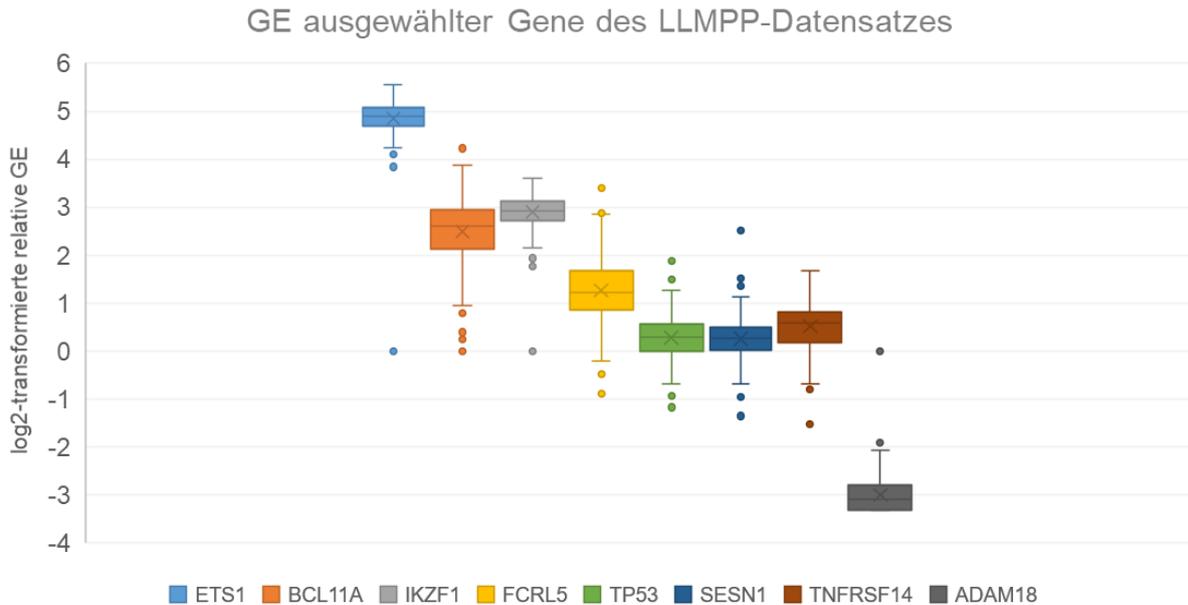


Abbildung 27: Auswertung der GE verschiedener Gene aus rekurrent aberranten Regionen, die im Rahmen des LLMPP-Projekts hinsichtlich ihrer Expression untersucht wurden. Folgende Gene wurden hierbei analysiert: *ETS-1* (hellblau), *BCL11A* (orange), *IKZF1* (grau), *FCRL5* (gelb), *TP53* (grün), *SESN1* (dunkelblau), *TNFRSF14* (braun) und *ADAM18* (dunkelgrau).

Da aus den bereits publizierten Daten jedoch die zugrundeliegende Aberration nicht bekannt war, wurde von ausgewählten IFL der vorliegenden Kohorte (mit und ohne Aberration) eine RT-PCR durchgeführt. *Tabelle 27* zeigt die analysierten Regionen und die inkludierten Gene.

Tabelle 27: Die GE identifizierter Zielgene wurde mittels RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die untersuchten Regionen und die darin liegenden Gene.

Region	Gen	CNA
1q23.1	<i>FCRL5</i>	Zugewinn
2p16.1	<i>BCL11A</i> , <i>REL</i>	Zugewinn
7p12.2	<i>IKZF1</i>	Zugewinn
8p11.22	<i>ADAM32</i>	Verlust
11q24.3	<i>ETS-1</i> , <i>FLI1</i>	Zugewinn

Für die Analyse der GE ausgewählter Gene wurden jeweils Proben von FL mit oder ohne die jeweilige Aberration verglichen. Für die gewonnenen Gene *FCRL5* (1q23.1), *BCL11A* und *REL* (beide 2p16.1) konnte jeweils eine erhöhte GE für Fälle mit Zugewinn beobachtet werden (n.s., Abb.28a-c). Für *IKZF1* wurde eine signifikant erhöhte GE in IFL mit Zugewinn gemessen ($p=0,0307$, Abb.28d). Bei der GE-Analyse der Verlustregion 8p11.22 (*ADAM32*) war in Fällen ohne Verlust eine signifikant höhere GE zu verzeichnen als in Fällen mit Verlust in *ADAM32* ($p=0,0103$, Abb.28e). Auch bei den beiden Genen *ETS-1* und *FLI1*, welche innerhalb der Zugewinn-Region 11q24.3 liegen, konnte für Fälle mit einem jeweiligen Zugewinn eine erhöhte GE im Vergleich zu Fällen ohne solchen Zugewinn detektiert werden (Abb.28f+g).

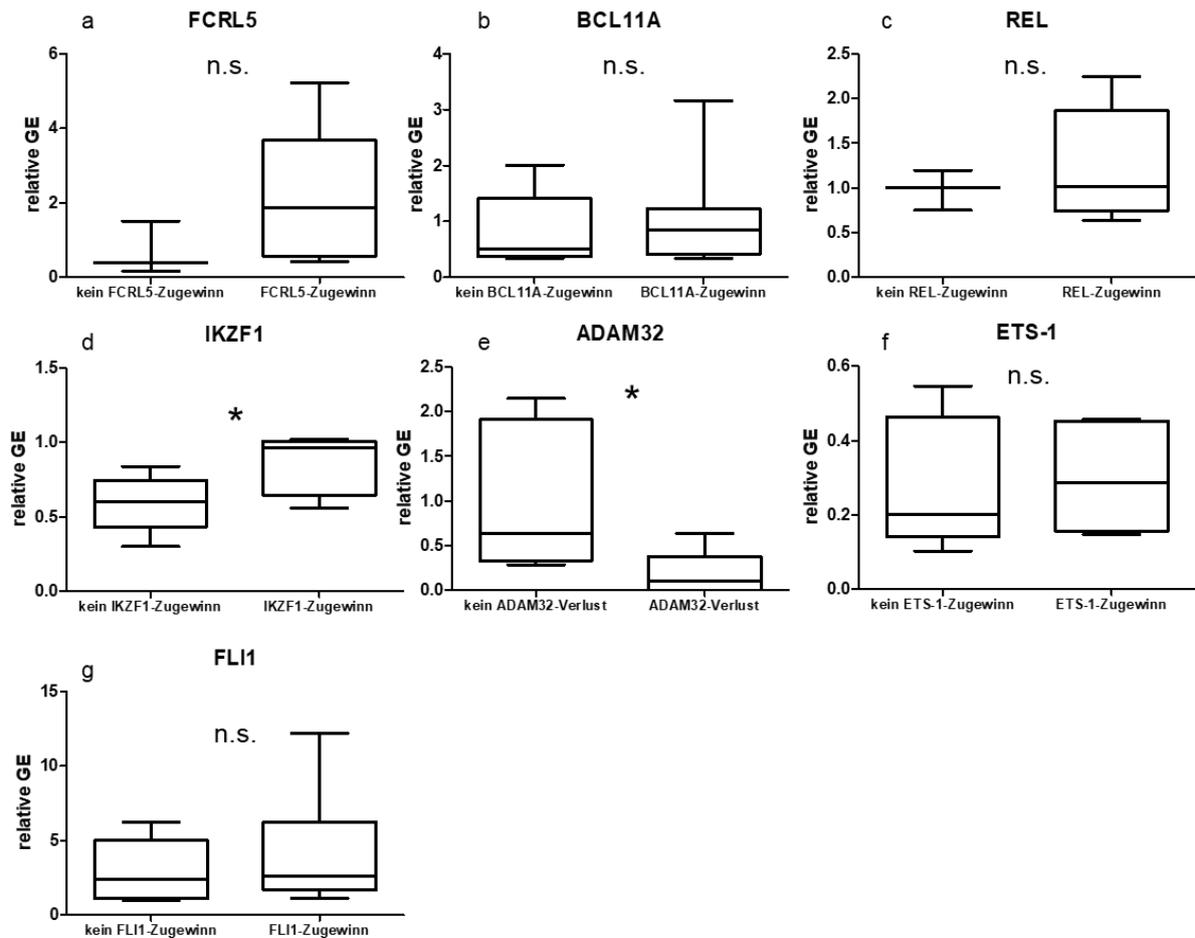


Abbildung 28: GE-Analysen ausgewählter Zielgene in den frequenten und signifikant aberranten Regionen. Die relative GE für Fälle mit und ohne jeweilige Aberration sind abgebildet. a: *FCRL5*. b: *BCL11A* c: *REL* d: *IKZF1* e: *ADAM32* f: *ETS-1* g: *FLI1*.

Insgesamt zeigte sich eine dem CN-Status entsprechende GE, wobei teilweise ein signifikanter Unterschied der GE zwischen Fällen mit und ohne Aberration nachgewiesen werden konnte.

3.7. Neu identifizierte putative Zielgene *IKZF1*, *FCRL5* und *ETS-1* werden auch auf Proteinebene exprimiert

3.7.1. Immunhistochemische Färbungen von FL

Um mögliche Auswirkungen der CNA auch auf Protein-Ebene zu analysieren, wurden IFL-Gewebeschnitte mit spezifischen AK immunhistochemisch gefärbt. Während für *ETS-1* und *FCRL5* mit den getesteten Antikörpern nur unspezifische oder keine Färbungen detektiert werden konnten (Abb.29c+d), zeigten die mit einem *IKZF1*-AK gefärbten FL-Präparate eine spezifische nukleäre Färbung der Tumorzellen (Abb.29b). 53,3% (16/30) der untersuchten FL ohne Zugewinn zeigten keine *IKZF1*-Expression (Abb.29a). Weitere 46,7% (14/30) der FL ohne *IKZF1*-Zugewinn wiesen eine erhöhte Expression von *IKZF1* auf. Bei 85,7% (12/14) der FL mit *IKZF1*-Zugewinn hingegen konnte auch eine erhöhte *IKZF1*-Expression detektiert

werden (Abb.30). Trotz des vorhandenen *IKZF1*-Zugewinns wurde in 14,3% (2/14) der Fälle keine erhöhte Expression von *IKZF1* beobachtet.

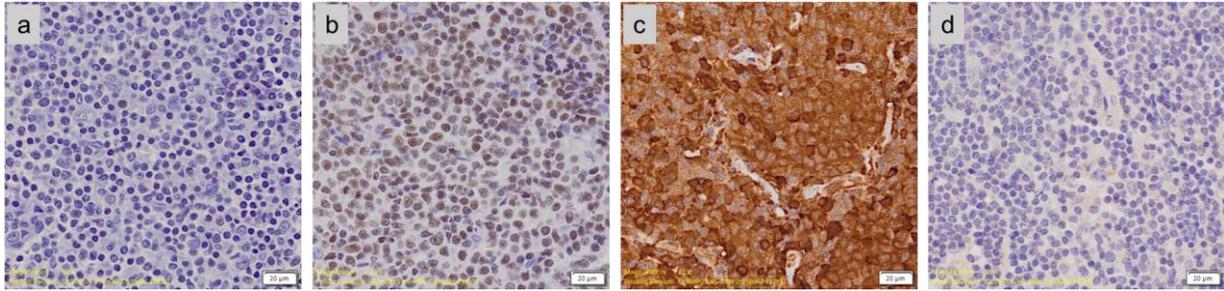


Abbildung 29: IHC-Färbungen von FL oder rLK mit diversen AK in 20-facher Vergrößerung. a: FL ohne *IKZF1*-Zugewinn zeigt keine *IKZF1*-Expression. b: FL mit *IKZF1*-Zugewinn zeigt eine erhöhte Expression von *IKZF1*. c: Unspezifische Färbung eines FL mit einem ETS-1-AK. d: Keine Färbung eines rLK mit einem FCRL5-AK.

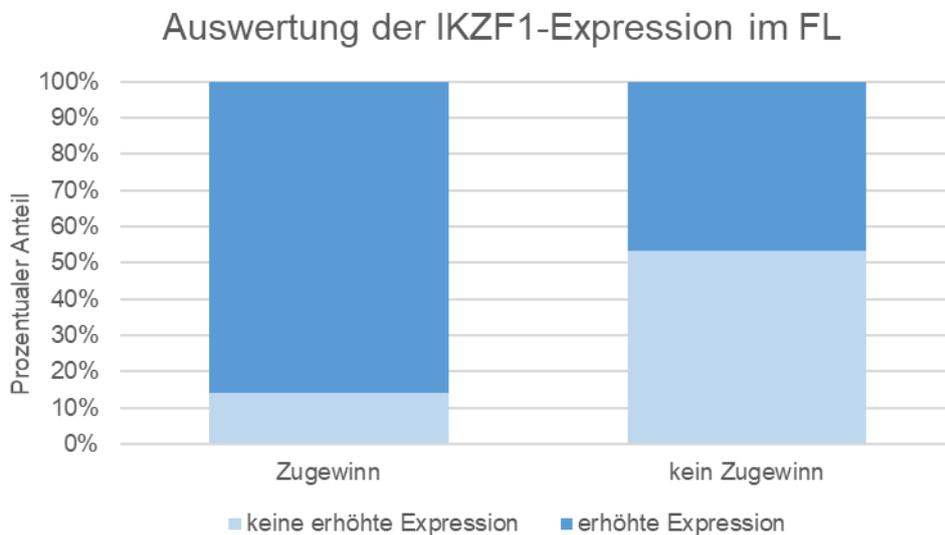


Abbildung 30: Darstellung der verschiedenen Konstellationen der CNA-Ergebnisse und der *IKZF1*-Expression in FL mit und ohne *IKZF1*-Zugewinn. Der prozentuale Anteil an Fällen mit niedriger bzw. ohne Expression ist in hellblau und der Anteil an Fällen mit erhöhter Expression in dunkelblau dargestellt.

3.7.2. Western Blot zur Analyse der Proteinexpression in Zelllinien verschiedener B-Zell-Lymphome

Die Expression von Proteinen einiger Zielgene wurde zudem mittels WB in verschiedenen B-Zell-Lymphom-ZL analysiert. Hierfür wurden sowohl ZL mit Zugewinnen (CN>2) als auch mit normaler Kopienzahl (CN=2) und Verlusten (CN<2) untersucht. Als Referenzgene wurden die konstitutiv exprimierten Gene *α-Tubulin* und *GAPDH* verwendet. Analysiert wurden die Expression der Proteine *IKZF1*, *ETS-1* und *FCRL5*. Für *IKZF1* zeigten die ZL mit Zugewinn OciLy3 (O3) und OciLy10 (O10) eine erhöhte Proteinexpression. Trotz *IKZF1*-Zugewinn zeigten die ZL SUDHL10 (SU10) und SUDHL6 (SU6) keine erhöhte Expression. Die ZL ohne *IKZF1*-Zugewinn (U2932 und Granta519) hingegen wiesen ebenfalls keine erhöhte *IKZF1*-Expression auf. Die Proteinexpression von *ETS-1* war für alle ZL unabhängig von der Kopienzahl gleich und zeigte bei den ZL mit normalem CN-Status die Expression von

Isoformen. Für FCRL5 wurde bei beiden ZL mit Zugewinn eine starke Expression detektiert. Ebenfalls stark wurde FCRL5 bei der ZL OciLy10 exprimiert, die eine normale Kopienzahl zeigte (Abb.31a-c). Die übrigen ZL, die allesamt eine normale Kopienzahl aufwiesen, zeigten eine schwächere FCRL5-Expression. Die relative Expressionsratio der Proteine ist in den *Abbildungen 31d-f* dargestellt.

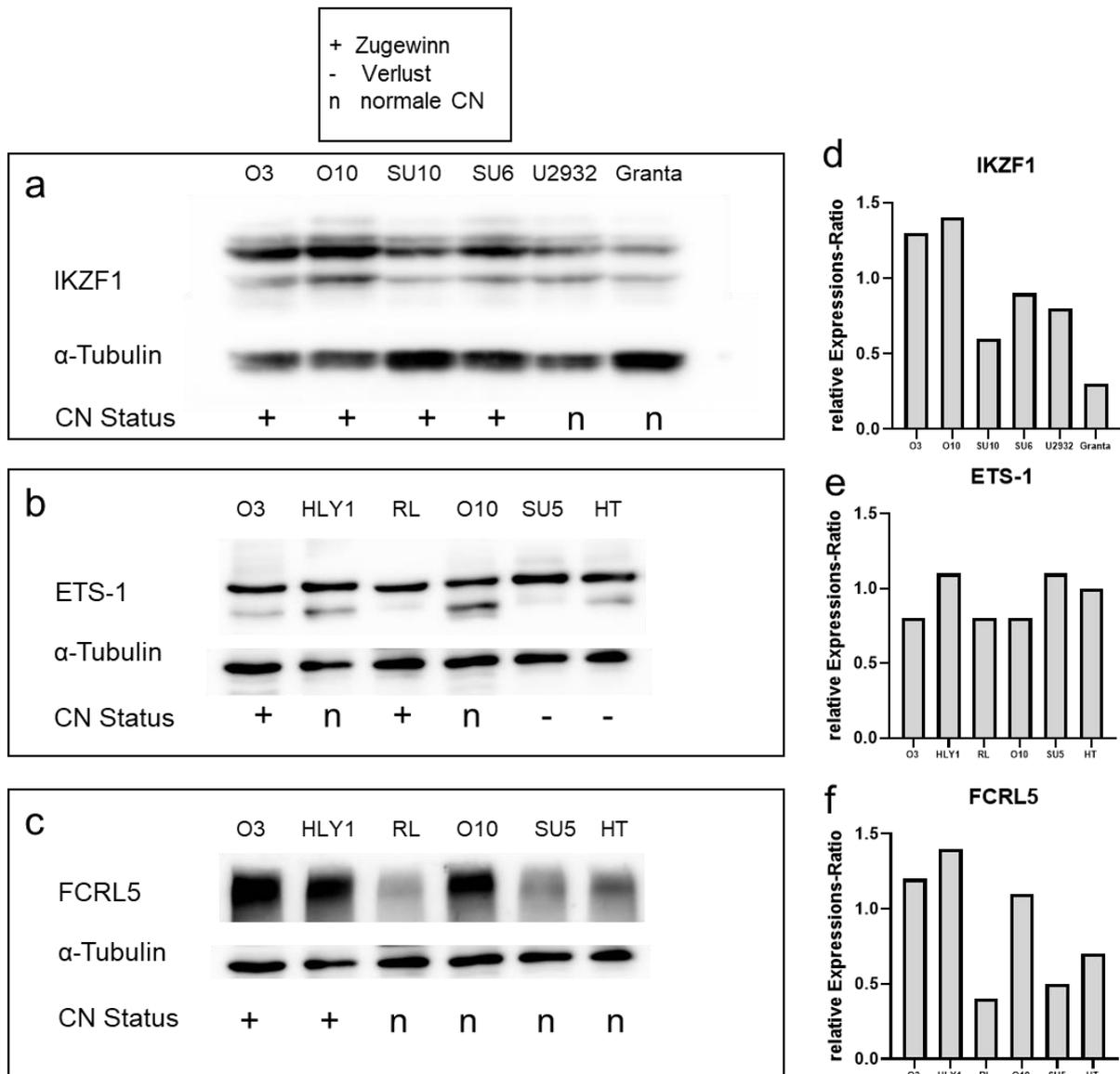


Abbildung 31: Die Proteinexpression der Zielgene *IKZF1*, *ETS-1* und *FCRL5* wurde mittels WB an B-Zell-Lymphom-ZL getestet, die entweder eine normale (n) Kopienzahl, einen Zugewinn (+) oder einen Verlust (-) aufwiesen. Die ZL OciLy 3 (O3), OciLy10 (O10), SUDHL10 (SU10), SUDHL6 (SU6) U2932 und Granta519 (Granta), sowie die ZL HLY1, RL, SUDHL 5 (SU5) und HT wurden analysiert. a: Die Proteinexpression von IKZF und dem konstitutiv exprimierten Gen α -Tubulin sind für ZL mit (+) und ohne (n) *IKZF1*-Zugewinn dargestellt. b: Die Proteinexpression von ETS-1 und α -Tubulin sind für ZL mit und ohne *ETS-1*-Zugewinn, sowie mit *ETS-1*-Verlust (-) dargestellt. c: Die Proteinexpression von FCRL5 und α -Tubulin ist für ZL mit und ohne *FCRL5*-Zugewinn abgebildet. d-f: Darstellung der mittels semi-quantitativer Bestimmung ermittelten relativen Expression des Zielgens zum konstitutiv exprimierten Gen.

Auswertungen der Proteinexpressionsanalysen ergaben überwiegend eine Korrelation zwischen dem identifizierten *IKZF1*-Zugewinn und einer erhöhten Proteinexpression sowohl in

FL als auch in ZL. Kein klares Muster konnte hingegen bei *ETS-1* und *FCRL5* beobachtet werden.

3.8. B-Zell-Lymphom-ZL zeigen ein differentielles Ansprechen auf *IKZF1*- und *ETS1*-Inhibitoren

B-Zell-Lymphom-ZL wurden mit Inhibitoren behandelt, die sich gegen die Kandidatengene aus den signifikant zugewonnen Regionen 11q24.3 (*ETS-1*) und 7p12.2 (*IKZF1*) richten. Die Auswahl dieser Gene lag darin begründet, dass Zugewinne der chromosomalen Region 11q22-q24 in etwa 8-15% diffuser großzelliger B-Zell Lymphome (DLBCL) bereits beschrieben wurden¹⁰³ und *ETS-1* (11q24) bereits als Proto-Onkogen bekannt ist¹⁰⁷. Mit dem *ETS-1*-Inhibitor YK-4-279 existiert zudem eine Substanz, die in präklinischen Studien bereits vielversprechende Daten zur Behandlung von Lymphomen lieferte, v.a. auch in Kombination mit dem BCL2-Inhibitor Venetoclax¹⁰⁸.

Als *IKZF1*-Inhibitor wurde Lenalidomid verwendet¹⁰⁹, das im FL als Therapeutikum eingesetzt wird^{63,110} und dessen Wirkung auf den proteasomalen Abbau von *IKZF1* im Multiplen Myelom (MM) bereits beschrieben wurde¹⁰⁹.

Für den *ETS-1*-Inhibitor YK-4-279 wurden die Konzentrationen 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM und 5 µM eingesetzt. Die Inkubationszeit der Zellen betrug 24, 48 oder 72 Stunden. Die ZL RL wies einen Zugewinn in *ETS-1* auf. Im Vergleich zum Kontrollwert ohne Inhibitor war bei jeder Inhibitorkonzentration ein Rückgang der viablen Zellen zu beobachten. Am stärksten zeigte sich dieser Effekt nach 72h Inkubationszeit. Hier zeigte sich bei einer Konzentration von 5 µM YK-4-279 noch 28,2% Zellviabilität, während nach 24h und 48h Inkubation noch 74,1% bzw. 63,8% der Zellen lebten (Abb.32a). Die SUDHL10-Zellen zeigten eine normale Kopienzahl für *ETS-1* (CN=2) in der CNA-Analyse. Auch hier war ein Rückgang an lebenden Zellen zu erkennen. Sowohl bei 24h als auch 48h Inkubation sank die viable Zellzahl mit steigender Inhibitorkonzentration und lag bei 21,2% nach 48h und 22,4% nach 72h Inkubation. Nach 72h Inkubation wurden bei Inhibitorkonzentrationen von 0,1 µM, 1 µM und 2,5 µM zunächst Anstiege der Zellzahlen gesehen (106,4%, 104,3% und 118,9%). Lediglich bei einer Konzentration von 5 µM war ein geringerer Wert an viablen Zellen zu sehen (31,1%, Abb.32b). Die ZL mit *ETS-1*-Verlust betrafen die ZL HT, SUDHL6 und U2932. Die ZL HT zeigte insgesamt bei allen Konzentrationen und jeder Inkubationszeit ein geringes Ansprechen auf YK-4-279. Der stärkste Einbruch der Zellzahl war nach 72h bei 5 µM Inhibitorkonzentration zu beobachten, wobei noch 51,9% viable Zellen vorhanden waren (Abb.32c). Ein starkes Ansprechen der Zellen war bei der ZL SUHDL6 zu erkennen. Bei allen drei Inkubationszeiten wurde ab einer Konzentration von 2,5 µM ein Rückgang der viablen Zellen beobachtet. Am stärksten fiel dieser Effekt erneut nach 72h Inkubation aus. 12,7% der Zellen wurden noch als

lebend identifiziert (Abb.32d). Ein weiteres, sehr geringes Ansprechen der Zellen auf YK-4-279 zeigten Zellen der Linie U2932. Auch nach 72h lagen bei einer 5 μM Konzentration noch 71,2% viable Zellen vor (Abb.32e).

Abbildung 32 stellt zusammenfassend das Ansprechen der verschiedenen ZL auf unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen von YK-4-279 sowie nach unterschiedlichen Inkubationszeiten dar. Hierbei zeigten ZL mit einem Zugewinn in *ETS-1* ein insgesamt gutes Ansprechen bereits bei niedrigen Konzentrationen des Inhibitors YK-4-279. Ein Ansprechen der Zellen auf den Inhibitor war zwar auch bei der ZL mit normaler Kopienzahl zu erkennen, wobei dies jedoch erst bei einer höheren Inhibitorkonzentration gegeben war. Derselbe Effekt konnte bei der SUDHL6-ZL mit *ETS-1*-Verlust beobachtet werden. Die anderen beiden ZL mit einem Verlust in *ETS-1* zeigten kein Ansprechen auf den Inhibitor.

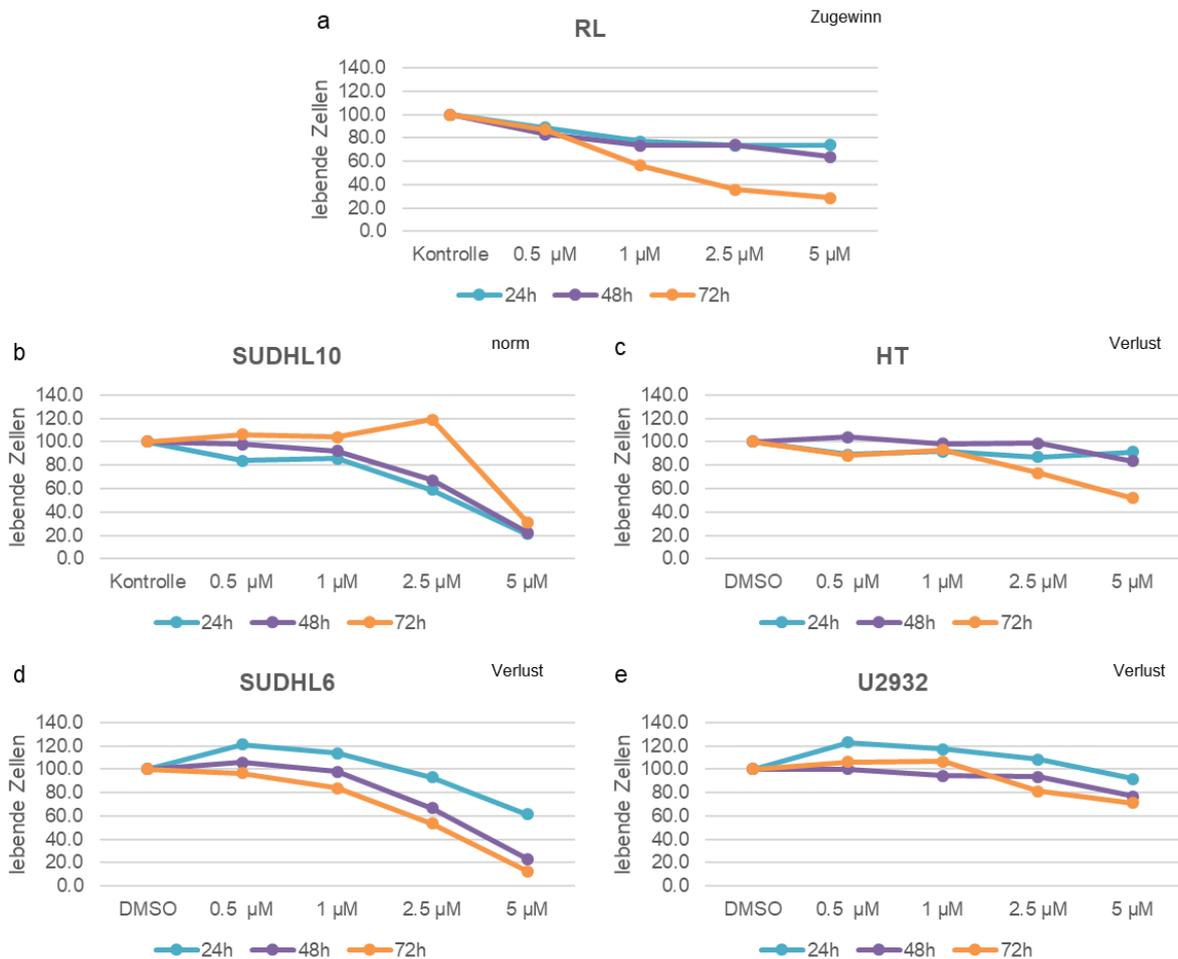


Abbildung 32: Behandlung verschiedener B-Zell-Lymphom-ZL mit dem *ETS-1*-Inhibitor YK-4-279. Die Konzentrationen des Inhibitors betragen 0,5 μM , 1 μM , 2,5 μM und 5 μM (X-Achse). Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen (Y-Achse) ist für die Inkubationszeiten 24h (blau), 48h (lila) und 72h (orange) dargestellt. Die ZL RL zeigte im OncoScan CNV Assay einen Zugewinn in *ETS-1* (a). SUDHL10 wies eine normale Kopienzahl (CN=2) auf (b). Die ZL HT (c), SUDHL6 (d) und U2932 (e) wiesen Verluste in *ETS-1* auf.

Ein weiteres Zielgen für den Viabilitätsassay war *IKZF1*, welches häufig zugewonnen war. Die ZL wurden mit den Inhibitorkonzentrationen 0,1 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM behandelt und für 24h, 48h und 72h inkubiert (Abb.33). Zu den ZL mit *IKZF1*-Zugewinn zählten SUDHL6, SUDHL10 und OciLy10. Ein sehr geringes Ansprechen der Zellen auf den Inhibitor Lenalidomid war für die ZL SUDHL6 und SUDHL10 zu beobachten. Bei keiner Kombination aus Inhibitorkonzentration und Inkubationszeit fiel die Zahl der viablen Zellen unter 80% (Abb.33a+b). Die ZL OciLy10 hingegen ließ einen Rückgang der viablen Zellen mit zunehmender Konzentration bei einer Inkubationszeit von 48h oder 72h erkennen. Nach 48h lag die Zellzahl für die Konzentration von 10 μM noch bei 63,5% und war nach 72h weiter auf 46,3% gesunken (Abb.33c). Zu den ZL mit normaler Kopienzahl (CN=2) zählten die ZL RL, Granta519, U2932 und HT. Für die RL-ZL war bei allen Konzentrationen und unabhängig von der Inkubationsdauer kein Sterben der Zellen zu erkennen. Auch bei 10 μM Konzentration lag der Anteil viabler Zellen noch bei ca. 100% (Abb.33d). Bei der Granta519-ZL wurde für die Konzentrationen 0,1 μM und 1 μM kaum eine prozentuale Veränderung an viablen Zellen detektiert. Bei 5 μM stieg bei allen drei Inkubationszeiten die Zellzahl auf Werte zwischen 122,3% (72h) und 133,3% (24h) an und fiel bei einer Konzentration von 10 μM wiederum ab. Hier wurde als niedrigster Wert 70,9% viabler Zellen nach 24h Inkubation gemessen (Abb.33e). Kein Rückgang der viablen Zellen wurde bei der ZL U2932 beobachtet. Der niedrigste Anteil viabler Zellen zeigte hierbei die Kombination aus 24h Inkubation und 10 μM Konzentration (99,0%, Abb.33f). Wesentlich geringer war der Anteil lebender Zellen bei der ZL HT. Nach allen drei Inkubationszeiten konnte eine Verminderung der Zellzahl bei 10 μM Inhibitorkonzentration ermittelt werden. Am niedrigsten lag der Wert nach 72h Inkubation mit 63,5% lebender Zellen (Abb.33g). Einzig die Zugewinn-ZL OciLy10 zeigte ein eindeutiges Ansprechen auf Lenalidomid. Dies war auch bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen der Fall. Die ZL ohne Zugewinn zeigten keinen Effekt bei einer Behandlung mit Lenalidomid im niedrigen Konzentrationsbereich.

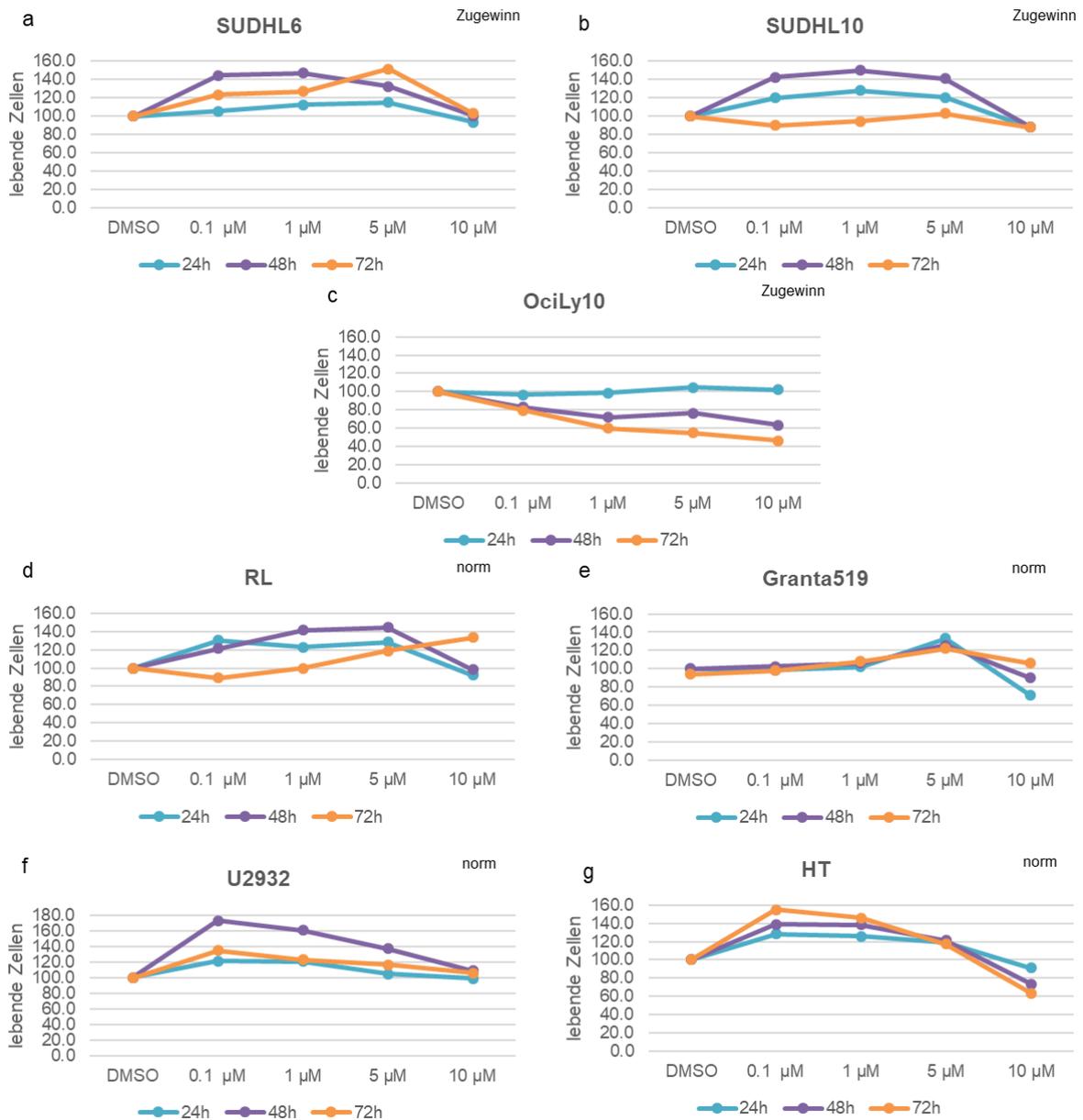


Abbildung 33: Behandlung verschiedener B-Zell-Lymphom-ZL mit dem *IKZF1*-Inhibitor Lenalidomid. Dargestellt sind die Anteile der lebenden Zellen (Y-Achse) unter verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Diese sind 0,1 µM, 1 µM, 5 µM und 10 µM (X-Achse). Die Zellen wurden entweder 24 h (blau), 48 h (lila) oder 72 h (orange) inkubiert. a-c: Die ZL SUDHL6, SUDHL10 und OciLy10 zeigten einen *IKZF1*-Zugewinn. d-g: Die ZL RL, Granta519, U2932 und HT haben eine normale Kopienzahl (CN=2) für *IKZF1*.

3.9. Verminderte *IKZF1*-Expression infolge der Lenalidomid-Behandlung in B-Zell-Lymphom-ZL mit *IKZF1*-Zugewinn

Nach 72-stündiger Behandlung mit Lenalidomid wurde die *IKZF1*-Expression in den ZL OciLy10 (mit *IKZF1*-Zugewinn) und U2932 (ohne *IKZF1*-Zugewinn) mittels Western Blot analysiert (Abb.34a). Bei der ZL mit *IKZF1*-Zugewinn (OciLy10) wurde eine abgeschwächte Expression bei den mit Lenalidomid-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beobachtet. Die ZL mit normaler Kopienzahl hingegen zeigte eine gleichwertige

Proteinexpression der behandelten und unbehandelten Zellen. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Protein GAPDH analysiert. Die Auswertung der semi-Quantitativen Analyse untermauert das Ergebnis (Abb.34b)

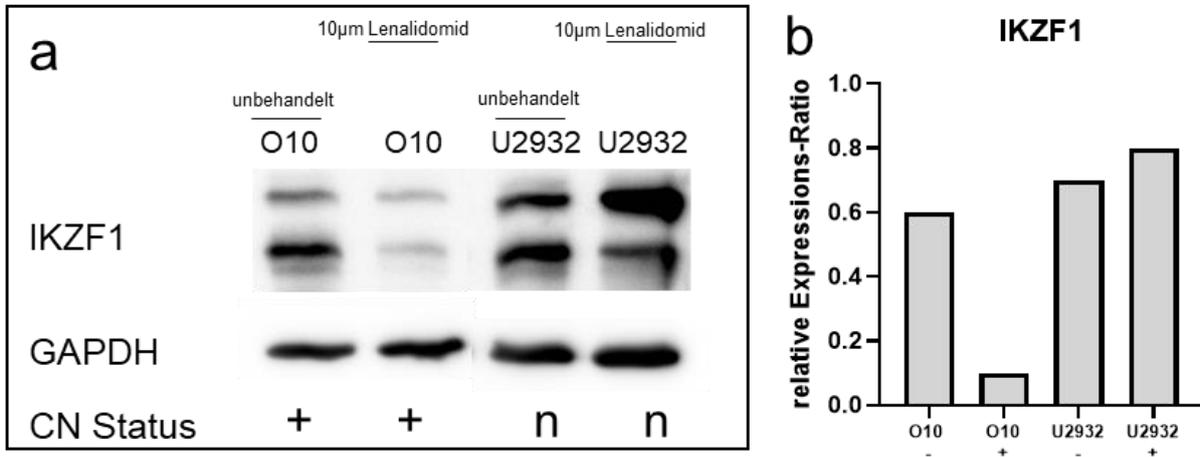


Abbildung 34: a: Proteinexpression von Zellen verschiedenen B-Zell-Lymphom-ZL mittels Western Blot. ZL mit *IKZF1*-Zugewinn (+) und ohne (n) wurden mit dem *IKZF1*-Inhibitor Lenalidomid behandelt und die Expression von *IKZF1* in OciLy10 (O10) und U2932 untersucht. b: Darstellung der mittels semi-quantitativer Bestimmung ermittelten relativen Expression des Zielgens der behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen zum konstitutiv exprimierten Gen.

3.10. Weiterführende Analysen

3.10.1. Untersuchung möglicher funktioneller Konsequenzen von Mutationen in CMG mittels Chromatin Accessibility Assay

Wie bereits gezeigt, treten im FL insbesondere Mutationen in CMG wie z.B. *CREBBP*, *KMT2D*, *EP300* und *EZH2* auf, die sich somit auf die Struktur des Chromatins auswirken können¹⁴. Mit Hilfe des Chromatin Accessibility Assays wurde die Beschaffenheit des Chromatins ausgewählter FL-Proben mit unterschiedlichem CMG-Mutationsstatus analysiert. Hierbei kann anhand der Ergebnisse des Assays auf ein Heterochromatin (verdichtet) oder Euchromatin (aufgelockert) eines Zielgens geschlossen werden, um auf diese Weise mögliche Rückschlüsse auf die funktionelle Konsequenz der CMG-Mutationen ziehen zu können. Insbesondere bei epigenetischen Prozessen spielt es eine große Rolle, ob regulatorische Elemente für Transkriptionsfaktoren im Chromatin zugänglich sind. Der Chromatin Accessibility Assay basiert auf einem Nuklease-vermittelten DNA-Verdau: nur bei Vorliegen eines aufgelockerten Euchromatins kann der Nuklease-Verdau in der behandelten Probe stattfinden. Findet ein Verdau statt, wird die anschließende DNA-Amplifikation mittels qPCR erschwert bzw. verhindert. Somit ist bei Fällen mit vorliegendem Euchromatin ein deutlicher Unterschied der detektierten Ct-Werte zwischen Nuklease-behandelter und –unbehandelter Probe zu erkennen, während dies bei Fällen mit verdichtetem Heterochromatin nicht der Fall ist, da der Nuklease-Verdau dann gar nicht bzw. nicht optimal stattfinden kann. Dieser

Unterschied wird durch die Berechnung des *Fold Enrichment* (Δ Ct Nuklease-behandelt vs. unbehandelt) verdeutlicht. Ein FE <400% weist auf ein verdichtetes Heterochromatin des Zielgens hin, während ein Wert >1600% eine Probe mit aufgelockertem Euchromatin zeigt.

Für diese Analysen wurden Proben mit bekanntem CMG-Mutationsstatus von B-Zell-Lymphom-ZL, rLK und primären FL verwendet. Primäre FL wurden aus nativen Lymphknoten gewonnen. Diese Zellen enthalten nicht nur die CD20+ Tumorzellen, sondern auch eine Vielzahl nicht-CD20+ Bystander-Zellen. Deshalb wurde zur Anreicherung des TZG zunächst eine MACS-basierte Separation CD20+ FL-Zellen durchgeführt. Zur Überprüfung der Effizienz der MACS-Separation erfolgte eine FACS-basierte Messung der CD20+ Zellen. Hierfür wurden jeweils 10.000 Zellen einer unseparierten Zellsuspension, der CD20+ und der CD20-Fraktion einer FL-Probe analysiert. Im unseparierten Ansatz wurden 46,58% (4.727/10.000) der Zellen als CD20+ detektiert und 51,94% (5.271/10.000) als CD20- (Abb.35a). In der CD20-Probe wurden 94,17% (9.540/10.000) als solche identifiziert, während darin 4,54% (460/10.000) der Zellen CD20+ waren (Abb.35b). Der CD20+ Ansatz wies 81,19% (8.258/10.000) CD20+ Zellen auf, während 17,13% (17.742/10.000) der Zellen als CD20-detektiert wurden (Abb.35c).

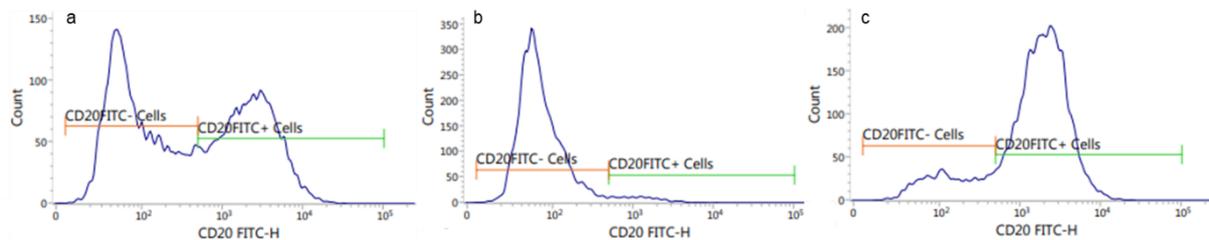


Abbildung 35: FACS-Messung der MACS-separierten FL-Probe. a: Unseparierter Ansatz, der zwei Fraktionen zeigt. CD20- Zellen sind im orangenen Abschnitt zu sehen, CD20+ Zellen im grünen Bereich. b: Im CD20- Ansatz sind fast ausschließlich CD20+ Zellen enthalten. c: Der Ansatz mit CD20+ Tumorzellen enthält überwiegend CD20+ positive Zellen.

Die Ergebnisse der im Anschluss erfolgten qPCR von Nuklease-behandelten und unbehandelten B-Zell-Lymphom-ZL, rLK und CD20-separierten primären FL können *Tabelle 28* entnommen werden. Im Rahmen der WES wurden für einige CMG der Mutationsstatus bestimmt. Der Mutationsstatus (mutiert: MUT, Wildtyp: WT) von *CREBBP*, *KMT2D*, *EP300* und *EZH2* und der mittels Chromatin Accessibility Assay berechnete FE und die daraus resultierende Chromatinstruktur für *GAPDH* ist in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 28: Ct-Werte der jeweiligen FL-Probe und das zugehörige FE. Der Mutationsstatus von *CREBBP*, *KMT2D*, *EP300* und *EZH2* sind für fünf der FL-Proben angegeben, die mittels Chromatin Accessibility Assay untersucht wurden. Zusätzlich ist der Wert des FE für jede Probe dargestellt. Werte des FE, die für ein Euchromatin sprechen, sind rot markiert.

	Mutationsstatus CMGs				CD20+ Unbehan- -delt (Ct)	CD20+ Behan- delt (Ct)	FE [%]	GAPDH Chromatin- struktur
	<i>CREBBP</i>	<i>KMT2D</i>	<i>EP300</i>	<i>EZH2</i>				
S04	WT	MUT	WT	MUT	24,45	24,18	83	Heterochrom.
S40	MUT	MUT	WT	WT	24,22	34,20	101.341	Euchromatin
S36	WT	WT	WT	WT	24,19	25,22	204	Heterochrom.
S08	MUT	MUT	WT	WT	32,18	35,67	1.122	Heterochrom.
S07	WT	MUT	MUT	MUT	30,81	34,88	1.673	Euchromatin
SUDHL5	MUT	WT	WT	WT	18,77	33,07	2.005.953	Euchromatin
OciLy10	WT	WT	WT	WT ¹¹¹	22,91	24,04	219	Heterochrom.
rLK I					21,55	37,87	8.181.059	Euchromatin
rLK II					25,49	27,62	440	Heterochrom.

Zwei der CD20+ FL-Proben wiesen ein FE <400% auf (S04: 83%; S36: 204%). Auch die ZL OciLy10 zeigte ein FE <400% (219%) und zeigte für die CMG einen WT-Status an. S40 (101.341%) und S07 (1673%), hingegen, wiesen FE-Werte von deutlich über 1600% auf. Das FE der ZL SUDHL5 lag bei 2.005.953% und auch der rLK I (8 181 059%) überschritt den Wert von 1600% deutlich. Die ZL SUDHL5 war nur in *CREBBP* mutiert. Die Werte der Proben S08 (1122%) und rLK II (440%) lagen zwischen 400% und 1600%.

Die Probe S04 wies Mutationen in *KMT2D* und *EZH2* auf und zeigte ein FE von 83%. Drei Mutationen in *KMT2D*, *EP300* und *EZH2* wurden in S07 identifiziert, wobei die Probe ein FE von 1673% aufwies. *CREBBP* und *KMT2D* waren in S08 mutiert und gingen mit einem FE von 1122% einher. Keine Mutation in den vier Genen wurde in S36 detektiert. Hier lag das FE bei 204%. Das höchste FE (101.341%) wurde für S40 berechnet, Mutationen konnten bei dieser Probe in *CREBBP* und *KMT2D* nachgewiesen werden.

Auf der Basis der vorliegenden Daten lassen sich daher bei der Bewertung der *GAPDH*-Chromatinstruktur zunächst keine Rückschlüsse auf einen möglichen Zusammenhang von CMG-Mutationen und resultierender Chromatinstruktur ziehen. Es bedarf weiterführender Analysen, um die Auswirkungen von Mutationen in CMG auf die Chromatinstruktur diverser Zielgene zu untersuchen.

3.10.2. Untersuchung des möglichen Einflusses von Mutationen in Spleißstellen auf die Genexpression

Die Mutationsmuster der IFL und sFL unterschieden sich innerhalb der Gene *CREBBP* und *KMT2D*. Mutationen in Spleißstellen beider Gene traten ausschließlich in IFL auf. Um mögliche Unterschiede in der Expression aufgrund der unterschiedlichen Mutationsmuster zu untersuchen, wurden GE-Analysen mittels RT-PCR durchgeführt (Abb.36). Für *KMT2D* und

CREBBP wurden innerhalb der IFL zunächst die GE von Fällen mit einer Spleißstellen-Mutation und einer Mutation in einem Exon verglichen. Zudem wurde vergleichsweise die relative GE von *KMT2D* und *CREBBP* eines rLK analysiert. IFL mit einer Spleißstellen-Mutation wiesen für *KMT2D* die niedrigste GE auf, während die *KMT2D*-Expression bei IFL mit einer Mutation im Exon höher war (n.s.). Eine deutlich höhere GE war beim rLK zu erkennen (n.s.). Die ebenfalls höchste GE zeigte der rLK für *CREBBP*. Geringfügig niedriger lag die GE bei IFL mit einer Spleißstellen-Mutation, während IFL mit einer Mutation im Exon die niedrigste GE aufwiesen (n.s.). Eine weitere komparative Analyse der GE wurde zwischen sFL mit einer Mutation im Exon, WT-sFL und IFL mit einer Spleißstellen-Mutation durchgeführt. Bei *KMT2D* lag die niedrigste GE bei sFL mit einem mutierten Exon vor und war bei IFL mit einer Spleißstellen-Mutation etwas höher. Die höchste Expression war bei WT-sFL zu erkennen (n.s.). Auch bei *CREBBP* war die niedrigste GE bei sFL mit einer Mutation im Exon zu erkennen. Höher lag die GE bei sFL ohne Mutation, während IFL mit einer Spleißstellen-Mutation die größte *CREBBP*-GE zeigten (n.s.).

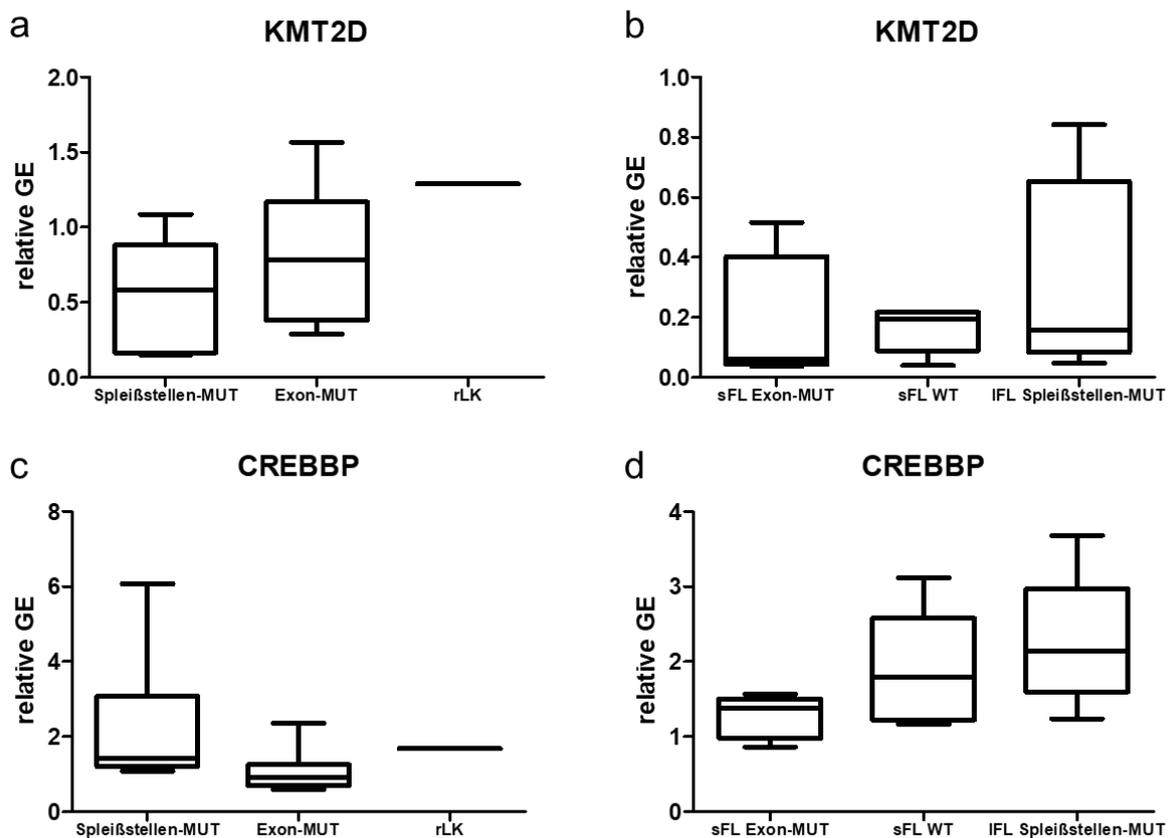


Abbildung 36: Relative GE von FL-Subkohorten mit spezifischen Mutationsmustern. a+c: Für *KMT2D* und *CREBBP* wurde die GE von IFL mit Spleißstellen-Mutationen, Mutationen im Exon und der GE eines rLK verglichen. b+d: Die vergleichenden GE von sFL mit Exon-Mutationen, WT-sFL und IFL mit Spleißstellen-Mutationen ist für *KMT2D* und *CREBBP* dargestellt.

3.10.3. Analyse der Auswirkungen von *STAT6*-Mutationen und CNA auf die GE von pro- und anti-apoptotischen Proteinen

Zu den häufigsten sowohl in IFL als auch sFL auftretenden Aberrationen zählen *STAT6*-Mutationen und Zugewinne in *IKZF1*. Zur Identifizierung möglicher Downstream-Effekt dieser Aberrationen wurden weitere GE-Analysen durchgeführt. Da sich das FL nicht durch eine hohe Proliferationsrate, sondern durch eine Vermeidung der Apoptose definiert⁹, wurden hier zunächst die möglichen Auswirkungen der *STAT6*-Mutationen auf pro- und anti-apoptotische Gene untersucht.

Eine *STAT6*-vermittelte Induktion pro- (*Bax*) und anti-apoptotischer Gene (*BCL2L1*) wurde bereits beschrieben. Da *STAT6*-Mutationen in *BCL2*-FL angereichert sind, wurden FL-Proben mit und ohne *STAT6*-Mutationen auf die relative Expression von *Bax* und *BCL2L1* analysiert. Weder die Expression von *Bax* noch *BCL2L1* zeigten signifikante Unterschiede beim Vergleich von *STAT6*-WT und *STAT6*-Mut FL (Abb.37a und b). Weiterhin wurde die *BCL2L1*-Expression in FL mit und ohne *IKZF1*-Zugewinn analysiert, da die durch *IKZF1* vermittelte *BCL2L1*-Expression bereits beschrieben wurde¹¹². Hierbei wurde keine unterschiedliche GE der beiden Subkohorten detektiert (Abb.37d).

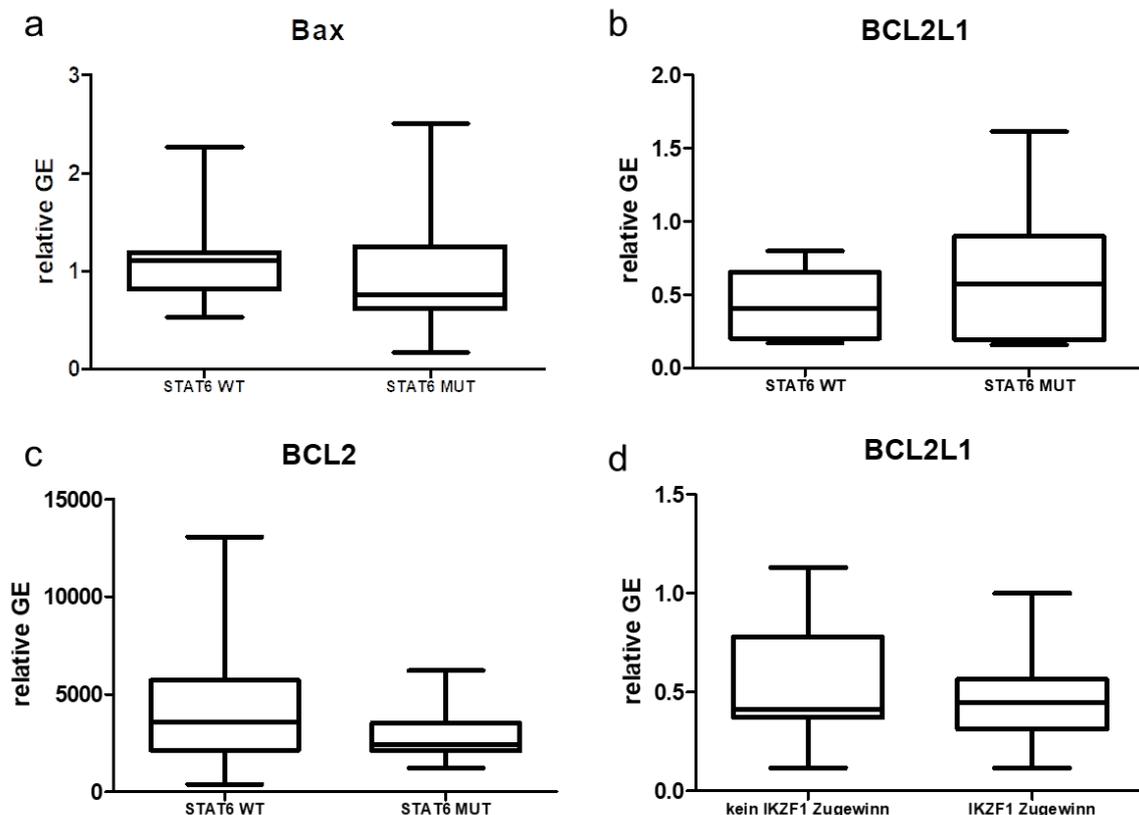


Abbildung 37: GE-Analysen von FL mit spezifischem Aberrations- und Mutationsmuster. a: Relative *Bax*-GE von FL mit und ohne *STAT6*-Mutationen. b: Relative *BCL2L1*-GE von FL mit und ohne *STAT6*-Mutation. c: Relative *BCL2*-GE von FL mit und ohne *STAT6*-Mutationen. d: Relative *BCL2L1*-GE von FL mit und ohne *IKZF1*-Zugewinn.

3.10.4. *BCL2*-Zugewinne beeinflussen das progressionsfreie Überleben der Patienten mit IFL

Zu innerhalb der GLA-Studien analysierten Proben von IFL standen klinische Daten zur Verfügung. Das PFS der Patienten mit IFL wurde einerseits mit den nachgewiesenen Aberrationen (Zugewinn in 2p16.1, 11q24.3, *FCRL5*, *IKZF1*, *BCL2* und Verlust in 8p11.22, sowie *BCL2*-Translokation) und andererseits mit zugrundeliegenden Mutationen (*CREBBP*, *KMT2D*, *BCL2*, *STAT6*, *ARID1A*) korreliert. *Abbildung 38* verdeutlicht, dass Patienten mit IFL, welche einen *BCL2*-Zugewinn aufwiesen, ein signifikant schlechteres PFS zeigten als Patienten mit IFL ohne *BCL2*-Zugewinn ($p=0,038$). 70% (7/10) dieser Fälle mit *BCL2*-Zugewinn wiesen keine *BCL2*-Translokation auf. Alle weiteren analysierten Parameter zeigten keine Korrelation mit dem PFS der Patienten.

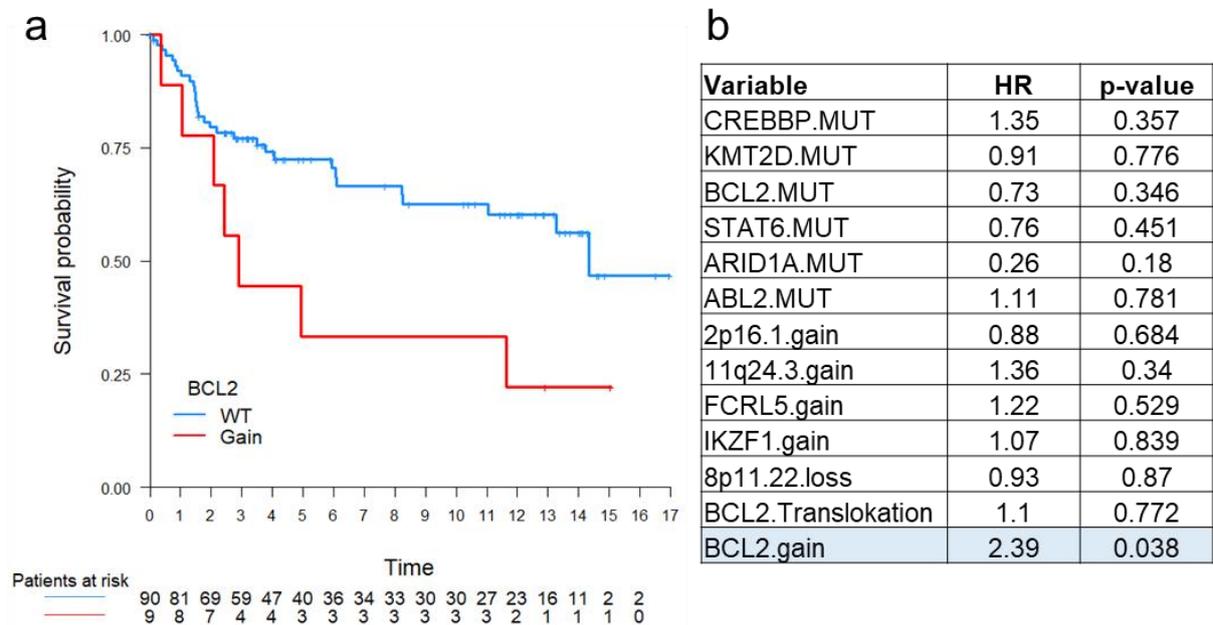


Abbildung 38: Korrelation des PFS von Patienten mit IFL mit spezifischen Aberrationen bzw. somatischen Mutationen. a: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit IFL mit oder ohne *BCL2*-Zugewinn. Die Kurve der Patienten mit *BCL2*-Zugewinn ist in rot abgebildet, die der Patienten ohne Zugewinn in blau. Zum jeweiligen Zeitpunkt ist die Anzahl der Patienten unterhalb der Abbildung zu sehen. b: HR-Werte (=Hazard Ratio) und p-Werte der analysierten CNA und somatischen Mutationen. Der signifikante p-Wert für den *BCL2*-Zugewinn ist hellblau hinterlegt.

4. Diskussion

Das FL ist bezüglich der Prognose ein sehr heterogenes B-Zell-Lymphom. Systemische Stadien der Erkrankung sind zum jetzigen Zeitpunkt mit konventioneller Therapie nicht heilbar. Die überwiegende Mehrheit an biologischen und klinischen Daten stammt aus systemischen, aber nicht lokalisierten Stadien. Um erste, existierende Hinweise auf biologische Unterschiede zwischen IFL und sFL zu ergänzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein gesamtgenomisches Profil großer Studienkohorten lokalisierter und systemischer FL erstellt, um mögliche molekulare Unterschiede zwischen den Stadien zu identifizieren. Hierzu wurden CNA-Analysen und WES-Sequenzierungen angewandt.

4.1. Probengewinnung, Qualitätskontrolle und Charakterisierung der FL-Fälle

Für die gesamtgenomische Charakterisierung der FL standen Proben von insgesamt 265 IFL und 570 sFL zur Verfügung. Mit Hilfe verschiedener PCR-Varianten wurde die Qualität der DNAs evaluiert. Ein Ausschluss der Proben aus der endgültigen Analyse war entweder durch die mangelnde Qualität der DNA begründet, welche bereits im Vorlauf der WES- bzw. CNA-Analyse festgestellt wurde oder durch das nicht Erreichen der gewünschten Qualitätsparameter nach der bioinformatischen Verarbeitung.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind Qualitätsanalysen der verwendeten DNAs vor der Analyse von zentraler Bedeutung, wenn das Probenmaterial aus FFPE-Blöcken gewonnen wurde, da die Formalin-Fixierung mit einer Fragmentierung der DNA einhergeht und eine ausreichende Qualität für diverse Methoden nicht garantiert werden kann⁷¹. Nicht zu vernachlässigen ist hierbei der Kostenaspekt der einzelnen Analysen. Jede Analyse, die an Proben mit unzureichender Qualität durchgeführt wird und zu nicht auswertbaren Ergebnissen führt, belastet unnötig das Budget. Insgesamt lagen für 132 Fälle sowohl CNA- als auch WES-Daten vor, für 16 IFL gab es ausschließlich CNA-Daten und acht IFL konnten lediglich mittels WES untersucht werden.

Für die Detektion der *BCL2*-Translokationen wurde bei Fällen, deren *BCL2*-Translokationsstatus unbekannt war, entweder eine FISH oder eine delta-PCR durchgeführt. Zwar ist die FISH die Standard-Methode zum Nachweis der *BCL2-IgH*-Translokation¹¹³, allerdings ist die Anwendung nur an Gewebeschnitten möglich. Da von einigen der Fälle lediglich bereits isolierte genomische DNA vorlag, wurde die delta-PCR⁷³ als alternative Methode gewählt. Die Detektion von chromosomalen Translokationen mittels PCR mit Multiplex-Primern gilt inzwischen als etablierte Methode, wird im Vergleich zur FISH jedoch überwiegend als weniger sensitiv beschrieben, da mittels FISH ein größerer Bereich abgedeckt werden kann, der auch die Mehrheit der Bruchstellen beinhaltet^{114–116}.

Einige der im Rahmen dieser Arbeit mittels FISH auf die *BCL2*-Translokation untersuchten Fälle wurden zusätzlich mittels delta-PCR vergleichend analysiert. Hierbei ließ sich eine höhere Sensitivität der FISH erkennen, da 25% (5/20) der untersuchten Fälle ausschließlich mittels FISH als transloziert detektiert wurden. 5% (1/20) der Translokationen wurden nur mittels delta-PCR identifiziert. Die nicht detektierte Translokation der FISH-Analyse kann zum einen durch die Analyse des Gewebes an unterschiedlichen Schnittebenen, zum anderen durch die Komplexität der Translokation begründet sein^{117,118}. Eine weitere PCR-basierte Detektion der Translokation könnte alternativ als Validierungsmethode eingesetzt werden¹¹⁹. Allerdings bleibt hervorzuheben, dass die FISH der PCR-basierten Methode immer überlegen ist¹²⁰. Ist kein Ausgangsmaterial für eine FISH vorhanden, kann zur Bestimmung des *BCL2*-Translokationsstatus unter Berücksichtigung der bekannten Limitationen eine PCR durchgeführt werden.

4.2. Identifikation von genetischen Aberrationen und Mutationen in verschiedenen klinischen Stadien des FL

Für die verschiedenen klinischen Stadien des FL wurden bereits molekularbiologische Unterschiede identifiziert und beschrieben. Hierzu zählen zum Beispiel differentielle Gensignaturen⁶⁸ und unterschiedliche chromosomale Aberrationen¹⁸ zwischen IFL und sFL. Zudem wurden kürzlich Unterschiede zwischen FL im Stadium I und sFL publiziert. Hierbei wurden in den FL I signifikant mehr *STAT6*-Mutationen identifiziert als in sFL. Im Gegensatz dazu wurden Mutationen in *KMT2D* und *ARID1A* signifikant häufiger in sFL beobachtet¹²¹.

Los-de-Vries und Kollegen verwendeten allerdings ausschließlich Gewebematerial von Patienten in sehr frühem Stadium I vergleichend zu den weit fortgeschrittenen Patienten in Stadium IV. Es wurden im Gesamten nur 82 Fälle untersucht und keine Gesamtexom-Sequenzierung durchgeführt, sondern lediglich eine Auswahl FL-relevanter Kandidatengene untersucht. Die Analyse der Kopienzahlveränderungen erfolgte begleitend aus dem Datensatz der Mutationsdaten ausschließlich basierend auf deskriptiven Analysen. Demgegenüber konnte für die vorliegende Arbeit eine sehr große Kohorte lokalisierter FL (n=147) gesamtgenomisch analysiert werden. Von einer Vielzahl von Patienten lagen darüber hinaus auch klinische Daten vor.

Für die vorliegende FL-Kohorte wurden mittels OncoScan CNV Assay, der sich insbesondere für die Anwendung an FFPE-Gewebe sehr gut eignet^{83,122}, rekurrente und signifikante CNA bestimmt. Eine zunächst deskriptive Auswertung der CNA wurde mittels ChAS und MSV durchgeführt, um die Verteilung aller CNA entlang des Genoms zu beschreiben. Zudem konnten somit frequent aberrante Regionen bestimmt werden. Im Gegensatz zu den bereits publizierten Daten von *Los-de-Vries* und Kollegen wurden weiterführende Analysen basierend

auf dem GISTIC 2.0 Algorithmus durchgeführt, welcher zuvor identifizierte Regionen auf die signifikanten eingrenzt und potentiell aberrante Kandidatengene aufzeigt. GISTIC 2.0 ermöglicht innerhalb einer Anwendung sowohl die Berechnung der Kopienzahl der Gensegmente einer Probe, als auch insbesondere die Identifizierung von CNA in Treibergenen und die Abgrenzung zu weniger relevanten Aberrationen innerhalb der Kohorte⁸⁷. Die Anwendung des GISTIC-Algorithmus erfordert die Erstellung eines bioinformatischen Dokuments, welches die CN-Daten aller Fälle enthält. Hierbei wird jedoch nicht jede einzelne Position des Genoms abgebildet, sondern das Genom jeder einzelnen Probe in unterschiedlich große Segmente unterteilt, für welche die jeweilige log₂-Ratio berechnet wird und somit die Kopienzahl bestimmt werden kann. Für die Normalisierung der Rohdaten und der Segmentierung stehen inzwischen zahlreiche bioinformatische Algorithmen zur Verfügung, die jeweils mit unterschiedlichen Segmentierungen arbeiten. Getestet wurden verschiedene Kombinationen von Methoden zur Normalisierung der Rohdaten und der anschließenden Segmentierung. Mittels ChAS konnte sowohl die Normalisierung, als auch die Segmentierung ausgeführt werden⁸⁴. Des Weiteren wurde die Kombination aus einer Normalisierung mittels ChAS und der Segmentierung anhand des *Circular Binary Segmentation* (CBS)^{123,124} Algorithmus getestet. Diese Prozessierung wurde innerhalb des R-Pakets „rCGH“ durchgeführt¹²⁵. Eine weitere Variante der CNA-Auswertung bestand in der Normalisierung durch das APT und die Segmentierung mittels ASCAT. Die Kombination dieser beiden Methoden wurde durch das EaCoN-Paket⁹⁰ innerhalb der R-Software angewandt. Ein Nachteil der CNA-Ermittlung, die auf der ausschließlichen Verwendung von ChAS basierte, ist die fehlende Möglichkeit verschiedene Parameter der Normalisierung und Segmentierung einzustellen. Dies war durch die Verwendung der anderen beiden Kombinationen innerhalb der Verwendung der R-Software gegeben. Sowohl die Segmentierung mittels CBS als auch mittels ASCAT wird für die CNA-Analyse häufig verwendet und beide Methoden weisen ähnliche Möglichkeiten auf, wie z.B. die Verminderung von Hintergrund-Signalen¹²⁶. Entscheidend für die Auswahl der verwendeten Kombination war zum einen die höhere Anzahl an Segmenten, die mittels ASCAT erzeugt wurden und zum anderen die Integration der verschiedenen Algorithmen in ein einzelnes R-Protokoll (EaCoN).

Für die vorliegende Kohorte wurden im Zuge der CNA-Analyse mittels ChAS und GISTIC zunächst bereits bekannte, häufige Aberrationen im sFL wiedergefunden und für das IFL bestätigt. Dies schließt zum einen Zugewinne in 1q, 2p, 7, 8, 12q, 18q, X und zum anderen Verluste in 1p36, 6q, 10q, 13p und 17p ein. Diese für das FL typischen CNA traten sowohl in IFL als auch sFL mit ähnlichen Frequenzen auf. Trotz der bislang publizierten molekularen Unterschiede von IFL und sFL ergab der Vergleich der CNA und Mutationen beider Kohorten überraschenderweise ein überwiegend ähnliches Aberrations- und Mutationsmuster. Wie

bereits für sFL beschrieben, wurden auch in IFL vor allem bekannte Mutationen identifiziert, die vor allem CMG wie *CREBBP*, *KMT2D* und *EZH2* betrafen.

Zusätzlich wurden in IFL *BCL2*- und *TNFRSF14*-Mutationen in hoher Frequenz (jeweils >30%) identifiziert. Auch *STAT6* zeigte eine erhöhte Mutationsfrequenz von knapp unter 30% in IFL und 16,7% in sFL, sodass die Ergebnisse dieser Analyse die bereits beschriebenen Mutationen im FL widerspiegeln^{9,15,17}. Auch der Vergleich innerhalb der IFL, welche die klinischen Stadien I und II umfassen, lieferte keine Anhaltspunkte für molekularbiologische Unterschiede. Das Resultat dieser Vergleiche korreliert mit den Ergebnissen von *Los-de-Vries et al*¹²¹, die ebenfalls überwiegend ähnliche Profile bei einem Vergleich von FL I und den sFL detektierten. Diese unerwarteten Ergebnisse der auf DNA-Ebene ähnlichen Profile für die verschiedenen Subkohorten im FL liefern zunächst keine Erklärung für die bisher beschriebenen Unterschiede, insbesondere die GE betreffend. Bestätigt werden konnten allerdings die unterschiedlichen Frequenzen der *BCL2*-Translokation zwischen IFL und sFL, die nur etwa halb so oft in IFL (49%) wie in sFL (92%) auftritt.⁶⁷

4.3. Vergleichende Analysen verschiedener FL-Subkohorten

Mittels ChAS wurden zunächst drei Regionen detektiert, die sich signifikant in ihrer Aberrationsfrequenz unterschieden. Die größte Signifikanz wurde hierbei für die Region 18p11-q21 berechnet ($q=7E-05$), welche mit Hilfe des GISTIC-Algorithmus auf die Gene *BCL2* und *MALT1* eingegrenzt werden konnte. 15,0% der IFL und 34,4% der sFL wiesen hierin Zugewinne auf. Zugewinne in *BCL2* gehen mit einer erhöhten *BCL2*-Expression einher¹²⁷.

Dies ist besonders im Hinblick auf die *BCL2*-FL von größter Bedeutung, da der chromosomale Zugewinn einen möglichen Alternativmechanismus der *BCL2*-Deregulation darstellt. Allerdings scheint ein Zugewinn des *BCL2*-Gens zunächst keinen rekurrenten anti-apoptotischen Alternativmechanismus zur *BCL2*-Translokation darzustellen, da nur etwa 8,8% (13/147) der IFL trotz fehlender *BCL2*-Translokation einen *BCL2*-Zugewinn aufwiesen. Innerhalb der *BCL2*-zugewonnenen Fälle war bei 10/13 (77%) Proben der *BCL2*-Translokationsstatus bekannt. 70% (7/10) der zugewonnenen FL wiesen keine *BCL2*-Translokation auf, 30% (3/10) zeigten jedoch sowohl die Translokation als auch den Zugewinn in *BCL2*. In allen *BCL2*-zugewonnenen Fällen, in denen Daten der IHC-Färbung verfügbar waren (7/13), konnte eine *BCL2*-Expression nachgewiesen werden. Dies geht einher mit bereits bekannten Daten zu *BCL2*-exprimierenden aber dennoch *BCL2*-FL, die einen 18q21-Zugewinn zeigten¹²⁸. Dies ist von besonderem Interesse, da die vorliegenden Daten zeigten, dass ein Zugewinn in *BCL2* im IFL mit einem kürzeren PFS assoziiert ist (Abb. 38). Dies ist nach derzeitigem Wissensstand der bisher erste Biomarker in IFL, der eine prognostische Relevanz zeigt. Von großem Interesse ist in diesem Zusammenhang auch, dass *BCL2*-

Zugewinne im sFL bereits mit dem Überleben der Patienten korreliert werden konnten¹²⁹, während *BCL2*-Translokationen weder im IFL noch im sFL mit einer veränderten Prognose der Patienten einhergehen^{18,67}. Zwar wurde lediglich der *BCL2*-Zugewinn in die Berechnung des PFS miteinbezogen, dennoch liegt mit *MALT1* ein weiteres Gen von Interesse in 18q21. *MALT1* ist in die *NF-κB*-Aktivierung von Lymphozyten involviert^{130,131}, wobei *MALT1*-Zugewinne im DLBCL mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind¹³². 12/13 Fälle mit *BCL2*-Zugewinn wiesen ebenfalls einen *MALT1*-Zugewinn auf, insgesamt gab es 18 Fälle mit *MALT1*-Zugewinn, wovon sechs Fälle gleichzeitig eine *BCL2*-Translokation aufwiesen. Ein *MALT1*-Zugewinn kann zwar nicht als alleiniger Kompensationsmechanismus zur fehlenden *BCL2*-Translokation angesehen werden, die Evaluierung einer prognostischen Bedeutung von *MALT1*-Zugewinnen ist jedoch dahingehend von großem Interesse, dass *MALT1*-Inhibitoren aktuell entwickelt werden und insbesondere im Lymphom Anwendung finden^{133,134}.

Auch für Aberrationen, die Chromosom 17q21 betreffen, zeigten IFL und sFL signifikant unterschiedliche Frequenzen, wobei Zugewinne im sFL vermehrt auftraten. Mittels GISTIC konnte auch hier die Region erheblich eingegrenzt und auf die signifikanten Gene reduziert werden. Hierin lagen die Gene *NGFR*, *PHB* und *ZNF652*. Speziell zu den Genen *NGFR* und *PHB* gibt es bereits Untersuchungen. *NGFR* ist ein im malignen Melanom bekannter Marker, der über diverse Mechanismen die Tumorentstehung und das Fortschreiten der Erkrankung fördert. Dies gelingt insbesondere, indem Melanomzellen, die *NGFR* exprimieren, der Immunabwehr durch NK-Zellen entgehen^{135–138}. *PHB* gehört zu den Prohibitinen und bildet Gerüstproteine, deren Funktionen vielfältig sind. Diese schließen die Beteiligung an Transkriptionsprozessen und der Apoptose mit ein^{139–141}. Zudem sind Prohibitine an der Proliferation, Resistenzbildung und Metastasierung mittels *c-raf-MEK-ERK*-Signalweg beteiligt^{142,143}. Speziell in hämatologischen Tumoren konnte eine Überexpression von *PHB* nachgewiesen werden¹⁴⁴.

Die Analyse der Zahl der somatischen Mutationen im FL ergab eine leicht erhöhte Variantenzahl pro Fall und Mb für die sFL (1,36 vs. 1,53) und geht mit einer ebenfalls erhöhten durchschnittlichen Anzahl an Mutationen pro Fall der sFL (80,1 vs. 90,6) einher. In Kombination mit einer zwar nur geringfügig erhöhten Anzahl an CNA pro Fall in den sFL untermauert dies die zunehmende Anreicherung genetischer Imbalancen mit fortschreitendem klinischen Stadium^{65,145–147}.

Signifikante Unterschiede somatischer Mutationen zwischen IFL und sFL betrafen *ARID1A*, die vermehrt in den sFL auftraten. *ARID1A* wirkt innerhalb des *SWI/SNF*-Komplexes mit, der für Chromatin-Veränderungen verantwortlich ist^{148,149} und wurde bereits als häufig mutiertes Gen im FL beschrieben¹⁵⁰. In unserer Kohorte konnte kein Mutations-Hotspot identifiziert werden, stattdessen traten unterschiedlichste Mutationen auf, die sich aber sowohl in den IFL

als auch den sFL auf überwiegend Nonsense-, Missense- und Frameshift-Mutationen verteilt und damit als inaktivierend anzusehen sind. Dies bestätigt die bisherigen Daten zu *ARID1A*-Mutationen im FL¹⁵⁰. Inaktivierende *ARID1A*-Mutationen führen zu einer signifikant geringeren Expression von FAS und verhindern somit die FAS-induzierte Apoptose in B-Zell-Lymphom-ZL^{151,152}. Darüber hinaus ist *ARID1A* bereits als prognostisch relevantes Gen im m7-FLIPI berücksichtigt³². Inwiefern sich die Expression von *ARID1A* auf RNA- und Proteinebene durch die auftretenden Mutationen in den verschiedenen Kohorten verändert, bleibt zunächst zu klären. Da die prognostische Relevanz von *ARID1A*-Mutationen im sFL bereits bekannt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung solcher Mutationen auch in den IFL überprüft: einen Einfluss von *ARID1A*-Mutationen auf das PFS der Patienten konnte jedoch nicht detektiert werden.

KIR3DL1-Mutationen wurden mit einer Häufigkeit von 15% ausschließlich in Patienten mit IFL gesehen. Die Expression von *KIR3DL1* ist prinzipiell auf T- und NK-zellen limitiert^{153,154} und spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung und Hemmung von NK-Zellen¹⁵⁵. Von besonderem Interesse ist die Arbeit von *Erbe et al. 2019*, die das Auftreten von *KIR3DL1*-Mutationen mit einem verbesserten Ansprechen von Rituximab bei Patienten mit FL assoziiert¹⁵⁶. Allerdings darf bei den Daten der vorliegenden Arbeit nicht außer Acht gelassen werden, dass der mediane Anteil mutierter Tumorzellen bei 0% liegt, was die Frage aufwirft, ob die Mutationen möglicherweise nicht eher in den nicht-malignen NK-Zellen auftreten, als in den malignen B-Zellen selbst. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung, in der keine der mittels WES detektierten Mutationen durch die Sanger-Sequenzierung bestätigt werden konnte. Weiterführende Analysen *KIR3DL1*-mutierter FL-Proben mit separater Untersuchung von Tumor- und Nicht-Tumor-Zellen sollen hier zukünftig Aufschluss geben. Da eine reduzierte Anzahl an NK-Zellen mit einer ungünstigeren Prognose für das unbehandelte FL einhergeht^{157,158}, ist dies ein interessantes Ergebnis. Außerdem scheint auch Lenalidomid einen positiven Effekt auf die Anzahl der NK-Zellen zu haben und vermittelt dadurch die verbesserte Wirkung von Rituximab in B-Zell-Lymphom-ZL¹⁵⁹.

Ergänzend zu den unterschiedlichen Mutationsfrequenzen konnten in *KMT2D* und *CREBBP* auch verschiedene Mutationsmuster zwischen IFL und sFL detektiert werden, obwohl sich die Häufigkeit der Mutationen in den IFL und sFL insgesamt nicht signifikant unterschied. Spleißstellenmutationen beider Gene wiesen nur IFL auf. Da *KMT2D* und *CREBBP* zu den CMG zählen, können aus der Mutation resultierende Veränderungen auf Proteinebene weitreichende Konsequenzen haben^{160–162}. Mögliche funktionelle Konsequenzen der Spleißstellenmutationen im IFL müssen noch detaillierter untersucht werden, v.a. im Vergleich mit deletären Mutationen innerhalb der Exone.

Ein wesentliches biologisches Merkmal lokalisierter FL ist die niedrigere Frequenz von *BCL2*-Translokationen, wohingegen diese im systemischen FL als identifizierendes Charakteristikum gelten. In der vorliegenden Kohorte wurden bei 47,1% der IFL und bei 70,8% (interne Bestände) bzw. 92,1% (GLSG2000) der sFL die Translokation nachgewiesen.

BCL2⁺ und *BCL2*⁻ IFL wurden daher ebenfalls anhand ihrer CNA-Profile verglichen und wiesen hier in bemerkenswerter Weise große Ähnlichkeiten auf. Signifikant unterschiedliche Frequenzen an CNA zwischen *BCL2*⁺ und *BCL2*⁻ IFL wurden nicht detektiert. Ein anderes Bild lieferte hingegen der Vergleich der Mutationen in *BCL2*⁺ und *BCL2*⁻ FL. Die Gene *BCL2*, *KMT2D*, *IGLL5* und *ABL2* waren in *BCL2*⁺ FL signifikant häufiger mutiert als in *BCL2*⁻ Tumoren. *BCL2*-Mutationen und die Kombination aus *BCL2*-Mutation und -Translokation wurden zwar bereits als Risikofaktoren für eine Transformation in eine aggressivere Variante beschrieben^{163,164}, die hier erhobenen Daten zeigten allerdings keinerlei prognostische Relevanz. Auch die Untersuchung einer mit Rituximab-behandelten FL-Kohorte ergab keine Hinweise auf eine prognostische Relevanz von *BCL2*-Mutationen, wobei auch hier ein hoher Anteil an synonymen Mutationen identifiziert wurde (46%)¹⁶⁵.

Die funktionelle Konsequenz der im vorliegenden Datensatz nachgewiesenen zahlreichen synonymen *BCL2*-Mutationen bleibt zunächst fraglich. Inwiefern die Kombination aus *BCL2*-Mutation und -Translokation eine möglicherweise höhere Proteinexpression und ggf. erhöhte anti-apoptotische Wirkung hat, soll perspektivisch ebenfalls untersucht werden. Da Mutationen in *KMT2D* vermehrt in sFL¹⁶⁶ auftreten und diese überwiegend zu den *BCL2*⁺ FL zählen, passen diese Daten gut ins Bild. *IGLL5*-Mutationen wurden insbesondere mit der Transformation des FL zum DLBCL in Verbindung gebracht^{167,168} und scheinen im DLBCL als Tumorsuppressor zu agieren¹⁶⁹. Die Expression von *ABL2* ist in zu DLBCL transformierten FL, verglichen mit primären FL, signifikant erhöht¹⁷⁰. Mutationen des *ABL2*-Gens sind bislang kaum beschrieben, ebenso wie deren potentiell funktionellen Effekte. Nicht außer Acht gelassen werden darf hierbei allerdings, dass die detektierten Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung nicht bestätigt werden konnten. Allerdings lag die mediane CCF bei 0%, sodass dies ursächlich für die fehlende Validierung sein könnte¹⁷¹. Auch die Allelfrequenz (AF) lag bei einem geringen Wert von 7-14%. Andererseits konnten mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung Keimbahnmutationen des *ABL2*-Gens identifiziert werden, die im Analyseprozess der somatischen Mutationen herausgefiltert wurden. Zudem zeigten zahlreiche Untersuchungen die deutlich höhere Sensitivität der NGS-basierten Methode im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung, sodass die ermittelten somatischen Mutationen durchaus als valide eingestuft werden können, auch wenn sie aufgrund des offensichtlich subklonalen Auftretens mittels Sanger-Sequenzierung nicht validiert werden können¹⁷²⁻¹⁷⁴.

STAT6-Mutationen hingegen waren signifikant häufiger in *BCL2*-FL zu finden, die wiederum überwiegend in IFL vorkommen. Dies korreliert mit Ergebnissen von *Los-de Vries et al.*, die in ihrer Arbeit signifikant vermehrt *STAT6*-Mutationen in FL identifizieren konnten¹²¹. Zudem wurden auch innerhalb unserer Kohorte *STAT6*-Mutationen häufiger in IFL (27,9%) als in sFL (16,7%) detektiert.

BCL7A-Mutationen betrafen signifikant häufiger *BCL2*- aber *BCL2*-MUT FL und werden im DLBCL mit dem Verlust der Tumor-suppressiven Funktion von *BCL7A* in Verbindung gebracht, wobei hierbei insbesondere Mutationen im N-terminalen Bereich auftraten¹⁷⁵. Auch in der für diese Arbeit verwendeten Kohorte traten mit Ausnahme einer Mutation alle im N-terminalen Bereich auf. Welche funktionellen Konsequenzen dies im FL hat, ist bisher unbekannt.

4.4. Die neu identifizierten aberranten Regionen enthalten Gene, die an der Pathogenese des FL beteiligt sein können

Mit einer kombinierten Auswertestrategie aus ChAS und GISTIC konnten im FL neu identifizierte Regionen auf die signifikanten Gene eingeschränkt werden. Hierzu zählen die mittels ChAS detektierten Zugewinne in 6p21.32 (*HLA*-Gene und *TAP2*), 11q24.3 (*ETS-1* und *FLI1*) und 17q21.32-q24.1 (166 Gene), sowie die Verlustregion 8p11.22 (*ADAM32* und *ADAM18*). Diese Regionen wurden durch die angeschlossene Analyse mittels GISTIC 2.0 Algorithmus bestätigt, zudem wurden größere Regionen, die gehäuft Aberrationen im Rahmen der ChAS-Analyse aufwiesen, auf signifikante Loci eingegrenzt. Mit besonders hoher Signifikanz zeichneten sich hierbei die chromosomalen Regionen 1q23.1 ($q=6,8274E-35$) und 7p12.2 ($q=7,9917E-37$) aus. Interessanterweise war in beiden signifikanten Regionen nur jeweils ein einzelnes Gen lokalisiert (s.u.).

Die in 6p21.32 inkludierten *HLA*-Gene umfassen die Gene *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB6* und *HLA-DQB1-AS1*, die allesamt der Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse II zuzuordnen sind. *HLA-DRB6* wird hierbei als Pseudogen aufgeführt und *HLA-DQB1-AS1* als nicht-kodierende RNA. Für die drei Gene *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* und *HLA-DRB1* ist bereits bekannt, dass sich unterschiedliche Haplotypen auf die Pathogenese des FL auswirken können. Ein Aminosäureaustausch kann die Affinität zum Antigen maßgeblich beeinflussen und im weiteren Verlauf durch eine beispielsweise chronische Aktivierung des Immunsystems die Pathogenese des FL begünstigen¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Dies bezieht sich insbesondere auf die Haplotypen *HLA-DRB1*01:01*, *HLA-DQA1*01:01* und *HLA-DQB1*05:01*, die in weiteren Studien mit einem etwa zweifach erhöhten Risiko, an einem FL zu erkranken, beschrieben werden¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Interessanterweise gibt es weitere Haplotypen, die für unterschiedliche B-Zell-Lymphome mit gegensätzlichen Risiken einhergehen. Während die Haplotypen *HLA-DRB1*15:01*, *HLA-DQA1*01:02* und *HLA-DQB1*06:02* im FL das Risiko für eine Erkrankung

eher minimieren, erhöhen diese das Risiko für die Manifestation eines DLBCL^{182–184}. *Cerhan et al.* identifizierten in ihrer Arbeit zusätzlich *TAP2*-SNPs, welche die *TAP2*-Expression erhöhen, als möglichen Risikofaktor für die Begünstigung einer FL-Erkrankung¹⁸⁴.

17q21.33 wurde insbesondere im sFL als signifikant zugewonnen identifiziert. Neben den Genen *NGFR*, *PHB* und *ZNF652*, die bereits hinsichtlich der signifikant häufigeren Zugewinn-Frequenz im sFL beschrieben wurden, sind hierin auch die nicht-kodierenden RNAs *LOC100288866*, *LOC101927207*, *LOC102724596*, sowie die Micro-RNA *MIR6165* lokalisiert. Letztere war bereits Gegenstand einiger Forschungsarbeiten und zeigte eine Beteiligung im Bereich des Zellzyklus, sowie der Apoptoseregulierung^{185–187}.

ADAM32 und *ADAM18* liegen in der neu identifizierten Verlust-Region 8p11.22 und zählen zu den Metallpeptidasen¹⁸⁸. Einige der *ADAM*-Gene wurden bereits mit der Tumorentstehung assoziiert, jedoch liegen bisher keine bekannten Daten zu *ADAM32* und *ADAM18* vor^{189–191}. Allerdings sind *ADAM18*-Mutationen im MM mit einem signifikant geringeren Gesamtüberleben assoziiert¹⁹². Mutationen in *ADAM*-assoziierten Genen konnten innerhalb der vorliegenden IFL-Kohorte in 39 Fällen (27,9%) identifiziert werden.

Zu den in 11q24.3 lokalisierten Genen *ETS-1* und *FLI1* gibt es bereits zahlreiche Daten im Bereich der B-Zell-Lymphome. Während dieser Locus im atypischen Burkitt-Lymphom eher als Verlustregion beschrieben wird¹⁰³, konnten in bis zu 20% der DLBCL 11q24.3-Zugewinne beobachtet werden^{193,194}. Beide Gene zählen zu den Transkriptionsfaktoren der *ETS-1* Familie¹⁹⁵ und sind in malignen B-Zell-Neoplasien häufig dereguliert^{196,197}. Im aktivierten B-Zell-Typ (ABC)-DLBCL wird *ETS-1* ebenfalls eine pathogene Rolle zugeschrieben¹⁹⁸.

Innerhalb der sehr signifikanten Zugewinn-Region 1q23.1 liegt das Gen *FCRL5*, welches für das gleichnamige Typ-I Membran-Glykoprotein kodiert und im zytoplasmatischen Bereich ITAM- und ITIM-ähnliche Elemente besitzt^{199,200}. Die Expression von *FCRL5* ist überwiegend in B-Lymphozyten zu sehen und spielt eine wichtige Rolle im Prozess der B-Zell-Reifung^{201,202}. Ein fokaler 1q23-Zugewinn, der ebenfalls *FCRL5* umfasste, wurde bereits im plasmoblastischen Lymphom nachgewiesen²⁰³. Zudem konnte eine erhöhte *FCRL5*-Expression in MM und Burkitt-Lymphomen nachgewiesen werden²⁰⁴.

Von großem Interesse ist die Identifizierung des häufig zugewonnenen Gens *IKZF1* innerhalb des 7p12.2 Locus. Zum einen zählt *IKZF1* zu den Transkriptionsfaktoren und ist in zahlreiche Prozesse während der Lymphopoese involviert²⁰⁵, zum anderen existiert mit dem Immunmodulator Lenalidomid bereits ein Therapeutikum, welches im MM indirekt die *IKZF1*-Expression hemmt¹⁰⁹. Hierbei wird der *cullin ring E3 ubiquitin ligase complex (CRL4)*-Komplex dereguliert, indem Lenalidomid an die Rezeptorkomponente (CRBN) des *CRL4*-Komplex bindet. Folglich findet eine proteasomale Degradation von *IKZF1* statt^{206,207}. Auch im FL kommt

Lenalidomid bereits zum Einsatz und wird zum einen in Kombination mit Rituximab für Rezidive und im Rahmen von klinischen Studien auch als Off-label Medikament in der Erstlinien-Therapie eingesetzt^{64,208}.

4.5. Weiterführende Untersuchungen der neu identifizierten aberranten Gene zeigen potentielle therapeutische Indikationen

Die Validierung der von CNA betroffenen lokalisierten Zielgenen bzw. deren funktionelle Auswirkungen erfolgte mehrstufig auf DNA-, RNA- und Proteinebene und beinhaltete neben der FISH und der qPCR auf DNA-Ebene auch eine RT-PCR zur Messung der relativen GE auf RNA-Ebene und Western Blots bzw. IHC-Färbungen zur Detektion der Proteinexpression. Bei der Durchführung der FISH und qPCR zur Validierung von CNA und beim sich anschließenden Vergleich der beiden Methoden konnte mittels FISH ein deutlich besseres Ergebnis erzielt werden. Welche Methode hiervon die geeignetere ist, um CNA nachzuweisen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Insgesamt scheinen Zugewinne sowohl mittels FISH als auch qPCR besser nachzuweisen zu sein als hemizygoten Verluste. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse der verschiedenen Methoden schwankt stark^{122,209,210}. Zudem ist das FL für seine Heterogenität und die Existenz von Subklonen bekannt^{14,147}, was mit einer erschwerten Detektion subklonaler Aberrationen einhergeht²¹¹⁻²¹³.

Die Validierung der CNA mittels FISH, die für diese Arbeit durchgeführt wurde, war für die ausgewählten Aberrationen (1q23-, 2p16-, 7p12- und 11q24.3-Zugewinn und 8p11-Verlust) erfolgreich. Auch die bereits von unserer Arbeitsgruppe publizierten FISH-Ergebnisse zu den Verlusten in 1p, 6q und 17p innerhalb der auch hier vorliegenden FL-Kohorte¹⁸ lieferten mit der CNA-Auswertung übereinstimmende Ergebnisse. Die funktionelle Konsequenz der CNA auf RNA-Ebene erfolgte mittels Analyse der relativen GE anhand mehrerer Datensätze. Einerseits wurden bereits publizierte Daten, andererseits Daten selbst durchgeführter RT-PCRs verwendet. Gene, die in der vorliegenden FL-Kohorte als zugewonnen identifiziert wurden (*ETS-1*, *BCL11A*, *IKZF1* und *FCRL5*) wiesen in bereits publizierten Datensätzen entsprechend höhere GE auf. Demgegenüber standen erniedrigte GE für diejenigen Gene, welche bei der CNA-Analyse Verluste zeigten (*TP53*, *SESN1*, *TNFRS14* und *ADAM18*)⁶⁶. Mit Ausnahme von *SESN1*, *TP53* und *TNFRSF14* wurden dieselben Gene mittels RT-PCR untersucht und zeigten auch hierbei eine erhöhte GE für Gene in Zugewinn-, bzw. eine erniedrigte GE für Gene in Deletionsregionen. Allerdings war hier nur bei der *IKZF1*- und der *ADAM32*-Expression ein signifikanter Unterschied zwischen Fällen mit und ohne Zugewinn messbar.

Auch auf Proteinebene wurden Auswirkungen der Zugewinne mit zwei verschiedenen Methoden analysiert. IHC-Färbungen zeigten verglichen mit nicht zugewonnenen FL-Fällen

eine erhöhte IKZF1-Expression in Fällen mit Zugewinn. 14,3% (2/14) der zugewonnenen Fälle wiesen jedoch trotz Zugewinn keine erhöhte Expression auf. Einer dieser Fälle zeigte im Rahmen der Mutationsanalyse eine *IKZF1*-Missense-Mutation. Die erhöhte Expression der Fälle ohne Zugewinn kann sich durch eine anderweitige Regulierung auf epigenetischer Ebene erklären. Interessanterweise enthält *IKZF1* eine Autobindestelle für *IKZF1* selbst, was eine Autoregulierung ermöglicht. Des Weiteren wurde eine *ETS-1*-Bindestelle identifiziert und ermöglicht somit die epigenetische Regulierung durch *ETS-1*²¹⁴. Ein Fall ohne *IKZF1*-Zugewinn aber mit erhöhter Expression wies stattdessen einen Zugewinn in *ETS-1* auf. ZL mit *IKZF1*-Zugewinn zeigten ebenfalls eine erhöhte Expression des Proteins im Vergleich zu ZL ohne Zugewinn.

Das FL ist ein indolentes Lymphom mit niedriger Proliferationsrate⁹ und manifestiert sich durch anti-apoptotische Prozesse. Hierbei spielt vor allem die *BCL2*-Translokation eine elementare Rolle, ein alternativer Mechanismus für *BCL2*- Fälle ist bisher nicht identifiziert. Da der *IKZF1*-Zugewinn im FL häufig auftritt, wurden mögliche nachgeschaltete Effekte des Zugewinns auf pro- und anti-apoptotische Gene untersucht. In Fällen mit und ohne *IKZF1*-Zugewinn erfolgte dies anhand der GE von *BCL2L1*, da ein Verlust der *IKZF1*-Funktion in der akuten Lymphatischen Leukämie mit einer schlechteren Prognose einhergeht^{215–217}. Prinzipiell findet eine Herunterregulierung von *BCL2L1* durch *IKZF1* statt, die bei dieser Form der Leukämie jedoch durch eine Überexpression von CK2 unterdrückt wird²¹⁸. Andererseits wird jedoch eine erhöhte *IKZF1*-Expression für eine Resistenz von MM-Zellen gegenüber Lenalidomid verantwortlich gemacht^{109,219}. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Isoform 6 des *IKZF1*-Gens die *BCL-xL*-Expression induziert und somit eine anti-apoptotische Wirkung hervorruft²²⁰. Die für diese Arbeit erhobenen Daten zur relativen GE von *BCL2L1* zeigten keinen Unterschied zwischen Fällen mit und ohne *IKZF1*-Zugewinne. Allerdings fand keine Bestimmung der *IKZF1*-Isoform statt.

Die *ETS-1*-Expression wurde an ZL mit Zugewinn, Verlust und normaler CN untersucht. Hierbei konnte kein Unterschied der Expression in Abhängigkeit vom Kopienzahl-Status beobachtet werden. Ein diffuses Expressionsmuster wurde für *FCRL5* detektiert. Beide ZL mit Zugewinn wiesen eine hohe Proteinexpression auf. Dies wurde allerdings auch für eine ZL (OciLy10) mit normalem Kopienzahl-Status beobachtet. Die übrigen drei ZL mit normaler CN wiesen eine niedrigere Expression auf. Auch hier lässt sich die erhöhte Expression möglicherweise durch epigenetische Regulierungen erklären. *Damdinsuren et al.* zeigten eine potentiell aktivierende Rolle des Transkriptionsfaktors *nuclear factor-kappa-B* (NF-κB), sowie eine mögliche indirekte Aktivierung von *FCRL5* durch *CREBBP*²²¹.

4.6. B-Zell-Lymphom-ZL mit Zugewinnen in 11q24 und 7p12 zeigen ein differentielles Ansprechen auf *ETS-1*- und *IKZF1*-Inhibitoren

ETS-1 und *IKZF1* wurden als Kandidatengene der signifikant zugewonnenen Regionen identifiziert und als Zielgene für Viabilitätsassays ausgewählt, da für beide Gene bereits spezifische Inhibitoren existieren.

ZL mit und ohne *ETS-1*-Zugewinn wurden mittels Viabilitätsassay auf ihr Ansprechen auf den spezifischen Inhibitor YK-4-279 getestet. Jeweils eine ZL mit Zugewinn bzw. normaler Kopienzahl und zwei ZL mit Verlust wurden für 24, 48 und 72 h mit vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (0,5-1-2,5-5 μ M) inkubiert. Ein Ansprechen aller ZL war bei 5 μ M zu erkennen, während lediglich die ZL mit Zugewinn bereits bei niedrigeren Konzentrationen einen deutlichen Rückgang der viablen Zellen nach 72 h zeigte. Insgesamt zeichnete sich bei ZL ohne *ETS-1*-Zugewinn kein Muster bzgl. des Ansprechens auf YK-4-279 ab, der Rückgang viabler Zellen bei einer Behandlung der Zugewinn-ZL mit YK-4-279 soll in weiteren ZL bestätigt werden. *In-vitro* und *in-vivo* Versuche an Mäusen zeigten zudem bereits die anti-tumorale Wirkung des Inhibitors^{108,222,223}. Eine klinische Studie zur Behandlung von Patienten mit Ewing-Sarkom, die mit dem klinischen YK-4-279-Derivat TK216 behandelt wurden, zeigte ein PFS von sechs Monaten in 12,0% der Fälle^{224–226}. Ob ein differentielles Ansprechen auf verschiedene YK-4-279-Konzentrationen auch in primären FL zu beobachten ist und welche funktionelle Konsequenzen daraus abzuleiten sind, bleibt noch zu klären.

Der *IKZF1*-Inhibitor Lenalidomid wurde ebenfalls zur Behandlung von B-Zell-Lymphom-ZL verwendet. Lediglich bei einer der ZL mit *IKZF1*-Zugewinn waren Auswirkungen des Inhibitors auf die Anzahl der viablen Zellen bereits ab 1 μ M-Konzentration bei mindestens 48 h Inkubationszeit nachweisbar. Zwei andere ZL, die ebenfalls einen Zugewinn zeigten, sprachen nicht bzw. deutlich geringer auf die Behandlung an. Eine Stratifizierung zum Ansprechen der ZL auf Lenalidomid, die ausschließlich den *IKZF1*-Status berücksichtigt, ist somit nicht ausreichend. Bezieht man allerdings weitere molekularbiologischen Marker mit ein, so zeigte sich, dass die ZL mit Zugewinn, welche nicht auf die Lenalidomid-Behandlung ansprachen, eine Translokation des *c-Myc*-Gens aufwiesen, während reagierende ZL mit *IKZF1*-Zugewinn diese *c-Myc*-Translokation nicht zeigten.

Ein ähnliches Phänomen wurde bereits im MM beobachtet. MM-Zellen, welche eine Resistenz gegenüber Lenalidomid entwickelten, wiesen eine *IKZF1*-unabhängige erhöhte *c-Myc*-Expression auf, welche auf eine Translokation dieses Gens zurückzuführen war. Der CNA-Status der ZL bezüglich *IKZF1* war jedoch nicht angegeben. *Davis et al.* stellten weiterhin die Hypothese auf, dass eine gezielte *c-Myc*-Inhibition die Resistenz gegen Lenalidomid potentiell aufheben könnte²²⁷.

Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal der ZL, die ein Ansprechen auf Lenalidomid zeigte, war die *Gain-of-Function*-Mutation in *EZH2* (p.Y641F). *EZH2*-Mutationen sind sowohl im FL als auch im DLBCL häufig zu finden⁹ und werden innerhalb klinischer Studien mit dem *EZH2*-Inhibitor Tazemetostat gezielt behandelt. Im FL zeigte eine Phase II-Studie, die an Patienten mit rezidiviertem oder therapieresistentem FL durchgeführt wurde, dass der *EZH2*-Inhibitor Tazemetostat in 98% der Patienten mit *EZH2*-Mutation und in 65% der Patienten mit *EZH2*-WT das Tumolvolumen reduzieren konnte²²⁸. Die Mutation p.Y641F war in dieser Kohorte jedoch nicht untersucht worden. Auch Daten zu weiteren genetischen oder epigenetischen Markern wurden nicht erhoben; daher bleibt unklar, weshalb nicht alle Patienten mit *EZH2*-Mutation auf die Behandlung ansprechen bzw. inwiefern die Inhibition von *EZH2* eine Wirkung bei Patienten ohne Mutation erzielen konnte. Eine *in-vitro* Studie, die eine kombinierte Behandlung von DLBCL-ZL mit Tazemetostat und Lenalidomid beinhaltete, konnte entweder ein Fortschreiten des Zellzyklus oder die Apoptoseeinleitung der Zellen induzieren. Das Ansprechen der Zellen war hierbei unabhängig vom Mutationsstatus von *EZH2*²²⁹.

Anwendung findet im FL auch bereits die Kombination aus Lenalidomid und einem weiteren Therapeutikum. Lenalidomid wird im rezidivierten FL als Kombinationsgabe mit Rituximab verabreicht und zeigt ein signifikant verlängertes PFS im Vergleich zu einer Kombinationstherapie aus Rituximab und einem Placebo (39,4 vs. 14,1 Monate)¹¹⁰. Die Anwendung von Lenalidomid als Erstlinientherapie ist bisher nur in klinischen Studien getestet worden. Auch hier wurde Lenalidomid in Kombination mit Rituximab verabreicht (L+R) und mit reiner R-Gabe verglichen. Dabei zeigte sich eine leicht erhöhte Toxizität bei der Anwendung von Lenalidomid im Vergleich zu Therapeutika ohne Lenalidomid, verbesserte aber weder das Gesamtüberleben, noch das PFS^{64,208,230,231}.

Auch wurde Lenalidomid bereits in Kombination mit dem *ETS-1*-Inhibitor YK-4-279/TK-216 an DLBCL-ZL getestet und dies auch in Mausversuchen fortgeführt, wobei eine erhöhte anti-tumorale Wirkung bei der kombinierten Gabe von Lenalidomid und TK-216 beobachtet werden konnte. Eine Korrelation der Ergebnisse mit dem *TP53*-, *MYD88*- und *CARD11*-Status oder der *c-Myc*-Translokation konnte nicht beobachtet werden aber die Sensitivität der ZL gegenüber der kombinierten Behandlung war beim Vorliegen einer *BCL2*-Translokation leicht geringer¹⁰⁸.

Eine kombinierte Therapie aus Lenalidomid und einem weiteren Therapeutikum wird somit auch im FL immer bedeutsamer. Da jedoch oftmals der Mechanismus noch unbekannt ist und auch kaum Biomarker mit in die Patientenauswahl einfließen, kann hier die Erhebung gesamtgenomischer Daten einen erheblichen Mehrwert bringen, um die molekulargenetischen Merkmale der Patienten bei der Rekrutierung zu berücksichtigen. Beispielsweise lagen bei den

beschriebenen Studien keine Informationen zum CN-Status der Patienten bzgl. *IKZF1* oder dem *c-Myc*-Translokationsstatus vor. Inwiefern sich das Vorliegen eines *IKZF1*-Zugewinns und der *c-Myc*-Translokation auf die Wirksamkeit von L+R im FL auswirkt bleibt bisher unklar und es bedarf weiterer systematischer Untersuchungen. Weitere *in-vitro* Viabilitäts-Versuche an B-Zell-Lymphom-ZL mit spezifischen molekularbiologischen Merkmalen und kombinierten Therapeutika sollen hierbei zusätzliche Erkenntnisse liefern. Die Anzahl der klinischen Studien, die Lenalidomid als Therapeutikum beinhalten, ist in den letzten Jahren stetig gewachsen³⁷. So gibt es zahlreiche weitere Kombinationstherapien, die z.B. die gemeinsame Gabe eines CD20-Inhibitors (Obinutuzumab), eines *BCL2*-Inhibitors (Venetoclax) und Lenalidomid („Leverage“-Studie, NCT03980171) testen.

4.7. Weiterführende Analysen und Perspektiven

Die gesamtgenomischen Analysen von CNA und Mutationen der FL-Kohorte ergaben bemerkenswerterweise kaum Unterschiede zwischen IFL und sFL, sowie zwischen *BCL2+* und *BCL2-* FL. Dennoch konnten einzelne Gene identifiziert werden, die in den verschiedenen Subkohorten unterschiedliche Aberrations- bzw. Mutationsfrequenzen aufwiesen und somit erste Anhaltspunkte für weiterführende Analysen lieferten. Mutationen und Aberrationen, die signifikant unterschiedlich in den diversen Subkohorten (IFL und sFL bzw. *BCL2+* und *BCL2-* FL) auftraten, sollen nun in der Zukunft intensiver analysiert werden. Zum einen sollen hier GE- und Proteinexpressionsanalysen von u.a. *ARID1A*, *KMT2D*, und *ABL2* folgen, zum anderen sollen die Signalwege der Gene evaluiert werden und inwiefern sie möglicherweise auf die Tumorgenese Einfluss nehmen können oder anti-apoptotisch wirken, um eine fehlende *BCL2*-Translokation im FL kompensieren zu können. Die gesamtgenomische Charakterisierung des FL soll zudem über die DNA-Ebene hinaus fortgeführt werden, indem sowohl der Methylierungsstatus, als auch das Proteom und Metabolom der verschiedenen FL untersucht werden könnten. Darüber hinaus sollen mittels Chromatin Accessibility Assay die Chromatinstruktur weiterer Zielgene und potentielle Auswirkungen von CMG-Mutationen auf diese Struktur analysiert werden.

Möglicherweise liegen die heterogenen klinischen Verläufe des FL aber nicht unbedingt bzw. ausschließlich in den klinischen Stadien oder dem Vorhandensein bzw. Fehlen der *BCL2*-Translokation begründet, sondern in bisher nicht analysierten Genen bzw. Genregionen. Ein erster Ansatzpunkt für perspektivische Arbeiten liegt daher bei der Analyse der neu identifizierten, häufigen Mutationen und CNA. Auch hier soll die Proteinexpression der neu identifizierten aberranten Regionen in ZL untersucht werden. Zudem ist die Inhibierung verschiedener Zielmoleküle mittels small interfering RNA (siRNA) geplant, um die betreffenden Signalwege zu identifizieren und die Effekte der Intervention ggf. für therapeutische Ziele nutzen zu können. Ein Fokus wird hierbei insbesondere auf *IKZF1* und dessen Inhibition liegen. Die Bestandteile des involvierten *CLR4*-Komplex sollen gezielt an ZL sequenziert werden, die trotz des 7p12.2-Zugewinns nicht auf eine Behandlung mit Lenalidomid ansprechen. Eine wichtige Rolle soll hier auch die multivariate Analyse der identifizierten Gene mit klinischen Daten spielen, um die Risikostratifizierung der Patienten mit FL zu verbessern.

Da die Kultivierung von FL-Zellen aufgrund ihrer Abhängigkeit vom Mikromilieu bisher kaum möglich ist, soll in Kooperation ein Zellkulturmodell für FL etabliert werden, um bisherige *in-vitro* Versuche auf FL-ZL zu erweitern.

Auch das Mikromilieu spielt eine immense Rolle bei der Entstehung und Progression des FL. Die *KIR3DL1*-Mutationen konnten nicht gesichert den FL-Zellen zugeordnet werden, so dass

diese möglicherweise in den NK-Zellen lokalisiert waren. Da einige der in dieser Arbeit verwendeten Fälle als FF-Gewebe vorlag, soll an diesen Fällen eine Separation der CD20+ und CD20- Zellen durchgeführt werden, um durch die Sequenzierung der CD20-negativen (nicht FL-Zellen) Aufschluss über Mutationen der Zellen im Mikromilieu geben zu können. Innerhalb der IKP279-Studie zur retrospektiven Analyse maligner B-Zell-Lymphome werden kontinuierlich native Lymphknoten-Proben von Patienten mit FL gesammelt, die sich für solche weiterführenden Analysen gut eignen.

Ein Fokus soll auch auf die verwendeten Inhibitoren YK-4-279 und Lenalidomid gelegt werden. Beispielsweise sollen weitere ZL mittels Viabilitätsassay mit diversen genetischen Aberrationen auf das Ansprechen auf Lenalidomid und YK-4-279 getestet werden, da Lenalidomid auch im DLBCL eingesetzt wird²³². Auch eine Kombinationstherapie aus Lenalidomid und YK-4-279 bzw. dem *BCL2*-Inhibitor Venetoclax und/oder dem *EZH2*-Inhibitor Tazemetostat kann mittels *in-vitro* Versuchen getestet werden. Des Weiteren werden Viabilitätsassays unter Verwendung von *MALT1*-Inhibitoren durchgeführt.

Bisherige Untersuchungen der Isoformen von *IKZF1* ergaben unterschiedliche Auswirkungen auf Zielproteine, die in apoptotische Prozesse involviert sind. Da im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des *IKZF1*-Status auf das Ansprechen der ZL auf Lenalidomid nicht gänzlich aufgeklärt werden konnte, wäre es von besonderem Interesse die Isoformen von *IKZF1* zu untersuchen.

Im Zuge der weiterführenden Analysen sollen perspektivisch potentiell neue therapeutisch relevante Zielstrukturen identifiziert werden und ggf. Marker zur Risikostratifizierung der Patienten und zur Eignung spezifischer Therapien etabliert werden. Eine zielgerichtete, personalisierte Therapie der Patienten und die spezifische Ergänzung der bisherigen therapeutischen Strategien könnte langfristig eine kurative Kombination sein.

Abbildungen

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der B-Zell-Reifung und der zahlreichen Möglichkeiten zur Entartung. Die B-Zelle (blau) entwickelt sich vom lymphoiden Vorläufer zur differenzierten Zelle. Ein Großteil der Entwicklungsschritte findet dabei im Lymphknoten statt. Die Manifestation des FL geschieht im Keimzentrum..... 1
- Abbildung 2: IHC-Färbungen von Keimzentren benigner reaktiver Lymphknoten (rLK) (oben) und eines FL (unten) mit BCL2 und Ki67. Braune Färbung zeigt die Expression der verschiedenen Marker. Beim rLK ist BCL2 kaum exprimiert, im FL hingegen stark. Der Proliferationsmarker Ki67 ist im rLK stark, im FL jedoch nur schwach exprimiert. 2
- Abbildung 3: Einteilung des FL in die verschiedenen Stadien I-IV. Rote Bereiche kennzeichnen schematisch die Lokalisation der Tumoren³⁰. 4
- Abbildung 4: Schema zur Therapieentscheidung bei einer FL-Diagnose⁴⁸. 6
- Abbildung 5: Darstellung der Wahrscheinlichkeit des Überlebens mit FL ab der Diagnosestellung in Jahren⁶⁷. 8
- Abbildung 6: a: Mittels Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde die BCL2-Translokation in knapp 90% der sFL aber nur in ca. 50% der IFL detektiert⁶⁸. b: Anhand der Genexpression konnte gezeigt werden, dass sich die Gensignaturen zwischen IFL und sFL unterscheiden. c: Patienten mit IFL, die eine sFL-ähnliche Gensignatur aufweisen, haben einen schlechteren klinischen Verlauf als „klassische“ IFL. 9
- Abbildung 7: Schematische Darstellung unterschiedlich degradierter DNA-Fragmente und die daraus resultierende Anzahl an erzeugten Amplikons⁷².19
- Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs des OncoScan CNV Assay. a: Aufbau einer MIP zur Detektion von SNPs in linearer und zirkulärer Form nach Bindung an die Zielsequenz. b: Aufteilen der Ansätze und Auffüllen der 1bp-Lücke mit dem komplementären Nukleotid. c: Enzymatische Auftrennung der zirkulären Form. d: Die MIP liegt in umgekehrter Richtung vor und kann amplifiziert werden. e: PCR und Biotin-Einbau. f: Separierung der Markierungssequenz zur Identifikation. g: Hybridisierung der Markierungssequenz auf den Chip und Färbung. h: Die Chips sind bereit zum Scannen.23
- Abbildung 9: Schematische Darstellung der Plattenbelegung für den Viabilitätsassay mit vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.35
- Abbildung 10: Aufstellung der FL-Fälle, die in die CNA- und WES-Analysen eingeschlossen wurden. Abgebildet ist auch der Anteil der Fälle mit und ohne BCL2-Translokation.41

- Abbildung 11: Übereinstimmung der FISH- und delta-PCR-Ergebnisse. Der prozentuale Anteil übereinstimmender Ergebnisse ist in blau dargestellt, der Anteil mit positivem FISH- aber negativem delta-PCR-Ergebnis in orange und der Anteil an negativer FISH aber positiver delta-PCR in grau.....42
- Abbildung 12: Zugewinne und Verluste der IFL wurden mittels GISTIC 2.0 weiter eingegrenzt. Zugewinne sind in rot abgebildet, Verluste in blau. FDR-Werte sind unter der Grafik angegeben. Auf der linken Seite sind Arm-level Aberrationen dargestellt, die entsprechenden Chromosomen sind in der Mitte der Grafik angegeben und rechts die als aberrant identifizierten fokalen Regionen.45
- Abbildung 13: Signifikante Zugewinn- und Verlustregionen der sFL. Zugewinne sind in rot, Verluste in blau dargestellt. FDR-Werte sind unter der Grafik angegeben, G-Werte, welche die Amplitude und Frequenz der Aberration angeben, stehen über der Grafik. Auf der linken Seite sind die Chromosomen angegeben, rechts die identifizierten Regionen.48
- Abbildung 14: a: Somatische Mutationen der IFL. Dargestellt sind die Mutationen pro Fall als farbiges Quadrat. Die farbliche Kodierung entspricht unterschiedlichen Mutationstypen. Die Gene mit entsprechendem Mutationsprofil sind nach absteigender Frequenz aufgelistet. Im unteren Bereich der Grafik sind weiterhin farblich das Geschlecht der Patienten (gender), das klinische Stadium (stage), das Auftreten der t(14;18)-Translokation und die Zugehörigkeit zu den IFL oder sFL (stage class) abgebildet. b: Des Weiteren sind die logarithmierten q-Wert der Mutation und die Cancer Cell Fraction (CCF) für die IFL abgebildet. Links ist die Verteilung der synonymen und nicht-synonymen Mutationen, sowie rechts die Farbcodierung zu erkennen. c: Somatische Mutationen der sFL.....52
- Abbildung 15: MSV-Darstellung der CNA von FL I und FL II. Zugewinne sind rot und Verluste blau dargestellt. Der prozentuale Anteil der Aberrationen entlang der Chromosomen (X-Achse) ist auf der Y-Achse dargestellt.....53
- Abbildung 16: MSV-Darstellung der CNA von IFL und sFL. Zugewinne sind rot und Verluste blau dargestellt. Der prozentuale Anteil der Aberrationen entlang der Chromosomen (X-Achse) ist auf der Y-Achse dargestellt.....54
- Abbildung 17: Frequenzen der häufigsten Mutationen in IFL (blau) und sFL (gelb). Gene, deren Frequenzen sich in IFL und sFL signifikant unterscheiden, sind mit einem Stern gekennzeichnet.55
- Abbildung 18: IFL und sFL wiesen unterschiedliche Mutationsmuster in den Genen CREBBP und KMT2D auf. Die Grafik zeigt die relativen Anteile der verschiedenen Mutationsarten.

- Missense- (hellblau), Nonsense- (orange), Frameshift- (grau), Spleißstellenmutationen (Splicing, gelb), Deletionen (dunkelblau) und Insertionen (grün) sind dargestellt.....55
- Abbildung 19: MSV-Darstellung der CNA von BCL2+ und BCL2- IFL. Die Frequenz der Zugewinne ist in rot und die der Verluste in blau abgebildet. Die Frequenz wird auf der y-Achse gezeigt und die x-Achse zeigt die Chromosomen.56
- Abbildung 20: Frequenzen der Mutationen der BCL2+ (dunkelblau) und BCL2+ FL. Signifikant unterschiedliche Frequenzen zwischen den BCL2+ und BCL2- FL sind mit einem Stern gekennzeichnet.58
- Abbildung 21: Relative Quantifizierung der Kopienzahl von ETS-1 und BCL11A in den B-Zell-Lymphom-ZL RL und OciLy10 mittels qPCR.60
- Abbildung 22: Schmelzkurven der Amplifikation von BCL11A (a) und ETS-1 (b). Die logarithmierte Fluoreszenz (Y-Achse) ist in Abhängigkeit der Temperatur (X-Achse) dargestellt.61
- Abbildung 23: Zellblöcke mit verschiedenen Anteilen an RL- (ETS1-Zugewinn) und OciLy10-Zellen (BCL11A-Zugewinn) wurden hybridisiert und ihre Signalkonstellation untersucht. a: Die RL-ZL wurde in drei verschiedenen prozentualen Anteil hybridisiert. 100% RL-Zellen, die Kombination aus 50% RL- und 50% OciLy10-Zellen und 0% RL (100% OciLy10). Der Anteil an gezählten Zellen, welcher mehr als zwei rote Signale aufwies, ist in orange dargestellt, der Anteil mit nur zwei Signalen in grün. b: Die OciLy10-ZL wurde in drei verschiedenen prozentualen Anteilen hybridisiert. 100% OciLy10-Zellen, die Kombination aus 50% OciLy10- und 50% RL-Zellen und 0% OciLy10 (100% RL). Der Anteil an gezählten Zellen, welcher mehr als zwei grüne Signale aufwies, ist in orange dargestellt, der Anteil mit nur zwei Signalen in grün.....62
- Abbildung 24: a: Ergebnisse der Validierung der CNA ausgewählter Regionen. Für die jeweilige Region wurde die Anzahl der mittels ChAS bzw. FISH analysierten Fälle mit bzw. ohne Aberration dargestellt. b: Darstellung der Sensitivität und Spezifität der FISH-Validierung für die Regionen 1q23, 2p16, 7p12, 8p11 und 11q24.3. c: Mikroskopische Aufnahme eines Gewebeschnitts bei 100-facher Vergrößerung. Die Nuklei sind blau gefärbt, rote und grüne Signale zeigen die Anzahl der Kopien des jeweiligen Gens. Rote Signale kennzeichnen das ETS-1-Gen und grüne Signale BCL11A. Die weißen Pfeile markieren Nuklei, die mehr als zwei grüne Signale aufweisen und daher einen Zugewinn für BCL11A abbilden.63
- Abbildung 25: Die Validierung der CNA-Ergebnisse erfolgte zusätzlich anhand bereits publizierter FISH-Daten für die Verlust-Regionen 1p, 6q und 17p. Dargestellt ist die Übereinstimmung der CNA-Ergebnisse mit den FISH-Resultaten (Koinzidenz).....64

- Abbildung 26: Sequenzen der mittels Sanger-Sequenzierung validierten Gene STAT6, EZH2, BCL7A und ABL2. Die schwarzen Pfeile weisen jeweils auf die Mutationen der Gene hin
a: Die Sequenz zeigt eine Missense-Mutation der Variante p.D419H in Exon 12 des STAT6-Gens. b: Dargestellt ist ein Ausschnitt des Exons 16 von EZH2 mit der Missense-Mutation als Variante p.Y641F. c: Der Ausschnitt einer Sequenz von BCL7A zeigt die Missense-Mutation in Exon 1 mit der Variante p.D17G. d: Innerhalb der ABL2-Sequenz sind zwei Mutationen zu erkennen, welche die Varianten p.G742G und p-G743S darstellen.65
- Abbildung 27: Auswertung der GE verschiedener Gene aus rekurrent aberranten Regionen, die im Rahmen des LLMPP-Projekts hinsichtlich ihrer Expression untersucht wurden. Folgende Gene wurden hierbei analysiert: ETS-1 (hellblau), BCL11A (orange), IKZF1 (grau), FCRL5 (gelb), TP53 (grün), SESN1 (dunkelblau), TNFRS14 (braun) und ADAM18 (dunkelgrau).67
- Abbildung 28: GE-Analysen ausgewählter Zielgene in den frequenten und signifikant aberranten Regionen. Die relative GE für Fälle mit und ohne jeweilige Aberration sind abgebildet. a: FCRL5. b: BCL11A c: REL d: IKZF1 e: ADAM32 f: ETS-1 g: FLI1.68
- Abbildung 29: IHC-Färbungen von FL oder rLK mit diversen AK in 20-facher Vergrößerung. a: FL ohne IKZF1-Zugewinn zeigt keine IKZF1-Expression. b: FL mit IKZF1-Zugewinn zeigt eine erhöhte Expression von IKZF1. c: Unspezifische Färbung eines FL mit einem ETS-1-AK. d: Keine Färbung eines rLK mit einem FCRL5-AK.69
- Abbildung 30: Darstellung der verschiedenen Konstellationen der CNA-Ergebnisse und der IKZF1-Expression in FL mit und ohne IKZF1-Zugewinn. Der prozentuale Anteil an Fällen mit niedriger bzw. ohne Expression ist in hellblau und der Anteil an Fällen mit erhöhter Expression in dunkelblau dargestellt.69
- Abbildung 31: Die Proteinexpression der Zielgene IKZF1, ETS-1 und FCRL5 wurde mittels WB an B-Zell-Lymphom-ZL getestet, die entweder eine normale (n) Kopienzahl, einen Zugewinn (+) oder einen Verlust (-) aufwiesen. Die ZL OciLy 3 (O3), OciLy10 (O10), SUDHL10 (SU10), SUDHL6 (SU6) U2932 und Granta519 (Granta), sowie die ZL HLY1, RL, SUDHL 5 (SU5) und HT wurden analysiert. a: Die Proteinexpression von IKZF und dem konstitutiv exprimierten Gen α -Tubulin sind für ZL mit (+) und ohne (n) IKZF1-Zugewinn dargestellt. b: Die Proteinexpression von ETS-1 und α -Tubulin sind für ZL mit und ohne ETS-1-Zugewinn, sowie mit ETS-1-Verlust (-) dargestellt. c: Die Proteinexpression von FCRL5 und α -Tubulin ist für ZL mit und ohne FCRL5-Zugewinn abgebildet. d-f: Darstellung der mittels semi-quantitativer Bestimmung ermittelten relativen Expression des Zielgens zum konstitutiv exprimierten Gen.70

Abbildung 32: Behandlung verschiedener B-Zell-Lymphom-ZL mit dem ETS-1-Inhibitor YK-4-279. Die Konzentrationen des Inhibitors betragen 0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M und 5 μ M (X-Achse). Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen (Y-Achse) ist für die Inkubationszeiten 24h (blau), 48h (lila) und 72h (orange) dargestellt. Die ZL RL zeigte im OncoScan CNV Assay einen Zugewinn in ETS-1 (a). SUDHL10 wies eine normale Kopienzahl (CN=2) auf (b). Die ZL HT (c), SUDHL6 (d) und U2932 (e) wiesen Verluste in ETS-1 auf.72

Abbildung 33: Behandlung verschiedener B-Zell-Lymphom-ZL mit dem IKZF1-Inhibitor Lenalidomid. Dargestellt sind die Anteile der lebenden Zellen (Y-Achse) unter verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Diese sind 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M (X-Achse). Die Zellen wurden entweder 24 h (blau), 48 h (lila) oder 72 h (orange) inkubiert. a-c: Die ZL SUDHL6, SUDHL10 und OciLy10 zeigten einen IKZF1-Zugewinn. d-g: Die ZL RL, Granta519, U2932 und HT haben eine normale Kopienzahl (CN=2) für IKZF1.74

Abbildung 34: a: Proteinexpression von Zellen verschiedenen B-Zell-Lymphom-ZL mittels Western Blot. ZL mit IKZF1-Zugewinn (+) und ohne (n) wurden mit dem IKZF1-Inhibitor Lenalidomid behandelt und die Expression von IKZF1 in OciLy10 (O10) und U2932 untersucht. b: Darstellung der mittels semi-quantitativer Bestimmung ermittelten relativen Expression des Zielgens der behandelten (+) und unbehandelten (-) Zellen zum konstitutiv exprimierten Gen.75

Abbildung 35: FACS-Messung der MACS-separierten FL-Probe. a: Unseparierter Ansatz, der zwei Fraktionen zeigt. CD20- Zellen sind im orangenen Abschnitt zu sehen, CD20+ Zellen im grünen Bereich. b: Im CD20- Ansatz sind fast ausschließlich CD20+ Zellen enthalten. c: Der Ansatz mit CD20+ Tumorzellen enthält überwiegend CD20+ positive Zellen.76

Abbildung 36: Relative GE von FL-Subkohorten mit spezifischen Mutationsmustern. a+c: Für KMT2D und CREBBP wurde die GE von IFL mit Spleißstellen-Mutationen, Mutationen im Exon und der GE eines rLK verglichen. b+d: Die vergleichenden GE von sFL mit Exon-Mutationen, WT-sFL und IFL mit Spleißstellen-Mutationen ist für KMT2D und CREBBP dargestellt.78

Abbildung 37: GE-Analysen von FL mit spezifischem Aberrations- und Mutationsmuster. a: Relative Bax-GE von FL mit und ohne STAT6-Mutationen. b: Relative BCL2L1-GE von FL mit und ohne STAT6-Mutation. c: Relative BCL2-GE von FL mit und ohne STAT6-Mutationen. d: Relative BCL2L1-GE von FL mit und ohne IKZF1-Zugewinn.79

Abbildung 38: Korrelation des PFS von Patienten mit IFL mit spezifischen Aberrationen bzw. somatischen Mutationen. a: Kaplan-Meier-Kurve von Patienten mit IFL mit oder ohne BCL2-Zugewinn. Die Kurve der Patienten mit BCL2-Zugewinn ist in rot abgebildet, die der Patienten ohne Zugewinn in blau. Zum jeweiligen Zeitpunkt ist die Anzahl der Patienten unterhalb der Abbildung zu sehen. b: HR-Werte (=Hazard Ratio) und p-Werte der

analysierten CNA und somatischen Mutationen. Der signifikante p-Wert für den BCL2-Zugewinn ist hellblau hinterlegt.80

Tabellen

Tabelle 1: Oligonukleotid-Sequenzen der HBB-Oligonukleotid-Kombinationen für die Qualitäts-PCR	17
Tabelle 2: Pipettierschema für die Zubereitung der Qualitäts-PCR	18
Tabelle 3: Bedingungen der PCR	18
Tabelle 4: Menge eingesetzter DNA und entsprechende Amplikonzahl.....	19
Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine RT-PCR für FTH1	20
Tabelle 6: PCR-Bedingungen des FTH1-Taqman Assays	20
Tabelle 7: Zuordnung der gewählten BAC-Klone zu den Zielgenen.....	26
Tabelle 8: Pipettierschema zur Herstellung eines einfachen Ansatzes des qPCR Mastermixes	28
Tabelle 9: PCR-Bedingungen der qPCR mittels SYBRgreen-Technologie	29
Tabelle 10: Pipettierschema zur Durchführung der PCR im Rahmen einer Sanger-Sequenzierung	30
Tabelle 11: Pipettierschema zum Ansetzen einer Sequenzier-PCR.....	30
Tabelle 12: PCR-Bedingungen für die Sequenzier-PCR.....	30
Tabelle 13: Reaktionsschema der GE-Analyse mittels TaqMan Assay.....	31
Tabelle 14: Temperaturbedingungen der qPCR des Chromatin Accessibility Assays.....	33
Tabelle 15: Zusammensetzung des Polyacrylamid-Gels für SDS-PAGE	36
Tabelle 16: Präparation der AK zur IHC-Färbungen von FL und rLK.	37
Tabelle 17: Anteile der in den Zellblöcken fixierten ZL.....	38
Tabelle 18: Aufstellung der zur Verfügung stehenden Fälle für die genomische Charakterisierung.....	39
Tabelle 19: Ergebnisse der QC der FL-Fälle für die jeweiligen Kohorten.....	39
Tabelle 20: Darstellung bereits bekannter CNA im FL, die mit Frequenzen >15% in einer Kohorte auftraten.....	44
Tabelle 21: Neu identifizierte, häufig aberrante Regionen in IFL und sFL	45
Tabelle 22: Chromosom 7 enthielt zahlreiche signifikante einzelne Regionen, die mittels GISTIC 2.0 identifiziert wurden. Die Regionen sind mit den zugehörigen q-Werten und den inkludierten Genen aufgelistet.	46

Tabelle 23: Mittels GISTIC 2.0 konnten die häufig aberranten Regionen der IFL auf die signifikantesten Gene eingegrenzt werden.	47
Tabelle 24: Mittels GISTIC 2.0 können die frequent aberranten Regionen der sFL auf die signifikantesten Regionen eingegrenzt werden	50
Tabelle 25: Frequenzunterschiede der CNA in BCL2- und BCL2+ IFL.....	57
Tabelle 26: Zuordnung der Gene zu ihrem Locus und der Art der Aberration, welche im LLMPP-Projekt auf ihre Expression hin untersucht wurden.	66
Tabelle 27: Die GE identifizierter Zielgene wurde mittels RT-PCR analysiert. Dargestellt sind die untersuchten Regionen und die darin liegenden Gene	67
Tabelle 28: Ct-Werte der jeweiligen FL-Probe und das zugehörige FE. Der Mutationsstatus von CREBBP, KMT2D, EP300 und EZH2 sind für fünf der FL-Proben angegeben, die mittels Chromatin Accessibility Assay untersucht wurden, Zusätzlich ist der Wert des FE für jede Probe dargestellt. Werte des FE, die für ein Euchromatin sprechen, sind rot markiert.	77

References

1. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, et al. *Krebs in Deutschland für 2017/2018*; 2021.
2. Kanas G, Ge W, Quek RGW, Keeven K, Nersesyan K, Jon EA. Epidemiology of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma (FL) in the United States and Western Europe: population-level projections for 2020-2025. *Leukemia & lymphoma*. 2022;63(1):54-63. Published September 11, 2021.
3. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine*. 1982;307(20):1231-1236.
4. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science (New York, N.Y.)*. 1984;226(4678):1097-1099.
5. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996;381(6585):751-758.
6. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science (New York, N.Y.)*. 1985;229(4720):1390-1393.
7. Roulland S, Faroudi M, Mamessier E, Sungalee S, Salles G, Nadel B. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. *Advances in immunology*. 2011;111:1-46.
8. Sungalee S, Mamessier E, Morgado E, et al. Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(12):5337-5351. Published November 10, 2014.
9. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., eds. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. World Health Organization classification of tumours.
10. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1720-1748. Published June 22, 2022.
11. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(19):8910-8914.
12. Limpens J, Stad R, Vos C, et al. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood*. 1995;85(9):2528-2536.
13. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1996;14(4):1333-1344.

14. Green MR, Gentles AJ, Nair RV, et al. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood*. 2013;121(9):1604-1611. Published January 7, 2013.
15. Schmidt J, Ramis-Zaldivar JE, Bonzheim I, et al. CREBBP gene mutations are frequently detected in in situ follicular neoplasia. *Blood*. 2018;132(25):2687-2690. Published November 6, 2018.
16. Loeffler M, Kreuz M, Haake A, et al. Genomic and epigenomic co-evolution in follicular lymphomas. *Leukemia*. 2015;29(2):456-463. Published July 16, 2014.
17. Bödör C, Grossmann V, Popov N, et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood*. 2013;122(18):3165-3168. Published September 19, 2013.
18. Horn H, Jurinovic V, Leich E, et al. Molecular Cytogenetic Profiling Reveals Similarities and Differences Between Localized Nodal and Systemic Follicular Lymphomas. *HemaSphere*. 2022;6(9):e767. Published August 10, 2022.
19. Schmidt J, Salaverria I, Haake A, 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):1103-1112. Published October 23, 2013.
20. Cheung K-JJ, Shah SP, Steidl C, et al. Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances. *Blood*. 2009;113(1):137-148. Published August 14, 2008.
21. Jong D de, Koster A, Hagenbeek A, et al. Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica*. 2009;94(1):70-77. Published December 4, 2008.
22. Scott DW, Steidl C. The classical Hodgkin lymphoma tumor microenvironment: macrophages and gene expression-based modeling. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. 2014;2014(1):144-150. Published November 18, 2014.
23. Leval L de, Jaffe ES. Lymphoma Classification. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*. 2020;26(3):176-185.
24. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016;66(6):443-459. Published September 12, 2016.
25. Cerhan JR. Epidemiology of Follicular Lymphoma. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2020;34(4):631-646. Published May 5, 2020.
26. National Cancer Institute. Cancer Stat Facts-Follicular Lymphoma. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/follicular.html>.

27. Cancer Research UK. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/non-hodgkin-lymphoma/survival#:~:text=Generally%20for%20people%20with%20follicular,years%20or%20more%20after%20diagnosis.>
28. Mounier M, Bossard N, Remontet L, et al. Changes in dynamics of excess mortality rates and net survival after diagnosis of follicular lymphoma or diffuse large B-cell lymphoma: comparison between European population-based data (EUROCARE-5). *The Lancet. Haematology*. 2015;2(11):e481-91. Published October 23, 2015.
29. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(27):3059-3068.
30. American Childhood Cancer Organization. CHILDHOOD HODGKIN LYMPHOMA DISEASE – STAGES AND PROGNOSIS. <https://www.acco.org/blog/childhood-hodgkin-lymphoma-disease-stages-and-prognosis/>.
31. Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*. 2004;104(5):1258-1265. Published May 4, 2004.
32. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *The Lancet. Oncology*. 2015;16(9):1111-1122. Published August 6, 2015.
33. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *American journal of clinical oncology*. 1982;5(6):649-655.
34. Pham RN, Gooley TA, Keeney GE, et al. The impact of histologic grade on the outcome of high-dose therapy and autologous stem cell transplantation for follicular lymphoma. *Bone marrow transplantation*. 2007;40(11):1039-1044. Published October 8, 2007.
35. Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. *British journal of haematology*. 2012;156(2):225-233. Published November 30, 2011.
36. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S, et al. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2021;32(3):298-308. Published November 26, 2020.
37. Cahill KE, Smith SM. Follicular Lymphoma: a Focus on Current and Emerging Therapies. *Oncology (Williston Park, N. Y.)*. 2022;36(2):97-106.
38. Ngu H, Takiar R, Phillips T, Okosun J, Sehn LH. Revising the Treatment Pathways in Lymphoma: New Standards of Care-How Do We Choose? *American Society of Clinical*

- Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting.* 2022;42:1-14.
39. Batlevi CL, Sha F, Alperovich A, et al. Follicular lymphoma in the modern era: survival, treatment outcomes, and identification of high-risk subgroups. *Blood cancer journal.* 2020;10(7):74. Published July 17, 2020.
40. Solal-Céligny P, Bellei M, Marcheselli L, et al. Watchful waiting in low-tumor burden follicular lymphoma in the rituximab era: results of an F2-study database. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2012;30(31):3848-3853. Published September 24, 2012.
41. Pugh TJ, Ballonoff A, Newman F, Rabinovitch R. Improved survival in patients with early stage low-grade follicular lymphoma treated with radiation: a Surveillance, Epidemiology, and End Results database analysis. *Cancer.* 2010;116(16):3843-3851.
42. Hoskin PJ, Kirkwood AA, Popova B, et al. 4 Gy versus 24 Gy radiotherapy for patients with indolent lymphoma (FORT): a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet Oncology.* 2014;15(4):457-463.
43. Friedberg JW, Byrtek M, Link BK, et al. Effectiveness of first-line management strategies for stage I follicular lymphoma: analysis of the National LymphoCare Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2012;30(27):3368-3375. Published August 20, 2012.
44. Herfarth K, Borchmann P, Schnaidt S, et al. Rituximab With Involved Field Irradiation for Early-stage Nodal Follicular Lymphoma: Results of the MIR Study. *HemaSphere.* 2018;2(6):e160. Published November 30, 2018.
45. Michallet A-SAS, Lebras LL, Bauwens DD, et al. Early stage follicular lymphoma: what is the clinical impact of the first-line treatment strategy? *Journal of hematology & oncology.* 2013;6:45. Published July 1, 2013.
46. Pulsoni A, Della Starza I, Frattarelli N, et al. Stage I/II follicular lymphoma: spread of bcl-2/IgH+ cells in blood and bone marrow from primary site of disease and possibility of clearance after involved field radiotherapy. *British journal of haematology.* 2007;137(3):216-220.
47. Buske C, Dreyling M, Herfarth K, et al. Leitlinie Follikuläres Lymphom. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/follikulaeres-lymphom/@@guideline/html/index.html>.
48. Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet (London, England).* 2013;381(9873):1203-1210. Published February 20, 2013.

49. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2005;106(12):3725-3732. Published August 25, 2005.
50. Marcus R, Davies A, Ando K, et al. Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2017;377(14):1331-1344.
51. Junlén HR, Peterson S, Kimby E, et al. Follicular lymphoma in Sweden: nationwide improved survival in the rituximab era, particularly in elderly women: a Swedish Lymphoma Registry study. *Leukemia*. 2015;29(3):668-676. Published August 25, 2014.
52. Sarkozy C, Maurer MJ, Link BK, et al. Cause of Death in Follicular Lymphoma in the First Decade of the Rituximab Era: A Pooled Analysis of French and US Cohorts. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2019;37(2):144-152. Published November 27, 2018.
53. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M, et al. Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(32):5165-5169. Published October 6, 2008.
54. Federico M, Caballero Barrigón MD, Marcheselli L, et al. Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis. *The Lancet Haematology*. 2018;5(8):e359-e367.
55. Casulo C, Barr PM. How I treat early-relapsing follicular lymphoma. *Blood*. 2019;133(14):1540-1547. Published January 30, 2019.
56. Vidal L, Gafer-Gvili A, Salles G, et al. Rituximab maintenance improves overall survival of patients with follicular lymphoma-Individual patient data meta-analysis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2017;76:216-225. Published March 21, 2017.
57. Barr PM, Saylor GB, Spurgeon SE, et al. Phase 2 study of idelalisib and entospletinib: pneumonitis limits combination therapy in relapsed refractory CLL and NHL. *Blood*. 2016;127(20):2411-2415. Published March 11, 2016.
58. Gopal AK, Kahl BS, Vos S de, et al. PI3K δ inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2014;370(11):1008-1018. Published January 22, 2014.
59. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *The New England journal of medicine*. 2017;377(26):2545-2554. Published December 10, 2017.

60. Ribrag V, Kim WS, Bouabdallah R, et al. Safety and efficacy of abexinostat, a pan-histone deacetylase inhibitor, in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *Haematologica*. 2017;102(5):903-909. Published January 25, 2017.
61. Kirschbaum M, Frankel P, Popplewell L, et al. Phase II study of vorinostat for treatment of relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(9):1198-1203. Published February 7, 2011.
62. Ogura M, Ando K, Suzuki T, et al. A multicentre phase II study of vorinostat in patients with relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma. *British journal of haematology*. 2014;165(6):768-776. Published March 12, 2014.
63. Leonard JP, Jung S-H, Johnson J, et al. Randomized Trial of Lenalidomide Alone Versus Lenalidomide Plus Rituximab in Patients With Recurrent Follicular Lymphoma: CALGB 50401 (Alliance). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(31):3635-3640. Published August 24, 2015.
64. Morschhauser F, Nastoupil L, Feugier P, et al. Six-Year Results From RELEVANCE: Lenalidomide Plus Rituximab (R2) Versus Rituximab-Chemotherapy Followed by Rituximab Maintenance in Untreated Advanced Follicular Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2022;40(28):3239-3245. Published August 10, 2022.
65. Lackraj T, Goswami R, Kridel R. Pathogenesis of follicular lymphoma. *Best practice & research. Clinical haematology*. 2018;31(1):2-14. Published November 1, 2017.
66. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *The New England journal of medicine*. 2004;351(21):2159-2169.
67. Leich E, Hoster E, Wartenberg M, et al. Similar clinical features in follicular lymphomas with and without breaks in the BCL2 locus. *Leukemia*. 2016;30(4):854-860. Published December 1, 2015.
68. Staiger AM, Hoster E, Jurinovic V, et al. Localized- and advanced-stage follicular lymphomas differ in their gene expression profiles. *Blood*. 2020;135(3):181-190.
69. Leich E, Maier C, Bomben R, et al. Follicular lymphoma subgroups with and without t(14;18) differ in their N-glycosylation pattern and IGHV usage. *Blood advances*. 2021;5(23):4890-4900.
70. Engelhard, M: Unterhalt, M, Hansmann M, Stuschke M. Follicular lymphoma: curability by radiotherapy in limited stage nodal disease ? updated results of a randomized trial. *Annals of Oncology*. 2011;22:iv90-iv91.
71. Fluidigm Corporation. Access Array™ System for Illumina Sequencing Systems User Guide:145.

72. Wong SQ, Li J, Tan AY-C, et al. Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. *BMC medical genomics*. 2014;7:23. Published May 13, 2014.
73. Lin M-T, Tseng L-H, Rich RG, et al. Δ -PCR, A Simple Method to Detect Translocations and Insertion/Deletion Mutations. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2011;13(1):85-92. Published December 23, 2010.
74. Horn H, Bausinger J, Staiger AM, et al. Numerical and structural genomic aberrations are reliably detectable in tissue microarrays of formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples by fluorescence in-situ hybridization. *PloS one*. 2014;9(4):e95047. Published April 14, 2014.
75. Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010;463(7283):899-905.
76. Luo F. A systematic evaluation of copy number alterations detection methods on real SNP array and deep sequencing data. *BMC bioinformatics*. 2019;20(25):1-16.
77. Zare F. An evaluation of copy number variation detection tools for cancer using whole exome sequencing data. *BMC bioinformatics*. 2017;18(1):1-13.
78. Foster JM, Oumie A, Togneri FS, et al. Cross-laboratory validation of the OncoScan® FFPE Assay, a multiplex tool for whole genome tumour profiling. *BMC medical genomics*. 2015;8:5. Published February 18, 2015.
79. Thermo Fisher Scientific. OncoScan™ CNV Assay. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/902695#/902695> (.)
80. Hardenbol P, Banér J, Jain M, et al. Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes. *Nature biotechnology*. 2003;21(6):673-678. Published May 5, 2003.
81. Wang Y, Moorhead M, Karlin-Neumann G, et al. Analysis of molecular inversion probe performance for allele copy number determination. *Genome biology*. 2007;8(11):R246.
82. Jung H-S. Utilization of the oncoscan microarray assay in cancer diagnostics. *Applied cancer research*. 2017;37(1):1-8.
83. Thermo Fisher Scientific. UserGuide OncoScan CNV FFPE Assay Kit. 2015.
84. Thermo Fisher Scientific. Chromosome Analysis Suite (ChAS) v4.2 User Guide.
85. Wagener R, Seufert J, Raimondi F, et al. The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma. *Blood*. 2019;133(9):962-966. Published December 19, 2018.
86. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.

87. Mermel CH. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome biology*. 2011;12(4):1-14.
88. Beroukhim R, Getz G, Nghiemphu L, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(50):20007-20012. Published December 6, 2007.
89. van Loo P, Nordgard SH, Lingjærde OC, et al. Allele-specific copy number analysis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(39):16910-16915. Published September 13, 2010.
90. Roussy G. EaCoN. <https://github.com/gustaveroussy/EaCoN>. Accessed February 24, 2023.
91. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*. 2001;25(4):402-408.
92. Klemm SL, Shipony Z, Greenleaf WJ. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature reviews. Genetics*. 2019;20(4):207-220.
93. Tsompana M, Buck MJ. Chromatin accessibility: a window into the genome. *Epigenetics & chromatin*. 2014;7(1):33. Published November 20, 2014.
94. Abcam. ab185901 – Chromatin Accessibility Assay Kit.
95. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, ed. *Assay Guidance Manual: Cell Viability Assays*; 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
96. Davarinejad H. Quantifications of Western Blots with ImageJ. <https://www.yorku.ca/yisheng/Internal/Protocols/ImageJ.pdf>. Accessed 31.3.23.
97. Mehrotra M, Luthra R, Abraham R, et al. Validation of quantitative PCR-based assays for detection of gene copy number aberrations in formalin-fixed, paraffin embedded solid tumor samples. *Cancer genetics*. 2017;212-213:24-31. Published March 20, 2017.
98. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*. 1958;53(282):457.
99. Kalmbach S, Grau M, Zapukhlyak M, et al. Novel insights into the pathogenesis of follicular lymphoma by molecular profiling of localized and systemic disease forms. *Leukemia*. 2023;37(10):2058-2065. Published August 10, 2023.
100. Viardot Aa, Barth TFE, Möller P, Döhner H, Bentz M. Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. *Seminars in cancer biology*. 2003;13(3):183-190.
101. Viardot A, Möller P, Högel J, et al. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(23):4523-4530.

102. Johnson NA, Al-Tourah A, Brown CJ, Connors JM, Gascoyne RD, Horsman DE. Prognostic significance of secondary cytogenetic alterations in follicular lymphomas. *Genes, chromosomes & cancer*. 2008;47(12):1038-1048.
103. Salaverria I, Martin-Guerrero I, Wagener R, et al. A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of MYC-negative high-grade B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma. *Blood*. 2014;123(8):1187-1198. Published January 7, 2014.
104. Horn H, Kalmbach S, Wagener R, et al. A Diagnostic Approach to the Identification of Burkitt-like Lymphoma With 11q Aberration in Aggressive B-Cell Lymphomas. *The American journal of surgical pathology*. 2021;45(3):356-364.
105. Zamò A, Pischmarov J, Schlesner M, et al. Differences between BCL2-break positive and negative follicular lymphoma unraveled by whole-exome sequencing. *Leukemia*. 2018;32(3):685-693. Published August 21, 2017.
106. D'haene B, Vandesompele J, Hellemans J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods (San Diego, Calif.)*. 2010;50(4):262-270. Published January 6, 2010.
107. Seth A, Papas TS. The c-ets-1 proto-oncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated. *Oncogene*. 1990;5(12):1761-1767.
108. Spriano F, Chung EYL, Gaudio E, et al. The ETS Inhibitors YK-4-279 and TK-216 Are Novel Antilymphoma Agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019;25(16):5167-5176. Published June 10, 2019.
109. Krönke J, Udeshi ND, Narla A, et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science (New York, N.Y.)*. 2014;343(6168):301-305. Published November 29, 2013.
110. Leonard JP, Trneny M, Izutsu K, et al. AUGMENT: A Phase III Study of Lenalidomide Plus Rituximab Versus Placebo Plus Rituximab in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2019;37(14):1188-1199. Published March 21, 2019.
111. Juskevicius D, Müller A, Hashwah H, Lundberg P, Tzankov A, Menter T. Characterization of the mutational profile of 11 diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Leukemia & lymphoma*. 2018;59(7):1710-1716. Published October 18, 2017.
112. Xia R, Cheng Y, Han X, Wei Y, Wei X. Ikaros Proteins in Tumor: Current Perspectives and New Developments. *Frontiers in molecular biosciences*. 2021;8:788440. Published December 7, 2021.
113. Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *American journal of clinical pathology*. 1995;103(4):472-478.

114. Bao F, Munker R, Lowery C, et al. Comparison of FISH and quantitative RT-PCR for the diagnosis and follow-up of BCR-ABL-positive leukemias. *Molecular diagnosis & therapy*. 2007;11(4):239-245.
115. Belaud-Rotureau M-A, Parrens M, Carrere N, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization is more sensitive than BIOMED-2 polymerase chain reaction protocol in detecting IGH-BCL2 rearrangement in both fixed and frozen lymph node with follicular lymphoma. *Human pathology*. 2007;38(2):365-372. Published November 28, 2006.
116. Einerson RR, Kurtin PJ, Dayharsh GA, Kimlinger TK, Remstein ED. FISH is superior to PCR in detecting t(14;18)(q32;q21)-IgH/bcl-2 in follicular lymphoma using paraffin-embedded tissue samples. *American journal of clinical pathology*. 2005;124(3):421-429.
117. Weremowicz S, Sandstrom DJ, Morton CC, Niedzwiecki CA, Sandstrom MM, Bieber FR. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for rapid detection of aneuploidy: experience in 911 prenatal cases. *Prenatal diagnosis*. 2001;21(4):262-269.
118. King RL, McPhail ED, Meyer RG, et al. False-negative rates for MYC fluorescence in situ hybridization probes in B-cell neoplasms. *Haematologica*. 2019;104(6):e248-e251. Published December 6, 2018.
119. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, 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):2257-2317.
120. Espinet B, Bellosillo B, Melero C, et al. FISH is better than BIOMED-2 PCR to detect IgH/BCL2 translocation in follicular lymphoma at diagnosis using paraffin-embedded tissue sections. *Leukemia research*. 2008;32(5):737-742. Published October 26, 2007.
121. Los-de Vries GT, Stevens WBC, van Dijk E, et al. Genomic and microenvironmental landscape of stage I follicular lymphoma, compared with stage III/IV. *Blood advances*. 2022;6(18):5482-5493.
122. Jung S-H, Shin S-H, Yim S-H, Choi H-S, Lee S-H, Chung Y-J. Integrated analysis of copy number alteration and RNA expression profiles of cancer using a high-resolution whole-genome oligonucleotide array. *Experimental & molecular medicine*. 2009;41(7):462-470.
123. Olshen AB, Venkatraman ES, Lucito R, Wigler M. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics (Oxford, England)*. 2004;5(4):557-572.
124. Venkatraman ES, Olshen AB. A faster circular binary segmentation algorithm for the analysis of array CGH data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2007;23(6):657-663. Published January 18, 2007.

125. Commo F, Guinney J, Ferté C, et al. rCGH: a comprehensive array-based genomic profile platform for precision medicine. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2016;32(9):1402-1404. Published December 26, 2015.
126. Sangaralingam A, Dayem Ullah AZ, Marzec J, et al. 'Multi-omic' data analysis using O-miner. *Briefings in bioinformatics*. 2019;20(1):130-143.
127. Avet-Loiseau H, Andree-Ashley LE, Moore D, et al. Molecular cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and plasma cell leukemia measured using comparative genomic hybridization. *Genes, chromosomes & cancer*. 1997;19(2):124-133.
128. Horsman DE, Okamoto I, Ludkovski O, et al. Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *British journal of haematology*. 2003;120(3):424-433.
129. Leich E, Salaverria I, Bea S, et al. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood*. 2009;114(4):826-834. Published May 26, 2009.
130. Ruland J, Duncan GS, Wakeham A, Mak TW. Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity*. 2003;19(5):749-758.
131. Ruefli-Brasse AA, French DM, Dixit VM. Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science (New York, N.Y.)*. 2003;302(5650):1581-1584. Published October 23, 2003.
132. Dierlamm J, Murga Penas EM, Bentink S, et al. Gain of chromosome region 18q21 including the MALT1 gene is associated with the activated B-cell-like gene expression subtype and increased BCL2 gene dosage and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2008;93(5):688-696. Published March 26, 2008.
133. Seshadri MR, Melnick AM. Targeting MALT1 for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2022;63(4):789-798. Published November 16, 2021.
134. Liang X, Cao Y, Li C, Yu H, Yang C, Liu H. MALT1 as a promising target to treat lymphoma and other diseases related to MALT1 anomalies. *Medicinal research reviews*. 2021;41(4):2388-2422. Published March 25, 2021.
135. Lehmann J, Caduff N, Krzywińska E, et al. Escape from NK cell tumor surveillance by NGFR-induced lipid remodeling in melanoma. *Science advances*. 2023;9(2):eadc8825. Published January 13, 2023.
136. Boiko AD, Razorenova OV, van de Rijn M, et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*. 2010;466(7302):133-137.
137. Civenni G, Walter A, Kobert N, et al. Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer research*. 2011;71(8):3098-3109. Published March 10, 2011.

138. Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*. 2012;490(7420):412-416. Published October 10, 2012.
139. Nijtmans LGJ, Artal SM, Grivell LA, Coates PJ. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2002;59(1):143-155.
140. Peng Y-T, Chen P, Ouyang R-Y, Song L. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2015;20(9):1135-1149.
141. Song W, Tian L, Li S-S, Shen D-Y, Chen Q-X. The aberrant expression and localization of prohibitin during apoptosis of human cholangiocarcinoma Mz-ChA-1 cells. *FEBS letters*. 2014;588(3):422-428. Published December 28, 2013.
142. Rajalingam K, Wunder C, Brinkmann V, et al. Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nature cell biology*. 2005;7(8):837-843. Published July 24, 2005.
143. Koushyar S, Jiang WG, Dart DA. Unveiling the potential of prohibitin in cancer. *Cancer letters*. 2015;369(2):316-322. Published October 9, 2015.
144. Ross JA, Robles-Escajeda E, Oaxaca DM, Padilla DL, Kirken RA. The prohibitin protein complex promotes mitochondrial stabilization and cell survival in hematologic malignancies. *Oncotarget*. 2017;8(39):65445-65456. Published July 1, 2017.
145. Huet S, Sujobert P, Salles G. From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma. *Nature reviews. Cancer*. 2018;18(4):224-239. Published February 9, 2018.
146. Küppers R, Stevenson FK. Critical influences on the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood*. 2018;131(21):2297-2306. Published April 17, 2018.
147. Kridel R, Chan FC, Mottok A, et al. Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. *PLoS medicine*. 2016;13(12):e1002197. Published December 13, 2016.
148. Dallas PB, Pacchione S, Wilsker D, Bowrin V, Kobayashi R, Moran E. The human SWI-SNF complex protein p270 is an ARID family member with non-sequence-specific DNA binding activity. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(9):3137-3146.
149. Wang X, Nagl NG, Flowers S, Zweitzig D, Dallas PB, Moran E. Expression of p270 (ARID1A), a component of human SWI/SNF complexes, in human tumors. *International journal of cancer*. 2004;112(4):636.
150. Bararia D, Heide M, Romashova T, et al. ARID1A Is Recurrently and Significantly Mutated in Follicular Lymphoma (FL) and Impairs DNA Repair Efficiency. *Blood*. 2014;124(21):73.

151. Antonioli M, Solovey M, Bararia D, et al. ARID1A Controls a Novel Transcriptional Network Regulating FAS in Follicular Lymphoma. *Blood*. 2021;138(Supplement 1):3492.
152. Luo B, Cheung HW, Subramanian A, et al. Highly parallel identification of essential genes in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(51):20380-20385. Published December 17, 2008.
153. Ugolini S, Arpin C, Anfossi N, et al. Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells. *Nature immunology*. 2001;2(5):430-435.
154. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology*. 2002;20:217-251. Published October 4, 2001.
155. Anfossi N, André P, Guia S, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006;25(2):331-342. Published August 10, 2006.
156. Erbe AK, Wang W, Carmichael L, et al. Follicular lymphoma patients with KIR2DL2 and KIR3DL1 and their ligands (HLA-C1 and HLA-Bw4) show improved outcome when receiving rituximab. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019;7(1):70. Published March 12, 2019.
157. Shafer D, Smith MR, Borghaei H, et al. Low NK cell counts in peripheral blood are associated with inferior overall survival in patients with follicular lymphoma. *Leukemia research*. 2013;37(10):1213-1215. Published August 7, 2013.
158. He L, Zhu H-Y, Qin S-C, et al. Low natural killer (NK) cell counts in peripheral blood adversely affect clinical outcome of patients with follicular lymphoma. *Blood cancer journal*. 2016;6(8):e457. Published August 12, 2016.
159. Wu L, Adams M, Carter T, et al. lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(14):4650-4657.
160. Hershenfeld SA, Shelton V, Bakhtiari M, et al. Crebbp Mutations Are Associated with Shorter Time to Progression in Limited-Stage Follicular Lymphoma Treated with Radiation. *Blood*. 2022;140(Supplement 1):3532-3533.
161. Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nature medicine*. 2015;21(10):1199-1208. Published September 14, 2015.
162. Vlasevska S, Garcia-Ibanez L, Duval R, et al. KMT2D acetylation by CREBBP reveals a cooperative functional interaction at enhancers in normal and malignant germinal center B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2023;120(11):e2218330120. Published March 9, 2023.

163. Correia C, Schneider PA, Dai H, et al. BCL2 mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2015;125(4):658-667.
164. Matolcsy A, Warnke RA, Knowles DM. Somatic mutations of the translocated bcl-2 gene are associated with morphologic transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma. *Annals of Oncology*. 1997;8:S119-S122.
165. Huet S, Szafer-Glusman E, Tesson B, et al. BCL2 mutations do not confer adverse prognosis in follicular lymphoma patients treated with rituximab. *American journal of hematology*. 2017;92(6):515-519. Published March 24, 2017.
166. Hellmuth JC, Louissaint A, Szczepanowski M, et al. Duodenal-type and nodal follicular lymphomas differ by their immune microenvironment rather than their mutation profiles. *Blood*. 2018;132(16):1695-1702. Published August 20, 2018.
167. González-Rincón J, Méndez M, Gómez S, et al. Unraveling transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *PloS one*. 2019;14(2):e0212813. Published February 25, 2019.
168. Russler-Germain DA. Mutations Associated with Progression in Follicular Lymphoma Predict Inferior Outcomes in Newly Diagnosed Patients. 621. Lymphomas: Translational—Molecular and Genetic: Poster I. New Orleans, Louisiana.
169. Reddy A, Zhang J, Davis NS, et al. Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell*. 2017;171(2):481-494.e15.
170. Vos S de, Hofmann W-K, Grogan TM, et al. Gene expression profile of serial samples of transformed B-cell lymphomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2003;83(2):271-285.
171. Dentre SC, Wedge DC, van Loo P. Principles of Reconstructing the Subclonal Architecture of Cancers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2017;7(8).
172. Gao J, Wu H, Shi X, Huo Z, Zhang J, Liang Z. Comparison of Next-Generation Sequencing, Quantitative PCR, and Sanger Sequencing for Mutation Profiling of EGFR, KRAS, PIK3CA and BRAF in Clinical Lung Tumors. *Clinical laboratory*. 2016;62(4):689-696.
173. Sivakumaran TA, Husami A, Kissell D, et al. Performance evaluation of the next-generation sequencing approach for molecular diagnosis of hereditary hearing loss. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2013;148(6):1007-1016. Published March 22, 2013.
174. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, Boer EN de, et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Human mutation*. 2013;34(7):1035-1042. Published April 29, 2013.

175. Baliñas-Gavira C, Rodríguez MI, Andrades A, et al. Frequent mutations in the amino-terminal domain of BCL7A impair its tumor suppressor role in DLBCL. *Leukemia*. 2020;34(10):2722-2735. Published June 24, 2020.
176. Akers NK, Curry JD, Conde L, Bracci PM, Smith MT, Skibola CF. Association of HLA-DQB1 alleles with risk of follicular lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2010;52(1):53-58.
177. Sillé FCM, Conde L, Zhang J, et al. Follicular lymphoma-protective HLA class II variants correlate with increased HLA-DQB1 protein expression. *Genes and immunity*. 2014;15(2):133-136. Published December 5, 2013.
178. Wang SS, Abdou AM, Morton LM, et al. Human leukocyte antigen class I and II alleles in non-Hodgkin lymphoma etiology. *Blood*. 2010;115(23):4820-4823. Published April 12, 2010.
179. Ten L-C, Chin Y-M, Tai M-C, et al. SNP variants associated with non-Hodgkin lymphoma (NHL) correlate with human leukocyte antigen (HLA) class II expression. *Scientific Reports*. 2017;7.
180. Skibola CF, Bracci PM, Halperin E, et al. Genetic variants at 6p21.33 are associated with susceptibility to follicular lymphoma. *Nature genetics*. 2009;41(8):873-875. Published July 20, 2009.
181. Conde L, Halperin E, Akers NK, et al. Genome-wide association study of follicular lymphoma identifies a risk locus at 6p21.32. *Nature genetics*. 2010;42(8):661-664. Published July 18, 2010.
182. Smedby KE, Foo JN, Skibola CF, et al. GWAS of follicular lymphoma reveals allelic heterogeneity at 6p21.32 and suggests shared genetic susceptibility with diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS genetics*. 2011;7(4):e1001378. Published April 21, 2011.
183. Qiao Y, Zhou Y, Wu C, et al. Risk of genome-wide association study-identified genetic variants for non-Hodgkin lymphoma in a Chinese population. *Carcinogenesis*. 2013;34(7):1516-1519. Published March 1, 2013.
184. Cerhan JR, Fredericksen ZS, Novak AJ, et al. A two-stage evaluation of genetic variation in immune and inflammation genes with risk of non-Hodgkin lymphoma identifies new susceptibility locus in 6p21.3 region. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2012;21(10):1799-1806. Published August 21, 2012.
185. Hassanlou M, Soltani BM, Medlej A, Kay M, Mowla SJ. Hsa-miR-6165 downregulates insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) expression and enhances apoptosis in SW480 cells. *Biological chemistry*. 2020;401(4):477-485.

186. Hassanlou M, Soltani BM, Mowla SJ. Expression and Function of hsa-miR-6165 in Human Cell Lines and During the NT2 Cell Neural Differentiation Process. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2017;63(2):254-266. Published September 27, 2017.
187. Parsi S, Soltani BM, Hosseini E, Tousi SE, Mowla SJ. Experimental verification of a predicted intronic microRNA in human NGFR gene with a potential pro-apoptotic function. *PloS one*. 2012;7(4):e35561. Published April 27, 2012.
188. Mullooly M, McGowan PM, Crown J, Duffy MJ. The ADAMs family of proteases as targets for the treatment of cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2016;17(8):870-880.
189. Duffy MJ, McKiernan E, O'Donovan N, McGowan PM. Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(4):1140-1144.
190. Duffy MJ, McKiernan E, O'Donovan N, McGowan PM. The role of ADAMs in disease pathophysiology. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2009;403(1-2):31-36.
191. Weber S, Saftig P. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development (Cambridge, England)*. 2012;139(20):3693-3709.
192. Evers M, Schreder M, Stühmer T, et al. Prognostic value of extracellular matrix gene mutations and expression in multiple myeloma. *Blood cancer journal*. 2023;13(1):43. Published March 23, 2023.
193. Bea S. Amplifications and target genes in diffuse large B-cell lymphoma: real targets or consequences of structural features of the genome? *Leukemia & lymphoma*. 2010;51(5):743-744.
194. Bonetti P, Testoni M, Scandurra M, et al. Deregulation of ETS1 and FLI1 contributes to the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013;122(13):2233-2241. Published August 7, 2013.
195. Dittmer J. The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Molecular cancer*. 2003;2:29. Published August 20, 2003.
196. Gallant S, Gilkeson G. ETS transcription factors and regulation of immunity. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2006;54(3):149-163. Published May 2, 2006.
197. Zhang XK, Gallant S, Molano I, et al. Decreased expression of the Ets family transcription factor Fli-1 markedly prolongs survival and significantly reduces renal disease in MRL/lpr mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2004;173(10):6481-6489.
198. Priebe V, Sartori G, Napoli S, et al. Role of ETS1 in the Transcriptional Network of Diffuse Large B Cell Lymphoma of the Activated B Cell-Like Type. *Cancers*. 2020;12(7). Published July 15, 2020.

199. Davis RS, Stephan RP, Chen C-C, Dennis G, Cooper MD. Differential B cell expression of mouse Fc receptor homologs. *International immunology*. 2004;16(9):1343-1353. Published August 9, 2004.
200. Guselnikov SV, Ershova SA, Mechetina LV, et al. A family of highly diverse human and mouse genes structurally links leukocyte FcR, gp42 and PECAM-1. *Immunogenetics*. 2002;54(2):87-95. Published March 14, 2002.
201. Polson AG, Zheng B, Elkins K, et al. Expression pattern of the human FcRH/IRTA receptors in normal tissue and in B-chronic lymphocytic leukemia. *International immunology*. 2006;18(9):1363-1373. Published July 18, 2006.
202. Capone M, Bryant JM, Sutkowski N, Haque A. Fc Receptor-Like Proteins in Pathophysiology of B-cell Disorder. *Journal of clinical & cellular immunology*. 2016;7(3).
203. Frontzek F, Staiger AM, Zapukhlyak M, et al. Molecular and functional profiling identifies therapeutically targetable vulnerabilities in plasmablastic lymphoma. *Nature communications*. 2021;12(1):5183. Published August 31, 2021.
204. Rostamzadeh D, Kazemi T, Amirghofran Z, Shabani M. Update on Fc receptor-like (FCRL) family: new immunoregulatory players in health and diseases. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2018;22(6):487-502. Published May 10, 2018.
205. Schwickert TA, Tagoh H, Gültekin S, et al. Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. *Nature immunology*. 2014;15(3):283-293. Published February 9, 2014.
206. Lu G, Middleton RE, Sun H, et al. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science (New York, N.Y.)*. 2014;343(6168):305-309. Published November 29, 2013.
207. Gandhi AK, Kang J, Havens CG, et al. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4CRBN. *British journal of haematology*. 2013;164(1):811-821.
208. Zucca E, Rondeau S, Vanazzi A, et al. Short regimen of rituximab plus lenalidomide in follicular lymphoma patients in need of first-line therapy. *Blood*. 2019;134(4):353-362. Published May 17, 2019.
209. D'haene B, Vandesompele J, Hellemans J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods (San Diego, Calif.)*. 2010;50(4):262-270. Published January 6, 2010.
210. Qiao Y, Liu X, Harvard C, et al. Large-scale copy number variants (CNVs): distribution in normal subjects and FISH/real-time qPCR analysis. *BMC Genomics*. 2007;8:167. Published June 12, 2007.

211. Kirkizlar E, Zimmermann B, Constantin T, et al. Detection of Clonal and Subclonal Copy-Number Variants in Cell-Free DNA from Patients with Breast Cancer Using a Massively Multiplexed PCR Methodology. *Translational oncology*. 2015;8(5):407-416.
212. Yu Z. CloneCNA: detecting subclonal somatic copy number alterations in heterogeneous tumor samples from whole-exome sequencing data. *BMC bioinformatics*. 2016;17(1):1-10.
213. Cun Y, Yang T-P, Achter V, Lang U, Peifer M. Copy-number analysis and inference of subclonal populations in cancer genomes using ScIust. *Nature protocols*. 2018;13(6):1488-1501. Published May 24, 2018.
214. Perotti EA, Georgopoulos K, Yoshida T. An Ikaros Promoter Element with Dual Epigenetic and Transcriptional Activities. *PloS one*. 2015;10(7):e0131568. Published July 2, 2015.
215. Kuiper RP, Schoenmakers EFPM, van Reijmersdal SV, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia*. 2007;21(6):1258-1266. Published April 19, 2007.
216. Loh ML, Mullighan CG. Advances in the genetics of high-risk childhood B-progenitor acute lymphoblastic leukemia and juvenile myelomonocytic leukemia: implications for therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(10):2754-2767.
217. Yokota T, Kanakura Y. Genetic abnormalities associated with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer science*. 2016;107(6):721-725. Published April 27, 2016.
218. Song C, Ge Z, Ding Y, et al. IKAROS and CK2 regulate expression of BCL-XL and chemosensitivity in high-risk B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2020;136(13):1520-1534.
219. Díaz T, Rodríguez V, Lozano E, et al. The BET bromodomain inhibitor CPI203 improves lenalidomide and dexamethasone activity in in vitro and in vivo models of multiple myeloma by blockade of Ikaros and MYC signaling. *Haematologica*. 2017;102(10):1776-1784.
220. Yagi T, Hibi S, Takanashi M, et al. High frequency of Ikaros isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: implications for up-regulation of the antiapoptotic protein Bcl-XL in leukemogenesis. *Blood*. 2002;99(4):1350-1355.
221. Damdinsuren B, Dement-Brown J, Li H, Tolnay M. B cell receptor induced Fc receptor-like 5 expression is mediated by multiple signaling pathways converging on NF- κ B and NFAT. *Molecular immunology*. 2016;73:112-121. Published April 8, 2016.
222. Barber-Rotenberg JS, Selvanathan SP, Kong Y, et al. Single enantiomer of YK-4-279 demonstrates specificity in targeting the oncogene EWS-FLI1. *Oncotarget*. 2012;3(2):172-182.

223. Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. *Nature medicine*. 2009;15(7):750-756. Published July 5, 2009.
224. Federman N, Meyers PA, Daw NC, et al. A phase I, first-in-human, dose escalation study of intravenous TK216 in patients with relapsed or refractory Ewing sarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):TPS11626-TPS11626.
225. Ludwig JA, Federman NC, Anderson PM, et al. TK216 for relapsed/refractory Ewing sarcoma: Interim phase 1/2 results. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2021;39(15_suppl):11500.
226. Oncternal Therapeutics. Oncternal Therapeutics presented updated interim phase 1/2 clinical trial data for ONCT-216 in patients with relapsed/refractory Ewing sarcoma. In: *CTOS 2021 Virtual Annual Meeting*.
227. Davis LN, Walker ZJ, Ohlstrom D, et al. Abstract 3956: MYC inhibition overcomes IMiD resistance in heterogeneous multiple myeloma populations. *Cancer research*. 2022;82(12_Supplement):3956.
228. Morschhauser F, Tilly H, Chaidos A, et al. Tazemetostat for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma: an open-label, single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*. 2020;21(11):1433-1442. Published October 6, 2020.
229. Tong KI, Yoon S, Isaev K, et al. Combined EZH2 Inhibition and IKAROS Degradation Leads to Enhanced Antitumor Activity in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2021;27(19):5401-5414.
230. Martin P, Jung S-H, Pitcher B, et al. A phase II trial of lenalidomide plus rituximab in previously untreated follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL): CALGB 50803 (Alliance). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(11):2806-2812.
231. Fowler NH, Davis RE, Rawal S, et al. Safety and activity of lenalidomide and rituximab in untreated indolent lymphoma: an open-label, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*. 2014;15(12):1311-1318. Published October 15, 2014.
232. Witzig TE, Nowakowski GS, Habermann TM, et al. A comprehensive review of lenalidomide therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2015;26(8):1667-1677. Published February 23, 2015.

Danksagung

Mein erster Dank gilt zunächst Prof. Matthias Schwab sowie Prof. German Ott, die die Betreuung und Begutachtung der Promotion übernommen haben. Zudem bedanke ich mich bei beiden herzlich für die Möglichkeiten seitens der Pathologie des RBK und des IKP die Dissertation an diesen Instituten anfertigen zu können.

Ein großer Dank gilt Dr. Heike Horn, die mich für die Thematik der Lymphome begeistert hat, meine Arbeit mit unermüdlichem Einsatz betreut hat und jederzeit Rückhalt und Ansprechpartnerin war.

Dr. Annette Staiger und Dr. Claudia Kalla danke ich für ihre Zeit für wertvolle Diskussionen und konstruktives Feedback.

Dr. Michael Grau und Dr. Myroslav Zapukhlyak danke ich für die bioinformatischen Analysen und tollen Plots, die in diese Arbeit einfließen durften.

Für das Einlernen in die Laborarbeit und die tolle Unterstützung bei Fragen zu Labortechniken sowie abseits des Laboralltags bedanke ich mich ganz herzlich bei Sophia Steinlein, Katja Bräutigam und insbesondere auch bei Petra Hitschke.

Beim Team der „AG Ott“ und der Pathologie bedanke ich mich für die tolle Zeit, die Zusammenarbeit und die vielen helfenden Hände.

Ein Dankeschön gilt ebenfalls Dr. Florian Büttner und Dr. Stefan Winter für ihre Hilfsbereitschaft bei statistischen und bioinformatischen Anliegen.

Ich möchte mich herzlich bei der „Toasty Crew“ für unterhaltsame Mittagspausen und die leckeren Sandwiches bedanken.

Ein letzter großer Dank gilt meiner Familie für ihre unermüdliche Motivation, ihr stetiger Rückhalt und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Anhang

R-Code EaCoN Package

```
> if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
> install.packages("BiocManager")
> install.packages("devtools")
> devtools::install_github("Crick-CancerGenomics/ascat/ASCAT")
> devtools::install_github("mskcc/facets")
> if(!installed.packages('BiocManager')) install.packages('BiocManager')
> BiocManager::install(c("affxparser", "Biostrings", "aroma.light", "BSgenome", "copynumber",
"GenomicRanges", "limma", "rhdf5", "sequenza"))
> library("BiocManager")
> library("copynumber")
> library("devtools")
> library("ASCAT")
> library("facets")
> library("affxparser")
> library("Biostrings")
> library("aroma.light")
> library("BSgenome")
> library("GenomicRanges")
> library("limma")
> library("rhdf5")
> library("sequenza")
> library("EaCoN")
```

```
> devtools::install_github("gustaveroussy/EaCoN")

> install.packages("https://nextcloud.gustaveroussy.fr/s/NfttrQ4ptgoLB9g/download", repos =
NULL, type = "source")

> devtools::install_github("gustaveroussy/apt.oncoscan.2.4.0")

> install.packages("https://nextcloud.gustaveroussy.fr/s/dEP8oirBM84zdwB/download", repos
= NULL, type = "source")

> if(!'BiocManager' %in% installed.packages()) install.packages('BiocManager')

BiocManager::install('BSgenome')

BSgenome::available.genomes()

> BiocManager::install('BSgenome.Hsapiens.UCSC.hg38')

> require(EaCoN)

> setwd("/home/project/EaCoN_results")

> OS.Process(ATChannelCel = "/home/project/CEL/S1_OncoScan_CNV_A.CEL",
GCChannelCel = "/home/project/CEL/S1_OncoScan_CNV_C.CEL", samplename =
"S1_OS")

> Segment.ff(RDS.file = "/media/ubuntu/Samsung USB/EaCoN FL
III_IV/4110/4110_OncoScan_CNV_hg38_processed.RDS", segmenter = "ASCAT")

> OS.Process.Batch(pairs.file="/media/ubuntu/Samsung USB/FL III_IV_CEL-
files/Pairs_file_FL III_IV.txt", nthread=3, genome.pkg =
"BSgenome.Hsapiens.UCSC.hg38", apt.build = "na36.r1" , wave.renorm = FALSE )

> Segment.ff.Batch(RDS.files = list.files(path = getwd(), pattern = ".*_processed.RDS$",
full.names = TRUE, recursive = TRUE), segmenter = "ASCAT", smooth.k = 5, SER.pen = 20,
nrf = 1.0, nthread = 2)
```