

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der
Technischen Universität München,
Klinikum rechts der Isar,
Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler

Interkompartimentäre Migrationsanalyse anhand der Mutationsmuster von
rearrangierten Immunglobulinschwerketten-Gen-Segmenten aus
Lymphknoten- und Knochenmark-residenten folliculären Lymphomzellen

Martin Wartenberg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M. A. Kremer
2. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland
3. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

Diese Dissertation wurde am 03.01.2011 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2012
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis.....	6
2 Einleitung.....	10
2.1 Non-Hodgkin-Lymphome.....	12
2.1.1 Zytogenetik und Genexpressionsprofile.....	12
2.1.2 Zellepitope und Immunphänotyp.....	13
2.1.3 Inzidenz der NHL und Prominenz der B-Zell-Lymphome.....	13
2.2 Lymphomklassifikationen.....	14
2.2.1 Vorläufersysteme.....	14
2.2.2 WHO-Klassifikation.....	15
2.3 Das folliculäre Lymphom.....	15
2.3.1 Immunphänotypisierung.....	17
2.3.2 Grading, Staging und Risikostratifizierung.....	17
2.3.3 Therapie des folliculären Lymphoms.....	18
2.4 Die Translokation t(14;18)	20
2.4.1 Translokation t(14;18) und die Keimzentrumsreaktion.....	21
2.4.2 Molekulare Aspekte von bcl-2 im Kontext der Apoptoseregulation.....	23
2.4.3 c-myc, NF-κB und genetische Instabilität.....	25
2.4.4 Folliculäre Lymphome ohne die Translokation t(14;18).....	26
2.4.5 Bedeutung der Translokation t(14;18) in gesunden Individuen.....	26
2.4.6 Mausmodelle zum folliculären Lymphom.....	27
2.4.7 Bewertung der Translokation t(14;18).....	28
2.5 Molekulare Aspekte der B-Zellrezeptor-Evolution.....	28
2.5.1 V(D)J-Rekombination und B-Zell Ontogenese.....	29
2.5.2 Somatische Hypermutation und B-Zellrezeptor-Affinitätsreifung.....	31
2.5.3 Verschiedene Immunglobulinklassen.....	34
2.5.4 Aberrantes Potential der V(D)J-Rekombination, SH und CSR.....	35
2.6 Tumorprogression und folliculäres Lymphom.....	35
2.6.1 Heterogenität der Entwicklung des folliculären Lymphoms.....	37
2.6.2 Progression zu aggressiven Lymphomen.....	38
2.6.3 Histologische und immunologische Nischen.....	39
2.7 Zusammenschau der Pathogenese des folliculären Lymphoms.....	41
3 Fragestellungen.....	43

4 Material und Methoden.....	44
4.1 Fallauswahl.....	44
4.2 Histologie und Immunhistochemie.....	44
4.3 Mikrodissektion.....	45
4.4 Nukleinsäureextraktion.....	45
4.4.1 DNS-Extraktion aus formalinfixiertem Paraffinblock-Gewebe.....	45
4.4.2 RNS-Extraktion aus kryoasserviertem Frischgewebe.....	45
4.5 Erzeugung von cDNS.....	46
4.6 Polymerase-Kettenreaktion.....	46
4.6.1 β -Globin PCR.....	46
4.6.2 IgVH-Familien-spezifische PCR und seminested PCR.....	46
4.7 Gelelektrophorese.....	48
4.8 Klonierung der IgVH-Gensegmente.....	48
4.8.1 Erzeugung rekombinanter Plasmide.....	48
4.8.2 Transformation von E. coli.....	49
4.8.3 Kultivierung von Bakterien.....	49
4.8.3.1 Prinzip der „Blau-Weiß“ Selektion.....	49
4.8.3.2 Selektion und Kultivierung einzelner Kolonien.....	50
4.8.4 Extraktion und Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide	50
4.9 Sequenzierung der IgVH-Gensegmente.....	50
4.9.1 Cycle-PCR.....	51
4.9.2 Sequenzbestimmung.....	51
4.10 Tumorzellevolution und Migrationsanalyse.....	51
4.10.1 Klonalitätsanalyse und Bestimmung der Mutationsmuster	52
4.10.2 Rekonstruktion der Tumorzellevolution.....	52
4.10.3 Berechnung der Migrationswahrscheinlichkeit.....	53
4.11 Statistik zur B-Zell-Rezeptoranalyse.....	54
5 Ergebnisse.....	55
5.1 Histologische Reevaluation, Gewebe und klinische Daten.....	55
5.2 Mutationsmuster und Migrationsanalyse.....	57
5.2.1 Patient 1.....	58
5.2.1.1 Gewebespezifische Tumorzellevolution.....	59
5.2.1.2 Migrationsanalyse.....	61
5.2.1.3 Interkompartimentäre Tumorzellevolution.....	64

5.2.1.4 Zusammenfassung.....	65
5.2.2 Patient 2.....	66
5.2.2.1 Gewebespezifische Tumorzellevolution.....	67
5.2.2.2 Migrationsanalyse.....	68
5.2.2.3 Interkompartimentäre Tumorzellevolution.....	70
5.2.2.4 Zusammenfassung.....	72
5.2.3 Patient 3.....	73
5.2.3.1 Gewebespezifische Tumorzellevolution.....	74
5.2.3.2 Migrationsanalyse und Tumorzellpersistenz.....	79
5.2.3.3 Interkompartimentäre Tumorzellevolution.....	84
5.2.3.4 Zusammenfassung.....	87
5.3 Analyse der somatische Hypermutation.....	89
5.3.1 Patient 1.....	89
5.3.2 Patient 2.....	90
5.3.3 Patient 3.....	90
6 Diskussion.....	92
6.1 Diskussion der Methoden.....	92
6.1.1 DNS-Qualität und Mikrodissektion.....	92
6.1.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	92
6.1.3 Klonalitäts- und Mutationsmusterbestimmung.....	93
6.1.4 Tumorzellevolution und Migrationswahrscheinlichkeit.....	93
6.1.4.1 Vorteile der FLER-Methode gegenüber dem MSA.....	94
6.1.4.2 Wertigkeit der mutierten Loci der IgVH-Segmente.....	95
6.1.4.3 Klongruppen und hypothetische Vorläuferklone.....	96
6.1.4.4 Wahrscheinlichkeit der hypothetischen Vorläuferklone.....	96
6.1.4.5 Konstruktion gewebespezifischer Stammbäume der Tumorzellevolution.....	97
6.1.4.6 Analyse der Migrationsbewegungen zwischen den Kompartimenten.....	98
6.1.4.7 Zusammenfassung.....	98
6.1.5 Antigendruck und Integrität des B-Zellrezeptors.....	98
6.1.5.1 Replacement- und silent-Mutationen.....	99
6.1.5.2 Framework und complementarity-determining regions.....	99
6.1.5.3 Verschiedene Methoden der B-Zellrezeptor-Mutationsanalyse.....	100
6.1.5.4 Bedeutung von Stopcodonen.....	100
6.1.5.5 Zusammenfassung.....	101

6.2 Diskussion der Ergebnisse	101
6.2.1 Mutationsmuster.....	102
6.2.2 Migration zwischen den Kompartimenten.....	104
6.2.3 Rolle von Antigenen und Bedeutung des B-Zellrezeptors.....	105
6.2.4 Ausbeutung nischenspezifischer Funktionen.....	106
6.2.5 Epikrise.....	108
7 Zusammenfassung.....	110
8 Literaturverzeichnis.....	112
9 Abbildungsverzeichnis.....	138
10 Anhang.....	140
10.1 Laborprotokolle.....	140
10.2 PCR-Protokolle und Primer.....	145
10.3 Quellcode des FLER-Computerprogramms.....	148
10.4 Verwendetes Material/Geräte.....	148
10.4.1 Bakterienstämme, Medien und Gele.....	148
10.4.2 Puffer, Lösungen und Primer.....	149
10.4.3 Antikörper, Enzyme, Plasmide.....	151
10.4.4 Kits.....	151
10.4.1 Geräte und Hilfsmittel.....	152
10.4.1 Computerprogramme.....	153
10.5 Sequenzen.....	153
10.5.1 Patient 1, FL ^o 2.....	153
10.5.2 Patient 2, FL ^o 1.....	158
10.5.2 Patient 3, FL ^o 1.....	162
10.5.3 HPCs und Eingabeparameter zur Berechnung von pm.....	169
10.5.3.1 HPCs Patient 1.....	169
10.5.3.2 HPCs Patient 2.....	175
10.5.3.3 HPCs Patient 3.....	176
11 Lebenslauf.....	180
12 Dankvermerk.....	181

1 Abkürzungsverzeichnis

°1/2	-	Grad 1/2 des histologischen Gradings des folliculären Lymphoms
A	-	Adenin
Abb.	-	Abbildung
AG	-	Antigen
AID	-	activation-induced (cytidine) deaminase
AK	-	Antikörper
AKT	-	Gengruppe der Proteinkinase B
Amp	-	Ampicillin
APC	-	Antigen-präsentierende Zelle
APE	-	apurinic-apyrimidinic endonuclease (DNS-Reperaturenzym)
AS	-	Aminosäure
BAD	-	bcl-2 antagonist of cell death
bcl(-2)	-	b-cell lymphoma Protein / Proteinfamilie
BCR	-	B-Zellrezeptor
BL	-	Burkitt Lymphom
bp	-	Basenpaar(e)
C	-	Cytidin
CD	-	cluster of differentiation
CDK	-	cyclin-dependent kinase
(R-)CHOP	-	Rituximab (R), Cyclophosphamid (C), Doxorubicin (H), Vincristin (O), Prednisolon (P)
c-myc	-	Transkriptionsfaktor
cDNS/cDNA	-	kompletäre Desoxyribonukleinsäure
CDR	-	complementarity-determining region
CSR	-	class switch recombination
CTX	-	Chemotherapie
C(X)CL	-	Ligand eines Chemokinrezeptors / Chemokin
C(X)CR	-	Chemokinrezeptor
der()	-	Deregulation
(R)-DHAP	-	Rituximab (R), Dexamethason (DH), Cytarabin (A) und Cisplatin (P)
DLBCL	-	diffuse large B-cell lymphoma
DNA/DNS	-	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphate: dATP, dGTP, dCTP, dTTP
DSB	-	double strand break
E	-	extranodal
EBV	-	Epstein-Barr-Virus
E. coli	-	Escherichia coli
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
E μ	-	Enhancer des Immunoglobulinschwereketten-Gens
FACS	-	fluorescence-activated cell sorting
FDC	-	follicular dendritic cell
FF	-	fresh frozen (tissue)
FFPE	-	formalin-fixed and paraffin-embedded tissue
FL	-	follicular lymphoma
FLER	-	follicular lymphoma evolution reconstructor
FLIPI	-	follicular lymphoma international prognostic index
FR1/FR2	-	Bereich des VH-Gens der bei bestimmten PCRs von den verwendeten Primern begrenzt wird
FRC	-	fibroblastic reticular cell
FRW	-	framework region
G	-	Guanin
GC	-	germinal center
GCL	-	germinal center lymphocyte
Gy	-	Gray
H&E	-	Hämatoxylin & Eosin
HPC	-	hypothetic predecessor clone
hpf	-	high power field
HSC	-	hematopoietic stem cell
HSP	-	heat shock protein
ICR	-	intermediary cluster region
(R-)IEV	-	Rituximab (R), Ifosfamid (I), Epirubicin (E) und Etoposid (V)
Ig	.	Immunglobulin
IgC	-	immunoglobulin constant region
IgH	-	immunoglobulin heavy chain
IgL	-	immunoglobulin light chain
IgV _H	-	immunoglobulin heavy chain variable region

IgV _L	-	immunoglobulin light chain variable region
I κ B α	-	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IL	-	Interleukin
ILSG	-	International Lymphoma Study Group
IPI	-	International Prognostic Index
IPTG	-	Isopropylthiogalaktosid
(x-)J-R	-	(x-)Jahresrezidivfreiheitsrate
kb	-	Kilobasen
KM	-	Knochenmark
LDH	-	Laktatdehydrogenase
LK	-	Lymphknoten
MALT	-	mucosa-associated lymphatic tissue
MAP	-	mitogen-activated protein
MBR	-	major break point region
MCL	-	mantle cell lymphoma
MCR	-	minor cluster region
MCS	-	multiple cloning site
MSA	-	multiple sequence alignment
MSC	-	mesenchymal stem cell
N	-	Nukleotid / Stickstoffatom
NF- κ B	-	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NHL	-	Non-Hodgkin lymphoma
NKC	-	natural killer cell
p	-	kurzer Arm von Chromosomen
P	-	relative Häufigkeit
PAS	-	periodic acid-schiff (stain)
PBC-LBL	-	precursor B-cell lymphoblastic lymphoma
PBL	-	peripheral blood lymphocyte
PCR	-	polymerase chain reaction
PI3K	-	phosphoinositide 3-kinase
pm	-	probability measure
q	-	langer Arm von Chromosomen
R	-	replacement mutation / Rituximab

RAG	-	recombination activating gene
RCTX	-	kombinierte Radiochemotherapie
REAL	-	Revised European American Lymphoma (classification)
RNA/RNS	-	Ribonukleinsäure
rpm	-	rounds per minute
RSS	-	recombination signal sequence
RT	-	reverse Transkriptase
RTX	-	Radiotherapie
S	-	silent mutation
s	-	Isotypswitchregion des Immunoglobulinschwereketten
sec	-	Sekunde
SH	-	somatic hypermutation
sμ	-	Klasse M Isotypswitchregion des Immunoglobulinschwereketten
ssDNA/DNS	-	single-stranded DNA
STAT	-	signal transducer and activator of transcription
T	-	Thymin
Taq	-	Thermus aquaticus
TdT	-	terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF	-	transforming growth factor
TNF	-	tumour necrosis factor
TRIS	-	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	-	Uracil
Ü	-	Überleben
UNG	-	uracil-N-glycosylase
URL	-	uniform resource locator
V(D)J	-	variable, diversity, joining
VH	-	variabler Bereich der (des) Immunoglobulinschwerekette(n-Gens)
WHO	-	World Health Organization
X	-	X-Chromosom
X-Gal	-	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
ZNS	-	zentrales Nervensystem

2 Einleitung

Abgeleitet vom Wortstamm „Lymph-“ und dem Suffix „-om“ bezeichnet der Begriff „Lymphom“ eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems (*Lee, 1994*). Erstmals wurde der Begriff „malignes Lymphom“ 1861 vom deutschen Chirurgen Theodor Billroth verwendet. Er beschrieb damit eine Neoplasie des lymphatischen Systems, welche sich nicht als Leukämie, sondern als solider Tumor präsentierte (*Billroth, 1861*). In der Hämatopathologie umfasst der Begriff eine sehr heterogene Gruppe maligner Tumoren, die von Zellen des lymphatischen Systems abstammen (*Kuppers, 1999*). Die überwiegende Mehrheit der Lymphome kann der B-Zelllinie zugeordnet werden, seltener der T-Zelllinie. Dabei werden aufgrund ähnlicher funktioneller und immunphänotypischer Eigenschaften T-Zellneoplasmen und Natürliche Killerzell (NKC)-Neoplasmen gemeinsam klassifiziert (*Feller, 2003*). Den zahlreichen hämatologischen Neoplasmen im Allgemeinen und der Gruppe der Lymphome im Besonderen liegen verschiedenste genetische Aberrationen zu Grunde. Dabei besitzen die chromosomalen Mutationen häufig initialen Charakter für die jeweilige Entität und werden als primäres malignes Ereignis betrachtet. Sie begünstigen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt ihres Auftretens im zeitlichen Spektrum der Hämato-, Myelo- bzw. Lymphopoese eine maligne Entartung (*Gilliland, 2001*).

Die Vielfalt der hämatologischen Neoplasmen spiegelt das enorme Differenzierungspotential hämatologischer Stammzellen, die große Kapazität des Zellumsatzes der Hämatopoese und letztlich die Komplexität der ablaufenden genetischen Programme wider (*Hoang, 2004; Metcalf, 1978; Orkin, 2000; Turner, 1996*).

Maligne Lymphome und ihre benignen Gegenstücke:

Anhand morphologischer und immunphänotypischer Eigenschaften wurde für eine Vielzahl der Lymphomentitäten ein benignes Gegenstück der lymphozytären Ontogenese postuliert (*Greaves, 1986*). Diese Korrelation bestimmt maßgeblich die Modalität ihrer Klassifikation (*Brittinger, 1978; Lukes, 1974*). Allerdings existieren Entitäten wie die Haarzellleukämie, deren mögliches physiologisches Pendant bis heute nicht gefunden wurde (*Plenderleith, 1970*). Auch wird die Eindeutigkeit einer auf dieser Zuordnung basierenden Einteilung durch Entitäten, welche Zelllinienheterogenität oder Zelllinienplastizität zeigen, abgeschwächt (*Jaffe, 1996; Macon, 2001*). Deshalb konnte das benigne Gegenstück nicht die alleinige Grundlage für eine Klassifikation der lymphoiden Neoplasmen sein. Aktuell beruht die Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) auf der Integration von Morphologie, Immunphänotyp und Zytogenetik bzw. Genexpressionsmustern der malignen Lymphomgewebe (vgl. 2.2 *Lymphomklassifikationen*).

Lymphome manifestieren sich primär in Organen des lymphatischen Systems und disseminieren im weiteren Krankheitsverlauf, meist ausgehend von Lymphknoten, in andere Organsysteme (*Jaffe, 2009*). Allerdings werden einige Entitäten primär in extralymphatischen Geweben manifest; das primäre kutane B-Zelllymphom und die Mycosis fungoides in Anteilen der Haut oder das primäre ZNS-Lymphom im Gehirn (*Hochberg, 1988; Jaffe, 2009; Rijlaarsdam, 1994; Weinstock, 1988*). In diesem Gewebetropismus verschiedener Lymphomentitäten offenbart sich neben dem funktionellen Status der lymphatischen Zelle zum Zeitpunkt ihrer malignen Transformation, die Gliederung des adaptiven Immunsystems in distinkte, geweberesidente Fraktionen (*Greaves, 1986; Kuppers, 1999; Rot, 2004; Shaffer, 2002*). Die lokale Zuteilung verschiedener Lymphozytenpopulationen zu bestimmten Geweben basiert maßgeblich auf der Wechselwirkung zwischen Chemokinen und Chemokinrezeptoren. In Abhängigkeit vom exprimierten Chemokinrezeptormuster sind Lymphozyten damit bestimmten Geweben zugeordnet. Dieses gliedernde Funktionsprinzip des lymphatischen Systems wird als „homing“ bezeichnet (*Brandtzaeg, 1999; Butcher, 1996; Butcher, 1999; Kunkel, 2003; Youngman, 2002*). Viele Lymphome besitzen zunächst die „homing-Rezeptoren“ ihres benignen Gegenstückes (*Picker, 1988*). Parallel zur Zunahme der genetischen Instabilität im Rahmen des Lymphomprogresses kann durch die damit einhergehende Veränderung bzw. den Verlust dieser Restriktion die Dissemination in weitere Gewebe erklärt werden (*Bowman, 2000; Butcher, 1996; Drillenburg, 2000; López-Giral, 2004*).

Aus der resultierenden Wechselwirkung mit neuen histologischen bzw. funktionellen Nischen kann ferner die Progression vorangetrieben werden, da sich parallel der biologische Charakter des Lymphoms verändert (*de Jong, 2005; Küppers, 2005; Stamatopoulos, 2000*). Weitere Belege für die Abhängigkeit der funktionellen Kompetenz der verschiedenen Lymphome von der jeweils zum Zeitpunkt der malignen Transformation erreichten Hierarchiestufe der Lymphopoese finden sich wie folgt: Plasmazellerkrankungen wie das Multiple Myelom sezernieren, entsprechend ihrer malignen Transformation im Entwicklungsstadium einer Plasmazelle, Immunglobuline / Bence Jones Proteine und infiltrieren das Knochenmark (*Kyle, 1975*); folliculäre Lymphomzellen sind in Analogie zu ihrem benignen Gegenstück, den Keimzentrums-B-Lymphozyten (GCL) im Stande, die Somatische Hypermutation (SH) der variablen Bereiche ihrer Immunglobulingene durchzuführen (*Jaffe, 1974; Zhu, 1994*).

Ferner sind weitere Schlüsselfaktoren der Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten auch für verschiedene Lymphome unverzichtbar, wie die Expression und Aktivierung eines intakten B-Zell-Rezeptors (BCR) (*Bahler, 1992b; Gunvén, 1980; Kuppers, 1999*). Da die lymphozytäre Ontogenese einerseits viele Differenzierungsschritte umfasst, existieren abhängig vom

Entstehungszeitpunkt der transformierenden genetischen Läsionen viele verschiedene Lymphome (*Hardy, 1991; Osmond, 1998; Petrie, 1990; Shortman, 1996*). Dies erklärt partiell deren vielseitige molekularpathologische, histologische und klinische Präsentation. Andererseits wird durch den Erwerb weiterer genetischer Veränderungen und die Erschließung neuer histologischer Nischen, die Präsentation der Lymphome im Laufe des Krankheitsprogresses verändert (*de Jong, 2005; Küppers, 2005; Stamatopoulos, 2000*). In Zusammenschau existiert nicht „das Lymphom per se“, sondern viele, in ihrem biologischen Verhalten unterschiedliche Gruppen, die wiederum je nach Progressionsstatus ihre molekularpathologische, morphologische und klinische Präsentation verändern (*Muller-Hermelink, 2001; Sanchez-Beato, 2003*).

2.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Thomas Hodgkin beschrieb 1832 in seinem Artikel „On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen“, den posthum nach ihm benannten Morbus Hodgkin (*Hodgkin, 1832; Wilks, 1856; Wilks, 1865*). Für die Kategorie des Hodgkin Lymphoms sind die binukleären Reed-Sternberg Zellen, sowie die mononukleären Hodgkin-Zellen pathognomonisch. Davon werden die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) abgegrenzt, welche per definitionem keine Reed-Sternberg- / Hodgkin-Zellen präsentieren (*Bucsky, 1987; Teerenhovi, 1988*).

2.1.1 Zytogenetik und Genexpressionsprofile

Die zahlreichen Vertreter der NHL sind häufig mit typischen zytogenetischen Aberrationen, meist Translokationen, assoziiert (*vgl. Abb. 1*) (*Barr, 1998; Küppers, 2001*). So zeichnet sich der Großteil der Burkitt Lymphome durch die Translokation t(8;14) aus, Mantelzell-Lymphome typischerweise durch die Translokation t(11;14) und folliculäre Lymphome durch die Translokation t(14;18) (*de Boer, 1997; Dyer, 1994; Magrath, 1990*). Diese chromosomalen Aberrationen erzeugen Fusiononkogene, wie c-myc/Ig, bcl-1/Ig und bcl-2/Ig, welche die Aktivierung bzw. Überexpression von Onkogenen wie c-myc, cyclin D1, oder bcl-2 bewirken. Diese Mutationen werden als primäres onkongenes Ereignis der jeweiligen Lymphomentwicklung betrachtet. Damit besitzen sie initialen Charakter für die jeweilige Entität (*Willis, 2000*). Die einzelne zytogenetische Veränderung ist dabei nicht streng spezifisch für die jeweilige Entität. Darüber hinaus lassen sich durch Genexpressionsuntersuchungen mittels „DNA-microarray-Technologie“ differenziertere Signaturen verschiedener Lymphomtypen und Subtypen unterscheiden (*Iqbal, 2009; Rosenwald, 2003*).

Abb. 1 – Translokationen bei Non-Hodgkin-Lymphomen (nach Sanchez-Beato M., 2003)

Lymphom	Translokation	Gen	Häufigkeit %	Funktion
FL	t(14;18)	bcl-2	70-90	Apoptosehemmung
MALT	t(1;14)	bcl-10		Apoptosehemmung
	t(11;18)	API2/MLT1	50	
MCL	t(11;14)	Cyclin D1	90	Zellzykluskontrolle
BL	t(8;14)	c-myc	80	Differenzierung, Zellzykluskontrolle, ...
	t(8;22)	c-myc	10	
	t(2;8)	c-myc	10	

FL: follikuläres Lymphom; MALT: Marginalzonenlymphom; MCL: Mantelzelllymphom; BL: Burkitt-Lymphom

2.1.2 Zellepitope und Immunphänotyp

Epitopenexpressionsmuster, meist in Form von zellmembranständigen Proteinkomplexen, dienen der diagnostischen Differenzierung verschiedener NHL (*Picker, 1987*). Diese Epitope werden als „cluster of differentiation“ (CD) bezeichnet und übernehmen Rezeptor- und Effektorfunktionen im Funktionskomplex des Immunsystems. Sie werden auch von benignen Lymphozyten und von nicht-immunologischen Zellen exprimiert (*Zola, 2005*). Insbesondere im Bereich der Hämatologie und der Hämatopathologie werden die Hierarchiestufen der hämatologischen Ontogenese durch das CD-Muster mittels Immunhisto- / -zytochemie und Durchflusszytometrie (FACS) charakterisiert (*Davey, 1990; Loken, 1987a; Loken, 1987b; Terstappen, 1990*). Diese immunologisch basierten Prinzipien stellen ein wesentliches Fundament der hämatopathologischen Definition und Diagnostik der Lymphome dar. Auch zytoplasmatische und nukleäre Epitope sind dabei von Interesse, wie die Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) (*Craig, 2008; Stelzer, 1997*).

2.1.3 Inzidenz der NHL und Prominenz der B-Zell-Lymphome

Die NHL sind mit bis zu 95% mehrheitlich B-Zell-Neoplasien und ihre Inzidenz beläuft sich in der westlichen Welt jährlich auf bis zu 15 NHL je 100000 Menschen (*Anderson, 1998; Fisher, 2004; Küppers, 2001*). Der große Überhang der B-Zellfraktion ist durch B-Zell-immanente Prozesse zu erklären: V(D)J-Rekombination, Somatischen Hypermutation (SH), Class Switch Recombination (CSR) (*Küppers, 2005; Shaffer, 2002*). Dies sind für bestimmte Entwicklungsstadien der B-Zell-

Ontogenese spezifische Reaktionen, welche die genetische Keimbahnkonfiguration der B-Zellen im Bereich der Immunglobulingene verändern. Dabei werden, mit dem Ziel eine optimale adaptive Immunantwort bereitzustellen, Einzel- und Doppelstrangbrüche, Rekombinationen, Deletionen und Punktmutationen in das Genom eingeführt. Es besteht folglich, abhängig vom Differenzierungsstadium der Vertreter der B-Zelllinie, ein intrinsisches Risiko zur Erzeugung von nicht-physiologischen, aberranten Mutationen. Diese besitzen das Potential als präkanzerotische Läsionen zu wirken (vgl. 2.1.1 *Zytogenetik und Genexpressionsprofile*) und markieren die angesprochenen primären und sekundären malignen Ereignisse der Lymphomentstehung (Hagen, 2006).

2.2 Lymphomklassifikationen

2.2.1 Vorläufersysteme

In der Vergangenheit wurden weltweit verschiedene Klassifikationen der Lymphome verwendet. Die traditionelle Rappaport Klassifikation von 1966 basierte auf rein histomorphologischen Kriterien und war die erste umfassende, relevante Einteilung der Lymphome. Sie fand klinisch große Anwendung, da sie damals eine unerreicht hohe prognostische Relevanz hatte. Sie stellt damit einen Meilenstein der klinischen Risikostratifizierung der Lymphome dar. Ferner unterschied sie erstmalig strikt Hodgkin von Non-Hodgkin-Lymphomen (Byrne, 1977; Rappaport, 1966). Durch neue Erkenntnisse im Bereich der Lymphozytenbiologie und des Immunsystems erschien die Rappaport Klassifikation zunehmend unzeitgemäß und es wurden differenziertere Klassifikationen notwendig, die den wachsenden Erkenntnisgewinnen der wissenschaftlichen Forschung gerecht werden sollten (Kirchner, 1972; Masuzawa, 1973; Parker, 1975; Shortman, 1972).

In Deutschland wandte die Arbeitsgruppe um den Pathologen und Anatom Prof. Dr. K. Lennert bis dahin ungesehene immunologische Methoden der CD-basierten Unterscheidung und damit der Charakterisierung von Lymphomen an. In den USA waren der aus Cleveland, Ohio stammende Pathologe Prof. Robert J. Lukes und der am Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee tätige Pathologe Prof. Robert D. Collins Pioniere auf dem Gebiet der Lymphomforschung. Die neuen Einsichten mündeten in Deutschland in der Kiel Klassifikation (Lennert, 1975). Sie gliederte die Entitäten gemäß histomorphologischer, zytomorphologischer und immunphänotypischer Kriterien, fand überwiegend in Europa Anwendung und wurde wiederholt aktualisiert (Bennett, 1974; Brittinger, 1978; Stansfeld, 1988). In den USA wurde die Lukes-Collins

Klassifikation erarbeitet, die ähnliche Kriterien anwendete wie der europäische Entwurf (*Lukes, 1974; Uppenkamp, 2002*). Mit der „Working Formulation“ wurde in den USA der Versuch unternommen, die neu definierten Entitäten gemäß ihres klinischen Verlaufs zu ordnen, um die wissenschaftlich abstrakten Einteilungen in klinisch relevante Leitlinien zur Behandlung der Lymphome zu übersetzen. Die Lymphome wurden dazu nach Graden der (abnehmenden) Lebenserwartung gruppiert: low, intermediate und high grade (*CA, 1982*). Die Parallelexistenz unterschiedlicher, teils rivalisierender und widersprüchlicher Klassifikationen und Leitlinien erschwerte den internationalen Vergleich klinischer Studien zu(r Therapie von) NHL und damit letztlich die Einigung auf international gültige Diagnosekriterien, Risikostratifizierungen und Therapieleitlinien. Diese Situation wurde zu Beginn der 1990-er Jahre von Pathologen und klinisch tätigen Ärzten überwunden. Sie formierten sich zur „International Lymphoma Study Group“ (ILSG), die eine integrative Klassifikation distinkter Lymphomentitäten, basierend auf morphologischen, klinischen, immunphänotypischen, zyto- und molekulargenetischen Aspekten definierte. Diese Klassifikation wurde 1994 als „Revised European-American Lymphoma (REAL) classification“ publiziert (*Harris, 1994; Niermann, 2008; Norton, 1996; Pileri, 1995; Uppenkamp, 2002*).

2.2.2 WHO-Klassifikation

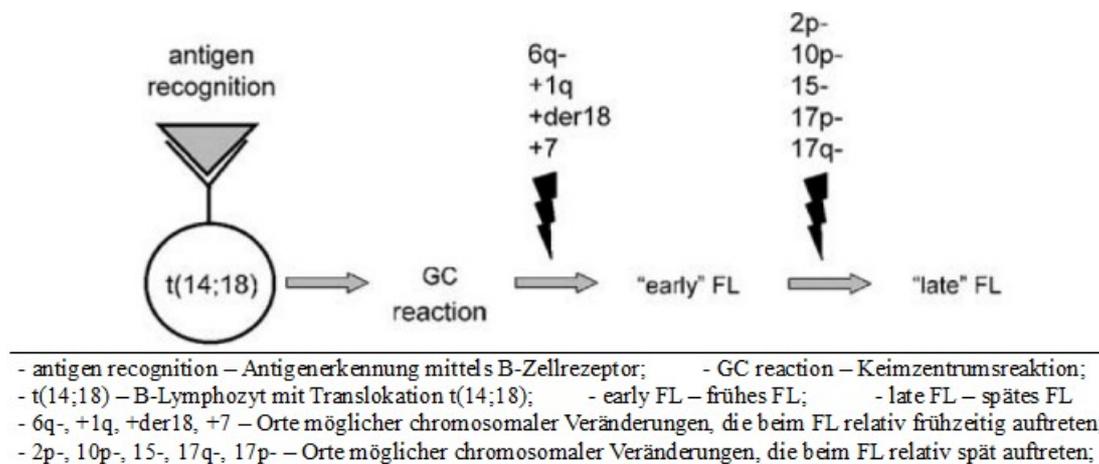
Die zuletzt im Jahr 2008 aktualisierte WHO Klassifikation der malignen Lymphome ist mit ihrer Fassung aus dem Jahr 2001 aus der REAL-Klassifikation hervorgegangen und stellt damit eine aktualisierte REAL-Klassifikation dar. Anders als die REAL Klassifikation deckt die WHO Klassifikation das gesamte Spektrum der Hämatopathologie ab (*Cogliatti, 2002; Jaffe, 2009*).

2.3 Das folliculäre Lymphom

Das folliculäre Lymphom (FL) ist in der westlichen Welt mit einem Anteil von ca. einem Drittel aller Lymphome das häufigste niedrig maligne B-Zell-NHL (70% aller niedrig malignen Lymphome) und nach dem „diffus großzelligen B-Zelllymphom“ (DLBCL) (30-40% aller Lymphome) das häufigste Lymphom überhaupt (*Anderson, 1998; Fisher, 2004; The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997*). Es findet sich primär überwiegend nodal und zeigt dabei morphologisch ein folliculäres Wachstumsmuster. U.a. hieraus wurde die Abstammung von Keimzentrums-B-Lymphozyten, den GCLs, abgeleitet. Der Anteil von Zentroblasten bestimmt dabei das histologische Grading. Die typische genetische Aberration des FLs ist die Translokation

t(14;18), die zum Fusionsonkogen BCL2/IgH führt (Jaffe, 2009). Aktuell ist es allgemein anerkannt, dass diese Läsion bereits in frühen Entwicklungsstadien der B-Zellontogenese im Knochenmark entsteht (Bertoli, 1988). Diese Translokation alleine ist für die Manifestation eines FLs nicht ausreichend, sondern wird als primäres onkogenes Ereignis angesehen, welches lediglich das Potential zur malignen Transformation in sich birgt; es sind weitere, sekundäre genetische Veränderungen für die Genese des FLs notwendig (vgl. Abb. 2) (Bende, 2007; de Jong, 2005).

Abb. 2 – sekundäre genetische Veränderungen der FL-Entwicklung (nach Bende R. J., 2007)



Die Inzidenz des FLs ist in Europa und den USA unter Menschen in der fünften und sechsten Lebensdekade am höchsten (Fisher, 2004). In Asien und Entwicklungsländern ist sie aus ungeklärten Gründen deutlich niedriger (Anderson, 1998; Biagi, 2002). Klinisch zeigt sich ein variabler, jedoch typischerweise protrazierter Verlauf. Das mediane Überleben beträgt ab Diagnosestellung ca. 10 Jahre. Das FL präsentiert sich bei der Mehrheit der Erkrankten bei Diagnose in einem fortgeschrittenen Ann-Arbor-Stadium (vgl. 2.3.2 Grading, Staging und Risikostratifizierung). Im Stadium IV liegt ein systemischer Befall durch das FL vor, der verschiedene Lymphknotenregionen, die Milz, den Waldeyerschen Rachenring und das Knochenmark involvieren kann. Eine sekundäre Infiltration extralymphatischer Gewebe wie des Gastrointestinaltrakt oder der Haut können v.a. bei diesen fortgeschrittenen Stadien auftreten (Bende, 2007; Horning, 1993; O'Brien, 1991). Nur vergleichsweise selten findet die primäre Manifestation extranodal statt, beispielsweise an der Haut (primär kutanes FL), den Ovarien, dem Auge oder dem Gastrointestinaltrakt (primär gastrointestinales FL) (Fisher, 2004; Jaffe, 2009). Das FL weist eine ungleiche Geschlechterverteilung auf. Das Verhältnis beträgt 1:1,7 (Mann:Frau) (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997). Bei 10-30% der Patienten mit FL kommt es im Krankheitsverlauf zu einer Progression des indolenten FLs zum aggressiven DLBCL (Morley,

2008; Ottensmeier, 1996). Diese Prozentangaben beruhen auf sehr konservativen Schätzungen und je nach Quellenlage transformieren 70% und mehr der FL-Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsgeschehens (vgl. 2.6.2 *Progression zu aggressiven Lymphomen*). Dies belegen u.a. post mortem Studien. Eine Progression zu anderen aggressiven Lymphomen, wie beispielsweise dem plasmablastischen Lymphom, tritt weitaus seltener auf (Muller-Hermelink, 2001).

2.3.1 Immunphänotypisierung

FL exprimieren typischerweise pan-B-Zellmarker wie CD19 und CD20, CD10 und CD79a. Ferner werden spezielle B-Zellmarker wie BCL-6, und CD38, sowie Immunglobuline mit folgender Häufigkeitsverteilung exprimiert: IgM (50-60%) > IgG (40%) > IgA (selten). Darüber hinaus finden sich CD95, CD86 und CD40, allerdings schwächer ausgeprägt, als auf normalen Keimzentrums-B-Zellen. Im Gegensatz zu Zentroblasten und Zentrozyten exprimieren FL-Zellen BCL-2 verstärkt. Die CD23- und CD43-Expression ist variabel. Ki67 wird anders als bei der reaktiven folliculären lymphatischen Hyperplasie in geringem Ausmaß exprimiert (Anderson, 1984; Jaffe, 1974).

2.3.2 Grading, Staging und Risikostratifizierung

Das histologische Grading des FLs richtet sich nach der Anzahl an zentroblastären Lymphomzellen, da die biologische Aggressivität des Lymphoms mit der Anzahl dieser Zellen tendenziell zunimmt (Anderson, 1982; Jaffe, 2009). Die WHO-Klassifikation führt die auf Berards Vorschlägen zur Zählweise beruhende Einteilung an (Mann, 1983; Nathwani, 1986):

- Grad I - null bis fünf Zentroblasten / high power field (hpf);
„follicular small cleaved lymphoma“.
- Grad II - sechs bis 15 Zentroblasten / hpf;
„follicular mixed“.
- Grad III - mehr als 15 Zentroblasten / hpf;
„follicular large cell lymphoma“.

FL des Grades I und II unterscheiden sich in ihrer klinischen Symptomatik, der Zytogenetik und ihrem Ansprechen auf Therapie nur gering und sollten deshalb, gemäß der aktuellen Version der WHO Klassifikation von 2008, beide als klinisch indolente, low-grade Lymphome angesehen

werden (*Harris, 1999; Jaffe, 2009; Solal-Céligny, 2004*). Kontrovers diskutiert wird die Unterteilung der high-grade FL in Grad IIIa- und Grad IIIb, wobei Grad IIIa ebenfalls als indolentes Lymphom und Grad IIIb eher als klinisch aggressives Lymphom anzusehen sei (*Bosga-Bouwer, 2003; Ott, 2002*). Das biologische Verhalten der Grad IIIb Lymphome steht dabei dem des DLBCLs näher, als dem des FLs (*Chau, 2003; Ha, 2003*). Die molekularpathologischen Befunde sprechen ebenfalls eher für eine DLBCL-Variante (*Karube, 2007; Katzenberger, 2004*). FL^o1/2 sind weltweit die häufigsten Präsentationen des FLs bei Diagnosestellung (*The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997*). Die klinische Stadieneinteilung des FLs erfolgt gemäß der Ann-Arbor-Klassifikation (*Carbone, 1971; Federico, 2000; The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993*). Um der Heterogenität des FLs im klinischen Staging gerechter zu werden, wurden verschiedene prognostische Indices eingeführt, u.a. der follicular international prognostic index (FLIPI) (*Lopez-Guillermo, 1994; Shipp, 1994; The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993*). Er dient der Risikostratifizierung und damit der zeitlichen Abwägung der verschiedenen Behandlungsmodalitäten (*Romaguera, 1991; Solal-Céligny, 2004*). Der FLIPI beinhaltet fünf Punkte:

- Alter (> vs. < 60 Jahre)
- LDH-Serumspiegel (erhöht vs. nicht erhöht)
- Lymphknotenregionen (> vs. < vier Regionen betroffen)
- Hämoglobin (niedriges Hämoglobin / Anämie vs. physiologische Werte)
- Ann-Arbor-Stadium (III und IV vs. I und II)

Patienten die keinen bzw. einen Punkt des FLIPI erfüllen, haben mit einer durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensrate von 91% und einer 10-Jahres-Überlebensrate von 71% ab Diagnosezeitpunkt ein relativ niedriges Risiko (kurzfristig) am FL zu versterben. Patienten mit zwei Punkten befinden sich im intermediären Risikobereich (78% 5-Jahres-Ü und 51% 10-Jahres-Ü) und Patienten mit drei oder mehreren Punkten besitzen ein deutlich höheres Risiko (52% 5-Jahres-Ü und 36% 10-Jahres-Ü) (*Solal-Céligny, 2004*).

2.3.3 Therapie des folliculären Lymphoms

In Abhängigkeit vom Ann-Arbor-Stadium, den Komorbiditäten des Patienten und des FLIPI existieren verschiedene stadienadaptierte Therapiemodalitäten. Dabei liegt meist keine unumstrittene Standardtherapie vor; ein umfassender wissenschaftlicher Konsens wurde noch nicht

ermittelt und ist Gegenstand zahlreicher klinischer Studien (*Aurora, 2006; Czuczman, 2006; Friedberg, 2009*). Angesichts vieler strittiger Punkte haben sich durch klinische Erfahrung und klinische Studien der Vergangenheit dennoch verschiedene Behandlungsstandards herausgebildet. In frühen Stadien der Erkrankung (Stadium I und II nach Ann-Arbor) stellen das Zuwarten unter regelmäßiger Kontrolle bis zum Auftreten von Symptomen („watchful waiting“ / „wait and see“), als auch die Radiotherapie (RTX) wissenschaftlich gestützte Optionen dar (*O'Brien, 1991*). Bei einem Subkollektiv dieser Patienten kann die extended-field Radiotherapie (RTX) sogar kurativ wirken (*Mac Manus, 1996*). Durch sie werden durchschnittlich 10-Jahres-Überlebensraten (10-J-Ü) von 60-80% und 10-Jahres-Rezidivfreiheitsraten (10-J-R) von 45-60% erreicht (*Chen, 1979*). Das „wait and see“-Konzept stützt sich auf die Einschätzung des FLs als indolente, über Jahre asymptomatisch verlaufende und nach Therapie zu Rezidiven mit progredient kürzeren Remissionsintervallen neigende Erkrankung (*Horning, 1984*). Offenbar als Reflexion der Tumorbiologie folgt das in klinischen Studien beobachtete Ausbleiben von Überlebensvorteilen bei frühem Therapiestart im Vergleich zum Zuwarten, mit Ausnahme der Patienten, die durch die RTX geheilt werden. Wie dieses Subkollektiv allerdings definiert ist und wie es sich im Rahmen des Stagings ermitteln lässt, ist nicht stringent definiert (*Advani, 2004; Brice, 1997; Guadagnolo, 2006; Mac Manus, 1996*). Eine auf die RTX folgende, adjuvante Chemotherapie (CTX) ist mit keinem zusätzlichen Überlebensvorteil verbunden (*Kelsey, 1994*). Bei Bestehen von Vorerkrankungen, welche eine RTX nicht zulassen, ist die abwartende Strategie somit bis zur klinischen Verschlechterung gerechtfertigt.

Da die Mehrheit der Patienten, ca. 70-85%, bei Diagnose des FLs ein fortgeschrittenes, inkurables Krankheitsstadium aufweist, dienen die therapeutischen Bemühungen hier der Symptomkontrolle und damit der Verbesserung der Lebensqualität (*Anderson, 1982*). Eine Therapie wird auch bei diesen Patienten mit Blick auf die Überlebensstatistik erst beim Auftreten von Symptomen begonnen, da die sofortige Initiierung der Therapie im asymptomatischen Krankheitsstadium ebenfalls keinen Überlebensvorteil nach sich zieht (*Ardeshna, 2003*). Sofern vom Patienten toleriert, wird bei symptomatischen Patienten die Modalität der Chemoimmuntherapie appliziert (*Hiddemann, 2005; Peterson, 2003*). Dabei ist die optimale CTX Gegenstand klinischer Studien. Die Ergänzung der CTX um eine Immuntherapie mit monoklonalen AK wie Rituximab, welcher gegen CD20 gerichtet ist (z.B. R-CHOP), hat ein verlängertes Überleben zur Folge (*Fisher, 2005; Herold, 2007; Marcus, 2008; Sacchi, 2007; Salles, 2008*).

Die Transplantationsmodalitäten wie allogene oder autologe Stammzell- / Knochenmarkstransplantation stellen für das FL in fortgeschrittenen Stadien und v.a. bei therapierefraktären

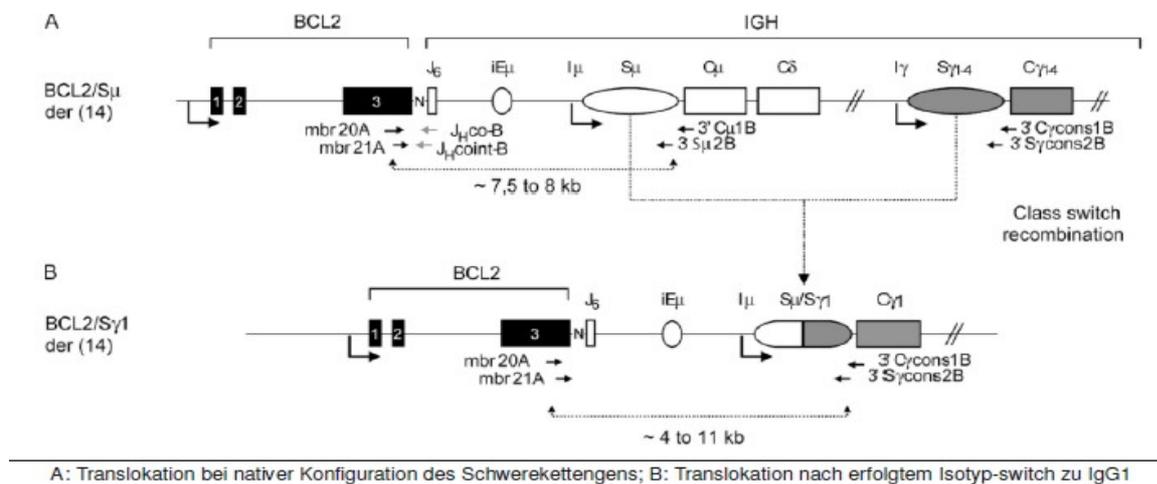
Verläufen potentiell kurative und damit vertretbare Optionen dar. Die autologe Stammzelltransplantation ist das relativ weniger belastende Verfahren. Allerdings sind beide Technologien noch mit einer hohen Therapie-assoziierten Morbidität und Mortalität verbunden, so dass sie (noch) keine Standardtherapie darstellen können. Mehrere klinische Studien zeigen Überlebensvorteile der Knochenmarks- / Stammzelltransplantationen im Vergleich zur CTX / Immuntherapie, weshalb sie aktuell v.a. für therapierefraktäre Fälle eine wertvolle Erweiterung der Therapieoptionen sind (*Bastion, 1995; Bertz, 2002; Freedman, 1999; Gopal, 2003; van Besien, 2003*). Andere erfolgversprechende Therapieansätze sind beispielsweise die Radioimmuntherapie und die anti-Idiotypen Vakzinetherapie (*Gandhi, 2005*).

2.4 Die Translokation t(14;18)

Das FL war eines der ersten Lymphome bei dem der zur Erkrankung disponierende genetische Defekt nachgewiesen wurde, nämlich die Translokation t(14;18)(q32;q21). Dies geschah durch mehrere Forschergruppen Ende der 1970er und während der 1980er Jahre (*Bakhshi, 1985; Bloomfield, 1983; Fukuhara, 1978; Levine, 1985; Rowley, 1988; Yunis, 1982*). Durch die balanzierte Translokation zwischen dem bcl-2-Gen auf Chromosom 18 und dem Immunglobulin-Schwereketten-(IgH-)Gen auf Chromosom 14, gelangt das bcl-2-Gen unter den Einfluss des potent wirkenden IgH-Enhancers (E_{μ}) (*Cleary, 1986a; Tsujimoto, 1984*). Die Bruchstellen auf Chromosom 18 befinden sich in 60-70% der Fälle in der nicht-translatierten Region in 3'-Richtung („3'-untranslated region“) des bcl-2-Gens. Dieser Lokus wird als „major breakpoint region“ (MBR) bezeichnet. In 10-25% der Translokationen akkumulieren die Bruchstellen auf Chromosom 18 in der „minor cluster region“ (MCR), die sich 30 Kilobasenpaare (kb) vom bcl-2 Gen in 3'-Richtung („downstream“) entfernt befindet. Die restlichen Translokationen verteilen sich auf den Bereich zwischen MBR und MCR. Er wird als „intermediary cluster region“ (ICR) bezeichnet (*vgl. Abb. 3*) (*Cleary, 1986b; Kneba, 1991*). Bezüglich der Abhängigkeit der Prognose von der Lokalisation des Bruchortes herrscht Uneinigkeit (*Lopez-Guillermo, 1999; Weinberg, 2007*). Diese chromosomale Mutation wird durch (T- und) B-Zell-spezifische V(D)J-Rekombinationssysteme verursacht. Dabei spielen die als Transposasen tätigen Produkte der „recombination activating genes“ (RAG) auf Chromosom 11q13, die Enzyme RAG1 und RAG2, eine entscheidende Rolle. Postuliert wurde, dass durch strukturelle Ähnlichkeit zwischen ihren physiologischen Zielstrukturen, den „recombination signal sequence“ (RSS)-Motiven der Immunglobulin-Kassetten-gene, und Abschnitten in der Umgebung des bcl-2-Gens, die RAG-Enzyme fälschlicherweise eine Rekombination zwischen Chromosom 14 und Chromosom 18 ausführen, die in der beschriebenen

Translokation mündet (Cleary, 1985; Hiom, 1998; Knecht, 1994; Tsujimoto, 1985; Tsujimoto, 1988).

Abb. 3 – schematische Darstellung der Translokation $t(14;18)$ (nach Roulland S., 2006)



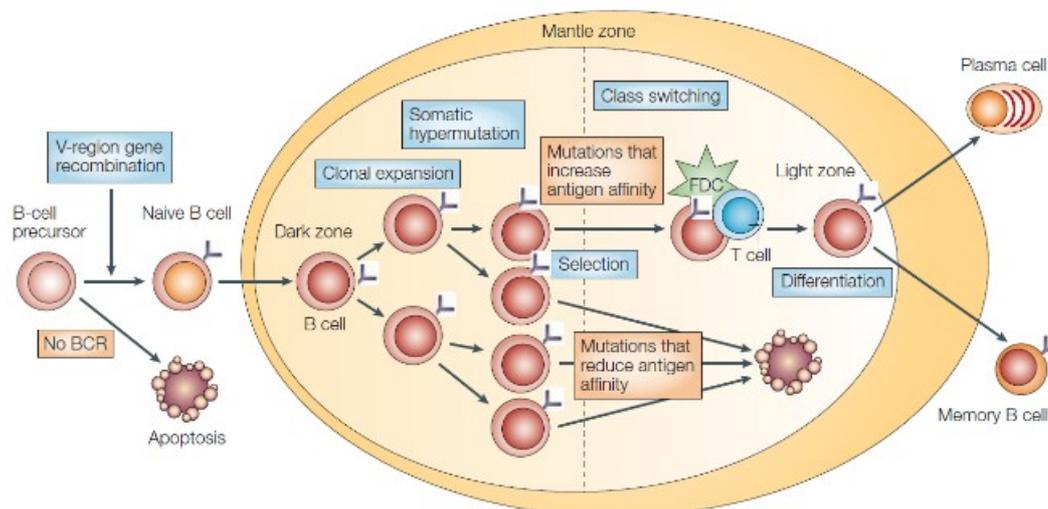
Allerdings wurde diese These auch angezweifelt und stattdessen die Konformation der DNS als non-B-DNS für die aberrante Wirkung der Transposasen verantwortlich gemacht (Raghavan, 2004). Unabhängig von der Ursache auf Seiten der DNS-Konformation / -Sequenz wird diskutiert, dass sich diese chromosomale Aberration in frühen Entwicklungsstadien der B-Lymphozyten im Knochenmark manifestiert, da die V(D)J-Rekombinationssysteme während dieser Stadien physiologischerweise aktiv sind (Bertoli, 1988). Ferner haben Sequenzierungsversuche gezeigt, dass es während der D-J_H- und V_H-DJ_H-Rekombination, also den Pro-B-Zell-Stadien, zur aberranten RAG1 / RAG2-Aktivität kommen kann (Lieber, 2006). Andererseits bestehen Hinweise, dass die Translokation $t(14;18)$ auch zu einem späteren Zeitpunkt der B-Zell-Ontogenese entstehen könnte. Der dem Isotyp-Switch der Immunglobuline zugrunde liegende genetische Prozess wurde dabei als mögliche alternative Läsionsmodalität identifiziert (vgl. 2.5.3 Verschiedene Immunglobulinklassen) (Fenton, 2002).

2.4.1 Translokation $t(14;18)$ und die Keimzentrumsreaktion

Da die transkriptionelle Aktivität von E_H in B-Zellen funktionsgemäß hoch ist, bewirkt die Translokation $t(14;18)$ eine konstitutive, erhöhte Expression des bcl-2-Proteins (Lieberson, 1995). Normalerweise ist diese Expression streng reguliert, besonders in den Keimzentren (GC) von LK (Levy, 1994; Merino, 1994). Auf Grund der antiapoptotischen Wirkung dieses Proteins und der

damit verbundenen Bedeutung für die Selektionsprozesse in den GC, besitzen naive t(14;18)-positive B-Zellen gegenüber nicht-translozierten B-Zellen einen Überlebensvorteil bzw. das Potential die GC-Reaktion zu deregulieren (Graninger, 1987; McDonnell, 1989). Gemäß des aktuellen pathogenetischen Modells der FL-Entstehung entziehen sich solche präkanzerotischen Zellen der (negativen) Selektion, indem sie zur bcl-2-Expression nicht mehr auf Wechselwirkung mit anderen Zellen, Zytokine, oder Wachstumsfaktoren angewiesen sind (Rajewsky, 1996). Physiologischerweise liefert das GC als Selektionsnische des adaptiven Immunsystems lediglich naiven B-Lymphozyten / Zentrozyten, die hochaffine B-Zellrezeptoren für präsentierte Antigene exprimieren, überlebenswichtige Signale (MacLennan, 1994). Durch die resultierende, transiente Erhöhung von bcl-2 und auch anderer antiapoptotischer Proteine wird ein Aufschub der Apoptose ermöglicht (Hockenbery, 1990; Korsmeyer, 1992a). Naive B-Lymphozyten / Zentrozyten, welche B-Zellrezeptoren geringer Affinität gegenüber präsentierten Antigenen exprimieren, gehen aus Mangel an trophischen Signalen nach durchschnittlich neuen Tagen durch Apoptoseinduktion zu Grunde (Baird, 1999). Dadurch überdauern weniger als 25% der neu generierten naiven B-Zellen den Selektionsdruck (vgl. Abb. 4) (Liu, 1997; MacLennan, 1994).

Abb. 4 – B-Zellentwicklungsstadien und Keimzentrumsreaktion (nach Küppers R., 2005)



- V-region gene recombination – Rekombination des variablen Bereichs der Immunglobulingene im Knochenmark;
- Clonal expansion – klonale Vermehrung im Keimzentrum nach Antigenkontakt;
- Somatic hypermutation – somatische Hypermutation der variablen Bereiche der Immunglobulingene;
- Class switching – Veränderung des Immunglobulintyps;
- Selection – Selektion von B-Zellklonen mit hochaffinen B-Zellrezeptoren gegenüber einem Antigen;
- Differentiation – Differenzierung von Keimzentrums-B-Zellen zu Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen;
- B-cell precursor – Vorläufer-B-Zelle; - Naive B cell – naive B-Zelle ohne Antigenkontakt; - Apoptosis – Apoptose;
- Dark zone – dunkle Zone des sekundären Keimzentrums; - Light zone – helle Zone des sekundären Keimzentrums;
- B cell – B-Zelle / B-Lymphozyt; - T cell – T-Zelle / T-Lymphozyt; FDC – follikuläre dendritische Zelle;
- Plasma cell – Plasmazelle; - Memory B cell – B-Gedächtniszelle; Mantle zone – Mantelzone eines Keimzentrums;
- No BCR – keine B-Zellrezeptorexpression;
- Mutations that increase antigen affinity – Mutationen, welche die Affinität des B-Zellrezeptors gegenüber einem Antigen erhöhen
- Mutations that reduce antigen affinity – Mutationen, welche die Affinität des B-Zellrezeptors gegenüber einem Antigen erniedrigen

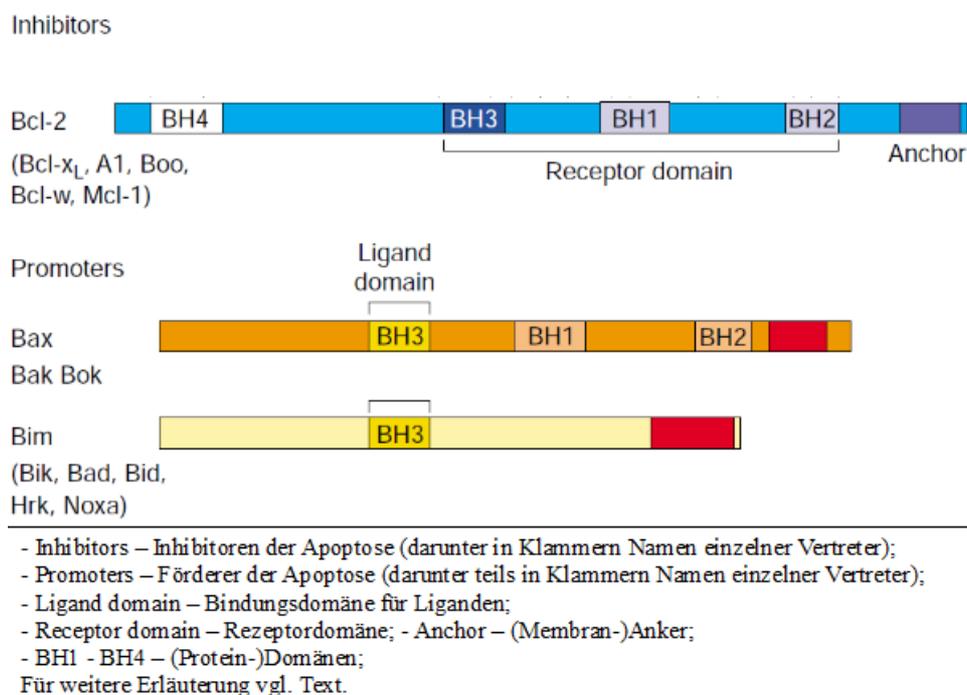
Die aberranten B-Zellen besitzen damit in ihrer Apoptose-attenuierten Nische der konstitutiven bcl-2-Expression die Möglichkeit, unabhängig vom beschriebenen Selektionsdruck zu persistieren (Cory, 1995; Vaux, 1988). Durch dieses Unterlaufen der regulatorisch wirksamen und generell die genetische Integrität von Zellen garantierenden Apoptose folgt das Potential weitere genetische Veränderungen erwerben zu können. Da die funktionellen Konsequenzen der Translokation t(14;18) den Selektionsdruck von den betroffenen B-Zellen nehmen, ist diese Mutation eine wesentliche molekulare Grundlage für die Entwicklung und Manifestation des FLs (Hockenbery, 1993; Korsmeyer, 1992b). Dennoch ist sie für die Ausprägung eines kompletten malignen Phänotyps nicht ausreichend. Weitere transformierende Ereignisse sind dazu notwendig (s.o.).

2.4.2 Molekulare Aspekte von bcl-2 im Kontext der Apoptoseregulation

Der stereotype Prozess des programmierten Zelltodes, der Apoptose, wird von den mannigfaltigen Mitgliedern der „bcl-2 Familie zytoplasmatischer Proteine“ reguliert (Adams, 1998; Kerr, 1972). Diese Familie lässt sich in proapoptotische und antiapoptotische Subfamilien untergliedern. Durch die wechselseitige Interaktion zwischen den verschiedenen proapoptotischen und antiapoptotischen Proteinen entsteht ein labiles Fließgleichgewicht, welches in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli verschoben werden kann und dadurch das Überleben oder den Tod der Zelle bedingt. Solche Stimuli können auf die Zelle einwirkende Zytokinmuster, Zytokinentzug, der Verlust des Kontaktes zu anderen Zellen bzw. zur extrazellulären Matrix (Anoikis), oder allgemein zytotoxischer Stress und DNS-Schäden sein (Fairbairn, 1993; Payne, 1995; Pitti, 1996; Puthalakath, 2001). Die Konzentration an freien pro- und antiapoptotischen Proteinen, welche durch ihre wechselseitigen Interaktionen bestimmt wird, setzen somit einen variablen Schwellwert, von welchem es abhängt, ob eine Zelle das Programm der Apoptose induziert, oder nicht (Adams, 2001). Man unterscheidet im Detail drei Subfamilien voneinander. Die antiapoptotische „bcl-2-like Proteinfamilie“, die proapoptotische „Bax/Bak-like Proteinfamilie“ und die proapoptotische „BH3-only Proteinfamilie“ (Antonsson, 2001; Bouillet, 2002). Die Vertreter der „bcl-2-like Proteinfamilie“ enthalten drei bis vier Homologiedomänen (BH1-BH4) (vgl. Abb. 5, *Inhibitors*). Die Domänen BH1-BH3 formen dabei eine hydrophobe Tasche, die fakultative BH4-Domäne stabilisiert diese. Diese Tasche ist der funktionelle Teil der „bcl-2-like Proteine“. Mit ihr werden „BH3-only Proteine“ und „Bax-like Proteine“ gebunden und über diese Sequestration die antiapoptotische Wirkung ausgeübt. Die „bcl-2-like Proteine“ besitzen keine enzymatische Aktivität und führen ihre Aufgaben ohne Beihilfe anderer Proteine aus. „Bax/Bak-like Proteine“ enthalten zwei bis drei BH-Domänen (vgl. Abb. 5, *Promoters, mittig*) und sind, ähnlich mancher bakterieller Toxine, Porenbildner. So erhöhen sie,

sofern sie nicht mit ihrer BH3-Domäne an „bcl-2-like Proteine“ gebunden sind, die Permeabilität verschiedener membranös begrenzter, (intra-)zellulärer Kompartimente, wie den Mitochondrien. Durch Porenbildung, beispielsweise in der äußeren mitochondrialen Membran, dringen aus dem mitochondrialen Intermembranraum proapoptotische Faktoren wie Cytochrom c und Apaf-1 in das Zytosol ein und verschieben das Fließgleichgewicht. Diese Faktoren dienen als Kondensationsfokus der Aktivierung von Apoptose-auslösenden Caspasekaskaden. Die Vertreter der „BH3-only Proteinfamilie“ binden mit ihrer BH3-Domäne an Vertreter der „bcl-2-like Proteinfamilie“ (vgl. Abb. 5, Promoters, unten). Da dies dieselbe Bindungstasche ist mit der „bcl-2-like Proteine“ die „Bax/Bak-like Proteine“ sequestrieren können, werden die „Bax/Bak-like Proteine“ durch den Einfluss der „BH3-only Proteine“ liberiert, wodurch das Fließgleichgewicht zwischen den „bcl-2 Familienmitgliedern“ in Richtung Apoptose verschoben wird. Demgegenüber sind Wechselwirkungen mit anderen Proteinen wie z.B. p53, die nicht einer der beiden proapoptotischen bcl-2 Familien zugeordnet werden, weitere Möglichkeiten des Apoptoseaufschubs (Borner, 2003; Coultas, 2003). Neben der Apoptoseregulation durch die „bcl-2 Familienmitglieder“ besteht die Möglichkeit der direkten Aktivierung von Caspasen durch Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor (Nagata, 1996).

Abb. 5 – bcl-2 Familie zytoplasmatischer Proteine (nach Adams J., 2001)



Dieser direkte Weg der Apoptose ist in den Keimzentren der sekundären Lymphfollikel für die Affinitätsreifung von untergeordneter Bedeutung und ist beispielsweise für die Eradikation

autoreaktiver Klone entscheidend. Zwar exprimieren die Keimzentrums-B-Zellen verstärkt den Fas-Rezeptor, jedoch vollzieht sich die negative Selektion niedrig-affiner B-Lymphozyten in erster Linie über den Mechanismus der Zytokindeprivation und damit über die Verschiebung des beschriebenen Fließgleichgewichts (*Kondo, 2007; Lagresle, 1995*). B-Zellen mit niedrig-affinen BCRs erhalten im Rahmen der Affinitätsreifung der Keimzentrumsreaktion nicht die überlebensnotwendigen, trophischen Signale (*Fairbairn, 1993*). Folglich gewinnen die proapoptotischen Vertreter der „bcl-2 Familie“ die Oberhand und induzieren die Apoptose (*Korsmeyer, 1992a*). Speziell im Kontext der Keimzentrumsreaktion fällt damit der funktionelle Zugewinn durch die t(14;18) Translokation besonders ins Gewicht und führt durch die Unterminierung der Selektionsprozesse zur Deregulation der Keimzentrumsreaktion (*Kondo, 2007; MacLennan, 1994*) (vgl. 2.4.1 *Translokation t(14;18) und die Keimzentrumsreaktion*).

2.4.3 c-myc, NF- κ B und genetische Instabilität

Eine konstitutive Expression von bcl-2 besitzt neben der Erzeugung von Apoptoseresistenz auch das Potenzial, einen Zustand der genetischen Instabilität zu fördern und zu unterhalten. Daran sind neben der Beeinflussung von DNS-Reparatursystemen auch Wechselwirkungen mit den potentiell onkogenen Proteinen c-myc und NF- κ B beteiligt (*Heckman, 2002; Marin, 1995; Saintigny, 2001; Vaux, 1988*). Untersuchungen haben gezeigt, dass die BH4-Domäne des bcl-2 Proteins an die MBII-Domäne von c-myc binden kann. Durch diese Heterodimerisierung der Proteine wird die transkriptionelle Aktivität von c-myc erhöht und die Zuverlässigkeit von DNS-Reparatursystemen reduziert (*Karlsson, 2003*). Besonders trifft dies für die Expression des DNS-Reparaturenzyms „apurinic-apyrimidinic endonuclease 1“ (APE1) zu (*Jin, 2006*). Das gehäufte Auftreten von DNS-Schäden wegen insuffizienter Reparatur ist die Folge. So können sich zusammen mit der Apoptoseresistenz in t(14;18)-positiven Zellen DNS-Schäden verstärkt anhäufen und persistieren (*Kuo, 1999*). Dies wird zusätzlich bekräftigt, da die physiologischerweise vorherrschende proapoptotische Wirkung einer verstärkten Expression von c-myc durch die konstitutive Expression von bcl-2 kompensiert wird (*Bende, 2007*). Folglich können die pathologisch erhöhten Spiegel von c-myc bestehen (*Jin, 2006*). Neben c-myc steht auch NF- κ B mit bcl-2 über positive „feedback“-Mechanismen in Wechselwirkung. Einerseits bewirkt die erhöhte Expression des bcl-2 Proteins eine Senkung der Konzentration des Inhibitors α von NF- κ B (I κ B α) und eine Erhöhung der NF- κ B-Konzentration. Andererseits erhöht NF- κ B als Transkriptionsfaktor die Expression von antiapoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern, so auch von bcl-2 (*Heckman, 2002*). Diese wechselseitigen Verstärkungsmechanismen zwischen bcl-2, c-myc und NF- κ B erweitern den

passiven, antiapoptotischen Charakter des bcl-2-Onkogens um eine potentiell aktive Komponente der Förderung genetischer Instabilität. Diese molekularen Verschränkungen wirken bei der Entstehung von Lymphomen damit synergistisch (*Hanahan, 2000*).

2.4.4 Follikuläre Lymphome ohne die Translokation t(14;18)

Die erhöhte bcl-2 Expression beruht in 80-90% der FL auf der Translokation t(14;18) (*Bloomfield, 1983; Rowley, 1988*). Bei t(14;18)-negativen FL liegen mehrheitlich funktionelle Äquivalente vor, wie die Translokation t(2;18) und t(18;22), bei denen anstelle von E μ , die Enhancer der Immunglobulinleichtketten-Gene (IgL-Gene) eine verstärkte Expression von bcl-2 bewirken (*Bertheas, 1992; Rimokh, 1993*). Ferner existieren alternative molekularbiologische Wege der FL-Entstehung, die vor allem im asiatischen Raum verbreitet sind und bei denen bcl-2 an der Lymphomentstehung nicht beteiligt ist (*Biagi, 2002*). Diskutierte alternative antiapoptotische Wege im FL sind dabei die Aktivierung des PI3K/AKT/BAD-Signalweges und die BCL-xL-Deregulation (*de Jong, 2005*). Unter den immunhistochemisch bcl-2-negativen t(14;18)-positiven FL wird in der Mehrzahl der Fälle dennoch bcl-2 exprimiert, allerdings in mutierter Form. Diese Mutationen verändern das für den immunhistochemischen Nachweis erforderliche Epitop und führen dadurch zu falsch-negativen Ergebnissen (*Schraders, 2005*). Wegen der Existenz von t(14;18)-negativen FL und dem Auftreten anderer t(14;18)-positiver Lymphomentitäten ist diese Translokation nicht strikt pathognomonisch für das FL. Dennoch stellt sie nach heutiger Überzeugung das molekularpathologische Leitmotiv und das ätiopathogenetische Fundament dieser Entität dar (*Leich, 2009*).

2.4.5 Bedeutung der Translokation t(14;18) in gesunden Individuen

Eine Forschergruppe der Universität Leiden wies in einer Studie die Translokation t(14;18) in peripheren Blutlymphozyten (PBL) unter mehr als der Hälfte der untersuchten, gesunden Individuen nach. Dieser Befund stand in starkem Kontrast zur vergleichsweise niedrigen Inzidenz (3/100.000) des FLs in den Niederlanden (*Limpens, 1991*). Eine ähnliche Studie untersuchte weitere Gewebe gesunder Probanden, wie die Milz, die Tonsillen, das Knochenmark und follikulär-hyperplastische Lymphknoten. Die Translokation wurde dabei ebenfalls, mit unterschiedlicher Gewebeshäufigkeit, nachgewiesen. Der Vergleich der Häufigkeiten t(14;18)-positiver PBL bzw. Milzlymphozyten zweier Alterskohorten (> 61 Jahre und < 20 Jahre) ergab eine 13-fach höhere Anzahl im Blut, bzw. eine 40-fache höhere Anzahl in der Milz, der älteren Kohorte (*Aster, 1992*).

Darüber hinaus zeigten auch andere Gruppen, dass die t(14;18) Translokation in Lymphozyten gesunder Individuen auftrat (*Dölken, 1996; Limpens, 1995; Roulland, 2006*). Männer und Raucher wiesen häufiger t(14;18)-positive Lymphozyten auf, als Frauen oder Nichtraucher (*Bell, 1995; Schmitt, 2006*). Diese Ergebnisse haben u.a. Diskussionen bezüglich der Wertigkeit einer molekular-biologischen Tumervorsorgeuntersuchung, eines Screenings auf diese Translokation hin angestoßen (*Summers, 2001*). Diese Beobachtung des Vorkommens von t(14;18)-positiven B-Zellen in gesunden Probanden steht ferner mit der „multistep“-Hypothese zur Entstehung von Neoplasien, speziell von Karzinomen in Einklang, gemäß derer nicht eine, sondern die Summe verschiedener Aberrationen zur Deregulation des physiologischen Lebenszyklus einer Zelle führt und somit zur Malignomentstehung / -manifestation (*Hanahan, 2000; Weinberg, 1989*). Die allgemein höhere Inzidenz des FLs unter älteren Menschen stützt dies zusätzlich (*Liu, 1994*). Ferner beschrieben Jaffe et al. das „in situ“ FL, welches als mögliches frühes Stadium der FL-Entstehung interpretiert wurde (*Cong, 2002*).

2.4.6 Mausmodelle zum folliculären Lymphom

Transgene Mäuse, bei denen das bcl-2-Gen unter den regulierenden Einfluss von E μ gestellt wurde, entwickelten zunächst folliculäre Hyperplasien, jedoch kein FL. Nach einem Jahr wiesen 15% der Mäuse ein DLBCL auf, von denen die Hälfte sekundär erworbene c-myc-Translokationen präsentierte (*McDonnell, 1989; McDonnell, 1991; Strasser, 1993*). Ein anderes Mausmodell, bei dem das bcl-2-Gen unter den Einfluss eines hämatopoetischen Promotors (Vav-P) gestellt wurde, zeigte in 45% der Fälle Lymphome, die zytomorphologisch FL-Zellen ähnelten, allerdings im histologischen Verbund das folliculäre Wachstumsmuster vermissen ließen (*Egle, 2004*). In doppelt E μ -bcl-2/c-myc transgenen Mäusen entwickelten sich verschiedene Lymphome schneller als in einfach transgenen Mäusen (E μ -bcl-2 und E μ -c-myc) (vgl. 2.4.3 c-myc, NF- κ B und genetische Instabilität) (*Strasser, 1990*). Bei den Lymphomen, welche sich in einfach E μ -c-myc transgenen Mäusen entwickelten, wurden häufig Läsionen in Tumorsuppressorgenen wie p53 und Arf, oder eine erhöhte Mdm2 Expression nachgewiesen (*Eischen, 1999*). Folglich existiert aktuell kein ideales Mausmodell des FLs. Auch lässt sich daran bereits antizipieren, dass eine rein zellzentrierte, lediglich auf den malignen Klone abzielende Betrachtung der Ätiopathogenese des FLs den aberranten funktionellen Modalitäten der Entwicklung dieser Entität nicht gerecht wird (vgl. 2.6 *Tumorprogression und folliculäres Lymphom*).

von dem deutschen und japanischen Bakteriologen Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato in Zusammenhang mit den Diphtherie- und Tetanustoxinen als Antitoxine bezeichnet worden waren, erfolgte 1891 durch den „Vater der Chemotherapie“ Paul Ehrlich (*Lindenmann, 1984*). Für die (AK-basierte) Serumtherapie erhielt Emil von Behring 1901 den ersten Nobelpreis für Medizin (*Stevenson, 1953*). Auf der Grundlage des Wissens um die Existenz von AK, wurden kontroverse Diskussionen bezüglich der Art der Kodierung der unzähligen, gegen verschiedenen Noxen gerichteten Antikörperspezifitäten geführt (*Jerne, 1955; Lederberg, 1988*). Zwei berüchtigte Theorien waren die „Keimbahntheorie“ und die „Somatische Diversifikationstheorie“ (*Dreyer, 1967; Wigzell, 1973*). Da alle, auf mehr als 10^9 geschätzten, möglichen Antikörperspezifitäten die Kapazität des menschlichen Genoms überschreiten würden, sofern diese keimbahnkodiert wären, bestand zunächst ein Paradoxon (*Dreyer, 1965*). 1976 hat sich das von Susumu Tonegawa aus genetischen Studien abgeleitete Modell der somatischen Rekombination der Immunglobulingene als Lösung dieses Kapazitätsparadoxons durchgesetzt und damit die „Somatische Diversifikationstheorie“ bestätigt (*Hozumi, 1976; Tonegawa, 1974; Tonegawa, 1983*). Der molekularbiologische Mechanismus dieser Rekombinationsprozesse wurde durch weitere Experimente aufgedeckt (*Alt, 1986; Alt, 1992; Bassing, 2002; Williamson, 1975*).

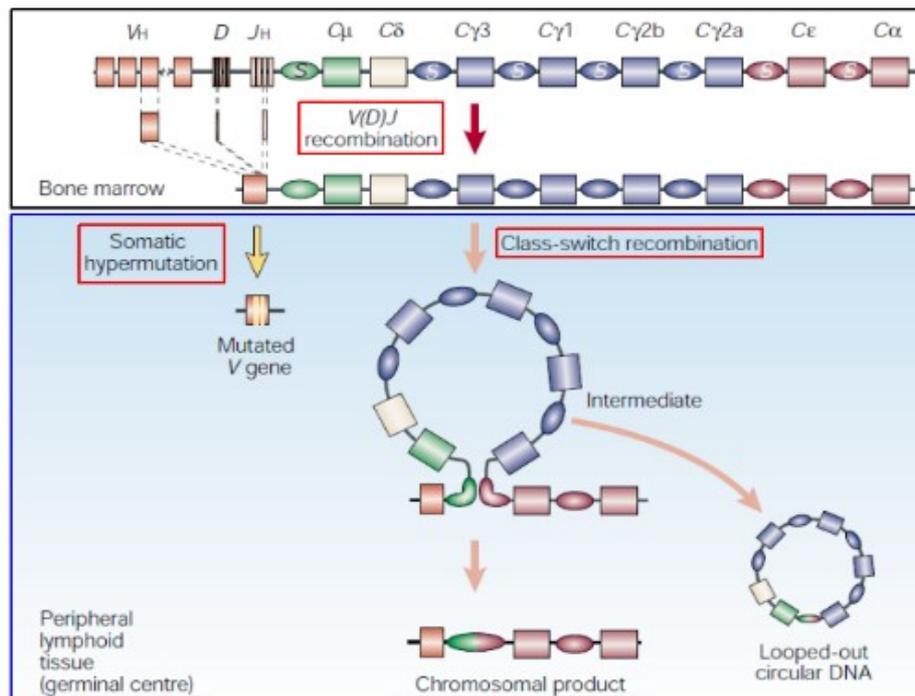
2.5.1 V(D)J-Rekombination und B-Zell Ontogenese

Das Prinzip der V(D)J-Rekombination wird am Beispiel des Immunglobulinschwereketten-Gens (IgH-Gen) (Chromosom 14q32) beschrieben. Für die IgL-Gene gilt analog dasselbe Prinzip, wobei folgende wesentliche Unterschiede bestehen: Im Haplosatz der menschlichen Chromosomen liegen zwei IgL-Loci vor, nämlich der IgL- κ -Locus (Chromosom 2p12) und der IgL- λ -Locus (Chromosom 22q11). Darüber hinaus besitzen die IgL-Loci keine D-Segmente und die Aktivität der TdT ist bei der VJ-Rekombination der IgL niedrig bis nicht vorhanden (*Cook, 1995; Tonegawa, 1978a; Tonegawa, 1978b*).

Der Kontakt eines Antikörpers bzw. eines B-Zell-Rezeptors mit einem Antigen erfolgt über die variablen Anteile der miteinander assoziierten schweren und leichten Kette. Diese beiden Anteile bilden die Bindungsstelle für die antigene Determinante. Jeder Antikörper / BCR besitzt davon zwei identische Ausführungen (vgl. *Abb. 6*) (*Edelman, 1973; Porter, 1973*). Die Aminosäuresequenz des variablen Anteils der schweren Kette (IgV_H) wird durch den variablen Anteil des Immunglobulinschwereketten-Gens (VH-Gen) kodiert. Dieser Genabschnitt entsteht durch die Ligation zufällig ausgewählter, keimbahnkodierter Gensegmente. Dabei werden jeweils ein variability-(V-), ein diversity-(D-) und ein joining-(J-)Segment miteinander verbunden (*Matsuda,*

1996). Es existiert eine Vielzahl an V-, D- und J-Segmenten, die in der Keimbahnkonfiguration in V-, D- und J-Segmentinseln organisiert sind. Das Resultat des Rekombinationsprozesses ist ein integrierter VDJ-Genabschnitt, eine transkriptionelle Einheit, die den rearrangierten Bereich des variablen Abschnittes des VH-Gens darstellt (vgl. Abb. 7) (Early, 1980).

Abb. 7 – VDJ-Rekombination, SH und CSR (nach Kinoshita K., 2001)



Die B-Zellrezeptor-modifizierenden Prozesse sind räumlich und zeitlich getrennt. Die Erzeugung einer transkriptionellen Einheit aus der Keimbahnkonfiguration der Immunglobulingene erfolgt über die V(D)J-Rekombination (recombination) im Knochenmark (bone marrow) früh während der B-Zellontogenese. Die somatische Hypermutation (somatic hypermutation) und der Wechsel des Immunglobulin-Isotyps (class-switch recombination) laufen, spätere B-Zelldifferenzierungsstadien definierend, in den Keimzentren (germinal centre) peripherer lymphatischer Gewebe (peripheral lymphoid tissue) ab.

- mutated V gene – im rearrangierten variablen Anteil des Immunglobulins werden Punktmutationen eingeführt.
- intermediate / looped-out circular DNA – beim Isotyp-Wechsel geht DNS verloren und es entsteht eine neue Konfiguration des konstanten Anteils des Immunglobulins.

Die nicht verwendeten Segmente gehen der Zelle im Zuge der VDJ-Rekombination durch Deletion verloren (Ehlich, 1995; ten Boekel, 1995). Die Leitenzyme der somatischen Rekombination sind die Lymphozyten-spezifischen Enzyme RAG1, RAG2 und TdT, die zusammen mit konstitutiv exprimierten Enzymen die erforderlichen Reaktionen ausführen (Agrawal, 1997; Komori, 1993). Insbesondere finden folgende, B-lymphozytäre Entwicklungsstadien definierende Prozesse im Knochenmark statt (Hardy, 1991; Osmond, 1998). Die RAG-Enzyme erkennen die einzelnen VDJ-Segmente anhand Segment-flankierender Signalsequenzen, den RSS-Sequenzen (Sakano, 1979). Im Stadium der frühen pro-B Zelle erfolgt die Ligation eines D- mit einem J-Segment zum

rearrangierten DJ-Segment, jeweils auf beiden Allelen. Anschließend wird, zunächst auf einem Allel, die späte pro-B-Zelle definierend, das Zusammenführen des DJ-Segments mit einem zufällig ausgewählten V-Segments zum VDJ-Segment vollzogen. Ist dieser Prozess fehlerhaft, folgt auf dem anderen Allel der Versuch ein weiteres, dieses Mal intaktes VDJ-rearrangement zu bilden (*Grawunder, 1998*). Eine Eigenheit der VDJ-Rekombination der IgV_H -Gene ist die Aktivität der TdT. Dieses Enzym führt, als „template-unabhängige“ DNS-Polymerase (- Humane DNS-Polymerasen benötigen normalerweise eine Schablone für die Ausübung ihrer Aktivität. Diese Schablonenfunktion wird, im Rahmen der semikonservativen DNS-Replikation, durch den zu replizierenden DNS-Einzelstrang bereitgestellt -) an den Verbindungsstellen der einzelnen Segmente zufällig Nukleotide ein und erhöht damit die Variabilität der entstandenen VDJ-Sequenz (*Gauss, 1996; Komori, 1993; Repasky, 2004*). Folglich wird einerseits bereits durch die Kombination zufällig ausgewählter V-, D- und J-Segmente Sequenzvielfalt erreicht; diese wird als „kombinatorische Vielfalt“ deklariert. Andererseits erzeugt die TdT-Aktivität zusätzlich „junktionale Vielfalt“. Alleine durch die kombinatorische Vielfalt der IgV_H und IgV_L zusammen, sind statistisch betrachtet mehr als 10^6 Antikörperspezifitäten denkbar (*Lee, 1993; Thompson, 1995; Weigert, 1980*).

2.5.2 Somatische Hypermutation und B-Zellrezeptor-Affinitätsreifung

Durch die V(D)J-Rekombination kann eine primäre Batterie von verschiedenen Antikörperspezifitäten generiert werden. Diese besitzen jedoch nicht zwingend hohe Affinität gegenüber Antigenen (AG), da sie AG-unabhängig erzeugt werden. Um hochaffine Antikörper gegenüber bestimmten Pathogenen zu erzeugen, besitzen Vertebraten die Möglichkeit zur AG-abhängigen somatischen Hypermutation der IgV_H - und IgV_L -Gensegmente. Dieser Prozess findet typischerweise in den GC sekundärer Lymphfollikel statt (*Jacob, 1991*). In diesen hochspezialisierten Regionen wird das entsprechende AG durch AG-präsentierende Zellen (APC), in diesem Fall v.a. durch folliculäre dendritische Zellen (FDC), dargeboten (*vgl. Abb. 4*) (*Humphrey, 1984*). Naive B-Lymphozyten mit einer im selektiven Kontext adäquaten Affinität zu einem der Epitope des AGs, können das AG mit ihrem BCR binden und durch Endozytose prozessieren. Durch Wechselwirkung mit T-Lymphozyten werden dann in der B-Zelle genetische Differenzierungsprogramme gestartet, so dass diese abwechselnd den Phänotyp von Zentrozyten und Zentroblasten annimmt, bis die Zelle negativ selektiert wird, oder eine weitere Differenzierung zu Memory- oder Plasmazellen erfolgt (*Wang, 1995*). Zentrozyten treten in Wechselwirkung mit AG, die auf FDC präsentiert werden, sowie mit den FDC selbst (*Choe, 2000*). Ist die Affinität zum

AG relativ zu den anderen im Wettbewerb stehenden BCR-Spezifitäten hoch, erhält der Zentrozyt das Überleben verlängernde, trophische Signale und differenziert zum Zentroblasten. Nach einigen Replikations- und Proliferationszyklen als Zentroblast, folgt die Redifferenzierung zum Zentrozyten, und so fort (*Liu, 1989*). Parallel findet die Einführung von Punktmutationen in die IgV_H- und IgV_L-Gene durch die SH statt (*vgl. Abb. 7*). Dadurch verändert sich die Aminosäuresequenz und die Affinität des BCRs mit jedem Zyklus der GC-Reaktion. Ist die SH der Affinitätserhöhung gegenüber dem präsentierten AG zuträglich gewesen, folgt weitere Expansion des betreffenden Zentroblasten und schließlich, in Abhängigkeit von den Zytokinmustern, die Differenzierung zu Memory-B-Zellen oder Plasmazellen (*McHeyzer-Williams, 1999; Ziegner, 1994*). Ist das Gegenteil der Fall, schwinden die Chancen des Klons zunehmend, im Wettbewerb um Epitope, an ein Antigen binden zu können und Überlebenssignale zu erhalten. Schließlich wird aus Mangel an trophischen Signalen die Apoptose induziert („Apoptose durch Antigendeprivation“) (*O'Connor, 2006; Pittner, 1998; Shlomchik, 1989*). Demzufolge resultieren aus mehreren Zyklen der SH, der klonalen Expansion und der Selektion, BCR-Spezifitäten mit hoher AG-Affinität (*Allen, 2007*).

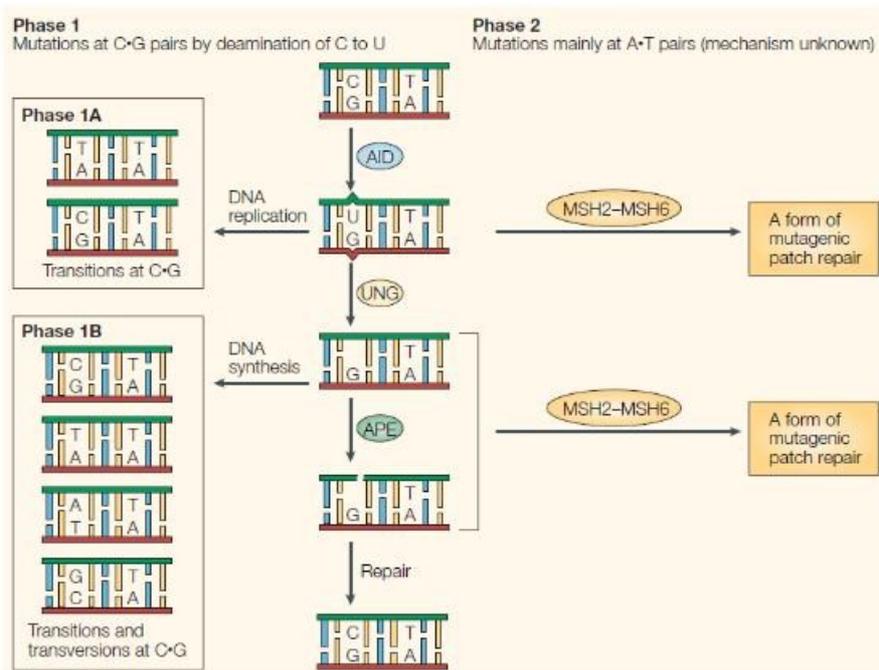
Das Schlüsselenzym dieser „neo-darwinistischen“ Evolution ist die B-zellspezifische „activation-induced cytidine deaminase“ (AID). Diese Deaminase ist das einzige B-zellspezifische Enzym, welches für die Ausführung der SH in Keimzentren notwendig ist. Die zusätzlich notwendigen Faktoren sind Produkte konstitutiv exprimierter Gene. Eine Deletion des AID-Gens im Mausmodell macht SH und CSR unmöglich (*Muramatsu, 2000*). Ein AID-Mangel verursacht im Menschen u.a. das Hyper-IgM-Syndrom Typ II, das durch die Unfähigkeit der B-Lymphozyten zur SH und CSR charakterisiert ist (*Revy, 2000*). Die AID wurde 1999 durch die Honjo Laboratorien in Japan identifiziert (*Muramatsu, 1999*). Es handelt sich um ein hoch konserviertes, 28-kDa schweres Polypeptid, das mit APOBEC1 nahe verwandt ist (*Barreto, 2005; Conticello, 2005; Scott, 1995*). Für SH und CSR sind unterschiedliche Domänen des Enzyms katalytisch bedeutend, da Mutationen im N-Terminus, nicht aber im C-Terminus die Fähigkeit zur SH verschlechtern. Umgekehrtes gilt für die CSR (*Barreto, 2003; Shinkura, 2004*). Die AID formt Homodimere und deaminiert die Base Cytosin (C) in Einzelstrang-DNS (ssDNS) während der Transkription (*Bransteitter, 2003; Fukita, 1998*). Sie erzeugt dadurch Uracil (U), führt folglich Punktmutationen in das Genom ein (*Dickerson, 2003; Wang, 2006*). Die Frequenz der Mutagenese beträgt ca. 10^{-3} je Basenpaar je Generation (*Jacob, 1991; Shlomchik, 1989*). Wegen der Deaminierung von Deoxycytidin in transkribierter ssDNS, resultieren posttranskriptionell aus C:G-Paaren, U:G-Fehlpaarungen (*Dickerson, 2003*). Diese Fehlpaarungen können nach aktuellem Forschungsstand unterschiedlich

prozessiert werden (vgl. Abb. 8) (Di Noia, 2007; Neuberger, 2005):

- Im Falle einer Replikation ohne vorhergehende Korrektur des Uracils, entsteht eine Transition. Dabei wird Uracil, als dem Thymin strukturell verwandte Base, bei der Replikation von DNS-Polymerasen als Thymin interpretiert und geht folglich mit Adenin eine Wasserstoffbrückenbindung ein (Phase 1A, Abb. 8).
- Genomisches Uracil kann alternativ durch zelluläre Reparatursysteme erkannt werden. Hierbei wird Uracil durch die Uracil-N-Glycosylase (UNG) entfernt und es entsteht ein abasischer Ort in der DNS. Es kann sowohl eine Transition, als auch eine Transversion resultieren (Phase 1B, Abb. 8).
- Genomisches Uracil kann auch, vermittelt durch die Aktivität von Endonukleasen (APE), einen Strangbruch mit den möglichen Folgen einer nichthomologen Rekombination oder Deletion nach sich ziehen (Phase 2, Abb. 8).
- Das Nukleotid-Exzisions-Reparatursystem kann ebenfalls aktiv werden und mehrere Nukleotide in der Umgebung eines abasischen Ortes bzw. von genomischem Uracil ausschneiden. Durch „non-proofreading“ DNS-Polymerasen können falsche Basen an die freien Stellen synthetisiert werden (Phase 2, Abb. 8).

Diese möglichen Mechanismen waren bis vor einigen Jahren nicht bekannt und beinhalten auch aktuell noch Forschungspotential. So ist noch keine eindeutige Erklärung für die Spezifität der AID für Immunglobulingene gefunden worden, oder warum die Zellreparaturmechanismen in diesem Zusammenhang Mutationen fördern, statt die Integrität des Genoms zu bewahren (Vallur, 2007). Man nimmt an, dass die AID-vermittelte Mutagenese mit der Transkription gekoppelt ist, da die AID lediglich Cytidin von ssDNS deaminiert, die Hypermutationsraten proportional zur transkriptionellen Aktivität sind und die AID mit dem transkriptionellen Apparat interagiert (Bransteitter, 2003; Dickerson, 2003; Fukita, 1998; Wang, 2006). Die Expression des Enzyms erfolgt im Rahmen der Keimzentrumsreaktion, für die es spezifisch ist (Muto, 2000). Daran sind durch IL4, TGF- β oder CD40-Ligation induzierte Signalwege wie der NF- κ B- und STAT-pathway beteiligt (McBride, 2006; Zhou, 2003). Des Weiteren spielen Kompartimentierung und der Phosphorylierungsstatus des Enzyms ebenfalls eine regulierende Rolle. Das Enzym weist ein C-terminales, nukleäres Exportsignal auf, weshalb sich der Großteil des Enzyms im Zytoplasma befindet (McBride, 2004; Rada, 2002). Ferner erhöht die Phosphorylierung des Enzyms dessen Aktivität (Basu, 2005).

Abb. 8 – molekulare Prozesse der SH (nach Neuberger M.S., 2005)



Während die Prozesse der Phase 1 der somatischen Hypermutation bereits gut erforscht sind, besteht bezüglich Phase 2 noch Erklärungsbedarf. Es werden wahrscheinlich Enzyme der konstitutiv exprimierten Zellreparatursysteme involviert (z.B. MSH2-MSH6), die jedoch aus ungeklärten Gründen fehlerhaft (a form of mutagenic patch repair) arbeiten bzw. in diesem Kontext gezielt permissiv für Mutationen wirken.

- Mutations at C•G pairs by deamination of C to U – Bei Cytosin-Guanin Basenpaaren findet durch Deaminierung die Umwandlung von C-G in C-U statt.
- Mutations mainly at A•T pairs (mechanism unknown) – wie Mutationen bei Adenin-Thymin Basenpaaren genau zu Stande kommen, ist noch ungeklärt.

2.5.3 Verschiedene Immunglobulinklassen

Dem Isotyp-Switch, dem Wechsel zwischen Immunglobulinklassen, liegt auf genetischer Ebene die „Class-Switch-recombination“ (CSR) zu Grunde (vgl. Abb. 7). Die CSR verbindet den rearrangierten variablen Bereich des Immunglobulin-Schwere-Kettengens (IgV_H) mit einem neuen konstanten Abschnitt (IgC) desselben Gens. Dabei wird die Switch-Region des (konstanten) IgM-Anteils (s_μ) durch eine in 3'-Richtung befindliche Switch-Region (s) ersetzt (Kinoshita, 1998; von Schwedler, 1990). Dieser Prozess führt zur Deletion der dazwischen gelegenen DNS (Cory, 1980; Iwasato, 1990). Die verschiedenen IgC besitzen entsprechend den neuen BCRs bzw. AK unterschiedliche Effektorfunktionen. Man unterscheidet auf Proteinebene IgM und IgD, IgG3, IgG1, IgG2b, IgG2a, IgE und IgA. Die verschiedenen s sind 2-10 Kilobasen (kb) lange DNS-Bereiche, welche „downstream“ des rearrangierten IgV_H-Bereiches liegen (Dunnick, 1993). Sie flankieren die verschiedenen IgC-Gene, welche analog zu den Immunglobulinisotypen als s_μ, s_{γ1}, s_{γ2b}, s_{γ2a}, s_ε und s_α bezeichnet werden (Shimizu, 1982). Die AID führt dabei in die zu

rekombinierenden s U:G-Fehlpaarungen ein (*Muramatsu, 2000*). Diese werden durch die UNG prozessiert, wodurch ein Substrat für die APE1 geschaffen wird (*Rada, 2004*). Diese Endonuklease APE1 erzeugt einen Doppelstrangbruch (DSB). Damit die Rekombination ablaufen kann, müssen in beiden s DSB erzeugt und die Fragmente in räumliche Nähe gebracht werden. Die DSB werden dann durch nichthomologe Rekombination vereint. Dadurch ist eine neuer BCR/AK-Isotyp entstanden (*Manis, 2002*). Mutationen im C-Terminus der AID unterbinden die CSR (*Barreto, 2003; Shinkura, 2004*). Die CSR findet wie die SH in den Keimzentren sekundärer Lymphfollikel statt. Der resultierende Isotyp wird u.a. durch das Zytokinmuster, durch welches die B-Zelle von ihrem Umfeld zur CSR stimuliert worden ist, determiniert (*Stavnezer, 1996*).

2.5.4 Aberrantes Potential der V(D)J-Rekombination, SH und CSR

In Zusammenschau lässt sich konstatieren, dass Vertebraten mit den Enzymen RAG1, RAG2, TdT und AID ein potentes und flexibles Arsenal zur Verteidigung gegenüber Pathogenen besitzen; zum einen wegen der kombinatorischen und junktionalen Vielfalt und der AK-/BCR-Perfektionierung durch bedarfsgerechte, optimale Affinitätsanpassung im Kontext der GC-Reaktion; zum anderen durch verschiedene, Isotyp-abhängigen Effektorfunktionen des Immunsystems im Rahmen von Infektionen und Entzündungen. Allerdings besteht durch die Existenz der V(D)J-Rekombination, der SH und der CSR das Risiko, tumorigene Aberrationen auszulösen, da die beteiligten Enzyme die DNS modifizieren und dabei fehlerhaft wirken können (*Dadi, 2009; de Yébenes, 2006; Kirsch, 1997; Knecht, 1994; Marculescu, 2006*).

2.6 Tumorprogression und follikuläres Lymphom

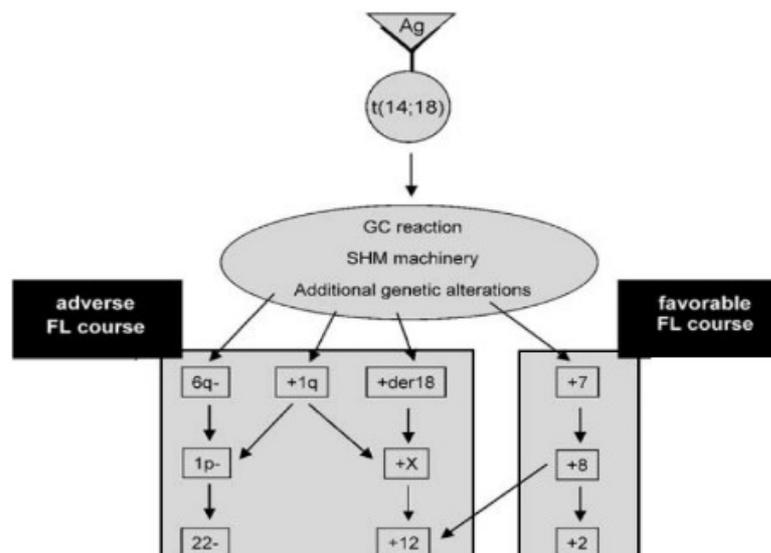
Gemäß der aktuellen Betrachtungsweise von Karzinomen sind maligne Neoplasmen die Folge eines Mehrstufenprozesses, in dessen Zentrum die Kumulation von DNS-Läsionen steht (*Duesberg, 2003; Schedin, 2004*). Ein bekanntes Beispiel ist das kontrovers diskutierte Tumorprogressionsmodell von Vogelstein, das für die Entstehung des Kolonkarzinoms etabliert wurde (*Fearon, 1990; Waliszewski, 1995*). Allgemein gesprochen akkumulieren mit meist erheblicher Latenz zur Tumormanifestation DNS-Alterationen. Dabei können die einzelnen Schäden am Erbmaterial ein Onkogen erzeugen, was als „gain of function“ bezeichnet wird, da dies einen Zugewinn an proliferativer / persistierender Kompetenz nach sich zieht. Alternativ können Alterationen auch einen „loss of function“, einen Verlust von Tumorsuppressorgenen bewirken, sofern beide Allele betroffen sind (*Canman, 1995; Weinberg, 1989*). Dieser Verlust zieht eine

potentielle Verminderung der Deregulationskontrolle, oder eine Störung der Reparatursysteme der Zelle nach sich. Einzelne Läsionen besitzen dabei keine transformierende Kompetenz. In ihrer Summe können die funktionellen Folgen einzelner Läsionen von der betroffenen Zelle allerdings nicht mehr kompensiert werden. Die Deregulation von Checkpointsystemen des Zellzyklus, die Schmälerung der Effizienz von DNS-Reparatursystemen, oder die Beeinträchtigung Apoptose-induzierender Mechanismen stellen allgemeingültige, synergistische Schlüsselereignisse der durch DNS-Läsionen bedingten Aufhebung der Zellhomöostase dar (*Hakem, 2008; Nowell, 2002*). Es wurden in diesem Zusammenhang sechs funktionelle Erweiterungen postuliert, die wesentliche Voraussetzung für eine maligne Transformation darstellen. Lediglich die Modalität der funktionellen Kompetenzerweiterung eines potentiell aberranten Klon unterscheidet demnach die mannigfaltigen Tumorentitäten (*Hanahan, 2000*). Chronische Entzündungszustände wurden unlängst als „seventh hallmark of cancer“ postuliert (*Bende, 2009; Colotta, 2009*). Mit diesen Betrachtungen ist die Bedeutung des nicht-neoplastischen Begleitinfiltrates der aberranten Zellen, neben der Autonomiehypothese der Tumorentstehung, die den aberranten Klon ins Zentrum der Betrachtung gestellt hat, wieder in den Fokus gerückt. Diese Bedeutung unterstrich Foulds 1954 in seiner Arbeit über Tumorprogression treffend, indem er den qualitativen Veränderungen von Tumorklonen die wesentliche Bedeutung für die Progression zuschrieb (*Foulds, 1954*). Analog werden maligne Neoplasmen zunehmend als Nischen-abhängige Erkrankungen betrachtet, die in pathogenetisch maßgebliche Wechselwirkung mit ihrer Umgebung treten (*Nguyen, 2009; Psaila, 2009*). Dies besitzt insbesondere für das FL Aktualität. Je nach zellulärer Zusammensetzung der infiltrierten Nische, primär des Keimzentrums, die durch bestimmte humorale Faktoren, Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktion charakterisiert ist, werden in präkanzerotischen t(14;18)-positiven Zellen unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Dementsprechend werden verschiedene genetische (Differenzierungs-) Programme, wie das der SH, die GC-typisch sind und physiologischerweise ablaufen, initiiert (*Muramatsu, 1999; Pasqualucci, 1998*). Wegen der Deregulation der Keimzentrumsreaktion durch eine konstitutive Expression von bcl-2, werden aberrante Hypermutationen allerdings unzulänglich korrigiert. Demzufolge akkumulieren prä-maligne Klone bis zum Erreichen eines malignen Phänotyps weitere genetische Läsionen, ohne in Apoptose zu gehen. Die Geschwindigkeit der Progression und Transformation, sowie die Reihenfolge der genetischen Wege aus der physiologischen Homöostase in die Deregulation werden in einer solchen Milieu-abhängigen Betrachtungsweise entscheidend durch das Umfeld bestimmt (*Alvaro, 2006; de Jong, 2005; Kaplan, 2007; Schedin, 2004*).

2.6.1 Heterogenität der Entwicklung des folliculären Lymphoms

Bezüglich der sekundären genetischen Veränderungen des FLs ergaben verschiedene zytogenetische Untersuchungen fünf häufig vorkommende Veränderungen. Dies waren -1p32-36 in 20%, -6q11-27 in 30%, +7 in 28%, +12 in 23% und +X in 24% der untersuchten Fälle. Die durchschnittliche Anzahl an chromosomalen Veränderungen eines „kompletten malignen Phänotyps“ betrug sechs. In weiteren Untersuchungen fanden sich vier chromosomale Veränderungen, welche unmittelbar nach der initialen Translokation t(14;18) erzeugt wurden. Dies waren +7 in 34%, 6q- in 20%, +(der)18 in 10% und +1q in 8%. Auf der Grundlage dieser frühen Alterationen wurden vier karyotypische Wege der FL-Evolution postuliert (vgl. Abb. 9).

Abb. 9 – nicht-zufällige Heterogenität der FL-Entwicklung (nach Bende R. J., 2007)



Antigen (Ag)-stimulierte, t(14;18)-positive B-Zellen führen im Rahmen der Keimzentrumsreaktion (GC reaction) somatische Hypermutation (SHM machinery) aus und erwerben in diesem Kontext weitere genetische Läsionen (additional genetic alterations). Parallel zur FL-Entwicklung lassen sich relativ zueinander frühe und späte zytogenetische Veränderungen feststellen. Ferner wurden auf der Grundlage von frühen Läsionen vier zytogenetische Wege der FL-Entwicklung bestimmt. Diese sind mit dem Verlauf und der Prognose der Erkrankung assoziiert (adverse FL course – schlechte Prognose; favorable FL course – gute Prognose).

Relativ dazu spät ablaufende Aberrationen wurden als 2p-, 10p-, -15, 17p- und 17q- identifiziert. Ferner wurden genetische Veränderungen wie +X, 1p-, +1q, +12, 17p- und 17q- als signifikant negative Prediktoren für das Gesamtüberleben der erkrankten Individuen eingestuft. Der stärkste zytogenetische Surrogatmarker für eine schlechte Prognose war -6q25-27. Für eine relativ gute Prognose standen hingegen +7, +8 oder +der(18) (Höglund, 2004; Mohamed, 2001; Viardot, 2002). Folglich existiert eine bereits durch frühe zytogenetische Aberrationen induzierte prognostische Divergenz. Die am häufigsten auftretenden, sekundären zytogenetischen Veränderungen fanden sich

auf Chromosom 1, speziell -1p32-36, +1p11-q44 und (der)1t(1;1)(p36;q11-23) (Höglund, 2004; Lestou, 2003). Somit bestehen vielfältige zytogenetische Veränderungen und in Analogie zur Heterogenität des FLs verschiedene molekulare Wege der FL-Entwicklung (Bende, 2007; de Jong, 2005). Durch den Vergleich von Genexpressionsanalysen zwischen FL-Zellen und gesunden Keimzentrums-B-Zellen wurden in FL-Zellen verschiedene, typische Veränderung festgestellt. Die betroffenen Gene umfassten Zell-Zyklus-Regulatoren, Transkriptionsfaktoren, Zell-Zell-Interaktionsmoleküle, Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Wachstumsfaktoren, etc. Speziell das TGF- β modulierende Signalmolekül SMAD1, die Map-Kinase MAP3K11, der Zellzyklusregulator CDKN1A/p21^{Cip1}, die Hitzeschockproteine Hsp27 und Hsp40, TNF-Zytokine und die Transkriptionsfaktoren ID2 und c-JUN wurden in FL-Zellen, vergleichsweise zu gesunden Keimzentrums-B-Zellen, stark exprimiert. Herabgesetzt war u.a. die Expression der migrationsinhibierenden Faktoren MRP8 und MRP14 (Husson, 2002).

2.6.2 Progression zu aggressiven Lymphomen

Anders als bei der Entwicklung zum kompletten malignen Phänotyp des FLs, für die überwiegend „gains of function“ verantwortlich gemacht werden, werden der Transformation zu aggressiven high-grade Lymphomen verschiedene „loss of function“-Ereignisse zugeschrieben (Sanchez-Beato, 2003). Am häufigsten transformiert das FL zum DLBCL (Muller-Hermelink, 2001). Die Hälfte der FL transformiert dabei innerhalb von 5 Jahren nach Diagnose (Ersbøll, 1989). Diese Transformation ist in 54% der Fälle mit einer homozygoten Deletion von p16^{INK4a} und in 25% mit p53-Mutationen assoziiert (Matolcsy, 1999). Die Inaktivierung weiterer „cyclin-dependent kinase inhibitors“ wurde beschrieben (Lo Coco, 1993). Neben Mutationen sind epigenetische Prozesse, wie die Methylierung der Promotorbereiche von Tumorsuppressorgenen an der Inaktivierung beteiligt (Pinyol, 1998). Eine aberrante somatische Hypermuation des bcl-6- oder bcl-2 Gens ist ebenfalls mit Progression und Transformation assoziiert (Matolcsy, 1996; Pasqualucci, 1998; Rossi, 2006; Szereday, 2000). Allerdings findet sich dabei die aberrante Aktivität der AID vergleichsweise zu de novo DLBCL (>50%) selten. Im Gegensatz zu den de novo DLBCL sind Mutationen des c-myc-Gens ebenfalls selten (Jardin, 2006; Matolcsy, 1996). Dennoch wird c-myc in mehr als 80% der transformierten Fälle verstärkt exprimiert, was u.a. auf die angeführte Wechselwirkung zwischen bcl-2 und c-myc zurückzuführen ist (vgl. 2.4.3 c-myc, NF- κ B und genetische Instabilität) (Arcinas, 2001; Knezevich, 2005). Demgegenüber finden sich Aberrationen des c-myc Gens beim Übergang in das precursor B-Zell lymphoblastische Lymphom (PBC-LBL) (8% aller Transformationen) häufig, v.a. als Translokation t(8;14) oder t(8;22) (Young, 2008). Transformationen des FLs zu immunoblastischen

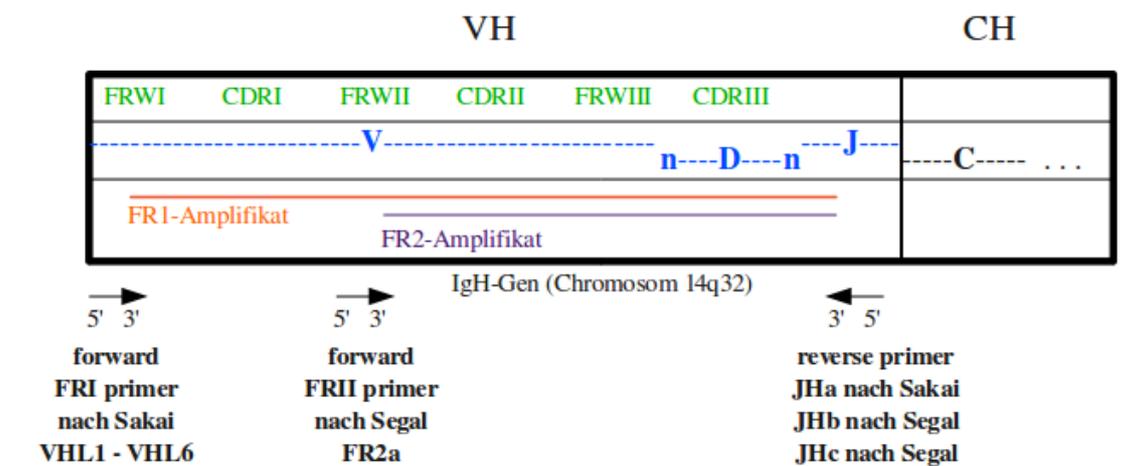
und Burkitt-type Lymphomen finden selten statt. Die SH nimmt im Zusammenhang mit der FL-Progression und Transformationsereignissen des FL zu aggressiven Lymphomen ab, oder wird komplett eingestellt (*Halldórsdóttir, 2008*). Parallel zur zytogenetischen Entwicklung des malignen Phänotyps des FLs finden sich bei der Progression zum DLBCL ebenfalls nicht-zufällige, mit unterschiedlicher Häufigkeit wiederkehrende, zytogenetische Aberrationen (*Berglund, 2007*).

2.6.3 Histologische und immunologische Nischen

Die Rolle des BCRs bei der Entstehung und Progression des FLs ist nicht eindeutig geklärt. Die B-Zellontogenese wird in Abhängigkeit vom BCR-Status definiert und das Überleben der B-Zellen hängt nahezu in jedem Entwicklungsstadium maßgeblich von dessen intakter Funktionalität ab (*Nemazee, 2000; Rajewsky, 1996*). Ferner exprimiert die Mehrheit aller B-Zelllymphome intakte BCRs (*Gunvén, 1980; Segal, 1991*). Die leitmotivischen Translokationen der einzelnen Entitäten involvieren dabei meist das nicht-funktionelle Immunglobulingen (*de Jong, 1989*). Ferner weisen BCR-negative Lymphome häufig funktionelle Alternativen zu den BCR-vermittelten Überlebenssignalen auf; so wird bei Hodgkin Lymphomen das BCR-Signal häufig durch EBV-Proteine simuliert (*Caldwell, 1998; Casola, 2004*). Die Beobachtung, dass eine Behandlung des FLs mit Idiotypen-Antikörpern nicht zur Selektion von BCR-negativen FL führt, als auch Erkenntnisse aus der molekularen Forschung, die intakten BCRs AG-unabhängige, das zelluläre Überleben unterstützende, tonische Signale zuschreibt, unterstreichen die Bedeutung des BCRs weiter (*Corcos, 2007; Meeker, 1985; Monroe, 2006*). Da die SH ein entscheidendes Merkmal des FLs darstellt und deren Induktion und Unterhaltung über die Wechselwirkung der BCRs mit der Umwelt erfolgt, wird neben der postulierten Bedeutung der Intaktheit des BCRs für das FL auch über die Bedeutung von Antigenen für die Entstehung und Progression des FLs diskutiert (*Bahler, 1992a; Dighiero, 1991*). Untersuchungen der Mutationsmuster der „framework“ (FRW) und „complementarity-determining“ (CDR) Regionen von Immunglobulingenen (vgl. *Abb. 10*) sprechen für die Erhaltung der Integrität der BCRs und einen antreibenden Einfluss von Antigenen auf die Lymphomagenese bzw. -progression (*Aarts, 2001; Chang, 1994; Lossos, 2000*). Innerhalb der für die strukturelle Integrität der BCRs verantwortlichen FRW-Regionen der Immunglobulingene wurde wiederholt ein statistisch signifikanter Überhang an strukturerhaltenden silent (S)-Mutationen gefunden, in den CDR-Regionen, welche bei B-Zellen Antigenkontakte vermitteln, gegenläufig ein Überhang an replacement (R)-Mutationen. Diese BCR-zentrierte Position der Lymphomagenese wird durch die Selektion von N-Glykosilierungsmotiven in den variablen Bereichen der BCRs von FL weiter gestützt, da diese Kohlenhydrat-basierten Modifizierungen der

BCR-Struktur eine Erhöhung der BCR-vermittelten Signalintensität bewirken können (Zhu, 2002). Hieraus folgt, dass die durch Lymphome exprimierte BCRs, in Analogie zu ihren benignen Gegenstücken, für eine Vielzahl von Lymphomen entscheidende pathogenetische Bedeutung besitzen. Dies gilt insbesondere für das FL, dessen benignes Pendant, die Keimzentrums-B-Zellen, unter der Maxime einer effizienten adaptiven Immunantwort SH betreiben (Allen, 2007; MacLennan, 1994; Natkunam, 2007). Damit lässt sich eine entscheidende Bedeutung von BCRs und BCR-medierte Signalen zumindest für bestimmte Stadien der Genese des FLs vertreten (Stamatopoulos, 2000). In weiterer Konsequenz zieht dies die Bedeutung von AG und des geweblichen Kontextes für das FL nach sich. So haben Genexpressionstudien den Charakter vom FL als rein von autonomen malignen Klonen ausgehende Tumorerkrankung endgültig relativiert und die bedeutende Determinante des histologischen und immunologischen Kontextes fokussiert (Alvaro, 2006; Ghia, 2000; Tzankov, 2008). Die nicht-neoplastische zelluläre Komposition war dabei wiederholt entscheidend mit der Aggressivität und Prognose assoziiert (Husson, 2002; Iqbal, 2009; Rosenwald, 2003).

Abb. 10 – Unterteilung des rearrangierten IGH-Gens (nach Segal G.H., 1994)



Schematische Unterteilung eines rearrangierten Immunglobulinschwerekettengens in den variablen (VH) Anteil und den ange deuteten konstanten Anteil (CH). VH setzt sich aus jeweils einem V-, D- und J-Segment zusammen. Am Übergang dieser Segmente finden sich als Resultat der TdT Nukleotidinsertionen n. VH lässt sich wie gezeigt in FRW (framework) und CDR (complementarity-determining) Regionen gliedern (grün). Ferner sind die Primeransatzstellen, sowie der Umfang der in dieser Arbeit verwendeten PCR-Amplifikate dargestellt.

Es wurde eine günstige Immunsignatur, dominiert durch T-lymphozytäre Genexpression einer ungünstigen, durch Makrophagen und FDC dominierten Expression gegenübergestellt (Farinha, 2005). Diese Unterscheidung fand in der Risikostratifizierung und Prognose der Patienten Bestätigung (Dave, 2004; LeBrun, 2008). Weiter wurde gezeigt, dass die genetische Signatur von regulatorischen T-Zellen positiv und die von Makrophagen negativ mit dem Überleben korreliert (Carreras, 2006). Ältere in vitro Studien haben bereits auf wichtige Interaktionen zwischen FL-

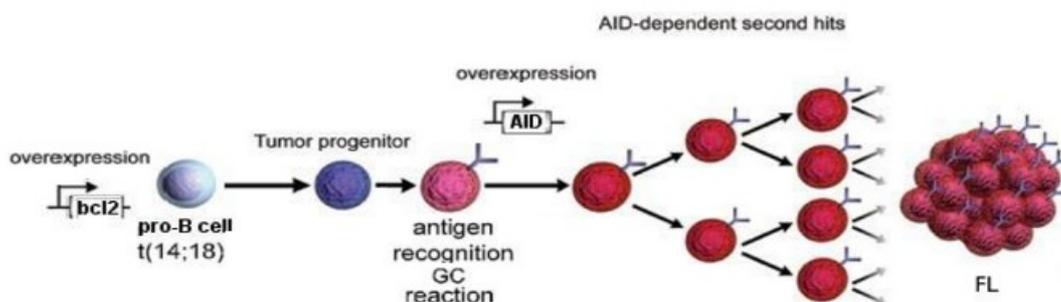
Zellen und anderen Immunzellen hingewiesen, sowohl parakrin-humoraler Art, als auch durch direkte Zell-Zell-Interaktion. So sind CD4 positive T-Zellen, wie auch FDC in der Lage, das Überleben von FL-Klonen zu verlängern (*Corcione, 2000; Meyer-Hermann, 2007; Tew, 2001; Thomazy, 2003; Umetsu, 1990*). Aktueller wurde und wird die Bedeutung mesenchymaler Stammzellen (MSC) für das FL erforscht (*Amé-Thomas, 2007; Roorda, 2009; Shiozawa, 2008*). Diese sezernieren humorale Faktoren, die u.a. GC-typisch sind und FL-Klone anziehen können, wie z.B. das Chemokin CXCL12. FL stimulieren durch TNF-alpha, IL-4 oder Lymphotoxine in vitro, als auch in vivo MSC zur Differenzierung zu FDC und fibroblastischen Retikulumzellen (FRC). Diese vielseitigen wechselseitigen Beeinflussungen von malignen und benignen Zellen werden als biologisches Korrelat der klinischen, histologischen und molekularen Heterogenität des FLs betrachtet (*de Jong, 2005; Stamatopoulos, 2000*). Auch in Zusammenhang mit der Entwicklung von Therapieresistenzen scheint der „non-malignant“ Kontext, das „microenvironment“, entscheidenden Einfluss auszuüben (*de Jong, 2009b; Lejeune, 2009; Taylor, 1999*). Bei der Transformation des FLs zu aggressiveren Lymphomen und im Zuge der Krankheitsprogression im Allgemeinen, lässt sich ein Rückgang der Beeinflussung der Lymphomagense durch das histo-immunologische Infiltrat erkennen (*Bernstein, 2009; de Jong, 2009a*).

2.7 Zusammenschau der Pathogenese des folliculären Lymphoms

In Zusammenschau ist die Einschätzung der Pathogenese des FLs mehr als die klonale Expansion von autonomen malignen Zellen. Sie stellt ein Paradigma der Malignom-begünstigenden Deregulation physiologischer Prozesse und Nischen dar. Beim FL ist dies die Deregulation der Keimzentrumsreaktion, deren Basis die bcl-2 bedingte Apoptoseresistenz ist. Zusammen mit der DNS-modifizierenden BCR-Evolution im selektiven Kontext der Keimzentren ist die Grundlage für eine maligne Entwicklung gelegt. In Form einer initialen Immundysfunktion sind die prämaligen Klone, wie ihr physiologisches Gegenstück, abhängig vom geweblichen Kontext der Keimzentren. Erzeugt das Umfeld adäquate Stimulation durch Antigene, Zytokine, oder Zell-Zell-Interaktion, könnten physiologische genetische Programme gestartet werden, die zur Expression der AID führen. Die SH kann anders als in GC-B-Zellen in t(14;18)-positiven Zellen aberrant ablaufen, ohne die Apoptose auszulösen. Abhängig vom aktuellen genetischen Expressionsstatus befinden sich bestimmte Chromatinabschnitte im offenen, transkriptionsbereiten Zustand und können durch (aberrante) AID-Aktivität mutiert werden. Diese AID-getriebene Mutagenese kann sekundäre genetische Aberrationen und damit veränderte Genexpressionsmuster bedingen (*vgl. Abb. 11*) (*Greeve, 2003; Kotani, 2007*). Insbesondere in Abhängigkeit von dem im entsprechenden

Keimzentrum vorherrschenden Entzündungsniveau und der erreichten funktionellen Kompetenz des prämaligen Klons findet eine stärker oder schwächer ausgeprägte (aberrante) SH statt (*Balkwill, 2005; Hardianti, 2004*). Dies bestimmt wiederum die Progressionsgeschwindigkeit und die Prognose der Erkrankung. Gewinnt die präkanzerotische Zelle neue funktionelle Kompetenz, können dadurch u.U. neue Nischen erschlossen werden, welche im Klon neue genetische (Differenzierungs-)Programme induzieren und damit der Evolution des FLs eine neue, erneut durch aberrante Mutation der jeweils Programm-spezifisch transkribierten Chromatinabschnitte determinierte, zusätzliche Richtung geben (*Drillenburg, 2000; Kaplan, 2007; Psaila, 2009; Shiozawa, 2008*).

Abb. 11 – Modell der graduellen Entwicklung des FLs (nach Kotani A., 2007)



Darstellung der mehrstufigen (multistep) Entstehung des FLs: Initial findet sich das „primär maligne Ereignis“ der Translokation t(14;18) in frühen Phasen der B-Zellontogenese (pro-B-cell). Dieses führt zur konstitutiven Überexpression (overexpression) des Onkogens bcl2 und damit zur Entstehung fakultativ präkanzerotischer, prämaligener B-Zellen (tumor progenitor). Durch B-Zellrezeptor-bedingte Antigen-Erkennung (antigen recognition) im Rahmen der Keimzentrumsreaktion (GC reaction), kommt es zur (Über-)Expression (overexpression) des Leitenzyms der somatischen Hypermutation, der AID. Wegen aberranter Wirkung dieses Enzyms erfolgen weitere, sekundäre genetische Läsionen (AID-dependent second hits), die im Sinne einer AID-induzierten Mutagenese zur „kompletten malignen Transformation“ der tumor progenitors führen. Der maligne Phänotyp des FLs ist manifest geworden.

Auch ist eine Beeinflussung des nicht-malignen Kontextes durch einzelne FL-Klone denkbar, welche die Tumorevolution durch Schaffung eines unterstützenden Milieus fördert (*Chang, 2003; Thomazy, 2003; Vega, 2002*). Im Laufe der FL-Entwicklung verschiebt sich folglich der Charakter von einer kontextabhängigen Immundysregulation hin zu einer autonomen malignen Tumorerkrankung, was letztlich durch Transformation zu aggressiven Lymphomen belegt wird.

3 Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der Infiltration des Knochenmarks (KM) beim follikulären Lymphom (FL) untersucht werden. Dazu wurden Mutationsanalysen der IgV_H-Gensegmente von FL-Zellen durchgeführt. Es wurden prätherapeutische Lymphknoten (LK)- und KM-Biopsate mit Infiltration durch ein FL untersucht, um den Ursprungsort der FL-Manifestation und mögliche Migrationsbewegungen zwischen den beiden Kompartimenten zu bestimmen. Ferner wurden Migrationsbewegungen auch an posttherapeutischen LK- und KM-Geweben nachvollzogen. Diese prä- und posttherapeutischen Befunde wurden zueinander in Relation gesetzt, um Information bezüglich einer möglichen Persistenz von malignen Zellen während der Therapie zu erhalten. Aus jedem untersuchten Gewebe wurden zwischen acht und 15 IgV_H-Gensegmentsequenzen maligner FL-Klone bestimmt. Weiter erfolgte die Bestimmung der Klonalität und des Mutationsmusters. Daran schloss sich eine mathematisch-statistische Auswertung der ermittelten Mutationsmuster durch eine eigens entwickelte, neue Methode an. Darauf basierend wurden Stammbäume der Tumorzellevolution generiert. Der Einfluss von möglichen Antigenen auf die somatische Hypermutation (SH) der IgV_H-Gensegmente und die strukturelle Integrität des B-Zellrezeptors (BCR) wurden anhand der Mutationsmuster der LK- und KM-Klonsequenzen in den „framework regions“ und „complementarity-determining regions“ der VH-Gene gemäß einer etablierten Methode abgeschätzt .

Somit standen folgende Fragen im Zentrum dieser Arbeit:

- Kann Migration von FL-Klonen zwischen dem LK- und KM-Kompartiment bestimmt werden ?
- Wie sind migrierende FL-Klone charakterisiert ? Besitzen sie eine niedrigere oder höhere Mutationslast als Klone, welche nicht migrieren ?
- Wann finden Migrationsbewegungen zwischen LK und KM statt ?
- Unterscheiden sich Migrationsbewegungen prä- und posttherapeutisch ?
- Ist das „microenvironment“ des KMs möglicherweise ohne Passage der Keimzentren von LK ausreichend, um einen malignen Phänotypen zu erzeugen ? Finden sich Klone, für die kein LK-Passage zu ermitteln ist ?
- Findet die somatische Hypermutation auch im KM und ohne die hierfür morphologisch charakteristischen Keimzentren statt ?
- Finden sich Belege für eine AG-getriebene SH im KM ?
- Ist die Integrität des BCRs eine Voraussetzung für die untersuchten FL ?

4 Material und Methoden

Eine ausführliche Übersicht der Laborprotokolle, der Zusammensetzung verwendeter Lösungen, der verwendeten Geräte, etc. findet sich im Anhang.

4.1 Fallauswahl

Die vorliegende Studie umfasste Tumorgewebe von drei Patienten. Die Gewebe von zwei der Patienten stammten aus dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München, Univ.-Prof. Dr. Heinz Höfler, und wurden über die Tumordatenbank des Institutes ermittelt. Die Gewebe des dritten Patienten stammten aus einer Pathologischen Praxis in Kaufbeuren (Gemeinschaftspraxis für Histologie und Zytologie, Dr. med. Marlene Lessel, PD Dr. med. Andreas Gaumann). Das Einschlusskriterium war ein prätherapeutischer, synchroner Befall von Lymphknoten (LK) und Knochenmark (KM) durch ein folliculäres Lymphom des histologischen Grades I oder II (FL^o1/°2). Alle Gewebe lagen als Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete Gewebelöcke (FFPE) vor. Die KM-Biopsate wurden gemäß histologischer Standardprotokolle der Institute sofort nach ihrer Gewinnung für 24h in 4%-iger Formalinlösung fixiert und anschließend mit gepufferter Natrium-Ethylendiamintetraacetat (Na-EDTA)-Lösung (pH=7,0) entkalkt. Von Patient 1 und 2 standen zusätzlich Stickstoff (N₂)-kryoasservierte LK-Gewebe (FF) zur Verfügung, welche durch Exzisionsbiopsie gewonnen worden waren.

4.2 Histologie und Immunhistochemie

FFPE LK- und mit EDTA entkalkte FFPE KM-Gewebe wurden in 4µm dicke Scheiben geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin (H&E), Periodsäure-Leukofuchsin (PAS) und Giemsa gefärbt. Die diagnostischen Immunfärbungen wurden gemäß der Herstellerprotokolle mit geringen Modifikationen mit einem automatisierten Immunostainer durchgeführt (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Die verwendeten Antikörper waren gegen die Epitope CD20 (L26, Dako, Copenhagen, Dänemark), CD3 (polyklonal, Dako), CD10 (Novocastra, Newcastle, UK), CD5 (Novocastra), BCL-2 (Dako), BCL-6 (Novocastra) und Ki67 (MIB1, Dako) gerichtet. Alle Gewebeproben wurden vom Autor dieser Arbeit und von zwei Hämatopathologen reevaluiert (Priv.-Doz. Dr. Marcus Kremer und Univ.-Prof. Dr. Falko Fend).

4.3 Mikrodissektion

Die KM-Gewebe der Patienten wurden einer Mikrodissektion unterzogen. Mit einem Mikrotom wurden dazu von jedem Paraffinblock ca. zehn 3µm dicke Scheiben abgetragen, auf Objektträger aufgebracht, mit Hämalaun gefärbt und in einem Wasserbad verwahrt. Mit 20-Gauge Kanülen wurden unter einem Lichtmikroskop Nester von in Parallelschnitten immunhistochemisch identifizierten Lymphomzellen abgehoben und in DNS-Extraktionspuffer resuspendiert.

4.4 Nukleinsäureextraktion

4.4.1 DNS-Extraktion aus formalinfixiertem Paraffinblock-Gewebe

Zur Extraktion genomischer DNS aus den FFPE Geweben wurde zunächst eine Entparaffinierung durchgeführt. Dazu wurden zehn Gewebescheiben von je 9µm Stärke in ein Sarstedtröhrchen übertragen, mit 1ml Xylol versetzt und für 15sec in einem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Deutschland) gemischt. Zum Auswaschen (des Xylols und Paraffins) wurden 250ml Ethanol (70%) beigelegt und nach erneutem Schütteln für 15sec wurden die Röhrchen für 5min bei 14000rpm zentrifugiert. Zum Trocknen des entstandenen Gewebepellets wurde der Überstand mit einer Pipette entfernt und die restliche Flüssigkeit in einer Vakuumzentrifuge vom Typ Concentrator 5301 (Eppendorf) bei 45°C verdampft. Das trockene Pellet wurde weiter in DNS-Extraktionspuffer gelöst, mit Proteinase K der Konzentration 20mg/ml versetzt und in einem Thermomixer (Eppendorf) über Nacht bei 55°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Röhrchen am nächsten Tag für 10min auf 100°C erhitzt. Zur Entfernung unlöslicher Bestandteile schloss sich eine 5 minütige Zentrifugation mit 14000rpm an (Eppendorf, Centrifuge 5415D). Die DNS wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

4.4.2 RNS-Extraktion aus kryoasserviertem Frischgewebe

Für die Extraktion von RNS aus kryoasserviertem Gewebe wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Mit einem Kryomikrotom wurden dazu zehn Scheiben von 20µm Dicke vom jeweiligen Frischgewebe abgetragen und in ein gekühltes 1,5ml fassendes Eppendorfgefäß übertragen. Diese Schnitte wurden mit einem Gemisch aus Lysis-Puffer RLT und β-Mercaptoethanol versetzt und mit einem Mörser homogenisiert. Das erhaltene Gemisch wurde auf einen Qia-Shredder pipettiert und gemäß des Herstellerprotokolls mehreren Zentrifugations- und Waschschritten unterzogen. Das Produkt wurde in 1,5ml fassende Eppendorfgefäße übertragen und

unmittelbar weiterverarbeitet.

4.5 Erzeugung von cDNS

Die extrahierte RNS wurde mit einer Reversen-Transkriptase (Superscript® III RT, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in komplementäre (c)DNS umgeschrieben. Um die Reaktion zu terminieren fand eine Inkubation bei 95°C für 5min statt. Die erzeugte cDNS wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C verwahrt.

4.6 Polymerase-Kettenreaktion

Für die PCRs wurden der Primus 96 Plus Thermal Cycler (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) und der MJ Research PTC200 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet. Die Primersequenzen, Cycler-Programme und PCR-Ansätze finden sich im Anhang unter *10.2 PCR-Protokolle und Primer*, für die Loci des „Annealings“ vgl. *Abb.10*.

4.6.1 β -Globin PCR

Abhängig vom Fixierungsprozess ist aus FFPE Gewebe extrahierte DNS zu einem gewissen Grad degradiert (*Greer, 1994*). Deshalb musste die Qualität des Materials überprüft werden (*Fend, 2005*). Dazu wurde aus jedem FFPE Gewebe eine Teil des β -Globingens amplifiziert. Dabei handelt es sich um einen 268bp langen Abschnitt des in allen Zellen vorhandenen, konstitutiv exprimierten β -Globingens, das auf dem kurzen Arm von Chromosoms 11 lokalisiert ist. Vom jeweiligen Amplifikat ließ sich die Qualität und damit die Verwendbarkeit des Materials ableiten (*Greer, 1991a; Greer, 1991b; Kremer, 2003*). Bei der PCR folgten auf die initiale vierminütige Denaturierung bei 94°C 40 Zyklen der folgenden Sequenz: Einminütige Denaturierung bei 94°C, einminütiges Annealing bei 55°C und einminütige Synthese bei 72°C. Abschließend wurde für 7min eine Temperatur von 72°C gehalten bevor die Reaktionsprodukte bis zu ihrer Entnahme bei 4°C gekühlt wurden.

4.6.2 IgV_H-Familien-spezifische PCR und seminested PCR

Für die folgenden PCRs zur Amplifikation der IgV_H-Gensegmente wurden die von Sakai und Segal beschriebenen Primer verwendet (*Sakai, 2000; Segal, 1994*) (vgl. *Abb. 10 und Anhang*). Im Fall von

cDNS der FF-Gewebe wurde eine einfache PCR-Reaktion, im Fall der aus FFPE Gewebe extrahierten DNS eine seminested-PCR-Reaktion angewandt (*Uchiyama, 2003*).

IgV_H-Familien-spezifische PCR:

Das PCR-Protokoll zur Amplifikation des framework 1 (FR1)-Bereiches der IgV_H-Gensegmente (vgl. *Abb. 10*) aus FF-Gewebe beinhaltete IgV_H-Familien-spezifische Upstreamprimer und den JH_a-Downstreamprimer. Ein Reaktionsansatz umfasste neben den Primern, PCR-Puffer, dNTPs, Aqua destillata und AmpliTaq Gold DNS Polymerase (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (*Moretti, 1998; Quach, 2004*). Es wurden jeweils zwei Ansätze verwendet, der eine mit den familienspezifischen Upstreamprimern für IgV_{H1}, IgV_{H3} und IgV_{H5}, und der andere mit den Primern für IgV_{H2}, IgV_{H4} und IgV_{H6}. Das PCR-Reaktionsvolumen einer Probe betrug 25µl, hiervon 2µl unverdünnte DNS des Extraktionsansatzes. Der erste Amplifikationszyklus wurde mit der Denaturierung bei 95°C für 7min, dem Annealing bei 65°C für 4min und der Extension bei 72°C für 1min vollzogen. Daran schlossen sich 40 Amplifikationszyklen der folgenden Sequenz an: 95 °C für 1min, 61°C für 30sec und 72°C für 6min. Abschließend wurde eine Temperatur von 72°C für 6min gehalten und dann bis zur Probenentnahme bei 4°C gekühlt.

Seminested PCR:

Unter einer seminested PCR versteht man, wie auch unter einer nested PCR, eine Sequenz aus zwei PCR-Reaktionen, wobei das Amplifikat der ersten Reaktion das Ausgangsprodukt der zweiten darstellt (*Essop, 1997*). Die in der zweiten Reaktion verwendeten Primer sind dabei so zu wählen, dass sie nicht außerhalb des durch das erste Primerpaar abgedeckten Bereichs liegen. Die PCRs sind folglich „nested“, verschachtelt. Daher wird die erste PCR auch als „extern“ und die zweite als „intern“ bezeichnet. In dieser Studie wurde an DNS aus FFPE Geweben eine framework 2 (FR2) PCR-Reaktion (vgl. *Abb. 10*) mit dem Upstreamprimer FR2a und dem Downstreamprimer JH_c (extern) bzw. JH_b (intern) angewandt. Die PCRs umfassten neben den jeweiligen Primerpaaren Aqua destillata, dNTPs, PCR-Puffer, und AmpliTaq Gold DNS Polymerase (PE Applied Biosystems). Beim externen Ansatz wurde die zu vervielfältigende DNS im Verhältnis 1:10 mit Aqua destillata verdünnt, beim internen Ansatz im Verhältnis 1:100. Das Gesamtvolumen eines Ansatz betrug 25µl, hiervon 2µl verdünnte DNS. Für die externe PCR wurde nachdem für 10min auf 95°C aufgeheizt wurde, nachfolgende Sequenz verwendet: 35 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 45sec, 1min Annealing bei 56°C und 1min Synthese bei 74°C. Termination der PCR bei 74°C für 1min und Abkühlung auf 4°C bis zur Entnahme. Der Ablauf der internen PCR war nahezu identisch, setzte sich allerdings aus 25 Zyklen, bestehend aus 45sec Denaturierung bei 94°C, Annealing bei 56°C und Synthese bei 74°C, für jeweils 1min zusammen.

4.7 Gelelektrophorese

Zur Visualisierung der Amplifikate und damit zur Kontrolle des PCR-Erfolgs wurden Teile der PCR-Produkte mit Ethidiumbromid interkaliert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert. Die Herstellung des Gels erfolgte durch Kochen des folgenden Gemischs: 2g Agarosepulver (SeaKem LE Agarose, BMA, Rockland, ME, USA) auf 100ml 1xTBE-Puffer. Anschließend wurde ein Tropfen Ethidiumbromid (Eurobio, Cedex, Frankreich) der Konzentration 0,7mg/ml hinzugefügt. Der Elektrophoreselaufpuffer wurde durch Mischen von 100ml des 10xTBE Puffers mit 900ml Aqua destillata und der Zugabe von 10 Tropfen Ethidiumbromid hergestellt. Jeweils 5µl des PCR-Produkts wurden mit 1µl Ladepuffer (10xDyes, Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) vermischt und in die Geltaschen der Elektrophoresegelplatte pipettiert. Zur Identifikation der PCR-Produkte wurde eine Geltasche mit 5µl eines Längenmarkers versetzt. Im Sinne einer Negativkontrolle und damit zum Ausschluss von Kontaminationen der PCR-Reagenzien, wurde jeder PCR ein Ansatz ohne DNS beigefügt und anschließend ebenfalls visualisiert. Die Elektrodenspannung betrug 130V und das Ergebnis wurde nach 30 Minuten unter UV-Licht abgelesen und fotografiert (Eagle Eye Systems II, Stratagene, La Jolla, CA, USA).

4.8 Klonierung der IgV_H-Gensegmente

Um die Amplifikate der PCRs für die folgenden Klonierungsexperimente verwenden zu können, mussten diese gereinigt werden. Für Amplifikate der seminested FR2-PCRs wurde dazu das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet, für Amplifikate der FR1-PCRs das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Für die Klonierungsexperimente selbst wurden das TOPO TA Cloning® Kit mit One Shot® TOP10F' Chemically Competent E. coli (Invitrogen) und das QIAprep Miniprep Kit (Qiagen) verwendet.

4.8.1 Erzeugung rekombinanter Plasmide

Der erste Schritt der Klonierungsexperimente umfasste die Erzeugung rekombinanter Plasmide (Vector pCR®2.1). Dazu wurden die IgV_H-Amplifikate der vorangegangenen PCRs mit Reagenzien des TOPO TA Cloning® Kits vermischt und über Nacht inkubiert. Das Verhältnis des Vektors zum PCR-Produkt betrug mit jeweils 2µl 1:1. Am nächsten Tag wurden die Ansätze entweder prozessiert oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C verwahrt.

4.8.2 Transformation von *E. coli*

Herstellung der Kulturplatten:

In jede Kulturschale wurden 25ml Agarose eingebracht. Das Verhältnis von Agarosepulver (LB Agar, powder Lennox L Agar, Invitrogen) zu Aqua destillata betrug 32g/l. Dieses Gemisch wurde zuvor autoklaviert (20min bei 121°C). Nach erfolgter Abkühlung auf 45°C wurden 250ml der Agarose mit folgenden Reagenzien versetzt: 125µl Ampicillin, 0,5ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid) und 250µl 0,1M IPTG (Isopropyl-thio-Galaktosid). Anschließend wurden die sterilen Petrischalen unter einem Abzug mit der Agarose gefüllt.

Transformation der Bakterien:

Um die rekombinanten Plasmide einzeln zu amplifizieren wurden Bakterien transformiert. Dazu wurden 2µl des jeweiligen Ligationsansatzes in 50µl Bakteriensuspension eingebracht und verschiedenen Inkubationsschritten unterzogen. Für jeden Ligationsansatz wurden zwei Agaroseplatten ausplattiert, einmal mit 50µl und einmal mit 100µl der Suspension. Diese Platten wurden über Nacht bei 34°C inkubiert und im Falle einer erfolgreichen Kultivierung bei 4°C aufbewahrt.

4.8.3 Kultivierung von Bakterien

4.8.3.1 Prinzip der „Blau-Weiß“ Selektion

Um erfolgreich transformierte Bakterienkolonien deren Plasmid das jeweilige PCR-Amplifikat integriert hatte erkennen zu können, fand das Prinzip der „Blau-Weiß-Selektion“ Anwendung (Davies, 1968): Bakterien, welche den Plasmid-Vektor pCR®2.1 in sich aufnehmen, erwerben hierdurch ein Ampicillinasegen (amp^r-Gen) und damit eine Ampicillinresistenz. Zusätzlich enthält der Vektor ein funktionsfähiges β-Galaktosidase-Gen, welches Bakterien befähigt X-Gal in Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol umzusetzen. Wird im Zuge der Ligationsreaktion ein DNS-Molekül / PCR-Amplifikat in den Vektor eingefügt, so geschieht dies technologiebedingt am „multiple cloning site“ (MCS). Dieser MCS liegt innerhalb des lacZ-Gens, welches einen Teil der β-Galaktosidase kodiert. Wird folglich ein Amplifikat in den Vektor integriert, kann das betroffene Bakterium wegen der dabei erfolgenden Zerstörung des β-Galaktosidase-Gens X-Gal nicht umsetzen. Solche erfolgreich transformierten Bakterien erscheinen als weißliche Kolonie. Die anderen Kolonien, deren Gründungsbakterien einen Vektor ohne am MCS eingefügter DNS aufgenommen haben, erscheinen wegen der Expression der

Galaktosidase und der Erzeugung von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol aus X-Gal bläulich. Als Induktor der Expression des β -Galaktosidase-Gens dient IPTG. Bakterien, welche gar keinen Vektor und damit kein Ampicillinasegen aufgenommen haben, werden durch Ampicillin abgetötet.

4.8.3.2 Selektion und Kultivierung einzelner Kolonien

Lediglich weiße, isoliert wachsende Kolonien wurden mit Pipettenspitzen abgehoben. Jede dieser Spitzen wurde in ein steriles Kulturröhrchen, das mit einem Gemisch aus 5ml Flüssigmedium (LB Broth Base (Lennox L Broth Base, Invitrogen) und Aqua destillata 20g/l) und 5 μ l Ampicillin gefüllt worden war, eingebracht. Diese Kulturröhrchen wurden über Nacht bei 36°C inkubiert.

4.8.4 Extraktion und Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide

Um die Plasmide der Bakterienkulturen zu extrahieren wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurden aus den Bakteriensuspensionen der Kulturröhrchen mittels Zentrifugation Pellets erzeugt. Diese Pellets wurden resuspendiert und mit verschiedenen Puffern versetzt. Dann wurde die Flüssigkeit auf einem Säulenfilter durch weitere Wasch- und Zentrifugationsschritte prozessiert. Anschließend wurde die DNS aus den Säulen in Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren. Zur Überprüfung des Erfolges der Extraktion der rekombinanten Plasmide und der Blau-Weiß-Selektion wurde ein Restriktionsverdau mit EcoR1 durchgeführt, welcher das klonierte PCR-Amplifikat aus dem Plasmidverband freilegen sollte. Zur Visualisierung der Produkte erfolgte analog zur vorhergehenden Beschreibung eine Gelelektrophorese.

4.9 Sequenzierung der IgV_H-Gensegmente

Das Prinzip der durchgeführten Sequenzierung beruhte, in Anlehnung an das enzymatische Kettenabbruchverfahren nach Sanger, auf dem zufälligen Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide in amplifizierte DNS-Moleküle während einer (Cycle-)PCR (Sanger, 1977). Da der Ribosebaustein der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide am für die DNS-Synthese essentiellen 3'-C-Atom keine Hydroxylgruppe besitzt, folgt bei deren zufälligem Einbau während der PCR ein Syntheseabbruch. Das Resultat sind verschieden lange Nukleinsäuremoleküle, die komplementär zur „Template“, also der zu sequenzierenden DNS-Sequenz sind. An ihrem 3'-Ende findet sich eines der vier Dideoxynukleotide. Jedes dieser Nukleotide ist mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff versehen. Dieser wird parallel zur sich anschließenden längenabhängigen

Auftrennung der Fragmente mittels Kapillarelektrophorese detektiert und damit die Sequenz bestimmt.

4.9.1 Cycle-PCR

Als Template wurden die Miniprepprodukte verwendet. Vor dem Einsetzen in die Cycle-PCR wurden diese mit dem QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) gemäß der Anleitung des Herstellers gereinigt, das gereinigte Produkt auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und nach 25 minütigem Lauf bei 130V unter UV-Licht abgelesen und fotografiert (Eagle Eye Systems II, Stratagene). Die Stärke der beobachteten Bande diente zur Einschätzung des in die Cycle-PCR einzusetzenden Template-Volumens. Dies waren maximal 13,75µl. Verwendet wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems). Für die Cycle-PCRs wurden je 4µl Premix, 2µl BigDye Sequencing Buffer und 0,25µl Primer (Konzentration 5pM, PE Applied Biosystems) mit der abgeschätzten Menge an Template vermischt und sofern nötig mit Aqua destillata zu einem Gesamtansatz von 20µl ergänzt. Die PCRs setzten sich aus dem initialen Denaturierungsschritt von 1min Dauer bei 96°C, aus 25 Zyklen zu je 10sec bei 96°C, 5sec bei 45 - 60°C und 4min bei 60°C zusammen (*vgl. 10.2 PCR-Protokolle und Primer*).

4.9.2 Sequenzbestimmung

Im Anschluss an die Cycle-PCR wurde das Amplifikat mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (50) (Qiagen) gereinigt. 5µl des Produktes wurden der Kapillarelektrophorese im ABI Prism® 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems) zugeführt. Die Basensequenz wurde von der zugehörigen Software ermittelt und digital erfasst.

4.10 Tumorzellevolution und Migrationsanalyse

Das Ziel der obig beschriebenen Prozesse war die Ermittlung von IgV_H-Gensegment-sequenzen einzelner FL-Zellen. Diese Sequenzen wurden zur Keimbahnkonfiguration mit der höchsten Homologie sowie untereinander verglichen. Anhand der resultierenden Vielfalt an Mutationsmustern wurden die klonalen Beziehungen innerhalb der FL-Populationen bestimmt, die weiter in Form von Stammbäumen der Tumorzellevolution veranschaulicht wurden.

4.10.1 Klonalitätsanalyse und Bestimmung der Mutationsmuster

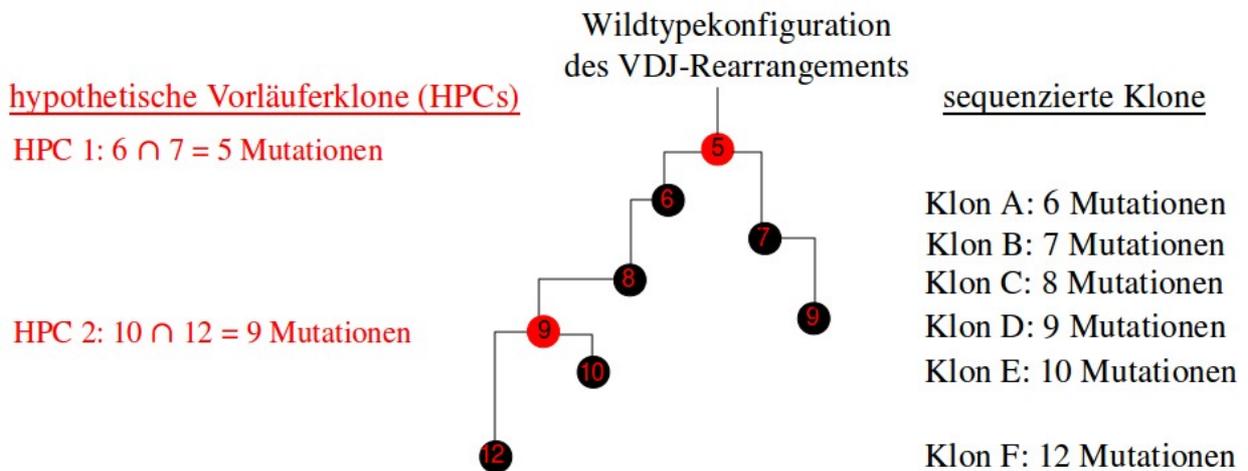
Zur Bestimmung der V_H -, D-, und J_H -Segmentfamilien der sequenzierten IgV_H -Gensegmente wurden diese, unter Verwendung des „Blastprogramms“ auf „www.pubmed.com/blast“ im Internet, mit den bekannten Keimbahnkonfigurationen des humanen IgV_H -Gens verglichen (*Johnson, 2000; Tomlinson, 1992*). Nur Sequenzen mit dem identischen V_HDJ_H -Rearrangement wurden weiter analysiert (*Wan, 1990*). Dabei wurden die V_H -, D und J_H -Segmentfamilien des Klons mit der höchsten Homologie zur entsprechenden Keimbahnkonfiguration als unmutierte Wildtypkonfiguration der FL-Population eines Patienten postuliert. Jede Klonsequenz wurde mit dieser unmutierten Wildtypkonfiguration verglichen. Loci, an denen die jeweilige Klonsequenz und die Wildtypsequenz identisch waren, wurden durch „-“, solche die mutiert waren, durch die aus der Mutation resultierende Base (A, T, C oder G) repräsentiert. Dadurch wurden verschiedene Mutationsmuster und die intraklonale Heterogenität der V_HDJ_H -Rearrangements offenkundig.

4.10.2 Rekonstruktion der Tumorzellevolution

Um eine Mutationshierarchie der intraklonalen Heterogenität zu erhalten, wurden die Mutationsmuster eines Patienten nach ansteigender Mutationsanzahl geordnet. Da der Prozess der SH im FL stattfindet und die resultierenden Mutationsmuster bei Expansion des FLs in andere Kompartimente beibehalten werden, müssen Mutationesmuster von alten, früh entstandenen Klonen idealerweise in stärker mutierten Klonen enthalten sein (*Bahler, 1992a; Noppe, 1999*). War solch eine direkte Überführung eines Mutationsmusters in das eines stärker mutierten Folgeklons nicht möglich, wurden hypothetische Vorläuferklone (HPCs) definiert, um die Evolution der sequenzierten Klone ausgehend von der unmutierten Wildtypkonfiguration zu rekapitulieren (*vgl. Abb. 12*) (*Adam, 2007; Bognar, 2005; Oeschger, 2002*). Zunächst wurden gewebespezifische Stammbäume der Tumorzellevolution generiert. Dies waren ein LK-Stammbaum, basierend auf der Hierarchie der Mutationsmuster der LK-Sequenzen und ein KM-Stammbaum, basierend auf der intraklonalen Heterogenität der KM-Klone. Um eine mögliche klonale Migration zwischen dem LK- und KM-Kompartiment abzuschätzen wurden „inter-tissue“ Stammbäume, basierend auf den Mutationsmustern von LK- und KM-Klonen eines Patienten, bestimmt. In Zusammenschau der klonalen Verhältnisse der gewebespezifischen und der gewebeübergreifenden „inter-tissue“ Stammbäume wurde für jede FL-Klonsequenz / jeden sequenzierten Klon die in diesem Modell wahrscheinlichste Evolution ermittelt.

Abb. 12 – Prinzip der Rekonstruktion der Tumorzellevolution

Wildtypkonfiguration		TCACCCGATGGTATGAACCGGTACCCTGTATTTACAGGTCCATTACCTTGCGCAATTGGCCAATTGGCCCGGTGA
Klon	Mutationen	intraklonale Mikroheterogenität
Klon A	6	-----A--C-----T-----A----GC-----
Klon B	7	-----A--C-----T-----A----GC-----G--
Klon C	8	-----A--C-----T-----A----GC-----C-----
Klon D	9	-----A--C-----T-----C-----A----GC--T-----G--
Klon E	10	-----A--C-----T-----A--T--A----GC-----C--G-----
Klon F	12	--C-----A--C--T-----G-----T-----A----GC-----C--G-----
HPCs	Mutationen	
HPC 1	5	-----A--C-----A----GC-----
HPC 2	9	-----A--C-----T-----A----GC-----C--G-----



4.10.3 Berechnung der Migrationswahrscheinlichkeit

Für jede der drei betrachteten Klonpopulationen (sequenzierte LK-Klone, KM-Klone, LK und KM-Klone zusammen) wurde ausgehend von Mutationen, die mindestens zwei der Sequenzen einer Population gemeinsam waren, die Gesamtheit der jeweils möglichen HPCs bestimmt. Um diese HPCs zu gewichten, wurde für jeden HPC dessen Wahrscheinlichkeitsmaß „pm“ berechnet (vgl. Abb. 13). Beginnend beim wahrscheinlichsten HPC wurde die jeweilige „pm“-stratifizierte HPC-Hierarchie nach dem nächstwahrscheinlichen HPC, welcher lediglich Klone umfasste, die bereits in zuvor ausgewählten HPCs gruppiert worden waren, durchsucht. Damit wurde die klonale Evolution der betrachteten Population von der unmutierten Wildtypkonfiguration nachvollzogen und als Stammbaum der Tumorzellevolution dargestellt. Besaß ein sequenzierter Klone im „inter-tissue“-Stammbaum einen HPC mit höherem Wahrscheinlichkeitsmaß „pm“, als im gewebespezifischen Stammbaum und vereinte dieser „inter-tissue“-HPC sowohl LK-, wie KM-Klone auf sich, wurde eine Migration zwischen LK und KM postuliert, also für diesen Klon die Evolution des „inter-

tissue“-Stammbaumes als wahrscheinlichste Evolutionsvariante postuliert. War hingegen der gewebespezifische HPC wahrscheinlicher, wurden Migrationsprozesse zur Erklärung der klonalen Entwicklung des betreffenden Klons abgelehnt. Zur Automatisierung, Distribution und Kontrolle dieser eigens entwickelten mathematisch-statistischen Methode wurde ein Computerprogramm (FLER) verfasst. Der Quellcode findet sich im Internet (*vgl. Anhang*).

Abb. 13 – Formel zur Berechnung des Wahrscheinlichkeitsmaßes „pm“

$$pm = (t - r + 1) * i * z \sqrt{\prod_{k=1}^l P_k}$$

pm:	Wahrscheinlichkeitsmaß des betrachteten HPCs
t:	Gesamtanzahl der sequenzierten Klone innerhalb der betrachteten Population (LK-, KM-, LK+KM-Klone)
r:	Gruppenstärke; Anzahl der sequenzierten Klone innerhalb einer HPC-definierenden Gruppe
i:	Mutationsanzahl des betrachteten HPCs
z:	Anzahl der Wiederholungen der Sequenz des betrachteten HPCs innerhalb seiner Population
l:	Länge der gesamten Sequenz
k:	Zähler, beginnt am ersten und endet am letzten Locus l der betrachteten Sequenz
P _k :	Relative Häufigkeit der Mutation am Locus k innerhalb der betrachteten Population (LK-, KM-, LK+KM-Klone)

4.11 Statistik zur B-Zell-Rezeptoranalyse

Zum Nachweis oder Ausschluss einer Antigen (AG)-bestimmten SH und einer Expression von funktionell intakten BCRs in den FL-Klonen, wurde ein „Java-Applet“ des Instituts für Statistik der „University of Stanford“ unter „<http://www-stat.stanford.edu/immunoglobulin>“ verwendet (*Lossos, 2000*). Eingabeparameter waren neben den Sequenzen der „framework regions“ (FRW) und „complementarity-determining regions“ (CDR) auch die Anzahl der „silent“ (S)- und „replacement“ (R)-Mutationen der sequenzierten IgV_H-Gensegmente (*vgl. Abb. 10*). Hieraus berechnete das Programm einen statistischen p-Wert für die CDR- und einen p-Wert für die FRW-Regionen. Anhand des ersten Wertes, p-Wert(CDR), konnte abgeschätzt werden, ob die SH unter dem Einfluss eines AGs stand, anhand des zweiten, p-Wert(FRW), ob die strukturelle Integrität des BCRs trotz SH gewahrt blieb (*Chang, 1994*).

5 Ergebnisse

Wenn in den folgenden Abschnitten von „Klon(en)“ gesprochen wurde, so bezeichnete dies die sequenzierten IgV_H-Gensegmente. Die berechneten hypothetischen Vorläuferklone (HPCs) stellten in den konstruierten Stammbäumen, basierend auf dem Wahrscheinlichkeitsmaß „pm“, die wahrscheinlichsten Knotenpunkte der Tumorzellevolution dar. Der Start der Evolution wurde beginnend bei der ermittelten, unmutierten Wildtypkonfiguration des V_HDJ_H-Rearrangements bis hin zu den einzelnen, sequenzierten FL-Klonen rekonstruiert. Dabei wurde die Mutationslast als Indikator der zeitlichen Entwicklung der FL-Population verstanden. In der Stammbaumdarstellung der Tumorzellevolution entsprachen die Ellipsen den HPCs, die Zahl in den Ellipsen gab die Mutationsanzahl des jeweiligen HPCs an. HPCs mit der gleichen Anzahl an Mutationen waren nicht identisch, außer dies wurde explizit erwähnt. Die sequenzierten Klone waren in den Stammbäumen durch ihren Namen und eine Zahl in Klammern dargestellt. Die Zahl in Klammern entsprach der Mutationsanzahl. Gestrichelte Linien der Tumorzellevolution stellten Alternativwege über HPCs geringerer Wahrscheinlichkeit „pm“ dar. Blaue Linien gaben Migration vom LK ins KM, rote vom KM in den LK an. Unterstrichene Klone exprimierten einen strukturell intakten B-Zell-Rezeptor (vgl. 4.11 Statistik zur B-Zell-Rezeptoranalyse). Die Sequenzen der IgV_H-Gensegmente der untersuchten FL-Klone und die der daraus abgeleiteten HPCs finden sich im Anhang.

5.1 Histologische Reevaluation, Gewebe und klinische Daten

Die histologische Reevaluation der LK-Gewebe der drei Patientinnen konnte die Diagnose „follikuläres Lymphom“ bestätigen. Die Entität von Patientin 1 wurde als FL Grad II und die Entitäten von Patientin 2 und 3 als FL Grad I klassifiziert.

Abb. 14 – zeitliche und therapeutische Relation der untersuchten Gewebe

Patient	gesamt	LK-Gewebe (Jahr)	KM-Gewebe (Jahr)
1	2	1 x prätherapeutisch (2006)	1x prätherapeutisch (2006)
2	2	1 x prätherapeutisch (2002)	1x posttherapeutisch (2005)
3	5	1 x prätherapeutisch (2004) 1 x posttherapeutisch (2007)	1 x prätherapeutisch (2004) 2 x posttherapeutisch (2006, 2007)

Auflistung der in dieser Studie untersuchten Gewebe in Relation zur Therapie und mit Jahresangabe der Biopsatgewinnung. Die LK-Gewebe von Patient 1 und 2 waren als FF- und FFPE-Gewebe, alle anderen als FFPE-Gewebe verfügbar.

Die KM-Infiltrate waren stets paratrabekulär lokalisiert, nahmen jeweils mindestens 50% des

Markraums ein und wiesen denselben Grad wie das Lymphom im zugehörigen LK-Gewebe auf. Alle Lymphominfiltrate der untersuchten LK- und KM-Gewebe zeigten mit der Expression von CD20, CD10, Bcl6 und Bcl2 den typischen Immunphänotyp des FLs. Die mittels β -Globin-PCR ermittelte Qualität der verwendeten FFPE Gewebe war in allen Fällen adäquat.

Patient 1:

Die erste Patientin war eine 35 Jahre alte Frau mit synchronem Befall des im Jahr 2006 biopsierten LKs und KMs (LK rechts inguinal vom 08.03.2006, KM Beckenkamm vom 10.03.2006) durch ein FL Grad II im Ann-Arbor Stadium IV. Die Erstdiagnose erfolgte im März 2006, der FLIPI betrug dabei 1/5. Es bestand keine Therapieindikation und die Patientin wurde im Sinne einer „watch & wait“ Strategie betreut. Im November 2009 erhielt sie im Rahmen einer Phase II-Studie am Universitätsklinikum Freiburg (Prof. Dr. Hendrik Veelken) die erste Dosis einer Vakzinierungstherapie. Damit standen die beschriebenen LK- und KM-Gewebe des prätherapeutischen Intervalls für diese Studie zur Verfügung.

Patient 2:

Die zweite Patientin, eine 44 Jahre alte Frau, zeigte einen synchronen LK- und KM-Befall durch ein FL Grad I (LK rechts inguinal vom 21.05.02, KM Beckenkamm vom 22.05.02) im Ann-Arbor Stadium IV. Die diagnostischen Biopsien wurden 2002 im Jahr der Erstdiagnose gewonnen. Hiervon war lediglich das LK-Gewebe für diese Studie verfügbar. Im Jahr 2005, drei Jahre nach Eintritt der klinischen Remission, induziert durch CTX (acht Zyklen CHOP), erlitt die Patientin ein Rezidiv. Dieses wurde durch eine KM Biopsie diagnostiziert und zeigte erneut eine Infiltration durch ein FL Grad I (KM Beckenkamm vom 20.12.2005). In dieser Studie wurde damit LK-Gewebe des prä- und KM-Gewebe des posttherapeutischen Intervalls verwendet.

Patient 3:

Von der dritten Patientin, einer 61 Jahre alten Frau, waren neben den prätherapeutisch gewonnenen Biopsaten zusätzlich posttherapeutische Biopsate aus Rezidiv-Geweben verfügbar. Die initialen LK- und KM-Biopsien wurden im Jahr 2004 entnommen und zeigten einen synchronen Befall durch ein FL Grad I (LK rechts axillär vom 02.04.2004, KM Beckenkamm vom 26.04.2004). Das klinische Stadium bei Erstdiagnose im April 2004 entsprach damit dem Stadium IV nach Ann-

Arbor. Die Behandlung mittels CTX (sechs Zyklen R-CHOP, 05-08/2004) führte zur Remission (im Beckenkammbiopsat vom 14.09.2004 kein Lymphom nachweisbar). Im Januar des Jahres 2006 wurde am KM-Biopsat ein Rezidiv diagnostiziert (KM Beckenkamm, 02.01.2006). Dieses Biopsat zeigte eine KM-Infiltration durch ein FL Grad I. Die Patientin erhielt drei Zyklen CTX nach dem R-IEV-Schema (02-04/2006), gefolgt von einer Hochdosis-CTX mit Stammzelltransplantation (05/2006). Im Oktober des Jahres 2007 erlitt die Patientin das zweite Rezidiv, welches durch weitere LK- und KM-Biopsien diagnostiziert wurde (LK rechts axillär, 14.10.2007; KM Beckenkamm 16.10.2007). Beide Biopsate zeigten erneut ein FL Grad I. Die Therapie erfolgte nach dem R-DHAP-Schema (vier Zyklen, 02-06/08). Im Februar 2009 kam es links inguinal nodal zum dritten Rezidiv. Es erfolgte eine RTX links inguinal mit 39,4Gy (04-05/2009), sowie eine Rituximab-Erhaltungstherapie (07/2008). (vgl. Abb. 14)

5.2 Mutationsmuster und Migrationsanalyse

Für die untersuchten FL-Klone der drei Patienten konnte je genau eine Wildtypkonfiguration des V_HDJ_H -Rearrangements bestimmt werden (vgl. Abb. 15).

Abb. 15 – VDJ-Rearrangements und Nukleotidinsertionen an den Segmentgrenzen

Patient	V_H -Segment	n	D-Segment	n	J_H -Segment
1	IGHV3-30*04	TTGG	IGHD6-19*01	ATT	IGHJ5*02
2	IGHV3-23*01	GGG	IGHD1-20*01	-----	IGHJ4*02
3	IGHV3-15*02	-----	IGHD2-21*02	-----	IGHJ4*03

Alle analysierten Klone eines Patienten besaßen dasselbe VDJ-Rearrangement und waren deshalb monoklonalen Ursprungs. Zwischen den V- und D-Segmenten, sowie den D- und J-Segmenten fanden sich als Resultat der TdT-Aktivität die angeführten Nukleotidinsertionen. Dabei wurden die inserierten Nukleotide, welche im Klon mit den geringsten Mutationen auftraten, als unmutierte Wildtypkonfiguration betrachtet.

Abb. 16 – Mutationsraten und Anzahl gemeinsamer Mutationen der untersuchten Gewebe

Patient	Jahr	durchschnittliche MR (%)		durchschn. mediane MR (%)		Range der MR (%)		Anzahl gemeinsamer Mutationen		
		LK (FR1/2)	KM	LK (FR1/2)	KM	LK (FR1/2)	KM	LK	KM	LK+KM
1	2006	22,2 / 23,1	15,6	55,0 / 28,3	17,6	0 - 33,8 / 0 - 34,0	5,6 - 27,0	0	1	0
2	2002	10,5 / 12,4	nv	10,5 / 12,2	nv	10,2 - 11,0 / 12,0 - 13,2	nv	27	---	---
	2005	---	13,6	---	13,6	---	8,3 - 15,3	---	22	---
3	2004	---	7,9	---	7,7	---	6,5 - 10,3	5	22	5
	2006	---	5,5	---	5,6	---	2,2 - 8,2	---	5	---
	2007	---	6,3	---	6,3	---	5,2 - 6,9	11	11	10

Die LK- und KM-Klone von Patient 2 hatten 20 identische Mutationen. „Jahr“ gibt das Jahr der jeweiligen Biopsiegewinnung an. Patient 1 hatte in allen Geweben ein FL², Patient 2 und 3 hatten in ihren Geweben ein FL¹. „nv“ zeigt an, dass die Biopsie nicht vorhanden war, aber gewonnen wurde. Die fünf gemeinsamen Mutationen von Patient 3 waren dieselben und in allen anderen enthalten.

Diese entsprach jeweils der Keimbahnkonfiguration mit der höchsten Homologie zu der am geringsten mutierten Klonsequenz. Alle LK- und KM-Sequenzen des jeweils betrachteten Patienten besaßen dasselbe V_HDJ_H -Rearrangement. Deshalb wurden die Klone als monoklonale Population betrachtet. Durch den Vergleich der einzelnen Klonsequenzen mit der Wildtypkonfiguration konnten verschiedene Mutationsmuster bestimmt werden (vgl. *Anhang*). Dadurch wurde für die jeweils gebildete Klonpopulation eines Patienten (LK-Klone, KM-Klone, oder LK-Klone+KM-Klone) die für das FL charakteristische intraklonale Heterogenität offenkundig. Die Anzahl gemeinsamer Mutationen der Sequenzen einer betrachteten Population variierte nach Patient und Population (vgl. *Abb. 16*). Es wurden keine Deletionen, Insertionen oder Duplikationen als Folge der SH detektiert. Alle Mutationen, welche die intraklonale Heterogenität bedingten, waren Punktmutationen. Je nach Patient konnten an der Verbindungsstelle zwischen dem D- und J_H -Segment, als auch zwischen dem V_H - und D-Segment, als Folge der Aktivität der TdT, verschiedene Nukleotidinsertionen nachgewiesen werden. Dabei wurde die Sequenz dieser „template“-unabhängig eingefügten Nukleotide des jeweils am geringsten mutierten Klons eines Patienten als unmutierte Konfiguration betrachtet (vgl. *Abb. 15*). Die am geringsten mutierte Sequenz wurde immer im therapienaiven LK-Gewebe gefunden. Im Rahmen der Migrationsanalyse wurden Bewegungen der Klone beider Kompartimente, LK und KM, zu verschiedenen Zeiten in beide Richtungen festgestellt. Die frühesten Migrationsbewegungen waren dabei immer vom LK ins KM gerichtet. Ferner zeigten sich als mögliche Ursache für die betrachteten Rezidive Hinweise auf KM-Persistenz früher, gering mutierter FL-Klone. Zur Migrationsanalyse wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit die FR2-Sequenzen der LK- und KM-Klone verwendet. Alle Stammbäume basierten folglich auf den darin enthaltenen Mutationsmustern.

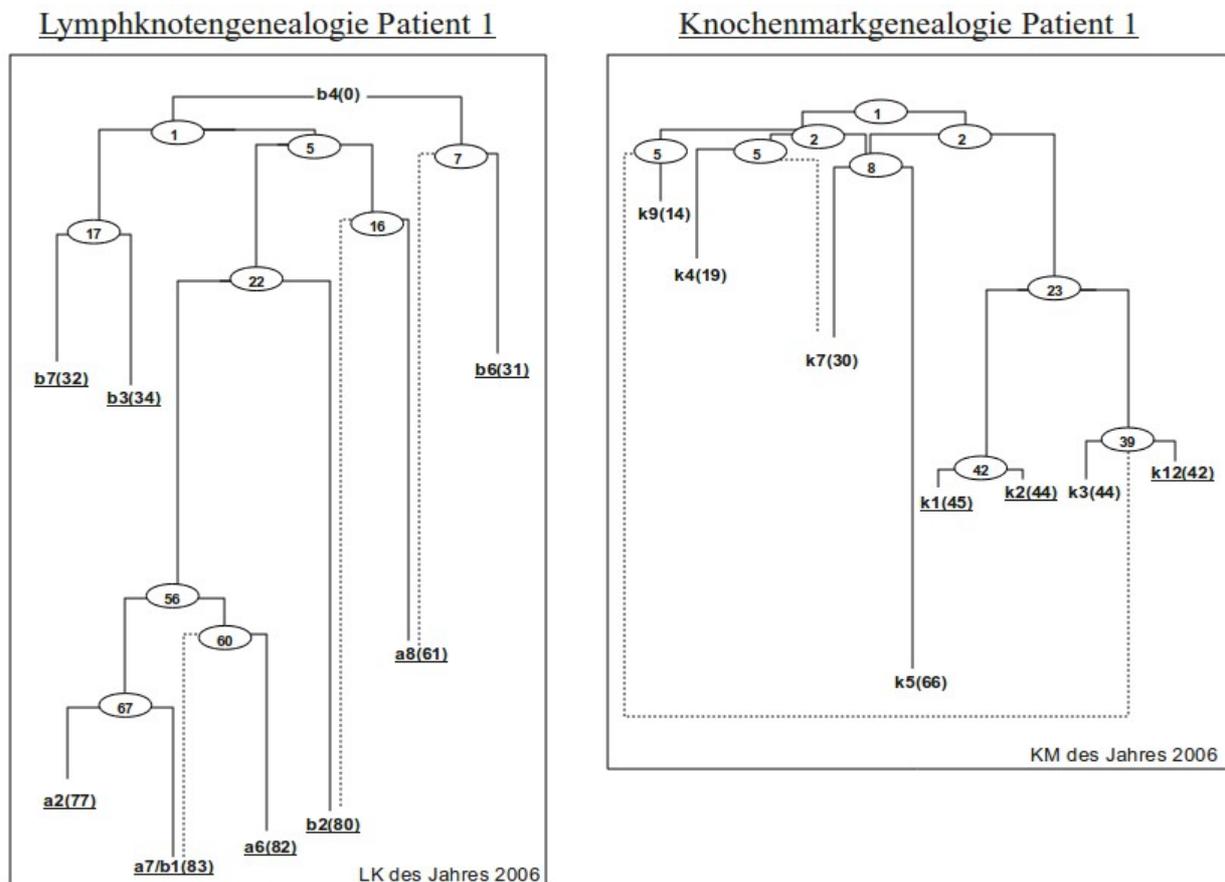
5.2.1 Patient 1

Die ermittelte IgV_H -Familie von Patient 1 war IGHV3-30*04. Die amplifizierten V_HDJ_H -Rearrangements umfassten im FR1 349 Basenpaare (bp) und im FR2 244 bp. Die LK-Sequenzen beinhalteten zwei identische Mutationsmuster. Dies waren die Sequenz des Klons a7 und b1. Ferner wurden innerhalb der Sequenzpopulation des KMs, als auch des LKs und des KMs zusammen, keine weiteren identischen Mutationsmuster nachgewiesen. Die durchschnittliche Mutationsrate der V_HDJ_H -Rearrangements der zehn LK-Klone betrug im FR1 22,2% und im FR2 23,1%, die der acht KM-Klone 15,6% (FR2) (vgl. *Abb.16*).

5.2.1.1 Gewebespezifische Tumorzellevolution

Innerhalb der LK-Population konnte kein Mutationsmuster eines sequenzierten Klons direkt in das von stärker mutierten Klone überführt werden. Es wurden neun HPCs verwendet um aus den Mutationsmustern der zehn LK-Klone die wahrscheinlichste Tumorzellevolution zu rekonstruieren. Da die Sequenz des Klons b4 der Wildtypkonfiguration entsprach, wurde sie als früheste Manifestation des FLs betrachtet. Alle anderen Sequenzen, sowohl die der bestimmten HPCs, als auch die der anderen, tatsächlich sequenzierten LK-Klone, wurden deshalb als deren Abkömmlinge angesehen. Innerhalb der aus acht Klone bestehenden KM-Population konnte ebenfalls kein Mutationsmuster eines sequenzierten Klons in das eines anderen übertragen werden. Es waren analog zur LK-Population exklusive Mutationen vorhanden, die eine direkte Übertragung der Mutationsmuster von geringer mutierten Klone in das stärker mutierter Klone unmöglich machten (vgl. Abb. 12). Um aus der intraklonalen Heterogenität der KM-Mutationsmuster die wahrscheinlichste Tumorzellevolution der KM-Population zu rekonstruieren, wurden neun HPCs eingeführt. (vgl. Abb. 17)

Abb. 17 – gewebespezifische Tumorzellevolution Patient 1, FL^o2



Die Kerngruppe der LK-Population wurde durch die Klone a2, a7, b1 und a6 gebildet, da sie den wahrscheinlichsten HPC der LK-Population definierten. Dieser HPC, HPC_LK1, besaß 56 Mutationen. Als nächstes wurde dieser Gruppe der Klon b2 zugefügt, da der zweitwahrscheinlichste HPC, der HPC_LK2 mit 22 Mutationen, neben den Klonen a2, a7, b1 und a6 auch den Klon b2 umfasste. Der HPC_LK3 mit 83 Mutationen spiegelte die Übereinstimmung der Mutationsmuster von a7 und b1 wider. Der HPC_LK4 mit 16 Mutationen stellte den Klon a8 in Relation zu Klon b2. Da die Evolution von b2 über HPC_LK2 mit 22 Mutationen wahrscheinlicher war, als über HPC_LK4, wurde die Verbindungslinie in der Genealogie gestrichelt dargestellt. Weiter bildeten die Klone b3 und b7 eine eigene Untergruppe und definierten HPC_LK5 mit 17 Mutationen. Der in der „pm“-Hierarchie folgende HPC mit neun Mutationen wurde nicht berücksichtigt, da er die Klone a2, a6, a7, a8 und b1 als Gruppe umfasste, dabei allerdings den Klon b2 nicht berücksichtigte (vgl. Abb. 18); b2 bildete aber einen wahrscheinlicheren HPC mit a2, a6, a7, und b1 (HPC_LK2), als a8. Der HPC_LK6 mit fünf Mutationen setzte HPC_LK2 und HPC_LK4 in Beziehung, somit die Klone a2, a6, a7, b1 und b2 zu Klon a8. Die HPCs HPC_LK7 und HPC_LK8 mit 67 und 60 Mutationen, fächerten die Beziehung der Klone der Kerngruppe zueinander detaillierter auf, HPC_LK9 zeigte, dass Klon b6 am ehesten zu Klon a8 in Beziehung stand, und HPC_LK10 verband alle Klone außer b6 und b4. Da b4 keine Mutation aufwies, wurden HPC_LK9 und HPC_LK10 mit ihm verbunden. Dies sollte die Entwicklung aller Klone ausgehend von der unmutierten b4-Sequenz veranschaulichen. (vgl. Abb. 17 und 18)

Der wahrscheinlichste HPC des KMs, HPC_KM1 mit einer Mutation umfasste alle acht KM-Klone. Diese Population beinhaltete die Kerngruppe aus Klon k1, k2, k3 und k12, die den HPC_KM2 mit 23 Mutationen definierte. Diese Gruppe wurde durch HPC_KM3 mit 42 und HPC_KM4 mit 39 Mutationen noch genauer spezifiziert, indem k1 und k2, sowie k3 und k12 evolutorisch noch näher in Beziehung gesetzt wurden. HPC_KM5 mit acht Mutationen verband Klon k5 und k7. Die beiden in der „pm“-Hierarchie folgenden HPCs mit vier und sieben Mutationen, wurden verworfen, da sie die Kerngruppe aus Klon k1, k2, k3 und k12 nur mit k5 oder mit k7 in Beziehung setzten, ohne k7 und k5 gleichzeitig zu umfassen (vgl. Abb. 19). Die Klone k5 und k7 bildeten allerdings, repräsentiert durch HPC_KM5, eine wahrscheinlichere Gruppe. Der Klon k9 stand der Untergruppe aus k12 und k3 am nächsten (HPC_KM6), und die Klone k4 und k7 definierten HPC_KM7 mit fünf Mutationen. In Form von HPC_KM8 wurden die Gruppe aus k5 und k7 mit der Kerngruppe in Verbindung gebracht. Die HPCs von k4, k5, k7 und k9 wurden schließlich durch HPC_KM9 mit zwei Mutationen verbunden. Der HPC_KM1 stellte somit den frühesten, am geringsten mutierten FL-Klon der KM-Population dar, welcher sich direkt von der unmutierten Wildtypkonfiguration

ableitete. (vgl. Abb. 19)

Abb. 18 – „pm“-Hierarchie der LK-HPCs, Patient 1, FL^o

Anzahl sequenzierter LK-Klone t: 10

pm	r	z	i	locus	Klongruppe	Name	pm	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
0.996105691	4	28	56	52	(a2 a6 a7 b1)	HPC_LK1	0.929870818	6	1	3	96	(a2 a6 a7 b1 b2 b7)	
0.993189382	5	15	22	190	(a2 a6 a7 b1 b2)	HPC_LK2	0.929870818	6	1	3	51	(a2 a6 a7 b1 b3 b7)	
0.984105090	2	6	83	56	(a7=b1)	HPC_LK3	0.929870818	6	1	3	21	(a2 a7 a8 b1 b3 b7)	
0.981687540	2	6	16	191	(a8 b2)	HPC_LK4	0.929744946	4	1	9	43	(a2 a7 b1 b7)	
0.972807130	2	4	17	53	(b3 b7)	HPC_LK5	0.929231928	6	1	2	209	(a2 a7 b1 b2 b3 b7)	
0.972313869	5	3	9	72	(a2 a6 a7 a8 b1)		0.928370261	5	1	4	45	(a2 a6 a7 b1 b3)	
(nicht verwendet, da Klon a8 einen wahrscheinlicheren HPC mit b2 bildet)							0.928335720	2	1	11	180	(a6 a8)	
0.972228968	6	3	5	53	(a2 a6 a7 a8 b1 b2)	HPC_LK6	0.928317767	8	1	1	171	(a2 a6 a7 a8 b1 b2 b3 b7)	HPC_LK10
0.971310310	5	3	8	48	(a2 a7 a8 b1 b2)		0.926762506	2	1	29	206	(a2 b2)	
(nicht verwendet, da Klon a6 nicht inbegriffen)							0.926399064	4	1	6	58	(a7 b1 b2 b7)	
0.968139171	3	3	67	110	(a2 a7 b1)	HPC_LK7	0.925030139	5	1	6	191	(a2 a7 b1 b3 b7)	
0.967649031	3	3	60	195	(a6 a7 b1)	HPC_LK8	0.924970437	2	1	25	110	(a6 b2)	
0.962002675	2	4	7	209	(a8 b6)	HPC_LK9	0.923777311	5	1	3	66	(a7 b1 b2 b3 b7)	
0.960847660	2	3	10	52	(b2 b3)		0.923040458	3	1	23	81	(a2 a6 b2)	
0.957210100	3	2	5	206	(a6 b3 b7)		0.921835799	4	1	2	60	(a8 b2 b3 b7)	
0.956661709	2	2	7	52	(a8 b7)		0.920615315	3	1	30	203	(a7 b1 b2)	
0.956483496	2	2	59	129	(a2 a6)		0.914667404	3	1	2	43	(a6 b2 b3)	
0.952764866	2	2	6	129	(a8 b3)		0.913797189	4	1	27	6	(a2 a7 b1 b2)	
0.951930999	2	2	11	59	(b2 b7)		0.903086550	4	1	2	208	(a6 a7 b1 b6)	
0.951711575	3	2	6	49	(b2 b3 b7)		0.902880451	6	1	1	146	(a2 a6 a7 b1 b2 b6)	
0.936646498	4	2	2	188	(a7 b1 b6 b7)		0.884157677	2	1	3	75	(b2 b6)	
0.933262707	2	2	3	203	(a2 b6)		0.877306662	4	1	1	206	(a7 a8 b1 b6)	
0.930906252	3	1	7	56	(a2 b3 b7)		0.860280654	3	1	1	196	(a8 b2 b6)	
0.930086848	7	1	2	159	(a2 a6 a7 a8 b1 b3 b7)		0.860280654	3	1	1	138	(a6 a8 b6)	
0.930086848	7	1	2	68	(a2 a6 a7 a8 b1 b2 b7)		0.860280654	3	1	1	205	(a6 b6 b7)	

Alle für das LK-Klonkollektiv von Patient 1 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zur Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde (siehe angedeutete Kommentare). Gesamtzahl der LK-HPCs: 48.

Abb. 19 – „pm“-Hierarchie der KM-HPCs, Patient 1, FL^o

Anzahl sequenzierter KM-Klone t: 8

pm	r	z	i	locus	Klongruppe	Name	pm	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	8	1	1	219	(k1 k12 k2 k3 k4 k5 k7 k9)	HPC_KM1	0.942942048	5	1	2	171	(k1 k12 k2 k3 k4)	
0.993175882	4	18	23	66	(k1 k12 k2 k3)	HPC_KM2	(nicht verwendet, da k4 mit k7 wahrscheinlicheren HPC bildet)						
0.991067728	2	14	42	188	(k1 k2)	HPC_KM3	0.938811585	5	1	3	16	(k2 k3 k4 k5 k9)	
0.989030389	2	11	39	188	(k12 k3)	HPC_KM4	(nicht verwendet, da k1 und k12 nicht enthalten)						
0.965505424	2	3	8	205	(k5 k7)	HPC_KM5	0.936703374	4	1	3	18	(k1 k2 k3 k9)	
0.962361334	5	2	4	65	(k1 k12 k2 k3 k5)		(nicht verwendet, da k12 und k3 nicht enthalten)						
(nicht verwendet, da k5 und k7 wahrscheinlicheren HPC bilden)							0.936703374	4	1	3	199	(k1 k12 k2 k7)	
0.957188732	2	2	7	15	(k1 k5)		(nicht verwendet, da k3 nicht enthalten)						
(nicht verwendet, da k5 mit k7 wahrscheinlicheren HPC bildet, k1 mit k2 k12 und k3)							0.933032992	4	1	2	205	(k1 k2 k4 k9)	
0.955689315	3	2	5	206	(k12 k3 k9)	HPC_KM6	(nicht verwendet, da k12 und k3 nicht enthalten)						
0.954841604	2	3	5	127	(k4 k7)	HPC_KM7	0.933032992	4	1	2	193	(k4 k5 k7 k9)	HPC_KM9
0.953184293	6	1	2	159	(k1 k12 k2 k3 k5 k7)	HPC_KM8	0.930123298	3	1	4	49	(k12 k3 k7)	
0.953184293	6	1	2	222	(k12 k2 k3 k4 k5 k9)		0.927763879	3	1	5	84	(k1 k2 k7)	
(nicht verwendet, da k1 nicht enthalten)							0.917078013	2	1	6	222	(k1 k7)	
0.953184293	6	1	2	21	(k1 k2 k3 k5 k7 k9)		0.915579611	2	1	9	13	(k3 k9)	
(nicht verwendet, da k12 nicht enthalten)							0.913105615	2	1	6	42	(k12 k7)	
0.942942048	5	1	2	190	(k12 k3 k5 k7 k9)								
(nicht verwendet, da k1 und k2 nicht enthalten)													

Alle für das KM-Klonkollektiv von Patient 1 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zur Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl der KM-HPCs: 24. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde (siehe angedeutete Kommentare).

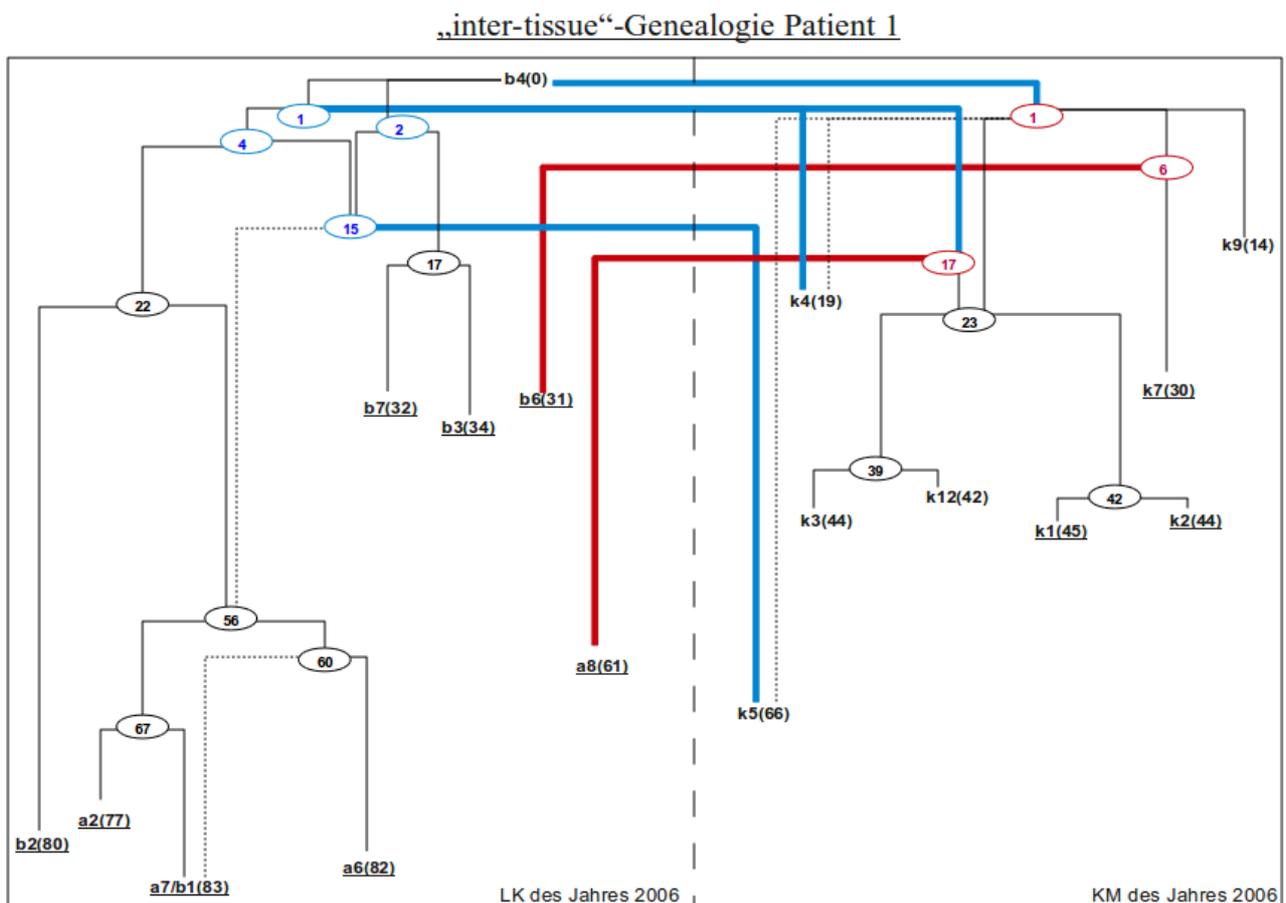
5.2.1.2 Migrationsanalyse

Der ermittelte „inter-tissue“-Stammbaum, der alle FL-Klone von Patientin 1 umfasste, ergab für die

Klone b6, a8, k4 und k5 eine durch Migration erklärable Entwicklung. Die anderen Klone entwickelten sich auch im „inter-tissue“-Stammbaum in dem für sie spezifischen Gewebe. Der „inter-tissue“-Stammbaum beinhaltet 16 HPCs. (vgl. Abb. 20)

Die Kerngruppe der LK-Genealogie aus Klon a2, a6 a7 und b1 war auch im „inter-tissue“-Stammbaum die Kerngruppe mit dem wahrscheinlichsten HPC, HPC_LK+KM1 mit 56 Mutationen. Der zweitwahrscheinlichste HPC, HPC_LK+KM2 war ebenfalls mit seinem Gegenstück im LK-Stammbaum identisch und brachte Klon b2 in die Darstellung ein. Der HPC_LK+KM3 mit 15 Mutationen war der erste HPC der „inter-tissue“-Population, welcher mit den Klonen k5, a2, a7, b1 und a6, Klone aus beiden Geweben, LK und KM, umfasste. Da die Mehrheit der zu dieser Klengruppe gehörenden Klone aus dem LK stammte und da, wie noch dargelegt wird, die Vorläuferklone von HPC_LK+KM3 im LK lokalisiert gewesen waren, wurde HPC_LK+KM3 dem LK-Kompartiment zugeordnet. Damit entwickelte sich in dieser „inter-tissue“-Darstellung der Klon k5 als Folge von Migration vom LK in das KM. Der nächstwahrscheinliche HPC_LK+KM4 mit 17 Mutationen umfasste in seiner Klengruppe neben den KM-Klonen k1, k2, k3 und k12, auch den LK-Klon a8.

Abb. 20 – gewebeübergreifende Tumorzellevolution, Patient 1, FL⁰²



Da die Mehrheit der Klone dieser Gruppe KM-Klone waren, wurde postuliert, dass Klon a8 in der „inter-tissue“-Darstellung als Folge von Migration entstanden war. Die HPCs HPC_LK+KM5, HPC_LK+KM6, HPC_LK+KM7 und HPC_LK+KM8 mit 42, 39, 83 und 17 Mutationen entsprachen den jeweiligen HPCs der gewebespezifischen Darstellung. Der HPC_LK+KM9 mit vier Mutationen wurde durch die Klongruppe aus Klon k5, a2, a6, a7, b1 und b2 definiert. Diesem Umstand wurde bereits zuvor mit der beschriebenen Entwicklung von k5 Rechnung getragen, die hierdurch bekräftigt wurde. Der Klon k7 bildete mit b6 eine Gruppe, die HPC_LK+KM10 mit sechs Mutationen bestimmte. Da HPC_LK+KM16 mit einer Mutation neben den Klonen b6 und k7 mit k1, k2, k3, k4, k5, k9 und k12 lediglich KM-Klone beinhaltete, wurde HPC_LK+KM10 im KM angesiedelt. Folglich wurde für Klon b6 eine Entwicklung aus einem Migrationsprozess postuliert. Die HPCs HPC_LK+KM11, HPC_LK+KM12 und HPC_LK+KM16 mit 23, 67 und 60 Mutationen entsprachen den jeweiligen HPCs der gewebespezifischen Darstellung.

Abb. 21 – „pm“-Hierarchie der LK+KM-HPCs, Patient 1, FL^o2

Anzahl sequenzierter LK- und KM-Klone t: 18											
pm	r	z	i locus	Klongruppe	Name	pm	r	z	i locus	Klongruppe	Name
0.995272941	4	17	56 60	(a2 a6 a7 b1)	HPC_LK+KM1	0.943722057	12	1	1 21	(k1 k2 k3 k5 k7 k9 a2 a7 a8 b1 b3 b7)	
0.991628452	5	9	22 190	(a2 a6 a7 b1 b2)	HPC_LK+KM2	0.943717943	5	1	4 184	(k1 k12 k2 k3 k5)	
0.991025389	5	9	15 18	(k5 a2 a6 a7 b1)	HPC_LK+KM3	0.943637953	2	1	8 205	(k5 k7)	
0.989239843	5	6	17 70	(k1 k12 k2 k3 a8)	HPC_LK+KM4	0.942573820	3	1	21 49	(k1 k2 a8)	
0.986316210	3	5	23 78	(k12 k3 a8)		0.942346363	2	1	9 127	(k5 a8)	
(nicht verwendet, da k2 und k3 nicht enthalten)											
0.985853674	2	5	42 188	(k1 k2)	HPC_LK+KM5	0.941098602	4	1	6 58	(a7 b1 b2 b7)	
0.985009879	2	5	39 208	(k12 k3)	HPC_LK+KM6	0.940838927	4	1	2 207	(k4 a6 a7 b1)	
0.984884900	2	5	83 129	(a7 b1)	HPC_LK+KM7	0.940838927	4	1	2 206	(k4 a6 b3 b7)	
0.980565997	7	3	6 78	(k1 k2 a2 a6 a7 b1 b2)		0.940692201	3	1	5 48	(a6 b3 b7)	
(nicht verwendet, da k2 und k3 nicht enthalten)											
0.975237441	2	3	17 50	(b3 b7)	HPC_LK+KM8	0.940351656	2	1	8 39	(k5 b3)	
0.974356182	9	2	6 108	(k1 k12 k2 k3 a2 a6 a7 a8 b1)		0.939125108	2	1	6 222	(k1 k7)	
(nicht verwendet, da k5 nicht enthalten)											
0.973184689	6	3	4 87	(k5 a2 a6 a7 b1 b2)	HPC_LK+KM9	0.936900984	2	1	10 44	(k5 b7)	
0.972329665	6	2	7 61	(k1 k12 k2 k3 a8 b2)		0.935979286	3	1	2 129	(k4 a2 a6)	
(nicht verwendet, da a2 a7 a6 b1 nicht enthalten)											
0.972020049	2	2	7 52	(a8 b7)		0.934761456	2	1	22 197	(k5 a2)	
(nicht verwendet, da b3 nicht enthalten)											
0.968692199	2	3	6 78	(k7 b6)	HPC_LK+KM10	0.934398034	3	1	4 42	(k12 k7 a8)	
0.967481700	4	2	23 66	(k1 k12 k2 k3)	HPC_LK+KM11	0.934049609	2	1	16 44	(a8 b2)	
0.965860813	2	3	7 209	(a8 b6)		0.933407112	6	1	2 222	(k12 k2 k3 k4 k5 k9)	
0.965136330	2	2	11 59	(b2 b7)		0.933032992	9	1	1 219	(k1 k12 k3 k4 k5 k7 k9 b6)	HPC_LK+KM15
0.965037408	5	2	4 52	(k7 a2 a6 a7 b1)		0.932075317	4	1	27 6	(a2 a7 b1 b2)	
0.963132649	3	2	67 13	(a2 a7 b1)	HPC_LK+KM12	0.931925043	5	1	2 157	(k1 k12 k2 k3 b6)	
0.959659257	2	2	14 67	(k5 b2)		0.931020120	2	1	10 111	(b2 b3)	
0.959090016	2	2	10 44	(k7 b3)		0.930943797	3	1	26 56	(k5 a7 b1)	
0.956044422	4	1	5 195	(k1 k2 b3 b7)		0.929866524	2	1	59 198	(a2 a6)	
0.955283010	5	2	2 188	(k5 a7 b1 b6 b7)		0.929690438	2	1	18 162	(k5 a6)	
0.954173030	6	1	3 43	(k5 k7 a2 a7 b1 b7)		0.929484925	4	1	21 172	(k5 a2 a7 b1)	
0.952794986	7	1	7 72	(k1 k2 a2 a6 a7 a8 b1)		0.929452696	5	1	3 16	(k2 k3 k4 k5 k9)	
0.952046584	6	2	3 96	(a2 a6 a7 b1 b2 b7)		0.927754113	2	1	9 66	(k7 a8)	
0.951547296	4	1	3 84	(k1 k2 k7 b3)		0.927371791	3	1	5 110	(k5 a6 b2)	
0.950165898	11	1	2 68	(k1 k12 k2 k3 a2 a6 a7 a8 b1 b2 b7)		0.926257065	6	1	3 48	(k5 a2 a7 a8 b1 b2)	
0.949658919	8	1	2 60	(k1 k12 k2 k3 a8 b2 b3 b7)		0.926236185	3	1	60 195	(a6 a7 b1)	HPC_LK+KM16
0.949269604	10	1	3 90	(k1 k12 k2 k3 a2 a6 a7 a8 b1 b2)		0.924428320	6	1	2 66	(k5 a7 b1 b2 b3 b7)	
0.949203507	3	1	7 56	(a2 b3 b7)		0.924312433	7	1	1 209	(k5 a2 a7 b1 b2 b3 b7)	
0.948882011	9	1	4 155	(k1 k12 k2 k3 a2 a7 a8 b1 b2)		0.924312433	7	1	1 50	(k5 k7 a2 a7 a8 b1 b2)	
0.948801998	3	1	3 129	(k7 a8 b3)		0.924312433	7	1	1 41	(k5 a2 a6 a7 a8 b1 b2)	
0.948463631	7	1	2 65	(k1 k12 k2 k3 k5 a8 b3)		0.924312433	7	1	1 205	(k1 k2 k4 k9 a6 b6 b7)	
0.948463631	7	1	2 51	(k5 a2 a6 a7 b1 b3 b7)	HPC_LK+KM13	0.924081156	4	1	3 55	(k5 b2 b3 b7)	
0.948325162	6	1	5 53	(a2 a6 a7 a8 b1 b2)		0.922899504	2	1	7 186	(k4 a6)	
0.947570874	2	2	3 203	(a2 b6)		0.918963718	6	1	1 146	(a2 a6 a7 b1 b2 b6)	
0.947530208	3	1	8 18	(k12 a8 b2)		0.918963718	6	1	1 200	(k12 k3 k9 a6 a7 b1)	
0.947452769	2	1	11 180	(a6 a8)		0.918963718	6	1	1 49	(k12 k3 k7 b2 b3 b7)	
0.947207528	13	1	1 159	(k1 k12 k2 k3 k5 k7 a2 a6 a7 a8 b1 b3 b7)	HPC_LK+KM14	0.918046801	3	1	2 191	(k7 a8 b2)	
0.947207528	13	1	1 171	(k1 k12 k2 k3 k4 a2 a6 a7 a8 b1 b2 b3 b7)		0.916900496	4	1	2 208	(a6 a7 b1 b6)	
0.947020496	3	1	14 196	(k1 k2 a6)		0.915899410	2	1	5 198	(k4 k7)	
0.946702330	6	1	2 191	(k4 a2 a7 b1 b3 b7)		0.913635012	3	1	2 117	(k7 b2 b3)	
0.946702330	6	1	2 45	(k7 a2 a6 a7 b1 b3)		0.912565628	5	1	1 193	(k4 k5 k7 k9 a6)	
0.945546243	3	2	2 15	(k1 k5 b2)		0.912565628	5	1	1 206	(k12 k3 k9 a2 b2)	
0.945230398	5	1	7 81	(k1 k2 a2 a6 b2)		0.912565628	5	1	1 206	(k5 a7 a8 b1 b6)	
0.944499440	3	1	7 194	(k12 k3 b3)		0.904591493	4	1	1 75	(k4 k7 b2 b6)	
0.944304319	6	1	3 52	(k1 k12 k2 k3 b2 b3)		0.894057698	3	1	1 127	(k4 k7 b3)	
0.944244761	5	1	2 199	(k1 k12 k2 k7 a8)		0.894057698	3	1	1 138	(a6 a8 b6)	
0.944244761	5	1	2 43	(k1 k2 a6 b2 b3)		0.894057698	3	1	1 196	(a8 b2 b6)	
0.943803257	4	1	3 18	(k1 k2 k3 k9)		0.894057698	3	1	1 197	(k9 a8 b2)	

Alle für das intertissue-Klonkollektiv von Patient 1 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zur Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl der intertissue-HPCs: 108. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen würde (vgl. Kommentare).

Die HPCs HPC_LK+KM13, HPC_LK+KM14 und HPC_LK+KM15 mit zwei, einer und einer Mutation beinhalteten jeweils LK- und KM-Klone. HPC_LK+KM13 und HPC_LK+KM14 wurden dem LK-Kompartiment zugeordnet, da sie bezüglich ihrer Klongruppe mehr LK-Klone, als KM-Klone auf sich vereinten. Dabei war HPC_LK+KM14 mit einer Mutation der wahrscheinlichste Vorläufer von HPC_LK+KM4 mit 17 Mutationen. Damit wurde ein zwischen diesen beiden Klonen liegendes Migrationsereignis postuliert. Auch wurde damit für die Entwicklung von Klon k4, dessen wahrscheinlichster HPC der HPC_LK+KM14 war, Migration postuliert. Ferner war HPC_LK+KM14 identisch zu HPC_LK10. Da der LK-Klon b4 die früheste Manifestation der gesamten FL-Population von Patient 1 darstellte, wurde er als Ursprungsklon aller LK-, KM-Klone und HPCs betrachtet. Folglich wurden relativ frühe Migrationsereignisse vom LK- in das KM-Kompartiment postuliert, sowie dazu relativ spätere, bidirektionale Migrationsereignisse. (vgl. *Abb. 20 und 21*)

5.2.1.3 Interkompartimentäre Tumorzellevolution

Im Sinne einer Synthese der Ergebnissen der gewebespezifischen und der „inter-tissue“ Analyse wurde für die Klone b6, a8, und k5 eine Entwicklung über Migrationsprozesse bestimmt, da sie wahrscheinlicher war, als die gewebespezifische Evolution. Für den Klon k4 hingegen war eine KM-residente Evolution das wahrscheinlichere Szenario (vgl. *Abb. 22*).

Abb. 22 – Wahrscheinlichkeitsabwägung, Patient 1, FL^o2

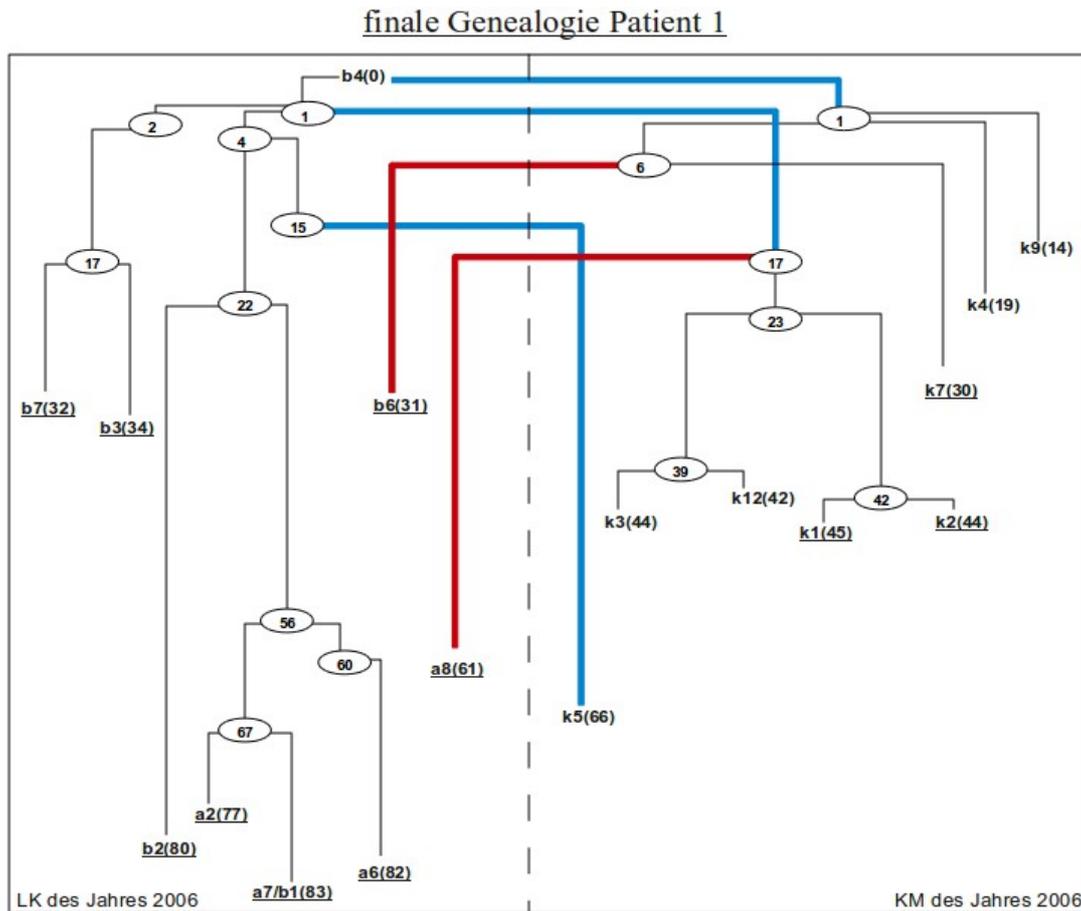
Klon	pm(HPC_LK+KM)	pm(HPC_LK)	pm(HPC_KM)
k4	0.947207528 (HPC_LK+KM14)		0.954841604 (HPC_KM7)
b6	0.968692199 (HPC_LK+KM10)	0.962002675 (HPC_LK9)	
a8	0.989239843 (HPC_LK+KM4)	0.981687540 (HPC_LK4)	
k5	0.991025389 (HPC_LK+KM3)		0.965505424 (HPC_KM5)

Gemessen am Vergleich der „pm“-Werte des jeweils wahrscheinlichsten gewebespezifischen und „inter-tissue“ HPCs der migrationsrelevanten Klone wurde die Entwicklung per Migrationsereignis beibehalten oder verworfen. Für Klon k4 wurde die Migration verworfen, da der Wert von pm(HPC_KM7) größer war, als derjenige von pm(HPC_LK+KM), für die Klone b6, a8 und k5 wurde sie beibehalten da der pm-Wert des intertissue-HPCs höher war, als der des gewebespezifischen HPCs.

Für k4 besaß HPC_KM7 einen höheren „pm“-Wert, als sein wahrscheinlichster HPC im „inter-tissue“ Stammbaum, der HPC_LK+KM14. Für die Klone b6, a8 und k5 war das Gegenteil der Fall.

Demzufolge wurden in der endgültigen Genealogie der Tumorzellentwicklung von Patient 1 alle „inter-tissue“-HPCs der wahrscheinlicher durch Migration entstandenen Klone beibehalten. Ansonsten wurden die HPCs aus den gewebespezifischen Darstellungen verwendet. (vgl. Abb. 23)

Abb. 23 – endgültige Tumorzellevolution, Patient 1, FL^o2

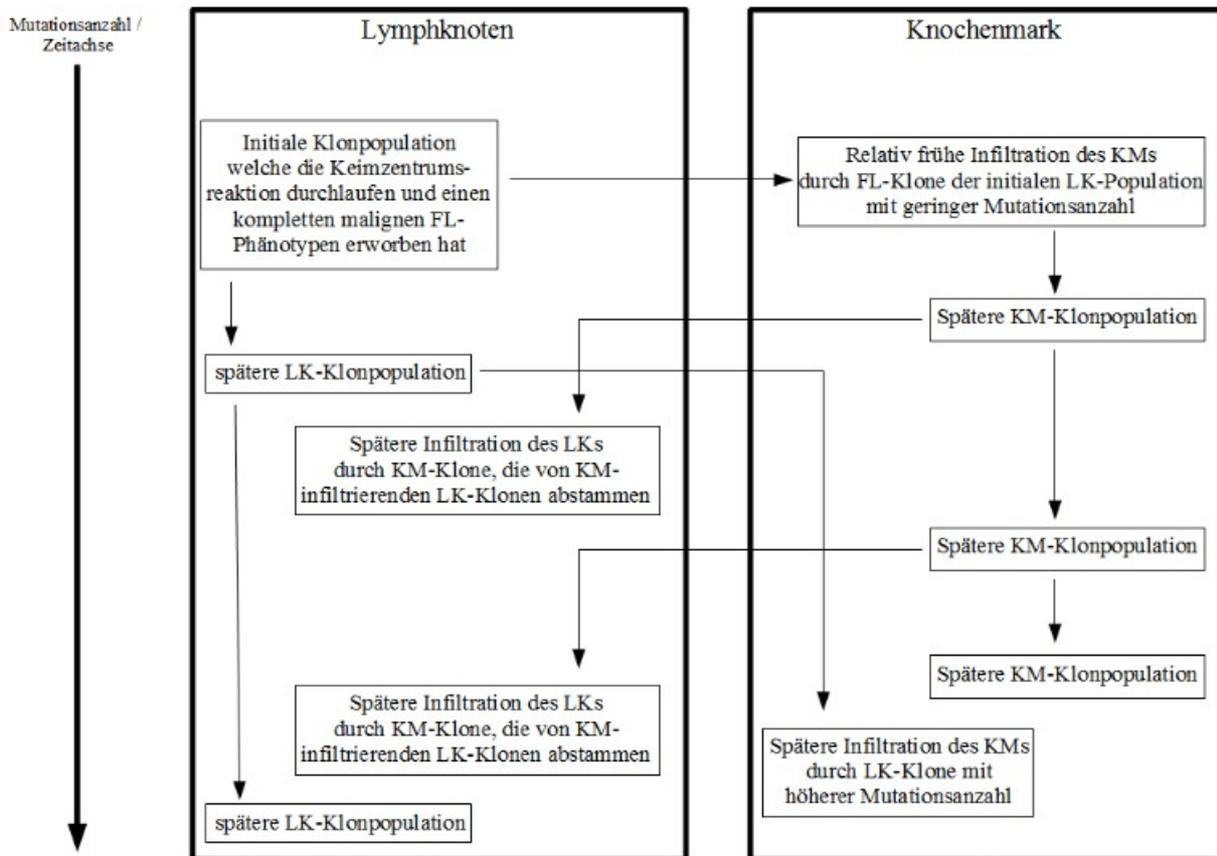


5.2.1.4 Zusammenfassung

Somit lässt sich zusammenfassend schließen, dass das KM von Patientin 1 sehr früh (entsprechend der Interpretation der Mutationslast als Korrelat der zeitlichen Entwicklung) im Verlauf der FL-Erkrankung durch LK-residente FL-Klone infiltriert wurde. Zusätzlich wurde ein relativ dazu später erfolgtes Infiltrationsereignis des KMs durch LK-Klone nachgewiesen. Auch KM-Klone waren im Stande den LK zu infiltrieren. Allerdings fanden solche Migrationsprozesse später statt, als die initialen Infiltrationen des KMs durch LK-Klone. Ferner leiteten sich die den LK infiltrierenden KM-Klone von LK-Klonen ab, die zuvor das KM infiltrierten. Damit befanden sich die FL-Klone des LKs und des KMs in bidirektionalem Austausch, wobei die Bewegungen zeitlich gerichtet

waren. Auch entstand der komplette maligne Phänotyp des FLs von Patientin 1, gemessen an der ermittelten Tumorzellevolution, im LK. Dieser Umstand wurde durch den unmutierten Klon b4 repräsentiert, der die früheste Manifestation des FLs innerhalb der gesamten Klonpopulation darstellte. (vgl. Abb. 24)

Abb. 24 – Zusammenschau des Modells der FL-Evolution von Patient 1



5.2.2 Patient 2

Die gemeinsame IgV_H-Familie der gesamten Klonpopulation war IGHV3-23*01. Die amplifizierten V_HDJ_H-Rearrangements waren im FR1 362 Basenpaare (bp) und im FR2 242 bp lang. Die durchschnittliche Mutationsrate der sechs LK-Klone betrug im FR1 10,5% und im FR2 12,4%. Für die 14 KM-Klone betrug sie 13,6% (FR2). Die LK-Sequenzen beinhalteten im FR2 zwei identische Klone, a1 und a6, die sich allerdings in ihrer FR1 Sequenz unterschieden. In der Sequenzpopulation des KMs, als auch im Vergleich der LK- mit den KM-Klonen, wurden keine weiteren identischen Mutationsmuster gefunden.

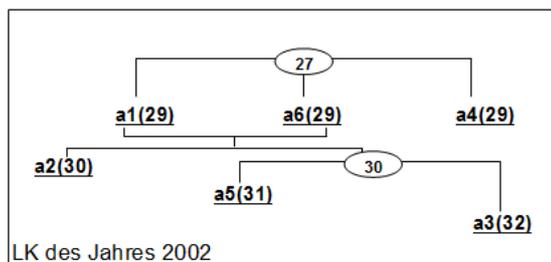
5.2.2.1 Gewebespezifische Tumorzellevolution

Die LK-Population umfasste sechs Klone. Die Mutationsmuster von a1 und a6 waren in allen stärker mutierten Klonsequenzen der LK-Population enthalten. Alle LK-Klone besaßen 27 gemeinsame Mutationen, die durch den wahrscheinlichsten HPC der LK-Population, HPC_LK1 mit 27 Mutationen dargestellt wurden. Der zweitwahrscheinlichste HPC_LK2 war identisch zu den Klonen a1 und a6 (FR2). Damit zweigte der Klon a4 bereits auf der Ebene von HPC_LK1 ab. Ferner wurden durch den dritten HPC, HPC_LK3 mit 30 Mutationen, die Klone a5 und a3 zueinander in Beziehung gesetzt. Folglich wurden die drei für diese LK-Population bestimmten HPCs zur Rekonstruktion der LK-Evolution eingeführt. (vgl. Abb. 25 und 26)

Unter den 14 KM-Klonen konnte das Mutationsmuster von k2 direkt in das von k6 übertragen werden. Weitere direkte Übergänge lagen nicht vor. Alle KM-Klone hatten 22 identische Mutationen gemeinsam, was durch den wahrscheinlichsten HPC, HPC_KM1, repräsentiert wurde. Vier weitere HPCs waren notwendig, um die Evolution der KM-Klone darzustellen. Der zweitwahrscheinlichste HPC, HPC_KM2 mit 23 Mutationen, wurde aus der Gruppe von vier HPCs mit gleicher Wahrscheinlichkeit „pm“ ausgewählt, da er im Gegensatz zu den anderen drei HPCs dieser „Vierergruppe“ die Klone k8, k2 und k14 umfasste, die im nächstwahrscheinlichen HPC, HPC_KM3 mit 24 Mutationen enthalten waren. Ferner wurden HPC_KM4 mit 27 und HPC_KM5 mit 28 Mutationen aus der Gesamtheit von 18 KM-spezifischen HPCs verwendet. (vgl. Abb. 25 und 27)

Abb. 25 – gewebespezifische Tumorzellevolution, Patient 2, FL^o1

Lymphknotengenealogie Patient 2



Knochenmarksgenealogie Patient 2

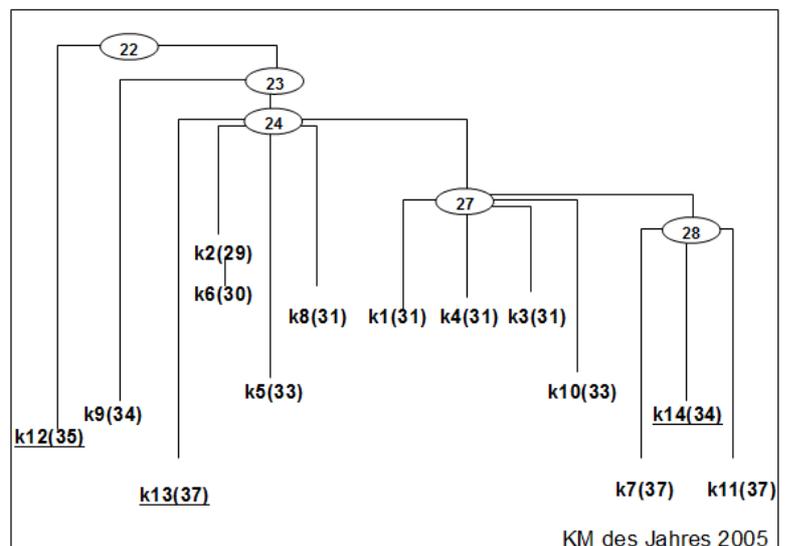


Abb. 26 – „pm“-Hierarchie der LK-HPCs, Patient 2, FL^o1

Anzahl sequenzierter LK-Klone t: 6

pm	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	6	27	27	104	(a1 a2 a3 a4 a5 a6)	HPC_LK1
0.996861460	5	2	29	61	(=a1=a6 in FR2) (a1 a2 a3 a5 a6)	HPC_LK2
0.990292390	2	1	30	180	(a3 a5)	HPC_LK3

Auflistung der drei LK-HPCs von Patient 2 mit Eingabeparametern für die Formel zur Berechnung von pm, einem exemplarischen Locus einer gemeinsamen Mutation zur Bestimmung der Klongruppe, der HPC-definierenden Klongruppen selbst und einem Namen, geordnet nach abnehmendem pm-Wert.

Abb. 27 – „pm“-Hierarchie der KM-HPCs, Patient 2, FL^o1

Anzahl sequenzierter KM-Klone t: 14

pm	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	14	22	22	172	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	HPC_KM1
0.998390254	13	1	23	61	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	
0.998390254	13	1	23	207	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	
0.998390254	13	1	23	162	(k1 k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	
0.998390254	13	1	23	83	(k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	HPC_KM2
					(ausgewählt, da k12 auch im nächsten HPC nicht enthalten ist, k8, k2 k14 aber schon)	
0.996834761	12	1	24	82	(k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8)	HPC_KM3
0.996113791	11	1	25	41	(k1 k10 k11 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	
					(verworfen, da k9 in HPC_KM3 nicht mehr enthalten war)	
0.996074069	9	1	25	9	(k10 k11 k12 k13 k2 k3 k5 k6 k9)	
					(verworfen, da k9 in HPC_KM3 nicht mehr enthalten war)	
0.996074069	9	1	25	16	(k1 k10 k13 k14 k3 k4 k5 k8 k9)	
					(verworfen, da k9 in HPC_KM3 nicht mehr enthalten war)	
0.996011853	7	1	24	129	(k12 k13 k2 k5 k6 k8 k9)	
					(verworfen, da k9 in HPC_KM3 nicht mehr enthalten war)	
0.994976559	6	1	27	130	(k1 k10 k11 k14 k3 k7)	HPC_KM4
0.994366030	3	1	26	18	(k12 k7 k9)	
					(verworfen, da k12 und k9 in HPC_KM4 nicht mehr enthalten waren)	
0.993923350	2	4	32	31	(k13 k14)	
					(verworfen, da k13 in HPC_KM4 nicht mehr enthalten war)	
0.993218771	3	1	27	190	(k11 k12 k9)	
					(verworfen, da k12 und k9 in HPC_KM4 nicht mehr enthalten waren)	
0.992973431	3	1	27	18	(k13 k14 k8)	
					(verworfen, da k8 und k13 in HPC_KM4 nicht mehr enthalten waren)	
0.992785142	3	1	29	13	(k11 k5 k9)	
					(verworfen, da k5 und k9 in HPC_KM4 nicht mehr enthalten waren)	
0.991806910	3	1	28	80	(k11 k14 k7)	HPC_KM5
0.989489587	2	1	27	17	(k12 k7)	
					(verworfen, da k12 in HPC_KM5 nicht mehr enthalten war)	

Auflistung der 18 KM-HPCs von Patient 2 mit Eingabeparametern für die Formel zur Berechnung von pm, einem exemplarischen Locus einer gemeinsamen Mutation zur Bestimmung der Klongruppe, der HPC-definierenden Klongruppen selbst und der Namen der verwendeten HPCs, geordnet nach abnehmendem pm-Wert. Die roten HPCs ohne Namen wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen mit größerem pm-Wert durch sie unterlaufen wurde (siehe angedeutete Kommentare).

5.2.2.2 Migrationsanalyse

Im ermittelten „inter-tissue“-Stammbaum, der alle FL-Klone von Patient 2 umfasste, war der

HPC_LK+KM1 mit 20 Mutationen der wahrscheinlichste HPC. Aus ihm entwickelten sich in dieser Darstellung alle LK- und KM-Klone. Da das LK-Gewebe aus dem prätherapeutischen und das KM-Gewebe aus dem posttherapeutischen Intervall des FLs stammte, wurde dieser HPC, der die früheste Manifestation des FLs von Patientin 2 repräsentierte, dem LK-Kompartiment zugeordnet. Der HPC_LK+KM2 mit 21 Mutationen wurde aus der „Dreiergruppe“ von HPCs mit der gleichen Wahrscheinlichkeit „pm“ als nächster HPC ausgewählt, da nur er die Klone k2 und k14 beinhaltetete, die im nächstwahrscheinlichen HPC, dem HPC_LK+KM3, enthalten waren. Analog dazu wurden zwei weitere HPCs aus der Gesamtheit der 24 HPCs des „inter-tissue“-Stammbaums ausgewählt. Dies waren HPC_LK+KM4 mit 25 und HPC_LK+KM5 mit 27 Mutationen. Damit wurden in der „inter-tissue“-Darstellung zwei Migrationsereignisse postuliert, ein initiales vom LK in das KM und ein relativ dazu später ablaufendes, was die LK-Population in zwei Gruppen aufteilte. Dies waren der Klon a4, der sich LK-resident entwickelte und die übrigen LK-Klone, die sich aus dem KM ableiteten (bzgl. des aus der zeitlichen Relation der LK- und KM-Population erwachsenden scheinbar bestehenden Widerspruchs der Entwicklung eines Teils der LK-Klone von 2002 aus dem KM von 2005 vgl. weitere Ausführungen). Die gesamte KM-Population leitete sich von einem HPC, HPCLK+KM2 ab, der sich wiederum aus dem LK ableitete. (vgl. Abb. 28 und 29)

Abb. 28 – gewebeübergreifende Tumorzellevolution, Patient 2, FL⁰¹

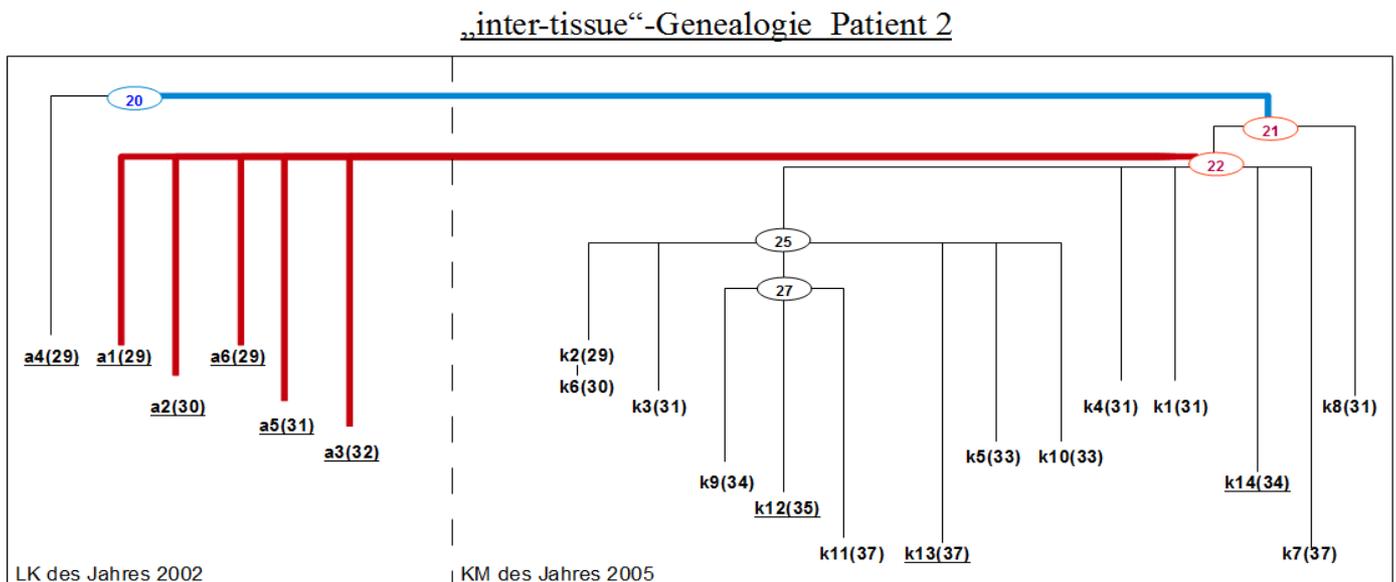


Abb. 29 – „pm“-Hierarchie der LK+KM-HPCs, Patient 2, FL⁰1

Anzahl sequenzierter LK+KM-Klone t: 20

pm	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	20	20	20	72	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	HPC_LK+KM1
0.998779477	19	1	21	162	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	
(verworfen, da Klon k14, der in HPC_LK+KM3 enthalten ist, hier nicht enthalten ist)						
0.998779477	19	1	21	207	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	
(verworfen, da Klon k2, der in HPC_LK+KM3 enthalten ist, hier nicht enthalten ist)						
0.998779477	19	1	21	65	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a5 a6)	HPC_LK+KM2
0.997629272	18	1	22	61	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a5 a6)	HPC_LK+KM3
0.997354361	14	1	22	232	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	
(verworfen, da k8 in HPC_LK+KM3 nicht enthalten)						
0.997264678	13	1	22	129	(k8 k12 k13 k2 k5 k6 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	
(verworfen, da k8 in HPC_LK+KM3 nicht enthalten)						
0.996854665	8	2	23	44	(k13 k14 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	
(verworfen, da a4 in HPC_LK+KM3 nicht enthalten)						
0.996245617	7	2	25	84	(k12 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	
(verworfen, da a4 in HPC_LK+KM3 nicht enthalten)						
0.995466541	9	1	25	9	(k10 k11 k12 k13 k2 k3 k5 k6 k9)	HPC_LK+KM4
0.995451944	13	1	23	83	(k8 k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	
0.994644658	3	1	26	18	(k12 k7 k9)	
0.994621201	2	1	25	177	(k11 a3)	
0.994387303	9	1	25	16	(k8 k1 k10 k13 k14 k3 k4 k5 k9)	
0.994066149	11	1	25	41	(k8 k1 k10 k11 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	
0.993771438	12	1	24	82	(k8 k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7)	
0.993330480	6	1	27	130	(k1 k10 k11 k14 k3 k4 k5 k6 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	
0.993209287	3	1	27	190	(k11 k12 k9)	HPC_LK+KM5
0.991719981	3	1	29	13	(k11 k5 k9)	
0.991606417	3	1	27	18	(k8 k13 k14)	
0.991288488	2	2	32	21	(k13 k14)	
0.991269043	3	1	28	180	(k13 a3 a5)	
0.990900142	3	1	28	80	(k11 k14 k7)	
0.990656748	2	1	27	17	(k12 k7)	

Aufzistung der 24 intertissue-HPCs von Patient 2 mit Eingabeparametern für die Formel zur Berechnung von pm, eines exemplarischen Locus einer gemeinsamen Mutation zur Bestimmung der Klongruppe, der HPC-definierenden Klongruppen selbst und der Namen der verwendeten HPCs, geordnet nach abnehmendem pm-Wert. Die roten HPCs ohne Namen wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen mit größerem pm-Wert durch sie unterlaufen wurde (siehe ange deutete Kommentare).

5.2.2.3 Interkompartimentäre Tumorzellevolution

Aus der „inter-tissue“-Darstellung folgte, dass die LK-Klone a1, a2, a3, a5 und a6 möglicherweise aus Migrationsprozessen vom KM in den LK resultierten und nicht durch eine LK-residente Entwicklung. Im Vergleich der „pm“-Wahrscheinlichkeitswerte ihrer gewebespezifischen und „inter-tissue“ HPCs folgte, dass für die Klone a2, a3 und a5 die Entwicklung aus dem KM heraus wahrscheinlicher war, als die LK-residente Evolution. Für die Klone a1 und a6, war das Gegenteil gegeben. (vgl. Abb. 30)

Abb. 30 – Wahrscheinlichkeitsabwägung, Patient 2, FL⁰¹

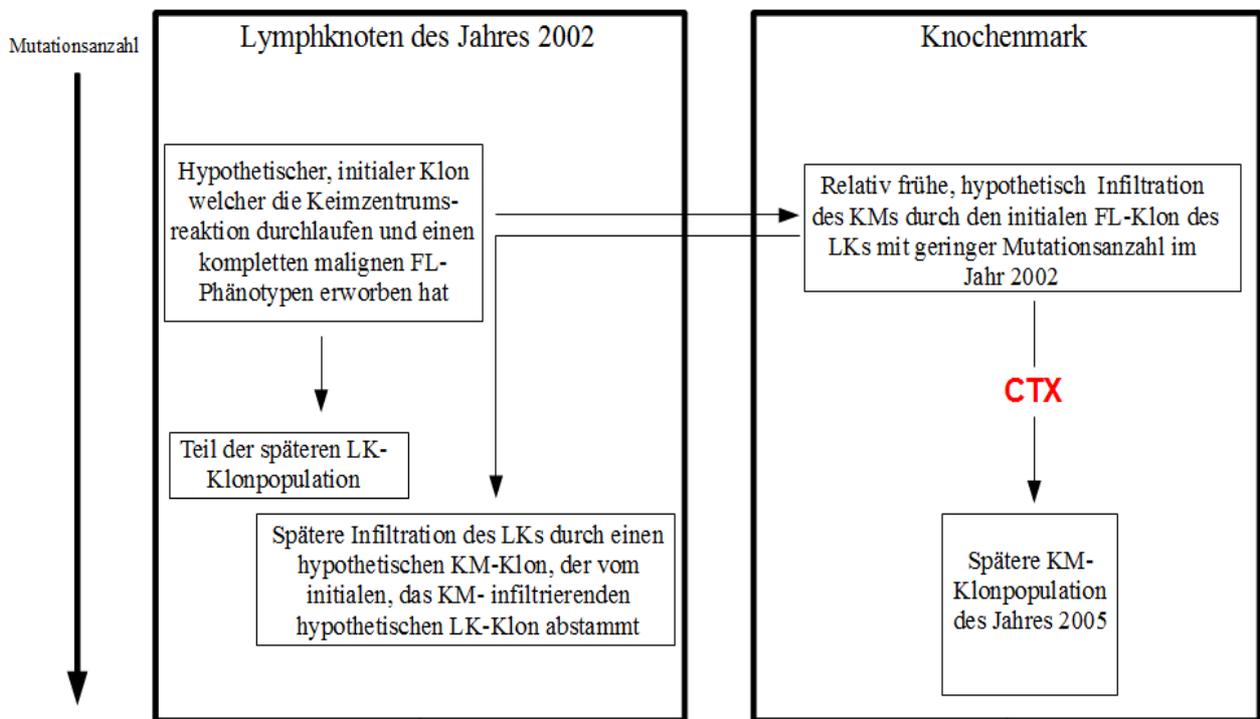
Klon	pm(HPC inter-tissue)	pm(HPC LK)
a1	0.997629272 (HPC_LK+KM3)	1.000000000 (HPC_LK1)
a6	0.997629272 (HPC_LK+KM3)	1.000000000 (HPC_LK1)
a2	0.997629272 (HPC_LK+KM3)	0.996861460 (HPC_LK2)
a3	0.997629272 (HPC_LK+KM3)	0.990292390 (HPC_LK3)
a5	0.997629272 (HPC_LK+KM3)	0.990292390 (HPC_LK3)

Gemessen am Vergleich der „pm“-Werte des jeweils wahrscheinlichsten gewebespezifischen und „inter-tissue“ HPCs der migrationsrelevanten LK-Klone wurde die Entwicklung per Migrationsereignis beibehalten oder verworfen. Für Klon a1 und a6 wurde die Migration verworfen, da der Wert von pm(HPC_LK1) größer war, als derjenige von pm(HPC_LK+KM3), für die Klone b6, a8 und k5 wurde sie beibehalten da der pm-Wert des intertissue-HPCs höher war, als der des gewebespezifischen HPCs.

Da das KM im Vergleich zum LK erst im Jahr 2005 und posttherapeutisch entnommen wurde, aber dennoch einige Klone der LK- und der KM-Population in wahrscheinlicherer klonaler „inter-tissue“-Beziehungen zueinander standen, als zu den Klonen ihres Gewebes, wurde eine KM-Persistenz von aus dem LK stammenden, frühzeitig das KM-infiltrierenden und im KM die CTX überdauernden FL-Klonen als Erklärung angenommen. Mit diesem Modell der wahrscheinlichsten klonalen Beziehungen des „inter-tissue Stammbaumes“ ließ sich die scheinbare zeitlich inkongruente Zweiteilung der LK-Population des Jahres 2002 in Beziehungen zu den FL-Klonen des Jahres 2005 erklären. (vgl. Abb. 31)

Damit teilte sich das LK-Klonkollektiv in Zusammenschau und Abwägung der aus der gewebespezifischen und gewebeübergreifenden Darstellung gewonnenen Information in Klone auf, die sich rein LK-resident entwickelten und Klone, die sich aus KM-Vorläuferklonen ableiteten. Da das LK-Gewebe prätherapeutisch im Jahre 2002 und das KM-Gewebe posttherapeutisch im Jahr 2005 gewonnen wurde, verbot sich zunächst aufgrund der zeitlichen Verhältnisse ein Migrationspostulat vom KM in den LK. Da sich allerdings die LK-Population wie geschildert unterteilen ließ, erschien es folgerichtig, im KM zwei relativ zueinander zeitlich getrennte Gruppen zu unterscheiden. Dies waren der HPC_LK+KM2 und HPC_LK+KM3 mit 21 und 22 Mutationen, die wegen ihrer direkten Assoziation zu LK-Klonen bereits im Jahr 2002 im KM vorhanden sein

Abb. 32 – Zusammenschau des Modells der FL-Evolution von Patient 2



5.2.3 Patient 3

Die gemeinsame IgV_H-Familie aller Klone war IGHV3-15*02. Es lagen lediglich FFPE Gewebe und damit nur FR2-Sequenzen vor. Die V_HDJ_H-Rearrangements waren 232 bp lang. Die Gewebe von Patient 3 stammten aus verschiedenen Jahren und repräsentierten damit Auszüge des Krankheitsverlaufs, nämlich des Primarius sowie des ersten und des zweiten Rezidivs. Zwei der LK-Sequenzen aus dem prätherapeutischen LK-Gewebe, Klon m1 und m4, zeigten das identische Mutationsmuster. Weitere Klone aus dem posttherapeutischen KM-Gewebe, s1 und s5 einerseits sowie s3 und s7 des Jahres 2007 andererseits wiesen ebenfalls identische Mutationsmuster auf. Der Vergleich der LK- und KM-Populationen ergab, dass die Sequenz des LK-Klons m2 der prätherapeutischen LK-Population identisch zur Sequenz des KM-Klons x3 der KM-Population der Biopsie des ersten Rezidivs (Jahres 2006) war. Weitere identische Mutationsmuster wurden nicht gefunden. Die durchschnittlichen Mutationsraten der LK-Klone lagen zwischen 2,2 und 7,3%, die der KM-Klone zwischen 2,2 und 10,3%. (vgl. Abb. 16)

5.2.3.1 Gewebespezifische Tumorzellevolution

LK 2004:

Die prätherapeutische LK-Population umfasste elf sequenzierte Klone. Das Mutationsmuster von Klon m2 war in den andern Klonen enthalten. Der wahrscheinlichste HPC entsprach damit m2. Es wurden drei weitere HPCs aus der Gesamtheit von zehn HPCs in die LK-Population des Jahres 2004 eingeführt. (vgl. Abb. 33 und Abb. 34)

Abb. 33 – gewebespezifische Tumorzellevolution LK 2004, Patient 3, FL^o1

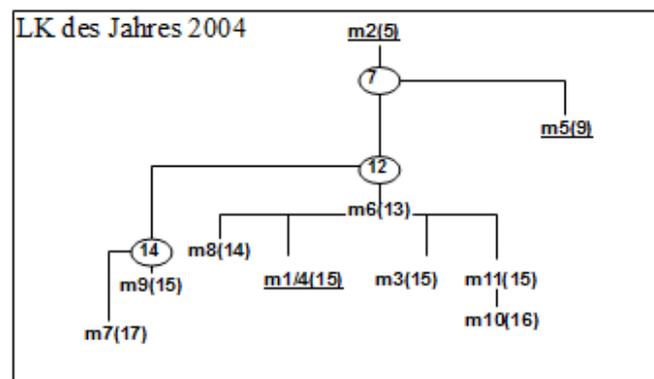


Abb. 34 – „pm“-Hierarchie der LK-HPCs 2004, Patient 3, FL^o1

Anzahl sequenzierter Klone: 11

pm LK 2004	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	11	5	5	136	(=m2)(m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	HPC_LK1_2004
0.993388763	9	5	12	145	(m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	HPC_LK2_2004
0.993215251	10	2	7	53	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	HPC_LK3_2004
0.984217308	8	1	8	18	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)	
					(nicht verwendet, da m2 und m9 in HPC_LK2_2004 noch enthalten)	
0.979015847	4	1	13	16	(m10 m11 m7 m9)	
					(nicht verwendet, da m6 in m11 und m10 überführbar ist)	
0.978450620	5	1	13	9	(m1 m10 m3 m4 m7)	
					(nicht verwendet, da m11 in m10 und m10 überführbar und m6 in m3 m1 m4)	
0.977948899	2	1	13	13	(m7 m8)	
					(nicht verwendet, da m6 in m8 überführbar ist)	
0.977921971	3	1	9	221	(=m5)(m10 m11 m5)	
0.974290904	3	1	14	221	(m1 m4 m7)	
					(nicht verwendet, da m6 in m1 und m4 überführbar ist)	
0.972455583	2	1	14	18	(m7 m9)	HPC_LK4_2004

Alle für das LK-Klonkollektiv des Jahres 2004 von Patient 3 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zu Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl der dieser HPCs: 10. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde (siehe angedeutete Kommentare).

LK 2007:

Die LK-Population des zweiten Rezidivs umfasste acht sequenzierte Klone. Unter diesen Klonen wurden keine identischen Mutationsmuster gefunden. Allerdings wurde das Muster von Klon o2 in den stärker mutierten Klonen o4, o1 und o6 übertragen. Der Klon o2 entsprach dabei dem HPC_LK3_2007. Alle Klone dieser LK-Population hatten elf identische Mutationen gemeinsam. Dies wurde durch den wahrscheinlichsten HPC, HPC_LK1_2007, repräsentiert. Ferner wurden zwei weitere HPCs, HPC_LK2_2007 mit 12 Mutationen und HPC, HPC_LK4_2007 mit 14 Mutationen, eingeführt. (vgl. Abb. 35 und Abb. 36)

Abb. 35 – gewebespezifische Tumorzellevolution LK 2007, Patient 3, FL^o1

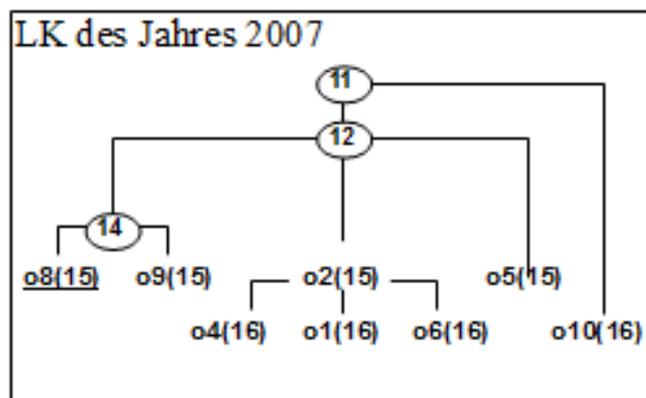


Abb. 36 – „pm“-Hierarchie der LK-HPCs 2007, Patient 3, FL^o1

Anzahl sequenzierter Klone t: 8

pm LK 2007	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	8	11	11	126	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8 o9)	HPC_LK1_2007
0.994451641	7	1	12	21	(o6 o1 o2 o4 o5 o8 o9)	HPC_LK2_2007
0.994451641	7	1	12	18	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8)	(nicht verwendet, da o8 und o9 zusammen gehören)
0.994451641	7	1	12	16	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o9)	(nicht verwendet, da o8 und o9 zusammen gehören)
0.985522602	4	1	15	221	(=o2) (o6 o1 o2 o4)	HPC_LK3_2007
0.985282237	2	2	14	221	(o8 o9)	HPC_LK4_2007

Alle für das LK-Klonkollektiv des Jahres 2007 von Patient 3 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zu Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl der dieser HPCs 6. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde (siehe angedeutete Kommentare).

KM 2004:

Die prätherapeutische KM-Population des Jahres 2004 umfasste neuen sequenzierte Klone. Dabei konnte das Mutationsmuster von Klon n10 in das von Klon n9 überführt werden. Weiter hatten alle neuen KM-Klone 13 identische Mutationen gemeinsam, was mit HPC_KM1_2004 dargestellt wurde. Ferner wurden der HPC_KM2_2004 mit 15 Mutationen und der HPC_KM3_2004 mit 16 Mutationen eingeführt. HPC_KM3_2004 umfasste dabei eine Gruppe aus fünf Klonen, n8, n10, n9, n7 und n3. Zuvor verließen die Klone n4, n5 und n6 auf der Ebene von HPC_KM2_2004 die Hauptgruppe. Der Klon n1 zweigte bereits von HPC_KM1_2004 ab. Damit wurden drei HPCs von insgesamt sechs bestimmten HPCs verwendet, die anderen drei verworfen. (vgl. Abb. 37 und 38)

Abb. 37 – gewebespezifische Tumorzellevolution KM 2004, Patient 3, FL⁰1

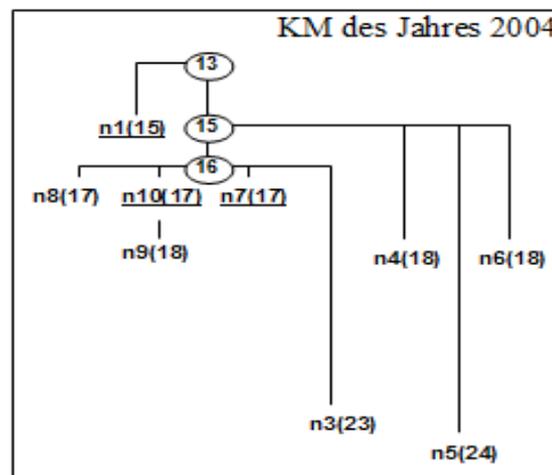


Abb. 38 – „pm“-Hierarchie der KM-HPCs 2004, Patient 3, FL⁰1

Anzahl sequenzierter Klone: 9

pm KM 2004	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	9	13	13	145	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)	HPC_KM1_2004
0.996081596	8	2	15	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)	HPC_KM2_2004
0.992785701	6	1	14	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9)	
(nicht verwendet, da n1 in HPC_KM2_2004 nicht mehr inbegriffen)						
0.989760871	5	1	16	18	(n10 n3 n7 n8 n9)	HPC_KM3_2004
0.989760871	5	1	16	16	(n3 n4 n6 n8 n9)	
(nicht verwendet, da n10 in n9 überführbar, n10 hier aber nicht enthalten)						
0.989158198	4	1	16	9	(n3 n4 n5 n7)	
(nicht verwendet, da n4 und n5 in HPC_KM3 nicht mehr enthalten)						

Alle für das KM-Klonkollektiv des Jahres 2004 von Patient 3 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zu Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl der dieser HPCs: 6. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde (siehe ange deutete Kommentare).

KM 2006:

Die KM-Population des ersten Rezidivs aus dem Jahr 2006 bestand aus neun sequenzierten FL-Klonen. Das Mutationsmuster von Klon x3 war in allen anderen acht KM-Klonen dieser Population enthalten. Der Klon x3 entsprach dabei dem wahrscheinlichsten HPC dieser KM-Population, dem HPC_KM1_2006. Weiter wurde HPC_KM2_2006 mit 11 Mutationen eingeführt, aus dem sich alle weiteren Klone ableiteten, außer x3.

Abb. 39 – gewebespezifische Tumorzellevolution KM 2006, Patient 3, FL⁰¹

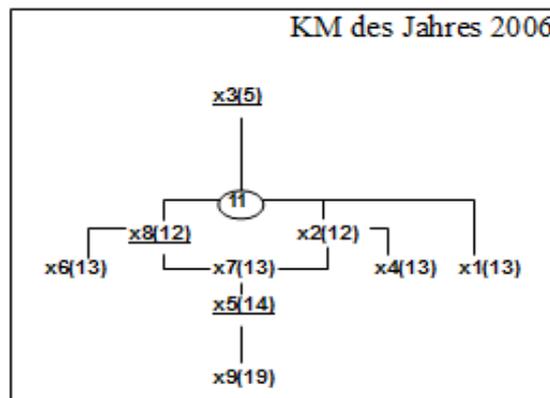


Abb. 40 – „pm“-Hierarchie der KM-HPCs 2006, Patient 3, FL⁰¹

Anzahl sequenzierter Klone: 9

pm KM 2006	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	9	5	5	136	(=x3) (x1 x2 x3 x4 x5 x6 x7 x8 x9)	HPC_KM1_2006
0.994660532	8	6	11	53	(x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9)	HPC_KM2_2006
0.978737511	3	1	12	221	(x1 x5 x9)	
(nicht verwendet, da x7 in x5 überführbar, x5 aber nicht enthalten)						
0.978737511	3	1	12	13	(x1 x6 x9)	
(nicht verwendet, da x5 in x9 überführbar, x5 aber nicht enthalten)						
0.978656322	5	1	12	9	(=x8) (x5 x6 x7 x8 x9)	HPC_KM3_2006
0.978656322	5	1	12	16	(=x2) (x2 x4 x5 x7 x9)	HPC_KM4_2006

Alle für das KM-Klonkollektiv des Jahres 2006 von Patient 3 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zu Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl der dieser HPCs: 6. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde (siehe angedeutete Kommentare).

Die HPCs HPC_KM3_2006 und HPC_KM4_2006 entsprachen den Klonen x8 bzw. x2. Das Mutationsmuster von Klon x8 wurde in die der Klone x6 und x7 überführt, das Mutationsmuster

von Klon x2 in die von Klon x4 und x7. Die Evolutionswege von Klone x7, aus Klon x8 oder aus Klon x2, stellten dabei gleichwertige Alternativen dar, da HPC_KM3_2006 und HPC_KM4_2006 bzw. Klon x8 und x2 die gleiche Wahrscheinlichkeit „pm“ besaßen. Das Mutationsmuster von x7 war ferner in Klon x5 enthalten und dieses wiederum in Klon x9, was sich im Stammbaum in der angegebenen Evolution manifestierte. (vgl. Abb. 39 und 40)

KM 2007:

Die KM-Population des zweiten Rezidivs umfasste zehn sequenzierte Klone. Davon waren jeweils Klon s1 und s5 sowie Klon s3 und s7 identisch. Alle Klone besaßen 11 gemeinsame Mutationen, die das Mutationsmuster des Ursprungs-HPCs dieser Population, HPC_KM1_2007 definierten.

Abb. 41 – gewebespezifische Tumorzellevolution KM 2007, Patient 3, FL^o1

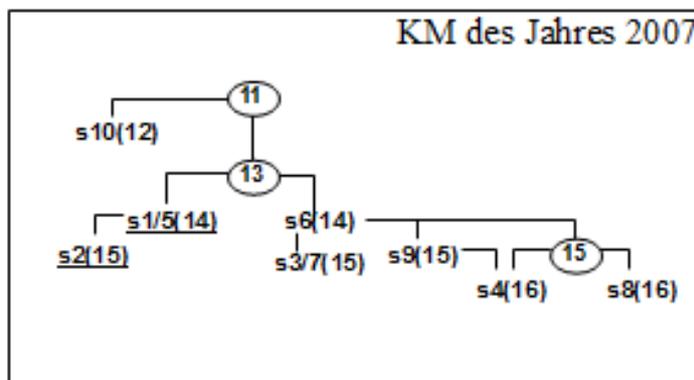


Abb. 42 – „pm“-Hierarchie der KM-HPCs 2007, Patient 3, FL^o1

Anzahl sequenzierter Klone: 10

pm KM 2007	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.00000000	10	11	11	24	(s1 s10 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)	HPC_KM1_2007
0.995955872	9	2	13	53	(s1 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)	HPC_KM2_2007
0.991522379	6	1	12	221	(=s10) (s1 s10 s2 s3 s5 s7)	
0.989745134	6	1	14	16	(=s6) (s3 s4 s6 s7 s8 s9)	HPC_KM3_2007
0.985658133	2	1	14	9	(s2 s8)	
0.982881660	2	1	15	221	(s4 s8)	HPC_KM4_2007
0.982881660	2	1	15	15	(=s9) (s4 s9)	HPC_KM5_2007

Alle für das KM-Klonkollektiv des Jahres 2007 von Patient 3 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zu Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl der dieser HPCs: 7. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde.

Aus der Gesamtheit von sieben bestimmten HPCs für die KM-Klone von 2007 wurden vier weitere in diese Klonpopulation eingeführt. Alle Klone außer Klon s10 leiteten sich von HPC_KM2_2007 mit 13 Mutationen ab. Der nächste ausgewählte HPC, HPC_KM3_2007 mit 14 Mutationen, entsprach dem Klon s6. Dieser Klon war wiederum unmittelbarer Ausgangspunkt für die Evolution von s3, s7, s9, s4 und s8. Dabei entsprach s9 dem HPC_KM5_2007 mit 15 Mutationen. Dieser HPC und der HPC_KM4_2007 besaßen dieselbe Wahrscheinlichkeit „pm“, so dass die Entwicklung von s4 aus HPC_KM4_2007 oder HPC_KM5_2007 gleichwertige Alternativen darstellten. (vgl. *Abb. 41 und 42*)

5.2.3.2 Migrationsanalyse und Tumorzellpersistenz

Der früheste, am geringsten mutierte Klon der gesamten sequenzierten FL-Population von Patient 3 war mit fünf Mutationen der LK-Klon m2 aus dem prätherapeutischen LK-Biopsat des Jahres 2004. Das Mutationsmuster dieses Klons war in allen anderen sequenzierten Klonen und HPCs enthalten. Im KM des ersten Rezidivs aus dem Jahr 2006 wurde mit dem Klon x3 das identische Mutationsmuster wiedergefunden. Darüber hinaus wurden keine weiteren identischen LK- und KM-Klone detektiert.

Im Vergleich der prätherapeutischen LK- und KM-Klone wurden vier „inter-tissue“ HPCs von 14 möglichen HPCs zur Erzeugung des zugehörigen „inter-tissue“-Stammbaumes verwendet. Die HPCs HPC_LK+KM1_2004 und HPC_LK+KM2_2004 mit fünf und sechs Mutationen umfassten alle LK- und alle KM-Klone, HPC_LK+KM3_2004 mit neun Mutationen umfasste zehn der 11 LK- und alle KM-Klone. Der HPC_LK+KM4_2004 mit 13 Mutationen umfasste ausschließlich die aus neuen Klonen bestehende KM-Population und stellte, wie der identische HPC_KM1_2004 im gewebespezifischen Stammbaum, damit die früheste, hypothetische Manifestation des FLs im KM von 2004 dar. Deshalb wurden die HPCs HPC_LK+KM1_2004, HPC_LK+KM2_2004 und HPC_LK+KM3_2004 dem LK zugeordnet. Da diese drei HPCs alle in HPC_LK+KM4_2004 überführt werden konnten, wurde eine prätherapeutische Infiltration des KMs aus dem LK postuliert. Eine frühere Infiltration, als durch HPC_LK+KM3_2004 kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Diesem Umstand wurde durch die gestrichelten Linien Rechnung getragen (vgl. *Abb. 43 und Abb. 44*).

Abb. 43 – Tumorzellevolution LK+KM2004, Patient 3, FL⁰¹

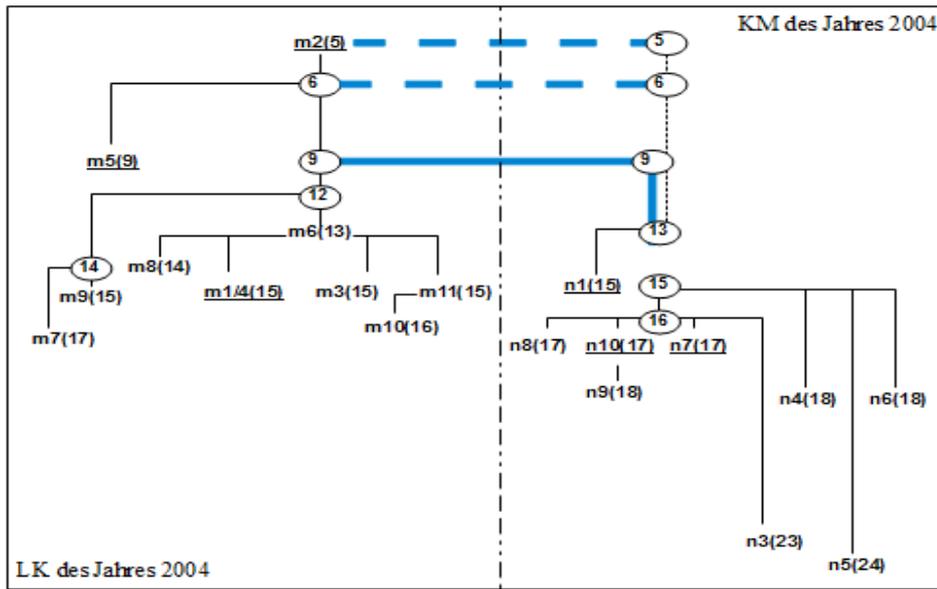


Abb. 44 – „pm“-Hierarchie der LK+KM-HPCs 2004, Patient 3, FL⁰¹

Anzahl sequenzierter Klonet: 20

pm LK+KM 2004	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	20	5	5	48	(=m2) (n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	HPC_LK+KM1_2004
0.995734681	19	1	6	53	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	HPC_LK+KM2_2004
0.995474778	18	3	9	126	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	HPC_LK+KM3_2004
0.994308875	9	4	13	63	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)	HPC_LK+KM4_2004
0.992568049	18	1	7	44	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	
0.990863297	13	1	8	18	(n10 n3 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)	
0.990331357	9	1	10	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 m1 m4 m7)	
0.990092723	9	1	12	9	(n3 n4 n5 n7 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m7)	
0.990092723	9	1	12	16	(n3 n4 n6 n8 n9 m10 m11 m7 m9)	
0.989986822	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	
0.988344503	3	1	12	13	(n3 m7 m8)	
0.985866294	3	1	13	18	(n6 m7 m9)	
0.985666125	17	1	11	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	
0.984780239	3	1	9	221	(=m5) (m10 m11 m5)	

Alle für das inter-tissue-Klonkollektiv des Jahres 2004 von Patient 3 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zu Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl dieser HPCs 14. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde.

Um eine klonale KM-Persistenz, welche sich durch die Detektion des zum initialen LK-Klon m2 identischen KM-Klons x3 des Jahres 2006 andeutete, als eine mögliche Ursache der Rezidive genauer zu untersuchen, wurden die Klonpopulationen der Rezidivgewebe entsprechend ihrer Chronologie graduell hinzugefügt. Dabei zeigte sich, dass durch die Ergänzung des „inter-tissue“-Stammbaums LK+KM2004 um die KM-Population des Jahres 2006, der zum nodalen Klon m2 identische KM-Klon x3 der wahrscheinlichste HPC des neu gebildeten Gesamtkollektivs war und dass HPC_LK+KM3_2004 mit neuen Mutationen als HPC_LK04KM04KM06_2 im KM von 2006

erneut auftrat (vgl. Abb. 45 und Abb. 46).

Abb. 45 – Tumorzellevolution LK04+KM04+KM06, Patient 3, FL^o1

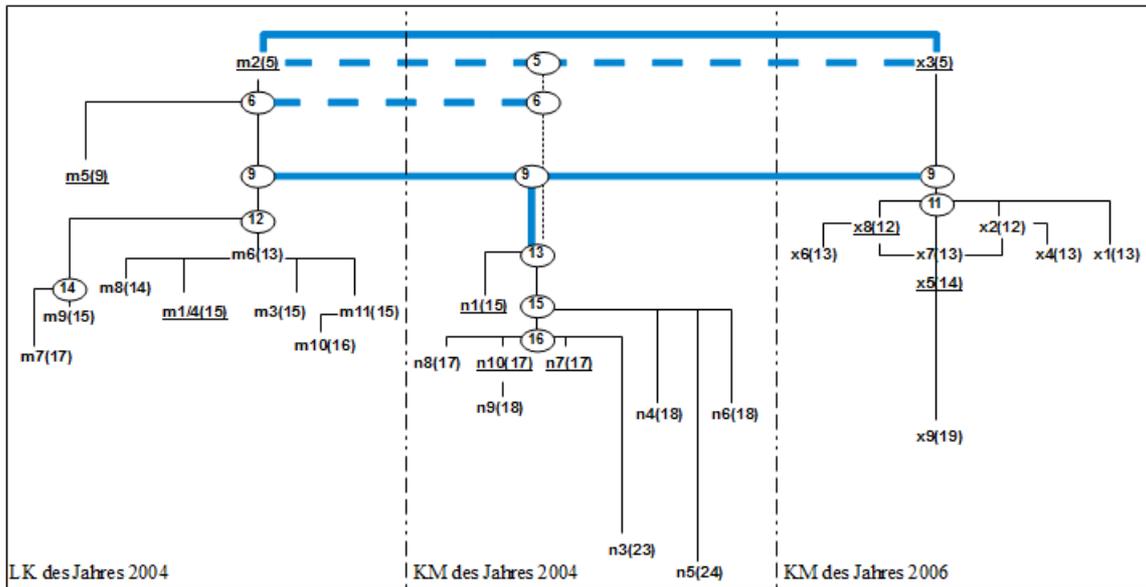


Abb. 46 – „pm“-Hierarchie von LK04+KM04+KM06, Patient 3, FL^o1

Anzahl sequenzierter Klone: 29

pm LK04KM04KM06	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	29	5	5	48	(alle Klone aus LK04, KM04, LK06)	HPC_LK04KM04KM06_1
0.996311847	26	3	9	126	(nicht m2 x3 m5)	HPC_LK04KM04KM06_2
0.996037927	27	1	6	53	(nicht m2 x3)	
(verworfen, da m5 durch HPC_LK04KM04KM06_2 bereist ausgeschlossen)						
0.995359389	9	4	13	57	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)	HPC_LK04KM04KM06_3
0.993568689	26	1	7	44	(nicht n1 m2 x3)	
0.993032282	21	1	8	18	(nicht n1 n4 n5 n6 m2 m7 x3 m9)	
0.992999084	14	1	11	16	(n3 n4 n6 n8 n9 x2 x4 x5 x7 x9 m1 m10 m11 m7 m9)	
0.992999084	14	1	11	9	(n3 n4 n5 n7 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m3 m4 m7)	
0.992906137	12	1	10	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 x1 x5 x9 m1 m4 m7)	
0.992564296	18	1	11	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	
0.992137916	6	1	11	13	(n3 x1 x6 x9 m7 m8)	
0.991495160	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	
0.988719091	3	1	13	18	(n6 m7 m9)	
0.988656942	3	1	9	221	(=m5)(m10 m11 m5)	
0.986646197	2	1	14	37	(n5 x9)	

Alle für das intertissue-Klonkollektiv des LKs von 2004, des KMs von 2004 und des KMs von 2006 von Patient 3 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zu Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl dieser HPCs: 15. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde.

Aus der Erweiterung des gewebeübergreifenden Stammbaums LK04+KM04+KM06 um die KM-

Population des Jahres 2007 folgte als wahrscheinlichster HPC erneut ein zu m2, HPC_LK+KM1_2004 und x3 identischer Klon, der HPC HPC_LK04+KM04+KM06+KM07_1. Ferner trat der Klon HPC_LK04+KM04+KM06+KM07_2 mit acht Mutationen zum ersten Mal im „inter-tissue“-Stammbaum LK04+KM04+KM06+KM07 auf. Dessen Mutationsmuster war in den zuvor wiederholt auftretenden, persistierenden HPCs mit neun Mutationen, HPC_LK+KM3_2004 und HPC_LK04+KM04+KM06_2, inbegriffen. (vgl. Abb. 47 und 48)

Abb. 47 – Tumorzellevolution LK04+KM04+KM06+KM07, Patient 3, FL⁰¹

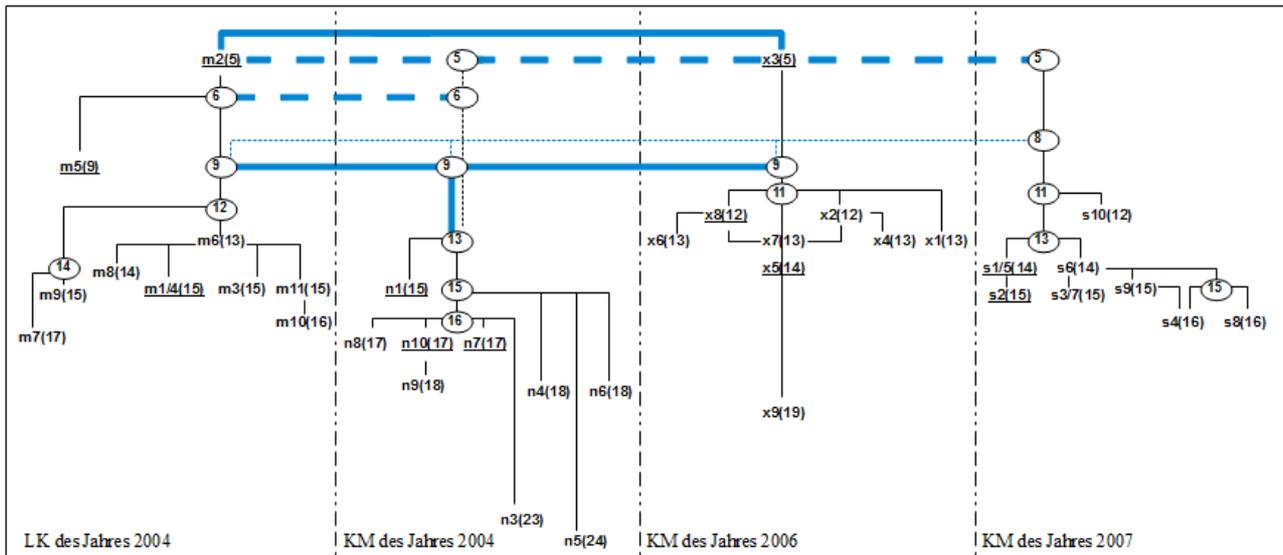


Abb. 48 – „pm“-Hierarchie von LK04+KM04+KM06+KM07, Patient 3, FL⁰¹

Anzahl sequenzierter Klone t: 39

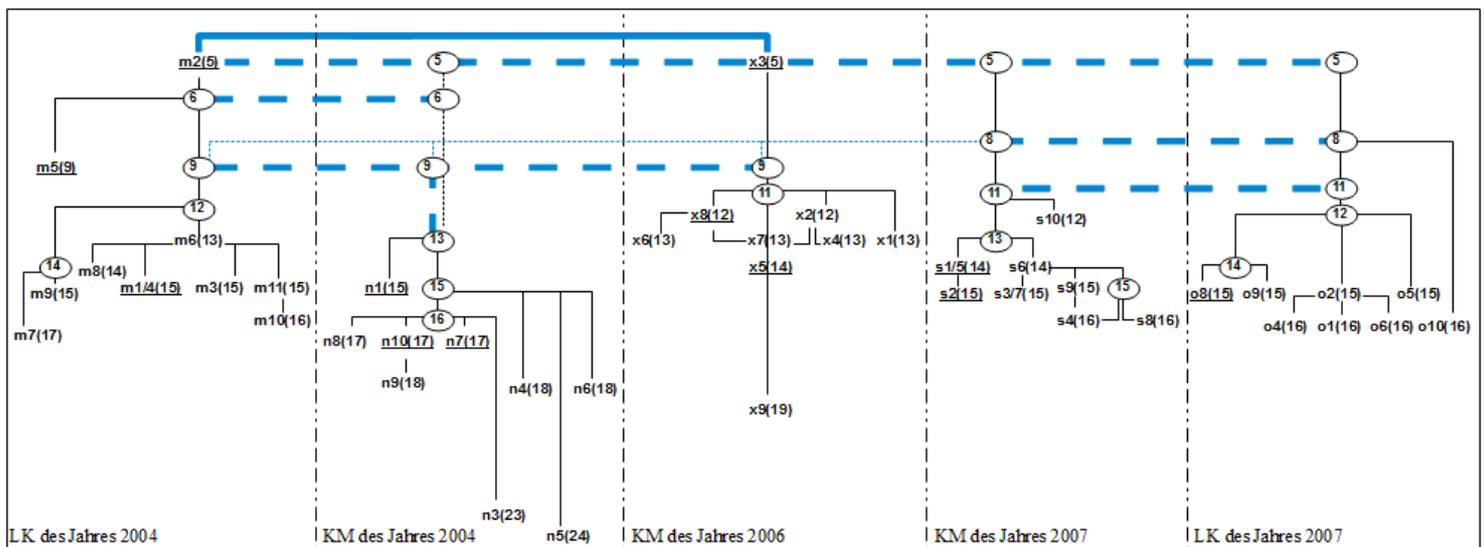
pm LK04KM04KM06KM07	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	39	5	5	129	(alle)	HPC_LK04KM04KM06KM07_1
0.997501791	36	3	8	145	(nicht m2 x3 m5)	HPC_LK04KM04KM06KM07_2
0.996670442	36	1	6	44	(nicht n1 m2 x3)	
0.996670442	36	1	6	53	(nicht m2 s10 x3)	
0.996170182	9	4	13	57	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)	HPC_LK04KM04KM06KM07_3
0.995157025	20	1	11	16	(n3 n4 n6 n8 n9 s3 s4 s6 s7 s8 s9 x2 x4 x5 x7 x9 m10 m11 m7 m8)	
0.995121083	16	1	11	9	(n3 n4 n5 n7 s2 s8 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m3 m4 m7)	
0.994895306	18	1	9	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 s1 s10 s2 s3 s5 s7 x1 x5 x9 m1 m4 m7)	
0.994733297	30	1	8	18	(nicht n1 n4 n5 n6 s10 m2 x3 m7 m9)	
0.994585313	28	1	10	24	(nicht n1 n4 n5 n6 s10 m2 x3 m7 m9)	
0.994204229	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	
0.993943507	6	1	11	13	(n3 x1 x6 x9 m7 m8)	
0.993920060	10	1	11	206	(s1 s10 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)	HPC_LK04KM04KM06KM07_4
0.992168688	5	1	9	221	(s4 s8 m10 m11 m5)	
0.991873521	3	1	14	15	(n3 s4 s9)	
0.991791981	3	1	13	18	(n6 m7 m9)	
0.989963956	2	1	14	37	(n5 x9)	

Alle für das inter-tissue-Klonkollektiv des LKs von 2004, des KMs von 2004, des KMs von 2006 und des KMs von 2007 von Patient 3 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zur Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl dieser HPCs: 17. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde.

Damit bestand die Möglichkeit, dass HPC_LK04+KM04+KM06+KM07_2 bereits im prätherapeutischen Gewebe vorhanden war, persistierte und erst im Stammbaum LK04+KM04+KM06+KM07 berechnet wurde. (vgl. Abb. 47 und Abb. 48)

Im gewebeübergreifenden Stammbaum LK04+KM04+KM06+KM07+LK07, welcher alle sequenzierten LK- und KM-Klone von Patient 3 umfasste, wurde als wahrscheinlichster HPC wieder ein Klon, dessen Mutationsmuster dem der Klone m2 und x3 aus den Jahren 2004 und 2006 entsprach, bestimmt. (vgl. Abb. 49 und 50)

Abb. 49 – Tumorzellevolution LK04+KM04+KM06+KM07+LK07, Patient 3, FL^o1



Damit war der am geringsten mutierte, früheste Klon m2 aus dem initialen, prätherapeutischen LK des Jahres 2004 der wahrscheinlichste Vorläuferklon der gesamten FL-Population (im Detail waren dies die HPCs: HPC_LK+KM1_2004, HPC_LK04+KM04+KM06_1, HPC_LK04+KM04+KM06+KM07_1 und HPC_LK04+KM04+KM06+KM07+LK07_1). Dass er in Form von x3 im Rezidivknochenmark des Jahres 2006 wiedergefunden wurde, bekräftigte die Möglichkeit dessen KM-Persistenz während des gesamten untersuchten Krankheitsverlauf. Weiter wurde durch das berechnete, wiederholte Auftreten der HPCs mit acht und 11 Mutationen des KMs des Jahres 2007 im zugehörigen LK desselben Jahres die Möglichkeit einer Reinfiltration des LKs durch gering mutierte KM-Klone aufgezeigt (im Detail waren dies die HPCs: HPC_LK04+KM04+KM06+KM07_2 und HPC_LK04+KM04+KM06+KM07_4 im Vergleich zu HPC_LK04+KM04+KM06+KM07+LK07_2 und HPC_LK04+KM04+KM06+KM07+LK07_3). Dabei leiteten sich diese hypothetischen Klone von der prätherapeutischen LK-Klonpopulation ab. Somit bestand die

Möglichkeit, dass das KM als therapieresistente Nische für FL-Klone fungierte, von der aus sich posttherapeutisch die KM-Rezidive sowie die nodale Reinfiltration manifestierten. (vgl. Abb. 49 und 50)

Abb. 50 – „pm“-Hierarchie von LK04+KM04+KM06+KM07+LK07, Patient 3, FL⁰¹

Anzahl sequenzierter Klonet: 47

pm LK04KM04KM06KM07LK07	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.000000000	47	5	5	129	(alle)	HPC_LK04KM04KM06KM07LK07_1
0.997940936	44	3	8	145	(nicht x3 m2 m5)	HPC_LK04KM04KM06KM07LK07_2
0.997255524	44	1	6	44	(nicht n1 x3 m2)	
0.997255524	44	1	6	53	(nicht s10 x3 m2)	
0.996615443	9	4	13	134	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)	HPC_LK04KM04KM06KM07LK07_3
0.996180039	27	1	11	16	(nicht n1 n10 n5 s1 s10 s2 s5 x1 x3 x6 x8 m1 m2 m3 m4 m5 m6 m8 o8)	
0.996099851	18	1	11	9	(n3 n4 n5 n7 s2 s8 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m3 m4 m7 o8 o9)	
0.995918697	22	1	9	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 s1 s10 s2 s3 s5 s7 x1 x5 x9 m1 m4 m7 o1 o2 o4 o6)	
0.995791318	37	1	8	18	(nicht n1 n4 n5 n6 s10 x3 m2 m7 m9 o9)	
0.995589252	36	1	10	24	(nicht n1 x1 x2 x3 x4 x5 x6 x7 x8 m2 m5)	
0.995396505	11	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9 o1)	
0.995058751	7	1	11	13	(n3 x1 x6 x9 m7 m8 o10)	
0.995040990	10	1	11	206	(s1 s10 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)	HPC_LK04KM04KM06KM07LK07_4
0.994930261	7	1	12	21	(o1 o2 o4 o5 o6 o8 o9)	HPC_LK04KM04KM06KM07LK07_5
0.993811444	7	1	8	221	(s4 s8 m10 m11 m5 o8 o9)	
0.993447760	3	1	14	15	(n3 s4 s9)	
0.993351661	3	1	13	18	(n6 m7 m9)	
0.993345570	2	1	13	4	(m3 o4)	
0.991538640	2	1	14	37	(n5 x9)	

Alle für das intertissue-Klonkollektiv des LKs von 2004, des KMs von 2004, des KMs von 2006, des KMs von 2007, sowie des LKs von 2007 von Patient 3 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zu Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl dieser HPCs 19. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde.

5.2.3.3 Interkompartimentäre Tumorzelevolution

Das wesentliche Argument für eine prätherapeutische KM-Infiltration aus dem LK sowie für die skizzierte KM-Persistenz von gering mutierten und damit frühen, initial im LK aufgetretenen Klonen, war neben der beschriebenen Wiederkehr bereits bekannter HPCs in den Folgegeweben die Detektion von x3 im KM des ersten Rezidivs. Da es sich hierbei um die identische Sequenz handelte, wie beim prätherapeutischen LK-Klon m2, waren damit der Ort dessen originärer Entwicklung und die Richtung der Migration zwischen den Kompartimenten LK und KM vorgegeben. Um zu untersuchen, ob die LK-Population des Rezidivs des Jahres 2007 wie zuvor postuliert tatsächlich durch „retrograde Re-Infiltration“ aus dem KM entstand, oder ob eine klonale LK-Persistenz die wahrscheinlichere Erklärung für das LK-Rezidiv von 2007 war, wurden die prä- und posttherapeutischen LK-Populationen miteinander verglichen und diese Ergebnisse den Befunden des Stammbaums LK04+KM04+KM06+KM07+LK07 gegenübergestellt. Bezüglich des gewebeübergreifenden Stammbaumes aus den LK-Populationen der Jahre 2004 und 2007 wurden 13 mögliche HPCs bestimmt, von denen fünf verwendet wurden. Da zwei dieser fünf HPCs

dieselbe Wahrscheinlichkeit „pm“ besaßen, dies waren HPC_LK04+LK07_4 und HPC_LK04+LK07_5 mit jeweils 12 Mutationen, wurden zwei Varianten dieses „inter-tissue“-Stammbaumes erzeugt.

Abb. 51 – Tumorzellevolution LK04+LK07, Patient 3, FL^o1

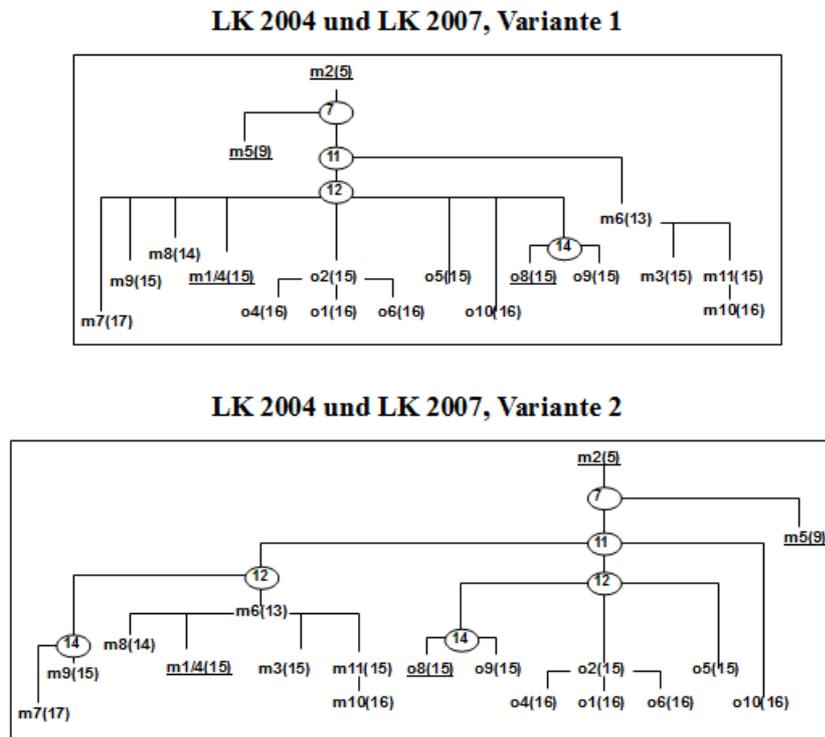


Abb. 52 – „pm“-Hierarchie von LK04+LK07, Patient 3, FL^o1

Anzahl sequenzierter Klone: 19

pm LK04+LK07	r	z	i	locus	Klongruppe	Name
1.00000000	19	5	5	129	(alle)	HPC_LK04+LK07_1
0.996145503	18	2	7	53	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9 o1 o10 o2 o4 o5 o6 o8 o9)	HPC_LK04+LK07_2
0.995819090	17	4	11	126	(m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9 o1 o10 o2 o4 o5 o6 o8 o9)	HPC_LK04+LK07_3
0.991423906	15	1	8	18	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8 o1 o10 o2 o4 o5 o6 o8)	HPC_LK04+LK07_4
0.990103363	7	1	12	221	(m1 m4 m7 m8 m9 o1 o10 o2 o4 o5 o6 o8 o9)	HPC_LK04+LK07_5
0.990103363	7	1	12	9	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 o1 o2 o4 o6)	HPC_LK04+LK07_5
0.990103363	7	1	12	21	(o1 o2 o4 o5 o6 o8 o9)	HPC_LK04+LK07_5
0.990091987	10	1	12	33	(m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9 o1)	
0.989870351	11	1	12	16	(m10 m11 m7 m9 o1 o10 o2 o4 o5 o6 o9)	
0.988309733	3	1	12	13	(m7 m8 o10)	
0.988045896	5	1	8	221	(m10 m11 m5 o8 o9)	
0.987089545	2	1	13	4	(m3 o4)	
0.984280706	2	1	14	18	(m7 m9)	

Alle für das intertissue-Klonkollektiv des Lymphknotens von 2004 und des Lymphknotens von 2007 von Patient 3 bestimmten HPCs mit den Eingabeparametern der Formel zu Berechnung von „pm“ und der HPC-definierenden Klongruppe sind dargestellt. Gesamtzahl dieser HPCs: 13. In blau sind die verwendeten, in rot die verworfenen HPCs abgebildet, alle nach abnehmendem „pm“ geordnet. Die roten HPCs wurden verworfen, da das Fortführen der bereits ermittelten Klongruppen durch sie unterlaufen wurde.

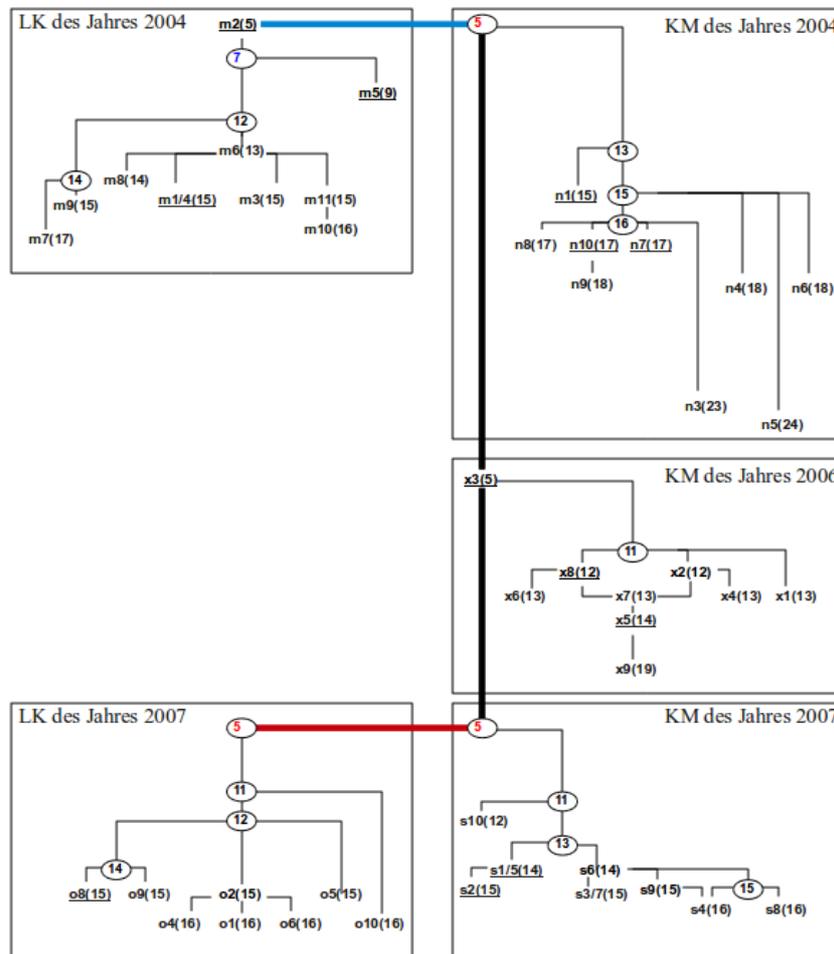
Die drei wahrscheinlichsten HPCs waren dabei in jedem der beiden Stammbäume enthalten. In Variante 1 umfasste HPC_LK04+LK07_4 sowohl LK-Klone aus dem Jahr 2004 und aus 2007, in Variante 2 HPC_LK04+LK07_5 demgegenüber lediglich Rezidivklone des Jahres 2007. HPC_LK04+LK07_3 war zu HPC_LK2_2007 der gewebespezifischen Darstellung identisch. Da allerdings nur HPC_LK04+LK07_5 und nicht HPC_LK04+LK07_4 dem gewebespezifischen HPC_LK2_2007 entsprach, wurde die Variante 2 des Stammbaumes LK04+LK07 als adäquatere Version bestimmt und damit HPC_LK04+LK07_4 verworfen. (vgl. Abb. 51 und 52)

Abb. 53 – „pm“-Hierarchie von LK04+LK07, Patient 3, FL^o1

Population	pm(HPC_LK04+LK07)	pm(HPC_LK04+KM04+KM06+KM07+LK07)
LK-Klone 2007	0.996145503 (HPC_LK04+LK07_2)	0.997940936 (HPC_LK04+KM04+KM06+KM07+LK07_2)

Gemessen an den Wahrscheinlichkeitswerten pm des jeweils wahrscheinlichsten HPCs (nach den zu m2 und x3 identischen HPCs) innerhalb der LK-Population LK04+LK07 und der alle Klone des FLs von Patient 3 umfassenden Population LK04+KM04+KM06+KM07+LK07, wurde entweder die LK-residente Evolution der LK-Rezidivpopulation von 2007, oder deren Entwicklung über nodale Re-Infiltration von KM-residenten Klonen als wahrscheinlichste Erklärung für das LK-Rezidiv des Jahres 2007 bestimmt.

Abb. 54 – endgültige Tumorzellevolution, Patient 3, FL^o1

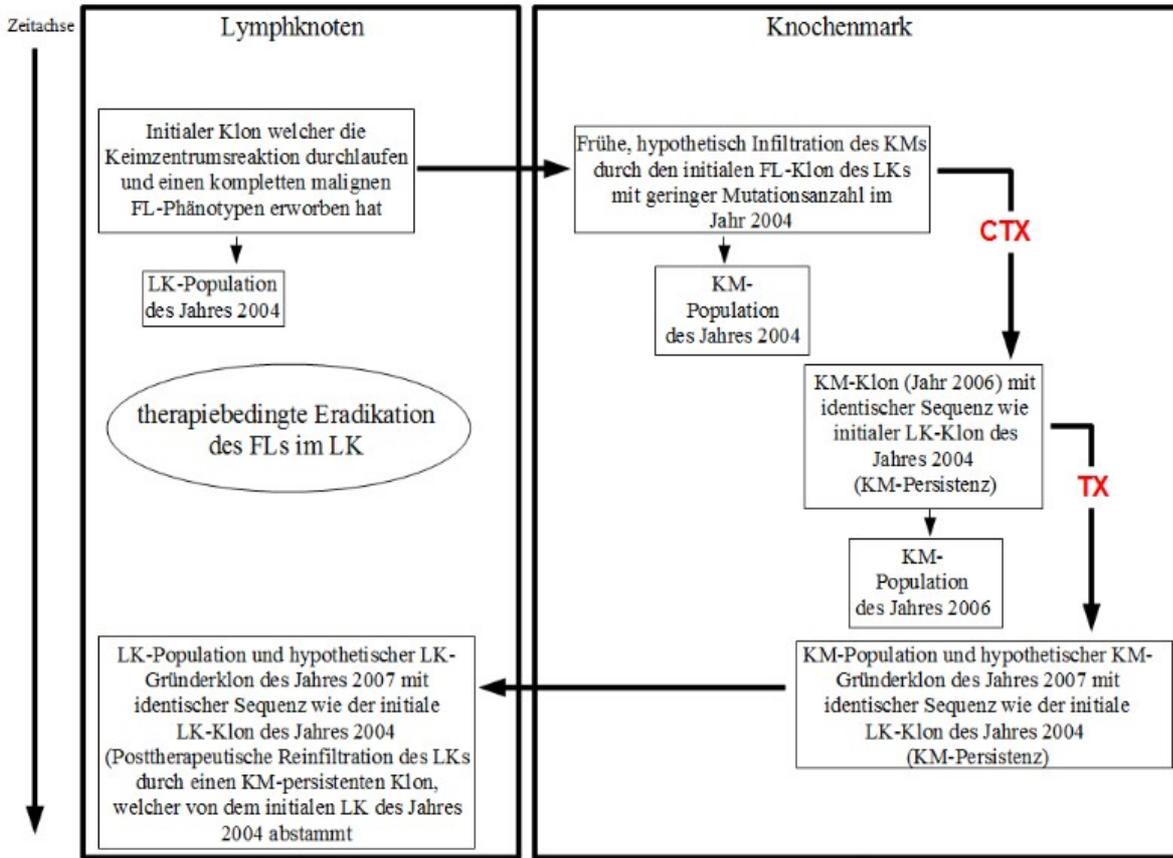


In Zusammenschau der gewonnenen Information bezüglich der HPCs der beiden Stammbäume LK04+LK07 und LK04+KM04+KM06+KM07+LK07, erschienen die zu den Klonen m2 und x3 identischen HPCs als die wahrscheinlichsten HPCs. Der nächste hypothetische Klon der HPC-Hierarchie des Stammbaumes LK04+LK07 war der lediglich in diesem Kollektiv auftretende, sieben Mutationen tragende HPC_LK04+LK07_2. Demgegenüber stand im Stammbaum LK04+KM04+KM06+KM07+LK07 der HPC_LK04+KM04+KM06+KM07+LK07_2 mit acht Mutationen. Letzterer hatte einen höheren „pm“-Wert und war deshalb wahrscheinlicher (vgl. Abb. 53). Somit stellte die nodale Re-Infiltration durch KM-Klone das plausible Erklärungsmodell für das LK-Rezidiv des Jahres 2007 dar, als die klonale LK-Persistenz zwischen den LK-Geweben der Jahre 2004 und 2007. (vgl. Abb. 54)

5.2.3.4 Zusammenfassung

Das Modell der klonalen Evolution des FLs von Patient 3 stellte sich als zwei zueinander gegenläufige Migrationsereignisse zwischen dem LK- und dem KM-Kompartiment, als auch durch die KM-Persistenz früher und gering mutierter, aus dem LK stammender Klone dar. Prätherapeutisch infiltrierte ein zu m2 identischer Klon das KM, repräsentierte dort den Gründerklon der KM-Population von 2004 und überdauerte die erste Therapie. Weiter verursachte dieser Klon, der im KM 2006 als x3 wiedergefunden wurde das erste KM-Rezidiv, indem er Ausgangspunkt für die KM-Klone desselben Jahres war. Wiederum überdauerte dieser, bzw. wie gezeigt weitere, gering mutierte Klone, die erneuten Therapiebemühungen, führte/n im Jahr 2007 zum zweiten Rezidiv im KM und durch retrograde Infiltration des LKs auch zum nodalen Rezidiv (vgl. Abb. 54 und Abb. 55). Damit erschien die auf proliferierende Zellen abzielende Therapiemodalität CTX FL-Klone zu zerstören, die eine relative hohe Mutationsrate ihrer Immunglobulingene aufwiesen. Weniger mutierte Klone, insbesondere die Gründerklone der FL-Populationen, schienen da sie sukzessiv als tatsächlich sequenzierte Klone, oder als wahrscheinlichste HPCs wiederholt auftraten, die CTX im KM zu überdauern. Folglich erschienen die frühen, gering mutierten Klone biologisch „stabiler“, als Klone mit hoher Mutationsrate. Die Mutationsrate wurde damit als Korrelat hoher proliferativer Aktivität und Sensitivität gegenüber CTX interpretiert, eine dazu relativ geringe Mutationslast als Indikator biologischer Stabilität und Indolenz.

Abb. 55 – Zusammenschau des Modells der FL-Evolution von Patient 3



- CTX – Chemotherapie; - TX – Stammzelltransplantation

- Eine therapiebedingte Eradikation des FLs im LK wird angenommen, da eine Persistenz des FLs im LK gemäß dem Wahrscheinlichkeitsmaß pm weniger wahrscheinlich ist, als eine Reinfiltration des LKs aus dem KM.

5.3 Analyse der somatische Hypermutation

Die Mutationsmuster der LK- und KM-Sequenzen aller Patienten zeigten mit unterschiedlicher Häufigkeit, als Resultat der SH der IgV_H-Gensegmente, Hinweise auf BCR-strukturerhaltende Mutationsmuster. Am häufigsten wurden solche nicht-zufälligen Selektionen von S-Mutationen unter Klonen der prätherapeutischen LK-Gewebe gefunden. Ferner enthielten die Sequenzen von LK-Klonen aus prätherapeutischen Geweben stets häufiger diesen Überhang an S-Mutationen, als prä- und posttherapeutische KM-Klone. Alle detektierten Stopcodone befanden sich in KM-Sequenzen (vgl. 6.1.5.4 Bedeutung von Stopcodonen), LK-Sequenzen enthielten keine Stopcodone. Ein signifikanter Überhang an R-Mutationen in den CDRs und damit ein Hinweis auf AG-getriebene SH wurde nicht nachgewiesen.

5.3.1 Patient 1

Alle LK-Klone (10/10, 100%) zeigten gemäß des Überhangs von S-Mutationen in den FRWs statistisch signifikante Werte für die Expression eines Intakten BCRs. Innerhalb der KM-Population waren dies lediglich drei (3/8, 37,5%). Die anderen fünf KM-Klone enthielten in ihrer Sequenz „in-frame“ Stopcodone und wurden deshalb nicht der Mutationsanalyse unterzogen. (vgl. Abb. 56 und Anhang)

Abb. 56 – R/S-Analyse Patient 1

Klon	FR2		p-Wert(FRW)	FR1		p-Wert(FRW)	FR2		p-Wert(CDR)	FR1		p-Wert(CDR)
	FRW			FRW			CDR			CDR		
	R	S		R	S		R	S		R	S	
LK Jahr 2006												
a2	14	25	<0,005	27	38	<0,005	18	20	0.95086	21	24	0.95239
a6	14	27	<0,005	27	44	<0,005	17	21	0.98773	20	27	0.98695
a7	16	26	<0,005	28	39	<0,005	19	22	0.96993	23	25	0.93649
a8	6	21	<0,005	13	27	<0,005	17	17	0.77305	20	22	0.64254
b1	16	26	<0,005	28	41	<0,005	19	22	0.96993	22	27	0.97144
b2	13	23	<0,005	26	38	<0,005	18	26	0.95880	19	27	0.98035
b3	4	7	<0,005	7	8	<0,005	9	14	0.79579	11	20	0.67921
b4	0	0		0	0		0	0		0	0	
b6	4	4	<0,005	5	6	<0,005	11	12	0.36245	13	13	0.12210
b7	2	6	<0,005	3	8	<0,005	9	15	0.68546	10	17	0.70370
KM Jahr 2006												
k1	7	12	<0,005				13	13	0.62905			
k2	8	10	<0,005				13	13	0.59154			
k7	2	5	<0,005				9	14	0.65408			
k3	Stopcodon in Codon 103 (TGA)											
k4	Stopcodon in Codon 99 (TAG)											
k5	Stopcodon in Codon 87 (TGA)											
k9	Stopcodon in Codon 103 (TAG)											
k12	Stopcodon in Codon 103 (TGA)											

5.3.2 Patient 2

Abb. 57 – R/S-Analyse Patient 2

Klon	FR2		p-Wert(FRW)	FR1		p-Wert(FRW)	FR2		p-Wert(CDR)	FR1		p-Wert(CDR)
	FRW R	S		FRW R	S		CDR R	S		CDR R	S	
LK Jahr 2002												
a1	4	8	<0,005	5	11	<0,005	9	8	0.54664	10	11	0.49653
a2	4	8	<0,005	5	11	<0,005	10	8	0.44953	11	11	0.39981
a3	4	10	<0,005	5	13	<0,005	9	9	0.68278	10	12	0.60967
a4	4	8	<0,005	5	11	<0,005	9	8	0.55311	10	11	0.50194
a5	4	5	<0,005	5	12	<0,005	9	9	0.64022	10	12	0.57324
a6	4	8	<0,005	5	12	<0,005	9	8	0.54664	10	11	0.53543
KM Jahr 2005												
k12	7	10	<0,005				11	7	0.53730			
k13	6	12	<0,005				11	8	0.65800			
k14	7	8	<0,005				11	8	0.50515			
k1	Stopcodon in Codon 49 (TAA)											
k2	Stopcodon in Codon 49 (TAA)											
k3	Stopcodon in Codon 49 (TAA)											
k4	Stopcodon in Codon 49 (TAA)											
k5	Stopcodon in Codon 49 (TAA)											
k6	Stopcodon in Codon 49 (TAA)											
k7	Stopcodon in Codon 49 (TAA)											
k8	Stopcodon in Codon 49 (TAA) und Codon 82 (TAA)											
k9	Stopcodon in Codon 49 (TAA)											
k10	Stopcodon in Codon 49 (TAA)											
k11	Stopcodon in Codon 49 (TAA)											

Die gesamte LK-Population (6/6, 100%) zeigte einen statistisch signifikanten Überhang an BCR-strukturerhaltenden S-Mutationen in den FRWs und diese Sequenzen enthielten keine Stopcondone. Von den 14 KM-Klonen enthielten 11 Sequenzen ein „in-frame“ Stopcodon. Die anderen drei KM-Klone (k14, k13, k12; 3/11; 21%) zeigten BCR-erhaltende Mutationsmuster. (vgl. Abb. 57 und Anhang)

5.3.3 Patient 3

In der gesamten FL-Population wurde kein „in-frame“ Stopcodon gefunden. Von den 11 LK-Sequenzen aus dem Jahr 2004 zeigten vier Sequenzen BCR-erhaltende Mutationsmuster (4/11; 36%), im korrespondierenden KM des Jahres 2004 zeigte sich unter einem Drittel der Klone ein solcher Befund (3/9; 33%). Die Population des KMs aus dem Jahr 2006 beinhaltete drei Klone mit BCR-erhaltendem Mutationsmuster (3/9; 33%), die LK Population aus 2007 einen Klon (1/8; 13%) und die zugehörigen KM-Klone aus 2007 zeigten zu 30% (3/10) signifikante Werte für die Integrität der BCR-Struktur. Insgesamt zeigten 32% (9/28) aller KM-Sequenzen und 26% (5/19) aller LK-Sequenzen statistische Evidenz für BCR-erhaltende Mutationsmuster. Demgegenüber zeigte die

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methoden

6.1.1 DNS-Qualität und Mikrodissektion

Der PCR-basierte Nachweis von monoklonalen, lymphoproliferativen Erkrankungen am FFPE KM-Gewebe war in der Vergangenheit umstritten gewesen. Vor allem eine Dekalzifizierung mittels Trichloracetat erwies sich dabei als nachteilig. Demgegenüber zog eine Dekalzifizierung mit EDTA keine Verschlechterung der DNS-Qualität und damit des PCR-Amplifikationserfolgs nach sich (*Weirich, 1995*). Eine PCR zur Amplifikation der IgV_H-Gensegmente ist damit auch am FFPE KM-Gewebe eine adäquate Methode zur Klonalitätsanalyse. Es wurde weiter gezeigt, dass die Sensitivität und Spezifität der PCR-Detektion monoklonaler, lymphoproliferativer Erkrankungen durch eine Mikrodissektion erhöht werden kann. Vor allem falsch-positive Ergebnisse, resultierend aus einem oligoklonalen Hintergrund, werden dadurch vermindert (*Pan, 1994*). Alle in dieser Studie verwendeten KM-Gewebe wurden mittels EDTA dekalzifiziert und einer Mikrodissektion unterzogen, um optimale Voraussetzungen für die tendenziell als schwierig geltende molekulare Diagnostik am FFPE KM-Gewebe zu schaffen.

6.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Um Polymerasefehler (Einführung von scheinbaren Punktmutationen wegen Erzeugung einer falschen Basenpaarung bei DNS-Replikation durch die verwendete PCR-Polymerasen) gering zu halten, wurde für die Amplifikation der IgV_H-Gensegmente die AmpliTaq Gold DNS Polymerase verwendet. Dieses Enzym besitzt keine 3'-5'-Exonuclease bzw. proofreading Aktivität, zeichnet sich jedoch gegenüber anderen DNS-Polymerasen durch zuverlässige Amplifikation mit geringen Fehlerraten aus (*Lawyer, 1989; Quach, 2004*). Ferner wurden in der vorliegenden Studie nur Mutationen in die Mutationsanalyse einbezogen, die mindestens in zwei Sequenzen auftraten. Damit wurde eine Beeinträchtigung der Analyse der Mutationsmusterevolution durch unzulängliche PCR-Artefakte minimiert. Die Mutationsraten der untersuchten Sequenzen lagen zusätzlich weit über den Taq-Fehlerraten anderer Studien zur Mutationsanalyse des FLs (*Aarts, 2001; Adam, 2007; Oeschger, 2002*).

6.1.3 Klonalitäts- und Mutationsmusterbestimmung

Die Untersuchung von Sequenzen monoklonaler Zellpopulationen wurde zunächst durch die Wahl der Primer gewährleistet. Die ermittelten Sequenzen der IgV_H-Rearrangements aus FF und FFPE Geweben beinhalteten die für die Klonalitätsbestimmung entscheidenden Junktionen zwischen den V_H-, D- und J_H-Segmenten, die CDRIII-Region. Es wurden lediglich die Sequenzen eines Patienten analysiert, deren Rearrangements sich aus denselben V_H-, D- und J_H-Familien wie die ermittelte Wildtypkonfiguration zusammensetzten (Segal, 1994; Uchiyama, 2003; Wan, 1990). Diese Wildtypkonfiguration entsprach der Keimbahnkonfiguration mit der höchsten Homologie zu der am geringsten mutierten Sequenz der gesamten FL-Population eines Patienten. Durch den Vergleich der sequenzierten Klone mit der Wildtypkonfiguration wurden, in Anlehnung an Mutationsanalysen des FLs durch andere wissenschaftliche Gruppen, die Mutationsmuster der monoklonalen Populationen bestimmt (Aarts, 2001; Adam, 2007; Oeschger, 2002).

6.1.4 Tumorzellevolution und Migrationswahrscheinlichkeit

Die Rekonstruktion der Tumorzellevolution des FLs durch multiplen Sequenzabgleich / „multiple sequence alignment“ (MSA), wurde vielfach angewandt (Adam, 2007; Bogner, 2005; Matolcsy, 1996; Oeschger, 2002; Ottensmeier, 1998). Da die einzelnen FL-Zellen im Zuge der FL-Entwicklung Punktmutationen anhäufen, nimmt die genetische Distanz der einzelnen Sequenzen untereinander zu. Diese, aus dem paarweisen Vergleich verschiedener Sequenzen zueinander resultierende genetische Distanz zwischen den Sequenzen, oder allgemein zwischen den „operational taxonomic units“ (OTU), ist die Größe, nach der die einzelnen Sequenzen beim MSA prinzipiell zueinander in Relation gesetzt werden. Dabei existieren unterschiedliche Algorithmen um aus den genetischen Distanzen Wahrscheinlichkeitsmatrizen zu erzeugen, wie der „neighbor-joining“ (NJ) Algorithmus und die „maximum-likelihood“ Methode. Generell gilt dabei die Prämisse, Sequenzen, die eine höhere Homologie bzw. geringer genetische Distanz zueinander aufweisen, stehen sich evolutorisch näher, als Sequenzen mit größerer genetischer Distanz. Diese genetischen Distanzen bestimmen in der Darstellung der Evolutionsprozesse die Kantenlänge der entsprechenden Phylogramme. Ausgehend vom Sequenzpaar mit der höchsten Homologie zueinander / dem höchsten Wahrscheinlichkeitswert, werden die verbleibenden Sequenzen beim MSA graduell nach abnehmender Homologie in die Darstellung eingeordnet, bis letztlich alle Sequenzen zueinander in Relation gesetzt sind (Felsenstein, 1981; Saitou, 1987). In dieser Arbeit wurde kein MSA-Algorithmus zur Rekapitulation der FL-Evolution verwendet, sondern stattdessen eine eigene, neue Methode entwickelt, welche die FL-Evolution als Deduktion der durch die

somatische Hypermutation (SH) in die Immunglobulingene eingefügten Mutationsmuster bestimmt. Diese Methode namens „Follicular Lymphoma Evolution Reconstructor“ (FLER) ist somit unabhängig von den einzelnen Sequenzvergleichen des MSA. Wegbereitend bei deren Entwicklung und der darauf basierenden Rekonstruktion der Tumorzellevolution waren folgende, sich aus dem monoklonalen Ursprung des FLs und der Fortführung der SH durch das FL erschießende Überlegungen: Stärker mutierte Klone müssen aus schwächer mutierten und damit älteren Klonen hervorgegangen sein (Die Möglichkeit von Artefakten aufgrund von Rückmutationen in den unmutierten Zustand eines Locus war unwahrscheinlich, da lediglich Mutationsmuster und nicht einzelne Mutationen die Grundlage der Rekonstruktion der Tumorzellevolution bildeten). Damit müssten die Mutationsmuster verschiedener Sequenzen ineinander überführbar sein. Würden demnach verschiedene Gewebeproben eines FLs, fakultativ von verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs analysierte, ließen sich Migrationsbewegungen zwischen verschiedenen Kompartimenten, die jeweiligen Ausgangsgewebe der Migration, sowie Gewebe möglicher klonaler Persistenz ableiten. Da in der vorliegenden Studie für jedes Gewebe nur eine geringe Anzahl (bis zu 15 Klone) von Sequenzen ermittelt wurde, musste das Fehlen vieler Mutationsmuster und damit vieler Zwischenschritte der Tumorzellevolution kompensiert werden. Hierzu wurden die wahrscheinlichsten hypothetischen Vorläuferklone (HPCs) als Fundamentalgröße des FLER berechnet.

6.1.4.1 Vorteile der FLER-Methode gegenüber dem MSA

Die angesprochenen, in der Literatur beschriebenen Mutationsanalysen des FLs verwendeten zur Rekapitulation der Tumorzellevolution insbesondere ein „Clustal“-Computerprogramm (*Jeanmougin, 1998*). Dieses Programm arbeitet nach dem Prinzip des MSA zur Bestimmung evolutionärer Homologien von Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen. Das Ergebnis wird dabei in Form von phylogenetischen Stammbäumen, beispielsweise der Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener Arten, dargestellt. Wesentlich ist die Zuordnung identischer Abschnitte der untersuchten Sequenzen, die durch „gaps“, Bereiche einer Sequenz, die kein Gegenstück in anderen Sequenzen finden, unterbrochen sind. Anhand von Wahrscheinlichkeitsmatrizen, die sich aus der Größe der identischen und unterschiedlichen Bereiche ableiten und abhängig vom verwendeten Algorithmus unterschiedlich erzeugt werden, wird das Homologiemmaß und damit der Verwandtschaftsgrad zwischen den OTU bestimmt (*Thompson, 1994*). Da beim FL die Prämisse einer monoklonalen Erkrankung besteht, spielen die unmutierten Bereiche der Klonsequenzen für die IgV_{H/L}-zentrierte Rekonstruktion der FL-Tumorzellevolution nach Auffassung des Autors dieser

Arbeit keine Rolle. Der Indikator der Tumorzellevolution offenbart sich lediglich in den Mutationsmustern. Damit verfälschen MSA-basierte Methoden, letztlich wegen ihres auf maximale Homologie möglichst großer Sequenzbereiche ausgelegten Prinzips, die erzeugte Evolutionsrekonstruktion des FLs. Auch wird die Interpretation der Mutationslast der einzelnen Sequenzen als zeitliches Maß der klonalen FL-Evolution aus besagten Gründen beim MSA nicht angemessen berücksichtigt. Mit der FLER-Methode werden ferner alle Sequenzen auf die unmutierte Wildtypkonfiguration und nicht auf das Sequenzpaar mit der höchsten Homologie bezogen. Die Wildtypkonfiguration wird damit als Nullpunkt der FL-Evolution festgesetzt, was dem pathogenetischen Modell des FLs entspricht. Folglich sind MSA-basierte Methoden zur Rekonstruktion der Tumorzellevolution des FLs weniger geeignet. Ferner erlauben sie keine Aussage über die Richtung von Migrationsprozessen zwischen verschiedenen Populationen, oder über deren relativen Zeitpunkt im Rahmen der Evolution, da die Kantenlängen der Phylogramme keine zeitliche Dimension, sondern den Grad der Homologie widerspiegeln. Deshalb wurde in dieser Arbeit mit der FLER-Methode ein neues mathematisch-statistisches Verfahren zur Rekonstruktion der wahrscheinlichsten Tumorzellevolution entwickelt, das lediglich identisch mutierte Loci, die in mindestens zwei Sequenzen vorkommen, berücksichtigt. Diese Mutationen werden nach der Häufigkeit ihres Auftretens innerhalb der betrachteten Klonpopulation gewichtet. Hieraus folgt die Berechnung der wahrscheinlichsten HPCs bis hin zur unmutierten Wildtypkonfiguration, die wegen des Bestehens der „ongoing hypermutation“ im FL gleichzeitig den relativen zeitlichen Verlauf der Erkrankung widerspiegelt. Die alleinige Grundlage der FLER-Methode sind somit die Punktmutationen und die dadurch entstehende intraklonale Heterogenität innerhalb betrachteter FL-Populationen. Ferner kann durch die zunächst getrennte Berechnung der Tumorzellevolution verschiedener Gewebekompartimente und dem sich anschließenden Vergleich der Tumorzellevolution der Gesamtpopulation die Richtung der Migration zwischen den Kompartimenten bestimmt werden.

6.1.4.2 Wertigkeit der mutierten Loci der IgV_H-Segmente

Sofern im Zuge der SH keine Rückmutationen erfolgen (*s.o.*), müssen wegen des aktuellen Modelles der klonalen Evolution von FL-Zellen frühe Punktmutationen der IgV_H-Gene in einer FL-Population häufiger auftreten, als Mutationen welche im zeitlichen Ablauf der FL-Evolution später eingeführt werden. Diese Überlegung wird durch die Einschätzung des FLs als klonale Erkrankung unterstrichen. Deshalb wurden für jeden Patienten die LK- und KM-Klone zunächst als separate und dann als Gesamtpopulation betrachtet. Die einzelnen Klone dieser drei gedanklich gebildeten

Populationen (LK-Klone, KM-Klone, LK+KM-Klone) wurden nach ansteigender Mutationsrate, jeweils repräsentiert durch ihre Mutationsmuster, aufgelistet. Dabei wurde jeder einzelne Locus in Abhängigkeit von der Anzahl der an dieser Stelle identisch mutierten Klone bewertet. Dies geschah für jede der drei gebildeten Populationen einzeln. Alle Loci, die innerhalb der betrachteten Population häufiger als einmal mutiert waren, wurden weiter betrachtet. Diese Loci wurden nach abnehmender Anzahl der identisch mutierten Klone einer Population geordnet.

6.1.4.3 Klongruppen und hypothetische Vorläuferklone

Auf der Basis der erzeugten Ordnung wurde jeder Locus durch die an ihm identisch mutierten Klone repräsentiert, so dass viele Klongruppen unterschiedlicher Stärke gebildet wurden. Jede dieser Gruppen wurde, wie zuvor die Gesamtheit der Klone einer Population, durch die Sequenzen der in ihr enthaltenen Klone repräsentiert und nach ansteigender Mutationsrate aufgelistet. Ferner wurde jede Gruppe mit der Variablen „r“ versehen. Diese Variable stand für die Anzahl der Klone innerhalb der betroffenen Gruppe. Weiter wurden ausschließlich Mutationen, die alle Klone einer Gruppe gemeinsam hatten in eine neue, hypothetische Sequenz, den HPC übertragen. Alle anderen Loci dieser hypothetischen Sequenz waren folglich identisch zur ermittelten Wildtypsequenz. Die Anzahl der Mutationen, dieses HPCs einer bestimmten Gruppe wurde mit der Variablen „i“ belegt. Die Anzahl der Wiederholungen eines bestimmten HPCs in der jeweiligen Population (LK-Klone, KM-Klone, LK+KM-Klone) wurde mit der Variablen „z“ versehen. (vgl. Abb. 13)

6.1.4.4 Wahrscheinlichkeit der hypothetischen Vorläuferklone

Generell gilt, ein Produkt aus relativen Häufigkeiten stellt eine Wahrscheinlichkeit dar. Beim Würfelwurf eines sechsaugigen Würfels besitzt jede Augenzahl die relative Häufigkeit von $1/6$. Demzufolge entspricht die Wahrscheinlichkeit mit zwei Würfeln genau zweimal die eins zu erhalten dem Produkt der relativen Häufigkeiten der Ereignisse: $1/6 \times 1/6$. In Analogie dazu wurde aus den relativen Häufigkeiten der jeweils identisch mutierten Loci innerhalb der jeweils betrachteten Klonpopulation (LK-Klone, KM-Klone, LK+KM-Klone) eine Wahrscheinlichkeit für die einzelnen HPCs berechnet. Diese Wahrscheinlichkeit entsprach dem Produkt der einzelnen relativen Häufigkeiten P der lokusspezifischen identischen Mutationen innerhalb der betrachteten Population. Der prinzipielle Unterschied zur angeführten Würfelanalogie bestand darin, dass die verschiedenen HPCs nicht dieselbe Augenzahl besaßen, also unterschiedliche Mutationsanzahl „i“ aufwiesen. Dies führte, parallel zur Zunahme der Mutationsanzahl „i“ innerhalb der HPC-Populationen zur multiplikativen Verminderung der resultierenden Wahrscheinlichkeit. Stark mutierte HPCs besaßen

eine vergleichsweise geringe Wahrscheinlichkeit, obwohl sie mehrere Mutationen tatsächlich sequenzierter Klone auf sich vereinten, als schwächer mutierte HPCs. Um solche HPCs aufzuwerten wurde die aus den relativen Häufigkeiten P berechneten Wahrscheinlichkeiten um den Korrekturfaktor „ x “ adaptiert. Da die zu adaptierende Wahrscheinlichkeit ein Produkt darstellte, wurde zur Korrektur die „ x “-te Wurzel gezogen. Der Korrekturfaktor „ x “ stellte dabei das Produkt aus der Anzahl der Mutationen des betrachteten HPCs „ i “, der Anzahl „ z “ der Wiederholungen des HPCs in der Gruppe der HPCs der betrachteten Klonpopulation, sowie eines Ausdrucks, welcher der Gruppenstärke „ r “ Rechnung trug, dar. Dieser Ausdruck war die Differenz aus der Gesamtanzahl „ t “ der tatsächlich sequenzierten Klone der betrachteten Population und der Gruppenstärke „ r “ (aus mathematischen Gründen musste zu diesem Ergebnis eine 1 addiert werden). Damit wurden v.a. Mutationsmuster mit wenig Mutationen, die im Laufe der Tumorzellevolution früh auftraten und dadurch in der Hierarchie der erzeugten HPCs überbewertet waren, in ihrem Einfluss auf die Rekonstruktion der klonalen Evolution des FLs zurückgedrängt. Unter den obig entwickelten Prämissen wurde für jeden HPC das Wahrscheinlichkeitsmaß „ pm “ berechnet, folglich eine Bereinigung des Produkts der Wahrscheinlichkeiten P vorgenommen. (vgl. *Abb. 13 und Anhang*)

6.1.4.5 Konstruktion gewebespezifischer Stammbäume der Tumorzellevolution

Die für die LK-Population gebildeten HPCs und die HPCs der KM-Population wurden zunächst als isolierte Gruppen betrachtet und nach absteigendem Wahrscheinlichkeitsmaß „ pm “ geordnet (vgl. *10.5.3 HPCs und Eingabeparameter zur Berechnung von pm*). Gemäß dieser HPC-Hierarchie wurde ausgehend vom wahrscheinlichsten HPC jeweils ein gewebespezifischer Stammbaum der Tumorzellevolution konstruiert. An dessen Spitze bzw. der Nullposition stand die unmutierte Wildtypkonfiguration, die gedankliche Ordinate war in dieser eindimensionalen Darstellung, nach unten gerichtet und repräsentierte die zunehmende Mutationsanzahl und damit die Zeitachse der Tumorevolution. Die Hierarchie der HPCs wurde solange ausgehend vom wahrscheinlichsten HPC durchlaufen und parallel der jeweilige HPC mit den aus ihm resultierenden tatsächlichen Klonen aufgezeichnet und verbunden, bis alle sequenzierten Klone mindestens einmal erfasst waren. Stand ein tatsächlicher Klon zu mehreren HPCs in Beziehung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich die Verbindung mit dem wahrscheinlichsten HPC dargestellt. Das Ergebnis war für jedes untersuchte Gewebe ein Stammbaum der monoklonalen FL-Evolution.

6.1.4.6 Analyse der Migrationsbewegungen zwischen den Kompartimenten

Um mögliche Migrationsbewegungen zwischen den Kompartimenten LK und KM zu erfassen, wurde neben den gewebespezifischen HPCs auch ein „inter-tissue“-Kollektiv an HPCs erzeugt. Dazu wurden alle Klone eines Patienten zu einer Population zusammengefasst (LK+KM) und wie bei den gewebespezifischen Stammbäumen verfahren. Eine Migration wurde postuliert, wenn LK- oder KM-Klonen ein wahrscheinlicherer „inter-tissue“-HPC zugeordnet werden konnte, als dies im jeweiligen gewebespezifischen Stammbaum der Fall war. Die Zuordnung solcher „inter-tissue“-HPCs zum LK- oder KM-Kompartiment war von der zum HPC gehörigen Gruppe tatsächlicher Klone abhängig. War ein HPC des „inter-tissue“-Stammbaums der gesetzte Vorläuferklon einer Gruppe tatsächlicher Klone, die sich aus mehreren LK- als KM-Klonen zusammensetzte, so wurde dieser HPC im LK-Kompartiment angesiedelt. War das Gegenteil der Fall, so wurde er dem KM-Kompartiment zugeordnet. Im Falle von gleich vielen LK- wie KM-Klonen, konnte keine Zugehörigkeit zu einem Kompartiment ermittelt werden. Folglich wurden die „inter-tissue“-HPCs dem LK-Kompartiment zugeordnet, wenn ihr Mutationsmuster mehrheitlich dem von LK-Klonen entsprach und vice versa, also mehrheitlich gewebespezifische Mutationen ihres unterstellten Ursprungskompartiments enthielten.

6.1.4.7 Zusammenfassung

Der Follicular Lymphoma Evolution Reconstructor (FLER-) Algorithmus stellt im Gegensatz zu den multiple sequence alignment (MSA-) Algorithmen nicht die Homologie unmutierter Bereiche als Grundlage zur Berechnung evolutorischer Verwandtschaftsgrade ins Zentrum der Betrachtung, sondern die Homologie identischer Mutationen und in Konsequenz die Homologie von Mutationsmustern. Damit erlaubt die FLER-Methode die Ermittlung gewebetypischer Mutationsmustersignaturen und die Zuordnung von HPCs zu verschiedenen untersuchten Gewebekompartimenten bei paralleler Quantifizierung der HPC-Wahrscheinlichkeit. Somit können anders als bei MSA-basierten Methoden Aussagen bezüglich möglicher Migrationsereignisse zwischen verschiedenen Kompartimenten getroffen werden.

6.1.5 Antigendruck und Integrität des B-Zellrezeptors

Die Abhängigkeit des FLs von der Expression eines intakten BCRs, sowie der Einfluss eines möglichen Antigens (AG) auf die Ätiopathogenese des FLs sind nicht eindeutig geklärt (*Bahler, 1992b; Kuppers, 1999; Ottensmeier, 1998; Zelenetz, 1992*). Es wurden verschiedene statistische

Modelle entwickelt, um solche Informationen aus den Mutationsmustern der IgV_H-Genabschnitte abzuleiten (*Chang, 1994; Lossos, 2000; Pascual, 1994; Shlomchik, 1989; Shlomchik, 1987*).

6.1.5.1 Replacement- und silent-Mutationen

Der genetische Code ist ein degenerierter Code. Dieses Phänomen drückt sich in der Kodierung des Großteils der proteinogenen Aminosäuren durch jeweils mehrere Basentriplets aus. Tryptophan und Methionin stellen dabei Ausnahmen dar. Von den 64 möglichen Triplets, abzüglich der Start- und Stopcodone, entfallen 61 Triplets auf 20 zu kodierende Aminosäuren. Deshalb bewirken manche Punktmutationen keine Veränderung der durch das Triplet kodierten Aminosäure. Im Falle einer silent (S)-Mutation ist die Aminosäure redundant durch mehr als ein Codon repräsentiert und wird durch die Mutation nicht verändert. Wird demgegenüber durch eine Punktmutation die kodierte Aminosäuresequenz verändert, so handelt es sich um eine replacement (R)-Mutation (*Chang, 1994*).

6.1.5.2 Framework und complementarity-determining regions

Durch Analysen der Mutationsmuster von humanen IgV_{H/L}-Gensegmenten wurden Bereiche gefunden, die eine durch ihre Basensequenz determinierte, intrinsische Neigung besaßen, durch beliebige Punktmutationen überdurchschnittlich häufig S-Mutationen anzuhäufen. Im Gegensatz dazu fanden sich auch Bereiche der Basensequenz, die überdurchschnittlich häufig R-Mutationen erwarben. Ferner lagen Sequenzbereiche vor, in die im Rahmen der SH sehr viele Punktmutationen eingeführt wurden und Bereiche die weitaus seltener Ziel der SH waren. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurden „framework“ Regionen (FRW) von „complementarity-determining“ Regionen (CDR) abgegrenzt. Diese Unterschiede der strukturimmanenten Variabilität der Mutagenese erschlossen sich durch 3D-Analysen und spiegelten die Funktionen dieser Bereiche im AK / BCR wider. Die FRW, speziell der IgV_H-Gene kodieren für Polypeptide, welche die strukturelle Integrität des BCRs gewährleisten. Eine Veränderung dieser Regionen würde zur strukturellen und damit funktionellen Zerstörung des BCRs führen. Demgegenüber kodieren die CDR für die Polypeptidbereiche des BCRs, die mit Antigenen in Kontakt treten. Da in diesem Bereich Veränderungen der Sequenzen durch Punktmutationen für die adaptive Immunantwort erwünscht sind, müssen sie folglich potentiell polymorph sein. Bei den FRW unterscheidet man auf dem IgV_H-Gen FRWI bis FRWIII, bei den CDR analog CDRI bis CDRIII voneinander (*Chang, 1994*) (vgl. Abb. 10).

6.1.5.3 Verschiedene Methoden der B-Zellrezeptor-Mutationsanalyse

Im Laufe der Zeit wandelte sich die Methodik der Analyse der AG-Abhängigkeit der SH. Galt früher das bloße Verhältnis aus R und S Mutationen für FRW- oder CDR-Regionen als Indiz für oder gegen AG-getriebene Selektionsvorgänge, so wurde in weiterentwickelten Modellen die intrinsische Neigung von bestimmten DNS-Sequenzen, R- oder S-Mutationen überdurchschnittlich häufig anzuhäufen, mit ins Kalkül einbezogen (*Shlomchik, 1989; Shlomchik, 1987*). Viel zitiert wurde in diesem Zusammenhang das binomiale Distributionsmodell von Chang und Casali (*Chang, 1994*). Dieses stellte für CDR und FRW getrennt die durch die Sequenz theoretisch bedingten Mutationshäufigkeiten den tatsächlich detektierten Häufigkeiten gegenüber. Diese Methode erfuhr Weiterentwicklungen, u.a. die vom binomialen zum multinomialen Modell (*Lossos, 2000*). Das bereits angeführte und in dieser Arbeit für die Evaluation des AG-Drucks verwendete „applet“ der „Stanford University“, basiert auf dieser multinomialen Theorie. Auch wurde generell die Sinnhaftigkeit solcher Mutationsanalysen in Frage gestellt. Zum einen basierend auf Überlegungen, welche die statistischen Modelle generell als unzulänglich erachteten, zum anderen aufgrund der Ergebnisse kristallographischer Untersuchungen von Antikörpern (*Bose, 2005; Chothia, 1992; Foote, 1992; Hillson, 1993*). Diese zeigten, dass die funktionelle Unterteilung in FRW- und CDR-Regionen nicht strikt war und beispielsweise auch FRW-Abschnitte Kontakt mit AG hatten. Somit reflektieren die Eingabeparameter der statistischen Analyse, die R/S-Quotienten der FRW- und CDR-Regionen nicht zwingend die Wirklichkeit. Ferner führen bereits geringe Veränderungen des Quotienten aus R- und S-Mutationen zu großen Folgen für die Bestimmung der statistischen p-Werte, da es sich um numerisch kleine Werte handelt. Deshalb wird die R/S-Analyse in dieser Arbeit primär vollzogen, da sie gemessen an der bestehenden Literatur zum FL obligat ist. Die Sinnhaftigkeit, insbesondere bezüglich einer allgemeinen Aussage für oder wider den Einfluss von AG auf die Genese des FLs wird jedoch hiermit kritisch eingeschätzt.

6.1.5.4 Bedeutung von Stopcodonen

Die Expression eines intakten BCRs setzt voraus, dass durch die SH kein Stopcodon in die IgV-Gene eingeführt wird. Deshalb wurden lediglich Klone, die im Zuge der SH kein Stopcodon erworben hatten der Analyse bezüglich des AG-Drucks / der Integrität des BCRs unterzogen. Dabei wurden nur Stopcodone beachtet, die im normalen Leserahmen auftraten („in-frame“ Stopcodone) (*Ottensmeier, 1998*).

6.1.5.5 Zusammenfassung

Basierend auf den angeführten Aspekten zur Statistik der AG-Selektion, wurde der Einfluss eines fraglichen AG auf die Evolution des FLs angenommen, wenn kein „in-frame“-Stopcodon detektiert wurde und der über das multinomiale Modell ermittelte p-Wert(CDR) $<0,05$ war. War der p-Wert(FRW) $<0,05$, wurde dies als Beleg für die (strukturelle) Intaktheit der BCRs angesehen.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Das Auftreten der Translokation t(14;18) während früher Entwicklungsstadien der B-Zell-Ontogenese stellt die klassische molekulare Prädisposition zur Entwicklung des FLs dar (Rowley, 1988; Yunis, 1982). Diese genetische Läsion begünstigt durch die Deregulation der GC-Reaktion die Erzeugung sekundärer genetischer Veränderungen, welche zur Entwicklung und klinischen Manifestation des FLs führen (Korsmeyer, 1992b; Willis, 2000). Dabei kommt es im Laufe der FL-Evolution zur Besiedlung präexistenter Lymphfollikel, zur Migration zwischen verschiedenen Follikeln eines LKs, sowie später zur Dissemination zwischen verschiedenen LK und zur systemischen, extranodalen Manifestation (Aarts, 2002; Cong, 2002; Oeschger, 2002; Su, 2001). Die Mehrheit der am FL erkrankten Patienten wird im fortgeschrittenen Stadium III oder IV nach Ann-Arbor diagnostiziert (Harris, 1999).

Als malignes Pendant zu den GCLs zeichnet sich das FL durch die „ongoing somatic hypermutation“ der variablen Bereiche der Immunglobulingene aus (Harris, 1994; Levy, 1987; Levy, 1988; Ottensmeier, 1998). Dieser „genetische Fingerabdruck“ der SH wurde in der vorliegenden Studie verwendet, um die Beziehung zwischen FL-Klonen des LKs und des KMs zu untersuchen. Diese, auf der analysierten intraklonalen Heterogenität der IgV_H-Gensegmente basierende, klonale Beziehung der malignen Zellen zueinander, wurde weiter unter Anwendung eines mathematisch-statistischen Algorithmus als interkompartimentäre Genealogie der Tumorzellevolution und -migration dargestellt.

Daneben sollten, dem Wandel des ätiopathogenetischen Modells maligner Neoplasmen von einer rein zellzentrierten Autonomiehypothese hin zur kontextabhängigen Deregulation physiologischer Prozesse entsprechend, mögliche nischenabhängige Einflüsse des histologischen und immunologischen Kontextes des LK- und KM-Kompartiments auf die FL-Evolution abgeschätzt werden (Ghia, 2000; Hanahan, 2000; Schedin, 2004). Hierfür wurden die einzelnen Mutationsmuster der malignen Klone auf gewebespezifische Unterschiede bezüglich der Expression eines intakten BCRs und der Beeinflussung der SH durch Antigene analysiert. Analog wurden prä-

und posttherapeutische FL-Populationen verglichen, um u.a. daraus die Bedeutung möglicher nischenspezifischer Funktionen für das Rezidiv der FL-Erkrankung abzuleiten.

6.2.1 Mutationsmuster

Da das FL als monoklonale Erkrankung betrachtet wird, resultieren durch das Wirken der SH innerhalb einer FL-Zellpopulation verschiedene Mutationsmuster der $IgV_{H/L}$ -Gene (Noppe, 1999). Diese Heterogenität nimmt im Verlauf der Erkrankung zunächst zu, wobei der Großteil der bisher durchgeführten Studien lediglich LK-Gewebe untersuchte. Im Laufe des Krankheitsprogresses, bei Transformation zu aggressiven Lymphomen, oder innerhalb von Rezidivpopulationen wurde demgegenüber eine Verminderung der intraklonalen Heterogenität bzw. eine Homogenisierung der Lymphompopulation, sowie das Sistieren der SH beobachtet (Aarts, 2001; Adam, 2007; Matolcsy, 1999; Ottensmeier, 1998; Zhu, 1994).

Das FL^{°2} von Patient 1 zeichnete sich durch das höchste Maß an intraklonaler Heterogenität der in dieser Arbeit untersuchten Lymphome aus. So besaß die maligne LK-Population keine gemeinsame, die KM-Population eine gemeinsame Mutation. Dabei lag die durchschnittliche Mutationsrate unter den LK-Klonen um rund 40% höher als unter den KM-Klonen. Dennoch wurde im LK-Gewebe auch eine unmutierte Wildtypsequenz nachgewiesen. Im FL^{°1} von Patient 2 lag die durchschnittliche Mutationsrate der posttherapeutischen KM-Klone um rund 15% höher als in der prätherapeutischen LK-Population. Die LK-Klone teilten 27 identische Mutationen, die KM-Klone lediglich 22. Beide Populationen hatten 20 Mutationen gemeinsam. Somit wies das posttherapeutische KM-Gewebe eine höhere intraklonale Heterogenität auf, als das prätherapeutische LK-Gewebe. Beim FL^{°1} von Patient 3 zeigten sich in den prätherapeutischen LK- und KM-Geweben gegenläufige Verhältnisse wie im posttherapeutischen LK- und KM-Gewebepaar. Prätherapeutisch lag in der KM-Population eine höhere durchschnittliche Mutationsrate vor, posttherapeutisch in der LK-Population. Unter der gesamten Rezidiv-Population ließ sich dabei anders als in den prätherapeutischen LK-Geweben eine Homogenisierung der Mutationsmuster, verdeutlicht durch eine Verdoppelung der gemeinsamen Mutationen von fünf auf zehn, feststellen.

Damit fanden sich sowohl im LK-, als auch im KM-Kompartiment aller untersuchten Lymphome prä- wie posttherapeutisch Hinweise auf „ongoing somatic hypermutations“. Die mannigfaltigsten Mutationsmuster wurden dabei im FL^{°2} von Patient 1 gefunden, wobei die Hypermutationsmaschinerie aufgrund der höheren Heterogenität der LK-Klone dort stärker aktiviert

erschien, als im KM. Beim FL^o1 von Patient 2 und 3 wurden die am stärksten mutierten Klone im prä- bzw. posttherapeutisch KM-Gewebe gefunden. Diese Beobachtung führte zu dem Schluss, dass die Hypermutationsmaschinerie nicht nur im LK, sondern auch im KM-Gewebe aktiv war (Bognar, 2005). Somit könnte die SH im FL unabhängig von der morphologischen Struktur der GCs ablaufen. Denkbar ist die Bedeutung der LK-GC für die Pathogenese des FL als Ort der Induktion der SH, eine Vermutung, die vor allem durch das Auffinden der unmutierten Wildtypsequenz des LK-Gewebes von Patient 1 unterstrichen wird (Greeve, 2003; Muramatsu, 1999; Ziegner, 1994). Auch fügt sich diese Vorstellung in die Betrachtung des FLs als Immundysregulation ein (Stamatopoulos, 2000). Im weiteren Verlauf der Erkrankung könnte die Hypermutationsmaschinerie, als Folge der deregulierten GC-Reaktion, konstitutiv exprimiert werden, bis die SH-induzierte Mutagenese den betroffenen Klon in einen funktionell autarken Zustand versetzt hat (Hagen, 2006; Noppe, 1999; Perez-Duran, 2007). In diesem Zusammenhang ist die positive Korrelation zwischen der Expression des Leitenenzym der SH, der AID und dem Ausmaß der SH im FL interessant (Hardianti, 2004). Die AID ist der einzige B-Zell-spezifische Faktor für die SH und die CSR. Ihre Expression in t(14;18)-positive B-Zellen könnte zusammen mit fehlerhaft wirkenden genetischen Reparatursystemen den Motor einer lymphomagenen Mutagenese darstellen (de Yébenes, 2006; Hakem, 2008; Jin, 2006; Karlsson, 2003; Kuo, 1999). So wurde die konstitutive Überexpression und aberrante Aktivität der AID für verschiedene NHL, auch für das FL, nachgewiesen (Halldórsdóttir, 2008; Pasqualucci, 1998; Rossi, 2006; Szereday, 2000). Die damit einhergehende genomische Instabilität könnte die zytogenetische Heterogenität der FL-Evolution erklären. So würde eine aberrante AID-induzierte Mutagenese abhängig vom genetischen Programm der Zelle und damit vom Zugang der AID zur jeweils transkribierten DNS die verschiedenen „zytogenetischen Wege“ der FL-Genese bedingen (Bende, 2007; Biagi, 2002; Dickerson, 2003; Greaves, 1986; Höglund, 2004). In dieser Hinsicht wären die verschiedenen histologischen Grade des FLs als Manifestation der unterschiedlichen Effizienz der lymphomagenen AID-induzierten Mutagenese zu interpretieren (Adam, 2007; Ottensmeier, 1998). Die Mutationslast der IgV_H-Segmente würde dabei als Indikator für die Effizienz der transformierenden Prozesse dienen, wobei FL^o2 ein höheres Maß an SH als FL^o1 benötigen, um einen funktionell autarken Zustand, den malignen Phänotypen, zu erlangen. Dass die posttherapeutischen KM-Gewebe von Patient 2 und 3 eine höhere Heterogenität der klonalen Mutationsmuster aufwiesen, als die prätherapeutischen LK-Gewebe, wurde ferner als Hinweis auf eine Reservoirfunktion des KM für FL-Klone während der Therapie gedeutet.

6.2.2 Migration zwischen den Kompartimenten

Verschiedene Gruppen haben die Sequenzanalyse der IgV_{H/L}-Gene zur Erschließung der Ätiopathogenese des FLs angewandt (*Aarts, 2001; Adam, 2007; Noppe, 1999; Oeschger, 2002*). Diese Methode erscheint sinnvoll, da das FL analog zu seinem benignen Gegenstück, den GCL, die SH fortführt und weil das FL per definitionem monoklonalen Ursprungs ist (*Harris, 1999; Jaffe, 2009*). Somit lassen sich auf der Grundlage der intraklonalen Heterogenität die zeitliche und räumliche Verzweigung der einzelnen malignen Klone rekonstruieren. Dadurch wurde bereits gezeigt, dass t(14;18)-positive B-Zellen Keimzentren infiltrieren und zwischen den verschiedenen Keimzentren eines LKs, als auch zwischen verschiedenen LK migrieren bzw. disseminieren. Diesem Umstand wurde mit der Einführung des Begriffes des „in-situ“-FLs Rechnung getragen (*Cong, 2002*). Dabei erfolgt parallel zum histologischen Grad des FLs eine Zunahme der Dissemination. In der vorliegenden Studie wurde die Migration des FLs über das LK-Kompartiment hinaus analysiert. Bognar et al. wiesen einen klonalen Austausch zwischen LK und KM während der FL-Evolution nach und unterstrichen damit die (unterschätzte) Bedeutung des KMs für das FL (*Bognar, 2005*). Wegen der Eigenheiten der verwendeten „Clustal W Methode“ zur Sequenzanalyse waren sie allerdings nicht im Stande Richtung und Zeitpunkt einer möglichen Migration zu bestimmen (*Thompson, 1994*). Deshalb wurde für diese Studie ein neues Analyseverfahren entwickelt, das es erlaubte, Migrationsrichtung und deren relativen Zeitpunkt zu rekapitulieren. Darauf basierend wurden in den drei untersuchten Tumorentitäten Hinweise für eine initiale, frühe FL-Infiltration des KMs durch gering mutierte, also früh entstandene LK-Klone gefunden. Dabei war die am geringsten mutierte Sequenz immer die eines LK-Klons aus prätherapeutischem LK-Gewebe. Dieser Befund korreliert mit der allgemein akzeptierten Vorstellung des FLs als Immundysregulation mit Beginn der neoplastischen Transformation im LK. Folglich wurde durch das initiale Migrationsverhalten der untersuchten FL die nodale GC-Reaktion als eine obligate Voraussetzung für die Initiierung der FL-Evolution bestätigt. Dass bereits FL-Klone mit einer geringen Mutationslast aus dem LK in das KM migrierten, findet in der klinischen Beobachtung der KM-Infiltration bei der Mehrheit der FL-Patienten Zuspruch (*Bernstein, 2009; Cameron, 1993; Canioni, 2004; Federico, 2000*). Somit könnte die Veränderung von Homing-Eigenschaften eine eher frühe funktionelle Erweiterung der zellulären Kompetenzen im Rahmen der FL-Genese darstellen (*Bowman, 2000; Drillenburg, 2000; Picker, 1988*). Analog zur Deregulation der GC-Reaktion durch t(14;18)-positive Zellen unterstreicht diese Annahme die These vom „niche-hijacking“, also des Konzepts der Ausnutzung physiologischer Milieus durch (prä-)neoplastische Zellen, als Modalität der Entwicklung und Progression maligner Neoplasmen (*Kaplan, 2007; Li,*

2006; Psaila, 2009; Shiozawa, 2008). Bezüglich der pathogenetisch wichtigen Bedeutung einer Veränderung von Homing-Eigenschaften im FL zeigten Genexpressions-Studien am FL u.a. Veränderungen des CXCR4/SDF-1-Rezeptor-Gens an (Husson, 2002; LeBrun, 2008). Dessen Ligand, das Chemokin CXCL12, bewirkt physiologischerweise die Restriktion von Zentroblasten in den dunklen Zonen der Keimzentren, aber auch die Restriktion von HSC in ihrer KM-Nische (Adams, 2006; Allen, 2007). Folglich stellt das von MSC sezernierte CXCL12 einen möglichen ätiologischen, attraktiven Faktor bei der Migration von FL-Zellen vom LK in das KM dar (Amé-Thomas, 2007; Roorda, 2009). Eine wechselseitige Beziehung zwischen der funktionellen Nische des nodalen GCs und der HSC-Nische des KMs und damit die Erschließung neuer histologischer Mikroenvironments könnte, basierend auf der obig beschriebenen These der transkriptionsbestimmten, AID-bedingten Mutagenese, die Heterogenität der Entität des FLs erklären (Ghia, 2000; Schedin, 2004; Shiozawa, 2008). Insbesondere bei dem FL^o2 von Patient 1 wurden in diesem Sinne, neben dem initialen, vom LK ins KM gerichteten Migrationsereignis, auch spätere Migrationen in beiden Richtungen postuliert. Innerhalb dieser prätherapeutischen Lymphompopulation herrschte ferner das größte Ausmaß an intraklonaler Heterogenität vor. Diese Beobachtung wurde, im Vergleich zu den Situationen der FL^o1 von Patient 2 und 3, als Manifestation der pathogenetischen Notwendigkeit nach einem hochaktivierten Zustand der Mutationsmaschinerie im FL^o2 Lymphom von Patient 1 interpretiert.

6.2.3 Rolle von Antigenen und Bedeutung des B-Zellrezeptors

Im Rahmen der adaptiven Immunantwort werden während der GC-Reaktion Punktmutationen in die BCR-kodierenden Gene eingeführt, um die Bindungsstärke gegenüber Antigenen zu verändern (Allen, 2007; Jacob, 1991). Zellen die hierbei einen BCR mit höherer Affinität zum Antigen exprimieren, werden positiv selektiert, wohingegen eine Verschlechterung der Bindungsstärke zur Apoptoseinduktion führt (Liu, 1989; Rajewsky, 1996). Die Analyse dieser Neumutationen lässt Rückschlüsse auf eine mögliche Antigenabhängigkeit der SH und auf die strukturelle Intaktheit des exprimierten BCRs zu (Bahler, 1992a; Bahler, 1992b; Kuppers, 1999; Noppe, 1999; Ottensmeier, 1998; Zelenetz, 1992). Analog zu diesen Untersuchungen am physiologischen Gegenstücken wurden solche Mutationsanalysen auch am FL durchgeführt, mit uneinheitlichen Ergebnissen (Chang, 1994; Lossos, 2000; Pascual, 1994; Shlomchik, 1987; Shlomchik, 1989). So ist die AG-Abhängigkeit der SH im FL umstritten. Möglicherweise ist sie während früher Phasen der FL-Genese als Induktor der AID-Expression essentiell. Die Notwendigkeit der Expression eines intakten BCRs scheint gegenüber der Abhängigkeit von Antigenen allerdings gesichert. Unter den

in der vorliegenden Studie untersuchten Lymphompopulationen fand sich kein einziger Klon, der einen statistisch signifikanten Überhang an R-Mutationen in den CDRs akquiriert hatte. Damit war eine AG-Abhängigkeit der Lymphomagenese für keines der FL nachweisbar. Es muss in Betracht gezogen werden, dass auf AG-bestimmte SH hinweisende Mutationsmuster zu Beginn der FL-Evolution vorhanden waren, allerdings durch die Persistenz t(14;18)-positiven Klone in GCs und dem damit einhergehenden Erwerb weiterer Mutationen unkenntlich gemacht wurden. Demgegenüber wiesen alle analysierten LK-Klone der FL von Patient 1 und 2 FRW-Mutationsmuster auf, die statistisch signifikant einer nicht-zufälligen Selektion von S-Mutationen genügten und damit auf die strukturelle Intaktheit der exprimierten BCRs schließen ließen. Mit den KM-Klonen verhielt es sich diesbezüglich uneinheitlich. Im FL^o2 von Patient 1 konnte die strukturelle Integrität der BCRs lediglich für drei KM-Klone nachgewiesen werden. Die verbleibenden KM-Klone wiesen Stopcodone auf. (Da der LK-Klon b4 keine Mutationen aufwies, erübrigte sich für ihn die Analyse.) Auch im FL^o1 von Patient 2 waren lediglich drei KM-Klone mit einem intakten BCR ausgestattet. Die anderen KM-Sequenzen beinhalteten ebenfalls ein Stopcodon. Beim FL^o1 von Patient 3 waren sowohl unter den prä- und posttherapeutischen LK-, als auch unter den prä- und posttherapeutischen KM-Klonen Stopcodone enthalten, die damit kein funktionell intaktes BCR-Molekül exprimierten. Im Vergleich der gesamten prä- zur gesamten posttherapeutischen Populationen zeigte sich dabei eine Reduktion der intakten Expression von BCRs nach Therapie um nahezu 50%. Dies galt analog für das FL von Patient 2 und stimmt mit den Ergebnissen anderer Gruppen überein (*Aarts, 2001; Adam, 2007; Ottensmeier, 1998*). Diese beobachtete BCR-Divergenz zwischen den LK- und KM-Klonen, sowie zwischen den prä- und posttherapeutischen Geweben, könnte darauf hinweisen, dass die SH und die FL-Klone im LK stärker auf die BCRs angewiesen sind, als im KM. Folglich könnten KM-spezifische Nischenfunktionen wirksam sein, welche die mögliche BCR-Restriktion von FL-Zellen attenuieren. Weiter wurden durch die antiproliferative CTX beim FL^o1 von Patient 3 verstärkt BCR-unabhängige KM-Klone selektiert, welche die Rezidivpopulation des LKs erzeugten. Diese exprimierten, abgesehen von Klon o8, ebenfalls keinen intakten BCR mehr.

6.2.4 Ausbeutung nischenspezifischer Funktionen

Der These vom „niche-hijacking“ zufolge würde die Erschließung der KM-Nische durch FL-Zellen deren funktionelle Erweiterung um KM-spezifische Eigenschaften entsprechen (*Li, 2006; Shiozawa, 2008*). Eine wesentliche Aufgabe des KMs liegt in der Nischenfunktion für hämatopoetische Stammzellen (HSC) begründet (*Arai, 2004; Reya, 2001*). Im Vergleich von prä-

und posttherapeutischen FL-Geweben von Patient 3 wurde eine mögliche Persistenz eines primär im LK detektierten Klons (m2) im ersten posttherapeutischen KM (x3) offenkundig. Das Mutationsmuster dieses LK-Klons war weiter in allen anderen Sequenzen enthalten und stellte die am geringsten mutierte und damit früheste Manifestation des FLs dar. Ferner wurden sowohl für andere hämatologische Malignome, wie das Multiple Myelom, oder die akute myeloische Leukämie, als auch für Karzinome, wie das Mammakarzinom, die Existenz von KM-residenten Tumorstammzellen postuliert und teils bewiesen (*Braun, 2000; Li, 2006; Matsui, 2004; Misaghian, 2009; Reya, 2001*). Auch deutet ein Fallbericht der Übertragung eines FLs durch allogene Knochenmarktransplantation auf eine solche Ausbeutung der KM-Nischenfunktion durch das FL hin (*Hart, 2007*). Bereits Aarts et al. zeigten mit ihrer an LK-Geweben durchgeführten Sequenzanalyse des FLs und der Schlussfolgerung der „subclone selection rather than clonal evolution“ die Bedeutung der klonalen Persistenz für Rezidive des FLs auf (*Aarts, 2001*). Da diese Studie allerdings kein KM-Gewebe umfasste, konnte diese Nische nicht als möglicher Ort der FL-Persistenz erschlossen werden.

Intensive Wechselwirkungen zwischen FL-Zellen und MSC, FDC, FRC und T-Lymphozyten wurden beschrieben (*Amé-Thomas, 2007; Freedman, 1992; Freedman, 1994; Thomazy, 2003; Umetsu, 1990; Vega, 2002*). Zusammen mit der Abhängigkeit der Prognose des FLs vom nicht-malignen lympho-retikulären und mesenchymalen Begleitinfiltrat, den beschriebenen Veränderungen der Homingeigenschaften und des grundlegenden Erfolges von Stammzelltransplantationen zur Therapie des FLs, erscheint die im FL von Patient 2 und 3 postulierte Klonpersistenz als ein entscheidender ätiologischer Faktor des Rezidivs dieser Entität (*Amé-Thomas, 2007; Dave, 2004; Drillenburg, 2000; Freedman, 1999; Husson, 2002; LeBrun, 2008; Lejeune, 2009; van Besien, 2003*). Die jeweilige Nische des FLs übt bestimmenden Einfluss auf die Genexpression in den malignen Klonen aus. Daraus resultiert möglicherweise die kontextabhängige Effizienz der AID-getriebenen Mutagenese und die obig beschriebenen nicht-zufälligen „zytogenetischen pathways“ der FL-Evolution und -Transformation, sowie letztlich die Heterogenität der gesamten Entität. Da innerhalb der hier untersuchten FL-Populationen nahezu ausschließlich KM-Klone Stopcodone aufwiesen, wurde gefolgert, dass die KM-Nische die Klone möglicherweise von der BCR-Restriktion befreit (*Bende, 2007; Berglund, 2007; Biagi, 2002; Höglund, 2004*). Da das KM die physiologische Nische der HSCs darstellt, die sich durch einen Zustand der „quiescence“-Induktion auszeichnet, wurde in dieser Studie das Auftreten von FL-KM-Sequenzen mit Stopcodon als Indikator für die Induktion eines die BCR-Restriktion attenuierenden G1/G0-Arrestes durch das KM-Microenvironment interpretiert (*Arai, 2004; Reya, 2001*). Folglich

könnten FL-Zellen das KM im Sinne eines „niche-hijackings“ deregulieren, indem sie „parasitär“ die KM-Funktion der Aufrechterhaltung von HSCs ausnutzen (*Shiozawa, 2008*). Speziell die nachgewiesene Anziehung von FL-Zellen durch MSC, sowie die Induktion der Differenzierung MSC durch FL-Zellen können als wichtige Hinweise auf eine grundlegende ätiopathogenetische Bedeutung der KM-Nischenderegulation für das FL betrachtet werden (*Amé-Thomas, 2007; Roorda, 2009*). Diesbezüglich erscheint die Interpretation der Tumorzellevolution des FLs von Patient 2 und v.a. Patient 3 als folgerichtig. Demnach wandern FL-Zellen sehr früh während der FL-Entwicklung in das KM, verharren dort und überdauern im Zustand des postulierten, „parasitär“ angeeigneten „quiescence-Status“ konventionelle, auf proliferierende Zellen abzielende Therapiemodalitäten. Die anderen, stärker mutierten und somit stärker proliferierenden Lymphomzellen würden durch die auf proliferierende Zellen abzielende Therapiemodalität der CTX eliminiert. Posttherapeutisch bedingen solche stammzellähnlichen FL-Zellen in diesem Modell des FLs das klinisch manifeste, nodale Rezidiv. Die Erfolge der sog. „targeted therapy“ des FLs mit beispielsweise Rituximab gegenüber konventioneller CTX unterstreichen die Plausibilität des Zusammenhangs der Aneignung eines „quiescence-Status“ im KM und einer möglichen einhergehenden Indolenz gegenüber CTX (*Fisher, 2005; Herold, 2007; Marcus, 2008; Sacchi, 2007; Salles, 2008*).

Damit unterstreicht das in dieser Arbeit aufgezeigte Modell zur klonalen Migration des FLs zwischen dem LK- und KM-Kompartiment, u.a. wegen der Exposition der (prä)malignen Zellen gegenüber neuen histologischen Wechselwirkungskontexten und der damit einhergehenden Induktion neuer Transkriptionsprogramme, die Ziele einer (aberranten) AID-Mutagenese sein können, den unterschätzten, die Pathogenese des FLs determinierenden und modulierenden Einfluss dieses interkompartimentären klonalen Austauschs. Das Konzept einer möglichen Persistenz- und Reservoirfunktion des KMs für (prä-)maligne FL-Klone wird dabei durch die Existenz von diskordanten Lymphomen unterstützt, bei denen im KM ein FL und im LK ein klonal verwandtes, (bereits) transformiertes DLBCL vorliegt (*Kremer, 2003*).

6.2.5 Epikrise

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie und dem dargelegten Mehrstufenkonzept der FL-Evolution benötigen t(14;18)-positive (prä-)maligne B-Zellen die nodale GC-Umgebung für die Initiierung der AID-bedingten SH. Dabei spielen BCR-vermittelte Signale eine entscheidende Rolle, da sie genetische Programme der physiologischen GCL-typischen Differenzierungsprozesse aktivieren. Anders als im gesunden GCL ist die AID-Aktivität in den t(14;18)-positiven B-Zellen

wegen der bcl-2-Deregulation aberrant und treibt die Mutagenese transkribierter DNS im Kontext der für die jeweilige B-lymphozytäre Entwicklungsstufe typischen genetischen Programme voran. Daraus resultiert möglicherweise in noch gering mutierten (prä-)malignen LK-Klonen als ein frühes, entscheidendes Ereignis eine Veränderung der Homing-Restriktion. Es würde die detektierte, frühe Infiltration und Ausnutzung der CXCL12-sezernierenden und HSC-erhaltenden KM-Nische im Laufe der FL-Evolution folgen. Die dort resident gewordenen FL-Klone wären gemessen an den Ergebnissen der Mutationsmusteranalyse der hier untersuchten Fälle im Stande, auch ohne die morphologische Struktur der GCs die SH fortzuführen. Ferner würden diese initial vom LK ins KM migrierten, KM-residenten Klone während CTX in der KM-Nische, womöglich in einem stammzellähnlichen Zustand, erworben durch KM-induzierten G1/G0-Arrest, wie er für HSC typisch ist, persistieren. Nach erfolgter Therapie fände ausgehend von dieser KM-Population die „retrograde Re-Besiedelung“ des LK-Kompartiments statt, so dass eine KM-Infiltration im FL sehr wahrscheinlich die Ursache für das häufige, für diese Entität typische Rezidiv darstellt. Ferner scheinen wechselseitige klonale Migrationsbewegungen zwischen dem LK- und KM-Kompartiment während der FL-Evolution pathogenetisch bedeutende Ereignisse zu sein. In der post-therapeutischen FL-Population könnte die Abhängigkeit der FL-Klone vom Einfluss des BCRs abnehmen, da die Rezidivklone aus der KM-Population des FLs stammen, die in der KM-Nische einen „quiescence-Status“ und damit eine Befreiung von der BCR-Restriktion erworben haben.

7 Zusammenfassung

Das folliculäre Lymphom ist das häufigste low-grade Non-Hodgkin-Lymphom. Es ist durch die Deregulation der nodalen Keimzentrumsreaktion durch prä-maligne B-Zellen, welche die fakultativ-präkanzerotische Translokation t(14;18) tragen, charakterisiert (Harris, 1994; Harris, 1999). Parallel zur zunächst partiellen Infiltration einzelner Lymphknoten steigt die Zahl genetischer Läsionen und damit die aberrante funktionelle Kompetenz dieser Zellen (Bende, 2007; Cong, 2002). Die klonale Migration zwischen verschiedenen Keimzentren eines LKs, weiter zwischen verschiedenen Lymphknoten, sowie letztlich die Dissemination in extranodale Kompartimente folgen, wobei sich der „komplette maligne Phänotyp“ des FLs graduell im Sinne einer „multistep Tumorigenese“ manifestiert (Oeschger, 2002). Damit liegt bei Diagnosestellung in der klinisch manifesten Phase des FLs in der Regel eine systemische Erkrankung vor. Häufig finden sich maligne Infiltrate im Knochenmark, was dem Ann-Arbor Stadium IV entspricht (Canioni, 2004; Jaffe, 2009). Dennoch ist die Rolle des Knochenmarks im ätiopathogenetischen Modell des FLs lediglich unzureichend charakterisiert. Durch die Erkenntnisse von Bogner et. al deutete sich möglicherweise eine Schlüsselrolle des KMs für das FL an (Bogner, 2005).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der FL-Infiltration des Knochenmarks und eines möglichen Austauschs zwischen den Tumorzellpopulationen des Lymphknotens und des Knochenmarks zu untersuchen. Dazu wurde die klonale Beziehung einzelner FL-Zellen aus dem LK und dem KM basierend auf der intraklonalen Heterogenität der Mutationsmuster ihrer VH-Gene analysiert. Die Ergebnisse dienen der Berechnung von Stammbäumen der Tumorzellevolution, mit deren Hilfe die Migration von FL-Zellen zwischen den Kompartimenten und damit die inter-kompartimentäre Evolution nachvollzogen wurde.

Ferner sollte untersucht werden, ob die Mutationsmuster der VH-Gene der malignen FL-Klone Hinweise für eine anhaltende somatische Hypermutation („ongoing mutations“) zeigten, wie es physiologischer Weise unter Keimzentrums-B-Lymphozyten der Fall ist. Insbesondere sollten die KM-Klone betrachtet werden, um eventuelle Hinweise auf SH außerhalb der dafür typischen Funktionsräume, nämlich den Keimzentren von LK, zu erhalten.

Schließlich sollte untersucht werden, ob die malignen Klone strukturell intakte B-Zellrezeptoren exprimierten. Auch wurde eine mögliche antigenabhängige Reifung dieser Rezeptoren analysiert, wie es physiologischer Weise zur Optimierung der Affinität gegenüber Antigenen der Fall ist. Dabei wurde besonders auf mögliche Unterschiede zwischen den LK- und KM-Populationen geachtet.

Es wurden drei FL des Grades I oder II mit synchronem Befall des LKs und des KMs

morphologisch und immunhistochemisch reevaluiert. Im zweiten und dritten Fall lagen zusätzlich Gewebe des posttherapeutischen Verlaufs vor. Aus jedem Gewebe wurde DNS von bis zu 15 FL-Klonen sequenziert. Durch einen eigens entwickelten, mathematisch-statistischen Algorithmus wurde aus den Mutationsmustern der VH-Gene die Tumorzellevolution rekonstruiert. Mittels eines etablierten Algorithmus wurde ferner die BCR-Analyse durchgeführt.

Es konnten bidirektionale Migrationsbewegungen zwischen LK und KM zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorzellevolution nachgewiesen werden. Dabei war die initiale Migration stets vom LK in das KM gerichtet. Der am geringsten mutierte, prätherapeutische Klon war immer im LK lokalisiert. Posttherapeutisch fanden sich Hinweise auf eine retrograde Reinfiltration des LKs durch einen KM-Klon. Dieser KM-Klon persistierte dabei während der Therapie des FLs im KM, war gering mutiert und leitete sich von frühen, prätherapeutischen Migrationsereignissen aus dem LK ins KM ab.

Sowohl innerhalb der LK-, als auch der KM-Population der Patienten fanden sich die für die somatische Hypermutation typischen Mutationsmuster der VH-Gene und die daraus resultierende intraklonale Heterogenität. Damit schien der Prozess der SH auch im KM, ohne die dafür typische Morphologie der Keimzentren aktiv gewesen zu sein. Die BCR-Analyse ergab, dass kein Klon der untersuchten FL antigenabhängige Mutationsmuster aufwies. Weiter zeigten deutlich mehr LK-Klone als KM-Klone Mutationsmuster, die für die strukturelle Intaktheit des BCRs und damit für die Abhängigkeit der Klone von der BCR-Expression sprachen. Ferner war diese Abhängigkeit im posttherapeutischen Klonkollektiv im Vergleich zu den prätherapeutischen Verhältnissen herabgesetzt.

Damit stellt das KM möglicherweise eine unterschätzte Nische für die Evolution und Persistenz des FLs dar, was die primäre Unzulänglichkeit konventioneller Therapiemodalitäten bezüglich Kuration erklären könnte. Rezidive wären aufgrund der Modalität der retrograden, posttherapeutischen Reinfiltration des LKs durch KM-residente, stammzellartige FL-Klone mit geringer proliferativer Aktivität obligat. Gemäß der in dieser Studie entwickelten Erklärungsmodelle sind solche hypothetischen KM-persistenten, CTX-indolenten „Tumorstammzellen“ das Resultat früher Migrationsereignisse von gering mutierten, LK-residenten FL-Klonen ins KM. Dort nutzen sie möglicherweise analog zur Dereglulation der Keimzentrumsreaktion des LKs, deregulierend die „quiescence-Qualität“ der HSC-Nische des KMs aus.

8 Literaturverzeichnis

- Aarts W., Bende R., Bossenbroek J., Pals S., van Noesel C.; Variable heavy-chain gene analysis of follicular lymphomas: subclone selection rather than clonal evolution over time; *Blood*; 98, (2001), 238.
- Aarts W., Bende R., Vaandrager J., Kluin P., Langerak A., Pals S., van Noesel C.; In situ analysis of the variable heavy chain gene of an igm/igg-expressing follicular lymphoma: evidence for interfollicular trafficking of tumor cells; *American Journal of Pathology*; 160, (2002), 883.
- Adam P., Schoof J., Hartmann M., Schwarz S., Puppe B., Ott M., Rosenwald A., Ott G., Muller-Hermelink H.K.; Cell migration patterns and ongoing somatic mutations in the progression of follicular lymphoma; *Cytogenet. Genome Res.*; 118, (2007), 328-336.
- Adams G.B., Scadden D.T.; The hematopoietic stem cell in its place; *Nat. Immunol.*; 7, (2006), 333-337.
- Adams J., Cory S.; Life-or-death decisions by the bcl-2 protein family; *Trends Biochem. Sci.*; 26, (2001), 61-66.
- Adams J., Cory S.; The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival; *Science*; 281, (1998), 1322.
- Advani R., Rosenberg S.A., Horning S.J.; Stage i and ii follicular non-hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of no initial therapy; *J. Clin. Oncol.*; 22, (2004), 1454-1459.
- Agrawal A., Schatz D.G.; Rag1 and rag2 form a stable postcleavage synaptic complex with dna containing signal ends in v(dj) recombination; *Cell*; 89, (1997), 43-53.
- Allen C., Okada T., Cyster J.; Germinal-center organization and cellular dynamics; *Immunity*; 27, (2007), 190-202.
- Alt F.W., Blackwell T.K., DePinho R.A., Reth M.G., Yancopoulos G.D.; Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation; *Immunol. Rev.*; 89, (1986), 5-30.
- Alt F.W., Oltz E.M., Young F., Gorman J., Taccioli G., Chen J.; Vdj recombination; *Immunol. Today*; 13, (1992), 306-314.
- Alvaro T., Lejeune M., Salvadó M., Lopez C., Jaén J., Bosch R., Pons L.E.; Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients; *J. Clin. Oncol.*; 24, (2006), 5350-5357.
- Amé-Thomas P., Maby-El Hajjami H., Monvoisin C., Jean R., Monnier D., Caulet-Maugendre S., Guillaudeux T., Lamy T., Fest T., Tarte K.; Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor b-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis; *Blood*; 109, (2007), 693-702.
- Anderson J.R., Armitage J.O., Weisenburger D.D.; Epidemiology of the non-hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations; *Ann. Oncol.*; 9, (1998), 717-720.
- Anderson K.C., Bates M.P., Slaughenhaupt B.L., Pinkus G.S., Schlossman S.F., Nadler L.M.; Expression of human b cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human b cell differentiation; *Blood*; 63, (1984), 1424-1433.
- Anderson T., Chabner B.A., Young R.C., Berard C.W., Garvin A.J., Simon R.M., DeVita V.T.J.; Malignant lymphoma. 1. the histology and staging of 473 patients at the national cancer institute; *Cancer*; 50, (1982), 2699-2707.

- Antonsson B.; Bax and other pro-apoptotic bcl-2 family" killer-proteins" and their victim the mitochondrion; *Cell Tissue Res.*; 306, (2001), 347-361.
- Arai F., Hirao A., Ohmura M., Sato H., Matsuoka S., Takubo K., Ito K., Koh G.Y., Suda T.; Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche; *Cell*; 118, (2004), 149-161.
- Arcinas M., Heckman C.A., Mehew J.W., Boxer L.M.; Molecular mechanisms of transcriptional control of bcl-2 and c-myc in follicular and transformed lymphoma; *Cancer Res.*; 61, (2001), 5202-5206.
- Ardeschna K.M., Smith P., Norton A., Hancock B.W., Hoskin P.J., MacLennan K.A., Marcus R.E., Jelliffe A., Vaughan G., Hudson; Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial; *Lancet*; 362, (2003), 516-522.
- Aster J.C., Kobayashi Y., Shiota M., Mori S., Sklar J.; Detection of the t(14;18) at similar frequencies in hyperplastic lymphoid tissues from american and japanese patients; *Am. J. Pathol.*; 141, (1992), 291-299.
- Aurora V., Winter J.; Current controversies in follicular lymphoma; *Blood Rev.*; 20, (2006), 179-200.
- Bahler D., Levy R.; Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 89, (1992a), 6770.
- Bahler D., Zelenetz A., Chen T., Levy R.; Antigen selection in human lymphomagenesis; *Cancer Res.*; 52, (1992b), 5547-5547.
- Baird A., Gerstein R., Berg L.; The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development; *Curr. Opin. Immunol.*; 11, (1999), 157-166.
- Bakhshi A., Jensen J.P., Goldman P., Wright J.J., McBride O.W., Epstein A.L., Korsmeyer S.J.; Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around jh on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18; *Cell*; 41, (1985), 899-906.
- Balkwill F., Charles K.A., Mantovani A.; Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease; *Cancer Cell*; 7, (2005), 211-217.
- Barr F.G.; Translocations, cancer and the puzzle of specificity; *Nat. Genet.*; 19, (1998), 121-124.
- Barreto V., Reina-San-Martin B., Ramiro A.R., McBride K.M., Nussenzweig M.C.; C-terminal deletion of aid uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion; *Mol. Cell*; 12, (2003), 501-508.
- Barreto V.M., Pan-Hammarstrom Q., Zhao Y., Hammarstrom L., Misulovin Z., Nussenzweig M.C.; Aid from bony fish catalyzes class switch recombination; *J. Exp. Med.*; 202, (2005), 733-738.
- Bassing C.H., Swat W., Alt F.W.; The mechanism and regulation of chromosomal v(d)j recombination; *Cell*; 109 Suppl, (2002), 45-55.
- Bastion Y., Brice P., Haioun C., Sonet A., Salles G., Marolleau J., Espinouse D., Reyes F., Gisselbrecht C., Coiffier B.; Intensive therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in 60 patients with poor-prognosis follicular lymphoma; *Blood*; 86, (1995), 3257.
- Basu U., Chaudhuri J., Alpert C., Dutt S., Ranganath S., Li G., Schrum J.P., Manis J.P., Alt F.W.; The aid antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase a phosphorylation; *Nature*;

438, (2005), 508-511.

- Bell D.A., Liu Y., Cortopassi G.A.; Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers; *J. Natl. Cancer Inst.*; 87, (1995), 223-224.
- Bende R.J., Smit L.A., van Noesel C.J.M.; Molecular pathways in follicular lymphoma; *Leukemia*; 21, (2007), 18-29.
- Bende R.J., van Maldegem F., van Noesel C.J.M.; Chronic inflammatory disease, lymphoid tissue neogenesis and extranodal marginal zone b-cell lymphomas; *Haematologica*; 94, (2009), 1109-1123.
- Bennett M., Farrer-Brown G., Henry K., Jelliffe A.; Classification of non-hodgkin's lymphomas; *Lancet*; 2, (1974), 405-406.
- Berglund M., Enblad G., Thunberg U., Amini R., Sundström C., Roos G., Erlanson M., Rosenquist R., Larsson C., Lagercrantz S.; Genomic imbalances during transformation from follicular lymphoma to diffuse large b-cell lymphoma; *Mod. Pathol.*; 20, (2007), 63-75.
- Bernstein S.H., Burack W.R.; The incidence, natural history, biology, and treatment of transformed lymphomas; *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; (2009), 532-541.
- Bertheas M.F., Bachy M., Magaud J.P., Rimokh R., Vasselon C., Berger F., Oriol P.C., Jaubert J., Reynaud J., Brizard C.P.; T(2;18) and t(18;22) variant chromosomal translocations in b cell malignancies; *Leuk. Lymphoma*; 8, (1992), 197-200.
- Bertoli L.F., Kubagawa H., Borzillo G.V., Burrows P.D., Schreeder M.T., Carroll A.J., Cooper M.D.; Bone marrow origin of a b-cell lymphoma; *Blood*; 72, (1988), 94-101.
- Bertz H., Illerhaus G., Veelken H., Finke J.; Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for patients with relapsed or refractory lymphomas: comparison of high-dose conventional conditioning versus fludarabine-based reduced-intensity regimens; *Ann. Oncol.*; 13, (2002), 135-139.
- Biagi J., Seymour J.; Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation; *Blood*; 99, (2002), 4265.
- Billroth T.; Neue Beobachtungen über die feinere Struktur pathologisch veränderter Lymphdrüsen; *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin, Berlin*; 21, (1861), 423-443.
- Bloomfield C.D., Arthur D.C., Frizzera G., Levine E.G., Peterson B.A., Gajl-Peczalska K.J.; Nonrandom chromosome abnormalities in lymphoma; *Cancer Res.*; 43, (1983), 2975-2984.
- Bognar A., Csernus B., Reiniger L., Szepesi A., Toth E., Kopper L., Matolcsy A.; Clonal selection in the bone marrow involvement of follicular lymphoma; *Leukemia*; 19, (2005), 1656-1662.
- Borner C.; The bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions; *Mol. Immunol.*; 39, (2003), 615-647.
- Bose B., Sinha S.; Problems in using statistical analysis of replacement and silent mutations in antibody genes for determining antigen-driven affinity selection; *Immunology*; 116, (2005), 172-183.
- Bosga-Bouwer A.G., van Imhoff G.W., Boonstra R., van der Veen A., Haralambieva E., van den Berg A., de Jong B., Krause V., Palmer M.C., Coupland R.; Follicular lymphoma grade 3b includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive; *Blood*; 101, (2003), 1149-1154.

- Bouillet P., Strasser A.; Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death; *J. Cell. Sci.*; 115, (2002), 1567.
- Bowman E., Campbell J., Soler D., Dong Z., Manlongat N., Picarella D., Hardy R., Butcher E.; Developmental switches in chemokine response profiles during b cell differentiation and maturation; *Journal of Experimental Medicine*; 191, (2000), 1303.
- Brandtzaeg P., Farstad I., Haraldsen G.; Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track; *Immunol. Today*; 20, (1999), 267-277.
- Bransteitter R., Pham P., Scharff M.D., Goodman M.F.; Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded dna but requires the action of rnaase; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 100, (2003), 4102-4107.
- Braun S., Kantenich C., Janni W., Hepp F., de Waal J., Willgeroth F., Sommer H., Pantel K.; Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients; *J. Clin. Oncol.*; 18, (2000), 80-86.
- Brice P., Bastion Y., Lepage E., Brousse N., Haïoun C., Moreau P., Straetmans N., Tilly H., Tabah I., Solal-Céligny P.; Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the groupe d'etude des lymphomes folliculaires. groupe d'etude des lymphomes de l'adulte; *J. Clin. Oncol.*; 15, (1997), 1110-1117.
- Brittinger G.; Prospektive multizentrische Studie der Kieler Lymphomgruppe: Über die klinische Bedeutung der Kiel-klassifikation der malignen Non-Hodgkin-Lymphome; *Ann. Hematol.*; 36, (1978), 111-116.
- Buchner H.; Über die bakterientötende Wirkung des zellenfreien Blutserums; *Zbl. Bakt. I Abt. Orig.*; 5, (1889), 1.
- Bucsky P.; Hodgkin's disease: the sternberg-reed cell; *Blut*; 55, (1987), 413-420.
- Butcher E., Picker L.; Lymphocyte homing and homeostasis; *Science*; 272, (1996), 60.
- Butcher E., Williams M., Youngman K., Rott L., Briskin M.; Lymphocyte trafficking and regional immunity; *Adv. Immunol.*; 72, (1999), 209-243.
- Byrne G.E.J.; Rappaport classification of non-hodgkin's lymphoma: histologic features and clinical significance; *Cancer Treat Rep*; 61, (1977), 935-944.
- CA.; National cancer institute sponsored study of classifications of non-hodgkin's lymphomas. summary and description of a working formulation for clinical usage; *CA: A Cancer Journal for Clinicians*; 49, (1982), 2112-2135.
- Caldwell R.G., Wilson J.B., Anderson S.J., Longnecker R.; Epstein-barr virus Imp2a drives b cell development and survival in the absence of normal b cell receptor signals; *Immunity*; 9, (1998), 405-411.
- Cameron D.A., Leonard R.C., Mao J.H., Prescott R.J.; Identification of prognostic groups in follicular lymphoma. The Scotland and Newcastle lymphoma group therapy working party; *Leuk. Lymphoma*; 10, (1993), 89-99.
- Canioni D., Brice P., Lepage E., Chababi M., Meignin V., Salles B., Xerri L., Péaud P., Rousselot P., Peuchmaur M.; Bone marrow histological patterns can predict survival of patients with grade 1 or 2 follicular lymphoma: a study from the groupe d'etude des lymphomes folliculaires; *Br. J. Haematol.*; 126, (2004), 364-371.

- Canman C.E., Kastan M.B.; Induction of apoptosis by tumor suppressor genes and oncogenes; *Seminars in Cancer Biology*; 6, (1995), 17-25.
- Carbone P.P., Kaplan H.S., Musshoff K., Smithers D.W., Tubiana M.; Report of the committee on hodgkin's disease staging classification; *Cancer Res.*; 31, (1971), 1860-1861.
- Carreras J., Lopez-Guillermo A., Fox B.C., Colomo L., Martinez A., Roncador G., Montserrat E., Campo E., Banham A.H.; High numbers of tumor-infiltrating foxp3-positive regulatory t cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma; *Blood*; 108, (2006), 2957-2964.
- Casola S., Otipoby K.L., Alimzhanov M., Humme S., Uyttersprot N., Kutok J.L., Carroll M.C., Rajewsky K.; B cell receptor signal strength determines b cell fate; *Nat. Immunol.*; 5, (2004), 317-327.
- Chang B., Casali P.; The cdr1 sequences of a major proportion of human germline ig vh genes are inherently susceptible to amino acid replacement; *Immunol. Today*; 15, (1994), 367-373.
- Chang K., Huang X., Medeiros L.J., Jones D.; Germinal centre-like versus undifferentiated stromal immunophenotypes in follicular lymphoma; *J. Pathol.*; 201, (2003), 404-412.
- Chau I., Jones R., Cunningham D., Wotherspoon A., Maisey N., Norman A.R., Jain P., Bishop L., Horwich A., Catovsky D.; Outcome of follicular lymphoma grade 3: is anthracycline necessary as front-line therapy?; *Br. J. Cancer*; 89, (2003), 36-42.
- Chen M.G., Prosnitz L.R., Gonzalez-Serva A., Fischer D.B.; Results of radiotherapy in control of stage i and ii non-hodgkin's lymphoma; *Cancer*; 43, (1979), 1245-1254.
- Choe J., Li L., Zhang X., Gregory C.D., Choi Y.S.; Distinct role of follicular dendritic cells and t-cells in the proliferation, differentiation, and apoptosis of a centroblast cell line, 13055; *J. Immunol.*; 164, (2000), 56-63.
- Chothia C., Lesk A.M., Gherardi E., Tomlinson I.M., Walter G., Marks J.D., Llewelyn M.B., Winter G.; Structural repertoire of the human vh segments; *J. Mol. Biol.*; 227, (1992), 799-817.
- Cleary M., Smith S., Sklar J.; Cloning and structural analysis of cdnas for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t (14; 18) translocation; *Cell (Cambridge)*; 47, (1986a), 19-28.
- Cleary M.L., Galili N., Sklar J.; Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphomas; *J. Exp. Med.*; 164, (1986b), 315-320.
- Cleary M.L., Sklar J.; Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 82, (1985), 7439-7443.
- Cogliatti S., Schmid U.; Who is who and what was real?; *Swiss Medical Weekly*; 132, (2002), 607-617.
- Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A.; Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability; *Carcinogenesis*; 30, (2009), 1073-1081.
- Cong P., Raffeld M., Teruya-Feldstein J., Sorbara L., Pittaluga S., Jaffe E.; In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection; *Blood*; 99, (2002), 3376.
- Conticello S.G., Thomas C.J.F., Petersen-Mahrt S.K., Neuberger M.S.; Evolution of the aid/apobec family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases; *Mol. Biol. Evol.*; 22, (2005),

367-377.

- Cook G.P., Tomlinson I.M.; The human immunoglobulin vh repertoire; *Immunol. Today*; 16, (1995), 237-242.
- Corcione A., Ottonello L., Tortolina G., Facchetti P., Airoidi I., Guglielmino R., Dadati P., Truini M., Sozzani S., Dallegri F.; Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma b cells; *J. Natl. Cancer Inst.*; 92, (2000), 628-635.
- Corcos D.; Ligand-independent activity of the b cell antigen receptor in physiology and pathology; *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*; 55, (2007), 77-82.
- Cory S.; Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family; *Annu. Rev. Immunol.*; 13, (1995), 513-543.
- Cory S., Jackson J., Adams J.M.; Deletions in the constant region locus can account for switches in immunoglobulin heavy chain expression; *Nature*; 285, (1980), 450-456.
- Coultas L., Strasser A.. The role of the bcl-2 protein family in cancer.; *Seminars in Cancer Biology*; 13, (2003), 115-123.
- Craig F., Foon K.; Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms; *Blood*; 111, (2008), 3941.
- Czuczman M.S.; Controversies in follicular lymphoma: "who, what, when, where, and why?" (not necessarily in that order!); *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; (2006), 303-310.
- Dadi S., Le Noir S., Asnafi V., Beldjord K., Macintyre E.A.; Normal and pathological v(d)j recombination: contribution to the understanding of human lymphoid malignancies; *Adv. Exp. Med. Biol.*; 650, (2009), 180-194.
- Dave S.S., Wright G., Tan B., Rosenwald A., Gascoyne R.D., Chan W.C., Fisher R.I., Braziel R.M., Rimsza L.M., Grogan T.M.; Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells; *N. Engl. J. Med.*; 351, (2004), 2159-2169.
- Davey F.R., Elghetany M.T., Kurec A.S.; Immunophenotyping of hematologic neoplasms in paraffin-embedded tissue sections; *Am. J. Clin. Pathol.*; 93, (1990), 17-26.
- Davies J., Jacob F.; Genetic mapping of the regulator and operator genes of the lac operon; *J. Mol. Biol.*; 36, (1968), 413-417.
- de Boer C.J., Vaandrager J.W., van Krieken J.H., Holmes Z., Kluin P.M., Schuurin E.; Visualization of mono-allelic chromosomal aberrations 3' and 5' of the cyclin d1 gene in mantle cell lymphoma using dna fiber fluorescence in situ hybridization; *Oncogene*; 15, (1997), 1599-1603.
- de Jong D.; Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors; *J. Clin. Oncol.*; 23, (2005), 6358-6363.
- de Jong D., de Boer J.P.; Predicting transformation in follicular lymphoma; *Leuk. Lymphoma*; 50, (2009a), 1406-1411.
- de Jong D., Koster A., Hagenbeek A., Raemaekers J., Veldhuizen D., Heisterkamp S., de Boer J.P., van Glabbeke M.; Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols; *Haematologica*; 94, (2009b), 70-77.
- de Jong D., Voetdijk B.M., Van Ommen G.J., Kluin-Nelemans J.C., Beverstock G.C., Kluin P.M.; Translocation t(14;18) in b cell lymphomas as a cause for defective immunoglobulin production; *J. Exp. Med.*; 169, (1989), 613-624.

- de Yébenes V.G., Ramiro A.R.; Activation-induced deaminase: light and dark sides; *Trends Mol Med*; 12, (2006), 432-439.
- Di Noia J., Neuberger M.; Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation; *Annual Review of Biochemistry*; 76, (2007), 1-22.
- Dickerson S.K., Market E., Besmer E., Papavasiliou F.N.; Aid mediates hypermutation by deaminating single stranded dna; *J. Exp. Med.*; 197, (2003), 1291-1296.
- Dighiero G., Hart S., Lim A., Borche L., Levy R., Miller R.A.; Autoantibody activity of immunoglobulins isolated from b-cell follicular lymphomas; *Blood*; 78, (1991), 581-585.
- Dölken G., Illerhaus G., Hirt C., Mertelsmann R.; Bcl-2/jh rearrangements in circulating b cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases; *J. Clin. Oncol.*; 14, (1996), 1333-1344.
- Dreyer W., Gray W., Hood L.. The genetic, molecular, and cellular basis of antibody formation: some facts and a unifying hypothesis.; *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 32, (1967), 353-367.
- Dreyer W.J., Bennett J.C.; The molecular basis of antibody formation: a paradox; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 54, (1965), 864-869.
- Drillenbug P., Pals S.T.; Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination; *Blood*; 95, (2000), 1900-1910.
- Duesberg P., Li R.; Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations; *Cell Cycle*; 2, (2003), 202-210.
- Dunnick W., Hertz G.Z., Scappino L., Gritzmacher C.; Dna sequences at immunoglobulin switch region recombination sites; *Nucleic Acids Res.*; 21, (1993), 365-372.
- Dyer M.J., Zani V.J., Lu W.Z., O'Byrne A., Mould S., Chapman R., Heward J.M., Kayano H., Jadayel D., Matutes E.; Bcl2 translocations in leukemias of mature b cells; *Blood*; 83, (1994), 3682-3688.
- Early P., Huang H., Davis M., Calame K., Hood L.; An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of dna: vh, d and jh; *Cell*; 19, (1980), 981-992.
- Edelman G.; Antibody structure and molecular immunology; *Science*; 180, (1973), 830-840.
- Egle A., Harris A.W., Bath M.L., O'Reilly L., Cory S.; Vavp-bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia; *Blood*; 103, (2004), 2276-2283.
- Ehlich A., Küppers R.; Analysis of immunoglobulin gene rearrangements in single b cells; *Curr. Opin. Immunol.*; 7, (1995), 281-284.
- Eischen C.M., Weber J.D., Roussel M.F., Sherr C.J., Cleveland J.L.; Disruption of the arf-mdm2-p53 tumor suppressor pathway in myc-induced lymphomagenesis; *Genes Dev.*; 13, (1999), 2658-2669.
- Ersbøll J., Schultz H.B., Pedersen-Bjergaard J., Nissen N.I.; Follicular low-grade non-hodgkin's lymphoma: long-term outcome with or without tumor progression; *Eur. J. Haematol.*; 42, (1989), 155-163.
- Essop M.F., Blakolmer K., Close P.M., Manuel Y.E., Cornelius S.; Analysis of low and high grade b-cell lymphoma subtypes using semi-nested pcr and two primer sets; *Eur. J. Haematol.*; 59, (1997), 136-141.
- Fairbairn L., Cowling G., Reipert B., Dexter T.; Suppression of apoptosis allows differentiation

and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors; *Cell (Cambridge)*; 74, (1993), 823-823.

- Farinha P., Masoudi H., Skinnider B.F., Shumansky K., Spinelli J.J., Gill K., Klasa R., Voss N., Connors J.M., Gascoyne R.D.; Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (lam) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (fl); *Blood*; 106, (2005), 2169-2174.
- Fearon E.R., Vogelstein B.; A genetic model for colorectal tumorigenesis; *Cell*; 61, (1990), 759-767.
- Federico M., Vitolo U., Zinzani P.L., Chisesi T., Clò V., Bellesi G., Magagnoli M., Liberati M., Boccomini C., Niscola P.; Prognosis of follicular lymphoma: a predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases. *Intergruppo Italiano Linfomi*; *Blood*; 95, (2000), 783-789.
- Feller A.C.; Classification and differential diagnosis of nk/t-cell lymphomas; *Verh Dtsch Ges Pathol*; 87, (2003), 43-52.
- Felsenstein J.; Evolutionary trees from dna sequences: a maximum likelihood approach; *J. Mol. Evol.*; 17, (1981), 368-376.
- Fend F., Bock O., Kremer M., Specht K., Quintanilla-Martinez L.; Ancillary techniques in bone marrow pathology: molecular diagnostics on bone marrow trephine biopsies; *Virchows Arch.*; 447, (2005), 909-919.
- Fenton J., Vaandrager J., Aarts W., Bende R., Heering K., van Dijk M., Morgan G., van Noesel C., Schuurin E., Kluin P.; Follicular lymphoma with a novel t(14; 18) breakpoint involving the immunoglobulin heavy chain switch mu region indicates an origin from germinal center b cells; *Blood*; 99, (2002), 716.
- Fisher R.I., LeBlanc M., Press O.W., Maloney D.G., Unger J.M., Miller T.P.; New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma; *J. Clin. Oncol.*; 23, (2005), 8447-8452.
- Fisher S.G., Fisher R.I.; The epidemiology of non-hodgkin's lymphoma; *Oncogene*; 23, (2004), 6524-6534.
- Foote J., Winter G.; Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops; *J. Mol. Biol.*; 224, (1992), 487-499.
- Foulds L.; The experimental study of tumor progression: a review; *Cancer Res.*; 14, (1954), 327-339.
- Freedman A.S., Munro J.M., Morimoto C., McIntyre B.W., Rhyhart K., Lee N., Nadler L.M.; Follicular non-hodgkin's lymphoma cell adhesion to normal germinal centers and neoplastic follicles involves very late antigen-4 and vascular cell adhesion molecule-1; *Blood*; 79, (1992), 206-212.
- Freedman A.S., Neuberger D., Mauch P., Soiffer R.J., Anderson K.C., Fisher D.C., Schlossman R., Alyea E.P., Takvorian T., Jallow H.; Long-term follow-up of autologous bone marrow transplantation in patients with relapsed follicular lymphoma; *Blood*; 94, (1999), 3325-3333.
- Freedman A.S., Saporito L., Rhyhart K., Morimoto C., Nadler L.M.; Adhesion of follicular lymphoma cells to lymphoid germinal centers--a potential mechanism of tumor cell homing following autologous transplantation; *Leuk. Lymphoma*; 13, (1994), 47-52.
- Friedberg J.W., Taylor M.D., Cerhan J.R., Flowers C.R., Dillon H., Farber C.M., Rogers E.S., Hainsworth J.D., Wong E.K., Vose J.M.; Follicular lymphoma in the United States: first report of

- the national lymphocare study; *J. Clin. Oncol.*; 27, (2009), 1202-1208.
- Fukita Y., Jacobs H., Rajewsky K.; Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription; *Immunity*; 9, (1998), 105-114.
 - Fukuhara S.; Significance of 14q translocations in non-hodgkin lymphomas; *Virchows Arch B Cell Pathol*; 29, (1978), 99-106.
 - Gandhi M.K., Marcus R.E.; Follicular lymphoma: time for a re-think?; *Blood Rev.*; 19, (2005), 165-178.
 - Gauss G.H., Lieber M.R.; Mechanistic constraints on diversity in human v(d)j recombination; *Mol. Cell. Biol.*; 16, (1996), 258-269.
 - Ghia P., Caligaris-Cappio F.; The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade b-cell neoplasms; *Adv. Cancer Res.*; 79, (2000), 157-173.
 - Gilliland D.; Hematologic malignancies; *Curr. Opin. Hematol.*; 8, (2001), 189.
 - Gopal A.K., Gooley T.A., Maloney D.G., Petersdorf S.H., Eary J.F., Rajendran J.G., Bush S.A., Durack L.D., Golden J., Martin P.J.; High-dose radioimmunotherapy versus conventional high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for relapsed follicular non-hodgkin lymphoma: a multivariable cohort analysis; *Blood*; 102, (2003), 2351-2357.
 - Graninger W.B., Seto M., Boutain B., Goldman P., Korsmeyer S.J.; Expression of bcl-2 and bcl-2-ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells; *J. Clin. Invest.*; 80, (1987), 1512-1515.
 - Grawunder U., West R.B., Lieber M.R.; Antigen receptor gene rearrangement; *Curr. Opin. Immunol.*; 10, (1998), 172-180.
 - Greaves M.F.; Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes; *Science*; 234, (1986), 697-704.
 - Greer C.E., Lund J.K., Manos M.M.; Pcr amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies; *PCR Methods Appl.*; 1, (1991a), 46-50.
 - Greer C.E., Peterson S.L., Kiviat N.B., Manos M.M.; Pcr amplification from paraffin-embedded tissues. effects of fixative and fixation time; *Am. J. Clin. Pathol.*; 95, (1991b), 117-124.
 - Greer C.E., Wheeler C.M., Manos M.M.; Sample preparation and pcr amplification from paraffin-embedded tissues; *PCR Methods Appl.*; 3, (1994), S113-22.
 - Greeve J., Philipsen A., Krause K., Klapper W., Heidorn K., Castle B.E., Janda J., Marcu K.B., Parwaresch R.; Expression of activation-induced cytidine deaminase in human b-cell non-hodgkin lymphomas; *Blood*; 101, (2003), 3574-3580.
 - Grothues D., Cantor C.R., Smith C.L.; Pcr amplification of megabase dna with tagged random primers (t-pcr); *Nucleic Acids Res.*; 21, (1993), 1321-1322.
 - Guadagnolo B.A., Li S., Neuberg D., Ng A., Hua L., Silver B., Stevenson M.A., Mauch P.; Long-term outcome and mortality trends in early-stage, grade 1-2 follicular lymphoma treated with radiation therapy; *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*; 64, (2006), 928-934.
 - Gunvén P., Klein G., Klein E., Norin T., Singh S.; Surface immunoglobulins on burkitt's lymphoma biopsy cells from 91 patients; *Int. J. Cancer*; 25, (1980), 711-719.
 - Ha C.S., Kong J.S., McLaughlin P., Tucker S.L., Fayad L.E., Hess M.A., Wilder R.B., Cabanillas F., Cox J.D.; Stage iii follicular lymphoma: long-term follow-up and patterns of failure; *Int. J.*

- Radiat. Oncol. Biol. Phys.; 57, (2003), 748-754.
- Hagen L., Peña-Diaz J., Kavli B., Otterlei M., Slupphaug G., Krokan H.E.; Genomic uracil and human disease; *Exp. Cell Res.*; 312, (2006), 2666-2672.
 - Hakem R.; Dna-damage repair; the good, the bad, and the ugly; *EMBO J.*; 27, (2008), 589-605.
 - Halldórsdóttir A.M., Frühwirth M., Deutsch A., Aigelsreiter A., Beham-Schmid C., Agnarsson B.A., Neumeister P., Richard Burack W.; Quantifying the role of aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma; *Leuk. Res.*; 32, (2008), 1015-1021.
 - Hanahan D., Weinberg R.; The hallmarks of cancer; *Cell*; 100, (2000), 57-70.
 - Hardianti M.S., Tatsumi E., Syampurnawati M., Furuta K., Saigo K., Nakamachi Y., Kumagai S., Ohno H., Tanabe S., Uchida M.; Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular lymphoma: association between aicda expression and ongoing mutation in fl; *Leukemia*; 18, (2004), 826-831.
 - Hardy R.R., Carmack C.E., Shinton S.A., Kemp J.D., Hayakawa K.; Resolution and characterization of pro-b and pre-pro-b cell stages in normal mouse bone marrow; *J. Exp. Med.*; 173, (1991), 1213-1225.
 - Harris N., Jaffe E., Stein H., Banks P., Chan J., Cleary M., Delsol G., De Wolf-Peeters C., Falini B., Gatter K.; A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group.; *Blood*; 84, (1994), 1361.
 - Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J., Flandrin G., Muller-Hermelink H.K., Vardiman J., Lister T.A., Bloomfield C.D.; World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting-airline house, virginia, november 1997.; *J Clin Oncol.*; 17, (1999), 3835-49.
 - Hart J., Turner A.R., Larratt L., Russell J., Franko B., Frantz C., Paonessa T., Mansoor A., Lai R.; Transmission of a follicular lymphoma by allogeneic bone marrow transplantation--evidence to support the existence of lymphoma progenitor cells; *Br. J. Haematol.*; 136, (2007), 166-167.
 - Heckman C.A., Mehew J.W., Boxer L.M.; Nf-kappab activates bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells; *Oncogene*; 21, (2002), 3898-3908.
 - Herold M., Haas A., Srock S., Nesper S., Al-Ali K.H., Neubauer A., Dölken G., Naumann R., Knauf W., Freund M.; Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an east german study group hematology and oncology study; *J. Clin. Oncol.*; 25, (2007), 1986-1992.
 - Hiddemann W., Kneba M., Dreyling M., Schmitz N., Lengfelder E., Schmits R., Reiser M., Metzner B., Harder H., Hegewisch-Becker S.; 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*; 106, (2005), 3725-3732.
 - Hillson J.L., Karr N.S., Oppliger I.R., Mannik M., Sasso E.H.; The structural basis of germline-encoded vh3 immunoglobulin binding to staphylococcal protein a; *J. Exp. Med.*; 178, (1993), 331-336.
 - Hiom K., Melek M., Gellert M.; Dna transposition by the rag1 and rag2 proteins: a possible source of oncogenic translocations; *Cell*; 94, (1998), 463-470.

- Hoang T.; The origin of hematopoietic cell type diversity; *Oncogene*; 23, (2004), 7188-7198.
- Hochberg F., Miller D.; Primary central nervous system lymphoma; *J. Neurosurg.*; 68, (1988), 835-853.
- Hockenbery D., Nuñez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J.; Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death; *Nature*; 348, (1990), 334-336.
- Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., Milliman C.L., Korsmeyer S.J.; Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis; *Cell*; 75, (1993), 241-251.
- Hodgkin T.; On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen; *Med Chir Trans.*; 17, (1832), 69-97.
- Höglund M., Sehn L., Connors J.M., Gascoyne R.D., Siebert R., Säll T., Mitelman F., Horsman D.E.; Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas; *Genes Chromosomes Cancer*; 39, (2004), 195-204.
- Horning S.J.; Natural history of and therapy for the indolent non-hodgkin's lymphomas; *Semin. Oncol.*; 20, (1993), 75-88.
- Horning S.J., Rosenberg S.A.; The natural history of initially untreated low-grade non-hodgkin's lymphomas; *N. Engl. J. Med.*; 311, (1984), 1471-1475.
- Hozumi N., Tonegawa S.; Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 73, (1976), 3628-3632.
- Humphrey J.H., Grennan D., Sundaram V.; The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on them; *Eur. J. Immunol.*; 14, (1984), 859-864.
- Husson H., Carideo E.G., Neuberg D., Schultze J., Munoz O., Marks P.W., Donovan J.W., Chillemi A.C., O'Connell P., Freedman A.S.; Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center b cells using cDNA arrays; *Blood*; 99, (2002), 282-289.
- Iqbal J., Liu Z., Deffenbacher K., Chan W.C.; Gene expression profiling in lymphoma diagnosis and management; *Best Pract Res Clin Haematol*; 22, (2009), 191-210.
- Iwasato T., Shimizu A., Honjo T., Yamagishi H.; Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination; *Cell*; 62, (1990), 143-149.
- Jacob J., Kelsoe G., Rajewsky K., Weiss U.; Intracлонаl generation of antibody mutants in germinal centres; *Nature*; 354, (1991), 389-392.
- Jaffe E., Harris N., Stein H., Vardiman J. (Ed.); *Who classification of tumours: Pathology & Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.*; IARC Press, Lyon, 2001, third edition.
- Jaffe E.S.; The 2008 who classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research; *Hematology*; (2009), 523-531.
- Jaffe E.S., Chan J.K., Su I.J., Frizzera G., Mori S., Feller A.C., Ho F.C.; Report of the workshop on nasal and related extranodal angiocentric t/natural killer cell lymphomas. definitions, differential diagnosis, and epidemiology; *Am. J. Surg. Pathol.*; 20, (1996), 103-111.
- Jaffe E.S., Shevach E.M., Frank M.M., Berard C.W., Green I.; Nodular lymphoma--evidence for origin from follicular b lymphocytes; *N. Engl. J. Med.*; 290, (1974), 813-819.

- Jardin F., Sahota S.S., Ruminy P., Parmentier F., Picquenot J.M., Rainville V., Buchonnet G., Leprêtre S., Tilly H., Bastard C.; Novel ig v gene features of t(14;18) and t(3;14) de novo diffuse large b-cell lymphoma displaying germinal center-b cell like and non-germinal center-b cell like markers; *Leukemia*; 20, (2006), 2070-2074.
- Jeanmougin F., Thompson J.D., Gouy M., Higgins D.G., Gibson T.J.; Multiple sequence alignment with clustal x; *Trends Biochem. Sci.*; 23, (1998), 403-405.
- Jerne N.; The natural selection theory of antibody formation; *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*; 41, (1955), 849-856.
- Jin Z., May W.S., Gao F., Flagg T., Deng X.; Bcl2 suppresses dna repair by enhancing c-myc transcriptional activity; *J. Biol. Chem.*; 281, (2006), 14446-14456.
- Johnson G., Wu T.T.; Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot; *Nucleic Acids Res.*; 28, (2000), 214-218.
- Kaplan R.N., Psaila B., Lyden D.; Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells; *Trends Mol Med*; 13, (2007), 72-81.
- Karlsson A., Deb-Basu D., Cherry A., Turner S., Ford J., Felsher D.W.; Defective double-strand dna break repair and chromosomal translocations by myc overexpression; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 100, (2003), 9974-9979.
- Karube K., Guo Y., Suzumiya J., Sugita Y., Nomura Y., Yamamoto K., Shimizu K., Yoshida S., Komatani H., Takeshita M.; Cd10-mum1+ follicular lymphoma lacks bcl2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features; *Blood*; 109, (2007), 3076-3079.
- Katzenberger T., Ott G., Klein T., Kalla J., Muller-Hermelink H., Ott M.; Cytogenetic alterations affecting bcl6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3b with a diffuse large b-cell component; *American Journal of Pathology*; 165, (2004), 481.
- Kelsey S.M., Newland A.C., Hudson G.V., Jelliffe A.M.; A british national lymphoma investigation randomised trial of single agent chlorambucil plus radiotherapy versus radiotherapy alone in low grade, localised non-hodgkins lymphoma; *Med. Oncol.*; 11, (1994), 19-25.
- Kerr J., Wyllie A., Currie A.; Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics; *Br. J. Cancer*; 26, (1972), 239.
- Kinoshita K., Tashiro J., Tomita S., Lee C.G., Honjo T.; Target specificity of immunoglobulin class switch recombination is not determined by nucleotide sequences of s regions; *Immunity*; 9, (1998), 849-858.
- Kirchner H., Oppenheim J.J.; Stimulation of chicken lymphocytes in a serum-free medium; *Cell. Immunol.*; 3, (1972), 695-699.
- Kirsch I.R., Lista F.; Lymphocyte-specific genomic instability and risk of lymphoid malignancy; *Semin. Immunol.*; 9, (1997), 207-215.
- Kneba M., Eick S., Herbst H., Willigeroth S., Pott C., Bolz I., Bergholz M., Neumann C., Stein H., Krieger G.; Frequency and structure of t(14;18) major breakpoint regions in non-Hodgkin's lymphomas typed according to the Kiel classification: analysis by direct DNA sequencing; *Cancer Res.*; 12, (1991), 3243-50.
- Knecht H., Brousset P., Bachmann E., Pallesen G., Odermatt B.F.; Expression of human recombination activating genes (rag-1 and rag-2) in lymphoma; *Leuk. Lymphoma*; 15, (1994), 399-403.

- Knezevich S., Ludkovski O., Salski C., Lestou V., Chhanabhai M., Lam W., Klasa R., Connors J.M., Dyer M.J.S., Gascoyne R.D.; Concurrent translocation of bcl2 and myc with a single immunoglobulin locus in high-grade b-cell lymphomas; *Leukemia*; 19, (2005), 659-663.
- Kohler R.; The background to eduard buchner's discovery of cell-free fermentation; *Journal of the History of Biology*; 4, (1971), 35-61.
- Komori T., Okada A., Stewart V., Alt F.W.; Lack of n regions in antigen receptor variable region genes of tdt-deficient lymphocytes; *Science*; 261, (1993), 1171-1175.
- Kondo E., Yoshino T.; Expression of apoptosis regulators in germinal centers and germinal center-derived b-cell lymphomas: insight into b-cell lymphomagenesis; *Pathol. Int.*; 57, (2007), 391-397.
- Korsmeyer S.; Bcl-2: a repressor of lymphocyte death.; *Immunol. Today*; 13, (1992a), 285.
- Korsmeyer S.J.; Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death; *Blood*; 80, (1992b), 879-886.
- Kotani A., Kakazu N., Tsuruyama T., Okazaki I., Muramatsu M., Kinoshita K., Nagaoka H., Yabe D., Honjo T.; Activation-induced cytidine deaminase (aid) promotes b cell lymphomagenesis in emu-cmyc transgenic mice; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 104, (2007), 1616-1620.
- Kremer M., Spitzer M., Mandl-Weber S., Stecker K., Schmidt B., Höfler H., Quintanilla-Martínez L., Fend F.; Discordant bone marrow involvement in diffuse large b-cell lymphoma: comparative molecular analysis reveals a heterogeneous group of disorders; *Lab. Invest.*; 83, (2003), 107-114.
- Kunkel E., Butcher E.; Plasma-cell homing; *Nature Reviews Immunology*; 3, (2003), 822-829.
- Kuo M.L., Shiah S.G., Wang C.J., Chuang S.E.; Suppression of apoptosis by bcl-2 to enhance benzene metabolites-induced oxidative dna damage and mutagenesis: a possible mechanism of carcinogenesis; *Mol. Pharmacol.*; 55, (1999), 894-901.
- Küppers R.; Mechanisms of b-cell lymphoma pathogenesis; *Nat. Rev. Cancer*; 5, (2005), 251-262.
- Küppers R., Dalla-Favera R.; Mechanisms of chromosomal translocations in b cell lymphomas; *Oncogene*; 20, (2001), 5580-5594.
- Kuppers R., Klein U., Hansmann M., Rajewsky K.; Cellular origin of human b-cell lymphomas; *New England Journal of Medicine*; 341, (1999), 1520.
- Kyle R.A.; Multiple myeloma: review of 869 cases; *Mayo Clin. Proc.*; 50, (1975), 29-40.
- Lagresle C., Bella C., Daniel P.T., Krammer P.H., Defrance T.; Regulation of germinal center b cell differentiation. role of the human apo-1/fas (cd95) molecule; *J. Immunol.*; 154, (1995), 5746-5756.
- Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D.H.; Isolation, characterization, and expression in escherichia coli of the dna polymerase gene from thermus aquaticus; *J. Biol. Chem.*; 264, (1989), 6427-6437.
- LeBrun D., Baetz T., Foster C., Farmer P., Sidhu R., Guo H., Harrison K., Somogyi R., Groller L.D., Feilotter H.; Predicting outcome in follicular lymphoma by using interactive gene pairs; *Clin. Cancer Res.*; 14, (2008), 478-487.
- Lederberg J.; Ontogeny of the clonal selection theory of antibody formation; *Annals of the New York Ac. of Sc*; 546, (1988), 175-182.

- Lee A., Desravines S., Hsu E.; Igh diversity in an individual with only one million b lymphocytes; *Dev. Immunol.*; 3, (1993), 211-222.
- Lee V.K.; Quick medical terminology: a self- teaching guide; *Family & Community Health*; 17, (1994), 77-78.
- Leich E., Salaverria I., Bea S., Zettl A., Wright G., Moreno V., Gascoyne R.D., Chan W., Braziel R.M., Rimsza L.M.; Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations; *Blood*; 114, (2009), 826-834.
- Lejeune M., Alvaro T.; Clinicobiological, prognostic and therapeutic implications of the tumor microenvironment in follicular lymphoma; *Haematologica*; 94, (2009), 16-21.
- Lennert K., Stein H., Kaiserling E.; Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata; *Br. J. Cancer Suppl.*; 2, (1975), 29-43.
- Lestou V.S., Ludkovski O., Connors J.M., Gascoyne R.D., Lam W.L., Horsman D.E.; Characterization of the recurrent translocation t(1;1)(p36.3;q21.1-2) in non-hodgkin lymphoma by multicolor banding and fluorescence in situ hybridization analysis; *Genes Chromosomes Cancer*; 36, (2003), 375-381.
- Levine E.G., Arthur D.C., Frizzera G., Peterson B.A., Hurd D.D., Bloomfield C.D.; There are differences in cytogenetic abnormalities among histologic subtypes of the non-hodgkin's lymphomas; *Blood*; 66, (1985), 1414-1422.
- Levy R., Levy S., Cleary M.L., Carroll W., Kon S., Bird J., Sklar J.; Somatic mutation in human b-cell tumors; *Immunol. Rev.*; 96, (1987), 43-58.
- Levy S., Mendel E., Kon S., Avnur Z., Levy R.; Mutational hot spots in ig v region genes of human follicular lymphomas; *J. Exp. Med.*; 168, (1988), 475-489.
- Levy Y., Brouet J.; Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center b cells by induction of the bcl-2 protein.; *Journal of Clinical Investigation*; 93, (1994), 424.
- Li L., Neaves W.B.; Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters; *Cancer Res.*; 66, (2006), 4553-4557.
- Lieber M., Yu K., Raghavan S.; Roles of nonhomologous dna end joining, v (d) j recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations; *DNA Repair (Amst.)*; 5, (2006), 1234-1245.
- Lieberon R., Ong J., Shi X., Eckhardt L.; Immunoglobulin gene transcription ceases upon deletion of a distant enhancer.; *EMBO J.*; 14, (1995), 6229.
- Limpens J., de Jong D., van Krieken J.H., Price C.G., Young B.D., van Ommen G.J., Kluin P.M.; Bcl-2/jh rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia; *Oncogene*; 6, (1991), 2271-2276.
- Limpens J., Stad R., Vos C., de Vlaam C., de Jong D., van Ommen G.J., Schuurin E., Kluin P.M.; Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood b cells of normal individuals; *Blood*; 85, (1995), 2528-2536.
- Lindenmann J.; Origin of the terms 'antibody' and 'antigen'; *Scand. J. Immunol.*; 19, (1984), 281-285.
- Liu Y., de Bouteiller O., Fugier-Vivier I.; Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers; *Curr. Opin. Immunol.*; 9, (1997), 256-262.
- Liu Y., Hernandez A.M., Shibata D., Cortopassi G.A.; Bcl2 translocation frequency rises with age

- in humans; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 91, (1994), 8910-8914.
- Liu Y.J., Joshua D.E., Williams G.T., Smith C.A., Gordon J., MacLennan I.C.; Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres; *Nature*; 342, (1989), 929-931.
 - Lo Coco F., Gaidano G., Louie D.C., Offit K., Chaganti R.S., Dalla-Favera R.; P53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma; *Blood*; 82, (1993), 2289-2295.
 - Loken M., Shah V., Dattilio K., Civin C.; Flow cytometric analysis of human bone marrow. ii. normal b lymphocyte development; *Blood*; 70, (1987a), 1316.
 - Loken M., Shah V., Dattilio K., Civin C.; Flow cytometric analysis of human bone marrow: i. normal erythroid development; *Blood*; 69, (1987b), 255.
 - López-Giral S., Quintana N.E., Cabrerizo M., Alfonso-Pérez M., Sala-Valdés M., De Soria V.G.G., Fernández-Rañada J.M., Fernández-Ruiz E., Muñoz C.; Chemokine receptors that mediate b cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in b cell chronic lymphocytic leukemia and non-hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination; *J. Leukoc. Biol.*; 76, (2004), 462-471.
 - Lopez-Guillermo A., Cabanillas F., McDonnell T.I., McLaughlin P., Smith T., Pugh W., Hagemester F., Rodriguez M.A., Romaguera J.E., Younes A.; Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma; *Blood*; 93, (1999), 3081-3087.
 - Lopez-Guillermo A., Montserrat E., Bosch F., Terol M., Campo E., Rozman C.; Applicability of the international index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma; *J. Clin. Oncol.*; 12, (1994), 1343-1348.
 - Lossos I.S., Tibshirani R., Narasimhan B., Levy R.; The inference of antigen selection on ig genes; *J. Immunol.*; 165, (2000), 5122-5126.
 - Lukes R., Collins R.; Immunologic characterization of human malignant lymphomas.; *Cancer*; 34, (1974), 1488-1503.
 - Mac Manus M., Hoppe R.; Is radiotherapy curative for stage i and ii low-grade follicular lymphoma? results of a long-term follow-up study of patients treated at stanford university; *Journal of Clinical Oncology*; 14, (1996), 1282.
 - MacLennan I.; Germinal centers; *Annu. Rev. Immunol.*; 12, (1994), 117-139.
 - Macon W.R., Levy N.B., Kurtin P.J., Salhany K.E., Elkhalfa M.Y., Casey T.T., Craig F.E., Vnencak-Jones C.L., Gulley M.L., Park J.P.; Hepatosplenic alphabeta t-cell lymphomas: a report of 14 cases and comparison with hepatosplenic gammadelta t-cell lymphomas; *Am. J. Surg. Pathol.*; 25, (2001), 285-296.
 - Magrath I.; The pathogenesis of burkitt's lymphoma; *Adv. Cancer Res.*; 55, (1990), 133-270.
 - Manis J., Tian M., Alt F.; Mechanism and control of class-switch recombination; *Trends Immunol.*; 23, (2002), 31-39.
 - Mann R.B., Berard C.W.; Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method; *Hematol Oncol*; 1, (1983), 187-192.
 - Marculescu R., Vanura K., Montpellier B., Roulland S., Le T., Navarro J., Jäger U., McBlane F., Nadel B.; Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures; *DNA Repair (Amst.)*; 5, (2006), 1246-1258.
 - Marcus R., Imrie K., Solal-Celigny P., Catalano J.V., Dmoszynska A., Raposo J.C., Offner F.C.,

- Gomez-Codina J., Belch A., Cunningham D.; Phase iii study of r-cvp compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma; *J. Clin. Oncol.*; 26, (2008), 4579-4586.
- Marin M., Hsu B., Stephens L., Brisbay S., McDonnell T.; The functional basis of c-myc and bcl-2 complementation during multistep lymphomagenesis in vivo; *Exp. Cell Res.*; 217, (1995), 240-247.
 - Masuzawa Y., Osawa T., Inoue K., Nojima S.; Effects of various mitogens on the phospholipid metabolism of human peripheral lymphocytes; *Biochim. Biophys. Acta*; 326, (1973), 339-344.
 - Matolcsy A.; High-grade transformation of low-grade non-hodgkin's lymphomas: mechanisms of tumor progression; *Leuk. Lymphoma*; 34, (1999), 251-259.
 - Matolcsy A., Casali P., Warnke R.A., Knowles D.M.; Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated bcl-2 gene; *Blood*; 88, (1996), 3937-3944.
 - Matolcsy A., Schattner E.J., Knowles D.M., Casali P.; Clonal evolution of b cells in transformation from low- to high-grade lymphoma; *Eur. J. Immunol.*; 29, (1999), 1253-1264.
 - Matsuda F., Honjo T.; Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus; *Adv. Immunol.*; 62, (1996), 1-29.
 - Matsui W., Huff C.A., Wang Q., Malehorn M.T., Barber J., Tanhehco Y., Smith B.D., Civin C.I., Jones R.J.; Characterization of clonogenic multiple myeloma cells; *Blood*; 103, (2004), 2332-2336.
 - McBride K., Gazumyan A., Woo E., Barreto V., Robbiani D., Chait B., Nussenzweig M.; Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 103, (2006), 8798.
 - McBride K.M., Barreto V., Ramiro A.R., Stavropoulos P., Nussenzweig M.C.; Somatic hypermutation is limited by crm1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase; *J. Exp. Med.*; 199, (2004), 1235-1244.
 - McDonnell T.J., Deane N., Platt F.M., Nunez G., Jaeger U., McKearn J.P., Korsmeyer S.J.; Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended b cell survival and follicular lymphoproliferation; *Cell*; 57, (1989), 79-88.
 - McDonnell T.J., Korsmeyer S.J.; Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18); *Nature*; 349, (1991), 254-256.
 - McHeyzer-Williams M.G., Ahmed R.; B cell memory and the long-lived plasma cell; *Curr. Opin. Immunol.*; 11, (1999), 172-179.
 - Meeker T., Lowder J., Cleary M.L., Stewart S., Warnke R., Sklar J., Levy R.; Emergence of idiotype variants during treatment of b-cell lymphoma with anti-idiotypic antibodies; *N. Engl. J. Med.*; 312, (1985), 1658-1665.
 - Merino R., Ding L., Veis D., Korsmeyer S., Nunez G.; Developmental regulation of the bcl-2 protein and susceptibility to cell death in b lymphocytes; *EMBO J.*; 13, (1994), 683.
 - Metcalf D.; Regulation of hemopoiesis.; *Nouvelle revue française d'hématologie*; 20, (1978), 521.
 - Meyer-Hermann M.; Are t cells at the origin of b cell lymphomas?; *J. Theor. Biol.*; 244, (2007), 656-669.
 - Misaghian N., Ligresti G., Steelman L.S., Bertrand F.E., Bäsecke J., Libra M., Nicoletti F.,

- Stivala F., Milella M., Tafuri A.; Targeting the leukemic stem cell: the holy grail of leukemia therapy; *Leukemia*; 23, (2009), 25-42.
- Mohamed A.N., Palutke M., Eisenberg L., Al-Katib A.; Chromosomal analyses of 52 cases of follicular lymphoma with t(14;18), including blastic/blastoid variant; *Cancer Genet. Cytogenet.*; 126, (2001), 45-51.
 - Monroe J.G.; Itam-mediated tonic signalling through pre-bcr and bcr complexes; *Nat. Rev. Immunol.*; 6, (2006), 283-294.
 - Moretti T., Koons B., Budowle B.; Enhancement of pcr amplification yield and specificity using amplitaq gold dna polymerase; *BioTechniques*; 25, (1998), 716-722.
 - Morley N.J., Evans L.S., Goepel J., Hancock B.W.; Transformed follicular lymphoma: the 25-year experience of a uk provincial lymphoma treatment centre; *Oncol. Rep.*; 20, (2008), 953-956.
 - Muller-Hermelink H., Zettl A., Pfeifer W., Ott G.; Pathology of lymphoma progression; *Histopathology*; 38, (2001), 285-306.
 - Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai Y., Honjo T.; Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (aid), a potential rna editing enzyme; *Cell*; 102, (2000), 553-563.
 - Muramatsu M., Sankaranand V., Anant S., Sugai M., Kinoshita K., Davidson N., Honjo T.; Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (aid), a novel member of the rna-editing deaminase family in germinal center b cells; *Journal of Biological Chemistry*; 274, (1999), 18470.
 - Muto T., Muramatsu M., Taniwaki M., Kinoshita K., Honjo T.; Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (aid) gene; *Genomics*; 68, (2000), 85-88.
 - Nagata S.; Fas-mediated apoptosis.; *Adv. Exp. Med. Biol.*; 406, (1996), 119.
 - Nathwani B., Metter G., Miller T., Burke J., Mann R., Barcos M., Kjeldsberg C., Dixon D., Winberg C., Whitcomb C.; What should be the morphologic criteria for the subdivision of follicular lymphomas?; *Blood*; 68, (1986), 837.
 - Natkunam Y.; The biology of the germinal center; *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 5, (2007), 210-215.
 - Nemazee D., Weigert M.; Revising b cell receptors; *J. Exp. Med.*; 191, (2000), 1813-1817.
 - Neuberger M.S., Di Noia J.M., Beale R.C.L., Williams G.T., Yang Z., Rada C.; Somatic hypermutation at a.t pairs: polymerase error versus dutp incorporation; *Nat. Rev. Immunol.*; 5, (2005), 171-178.
 - Nguyen D.X., Bos P.D., Massagué J.; Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization; *Nat. Rev. Cancer*; 9, (2009), 274-284.
 - Niermann C., Schulze H., Hallermann C.; Zur Geschichte der Klassifikation von Lymphomen unter besonderer Berücksichtigung kutaner Lymphome; *Der Hautarzt*; 59, (2008), 394-399.
 - Noppe S.M., Heirman C., Bakkus M.H., Brissinck J., Schots R., Thielemans K.; The genetic variability of the vh genes in follicular lymphoma: the impact of the hypermutation mechanism; *Br. J. Haematol.*; 107, (1999), 625-640.
 - Norton A.J.; Classification of non-hodgkin's lymphomas; *Baillieres Clin. Haematol.*; 9, (1996), 641-652.

- Nowell P.; Tumor progression: a brief historical perspective.; *Seminars in Cancer Biology*; 12, (2002), 261-266.
- O'Brien M.E., Easterbrook P., Powell J., Blackledge G.R., Jones L., MacLennan I.C., Leonard R.C.; The natural history of low grade non-hodgkin's lymphoma and the impact of a no initial treatment policy on survival; *Q. J. Med.*; 80, (1991), 651-660.
- O'Connor B.P., Vogel L.A., Zhang W., Loo W., Shnyder D., Lind E.F., Ratliff M., Noelle R.J., Erickson L.D.; Imprinting the fate of antigen-reactive b cells through the affinity of the b cell receptor; *J. Immunol.*; 177, (2006), 7723-7732.
- Oeschger S., Brauninger A., Kuppers R., Hansmann M.; Tumor cell dissemination in follicular lymphoma; *Blood*; 99, (2002), 2192.
- Orkin S.; Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages; *Nature Reviews Genetics*; 1, (2000), 57-64.
- Osmond D.G., Rolink A., Melchers F.; Murine b lymphopoiesis: towards a unified model; *Immunol. Today*; 19, (1998), 65-68.
- Ott G., Katzenberger T., Lohr A., Kindelberger S., Rüdiger T., Wilhelm M., Kalla J., Rosenwald A., Müller J.G., Ott M.M.; Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3; *Blood*; 99, (2002), 3806-3812.
- Ottensmeier C., Mead G.; Histological transformation of indolent (follicular) lymphoma; *Ann. Oncol.*; 7, (1996), 849-853.
- Ottensmeier C.H., Thompsett A.R., Zhu D., Wilkins B.S., Sweetenham J.W., Stevenson F.K.; Analysis of vh genes in follicular and diffuse lymphoma shows ongoing somatic mutation and multiple isotype transcripts in early disease with changes during disease progression; *Blood*; 91, (1998), 4292-4299.
- Pan L.X., Diss T.C., Peng H.Z., Isaacson P.G.; Clonality analysis of defined b-cell populations in archival tissue sections using microdissection and the polymerase chain reaction; *Histopathology*; 24, (1994), 323-327.
- Parker D.; Stimulation of mouse lymphocytes by insoluble anti-mouse immunoglobulin; *Nature*; 258, (1975), 361 - 363.
- Pascual V., Liu Y.J., Magalski A., de Bouteiller O., Banchereau J., Capra J.D.; Analysis of somatic mutation in five b cell subsets of human tonsil; *J. Exp. Med.*; 180, (1994), 329-339.
- Pasqualucci L., Migliazza A., Fracchiolla N., William C., Neri A., Baldini L., Chaganti R.S., Klein U., Küppers R., Rajewsky K.; Bcl-6 mutations in normal germinal center b cells: evidence of somatic hypermutation acting outside ig loci; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 95, (1998), 11816-11821.
- Payne C., Bernstein C., Bernstein H.; Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, dna damage and signal-transduction pathways; *Leukemia & Lymphoma*; 19, (1995), 43-93.
- Perez-Duran P., de Yébenes V., Ramiro A.; Oncogenic events triggered by aid, the adverse effect of antibody diversification; *Carcinogenesis*; 28, (2007), 2427.
- Peterson B.A., Petroni G.R., Frizzera G., Barcos M., Bloomfield C.D., Nissen N.I., Hurd D.D., Henderson E.S., Sartiano G.P., Johnson J.L.; Prolonged single-agent versus combination chemotherapy in indolent follicular lymphomas: a study of the cancer and leukemia group b; *J. Clin. Oncol.*; 21, (2003), 5-15.

- Petrie H.T., Hugo P., Scollay R., Shortman K.; Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: cd3, cd4, and cd8 acquisition in vivo and in vitro; *J. Exp. Med.*; 172, (1990), 1583-1588.
- Picker L., Medeiros L., Weiss L., Warnke R., Butcher E.; Expression of lymphocyte homing receptor antigen in non-hodgkin's lymphoma.; *Am. J. Pathol.*; 130, (1988), 496.
- Picker L., Weiss L., Medeiros L., Wood G., Warnke R.; Immunophenotypic criteria for the diagnosis of non-hodgkin's lymphoma.; *Am. J. Pathol.*; 128, (1987), 181.
- Pileri S., Leoncini L., Falini B.; Revised european-american lymphoma classification; *Current opinion in oncology*; 7, (1995), 407.
- Pinyol M., Cobo F., Bea S., Jares P., Nayach I., Fernandez P.L., Montserrat E., Cardesa A., Campo E.; P16(ink4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-hodgkin's lymphomas; *Blood*; 91, (1998), 2977-2984.
- Pitti R., Marsters S., Ruppert S., Donahue C., Moore A., Ashkenazi A.; Induction of apoptosis by apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family; *Journal of Biological Chemistry*; 271, (1996), 12687.
- Pittner B., Snow E.; Strength of signal through bcr determines the fate of cycling b cells by regulating the expression of the bcl-2 family of survival proteins; *Cell. Immunol.*; 186, (1998), 55-62.
- Plenderleith I.; Hairy cell leukemia; *Canadian Medical Association Journal*; 102, (1970), 1056.
- Porter R.; Structural studies of immunoglobulins; *Science*; 180, (1973), 713-716.
- Psaila B., Lyden D.; The metastatic niche: adapting the foreign soil; *Nat. Rev. Cancer*; 9, (2009), 285-293.
- Puthalakath H., Villunger A., O'Reilly L., Beaumont J., Coultas L., Cheney R., Huang D., Strasser A.; Bmf: a proapoptotic bh3-only protein regulated by interaction with the myosin v actin motor complex, activated by anoikis; *Science's STKE*; 293, (2001), 1829.
- Quach N., Goodman M.F., Shibata D.; In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during pcr; *BMC Clin Pathol*; 4, (2004), 1.
- Rabkin C.S., Hirt C., Janz S., Dölken G.; T(14;18) translocations and risk of follicular lymphoma; *J. Natl. Cancer Inst. Monographs*; 39, (2008), 48-51.
- Rada C., Di Noia J.M., Neuberger M.S.; Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both ig switching and the a/t-focused phase of somatic mutation; *Mol. Cell*; 16, (2004), 163-171.
- Rada C., Jarvis J.M., Milstein C.; Aid-gfp chimeric protein increases hypermutation of ig genes with no evidence of nuclear localization; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 99, (2002), 7003-7008.
- Raghavan S.C., Swanson P.C., Wu X., Hsieh C., Lieber M.R.; A non-b-dna structure at the bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the rag complex; *Nature*; 428, (2004), 88-93.
- Rajewsky K.; Clonal selection and learning in the antibody system; *Nature*; 381, (1996), 751-758.
- Raju T.N.; The nobel chronicles. 1972: gerald m edelman (b 1929) and rodney r porter (1917-85); *Lancet*; 354, (1999), 1040.
- Rappaport H.; The Rappaport Classification in „Tumors of the hematopoietic system.“, *Armed*

Forces Institute of Pathology, Washington DC, 1966, first edition.

- Repasky J.A.E., Corbett E., Boboila C., Schatz D.G.; Mutational analysis of terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated n-nucleotide addition in v(dj) recombination; *J. Immunol.*; 172, (2004), 5478-5488.
- Revy P., Muto T., Levy Y., Geissmann F., Plebani A., Sanal O., Catalan N., Forveille M., Dufourcq-Labelouse R., Gennery A.; Activation-induced cytidine deaminase (aid) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-igm syndrome (higm2); *Cell*; 102, (2000), 565-575.
- Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L.; Stem cells, cancer, and cancer stem cells; *Nature*; 414, (2001), 105-111.
- Rijlaarsdam J., Willemze R.; Primary cutaneous b-cell lymphomas; *Leukemia & Lymphoma*; 14, (1994), 213-218.
- Rimokh R., Gadoux M., Berthéas M.F., Berger F., Garoscio M., Deléage G., Germain D., Magaud J.P.; Fvt-1, a novel human transcription unit affected by variant translocation t(2;18) (p11;q21) of follicular lymphoma; *Blood*; 81, (1993), 136-142.
- Romaguera J.E., McLaughlin P., North L., Dixon D., Silvermintz K.B., Garnsey L.A., Velasquez W.S., Hagemester F.B., Cabanillas F.; Multivariate analysis of prognostic factors in stage iv follicular low-grade lymphoma: a risk model; *J. Clin. Oncol.*; 9, (1991), 762-769.
- Roorda B.D., ter Elst A., Kamps W.A., de Bont E.S.J.M.; Bone marrow-derived cells and tumor growth: contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells; *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*; 69, (2009), 187-198.
- Rosenwald A.; Dna microarrays in lymphoid malignancies; *Oncology*; 17, (2003), 1743-1755.
- Rossi D., Berra E., Cerri M., Deambrogi C., Barbieri C., Franceschetti S., Lunghi M., Conconi A., Paulli M., Matolcsy A.; Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large b-cell lymphoma; *Haematologica*; 91, (2006), 1405-1409.
- Rot A., von Andrian U.; Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells; *Annual Review of Immunology*; 22, (2004), 891-928.
- Roulland S., Navarro J., Grenot P., Milili M., Agopian J., Montpellier B., Gauduchon P., Lebailly P., Schiff C., Nadel B.; Follicular lymphoma-like b cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis; *J. Exp. Med.*; 203, (2006), 2425-2431.
- Rowley J.D.; Chromosome studies in the non-hodgkin's lymphomas: the role of the 14;18 translocation; *J. Clin. Oncol.*; 6, (1988), 919-925.
- Sacchi S., Pozzi S., Marcheselli L., Bari A., Luminari S., Angrilli F., Merli F., Vallisa D., Baldini L., Brugiattelli M.; Introduction of rituximab in front-line and salvage therapies has improved outcome of advanced-stage follicular lymphoma patients; *Cancer*; 109, (2007), 2077-2082.
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H.; Primer-directed enzymatic amplification of dna with a thermostable dna polymerase; *Science*; 239, (1988), 487-487.
- Saintigny Y., Dumay A., Lambert S., Lopez B.S.; A novel role for the bcl-2 protein family: specific suppression of the rad51 recombination pathway; *EMBO J.*; 20, (2001), 2596-2607.
- Saitou N., Nei M.; The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic

- trees; *Mol. Biol. Evol.*; 4, (1987), 406-425.
- Sakai A., Marti G., Caporaso N., Pittaluga S., Touchman J., Fend F., Raffeld M.; Analysis of expressed immunoglobulin heavy chain genes in familial b-cell; *Blood*; 95, (2000), 1413.
 - Sakano H., Hüppi K., Heinrich G., Tonegawa S.; Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes; *Nature*; 280, (1979), 288-294.
 - Salles G., Mounier N., de Guibert S., Morschhauser F., Doyen C., Rossi J., Haioun C., Brice P., Mahé B., Bouabdallah R.; Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the gela-goelams fl2000 study; *Blood*; 112, (2008), 4824-4831.
 - Sanchez-Beato M., Sanchez-Aguilera A., Piris M.; Cell cycle deregulation in b-cell lymphomas; *Blood*; 101, (2003), 1220.
 - Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.; Dna sequencing with chain-terminating inhibitors; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 74, (1977), 5463-5467.
 - Schedin P., Elias A.; Multistep tumorigenesis and the microenvironment; *Breast Cancer Res.*; 6, (2004), 93-101.
 - Schmitt C., Balogh B., Grundt A., Buchholtz C., Leo A., Benner A., Hensel M., Ho A.D., Leo E.; The bcl-2/igh rearrangement in a population of 204 healthy individuals: occurrence, age and gender distribution, breakpoints, and detection method validity; *Leuk. Res.*; 30, (2006), 745-750.
 - Schraders M., de Jong D., Kluin P., Groenen P., van Krieken H.; Lack of bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the bcl2 gene or by absence of the t(14;18) translocation; *J. Pathol.*; 205, (2005), 329-335.
 - Scott J.; A place in the world for rna editing; *Cell*; 81, (1995), 833-836.
 - Segal G., Edinger M., Owen M., McNealis M., Lopez P., Perkins A., Linden M., Fishleder A., Stoler M., Tubbs R.; Concomitant delineation of surface ig, b-cell differentiation antigens, and hladr on lymphoid proliferations using three-color immunocytometry; *Cytometry*; 12, (1991), 350-359.
 - Segal G.H., Jorgensen T., Scott M., Braylan R.C.; Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: ii. follicular lymphomas; *Hum. Pathol.*; 25, (1994), 1276-1282.
 - Shaffer A.L., Rosenwald A., Staudt L.M.; Lymphoid malignancies: the dark side of b-cell differentiation; *Nat. Rev. Immunol.*; 2, (2002), 920-932.
 - Shimizu A., Takahashi N., Yaoita Y., Honjo T.; Organization of the constant-region gene family of the mouse immunoglobulin heavy chain; *Cell*; 28, (1982), 499-506.
 - Shinkura R., Ito S., Begum N.A., Nagaoka H., Muramatsu M., Kinoshita K., Sakakibara Y., Hijikata H., Honjo T.; Separate domains of aid are required for somatic hypermutation and class-switch recombination; *Nat. Immunol.*; 5, (2004), 707-712.
 - Shiozawa Y., Havens A.M., Pienta K.J., Taichman R.S.; The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites; *Leukemia*; 22, (2008), 941-950.
 - Shipp M.; Prognostic factors in aggressive non-hodgkin's lymphoma: who has " high-risk" disease?; *Blood*; 83, (1994), 1165.
 - Shlomchik M., Litwin S., Weigert M.; The influence of somatic mutation on clonal expansion.; *Prog. Immunol.*; 7, (1989), 415-423.

- Shlomchik M.J., Aucoin A.H., Pisetsky D.S., Weigert M.G.; Structure and function of anti-dna autoantibodies derived from a single autoimmune mouse; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 84, (1987), 9150-9154.
- Shortman K., Cerottini J., Brunner K.; The separation of sub-populations of t and b lymphocytes; *Eur. J. Immunol*; 2, (1972), 313.
- Shortman K., Wu L.; Early t lymphocyte progenitors; *Annu. Rev. Immunol.*; 14, (1996), 29-47.
- Solal-Céligny P., Roy P., Colombat P., White J., Armitage J.O., Arranz-Saez R., Au W.Y., Bellei M., Brice P., Caballero D.; Follicular lymphoma international prognostic index; *Blood*; 104, (2004), 1258-1265.
- Stamatopoulos K., Kosmas C., Belessi C., Stavroyianni N., Kyriazopoulos P., Papadaki T.; Molecular insights into the immunopathogenesis of follicular lymphoma; *Immunol. Today*; 21, (2000), 298-305.
- Stansfeld A.G., Diebold J., Noel H., Kapanci Y., Rilke F., Kelényi G., Sundstrom C., Lennert K., van Unnik J.A., Mioduszevska O.; Updated kiel classification for lymphomas; *Lancet*; 1, (1988), 292-293.
- Stavnezer J.; Immunoglobulin class switching; *Curr. Opin. Immunol.*; 8, (1996), 199-205.
- Stelzer G.T., Marti G., Hurley A., McCoy P. Jr, Lovett E.J., Schwartz A.; U.s.-canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures.; *Cytometry*; 30, (1997), 214-230.
- Stevenson L.; Emil von Behring in „Nobel prize winners in medicine and physiology, 1901-1950“, Schuman H. (Ed.), *The Life of science library*, New York, 1953, first edition.
- Strasser A., Harris A.W., Bath M.L., Cory S.; Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2; *Nature*; 348, (1990), 331-333.
- Strasser A., Harris A.W., Cory S.; E mu-bcl-2 transgene facilitates spontaneous transformation of early pre-b and immunoglobulin-secreting cells but not t cells; *Oncogene*; 8, (1993), 1-9.
- Su W., Spencer J., Wotherspoon A.C.; Relative distribution of tumour cells and reactive cells in follicular lymphoma; *J. Pathol.*; 193, (2001), 498-504.
- Summers K.E., Goff L.K., Wilson A.G., Gupta R.K., Lister T.A., Fitzgibbon J.; Frequency of the bcl-2/igh rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma; *J. Clin. Oncol.*; 19, (2001), 420-424.
- Szereday Z., Csernus B., Nagy M., László T., Warnke R.A., Matolcsy A.; Somatic mutation of the 5' noncoding region of the bcl-6 gene is associated with intraclonal diversity and clonal selection in histological transformation of follicular lymphoma; *Am. J. Pathol.*; 156, (2000), 1017-1024.
- Taylor S.T., Hickman J.A., Dive C.; Survival signals within the tumour microenvironment suppress drug-induced apoptosis: lessons learned from b lymphomas; *Endocr. Relat. Cancer*; 6, (1999), 21-23.
- Teerenhovi L., Lindholm C., Pakkala A., Franssila K., Stein H., Knuutila S.; Unique display of a pathologic karyotype in hodgkin's disease by reed-sternberg cells; *Cancer Genet. Cytogenet.*; 34, (1988), 305-311.
- ten Boekel E., Melchers F., Rolink A.; The status of ig loci rearrangements in single cells from different stages of b cell development; *Int. Immunol.*; 7, (1995), 1013-1019.

- Terstappen L.W., Safford M., Loken M.R.; Flow cytometric analysis of human bone marrow. iii. neutrophil maturation; *Leukemia*; 4, (1990), 657-663.
- Tew J.G., Wu J., Fakher M., Szakal A.K., Qin D.; Follicular dendritic cells: beyond the necessity of t-cell help; *Trends Immunol.*; 22, (2001), 361-367.
- The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project; A predictive model for aggressive non-hodgkin's lymphoma; *N. Engl. J. Med.*; 329, (1993), 987-994.
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project; A clinical evaluation of the international lymphoma study group classification of non-hodgkin's lymphoma; *Blood*; 89, (1997), 3909-3918.
- Thomazy V.A., Vega F., Medeiros L.J., Davies P.J., Jones D.; Phenotypic modulation of the stromal reticular network in normal and neoplastic lymph nodes: tissue transglutaminase reveals coordinate regulation of multiple cell types; *Am. J. Pathol.*; 163, (2003), 165-174.
- Thompson C.B.; New insights into v(d)j recombination and its role in the evolution of the immune system; *Immunity*; 3, (1995), 531-539.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.; Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice; *Nucleic Acids Res.*; 22, (1994), 4673-4680.
- Tomlinson I.M., Walter G., Marks J.D., Llewelyn M.B., Winter G.; The repertoire of human germline vh sequences reveals about fifty groups of vh segments with different hypervariable loops; *J. Mol. Biol.*; 227, (1992), 776-798.
- Tonegawa S.; Somatic generation of antibody diversity; *Nature*; 302, (1983), 575-581.
- Tonegawa S., Brack C., Hozumi N., Pirrotta V.; Organization of immunoglobulin genes; *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*; 42, (1978a), 921-931.
- Tonegawa S., Maxam A.M., Tizard R., Bernard O., Gilbert W.; Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 75, (1978b), 1485-1489.
- Tonegawa S., Steinberg C., Dube S., Bernardini A.; Evidence for somatic generation of antibody diversity; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 71, (1974), 4027.
- Tsujimoto Y., Croce C.M.; Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 83, (1986), 5214-5218.
- Tsujimoto Y., Finger L.R., Yunis J., Nowell P.C., Croce C.M.; Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic b cells with the t(14;18) chromosome translocation; *Science*; 226, (1984), 1097-1099.
- Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M.; The t(14;18) chromosome translocations involved in b-cell neoplasms result from mistakes in v(d)j joining; *Science*; 229, (1985), 1390-1393.
- Tsujimoto Y., Louie E., Bashir M.M., Croce C.M.; The reciprocal partners of both the t(14; 18) and the t(11; 14) translocations involved in b-cell neoplasms are rearranged by the same mechanism; *Oncogene*; 2, (1988), 347-351.
- Turner M., Sweetenham J.; Haemopoietic progenitor homing and mobilization.; *Br. J. Haematol.*; 94, (1996), 592.
- Tzankov A., Meier C., Hirschmann P., Went P., Pileri S.A., Dirnhofer S.; Correlation of high

- numbers of intratumoral foxp3+ regulatory t cells with improved survival in germinal center-like diffuse large b-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical hodgkin's lymphoma; *Haematologica*; 93, (2008), 193-200.
- Uchiyama M., Maesawa C., Yashima A., Itabashi T., Ishida Y., Masuda T.; Consensus primers for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in b cell lymphomas; *J. Clin. Pathol.*; 56, (2003), 778-779.
 - Umetsu D.T., Esserman L., Donlon T.A., DeKruyff R.H., Levy R.; Induction of proliferation of human follicular (b type) lymphoma cells by cognate interaction with cd4+ t cell clones; *J. Immunol.*; 144, (1990), 2550-2557.
 - Uppenkamp M., Feller A.C.; Classification of malignant lymphoma; *Onkologie*; 25, (2002), 563-570.
 - Vallur A.C., Yabuki M., Larson E.D., Maizels N.; Aid in antibody perfection; *Cell. Mol. Life Sci.*; 64, (2007), 555-565.
 - van Besien K., Loberiza F.R.J., Bajorunaite R., Armitage J.O., Bashey A., Burns L.J., Freytes C.O., Gibson J., Horowitz M.M., Inwards D.J.; Comparison of autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma; *Blood*; 102, (2003), 3521-3529.
 - Vaux D.L., Cory S., Adams J.M.; Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-b cells; *Nature*; 335, (1988), 440-442.
 - Vega F., Medeiros L.J., Lang W., Mansoor A., Bueso-Ramos C., Jones D.; The stromal composition of malignant lymphoid aggregates in bone marrow: variations in architecture and phenotype in different b-cell tumours; *Br. J. Haematol.*; 117, (2002), 569-576.
 - Viardot A., Möller P., Högel J., Werner K., Mechttersheimer G., Ho A.D., Ott G., Barth T.F.E., Siebert R., Gesk S.; Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma; *J. Clin. Oncol.*; 20, (2002), 4523-4530.
 - von Schwedler U., Jäck H.M., Wabl M.; Circular dna is a product of the immunoglobulin class switch rearrangement; *Nature*; 345, (1990), 452-456.
 - Waliszewski P.; Controversies about the genetic model of colorectal tumorigenesis; *Pol J Pathol*; 46, (1995), 239-243.
 - Wan J.H., Trainor K.J., Brisco M.J., Morley A.A.; Monoclonality in b cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction; *J. Clin. Pathol.*; 43, (1990), 888-890.
 - Wang J., Shinkura R., Muramatsu M., Nagaoka H., Kinoshita K., Honjo T.; Identification of a specific domain required for dimerization of activation-induced cytidine deaminase; *J. Biol. Chem.*; 281, (2006), 19115-19123.
 - Wang Z., Karras J.G., Howard R.G., Rothstein T.L.; Induction of bcl-x by cd40 engagement rescues sig-induced apoptosis in murine b cells; *J. Immunol.*; 155, (1995), 3722-3725.
 - Weigert M., Perry R., Kelley D., Hunkapiller T., Schilling J., Hood L.; The joining of v and j gene segments creates antibody diversity; *Nature*; 283, (1980), 497-499.
 - Weinberg O.K., Ai W.Z., Mariappan M.R., Shum C., Levy R., Arber D.A.; "minor" bcl2 breakpoints in follicular lymphoma: frequency and correlation with grade and disease presentation in 236 cases; *J Mol Diagn*; 9, (2007), 530-537.
 - Weinberg R.A.; Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis;

- Cancer Res.; 49, (1989), 3713-3721.
- Weinstock M., Horm J.; Mycosis fungoides in the united states. increasing incidence and descriptive epidemiology; JAMA; 260, (1988), 42.
 - Weirich G., Funk A., Hoepner I., Heider U., Noll S., Pütz B., Fellbaum C., Höfler H.; Pcr-based assays for the detection of monoclonality in non-hodgkin's lymphoma: application to formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and decalcified bone marrow samples; J Mol Med; 73, (1995), 235-241.
 - Wigzell H.; Editorial: antibody diversity: is it all coded for by the germ line genes?; Scand. J. Immunol.; 2, (1973), 199.
 - Wilks S.; Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or hodgkin's disease), with remarks; Guy's Hosp Rep; 11, (1865), 56-67.
 - Wilks S.; Cases of lardaceous disease and some allied affections, with remarks; Guy's Hosp Rep; 2, (1856), 103-132.
 - Williamson A.R., Premkumar E., Shoyab M.; Germ line basis for antibody diversity; Fed. Proc.; 34, (1975), 28-32.
 - Willis T., Dyer M.; The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of b-cell malignancies; Blood; 96, (2000), 808.
 - Young K.H., Xie Q., Zhou G., Eickhoff J.C., Sanger W.G., Aoun P., Chan W.C.; Transformation of follicular lymphoma to precursor b-cell lymphoblastic lymphoma with c-myc gene rearrangement as a critical event; Am. J. Clin. Pathol.; 129, (2008), 157-166.
 - Youngman K., Franco23 M., Kuklin N., Rott L., Butcher E., Greenberg H.; Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific b cells during the murine anti-rotavirus immune response; The Journal of Immunology; 168, (2002), 2173.
 - Yunis J.J., Oken M.M., Kaplan M.E., Ensrud K.M., Howe R.R., Theologides A.; Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-hodgkin's lymphoma; N. Engl. J. Med.; 307, (1982), 1231-1236.
 - Zelenetz A., Chen T., Levy R.; Clonal expansion in follicular lymphoma occurs subsequent to antigenic selection; Journal of Experimental Medicine; 176, (1992), 1137.
 - Zheng B., Xue W., Kelsoe G.; Locus-specific somatic hypermutation in germinal centre t cells; Nature; 372, (1994), 556-559.
 - Zhou C., Saxon A., Zhang K.; Human activation-induced cytidine deaminase is induced by il-4 and negatively regulated by cd45: implication of cd45 as a janus kinase phosphatase in antibody diversification; The Journal of Immunology; 170, (2003), 1887.
 - Zhu D., Hawkins R., Hamblin T., Stevenson F.; Clonal history of a human follicular lymphoma as revealed in the immunoglobulin variable region genes; Br. J. Haematol.; 86, (1994), 505-505.
 - Zhu D., McCarthy H., Ottensmeier C.H., Johnson P., Hamblin T.J., Stevenson F.K.; Acquisition of potential n-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma; Blood; 99, (2002), 2562-2568.
 - Ziegner M., Steinhäuser G., Berek C.; Development of antibody diversity in single germinal centers: selective expansion of high-affinity variants; Eur. J. Immunol.; 24, (1994), 2393-2400.
 - Zola H., Swart B., Nicholson I., Aasted B., Bensussan A., Bousmell L., Buckley C., Clark G.,

Drbal K., Engel P.; Cd molecules 2005: human cell differentiation molecules; Blood; 106, (2005), 3123-3126.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 – Translokationen bei Non-Hodgkin-Lymphomen (nach Sanchez-Beato M., 2003).....	13
Abb. 2 – sekundäre genetische Veränderungen der FL-Entwicklung (nach Bende R. J., 2007).....	16
Abb. 3 – schematische Darstellung der Translokation t(14;18) (nach Roulland S., 2006).....	21
Abb. 4 – B-Zellentwicklungsstadien und Keimzentrumsreaktion (nach Küppers R., 2005).....	22
Abb. 5 – bcl-2 Familie zytoplasmatischer Proteine (nach Adams J., 2001).....	24
Abb. 6 – Struktur eines Antikörpers / B-Zellrezeptors (nach Edelman G., 1973).....	28
Abb. 7 – VDJ-Rekombination, SH und CSR (nach Kinoshita K., 2001).....	30
Abb. 8 – molekulare Prozesse der SH (nach Neuberger M.S., 2005).....	34
Abb. 9 – nicht-zufällige Heterogenität der FL-Entwicklung (nach Bende R. J., 2007).....	37
Abb. 10 – Unterteilung des rearrangierten IGH-Gens (nach Segal G.H., 1994).....	40
Abb. 11 – Modell der graduellen Entwicklung des FLs (nach Kotani A., 2007).....	42
Abb. 12 – Prinzip der Rekonstruktion der Tumorzellevolution.....	53
Abb. 13 – Formel zur Berechnung des Wahrscheinlichkeitsmaßes „pm“.....	54
Abb. 14 – zeitliche und therapeutische Relation der untersuchten Gewebe.....	55
Abb. 15 – VDJ-Rearrangements und Nukleotidinsertionen an den Segmentgrenzen.....	57
Abb. 16 – Mutationsraten und Anzahl gemeinsamer Mutationen der untersuchten Gewebe.....	57
Abb. 17 – gewebespezifische Tumorzellevolution Patient 1, FL ^o 2.....	59
Abb. 18 – „pm“-Hierarchie der LK-HPCs, Patient 1, FL ^o 2.....	61
Abb. 19 – „pm“-Hierarchie der KM-HPCs, Patient 1, FL ^o 2.....	61
Abb. 20 – gewebeübergreifende Tumorzellevolution, Patient 1, FL ^o 2.....	62
Abb. 21 – „pm“-Hierarchie der LK+KM-HPCs, Patient 1, FL ^o 2.....	63
Abb. 22 – Wahrscheinlichkeitsabwägung, Patient 1, FL ^o 2.....	64
Abb. 23 – endgültige Tumorzellevolution, Patient 1, FL ^o 2.....	65
Abb. 24 – Zusammenschau des Modells der FL-Evolution von Patient 1.....	66
Abb. 25 – gewebespezifische Tumorzellevolution, Patient 2, FL ^o 1.....	67
Abb. 26 – „pm“-Hierarchie der LK-HPCs, Patient 2, FL ^o 1.....	68
Abb. 27 – „pm“-Hierarchie der KM-HPCs, Patient 2, FL ^o 1.....	68
Abb. 28 – gewebeübergreifende Tumorzellevolution, Patient 2, FL ^o 1.....	69
Abb. 29 – „pm“-Hierarchie der LK+KM-HPCs, Patient 2, FL ^o 1.....	70
Abb. 30 – Wahrscheinlichkeitsabwägung, Patient 2, FL ^o 1.....	71
Abb. 31 – endgültige Tumorzellevolution, Patient 2, FL ^o 1.....	72
Abb. 32 – Zusammenschau des Modells der FL-Evolution von Patient 2.....	73

Abb. 33 – gewebespezifische Tumorzellevolution LK 2004, Patient 3, FL ^o 1.....	74
Abb. 34 – „pm“-Hierarchie der LK-HPCs 2004, Patient 3, FL ^o 1.....	74
Abb. 35 – gewebespezifische Tumorzellevolution LK 2007, Patient 3, FL ^o 1.....	75
Abb. 36 – „pm“-Hierarchie der LK-HPCs 2007, Patient 3, FL ^o 1.....	75
Abb. 37 – gewebespezifische Tumorzellevolution KM 2004, Patient 3, FL ^o 1.....	76
Abb. 38 – „pm“-Hierarchie der KM-HPCs 2004, Patient 3, FL ^o 1.....	76
Abb. 39 – gewebespezifische Tumorzellevolution KM 2006, Patient 3, FL ^o 1.....	77
Abb. 40 – „pm“-Hierarchie der KM-HPCs 2006, Patient 3, FL ^o 1.....	77
Abb. 41 – gewebespezifische Tumorzellevolution KM 2007, Patient 3, FL ^o 1.....	78
Abb. 42 – „pm“-Hierarchie der KM-HPCs 2007, Patient 3, FL ^o 1.....	78
Abb. 43 – Tumorzellevolution LK+KM2004, Patient 3, FL ^o 1.....	80
Abb. 44 – „pm“-Hierarchie der LK+KM-HPCs 2004, Patient 3, FL ^o 1.....	80
Abb. 45 – Tumorzellevolution LK04+KM04+KM06, Patient 3, FL ^o 1.....	81
Abb. 46 – „pm“-Hierarchie von LK04+KM04+KM06, Patient 3, FL ^o 1.....	81
Abb. 47 – Tumorzellevolution LK04+KM04+KM06+KM07, Patient 3, FL ^o 1.....	82
Abb. 48 – „pm“-Hierarchie von LK04+KM04+KM06+KM07, Patient 3, FL ^o 1.....	82
Abb. 49 – Tumorzellevolution LK04+KM04+KM06+KM07+LK07, Patient 3, FL ^o 1.....	83
Abb. 50 – „pm“-Hierarchie von LK04+KM04+KM06+KM07+LK07, Patient 3, FL ^o 1.....	84
Abb. 51 – Tumorzellevolution LK04+LK07, Patient 3, FL ^o 1.....	85
Abb. 52 – „pm“-Hierarchie von LK04+LK07, Patient 3, FL ^o 1.....	85
Abb. 53 – „pm“-Hierarchie von LK04+LK07, Patient 3, FL ^o 1.....	86
Abb. 54 – endgültige Tumorzellevolution, Patient 3, FL ^o 1.....	86
Abb. 55 – Zusammenschau des Modells der FL-Evolution von Patient 3.....	88
Abb. 56 – R/S-Analyse Patient 1.....	89
Abb. 57 – R/S-Analyse Patient 2.....	90
Abb. 58 – R/S-Analyse Patient 3.....	91

10 Anhang

10.1 Laborprotokolle

DNS-Extraktion aus FFPE-Gewebe:

- Am Mikrotom werden ca. 10 Scheiben zu je 9µm Dicke vom Paraffinblock abgeschnitten und in ein Sarstedt-Röhrchen gegeben.
- In das Röhrchen wird 1ml Xylol zugesetzt.
- Das Röhrchen wird verschlossen und 15sec geschüttelt.
- Das Gemisch wird mit 250µl 70%-igem Ethanol versetzt und erneut für 15sec geschüttelt.
- Dann wird das Röhrchen für 5min bei 14000rpm zentrifugiert.
- Den flüssigen Überstand mit einer Pipette entfernen und das Röhrchen samt verbleibendem Pellet in einer Vakuum-Zentrifuge bei 45°C platzieren, um die restliche Flüssigkeit zu verdampfen.
- Das trockene Pellet wird mit 100µl Proteinase-K-Puffer gemischt und des Weiteren mit 5µl Proteinase-K versetzt.
- Dieses Gemisch wird in einem Thermoschüttler über Nacht bei 55°C und einer Frequenz von 600rpm inkubiert.
- Am nächsten Tag wird das Röhrchen mit einem Schwimmer zur Inaktivierung der Proteinase-K für 10min in kochendes destilliertes Wasser gestellt.
- Die extrahierte DNS kann bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren werden.

RNS-Extraktion aus N₂-kryoasserviertem Frischgewebe (RNeasy Mini Kit, Qiagen):

- Über Nacht werden die benötigten Pistillen in ein Gemisch aus 500µl DEPC und 500ml Aqua destillata in einem Erlenmeyerkolben eingebracht.
- Am darauf folgenden Tag autoklaviert man den Kolben samt Pistillen und Flüssigkeit.
- Die aus dem Blockmaterial mit dem Kryomikrotom erzeugten 20µm starken Scheiben, ca. zehn an der Zahl, werden in ein vorgekühltes 1,5ml Eppendorfgefäß verbracht und um Degradation der RNS durch gewebeimmanente RNasen zu minimieren und weiter gekühlt.
- 1ml des im Kit enthaltenen Lysis-Puffer RLT wird mit 10µl β-Mercaptoethanol vermischt.
- 350µl dieses Gemisches werden in das Eppendorfgefäß mit den Gewebescheiben gegeben, und das Gemisch wird anschließend mit einer Pistille gemörsert, bis es homogenisiert worden ist.
- Dieses Gemisch wird für 2min bei Raumtemperatur stehen gelassen.
- Dann wird das gesamte Gemisch auf den im Kit enthaltenden Qia-Shredder pipettiert und 2min bei 13000rpm zentrifugiert.
- Nun wird die Säule des Shredders verworfen und in den Durchlauf werden 350µl 70% Ethanol zugefügt und solange auf- und abpipettiert bis die Lösung homogenisiert worden ist.
- Diese Flüssigkeit wird auf die RNeasy-Säule pipettiert und 2min bei 9000rpm zentrifugiert.
- Der Durchlauf wird verworfen und die Säule wird wie folgt gewaschen:

- 700µl Waschpuffer RW1 in die Säule pipettiert und 1min bei 10000rpm zentrifugieren, den Durchlauf verwerfen.
- 500µl Waschpuffer RPE in die Säule pipettiert und 1min bei 10000rpm zentrifugieren, den Durchlauf verwerfen.
- 500µl Waschpuffer RPE in die Säule pipettiert und 1min bei 10000rpm zentrifugieren, den Durchlauf verwerfen.
- 2min bei 10000rpm trocken zentrifugieren.
- Nun wird die Säule auf ein trockenes 1,5ml Eppendorfgefäß gesetzt, 28µl RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert und das ganze für 2min bei 10000rpm zentrifugiert

Reverse Transkription der extrahierten RNS in cDNS:

- 17,5µl des RNS-Produktes aus der vorhergegangenen Extraktion werden mit 1µl vom Random Hexamers (Roche, Mannheim, Deutschland) vermischt.
- Dieses Gemisch wird bei 70°C für 5min inkubiert.
- Dann erneut bei Raumtemperatur für 5min inkubieren.
- Zu diesem Gemisch werden 11,5µl RT-Mix zugefügt. Der RT-Mix setzt sich wie folgt zusammen:
 - 6µl RT-Puffer
 - 3µl 0,1M DTT
 - 1µl 10mM dNTPs
 - 0,5µl RNase Out
 - 1µl Superscript RT
- Hieran schließt sich eine Inkubation dieses Gemisches für 1h bei 42°C an um die reverse Transkription zu starten und zu unterhalten.
- Zum Terminieren der reversen Transkription findet eine Inkubation bei 95°C für 5min statt.
- Die erzeugte cDNS kann bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren werden.

Reinigung des Amplifikats der FR1-Lymphom-PCR (QIAquick Gel Extaction Kit, Qiagen):

- 1,5% Low Melting und 0,5% normale Agarose abwiegen und mit frischem 1xTBE-Puffer kochen.
- 50µl der Probe für 20min einer Elektrophorese bei 170V unterziehen.
- erzeugte Bande mit einem Skalpell ausschneiden und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß geben.
- 600µl QG Puffer zufügen und für 15min bei 50°C in einem Thermoblock inkubieren.
- 100µl Isopropanol in das Eppendorfgefäß geben und das resultierende Gemisch auf die Säule pipettieren.
- 1min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren und den Durchlauf verwerfen.
- 500µl des Puffers auf die Säule pipettieren und erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren und den Durchlauf verwerfen.

- 750µl Waschpuffer auf die Säule geben und 5min stehen lassen, dann erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren und den Durchlauf verwerfen.
- 5min trocken zentrifugieren.
- Säule auf dein neues 1,5ml Eppendorfgefäß setzen und 50µl EB Puffer zugeben und für 1min bei Geschwindigkeit zentrifugieren.

Reinigung des Amplifikats der FR2-Lymphom-PCR (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen):

- PB Puffer und zu reinigendes Volumen im Verhältnis 5:1 mischen.
- Gemisch auf Säulen pipettieren und bei 13000rpm 45sec zentrifugieren.
- Durchlauf verwerfen und 750µl Waschpuffer PE auf die Säule geben und 45sec zentrifugieren.
- Durchlauf verwerfen und 1min trocken zentrifugieren.
- Säule auf ein 1,5ml Eppendorfgefäß setzen und 45µl EB Puffer auf die Säule pipettieren.
- 1min ruhen lassen, dann erneut 1min zentrifugieren.

Erzeugung der rekombinanten Plasmide (Ligation) (TOPO TA Cloning® Kit, Invitrogen):

- Ein Thermoschüttler wird auf 14°C aufgeheizt.
- Die folgenden Reagenzien werden in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert.
 - 1µl 10x Ligationspuffer
 - 2µl pCR®2.1-Vektor
 - 1µl T4 DNA Ligase
 - 2µl PCR-Produkt
 - 4µl Aqua destillata
- Die Reagenzien werden vorsichtig gemischt und im Thermoschüttler bei 14°C über Nacht inkubiert.

Transformation von E. coli mit rekombinanten Plasmiden (TOPO TA Cloning® Kit, Invitrogen):

- Es wird ein 42°C warmes Wasserbad angerichtet.
- Das SOC-Medium wird auf Zimmertemperatur vorgewärmt.
- Alle folgenden Arbeitsschritte müssen, sofern nicht anders angegeben, auf Eis ablaufen.
- One Shot® TOP10F' Chemically Competent E. coli Bakterien auf Eis auftauen lassen.
- 2µl des Ligationsansatzes in das Bakterienröhrchen, welches standardisiert 50µl Zellsuspension enthält, geben und durch Schwenken des Röhrchens mischen.
- Dieses Röhrchen wird nun für 30min auf Eis inkubiert.
- Dann wird das Röhrchen für genau 30sec in das 42°C warme Wasserbad gestellt und dann unverzüglich für 2min auf Eis inkubiert.

- Nach Zugabe von 250µl des auf Zimmertemperatur vorgewärmten SOC-Mediums wird das Gemisch für 1h unter Schütteln (225rpm) bei 37 °C inkubiert.
- Danach wird das Röhrchen auf Eis gestellt.
- 50 und 100µl des Reagenz werden auf je einer vorbereitete Agaroseplatte (vgl. nächsten Punkt) mit einem sterilen Drigalskispatel ausplattiert.
- Die Platten werden dann bei 37 °C über Nacht inkubiert.
- Ist die blaue Farbe von einigen Kolonien am nächsten Morgen noch schwach ausgeprägt, so können die Platten zusätzlich zwei h lang bei 4°C inkubiert werden, was das Blau-Weiß-Selektion erleichtert.

Herstellung der Agarose und Gießen der Agaroseplatten:

- Für zehn Agaroseplatten 250 ml Agarose einplanen (Agarosepulver/Aqua destillata 32 g/l).
- Das Gemisch in einer Schottflasche homogen rühren.
- 30min bei 121°C autoklaviert.
- Abkühlung auf 42°C in einem Wasserbad.
- Agarose folgende Reagenzien zufügen und die Flüssigkeit durch Schwenken mischen:
 - 125µl Ampicillin
 - 0,5ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid)
 - 250µl 0,1M IPTG (Isopropyl-thio-Galaktosid)
- jetzt die Platten unter einem Abzug gießen.

Abheben weißer Bakterienkolonien und Kultivierung:

- Flüssigmedium: 20 g Pulver/Liter Aqua destillata
- Gemisch vor Verwendung in einer Schottflasche für 30min bei 121 °C autoklavieren.
- Abkühlen und bei 4 °C und verwahren.
- Die über Nacht mit transformierten E. coli Bakterien bestückten, inkubierten Agaroseplatten der Blau-Weiß-Selektion unterziehen.
- Weiße Kolonien werden mit einer Pipettenspitze von der Agarose abgehoben.
- Diese werden jeweils in einem sterilen Kulturröhrchen, das mit einem Gemisch aus 5 ml Flüssigmedium und 5µl Ampicillin gefüllt ist, versenkt.
- Die verschlossene Kulturröhrchen über Nacht bei 37 °C und bei einer Frequenz von 225rpm inkubieren.

Extraktion der rekombinanten Plasmide aus den kultivierten Bakterien (Miniprep) (QIAprep Miniprep Kit, Qiagen):

- Mit dem Inhalt der Flüssigkulturröhrchen wird jeweils ein 2ml Eppendorfgefäß gefüllt und bei 5000rpm für 6min zentrifugiert.

- Der Überstand wird verworfen, das Eppendorfgefäß erneut mit dem jeweiligen Inhalt des Übernachtkulturröhrchens gefüllt und nochmal bei 5000rpm für 6min zentrifugiert.
- Der Überstand wird erneut verworfen, am Boden des Eppendorfgefäßes ist nun ein Pellet verblieben.
- Diese Pellet wird mit 250µl des P2-Puffers versetzt und 5 Mal geschwenkt.
- Anschließend werden weitere 350µl des N3-Puffers zugefügt und es erfolgt erneutes fünfmaliges Schwenken.
- Dieser Mix wird 10min bei 13000rpm und 4°C in einer Vakuumzentrifuge zentrifugiert.
- Der Überstand ist in den im Kit enthaltenen Säulenfilter zu pipettieren, dieser ist wiederum im Anschluss 1min bei 13000rpm zu zentrifugieren.
- Der Durchlauf wird verworfen und auf die Säule werden 500µl des PB-Puffers pipettiert. Es schließt sich erneutes Zentrifugieren bei 13000rpm über 1min an.
- Der Durchlauf wird wieder verworfen und auf die Säule werden jetzt 750µl des PE-Puffers pipettiert. Es schließt sich erneutes Zentrifugieren bei 13000rpm über 1min an.
- Der Durchlauf wird wieder verworfen und die Säule wird zum Trocknen erneut bei 13000rpm über 1min zentrifugiert.
- Danach wird die Säule auf ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß gesetzt und mit 50µl des EB-Puffers, welcher in die Mitte der Säulenmembran pipettiert wird, versehen.
- Dieses Gemisch wird 1min stehen gelassen und dann 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Anschließend wird die Säule verworfen und das Eppendorfgefäß mit Inhalt bis zur weiteren Verarbeitung verschlossen und eingefroren.

EcoR1-Verdau der rekombinanten Plasmide und elektrophoretische Analyse:

- 7µl Aqua destillata werden mit 1µl EcoR1-10x-Puffer und 1µl EcoR1 in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert und vorsichtig vermischt.
- In diesen Mix wird 1µl des betreffenden Plasmidgemisches, welches durch das Miniprep-Verfahren extrahiert wurde, zugegeben.
- Das Reagenz wird für eine h bei 37°C inkubiert.
- Anschließend werden 5µl des eben inkubierten Gemisches jeder Probe mit 1µl Dye gemischt und in die Einsenkungen eines Agarosegels (1,5g Agarose auf 100ml 10x-Puffer) pipettiert.
- Das Gemisch wird bei 130V für 30min mit dem Elektrophoresegerät aufgetrennt.
- Mit Hilfe des Eagle Eye Systems II (Stratagene, La Jolla, CA, USA) wird nun verifiziert, ob der Verdau erfolgreich abgelaufen ist, je Probe also eine Bande auf der entsprechenden Höhe vorhanden ist.

Reinigung der zu sequenzierenden Klonierungsprodukte vor der Cycle-PCR (vgl. oben: QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen):

Reinigung des Cycle-PCR-Amplifikats vor der Kapillarelektrophorese (DyeEx 2.0 Spin Kit (50) Qiagen):

- Proben nach erfolgter Cycle-PCR kurz zentrifugieren.
- Spin Tubes kurz schütteln, in 2ml Einsätze stellen und bei 2700rpm für 3min zentrifugieren.
- Spin Tubes in ein 1,5ml Eppendorfgefäß setzen und die Probe in die Mitte des Gels geben.
- 3min bei 2700rpm zentrifugieren.

10.2 PCR-Protokolle und Primer

Für eine schematische Darstellung der Primerannealingorte vgl. *Abb. 10*.

IgV_H-Familien-spezifische PCR:

Cycler-Programm: Annealing-Temperatur 61°C

- | | | |
|---------------|-------------|-----------|
| - 95°C | 7min | |
| - 65°C | 4min | |
| - <u>72°C</u> | <u>1min</u> | |
| - 95°C | 1min | |
| - 61°C | 30sec | 40 Zyklen |
| - <u>72°C</u> | <u>1min</u> | |
| - 72 °C | 6min | |

PCR-Mix der FRI-PCR :

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Ansatz A: VHL 1-3-5: <li style="padding-left: 20px;">- Aqua dest. 15,25µl <li style="padding-left: 20px;">- dNTPs (0,2mmol/L) 4µl <li style="padding-left: 20px;">- PCR-Puffer 15mM 2,5µl <li style="padding-left: 20px;">- Primer JHa 0,25µl <li style="padding-left: 20px;">- Primer VHL1 0,25µl <li style="padding-left: 20px;">- Primer VHL3 0,25µl <li style="padding-left: 20px;">- Primer VHL5 0,25µl <li style="padding-left: 20px;">- Taq Gold (1,25 U/µl) 0,25µl <li style="padding-left: 20px;">- cDNA 2µl | <ul style="list-style-type: none"> - Ansatz B: VHL 2-4-6: <li style="padding-left: 20px;">- Aqua dest. 15,25µl <li style="padding-left: 20px;">- dNTPs (0,2mmol/L) 4µl <li style="padding-left: 20px;">- PCR-Puffer 15mM 2,5µl <li style="padding-left: 20px;">- Primer JHa 0,25µl <li style="padding-left: 20px;">- Primer VHL2 0,25µl <li style="padding-left: 20px;">- Primer VHL4 0,25µl <li style="padding-left: 20px;">- Primer VHL6 0,25µl <li style="padding-left: 20px;">- Taq Gold (1,25 U/µl) 0,25µl <li style="padding-left: 20px;">- cDNA 2µl |
|--|--|

Verwendete Primer (Sakai, 2000):

- JHa 5'-ACCTGAGGAGACGGTGACC-3'
- VHL1 5'-CCATGGACTGGACCTGGAGG-3'
- VHL2 5'-ATGGACATACTTTGTTCCAGC-3'
- VHL3 5'-CCATGGAGTTTGGGCTGAGC-3'

- VHL4 5'-ATGAAACACCTGTGGTTCTT-3'
- VHL5 5'-ATGGGGTCAACCGCCATCCT-3'
- VHL6 5'-ATGTCTGTCTCCTTCCTCAT-3'

Seminested whole-tissue PCR:

Cycler-Programm extern: Annealing-Temperatur 56°C

- | | | |
|--------|-------|-----------|
| - 95°C | 10min | |
| - 94°C | 45sec | |
| - 56°C | 1min | 35 Zyklen |
| - 74°C | 1min | |
| - 74°C | 10min | |

Cycler-Programm intern: Annealing-Temperatur 56°C

- | | | |
|--------|-------|-----------|
| - 95°C | 10min | |
| - 94°C | 45sec | |
| - 56°C | 1min | 25 Zyklen |
| - 74°C | 1min | |
| - 74°C | 10min | |

PCR-Mix der FR2a-Lymphom-PCR:

- | | |
|--|---|
| <p>- Ansatz extern:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aqua dest. 15,25µl - dNTPs (0,2mmol/L) 4µl - PCR-Puffer 20mM 2,5µl - Primer FR2a 0,5µl - Primer JHc 0,5µl - Taq Gold (1,25 U/µl) 0,25µl - cDNA (1:10) 2µl | <p>- Ansatz intern:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aqua dest. 15,25µl - dNTPs (0,2mmol/L) 4µl - Puffer 20mM 2,5µl - Primer FR2a 0,5µl - Primer JHb 0,5µl - Taq Gold (1,25 U/µl) 0,25µl - cDNA (1:100) 2µl |
|--|---|

Verwendete Primer (Segal, 1994):

- FR2a 5'-TGG(A/G)TCCG(C/A)CAG(G/C)C(T/C)(T/C)CNGG-3'
- JHc (extern) 5'-TGAGGAGACGGTGACC-3'
- JHb (intern) 5'-GTGACCAGGGTNCCTTGGCCCCAG-3'

Cycle-PCR:

Cycler-Programm: Annealing-Temperatur abhängig von der erwarteten Länge der Sequenz abschätzen gemäß: Für Adenin-Thymin-Paare je 2°C, für Guanin-Cytosin-Paare je 4°C ansetzen.

-	96°C	1min	
-	96°C	10sec	
-	45-60°C	5sec	25 Zyklen
-	60°C	4min	
-	4 °C		

Ansatz: insgesamt 20µl

-	Premix	4µl
-	BigDyeSequencing Puffer	2µl
-	Primer	0,25µl
-	Aqua dest.	fakultativ
-	Template	13,75µl (max.)

Verwendete Primer (Grothues, 1993): random primer

β-Globin PCR:

Cycler-Programm: Annealing-Temperatur 55°C

-	94°C	4min	
-	94°C	1min	
-	55°C	30sec	25 Zyklen
-	72°C	30sec	
-	72°C	4min	

PCR-Mix der β-Globin-PCR:

-	Aqua dest.	15,25µl	-	Primer GH20	0,5µl
-	dNTPs (0,2mmol/L)	4µl	-	Taq (5 U/µl)	0,25µl
-	Puffer 10mM	2,5µl	-	cDNA	2µl
-	Primer PC04	0,5µl			

Verwendete Primer (Saiki, 1988):

-	PC04	5' - CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC - 3'
-	GH20	5' - GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC - 3'

10.3 Quellcode des FLER-Computerprogramms

Unter der URL „<http://petervasil.net/fler>“, sind neben einer ausführlichen Dokumentation des FLER-Computerprogramms, dessen Quellcode, die für diese Arbeit im Labor bestimmten und verwendeten, anonymisierten Klonsequenzen, die daraus generierten HPCs mit ihren Zusatzinformationen, sowie die ausführbare, zum Download angebotene Form des Programms hinterlegt. Das Programm wurde in der Programmiersprache „C++“ verfasst und ist quelloffen / open source. Somit steht es jedem frei zur Verfügung und kann weiterentwickelt werden. Das Programm wurde von Herrn Peter Vasil, Technische Universität Berlin, nach den Vorgaben des Autors geschrieben. Der Text der „Main page“ auf „<http://petervasil.net/fler>“ unter den Punkten „Description“ und „Help“, wurde vom Autor dieser Arbeit verfasst. Die zugrunde liegende „FLER-Methode“, einschließlich des Namens „FLER“, wurde ebenfalls vom Autor der vorliegenden Arbeit entwickelt. Das Computerprogramm diente zur Kontrolle der manuell bestimmten Rekapitulation der Tumorzellevolution. Weiter dient es generell der einfachen Anwendbarkeit und der Distribution der „FLER-Methode“, sowie als Grundlage einer möglichen Weiterentwicklung.

10.4 Verwendetes Material/Geräte

10.4.1 Bakterienstämme, Medien und Gele

Bakterienstämme:

- One Shot® TOP10F' Chemically Competent E. coli (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Medien:

Festmedien:

- LB Agar (Lennox L Agar, Invitrogen) / Aqua destillata 32g/l
 - Trypton 10g/l
 - Hefeextrakt 5g/l
 - NaCl 5g/l
 - Agar 15g/l

Flüssigmedien:

- LB Broth Base (Lennox L Broth Base, Invitrogen) / Aqua destillata 20g/l
 - Select Pepton140 10g/l
 - Hefeextrakt 5 g/l
 - NaCl 5,5 g/l
- SOC-Medium (Invitrogen)

- 10g Trypton
- 20mM Glukose
- 2,5g Hefeextrakt
- 0,3g NaCl
- 0,09g KCl
- 1,02g MgCl₂
- 1,23g MgSO₄
- 500ml Aqua destillata

Gele:

- x% Agarosegel für Elektrophorese (SeaKem LE Agarose, BMA, Rockland, ME, USA)
 - x g Agarose
 - 100ml 1x TBE
 - 1 Tropfen Ethidiumbromid (0,7mg/ml)
- 1,5% low melting point Agarosegel (SeaKem LE Agarose, BMA, Rockland, ME, USA)
 - 1,5% low melting point Agarose
 - 100ml 1x TBE

10.4.2 Puffer, Lösungen und Primer**Puffer:**

- Big Dye Sequencing Buffer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
 - 200mM Tris-HCl, pH9,0
 - 5mM MgCl₂
- 10xDyes Elektrophoreseladepuffer
 - Bromphenolblau-Xylencyanol Dye (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
 - 20ml Formamid
 - 5ml Aqua destillata
- DNS-Extraktions-Puffer
 - 50ml 1M Tris-HCl, pH 8,3
 - 2ml 0,5M EDTA, pH 8
 - Polysorbat-20 50ml/250ml (Tween 20, Merck, Darmstadt, Deutschland))
 - 1000ml Aqua destillata
- Elektrophoreselaufpuffer
 - 100ml 10xTBE
 - 10 Tropfen Ethidiumbromid (0,7mg/ml)
 - 900ml Aqua destillata

- Ligationspuffer, pH 7,5
 - 660mM Tris-HCl
 - 50mM MgCl₂
 - 10mM Dithioerythrit
 - 10mM ATP
- Lysis-Puffer RLT (Qiagen)
- PCR-Puffer für IgV_H1/V_H3/V_H5-Familien-spezifische PCR
 - 10mmol/L Tris-HCl, pH 8.3
 - 50mmol/L KCl
 - 1,5mmol/L MgCl₂
- PCR-Puffer für IgV_H2/V_H4/V_H6-Familien-spezifische PCR
 - 10mmol/L Tris-HCl, pH 8.3
 - 50mmol/L KCl
 - 2,0mmol/L MgCl₂
- Reverse Transkriptase (RT-) Puffer
 - 670mM Tris-HCl, pH 8,9
 - 166mM Ammoniumsulfat
 - 0,1% Polysorbat-20
- 1x TBE-Puffer (für Elektrophoreseigel)
 - 100ml 10x TBE-Puffer
 - 900ml Aqua destillata
- 10x TBE-Puffer (Elektrophoreselaufpuffer)
 - 108g Tris-HCl, pH 8,3
 - 55g Borsäure
 - 40ml 0,5M EDTA, pH 8,0
 - 1l Aqua destillata

Lösungen:

- Ampicillin 40mg/ml H₂O
- β-Mercaptoethanol (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- DEPC (Diethyldicarbonat)
- DNS-Längenmarker (Elektrophorese)
 - 1μl DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, IX (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
 - 6μl 6x Loading Dye solution (MBI Fermentas)
 - 24ml Aqua destillata
- EDTA (Gibco BRL, Deutschland)

- Ethanol 70%
- Ethidiumbromid 0,7mg/ml (Eurobio, Cedex, Frankreich)
- IPTG 0,1M (Isopropyl-thio-Galaktosid)
- Loading Dye Solution 6x (MBI Fermentas)
- Nukleotide (Pharmacia, Freiburg)
- Premix (PE Applied Biosystems)
- X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid)
- Xylol

Primer:

- Primer (PE Applied Biosystems)
- Random Hexamers (Roche, Mannheim, Deutschland)

10.4.3 Antikörper, Enzyme, Plasmide**Antikörper:**

- BCL-2 (Dako, Copenhagen, Dänemark)
- BCL-6 (Novocastra, Newcastle, UK)
- CD10 (Novocastra)
- CD20 (L26, Dako)
- CD3 (polyklonal, Dako)
- CD5 (Novocastra)
- Ki67 (MIB1, Dako)

Enzyme:

- AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (PE Applied Biosystems)
- EcoR1 (Invitrogen)
- Proteinase K 20mg/ml (Roche, Mannheim, Deutschland)
- Superscript III Reversen-Transkriptase (Invitrogen)
- Taq-Polymerase (GE Health Care, Dallas, Texas, USA)

Plasmide:

- Vector pCR®2.1 des TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen)

10.4.4 Kits

- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems)
- DyeEx 2.0 Spin Kit (50) (Qiagen)
- QIAprep Miniprep Kit (Qiagen)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

- QIAquick Gel Extaction Kit (Qiagen)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
- RNeasy Mini Kit von QIAGEN (Qiagen)
- TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen)

10.4.1 Geräte und Hilfsmittel

Geräte:

- Abzug
- Autoklav
- ABI Prism® 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems)
- Eagle Eye Systems II (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- Elektrophoresegerät
- Feinwaage (digital)
- Fireboy (Integra, Zizers, Schweiz)
- Immunostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA)
- Inkubator
- Inkubatorschüttler
- Kryomikrotom
- Lichtmikroskope
- Mikrotom
- MJ Research PTC200 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad Lab GmbH, München, Deutschland)
- Pipetten
- Primus 96 Plus Thermal Cycler (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland)
- Stoppuhr
- Thermometer
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Vakuumzentrifuge Typ Concentrator 5301 (Eppendorf)
- Vortex Mixer
- Wasserbad
- Zentrifuge Typ Centrifuge 5415D (Eppendorf)

Hilfsmittel:

- Drigalskispatel
- 1,5ml Eppendorfgefäße
- Erlenmeyerkolben
- Kanülen (20Gauge)

- Lochplatten
- Objektträger
- Petrischalen
- Pipettenspitzen
- Pistillen
- Sarstedt-Röhrchen
- Schottflaschen

10.4.1 Computerprogramme

- Applet auf „www-stat.stanford.edu/immuunogloblin“ (BCR-Analyse)
- Bibus 1.5.1 (Literaturdatenbank)
- FLER (Rekonstruktion der Tumorzellevolution)
- GIMP 2.6.7 (Bildbearbeitung)
- Ig-Blastprogramm auf „www.pubmed.com/blast“ (Bestimmung der V-,D- und J-Familien)
- Open office.org Textverarbeitungsprogramm 3.1.1
- Open office.org Tabellenkalkulation 3.1.1
- Open office.org Präsentation 3.1.1

10.5 Sequenzen

10.5.1 Patient 1, FL⁰²

FRI-Sequenzen der LK-Klone von Patient 1

PATIENT 1:
wildtype configuration (WTC): IGHV3-30*04 IGHJ6-19*01 IGHJ5*02

codon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19																																					
locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19																																					
FRW/CDR	<																																																							
WTC	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	T	C	C	C	T	G	A	G																									
10 LK-SEQUENZEN/KLONE FRI1																																																								
b4(8)	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	C	G	T	G	G	T	C	C	A	G	C	C	T	G	A	G												
b6(37)	C	A	G	G	T	G	C	A	C	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	C	G	T	G	G	T	C	A	G	C	C	T	G	G	A	G	G	T	C	C	C	T	G	A	G			
b7(38)	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	C	G	T	G	G	T	C	C	A	G	C	C	T	G	G	A	G	G	C	C	C	T	G	A	G			
b3(46)	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	C	T	T	G	G	T	C	A	A	G	C	C	T	G	G	A	G	G	T	C	C	C	T	G	A	G		
a8(82)	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	C	T	T	G	C	T	A	A	T	G	C	C	G	G	G	G	G	G	G	T	C	C	C	T	A	A	G	
a2(118)	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	A	G	C	A	G	A	G	G	T	G	A	A	A	A	A	G	C	C	G	G	G	G	G	A	G	T	C	T	C	T	G	A	A
b2(118)	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	T	G	A	G	A	G	T	T	G	A	A	A	A	A	G	C	C	T	G	G	G	C	C	T	C	A	G	T	G	A	A		
a7(115)	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	A	G	C	A	G	A	A	G	T	G	A	A	A	A	A	G	C	C	G	G	G	G	A	G	T	C	T	C	T	G	A	A	
a6(118)	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	A	G	C	A	G	A	G	T	G	A	A	A	A	A	A	G	C	C	C	G	G	G	G	A	G	T	C	T	C	T	G	A	A
b1(118)	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	A	G	C	A	G	A	G	A	T	G	A	A	A	A	A	C	C	C	G	G	G	G	A	G	T	C	T	C	T	G	A	G	
b1(118)	C	A	G	G	T	G	C	A	G	C	T	G	G	T	G	G	A	G	T	C	T	G	G	A	G	C	A	G	A	G	A	T	G	A	A	A	A	A	C	C	C	G	G	G	G	A	G	T	C	T	C	T	G	A	G	

20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T T C A C C T T C A G T A G C T A T G C T A T G C A C T G G G T C C G C
 A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G C T T C A C C T T C A G T A A C T A T G T C A T G C A C T G G G T C C G C
 A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T T C A C C T T T A G C A G C T A T G C C A T G A G C T G G G T C C G C
 A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T T C A C C T T C A G T G A C T A C T A C A T G A G C T G G A T C C G C
 A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T T C A T T T T C A A G A G C G C C T G G A T G A C C T G G G T C C G C
 G A T C T C C T G T A A G G G T T C T G G A T A C A G C T T A C C A G C T A C T G G A T C G G C T G G G T G C G C
 G A - - - - - A A G - G T - - - - - A - - - - - G - - - - - T - C C - - - - - C T G G - - - - - C G G - - - - - G - - - - -
 G G T T T C C T G C A A G G C C T T C T G G A T A C A C C T T C A C T A G C T A T G C T A T G A A T T G G G T G C G A
 G G - - - - - C A A G - G T - - - - - C - - - - - A - - - - - C - - - - - T - - - - - A - - - - - T - - - - - G - - - - - G - - - - -
 G A T C T C C T G T A A G G G T T C T G G A T A C A G C C T T A G C A A C T A T T G G A T C G G C C T G G G T G C G C
 G A - - - - - A A G - G T - - - - - A - - - - - G - - - - - T - - - - - A - - - - - C - - - - - A - - - - - T - - - - - G - - - - -
 G A T T T C C T G T A A G G G G T C T G G A T A C A G G T T C A A C G G T T A T T G G C C T T G C C T G G G T T C G C
 G A - - - - - A A G - G G - - - - - A - - - - - G - - - - - T - - - - - A - - - - - C - - - - - G - - - - - T - - - - - T - - - - -
 G A T C T C C T G T A A G G G T T C T G G A T A T A C C C T T A C C A G T T A C T G G A T C G G C T G G G T G C G C
 G A - - - - - A A G - G T - - - - - A - - - - - T - - - - - T - - - - - C - - - - - C - - - - - T - - - - - C - - - - - G - - - - -

39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C A G G C T C C A G G C A A G G G G C T G G A G T G G G T G G C A G T T A T A T C A T A T G A T G G A A G T A A T A
 C A G G C T C C A G G C A A G G G G C T G G A G T G G G T G G C A G T T A T A T C A T T T G A T G G A A A T A A T G
 C A G G C T C C A G G G A A G G G G C T G G A G T G G G T C T C A A C T A T T A G T G G T A G G C A C T A G T A G C A
 C A G G C T C C A G G G A A G G G G C T G G A G T G G G T T T C A T A C A T T A G T A G T A G T A G T A G T A C C A
 C A G G C T C C T G G G A G G G G G C T G G A A T G G G T G G C C G T A T C G A A G C T G A T G G T G G G A C G A
 C A G A T G C C C G G A A A G G C C T G G A G T G G A T G G G A T C A T C T A T C C T G G C T A A C T C T G A C A
 C A G G C C C T G G A C A A G G G C T T G A G T G G A T G G G A T G G - - - - - C - - - - - A - - - - - C - - - - -
 C A G A T G C C C G G A A A G G C C T G G A G T G G A T G G G A T C A T C T A T C C T G G C T A A C T C T G A C A
 C A G T T G C C C G G T T A A A G C C T G G A G T G G A T G G G T T C A T T T T T C C - - - - - T - - - - - G A T A
 C A G A T G C C C G G G A A A G G C C T G G A G T G G A T G G G A T C A T C C T G A T C C T G A C A C T C T G A C A
 C A - - - - - A - - - - - G - - - - - A - - - - - G - - - - - C - - - - - C - - - - - A - - - - - T - - - - - T - - - - - T - - - - -
 C A G A T G C C C G G G A A A G G C C T G G A G T G G A T G G G A T C A T C C T G A T C C T G A C A C T C T G A C A
 C A - - - - - A - - - - - G - - - - - A - - - - - G - - - - - C - - - - - C - - - - - A - - - - - T - - - - - T - - - - - T - - - - -

59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	
173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A A T A C T A C G C A G A C T C C G T G A A G G G C C G A T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A T T C C A A G A A
 A A T A C T A C G C A G A C T C C G T G A A G G G C C G A T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A T T C C A A G A A
 C A T A C T A C G C A G A C T C C G T G A A G G G C C G G T T C A C C A T C T C C A G A G A C A A T T C C A A G A A
 T A T A C T A C G C A G A C T C T G T G A A G G G C C G A T T C A C C A T C T C C A G G G A C A A C G C C A A G A A
 C T G A A T A C G C T G C A C C C G T G A A A G A C A G A T T C A C C A T C T C A A G A G A T T G A T T C G C A A A
 C C A G A T A C A G C C C G T C C T T C C A A G G C C A A G G T C A C C A T C T C A G C C G A C A A G T C C A T C A G
 C A A C G T A T G C C C A G G G C T T C C A A G A C G G T T G T T T C T C T C T G G A C A C C T C T G T C A G
 C C A G A T A C A G C C C C T C C T T C C A A G G C C A G G T C A C C A T C T C A G C C G A C A A G T C C A T C A G
 C C A G A T A C A G C C C G T C C T T C C A A G G C C A G G T C A C C A T C T C A G T C G A C A A G T C C A T C A G
 C C A G A T A C A G C C C C T C C T T C C A A G G C C A G G T C A C C A T C T C A G C C G A C A A G T C C A T C A G
 C C A G A - - - - - A G C C - - - - - T - - - - - C - - - - - A - - - - - A G G - - - - - A G G - - - - - A G C C - - - - -

78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	
231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C A C G C T G T A T C T G C A A A T G A A C A G C C T G A G A G C T G A G G A C A C G G C T G T G T A T T A C T G T
 T A C G C T G T A T C T C C A A A T G A G T A G C C T G A G A A C T G A G G A C A C G G C T C T A T A T T A C T G T
 C A C G C T G T A T C T G C A A A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C G G C C G T A T A T T A C T G T
 T C A A C T G T A T C T G C A A A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C G G C C G T G T A T T A C T G T
 T C T A C T G T A T C T C C A A A T G A A C A G C C T G A A A G C C G A G G A C A C A G C C G T G T A T T A T T G T
 C A C C C C T A C C T G C A G T G G A G C A G C C T G A A A G C C T C G G A C A C C G C A T G T A T T A C T G T
 C A C G C A T A T C T G C A G A T C A G C A G C C T A A A G G C T G A G G A C A C T G C C G T G T A T T A C T G T
 C A C T G C C T A C C T G C A G T G G A G C A G C C T G A A G G C C T C G G A C A G C C C A T A T A T T A C T G T
 C A C G C C T A C C T C C A G T G G A G C A G C C T G A G G C C T C A G A C G T C G G C G T G T A T T A T T G T
 C A C T G C C T A C C T C C A G T G G A G C A G C C T G A G G C C T C A G A C G T C G G C G T G T A T T A T T G T
 C A C T G C C T A C C T C C A G T G G A G C A G C C T G A G G C C T C A G A C G T C G G C G T G T A T T A T T G T
 C A C T G C C T A C C T C C A G T G G A G C A G C C T G A G G C C T C A G A C G T C G G C G T G T A T T A T T G T

58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76																																						
171	172	173	174	175	176	177	178	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190																																						
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																						
C	A	C	A	G	C	C	G	T	G	T	A	T	T	A	C	T	G	T	A	C	C	A	C	A	G	T	G	T	T	C	C	T	G	A	C	T	G	C	T	G	G	G	G	C	C	A	A	G	G	T	A	C	C	C	T	G

77 78
228 229 230 231 232

G	T	C	A	C
G	T	C	A	C
G	T	C	A	C
G	T	C	A	C
G	T	C	A	C
G	T	C	A	C
G	T	C	A	C
G	T	C	A	C

FR2-Sequenzen der KM-Klone von Patient 3, Jahr 2007

PATIENT 3:
wildtype configuration (WTC): IGHV3-15*02 IGH2-21*02 IGHJ4*03

codon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19																																		
locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19																																		
FRM/CDR	<	-	-	-	-	-	-	F	R	W	2	-	-	-	-	-	-	-	-																																		
WTC	T	G	G	T	C	C	G	C	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A	G	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	G	T	A	T	A	A	A	A	G	C	A	
10 KM-SEQUENZEN/KLONE FR2, 2007																																																					
s1(14)	T	G	G	T	C	C	G	C	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	A	T	A	T	C	A	A	A	A	A	C	A	
s10(12)	T	G	G	T	C	C	G	C	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	A	T	A	T	C	A	A	A	A	G	C	A	
s2(15)	T	G	G	T	C	C	G	A	C	A	G	G	C	T	C	C	G	G	G	A	A	C	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	A	T	A	T	C	A	A	A	A	A	C	A
s3(15)	T	G	G	T	C	C	G	C	C	A	G	G	C	T	T	C	G	G	G	A	A	C	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	A	T	A	T	C	A	A	A	A	A	C	A
s4(16)	T	G	G	T	C	C	G	C	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A	C	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	A	T	A	T	C	A	A	A	A	A	C	A
s5(14)	T	G	G	T	C	C	G	C	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A	C	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	A	T	A	T	C	A	A	A	A	A	C	A
s6(14)	T	G	G	T	C	C	G	C	C	A	G	G	C	T	T	C	G	G	G	A	A	C	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	A	T	A	T	C	A	A	A	A	A	C	A
s7(15)	T	G	G	T	C	C	G	C	C	A	G	G	C	T	T	C	G	G	G	A	A	C	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	A	T	A	T	C	A	A	A	A	A	C	A
s8(16)	T	G	G	T	C	C	G	A	C	A	G	G	C	T	T	C	G	G	G	A	A	C	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	A	T	A	T	C	A	A	A	A	A	C	A
s9(15)	T	G	G	T	C	C	G	C	C	A	G	G	C	T	C	C	A	G	G	A	A	C	G	G	G	C	T	G	G	A	G	T	G	G	G	T	T	G	G	C	C	A	T	A	T	C	A	A	A	A	A	C	A

10.5.3.2 HPCs Patient 2

pm_LK_2002	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81
1.000000000	6	27	27	104	(a1 a2 a3 a4 a5 a6)	A	AG	C	A
0.996614600	5	2	29	61	(=a1=a6 in FR2) (a1 a2 a3 a5 a6)	A	AG	C	A
0.990292390	2	1	30	180	(a3 a5)	A	AG	C	A

pm_LK_2002	r	z	i	locus	Klongruppe	101	121	141	161	181
1.000000000	6	27	27	104	(a1 a2 a3 a4 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.996614600	5	2	29	61	(=a1=a6 in FR2) (a1 a2 a3 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.990292390	2	1	30	180	(a3 a5)	CT	CA	A	G	T

pm_LK_2002	r	z	i	locus	Klongruppe	201	221	241
1.000000000	6	27	27	104	(a1 a2 a3 a4 a5 a6)	G		
0.996614600	5	2	29	61	(=a1=a6 in FR2) (a1 a2 a3 a5 a6)	G		
0.990292390	2	1	30	180	(a3 a5)	G		

pm_KM_2005	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81
1.000000000	14	22	22	172	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	A	C	A	C
0.998390254	13	1	23	61	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	A	C	A	C
0.998390254	13	1	23	207	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	A	C	A	C
0.998390254	13	1	23	162	(k1 k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	A	C	A	C
0.998390254	13	1	23	83	(k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	A	C	A	C
0.996834761	12	1	24	82	(k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	A	C	A	C
0.996113791	11	1	25	41	(k1 k10 k11 k12 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	A	A	C	A
0.996074069	9	1	25	9	(k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k9)	A	C	A	C
0.996074069	9	1	25	16	(k1 k10 k13 k14 k3 k4 k5 k8 k9)	A	C	A	C
0.996011853	7	1	24	129	(k12 k13 k2 k5 k6 k8 k9)	A	C	A	C
0.994976559	6	1	27	130	(k1 k10 k11 k14 k3 k7)	A	C	A	C
0.994366030	3	1	26	18	(k12 k7 k9)	A	C	A	C
0.993923350	2	4	32	31	(k13 k14)	A	C	A	C
0.993218771	3	1	27	190	(k11 k12 k9)	A	C	A	C
0.992973431	3	1	27	18	(k13 k14 k8)	A	C	A	C
0.992785142	3	1	29	13	(k11 k5 k9)	A	C	A	C
0.991806910	3	1	28	80	(k11 k14 k7)	A	C	A	C
0.989489587	2	1	27	17	(k12 k7)	A	C	A	C

pm_KM_2005	r	z	i	locus	Klongruppe	101	121	141	161	181
1.000000000	14	22	22	172	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	CT	CA	A	G	T
0.998390254	13	1	23	61	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	CT	CA	A	G	T
0.998390254	13	1	23	207	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	CT	CA	A	G	T
0.998390254	13	1	23	162	(k1 k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	CT	CA	A	G	T
0.998390254	13	1	23	83	(k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	CT	CA	A	G	T
0.996834761	12	1	24	82	(k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	CT	CA	A	G	T
0.996113791	11	1	25	41	(k1 k10 k11 k12 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	CT	CA	A	G	T
0.996074069	9	1	25	9	(k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k9)	CT	CA	A	G	T
0.996074069	9	1	25	16	(k1 k10 k13 k14 k3 k4 k5 k8 k9)	CT	CA	A	G	T
0.996011853	7	1	24	129	(k12 k13 k2 k5 k6 k8 k9)	CT	CA	A	G	T
0.994976559	6	1	27	130	(k1 k10 k11 k14 k3 k7)	CT	CA	A	G	T
0.994366030	3	1	26	18	(k12 k7 k9)	CT	CA	A	G	T
0.993923350	2	4	32	31	(k13 k14)	CT	CA	A	G	T
0.993218771	3	1	27	190	(k11 k12 k9)	CT	CA	A	G	T
0.992973431	3	1	27	18	(k13 k14 k8)	CT	CA	A	G	T
0.992785142	3	1	29	13	(k11 k5 k9)	CT	CA	A	G	T
0.991806910	3	1	28	80	(k11 k14 k7)	CT	CA	A	G	T
0.989489587	2	1	27	17	(k12 k7)	CT	CA	A	G	T

pm_KM_2005	r	z	i	locus	Klongruppe	201	221	241
1.000000000	14	22	22	172	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	G		
0.998390254	13	1	23	61	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	G		
0.998390254	13	1	23	207	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	G		
0.998390254	13	1	23	162	(k1 k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	G		
0.998390254	13	1	23	83	(k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	G		
0.996834761	12	1	24	82	(k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	G		
0.996113791	11	1	25	41	(k1 k10 k11 k12 k3 k4 k5 k6 k7 k8 k9)	G		
0.996074069	9	1	25	9	(k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k9)	G		
0.996074069	9	1	25	16	(k1 k10 k13 k14 k3 k4 k5 k8 k9)	G		
0.996011853	7	1	24	129	(k12 k13 k2 k5 k6 k8 k9)	G		
0.994976559	6	1	27	130	(k1 k10 k11 k14 k3 k7)	G		
0.994366030	3	1	26	18	(k12 k7 k9)	G		
0.993923350	2	4	32	31	(k13 k14)	G		
0.993218771	3	1	27	190	(k11 k12 k9)	G		
0.992973431	3	1	27	18	(k13 k14 k8)	G		
0.992785142	3	1	29	13	(k11 k5 k9)	G		
0.991806910	3	1	28	80	(k11 k14 k7)	G		
0.989489587	2	1	27	17	(k12 k7)	G		

pm_LK2_KM05	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81
1.000000000	20	20	20	72	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	A	C	A	C
0.998779477	19	1	21	162	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	A	C	A	C
0.998779477	19	1	21	207	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	A	C	A	C
0.998779477	19	1	21	65	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a5 a6)	A	C	A	C
0.997629272	18	1	22	61	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a5 a6)	A	C	A	C
0.997354361	14	1	22	232	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	A	C	A	C
0.997264678	13	1	22	129	(k8 k12 k13 k2 k5 k6 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	A	C	A	C
0.996854605	8	2	23	44	(k13 k14 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	A	AG	C	A
0.996245617	7	2	25	84	(k12 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	A	AG	C	A
0.995466541	9	1	25	9	(k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k9)	A	C	A	C
0.995451944	13	1	23	83	(k8 k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	A	C	A	C
0.994646558	3	1	26	18	(k12 k7 k9)	A	C	A	C
0.994621201	2	1	25	177	(k11 a3)	A	C	A	C
0.994873983	9	1	25	16	(k8 k1 k10 k13 k14 k3 k4 k5 k9)	A	C	A	C
0.994866149	11	1	25	41	(k8 k1 k10 k11 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	A	C	A	C
0.993771438	12	1	24	82	(k8 k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	A	C	A	C
0.993330488	6	1	27	130	(k1 k10 k11 k14 k3 k4 k5 k6 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	A	C	A	C
0.993209287	3	1	27	190	(k11 k12 k9)	A	C	A	C
0.991719981	3	1	29	13	(k11 k5 k9)	A	C	A	C
0.991606417	3	1	27	18	(k8 k13 k14)	A	C	A	C
0.991288488	2	2	32	21	(k13 k14)	A	AG	C	A
0.991269443	3	1	28	180	(k13 a3 a5)	A	AG	C	A
0.990980142	3	1	28	80	(k11 k14 k7)	A	C	A	C
0.99656748	2	1	27	17	(k12 k7)	A	C	A	C

pm_LK2_KM05	r	z	i	locus	Klongruppe	101	121	141	161	181
1.000000000	20	20	20	72	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.998779477	19	1	21	162	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.998779477	19	1	21	207	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.998779477	19	1	21	65	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.997629272	18	1	22	61	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.997354361	14	1	22	232	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	CT	CA	A	G	T
0.997264678	13	1	22	129	(k8 k12 k13 k2 k5 k6 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.996854605	8	2	23	44	(k13 k14 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.996245617	7	2	25	84	(k12 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.995466541	9	1	25	9	(k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k9)	CT	CA	A	G	T
0.995451944	13	1	23	83	(k8 k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	CT	CA	A	G	T
0.994646558	3	1	26	18	(k12 k7 k9)	CT	CA	A	G	T
0.994621201	2	1	25	177	(k11 a3)	CT	CA	A	G	T
0.994873983	9	1	25	16	(k8 k1 k10 k13 k14 k3 k4 k5 k9)	CT	CA	A	G	T
0.994866149	11	1	25	41	(k8 k1 k10 k11 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	CT	CA	A	G	T
0.993771438	12	1	24	82	(k8 k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)	CT	CA	A	G	T
0.993330488	6	1	27	130	(k1 k10 k11 k14 k3 k4 k5 k6 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	CT	CA	A	G	T
0.993209287	3	1	27	190	(k11 k12 k9)	CT	CA	A	G	T
0.991719981	3	1	29	13	(k11 k5 k9)	CT	CA	A	G	T

pm LK02 KM05	r	z	i	locus	Klongruppe	201	221	241
1.000000000	20	20	20	72	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)			
0.998779477	19	1	21	162	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)			
0.998779477	19	1	21	207	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	-G-		
0.998779477	19	1	21	65	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)			
0.997264678	18	1	22	61	(k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)			
0.997264678	14	1	22	232	(k8 k1 k10 k11 k12 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)			A
0.996854665	13	1	22	129	(k8 k12 k13 k2 k5 k6 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)			
0.996245617	8	2	23	44	(k13 k14 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	-G-		
0.995466541	7	2	25	84	(k12 a1 a2 a3 a4 a5 a6)			
0.995466541	9	1	25	9	(k10 k11 k12 k13 k2 k3 k5 k6 k9)			A
0.995451944	13	1	23	83	(k8 k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)			A
0.994644658	3	1	26	18	(k12 k7 k9)	-G-		A
0.994621201	2	1	25	177	(k11 a3)	-G-		A
0.994387303	9	1	25	16	(k8 k1 k10 k13 k14 k3 k4 k5 k9)	-G-		A
0.994066149	11	1	25	41	(k8 k1 k10 k11 k2 k3 k4 k5 k6 k7 k9)			A
0.993771438	12	1	24	82	(k8 k1 k10 k11 k13 k14 k2 k3 k4 k5 k6 k7)			A
0.993304080	6	1	27	130	(k1 k10 k11 k14 k3 k4 k5 k6 k9 a1 a2 a3 a4 a5 a6)	-G-		A
0.993209287	3	1	27	190	(k11 k12 k9)	-G-		A
0.991719981	3	1	29	13	(k11 k5 k9)	-G-		A
0.991606417	3	1	27	18	(k8 k13 k14)	-G-		A
0.991288488	2	2	32	21	(k13 k14)	-G-		A
0.991269043	3	1	28	180	(k13 a3 a5)	-G-		A
0.99090142	3	1	28	80	(k11 k14 k7)	-G-		A
0.990656748	2	1	27	17	(k12 k7)	-G-		A

10.5.3.3 HPCs Patient 3

pm LK 2004	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81	
1.000000000	11	5	5	136	(=m2) (m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)					
0.993388763	9	5	12	145	(m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)					
0.993215251	10	2	7	53	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)					
0.984217308	8	1	8	18	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)	-G				
0.979015847	4	1	13	16	(m10 m11 m7 m9)	-T-				
0.978450620	5	1	13	9	(m1 m10 m3 m4 m7)					
0.977948899	2	1	13	13	(m7 m8)					
0.977921971	3	1	9	221	(=m5) (m10 m11 m5)					
0.974290904	3	1	14	221	(m1 m4 m7)					
0.972455583	2	1	14	18	(m7 m9)					
pm LK 2004	r	z	i	locus	Klongruppe	101	121	141	161	181
1.000000000	11	5	5	136	(=m2) (m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)					
0.993388763	9	5	12	145	(m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)					
0.993215251	10	2	7	53	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)					
0.984217308	8	1	8	18	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)					
0.979015847	4	1	13	16	(m10 m11 m7 m9)					
0.978450620	5	1	13	9	(m1 m10 m3 m4 m7)					
0.977948899	2	1	13	13	(m7 m8)					
0.977921971	3	1	9	221	(=m5) (m10 m11 m5)					
0.974290904	3	1	14	221	(m1 m4 m7)					
0.972455583	2	1	14	18	(m7 m9)					
pm LK 2004	r	z	i	locus	Klongruppe	201	221			
1.000000000	11	5	5	136	(=m2) (m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)					
0.993388763	9	5	12	145	(m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)					
0.993215251	10	2	7	53	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)					
0.984217308	8	1	8	18	(m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)					
0.979015847	4	1	13	16	(m10 m11 m7 m9)					
0.978450620	5	1	13	9	(m1 m10 m3 m4 m7)					
0.977948899	2	1	13	13	(m7 m8)					
0.977921971	3	1	9	221	(=m5) (m10 m11 m5)					
0.974290904	3	1	14	221	(m1 m4 m7)					
0.972455583	2	1	14	18	(m7 m9)					
pm KM 2004	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81	
1.000000000	9	13	13	145	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)					
0.996081596	8	2	15	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)					
0.992785701	6	1	14	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9)					
0.989760871	5	1	16	18	(n10 n3 n7 n8 n9)					
0.989760871	5	1	16	16	(n3 n4 n6 n8 n9)					
0.989158198	4	1	16	9	(n3 n4 n5 n7)					
pm KM 2004	r	z	i	locus	Klongruppe	101	121	141	161	181
1.000000000	9	13	13	145	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)					
0.996081596	8	2	15	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)					
0.992785701	6	1	14	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9)					
0.989760871	5	1	16	18	(n10 n3 n7 n8 n9)					
0.989760871	5	1	16	16	(n3 n4 n6 n8 n9)					
0.989158198	4	1	16	9	(n3 n4 n5 n7)					
pm KM 2004	r	z	i	locus	Klongruppe	201	221			
1.000000000	9	13	13	145	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)					
0.996081596	8	2	15	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)					
0.992785701	6	1	14	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9)					
0.989760871	5	1	16	18	(n10 n3 n7 n8 n9)					
0.989760871	5	1	16	16	(n3 n4 n6 n8 n9)					
0.989158198	4	1	16	9	(n3 n4 n5 n7)					
pm KM 2006	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81	
1.000000000	9	5	5	136	(=x3) (x1 x2 x3 x4 x5 x6 x7 x8 x9)					
0.99460532	8	6	11	53	(x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9)					
0.978737511	3	1	12	221	(x1 x5 x9)					
0.978737511	3	1	12	13	(x1 x6 x9)					
0.978656322	5	1	12	9	(=x8) (x5 x6 x7 x8 x9)					
0.978656322	5	1	12	16	(=x2) (x2 x4 x5 x7 x9)					
pm KM 2006	r	z	i	locus	Klongruppe	101	121	141	161	181
1.000000000	9	5	5	136	(=x3) (x1 x2 x3 x4 x5 x6 x7 x8 x9)					
0.99460532	8	6	11	53	(x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9)					
0.978737511	3	1	12	221	(x1 x5 x9)					
0.978737511	3	1	12	13	(x1 x6 x9)					
0.978656322	5	1	12	9	(=x8) (x5 x6 x7 x8 x9)					
0.978656322	5	1	12	16	(=x2) (x2 x4 x5 x7 x9)					
pm KM 2006	r	z	i	locus	Klongruppe	201	221			
1.000000000	9	5	5	136	(=x3) (x1 x2 x3 x4 x5 x6 x7 x8 x9)					
0.99460532	8	6	11	53	(x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9)					
0.978737511	3	1	12	221	(x1 x5 x9)					
0.978737511	3	1	12	13	(x1 x6 x9)					
0.978656322	5	1	12	9	(=x8) (x5 x6 x7 x8 x9)					
0.978656322	5	1	12	16	(=x2) (x2 x4 x5 x7 x9)					

pm KM 2007	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81
1.000000000	10	11	11	24	(s1 s10 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)	C	A	C	GC
0.995955872	9	2	13	53	(s1 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)	G	C	A	GC
0.991522379	6	1	12	221	(=s10) (s1 s10 s2 s3 s5 s7)	C	C	A	GC
0.989745134	6	1	14	16	(=s6) (s3 s4 s6 s7 s8 s9)	T	G	C	GC
0.985658133	2	1	14	9	(s2 s8)	A	T	G	GC
0.982881660	2	1	15	221	(s4 s8)	T	G	C	GC
0.982881660	2	1	15	15	(=s9) (s4 s9)	CT	G	C	GC

pm KM 2007	r	z	i	locus	Klongruppe	101	121	141	161	181
1.000000000	10	11	11	24	(s1 s10 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)	G	G	T	G	T
0.995955872	9	2	13	53	(s1 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)	G	G	T	G	T
0.991522379	6	1	12	221	(=s10) (s1 s10 s2 s3 s5 s7)	G	G	T	G	T
0.989745134	6	1	14	16	(=s6) (s3 s4 s6 s7 s8 s9)	G	G	T	G	T
0.985658133	2	1	14	9	(s2 s8)	G	G	T	G	T
0.982881660	2	1	15	221	(s4 s8)	G	G	T	G	T
0.982881660	2	1	15	15	(=s9) (s4 s9)	G	G	T	G	T

pm KM 2007	r	z	i	locus	Klongruppe	201	221
1.000000000	10	11	11	24	(s1 s10 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)	T	T
0.995955872	9	2	13	53	(s1 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)	T	T
0.991522379	6	1	12	221	(=s10) (s1 s10 s2 s3 s5 s7)	T	T
0.989745134	6	1	14	16	(=s6) (s3 s4 s6 s7 s8 s9)	T	T
0.985658133	2	1	14	9	(s2 s8)	T	T
0.982881660	2	1	15	221	(s4 s8)	T	T
0.982881660	2	1	15	15	(=s9) (s4 s9)	T	T

pm LK 2007	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81
1.000000000	8	11	11	126	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8 o9)	C	A	C	GC
0.994451641	7	1	12	21	(o6 o1 o2 o4 o5 o8 o9)	C	C	A	GC
0.994451641	7	1	12	18	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8)	T	G	C	GC
0.994451641	7	1	12	16	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8)	T	G	C	GC
0.985522602	4	1	15	221	(=o2) (o6 o1 o2 o4)	A	T	G	GC
0.985282237	2	2	14	221	(o8 o9)	A	C	A	GC

pm LK 2007	r	z	i	locus	Klongruppe	101	121	141	161	181
1.000000000	8	11	11	126	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8 o9)	G	G	T	G	T
0.994451641	7	1	12	21	(o6 o1 o2 o4 o5 o8 o9)	G	G	T	G	T
0.994451641	7	1	12	18	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8)	G	G	T	G	T
0.994451641	7	1	12	16	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8)	G	G	T	G	T
0.985522602	4	1	15	221	(=o2) (o6 o1 o2 o4)	G	G	T	G	T
0.985282237	2	2	14	221	(o8 o9)	G	G	T	G	T

pm LK 2007	r	z	i	locus	Klongruppe	201	221
1.000000000	8	11	11	126	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8 o9)	T	T
0.994451641	7	1	12	21	(o6 o1 o2 o4 o5 o8 o9)	T	T
0.994451641	7	1	12	18	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8)	T	T
0.994451641	7	1	12	16	(o6 o1 o10 o2 o4 o5 o8)	T	T
0.985522602	4	1	15	221	(=o2) (o6 o1 o2 o4)	T	T
0.985282237	2	2	14	221	(o8 o9)	T	T

pm LK04 KM04	r	z	i	locus	(=m2) (n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	21	41	61	81
1.000000000	20	5	5	48	(=m2) (n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	C	A	C	GC
0.995734681	19	1	6	53	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	C	A	C	GC
0.995474778	18	3	9	126	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	C	A	C	GC
0.994398875	9	4	13	63	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)	C	A	G	GC
0.992568849	18	1	7	44	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	A	C	A	GC
0.990863297	13	1	8	18	(n10 n3 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)	G	C	A	GC
0.99031357	9	1	10	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 m1 m4 m7)	C	A	C	GC
0.990892723	9	1	12	9	(n3 n4 n5 n7 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m7)	A	C	A	GC
0.990892723	9	1	12	16	(n3 n4 n6 n8 n9 m10 m11 m7 m9)	T	C	A	GC
0.989986822	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	T	C	A	GC
0.988344503	3	1	12	13	(n3 m7 m8)	C	C	A	GC
0.985866294	3	1	13	18	(n6 m7 m9)	T	C	A	GC
0.985666125	17	1	11	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	C	C	A	GC
0.984780239	3	1	9	221	(=m5) (m10 m11 m5)	G	C	A	GC

pm LK04 KM04	r	z	i	locus	(=m2) (n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	101	121	141	161	181
1.000000000	20	5	5	48	(=m2) (n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	G	G	T	G	T
0.995734681	19	1	6	53	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	G	G	T	G	T
0.995474778	18	3	9	126	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	G	G	T	G	T
0.994398875	9	4	13	63	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)	G	G	T	G	T
0.992568849	18	1	7	44	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	G	G	T	G	T
0.990863297	13	1	8	18	(n10 n3 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)	G	G	T	G	T
0.99031357	9	1	10	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 m1 m4 m7)	G	G	T	G	T
0.990892723	9	1	12	9	(n3 n4 n5 n7 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m7)	G	G	T	G	T
0.990892723	9	1	12	16	(n3 n4 n6 n8 n9 m10 m11 m7 m9)	G	G	T	G	T
0.989986822	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	G	G	T	G	T
0.988344503	3	1	12	13	(n3 m7 m8)	G	G	T	G	T
0.985866294	3	1	13	18	(n6 m7 m9)	G	G	T	G	T
0.985666125	17	1	11	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	G	G	T	G	T
0.984780239	3	1	9	221	(=m5) (m10 m11 m5)	G	G	T	G	T

pm LK04 KM04	r	z	i	locus	(=m2) (n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	201	221
1.000000000	20	5	5	48	(=m2) (n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	T	T
0.995734681	19	1	6	53	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	T	T
0.995474778	18	3	9	126	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	T	T
0.994398875	9	4	13	63	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)	T	T
0.992568849	18	1	7	44	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)	T	T
0.990863297	13	1	8	18	(n10 n3 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)	T	T
0.99031357	9	1	10	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 m1 m4 m7)	T	T
0.990892723	9	1	12	9	(n3 n4 n5 n7 m1 m10 m11 m2 m3 m4 m7)	T	T
0.990892723	9	1	12	16	(n3 n4 n6 n8 n9 m10 m11 m7 m9)	T	T
0.989986822	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	T	T
0.988344503	3	1	12	13	(n3 m7 m8)	T	T
0.985866294	3	1	13	18	(n6 m7 m9)	T	T
0.985666125	17	1	11	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)	T	T
0.984780239	3	1	9	221	(=m5) (m10 m11 m5)	T	T

pm_LK04KM04KM06	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81
1.000000000	29	5	5	48	(alle LK04)				
0.99631847	26	3	9	126	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)				
0.99607927	27	1	6	53	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)				
0.995359389	9	4	13	57	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)				
0.995356869	26	1	7	44	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)				
0.993032282	21	1	8	18	(n10 n3 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)				
0.992999804	14	1	11	16	(n3 n4 n6 n8 n9 x2 x4 x5 x7 x9 m1 m10 m11 m7 m9)				
0.992999804	14	1	11	9	(n3 n4 n5 n7 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m3 m4 m7)				
0.99296137	12	1	10	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 x1 x5 x9 m1 m4 m7)				
0.992564296	18	1	11	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)				
0.992137916	6	1	11	13	(n3 x1 x6 x9 m7 m8)				
0.991495160	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)				
0.988719091	3	1	13	18	(n6 m7 m9)				
0.988656942	3	1	9	221	(=m5) (m10 m11 m5)				
0.986646197	2	1	14	37	(n5 x9)				

pm_LK04KM04KM06	r	z	i	locus	Klongruppe	101	121	141	161	181
1.000000000	29	5	5	48	(alle LK04)					
0.99631847	26	3	9	126	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)					
0.99607927	27	1	6	53	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)					
0.995359389	9	4	13	57	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)					
0.995356869	26	1	7	44	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)					
0.993032282	21	1	8	18	(n10 n3 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)					
0.992999804	14	1	11	16	(n3 n4 n6 n8 n9 x2 x4 x5 x7 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)					
0.992999804	14	1	11	9	(n3 n4 n5 n7 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m3 m4 m7)					
0.99296137	12	1	10	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 x1 x5 x9 m1 m4 m7)					
0.992564296	18	1	11	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)					
0.992137916	6	1	11	13	(n3 x1 x6 x9 m7 m8)					
0.991495160	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)					
0.988719091	3	1	13	18	(n6 m7 m9)					
0.988656942	3	1	9	221	(=m5) (m10 m11 m5)					
0.986646197	2	1	14	37	(n5 x9)					

pm_LK04KM04KM06	r	z	i	locus	Klongruppe	201	221
1.000000000	29	5	5	48	(alle LK04)		
0.99631847	26	3	9	126	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)		
0.99607927	27	1	6	53	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)		
0.995359389	9	4	13	57	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)		
0.995356869	26	1	7	44	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9)		
0.993032282	21	1	8	18	(n10 n3 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m8)		
0.992999804	14	1	11	16	(n3 n4 n6 n8 n9 x2 x4 x5 x7 x9 m1 m10 m11 m7 m9)		
0.992999804	14	1	11	9	(n3 n4 n5 n7 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m3 m4 m7)		
0.99296137	12	1	10	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 x1 x5 x9 m1 m4 m7)		
0.992564296	18	1	11	24	(n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 x1 x2 x4 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)		
0.992137916	6	1	11	13	(n3 x1 x6 x9 m7 m8)		
0.991495160	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)		
0.988719091	3	1	13	18	(n6 m7 m9)		
0.988656942	3	1	9	221	(=m5) (m10 m11 m5)		
0.986646197	2	1	14	37	(n5 x9)		

pm_LK04KM04KM06KM07	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81
1.000000000	39	5	5	129	(alle)				
0.997501791	36	3	8	145	(nicht m2 x3 m5)				
0.996670442	36	1	6	44	(nicht n1 m2 x3)				
0.996670442	36	1	6	53	(nicht m2 s10 x3)				
0.996170182	9	4	13	57	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)				
0.995157025	20	1	11	16	(n3 n4 n6 n8 n9 s3 s4 s6 s7 s8 s9 x2 x4 x5 x7 x9 m10 m11 m7 m8)				
0.995121883	16	1	11	9	(n3 n4 n5 n7 s2 s8 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m3 m4 m7)				
0.994895306	18	1	9	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 s1 s10 s2 s3 s5 s7 x1 x5 x9 m1 m4 m7)				
0.994733297	30	1	8	18	(nicht n1 n4 n5 n6 s10 m2 x3 m7 m9)				
0.994585313	28	1	10	24	(nicht n1 n4 n5 n6 s10 m2 x3 m7 m9)				
0.994284229	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)				
0.993943507	6	1	11	13	(n3 x1 x6 x9 m7 m8)				
0.993920060	10	1	11	206	(s1 s10 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)				
0.992168688	5	1	9	221	(s4 s8 m10 m11 m5)				
0.991873521	3	1	14	15	(n3 s4 s9)				
0.991791981	3	1	13	18	(n6 m7 m9)				
0.989963956	2	1	14	37	(n5 x9)				

pm_LK04KM04KM06KM07	r	z	i	locus	Klongruppe	101	121	141	161	181
1.000000000	39	5	5	129	(alle)					
0.997501791	36	3	8	145	(nicht m2 x3 m5)					
0.996670442	36	1	6	44	(nicht n1 m2 x3)					
0.996670442	36	1	6	53	(nicht m2 s10 x3)					
0.996170182	9	4	13	57	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)					
0.995157025	20	1	11	16	(n3 n4 n6 n8 n9 s3 s4 s6 s7 s8 s9 x2 x4 x5 x7 x9 m10 m11 m7 m8)					
0.995121883	16	1	11	9	(n3 n4 n5 n7 s2 s8 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m3 m4 m7)					
0.994895306	18	1	9	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 s1 s10 s2 s3 s5 s7 x1 x5 x9 m1 m4 m7)					
0.994733297	30	1	8	18	(nicht n1 n4 n5 n6 s10 m2 x3 m7 m9)					
0.994585313	28	1	10	24	(nicht n1 n4 n5 n6 s10 m2 x3 m7 m9)					
0.994284229	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)					
0.993943507	6	1	11	13	(n3 x1 x6 x9 m7 m8)					
0.993920060	10	1	11	206	(s1 s10 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)					
0.992168688	5	1	9	221	(s4 s8 m10 m11 m5)					
0.991873521	3	1	14	15	(n3 s4 s9)					
0.991791981	3	1	13	18	(n6 m7 m9)					
0.989963956	2	1	14	37	(n5 x9)					

pm_LK04KM04KM06KM07	r	z	i	locus	Klongruppe	201	221
1.000000000	39	5	5	129	(alle)		
0.997501791	36	3	8	145	(nicht m2 x3 m5)		
0.996670442	36	1	6	44	(nicht n1 m2 x3)		
0.996670442	36	1	6	53	(nicht m2 s10 x3)		
0.996170182	9	4	13	57	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)		
0.995157025	20	1	11	16	(n3 n4 n6 n8 n9 s3 s4 s6 s7 s8 s9 x2 x4 x5 x7 x9 m10 m11 m7 m8)		
0.995121883	16	1	11	9	(n3 n4 n5 n7 s2 s8 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m3 m4 m7)		
0.994895306	18	1	9	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 s1 s10 s2 s3 s5 s7 x1 x5 x9 m1 m4 m7)		
0.994733297	30	1	8	18	(nicht n1 n4 n5 n6 s10 m2 x3 m7 m9)		
0.994585313	28	1	10	24	(nicht n1 n4 n5 n6 s10 m2 x3 m7 m9)		
0.994284229	10	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m6 m7 m8 m9)		
0.993943507	6	1	11	13	(n3 x1 x6 x9 m7 m8)		
0.993920060	10	1	11	206	(s1 s10 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)		
0.992168688	5	1	9	221	(s4 s8 m10 m11 m5)		
0.991873521	3	1	14	15	(n3 s4 s9)		
0.991791981	3	1	13	18	(n6 m7 m9)		
0.989963956	2	1	14	37	(n5 x9)		

pm_LK04KM04KM06KM07LK07	r	z	i	locus	Klongruppe	21	41	61	81
1.000000000	47	5	5	129	(alle)				
0.997940936	44	3	8	145	(nicht x3 m2 m5)				
0.997255524	44	1	6	44	(nicht n1 x3 m2)				
0.997255524	44	1	6	53	(nicht s10 x3 m2)				
0.996615443	9	4	13	134	(n1 n10 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9)				
0.996180039	27	1	11	16	(n3 n4 n6 n7 n8 n9 s3 s4 s6 s7 s8 s9 x2 x4 x5 x7 x9 m10 m11 m7 m9 o1 o10 o2 o4 o5 o6 o9)				
0.996099851	18	1	11	9	(n3 n4 n5 n7 s2 s8 x5 x6 x7 x8 x9 m1 m10 m3 m4 m7 o8 o9)				
0.995918697	22	1	9	221	(n1 n10 n3 n4 n5 n9 s1 s10 s2 s3 s5 s7 x1 x5 x9 m1 m4 m7 o1 o2 o4 o6)				
0.995791318	37	1	8	18	(nicht n1 n4 n5 n6 s10 x3 m2 m7 m9 o9)				
0.995589252	36	1	10	24	(nicht n1 x1 x2 x3 x4 x5 x6 x7 x8 m2 m5)				
0.995396595	11	1	12	33	(n5 m1 m10 m11 m3 m4 m5 m6 m7 m8 m9 o1)				
0.995058751	10	1	11	13	(n3 x1 x6 x9 m7 m8 o10)				
0.995040990	10	1	11	206	(s1 s10 s2 s3 s4 s5 s6 s7 s8 s9)				
0.994930261	7	1	12	21	(o1 o2 o4 o5 o6 o8 o9)				
0.993811444	7	1	8	221	(s4 s8 m10 m11 m5 o8 o9)				
0.993447760	3	1	14	15	(n3 s4 s9)				

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Nachname: Wartenberg
Vorname: Martin
Nationalität: deutsch

Chronologie:

Okt. 2003 – Nov. 2009 Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilian Universität München und der Technischen Universität München und Abschluss des Medizinstudiums durch das Zweite Staatsexamen

Nov. 2009 – Juni 2010 Ausgestaltung der Doktorarbeit und des zugehörigen wissenschaftlichen Artikels

Juni 2010 - aktuell Assistenzarzt am Pathologischen Institut der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Institutsdirektor Univ-Prof. Dr. A. Rosenwald

12 Dankvermerk

Die vorliegende Doktorarbeit ist meiner Familie, nämlich meiner Mutter Gabriele Wartenberg (geb. Lindenthal), meinem Bruder Roland Oliver Thomas Wartenberg und meinem Vater Thomas Wartenberg gewidmet, da sie mich immer bedingungslos unterstützen. Ferner widme ich diese Arbeit meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Marcus Kremer, vor allem für seine Wertschätzung, sein Vertrauen, seine Förderung und Unterstützung, die er mir aus Anlass dieser Arbeit zukommen hat lassen und die das von mir zu Erwartende weit übertroffen haben.

Ich möchte den medizinisch technischen Assistentinnen des Pathologischen Institutes der Technischen Universität München herzlichst für Ihre ausgesprochen hohe Expertise und Unterstützung im Rahmen der Einarbeitung in die molekular-pathologischen Methoden danken. Dies sind vor allem und insbesondere Frau Birgit Geist und Frau Christa Schott, zu denen auch über die Arbeit hinaus ein von Freundlichkeit, Spaß und Respekt geprägtes Verhältnis bestanden hat.

Frau Dr. Teresa Vela Chavez sei für die gute Zeit, die ich mit Ihr am Institut gehabt habe ebenfalls gedankt.

Herrn Peter Vasil möchte ich für seine Bemühungen beim Eindenken in die vom Verfasser dieser Arbeit entwickelte FLER-Methode zur Rekonstruktion der FL-Evolution mittels HPCs und für die Erstellung des FLER-Computerprogramms herzlichst danken.

Für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seinem modernen, von Expertise geprägten Münchner Institut bestreiten und die zugehörige Infrastruktur nutzen zu können, möchte ich mich aller herzlichst beim Institutsdirektor Herrn Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler bedanken.

„Die Großen hören auf zu herrschen, wenn die Kleinen aufhören zu kriechen“

Johann Christoph Friedrich von Schiller (1759 - 1805)