

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. H. K. Müller-Hermelink

**Ein zytogenetisches Profil diffuser grosszelliger B-Zell Lymphome:
Der Einfluss von Lokalisation und zellulärer Differenzierung**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Philipp Singler
aus Burghausen

Würzburg, April 2007

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. H. K. Müller-Hermelink

**Ein zytogenetisches Profil diffuser grosszelliger B-Zell Lymphome:
Der Einfluss von Lokalisation und zellulärer Differenzierung**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Philipp Singler
aus Burghausen

Würzburg, April 2007

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. German Ott

Korreferent: Prof. Dr. med. H. Höhn

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.08.2007

Der Promovend ist Arzt.

**Meinen Eltern und
Großeltern gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung

1.1	Maligne Lymphome	1
1.2	Die WHO – Klassifikation	2
1.3	Epidemiologie	4
1.4	Diffuse großzellige B-Zell Lymphome	4
1.5	Klinik und Ätiologie	5
1.6	Heterogenität von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen	5
1.7	Entstehung	7
1.8	Genomische Imbalancen bei DLBCL	8
1.9	Ziel der vorliegenden Arbeit	10

2. Material und Methoden

2.1	Untersuchungsmaterial	11
2.2	Angewandte Methoden	13
2.3	Zytogenetische Analysen	13
2.4	Herstellung und Stimulation der Zellkulturen	14
2.5	Präparation der Metaphasen	15
2.6	Giemsa-Bänderungstechnik und Dauerpräparate	16
2.7	Anfertigung und Auswertung der Karyogramme	16
2.8	Statistische Auswertung	17

3. Ergebnisse

3.1	Untersuchungsmaterial	18
3.2	Aberrationen im Primärmaterial	21
3.3	Verteilung chromosomaler Zugewinne und Verluste in unterschiedlichen Subgruppen von DLBCL (Primärmaterial)	24
3.4	Chromosomale Aberrationen in Tumoren, die bei Rezidiven untersucht wurden	29
3.5	Vergleich chromosomalen Aberrationen bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen vom GCB- und non-GCB-Typ	31

<u>4.</u>	<u>Diskussion</u>	
4.1	Einführung	44
4.2	Chromosomale Aberrationen in grosszelligen B-Zell-Lymphomen	44
4.3	Nodale und extranodale DLBCL	47
4.4	Follikuläre Lymphome Grad 3B +/- DLBCL	51
4.5	Zytogenetische Untersuchungen von rezidierten DLBCL	53
4.6	Vergleich der Zytogenetik von GC-DLBCL und non-GC-DLBCL	56
4.7	Vergleich der Ergebnisse mit der aktuellen Literatur	63
4.8	Biologische Bedeutung chromosomaler Aberrationen	65
<u>5.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	67
<u>6.</u>	<u>Anhang</u>	
6.1	Chemikalien und Lösungen für Zellkultur und Zytogenetik	70
6.2	Ansätze für Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur	70
<u>7.</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	72

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome sind Neoplasien, die sich aus den Zellen des lymphatischen Systems, also aus Lymphozyten und ihren Vorläufer- und Stammzellen entwickeln. Sie entstehen durch klonale Expansion einer einzelnen, ungehindert proliferierenden Zelle und umfassen eine histopathologisch und klinisch heterogene Gruppe von Erkrankungen. Im Gegensatz zur hämatogenen Manifestation bei Leukämien beschreibt der Begriff Lymphom den tumorösen Primärbefall von Lymphknoten (nodale Lymphome) oder extranodalen lymphatischen Gewebes wie zum Beispiel der Haut oder des Gastrointestinaltraktes. Die auf molekularer Ebene liegenden zell- und lymphomtypischen Unterschiede begründen das unterschiedliche biologische Verhalten sowie den klinischen Verlauf von malignen Lymphomen.

Im Jahr 1832 hatte Sir Thomas Hodgkin (Hodgkin 1832) maligne Lymphome erstmals als eigenständige Gesamtheit, als „Entität“, beschrieben. Eine Entität ist eine diagnostizierbare Erkrankung, die aufgrund ihrer morphologischen, immunphänotypischen und genotypischen Eigenschaften sowie ihrer klinischen Präsentation charakterisiert ist (Rüdiger 2002). Jedoch sind wenige Gebiete der Pathologie in den vergangenen Jahrzehnten so kontrovers diskutiert worden, wie die Klassifikation maligner Non-Hodgkin-Lymphome. Der Grund hierfür liegt wohl in der Komplexität des Immunsystems und in den vielen unterschiedlichen Entwicklungsstadien der möglichen Ausgangszellen.

Molekularbiologische Untersuchungsmethoden haben das Wissen über die Pathogenese dieser Tumorentität in den letzten Jahren maßgeblich erweitert. Es gelang, präzisere Charakterisierungen und Definitionen der sehr unterschiedlichen Formen vorzunehmen. Die daraus resultierenden wesentlichen Fortschritte in der Diagnostik sind maßgeblich für die Therapie. Neben der primären histopathologischen Diagnostik ermöglicht die

prätherapeutische Erhebung von prognostischen und prädiktiven Parametern und deren Gewichtung in sogenannten „Predictor Scores“ möglicherweise eine individuell differenzierte Therapiestrategie.

1.2 Die WHO - Klassifikation

Im Konsens zwischen Pathologen und Klinikern aus aller Welt wurde 2001 die neue WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatolymphatischen Gewebes veröffentlicht – entstanden aus der Zusammenarbeit der International Lymphoma Study Group, ILSG. (Harris 1999; Jaffe 2001). Sie ist als pathohistologische Klassifikation primär deskriptiv und definiert Krankheitsentitäten aufgrund von morphologischen, genetischen und klinischen Gesichtspunkten. Die Unterteilung in niedrig- und hochmaligne Lymphome, wie sie aus der Kiel-Klassifikation bekannt war, wurde nicht übernommen. Die WHO-Klassifikation unterteilt die hämatologischen Malignome gemäß ihrer Linienzugehörigkeit: myeloische Neoplasien, maligne Lymphome (Non-Hodgkin- und Hodgkin-Lymphome), Mastzellerkrankungen, sowie histiozytische und dendritische Neoplasien. Die Lymphome werden außerdem nach dem Grad ihrer Differenzierung (Vorläuferzell- oder reifzellige Lymphome) und nach B- oder T-Zell-Lymphomen klassifiziert.

Tabelle1: Die WHO – Klassifikation maligner Non-Hodgkin-Lymphome

B-Zell Neoplasien

Vorläufer B-Zell Neoplasien

Vorläufer B-lymphoblastische Leukämie / B-lymphoblastisches Lymphom

Reife B-Zell Neoplasien

Chronische lymphatische Leukämie / kleinzelliges lymphozytisches Lymphom

Prolymphozyten – Leukämie vom B-Typ

Lymphoplasmozytisches Lymphom

Haarzell – Leukämie

Extranodales B-Zell Marginalzonenlymphom, MALT – Typ

Nodales B-Zell Marginalzonenlymphom

Splenisches Marginalzonenlymphom

Mantelzell – Lymphom

Follikuläres Lymphom

Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom

Varianten: Zentroblastisch

Immunoblastisch

Plasmoblastisch

T-Zell- oder Histiocyten- reich

großzellig anaplastisch

Subtypen: Mediastinales (thymisches) großzelliges Lymphom

Intravaskuläres großzelliges Lymphom

Primäres Effusions – Lymphom

Plasmozytom

BURKITT – Lymphom

T-Zell Neoplasien

Vorläufer T-Zell Neoplasien

Vorläufer T-lymphoblastische Leukämie / T-lymphoblastisches Lymphom

Reife T-Zell Neoplasien

Prolymphozyten – Leukämie vom T- Typ

Chronische lymphatische Leukämie

Aggressive NK-Zell Leukämie

Nasale NK / T-Zell Lymphome

Sézary – Syndrom

Mycosis fungoides

Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom

Peripheres T-Zell Lymphom, nicht weiter spezifiziert

Adulte T-Zell Leukämie / Lymphom

Großzellig anaplastisches Lymphom

Primär cutanes CD30 – positives T-Zell Lymphom

Subkutanes Pannikulits-ähnliches T-Zell Lymphom
Intestinales T-Zell Lymphom
Hepatosplenisches Gamma / Delta T-Zell Lymphom

1.3 Epidemiologie

Maligne Lymphome werden jährlich bei über 12 000 Patienten in Deutschland und 55 000 Patienten in den USA neu diagnostiziert (Groves 2000; Zeeb 2001), was einer Inzidenz von mehr als zehn Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohnern entspricht. Sie repräsentieren einen Anteil von etwa drei bis fünf Prozent aller Malignomerkrankungen und stehen an fünfter Stelle der neu aufgetretenen bösartigen Tumoren nach Mamma-, Prostata-, Bronchial- und Kolonkarzinomen. In Nordamerika und Europa ist ihre Inzidenz in den letzten Jahren so rasch angestiegen, dass Weisenburger von einer beginnenden Epidemie spricht (Weisenburger 1994). Die Ursachen für diesen – auch unabhängig von der zunehmenden Verschiebung der Alterspyramide und der HIV-Epidemie – zu beobachtenden Anstieg sind derzeit nicht klar, vor allem weil bei Hodgkin-Lymphomen offenbar kein derartiger Anstieg zu verzeichnen ist (Morgan 1997, Cartwright 1999; Baris 2000). Non-Hodgkin-Lymphome gehen in Europa zu ungefähr 90 Prozent von B-Lymphozyten und zu lediglich zehn Prozent von T- oder NK- (natural killer) Zellen aus (Jaffe 1999).

1.4 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome

Die größte Gruppe der B-Zell Lymphome stellen mit etwa 30 bis 40 Prozent diffuse großzellige B-Zell Lymphome („diffuse large B-cell lymphomas“ – DLBCL) dar (The Non-Hodgkin's-Lymphoma Classification Project 1997). Dieser Anteil ist in Entwicklungsländern sogar noch größer. Ungefähr ein Drittel der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome zeigt eine primär extranodale Manifestation, wobei sie neben dem Magen und der Ileozökalregion in prinzipiell jeder Lokalisation auftreten können (Gatter und Warnke 2001). Neben primären („de-

novo“) diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen können diese Lymphome auch sekundär infolge einer Transformation aus folliculären Lymphomen, Marginalzonen-B-Zell Lymphomen oder einer chronischen lymphatischen Leukämie entstehen. Eine proliferierende periphere B-Zelle mit Ursprung aus dem Keimzentrum oder nach der Keimzentrumsreaktion wird als Ausgangszelle angenommen.

1.5 Klinik und Ätiologie

In den meisten Fällen klagen die Patienten über eine rasch an Größe zunehmende Raumforderung mit Verdrängungssymptomatik. Männer sind etwas häufiger als Frauen betroffen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der siebten Lebensdekade, unterliegt jedoch einer breiten Streuung, wobei auch Kinder betroffen sein können. Das Lymphom verdrängt die physiologische Lymphknotenarchitektur und kann durch Dissemination der Erkrankung unbehandelt innerhalb von Monaten zum Tode führen. Mit einer aggressiven Chemotherapie besteht jedoch eine mögliche kurative Therapieoption. Die Ursache für die Entstehung bleibt ungeklärt, wobei als „Risikofaktoren“ eine genetische Prädisposition, chemische Noxen, Infektionen und Immunsuppression oder andere Immundysfunktionen wie Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen.

1.6 Heterogenität von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen

Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome stellen eine heterogene Gruppe aggressiver lymphoider Neoplasien dar. In der Kiel-Klassifikation wurden zentroblastische, immunoblastische und großzellig-anaplastische Lymphome vom B-Typ unterschieden (Lennert 1992). Dieser Unterscheidung wird in der WHO-Klassifikation durch die Beschreibung von Varianten und Subtypen des diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms Rechnung getragen.

Bei den Varianten handelt es sich um zytomorphologisch oder nach der Art ihrer zellulären Zusammensetzung klassifizierte Tumortypen (zentroblastisch, immunoblastisch, T-Zell/Histiozyten-reich, anaplastisch). Die Subtypen entsprechen klinisch (nach der Präsentation) und nach der Lokalisation definierten Unterentitäten (mediastinales DLBCL, intravaskuläres DLBCL, primäres Ergusslymphom). Das immunhistochemische Profil der Tumorzellen ist variabel. Nach heutigen Standards muss die B-zelluläre Natur des Tumors durch einen linienspezifischen Marker wie CD20, CD79a, PAX-5 oder eine Leichtkettenrestriktion, oder durch ein klonales Rearrangement der Immunglobulinleicht- oder Schwereketten gene belegt sein. Etwa 30-40% der Tumoren zeigen eine Reaktivität für CD10 und/oder BCL-6 als Hinweis auf eine Keimzentrumsdifferenzierung. CD5 ist in etwa 10% der Fälle koexprimiert. Morphologisch von *de novo* entstandenen oder sekundär transformierten DLBCL nicht immer zweifelsfrei unterscheidbare aggressive Neoplasien sind zum einen das Burkitt-Lymphom, zum anderen häufig mit einer Epstein-Barr Virus (EBV)-Infektion einhergehende Immundefizienz-assoziierte Lymphoproliferationen. Gemeinsam sind diesen verschiedenen Tumortypen jedoch das überwiegend diffuse Infiltrationsmuster, die zytologische Zusammensetzung aus transformierten peripheren B-Blasten, ein hoher Proliferationsindex sowie ein aggressiver klinischer Verlauf. Daraus resultiert die Behandlungsoption mit einer Chemotherapie (Pileri 2002).

Eine Übernahme dieser vormals abgegrenzten Entitäten als Subklassifikation wurde von den Verfassern der R.E.A.L. – Klassifikation, der Vorläuferin der WHO-Klassifikation, nicht vorgeschlagen: eine solche Subklassifikation wäre klinisch aufgrund der geringen Reproduzierbarkeit nicht anwendbar, da sowohl verlässliche pathologische als auch biologische Kriterien zur Unterscheidung einzelner Entitäten innerhalb der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome fehlten (Harris 1994; The Non-Hodgkin's-Lymphoma Classification Project 1997). Einige Autoren sprechen deshalb auch von einer „diagnostischen Kategorie“, die im klinischen Verlauf eine große Variabilität zeigt.

Prognostische Aussagen wurden in erster Linie durch die Etablierung eines klinischen Prognose-Index, des „International Prognostic Index – IPI“ (Shipp 1994) möglich. Versuche, auch auf biologischer Ebene (Histologie, Zytogenetik, Immunphänotyp) unterschiedliche - „distinkte“ - Subtypen zu definieren, schlugen lange Zeit fehl. Es gelang nicht, biologische „Marker“ mit einer bestimmten Entität in kausale Verbindung zu bringen (Heim und Mitelman 1995). Da bis heute nur etwa ein Drittel der Patienten durch Chemotherapie geheilt werden kann (Coiffier 2001), wäre es jedoch wichtig, mit eben diesen „Markern“ solche Patienten zu identifizieren, die zum Beispiel von einer aggressiveren Chemotherapie oder experimentellen Therapieansätzen profitieren könnten.

1.7 Entstehung

Die Grundlage für die klonale Dysregulation der Zellproliferation sind Veränderungen im Genom der Zelle. Sie werden in einem Mehrstufenprozeß erworben: primäre Aberrationen sind häufig Translokationen, die zu strukturellen Aberrationen im Genom der Zelle und zu Chromosomenbrüchen führen und mit einem spezifischen Tumortyp assoziiert sind. Sekundäre Aberrationen der Chromosomen scheinen hauptsächlich mit der klonalen Evolution und der Progression des Tumors in Zusammenhang zu stehen. Derartige Veränderungen umfassen vor allem Aberrationen, die durch unbalancierten Verlust oder Zugewinn von genetischem Material gekennzeichnet sind. Andererseits kann das Genom auch auf Genebene durch Mutationen oder Genamplifikationen verändert werden.

Diese Mechanismen führen zur unkontrollierten Aktivierung von wachstumsfördernden Genen (Onkogenen) oder zum Funktionsverlust von wachstumshemmenden Genen (Tumorsuppressorgenen) und von Genen, die den programmierten Zelltod (Apoptose) regulieren. Die häufigsten chromosomalen Aberrationen bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen stellen Translokationen unter Mitbeteiligung der Bande 14q32 dar, dem Sitz des Immunglobulin-Schwerkettengens (IgH). Durch diese Umlagerung geraten

verschiedene Proto-Onkogene, die auf den an der Translokation beteiligten Partner-Chromosomen liegen, unter den Einfluß des IgH- Promotors und werden so dereguliert und/oder überexprimiert.

1.8 Genomische Imbalancen bei DLBCL

Die häufigsten rekurrenten Translokationen (etwa 30 - 40 Prozent) der diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen betreffen nach Angaben aus der Literatur die 3q27-Region, häufig durch eine $t(3;14)(q27;q32)$ (Offit 1991; Gatter und Warnke 2001), durch die der Transkriptionsfaktor *BCL6* auf 3q27 überexprimiert wird (Ye 1993). In etwas geringerer Anzahl werden Translokationen unter Einbeziehung von 18q21, dem Genlocus von *BCL2*, beobachtet. Seine Bedeutung liegt in der Verhinderung des programmierten Zelltodes. An erster Stelle steht hier die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$, die zwar hauptsächlich bei folliculären Lymphomen, jedoch ebenfalls in bis zu 30 Prozent der großzelligen B-Zell Lymphome angetroffen wird (Offit 1989). Die für das Burkitt-Lymphom charakteristische Translokation $t(8;14)(q24;q32)$ (Zech 1976), welche die Expression von *CMYC* auf 8q24 beeinflusst, ist deutlich seltener. Durch Überexpression wird dieses Onkogen dereguliert, wodurch die Ausdifferenzierung der Zellen verhindert und die Zellen im Zyklus gehalten werden (Dalla-Favera 1982).

Derartige primäre Aberrationen sind in der Regel mit spezifischen Tumortypen assoziiert. Ihre Bedeutung liegt in der Etablierung des malignen Phänotyps, das heißt sie sind wichtig für die primäre Tumorentstehung. Bereits die unterschiedliche Frequenz dieser primären Aberrationen in nodalen und extranodalen Tumoren unterstreicht die Bedeutung verschiedener Transformationswege: die $t(14;18)$ wird ausschließlich und die $t(3;14)$ weit überwiegend in nodalen diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen, die $t(8;14)$ hingegen deutlich häufiger in extranodalen Tumoren nachgewiesen (Ott 2000). Auch über diese grundsätzlichen - die Primärlokalisierung betreffenden - Befunde hinaus konnten Daten erhoben werden, die auf eine unterschiedliche Frequenz

dieser Aberrationen in zytomorphologisch definierten Subgruppen hinweisen. Schlegelberger et al. konnten zeigen, dass die t(14;18) signifikant häufiger in zentroblastischen Varianten vorkommt als in immunoblastischen Lymphomen (Schlegelberger 1999). Dies deutet auf eine genetische Unterschiedlichkeit dieser Tumoren hin, zumindest jedoch auf eine unterschiedliche Bedeutung chromosomaler Alterationen in zytomorphologisch verschiedenen Varianten von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen.

Die meisten Fälle offenbaren jedoch weit komplexere zytogenetische Anomalien. In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch die sekundären chromosomalen Aberrationen bei morphologischen Varianten unterschiedlich waren. Strukturelle Chromosomenaberrationen betrafen am häufigsten den langen Arm des Chromosoms 6 in Form von Deletionen (Schlegelberger 1992). Die Regionen 6q15-21 und 6q23-27 stehen im Verdacht, ein oder mehrere Tumorsuppressorgene zu beherbergen (Zhang 2000). Aufgrund der Häufigkeit ihres Auftretens in hämatologischen wie anderen Malignomen stellt die 6q-Deletion ein Beispiel für eine bedeutende sekundäre Chromosomenalteration dar.

Über den Entstehungsort oder die Zytomorphologie hinaus existiert eine weitere Möglichkeit der Unterteilung von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen. Sie ist seit kurzem Gegenstand der Forschung. Alizadeh et al. untersuchten im Jahr 2000 das Gen-Expressionsmuster von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen anhand von Microarrays und identifizierte zwei Kategorien, deren jeweils vorherrschender Zelltyp durch unterschiedliche Reifestadien der B-Zell Entwicklung charakterisiert ist. Der sogenannte „germinal center“ Typ (GCB) wies ein Genexpressionsmuster ähnlich der B-Zellen im physiologischen Keimzentrum auf. Beim „activated B-Cell“ Typ (ABC) war ein Expressionsprofil ähnlich von *in vitro* aktivierten, peripheren B-Zellen nachweisbar (Alizadeh 2000).

1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit

In den letzten Jahren wurde auf der Grundlage von zytogenetischen, molekularbiologischen und zellbiologischen Erkenntnissen neue Einblicke in die Pathogenese und Progression maligner Lymphome gewonnen und damit entscheidende Hinweise zu einem besseren Verständnis der Biologie von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen und ihrer möglichen Therapie geschaffen. Die oben angeführten Beispiele sollen ansatzweise zeigen, dass aufgrund des nicht-zufälligen („non-random“) Verteilungsmusters von rekurrenten genomischen Aberrationen (Johansson 1995) die Annahme berechtigt ist, dass es sich bei der diagnostischen Kategorie der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome auch genetisch um eine heterogene Entität handelt. Es sollte nun untersucht werden, wie sich die verschiedenen genomischen Imbalancen auf postulierte Subgruppen verteilen und ob durch ihr Vorkommen Rückschlüsse auf die Zugehörigkeit eines vorliegenden diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms zu einer definierten Untergruppe gezogen werden können.

Durch die Erstellung eines zytogenetischen Profils diffuser großzelliger B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome soll ein Baustein für eine reproduzierbare Definition eigenständiger Entitäten geliefert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Die untersuchten Fälle entstammten dem Routineeingangsmaterial des Institutes für Pathologie der Universität Würzburg sowie des Referenzzentrums für Lymphknotenpathologie Würzburg aus den Jahren 1991-2004. Es wurden insgesamt 162 großzellige B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome untersucht, von denen 25 als Rezidiv in die Datenbank aufgenommen worden waren. Voraussetzung für die Aufnahme eines Falles war neben der Diagnose eines grosszelligen B-Zell-Lymphoms der zytogenetische Nachweis klonaler chromosomaler Aberrationen.

Die 137 primären B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome untergliedern sich in 31 extranodale Non-Hodgkin-Lymphome (21 im Gastrointestinaltrakt - vorwiegend Magen, 5 in der Schilddrüse, und jeweils einmal in Hoden, Mamma, Lunge, Sinus maxillaris und Glandula submandibularis) und 106 primär nodale Tumoren, darunter 82 diffuse großzellige B-Zell Lymphome mit überwiegend diffusem Wachstumsmuster und 24 follikuläre Lymphome Grad 3b mit oder ohne zusätzliche Komponente eines diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms (FL Grad 3B +/- DLBCL).

Die Klassifikation eines malignen Lymphoms als primär extranodal setzte voraus, dass die entsprechende extranodale Lokalisation die einzige Infiltrationsstelle beziehungsweise diejenige Lokalisation mit der höchsten Tumorlast war, ohne Berücksichtigung, ob zusätzliche regionäre Lymphknoten befallen waren. Als „nodale“ Lymphome wurden auch Tumoren der Tonsillen (5 Fälle) und der Milz (2 Fälle) bewertet. Zwei DLBCL traten im Knochenmark mit leukämischer Ausschwemmung auf.

Nach den *Kriterien der Kiel-Klassifikation* fanden sich 22 immunoblastische Lymphome, alle mit diffusem Wachstumsmuster. Neben den 31 extranodalen

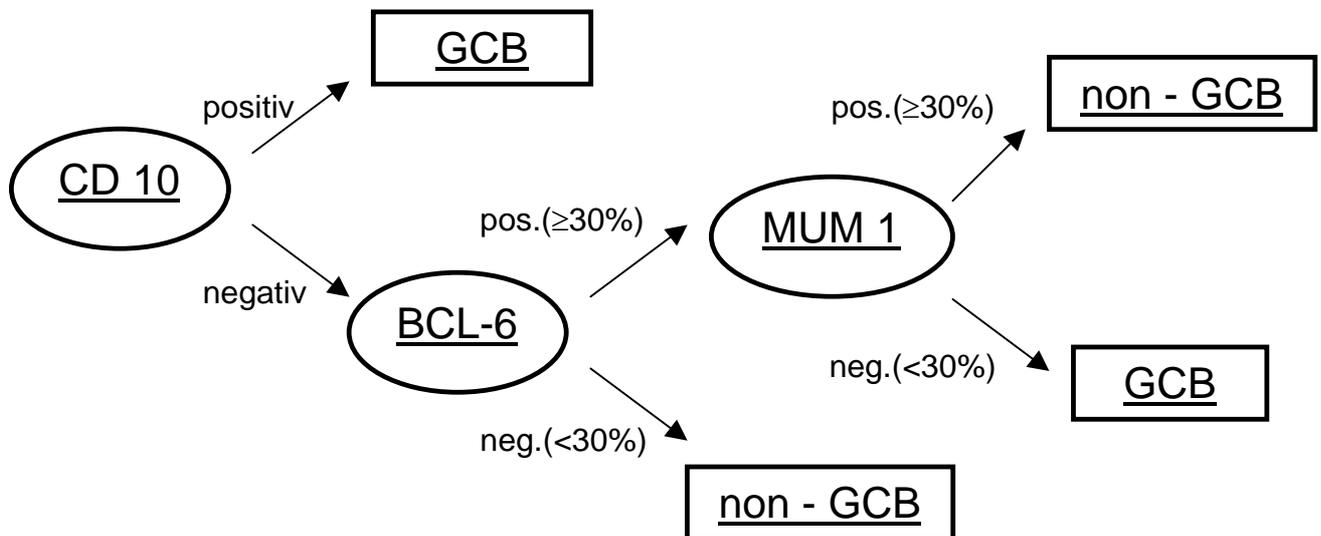
Tumoren (eingeschlossen drei Burkitt-like Tumoren) wurden 84 centroblastische Lymphome diagnostiziert.

Die histopathologischen Diagnosen wurden anhand von mit Hämatoxylin-Eosin (HE), Giemsa, PAS und der Silberfärbung nach Gomöri gefärbten Paraffinschnitten unter Berücksichtigung immunhistochemischer Zusatzuntersuchungen (Antigen-Expressionsmuster) gestellt. Die Kriterien der neuesten Fassung der WHO-Klassifikation kamen dabei zur Anwendung (Harris 1999, Jaffe 2001). Subtypen des DLBCL, wie das primäre Effusions-Lymphom, das mediastinale oder thymische DLBCL, das T-Zell- oder Histiocytenreiche DLBCL oder das intravaskuläre großzellige B-Zell-Lymphom wurden nicht einbezogen.

Über die zur Diagnosefindung erforderlichen Marker hinaus wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD10, BCL-6 sowie MUM 1 durchgeführt. Diese Zusatzfärbungen kamen zur Anwendung, da sich in der Arbeit von Alizadeh (2000) gezeigt hatte, dass sich DLBCL auf molekularer Ebene aufgrund ihres „Genexpressionsprofils“ unterscheiden lassen.

Nach den Kriterien von Hans et al. ließ sich das vorliegende Untersuchungsgut in 68 GCB („Keimzentrums-“) DLBCL und 69 non-GCB DLBCL unterteilen; letztere in ihrem Expressionsmuster den von Alizadeh definierten ABC („aktivierte B-Zell-“) DLBCL ähnlich. Folgender Algorithmus zur Unterteilung der 137 Tumoren wurde angewandt: Zeigte sich eine positive CD10-Expression, wurde der Fall der GCB-Gruppe zugeordnet. War CD10 negativ und BCL-6 in kleiner als 30% exprimiert, wurden die Fälle als non-GCB klassifiziert. Bei einer BCL-6 Expression größer oder gleich 30% kam es auf die MUM1-Expression an: größer oder gleich 30% wurde als non-GCB, kleiner 30% als GCB klassifiziert (Hans 2004).

Abbildung 1: Flussdiagramm zur Klassifikation der Lymphome in GCB- oder non-GC-DLBCL



2.2 Angewandte Methoden

Die älteste etablierte Methode zur Erfassung numerischer oder struktureller chromosomaler Aberrationen stellt die klassische zytogenetische Bänderungsanalyse dar. Mit den Methoden der Zellkultur werden aus nativ zugesandten Lymphomgeweben Einzelzellsuspensionen hergestellt. Diese Zellen werden zum einen zur Metaphasenpräparation nach Standardprotokollen verwendet, um die diffusen großzelligen B-Zell Lymphome zytogenetisch zu charakterisieren. Zum anderen dienen sie - fixiert in Methanol-Eisessig - als Ausgangsmaterial zur Durchführung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).

2.3 Zytogenetische Analysen

Das im Institut nativ eingegangene Gewebe wurde nach Entnahme von Material für die Diagnostik und die Tumordatenbank mechanisch mittels eines sterilen Nyloonsiebs vereinzelt und die Zellen in einem Kulturmedium aus RPMI 1640

(Gibco) mit einem Zusatz von zehn Prozent fötalem Kälberserum und Antibiotika kultiviert. Nach 24 Stunden Kultur folgte die Inkubation mit 50 µl einer Colchizinlösung (0,1 µg/ml) für 30 – 50 Minuten, anschließend die Präparation der Metaphasen durch Inkubation der Zellen in einer 0,075 molaren Kaliumchloridlösung und Fixation in einer – 20 °C kalten Lösung aus Methanol und Eisessig (3:1). Nach mehrmaligem Waschen wurde das Pellet auf angefeuchtete Objektträger ausgetropft. Die Bänderung wurde nach Lagerung der Präparate für etwa eine Woche durch Inkubation mit einer handelsüblichen Trypsinlösung (400 mg / 100 ml 0,9% NaCl-Lösung) und Gegenfärbung mit Giemsa erreicht. Die Beschreibung der chromosomalen Veränderungen folgte den Regeln des Internationalen Systems für humane zytogenetische Nomenklatur - ISCN (Shaffer 2005).

Ein Teil der so gewonnenen Zellen wurde in einer Fixationslösung bestehend aus einem Teil 100% Eisessigsäure und drei Teilen 100% Methanol bei –20°C aufbewahrt. Diese Zellen eignen sich gut als Material für spätere Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (Yan 2000); damit ergibt sich die Möglichkeit einer retrospektiven Analyse archivierten Untersuchungsgutes (Baurmann 1993; Gray 1994).

2.4 Herstellung und Stimulation der Zellkulturen

Das Nativ-Material wurde zunächst durch ein steriles Nylonsieb der Porengröße 100 µm gepresst. Die im Gewebe befindlichen Zellen wurden mittels 20 ml Zellkulturmedium RPMI 1640 (Gibco) in Lösung gebracht, anschließend die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt und zehn Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und nochmals 20 ml RPMI 1640 zugesetzt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach Bestimmung der Zelldichte pro Milliliter mittels einer Zählkammer wurde erneut abzentrifugiert oder RPMI 1640 Medium mit fetalem Kälberserum und Gentamycin hinzugefügt, bis nach Aufteilung der Zellsuspension in zwei oder drei Kulturflaschen mit je 10 ml Inhalt die Zellzahl $1-2 \times 10^7$ pro 10 ml betrug. Die

Zellkulturen konnten nun bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 7,5% im Brutschrank inkubiert werden.

2.5 Präparation der Metaphasen

Von jedem Fall wurde je eine Kulturflasche zur Direktpräparation (ohne Inkubation im Brutschrank) verwendet. Von den unstimulierten Zellsuspensionen wurde ein 24-Stunden-Abbruch und, wenn ausreichend Material vorhanden war, zusätzlich ein 48-Stunden-Abbruch durchgeführt. Die Arretierung sich teilender Zellen in der Metaphase durch Zerstörung des Spindelapparates wurde durch Zusatz einer Colchizin-Lösung (Konzentration: 0,1 µl/ml) erreicht. Im Falle eines Direktabbruches wurden die Lösungen mit 60 µl Colchizin versetzt und für 20 Minuten im Brutschrank belassen. Allen anderen Ansätzen wurde 30 µl Colchizin zugefügt; die Inkubationszeit betrug hier 30 Minuten.

Anschließend wurde die Zelllösung in ein Zentrifugengläschen umgefüllt und für 10 Minuten bei 1000 U / min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit erwärmter (37°C), hypotoner 0,75 molarer KCl-Lösung vorsichtig resuspendiert und anschließend 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen und Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension und Fixation des Pellets mit einer -20°C kalten Fixationslösung, bestehend aus einem Teil 100% Eisessigsäure und drei Teilen 100% Methanol. Dabei wurde zuerst 1 ml der Fixierung vorsichtig über das resuspendierte Zellmaterial gegeben, die Lösung durchmischt und anschließend das Volumen auf 10 ml mit Methanol-Eisessig-Lösung ergänzt. Dieser Arbeitsschritt wurde zweimal wiederholt, wobei bei den Wiederholungen das Schichten des Fixativs unterbleiben konnte. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das Zellsediment mit 0,5 ml Fixativ resuspendiert und je drei bis fünf Tropfen der Lösung (je nach Zelldichte) auf angefeuchtete Objektträger aufgetropft, die zuvor in 70% Alkohol gereinigt und mit destilliertem Wasser gespült worden waren. Die so erzeugten Präparate reiften nun geschützt vor Verunreinigungen und Sonnenlicht für 10-14 Tage bei Raumtemperatur.

2.6 Giemsa-Bänderungstechnik und Dauerpräparate

Bei der Giemsa-Bänderungstechnik wurden die luftgetrockneten Präparate zwischen 10 und 40 Sekunden – was für jeden Fall individuell zu ermitteln war – in Trypsinlösung (400 mg Trypsin gelöst in 100 ml 0,9% NaCl-Lösung) und unmittelbar im Anschluß zur Unterbrechung der enzymatischen Andauung der Chromosomen zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung gespült. Anschließend erfolgte für etwa fünf Minuten die Färbung der Präparate in Giemsa, bestehend aus 5 ml gefilterter Stammlösung und 75 ml Sörensen-Puffer. Nun wurden die gefärbten Objektträger zweimal mit Aqua destillata gespült, luftgetrocknet und zuletzt mit Pertex-Schnelleindeckmittel und Deckglas eingedeckt.

2.7 Anfertigung und Auswertung der Karyogramme

Die Dauerpräparate wurden nun systematisch mit dem Lichtmikroskop bei etwa fünfundzwanzigfacher Vergrößerung nach Mitosen abgesucht. Geeignete Metaphasen wurden mit einem Photomikroskop (Axiophot, Firma Zeiss) unter Verwendung eines Ölimmersions-Objektivs bei hundertfacher Vergrößerung photographiert. Die Klassifikation der Aberrationen wurde mit einem an das Mikroskop angeschlossenen Computer – also einer digitalen Bildverarbeitungseinheit - durchgeführt. Sie folgte der internationalen Nomenklatur für die Zytogenetik des Menschen (ISCN 2005).

Um reproduzierbare und exakte Ergebnisse zu erstellen, wurden im Durchschnitt 10 bis 20 Metaphasen pro Fall ausgewertet. Klonale Aberrationen lagen dann vor, wenn zumindest zwei verschiedene Metaphasen des gleichen Falles identische strukturelle Chromosomenveränderungen oder numerische Zugewinne aufwiesen, oder wenn mindestens drei der ausgewerteten Metaphasen gleiche numerische Verluste zeigten.

2.8 Statistische Auswertung

Die bekannteste mathematische Technik stellt der Chi-Quadrat-Test zum Prüfen von Abhängigkeiten bei Zufallsvariablen dar. Die untersuchten Fälle stellen mathematisch gesehen eine Stichprobe dar. Die Nullhypothese lautet: Der Beobachtungsreihe liegt die angenommene theoretische Verteilung zugrunde. Die Beurteilung erfolgt anhand der im Chi-Quadrat-Test erhaltenen Signifikanzniveaus. Diese sogenannten Irrtumswahrscheinlichkeiten bewerten bei einer Wahrscheinlichkeit (p-Wert) von 0,05 (5%) die angenommene theoretische Verteilung (Nullhypothese) als signifikant und bei 0,001 (0,1%) als hochsignifikant. Die Bedingungen für die Anwendung des Chi-Quadrat-Tests, nämlich die Unabhängigkeit der zu vergleichenden Gruppen (zum Beispiel ‚nodal‘ versus ‚extranodal‘ und ‚Merkmal vorhanden‘ versus ‚Merkmal nicht vorhanden‘) und die erwarteten Häufigkeiten werden erfüllt (Weber 1964).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungsmaterial

Von insgesamt 162 Patienten war in 137 Fällen das Proben-Material bei der Erstdiagnose gewonnen worden; in 25 Fällen handelte es sich somit um ein Rezidiv. Voraussetzung für die Aufnahme eines Falles war neben der Diagnose der zytogenetische Nachweis klonaler chromosomaler Aberrationen.

Die 137 zum Zeitpunkt der Diagnose untersuchten großzelligen B-Zell-Lymphome untergliedern sich in 31 extranodale Non-Hodgkin-Lymphome (18 mit Primärmanifestation im Magen, zwei im Dünndarm, eines im Colon, fünf in der Schilddrüse und je einmal in Sinus maxillaris, Mamma, Hoden, Lunge und Glandula submandibularis) und 106 nodale Tumoren, darunter 82 rein diffuse großzellige B-Zell Lymphome und 24 folliculäre Lymphome Grad 3B mit (17 Fälle) oder ohne (7 Fälle) zusätzliche Komponente eines diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms (FL Grad 3B +/- DLBCL). Letztere bestehen nur aus Zentroblasten, denen keine Zentrozyten untergemischt sind. Ihre biologischen und klinischen Eigenschaften entsprechen offenbar diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen (Ott 1999). Sie wurden zur Verifizierung und Prüfung dieser Annahme in die Studie mit einbezogen.

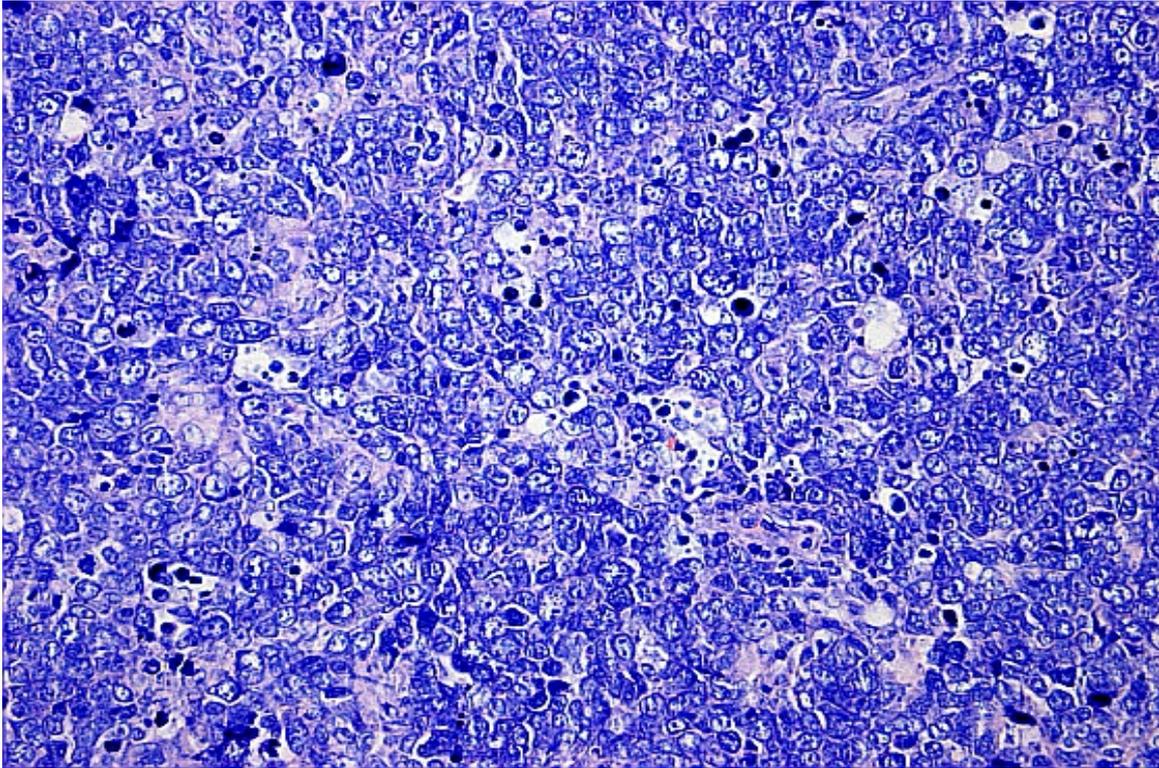


Abbildung 2: DLBCL vom centroblastischen Typ.

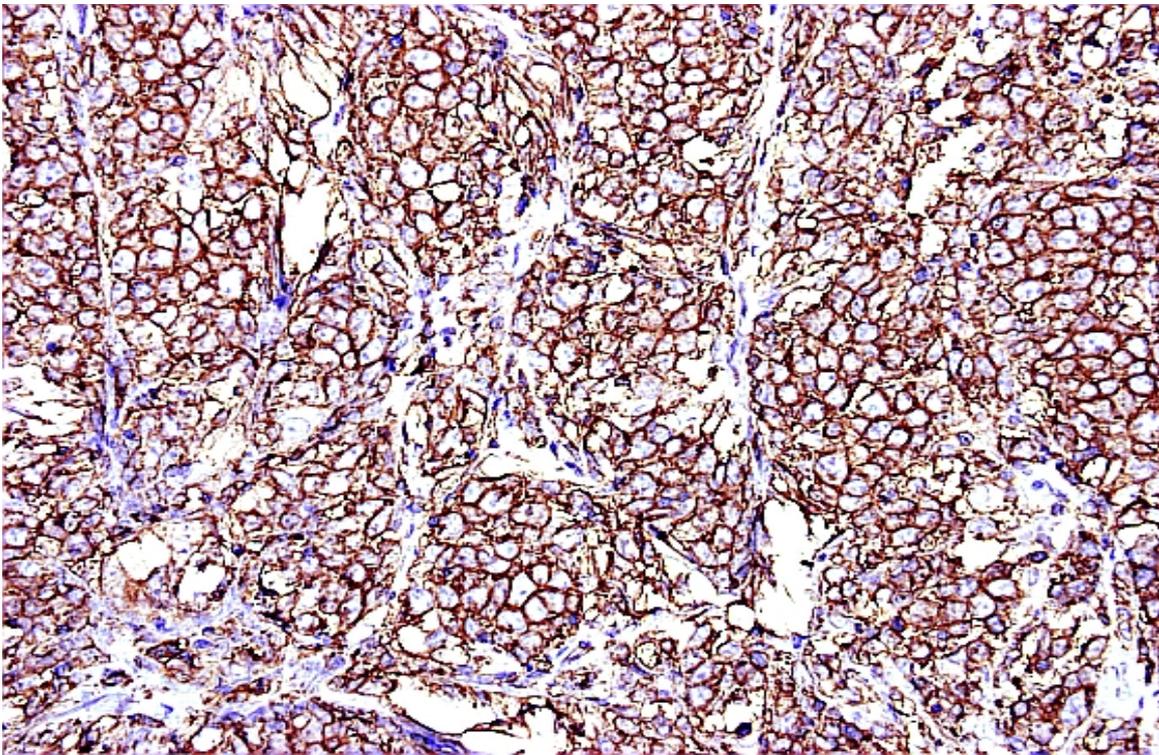


Abbildung 3: DLBCL. Färbung mit CD10. Die Tumorzellen sind sämtlich positiv.

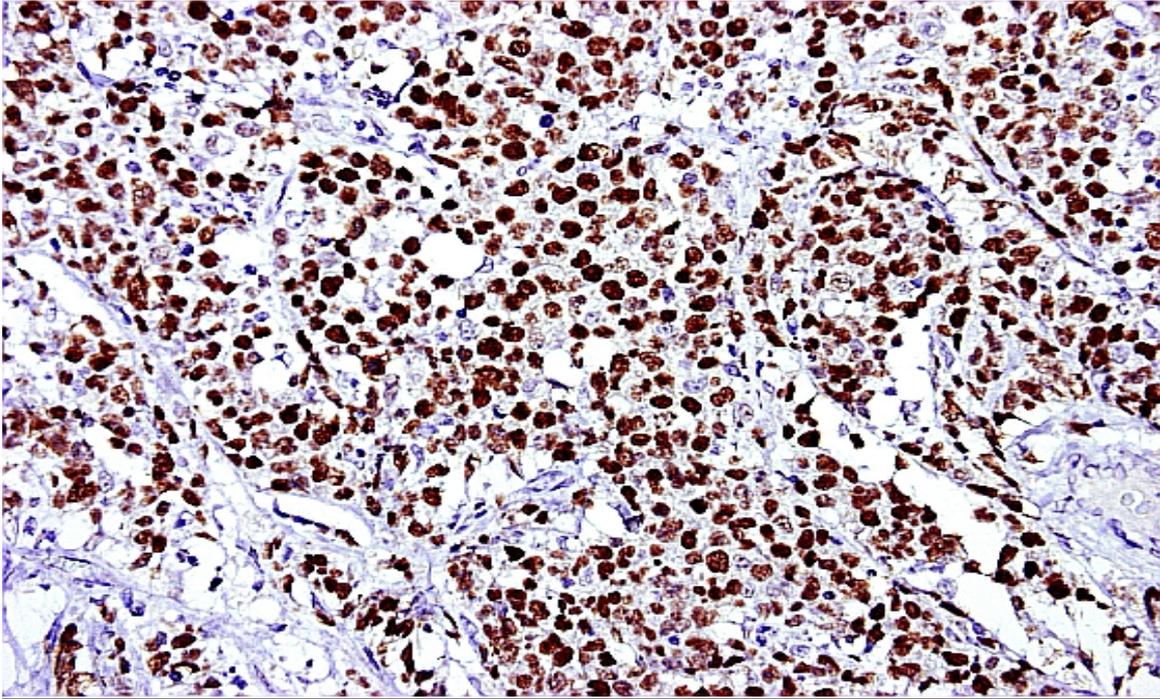


Abbildung 4: DLBCL. Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen BCL-6. Ein Großteil der Zellen zeigt eine nukleäre Reaktivität.

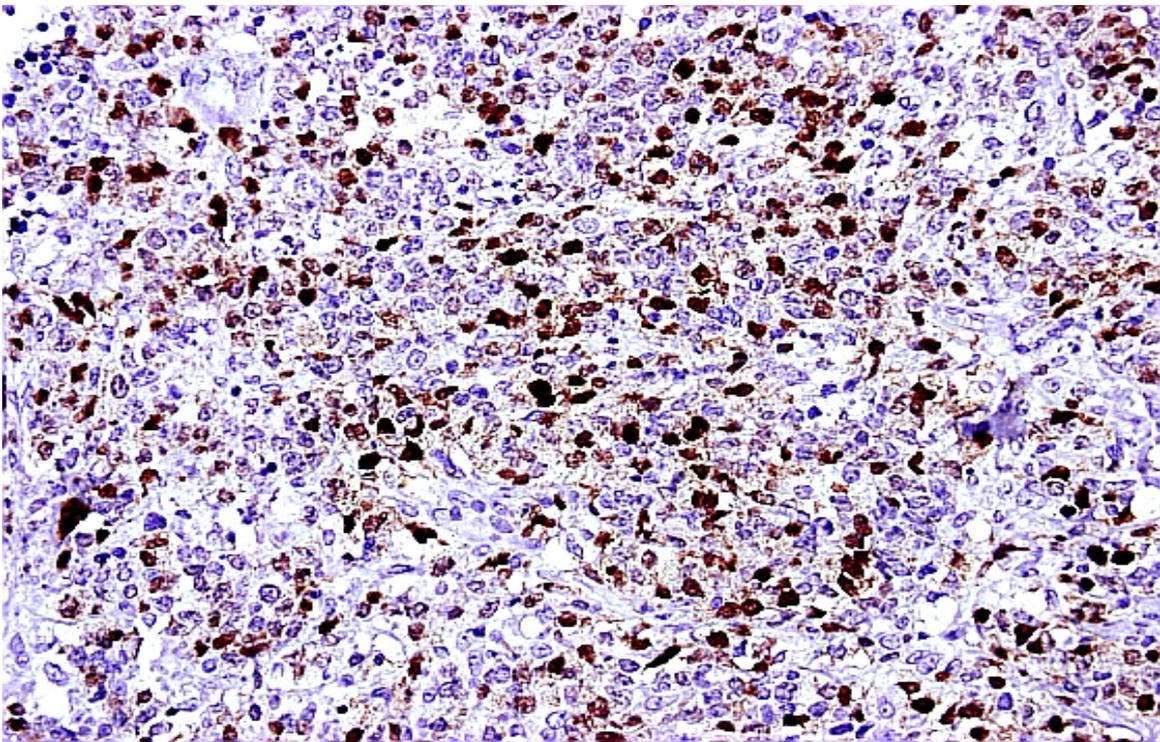


Abbildung 5: DLBCL. Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen MUM1. Im Vergleich zu den ersten beiden immunhistochemischen Färbungen zeigt sich eine geringere Reaktivität der Kerne.

3.2 Aberrationen im Primärmaterial

Es besteht die Möglichkeit, dass beim Rezidiv eines Tumors andere genetische Aberrationen auftreten, als bei der primären Manifestation. Deshalb werden zunächst nur die Aberrationen im Primärmaterial (n=137) betrachtet. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die beobachteten chromosomalen Zugewinne und Verluste sowie über deren absolute und relative Häufigkeit. Diagramm 2 und 3 zeigen die wichtigsten Zugewinne und Verluste der Regionen, deren relative Häufigkeit jeweils mindestens 10% beträgt.

Trisomien der Chromosomen 3, 7, 12 und 18 traten in 18%, 15%, 14% und 12% auf. Weiterhin fällt auf, dass chromosomale Zugewinne insgesamt häufiger als Verluste sind. 16 Lokalisationen mit Zugewinnen weisen eine relative Häufigkeit von mehr als 10% auf, während es nur elf Regionen mit relevanten Verlusten gibt (siehe Tabelle 1).

Die mit Abstand häufigste Aberration ist der Verlust des langen Armes des Chromosoms 6 mit 44% (60/137) im Primärmaterial. Zugewinne bei 3q und 3p inklusive der jeweils hinzugerechneten Fälle einer Trisomie 3 folgen mit 29% (40/137) bzw. 28% (39/137). In absteigender Reihe folgen del 17p (25% - 34/137), +12q (23% - 31/137) und +Xp (23% - 32/137), +1q (22% - 30/137), +7q (21% - 29/137), +7p (20% - 28/137) und +11q (19% - 26/137). Zugewinne in 12p, 18q sowie Verluste von 1p und Xq wurden in jeweils 18% festgestellt. Die Lokalisationen 1q und Xp weisen Zugewinne *und* Verluste in relevanter Höhe auf.

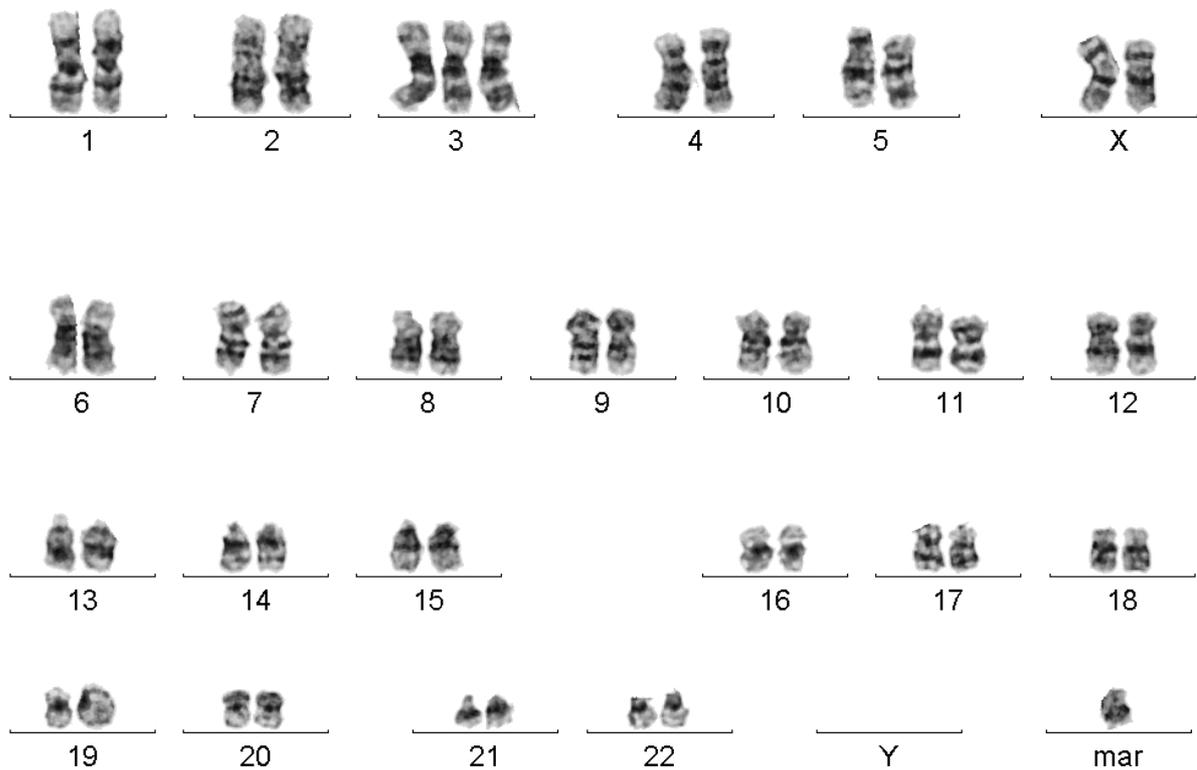


Abbildung 6: Karyotyp eines DLBCL mit einer Trisomie 3

TABELLE 2: Aberrationen im Primärmaterial (n=137)

Lokalisation	Anzahl	Prozent	Lokalisation	Anzahl	Prozent
del (1q)	20	15%	del (11q)	8	6%
del (1p)	25	18%	+ 12	19	14%
+ 1q	30	22%	+ 12q	31	23%
del (2p)	17	12%	+ 12p	24	18%
+ 3	24	18%	t (14;18)	13	9%
+ 3q	40	29%	+ 15q	9	7%
+ 3p	39	28%	+ 16p	16	12%
t (3;14)	12	9%	+ 17q	22	16%
del (4q)	19	14%	+ 17p	10	7%
+ 5q	22	16%	del (17p)	34	25%
del (6q)	60	44%	+ 18	16	12%
+ 6p	18	13%	+ 18q	25	18%
+ 7	20	15%	+ 18p	19	14%
+ 7q	29	21%	del (18 p)	11	8%
+ 7p	28	20%	del (19q)	10	7%
del (7q)	13	9%	+ 21q	17	12%
del (8p)	14	10%	del (22q)	11	8%
t (8;14)	10	7%	del (Xq)	24	18%
del (9p)	18	13%	del (Xp)	20	15%
del (10q)	15	11%	+ X	32	23%
+ 11q	26	19%	del Y	13	9%

DIAGRAMM 1a: Die häufigsten chromosomalen Zugewinne

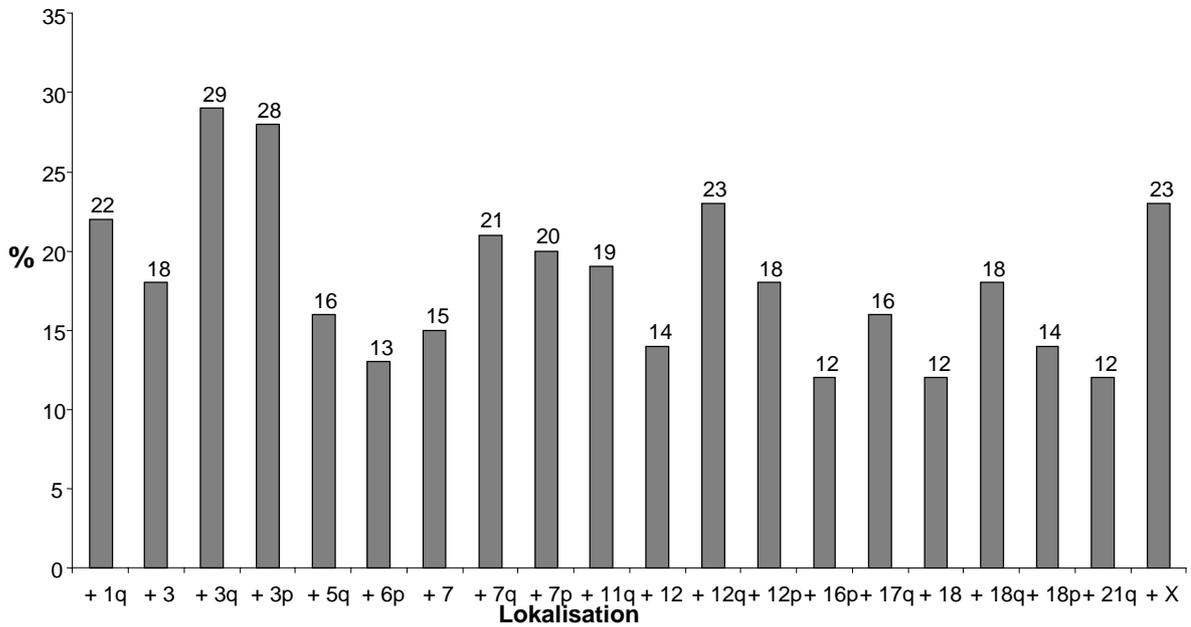
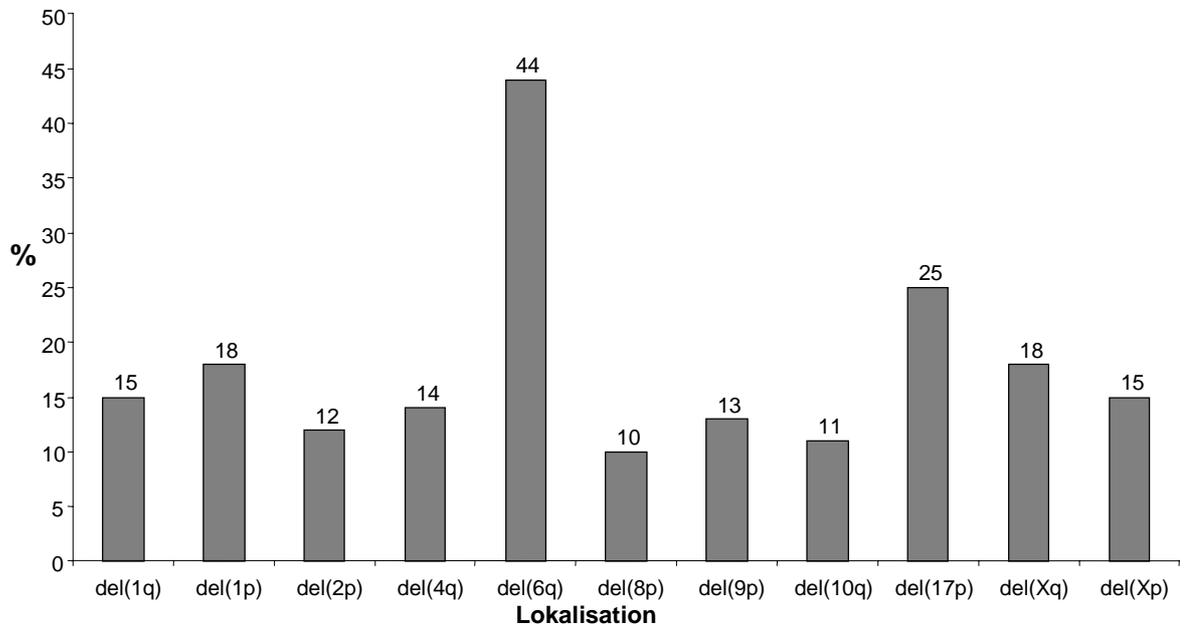


DIAGRAMM 1b: Die häufigsten chromosomalen Verluste



3.3 Verteilung chromosomaler Zugewinne und Verluste in unterschiedlichen Subgruppen von DLBCL (Primärmaterial)

Das Primärmaterial wurde anhand der Primärlokalisierung unterteilt. Der Gruppe der extranodalen Tumoren wurden zuerst die nodalen Lymphome und dann nur die nodalen Lymphome mit rein diffusem Wachstumsmuster gegenübergestellt. Außerdem wurden innerhalb der Gruppe der nodalen NHL solche Lymphome mit rein diffusem und partiell follikulärem Wachstumsmuster verglichen.

Die Tabellen 3 bis 5 zeigen die Verteilung der chromosomalen Zugewinne und Verluste in diesen Subgruppen.

Dabei wird deutlich, dass im Vergleich zwischen extranodaler und nodaler Primärmanifestation die relative Häufigkeit der meisten Aberrationen in der nodalen Gruppe höher ist. Ein Zugewinn in den Lokalisationen 15q (8% - 9/106), sowie Verluste von 19q (9% - 10/106) und Chromosom Y (12% - 13/106) ist sogar ausschließlich - wenn auch in geringer Häufigkeit - in der Gruppe der nodalen Lymphome nachweisbar.

Kein Unterschied im Vorkommen dieser Aberrationen erreicht in dieser Unterteilung statistische Signifikanz auf der Basis des Chi-Quadrat Testes. Hervorgehoben werden jedoch folgende Lokalisationen: del(1p) (23/106 (22%) vs 2/31 (6%)), +5q (20/106 (19%) vs 2/31 (6%)), del(6q) (51/106 (48%) vs 9/31 (29%)), +16p (15/106 (14%) vs 1/31 (3%)), +18q (22/106 (21%) vs 3/31 (10%)), del(19q) (10/106 (9%) vs 0%) und del(Y) (13/106 - 13% vs 0%). Diese Aberrationen sind zwar nicht signifikant, dennoch deutlich häufiger in der Gruppe der nodalen Lymphome nachweisbar. Ausnahmen - also eine *höhere prozentuale Inzidenz in der Gruppe der extranodalen Tumoren* - weisen del(7q) (5/31(16%) extranodal vs 8/106(8%) nodal), +17q (7/31(23%) vs 15/106(14%)) und +17p (4/31(13%) vs 6/106(6%)) auf: eine statistische Signifikanz findet sich nicht. Ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis zeigen del(11q) und +12q.

Eine diskriminierende statistische Relevanz zeigten lediglich die unterschiedliche Frequenz der Translokationen: die t(8;14) kommt in fünf von 31 extranodalen Tumoren als auch in fünf von 106 nodalen Lymphomen vor (16% vs 5%; $p < 0,05$). Bei der t(14;18) ist das Verhältnis umgekehrt. Diese Translokation wurde mit 12% (13/106) ausschließlich bei nodalen LBL gefunden.

Betrachtet man von den nodalen Lymphomen nur solche mit diffusem Anteil und stellt diese wiederum den extranodalen Tumoren gegenüber, ergibt sich keine wesentliche Veränderung der relativen Häufigkeiten, oder der Verteilung der primären und sekundären Aberrationen. In der Gegenüberstellung zwischen nodalen großzelligen B-NHL mit rein diffusem oder diffusem *und* follikulärem Wachstumsmuster und rein follikulärem Wachstumsmuster ergeben sich erwartungsgemäß Veränderungen dieses Verteilungsmusters. Zugewinne auf dem langen Arm des Chromosoms 1 sind häufiger bei Lymphomen mit einem zusätzlichen oder ausschließlich follikulärem Wachstumsanteil: 42% (10/24) vs 20% (16/82); $p < 0,05$. Das gleiche gilt für die Aberrationen del(6q) - wiederum die häufigste Aberration (15/24 - 63% vs 36/82 - 44%; p-Wert nicht signifikant). Ansonsten sind die chromosomalen Aberrationen gleichmäßiger verteilt. Lediglich Verluste von 18p (11% - 9/82) kommen ausschließlich bei rein diffus wachsenden DLBCL vor. Die del(9p) (14/82 - 17% vs 1/24 - 1%) und +11q (14/82 - 13% vs 4/31 - 13%) sind auch bei rein diffus Lymphomen deutlich häufiger vertreten, jedoch ohne statistische Signifikanz.

TABELLE 3: Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen im Vergleich zwischen extranodaler und nodaler Primärlokalisierung

Tabelle 3		extranodal		<i>Prozent</i>	nodal		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		31			106		
del (1q)	20	4	31	13%	16	106	15%	n.s.
del (1p)	25	2	31	6%	23	106	22%	n.s.
+ 1q	30	4	31	13%	26	106	25%	n.s.
del (2p)	17	4	31	13%	13	106	12%	n.s.
+ 3	24	5	31	16%	19	106	18%	n.s.
+ 3q	40	7	31	23%	33	106	31%	n.s.
+ 3p	39	8	31	26%	31	106	29%	n.s.
t (3;14)	12	1	31	3%	11	106	10%	n.s.
del (4q)	19	3	31	10%	16	106	15%	n.s.
+ 5q	22	2	31	6%	20	106	19%	n.s.
del (6q)	60	9	31	29%	51	106	48%	n.s.
+ 6p	18	2	31	6%	16	106	15%	n.s.
+ 7	20	3	31	10%	17	106	16%	n.s.
+ 7q	29	5	31	16%	24	106	23%	n.s.
+ 7p	28	4	31	13%	24	106	23%	n.s.
del (7q)	13	5	31	16%	8	106	8%	n.s.
del (8p)	14	2	31	6%	12	106	11%	n.s.
t (8;14)	10	5	31	16%	5	106	5%	0,05
del (9p)	18	3	31	10%	15	106	14%	n.s.
del (10q)	15	1	31	3%	14	106	13%	n.s.
+ 11q	26	4	31	13%	22	106	21%	n.s.
del (11q)	8	2	31	6%	6	106	6%	n.s.
+ 12	19	5	31	16%	14	106	13%	n.s.
+ 12q	31	6	31	19%	25	106	24%	n.s.
+ 12p	24	6	31	19%	18	106	17%	n.s.
t (14;18)	13	0	31	0%	13	106	12%	n.d.
+ 15q	9	0	31	0%	9	106	8%	n.d.
+ 16p	16	1	31	3%	15	106	14%	n.s.
+ 17q	22	7	31	23%	15	106	14%	n.s.
+ 17p	10	4	31	13%	6	106	6%	n.s.
del (17p)	34	6	31	19%	28	106	26%	n.s.
+ 18	16	3	31	10%	13	106	12%	n.s.
+ 18q	25	3	31	10%	22	106	21%	n.s.
+ 18p	19	3	31	10%	16	106	15%	n.s.
del (18 p)	11	2	31	6%	9	106	8%	n.s.
del (19q)	10	0	31	0%	10	106	9%	n.d.
+ 21q	17	5	31	16%	12	106	11%	n.s.
del (22q)	11	2	31	6%	9	106	8%	n.s.
del (Xq)	24	5	31	16%	19	106	18%	n.s.
del (Xp)	20	5	31	16%	15	106	14%	n.s.
+ X	32	4	31	13%	28	106	26%	n.s.
del Y	13	0	31	0%	13	106	12%	n.d.

TABELLE 4: Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen im Vergleich zwischen extranodalen Tumoren und nodalen Lymphomen mit rein diffusem Wachstumsmuster

Tabelle 4		diffus		<i>Prozent</i>	extranodal		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		82			31		
del (1q)	15	11	82	13%	4	31	13%	n.s.
del (1p)	18	16	82	20%	2	31	6%	n.s.
+ 1q	20	16	82	20%	4	31	13%	n.s.
del (2p)	14	10	82	12%	4	31	13%	n.s.
+ 3	22	17	82	21%	5	31	16%	n.s.
+ 3q	34	27	82	33%	7	31	23%	n.s.
+ 3p	32	24	82	29%	8	31	26%	n.s.
t (3;14)	9	8	82	10%	1	31	3%	n.s.
del (4q)	15	12	82	15%	3	31	10%	n.s.
+ 5q	17	15	82	18%	2	31	6%	n.s.
del (6q)	45	36	82	44%	9	31	29%	n.s.
+ 6p	13	11	82	13%	2	31	6%	n.s.
+ 7	17	14	82	17%	3	31	10%	n.s.
+ 7q	24	19	82	23%	5	31	16%	n.s.
+ 7p	24	20	82	24%	4	31	13%	n.s.
del (7q)	11	6	82	7%	5	31	16%	n.s.
del (8p)	12	10	82	12%	2	31	6%	n.s.
t (8;14)	9	4	82	5%	5	31	16%	0,05
del (9p)	17	14	82	17%	3	31	10%	n.s.
del (10q)	11	10	82	12%	1	31	3%	n.s.
+ 11q	18	14	82	17%	4	31	13%	n.s.
del (11q)	6	4	82	5%	2	31	6%	n.s.
+ 12	16	11	82	13%	5	31	16%	n.s.
+ 12q	25	19	82	23%	6	31	19%	n.s.
+ 12p	20	14	82	17%	6	31	19%	n.s.
t (14;18)	10	10	82	12%	0	31	0%	n.d.
+ 15q	7	7	82	9%	0	31	0%	n.d.
+ 16p	14	13	82	16%	1	31	3%	n.s.
+ 17q	17	10	82	12%	7	31	23%	n.s.
+ 17p	9	5	82	6%	4	31	13%	n.s.
del (17p)	27	21	82	26%	6	31	19%	n.s.
+ 18	11	8	82	10%	3	31	10%	n.s.
+ 18q	18	15	82	18%	3	31	10%	n.s.
+ 18p	13	10	82	12%	3	31	10%	n.s.
del (18 p)	11	9	82	11%	2	31	6%	n.s.
del (19q)	9	9	82	11%	0	31	0%	n.d.
+ 21q	15	10	82	12%	5	31	16%	n.s.
del (22q)	10	8	82	10%	2	31	6%	n.s.
del (Xq)	19	14	82	17%	5	31	16%	n.s.
del (Xp)	18	13	82	16%	5	31	16%	n.s.
+ X	24	20	82	24%	4	31	13%	n.s.
del Y	12	12	82	15%	0	31	0%	n.d.

TABELLE 5: Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen bei nodalen NHL im Vergleich zwischen diffusem und folliculärem Wachstumsmuster

Tabelle 5		diffus		<i>Prozent</i>	follikulär		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		82			24		
del (1q)	16	11	82	13%	5	24	21%	n.s.
del (1p)	23	16	82	20%	7	24	29%	n.s.
+ 1q	26	16	82	20%	10	24	42%	0,05
del (2p)	13	10	82	12%	3	24	13%	n.s.
+ 3	19	17	82	21%	2	24	8%	n.s.
+ 3q	33	27	82	33%	6	24	25%	n.s.
+ 3p	31	24	82	29%	7	24	29%	n.s.
t (3;14)	11	8	82	10%	3	24	13%	n.s.
del (4q)	16	12	82	15%	4	24	17%	n.s.
+ 5q	20	15	82	18%	5	24	21%	n.s.
del (6q)	51	36	82	44%	15	24	63%	n.s.
+ 6p	16	11	82	13%	5	24	21%	n.s.
+ 7	17	14	82	17%	3	24	13%	n.s.
+ 7q	24	19	82	23%	5	24	21%	n.s.
+ 7p	24	20	82	24%	4	24	17%	n.s.
del (7q)	8	6	82	7%	2	24	8%	n.s.
del (8p)	12	10	82	12%	2	24	8%	n.s.
t (8;14)	5	4	82	5%	1	24	4%	n.s.
del (9p)	15	14	82	17%	1	24	4%	n.s.
del (10q)	14	10	82	12%	4	24	17%	n.s.
+ 11q	22	14	82	17%	8	24	33%	n.s.
del (11q)	6	4	82	5%	2	24	8%	n.s.
+ 12	14	11	82	13%	3	24	13%	n.s.
+ 12q	25	19	82	23%	6	24	25%	n.s.
+ 12p	18	14	82	17%	4	24	17%	n.s.
t (14;18)	13	10	82	12%	3	24	13%	n.s.
+ 15q	9	7	82	9%	2	24	8%	n.s.
+ 16p	15	13	82	16%	2	24	8%	n.s.
+ 17q	15	10	82	12%	5	24	21%	n.s.
+ 17p	6	5	82	6%	1	24	4%	n.s.
del (17p)	28	21	82	26%	7	24	29%	n.s.
+ 18	13	8	82	10%	5	24	21%	n.s.
+ 18q	22	15	82	18%	7	24	29%	n.s.
+ 18p	16	10	82	12%	6	24	25%	n.s.
del (18 p)	9	9	82	11%	0	24	0%	n.s.
del (19q)	10	9	82	11%	1	24	4%	n.s.
+ 21q	12	10	82	12%	2	24	8%	n.s.
del (22q)	9	8	82	10%	1	24	4%	n.s.
del (Xq)	19	14	82	17%	5	24	21%	n.s.
del (Xp)	15	13	82	16%	2	24	8%	n.s.
+ X	28	20	82	24%	8	24	33%	n.s.
del Y	13	12	82	15%	1	24	4%	n.s.

3.4 Chromosomale Aberrationen in Tumoren, die bei Rezidiven untersucht wurden

In der Gegenüberstellung der primär diagnostizierten Fälle mit den Rezidiven zeigt sich im Rezidivmaterial ein prozentual höherer Anteil an Aberrationen – sowohl Zugewinne als auch Verluste betreffend (siehe Tabelle und Diagramm 5). Statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) sind Verluste in 7q (6/25 - 24% vs 13/137 - 9%), sowie die Trisomie 12 (8/25 - 32% vs 19/137 - 14%). Zugewinne bei 15q (4/25 - 16% vs 9/137 - 7%), Zugewinne bei 7p (7/25 - 28% vs 28/137 - 20%) und 17p (4/25 - 16% vs 10/137 - 7%) sind - ohne statistische Signifikanz - ebenfalls weitaus häufiger bei den Rezidiven nachweisbar; dieser Unterschied wird auch im Diagramm deutlich. Die im Primärmaterial häufigste Aberration, Verluste auf dem langen Arm des Chromosoms 6, ist auch bei den Rezidiven am häufigsten. Sie tritt in beiden Gruppen mit gleicher relativer Häufigkeit auf (44%). Nur die Aberrationen +3q, +6p, del(9p) und del(17p) sind im Primärmaterial häufiger – letztere mit 25% (34/137) gegenüber 12% (3/25) bei den Rezidiven. Die untersuchten Translokationen treten im Primär- als auch im Rezidivmaterial mit ungefähr gleicher relativer Häufigkeit auf.

TABELLE 6: *Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen im Primärmaterial im Vergleich zu im Rezidiv untersuchten großzelligen B-Zell-Lymphomen*

Tabelle 6		primär		<i>Prozent</i>	rezidiert		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		137			25		
del (1q)	25	20	137	15%	5	25	20%	n.s.
del (1p)	30	25	137	18%	5	25	20%	n.s.
+ 1q	38	30	137	22%	8	25	32%	n.s.
del (2p)	20	17	137	12%	3	25	12%	n.s.
+ 3	27	24	137	18%	3	25	12%	n.s.
+ 3q	44	39	137	28%	5	25	20%	n.s.
+ 3p	19	16	137	12%	3	25	12%	n.s.
t (3;14)	15	12	137	9%	3	25	12%	n.s.
del (4q)	23	19	137	14%	4	25	16%	n.s.
+ 5q	26	22	137	16%	4	25	16%	n.s.
del (6q)	71	60	137	44%	11	25	44%	n.s.
+ 6p	20	18	137	13%	2	25	8%	n.s.
+ 7	22	20	137	15%	2	25	8%	n.s.

+ 7q	35	29	137	21%	6	25	24%	n.s.
+ 7p	35	28	137	20%	7	25	28%	n.s.
del (7q)	19	13	137	9%	6	25	24%	0,05
del (8p)	17	14	137	10%	3	25	12%	n.s.
t (8;14)	12	10	137	7%	2	25	8%	n.s.
del (9p)	21	18	137	13%	3	25	12%	n.s.
del (10q)	16	15	137	11%	1	25	4%	n.s.
+ 11q	30	26	137	19%	4	25	16%	n.s.
del (11q)	11	8	137	6%	3	25	12%	n.s.
+ 12	27	19	137	14%	8	25	32%	0,05
+ 12q	39	31	137	23%	8	25	32%	n.s.
+ 12p	32	24	137	18%	8	25	32%	n.s.
t (14;18)	15	13	137	9%	2	25	8%	n.s.
+ 15q	13	9	137	7%	4	25	16%	n.s.
+ 16p	21	16	137	12%	5	25	20%	n.s.
+ 17q	27	22	137	16%	5	25	20%	n.s.
+ 17p	14	10	137	7%	4	25	16%	n.s.
del (17p)	37	34	137	25%	3	25	12%	n.s.
+ 18	21	16	137	12%	5	25	20%	n.s.
+ 18q	31	25	137	18%	6	25	24%	n.s.
+ 18p	24	19	137	14%	5	25	20%	n.s.
del (18 p)	13	11	137	8%	2	25	8%	n.s.
del (19q)	13	10	137	7%	3	25	12%	n.s.
+ 21q	21	17	137	12%	4	25	16%	n.s.
del (22q)	14	11	137	8%	3	25	12%	n.s.
del (Xq)	31	24	137	18%	7	25	28%	n.s.
del (Xp)	25	20	137	15%	5	25	20%	n.s.
+ X	36	32	137	23%	4	25	16%	n.s.
del Y	17	13	137	9%	4	25	16%	n.s.

Zu den Tabellen gilt anzumerken:

- Ist der p -Wert oberhalb von 0,05 ($p > 0,05$) liegt kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung von Aberrationen vor. Es findet sich daher „n.s.“ für „nicht signifikant“.
- Ist mindestens ein absoluter Wert gleich Null, so ist eine Bestimmung des Signifikanzniveaus auf Basis des Chi-Quadrat-Tests nicht aussagekräftig. Es findet sich daher „n.d.“ für „nicht definiert“.

3.5 Vergleich chromosomalen Aberrationen bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen vom GCB- und non-GCB-Typ

Für den Vergleich zwischen den durch ihr Protein-Expressionsmuster nach Hans et al. (2004) definierten GCB- und non-GCB- großzelligen B-Zell Lymphomen wurden nur chromosomale Zugewinne und Verluste betrachtet, deren relative Häufigkeit im Primärmaterial mindestens 10% betragen hatte. *(Einen Überblick über diese Lokalisationen geben die Diagramme 1a und 1b.)* Die Tabelle 7 zeigt die Verteilung von GCB und non-GCB in nach Primärmanifestation und/oder Wachstumsmuster unterteilten DLBCL-Subgruppen. In allen Gruppen sind GCB und non-GCB nahezu annähernd gleich verteilt. Gewisse Unterschiede bestehen jedoch bei extranodalen Tumoren, bei denen die non-GCB-Signatur häufiger zu sein scheint. Bei den rein follikulären LBL weist hingegen die GCB-Signatur eine höhere relative Häufigkeit auf.

Tabelle 7	GCB		non-GCB	
extranodal	14 / 31	45%	17 / 31	55%
nodal	54 / 106	51%	52 / 106	49%
extranodal	14 / 31	45%	17 / 31	55%
nodal rein diffus	40 / 82	49%	42 / 82	51%
nodal rein diffus	40 / 82	49%	42 / 82	51%
nodal follikulär und diffus	14 / 24	58%	Okt 24	42%

Im Folgenden wird die Verteilung der chromosomalen Aberrationen bei GCB- und non-GCB DLBCL dargestellt. Zunächst wird das gesamte Primärmaterial betrachtet (Tabelle 8). Anschließend erfolgt die Betrachtung einzelner Subgruppen:

- | | |
|--|------------|
| 1. Gesamtes Material | Tabelle 8 |
| 2. Extranodale Tumore: | Tabelle 9 |
| 3. Nodale Lymphome: | Tabelle 10 |
| 4. Nodale L. mit ausschließlich diffusem Wachstum: | Tabelle 11 |
| 5. Nodale Lymphome mit follikulärem Wachstum: | Tabelle 12 |
| 6. Extranodale und nodal diffuse Lymphome: | Tabelle 13 |
| 7. Rezidive | Tabelle 14 |

3.5.1 Vergleich von chromosomalen Aberrationen in DLBCL vom GCB- und non-GCB-Typ im Primärmaterial

Im Primärmaterial (n=137; Tabelle 8) wurden 68 Fälle als GCB- und 69 Fälle als non-GCB- DLBCL klassifiziert. Deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen bestanden in der Häufigkeitsverteilung von numerischen Aberrationen der Chromosomen 3, 7 und 18 sowie bezüglich der Translokationen t(14;18) und t(8;14). Hochsignifikant war der Unterschied unter anderem bei der Trisomie 3: sie trat bei GC-DLBCL in 9% (6/68) und bei non-GC-DLBCL in 26% (18/69) auf. Zugewinne von 3q (Fälle mit einer Trisomie 3 hinzugerechnet) waren zu 16% (11/68) in der GCB-Gruppe und zu 42% (30/69) in der Gruppe der non-GC-DLBCL nachweisbar (p-Wert < 0,001).

Die Trisomie 18 wies eine ähnliche Tendenz auf: 4/68 (6%) GCB vs 12/69 (17%) non-GCB; p<0,05). Ein Zugewinn des langen Arms trat in 12% der GCB (8/68) und in 25% (17/69) der non-GC-DLBCL auf. Bei +18p lag das Verhältnis bei 9% (6/68) zu 19% (13/69). Es fand sich in beiden Fällen ein p-Wert, der knapp unter 0,05 lag. Ein genau gegensätzliches Verteilungsmuster zeigten die Trisomien 7 und 12: Trisomie 7 fand sich bei GC-DLBCL in 24% (16/68) und bei non-GC-DLBCL in 6% (4/69; p <0,001), Trisomie 12 zeigte ein Verhältnis von 19% (13/68 GCB) gegenüber 9% (6/69 non-GCB), dieser Unterschied erreicht jedoch nicht statistische Signifikanz.

Sowohl die Translokation t(8;14) als auch die Translokation t(14;18) waren bei diffusen großzelligen Lymphomen mit dem Genexpressionsprofil der Keimzentrumsreaktion (GC-DLBCL) überrepräsentiert. Die t(8;14) konnte hier in 12% (8/68) vs 3% (2/69) der Fälle (p<0,05) nachgewiesen werden. Hochsignifikant war der Unterschied für die Translokation t(14;18), die in 18% der GCB (12/68) gegenüber nur 1% bei non-GCB (1/69) vorkam. Die anderen Imbalancen zeigten ein nahezu ausgeglichenes Verteilungsmuster. So trat insbesondere die häufigste Aberration, del(6q), bei GCB mit 43% (29/68) und bei non-GCB mit 45% (31/69) auf.

3.5.2 Vergleich von chromosomalen Aberrationen in DLBCL vom GCB- und non-GCB-Typ bei extranodalen Tumoren

Unter den Tumoren mit extranodaler Primärmanifestation (n=31, Tabelle 9) betrug das Verhältnis von GC-DLBCL zu non-GC-DLBCL 14 zu 17. Aufgrund der geringen Fallzahl von n=31 stößt hier der Chi-Quadrat-Test an seine Grenzen: der p-Wert verliert an Aussagekraft. Die häufigste Aberration war ebenfalls die Deletion von 6q mit 29% - wiederum gleich häufig bei GCB und non-GCB. Viele primäre und sekundäre Aberrationen zeigen jedoch auch in dieser Teilmenge des Untersuchungsgutes deutliche Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung. Die Trisomien 7 und 12 kommen in 21% (3/14) bzw. 14% (2/14) der GC-DLBCL vor. Beide sind in der Gruppe der non-GCB nicht nachweisbar. Fünf der 14 GC-DLBCL weisen eine Translokation t(8;14) auf (36%; p<0,001); die ebenfalls bei non-GCB nicht auftritt. Wie aus der Betrachtung des gesamten Primärmaterials zu erwarten, tritt die Trisomie 3 hingegen häufiger bei non-GC-DLBCL auf: 4/17 (24%) vs 1/14 (7%). Betrachtet man die Lokalisationen 3p und 3q, so wird dieser Unterschied noch deutlicher. Diese Aberrationen treten in 41% (7/17) (p<0,001) respektive 35% (6/17) gegenüber jeweils 7% (1/14) in der GCB-Gruppe auf.

Die im Primärmaterial festgestellten unterschiedlichen Verteilungen von Aberrationen bei Chromosom 18 sowie bezüglich der Translokation t(14;18) fielen unter den extranodalen Tumoren nicht auf.

3.5.3 Vergleich von chromosomalen Aberrationen in DLBCL vom GCB- und non-GCB-Typ bei nodalen LBL

Im Gegensatz dazu standen die Ergebnisse bei den nodalen Lymphomen (n=106, Tabelle 10). Hier glich bis auf zwei nennenswerte Ausnahmen das Verteilungsmuster der genetischen Imbalancen dem Spektrum der Aberrationen des gesamten Primärmaterials. So fiel auch bei der Betrachtung dieser Subgruppe auf, dass Zugewinne des Chromosoms 3 weitaus häufiger bei non-GC-DLBCL vorkommen. Bei der Trisomie 3 betrug das Verhältnis 14/52 (27%)

vs 5/54 (9%) ($p < 0,05$); die Lokalisationen +3p und +3q waren mit 42% zu 19% beziehungsweise 50% zu 15% (p -Wert jeweils $< 0,001$) noch deutlicher zugunsten der non-GC-DLBCL verteilt. Fälle mit einer Trisomie 18 fanden sich in 19% (10/52) bei non-GCB und in 6% (3/54) bei GC-DLBCL ($p < 0,05$).

Auch die Trisomie 7 (13/54 - 24% vs 4/52 - 8%) und die Trisomie 12 (11/54 - 20% vs 3/526%) verhielten sich wie im gesamten Primärmaterial: sie waren bei den GC-DLBCL häufiger ($p < 0,05$). Zugewinne des langen Armes von Chromosom 1 waren ohne statistische Signifikanz ebenfalls in dieser Gruppe häufiger vertreten (16/54 - 30% vs 10/52 - 19%).

Einen statistisch hochsignifikanten Unterscheid zeigte das Verteilungsmuster der Translokation t(14;18): sie trat in 22% (12/54) der GC-DLBCL auf und war nur in einem Fall der non-GC-DLBCL nachzuweisen. Im Gegensatz zur Betrachtung aller Tumoren war die Verteilung der Translokation t(8;14) bei den nodalen DLBCL jedoch ausgeglichen.

3.5.4 Vergleich von chromosomalen Aberrationen in DLBCL vom GCB- und non-GCB-Typ bei nodalen LBL mit rein diffusem Wachstumsmuster

Diese Unterschiede waren bei alleiniger Betrachtung der nodalen Lymphome ($n=82$, Tabelle 11) ähnlich. Auffällig war lediglich, dass sich die Verteilung der häufigsten Aberration etwas zugunsten der non-GCB verschob: die del(6q) war hier in 50% (21/42) der Fälle nachweisbar, wohingegen sie in 38% (15/40) der GC-DLBCL auftrat. Die Häufigkeitsverteilung änderte sich auch bei der Trisomie 18, die in dieser Teilmenge des Primärmaterials zwischen LBL mit GCB- und non-GCB-Signatur annähernd gleich häufig verteilt war. Auch die Zugewinne für das Chromosom 1 waren gleichmäßiger verteilt.

3.5.5 Vergleich von chromosomalen Aberrationen in DLBCL vom GCB- und non-GCB-Typ bei nodalen LBL mit partiell folliculärem Wachstumsmuster

In Lymphomen mit partiell folliculärem Wachstumsmuster (n=24, Tabelle 12) konnte eine Deletion von 6q in 63% der Fälle nachgewiesen werden; eine Häufung dieser Aberration bei GC-DLBCL war jedoch nicht signifikant (10/14 - 71% vs 5/10 - 50%). Die +5q (4/10 - 40% gegenüber 1/14 - 7%) und del(10q) (4/10 - 40% gegenüber 0%) waren häufiger bei den non-GCB vertreten, ein Unterschied, der sich wahrscheinlich aufgrund der kleinen Stichprobe von nur 24 folliculären Lymphomen als statistisch nicht signifikant herausstellte. Die unterschiedliche Verteilung von Zugewinnen zugunsten der non-GCB bei Chromosom 3 und 18 war tendenziell nachweisbar. Auch die Translokation t(14;18) war wie in den bisherigen Stichproben in der GCB-Gruppe häufiger. Zugewinne für das Chromosom 7 waren jedoch in beiden Gruppen annähernd gleich häufig vertreten.

3.5.6 Vergleich von chromosomalen Aberrationen in DLBCL vom GCB- und non-GCB-Typ primär extranodaler Tumoren und rein diffus wachsenden nodalen DLBCL

Eine leichte Verschiebung der Ergebnisse ergab sich bei der Betrachtung der Zusammenfassung der extranodalen Tumoren und der nodalen LBL mit diffusem Wachstumsmuster (n=113, Tabelle 13). Hier wiesen Zugewinne die Chromosomen 12 und 18 betreffend ein ausgeglicheneres Verteilungsmuster auf. Ansonsten brachte das Weglassen der LBL mit folliculärem Wachstumsmuster keinen weiteren Informationsgewinn.

3.5.7 Vergleich von chromosomalen Aberrationen in DLBCL vom GCB- und non-GCB-Typ bei Rezidiven

Auch die Stichprobe der Rezidive war mit 25 Fällen deutlich kleiner (Tabelle 14). Im Gegensatz zum Primärmaterial wurden diese Fälle häufiger als non-GCB-diffuse großzellige B-Zell Lymphome klassifiziert (16 non-GC- vs 9 GC-DLBCL), ein Unterschied, der jedoch nicht signifikant war. Folgende ungleiche Häufigkeiten der chromosomalen Aberrationen fielen auf: del(17p) war mit 33% (3/9) bei GCB, jedoch nicht in der non-GCB-Gruppe vertreten. Del(Xq) kam mit 44% (4/9) gegenüber 19% (3/16) wie auch +15q mit 44% (4/9) vs 0% ebenfalls häufiger in dieser Gruppe vor. +3q war mit 31% (5/16) gegenüber 11% (1/9) hingegen bei den non-GCB häufiger. Bis auf die Translokation t(14;18) – in 22% (2/9) bei GC-DLBCL – waren die Translokationen in beiden Untergruppen annähernd gleich verteilt. Keines dieser Ergebnisse war statistisch signifikant. Die Trisomien 3, 7, 12 und 18 zeigten im Rezidivmaterial ebenfalls ein ausgeglichenes Verteilungsmuster zwischen den Gruppen der GCB- und der non-GC-DLBCL.

TABELLE 8: Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen im Primärmaterial im Vergleich zwischen GCB- und non-GCB- LBL

Tabelle 8		non-GCB		<i>Prozent</i>	GCB		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		69			68		
del (1q)	20	9	69	13%	11	68	16%	n.s.
del (1p)	25	11	69	16%	14	68	21%	n.s.
+ 1q	30	12	69	17%	18	68	26%	n.s.
del (2p)	17	11	69	16%	6	68	9%	n.s.
+ 3	24	18	69	26%	6	68	9%	0,001
+ 3q	41	30	69	43%	11	68	16%	0,001
+ 3p	40	29	69	42%	11	68	16%	0,001
t (3;14)	12	7	69	10%	5	68	7%	n.s.
del (4q)	19	8	69	12%	11	68	16%	n.s.
+ 5q	22	10	69	14%	12	68	18%	n.s.
del (6q)	60	31	69	45%	29	68	43%	n.s.
+ 6p	18	10	69	14%	8	68	12%	n.s.
+ 7	20	4	69	6%	16	68	24%	0,001
+ 7q	29	10	69	14%	19	68	28%	n.s.
+ 7p	28	9	69	13%	19	68	28%	0,05
del (7q)	13	10	69	14%	3	68	4%	0,05
del (8p)	14	7	69	10%	7	68	10%	n.s.
t (8;14)	10	2	69	3%	8	68	12%	0,05
del (9p)	18	11	69	16%	7	68	10%	n.s.
del (10q)	15	8	69	12%	7	68	10%	n.s.
+ 11q	26	14	69	20%	12	68	18%	n.s.
del (11q)	8	3	69	4%	5	68	7%	n.s.
+ 12	19	6	69	9%	13	68	19%	n.s.
+ 12q	31	14	69	20%	17	68	25%	n.s.
+ 12p	24	9	69	13%	15	68	22%	n.s.
t (14;18)	13	1	69	1%	12	68	18%	0,001
+ 15q	9	4	69	6%	5	68	7%	n.s.
+ 16p	16	9	69	13%	7	68	10%	n.s.
+ 17q	22	12	69	17%	10	68	15%	n.s.
+ 17p	10	7	69	10%	3	68	4%	n.s.
del (17p)	34	16	69	23%	18	68	26%	n.s.
+ 18	16	12	69	17%	4	68	6%	0,05
+ 18q	25	17	69	25%	8	68	12%	n.s.
+ 18p	19	13	69	19%	6	68	9%	n.s.
del (18 p)	11	6	69	9%	5	68	7%	n.s.
del (19q)	10	6	69	9%	4	68	6%	n.s.
+ 21q	17	6	69	9%	11	68	16%	n.s.
del (22q)	11	6	69	9%	5	68	7%	n.s.
del (Xq)	24	9	69	13%	15	68	22%	n.s.
del (Xp)	20	8	69	12%	12	68	18%	n.s.
+ X	32	17	69	25%	15	68	22%	n.s.
del Y	13	9	69	13%	4	68	6%	n.s.

TABELLE 9: Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen bei extranodalen Tumoren im Vergleich zwischen GCB- und non-GCB- LBL

Tabelle 9		non-GCB		<i>Prozent</i>	GCB		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		17			14		
del (1q)	4	3	17	18%	1	14	7%	n.s.
del (1p)	2	2	17	12%	0	14	0%	n.d.
+ 1q	4	2	17	12%	2	14	14%	n.s.
del (2p)	4	3	17	18%	1	14	7%	n.s.
+ 3	5	4	17	24%	1	14	7%	n.s.
+ 3q	7	6	17	35%	1	14	7%	n.s.
+ 3p	8	7	17	41%	1	14	7%	0,001
t (3;14)	1	0	17	0%	1	14	7%	n.d.
del (4q)	3	0	17	0%	3	14	21%	n.d.
+ 5q	2	1	17	6%	1	14	7%	n.s.
del (6q)	9	5	17	29%	4	14	29%	n.s.
+ 6p	2	0	17	0%	2	14	14%	n.d.
+ 7	3	0	17	0%	3	14	21%	n.d.
+ 7q	5	2	17	12%	3	14	21%	n.s.
+ 7p	4	1	17	6%	3	14	21%	n.s.
del (7q)	2	1	17	6%	1	14	7%	n.s.
del (8p)	2	1	17	6%	1	14	7%	n.s.
t (8;14)	5	0	17	0%	5	14	36%	n.d.
del (9p)	3	2	17	12%	1	14	7%	n.s.
del (10q)	1	1	17	6%	0	14	0%	n.d.
+ 11q	4	3	17	18%	1	14	7%	n.s.
del (11q)	2	1	17	6%	1	14	7%	n.s.
+ 12	2	0	17	0%	2	14	14%	n.d.
+ 12q	6	4	17	24%	2	14	14%	n.s.
+ 12p	7	5	17	29%	2	14	14%	n.s.
t (14;18)	0	0	17	0%	0	14	0%	n.d.
+ 15q	0	0	17	0%	0	14	0%	n.d.
+ 16p	1	1	17	6%	0	14	0%	n.d.
+ 17q	7	3	17	18%	4	14	29%	n.s.
+ 17p	4	2	17	12%	2	14	14%	n.s.
del (17p)	6	3	17	18%	3	14	21%	n.s.
+ 18	3	2	17	12%	1	14	7%	n.s.
+ 18q	3	2	17	12%	1	14	7%	n.s.
+ 18p	3	2	17	12%	1	14	7%	n.s.
del (18 p)	2	2	17	12%	0	14	0%	n.d.
del (19q)	0	0	17	0%	0	14	0%	n.d.
+ 21q	5	2	17	12%	3	14	21%	n.s.
del (22q)	2	1	17	6%	1	14	7%	n.s.
del (Xq)	5	2	17	12%	3	14	21%	n.s.
del (Xp)	5	2	17	12%	3	14	21%	n.s.
+ X	4	3	17	18%	1	14	7%	n.s.
del Y	0	0	17	0%	0	14	0%	n.d.

TABELLE 10: Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen bei nodalen LBL im Vergleich zwischen GCB- und non-GCB- LBL

Tabelle 10		non-GCB		<i>Prozent</i>	GCB		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		52			54		
del (1q)	16	6	52	12%	10	54	19%	n.s.
del (1p)	23	9	52	17%	14	54	26%	n.s.
+ 1q	26	10	52	19%	16	54	30%	n.s.
del (2p)	13	8	52	15%	5	54	9%	n.s.
+ 3	19	14	52	27%	5	54	9%	0,05
+ 3q	34	26	52	50%	8	54	15%	0,001
+ 3p	32	22	52	42%	10	54	19%	0,001
t (3;14)	11	7	52	13%	4	54	7%	n.s.
del (4q)	16	8	52	15%	8	54	15%	n.s.
+ 5q	20	9	52	17%	11	54	20%	n.s.
del (6q)	51	26	52	50%	25	54	46%	n.s.
+ 6p	16	10	52	19%	6	54	11%	n.s.
+ 7	17	4	52	8%	13	54	24%	0,05
+ 7q	24	7	52	13%	17	54	31%	0,05
+ 7p	24	8	52	15%	16	54	30%	n.s.
del (7q)	8	6	52	12%	2	54	4%	n.s.
del (8p)	12	6	52	12%	6	54	11%	n.s.
t (8;14)	5	2	52	4%	3	54	6%	n.s.
del (9p)	15	9	52	17%	6	54	11%	n.s.
del (10q)	14	7	52	13%	7	54	13%	n.s.
+ 11q	22	11	52	21%	11	54	20%	n.s.
del (11q)	6	2	52	4%	4	54	7%	n.s.
+ 12	14	3	52	6%	11	54	20%	0,05
+ 12q	25	10	52	19%	15	54	28%	n.s.
+ 12p	18	5	52	10%	13	54	24%	0,05
t (14;18)	13	1	52	2%	12	54	22%	0,001
+ 15q	9	4	52	8%	5	54	9%	n.s.
+ 16p	15	8	52	15%	7	54	13%	n.s.
+ 17q	15	9	52	17%	6	54	11%	n.s.
+ 17p	6	5	52	10%	1	54	2%	n.s.
del (17p)	28	13	52	25%	15	54	28%	n.s.
+ 18	13	10	52	19%	3	54	6%	0,05
+ 18q	22	15	52	29%	7	54	13%	0,05
+ 18p	16	11	52	21%	5	54	9%	n.s.
del (18 p)	9	4	52	8%	5	54	9%	n.s.
del (19q)	10	6	52	12%	4	54	7%	n.s.
+ 21q	12	4	52	8%	8	54	15%	n.s.
del (22q)	9	5	52	10%	4	54	7%	n.s.
del (Xq)	19	7	52	13%	12	54	22%	n.s.
del (Xp)	15	6	52	12%	9	54	17%	n.s.
+ X	28	14	52	27%	14	54	26%	n.s.
del Y	13	9	52	17%	4	54	7%	n.s.

TABELLE 11: Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen bei nodalen LBL mit rein diffusem im Vergleich zwischen GCB- und non-GCB- LBL

Tabelle11		non-GCB		<i>Prozent</i>	GCB		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		42			40		
del (1q)	11	5	42	12%	6	40	15%	n.s.
del (1p)	16	7	42	17%	9	40	23%	n.s.
+ 1q	16	7	42	17%	9	40	23%	n.s.
del (2p)	10	6	42	14%	4	40	10%	n.s.
+ 3	17	12	42	29%	5	40	13%	n.s.
+ 3q	27	22	42	52%	5	40	13%	0,001
+ 3p	24	17	42	40%	7	40	18%	0,05
t (3;14)	8	6	42	14%	2	40	5%	n.s.
del (4q)	12	7	42	17%	5	40	13%	n.s.
+ 5q	15	5	42	12%	10	40	25%	n.s.
del (6q)	36	21	42	50%	15	40	38%	n.s.
+ 6p	11	8	42	19%	3	40	8%	n.s.
+ 7	14	3	42	7%	11	40	28%	0,05
+ 7q	19	5	42	12%	14	40	35%	0,05
+ 7p	20	6	42	14%	14	40	35%	0,05
del (7q)	6	5	42	12%	1	40	3%	n.s.
del (8p)	10	5	42	12%	5	40	13%	n.s.
t (8;14)	4	2	42	5%	2	40	5%	n.s.
del (9p)	14	9	42	21%	5	40	13%	n.s.
del (10q)	10	3	42	7%	7	40	18%	n.s.
+ 11q	14	8	42	19%	6	40	15%	n.s.
del (11q)	4	1	42	2%	3	40	8%	n.s.
+ 12	11	3	42	7%	8	40	20%	n.s.
+ 12q	19	9	42	21%	10	40	25%	n.s.
+ 12p	14	5	42	12%	9	40	23%	n.s.
t (14;18)	10	1	42	2%	9	40	23%	0,001
+ 15q	7	3	42	7%	4	40	10%	n.s.
+ 16p	13	7	42	17%	6	40	15%	n.s.
+ 17q	10	7	42	17%	3	40	8%	n.s.
+ 17p	5	4	42	10%	1	40	3%	n.s.
del (17p)	21	10	42	24%	11	40	28%	n.s.
+ 18	8	6	42	14%	2	40	5%	n.s.
+ 18q	15	11	42	26%	4	40	10%	n.s.
+ 18p	10	7	42	17%	3	40	8%	n.s.
del (18 p)	9	4	42	10%	5	40	13%	n.s.
del (19q)	9	6	42	14%	3	40	8%	n.s.
+ 21q	10	4	42	10%	6	40	15%	n.s.
del (22q)	8	5	42	12%	3	40	8%	n.s.
del (Xq)	14	6	42	14%	8	40	20%	n.s.
del (Xp)	13	5	42	12%	8	40	20%	n.s.
+ X	20	10	42	24%	10	40	25%	n.s.
del Y	12	9	42	21%	3	40	8%	n.s.

TABELLE 12: Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen bei nodalen LBL im Vergleich zwischen GCB- und non-GCB- LBL

Tabelle12		non-GCB		<i>Prozent</i>	GCB		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		10			14		
del (1q)	5	1	10	10%	4	14	29%	n.s.
del (1p)	7	2	10	20%	5	14	36%	n.s.
+ 1q	10	3	10	30%	7	14	50%	n.s.
del (2p)	3	2	10	20%	1	14	7%	n.s.
+ 3	2	2	10	20%	0	14	0%	n.d.
+ 3q	7	4	10	40%	3	14	21%	n.s.
+ 3p	8	5	10	50%	3	14	21%	n.s.
t (3;14)	3	1	10	10%	2	14	14%	n.s.
del (4q)	4	1	10	10%	3	14	21%	n.s.
+ 5q	5	4	10	40%	1	14	7%	n.s.
del (6q)	15	5	10	50%	10	14	71%	n.s.
+ 6p	5	2	10	20%	3	14	21%	n.s.
+ 7	3	1	10	10%	2	14	14%	n.s.
+ 7q	5	2	10	20%	3	14	21%	n.s.
+ 7p	4	2	10	20%	2	14	14%	n.s.
del (7q)	2	1	10	10%	1	14	7%	n.s.
del (8p)	2	1	10	10%	1	14	7%	n.s.
t (8;14)	1	0	10	0%	1	14	7%	n.d.
del (9p)	1	0	10	0%	1	14	7%	n.d.
del (10q)	4	4	10	40%	0	14	0%	n.d.
+ 11q	8	3	10	30%	5	14	36%	n.s.
del (11q)	2	1	10	10%	1	14	7%	n.s.
+ 12	3	0	10	0%	3	14	21%	n.d.
+ 12q	6	1	10	10%	5	14	36%	n.s.
+ 12p	4	0	10	0%	4	14	29%	n.d.
t (14;18)	3	0	10	0%	3	14	21%	n.d.
+ 15q	2	1	10	10%	1	14	7%	n.s.
+ 16p	2	1	10	10%	1	14	7%	n.s.
+ 17q	5	2	10	20%	3	14	21%	n.s.
+ 17p	1	1	10	10%	0	14	0%	n.d.
del (17p)	7	3	10	30%	4	14	29%	n.s.
+ 18	5	4	10	40%	1	14	7%	n.s.
+ 18q	7	4	10	40%	3	14	21%	n.s.
+ 18p	6	4	10	40%	2	14	14%	n.s.
del (18 p)	0	0	10	0%	0	14	0%	n.d.
del (19q)	1	0	10	0%	1	14	7%	n.d.
+ 21q	2	0	10	0%	2	14	14%	n.d.
del (22q)	1	0	10	0%	1	14	7%	n.d.
del (Xq)	5	1	10	10%	4	14	29%	n.s.
del (Xp)	2	1	10	10%	1	14	7%	n.s.
+ X	8	4	10	40%	4	14	29%	n.s.
del Y	1	0	10	0%	1	14	7%	n.d.

TABELLE 13: Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen bei extranodalen Tumoren und LBL mit diffusem Wachstumsmuster im Vergleich zwischen GCB- und non-GCB-LBL

Tabelle13		non-GCB		<i>Prozent</i>	GCB		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		59			54		
del (1q)	15	8	59	14%	7	54	13%	n.s.
del (1p)	18	9	59	15%	9	54	17%	n.s.
+ 1q	20	9	59	15%	11	54	20%	n.s.
del (2p)	14	9	59	15%	5	54	9%	n.s.
+ 3	22	16	59	27%	6	54	11%	0,05
+ 3q	34	26	59	44%	8	54	15%	0,001
+ 3p	32	24	59	41%	8	54	15%	0,001
t (3;14)	9	6	59	10%	3	54	6%	n.s.
del (4q)	15	7	59	12%	8	54	15%	n.s.
+ 5q	17	6	59	10%	11	54	20%	n.s.
del (6q)	45	26	59	44%	19	54	35%	n.s.
+ 6p	13	8	59	14%	5	54	9%	n.s.
+ 7	17	3	59	5%	14	54	26%	0,001
+ 7q	24	8	59	14%	16	54	30%	0,05
+ 7p	24	7	59	12%	17	54	31%	0,05
del (7q)	11	9	59	15%	2	54	4%	0,05
del (8p)	12	6	59	10%	6	54	11%	n.s.
t (8;14)	9	2	59	3%	7	54	13%	n.s.
del (9p)	17	11	59	19%	6	54	11%	n.s.
del (10q)	11	4	59	7%	7	54	13%	n.s.
+ 11q	18	11	59	19%	7	54	13%	n.s.
del (11q)	6	2	59	3%	4	54	7%	n.s.
+ 12	16	6	59	10%	10	54	19%	n.s.
+ 12q	25	13	59	22%	12	54	22%	n.s.
+ 12p	20	9	59	15%	11	54	20%	n.s.
t (14;18)	10	1	59	2%	9	54	17%	0,001
+ 15q	7	3	59	5%	4	54	7%	n.s.
+ 16p	14	8	59	14%	6	54	11%	n.s.
+ 17q	17	10	59	17%	7	54	13%	n.s.
+ 17p	9	6	59	10%	3	54	6%	n.s.
del (17p)	27	13	59	22%	14	54	26%	n.s.
+ 18	11	8	59	14%	3	54	6%	n.s.
+ 18q	18	13	59	22%	5	54	9%	n.s.
+ 18p	13	9	59	15%	4	54	7%	n.s.
del (18 p)	11	6	59	10%	5	54	9%	n.s.
del (19q)	9	6	59	10%	3	54	6%	n.s.
+ 21q	15	6	59	10%	9	54	17%	n.s.
del (22q)	10	6	59	10%	4	54	7%	n.s.
del (Xq)	19	8	59	14%	11	54	20%	n.s.
del (Xp)	18	7	59	12%	11	54	20%	n.s.
+ X	24	13	59	22%	11	54	20%	n.s.
del Y	12	9	59	15%	3	54	6%	n.s.

TABELLE 14: Absolute und relative Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen bei Rezidiven im Vergleich zwischen GCB- und non-GCB- LBL

Tabelle14		non-GCB		<i>Prozent</i>	GCB		<i>Prozent</i>	P-Wert
Lokalisation	gesamt		16			9		
del (1q)	5	2	16	13%	3	9	33%	n.s.
del (1p)	5	2	16	13%	3	9	33%	n.s.
+ 1q	8	5	16	31%	3	9	33%	n.s.
del (2p)	3	2	16	13%	1	9	11%	n.s.
+ 3	3	2	16	13%	1	9	11%	n.s.
+ 3q	6	5	16	31%	1	9	11%	n.s.
+ 3p	5	4	16	25%	1	9	11%	n.s.
t (3;14)	3	3	16	19%	0	9	0%	n.d.
del (4q)	4	3	16	19%	1	9	11%	n.s.
+ 5q	4	3	16	19%	1	9	11%	n.s.
del (6q)	11	8	16	50%	3	9	33%	n.s.
+ 6p	2	2	16	13%	0	9	0%	n.s.
+ 7	2	1	16	6%	1	9	11%	n.s.
+ 7q	6	5	16	31%	1	9	11%	n.s.
+ 7p	7	5	16	31%	2	9	22%	n.s.
del (7q)	6	5	16	31%	1	9	11%	n.s.
del (8p)	3	3	16	19%	0	9	0%	n.s.
t (8;14)	2	1	16	6%	1	9	11%	n.s.
del (9p)	3	1	16	6%	2	9	22%	n.s.
del (10q)	1	0	16	0%	1	9	11%	n.d.
+ 11q	4	2	16	13%	2	9	22%	n.s.
del (11q)	3	2	16	13%	1	9	11%	n.s.
+ 12	8	5	16	31%	3	9	33%	n.s.
+ 12q	8	5	16	31%	3	9	33%	n.s.
+ 12p	8	5	16	31%	3	9	33%	n.s.
t (14;18)	2	0	16	0%	2	9	22%	n.d.
+ 15q	4	0	16	0%	4	9	44%	n.d.
+ 16p	5	3	16	19%	2	9	22%	n.s.
+ 17q	5	3	16	19%	2	9	22%	n.s.
+ 17p	4	3	16	19%	1	9	11%	n.s.
del (17p)	3	0	16	0%	3	9	33%	n.d.
+ 18	5	3	16	19%	2	9	22%	n.s.
+ 18q	6	4	16	25%	2	9	22%	n.s.
+ 18p	5	3	16	19%	2	9	22%	n.s.
del (18 p)	2	1	16	6%	1	9	11%	n.s.
del (19q)	3	2	16	13%	1	9	11%	n.s.
+ 21q	4	3	16	19%	1	9	11%	n.s.
del (22q)	3	0	16	0%	3	9	33%	n.d.
del (Xq)	7	3	16	19%	4	9	44%	n.s.
del (Xp)	5	2	16	13%	3	9	33%	n.s.
+ X	4	2	16	13%	2	9	22%	n.s.
del Y	4	0	16	0%	4	9	44%	n.d.

4. Diskussion

4.1 Einführung

Die Bezeichnung „diffuses großzelliges B-Zell Lymphom“ (DLBCL) wurde während der Ausarbeitung der REAL-Klassifikation von der International Lymphoma Study Group vorgeschlagen. Somit wurden „Entitäten“ aus der Kiel-Klassifikation, wie das diffuse centroblastische Lymphom vom mono- und polymorphem sowie multilobuliertem Subtyp, das immunoblastische Lymphom und das anaplastische B-Zell Lymphom zu einer „diagnostischen Kategorie“ zusammengefasst. Da die Kenntnisse über das biologische Verhalten dieser Tumoren nicht ausreichend waren, kamen die Autoren überein, dass aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit eine Unterklassifizierung – außerhalb wissenschaftlicher Fragestellung - noch nicht sinnvoll wäre.

Chromosomale Aberrationen im Genom von Tumorzellen zeigen eine nicht-zufällige Verteilung, wie sich bei umfangreichen genetischen Analysen von malignen Lymphomen zeigte (Johansson 1995). Dies deutet darauf hin, dass es möglich sein müsste, nach erfolgter Definition eines bestimmten Aberrationsspektrums später nach erneuter Identifikation auf das Vorliegen eines bestimmten Subtyps schließen zu können und so eine sinnvolle Unterteilung dieser heterogenen Entität zu etablieren.

4.2 Chromosomale Aberrationen in grosszelligen B-Zell-Lymphomen

Bei der Betrachtung des Aberrationsspektrums im vorliegenden Untersuchungsgut stellt man fest, dass im Primärmaterial (n=137) chromosomale Zugewinn häufiger als Verluste sind - ein Ergebnis, das durchweg im Einklang mit den publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen steht (Schlegelberger 1992). Trisomien der Chromosomen 3 (24/137), 7 (20/137), 12 (19/137) und 18 (16/137) treten in knapp 20% auf. Weiterhin ergeben sich in

absteigender Häufigkeit folgende Zugewinne, wobei bei Aberrationen, die Chromosomen mit Trisomien betreffen (Chromosomen 3, 7, 12 und 18), die Fälle mit dem alleinigen Nachweis einer Trisomie zu den jeweiligen Zugewinnen hinzugerechnet wurden: +3q (einschließlich der Trisomie 3: 40/137 - 29%), +3p (einschließlich der Trisomie 3: 39/137 - 28%), +X (32/137 - 23%), +12q (einschließlich der Trisomie 12: 31/137 - 23%), +1q (30/137 - 22%), +7q (einschließlich der Trisomie 7: 29/137 - 21%), +7p (einschließlich der Trisomie 7: 28/137 - 20%), +11q (26/137 - 19%), +18q (einschließlich der Trisomie 18: 25/137 - 18%), +12p (einschließlich der Trisomie 12: 24/137 - 18%), +5q (22/137 - 16%) und +17q (22/137 - 16%). Die häufigste strukturelle Aberration sind jedoch Verluste auf dem langen Arm des Chromosoms 6. Diese treten in 44% (60/137) auf. Weitere Verluste sind: del(17p) (34/137 - 25%), del(1p) (25/137 - 18%), del(Xq) (24/137 - 18%), del(Xp) (20/137 - 15%), del(1q) (20/137 - 15%), del(4q) (19/137 - 14%), del(9p) (18/137 - 13%), del(10q) (15/137 - 11%) und del(2p) (17/137 - 12%).

Wie in der Literatur vorbeschrieben, wurden Verluste im langen Arm des Chromosoms 6 auch in der vorliegenden Serie als häufige Aberrationen bei Non-Hodgkin-Lymphomen beschrieben. Monni et al. beschreiben 6q-Deletionen in 38% der untersuchten diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (1996). Eine prognostische Relevanz dieser Aberration ist nicht gesichert. Offit et al. (1991) beschreiben, dass 30-60% der „intermediate“ und „high-grade“ B-Zell NHL mit einer Translokation t(14;18) eine Deletion 6q aufweisen. Dies könnte ein möglicher Hinweis für eine prognostische Relevanz dieser Aberration sein. Bei Vitolo et al. (1998) scheint das Auftreten einer 6q-Deletion keinen Einfluss auf Prognose und klinischen Verlauf von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen zu haben. Zu beachten gilt jedoch, dass bei letzterer Analyse nur Fälle *nach Behandlung mit Anthrazyklin-haltiger Chemotherapie* untersucht wurden.

Als erste charakteristische Chromosomenaberration eines malignen Lymphoms wurde die Translokation t(8;14) von Zech et al. 1976 mit Hilfe der klassischen Zytogenetik beschrieben. Sie findet sich in etwas 80% bei Burkitt-Lymphomen. Die t(14;18) ist in bis zu 85% der folliculären Lymphome vorhanden (Yunis

1987). Schlegelberger et al. konnten 1999 zeigen, dass diese Translokation häufiger in zentroblastischen als in immunoblastischen Varianten vorkommt. Die dadurch resultierende Aktivierung des *BCL2*-Gens verschafft diesen Zellen eine verlängerte Überlebenszeit (Hockenberry 1990). Weiterhin wird in dieser Arbeit beschrieben, dass in immunoblastischen Lymphomen das Vorkommen von Aberrationen bei 7q und 8q einen schwerwiegenderen Einfluss auf das Überleben hat, als der International Prognostic Index. Dieses Beispiel zeigt ebenfalls, dass ein nicht-zufälliges Verteilungsmuster von chromosomalen Aberrationen wahrscheinlich ist. Bereits 1992 berichtete diese Arbeitsgruppe über das Auftreten der Trisomien der Chromosome 7, 11 und 12 sowie von überzähligen X-Chromosomen als *sekundäre Chromosomenaberrationen*. Strukturelle Aberrationen betrafen am häufigsten den kurzen Arm des Chromosoms 6 in Form von Deletionen, wie sich auch bei den in dieser Studie untersuchten Fällen zeigte. Es gilt somit die Annahme, dass bestimmte sekundäre Chromosomenaberrationen Bedeutung für das histologische Bild und den klinischen Verlauf haben (Yunis 1987).

Obwohl die oben beschriebenen Translokationen auch mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder mit Blotting-Verfahren (Southern Blot) nachgewiesen werden können, hat sich die zytogenetische Chromosomenanalyse gegenüber diesen moderneren Verfahren als verlässlicher erwiesen (Schlegelberger 1999). Aufgrund der Teilungsfreudigkeit der Tumorzellen ist eine zytogenetische Chromosomenanalyse durchaus sinnvoll, da sich ausreichend Zellen in der Metaphase befinden (Bentz 1999). Die zytogenetische Analyse von Non-Hodgkin-Lymphome hat folglich die Assoziation von klonalen Aberrationen mit bestimmten klinischen und biologischen Merkmalen ermöglicht (Cigudosa 1999).

Die comparative genomische Hybridisierung (CGH) ermöglicht eine Nukleinsäureanalyse, bei der das zu untersuchende Material mit normalem Referenz-Material um die Hybridisierung auf Metaphasen-Chromosomen von gesunden Probanden konkurriert. Mit der CGH ist es möglich, in Verbindung mit computergestützten Auswerteeinheiten vergleichsweise hohe Zellzahlen zu analysieren und somit Rückschlüsse über die Verteilung der Aberrationen in

einer untersuchten Zellpopulation zu ziehen. Unterschiede zur klassischen Zytogenetik bestehen in der Tatsache, dass durch die der zytogenetischen Analyse vorangehende Zellkultur eine klonale Selektion stattfindet: Klone mit einem beispielsweise durch bestimmte Aberrationen erworbenen Überlebensvorteil sind somit möglicherweise überrepräsentiert. Dies mag die Abweichungen in der Frequenz der unterschiedlichen Aberrationen zwischen den Studien, die klassische zytogenetische Untersuchungen durchgeführt haben und solchen, in denen die Ergebnisse mittels CGH zustande kamen, erklären. Dabei ist insbesondere zu erwähnen, dass die CGH nur Imbalancen genetischen Materials und nur solche in mehr als 50% der Zellen erkennt.

4.3 Nodale und extranodale DLBCL

Etwa 30-40% diffuser großzelliger B-Zell Lymphome (DLBCL) entstehen primär extranodal in Organen, in denen lymphatisches Parenchym zum Teil nicht primär angelegt ist. Am häufigsten treten sie im Gastrointestinaltrakt, und hier weit überwiegend im Magen auf, kommen aber häufiger auch im ZNS, den Hoden, der Lunge, oder in der Haut vor. Morphologisch zeigen die Tumorzellen das gesamte Spektrum peripherer B-Blasten und entsprechen daher Centroblasten, Immunoblasten, oder Plasmoblasten. Von primär nodalen (und häufig systemischen) DLBCL sind sie morphologisch also kaum abzugrenzen. Neuere klinische, immunologische und molekulargenetische Daten deuten aber darauf hin, dass extranodale DLBCL besondere Tumoren sind, die sich insbesondere in ihren molekularen Charakteristika von nodalen Tumoren (und auch untereinander) unterscheiden und somit häufig organotypische Eigenschaften aufweisen. Diese können eine besondere organabhängige, klinische Präsentation sein, oder eine gegenüber nodalen Tumoren häufig distinkte genetische Konstitution mit besonderen Aberrationen darstellen, die häufig mit dem Entstehungsort der Tumoren assoziiert sind (Ott und Rosenwald 2007).

In der vorliegenden Studie wurden die Aberrationen bei nodalen LBL (n=106) und primär extranodalen Tumoren (n=31) verglichen. Statistisch signifikant war

das unterschiedliche Auftreten zweier Translokationen in nodalen großzelligen B-Zell Lymphomen (LBL) und primär extranodalen Tumoren. So war die Translokation t(8;14) signifikant häufiger bei extranodalen Tumoren nachweisbar (5/31 – 16% vs 5/106 – 5%; $p < 0,05$), während die Translokation t(14;18) ausschließlich bei nodalen LBL auftrat (12% - 13/106). Die Translokation t(3;14) (einschließlich der Fälle mit einem nachgewiesenen Bruchpunkt bei 3q27) betreffend erreichte der Unterschied zwar keine statistische Signifikanz, war jedoch tendenziell häufiger bei nodalen LBL nachweisbar: Sie trat bei einem von 31 Fällen bei extranodalen Tumoren auf; bei den nodalen LBL fanden sich elf Fälle von 106 (10%). Die unterschiedliche Frequenz der Translokationen t(14;18), t(8;14) und t(3;14) in nodalen und extranodalen Tumoren (Ott et al. 1997) unterstreicht einerseits die Bedeutung verschiedener Transformationswege in Tumoren unterschiedlicher Lokalisation. Andererseits sind diese primären Aberrationen für das Auftreten von weiteren chromosomalen Imbalancen (Deletionen und Zugewinne) verantwortlich (Johansson et al 1995). So fanden sich im vorliegenden Untersuchungsgut weitere Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung von sekundären Aberrationen – allerdings ohne statistische Signifikanz. Einen Überblick gibt folgende Tabelle Nr. 15.

Lokalisation	Extran. LBL (n=31)		nodale LBL (n=106)	
del (1p)	2	6%	23	22%
+ 1q	4	13%	26	25%
+ 3q	7	23%	33	31%
+ 5q	2	6%	20	19%
del (6q)	9	29%	51	48%
del (7q)	5	16%	8	8%
+ 11q	4	13%	22	21%
+ 12q	6	19%	25	24%
+ 15q	0	0%	9	8%
+ 16p	1	3%	15	14%
del (17p)	6	19%	28	26%
+ 18q	3	10%	22	21%
+ X	4	13%	28	26%
del Y	0	0%	13	12%

Tabelle 15: Unterschiede in der relativen Häufigkeit von sekundären Aberrationen bei extranodalen und nodalen LBL. In nahezu allen Regionen finden sich in der Gruppe der nodalen LBL eine höhere Frequenz.

In vorangegangenen Studien wird beschrieben, dass sowohl nodale LBL als auch extranodale diffuse großzellige B-Zell Lymphome rekurrente genomische Aberrationen aufweisen (Offit et al. 1991, Schlegelberger et al. 1992, Monni et al. 1996, Barth et al. 1998, Cigudosa et al. 1999). Generell zeigen primär extranodale DLBCL im Gastrointestinaltrakt ähnliche chromosomale Aberrationen wie primär nodale DLBCL, mit Ausnahme der t(14;18)/*BCL2*-Rearrangement, die in 15-25% nodaler DLBCL, nicht jedoch in extranodalen DLBCL nachzuweisen ist. Sekundäre genetische Alterationen wie eine Mutation/Inaktivierung von *TP53* oder *p16* werden sowohl in diesen extranodalen DLBCL wie auch in nodalen DLBCL in ähnlicher Frequenz angetroffen (Ott und Rosenwald 2007).

Das Spektrum chromosomaler Imbalancen (Deletionen und Zugewinne) in nodalen und extranodalen, insbesondere gastralen und intestinalen DLBCL ist ähnlich, unterscheidet sich aber in der Häufigkeit, in der die unterschiedlichen Regionen betroffen sind. So lagen in klassischen zytogenetischen Untersuchungen Unterschiede in der Frequenz des Auftretens von Zugewinnen für das Chromosom 5, für Zugewinne in 11q und für die Chromosomen 15/15q und 16/16q vor. Diese Regionen waren in primär extranodalen Lymphomen deutlich seltener bzw. gar nicht betroffen (Ott et al. 1997). In CGH-Untersuchungen konnten Zugewinne in 11/11q, 12q und 1q in gastrointestinalen DLBCL besonders häufig nachgewiesen werden (Barth et al. 1998). Auch Verluste für das Y-Chromosom lagen bei primär nodalen Lymphomen häufiger vor. Hingegen waren Deletionen im langen Arm des Chromosoms 7 (überwiegend in der Region q22-ter) häufiger bei extranodalen Lymphomen anzutreffen. Die in nodalen DLBCL in etwa 5-10% der Fälle nachweisbare t(8;14)(q24;q32) scheint deutlich häufiger in Tumoren extranodaler Primärlokalisationen nachweisbar (Ott et al. 1997). Dieser Befund ist insbesondere in primären gastrointestinalen DLBCL evident, die ein Rearrangement des *CMYC* Onkogens in bis zu 50% der Tumoren nachweisen ließen (van Krieken et al. 1990). In der vorliegenden Studie fielen die meisten dieser beschriebenen Unterschiede (Chromosom +1q, +5q, +11q, +15q, +16q und del(7q)) ebenfalls auf. Weiterhin fand sich ein zusätzliches Chromosom X,

das hier bei den nodalen Tumoren häufiger vorkommt. Barth et al. (1998) beschrieben als häufigste Aberrationen bei extranodalen großzelligen B-Zell-Lymphomen des Gastrointestinaltraktes Zugewinne von Chromosom 11, 12, 1q und 3q, sowie Verluste in 17p und 6q. Diese Ergebnisse finden sich auch im vorliegenden Untersuchungsgut. Jedoch kommen ausnahmslos alle von dieser Arbeitsgruppe beschriebenen Aberrationen häufiger bei nodalen LBL vor. Die Deletion 6q stellt nicht nur die häufigste chromosomale Imbalance im gesamten vorliegenden Untersuchungsgut dar, sondern ist auch in den jeweils untersuchten Untergruppen am häufigsten vertreten. Bezüglich der Zugewinne bei Chromosom 12 fand sich ein nahezu gleiches Verteilungsmuster dieser Aberration in den beiden Untergruppen. Die Deletion 17p ist ebenfalls in beiden Gruppen annähernd gleich häufig vertreten.

Auffallend ist die Heterogenität des Untersuchungsgutes bezüglich der Primärmanifestation in den bisher durchgeführten Studien mit zumeist relativ geringer Fallzahl, die bis heute eine reproduzierbare und weiterführende Beurteilung nicht zugelassen haben. Eine mögliche Ursache könnte in der Tatsache liegen, dass extranodale Tumoren aufgrund des klinischen Verlaufes eher diagnostiziert werden (López-Guillermo et al. 2005). Dadurch wird die Vermutung, dass mit länger andauerndem Verlauf mehr und mehr Aberrationen auftreten, beziehungsweise ein Auftreten von zusätzlichen Aberrationen mit der Progression assoziiert ist, unterstützt.

Im Zuge der klinischen und biologischen Charakterisierung von DLBCL anhand der Primärlokalisation fand sich bei López-Guillermo et al. (2005) bei nodalen LBL häufiger eine Knochenmarksinfiltration, ein erhöhter Serum-LDH-Spiegel, erhöhte Beta2Mikroglobulin-Werte sowie häufiger eine „bulky disease“ – also größere Tumormassen: all diese Faktoren deuten auf ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium hin. In dieser Arbeit waren weiterhin Zugewinne von 18q21 häufiger bei nodalen LBL, ein Ergebnis, das im vorliegenden Untersuchungsgut reproduzierbar war, allerdings in weit geringerer Häufigkeit und statistisch nicht signifikant.

Es ist nicht klar, ob die klinischen und biologischen Unterschiede zwischen nodalen und extranodalen LBL aufgrund der unterschiedlichen Primärlokalisierung oder aufgrund tatsächlicher biologischer Unterschiede zustande kommen. Zudem wurden in einigen Studien (López-Guillermo et al. 2005) nur lokale extranodale DLBCL als „primär extranodal“ gewertet, obwohl selbstverständlich auch diese Entität disseminiert auftreten kann - vor allem in den fortgeschrittenen Stadien AnnArbor III und IV. Dies führt zu einem unvollständigen Bild des zytogenetischen Aberrationsspektrums der extranodalen Tumoren in solchen Studien.

4.4 Follikuläre Lymphome Grad 3B +/- DLBCL

Bei der Betrachtung der 24 Fälle der follikulären Lymphome mit oder ohne zusätzlicher Komponente eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (FL 3B +/- DLBCL) und Gegenüberstellung mit den nodalen Lymphomen mit rein diffusem Wachstumsmuster fällt als einzig statistisch signifikanter Unterschied ein häufigeres Vorkommen von Zugewinnen bei 1q (10/24 – 42% vs 16/82 – 20%; $p < 0,05$) bei den FL 3B +/- DLBCL auf. Nicht signifikant, jedoch ebenfalls deutlich ist der Unterschied bei der Deletion 6q. Es zeigt sich mit einer Verteilung von 63% (15/24) gegenüber 44% (36/82) zugunsten der FL 3B +/- DLBCL ein bemerkenswerter Unterschied. Die gleiche Tendenz weisen ein Zugewinn des Chromosoms X (8/24 – 33% vs 20/82 – 24%) und Zugewinne bei 11q (8/24 – 33% vs 14/82 – 17%) auf.

Auch Zugewinne bei Chromosom 18 sind häufiger bei FL 3B +/- DLBCL: die Trisomie 18 zeigt ein Verhältnis von 21% (5/24) gegenüber 10% (8/82), +18q ein Verhältnis von 29% (7/24) gegenüber 18% (15/82) und +18p ein Verhältnis von 25% (6/24) gegenüber 12% (10/82). Bei Chromosom 3 fällt wie bei den folgenden Aberrationen ein gegensätzliches Verteilungsmuster auf. Hier konnte die Trisomie 3 mit 21% (17/82) gegenüber 8% (2/24) deutlich häufiger bei den nodalen DLBCL mit rein diffusem Wachstumsmuster nachgewiesen werden. Zugewinne von 3q zeigten eine Verteilung von 33% (27/82) gegenüber 25%

(6/24). Bei Chromosom 7 zeigte sich ebenfalls diese Tendenz. Ein nennenswerter Unterschied in der relativen Häufigkeit bestand nur bei +7p (24% - 20/82 vs 17% - 4/24). Die Deletion 9p kam bei 17% (14/82) bei nodalen DLBCL mit rein diffusem Wachstumsmuster und nur bei 4% (1/24) bei den FL 3B +/- DLBCL vor.

Die Unterteilung des Untersuchungsgutes in der vorliegenden Studie nach nodalen DLBCL mit rein diffusem Wachstumsmuster und FL 3B +/- DLBCL begründet sich in der Beobachtung, dass folliculäre Lymphome Grad 3 einen aggressiveren Verlauf als folliculäre Lymphome Grad 1 und 2 zeigen und in ihrem klinischen Verhalten sowie dem Ansprechen auf Chemotherapie eher den DLBCL entsprechen (Hans et al. 2003). FL Grad 3 sollten daher als heterogene Gruppe angesehen werden. Ott et al. (2002) und Katzenberger et al. (2004) konnten nachweisen, dass eine Gruppe FL3A mit häufigerem Auftreten (in etwa 70% der Fälle) der t(14;18) und eine Gruppe FL3B (gegebenenfalls mit einer zusätzlichen DLBL-Komponente) mit einem Rearrangement von *BCL6* (Translokation t(3;14) oder Varianten in etwa 60% der Fälle) assoziiert ist.

Die Untergruppe der FL 3B +/- DLBCL entspricht laut Ott et al. (2002) offenbar eher diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen. Bei der Betrachtung des vorliegenden Untersuchungsgutes zeigt sich bei den FL 3B +/- DLBCL tatsächlich bis auf ein signifikant häufigeres Vorkommen von Zugewinnen bei 1q ein weitgehend ähnliches Verteilungsspektrum an chromosomalen Aberrationen wie bei den nodalen Lymphomen mit rein diffusem Wachstumsmuster. In der Literatur (Schlegelberger et al. 1992) wird die Translokation t(14;18) als eine folliculäre Lymphome nahezu definierende primäre Aberration angesehen; sie ist in jener Untersuchung mit Zugewinnen von 1q assoziiert – ein Ergebnis, das zur vorliegenden Untersuchung passt. Hier kommt die Translokation t(14;18) in nodalen Lymphomen mit rein diffusem Wachstumsmuster und folliculären Lymphomen Grad 3B +/- DLBCL in etwa gleich häufig vor – wie auch die Translokationen t(3;14) und t(8;14).

Es kann dadurch gezeigt werden, dass die Gruppe der folliculären Lymphome Grad 3B mit oder ohne zusätzliche Komponente eines diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms sich durch zytogenetische Charakterisierung kaum von den nodalen Lymphomen mit diffusem Wachstum abgrenzen lassen. Sie weisen ein anderes Aberrationsspektrum als die in der Literatur beschriebenen t(14;18)-positiven Lymphome auf und sind durch das Vorliegen eines „Rearrangements“ in 3q27 gekennzeichnet (Katzenberger et al. 2004). Dies könnte als weiterer Hinweis der Zugehörigkeit der FL 3B +/- DLBCL zu den DLBCL gewertet werden.

4.5 Zytogenetische Untersuchungen von rezidierten DLBCL

Rezidive maligner Lymphome nach Chemotherapie sind überwiegend klonal mit dem de-novo aufgetretenen LBL verwandt. Es werden jedoch einerseits zusätzliche Aberrationen, andererseits eine höhere relative Häufigkeit von bestimmten Aberrationen im Rezidivmaterial erwartet. Dies betrifft sowohl das erneute Auftreten eines diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms nach einer Therapie mit anschließender klinischer Remission, als auch die Resistenz residualer Tumorzellen gegen die verwendeten Therapeutika. In beiden Fällen liegen wohl Mechanismen vor, die ähnlich denen bei Tumorentstehung und –progression sind. Es gilt also zu untersuchen, ob im Rezidivmaterial weitere Aberrationen auftreten, beziehungsweise ob bestimmte Aberrationen das Rezidivrisiko anzeigen.

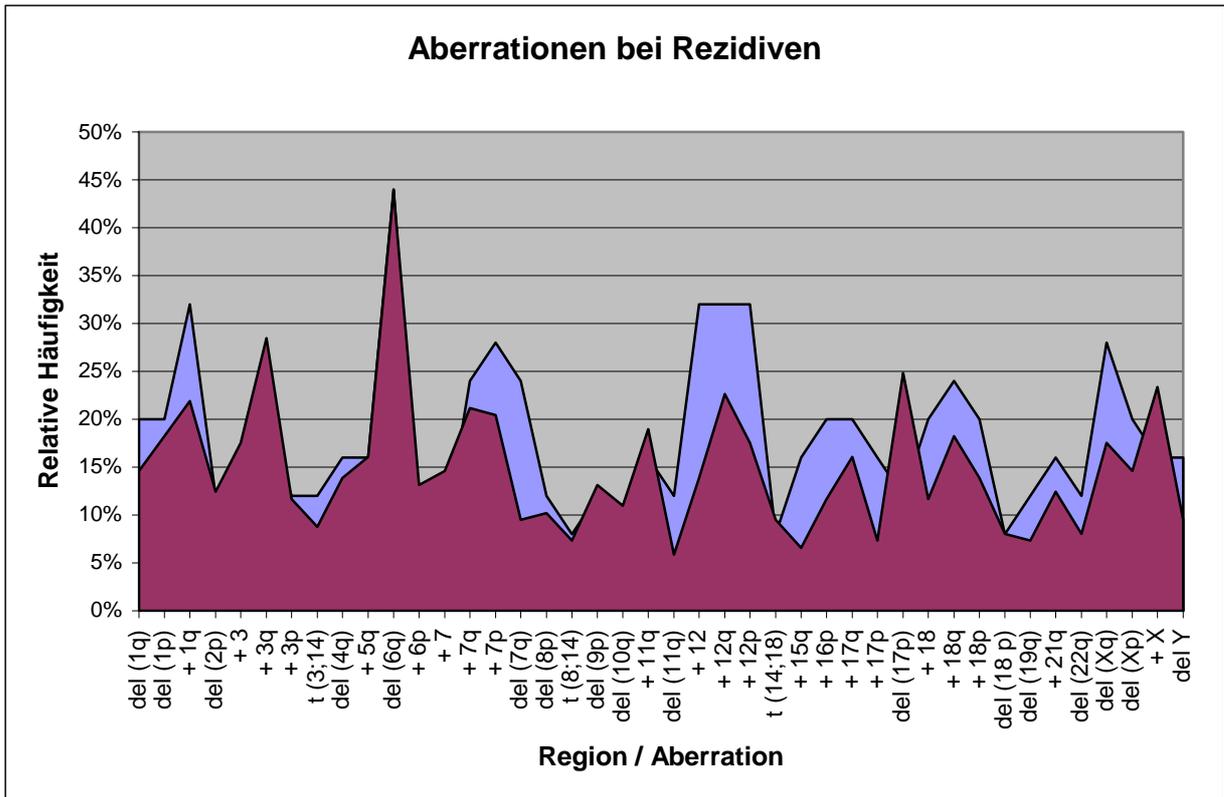


Diagramm 2: Verhältnis der relativen Häufigkeiten von chromosomalen Aberrationen im Primärmaterial (rote Fläche) im Vergleich zu Rezidiven (blaue Fläche). Es zeigt sich, dass die relative Häufigkeit der Aberrationen bei Rezidiven in den meisten Regionen überwiegt. Verluste des langen Armes von Chromosom 6 – del(6q) – finden sich jedoch in beiden Gruppen gleich häufig.

Im vorliegenden Untersuchungsgut zeigten sich in zwei Regionen statistisch signifikante Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der untersuchten Aberrationen: die Deletion 7q (6/25 - 24% vs 13/137 - 9%; $p < 0,05$) sowie die Trisomie 12 (8/25 - 32% vs 19/137 - 14%; $p < 0,05$) traten häufiger bei Rezidiven auf. Zugewinne des langen Armes von Chromosom 1 waren mit 8/25 (32%) gegenüber 30/137 (22%) ebenfalls deutlich häufiger – jedoch ohne statistische Signifikanz – bei rezidierten DLBCL nachweisbar, wie auch die Deletion 16p (5/25 - 20% vs 16/137 - 12%), die Trisomie 18 (5/25 - 20% vs 16/137 - 12%) sowie Verluste des Y-Chromosoms (4/25 - 16% vs 13/137 - 9%). Die Deletionen Xq (7/25 - 28% vs 24/137 18%) und Xp (5/25 - 20% vs 20/137 - 15%) zeigten auch eine Häufung zugunsten des Rezidivmaterials, wohingegen ein Zugewinn von X mit 32/137 (23%) gegenüber 4/25 (16%) häufiger im Primärmaterial vertreten war. Auch folgende Aberrationen waren häufiger bei de-novo aufgetretenen DLBCL: Die Verteilung der Deletion 10q (15/137 - 11% vs 1/25 -

4%) und der Deletion 17q (34/137 – 25% vs 3/25 – 12%) war jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Trisomie 3 (24/137 – 18% vs 3/25 – 12%) sowie Zugewinne von 3q (39/137 – 28% vs 5/25 – 20%) waren häufiger im Primärmaterial nachweisbar, Zugewinne von 3p zeigten im Gegensatz jedoch ein ausgeglichenes Verteilungsmuster. Die untersuchten Translokationen wiesen bei den Rezidiven eine nahezu gleiche relative Häufigkeitsverteilung auf. Auffallend war, dass die Deletion 6q - in der Literatur in einigen Studien (Beà et al. 2004) ein Indiz für schlechtere Prognose - sich bei de-novo DLBCL genauso häufig wie bei Rezidiven fand. Ein Ergebnis, das sicher aufgrund der hohen Frequenz dieser Aberration (44% in beiden Gruppen) deutliche Aussagekraft besitzt.

Studien, die sich in erster Linie mit dem Aberrationsspektrum von Rezidiven bei malignen Lymphomen befassen, finden sich kaum. Man könnte lediglich davon ausgehen, dass Aberrationen, die einen aggressiveren Verlauf eines DLBCL vermuten lassen, unter Umständen auch für die Rezidivfreudigkeit verantwortlich sind. So konnten Simonitsch-Klupp et al. (2004) zeigen, dass die TP53-Deletion (Chromosom 17p) mit einem aggressiveren Verlauf bei DLBCL mit plasmoblastischen / plasmozytischen Merkmalen assoziiert ist.

Mutationen des Gens TP53 sind sekundäre Aberrationen, die laut bisher durchgeführter Studien (Zhang et al. 1999, Barrans et al. 2002) bei den meisten histologischen Subtypen mit einer schlechteren Prognose einhergehen sollen. Was diesen Locus betrifft, so zeigt sich bei den untersuchten Fällen ein uneinheitliches Bild. Zugewinne von 17p sind häufiger bei Rezidiven, Verluste häufiger im Primärmaterial zu beobachten; in beiden Fällen jedoch ohne statistische Signifikanz. Da aber der biologisch entscheidende Mechanismus die TP53-Deletion ist, kann aus dem vorliegenden Material bei Betrachtung der 17p-Zugewinne bei Rezidiven einerseits und der 17p-Deletion im Primärmaterial andererseits, kein Rückschluss über die biologische Relevanz dieses Ergebnisses gezogen werden.

Sekundäre Aberrationen, die zwar nicht mit Rezidiven assoziiert werden konnten, jedoch laut der Autoren eine morphologische Progression von

follikulären Lymphomen mit sich brachten, waren bei Horsman et al. (2001) $\text{del}(1\text{p}36)$, $\text{del}(6\text{q})$ und $\text{del}(10\text{q}22-24)$. Dave et al. (2002) fanden, dass eine Deletion bei 9p, 6q oder 17p und Zugewinne bei Chromosom 7 (einschließlich der Trisomie) zu einer Transformation von follikulären Lymphomen zu aggressiveren DLBCL führte. Keine der aufgeführten Genloci war in der vorliegenden Studie bei Rezidiven häufiger nachweisbar. Die Deletion 10q sowie die Deletion 17p fanden sich hier sogar häufiger bei den *nicht-rezidierten* DLBCL.

Die aktuelle Datenlage deutet auf eine mögliche nicht-zufällige Verteilung von sekundären Aberrationen bei Rezidiven hin. Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass jede einzelne dieser genomischen Imbalancen für sich eine Bedeutung für die Entstehung oder Progression und damit für die Prognose hat. Einige, besonders die weniger häufigeren, entstehen wohl mehr oder weniger als Nebeneffekt bei verschiedenen Transformationswegen und weisen deshalb kein einheitliches Verteilungsmuster auf. Somit spielen sie im Rahmen der Analyse nur eine untergeordnete Rolle. Welche der sekundären Aberrationen jedoch Bedeutung für Entstehung und Progression haben, bleibt noch zu klären.

4.6 Vergleich der Zytogenetik von GC-DLBCL und non-GC-DLBCL

4.6.1 Zytogenetische Aberrationen in der Klassifikation

Der alleinige Nachweis von Translokationen ist nicht ausreichend, um die Zuordnung eines Lymphoms in diagnostischen Untergruppen zu rechtfertigen. Dies liegt zum Einen daran, dass Translokationen auch bei offensichtlich Gesunden nachgewiesen werden können. In erster Linie aber zeigt sich, dass Translokationen wie die $t(14;18)$ in unterschiedlichen Entitäten vorkommen, wie zum Beispiel bei follikulären Lymphomen und DLBCL (Willis et al. 2000). Bei sekundären Aberrationen sind ebenfalls in hohem Maße Gene betroffen, die nicht ausschließlich bei malignen Lymphomen der B-Zell-Reihe, sondern bei

einer Großzahl anderer Neoplasien für Tumor-Entstehung und –Progression verantwortlich sind (ISCN 2005). Dies führte zur Suche nach weiteren diskriminierenden Faktoren zur Unterteilung von DLBCL.

4.6.2 Genexpressionsprofile von DLBCL

Alizadeh et al. beschrieben im Jahre 2000 durch die Erstellung eines Gen-Expressionsprofils ein molekulares Portrait unterschiedlicher DLBCL-Typen. Zum Einsatz kam dabei ein neu generierter „Lymphochip“, ein spezieller Mikroarray („complementary DNA-microarray“), zur Quantifizierung der Expression tausender Gene. Die Unterteilung des Untersuchungsgutes zum Beispiel nach Proliferation und Differenzierungsgrad führte zur Identifikation zweier DLBCL-Typen, die offenbar durch unterschiedliche Reifestadien ihrer Ausgangszellen charakterisiert sind. Mittels dieser DNA-Microarrays gelang es, zu zeigen, dass verschiedene Genexpressionsmuster – sogenannte „Signaturen“ – in Zellen unterschiedlicher Reifestadien verschieden stark zur Ausprägung kamen. Somit konnten Schlüsse vom Genexpressionsmuster auf den Differenzierungsgrad der Zelle gezogen werden. Der „Germinal-center“ Typ (GC-B-Zell-Lymphom) exprimiert Gene, die typischerweise im Expressionsmuster von normalen B-Zellen im Keimzentrum nachweisbar sind. Der „Activated-B-Cell“ Typ exprimiert Gene, die bei der Aktivierung peripherer Plasmazellen induziert werden.

Die Messung der mRNA führte zur Zusammenstellung einer „molekularen Signatur“. Tumoren mit einer ähnlichen Signatur sollen ähnliche Eigenschaften und somit ähnliche klinische Verläufe haben (Harris et al. 2001). Es zeigte sich, dass Patienten mit Tumoren, die eine charakteristische „Keimzentrumssignatur“ (Germinal center B-like DLBCL – ‚GC-DLBCL‘) aufwiesen, eine signifikant höhere Lebenserwartung hatten. Umgekehrt war bei Patienten mit Tumoren mit der Signatur von aktivierten Plasmazellen (analog zur Signatur der in-vitro aktivierten peripheren B-Lymphozyten: Activated B-like DLBCL – ‚ABC-DLBCL‘), die Lebenserwartung herabgesetzt. So waren in der GC-Gruppe nach 5 Jahren noch 76% der Patienten am Leben, wo hingegen in der non-GCB-Gruppe nur

16% der Betroffenen überlebten. Rosenwald et al. (2002) grenzten von über 5000 in der Arbeit von Alizadeh et al. (2000) untersuchten Genen wenige Gene ab, um eine Risikoabschätzung auf molekularer Ebene zu entwickeln und erhielt so einen überschaubareren Zugang zur dieser großen Datenmenge. Als typische chromosomale Imbalancen bei ABC-DLBCL-Patienten finden sich Zugewinne in den langen Armen der Chromosomen 3 und 18 (3q und 18q) (Beá et al. 2005).

Immunhistochemische Untersuchungen tragen in der Diagnostik maligner Lymphome im Allgemeinen zur weiteren Spezifizierung der verschiedenen Entitäten bei. CD10 (CALLA = common acute lymphoblastic leucaemia antigen) ist ein Antigen, das von pro-B-Zellen und Keimzentrumszellen exprimiert wird. Die Tumorzellen des Burkitt-Lymphoms und der folliculären Lymphome Grad 1-3A sind typischerweise CD10-positiv. Die klinische Relevanz der Expression dieses Markers ist noch umstritten. CD5 wiederum ist ein Oberflächen-Glycoprotein, das normalerweise von T-Zellen exprimiert wird. CD5-positive B-Zellen finden sich um die Keimzentren in lymphatischem Gewebe. In B-Zell-Neoplasien wird dieses Antigen vor allem bei der CLL und beim Mantelzelllymphom nachgewiesen, es fand sich jedoch auch in Burkitt-Lymphomen und DLBCL, wo es mit einem ungünstigeren klinischen Verlauf und mit dem Vorkommen spezifischer chromosomaler Aberrationen assoziiert zu sein scheint (Yamaguchi et al. 1999, Katzenberger et al. 2003). MUM1 oder IRF-4 (Gen-Lokus 6p23-25) ist ebenfalls ein Onkogen, das eine Funktion als ein Interferon-regulierender Faktor hat. Diese Funktion spielt ebenfalls eine Rolle in der Regulierung und Differenzierung von B-Zellen.

Charakteristische Gene der Keimzentrumszellen sind unter anderem CD10, BCL-6, CD38, JAW1 und A-myb (Siebert et al. 2001) während BCL2, CyclinD2 und IRF4 (MUM1) normalerweise während der in-vitro Aktivierung von peripheren B-Zellen induziert werden. DLBCL entstehen entweder von B-Zellen aus dem Keimzentrum oder in einem späteren Stadium der Differenzierung. Im Modell von Hans et al. (2004) wurde wie unter anderem bei Barrans et al. (2002) und Colomo et al. (2003) ein Algorithmus zur Klassifizierung von DLBCL in die von Alizadeh definierten Subgruppen angewendet, der auf der

immunohistochemischen Expression von CD10, BCL-6 und MUM1 basiert. So wurde das Untersuchungsgut analog zu diesem Modell (*siehe Flussdiagramm aus „Material und Methoden“*) in GCB und ABC (beziehungsweise non-GCB) unterteilt und so das zuvor zytogenetisch charakterisierte Material auf die Häufigkeitsverteilung von chromosomalen Aberrationen untersucht.

4.6.3 Das zytogenetische Profil von DLBCL mit GC-Phänotyp und non-GC-Phänotyp

Diese Studie zeigt bezüglich Entstehungsort (nodal vs extranodal) und histologischer Differenzierung in follikuläres oder diffuses Wachstumsmuster bis auf eine statistisch nicht signifikante Häufung von non-GC-DLBCL bei extranodalen Tumoren (55% vs 45%) eine relativ ausgeglichene Häufigkeitsverteilung der beiden Phänotypen in die nach Primärlokalisierung und Wachstumsmuster unterteilten Subgruppen des Untersuchungsgutes. López-Guillermo et al. (2005) betrachteten die verschiedenen extranodalen Primärlokalisationen gesondert: bei gastrointestinalen Lymphomen war im Gegensatz zu Lymphomen des Waldeyer-Ringes und anderen Primärlokalisationen die post-Keinzentrums-Signatur deutlich seltener. Colomo et al. (2003) beschrieben ein genau umgekehrtes Verhalten: in jener Studie fand sich der GC-Phänotyp häufiger bei extranodalen Tumoren – einhergehend mit günstigerer Prognose.

In der vorliegenden Serie zeigte sich beim Vergleich von DLBCL mit GC-Phänotyp und non-GC-Phänotyp deutliche Unterschiede in der Verteilung von Aberrationen, die auf eine unterschiedliche Ausgangszelle und eine verschiedene Entstehung hindeuten und somit Hinweise auf das Vorhandensein distinkter Entitäten sein könnten. Die Translokation t(14;18) kommt nahezu ausschließlich bei GC-DLBCL vor (12/68 – 18% vs 1/69 – 1%; $p < 0,001$). Die Translokation t(8;14) findet sich hier ebenfalls häufiger (8/68 – 12% vs 2/69 – 3%; $p < 0,05$). Bezüglich der Häufigkeitsverteilung der Translokation t(3;14) einschließlich der Fälle mit nachgewiesenem Rearrangement von 3q27 findet sich kein

nennenswerter Unterschied in beiden Gruppen. Demnach scheint der GCB-Phänotyp eng mit der Translokation t(14;18) verknüpft zu sein. Bei den sekundären Aberrationen finden sich zahlreiche Regionen, die durch ihre unterschiedliche Verteilung diskriminierendes Potential erreichen. Die Trisomie 3 (18/69 – 26% vs 6/68 – 9%) sowie Zugewinne bei 3q (30/69 – 43% vs 11/68 – 16%) und 3p (29/69 – 42% vs 11/68 – 16%; jeweils $p < 0,001$) waren hochsignifikant häufiger bei den durch den hier angewendeten Algorithmus als non-GCB klassifizierten großzelligen B-Zell-Lymphomen vertreten. Bei Zugewinnen des Chromosom 18 zeigt sich die gleiche Tendenz: Die Trisomie 18 (12/69 – 17% vs 4/68 – 6%; $p < 0,05$), +18q (17/69 – 25% vs 8/68 – 12%) und 18p (13/69 – 19% vs 6/68 – 9%) waren häufiger bei non-GC-DLBCL.

Umgekehrt verhielten sich Zugewinne von Chromosom 7: die Trisomie konnte in 16 von 68 Fällen bei GC-DLBCL nachgewiesen werden, trat aber nur in vier von 69 non-GC-DLBCL auf (24% vs 6%; $p < 0,001$). Die Verteilung von 7q und 7p zeigt bei gleicher Tendenz eine Schwankung um das Signifikanzniveau. Verluste von 7q sind dagegen häufiger bei non-GC-DLBCL (10/69 – 14% vs 3/68 – 4%; $p < 0,05$).

Diese sekundäre Aberration fiel bereits bei extranodalen DLBCL häufiger auf – ein möglicher Hinweis, dass diese Region Schlüsselgene für die Tumorgenese enthalten könnte. Folgende sekundäre Aberrationen sind häufiger, wenn auch nicht statistisch signifikant bei GC-DLBCL vertreten: Zugewinne bei 1q (18/68 – 26% vs 12/69 – 17%), die Trisomie 12 (13/68 – 19% vs 6/69 – 9%) und bei diesem Chromosom insbesondere auch Zugewinne bei 12p (15/68 – 22% vs 9/69 – 13%) sowie Verluste von Xq (15/68 – 22% vs 9/69 – 13%). Eine Übersicht über die relevanten Regionen zeigt folgende Tabelle Nr. 16:

Lokalisation	GC-DLBCL (n=68)		non-GCB (n=69)	
+ 1q	18	26%	12	17%
+ 3	6	9%	18	26%
+ 3q	11	16%	30	43%
+ 3p	11	16%	29	42%
t (3;14)	5	7%	7	10%
del (6q)	29	43%	31	45%
+ 7	16	24%	4	6%
+ 7q	19	28%	10	14%
+ 7p	19	28%	9	13%
del (7q)	3	4%	10	14%
t (8;14)	8	12%	2	3%
+ 12	13	19%	6	9%
+ 12q	17	25%	14	20%
+ 12p	15	22%	9	13%
t (14;18)	12	18%	1	1%
+ 18	4	6%	12	17%
+ 18q	8	12%	17	25%
+ 18p	6	9%	13	19%
del (Xq)	15	22%	9	13%

Tabelle 16: Übersicht über die unterschiedliche Verteilung der primären und sekundären Aberrationen bei GC-DLBCL und non-GC-DLBCL.

In einer weiteren Analyse wurde das gesamte Untersuchungsgut aufgeteilt und die Verteilung der Aberrationen bei GC-DLBCL und non-GC-DLBCL getrennt nach Subgruppen betrachtet. Innerhalb der Gruppe der nodalen DLBCL (n=106) erreichen auch die Unterschiede in der Verteilung bei Chromosom 12 (Trisomie 12 und Zugewinne von 12p: häufiger bei GC-DLBCL) und Chromosom 18 (Trisomie 18 und Zugewinne von 18q: häufiger bei non-GCB DLBCL) ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ auf Basis des Chi-Quadrat-Tests. Bei ausschließlicher Betrachtung der DLBCL mit rein diffusem Wachstumsmuster (n=82) wie bei der gemeinsamen Analyse dieser Gruppe mit den extranodalen Tumoren (zusammen n=113) fällt dieser Unterschied unter das Signifikanzniveau. Die häufigste Deletion - die del(6q) - zeigt im gesamten Primärmaterial eine ausgeglichene Verteilung in beiden Phänotypen und weist nur bei der alleinigen Betrachtung der nodalen DLBCL (insbesondere mit

diffusem Wachstumsmuster) eine tendenzielle und statistisch nicht signifikante Häufung bei den non-GC-DLBCL auf.

Bei alleiniger Betrachtung der extranodalen Tumoren sieht man trotz geringerer Fallzahl (n=31) die Tendenzen in der Verteilung der chromosomalen Aberrationen, die sich aus der Betrachtung des gesamten Primärmaterials ergeben haben, bestätigt. Bei eingeschränkter Anwendbarkeit von Signifikanztests zeigt sich, dass Zugewinne von Chromosom 3 (Trisomie 3 (4/17 – 24% vs 1/14 – 7%; +3q (6/17 – 35% vs 1/14 – 7%; +3p (7/17 – 41% vs 1/14 – 7%; $p < 0,001$) häufiger bei non-GC-DLBCL vorkommen, während die Trisomie 7 bei drei von 14 GC-DLBCL (21% vs 0%) und die Trisomie 12 bei zwei von 14 GC-DLBCL (14% vs 0%) vorkommt. Die Translokation t(8;14) ist mit fünf von 14 Fällen ebenfalls ausschließlich bei extranodalen GC-DLBCL vertreten. Die Verteilung von Zugewinnen bei Chromosom 18 sind in diesem Teil des Untersuchungsgutes jedoch nivelliert: eine unterschiedliche Verteilung ist hier nicht nachweisbar.

Im Rezidivmaterial ist bei einer geringeren Fallzahl (n=25) der Chi-Quadrat-Test nur eingeschränkt anwendbar. Dennoch fallen hier zusätzliche Aberrationen auf, die bei den rezidierten GC-DLBCL im Vergleich zu rezidierten non-GC-DLBCL häufiger vertreten sind: del(Y) (4/9 – 44% vs 0/16), del(22q) (3/9 – 33% vs 0/16), +15q (4/9 – 44% vs 0/16) und del (17p) (3/9 – 33% vs 0/16). Besonders letzteres Ergebnis steht im Einklang mit dem Verdacht, dass Mutationen oder Deletionen des Tumorsuppressorgens *TP53* betreffend eine Rolle bei der Transformation von t(14;18)-positiven primär hochmalignen großzelligen B-Zell-Lymphomen aus Keimzentrumlymphomen spielen könnten (Ott et al. 2000).

Die Analyse der verschiedenen Untergruppen zeigt somit deutliche Unterschiede in der Frequenz des Auftretens von chromosomalen Aberrationen bei GC-DLBCL und non-GC-DLBCL. Zur zytogenetischen Charakterisierung von diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen anhand des Proteinexpressionsmusters von CD10, BCL-6 und MUM1 in GC-DLBCL und non-GC-DLBCL tragen demnach nur Resultate bei, die sowohl im Primärmaterial als auch im nach Wachstum und

Primärmanifestation aufgeteilten Untersuchungsgut nachweisbar sind. GC-DLBCL, die durch das Auftreten der Translokation t(14;18) charakterisiert sind, zeigen eine Assoziation mit einer Trisomie 7. Non-GC-DLBCL weisen häufiger eine Trisomie 3 als auch Zugewinne bei 3p und 3q auf. Weitere in der Literatur vorbeschriebene Aberrationen, wie ein häufigeres Auftreten von Zugewinnen von Chromosom 18 bei non-GC-DLBCL sowie von Zugewinnen von Chromosom 12 bei GC-DLBCL sind zwar tendenziell nachweisbar, jedoch nicht statistisch signifikant. Die häufigste Aberration, die Deletion 6q, zeigt in beiden Subgruppen ein etwa gleiches Verteilungsmuster.

4.7 Vergleich der Ergebnisse mit der aktuellen Literatur

Schlegelberger et al. hatten 1992 eine zytogenetische Analyse von malignen Non-Hodgkin-Lymphome vorgestellt. Das Vorhandensein der Translokation t(14;18) war mit charakteristischen sekundären Chromosomenaberrationen assoziiert: ein gemischtzelliges Bild ging mit Trisomien 7,12 und der Deletion 6q einher, während die Trisomien 3, 18 und 21 mit einem großzelligen Bild vergesellschaftet waren. In jener Studie wurde auf eine mögliche prognostische Relevanz dieser Ergebnisse hingewiesen. Dieselbe Arbeitsgruppe veröffentlichte 1999 Daten zu centroblastischen und immunoblastischen Lymphomen. Die Translokation t(8;14) trat in Burkitt-Lymphomen gehäuft auf, die Translokation t(14;18) in centroblastischen Lymphomen und Deletionen in 8q und 14q, Rearrangement von 4q und Verluste des Chromosoms 10 in immunoblastischen Lymphomen. Bei centroblastischen Lymphomen zeigten Deletionen in 1q42-qter, Duplikationen in 1q23-32 und die Trisomie 5 prognostische Relevanz, wohingegen in immunoblastischen Lymphomen ein Rearrangement in 7q und 8q einen weitreichenderen Einfluss auf das Überleben der Patienten hatte als der ‚International Prognostic Index‘.

In der vorliegenden Studie wurden die nach der Kiel-Klassifikation als centroblastische und immunoblastische Lymphome unterteilte Gruppe durch einen Algorithmus auf Basis des Genexpressionsprofils neu charakterisiert,

jedoch mit dem Unterschied, dass zuvor die prognostische Relevanz der Genexpression in Hochdurchsatz-Untersuchungen vorheriger Studien (Alizadeh et al. 2000, Rosenwald et al. 2002) belegt worden war. Bis dato war eine zytogenetische Unterteilung der als heterogen bezeichneten Entität der DLBCL weder auf Basis des Wachstumsmusters noch durch den Ort der Primärmanifestation gelungen. Die hier durchgeführte Unterteilung in GC-DLBCL und non-GC-DLBCL liefert jedoch Daten, die vermuten lassen, dass es sich bei diesen Subgruppen um unterschiedliche „Krankheiten“ handelt.

In der Literatur finden sich zu den hier gefunden chromosomalen Aberrationen vergleichbare Ergebnisse. Beà et al. (2005) untersuchten das Aberrationsspektrum von 225 unbehandelten de-novo diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen, die anhand des Genexpressionsprofils in GCB, ABC und zwei weitere Gruppen (primär mediastinales DLBCL und „nicht klassifizierbare DLBCL“) unterteilt waren und fanden einen signifikanten Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der chromosomalen Aberrationen. In dieser Studie wurden mittels comparativer genomischer Hybridisierung (CGH) zuvor in drei Genexpressionsgruppen unterteilte DLBCL charakterisiert. DLBCL mit dem ABC-Phänotyp wiesen häufiger eine Trisomie 3 und Zugewinne von 3q auf, die sich nicht bei GC-DLBCL nachweisen ließen. Weiterhin fanden sich bei den ABC DLBCL auch häufiger Zugewinne von 18q21 und Verluste von 6q21, während bei GC-DLBCL Zugewinne von 12q12 häufiger waren. 18q-Zugewinne oder Aberrationen waren im Untersuchungsmaterial dieser Arbeitsgruppe signifikant mit einem höherem International Prognostic Index und klinischen Merkmalen verknüpft, die dem post-Keimzentrums-Phänotyp zugeschrieben werden. In einer dritten Gruppe, den primären mediastinalen DLBCL fand sich unter anderem Zugewinne von 9p. Diese Gruppe wurde in anderen Publikationen den ABC- oder non-GC-DLBCL zugeordnet. Interessanterweise fand sich in der vorliegenden Untersuchung häufiger ein Verlust dieser Region.

Tagawa et al. untersuchten 2005, ob sich die vorher in CD5-positive und CD5-negative/CD10-positive unterteilten DLBCL in Korrelation mit GC-DLBCL und ABC-DLBCL bringen lassen: Der GC-Phänotyp war hier durch Zugewinne von

1q, 2p, 7q und 12q charakterisiert, wohingegen bei ABC-DLBCL die Aberrationen +3q, +18q, +19q, del(6q) und del(9p21) häufiger waren. Die Autoren kamen weiterhin zu dem Schluss, dass anhand der Expression von CD5 und CD10 eine Unterteilbarkeit des Untersuchungsgutes in ABC-DLBCL und GC-DLBCL gegeben sei. Diese Tatsache bekräftigt die Anwendbarkeit des oben dargestellten Algorithmus, wenn auch in abgewandelter Art und Weise. Auffällig ist wiederum eine leichte Verschiebung im Spektrum der genetischen Imbalancen, der Deletion 6q wird jedoch auch in dieser Publikation Bedeutung zugeschrieben. Außerdem zeigte sich, dass die Deletion 9p21 in DLBCL mit dem aggressivsten klinischen Verlauf am häufigsten vertreten war.

4.8 Biologische Bedeutung chromosomaler Aberrationen

DLBCL weisen in der Regel komplexe Karyotypalterationen auf (Lossos et al. 2005). Rekurrente chromosomale Translokationen können insbesondere unter Einbeziehung der Bande 14q32 im Bereich des Schwerekettenlocus gefunden werden. Der häufigste Translokationspartner ist das *BCL2*-Gen in etwa 10-20% *de novo* entstandener DLBCL. Weitere häufige Rearrangements betreffen *BCL6* in der Bande 3q27 in etwa 20-35% der Tumoren (Katzenberger et al. 2004). Chromosomale Imbalancen, also rekurrente Zugewinne oder Verluste genetischen Materials, betreffen beim DLBCL insbesondere die Regionen X, 1q, 3, 7, 11, 12, 18 und 21 (Zugewinne), und 1p, 6q, 8p, 9p, 13q, 17p und Y (Verluste) (Beà 2005 und vorliegende Arbeit).

In der Arbeit von Alizadeh et al. (2000) stellte sich heraus, dass der Protein-Expressionslevel von DLBCL nicht in jedem Fall mit zytogenetischen Aberrationen korreliert. Auch die Arbeitsgruppe von Beà et al. (2005) fanden, dass chromosomale Aberrationen auch einen ähnlich starken Einfluss auf die Expression von Genen haben können, die *nicht* in der betreffenden Region kodiert werden – ein biologisches Phänomen, das als Transaktivierung bezeichnet wird. Somit liegt der Verdacht nahe, dass erhöht gemessene m-RNA-Werte auch auf anderem Wege als zum Beispiel durch Immunglobulin-

Translokationen zustande kommen können und dass nicht der Nachweis einer Translokation oder sekundärer Aberrationen allein ausreichend ist, um einen Fall in eine bestimmte Subgruppe einordnen zu können. Dies könnte ein möglicher Grund sein für die uneinheitlichen Ergebnisse bei den Versuchen, den klinischen Verlauf postulierter Subgruppen mit chromosomalen Aberrationen in Verbindung zu bringen.

Eine mögliche prognostische Bedeutung einer Überrepräsentation von Material auf Chromosom 3 wird bei der Betrachtung des Rearrangements des BCL6-Gens deutlich, das in 3q27 lokalisiert ist. Lossos et al. (2001) fanden, dass die Stärke der BCL6-Genexpression bei DLBCL mit der Überlebensrate korreliert und dass die Hinzunahme des International Prognostic Index keine zusätzliche Information zur Risikostratifizierung brachte. Auch die Expression von BCL-2, lokalisiert in 18q21, wird, allerdings kontrovers, in bisherigen Studien (Barrans et al. 2001; Iqbal et al. 2006) von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen mit der Prognose in Verbindung gebracht. In einer multivariaten Analyse konnten Barrans et al. (2001) zeigen, dass die BCL-2-Expression, ein Rearrangement von 3q27, und der non-GC-Phänotyp mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Bei Iqbal et al. (2006) wird deutlich, dass eine erhöhte BCL-2-Expression sowohl aus einer t(14;18), die mit dem GC-Phänotyp assoziiert ist, als auch durch Zugewinne von 18q21 (bei non-GC-DLBCL häufiger) zustande kommen kann. Letztere Studie zeigt somit, dass mit der alleinigen Bruchpunkt-Analyse nur schwer Aussagen über die Prognose eines DLBCL zu gewinnen sind.

5. Zusammenfassung

Diffuse großzellige B-Zell Lymphome stellen weltweit die größte Gruppe maligner B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome dar und umfassen eine biologisch, genetisch und klinisch heterogene Gruppe lymphoider Tumoren, die als Hauptmerkmal große transformierte B-Lymphozyten mit vesikulären Kernen und prominenten Nukleoli aufweisen. Nur ungefähr 40% der Patienten zeigen ein Ansprechen auf eine konventionelle Chemotherapie. Um von einer präziseren Prognose profitieren zu können, ist eine reproduzierbare Klassifizierung dieser „inhomogenen Entität“ nicht nur für die Betroffenen wünschenswert. Dadurch könnten Krankheitsverläufe genauer vorhergesagt und die Therapie optimiert werden.

Die maligne Transformation ist ein Geschehen, das durch das schrittweise Auftreten unterschiedlicher Aberrationen gekennzeichnet ist. Während akute Leukämien häufig mit einer Translokation assoziiert sind, zeigt sich bei B-Zell-Lymphomen ein weitaus komplexeres Bild an zytogenetischen Aberrationen. Diese werden einerseits mit der Etablierung des malignen Phänotyps, andererseits mit der Tumorprogression und der klonalen Evolution eines Tumors in Verbindung gebracht. Obwohl die meisten Neoplasien rekurrente und Tumorspezifische klonale chromosomale Aberrationen aufweisen, ist es noch nicht gelungen, durch Etablieren genetischer „Marker“ eine zuverlässige Aussage über Verlauf und Ansprechen und damit über die Prognose dieser Erkrankung zu machen. Solche Aussagen sind bis dato nur auf Basis allgemeiner klinischer Parameter wie dem Allgemeinzustand der Patienten und der Höhe der Lactat-Dehydrogenase (LDH) im Serum gesichert möglich, die neben anderen Parametern im „International Prognostic Index“ zusammengefasst sind. Die Ursache hierfür ist in erster Linie in der bislang nur unzureichend verstandenen, molekularen Heterogenität der Tumoren zu suchen, die für das Ansprechen bzw. Nichtansprechen auf eine bestimmte Therapie mit verantwortlich ist. Zytogenetische, molekulargenetische und in den letzten Jahren auch Hochdurchsatz-Untersuchungen, wie z.B. die Mikroarray-Technologie, haben

bereits zu einem besseren Verständnis dieser molekularen Unterschiede geführt. Die WHO-Klassifikation stellt im Hinblick auf die Definition ‚biologischer‘ Tumorgruppen einen deutlichen Fortschritt dar.

Diese neueren Untersuchungen zeigen auf der Basis des Genexpressionsprofils von diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen die mögliche Unterteilbarkeit dieser diagnostischen Kategorie anhand zweier unterschiedlicher Phänotypen: GC-DLBCL zeigen eine molekulare Signatur, die vergleichbar mit normalen Keimzentrumzellen ist. Die andere Gruppe (ABC-DLBCL bzw. non-GC-DLBCL) entsteht aus Zellen, die die Keimzentrumsreaktion bereits durchlaufen haben. GC- und ABC-DLBCL-Patienten weisen bei einer Anthracyclin-haltigen Chemotherapie (z. B. CHOP) in retrospektiven klinischen Studien einen deutlichen Unterschied in der 5-Jahres-Überlebensrate auf (etwa 60% für GC-DLBCL und 35% für ABC-DLBCL). Somit scheint die Annahme, dass mindestens zwei Entitäten vorliegen, gerechtfertigt: Eine Beobachtung, die lange durch zytogenetische Analysen allein nicht bestätigt werden konnte.

In der vorliegenden Studie konnten das zytogenetische Aberrationsspektrum mittels eines Algorithmus anhand des Genexpressionsprofils mit zwei verschiedenen Subgruppen – den GC-DLBCL und den non-GC-DLBCL - korreliert werden. Es entstand die bisher umfangreichste zytogenetische Charakterisierung dieser postulierten Phänotypen. Es konnte gezeigt werden, dass GC-DLBCL, die durch die Translokation t(14;18) charakterisiert sind, häufiger Zugewinne bei Chromosom 7 aufweisen, während non-GC-DLBCL mit dem Vorliegen einer Trisomie 3 und Zugewinnen bei 3p und 3q assoziiert sind - Ergebnisse, die mit der CGH-Analyse von Beà et al. (2005) im Einklang stehen.

Zwei Modelle könnten eine Erklärung für die Assoziation genomischer Instabilitäten mit den unterschiedlichen Genexpressionsprofilen sein. Einerseits könnte eine gewisse Region für die Kodierung eines Schlüsselregulatorgenes verantwortlich sein, welches die Zellbiologie und damit die Genexpression verändert. Andererseits könnten die Subgruppen der DLBCL auf verschiedenem

Wege entstehen und somit unterschiedliche Ereignisse für die verschiedenen Aberrationen verantwortlich sein.

Es gilt nun, einerseits diese Mechanismen, die zu einer veränderten Genexpression beitragen, aufzudecken und andererseits ein diagnostisches Vorgehen zu etablieren, bei dem beispielsweise nach dem erfolgten Nachweis von Index-Aberrationen eine bestimmte molekulare Signatur überprüft wird.

Wie fast alle der bereits definierte Lymphomentitäten verhalten sich allerdings auch die beiden durch den hier angewandten Algorithmus definierten Phänotypen aus klinischer Sicht heterogen. Es ist daher anzunehmen, dass molekulare Analysen in absehbarer Zeit vermehrt Einzug in den klinischen Alltag halten und therapeutische Entscheidungen mit beeinflussen werden. In Zukunft wird anhand der Expression von Schlüsselgenen die Zuordnung eines Falles in diagnostische Untergruppen erfolgen. Außerdem könnte durch Peptidblockade dieser Schlüsselgene eine zusätzliche Therapieoption bestehen – eine Vermutung, die weitere Studien erforderlich macht.

6. Anhang

6.1 Chemikalien und Lösungen für Zellkultur und Zytogenetik

Aqua destillata / bidestillata

Chromosomenmedium RPMI 1640 (Firma Gibco)

Colchizin-Lösung (Firma Sigma)

Essigsäure 100% (Firma Merck)

Ethanol (Firma Merck)

Gentamycin

Giemsa (Firma Merck)

Fetales Kälberserum

Kaliumchlorid (Firma Merck)

Kaliumdihydrogenphosphat KH_2HPO_4 (Firma Merck)

Lipopolysaccharid von Escherichia coli (O55:5b) (Firma Sigma),

Konzentration 40 – 100 µg / ml

Methanol (Firma Merck)

Natriumchlorid 0,9% (Firma Merck)

Natriumhydrogencarbonat (Firma Merck)

Natriumhydrogenphosphat (Firma Merck)

Pertex Schnelleindeckmittel (Firma Medite Medizintechnik)

Phytohämagglutinin (Firma Sigma), im Verhältnis zu destilliertem Wasser 1:67

Pokeweed mitogen = PWM (Firma Gibco), im Verhältnis zu destilliertem Wasser
1:400

12-0-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat = TPA (Firma Sigma)

Trypsin (Firma Seva Feinbiochemica)

6.2 Ansätze für Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Colchizin-Lösung

Stocklösung: 1 mg Colchizin auf 1 ml Aqua bidestillata

Arbeitsverdünnung: 0,1 mg/ml Aqua bidestillata

Fixier-Lösung

1 Teil 100% Essigsäure und 3 Teile 100% Methanol, gekühlt bei -20°C

Hypotone KCl-Lösung 0,75 M

5,592 g KCl ad 1000 ml Aqua bidestillata

Kulturmedium RPMI 1640

RPMI 1640 Trockensubstanz, 900 ml Aqua bidestillata und 2 g/l Natriumhydrogencarbonat; nach Zugabe von 100 ml inaktiviertem fetalem Kälberserum erfolgt eine Filtration mit dem Sterilfilter; kurz vor dem Gebrauch wird noch Gentamicin zugegeben.

Sörensen-Puffer

1,80 g Kaliumhydrogenphosphat und 2,07 g Natriumhydrogen-phosphat ad 1000 ml Aqua bidestillata

Trypsinlösung

400 mg Trypsin in 80 ml 0,9% Natriumchlorid-Lösung

7. Literaturverzeichnis

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000 Feb 3;403(6769):503-11.

Armitage JO, Sanger WG, Weisenburger DD, Harrington DS, Linder J, Bierman PJ, Vose JM, Purtilo DT: Correlation of secondary cytogenetic abnormalities with histologic appearance in non-Hodgkin's lymphomas bearing t(14;18)(q32;q21). *J Natl Cancer Inst* 1988 Jun 15;80(8):576-80.

Baris D, Zahm SH: Epidemiology of Lymphomas. *Curr Opin Oncol* 2000 Sep; 12 (5): 383-94.

Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS: Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2002 May;117(2):322-32.

Barth TF, Dohner H, Werner CA, Stilgenbauer S, Schlotter M, Pawlita M, Lichter P, Moller P, Bentz M: Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. *Blood* 1998 Jun 1;91(11):4321-30.

Bastard C, Tilly H, Lenormand B, Bigorgne C, Boulet D, Kunlin A, Monconduit M, Piguet H: Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1992 May 15; 79(10): 2527-31.

Baurmann H, Cherif D, Berger R: Interphase cytogenetics by fluorescence in situ hybridisation (FISH) for characterization of monosomy-7-associated myeloid disorders. *Leukemia* 1993; 7: 384-391.

Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A, Salaverria I, Puig X, Pinyol M, Rives S, Montserrat E, Campo E. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 2004 Sep 1;22(17):3498-506.

Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Puig X, Yang L, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Grogan TM, Brazier R, Fisher RI, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Simon R, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Campo E, Rosenwald A; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project: Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 2005 Nov 1;106(9):3183-90. Epub 2005 Jul 26.

Bentz M, Huck K, du Manoir S, Joos S, Werner CA, Fischer K, Döhner H, Lichter P: Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 1995 Jun 15; 85(12): 3610-8.

Bentz M, Stilgenbauer S, Lichter P, Dohner H: Interphase FISH in chronic lymphoproliferative disorders and comparative genomic hybridization in the study of lymphomas. *Haematologica* 1999 Jun; 84 Suppl EHA-4: 102-106.

Cartwright R, Brincker H, Carli PM, Clayden D, Coebergh JW, Jack A, McNally R, Morgan G, de Sanjose S, Tumino R, Vornanen M. The rise in incidence of lymphomas in Europe 1985-1992. *Eur J Cancer*. 1999 Apr;35(4):627-33.

Cigudosa JC, Parsa NZ, Louie DC, Filippa DA, Jhanwar SC, Johansson B, Mitelman F, Chaganti RS: Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1999 Jun;25(2):123-33.

Coiffier B: Diffuse large cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2001; 13:325-34.

Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, Colomer D, Falini B, Montserrat E, Campo E: Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003 Jan 1;101(1):78-84. Epub 2002 Aug 8.

Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM: Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 Dec; 79(24): 7824-7.

Dave BJ, Nelson M, Pickering DL, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Sanger WG: Cytogenetic characterization of diffuse large cell lymphoma using multi-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2002 Jan 15;132(2):125-32.

Diebold J, Anderson JR, Armitage JO, Connors JM, Maclennan KA, Muller-Hermelink HK, athwani BN, Ullrich F, Weisenburger DD. Diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic analysis of 444 cases classified according to the updated Kiel classification. *Leuk Lymphoma*. 2002 Jan; 43(1):97-104.

Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M, Pittaluga S, Wlodarska I, Michaux L, Van den Berghe H, Hagemeijer A: pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 1997 May; 11 (5): 747-58.

Gall JG, Pardue ML: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecule in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 64:600-604.

Gatter KC und Warnke RA: Diffuse large B-cell lymphoma, in Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Hrsg.): World Health Organization classification of tumors: Pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press (Lyon, Frankreich) 2001: 171-174.

Gray JW, Pinkel D, Brown JM: Fluorescence in situ hybridization in cancer and radiation biology. Radiation Research 1994; 137: 275-289.

Groves FD, Linet MS, Travis LB, Devesi SS. Cancer Surveillance Series: Non-Hodgkin's Lymphoma Incidence by Histologic Subtype in the United States From 1978 Through 1995. JNCI 2000; 92: 1240-1251.

Hans CP, Weisenburger DD, Vose JM, Hock LM, Lynch JC, Aoun P, Greiner TC, Chan WC, Bociek RG, Bierman PJ, Armitage JO. A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. Blood. 2003 Mar 15;101(6):2363-7. Epub 2002 Nov 7.

Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Muller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC: Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood 2004 Jan 1;103(1):275-82. Epub 2003 Sep 22.

Harris NL et al: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international Lymphoma Study Group. Blood 1994; 84: 1361-1392.

Harris NL et al: Lymphoma-classification – from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO-classification of lymphoid neoplasms. Ann Oncol 2000: Suppl 1: 3-10.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting – Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17:3835 –3849.

Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L, Chan WC. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program* 2001: 194-220.

Heim S, Mitelman F: *Cancer Cytogenetics*, 2nd edition. John Wiley & Sons; New York (1995): 266-299.

Henderson AS, Warburton D, Atwood KC: Location of rDNA in the human chromosome complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 3394-3398.

Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 1990 Nov 22;348(6299):334-6.

Hodgkin T: On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Medico-Chirurgical Transactions (London)* 1832; 17:68-114.

Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes Cancer*. 2001 Apr;30(4):375-82.

Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer M, Jong PJ de: A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nature Gen* 1994; 6: 84-89.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds). *World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphatic Tissue*. IARC Press (Lyon) 2001.

Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, Lynch J, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Campo E, Ott G, Muller-Hermelink HK, Delabie J, Jaffe ES, Grogan TM, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Staudt LM, Chan WC: BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 20;24(6):961-8. Epub 2006 Jan 17.

Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Müller-Hermelink HK: World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am J Clin Pathol* 1999; 111(1 Suppl 1): 8-12.

Johansson B et al: Cytogenetic evolution patterns in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1995; 86: 3905-3914.

John H, Birnstiel M, Jones K: RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature* 1969; 223: 582-587.

Katzenberger T, Lohr A, Ott MM, Kalla J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G. Genetic and biological features define two types of follicular non-Hodgkin grade 3 lymphoma. Article in German. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000;84:153-61.

Katzenberger T, Lohr A, Schwarz S, Dreyling M, Schoof J, Nickenig C, Stilgenbauer S, Kalla J, Ott MM, Muller-Hermelink HK, Ott G. Genetic analysis of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphomas suggests an origin from a somatically mutated CD5+ progenitor B cell. *Blood* 2003 Jan 15;101(2):699-702. Epub 2002 Aug 29.

Katzenberger T, Ott G, Klein T: Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *Am J Pathol* 2004; 165:481-90

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (Hrsg.): Robbins's Basic Pathology. Verlag Saunders (Philadelphia) 2003; 7. Auflage

van Krieken JH, Raffeld M, Raghoebar S: Molecular genetics of gastrointestinal non-Hodgkin's lymphomas: unusual prevalence and pattern of c-myc rearrangements in aggressive lymphomas. *Blood* 76:797-800, 1990.

Langer PR, Waldrop AA, Ward DC: Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6633-6637.

Lennert K. Non-Hodgkin's lymphomas: principles and application of the Kiel classification. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 1992;76:1-13.

Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC: Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 1988; 80(3): 224-34.

Lopez-Guillermo A, Colomo L, Jimenez M, Bosch F, Villamor N, Arenillas L, Muntanola A, Montoto S, Gine E, Colomer D, Bea S, Campo E, Montserrat E. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 20;23(12):2797-804. Epub 2005 Feb 22.

Lossos IS, Jones CD, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, Zehnder JL, Tibshirani R, Levy R: Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2001 Aug 15;98(4):945-51.

Lossos IS: Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:6351-7.

Mitelman F (ed.): *ISCN – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* S. Karger AG (Basel) 1995.

Möller G: Lymphocyte activation by mitogens. *Transplant rev* 1972; 11: 1-267.

Monni O, Joensuu H, Franssila K, Knuutila S. DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma--comparative genomic hybridization study. *Blood*. 1996 Jun 15;87(12):5269-78.

Morgan G, Vornanen M, Puitinen J, Naukarrinen A, Brincker H, Olsen J et al: Changing trends for the incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Europe. *Ann Oncol* 1997; 8: 49-54.

Offit K, Jhanwar SC, Ladanyi M, Filippa DA, Chaganti RSK: Cytogenetic Analysis of 434 Consecutively Ascertained Specimens of non-Hodgkin's Lymphoma: Correlations Between Recurrent Aberrations, Histology, and Exposure to Cytotoxic Treatment. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1991; 3: 189 – 201.

Offit K, Koduru PR, Hollis R, Filippa D, Jhanwar SC, Clarkson BC, Chaganti RS: 18q21 rearrangement in diffuse large cell lymphoma: incidence and clinical significance. *Br J Haematol* 1989 Jun; 72(2): 178-83.

Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa DA, Rosenbaum A, et al: Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1994 Jul 14; 331(2): 74-80.

Ott G, Katzenberger T, Greiner A, et al: The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-)type. *Cancer Res* 57:3944-8, 1997.

Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rudiger T, Wilhelm M, Kalla J, Rosenwald A, Muller JG, Ott MM, Muller-Hermelink HK: Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 2002 May 15; 99(10): 3806-12.

Ott G: Pathologie des lymphatischen Keimzentrums. Habilitationsschrift, Pathologisches Institut der Universität Würzburg. Würzburg 2000.

Ott G, Rosenwald A: Extranodal diffuse large B-cell lymphoma - an organotypic disease? Pathologie 2007 Jan 9; Epub ahead of print.

Pardue ML, Gall JG: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 1969; 64: 600-604.

Pileri SA, Dirnhofer S, Went Ph, Ascani S, Sabattini E, Marafioti T, Tzankov A, Leoncini L, Falini B & Zinzani P L: Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. Histopathology 2002; 41:482–509.

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltneane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Whysuchashit DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2002 Jun 20;346(25):1937-47.

Rüdiger T, Muller-Hermelink HK. WHO-classification of malignant lymphomas. Radiologe. 2002 Dec;42(12):936-42.

Sandberg A: Methods in Cytogenetics. The Chromosomes in Human Cancer and Leucemia, 2nd edition 1990: 101-119.

Schlegelberger B: Cytogenetics of Malignant Lymphomas. *Verh Dtsch Ges Path* 1992; 76: 60-65.

Schlegelberger B, Zwingers T, Harder L, Nowotny H, Siebert R, Vesely M, Bartels H, Sonnen R, Hopfinger G, Nader A, Ott G, Müller-Hermelink HK: Clinicopathogenetic Significance of Chromosomal Abnormalities in Patients With Blastic Peripheral B-Cell Lymphoma. *Blood* 1999; 94: 3114-3120.

Shaffer LG, Tommerup N: *ISCN 2005 - An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature.* Verlag Karger (Schweiz): Published in collaboration with "Cytogenetic and Genome Research" ; 2005

Shipp MA: Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin-lymphoma: who has "high-risk" disease? *Blood* 1994; 83: 1165-1173.

Siebert R, Rosenwald A, Staudt LM, Morris SW. Molecular features of B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol.* 2001 Sep;13(5):316-24.

Simonitsch-Klupp I, Hauser I, Ott G, Drach J, Ackermann J, Kaufmann J, Weltermann A, Greinix HT, Skrabcs C, Dittrich C, Lutz D, Potter R, Mannhalter C, Lechner K, Chott A, Jaeger U. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic/plasmacytoid features are associated with TP53 deletions and poor clinical outcome. *Leukemia.* 2004 Jan;18(1):146-55.

Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, Ohshima K, Okamoto M, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2005 Sep 1;106(5):1770-7. Epub 2005 May 10. Erratum in: *Blood.* 2006 Apr 15;107(8):3052.

The Non-Hodgkin's-Lymphoma Classification Project (ohne Autorengabe): A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997 Jun 1;89(11):3909-18.

Trask BJ: DNA sequence localization in metaphase and interphase cells by fluorescence in situ hybridization. Review. *Methods Cell Biol*. 1991a; (35):3-35.

Van Dekken H, Krijtenburg PJ, Alers JC: DNA in situ hybridization (interphase cytogenetics) versus comparative genomic hybridisation (CGH) in human cancer: detection of numerical and structural chromosome aberrations. *Acta Histochemica* 2000 Feb; 102 (1): 85-94.

Vitolo U, Gaidano G, Volpe G, Audisio E, Bertini M, Calvi R, Freilone R, Novero D, Orsucci L, Pastore C, Capello D, Parvis G, Sacco C, Zagonel V, Carbone A, Mazza U, Palestro G, Saglio G, Resegotti L. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol*. 1998 Jan;9(1):55-61.

Weber E: *Grundriss der biologischen Statistik*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1964; 5. Auflage: 386f.

Weisenburger DD. Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma: Recent findings regarding an emerging epidemic. *Ann Oncol* 1994; Suppl 1: 19-24.

Willis TG, Dyer MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 2000 Aug 1;96(3):808-22. Review.

Wolfe KQ, Herrington CS: Interphase Cytogenetics and pathology: a tool for diagnosis and research. *J Pathol* 1997; 181: 359-361.

Yamaguchi M, Ohno T, Oka K, Taniguchi M, Ito M, Kita K, Shiku H. De novo CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma: clinical characteristics and therapeutic outcome. *Br J Haematol.* 1999 Jun;105(4):1133-9.

Yan J, Zhang XX, Fetni R, Drouin R: Trisomy 8 and monosomy 7 detected in bone marrow using primed in situ labelling, fluorescence in situ hybridization, and conventional cytogenetic analyses. A study of 54 cases with haematological disorders. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2001; 125: 30-40.

Ye BH, Rao PH, Chaganti RSK, Dalla-Favera L: Cloning of BCL-6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-Cell lymphoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2732-2735.

Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M: Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med.* 1987 Jan 8;316(2):79-84.

Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G: Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976 Jan 15; 17(1): 47-56.

Zeeb H, Blettner M: Steigende Inzidenz und Mortalität der Non-Hodgkin-Lymphome. *Med Klin* 2001; 96: 87-100.

Zhang Y, Matthiesen P, Harder S, Siebert R, Castoldi G, Calasanz MJ, Wong KF, Rosenwald A, Ott G, Atkin NB, Schlegelberger B: A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2000 Jan; 27(1):52-8.

DANK

Herrn Professor Dr. H.-K. Müller-Hermelink danke ich für die großzügig gewährte Möglichkeit, die vorliegende Dissertation am Pathologischen Institut der Universität Würzburg anfertigen zu können.

Mein Dank gilt besonders Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Ott für die Überlassung des Themas und für seine stetige Diskussionsbereitschaft – ebenso den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. H. Höhn für die Übernahme des Korreferates.

Frau A. Trumpfheller danke ich für die Unterstützung beim Erlernen der praktischen Labortätigkeit.

Frau I. Eichelbrönner und Frau H. Brückner danke ich für ihren Einsatz und ihre Hilfe.

Auch meiner Mutter sowie meinen Verwandten und Freunden möchte ich hier nochmals für die Unterstützung während meiner Studienzeit und Promotionsarbeit ganz herzlich danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Philipp Anton Singler
Geburtsdatum: 15. März 1975
Geburtsort: München
Mutter: Helene Singler, geb. Karl, Oberstudienrätin
Vater: Dr. rer. nat. Anton Singler, Physiker
Konfession: katholisch
Familienstand: ledig

Schulbildung

09 / 1981 - 07 / 1985 Hans-Kammerer Grundschule Burghausen / Salzach
09 / 1985 - 07 / 1994 Aventinus-Gymnasium Burghausen; Abitur 07 / 1994

Zivildienst

01 / 1995 – 02 / 1996 Rettungsdiensthelfer beim Bayerischen Roten Kreuz

Hochschulausbildung

05 / 1996 – 04 / 1998 Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
05 / 1998 – 03 / 2002 Klinisches Studium an der Universität Würzburg
05 / 2003 Ärztliche Prüfung; Abschluss des Studiums

Promotion

seit Mai 1999 am Pathologischen Institut der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med H.-K. Müller-Hermelink

Berufliche Tätigkeiten

11 / 2003 – 10 / 2004 Arzt im Praktikum in der pädiatrischen Abteilung
des St.-Josef - Krankenhauses in Zell / Mosel
seit 09 / 2005 Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin,
Kreisklinik Burghausen

Burghausen im April 2007

Philipp Singler