

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

**Charakterisierung genetischer Aberrationen
in Follikulären Lymphomen Grad 3B
durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Christopher Michael Schmelter
aus Ingolstadt

Würzburg, Februar 2011

Eingereicht am:

10. Februar 2011

Referent:

Prof. Dr. med. German Ott

Korreferent:

Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Dekan der Medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

30. Juni 2011

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die untersuchten malignen Neoplasien	1
1.1.1	Die malignen Lymphome	1
1.1.2	Die B-Zell-Lymphome	3
1.1.3	Das Follikuläre Lymphom (FL)	5
1.1.3.1	Epidemiologie	5
1.1.3.2	Klinik und Prognose	5
1.1.3.3	Histologie und Grading	7
1.1.3.4	Immunphänotyp	9
1.1.3.5	Zytogenetik	10
1.1.3.6	Therapie	12
1.1.4	Das Diffuse Großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL)	13
1.1.5	Das Lymphom des Mukosa-assoziierten Gewebes (MALT-Lymphom)	14
1.2	Die untersuchten genetischen Veränderungen	15
1.2.1	Die BCL2 18q21 Aberration	15
1.2.2	Die BCL6 3q27 Aberration	17
1.2.3	Die MYC 8q24 Aberration	19
1.2.4	Die IGH 14q32 Aberration	21
1.3	Die Zielsetzung der Arbeit	23
2.	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Untersuchungsmaterial	25
2.1.2	Sonden	27
2.1.3	Sonden-Lösungen	27
2.1.4	Immunhistochemische Färbungen	28
2.1.5	Chemikalien und Lösungen	29
2.1.6	Puffer	30
2.1.7	Laborgeräte	31

2.2	Methoden	32
2.2.1	Lichtmikroskopische Auswahl der Fälle nach Histologie und Morphologie	34
2.2.2	Anfertigung der Gewebeschnitte	37
2.2.3	Tissue Microarray (TMA)	37
2.2.4	Immunhistochemie	40
2.2.5	Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Fälle	40
2.2.6	Konventionelle Zytogenetik	41
2.2.7	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	41
2.2.8	Auswertung der Fluoreszenz hybridisierten Fälle	43
3.	Ergebnisse	47
3.1	Schwellenwerte (cut-off-Werte)	47
3.2	Vergleich von FISH und konventioneller Zytogenetik	49
3.2.1	BCL2	49
3.2.2	BCL6	52
3.2.3	MYC	55
3.2.4	IGH	58
3.2.5	Überblick	62
3.3	Zytogenetische Charakterisierung der Follikulären Lymphome Grad 3B (FL 3B)	67
3.3.1	Diagnosestellung	67
3.3.2	FISH - BCL2, BCL6, MYC und IGH	69
3.3.3	Immunhistochemie - BCL2, BCL6, CD5, CD10, CD20, IRF4/MUM1, TCL1, Ki67, p53, kappa (κ) und lambda (λ)	75
3.3.4	Überblick	86

4.	Diskussion	87
4.1	Schwellenwerte (cut-off-Werte)	87
4.2	Vergleich von FISH und konventioneller Zytogenetik	88
4.3	Zytogenetische Charakterisierung der Follikulären Lymphome Grad 3B (FL 3B)	94
5.	Zusammenfassung	115
	Literaturverzeichnis	118
	Publikationen	
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Ehrenwörtliche Erklärung	

1. Einleitung

1.1 Die untersuchten malignen Neoplasien

1.1.1 Die malignen Lymphome

Der Begriff „Lymphom“ beschreibt im ursprünglichen Sinne jede Vergrößerung von Lymphknoten oder die Vermehrung von Lymphknotengewebe. Enger gefasst wird diese Bezeichnung auf alle primären Tumoren des lymphatischen Systems angewendet¹.

Diese Neoplasien sind klonale Tumoren der B- und T-Zell-Linie oder der Zell-Linie der Natürlichen Killer (NK)-Zellen, und können von reifen und unreifen Ursprungszellen jeglichem Differenzierungsgrades ausgehen².

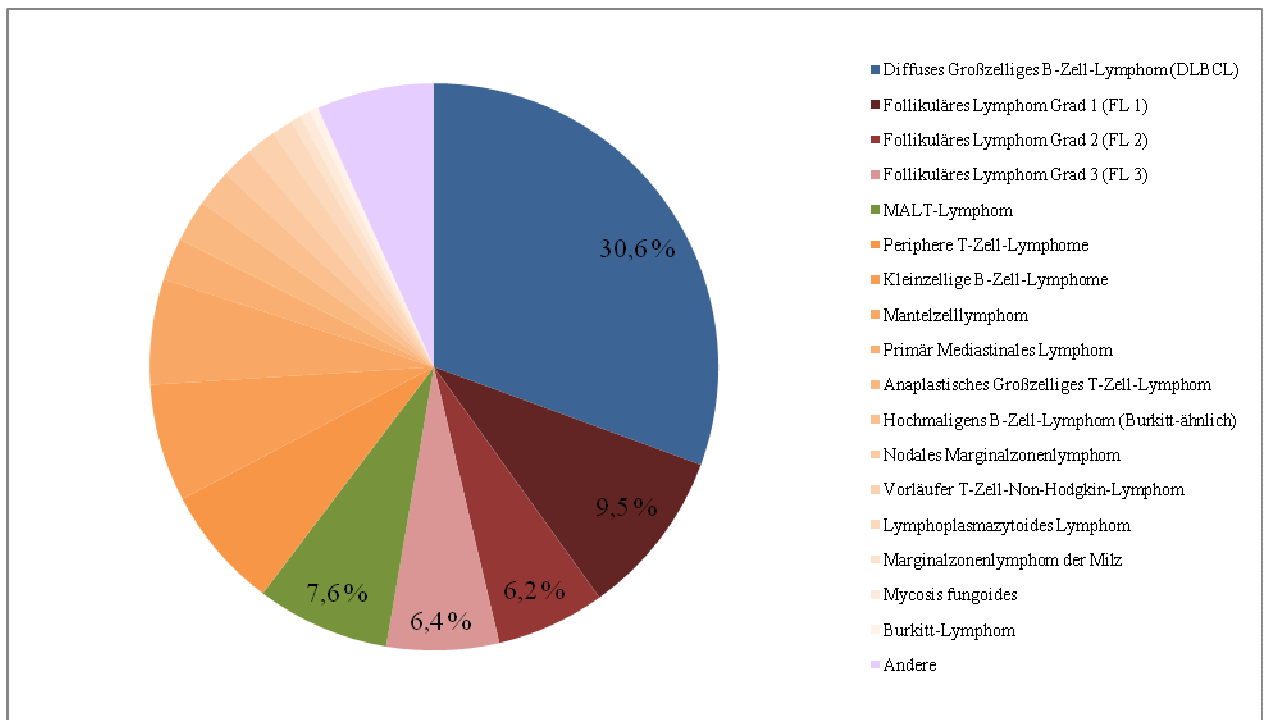
Maligne Lymphome können in Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und das klassische Hodgkin-Lymphom (Classical Hodgkin Lymphoma, CHL) eingeteilt werden¹.

Die aktuelle WHO-Klassifikation für Tumoren der Hämatopoetischen und Lymphatischen Gewebe (WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues) basiert auf den bisher verwendeten Kiel- und Revised European-American Lymphoma (REAL)-Klassifikationen zur Einteilung der Lymphome, und hat diese abgelöst³.

Eine durch die Kiel-Klassifikation vorgegebene Einteilung der NHL in low und high grade-Tumoren findet allerdings nach wie vor ihre (klinische) Anwendung^{4,5}.

Bei 100.000 Menschen entstehen jährlich 33,7 neue lymphatische Neoplasien. Die Inzidenz liegt dabei mit 26,1 für B-Zell-Tumoren am höchsten, für klassische Hodgkin-Lymphome bei 2,7 und bei T-Zell-Neoplasien mit 1,8 am niedrigsten. Hierbei machen die B-Zell-NHL des Diffusen Großzelligen B-Zell-Lymphoms (Diffuse Large B-Cell-Lymphoma, DLBCL) und des Follikulären Lymphoms (FL) mit 60 % den Großteil der Lymphome aus² (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1: Relative Häufigkeit der Non-Hodgkin-Lymphome



nach ¹¹: *The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project "A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma", Blood 89, 3909-3918 (1997).*

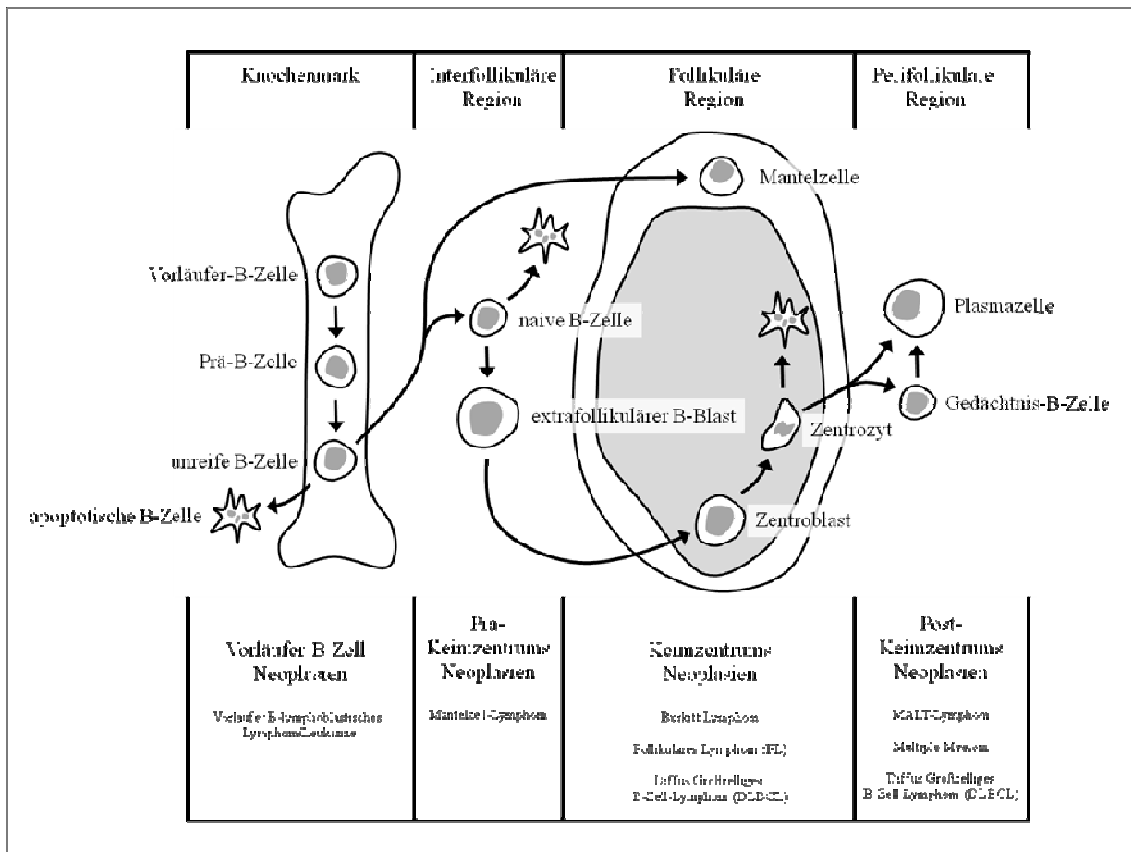
Die Inzidenz der Lymphome ist in den letzten Jahren stetig angewachsen. Weltweit treten jedes Jahr etwa 280.000 Fälle auf. Risikofaktoren für eine Erkrankung sind vor allem Erkrankungen des Immunsystems, entweder durch eine Immunschwäche einerseits, oder durch Autoimmunerkrankungen andererseits verursacht².

1.1.2 Die B-Zell-Lymphome

Die normale Differenzierung der B-Lymphozyten-Linie von der Stammzelle zur Plasmazelle findet nacheinander in der fetalen Leber, dem Knochenmark und schließlich im Lymphknoten statt⁴.

B-Zell-Lymphome werden normalerweise in Vorläufer-B-Zell-Lymphome, die aus unreifen lymphatischen Zellen des Knochenmarks bestehen, und reife B-Zell-Lymphome, die aus reifen Funktionszellen im Lymphknoten, der Milz oder dem peripheren Blut bestehen, eingeteilt³ (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2: B-Zell-Differenzierung und Herkunft ausgewählter B-Zell-Neoplasien



nach²: Swerdlow et al. "WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues" IARC, Lyon, 159 (2008).

Genetische Aberrationen, die zum Beispiel zu einer Deregulierung der Apoptose-Mechanismen führen, sind unter anderem für die Ausbildung von B-Zell-Lymphomen verantwortlich. Des Weiteren scheinen Umwelttoxine und infektiöse Agenzien Risikofaktoren für die Entstehung eines B-Zell-Tumors darzustellen. So können Herbizide und Pestizide an der Entwicklung eines DLBCL oder FL beteiligt sein².

Neoplasien reifer B-Zellen machen mehr als 75 bis 90 % aller malignen lymphatischen Tumoren und 4 % aller Krebsneuerkrankungen weltweit aus. In hoch entwickelten Regionen wie Nordamerika, Australien und Westeuropa scheinen diese Tumoren häufiger aufzutreten^{2,4}.

Die Frequenz von bestimmten B-Zell-Lymphomen differiert allerdings stark in verschiedenen Ländern weltweit und zwischen Menschen verschiedener ethnischer Herkunft. Dennoch sind weltweit das DLBCL mit 37 % und das FL mit 29 % der Fälle die häufigsten Lymphomvarianten der B-Zell-Reihe².

Der Altersmedian für eine Erkrankung an einer reifen B-Zell-Neoplasie liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Eine nennenswerte Häufigkeit von reifen B-Zell-Lymphomen im Kindesalter kommt nur bei Burkitt-Lymphomen und DLBCL vor².

Die meisten Tumoren der B-Zell-Reihe treffen eher das männliche Geschlecht (männlich : weiblich = 53 % : 46 %)².

Durch die Kombination morphologischer Charakteristika mit dem Antikörper-Profil des Tumors kann eine Einteilung und Klassifikation des Lymphoms vorgenommen werden. Diese genaue Tumorklassifikation ist für die Erstellung einer Prognose und für das Festlegen einer Therapie von herausragender Bedeutung⁴.

Die B-Zell-Herkunft der Tumorzellen kann durch Immunfärbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen Pan-B-Zell-Marker, wie CD19, CD20, CD22 oder CD79a (Cluster of Differentiation) festgestellt werden⁴.

1.1.3 Das Follikuläre Lymphom (FL)

1.1.3.1 Epidemiologie

Das FL stellt in der westlichen Welt mit einer Inzidenz von 2 auf 100.000 das zweithäufigste B-Zell-Lymphom nach dem DLBCL und das häufigste indolente, also „niedrig maligne“ Lymphom dar⁶.

Während die Inzidenz in Osteuropa, Asien und den Entwicklungsländern eher gering ist, finden sich in Nordamerika und Westeuropa deutlich höhere Neuerkrankungszahlen^{2,7}.

Im Gegensatz zu den meisten anderen B-Zell-Lymphomen tritt die Erkrankung bei Frauen im Vergleich zu Männern häufiger auf (männlich : weiblich = 1,0 : 1,6)^{2,7}.

Das FL tritt selten bei jungen Patienten unter 20 Jahren auf. Der Altersmedian liegt in der sechsten Lebensdekade, bei etwa 59 Jahren^{2,4,7}.

Das pädiatrische FL macht nur etwa 1 % aller kindlichen Tumoren aus, allerdings wird diskutiert, ob es sich hierbei um eine eigene Entität im Vergleich zum adulten FL handeln könnte^{6,7}.

1.1.3.2 Klinik und Prognose

Das FL tritt vor allem in den Lymphknoten, insbesondere zervikal und inguinal, aber auch in der Milz, im Knochenmark oder im peripheren Blut auf. Gelegentlich kann eine weit fortgeschrittene Erkrankung auch extranodale Gewebe, wie den Gastrointestinal-Trakt (GIT) oder Weichteilgewebe miteinbeziehen^{1,2}.

Das FL kann außerdem auch primär von extranodalen Geweben, wie der Haut, dem GIT, dem Hoden oder der Mamma ausgehen^{1,2}.

Die wenigsten Lymphome können bereits zu einem frühen Zeitpunkt diagnostiziert werden, zumal die Patienten selbst mit weit fortgeschrittener Erkrankung noch ohne Symptome sein können².

Die Erkrankung tritt häufig mit einer weit fortgeschrittenen generalisierten charakteristischerweise schmerzfreien Lymphadenopathie und Splenomegalie auf. Das Knochenmark ist bereits in 40 bis 70 % der Fälle befallen. Im peripheren Blut zirkulierende maligne Zellen finden sich bei etwa 10 % der Patienten. Weitere CT-Untersuchungen zeigen häufig intrathorakale und intraabdominale Erkrankungsherde auf^{2,6} (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: *Klinische Eigenschaften des Follikulären Lymphom (FL)*

Geschlecht	männlich : weiblich	51 : 49
Alter	< 60 : ≥ 60 Jahre	63 : 37
Stadium nach Ann-Arbor	I + II : III + IV	22 : 78
B-Symptomatik	nicht vorhanden : vorhanden	81 : 19
Anzahl betroffener Lymphknoten	< 4 : ≥ 4	65 : 35
Milzbeteiligung	nicht vorhanden : vorhanden	78 : 22
Knochenmarkbeteiligung	nicht vorhanden : vorhanden	52 : 48
Histologie	kleine Zellen : gemischtes Zellmuster : große Zellen	50 : 41 : 9

nach ⁶: *Canellos, Lister, Young "The Lymphomas" Elsevier Inc., Philadelphia, 350 (2006).*

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist sehr variabel. Das mediane Überleben liegt zwar bei etwa neun Jahren, aber einige Patienten leben mehr als 15 Jahre nach Diagnose noch, während andere bereits innerhalb der ersten fünf Jahre versterben⁶.

Ein FL kann in 25 bis 60 % der Fälle in ein hoch malignes DLBCL übergehen, und diese Transformation hat eine deutliche Verschlechterung der Prognose zur Folge⁶.

Das FL gehört zu den wenigen Tumoren bei denen sehr selten eine spontane Tumorregression beobachtet worden ist. Dieses Phänomen scheint auf eine Anti-Tumor-Immunreaktion der Patienten zurückzugehen⁶.

1.1.3.3 Histologie und Grading

Das FL ist durch seine Keimzell-Herkunft, seine niedrige Proliferationsrate und das follikuläre Wachstumsmuster bestimmt^{2,4}.

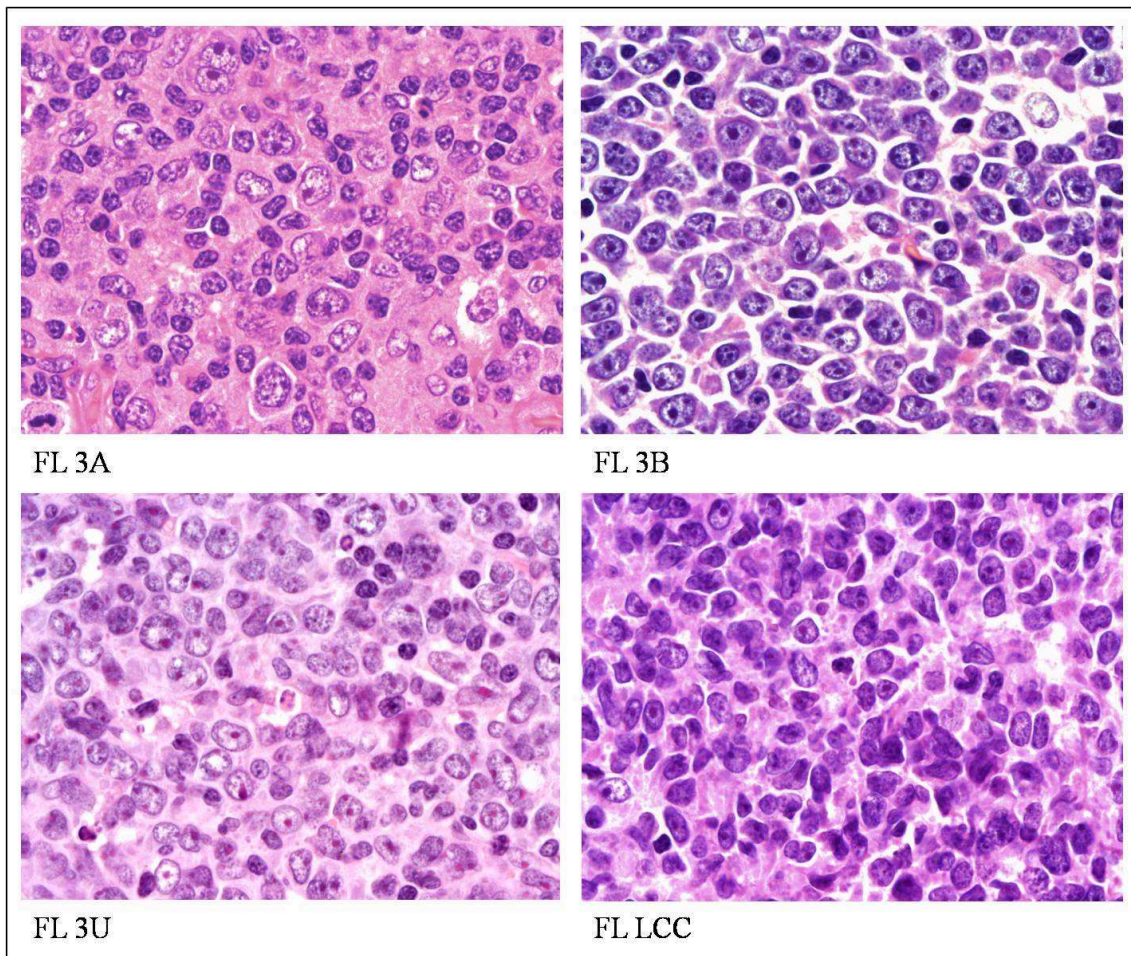
FL bestehen meist sowohl aus Zentroblasten als auch aus Zentrozyten. Normalerweise dominieren in diesen Tumoren die Zentrozyten^{2,4}.

Zentrozyten sind kleine bis mittelgroße Zellen in etwa der Größe eines normalen Lymphozyten mit langgezogenem, abgewinkeltem, verdrehtem oder gespaltenem Zellkern, unauffälligen Nukleoli und wenig hellem Zytoplasma. Zentroblasten sind große Zellen in etwa der zwei- bis dreifachen Größe eines normalen Lymphozyten mit runden oder ovalären, mitunter eingekerbten oder multilobulierten Kernen, vesikulärem Chromatin, ein bis drei peripher liegenden Nukleoli und einem schmalen Randsaum von Zytoplasma. Gelegentlich können FL auch überwiegend aus Zellen mit irregulär geformten Zellkernen bestehen, die wie große Zentrozyten imponieren. Man spricht vom „Large Centrocyte“-Typ (FL LCC)^{2,4}.

Die aktuelle WHO-Klassifikation teilt die FL in verschiedene Unterformen ein, indem diesen ein bestimmter Grad abhängig von der Zahl der Zentroblasten zugewiesen wird. Als indolente FL werden Neoplasien bezeichnet, die bei starker Vergrößerung in 10 Gesichtsfeldern (HPF, high-power-fields) von 0,159 mm² in der Lichtmikroskopie (40x Objektiv und 18 mm Sichtfeld-Okular) eine Zentroblastenzahl von 0 bis 50 bei Grad 1, beziehungsweise 51 bis 150 bei Grad 2 zeigen. Follikuläre Lymphome Grad 3 weisen mehr als 150 Zentroblasten pro 10 HPF auf, und zeigen entweder (wenige) verbleibende Zentrozyten entsprechend dem Grad 3A, oder ein ausschließlich aus Zentroblasten bestehendes Wachstum entsprechend dem Grad 3B².

In manchen Fällen ist die Festlegung zwischen dem Grad 3A und 3B schwierig. Diese Fälle werden als FL 3U (unklassifiziert oder „Grauzone“) bezeichnet. FL mit großen Zentrozyten (FL LCC) werden nur nach dem Gehalt an Blasten gradiert und entsprechen somit meistens einem Grad 1 oder 2 (siehe Abbildung 3).

Abbildung 3: Gradierung der Follikulären Lymphome (FL)



Während Lymphome, die einen hohen Anteil an Zentrozyten aufweisen (FL 1 und FL 2), den indolenten Tumoren zugerechnet werden, sind FL 3B aggressive Neoplasien. Über die Zuordnung des FL 3A besteht bislang noch Unsicherheit².

Das FL wird zusätzlich nach dem Ausmaß des folliculären Wachstumsanteils des Tumors in „follikulär“ (mehr als 75 % folliculäre Anteile), „follikulär und diffus“ (25 bis 75 % folliculäre Anteile), oder überwiegend diffus (weniger als 25 % folliculäre Anteile) eingeteilt².

Die große Mehrheit (80 bis 90 % der Fälle) der FL sind Grad 1 und 2-Lymphome. Follikuläre Lymphome Grad 3B (mit rein folliculärem Wachstumsmuster) sind sehr selten².

Im Verlauf der Erkrankung kann sich das histologische Bild des Tumors ändern. Der Anteil der Zentroblasten kann zunehmen, das folliculäre Muster kann sich auflösen, und der Tumor kann in ein DLBCL transformieren. DLBCL können auch eine FL 3A- oder eine FL 3B-Komponente aufweisen^{2,6}.

1.1.3.4 Immunphänotyp

Das FL zeigt die Expression typischer Pan-B-Zell-Marker, wie CD19, CD20, CD22 oder CD79a. Etwa 60 bis 80 % der FL zeigen eine Positivität für CD10 (auch CALLA, Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen). Selten (< 50 % der Fälle) kann eine Expression von CD23 nachgewiesen werden. Für CD3, CD5, CD11c, CD43, CD103, Cyclin D1 und IRF4/MUM1 sind die Zellen negativ (< 10 % der Fälle)^{2,3,4,7}.

Allerdings gibt es einige wenige Fälle von FL die für CD10 negativ sind, und eine IRF4/MUM1-Positivität aufweisen. Insbesondere bei FL 3A und 3B kann diese Reaktivität für IRF4/MUM1 gefunden werden (< 50% der Fälle)^{2,6,12}.

Das BCL2-Protein wird in Tumoren der Grade 1 und 2 in 85 bis 90 % der Fälle exprimiert, bei FL 3A findet sich nur in 50 % der Fälle eine Positivität. Der Nachweis von BCL2 kann sehr hilfreich für die Unterscheidung eines FL von einer Reaktiven Follikulären Hyperplasie (RFH) sein².

Da FL aus Zentroblasten und -zyten des Keimzentrums hervorgehen, findet sich in diesen Tumoren eine über 90 % Positivität für das BCL6-Protein. In einem Teil der Fälle findet sich neben den konstant nachweisbaren Oberflächen-Immunglobulinen (sIg, surface immunglobulins) auch zytoplasmatisches Immunglobulin (cIg, cytoplasmatic immunglobulin) im Sinne einer sekretorischen Differenzierung. Unter den Oberflächen-Antikörpern findet sich am häufigsten IgM, allerdings können auch IgG-, IgD- und selten IgA-Moleküle auftreten^{2,3,4,6}.

Sowohl in den Follikeln als auch in der Interfollikulär-Zone finden sich B-Zellen, die an ihrer Oberfläche oder ihrem Zytoplasma die Immunglobulin-Leichtketten kappa (κ) oder lambda (λ) ausbilden. Bei der normalen B-Zell-Reifung werden etwa doppelt so viele Zellen mit der kappa (κ)-Leichtkette ausgebildet, als solche, die die lambda (λ)-Leichtkette tragen. Im malignen Prozess ist dieses Verhältnis meist verändert^{3,4}.

Der Proliferationsindex, bestimmt durch den Ki67-Marker, korreliert in den meisten FL sehr gut mit dem zugewiesenen Tumorgrad. Während FL 1 und FL 2 eine Proliferationsfraktion aufweisen, die unter 20 % liegt, zeigen FL 3 eine Proliferationsfraktion von über 20 %. Die niedrige Proliferationsfraktion der low grade-Lymphome ist das Resultat der starken Expression des anti-apoptotischen und Zellzyklus-hemmenden BCL2-Proteins durch die Tumorzellen^{2,3} (siehe Kapitel 1.2.1).

1.1.3.5 Zytogenetik

Die Ätiologie der Erkrankung ist nach wie vor unbekannt, doch haben einige Studien gezeigt, dass eine chromosomale Translokation t(14;18), die zu einer Überexpression des BCL2-Gens führt, einen integralen Bestandteil der Tumorentstehung darstellt⁶.

Durch die Translokation gerät das Proto-Onkogen BCL2 unter den Einfluss des Promoters des Immunglobulin-Schwerketten (IGH)-Gens, was zu einer enorm gesteigerten Expression von BCL2 auf RNA- und Proteinebene führt, wodurch zelluläre Apoptose-Mechanismen gehemmt werden. Statt des IGH-Gens kann in seltenen Fällen auch das Immunglobulin-kappa (κ)-Leichtketten-Gen auf Chromosom 2p12 oder das Immunglobulin-lambda (λ)-Leichtketten-Gen auf Chromosom 22q11 als Translokations-Partner des BCL2-Gens betroffen sein. Etwa 85 bis 90 % aller FL in Europa und Nordamerika weisen diese BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation auf. Deutlich seltener findet sich diese Translokation allerdings bei asiatischen Patienten und beim pädiatrischem FL^{2,4,6,7}.

Während die niedriggradigen FL hohe Prozentsätze für die t(14;18)(q32;q21) Translokation aufweisen, finden sich niedrigere Prozentsätze bei den drittgradigen FL. Die Ursache hierfür liegt in der Heterogenität der FL Grad 3. So zeigt das FL 3A ein ähnlich hohes Auftreten der t(14;18)(q32;q21) Translokation (64 bis 73 %) wie die FL Grad 1 und 2 (85 bis 88 %). Bei dem FL 3B hingegen kann eine derartige genetische Alteration nur in den wenigsten Fällen nachgewiesen werden^{13,14}.

Interessanterweise wird diese Translokation auch in aktiviertem lymphatischem Parenchym und im peripherem Blut bei gesunden Testpersonen gefunden, was darauf schließen lässt, dass diese Veränderung alleine nicht ausreichend für die Genese eines Lymphoms sein kann⁴.

Die BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation ist allerdings nicht die einzige genetische Veränderung im FL. Als ausschließlich einzige genetische Aberration bei FL findet sich die BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation nur in 10 % der Fälle, die aber bei molekularen Untersuchungen noch weitere Aberrationen aufweisen^{4,6}.

Im Durchschnitt finden sich sechs verschiedene zytogenetische Alterationen - zumeist Zugewinne oder Verluste genetischen Materials - im Genom des FL. Die Anzahl der zusätzlichen genetischen Veränderungen steigt mit dem histologischen Grad des Tumors, und scheint ein wichtiger Faktor für die Prognose der Erkrankung zu sein^{2,6,13}.

Häufig können Zugewinne der Chromosomen 1q, 2p, 5/5q, 6p, 7, 8, 12/12q, 17q und X, und Verluste der Chromosomen 1p, 6q, 10q, 13q und 17p beobachtet werden. Die verschiedenen Varianten der zusätzlichen Chromosomenaberrationen unterscheiden sich aber zwischen FL 1 bis 3A und FL 3B. Da die genetischen Alterationen des FL Grad 3B Übereinstimmungen mit den genetischen Veränderungen beim DLBCL zeigen, wird vermutet, dass das FL 3B weniger den Follikulären Lymphomen zuzurechnen ist, als dass es vielmehr eine Variante des DLBCL darstellt^{2,6,8,13}.

Genetische Veränderungen auf Chromosom 3q27, die das BCL6-Gen, einen Regulator der Transkription, betreffen, können in 5 bis 15 % aller FL nachgewiesen werden. Ein 3q27-Bruchpunkt findet sich vor allem bei drittgradigen Lymphomen. Insbesondere bei FL Grad 3B mit einer DLBCL-Komponente (55 bis 58 %), aber auch bei FL 3A (18 %) konnte diese genetische Alteration gezeigt werden. Bemerkenswerterweise konnte ein Bruchpunkt auf Chromosom 3q27 für das FL 3B ohne DLBCL-Anteil nicht gefunden werden (0 %). Insgesamt scheint diese Aberration aber von prognostischer Relevanz zu sein. FL 3B, die eine DLBCL-Komponente aufweisen, zeigen eine höhere BCL6-Rearrangement-Frequenz (55 bis 58 %) wie das DLBCL selbst (21 %)^{2,6,13,14}.

Während eines Transformations-Ereignis kann es in 8 % der Fälle zu einem zusätzlichen Rearrangement des MYC-Onkogens in Chromosom 8q24 kommen^{2,6}.

1.1.3.6 Therapie

Die Prognose der Erkrankung ist sehr stark von der Ausbreitung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose abhängig. Der Überlebensmedian liegt bei etwa neun Jahren, allerdings variiert das tatsächliche Überleben enorm^{2,5,6}.

Da bei den meisten Patienten mit FL zum Diagnosezeitpunkt ein weit fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung vorliegt, kann das FL normalerweise nicht vollständig geheilt werden. Nur in Fällen von lokalisierten Stadien (Stadium I oder II nach Ann-Arbor) ist unter Umständen und prinzipiell eine Heilung möglich⁶.

Abhängig von der Tumorausbreitung bei Erstdiagnose und der Klinik des Patienten gibt es verschiedenste Therapieoptionen⁶.

Bei einigen Patienten mit FL ist zu Beginn der Erkrankung ein kontrolliertes Zuwarten („watchful waiting“) ausreichend, andere erhalten direkt eine Chemotherapie, eine Immuntherapie oder auch eine Kombination aus diesen. Der Großteil der Patienten mit FL wird aufgrund des hohen Disseminationspotentials des Tumors im Laufe der Erkrankung mit einer Kombinationstherapie verschiedener zytotoxischer Chemotherapeutika behandelt werden. Durch Einsatz neuer Technologien in der Herstellung von monoklonalen Antikörpern konnte der gegen CD20 gerichtete Antikörper Rituximab/Mabthera als neue Behandlungsoption für das FL eingeführt werden. Eine Kombination aus Chemotherapie und Rituximab gefolgt von einer myeloablativen Therapie scheint eine mögliche Strategie für eine Behandlung mit kurativer Absicht zu sein⁶.

Eine allogene Knochenmarks-Transplantation kann bei Patienten, die durch andere Therapien keine komplette Remission erreichen konnte, zu einer vollständigen Remission führen. Leider besteht eine hohe Therapie-bedingte Mortalität, aber jene Patienten, die die Knochenmarks-Transplantation überleben, zeigen eine sehr gute Rate von langzeitigem krankheitsfreiem Überleben⁶.

1.1.4 Das Diffuse Großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL)

Das DLBCL stellt mit 30 bis 40 % die häufigste Form des NHL in der westlichen Welt dar. Es handelt sich um einen aggressiven Tumor mit starker Disseminierungstendenz, der aber unter Umständen heilbar ist^{1,2}.

Klinisch zeigen die meisten Patienten eine sich rasch vergrößernde Tumormasse, die meist im Lymphknoten lokalisiert ist, sich aber auch extranodal manifestieren kann^{1,2,6}.

Die Ätiologie des DLBCL ist unbekannt. Es kann de novo (primär) entstehen, oder sich sekundär aus einem niedrig malignen Tumor wie dem FL oder dem MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue)-Lymphom entwickeln^{1,2}.

Als normales Gegenstück der neoplastischen Zellen des DLBCL wird die periphere B-Zelle mit Keimzentrums- oder auch Post-Keimzentrums-Differenzierung postuliert².

Bei DLBCL können unterschiedlichste chromosomale Alterationen auftreten, was zu äußerst komplexen Karyotypen führen kann².

Die häufigsten chromosomalen Aberrationen beim DLBCL sind die BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21), die BCL6/IGH t(3;14)(q27;q32), beziehungsweise deren Varianten und die MYC/IGH t(8;14)(q24;q32) und deren Varianten^{1,15}.

Die t(14;18)(q32;q21) findet sich in etwa 20 bis 30 % der DLBCL. Bis zu 30 % der Tumoren weisen Aberrationen der 3q27-Region auf, die das BCL6-Gen betreffen. In etwa 5 bis 10 % der Fälle kann eine Rearrangierung des MYC-Gens im Tumor gefunden werden^{2,9}.

1.1.5 Das Lymphom des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-Lymphom)

Das extranodale Marginalzonenlymphom des Mukosa-assoziierten Gewebes (Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphom) ist ein niedrig malignes Lymphom des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT) in Magen, Darm, Bronchialschleimhaut, Speicheldrüsen, Schilddrüse oder in der Orbita. Unter Umständen kann dieser Tumor allerdings in ein hochmalignes Lymphom übergehen¹.

Das MALT-Lymphom macht etwa 6 bis 7 % aller NHL aus. Betroffen sind vor allem Erwachsene im Alter von etwa 60 Jahren, mit einer leichten Bevorzugung für Frauen (männlich : weiblich = 1,0 : 1,2)².

Das MALT-Lymphom ist ein eher indolenter maligner Tumor mit nur geringem Hang zur Disseminierung. Allerdings kann das Lymphom unter Umständen in ein hoch malignes DLBCL transformieren².

In vielen Fällen des MALT-Lymphoms liegt eine lang anhaltende chronische Entzündung mit einer Akkumulation von extranodalem lymphoidem Gewebe vor. Diese chronische Entzündung kann das Resultat einer Infektion, einer Autoimmunerkrankung oder eines unbekanntes Stimulus sein².

Als natürliches Gegenstück zur malignen Zelle des MALT-Lymphoms wird die post-Keimzentrums Gedächtnis-B-Zelle der Marginalzone postuliert^{2,6}.

Häufige chromosomale Aberrationen beim MALT-Lymphom sind die API2/MALT1 t(11;18)(q21;q21) Translokation, die IGH/MALT1 t(14;18)(q32;q21) Translokation und die BCL10/IGH t(1;14)(p22,q32) Translokation¹⁵.

Während das API2-Gen für einen Inhibitor der Zell-Apoptose kodiert, ist die Funktion des MALT1/MLT-Gens noch unbekannt. Das BCL10-Protein ist vermutlich ein Aktivator des NF-κB-Signalwegs, und auch für MALT1 wird eine solche Rolle diskutiert⁶.

1.2 Die untersuchten genetischen Veränderungen

1.2.1 Die BCL2 18q21 Aberration

Das BCL2-Protein ist der Prototyp einer ganzen BCL2-Familie von Proteinen, die wichtige Regulatoren der Apoptose darstellen. Diese Proteine finden sich vor allem in der Membran der Mitochondrien, und können dort durch Homo- und Heterodimerisierung die Membranpermeabilität beeinflussen⁶.

Der mitochondriale Apoptoseweg wird durch elektrische Gradienten über die Mitochondrien-Membran gesteuert. Ein Verlust der Potentialdifferenz, hervorgerufen durch eine erhöhte Durchlässigkeit der Membran, führt zu einer Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma. Dieses wiederum ist ein Aktivator der Caspasen, die die Apoptose der Zelle vorantreiben⁶.

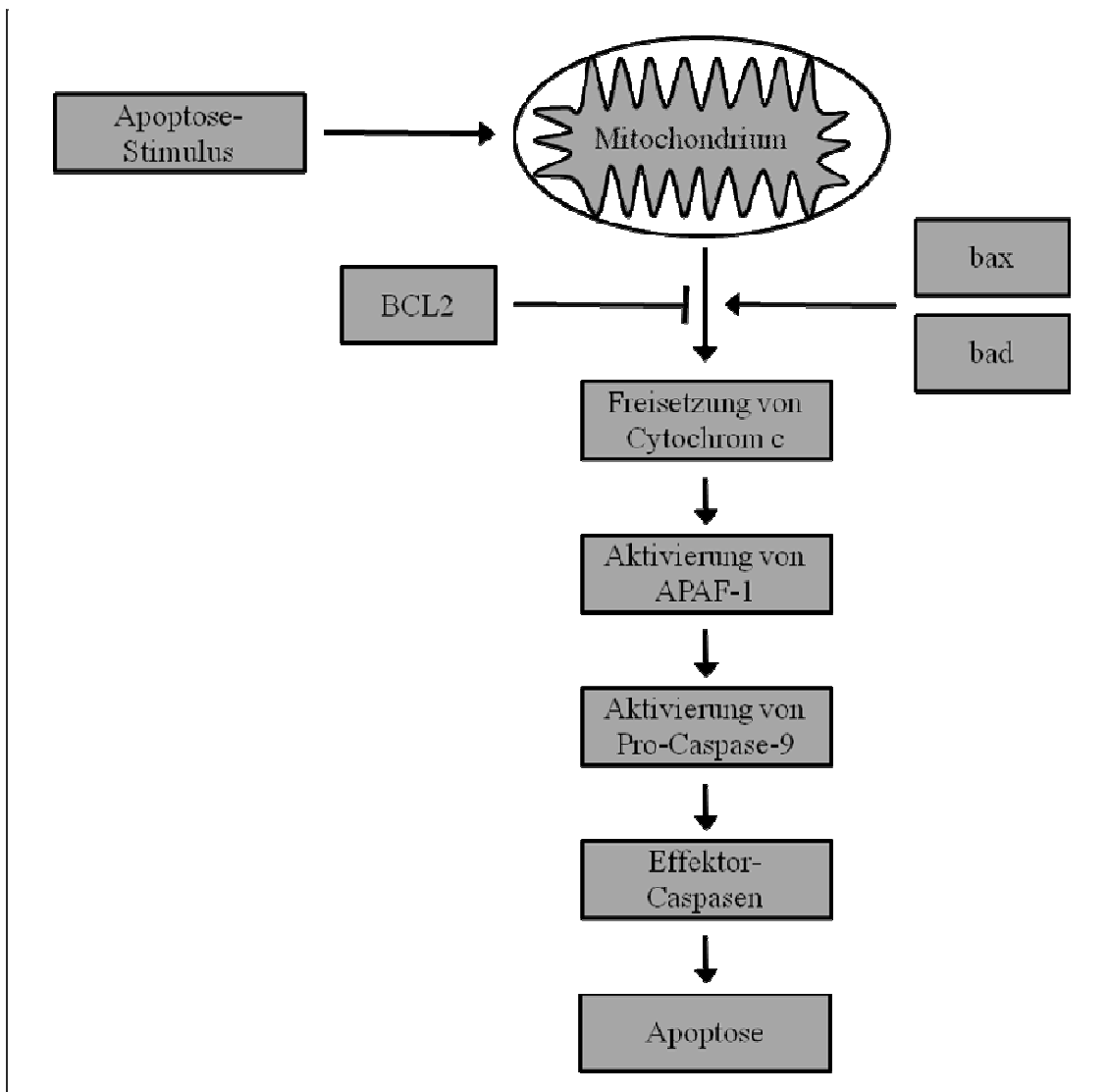
Durch das Aufrechterhalten der mitochondrialen Membranintegrität kann BCL2 auch gegen zahllose zytotoxische Stimuli die zelluläre Apoptose verhindern⁶.

Dem normalen Apoptose-Vorgang liegt eine Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium zu Grunde. Dieses assoziiert im Zytoplasma mit dem Apoptosis Activating Factor-1-Protein (APAF-1)⁹.

Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung an APAF-1, und die Caspase Recruiting Domain (CARD) wird freigelegt, die wiederum die Pro-Caspase-9 bindet und aktiviert. Die so aktivierte Caspase-9 setzt die Caspase-Kaskade in Gang, die letztlich zur Apoptose führt⁹.

Durch verschiedene Mitglieder der BCL2-Familie kann die Freisetzung von Cytochrom C gehemmt oder gefördert werden⁹ (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Regulation der Apoptose durch Mitglieder der BCL2-Familie



nach ⁹: Wagner "Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren"
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 129 (1999).

Unabhängig von seiner anti-apoptotischen Wirkung kann BCL2 auch zu einem Zellzyklus-Arrest, einem Verzögern des Eintritts in den Zellzyklus und einer Aufhebung des begonnenen Zellzyklus führen. Somit scheint BCL2 eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellzyklus und dem Übergang aus der Interphase inne zu haben⁴.

Im normalen nicht-neoplastischen Keimzentrum zeigt sich eine hohe Apoptose-Rate, da Zellen, die fehlerhafte oder ungewünschte chromosomale Veränderungen während ihrer Affinitätsreifung ausbilden, kontrolliert eliminiert werden. Entsprechend ist die BCL2-Expression im Keimzentrum normalerweise niedrig².

Durch die BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation und die hieraus resultierende konstitutive BCL2-Expression umgehen die B-Lymphozyten im Keimzentrum die Apoptose, und können durch eine unregulierte Affinitätsreifung weitere, sekundäre genetische Alterationen akkumulieren².

Die t(14;18)(q32;q21) findet sich in 85 % aller FL und in 20 bis 50 % der DLBCL^{4,6,8}.

Hierbei wird die gesamte kodierende Region von BCL2, die auf Chromosom 18q21 liegt, auf eines der joining-Segmente (J_H) des IGH-Gens auf Chromosom 14 übertragen, und gerät somit unter die Kontrolle eines IGH-Enhancers, was eine enorme Steigerung der BCL2-Protein-Expression zu Folge hat^{6,9}.

In seltenen Fällen ist bei einer Translokation von BCL2 nicht das IGH-Gen betroffen, sondern das auf Chromosom 2p12 gelegene kappa (κ)-Leichtketten-Gen oder das auf Chromosom 22q11 lokalisierte lambda (λ)-Leichtketten-Gen².

1.2.2 Die BCL6 3q27 Aberration

Das BCL6 (B-Cell Lymphoma 6)-Gen liegt in der Bande 27 des langen Arms von Chromosom 3, und ist auch unter der Bezeichnung LAZ3 bekannt⁴.

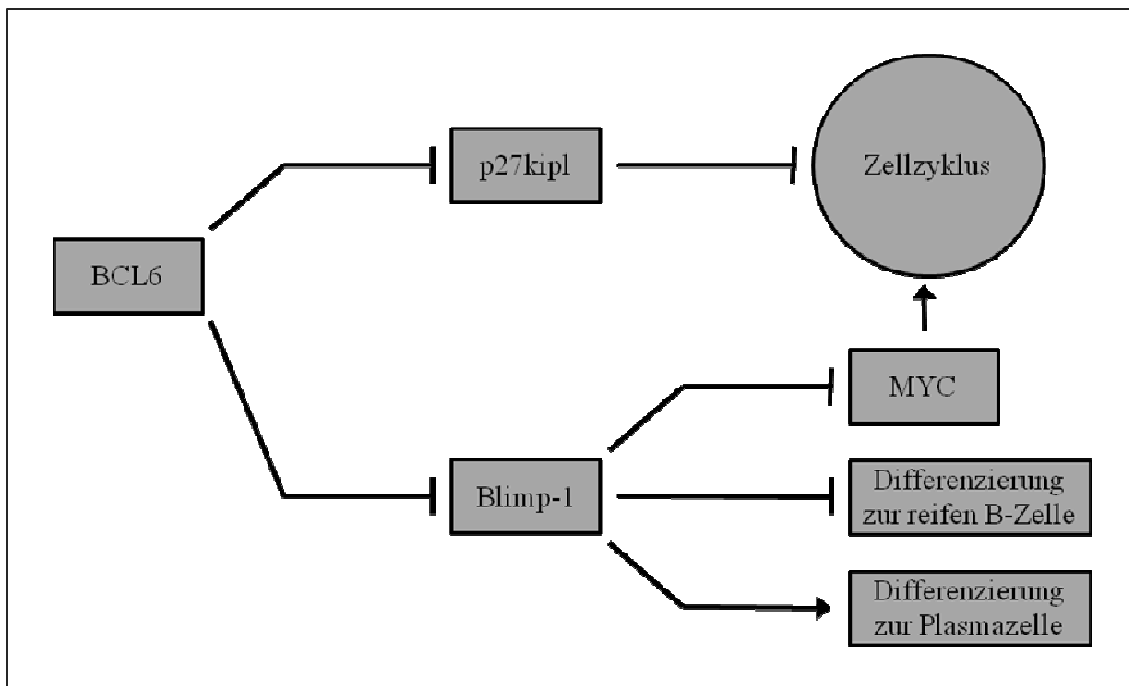
BCL6 kodiert für das BCL6-Protein, einen Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, der in die B-Zell-Differenzierung, in die Antikörper-Affinitätsreifung und in verschiedene T-Helferzell-vermittelte Reaktionen involviert ist⁴.

Im Keimzentrum wird das BCL6-Protein von Zentroblasten und -zyten exprimiert. Naive (präfollikuläre) B-Zellen hingegen sind BCL6 negativ, und auch in Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen wird die BCL6-Expression wieder deaktiviert^{2,4}.

Zentrozyten, die durch somatische Hypermutationen der entsprechenden Genregionen die Antikörper-Affinität ihrer Immunglobuline verbessern konnten, werden von follikulär dendritischen Zellen (FDC) und T-Zellen über CD23 und CD40-Ligand dazu stimuliert, die BCL6-Expression einzustellen, und somit zu Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen zu differenzieren².

Das BCL6-Protein ist ein Transkriptions-Repressor, der die Expression des Zellzyklus-Inhibitors p27^{kip1} und des Transkriptions-Hemmers „B-lymphocyte-induced maturation protein-1“ (Blimp-1) verhindert. Blimp-1 ist ein wichtiger Zellregulator, der die Differenzierung zur Plasmazelle vorantreibt, indem es einerseits die gesamte Expression von Differenzierungs-Genen der reifen B-Zellen blockiert, andererseits die Expression des MYC-Proteins und anderer mit der Proliferation assoziierter Gene inhibiert^{4,6}. Somit führt die Expression von BCL6 zu einer Förderung des Zellzyklus, indem p27^{kip1} inhibiert und MYC enthemmt wird⁶ (siehe Abbildung 5).

Abbildung 5: BCL6 als Zellzyklus- und B-Zell-Differenzierungs-Regulator



nach ⁶: Canellos, Lister, Young "The Lymphomas" Elsevier Inc., Philadelphia, 111 (2006).

Es wird angenommen, dass BCL6 die Expression des Tumor-Suppressor-Gens p53 hemmt, und somit Zellen der B-Zell-Linie vor einer durch DNA-Schäden induzierten Apoptose schützt¹⁶.

Unabhängig hiervon konnte im Maus-Modell gezeigt werden, dass die Interaktion von BCL6 mit dem CD40-Signalweg zu einer malignen Transformation von B-Zellen führen kann¹⁶.

Eine Translokation, die BCL6 betrifft, kann bei 30 bis 40 % der neuauftretenden DLBCL und etwa 10 % der FL nachgewiesen werden. BCL6 ist das Onkogen, welches im DLBCL am häufigsten dereguliert oder mutiert ist^{4,6}.

Bei einer Translokation können verschiedene Partner-Gene betroffen sein, in den meisten Fällen (40 bis 50 %) ist es das IGH-Gen auf Chromosom 14q32. Selten kann auch das kappa (κ)-Leichtketten-Gen auf Chromosom 2p12 oder das lambda (λ)-Leichtketten-Gen auf Chromosom 22q11 als Partner-Gen involviert sein. Auch andere Gene können betroffen sein. Gelegentlich lassen sich auch Punktmutationen im BCL6-Gen bei DLBCL, Burkitt-Lymphom oder FL feststellen^{4,10}.

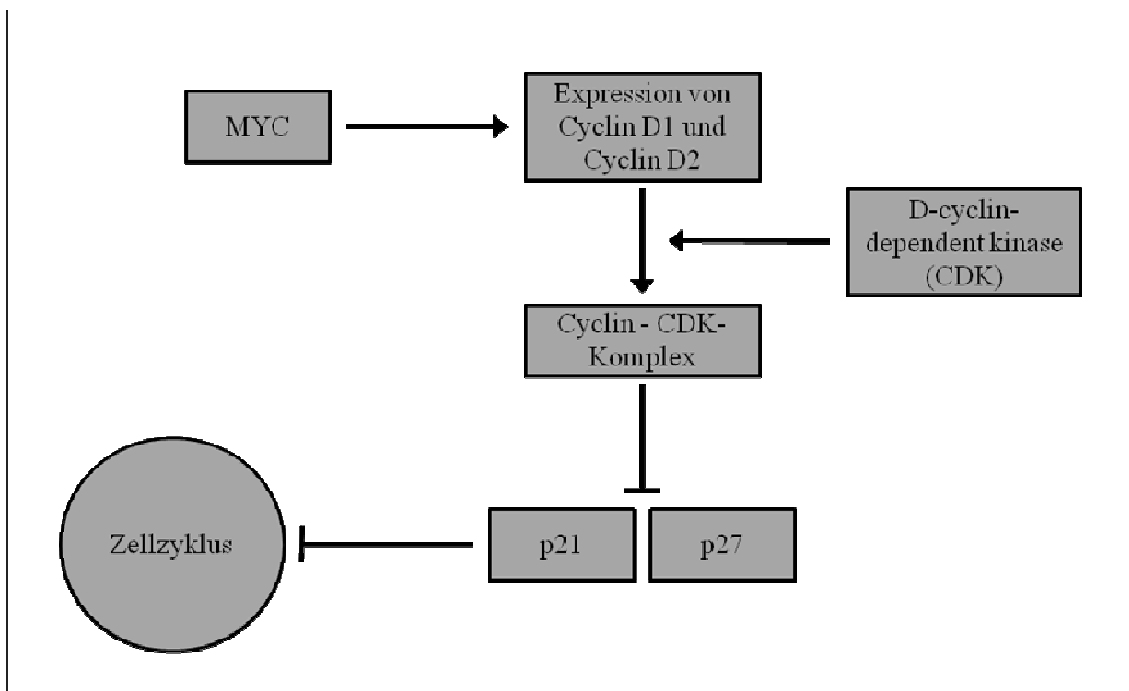
Die Prognose bei Tumoren mit BCL6 3q27-Translokation kann durch das Translokations-Partner-Gen mitbestimmt werden. So wurde für Tumoren mit Bruchpunkten, die nicht das IGH-Gen betreffen, eine ungünstigere Prognose postuliert⁴.

1.2.3 Die MYC 8q24 Aberration

Das MYC-Gen, welches in 8q24 liegt, kodiert für das MYC-Protein, das auch als c-MYC (cellular) bekannt ist. Das MYC-Protein ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, welcher als Helix-Loop-Helix-Zipper-Protein die Expression von etwa 15 % aller menschlichen Gene reguliert. Das MYC-Gen ist bei Induktion der Mitose eines der ersten Gene, das in der noch ruhenden Zelle aktiviert wird, und spielt somit eine wichtige Rolle bei dem Übergang von der zellulären Ruhephase in die Zell-Proliferation^{4,10}.

Das MYC-Protein ist ein Phosphoprotein und ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor, der die Expression von einigen Proteinen induziert, darunter Cyclin D1 und D2. Diese wiederum bilden mit Cyclin-abhängigen Kinasen einen Komplex, der die Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p27 hemmt, und somit den Zellzyklus vorantreibt⁴ (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6: Die negative Wirkung von MYC auf die Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p27



nach⁴: Ioachim, Medeiros "Lymph Node Pathology", Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 66 (2009).

Chromosomale Veränderungen, die das MYC-Gen auf Chromosom 8q24 betreffen, sind charakteristisch für das Burkitt-Lymphom. Aber auch andere B-Zell-Lymphome können eine MYC-Translokation aufweisen, so etwa das DLBCL oder auch low grade-Lymphome, die eine Transformation durchlaufen sind, wie etwa das FL^{4,15}.

Die häufigste MYC betreffende Aberration ist die MYC/IGH t(8;14)(q24;q32) Translokation, die sich in 80 bis 85 % der MYC-Alterationen findet, und das IGH-Gen als Partner hat. In den restlichen 10 bis 15 % der Fälle ist als Translokations-Partner entweder das kappa (κ)-Leichtketten-Gen auf Chromosom 2p11 oder das lambda (λ)-Leichtketten-Gen auf Chromosom 22q11 involviert, oder aber IGH unabhängige Gene⁴. Neben Translokationen können sich auch Amplifikationen von MYC in transformierten low grade-Lymphomen finden⁴.

Bei der MYC/IGH t(8;14)(q24;q32) Translokation wird das MYC-Gen von Chromosom 8 auf den IGH-Gen-Lokus auf Chromosom 14 verlagert. Reziprok wird der V_H (variable)-Genabschnitt von Chromosom 14 auf Chromosom 8 übertragen⁹.

Die durch die Translokation ausgelöste Überexpression des MYC-Proteins beeinflusst viele zelluläre Vorgänge, wie die Proliferation, die Zell-Differenzierung oder die Apoptose, und kann hierdurch eine Tumor-Transformation unterstützen⁴.

Eine andauernde Expression von MYC bewirkt an kultivierten Zellen im Kulturmedium auch bei Abwesenheit sonstiger Wachstumsfaktoren eine Proliferation. Im Umkehrschluss kann durch Inhibition von MYC das Zell-Wachstum gehemmt werden. Abhängig von Zelltyp und Differenzierungsstatus kann MYC also die Zell-Proliferation oder -Apoptose begünstigen. Durch den Apoptose-hemmenden Einfluss von BCL2 wird die Wirkung von MYC in Richtung Proliferation gelenkt⁹.

Diese Interaktion könnte möglicherweise die Ursache für die Aggressivität von den sogenannten „double hit“-Lymphomen sein, bei denen sowohl das MYC- als auch das BCL2-Gen transloziert ist⁹.

1.2.4 Die IGH 14q32 Aberrationen

Lymphatische Tumoren weisen sehr häufig Translokationen und Rearrangements der Chromosomen 7 und 14 auf. Die Ursache hierfür liegt in der Rearrangierung der Immunglobulin-Gene bei der Differenzierung von B-Lymphozyten und der T-Zellrezeptor (TCR)-Gene bei der T-Zell-Reifung⁹.

Das IGH-Gen (q32) und die TCR α - und TCR δ -Gene (q11) liegen auf Chromosom 14, und auf Chromosom 7 findet sich das TCR β -Gen⁹.

Während der Differenzierung werden die D (diversity)- oder J (joining)-Regionen rekombiniert, daher liegen im Allgemeinen die Bruchstellen innerhalb dieser Regionen⁸. Die Bruchstelle auf Chromosom 14 liegt meist in der Nähe oder direkt im J-Segment des IGH-Gens. Diese Lokalisation lässt vermuten, dass die Translokation eine Folge einer fehlerhaften Rekombination zwischen D- und J-Segmenten des IGH-Gens darstellt⁹. Gene die auf eines der IGH- oder TCR-Gene übertragen werden, kodieren häufig für intakte Proteine. Durch die Translokation wird deren Transkription den zellulären Kontrollmechanismen entzogen und permanent aktiviert. Die translozierten Gene geraten dabei unter die Kontrolle des Promoters des IGH-Gens, und werden hierdurch verstärkt - konstitutiv - exprimiert⁹.

1.3 Die Zielsetzung der vorgelegten Arbeit

Laut den bislang in der Literatur vorliegenden (spärlichen) Daten zeigen FL 3A und FL 3B unterschiedliche Antigen-Profile und offenbar auch unterschiedliche (primäre) genetische Veränderungen, wobei gerade für das FL 3B nur wenige Daten vorliegen. Während Grad 3A-Tumoren einige Ähnlichkeiten zu den FL 1 und 2 zeigen, scheint das FL 3B im Immunphänotyp wie in der Genetik eher dem DLBCL zu ähneln. Allerdings lässt sich bei kritischer Durchsicht der Literatur erkennen, dass die meisten Fälle eines FL Grad 3 entweder gar nicht den Graden 3A oder 3B zugeordnet, beziehungsweise in diese unterschieden wurden, oder häufig bereits einen zusätzlichen diffusen Wachstumstyp aufweisen, nach den Regeln der WHO-Klassifikation für Tumoren der Hämatopoetischen und Lymphatischen Gewebe (2008) also als DLBCL mit einem zusätzlichen folliculären Wachstumsanteil klassifiziert würden. Somit sind die Daten insbesondere über die rein folliculär wachsenden FL 3B äußerst spärlich.

In der Fachliteratur wird kontrovers darüber diskutiert, ob eine Unterteilung der FL Grad 3, wie es die WHO-Klassifikation vorsieht, eine pathologische oder klinische Relevanz besitzt.

Um diese Frage zu beantworten, müssen die Pathogenese, die Eigenschaften und die Klinik dieser beiden Tumor-Entitäten weiter untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der immunhistochemischen und genetischen Charakterisierung der FL 3B. Von besonderem Interesse war die Bestimmung der Häufigkeit der BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21), BCL6/IGH t(3;14)(q27;q32) und MYC/IGH t(8;14)(q24;q32) Translokationen in den verschiedenen Typen der FL. Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Anwendung der Tissue Microarray (TMA)-Technik und der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an TMAs robuste Daten zu dieser Fragestellung liefern kann.

In einem ersten Schritt wurden vorhandene TMAs von FL, DLBCL und MALT-Lymphomen mit break-apart-Sonden für BCL2, BCL6, MYC und IGH hybridisiert, und die gewonnenen Ergebnisse mit Daten der konventionellen Zytogenetik abgeglichen.

Hierdurch sollte nachgewiesen werden, dass die FISH in Kombination mit der TMA-Technik eine valide Testmethode zur Aufdeckung der gesuchten chromosomalen Aberrationen darstellt, die in Sensitivität und Spezifität der klassischen Zytogenetik nicht nachsteht.

In einem zweiten Schritt wurden FL aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg anhand der aktuellen WHO-Kriterien in die Grade 1, 2, 3A und 3B eingeteilt (und reklassifiziert). Diese Tumoren wurden im TMA und im Vollschnitt durch immunhistochemische Färbungen auf ihre Protein-Expression und mittels FISH auf ihre genetischen Eigenschaften untersucht und charakterisiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterialien

Für die vorliegende Arbeit wurde in Paraffin-eingebettetes Gewebe im Vollschnitt und als TMA aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg und des Pathologischen Instituts des Hospital General de México, Juárez, Mexiko untersucht.

Für den Abgleich der FISH-Ergebnisse an TMAs und an Vollschnitten mit vorhandenen Daten der konventionellen Zytogenetik standen insgesamt 45 Fälle zur Verfügung.

Die meisten dieser Fälle fanden sich auf bereits vorhandenen TMAs des Pathologischen Instituts: 14 Fälle, die als FL mit folliculären und diffusen Anteilen beschrieben waren (TMA FL), 17 Fälle von DLBCL (TMA DLBCL) und elf Fälle von MALT-Lymphomen (TMA MALT). Hinzu kamen drei Fälle aus dem für diese Arbeit angefertigten TMA FL 3B mit FL 3B (siehe Tabelle 2).

Die untersuchten Fälle fanden in den Jahren 1990 bis 2004 Eingang in das Archiv des Pathologischen Instituts, und wurden anhand der Diagnosekriterien der Kiel- und WHO-Klassifikation klassifiziert.

Tabelle 2: Verwendete Fälle für den Abgleich klassische Zytogenetik versus FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung)

TMA FL 3B	3 Fälle
TMA FL	14 Fälle
TMA DLBCL	17 Fälle
TMA MALT	11 Fälle
Gesamt	45 Fälle* ¹

*¹ sieben Fälle fanden sich auf mehreren TMAs oder Schnitten

Für die Auffindung und Reklassifikation der FL Grad 3 wurden mit Hilfe der digitalen Gesamt-Datenbank 224 Fälle aus dem Archiv des Pathologischen Instituts ermittelt, in deren Diagnose sich die Begriffe „FL 3B“ (nach der WHO-Klassifikation) oder „zentroblastisches folliculäres Lymphom“ (nach der Kiel-Klassifikation) fanden. Diese 224 Fälle wurden nach den Kriterien der WHO re-evaluiert, und ihre Diagnose bestätigt oder korrigiert. Somit konnten 50 Fälle von FL bestimmt werden, die für eine genauere Charakterisierung mittels Immunhistochemie und FISH geeignet waren. Unter diesen fanden sich sowohl Fälle, die sicher als FL Grad 3B diagnostiziert werden konnten (Gruppe 1), aber auch Fälle, die nicht eindeutig den FL 1 bis 3A oder FL 3B zugeordnet werden konnten (Gruppe 2). Auch einzelne Fälle von zentrozytischen FL (FL Grad 1 bis 3A) wurden in die Arbeit mit aufgenommen (Gruppe 3, siehe Tabelle 3). Von diesen 50 Fällen, wurde ein TMA mit 40 Fällen erstellt, zehn Fälle wurden im Vollschnitt untersucht. Eine erfolgreiche Hybridisierung gelang in 35 Fällen des TMA und in allen zehn Fällen im Vollschnitt also in insgesamt 45 Fällen. Mit zwei Fällen die aus den Beständen des Pathologischen Instituts des Hospital General de México, Juárez, Mexiko hinzukamen, und als reine FL 3B (Gruppe 1) bestätigt wurden, konnten letztlich 47 FL analysiert werden (siehe Tabelle 4, Kapitel 2.2). Diese Fälle stammten aus den Jahren 1993 bis 2007.

Tabelle 3: Einteilung der untersuchten FL nach Diagnose in Gruppen

Gruppe 1	Rein folliculäre FL 3B	23 Fälle
Gruppe 2	FL 3A, FL 3B und FL 3U, insbesondere Kombinationen aus den Genannten	15 Fälle
Gruppe 3	FL 1, FL 2, FL 3A mit oder ohne LCC-Komponente* ¹ , Kombinationen aus den Genannten	9 Fälle

*¹ Large Centrocyte (LCC)

Um die Schwellenwerte (cut-off-Werte) für die BCL2-, BCL6-, MYC- und IGH-Sonden zu bestimmen, wurden sieben Fälle von nicht-neoplastischem, lymphatischem Gewebe aus dem Archiv des Pathologischen Instituts hybridisiert. Alle diese Fälle wurden im Jahr 2005 in das Archiv des Pathologischen Instituts aufgenommen.

2.1.2 Sonden

Folgende Sonden beziehungsweise Sondenkombinationen fanden Verwendung:

Vysis LSI® BCL2 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Vysis LSI® BCL6 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Vysis LSI® MYC Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Vysis LSI® IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden

2.1.3 Sonden-Lösungen

Einfacher Gewebeschnitt

Aqua destillata, H ₂ O	2,00 µl	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Vysis LSI® Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	1,00 µl	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Vysis LSI/WCP® Hybridisation Buffer	7,00 µl	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Tissue Microarray

Aqua destillata, H ₂ O	3,00 µl	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Vysis LSI® Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	1,50 µl	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Vysis LSI/WCP® Hybridisation Buffer	10,50 µl	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden

2.1.4 Immunhistochemische Färbungen

Histostain-Plus Staining Kit Biotin/Streptavidin/Meerrettichperoxidase	Zymed, San Francisco, USA
BCL2, Clone 124, Verdünnung 1:400	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
BCL6, Klon PG-B6p, Verdünnung 1:20	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
CD5, Clone 4C7, Verdünnung 1:40	Novocastra Reagents, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
CD10, Klon NCL-CD10-270, Verdünnung 1:100	Novocastra Reagents, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
CD20, Clone L26, Verdünnung 1:1000	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
IRF4/MUM1, Klon IRF4/MUM1p, Verdünnung 1:8000	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Ki67, Klon MM1, Verdünnung 1:30	Novocastra Reagents, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
p53, Klon DO-7, 1:40	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
kappa (κ), 1:20000	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
lambda (λ), 1:20000	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

Der verwendete monoklonale TCL1-Antikörper, gerichtet gegen ein spezifisches 14-Aminosäuren-Peptid-Epitop in einer α -loop-Region des TCL1-Gens, wurde von der Forschungsgruppe Dr. med. M. Herling, Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln, Köln und Department of Hematopathology, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, USA hergestellt, und freundlicherweise zur Verfügung gestellt¹⁷.

2.1.5 Chemikalien und Lösungen

Aqua destillata, H ₂ O	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol, C ₁₆ H ₁₅ N ₅	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	AppliChem, Darmstadt
Ethanol, C ₂ H ₆ O	AppliChem, Darmstadt
FixoGum Rubber Cement	Marabuwerke GmbH & Co. KG, Tamm
Vysis LSI/WCP® Hybridisation Buffer	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Immersionsöl für die Mikroskopie, fluoreszenzfrei	AppliChem, Darmstadt
Natronlauge (1M), NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
NP40, Igepol CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pepsin Kristallin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNase From Bovine Pancreas	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Salzsäure Maßlösung (1M), HCl	AppliChem, Darmstadt
TRIS, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, C ₄ H ₁₁ NO ₃	AppliChem, Darmstadt
Vectashield Mounting Medium For Fluorescence	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylol Isomerengemisch, C ₈ H ₁₀	CSC Jäckle Chemie GmbH & Co. KG, Nürnberg

DAPI-Vectashield-Kerngegenfärbung

DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol, C ₁₆ H ₁₅ N ₅	1,00 µl	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Vectashield Mounting Medium For Fluorescence	1,50 µl	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Waschlösung

Aqua destillata, H ₂ O	95,00 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
NP40, Igepol CA-630	300,00 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SSC, Standard Saline Citrat (20x)	2,00 ml	siehe Kapitel 2.1.6

2.1.6 Puffer

SSC, Standard Saline Citrat (20x)

Aqua destillata, H ₂ O	1000,00 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumacetat, C ₂ H ₃ NaO ₂	88,20 g	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	175,30 g	Merck KGaA, Darmstadt

10xPBS, Phosphate Buffered Saline

Aqua destillata, H ₂ O	1000,00 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Dinatriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	14,40 g	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid, KCl	2,00 g	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	2,00 g	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	80,00 g	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

TRIS/EDTA-Puffer, pH 9,0

Aqua destillata, H ₂ O	2000,00 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	1,49 g	AppliChem, Darmstadt
TRIS, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, C ₄ H ₁₁ NO ₃	12,11 g	AppliChem, Darmstadt

Der pH-Wert wurde mit Salzsäure HCl (1 M) und Natronlauge NaOH (1 M) auf pH 9,0 eingestellt.

2.1.7 Laborgeräte

Fluoreszenz-Mikroskop, ebq100	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Fluoreszenz-Mikroskop, DMRBE	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Heizblock, Model 12895	Medax Nagel GmbH, Kiel
Manual Tissue Arrayer, MTA-1	Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, USA
Mikrotom, SM 2000R	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
pH-Meter, pH 330	WTW GmbH, Weilheim
Pipetten, 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettier-Automat, Tecan Genesis RSP 200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Präzisionswaage, Adventurer, Typ ARRW60	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Präzisionswaage, Adventurer, Typ AR1530	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Trockenschrank, Typ UT 6060	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Wasserbad 37°C, Typ 3047	Köttermann Labortechnik, Uetze-Hämigen
Wasserbad 73°C, Typ FRG WB14	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad 100°C, Typ 1002	GFL mbH, Burgwedel
Vortex, Genie 2	Scientific Laboratories Inc., Bohemia, USA
Zentrifuge, Typ 5415D	Eppendorf AG, Hamburg

Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Sarstedt, Nürnberg verwendet.

Mikroskopische und Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit dem Programm Isis (in situ imaging software) Version 4.4.25 der Firma MetaSystems, Altlußheim erstellt.

2.2 Methoden

Für die beiden unterschiedlichen Arbeitsansätze, den Vergleich von FISH an TMAs und konventioneller Zytogenetik, beziehungsweise der Charakterisierung der FL wurden zwei unterschiedliche Sets von Fällen verwendet. Für den Methodenvergleich FISH an TMAs versus klassische Zytogenetik wurden insgesamt 45 Fälle von B-Zell-Lymphomen untersucht, die sich auf vier verschiedenen bereits vorhandenen TMAs und einem für diese Arbeit angefertigten TMA fanden. Die Charakterisierung der FL, und insbesondere der FL 3B, wurde an 47 Fällen durchgeführt, die teils im TMA und teils im Vollschnitt untersucht wurden (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Methode und Gruppenzuordnung der Follikulären Lymphome (FL)

Fallnummer	Gruppe	Methode
#301	1	Vollschnitt
#302	1	Vollschnitt
#303	1	TMA
#304	1	TMA
#305	1	TMA
#306	1	TMA
#307	1	Vollschnitt
#308	1	TMA
#309	1	TMA
#310	1	TMA
#311	1	Vollschnitt
#312	1	TMA
#313	1	Vollschnitt
#314	1	TMA
#315	1	TMA
#316	1	Vollschnitt
#317	1	TMA
#318	1	Vollschnitt
#319	1	Vollschnitt
#320	1	TMA
#321	1	TMA

Tabelle 4: Methode und Gruppenzuordnung der Follikulären Lymphome (FL)
(Fortsetzung)

Fallnummer	Gruppe	Methode
#322	1	TMA
#323	1	TMA
#324	2	Vollschnitt
#325	2	TMA
#326	2	Vollschnitt
#327	2	TMA
#328	2	TMA
#329	2	TMA
#330	2	TMA
#331	2	TMA
#332	2	TMA
#333	2	TMA
#334	2	TMA
#335	2	TMA
#336	2	Vollschnitt
#337	2	TMA
#338	2	TMA
#339	3	TMA
#340	3	Vollschnitt
#341	3	TMA
#342	3	TMA
#343	3	TMA
#344	3	TMA
#345	3	TMA
#346	3	TMA
#347	3	TMA

2.2.1 Lichtmikroskopische Auswahl der Fälle nach Histologie und Morphologie

Die Auswahl der für diese Arbeit verwendeten Fälle erfolgte anhand der Kriterien der WHO-Klassifikation für Tumoren der Hämatopoetischen und Lymphoiden Gewebe.

Hierzu wurden in der digitalen Datenbank des Pathologischen Instituts gezielt Fälle gesucht, die die Schlagworte „FL 3B“ oder „zentroblastisches folliculäres Lymphom“ in ihrer Diagnose enthielten.

Aus insgesamt 224 Fällen wurden 58 Fälle zur weiteren Begutachtung ausgewählt, bei denen es sich entweder um eindeutige FL 3B nach den Kriterien der WHO handelte, oder aber um im Rahmen dieser Arbeit interessante Varianten, beziehungsweise Differenzialdiagnosen des FL Grad 3B handelte. Für die Diagnose „FL 3B“ musste der jeweilige Fall entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation ein ausschließlich folliculäres Wachstumsmuster zeigen, und im HPF von 0,159 mm² sollten ausschließlich Zentroblasten in der Lichtmikroskopie (40x Objektiv und 18 mm Sichtfeld-Okular) zu erkennen sein (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Grad-Einteilung der Follikulären Lymphome (FL) nach der WHO-Klassifikation

Grad 1 - 2	0 - 15 Zentroblasten per hpf
Grad 1	0 - 5 Zentroblasten per hpf
Grad 2	6 - 15 Zentroblasten per hpf
Grad 3	> 15 Zentroblasten per hpf
Grad 3A	Zentrozyten vorhanden
Grad 3B	keine Zentrozyten vorhanden
follikulär	> 75 % folliculäre Anteile
follikulär und diffus	25 - 75 % folliculäre Anteile
prädominant diffus	< 25 % folliculäre Anteile

hpf \triangleq high-power-field von 0,159 mm² (40x Objektiv und 18 mm Sichtfeld-Okular)

nach ²: Swerdlow et al. “WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues” IARC, Lyon, 220 (2008).

Zusätzlich zur Grad-Einteilung wurde der Anteil an diffusen Wachstumsabschnitten im Gewebepräparat bestimmt. Zeigte sich ein herdförmiges eindeutig diffuses Wachstumsareal bei einem FL Grad 3, so wurde das Lymphom als DLBCL mit FL-Komponente (FL + DLBCL) klassifiziert.

Ein besonderer Vermerk wurde angefügt, wenn viele große oder gar atypische Zentrozyten im Präparat zu erkennen waren (FL LCC).

Fälle, die nicht eindeutig einem FL Grad 3A oder einem Grad 3B zuzuordnen waren, wurden als FL 3U (undefiniert) beschrieben.

Von diesen 58 Fällen wurden 40 Fälle in einen TMA eingebracht, zehn Fälle wurden (aufgrund des spärlichen Materials) nur im Vollschnitt untersucht. Acht Fälle konnten aufgrund unzureichendem Gewebe im Paraffinblock nicht weiter untersucht werden. Fünf Fälle auf dem TMA erbrachten auch nach mehrmaliger Hybridisierung keine auswertbaren Ergebnisse.

Die 45 verbliebenen Fällen konnten noch durch zwei eindeutig als FL 3B diagnostizierte Fälle aus den Beständen des Pathologischen Institut des Hospital General de México, Juárez, Mexiko ergänzt werden, die freundlicherweise von Frau Dr. Monica Romero de Manzanilla zur Verfügung gestellt wurden.

Somit konnten insgesamt 47 Fälle von FL den drei vorgegebenen Gruppen zugeordnet werden, und mit immunhistochemischen Färbungen und der FISH-Methode untersucht werden (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Einteilung der Follikulären Lymphome (FL) nach Diagnosen in Gruppen

Fallnummer	1. Diagnosedurchgang	2. Diagnosedurchgang	3. Diagnosedurchgang	Gruppe
#301	n.a.	FL 3B	FL 3B	1
#302	n.a.	n.a.	FL 3B	1
#303	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#304	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#305	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#306	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#307	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#308	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#309	n.a.	CB follikulär* ¹	FL 3B	1

n.a. \triangleq nicht analysiert

*¹ entsprechend Kiel-Klassifikation

Tabelle 6: Einteilung der Follikulären Lymphome (FL) nach Diagnosen in Gruppen
(Fortsetzung)

Fallnummer	1. Diagnosedurchgang	2. Diagnosedurchgang	3. Diagnosedurchgang	Gruppe
#310	n.a.	CB follikulär* ¹	FL 3B + DLBCL	1
#311	n.a.	n.a.	FL 3B	1
#312	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#313	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#314	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#315	FL 3	FL 3B	FL 3B	1
#316	n.a.	FL 3B	FL 3B	1
#317	FL 3B	FL 3B; FL 3A	FL 3B	1
#318	FL 3B + DLBCL	FL 3B	FL 3B	1
#319	n.a.	FL 3B	FL 3B	1
#320	n.a.	CB follikulär	FL 3B	1
#321	n.a.	CB follikulär	FL 3B	1
#322	n.a.	CB follikulär	FL 3B	1
#323	n.a.	CB follikulär	FL 3B	1
#324	n.a.	n.a.	FL 3U	2
#325	FL 3B	FL 3B; FL 2	FL 3A + FL 3B	2
#326	n.a.	FL 3B	FL 1 + FL 3B	2
#327	FL 3B	FL 3B	FL 3U	2
#328	n.a.	FL 3B	FL 3U	2
#329	FL 3B	FL 3B	FL 3A LCC	2
#330	FL 3B	FL 3B	FL 3A	2
#331	FL 3A	FL 3B	FL 3A	2
#332	FL 3B	FL 3B	FL 3U	2
#333	FL 3B	FL 3B; FL 3A	FL 3A	2
#334	FL 3B + DLBCL	FL 3B	FL 3A	2
#335	FL 3B	FL 3B	FL 3U	2
#336	FL 1 - FL 2	FL 3B	FL 3B	2
#337	FL 3B	FL 3A LCC; FL 3B	FL 3U	2
#338	FL 3B	FL 3B	FL 2	2
#339	FL 3A	FL 1 - FL 3A	FL 2	3
#340	FL 3B	FL 3B; FL 3A LCC	FL 3A LCC	3
#341	FL 3A; DLBCL	FL 3A LCC	FL 1 - FL 2 LCC	3
#342	FL 3B	FL 3A LCC	FL 1 - FL 2 LCC	3
#343	FL 3B	FL 3A LCC	FL 1 - FL 2	3
#344	FL 3A	FL 3A LCC	FL 1 - FL 2 LCC	3
#345	FL 1 - FL 3B	FL 3A LCC	FL 2 + FL 3A	3
#346	FL 3B	FL 3A LCC	FL 1 LCC	3
#347	FL 1 - FL 3B	FL 3A LCC	FL 1 LCC	3

n.a. ≙ nicht analysiert

*¹ entsprechend Kiel-Klassifikation

2.2.2 Anfertigung der Gewebeschnitte

Die zu untersuchenden Gewebeschnitte wurden mittels eines konventionellen Mikrotoms hergestellt, und auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Durch diese Silanisierung wurde die Haftung der Gewebe an die Oberfläche der Objektträger erhöht. Vollschnitte wurden mit einer Schichtdicke von 4 µm angefertigt. Schnitte von TMA-Blöcken wurden mit nur 1 µm Stärke erstellt, da Gewebestanden in dickeren Schnitten häufiger verloren gehen, und hierdurch Material gespart werden konnte.

2.2.3 Tissue Microarray (TMA)

Für die Erstellung eines TMA wurden 40 Fälle von FL ausgewählt. Das im Paraffin-Block gebettete Gewebe dieser Fälle sollte eine verbliebene Stärke von 2 mm nicht unterschreiten.

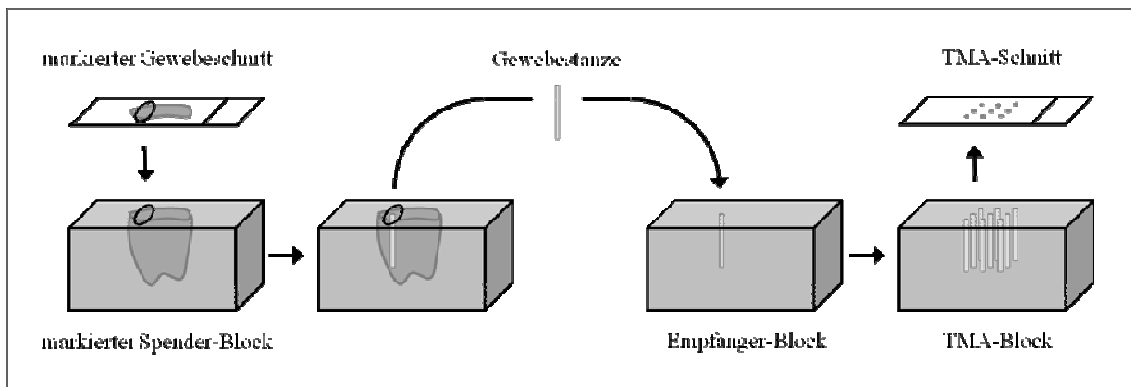
Vollschnitte dieser Fälle wurden in HE- und Giemsa-Färbung begutachtet. Eindeutig neoplastische Areale wurden optisch von der Mikroskopie auf das makroskopisch sichtbare Gewebe übertragen, und mittels Markierung auf dem Deckglass des jeweiligen Falles gekennzeichnet. Diese Markierungen wurden dann auf die korrespondierenden Areale der zugehörigen Paraffin-Gewebe-Blöcke übernommen.

Die Anfertigung des eigentlichen TMA erfolgte dann unter Verwendung des Manual Tissue Arrayer, MTA-1 der Firma Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, USA.

Durch Verwendung von Hohladeln und Trokar wurden Gewebezylinder in definierter Größe von 0,6 mm aus dem markierten Areal des Paraffin-Gewebe-Blocks (Spender-Block) entnommen, und in einen Leerblock (Empfänger-Block) aus speziellem Paraffin (Schmelzpunkt 56 bis 58 °C) übertragen.

Bevor die Gewebestanze in den Empfänger-Block überführt werden konnte, wurde an der vorgesehenen Position aus dem Empfänger-Block eine größengleiche Paraffinstanze entnommen. Der Gewebezylinder konnte dann in den so entstandenen Stanzkanal eingeführt werden (siehe Abbildung 7).

Abbildung 7: Prinzip des Tissue Microarray (TMA)

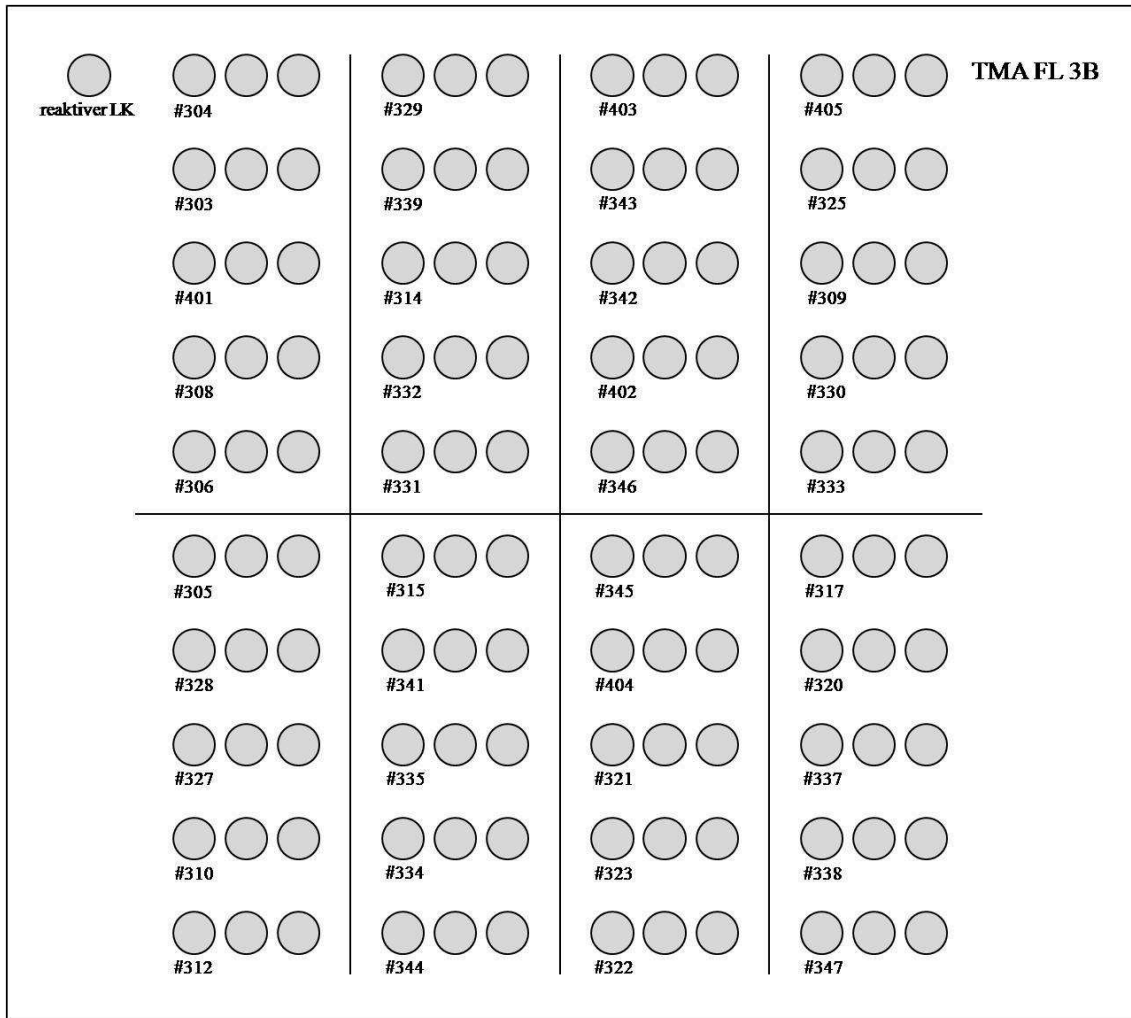


Um die exakte Positionierung der Stanzen zu gewährleisten, verfügt der verwendete Manual Tissue Arrayer, MTA-1 über eine Koordinaten-Anzeige, die die Position der Stanzen auf dem Empfänger-Block millimetergenau angibt.

Mit Hilfe dieser Koordinaten-Angaben konnten mehrere Stanzen verschiedener Spender-Blöcke in der richtigen Reihenfolge und im gewünschten Muster in den Empfänger-Block eingebracht werden.

Die Anordnung der Stanzen, und die zugehörigen Fallnummern wurden in einer Orientierungskarte (Map) für diesen TMA-Block festgehalten (siehe Abbildung 8).

Abbildung 8: Orientierungs-Karte (Map) des TMA FL 3B



Die Positionierung der Fälle erfolgte in Zeilen und Spalten.

Von jedem einzelnen Fall wurden jeweils drei Gewebestanden mit je 1 mm Abstand in den Empfänger-Block nebeneinander eingesetzt. In der Horizontalen wurde der nächste Fall mit wiederum drei Stanzen in 2 mm Entfernung zu den Stanzen des ersten Falles platziert. Insgesamt wurden so vier Spalten entsprechend vier Fällen mit jeweils drei Stanzen vorgegeben.

In der Vertikalen wurden untereinander erst fünf Fälle à drei Stanzen mit jeweils 1 mm Abstand, und dann mit einmalig 2 mm Abstand weitere fünf Fälle mit drei Stanzen und je 1 mm Entfernung angebracht.

Um makro- und mikroskopisch den Startpunkt der Fallnummerierung hervorzuheben, wurde horizontal 1 mm vor dem ersten Fall des TMA eine Markierung mit einer Gewebestanz eines nicht-neoplastischen reaktiven Lymphknoten gesetzt.

2.2.4 Immunhistochemie

Die Charakterisierung der FL erfolgte unter anderem durch immunhistochemische Färbungen zur Beurteilung der Proteinexpression der Tumoren.

Hierzu wurden von dem TMA FL 3B und den Vollschnitten der FL-Fälle mit einem konventionellen Mikrotom Gewebeschnitte von 1 µm und 4 µm Dicke angefertigt, und die Schnittpräparate auf silanisierte Objektträger aufgezogen.

Von diesen Gewebeschnitten wurden dann HE- und Giemsa-Färbungen angefertigt.

Weitere Schnitte wurden für die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen verwendet, die in der Immunperoxidase-Technik mit einem kommerziell erhältlichen Biotin/Streptavidin/Meerrettichperoxidasesystem und dem Pipettier-Automaten TECAN Genesis RSP 200 durchgeführt wurden.

Diese Gewebeschnitte wurden für die Oberflächenmerkmale BCL2, BCL6, CD5, CD10, CD20, die nukleären Marker IRF4/MUM1, TCL1, Ki67, p53 und die Immunglobulin-Leichtketten kappa (κ) und lambda (λ) angefärbt (siehe Kapitel 2.1.4).

2.2.5 Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Fälle

Die untersuchten Fälle wurden lichtmikroskopisch entsprechend des spezifischen qualitativen und quantitativen Ergebnisses der immunhistochemischen Färbung beurteilt. Die Intensität der Anfärbung, die Anzahl der positiv gefärbten Zellen und die Verteilung der gefärbten Zellen im Präparat wurden bestimmt. Entsprechend konnte der jeweilige Fall als positiv oder negativ für die einzelne Färbung bestimmt werden.

Bei einigen Färbungen wurden bereits bekannte cut-off-Werte (Schwellenwerte) für B-Zell-Lymphome aus der Fachliteratur zur Beurteilung herangezogen. Fälle mit IRF4/MUM1 und TCL1 wurden ab einem Prozentsatz von mindestens 40 % positiv gefärbter Zellen als positiv bewertet, Fälle mit Ki67 und p53 ab einem Prozentsatz von mindestens 20 %.

Andere Färbungen wurden anhand der in der lichtmikroskopischen Beurteilung eindeutig zu erkennenden positiven oder negativen Anfärbung im Vergleich zur Hintergrundfärbung bestimmt (kappa (κ), lambda (λ), CD5, CD10, und CD20), oder aufgrund der gewonnenen Prozentdaten positiver Zellen als negativ oder positiv entsprechend einer starken ($\geq 25\%$) oder schwachen, beziehungsweise fehlenden Anfärbung ($< 25\%$) eingeteilt (BCL2 und BCL6)^{17,18}.

2.2.6 Konventionelle Zytogenetik

Die Daten der konventionellen Zytogenetik, die für diese Arbeit verwendet wurden, wurden aus der Datenbank des Pathologischen Instituts entnommen, und wurden primär im Rahmen der Routine-Diagnostik oder anderer Forschungsarbeiten erarbeitet.

2.2.7 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Eine FISH-Untersuchung wurde an vier verschiedenen TMA-Blöcken (TMA FL 3B, TMA FL, TMA DLBCL und TMA MALT), an zehn Fällen im Vollschnitt aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg und an zwei Fällen im Vollschnitt aus dem Pathologischen Institut des Hospital General de México, Juárez, Mexiko durchgeführt.

Des Weiteren wurden sieben Fälle an Vollschnitten nicht-neoplastischen, lymphatischen Gewebes zur Bestimmung eines cut-off-Wertes hybridisiert.

Da die Translokationen t(14;18)(q32;q21), t(3;14)(q27;q32) und t(8;14)(q24;q32) bei FL von besonderem Interesse sind, wurden die break-apart-Sonden für die Gene BCL2, BCL6, MYC und IGH für die FISH-Untersuchungen ausgewählt.

Die verwendeten Sonden waren in allen Fällen kommerziell erhältliche Vysis LSI® Dual Color, Break Apart Rearrangement Probes der Firma Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden.

Die in Paraffin-eingebetteten TMA- und Vollschnitte wurden bei 80 °C für mindestens eine Stunde auf einer Heizplatte erhitzt, um das Paraffin zu verflüssigen, und dieses dann durch ein 20-minütiges Bad in Xylol völlig abzuwaschen.

Die Wässerung der Objektträger (OT) erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe mit jeweils 100 %, 90 % und 70 % Alkohol für je fünf Minuten.

Durch die Inkubation der Gewebeschnitte im TRIS/EDTA-Puffer, pH 9,0 bei 100 °C im Dampfkochtopf für fünf Minuten oder im Wasserbad für zehn Minuten wurde die thermische Demaskierung der DNA erreicht. Im Wasserbad erhitzte OT wurden im Anschluss weitere zehn Minuten im Puffer bei Raumtemperatur abgekühlt.

Eventuell noch vorhandene RNA wurde durch eine 30-minütige Behandlung mit RNase-Lösung im Wasserbad bei 37 °C entfernt, und die OT im Anschluss für zehn Minuten mit 2xSSC-Lösung gewaschen.

Das Gewebe wurde ebenfalls im Wasserbad bei 37 °C in einer sauren Pepsin-Lösung zur Proteolyse angedaut, und nachfolgend zur pH-Neutralisierung für zehn Minuten mit 1xPBS-Lösung behandelt.

Für jeweils fünf Minuten in einer 70 %, 90 % und 100 % Alkohol-Lösung folgte die Entwässerung der Gewebeschnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe.

Nachdem die OT für zehn Minuten bei 37 °C in der Wärmekammer getrocknet hatten, erfolgte die Zugabe der Sonden-Lösungen auf das Gewebe.

Die OT wurden mit Deckgläsern versehen, und luftdicht versiegelt.

Auf der Heizplatte wurde die DNA für zehn Minuten bei 80 °C denaturiert, und somit für die Sonden endgültig zugänglich gemacht.

Die eigentliche Hybridisierung erfolgte dann über mehrere Stunden, meist über Nacht, bei 37 °C in einer feuchten Hybridisierungskammer.

Nach zwölf bis 16 Stunden wurden die Gewebeschnitte für zehn Minuten in 2xSSC gewaschen, und die Deckgläser samt Versiegelung von den OT abgenommen.

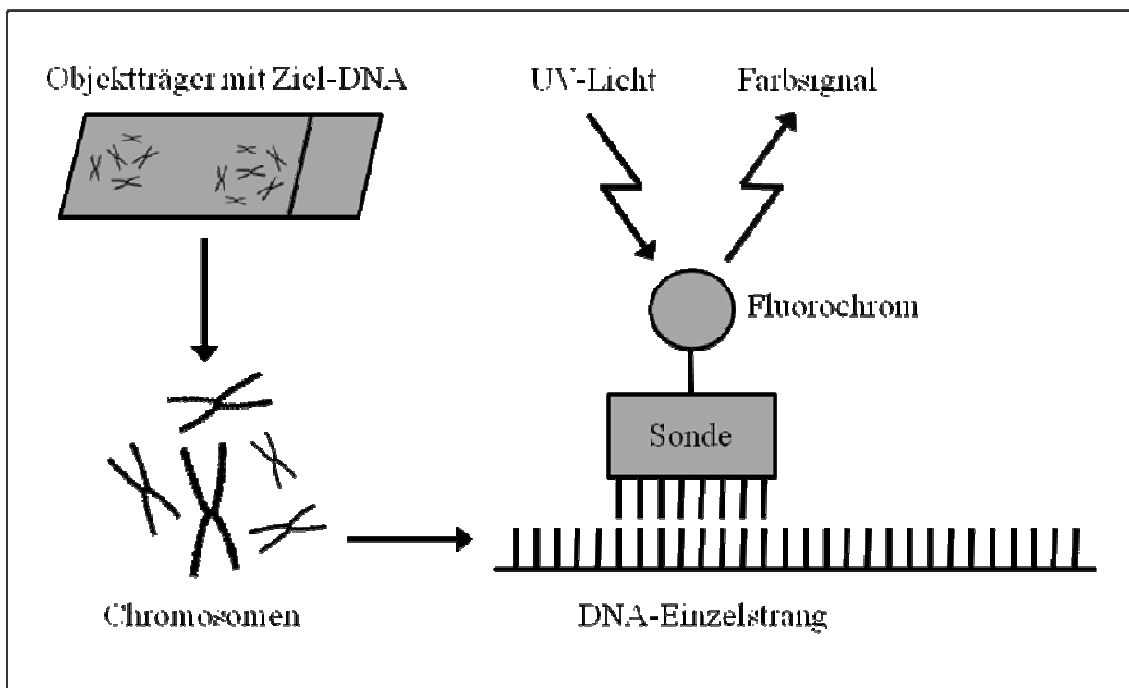
Im Wasserbad bei 73 °C für drei Minuten wurde der Sondenüberstand mittels einer Waschlösung von den OT entfernt. In der ansteigenden Alkoholreihe mit jeweils 70 %, 90 % und 100 % für fünf Minuten erfolgte die abschließende Entwässerung der Gewebeschnitte. Bei 37 °C wurden die OT in der Wärmekammer getrocknet. Die Gewebe auf den OT wurden abschließend mit einer DAPI-Vectashield-Kerngegenfärbung behandelt, um eine Verstärkung der Fluoreszenz zu erreichen.

Die Lagerung der hybridisierten TMA- und Vollschnitte erfolgte in abgedunkeltem Zustand in einem Kühlschrank bei etwa 4 °C.

2.2.8 Auswertung der Fluoreszenz hybridisierten Fälle

Die Beurteilung der hybridisierten TMAs und Vollschnitte wurde in einem abgedunkelten Raum mit einem Fluoreszenzmikroskop, welches mit Spectrum Orange-, Texas Red-, FITC-, DAPI- und Triple-Filter ausgestattet ist, durchgeführt (siehe Abbildung 9).

Abbildung 9: Prinzip der Fluoreszenz in situ Hybridisierung



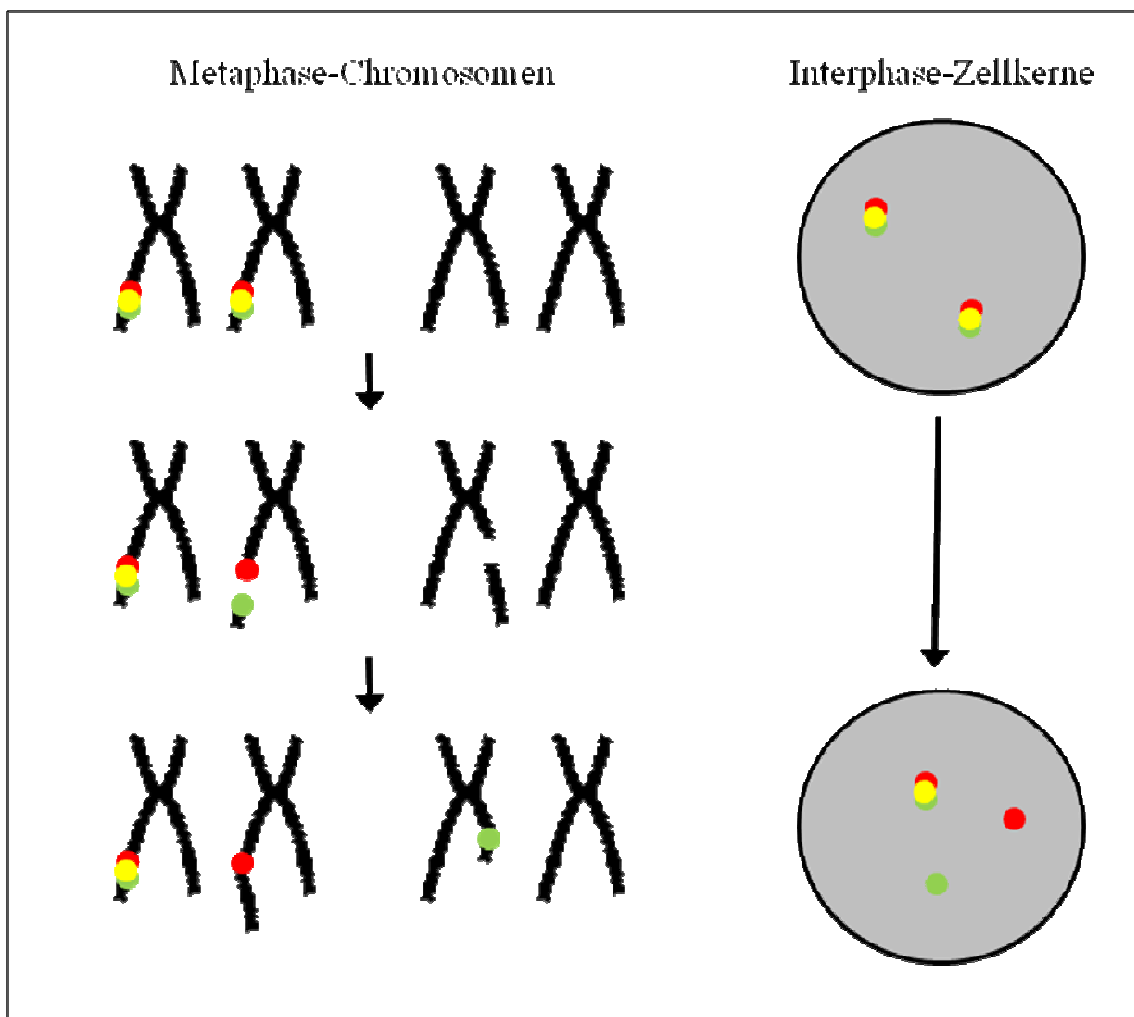
Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurden insgesamt 100 Zellkerne auf Signalkonstellationen der break-apart-Sonden begutachtet. In Vollschnitten wurden Zellen in drei verschiedenen Arealen des Gewebes untersucht, bei TMAs wurden jeweils drei Areale auf jeder der drei Stanzten eines Falles bewertet.

Eine Zelle wurde als positiv für eine bestimmte Translokation angesehen, wenn ein grünes und ein rotes Signal neben einem gelb-erscheinenden Kombinationssignal des nicht-translozierten Allels vorhanden waren. Auch wenn eines der beiden Einzelsignale gefehlt hat, so wurde die Zelle als positiv gewertet, da davon auszugehen ist, dass das fehlende Signal aufgrund der Schnittebene abhanden gekommen ist.

Als negativ für eine Translokation wurde eine Zelle gewertet, die zwei gelbe Kombinationssignale aufwies.

Zwei Signale wurden als getrennte, translozierte Sonden interpretiert, wenn der Abstand zwischen diesen größer als der zweifache durchschnittliche Signal-Durchmesser war (siehe Abbildung 10).

Abbildung 10: Break-apart-Sonden auf Metaphase-Chromosomen und am Interphase-Zellkernen



nach ¹⁵: Ventura "FISH Analysis for the Detection of Lymphoma-Associated Chromosomal Abnormalities in Routine Paraffin-Embedded Tissue" *Journal of Molecular Diagnostics* 8, 141-151 (2006).

Vor den eigentlichen FISH-Untersuchungen wurden sieben Fälle von nicht-neoplastischen, gesunden lymphatischen Geweben auf alle vier Sonden getestet, um einen Eindruck von den Eigenheiten der verschiedenen Sonden zu gewinnen, und um einen Schwellenwert für jede einzelne Sonde festzulegen.

Der cut-off-Wert einer Sonde berechnete sich aus der durchschnittlichen Anzahl positiv gewerteter Signalkonstellationen auf 100 Zellen aller sieben cut-off-Fälle, addiert um die dreifache Standardabweichung σ . Somit sollten unter Annahme einer Standardnormalverteilung der positiv gewerteten Zellen in nicht-neoplastischen Fällen 99,7% aller prozentualen Messwerte in einem Intervall von null bis zum um die dreifache Standardabweichung addierten Mittelwert liegen (siehe Formel 1).

Formel 1: Die Standardabweichung

$$\sigma_X := \sqrt{\text{Var}(X)} = \sqrt{\text{E}((X - \text{E}(X))^2)}$$
 wobei E den Erwartungswert bildet

Aus dem Schwellenwert ergab sich, dass ein Fall als positiv gewertet wurde, wenn die Zahl der positiven Zellen den cut-off-Wert überstieg. Lag die Anzahl der positiven Zellen auf dem Schwellenwert oder darunter, so galt der jeweilige Fall als negativ.

Zum statistischen Vergleich der FISH an TMAs und der konventionellen Zytogenetik wurden die statistischen Kennwerte der Sensitivität und Spezifität, des positiven und negativen prädiktiven Werts herangezogen und berechnet (siehe Formel 2, 3, 4 und 5).

Formel 2: Die Sensitivität

$$P(\text{positiv erkannt}|\text{tatsächlich positiv}) = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven}}{\text{Anzahl der richtig positiven} + \text{Anzahl der falsch negativen}}$$

Formel 3: Die Spezifität

$$P(\text{negativ erkannt}|\text{tatsächlich negativ}) = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen}}{\text{Anzahl der richtig negativen} + \text{Anzahl der falsch positiven}}$$

Formel 4: Der positive prädiktive Wert

$$P(\text{richtig positiv erkannt}|\text{positiv erkannt}) = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven}}{\text{Anzahl der richtig positiven} + \text{Anzahl der falsch positiven}}$$

Formel 5: Der negative prädiktive Wert

$$P(\text{richtig negativ erkannt}|\text{negativ erkannt}) = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen}}{\text{Anzahl der richtig negativen} + \text{Anzahl der falsch negativen}}$$

3. Ergebnisse

3.1 Schwellenwerte (cut-off-Werte)

Sieben Fälle nicht-neoplastischen lymphatischen Gewebes aus dem Archiv des pathologischen Instituts wurden mit break-apart-Sonden für BCL2, BCL6, MYC und IGH auf die jeweiligen spezifischen Bruchpunkte untersucht.

Der Schwellenwert für die jeweilige Sonde wurde durch den Mittelwert positiv gewerteter Zellen aller sieben Fälle addiert mit der zugehörigen dreifachen Standardabweichung ermittelt.

Für die BCL2-Sonde ergab sich ein rechnerischer Schwellenwert von 10 %, für die BCL6-Sonde von 8 %, für MYC-Sonde von 10 % und für IGH-Sonde von 13 % positiv gewerteten Zellen (siehe Tabelle 7).

***Tabelle 7:** Schwellenwerte (cut-off-Werte) für ein Translokationsereignis mit den Sonden BCL2, BCL6, MYC und IGH*

Fallnummer	BCL2 [%]	BCL6 [%]	MYC [%]	IGH [%]
#101	4	3	7	8
#102	1	2	5	9
#103	1	6	3	8
#104	2	0	1	3
#105	7	3	2	3
#106	4	1	4	6
#107	1	1	2	4
rechnerischer Schwellenwert	10	8	10	13
Erfahrungsschwellenwert	20	20	30	20

Aufgrund der langjährigen Erfahrung im Umgang mit den angewendeten Sonden in der Diagnostik und Forschung mittels FISH durfte allerdings angenommen werden, dass die Mehrzahl der tatsächlich für einen bestimmten Bruchpunkt positiven Fälle einen deutlich höheren Prozentsatz von Translokations-positiven Zellen aufweist, auch da es sich sehr häufig um primäre Translokationen handelt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Großteil der untersuchten Fälle an Schwellenwerten gemessen, die nicht den

rechnerischen cut-off-Werten entsprachen, sondern aufgrund der Erfahrungswerte festgelegt wurden.

Für die BCL2-, BCL6- und IGH-Sonden wurde somit ein Erfahrungs-Schwellenwert von jeweils 20 %, und für die MYC-Sonde von 30 % festgelegt. Somit wurden alle Fälle positiv gewertet, die einen Anteil positiver Zellen von mindestens 20 % für BCL2, BCL6 und IGH oder 30 % für MYC aufwiesen (siehe Tabelle 7).

3.2 Vergleich von FISH und konventioneller Zytogenetik

Um die FISH an TMAs als Hochdurchsatz-Methode zur Detektierung von Translokationen an großen Fallzahlen zu etablieren, wurden die FISH-Ergebnisse von insgesamt 45 Fällen auf vier verschiedenen TMAs mit den für alle Fälle vorliegenden Ergebnissen der konventionellen Zytogenetik als derzeitiger Gold-Standard verglichen und auf Reproduzierbarkeit der Resultate geprüft.

Bei den untersuchten Fällen handelt es sich ausschließlich um B-Zell-Lymphome, genauer um FL, DLBCL und MALT-Lymphome.

3.2.1 BCL2

Tabelle 8: Gegenüberstellung der FISH- und Zytogenetik-Ergebnisse für BCL2

Fallnummer	TMA	FISH (BCL2) [%]	konventionelle Zytogenetik (BCL2 18q21) [%]
#201	FL 3B	- (11)	-
#202	FL 3B	- (11)	-
#203	FL 3B	+ (72)	+ der(18)t(?1;18)(q32;q21)
#204	FL	- (2)	-
#205	FL	- (4)	-
#206	FL	- (0)	-
#207	FL	- (0)	-
#208	FL	- (0)	-
#209	FL	+ (39)	+ t(14;18)(q32;q21)
#210	FL	+ (86)	+ t(14;18)(q32;q21)
#211	FL	- (1)	-
#212	FL	+ (67)	+ t(14;18)(q32;q21)
#213	FL	+ (42)	+ t(14;18)(q32;q21)
#214	FL	- (2)	-
#215	FL	- (4)	-
#216	FL	- (8)	-
#217	FL	- (3)	-

+ \triangleq positiv

- \triangleq negativ

n.a. \triangleq nicht analysiert

Tabelle 8: Gegenüberstellung der FISH- und Zytogenetik-Ergebnisse für BCL2
(Fortsetzung)

Fallnummer	TMA	FISH (BCL2) [%]	konventionelle Zytogenetik (BCL2 18q21) [%]
#218	DLBCL	- (1)	-
#219	DLBCL	- (3)	-
#220	DLBCL	- (1)	-
#221	DLBCL	+ (37)	- 47~48,XY,del(1)(p11),der(5)(q31),+5,+22,+mar
#222	DLBCL	- (5)	-
#223	DLBCL	- (3)	-
#224	DLBCL	- (2)	-
#225	DLBCL	- (5)	-
#226	DLBCL	n.a.	+ t(14;18)(q32;q21)
#227	DLBCL	- (2)	-
#228	DLBCL	- (4)	-
#229	DLBCL	- (0)	-
#230	DLBCL	- (2)	-
#231	DLBCL	- (1)	-
#232	DLBCL	- (1)	-
#233	DLBCL	- (2)	-
#234	DLBCL	- (9)	-
#235	MALT	- (14)	-
#236	MALT	- (8)	-
#237	MALT	- (8)	-
#238	MALT	- (4)	-
#239	MALT	- (11)	-
#240	MALT	- (8)	-
#241	MALT	- (5)	-
#242	MALT	- (9)	-
#243	MALT	- (2)	-
#244	MALT	- (1)	-
#245	MALT	- (8)	-

+ $\hat{=}$ positiv

- $\hat{=}$ negativ

n.a. $\hat{=}$ nicht analysiert

Im Rahmen der konventionellen Zytogenetik wurden neben der balancierten Translokation t(14;18)(q32;q21) auch nicht balancierte Translokationen als positiv gewertet, wie etwa im Fall #203 mit der unbalancierten Translokation der(18)t(?1;18)(q32;q21). Von insgesamt 45 Fällen konnte in einem Fall mittels FISH kein auswertbares Ergebnis erzielt werden. In 43 von 44 Datenpaaren fand sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse (97,7 %). In 38 Fällen konnte sowohl durch FISH, als auch durch die klassische Zytogenetik ein negatives Ergebnis nachgewiesen werden, fünf Fälle zeigten sich in beiden Methoden positiv. Nur in einem Fall zeigte die FISH ein positives Ergebnis im Unterschied zum negativen Ergebnis der konventionellen Zytogenetik (2,3 %). Für den in der FISH positiven und mit Hilfe der Zytogenetik als negativ bestimmten Fall #221 wurden bei der konventionellen zytogenetischen Untersuchung lediglich vier Metaphasen untersucht, wobei von diesen wiederum nur zwei klonal waren. Beide Metaphasen zeigten den Karyotyp 47~48,XY,del(1)(p11),der(5)(q31),+5,+22,+mar (siehe Tabelle 8).

Tabelle 9: Methodenvergleich von FISH an TMAs mit konventioneller Zytogenetik für den Bruchpunkt BCL2

		konventionelle Zytogenetik		
		negativ	positiv	
FISH an TMAs	negativ	38	0	38
	positiv	1	5	6
		39	5	44 Fälle

Wurde die konventionelle Zytogenetik als Gold-Standard für die Diagnose eines Bruchereignisses im BCL2-Gen festgelegt, ergab sich somit für die FISH an TMAs eine Sensitivität von 100,0 % (5 von 5), eine Spezifität von 97,4 % (38 von 39), ein positiver prädiktiver Wert von 83,3 % (5 von 6) und ein negativer prädiktiver Wert von 100,0 % (38 von 38).

3.2.2 BCL6**Tabelle 10:** Gegenüberstellung der FISH- und Zytogenetik-Ergebnisse für BCL6

Fallnummer	TMA	FISH (BCL6) [%]	konventionelle Zytogenetik (BCL6 3q27) [%]
#201	FL 3B	- (8)	-
#202	FL 3B	- (9)	-
#203	FL 3B	+ (39)	- 42~44,XY,i(1)(q10),t(3;6)(p21;p22),add(14)(q32),-6, t(7;9)(q21;q32),der(18)t(?1;18)(q32;q21),+mar
#204	FL	+ (53)	+ add(3)(q27)
#205	FL	- (5)	-
#206	FL	+ (69)	+ ins(3)(q27-q29;p13p21)
#207	FL	- (3)	-
#208	FL	- (3)	-
#209	FL	- (0)	-
#210	FL	- (5)	-
#211	FL	- (3)	-
#212	FL	- (3)	-
#213	FL	- (0)	+ inv(3)(p21q27)
#214	FL	+ (27)	+ t(3;14)(q27;q32), der(3)t(3;14)(q27;q32)
#215	FL	- (0)	-
#216	FL	- (10)	-
#217	FL	+ (32)	+ dup(3)(q21q27)
#218	DLBCL	- (1)	-
#219	DLBCL	+ (16)	+ der(3)?t(3;?)(q27;?)
#220	DLBCL	+ (74)	- 43-45,XY,del(2)(q21q31),-6, del(9)(p13),del(10)(q22q24),+mar(2*)
#221	DLBCL	- (5)	-
#222	DLBCL	+ (25)	+ t(3;12)(q27;p11), der(12)t(3;12)(q27;p11)
#223	DLBCL	+ (80)	- 48,XY,+X,-2,+3,der(4)t(?3;4)(?q21;p16), der(6)t(2;6)(q21;q15),ins(12)(q13;q15q24)
#224	DLBCL	- (2)	+ t(3;14)(q27;q32), der(14)t(3;14)(q27;q32)
#225	DLBCL	+ (42)	- 44/48,XY,-6,+21

+ $\hat{=}$ positiv- $\hat{=}$ negativn.a. $\hat{=}$ nicht analysiert

Tabelle 10: Gegenüberstellung der FISH- und Zytogenetik-Ergebnisse für BCL6
(Fortsetzung)

Fallnummer	TMA	FISH (BCL6) [%]	konventionelle Zytogenetik (BCL6 3q27) [%]
#226	DLBCL	+ (29)	- 47,X,-X,-1,t(14;18)(q32;q21),+20,+mar1,+mar2
#227	DLBCL	+ (55)	+ t(3;14)(q27;q32), der(3)t(3;14)(q27;q32)
#228	DLBCL	- (3)	-
#229	DLBCL	- (2)	-
#230	DLBCL	- (8)	-
#231	DLBCL	- (14)	-
#232	DLBCL	- (1)	-
#233	DLBCL	+ (56)	+ dup(3)(p21q27)
#234	DLBCL	- (4)	-
#235	MALT	- (5)	-
#236	MALT	- (4)	-
#237	MALT	n.a.	-
#238	MALT	n.a.	-
#239	MALT	- (8)	-
#240	MALT	- (2)	-
#241	MALT	- (3)	-
#242	MALT	- (4)	-
#243	MALT	- (6)	-
#244	MALT	- (7)	-
#245	MALT	- (10)	-

+ \triangleq positiv

- \triangleq negativ

n.a. \triangleq nicht analysiert

Neben der balancierten Translokation t(3;14)(q27;q32) wurden auch nicht balancierte Translokationen mit Einbegreifen der 3q27-Region in der Zytogenetik als positiv gewertet. Bei zwei von insgesamt 45 Fällen konnte mittels FISH kein auswertbares Resultat erzielt werden.

Von 43 Fällen stimmten in 36 Fällen die Ergebnisse von FISH und Zytogenetik überein (36 von 43; 83,7 %). Dabei wurden jeweils übereinstimmend negative Resultate in 28 Fällen und übereinstimmend positive Ergebnisse in acht Fällen beobachtet. In sieben Fällen konnte eine Übereinstimmung nicht nachgewiesen werden (7 von 43; 16,3 %). Hierbei zeigte die FISH in fünf Fällen ein positives Ergebnis im Vergleich zum

negativen Resultat in der konventionellen Zytogenetik, und in zwei Fällen war das Ergebnis der FISH negativ obwohl die Zytogenetik diesen Fall als positiv wertete.

Bei der zytogenetischen Auswertung der durch FISH positiv und mittels Zytogenetik negativ bestimmten Fälle wurden unterschiedliche Anzahlen an Metaphasen untersucht. Für den Fall #203 wurden sieben klonale Metaphasen, für den Fall #220 15 klonale Metaphasen, für den Fall #225 drei klonale Metaphasen und für den Fall #226 nur zwei klonale Metaphasen analysiert. Für den Fall #223 fanden sich in der zytogenetischen Datenbank keine Angaben zur Anzahl der untersuchten Metaphasen.

Bemerkenswert war die Beobachtung, dass die durch Zytogenetik aufgedeckten Aberrationen im Falle von Inversionen und Deletionen mit einem negativen Ergebnis in der FISH assoziiert waren, während Additionen und Duplikationen mit einem positiven Resultat verbunden waren.

Tabelle 11: Methodenvergleich von FISH an TMAs mit konventioneller Zytogenetik für den Bruchpunkt BCL6

		konventionelle Zytogenetik		
		negativ	positiv	
FISH an TMAs	negativ	28	2	30
	positiv	5	8	13
		33	10	43 Fälle

Der Nachweis eines BCL6-Bruchs mittel FISH an TMAs im Vergleich zur klassischen Zytogenetik als Gold-Standard erbrachte eine Sensitivität von 80,0 % (8 von 10), eine Spezifität von 84,8 % (28 von 33), einen positiven prädiktiven Wert von 61,5 % (8 von 13) und einen negativen prädiktiven Wert von 93,3 % (28 von 30).

3.2.3 MYC**Tabelle 12: Gegenüberstellung der FISH- und Zytogenetik-Ergebnisse für MYC**

Fallnummer	TMA	FISH (MYC) [%]	konventionelle Zytogenetik (MYC 8q24) [%]
#201	FL 3B	- (13)	-
#202	FL 3B	- (7)	-
#203	FL 3B	+ (52)	- 42~44,XY,i(1)(q10),t(3;6)(p21;p22),add(14)(q32),-6, t(7;9)(q21;q32),der(18)t(?1;18)(q32;q21),+mar
#204	FL	- (6)	-
#205	FL	- (4)	-
#206	FL	- (7)	-
#207	FL	n.a.	-
#208	FL	- (3)	-
#209	FL	- (19)	-
#210	FL	- (2)	-
#211	FL	- (2)	-
#212	FL	n.a.	-
#213	FL	- (1)	-
#214	FL	- (2)	+ q23;q24der(8)t(8;?8)(p21or22;q23or24)
#215	FL	+ (27)* ¹	+ q24t(8;14)(q24;q32), der(14)t(8;14)(q24;q32)
#216	FL	- (3)	-
#217	FL	- (0)	-
#218	DLBCL	- (2)	-
#219	DLBCL	- (2)	-
#220	DLBCL	- (7)	-
#221	DLBCL	+ (50)	-
#222	DLBCL	- (12)	-
#223	DLBCL	- (3)	-
#224	DLBCL	- (2)	-
#225	DLBCL	- (8)	-
#226	DLBCL	n.a.	-
#227	DLBCL	- (2)	-
#228	DLBCL	- (5)	-
#229	DLBCL	- (0)	-

+ \triangleq positiv- \triangleq negativn.a. \triangleq nicht analysiert

*¹ Die grenzwertig negativen Fälle #215 und #241 wurden von einem weiteren unabhängigen Beobachter als eindeutig positiv bestimmt.

Tabelle 12: Gegenüberstellung der FISH- und Zytogenetik-Ergebnisse für MYC
(Fortsetzung)

Fallnummer	TMA	FISH (MYC) [%]	konventionelle Zytogenetik (MYC 8q24) [%]
#230	DLBCL	- (10)	-
#231	DLBCL	- (9)	-
#232	DLBCL	- (10)	-
#233	DLBCL	- (3)	-
#234	DLBCL	- (8)	-
#235	MALT	- (16)	-
#236	MALT	- (7)	-
#237	MALT	- (6)	-
#238	MALT	- (23)	-
#239	MALT	- (21)	-
#240	MALT	- (9)	-
#241	MALT	+ (28)* ¹	+ t(8;14)(q24;q32)
#242	MALT	- (11)	-
#243	MALT	- (8)	+ t(8;14)(q24;q32)
#244	MALT	- (24)	-
#245	MALT	- (18)	-

+ \triangleq positiv

- \triangleq negativ

n.a. \triangleq nicht analysiert

*¹ Die grenzwertig negativen Fälle #215 und #241 wurden von einem weiteren unabhängigen Beobachter als eindeutig positiv bestimmt.

Neben der klassischen balancierten Translokation t(8;14)(q24;q32) wurden auch nicht balancierte Translokationen der Chromosomenregion 8q24 in der Zytogenetik als positiv gewertet.

Für den Genlokus 8q24 konnten insgesamt 42 aus 45 Fälle verglichen werden, bei denen sowohl Ergebnisse der FISH-Untersuchung als auch der konventionellen Zytogenetik vorlagen. In drei Fällen konnte mit der FISH kein auswertbares Resultat erzielt werden.

Ein übereinstimmend negatives Ergebnis für eine Veränderung des 8q24 Genlokus zeigte sich in 36 Fällen. Ein positives Ergebnis der FISH- und Zytogenetik-Untersuchungen lag in nur zwei Fällen vor. Somit konnte in insgesamt 38 Fällen ein übereinstimmendes Ergebnis gefunden werden (38 von 42; 90,5 %). In vier Fällen

konnte keine Übereinstimmung aufgezeigt werden (4 von 42; 9,5 %). In zwei Fällen erbrachte nur die FISH-Untersuchung ein positives Ergebnis, während in weiteren zwei Fällen ausschließlich die konventionelle Zytogenetik ein positives Resultat aufwies.

Bei den durch FISH positiv und mittels Zytogenetik negativ eingestuften Fällen wurden für #203 sieben Metaphasen, davon sechs klonal, und für #221 vier Metaphasen, davon nur zwei klonal, zytogenetisch untersucht.

Tabelle 13: *Methodenvergleich von FISH an TMAs mit konventioneller Zytogenetik für den Bruchpunkt MYC*

		konventionelle Zytogenetik		
		negativ	positiv	
FISH an TMAs	negativ	36	2	38
	positiv	2	2	4
		38	4	42 Fälle

Im direkten Vergleich zur konventionellen Zytogenetik zeigte die FISH an TMAs für einen Bruchpunkt im MYC-Gen eine Sensitivität von 50,0 % (2 von 4), eine Spezifität von 94,7 % (36 von 38), einen positiven prädiktiven Wert von 50,0 % (2 von 4) und einen negativen prädiktiven Wert von 94,7 % (36 von 38).

3.2.4 IGH

Tabelle 14: Gegenüberstellung der FISH- und Zytogenetik-Ergebnisse für IGH

Fallnummer	TMA	FISH (IGH) [%]	konventionelle Zytogenetik (IGH 14q32) [%]	FISH an Frischgewebe IGH [%]
#201	FL 3B	- (17)	-	n.a.
#202	FL 3B	- (10)	-	- (3)
#203	FL 3B	+ (31, 25)	+ add(14)(q32)	+ (27)
#204	FL	- (12,6)	-	- (16)
#205	FL	+ (55, 62, 23)	- 42~45,X,-Y, +add(3)(p21or22)[11], add(4)(q35),+add(4)(p16), del(6)(q13or15q25)[7],-8[4], -9,add(17)(p11), add(19)(q13), der(21)t(9;21)(p11or13; q11or12)[11];[cp12]	+ (28)
#206	FL	+ (87, 66)	+ t(10;14)(q24;q32)	+ (31)
#207	FL	- (9,2)	-	-
#208	FL	- (8, 11)	-	-
#209	FL	+ (75, 32)	+ t(14;18)(q32;q21)	+ (72)
#210	FL	+ (81, 78)	+ t(14;18)(q32;q21)	+ (46)
#211	FL	- (16, 6)	-	-
#212	FL	+ (52)	+ t(14;18)(q32;q21)	+ (79)
#213	FL	+ (50, 35)	+ t(14;18)(q32;q21)	+ (29)
#214	FL	+ (41, 47)	+ t(3;14)(q27 ;q32), der(3)t(3;14)(q27 ;q32)	-
#215	FL	+ (31, 30, 32)	+ t(8;14)(q24;q32), der(14)t(8;14)(q24;q32)	+ (20)
#216	FL	- (11, 5)	-	-
#217	FL	- (8, 4)	-	-
#218	DLBCL	- (7)	-	n.a.
#219	DLBCL	- (7)	-	n.a.
#220	DLBCL	- (4)	-	n.a.
#221	DLBCL	+ (39)	- 47~48,XY,del(1)(p11), der(5)(q31),+5,+22,+mar	n.a.

+ \triangleq positiv

- \triangleq negativ

n.a. \triangleq nicht analysiert

Tabelle 14: Gegenüberstellung der FISH- und Zytogenetik-Ergebnisse für IGH
(Fortsetzung)

Fallnummer	TMA	FISH (IGH) [%]	konventionelle Zytogenetik (IGH 14q32) [%]	FISH an Frischgewebe IGH [%]
#222	DLBCL	- (12)	-	n.a.
#223	DLBCL	- (17)	-	n.a.
#224	DLBCL	- (19)	+ t(3;14)(q27;q32), der(14)t(3;14)(q27;q32)	n.a.
#225	DLBCL	n.a.	-	n.a.
#226	DLBCL	n.a.	+ t(14;18)(q32;q21)	n.a.
#227	DLBCL	+ (95)	+ t(3;14)(q27 ;q32), der(3)t(3;14)(q27 ;q32)	n.a.
#228	DLBCL	+ (61)	+ der(14)t(14;?)(q32;?)	n.a.
#229	DLBCL	- (4)	-	n.a.
#230	DLBCL	+ (45)	+ add(14)(q32)	n.a.
#231	DLBCL	- (5)	-	- (23)
#232	DLBCL	- (13)	-	-
#233	DLBCL	- (4)	-	n.a.
#234	DLBCL	+ (34)	+ add(14)(q32)x2	n.a.
#235	MALT	- (7, 8)	-	-
#236	MALT	+ (77, 62, 70)	+ t(3;14)(p21;q32)	-
#237	MALT	- (12, 13)	-	-
#238	MALT	- (11, 8, 7)	-	- (17)
#239	MALT	+ (67, 70)	+ t(3;14)(p21;q32)	- (4)
#240	MALT	- (10, 10)	-	- (4)
#241	MALT	+ (88, 82)	+ t(8;14)(q24;q32)	+ (62)
#242	MALT	- (11, 7)	-	- (12)
#243	MALT	+ (97, 92)	+ t(8;14)(q24;q32)	+ (46)
#244	MALT	- (11, 11)	+ t(2;14)(q21;32)	+ (29)
#245	MALT	- (5, 6)	-	-

+ $\hat{=}$ positiv

- $\hat{=}$ negativ

n.a. $\hat{=}$ nicht analysiert

Bei der zytogenetischen Untersuchung der Fälle wurden neben balancierten Translokationen auch nicht balancierte Translokationen und chromosomale Hinzugewinne in der Chromosomenbande 14q32 als positiv gewertet.

Bei 45 Fällen, die mit FISH und klassischer Zytogenetik auf Veränderungen des 14q32 Genlokus untersucht wurden, konnten in 43 Fällen identische Befunde erhoben werden.

In zwei Fällen konnte durch die FISH kein auswertbares Ergebnis erzielt werden.

Bei 39 der 43 Fälle mit vorhandenen Datenpaaren konnte ein übereinstimmendes Ergebnis gefunden werden (39 von 43; 90,7 %). Dabei konnten bei 23 Fällen sowohl in der FISH-Untersuchung als auch in der Zytogenetik keine Veränderungen des Genlokus 14q32 beobachtet werden. Ein übereinstimmend positives Ergebnis wurde in 16 Fällen nachgewiesen. In vier Fällen erbrachten die FISH und die Zytogenetik kein übereinstimmendes Ergebnis (4 von 43; 9,3 %). Zwei dieser Fälle wurden durch die FISH als negativ, aber in der Zytogenetik als positiv bestimmt. Ein positives Ergebnis der FISH im Gegensatz zur Zytogenetik wurde in zwei Fällen aufgedeckt (2 von 43; 4,7 %). Für diese beiden Fälle wurden bei der zytogenetischen Begutachtung für den Fall #205 zwölf Metaphasen, die alle klonal waren, beziehungsweise für den Fall #221 nur vier Metaphasen, davon zwei klonal, untersucht. Für 29 Fälle lagen auch Daten einer FISH-Untersuchung an Frischgewebe vor, teilweise mit Prozentangaben für positiv gewertete Zellen. In 24 Fällen bestätigt diese zusätzliche Untersuchung die erhobenen Ergebnisse (24 von 29; 82,8 %). Drei Fälle wurden durch Frischgewebe-FISH als negativ bewertet, obwohl sowohl die herkömmliche FISH als auch die konventionelle Zytogenetik die beiden Fälle als positiv bestimmt hatten. In einem weiteren Fall unterstützte die FISH an Frischgewebe das positive Ergebnis der normalen FISH im Gegensatz zum negativen Ergebnis der konventionellen Zytogenetik. Und in einem letzten Fall zeigten sowohl Frischgewebe-FISH als auch Zytogenetik ein positives Ergebnis, während die normale FISH ein negatives Resultat erbrachte.

Tabelle 15: Methodenvergleich von FISH an TMAs mit konventioneller Zytogenetik für den Bruchpunkt IGH

		konventionelle Zytogenetik		
		negativ	positiv	
FISH an TMAs	negativ	23	2	25
	positiv	2	16	18
		25	18	43 Fälle

Wurde die konventionelle Zytogenetik als Gold-Standard für den Nachweis eines IGH-Bruchs bestimmt, so erreichte die FISH an TMAs eine Sensitivität von 88,9 % (16 von 18), eine Spezifität von 92,0 % (23 von 25), einen positiven prädiktiven Wert von 88,9 % (16 von 18) und einen negativen prädiktiven Wert von 92,0 % (23 von 25).

3.2.5 Überblick**Tabelle 16:** FISH- und Zytogenetik-Ergebnisse für BCL2, BCL6, MYC und IGH

Fallnummer	TMA	BCL2	BCL6	MYC	IGH
#201	FL 3B	-	-	-	-
#202	FL 3B	-	-	-	-
#203	FL 3B	+	FISH + Zytogenetik -	FISH + Zytogenetik -	+
#204	FL	-	+	-	-
#205	FL	-	-	-	FISH + Zytogenetik -
#206	FL	-	+	-	+
#207	FL	-	-	n.a.	-
#208	FL	-	-	-	-
#209	FL	+	-	-	+
#210	FL	+	-	-	+
#211	FL	-	-	-	-
#212	FL	+	-	n.a.	+
#213	FL	+	FISH - Zytogenetik +	-	+
#214	FL	-	+	FISH - Zytogenetik +	+
#215	FL	-	-	+	+
#216	FL	-	-	-	-
#217	FL	-	+	-	-
#218	DLBCL	-	-	-	-
#219	DLBCL	-	+	-	-
#220	DLBCL	-	FISH + Zytogenetik -	-	-
#221	DLBCL	FISH + Zytogenetik -	-	FISH + Zytogenetik -	FISH + Zytogenetik -
#222	DLBCL	-	+	-	-
#223	DLBCL	-	FISH + Zytogenetik -	-	-
#224	DLBCL	-	FISH - Zytogenetik +	-	FISH - Zytogenetik +
#225	DLBCL	-	FISH + Zytogenetik -	-	n.a.
#226	DLBCL	n.a.	FISH + Zytogenetik -	n.a.	n.a.
#227	DLBCL	-	+	-	+
#228	DLBCL	-	-	-	+

+ \triangleq positiv- \triangleq negativn.a. \triangleq nicht analysiert

Tabelle 16: FISH- und Zytogenetik-Ergebnisse für BCL2, BCL6, MYC und IGH (Fortsetzung)

Fallnummer	TMA	BCL2	BCL6	MYC	IGH
#229	DLBCL	-	-	-	-
#230	DLBCL	-	-	-	+
#231	DLBCL	-	-	-	-
#232	DLBCL	-	-	-	-
#233	DLBCL	-	+	-	-
#234	DLBCL	-	-	-	+
#235	MALT	-	-	-	-
#236	MALT	-	-	-	+
#237	MALT	-	n.a.	-	-
#238	MALT	-	n.a.	-	-
#239	MALT	-	-	-	+
#240	MALT	-	-	-	-
#241	MALT	-	-	+	+
#242	MALT	-	-	-	-
#243	MALT	-	-	FISH - Zytogenetik +	+
#244	MALT	-	-	-	FISH - Zytogenetik +
#245	MALT	-	-	-	-

+ \triangleq positiv

- \triangleq negativ

n.a. \triangleq nicht analysiert

Von 45 Fällen lagen Daten von 39 Fällen zu allen vier untersuchten Genloci vor. Eine fehlende Übereinstimmung der FISH- und Zytogenetik-Resultate mindestens für einen Genlocus fand sich bei zehn Fällen, die Datenpaare für alle Genloki vorliegen hatten (10 von 39; 25,6 %). Entsprechend fand sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse von FISH und konventioneller Zytogenetik über alle vier untersuchten Loci hinweg bei 29 Fällen (29 von 39; 74,4 %).

Tabelle 17: Methodenvergleich von FISH an TMAs mit konventioneller Zytogenetik für alle untersuchten Fälle und Bruchpunkte

		konventionelle Zytogenetik		
		negativ	positiv	
FISH an TMAs	negativ	125	6	131
	positiv	10	31	41
		135	37	172 Fälle

Vergleicht man die Ergebnisse sämtlicher hybridisierten Fälle mit den Daten der Zytogenetik als Gold-Standard, ergibt sich für die FISH an TMAs eine Sensitivität von 83,8 % (31 von 37), eine Spezifität von 92,6 % (125 von 135), einen positiven prädiktiven Wert von 75,6 % (31 von 41) und einen negativen prädiktiven Wert von 95,4 % (125 von 131).

Abbildung 11: Vergleich der Ergebnisse von FISH und konventioneller Zytogenetik für die einzelnen Bruchpunkte BCL2, BCL6, MYC und IGH

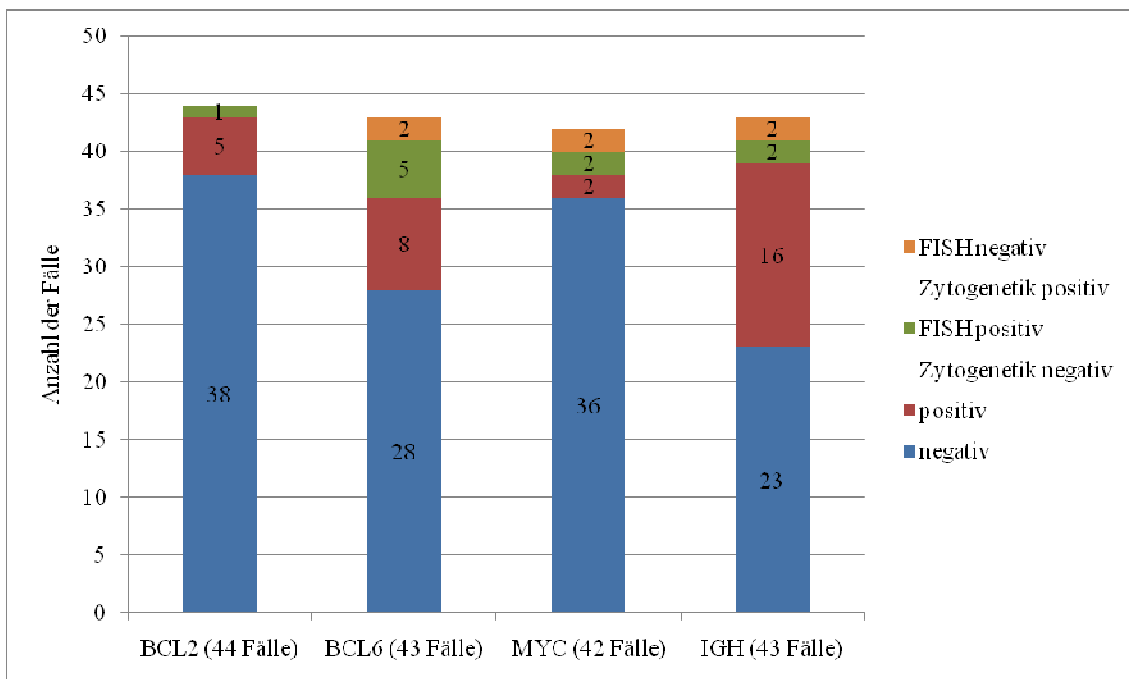


Abbildung 12: Vergleich der Ergebnisse von FISH und konventioneller Zytogenetik für die einzelnen Bruchpunkte BCL2, BCL6, MYC und IGH im TMA FL 3B und TMA FL

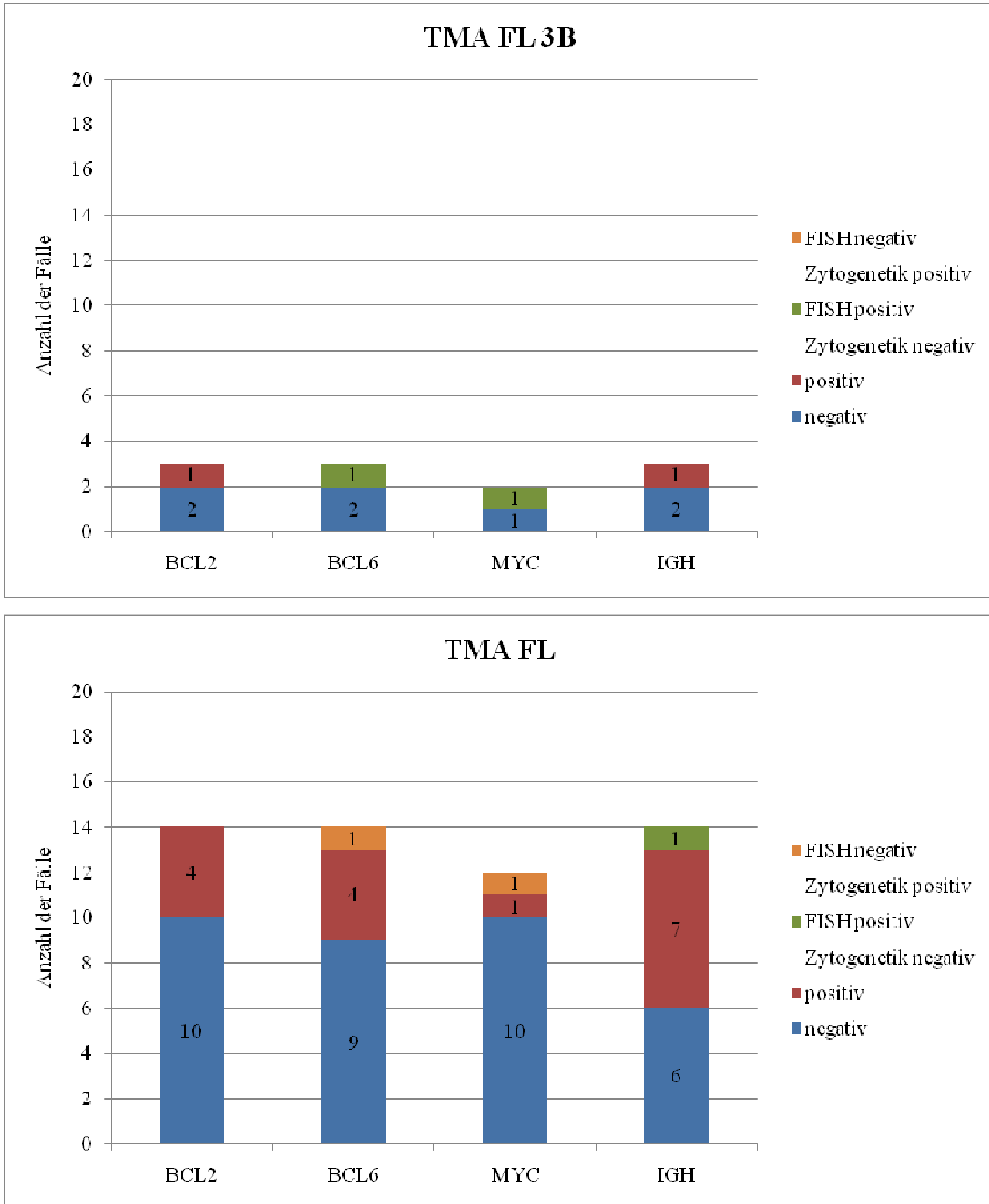
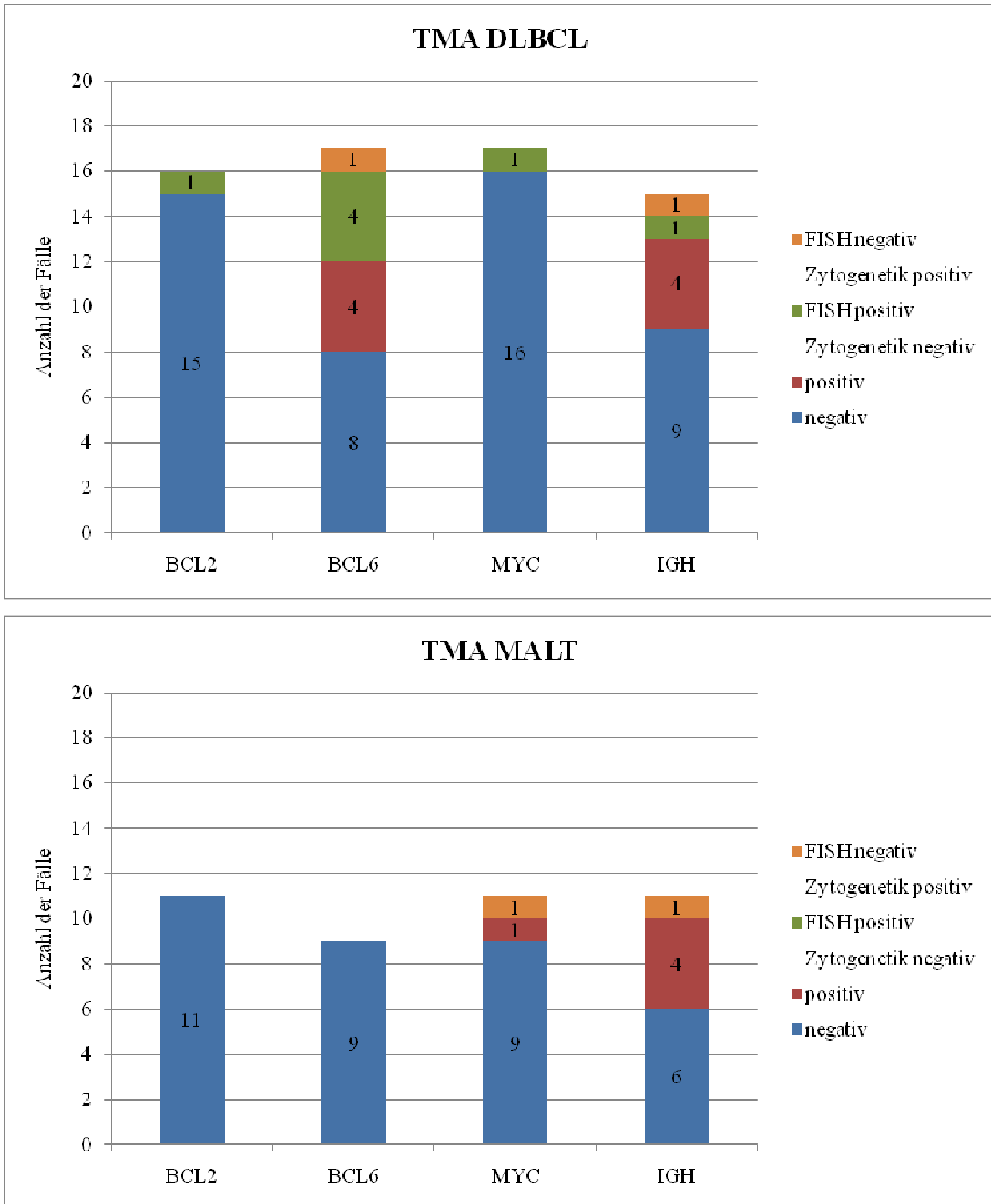


Abbildung 13: Vergleich der Ergebnisse von FISH und konventioneller Zytogenetik für die einzelnen Bruchpunkte BCL2, BCL6, MYC und IGH im TMA DLBCL und TMA MALT



3.3 Zytogenetische Charakterisierung der Follikulären Lymphome Grad 3B (FL 3B)

3.3.1 Diagnosestellung

Insgesamt wurden jeweils 47 Fälle mit den Sonden BCL2, BCL6, MYC und IGH hybridisiert. Außerdem wurden zur detaillierteren Charakterisierung der Lymphome immunhistochemische Färbungen für BCL2, BCL6, CD5, CD10, CD20, IRF4/MUM1, TCL1, Ki67, p53, kappa (κ) und lambda (λ) durchgeführt. Ein histopathologisches Review dieser Fälle hatte ergeben, dass es sich um rein follikulär wachsende FL 3B, aber auch andere follikuläre Lymphome (FL 1 bis FL 3A), Kombinationen aus diesen und Kombinationen mit DLBCL handelte. Im Weiteren wurden die Fälle entsprechend ihrer am häufigsten gestellten Diagnose in drei unabhängigen und blind durchgeführten Re-Reviews in drei verschiedene Gruppen - sicher (Gruppe 1), zweifelhaft (Gruppe 2) und negativ (Gruppe 3) unterteilt (siehe Tabelle 18 und 19).

Tabelle 18: Einteilung der untersuchten FL nach Diagnose in Gruppen

Gruppe 1	Rein follikuläre FL 3B
Gruppe 2	FL 3A, FL 3B und FL 3U, insbesondere Kombinationen aus den Genannten
Gruppe 3	FL 1, FL 2, FL 3A mit oder ohne LCC-Komponente, Kombinationen aus den Genannten

Tabelle 19: Einteilung der Follikulären Lymphome (FL) nach Diagnosen in Gruppen

Fallnummer	1. Diagnosedurchgang	2. Diagnosedurchgang	3. Diagnosedurchgang	Gruppe
#301	n.a.	FL 3B	FL 3B	1
#302	n.a.	n.a.	FL 3B	1
#303	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#304	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#305	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#306	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#307	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#308	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#309	n.a.	CB follikulär* ¹	FL 3B	1

n.a. \triangleq nicht analysiert

*¹ entsprechend Kiel-Klassifikation

Tabelle 16: Einteilung der Follikulären Lymphome (FL) nach Diagnosen in Gruppen
(Fortsetzung)

Fallnummer	1. Diagnosedurchgang	2. Diagnosedurchgang	3. Diagnosedurchgang	Gruppe
#310	n.a.	CB fllikulär* ¹	FL 3B + DLBCL	1
#311	n.a.	n.a.	FL 3B	1
#312	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#313	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#314	FL 3B	FL 3B	FL 3B	1
#315	FL 3	FL 3B	FL 3B	1
#316	n.a.	FL 3B	FL 3B	1
#317	FL 3B	FL 3B; FL 3A	FL 3B	1
#318	FL 3B + DLBCL	FL 3B	FL 3B	1
#319	n.a.	FL 3B	FL 3B	1
#320	n.a.	CB fllikulär	FL 3B	1
#321	n.a.	CB fllikulär	FL 3B	1
#322	n.a.	CB fllikulär	FL 3B	1
#323	n.a.	CB fllikulär	FL 3B	1
#324	n.a.	n.a.	FL 3U	2
#325	FL 3B	FL 3B; FL 2	FL 3A + FL 3B	2
#326	n.a.	FL 3B	FL 1 + FL 3B	2
#327	FL 3B	FL 3B	FL 3U	2
#328	n.a.	FL 3B	FL 3U	2
#329	FL 3B	FL 3B	FL 3A LCC	2
#330	FL 3B	FL 3B	FL 3A	2
#331	FL 3A	FL 3B	FL 3A	2
#332	FL 3B	FL 3B	FL 3U	2
#333	FL 3B	FL 3B; FL 3A	FL 3A	2
#334	FL 3B + DLBCL	FL 3B	FL 3A	2
#335	FL 3B	FL 3B	FL 3U	2
#336	FL 1 - FL 2	FL 3B	FL 3B	2
#337	FL 3B	FL 3A LCC; FL 3B	FL 3U	2
#338	FL 3B	FL 3B	FL 2	2
#339	FL 3A	FL 1 - FL 3A	FL 2	3
#340	FL 3B	FL 3B; FL 3A LCC	FL 3A LCC	3
#341	FL 3A; DLBCL	FL 3A LCC	FL 1 - FL 2 LCC	3
#342	FL 3B	FL 3A LCC	FL 1 - FL 2 LCC	3
#343	FL 3B	FL 3A LCC	FL 1 - FL 2	3
#344	FL 3A	FL 3A LCC	FL 1 - FL 2 LCC	3
#345	FL 1 - FL 3B	FL 3A LCC	FL 2 + FL 3A	3
#346	FL 3B	FL 3A LCC	FL 1 LCC	3
#347	FL 1 - FL 3B	FL 3A LCC	FL 1 LCC	3

n.a. ≙ nicht analysiert

*¹ entsprechend Kiel-Klassifikation

3.3.2 FISH - BCL2, BCL6, MYC und IGH*Tabelle 20: FISH-Ergebnisse für BCL2, BCL6, MYC und IGH*

Fallnummer	Gruppe	BCL2 [%]	BCL6 [%]	MYC [%]	IGH [%]
#301	1	- (5)	- (1)	- (11)	- (12)
#302	1	+ (40)	- (8)	- (10)	+ (40)
#303	1	- (5)	+ (72)	- (21)	+ (65)
#304	1	- (9)	+ (75)	- (18)	+ (79)
#305	1	- (2)	- (7)	- (9)	+ (20)
#306	1	- (3)	- (6)	- (14)	- (6)
#307	1	- (7)	- (5)	- (6)	- (5)
#308	1	- (10)	+ (95)	- (17)	- (9)
#309	1	- (11)	- (8)	- (13)	- (17)
#310	1	- (5)	+ (15)	- (12)	+ (21)
#311	1	- (10)	- (18)	+ (50)	+ (30)
#312	1	- (5)	- (8)	- (9)	- (19)
#313	1	- (3)	- (1)	- (2)	- (8)
#314	1	- (7)	- (9)	+ (39)	- (11)
#315	1	- (2)	- (5)	- (18)	- (4)
#316	1	- (1)	- (2)	- (2)	- (8)
#317	1	- (7)	- (4)	- (9)	- (16)
#318	1	- (4)	- (4)	+ (49)	+ (82)
#319	1	- (2)	- (2)	+ (76)	+ (67)
#320	1	- (9)	- (4)	- (11)	- (5)
#321	1	- (11)	- (9)	- (7)	- (10)
#322	1	- (5)	- (5)	- (5)	+ (31)
#323	1	+ (72)	+ (39)	+ (52)	+ (31)
#324	2	+ (20)	- (6)	- (7)	+ (21)
#325	2	+ (14)	- (7)	- (11)	+ (17)
#326	2	- (3)	- (0)	- (11)	- (7)
#327	2	- (2)	+ (75)	- (16)	+ (52)
#328	2	- (3)	- (12)	+ (55)	- (17)
#329	2	- (0)	- (3)	- (10)	- (14)
#330	2	+ (21)	- (11)	- (11)	+ (30)
#331	2	- (4)	+ (53)	- (7)	+ (31)
#332	2	+ (82)	- (14)	+ (78)	+ (81)
#333	2	- (7)	- (8)	- (11)	- (9)
#334	2	- (1)	- (5)	- (7)	- (16)

+ \triangleq positiv- \triangleq negativ

Tabelle 20: FISH-Ergebnisse für BCL2, BCL6, MYC und IGH (Fortsetzung)

Fallnummer	Gruppe	BCL2 [%]	BCL6 [%]	MYC [%]	IGH [%]
#335	2	+ (25)	- (4)	- (7)	+ (18)
#336	2	- (3)	- (3)	- (5)	- (19)
#337	2	- (6)	- (8)	- (9)	- (13)
#338	2	+ (78)	- (10)	- (7)	+ (53)
#339	3	+ (40)	- (3)	- (22)	+ (42)
#340	3	- (1)	- (5)	- (16)	- (11)
#341	3	+ (45)	- (7)	- (8)	+ (51)
#342	3	+ (65)	- (8)	+ (71)	+ (55)
#343	3	+ (73)	- (4)	+ (82)	+ (58)
#344	3	+ (84)	- (10)	- (21)	+ (74)
#345	3	- (4)	+ (69)	- (4)	+ (34)
#346	3	+ (64)	- (17)	- (9)	+ (17)
#347	3	+ (81)	+ (69)	- (6)	+ (47)

+ \triangleq positiv

- \triangleq negativ

Für einige Fälle lagen Daten einer FISH-Untersuchung mit einer BCL2-IGH-Fusionssonde oder der konventionellen Zytogenetik vor. Wurde bei diesen Untersuchungen ein abweichendes Ergebnis festgestellt, wurden die entsprechenden Fälle trotz abweichender Prozentangaben entsprechend korrigiert. Für den Fall #310 war eine BCL6-Translokation t(3;14)(q27;q32) zytogenetisch nachgewiesen. In den Fällen #325, #335 und #346 konnte mittels BCL2-IGH-Fusionssonde eine t(14;18)(q32;q21) gezeigt werden.

Von 47 mit der BCL2-Sonde hybridisierten Fällen wurden 32 Fälle als negativ (32 von 47; 68,1 %) und 15 Fälle als positiv für einen BCL2-Bruchpunkt bestimmt (15 von 47; 31,9 %). Innerhalb der Gruppe der reinen FL 3B mit 23 Fällen lagen nur zwei positiv gewertete Fälle vor (2 von 23; 8,7 %), und somit sind 21 Fälle negativ für BCL2 (21 von 23; 91,3 %). In der Gruppe 2 mit 15 Fällen fand sich bei neun Fällen ein negatives Ergebnis (9 von 15; 60,0 %), und in sechs Fällen ein positives Resultat (6 von 15; 40,0 %). Von neun Fällen in der Gruppe 3 waren zwei Fälle negativ (2 von 9; 22,2 %), sieben Fälle positiv (7 von 9; 77,8 %).

Die BCL6-Sonde erbrachte bei 47 untersuchten Fällen in 38 Fällen ein negatives Ergebnis (38 von 47; 80,9 %), neun Fällen wurden als positiv eingestuft (9 von 47; 19,1 %). In Gruppe 1 zeigte sich ein negatives Resultat für BCL2 in 18 Fällen (18 von 23; 78,3 %), ein positives Ergebnis in fünf Fällen (5 von 23; 21,7 %). Innerhalb der Gruppe 2 waren 13 Fälle negativ (13 von 15; 86,7 %) und zwei Fälle positiv (2 von 15; 13,3 %). Sieben Fälle in der Gruppe 3 wurden als negativ gewertet (7 von 9; 77,8 %), zwei Fälle als positiv (2 von 9; 22,2 %).

Mit der MYC-Sonde konnte in 38 von 47 Fällen kein Bruch nachgewiesen werden (37 von 47; 80,9 %), in neun Fällen zeigte sich eine Translokation (9 von 47; 19,1 %). In der Gruppe der reinen FL 3B wurden 18 Fälle als negativ gewertet (18 von 23; 78,3 %), fünf Fälle als positiv (5 von 23; 21,7 %). Von 15 Fällen der Gruppe 2 waren 13 Fälle negativ (13 von 15; 86,7 %), zwei Fälle positiv (2 von 15; 13,3 %). Die Gruppe 3 erbrachte sieben negative Fälle (7 von 9; 77,8 %) und zwei positive Fälle für einen Bruchpunkt in MYC (2 von 9; 22,2 %).

Für den IGH-Genlokus konnte in 21 Fällen keine Translokation festgestellt werden (21 von 47; 44,7 %), in 26 Fällen konnte ein Bruch gezeigt werden (26 von 47; 55,3 %). In der Gruppe 1 zeigte sich in 13 Fällen ein negatives Resultat (13 von 23; 56,5 %), in zehn Fällen ein positives Ergebnis (10 von 23; 43,5 %). Die Gruppe 2 erbrachte sieben negative Fälle (7 von 15; 46,7 %) und acht positive Fälle (8 von 15; 53,3 %). In der Gruppe 3 zeigte sich nur ein Fall negativ für IGH (1 von 9; 11,1 %), acht Fälle waren positiv (8 von 9; 88,9 %).

Bei 18 von 47 untersuchten Fällen fand sich unter Betrachtung aller Sonden keine Veränderungen, die mit den verwendeten Sonden nachgewiesen werden konnten (18 von 47; 38,3 %). In 29 Fällen zeigte sich mindestens eine oder eine Kombination von Bruchereignissen (29 von 47; 61,7 %). Von 23 Fällen in der Gruppe 1 konnten elf Fälle als negativ für alle getesteten Sonden beschrieben werden (11 von 23; 47,8 %), in der Gruppe 2 waren sechs von 15 Fällen einheitlich negativ (6 von 15; 40,0 %) und in der Gruppe 3 war nur ein einziger Fall negativ für alle Sonden (1 von 9; 11,1 %).

Ein übereinstimmender Bruch, der sowohl im BCL2- als auch im IGH-Genlokus lag, ohne dass weitere Brüche in BCL6 oder MYC vorlagen, und somit auf eine BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation schließen ließ, konnte in zehn Fällen aufgedeckt werden. Diese Veränderung stellte somit das häufigste Bruchereignis in dieser Untersuchung dar. Eine derartige Bruchkombination fand sich in einem Fall der Gruppe 1, in fünf Fällen der Gruppe 2 und in vier Fällen der Gruppe 3.

In keinem einzigen Fall konnte ein Bruchpunkt im BCL2-Gen ohne dem gleichzeitigen Vorliegen eines IGH-Bruchs gezeigt werden.

Brüche in den Genloci von BCL6 und IGH (ohne Brüche in BCL2 oder MYC), die auf eine BCL6/IGH t(3;14)(q27;q32) Translokation hinwiesen, konnten bei insgesamt sechs Fällen gezeigt werden, drei in der Gruppe 1, zwei in der Gruppe 2 und ein Fall in der Gruppe 3.

Ein Bruchereignis in BCL6, ohne ein entsprechendes Ereignis im IGH-Gen fand sich bei BCL6 in nur einem einzigen Fall der Gruppe 1.

Die Bruchkombination MYC und IGH, ohne Brüche in BCL2 und BCL6, die einen Hinweis auf die MYC/IGH t(8;14)(q24;q32) Translokation gab, konnte in der Gruppe 1 dreimal nachgewiesen werden.

Ein Bruchpunkt in MYC ohne einen gleichzeitig nachweisbaren Bruch in IGH zeigte sich in je einem Fall aus der Gruppe 1 und 2.

Ein IGH-Bruch ohne Hinweise auf weitere Bruchereignisse in BCL2, BCL6 oder MYC konnte in zwei Fällen der Gruppe 1 nachgewiesen werden.

Die Kombination von Bruchereignissen in BCL2 mit BCL6 und IGH konnte in nur einem Fall der Gruppe 3 aufgedeckt werden. Brüche in BCL2, MYC und IGH fanden sich in einem Fall der Gruppe 2 und in zwei Fällen der Gruppe 3. In einem Fall der Gruppe 1 fand sich eine Kombination von Brüchen in BCL2, BCL6, MYC und IGH.

Weitere denkbare Kombinationsmöglichkeiten, wie etwa BCL2 und BCL6, BCL2 und MYC, BCL6 und MYC oder BCL6, MYC und IGH lagen nicht vor.

Abbildung 14: Häufigkeit der einzelnen Brüche und Bruchkombinationen

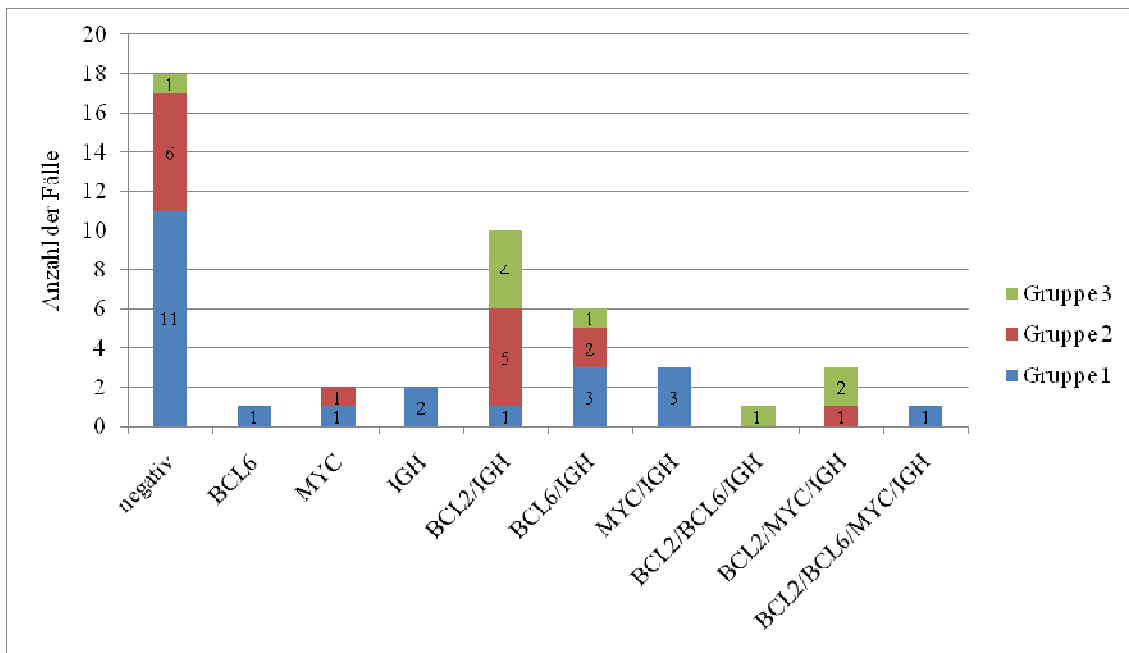


Abbildung 15: Häufigkeit positiv getester Fälle für einen Bruchpunkt in BCL2, BCL6, MYC und IGH nach Gruppen

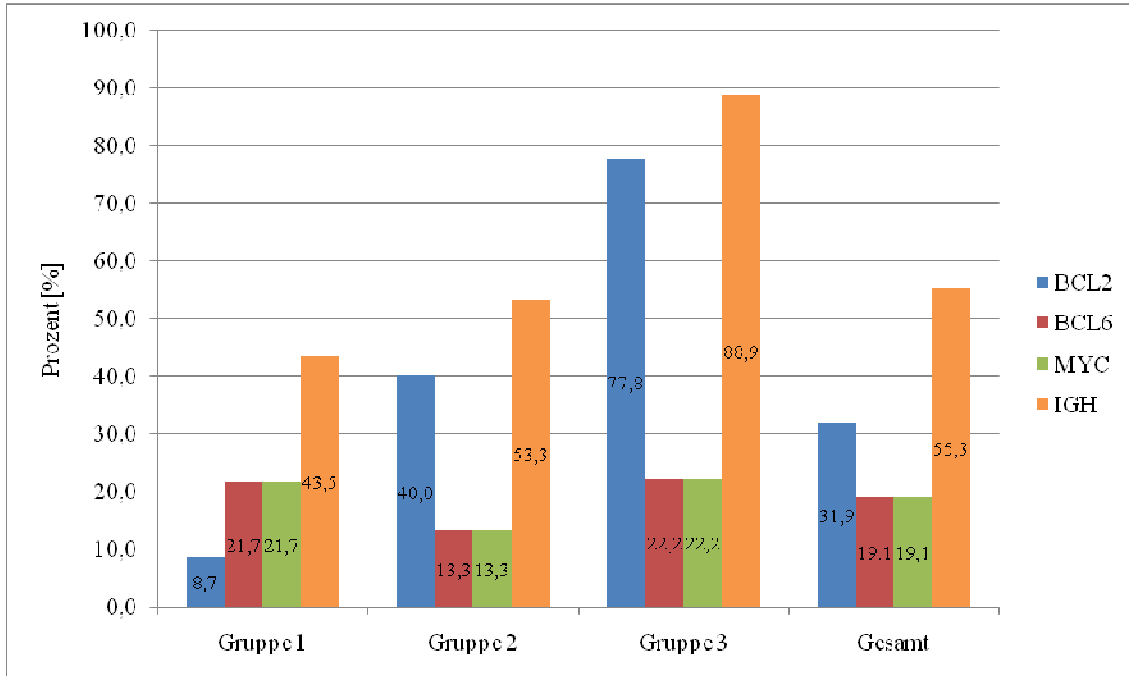
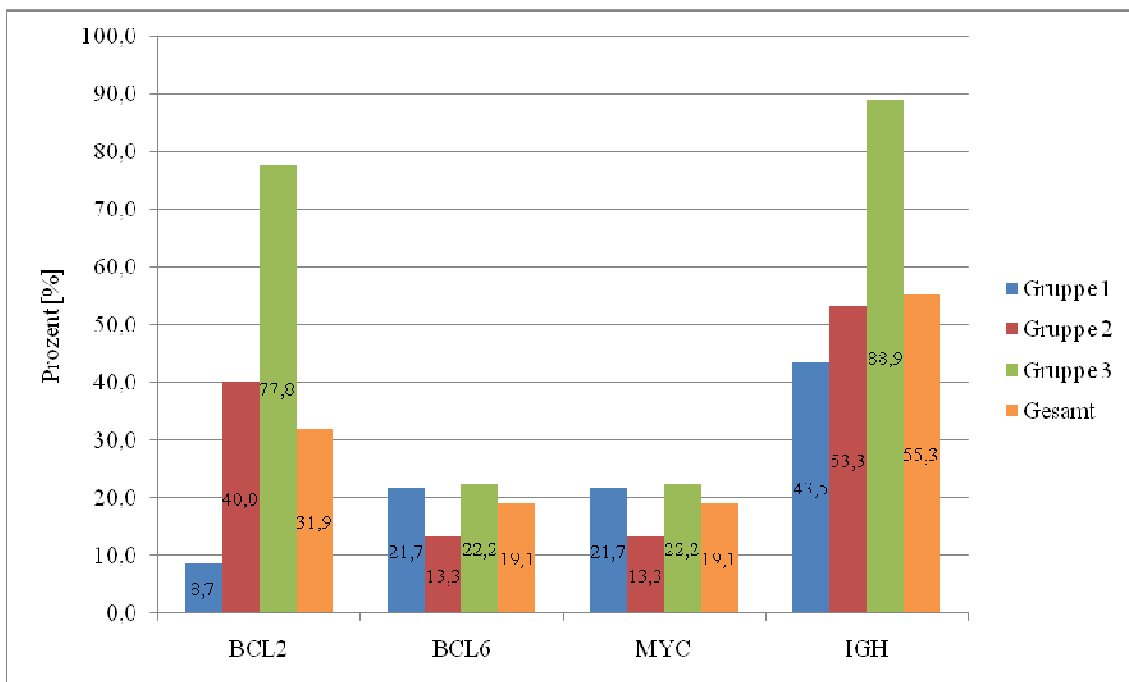


Abbildung 16: Häufigkeit positiv getester Fälle für einen Bruchpunkt in BCL2, BCL6, MYC und IGH nach Sonden



3.3.3 Immunhistochemie – BCL2, BCL6, CD5, CD10, CD20, IRF4/MUM1, TCL1, Ki67, p53, kappa (κ) und lambda (λ)

Tabelle 21: Ergebnisse der Immunhistochemie für BCL2, BCL6, CD5, CD10, CD20, IRF4/MUM1, TCL1, Ki67, p53, kappa (κ) und lambda (λ)

Fallnummer	Gruppe	BCL2 [%]	BCL6 [%]	CD5	CD10	CD20	IRF4/MUM1	TCL1	Ki67 [%]	p53 [%]	kappa (κ)	lambda (λ)
#301	1	- (10)	+ (70)	-	-	+	n.a.	-	+ (60)	- (10)	-	-
#302	1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
#303	1	+ (100)	+ (70)	-	-	+	+	-	+ (90)	+ (20)	+	-
#304	1	+ (100)	+ (80)	-	+	+	-	-	+ (100)	+ (20)	+	-
#305	1	+ (100)	+ (80)	+	-	+	n.a.	+	+ (20)	- (10)	-	-
#306	1	+ (30)	+ (70)	-	+	+	n.a.	-	n.a.	+ (60)	+	-
#307	1	- (0)	+ (50)	-	+	+	n.a.	+	+ (80)	+ (70)	-	-
#308	1	+ (100)	+ (70)	-	-	+	+	-	+ (90)	- (10)	+	-
#309	1	+ (100)	+ (70)	-	+	n.a.	-	+	+ (80)	- (10)	-	-
#310	1	+ (80)	+ (70)	-	-	+	-	-	+ (20)	+ (40)	+	-
#311	1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
#312	1	+ (100)	+ (70)	-	-	+	+	+	+ (30)	+ (30)	+	-
#313	1	+ (50)	- (0)	-	+	+	n.a.	-	+ (80)	- (10)	+	-
#314	1	- (0)	+ (80)	-	+	+	-	+	+ (50)	+ (50)	-	-
#315	1	+ (100)	- (10)	-	-	+	-	-	+ (30)	- (10)	+	-
#316	1	+ (100)	+ (40)	-	-	+	n.a.	+	+ (60)	+ (20)	+	-
#317	1	- (0)	+ (80)	-	-	+	-	-	+ (70)	+ (30)	-	-
#318	1	+ (100)	+ (90)	-	-	+	n.a.	+	+ (90)	+ (90)	+	-
#319	1	+ (100)	- (10)	-	n.a.	+	n.a.	+	+ (90)	- (10)	-	-
#320	1	+ (100)	+ (70)	n.a.	-	+	+	-	+ (20)	- (10)	+	-
#321	1	+ (100)	+ (80)	-	+	+	n.a.	+	+ (40)	- (10)	-	-
#322	1	n.a.	+ (70)	n.a.	-	+	n.a.	+	+ (50)	- (10)	-	-
#323	1	+ (100)	+ (70)	-	+	+	-	-	+ (20)	- (10)	-	+
#324	2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
#325	2	+ (100)	+ (70)	-	-	+	+	-	+ (50)	- (10)	-	-
#326	2	+ (100)	+ (70)	-	-	+	n.a.	+	+ (50)	- (0)	-	-
#327	2	+ (100)	+ (90)	-	-	+	-	+	n.a.	- (10)	-	-
#328	2	- (0)	+ (70)	-	+	+	-	-	+ (50)	- (10)	-	-
#329	2	+ (100)	+ (70)	-	-	+	+	+	+ (80)	- (10)	-	+
#330	2	- (0)	+ (70)	-	-	+	-	-	+ (80)	- (10)	-	-

+ ≙ positiv

- ≙ negativ

n.a. ≙ nicht analysiert

Tabelle 21: Ergebnisse der Immunhistochemie für BCL2, BCL6, CD5, CD10, CD20, IRF4/MUM1, TCL1, Ki67, p53, kappa (κ) und lambda (λ) (Fortsetzung)

Fallnummer	Gruppe	BCL2 [%]	BCL6 [%]	CD5	CD10	CD20	IRF4/MUM1	TCL1	Ki67 [%]	p53 [%]	kappa (κ)	lambda (λ)
#331	2	+ (60)	+ (70)	-	+	+	-	+	+ (20)	- (10)	-	-
#332	2	+ (100)	+ (90)	-	+	+	-	+	+ (40)	- (10)	-	-
#333	2	- (0)	+ (70)	-	-	+	-	+	+ (60)	- (10)	-	-
#334	2	n.a.	+ (70)	-	-	n.a.	n.a.	-	- (0)	n.a.	n.a.	n.a.
#335	2	+ (100)	+ (80)	-	+	+	-	+	- (10)	+ (80)	-	-
#336	2	+ (100)	+ (70)	-	-	+	n.a.	+	+ (50)	- (10)	-	-
#337	2	- (20)	+ (70)	-	-	+	-	-	+ (20)	- (10)	-	-
#338	2	+ (100)	+ (70)	+	+	+	-	-	- (10)	- (10)	-	-
#339	3	+ (100)	+ (80)	-	+	+	-	+	+ (80)	- (10)	-	+
#340	3	- (0)	+ (80)	-	-	+	n.a.	-	+ (80)	+ (30)	-	-
#341	3	+ (100)	+ (70)	-	+	+	-	+	+ (20)	- (10)	-	-
#342	3	+ (100)	+ (80)	-	+	+	-	+	- (10)	- (10)	-	-
#343	3	+ (100)	+ (70)	-	+	+	-	+	+ (70)	- (10)	+	-
#344	3	+ (100)	+ (80)	-	+	+	-	-	+ (40)	- (10)	-	-
#345	3	+ (100)	+ (70)	-	-	+	-	-	+ (20)	- (10)	-	+
#346	3	+ (80)	+ (70)	+	+	+	-	-	+ (20)	- (10)	-	-
#347	3	- (20)	+ (70)	-	+	+	-	-	- (10)	- (10)	-	-

+ \triangleq positiv

- \triangleq negativ

n.a. \triangleq nicht analysiert

Von 47 für BCL2 gefärbten Fällen konnte für 42 Fälle ein auswertbares Resultat erzielt werden. Insgesamt lag der Anteil von BCL2 positiven (exprimierenden) Fällen bei 76,2 % (32 von 42; 76,2 %). Während in der Gruppe der reinen FL 3B 80,0 % der Fälle positiv für das BCL2-Protein waren (16 von 20; 80,0 %), zeigten sich in Gruppe 2 69,2 % (9 von 13; 69,2 %) und in Gruppe 3 77,8 % der Fälle positiv (7 von 9; 77,8 %).

Ein Vergleich der Ergebnisse der FISH-Untersuchung für den Bruchpunkt BCL2 18q21 mit der Immunhistochemie für BCL2 konnte für 42 Fälle (mit Ergebnissen für beide Methoden) durchgeführt werden. Über alle Gruppen hinweg stimmten für ein doppelt positives Ergebnis elf Fällen überein, für ein doppelt negatives acht Fälle, und somit fand sich in 19 Fällen eine Übereinstimmung (19 von 42; 45,2 %). Ein diskordantes Ergebnis lag in insgesamt 23 Fällen (23 von 42; 54,8 %) vor, mit einem

BCL2-Bruchpunkt positiven, BCL2-Protein negativen Ergebnis in zwei Fällen und einem BCL2-Bruchpunkt negativen, BCL2-Protein positiven Resultat in 21 Fällen (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Vergleich der Ergebnisse der FISH für einen BCL2-Bruchpunkt und der Immunhistochemie für das BCL2-Protein

[%]	Gesamt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Übereinstimmung	45,2	25,0	53,8	77,8
BCL2-Bruchpunkt positiv BCL2-Protein positiv	26,2	5,0	30,8	66,7
BCL2-Bruchpunkt negativ BCL2-Protein negativ	19,0	20,0	23,1	11,1
keine Übereinstimmung	54,8	75,0	46,2	22,2
BCL2-Bruchpunkt positiv BCL2-Protein negativ	4,8	0,0	7,7	11,1
BCL2-Bruchpunkt negativ BCL2- Protein positiv	50,0	75,0	38,5	11,1

Bei 47 in der Immunhistochemie auf eine Expression von BCL6 getesteten Fällen konnte in drei Fällen kein Ergebnis erzielt werden. Über alle Gruppen hinweg fand sich in nur drei Fällen ein negatives Ergebnis, und somit ein positives Ergebnis in 93,2 % der untersuchten Fälle (41 von 44; 93,2 %). Alle drei BCL6 negativen Fälle (#313, #315 und #319) fanden sich in der Gruppe der reinen FL 3B. Während die Fälle #313 und #315 in der FISH für sämtliche Bruchpunkte und insbesondere für die BCL2/IGH-Translokation negativ waren, konnte für den Fall #319 zwar ebenfalls keine BCL2/IGH-Translokation nachgewiesen werden, aber sehr wohl eine Translokation für MYC und IGH.

Somit lag eine Positivität von 85,7 % in der Gruppe 1 (18 von 21; 85,7 %) und von je 100,0 % in Gruppe 2 (14 von 14; 100,0 %) und Gruppe 3 vor (9 von 9; 100,0 %). Da es sich bei allen untersuchten Fällen um Lymphome mit einem follikulären „Hintergrund“ handelte, war dieses Ergebnis zu erwarten.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Immunhistochemie für BCL6 und der FISH für den Bruchpunkt BCL6 3q27 konnte an 44 von 47 Fällen durchgeführt werden. Insgesamt zeigte sich ein übereinstimmendes Ergebnis bei 12 Fällen (12 von 44; 27,3 %). Dabei konnte in neun Fällen ein doppelt positives Ergebnis und in drei Fällen ein doppelt negatives Ergebnis gezeigt werden, das heißt alle drei der FISH negativen Fälle exprimierten auch kein BCL6-Protein. Entsprechend stimmten in 32 Fällen die Ergebnisse nicht überein (32 von 44; 72,7 %), in allen diesen Fällen war die FISH für BCL6 negativ während die Immunhistochemie für BCL6 positiv war (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Vergleich der Ergebnisse der FISH für einen BCL6-Bruchpunkt und der Immunhistochemie für das BCL6-Protein

[%]	Gesamt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Übereinstimmung	27,3	38,1	14,3	22,2
BCL6-Bruchpunkt positiv BCL6- Protein positiv	20,5	23,8	14,3	22,2
BCL6-Bruchpunkt negativ BCL6-Protein negativ	6,8	14,3	0,0	0,0
keine Übereinstimmung	72,7	61,9	85,7	77,8
BCL6-Bruchpunkt positiv BCL6-Protein negativ	0,0	0,0	0,0	0,0
BCL6-Bruchpunkt negativ BCL6-Protein positiv	72,7	61,9	85,7	77,8

Der T-Zell Marker CD5 konnte erfolgreich in 42 von 47 Fällen angewendet werden. Für dieses T-Zell-spezifische Oberflächenmerkmal ist das Gros der untersuchten Fälle negativ, lediglich drei Fälle zeigten eine Positivität für den Marker (3 von 42; 7,1 %). Ein einzelner Fall (#305) aus der Gruppe der reinen FL 3B (1 von 19; 5,3 %), ein Fall (#338) in der Gruppe 2 (1 von 14; 7,1 %) und ein Fall (#346) der Gruppe 3 (1 von 9; 11,1 %) waren positiv getestet worden. Die Fälle #338 und #346 zeigten in der FISH-Untersuchung eine BCL2/IGH-Translokation, für den Fall #305 konnte nur ein Bruch im IGH-Gen gezeigt werden

Von 47 Fällen, die auf das Vorhandensein des Keimzentrumszell-spezifischen Oberflächenmarkers CD10 getestet wurden, zeigten 20 Fälle ein positives Ergebnis. Da vier Fälle zu keinem auswertbaren Resultat führten, lag der Anteil CD10 positiver Fälle über alle Gruppen hinweg bei 46,5 % (20 von 43; 46,5 %). In der Gruppe der reinen FL 3B lag die Häufigkeit bei 40,0 % (8 von 20; 40,0 %), in der Gruppe 2 bei 35,7 % (5 von 14; 35,7 %) und in der Gruppe 3 bei 77,8% (7 von 9; 77,8 %).

Tabelle 24: FISH-Ergebnisse für BCL2, BCL6, MYC und IGH für alle CD10 negativen Fälle der Immunhistochemie

Fallnummer	Gruppe	BCL2 [%]	BCL6 [%]	MYC [%]	IGH [%]
#301	1	- (5)	- (1)	- (11)	- (12)
#303	1	- (5)	+ (72)	- (21)	+ (65)
#305	1	- (2)	- (7)	- (9)	+ (20)
#308	1	- (10)	+ (95)	- (17)	- (9)
#310	1	- (5)	+ (15)	- (12)	+ (21)
#312	1	- (5)	- (8)	- (9)	- (19)
#315	1	- (2)	- (5)	- (18)	- (4)
#316	1	- (1)	- (2)	- (2)	- (8)
#317	1	- (7)	- (4)	- (9)	- (16)
#318	1	- (4)	- (4)	+ (49)	+ (82)
#320	1	- (9)	- (4)	- (11)	- (5)
#322	1	- (5)	- (5)	- (5)	+ (31)
#325	2	+ (14)	- (7)	- (11)	+ (17)
#326	2	- (3)	- (0)	- (11)	- (7)
#327	2	- (2)	+ (75)	- (16)	+ (52)
#329	2	- (0)	- (3)	- (10)	- (14)
#330	2	+ (21)	- (11)	- (11)	+ (30)
#333	2	- (7)	- (8)	- (11)	- (9)
#334	2	- (1)	- (5)	- (7)	- (16)
#336	2	- (3)	- (3)	- (5)	- (19)
#337	2	- (6)	- (8)	- (9)	- (13)
#340	3	- (1)	- (5)	- (16)	- (11)
#345	3	- (4)	+ (69)	- (4)	+ (34)

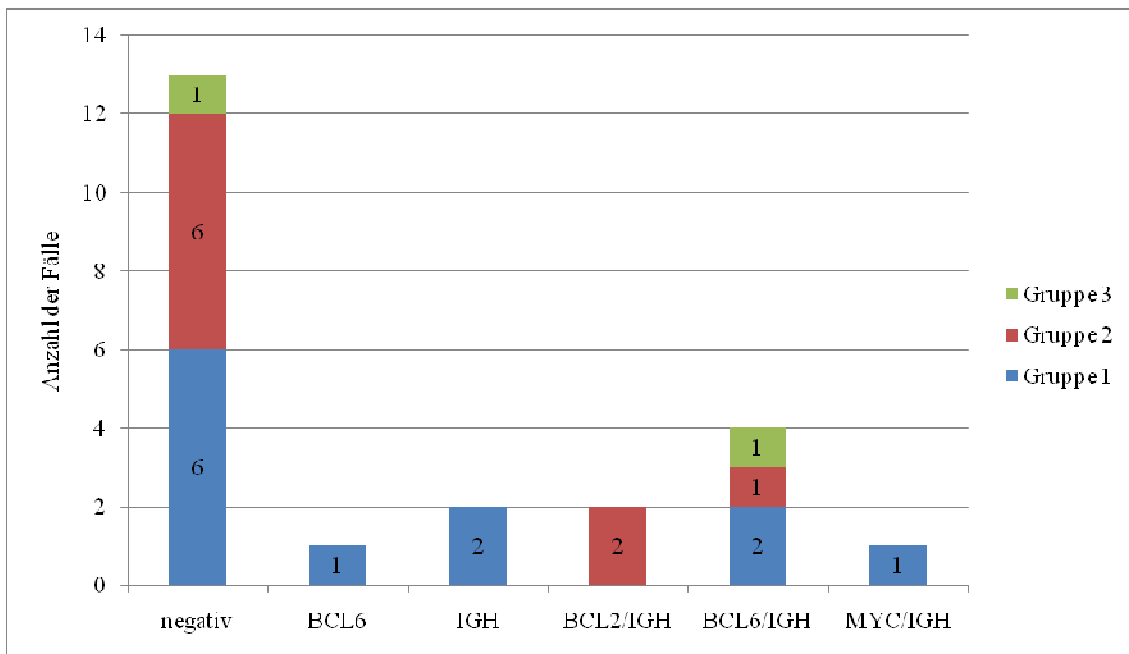
+ \triangleq positiv

- \triangleq negativ

Eine Assoziation für die CD10 negativen Fälle mit einem bestimmten Bruchereignis konnte nicht gezeigt werden. Von 23 Fällen, die in der Immunhistochemie negativ für CD10 waren, konnte in elf Fällen (11 von 23; 47,8 %) gar kein Bruchereignis nachgewiesen werden. In einem Fall konnte ausschließlich ein Bruch im BCL6-Gen gezeigt werden, in zwei weiteren fand sich nur ein IGH-Bruchpunkt ohne einen weiteren Bruch in BCL2, BCL6 oder MYC.

In zwei Fällen zeigte sich eine BCL2/IGH-Translokation, und in einem weiteren Fall konnte eine MYC/IGH-Translokation nachgewiesen werden. Die häufigste Genveränderung stellte aber mit vier Fällen die BCL6/IGH-Translokation dar (siehe Abbildung 17).

Abbildung 17: Häufigkeit der einzelnen Brüche und Bruchkombinationen für alle CD10 negativen Fälle der Immunhistochemie



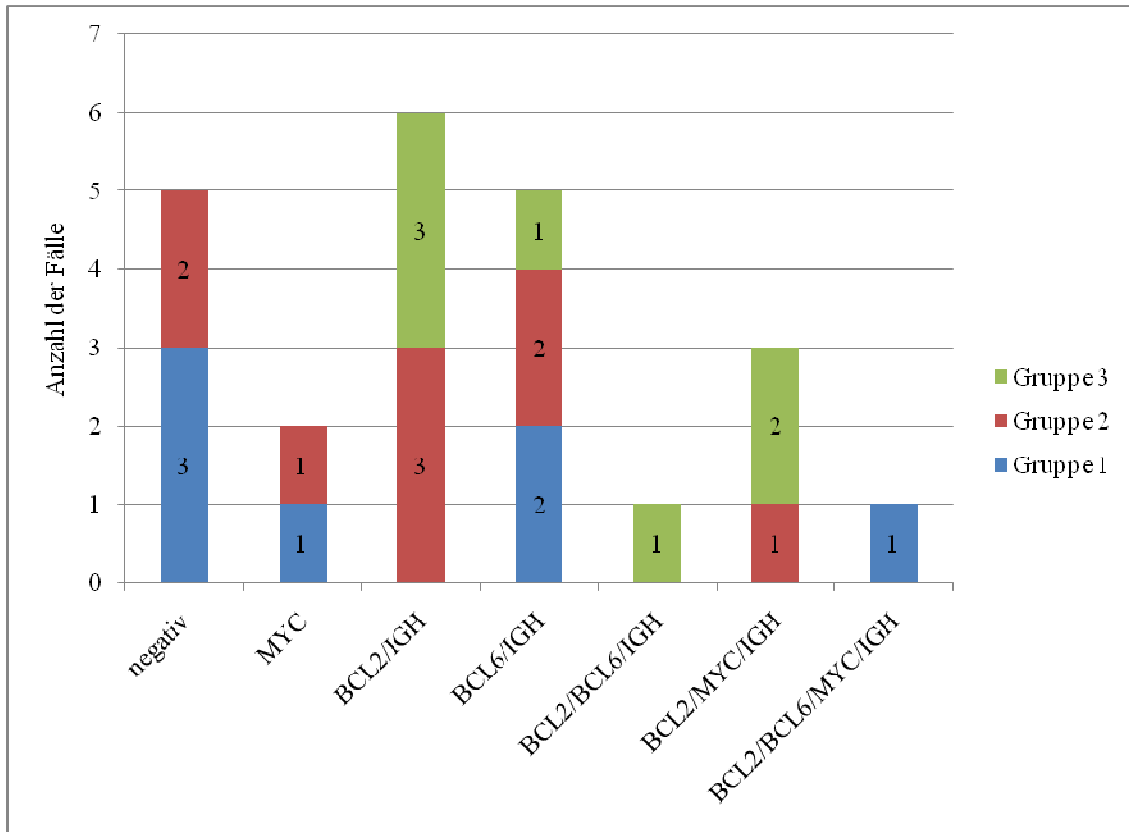
Eine auswertbare immunhistochemische Färbung für den Pan-B-Zell-Marker CD20 gelang in 42 von 47 Fällen. Alle 42 auswertbaren Fälle und somit alle Fälle in allen Gruppen waren positiv für diesen Marker (42 von 42; 100,0 %).

Eine immunhistochemische Färbung für den Post-Keimzentrums-B-Zellen spezifischen Marker IRF4/MUM1 konnte in 30 von 47 Fällen erfolgreich und auswertbar durchgeführt werden. Insgesamt fand sich eine Frequenz einer Expression für IRF4/MUM1 von 20,0 % (6 von 30; 20,0 %), allerdings zeigt sich, dass die Häufigkeit mit dem steigendem Tumorgrad zunimmt. So sind alle Fälle der Gruppe 3 negativ für IRF4/MUM1 (0 von 8; 0,0 %), nur zwei Fälle in der Gruppe 2 positiv (2 von 11; 18,2 %), und vier von elf Fällen in der Gruppe der reinen FL 3B (4 von 11; 36,4 %).

Unter den sechs IRF4/MUM1 positiven Fällen fanden sich in drei Fällen keine Bruchereignisse in der FISH-Untersuchung. In einem Fall konnte nur ein BCL6-Bruch ohne IGH-Bruchpunkt festgestellt werden. Jeweils einmal zeigte sich eine BCL2/IGH-, beziehungsweise eine BCL6/IGH-Translokation.

Fälle, die für IRF4/MUM1 negativ getestet wurden, zeigten eine große Bandbreite an Bruchkombinationen in der FISH. Zwei Fälle wiesen zwar einen MYC-Bruchpunkt auf, aber keinen Bruch im IGH-Genlocus. Die BCL2/IGH-Translokation fand sich insgesamt sechsmal, während die BCL6/IGH-Translokation insgesamt fünfmal auftrat. Kombinationen aus drei oder vier Bruchpunkten fanden sich bei den IRF4/MUM1-negativen Fällen insgesamt fünfmal (siehe Abbildung 18).

Abbildung 18: Häufigkeit der einzelnen Brüche und Bruchkombinationen für alle IRF4/MUM1 negativen Fälle der Immunhistochemie



Darüber hinaus konnte in allen Gruppen eine gegensätzliche Beziehung von IRF4/MUM1 und CD10 beobachtet werden. Bei 30 Fällen, die sowohl ein auswertbares Ergebnis für IRF4/MUM1 als auch für CD10 zeigten, konnte in 22 Fällen ein inverses Verhältnis beobachtet werden (22 von 30; 73,3 %), in acht Fällen war das Ergebnis für beide Färbungen negativ. In der Gruppe 1 konnte dreimal ein doppelt negatives Ergebnis gezeigt werden, viermal ein CD10 positives, IRF4/MUM1 negatives Resultat und viermal ein CD10 negatives, IRF4/MUM1 positives Ergebnis nachgewiesen werden. Vier Fälle der Gruppe 2 waren doppelt negativ, fünf Fälle CD10 positiv, IRF4/MUM1 negativ und zwei Fälle CD10 negativ, IRF4/MUM1 positiv. Nur ein Fall in der Gruppe 3 war doppelt negativ, alle anderen sieben Fälle waren positiv für CD10 und negativ für IRF4/MUM1.

Eine Testung auf TCL1 konnte in 44 von 47 Fällen ein auswertbares Resultat liefern. Insgesamt zeigten sich 22 Fälle positiv für diesen Marker (22 von 44; 50,0 %). In den einzelnen Gruppen konnte TCL1 in 47,6 % der Fälle der Gruppe 1 (10 von 21; 47,6 %), in 57,1 % der Fälle von Gruppe 2 (8 von 14; 57,1 %) und in 44,4 % der Fälle von Gruppe 3 (4 von 9; 44,4 %) nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen lag somit nicht vor.

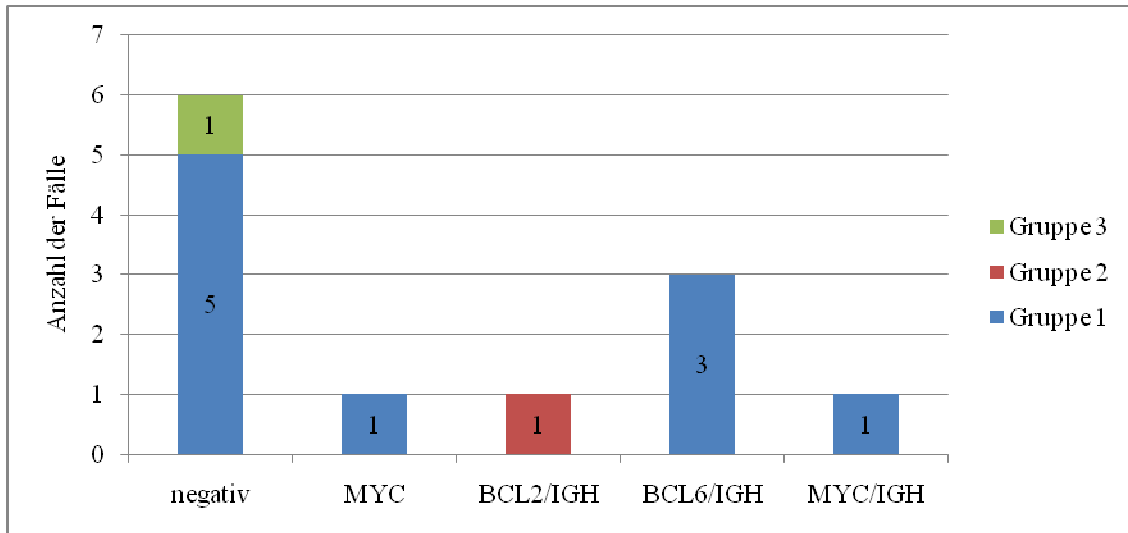
Der Proliferationsindex, der mit dem Marker Ki67 bestimmt wird, konnte in 42 von 47 Fällen ausgewertet werden. Fünf Fälle erbrachten in der immunhistochemischen Färbung kein auswertbares Ergebnis. Insgesamt wiesen 37 Fälle eine Proliferationsfraktion von mindestens 20 % auf (37 von 42; 88,1 %). In der Gruppe der reinen FL 3B wurden alle Fälle positiv getestet (20 von 20; 100,0 %). Die Fälle der Gruppe 2 erreichten eine Positivität von 76,9 % (10 von 13; 76,9 %), in der Gruppe 3 wurde der Anteil der positiven Fälle mit 77,8 % (7 von 9; 77,8 %) bestimmt.

Die Durchschnittswerte des Proliferationsindex liegen für die Gruppe 1 bei 58,5 %, für die Gruppe 2 bei 40,0 % und in der Gruppe 3 bei 38,9 %.

Eine immunhistochemische Testung der Expression des Tumorsuppressor-Proteins p53 war in 43 von 47 Fällen erfolgreich. Insgesamt zeigten zwölf Fälle eine Überexpression für diesen Marker (12 von 43; 27,9 %). Dabei handelte es sich überwiegend um Fälle aus der Gruppe 1 (10 von 21; 47,6 %), während jeweils nur ein Fall der Gruppe 2 (1 von 13; 7,7 %) und ein Fall der Gruppe 3 (1 von 9; 11,1 %) als positiv bestimmt wurde.

Durch die vorangegangene FISH-Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die p53 positiven Fälle unterschiedliche genetische Veränderungen aufwiesen. In einem Fall fand sich nur ein einzelner MYC-Bruchpunkt, ohne dass ein Bruch von IGH gezeigt werden konnte. In je einem Fall konnte die BCL2/IGH-, beziehungsweise die MYC/IGH-Translokation nachgewiesen werden. Eine Translokation BCL6 und IGH betreffend, fand sich in drei Fällen. Sechs Fälle zeigten keine genetischen Veränderungen in den untersuchten Genloki (siehe Abbildung 19).

Abbildung 19: Häufigkeit der einzelnen Brüche und Bruchkombinationen für alle p53 positiven Fälle der Immunhistochemie

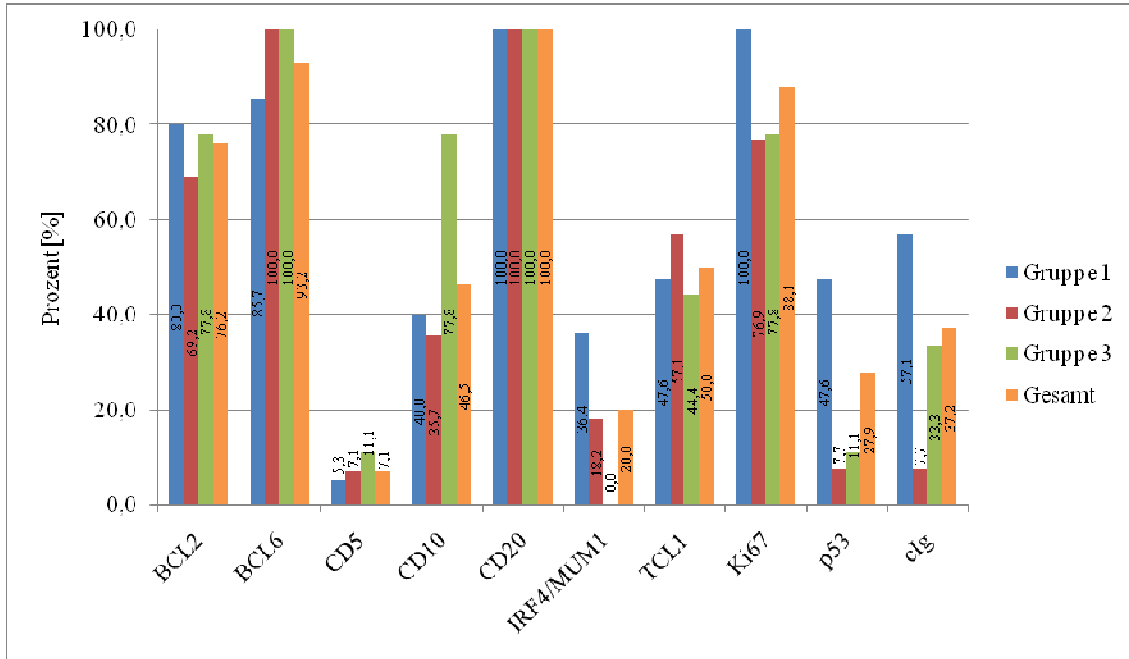


Von insgesamt zwölf p53 positiven Fällen, zeigte sich in zwei Fällen ein doppelt negatives Ergebnis für CD10 und IRF4/MUM1. Ein ausschließlich CD10 positives Ergebnis konnte in drei Fällen gefunden werden. In zwei Fällen war nur IRF4/MUM1 positiv. In fünf Fällen, für die leider kein Ergebnis einer IRF4/MUM1-Färbung vorlag, konnte in zwei Fällen ein positives Ergebnis für CD10 und in drei Fällen ein negatives Resultat für CD10 beschrieben werden.

Unter 47 Fällen, die auf eine monotypische zytoplasmatische (cIg) Immunglobulin-Leichtketten kappa (κ)- und lambda (λ)-Expression getestet wurden, konnte in vier Fällen kein Ergebnis erzielt werden. Von 43 Fällen waren zwölf Fälle positiv für die Leichtkette kappa (κ) (12 von 43; 27,9 %), vier Fälle waren positiv für die Leichtkette lambda (λ) (4 von 43; 9,3 %). Die meisten Fälle zeigten sich negativ für eine monotypische zytoplasmatische Leichtketten (cIg)-Expression (27 von 43; 62,8 %).

Von den cIg positiven Fällen zeigten sich zwölf in der Gruppe der reinen FL 3B (12 von 21; 57,1 %), nur ein einziger Fall in der Gruppe 2 (1 von 13; 7,7 %), und drei weitere Fälle in der Gruppe 3 (3 von 9; 33,3 %).

Abbildung 20: Häufigkeit positiv getesteter Fälle für BCL2, BCL6, CD5, CD10, CD20, IRF4/MUM1, TCL1, Ki67, p53, cIg in den einzelnen Gruppen



3.3.4 Überblick

***Tabelle 25:** Ergebnisse der FISH- und immunhistochemischen Untersuchungen an FL im Überblick*

	Gesamt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
FISH				
BCL2 [%]	31,9	8,7	40,0	77,8
BCL6 [%]	19,1	21,7	13,3	22,2
MYC [%]	19,1	21,7	13,3	22,2
IGH [%]	55,3	43,5	53,3	88,9
Immunhistochemie				
BCL2 [%]	76,2	80,0	69,2	77,8
BCL6 [%]	93,2	85,7	100,0	100,0
CD5 [%]	7,1	5,3	7,1	11,1
CD10 [%]	46,5	40,0	35,7	77,8
CD20 [%]	100,0	100,0	100,0	100,0
IRF4/MUM1 [%]	20,0	36,4	18,2	0,0
TCL1 [%]	50,0	47,6	57,1	44,4
Ki67 [%]	88,1	100,0	76,9	77,8
p53 [%]	27,9	47,6	7,7	11,1
cIg [%]	37,2	57,1	7,7	33,3

4. Diskussion

4.1 Schwellenwerte (cut-off-Werte)

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Bestimmung der rechnerischen Schwellenwerte für durch die FISH detektierte chromosomale Aberrationen an nicht-neoplastischem, lymphatischem Gewebe wurde in vorausgehenden Studien bereits mehrfach durchgeführt, und ist allgemein anerkannt (zum Beispiel in einem Review von Ventura et al. aus dem Jahr 2006)¹⁵.

Für die Bestimmung der cut-off-Werte wurden dieselben Methoden angewendet, die im Institut für Pathologie der Universität Würzburg bereits für eine Arbeit von Katzenberger et al. aus dem Jahre 2004 genutzt wurde. In dieser Arbeit wurde anhand einer Hybridisierung von fünf Gewebeproben reaktiver Lymphknoten ein cut-off-Wert für BCL6 (3q27) von 6 % und für die BCL2/IGH-Translokation von 5 % bestimmt. In der vorliegenden Arbeit konnte der BCL6-Prozentwert von Katzenberger et al. annähernd bestätigt werden, der berechnete Schwellenwert für BCL6 lag bei 8 %. Für BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) wurde allerdings ein cut-off-Wert berechnet, der mit 10 % doppelt so hoch lag, wie der Vergleichswert von Katzenberger et al.¹⁴.

Eine Arbeit von Haralambieva et al. aus dem Jahr 2002 beschreibt einen Schwellenwert für Brüche im MYC (8q24)-Genlokus von 10 %, allerdings wurden in dieser Arbeit keine kommerziellen Sonden verwendet. Der für die vorliegende Arbeit berechnete Schwellenwert für MYC entspricht dem cut-off-Wert von Haralambieva et al. mit 10 %¹⁹.

Auch in einer Arbeit von Bosga-Bouwer et al. (2006) wurde der MYC-Bruchpunkt durch FISH untersucht, allerdings wurden keine Angaben zu Schwellenwerten gemacht²⁰.

Durch die Festlegung eines streng nach Vorgabe errechneten cut-off-Werts (Mittelwert +/- 3 Standardabweichungen^{14,15}), ergab sich eine Problematik im Umgang mit grenzwertigen Fällen, insbesondere bei Fällen, die einen Prozentwert zeigten, der zwar knapp oberhalb des Schwellenwerts lag, aber keine wirklich eindeutige Positivität des Falls bewies. Es war davon auszugehen, dass ein tatsächlich BCL2, BCL6, MYC

oder IGH positiver Fall auch einen entsprechend hohen Anteil an Zellen mit dem jeweiligen Bruchpunkt aufweisen würde, also Prozentsätze die über 20 bis 30 % liegen. Aufgrund dieser Beobachtungen und dem langjährigen Umgang mit den verwendeten Sonden wurden in der vorliegenden Arbeit Erfahrungs-Schwellenwerte bestimmt, die in der Auswertung die rechnerischen cut-off-Werte sinnvoll ergänzt haben, und in der Regel deutlich höher als diese lagen.

4.2 Vergleich von FISH und konventioneller Zytogenetik

Für den Methodenvergleich der FISH an TMAs gegenüber der klassischen zytogenetischen Untersuchung wurden insgesamt 45 Fälle auf vier verschiedenen TMAs mit den break-apart-Sonden für BCL2, BCL6, MYC und IGH hybridisiert, und die Resultate mit den bereits vorhandenen Ergebnissen in der zytogenetischen Datenbank des Pathologischen Instituts abgeglichen.

Wurde die Methode der konventionellen Zytogenetik als Gold-Standard definiert, an der sich die FISH an TMAs messen musste, so erreichte die FISH über sämtliche hybridisierten Fälle und Sonden hinweg eine moderate Sensitivität (83,8 %) und eine gute Spezifität (92,6 %) für die Erkennung eines Bruchpunktes.

Betrachtete man für die einzelnen Sonden die Ergebnisse genauer, konnte festgestellt werden, dass die break-apart-Sonde für BCL2 die beste Sensitivität (100,0 %) und Spezifität (97,4 %) aufwies. Es folgten die Sonde für IGH mit guten Werten (88,9 % und 92,0 %) und die Sonde für BCL6 mit moderaten Werten (80,0 % und 84,8 %). Die geringe Sensitivität (50,0 %) der MYC-Sonde stand im Kontrast zur guten Spezifität (94,7 %) derselben. Einerseits wird die schlechte Sensitivität durch die nur geringe Zahl (vier Fälle) an zytogenetisch positiven MYC-Fällen, von denen eben nur zwei Fälle durch die FISH erkannt wurden (2 von 4; 50,0 %) beeinflusst, andererseits ist das schlechte Ergebnis unter Umständen auf eine nicht optimale MYC break-apart-Sonde zurückzuführen.

Bemerkenswert an diesen Feststellungen war das gute Ergebnis mit der IGH break-apart-Sonde, deren Auswertung aufgrund des relativ großen IGH-Gens, das von der Sonde markiert wird, häufig Schwierigkeiten bereitet. Selbst bei negativen Fällen für

IGH können daher die grünen und roten Fluoreszenz-Signale weit auseinanderliegen und einen Bruch vortäuschen. Diese Problematik schien sich aber bei Kenntnis des Sachverhalts und guter Einarbeitung in die Auswertung der IGH break-apart-Sonde nicht negativ auf die Resultate auszuwirken, wie der direkte Vergleich mit der konventionellen Zytogenetik belegte.

Für alle Sonden konnte, gemessen am Gold-Standard der Zytogenetik, gezeigt werden, dass ein falsch positives Ergebnis der FISH gleich häufig (MYC und IGH) oder häufiger (BCL2 und BCL6) auftrat, wie ein falsch negatives Ergebnis.

In einer Arbeit von Bosga-Bouwer et al. (2003), die sich ebenfalls mit der Charakterisierung der FL 3B beschäftigten, wurden ebenfalls FISH- und zytogenetische Methoden angewendet. Auch wenn kein direkter Vergleich dieser Studie mit der vorliegenden Arbeit möglich ist, da die Untersuchung nicht an TMAs stattfand, und nicht-kommerzielle Sonden für das Auffinden der BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation und eines BCL6 3q27-Bruchereignisses verwendet wurden, konnten von dieser Forschungsgruppe ebenfalls sehr gute Ergebnisse der FISH gemessen am Gold-Standard der konventionellen Zytogenetik mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100,0 % und 94,4 % für BCL2/IGH und 85,7 % und 95,5 % für BCL6 erreicht werden²¹.

Die Autoren sprachen sich daher für die konventionelle Zytogenetik als beste Methode zur Aufdeckung von BCL2/IGH-Translokationen und BCL6-Brüchen im Vergleich zu den Techniken des Southern Blot (SB) und der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus. Nur die FISH könnte mit ausreichender Genauigkeit ähnliche Ergebnisse erbringen²¹.

Auch Ioachim und Medeiros vergleichen in ihrem Fachbuch "Lymph Node Pathology, Fourth Edition" (2009) die Techniken der konventionellen Zytogenetik, der FISH, des Southern Blot und der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) untereinander⁴.

Im Vergleich zur Zytogenetik wird die FISH als weniger arbeitsintensiveres aber teures Verfahren beschrieben. Die klassische Zytogenetik bietet zwar eine globale Analyse aller Chromosomen, allerdings bleibt sie auf Patientenmaterial mit lebenden, teilungsfähigen Zellen angewiesen. Die FISH kann hingegen auf ein großes Spektrum

von Patientenmaterial angewendet werden, allerdings muss im Vorhinein bekannt sein, nach welcher genetischen Veränderung gefahndet werden soll⁴.

Für die Diagnostik einer BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation wird die FISH als exzellente Alternative zur PCR und zur zeitaufwändigen klassischen Zytogenetik beschrieben. Beim Nachweis der BCL2/IGH-Translokation in FL scheint die FISH sogar sensitiver und gleich spezifisch im Vergleich zur PCR zu sein. Die telomernahe Lage des BCL6-Translokations-Bruchpunktes im Chromosom 3 macht eine zytogenetische Diagnostik dieser Alteration schwierig, während die FISH hier ähnlich gute Ergebnisse erbringt wie eine Southern Blot Analyse. Eine MYC-Translokation wird sowohl durch die konventionelle Zytogenetik als auch durch die FISH gut erfasst⁴.

Die Ursachen für falsch positive oder falsch negative Ergebnisse sowohl bei einer FISH-Untersuchung als auch bei der Methode der konventionellen Zytogenetik sind vielfältig. Neben Fehlern in der Auswertung können die Methoden selbst, unabhängig von menschlichem Versagen, zu fehlerhaften Ergebnissen führen, wie etwa alternative Bruchpunkt-Regionen, die durch die verwendete Sonde in der FISH nicht erfasst werden.

Eine Grundvoraussetzung für eine vernünftige Auswertung von FISH-Material ist eine ausreichend gute Hybridisierung, die unter Umständen erst nach mehreren Hybridisierungsversuchen mit leicht abgeändertem Versuchsablauf erreicht werden kann. Für die auswertende Person ist es unerlässlich sich für jede genutzte Sonde an gesichert negativem und positivem Material einzusehen, da sich das Hybridisierungsmuster der Sonden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop unterscheidet. Es muss sichergestellt sein, dass sich tatsächlich Tumor-haltige Areale im Gewebe befinden, da andernfalls gesunde Zellen untersucht werden, und somit falsch negative Ergebnisse produziert werden. Eine reliable Auswertung sollte nur unter standardisiertem Vorgehen (drei verschiedene Areale, 100 auszählende Zellen) und blind, also in Unkenntnis des zu erwartenden Ergebnisses erfolgen, da nur so die Auswahl und Bewertung einzelner Zellen objektiv erfolgen kann. Erwähnenswert ist außerdem, dass grenzwertige Fälle in der FISH, mit nahe beieinander liegenden aber getrennten Signalen, tendenziell eher als positiv denn als negativ bestimmt werden. Dies führt zu vermehrt falsch positiven Ergebnissen in der Auswertung.

Unabhängig von der Auswertung kann die Methode der FISH selbst zu falschen Ergebnissen führen. Die kommerziellen break-apart-Sonden, die für diese FISH-Untersuchungen genutzt wurden, markieren sehr spezifisch einen bestimmten Gen-Abschnitt um den erwarteten Bruchpunkt im Gen, das heißt, es wird genau ein Bruchpunkt untersucht.

Bei den meisten bekannten Translokationen findet sich der Bruchpunkt aber nicht ausschließlich an derselben Stelle im Gen. Häufig existieren neben der sogenannten Major Breakpoint Region (MBR) auch minor cluster regions (mcr) oder Alternative Breakpoint Regions (ABR). Diese werden aber mit den meisten kommerziellen Sonden nicht abgedeckt, so dass ein tatsächlich vorhandener Bruch zu keinem Translokationssignal in der FISH führt. Die Häufigkeit von solchen alternativen Bruchpunkten ist von Translokation zu Translokation unterschiedlich. Während bei der BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) im BCL2-Gen fast ausschließlich nur ein einziger Bruchpunkt auftritt, existieren etwa im BCL6-Gen (3q27) unterschiedliche Bruchpunkte. Dies kann zu falsch negativen Ergebnissen in der FISH-Untersuchung führen^{4,22}.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich durch FISH negativ und in der Zytogenetik positiv bestimmte Fälle für BCL6, MYC und IGH, nicht aber für BCL2.

Bemerkenswert ist außerdem die Feststellung, dass Inversionen und Deletionen durch die Dual Color-FISH mit den verwendeten break-apart-Sonden offenbar nicht aufgedeckt werden konnten. Bei einer Inversion wird der betroffene Chromosomenabschnitt zwar invertiert, aber die genetische Information bleibt unverändert erhalten, entweder in invertierter Form oder die Inversion flankierend, und somit bleibt auch der Angriffspunkt für die verwendeten break-apart-Sonden bestehen. Im Ziel-Genabschnitt findet sich also eine Signalkonstellation mit zwei nahe beieinander liegenden Signalen, die in der Auswertung als negativ gewertet wird. Sollte der invertierte Genabschnitt relativ groß sein, ist es aber auch möglich dass der Bruchpunkt mit Markierungssonde auf dem Chromosom derart verlagert wird, dass sich der Abstand zur zweiten Sondenmarkierung derart vergrößert, dass die Veränderung als positiv erkannt werden kann.

Bei einer Deletion fehlt entweder der zu markierende Genabschnitt komplett und somit auch der Angriffspunkt für die verwendete break-apart-Sonde, oder die Sonden markieren Genabschnitte, die die Deletion flankieren. Folglich bleibt die normale, negative Signalkonstellation erhalten, oder die unverändert negative Signalkonstellation findet sich in diesem Zellkern nur für das homologe nicht von der Deletion betroffene Chromosom. Ist allerdings nur einer der beiden Genloci betroffen, an den die Sonden binden, so findet sich unter dem Fluoreszenzmikroskop nur ein einzelnes Signal, so dass ein Bruch angenommen werden kann.

In Folge einer Duplikation oder Addition (oder Insertion) wird zusätzliches genetisches Material in das Ziel-Gen eingefügt. Hierdurch rücken die Signale der break-apart-Sonde weiter auseinander, so dass eine positive Signal-Konstellation entsteht.

Die FISH-Methode mit break-apart-Sonden eignet sich somit insbesondere zur Aufdeckung von bekannten Translokationen, während Fragestellungen zu anderen strukturellen Chromosomenaberrationen besser durch die konventionelle Zytogenetik aufgedeckt werden können.

Auch klassische zytogenetische Untersuchungen sollten immer durch geschultes und geübtes Personal durchgeführt werden, da sowohl in der Durchführung als auch in der Auswertung Fehler unterlaufen können, die zu falsch positiven oder negativen Ergebnissen führen können. Für eine zytogenetische Untersuchung werden Tumorzellen in Kultur gezogen, und die Giemsa-gefärbten kondensierten Chromosomen in der Metaphase nach numerischen und strukturellen Veränderungen untersucht. Dies ermöglicht eine ganzheitliche Beurteilung des gesamten Chromosomensatzes und einzelner Chromosomen. Translokationen können so unabhängig von ihren jeweiligen Bruchpunkten nachgewiesen werden, also auch wenn minor cluster regions (mbr) oder Alternative Breakpoint Regions (ABR) betroffen sind^{4,22}.

Für eine korrekte Bewertung muss das ursprüngliche Zellmaterial auch tatsächlich aus dem Tumorgewebe stammen, und während der Anzucht im Kulturmedium dürfen keine sekundären Aberrationen - also in vitro Artefakte - entstanden sein.

Eine Auswertung sollte an zumindest zwanzig Metaphasen durchgeführt werden.

Interessanterweise wurden in den meisten Fällen der vorliegenden Arbeit die durch FISH als positiv und zytogenetisch negativ bestimmt wurden, in der Zytogenetik weit weniger als zwanzig Metaphasen untersucht, was auf eine schlechte Auswertbarkeit dieser Fälle hinweist.

Trotz der geringen Fallzahl konnten sowohl durch FISH als auch durch die konventionelle Zytogenetik die typischen Translokationsereignisse der verschiedenen Lymphom-Entitäten gezeigt werden. Die Fälle des TMA FL 3B und TMA FL zeigten die für das FL typische BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21), aber auch Brüche in BCL6 und MYC, wie sie insbesondere bei den FL 3B vorkommen. Das nebeneinander der verschiedenen Translokationen ließ sich durch die verschiedenen Subtypen (FL 1 bis 3B) der FL erklären, die im TMA FL nicht genauer klassifiziert worden waren. Der TMA DLBCL wies als häufigste Translokation die für DLBCL typische BCL6/IGH t(3;14)(q27;q32) auf. Der TMA MALT zeigte eine geringe Fallzahl an MYC/IGH t(8;14)(q24;q32), aber einen darüber hinausgehenden großen Anteil an IGH-Brüchen, die auf die in MALT-Lymphomen häufig vorkommenden Translokationen IGH/MALT1 und BCL10/IGH hinweisen^{2,6,15}.

Abschließend lies sich feststellen, dass in der vorliegenden Arbeit die Methode der FISH gemessen am Gold-Standard der konventionellen Zytogenetik zufriedenstellende Ergebnisse erbrachte, insbesondere in Hinsicht auf die Verwendung eines TMA.

Allerdings ist zu bemerken, dass FISH und Zytogenetik nicht als konkurrierende Verfahren betrachtet werden sollten, sondern vielmehr als sich ergänzende Methoden.

Die Durchführung der FISH an TMAs ist zum Umsatz großer Fallzahlen uneingeschränkt zu empfehlen, und eignete sich somit auch hervorragend zur weiteren Charakterisierung der FL 3B.

4.3 Zytogenetik der Follikulären Lymphome Grad 3B (FL 3B)

Die Auswahl, beziehungsweise die hämatopathologische Diagnostik der Fälle zur Charakterisierung der FL 3B erfolgte entsprechend den Kriterien der WHO-Klassifikation für Tumoren der Hämatopoetischen und Lymphoiden Gewebe in drei unabhängigen Diagnosedurchgängen (Erstdiagnose aus der Datenbank, Zweitdiagnose in der ersten morphologischen Auswertung, Drittdiagnose als unabhängiger Durchgang). Auch wenn die Diagnosekriterien der WHO objektiv erscheinen, so erscheint die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse möglicherweise unzureichend.

So liegt die Reproduzierbarkeit der Graduierung bei FL unter erfahrenen Hämatopathologen bei nur 61 bis 73 %. Gerade die Unterscheidung zwischen großen Zentrozyten (Large Centrocyte, LCC) und kleinen Zentroblasten macht eine definitive Einteilung offenbar relativ schwierig²³.

Auch die Diagnosen einiger Fälle in der vorliegenden Arbeit wurden in den verschiedenen Durchgängen revidiert, eine Tatsache die dafür spricht, dass belastbare, robuste Kriterien für diese Unterscheidung gerade von FL 3A und FL 3B derzeit noch nicht in ausreichendem Maß vorliegen.

Die Untersuchung der FL mittels FISH zeigte bedeutende Unterschiede in der Häufigkeit bestimmter genetischer Aberrationen in den einzelnen Gruppen. Diese Unterschiede belegen zunächst, dass die hier vorgeschlagene Unterteilung in drei Gruppen offenbar durchaus einen biologischen (genetischen) Hintergrund hat.

Für die Gesamtheit aller untersuchten FL konnten Translokationen des BCL6- und des MYC-Gens in einer Frequenz nachgewiesen werden, die für BCL6 etwa im erwarteten Bereich (19,1 %), für MYC aber relativ hoch lag (21,3 %). Etwas häufiger zeigte sich ein transloziertes BCL2-Gen (31,9 %). Eine Translokation des IGH-Gens fand sich am häufigsten und in etwa der Hälfte aller Fälle (53,2 %).

Die gewonnenen Daten belegen, dass eine BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation die häufigste genetische Aberration auch in der vorliegenden Fallkonstellation darstellte. Dieses Ergebnis entsprach der Erwartung, da das FL ja gerade durch diese BCL2/IGH-Translokation charakterisiert ist. Auch wenn in Betracht gezogen wurde, dass ein kleiner Teil der BCL2-Translokationen nicht das IGH-Gen als Translokationspartner

zeigen, konnte doch von einer Häufigkeit der BCL2/IGH-Translokation von etwa 30 % ausgegangen werden. Diese Translokations-Frequenz ist allerdings erheblich niedriger, als die in der Literatur beschriebene Frequenz von 85 %. Hier muss freilich beachtet werden, dass sich die vorliegende Arbeit nicht mit „typischen“ FL der Grade 1 und 2 beschäftigte, sondern dass hier vor allem FL 3B und deren Varianten beziehungsweise Differentialdiagnosen untersucht wurden, die gerade durch die geringere Häufigkeit der BCL2/IGH-Translokation charakterisiert sind^{2,4,6,8}.

In der Literatur wird angegeben, dass FL 3B durch das Fehlen einer t(14;18)(q32;q21), aber dem häufigeren Vorhandensein einer BCL6-Translokation charakterisiert sind. Entsprechend fand sich für BCL6 ein höherer Prozentsatz (19,1 %), etwa vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen Werten (5 bis 15 %)^{2,4,14}.

Die relativ hohe Frequenz von Translokationen im IGH-Gen entsprach der Erwartung (53,2 %). Allerdings muss angemerkt werden, dass die Beurteilung einer IGH-Translokation in der FISH nicht ganz unproblematisch ist. Im Gegensatz zu den BCL2-, BCL6- oder MYC-Genen ist das IGH-Gen relativ groß, und somit flankieren die verwendeten IGH break-apart-Sonden auch einen relativen weiten Bereich des Chromosoms. Unter Umständen finden sich unter dem Fluoreszenzmikroskop keine Fusionssignale sondern nahe beieinander liegende Einzelsignale. Diese Problematik der IGH break-apart-Sonde kann bei Unkenntnis des Sachverhalts vermehrt zu falsch positiven Ergebnissen führen. Eine gute Einarbeitung an nicht-neoplastischen lymphatischen Gewebe war somit insbesondere für die IGH break-apart-Sonde eine wichtige Voraussetzung (siehe Kapitel 2.2.8).

Wichtig zu bemerken ist aber weiterhin, dass sich die Häufigkeiten von Bruchereignissen in BCL2 und IGH in den verschiedenen Gruppen relativ stark unterschieden, während BCL6 und insbesondere MYC nur geringe Unterschiede und Schwankungen um den Gesamtprozentsatz in den drei Gruppen zeigten.

Die Gruppe 3, bestehend aus FL 1, FL 2 und FL 3A konnte durch das häufige Auftreten von BCL2- (77,8 %) und IGH-Translokationen (88,9 %), und einen geringeren Anteil an Brüchen im BCL6-Gen (22,2 %) charakterisiert werden. Der Anteil der Fälle mit MYC-Bruchpunkt lag mit 22,2 % für FL sehr hoch.

Der Prozentanteil einer BCL2/IGH-Translokation innerhalb dieser Gruppe wurde in zwei Fachartikeln mit 64 bis 88 % angegeben, für eine BCL6-Translokation mit 0 bis 18 %, was etwa den eigenen Ergebnissen entsprach^{13,14}.

Die Gruppe 1, bestehend aus reinen FL 3B, zeigte bemerkenswerterweise ein anderes Bild: ein sehr niedriger Anteil an BCL2-Brüchen (8,7 %), einen vergleichsweise geringen Anteil an Translokationen des IGH-Gens (39,1 %), und selten Brüche in BCL6 (21,7 %). Bruchereignisse im MYC-Gen traten für FL mit einer enorm hohen Frequenz von 26,1 % auf und somit dem höchsten MYC-Prozentwert aller drei Gruppen.

Die reinen FL 3B wurden bereits in zwei vorhergehenden Studien von Ott et al. (2002) und Katzenberger et al. (2004) untersucht, und dabei konnten keine Bruchereignisse in BCL2 und BCL6 nachgewiesen werden. Die untersuchten Fallzahlen mit $n = 4$ und $n = 5$ waren allerdings sehr niedrig, und so verwundert es nicht, dass in der vorliegenden Arbeit mit $n = 23$ Translokationen von BCL2 zwar sehr selten (8,7 %), aber Brüche in BCL6 in deutlich höherer Frequenz (21,7 %) nachgewiesen werden konnten^{13,14}.

Die Gruppe 2, bestehend aus FL, die entweder nicht eindeutig dem Grad 3A oder 3B zugeordnet werden konnten, oder als undefiniert (FL 3U) beschrieben wurden, zeigte in der FISH mäßig häufige Bruchereignisse in BCL2 (40,0 %) und in IGH (53,3 %). In dieser Gruppe wurden Brüche im BCL6- (13,3 %) und MYC-Gen (13,3 %) am seltensten nachgewiesen. Offenbar handelt es sich auch in genetischer Hinsicht also um eine „intermediäre“ Tumorgruppe. Interessanterweise liegt der Prozentwert eines BCL6-Bruchs in der undifferenzierten Gruppe 2 niedriger als der Wert der Gruppe 1 der reinen FL 3B, obwohl in zwei vorhergehenden Studien für FL 3A ein BCL6-Prozentwert von 15 bis 18 % und für reine FL 3B von 0 % gezeigt wurde, was einen niedrigeren Wert in der Gruppe 1 der reinen FL 3B hätte vermuten lassen^{13,14}.

In einer Arbeit von Ott et al. aus dem Jahr 2002 wurden neben zytogenetischen Unterschieden auch variante immunhistochemische Daten zwischen FL 1, FL 2 und FL 3A einerseits (Gruppe A) und reinen FL 3B, beziehungsweise FL 3B mit einer DLBCL-Komponente (Gruppe B) beschrieben¹³.

Eine BCL2-Proteinexpression wurde in 100 % der FL 1 und FL 2 beschrieben, während sich das BCL2-Protein nur in 73 % der FL 3A und 50 % der reinen FL 3B fand. Das Membran-Glykoprotein CD10 konnte in 100 % der FL 1, 97 % der FL 2, 100 % der FL 3A und 75 % der reinen FL 3B nachgewiesen werden. Eine Expression von p53 konnte für FL 1 und FL 3B nicht gezeigt werden, während FL 2 (3 %) und FL 3A (9 %) geringe Frequenzen einer Reaktivität aufwiesen. Die zytoplasmatischen Immunglobulin-Leichketten (cIg) wurden bei FL 1 und FL 2 mit 3 % nachgewiesen. Für cIg waren 75 % der FL 3B positiv, aber kein einziger FL 3A-Fall (0 %)¹³.

Die BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation wurde mit einer Häufigkeit von 86 % und 85 % bei FL Grad 1 und 2 beobachtet, während bei FL 3A eine Frequenz von 73 % vorlag. Für reine FL 3B konnte diese BCL2/IGH-Translokation nicht nachgewiesen werden. Ein Bruchpunkt im 3q27 Genlocus zeigte sich in 3 % der FL 1 bis 2 und in 18 % der FL 3A. Für die reinen FL 3B konnte kein Bruch in 3q27 gezeigt werden¹³.

Ein Vergleich der vorliegenden Arbeit mit der Studie von Ott et al. (2002) ist nur für die Gruppe 1 (reine FL 3B) und Gruppe 3 (FL 1, FL 2, FL 3A) möglich (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Vergleich der zytogenetischen und immunhistochemischen Daten einer Arbeit von Ott et al. (2002)¹³ mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit

	Ott et al. (2002) ¹³				vorliegende Arbeit	
	FL 1	FL 2	FL 3A	FL 3B - DLBCL	Gruppe 3 FL 1, FL 2, FL 3A	Gruppe 1 reine FL 3B
Immunhistochemie						
BCL2 [%]	100	100	73	50	77,8	80,0
CD10 [%]	100	97	100	75	77,8	40,0
p53 [%]	0	3	9	0	11,1	47,6
cIg [%]	3	3	0	75	33,3	57,1
FISH						
BCL2 [%]	86	85	73	0	77,8	8,7
BCL6 [%]	3	3	18	0	22,2	21,7

Die Gruppe 2 der vorliegenden Arbeit findet in der Studie von Ott et al. (2002) keinen direkten Vergleich¹³.

Wie aus Tabelle 26 sichtbar wird, stimmen die Ergebnisse der beiden Arbeiten in einigen Punkten überein. Für CD10 konnte für die Zentrozyten-haltigen FL (FL 1, FL 2, und FL 3A) eine deutlich höhere Expression festgestellt werden, als für FL 3B. Die zytoplasmatischen Immunglobulin-Leichtketten (cIg) konnten deutlich häufiger in FL 3B als in den FL 1 bis 3A nachgewiesen werden. Eine BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation zeigte sich in beiden Arbeiten mit sehr hoher Frequenz bei den FL 1 bis 3A und sehr selten bei den reinen FL 3B¹³.

Bei der Expression von p53 unterschieden sich allerdings die Ergebnisse der beiden Arbeiten. Während p53 bei den FL 1 bis FL 3A in beiden Studien mit sehr niedriger Frequenz auftrat, zeigte sich bei Ott et al. für reine FL 3B keine Expression (0 %) während sich die reinen FL 3B in der vorliegenden Arbeit mit deutlich erhöhter p53-Expression (47,6 %) präsentierten. Die Expression von BCL2 lag für die Gruppe der FL 1 bis FL 3A in beiden Arbeiten bei ähnlich hohen Werten (73 bis 100 %). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich allerdings eine ähnliche hohe BCL2-Expression

(80,0 %) auch für die Gruppe 1 (reine FL 3B), während bei Ott et al. die Proteinexpression deutlich vermindert war (50 %). Auch beim Bruchpunkt BCL6 3q27 fanden sich unterschiedliche Ergebnisse: Die Prozentwerte für FL 1 bis FL 3A (3 bis 18 %) lagen bei Ott et al. unter den entsprechenden Werten (22,2 %) der Gruppe 3 der vorliegenden Arbeit. Und während sich bei Ott et al. kein Bruch in BCL6 für FL 3B feststellen ließ, konnte in der vorliegenden Arbeit eine Frequenz von 21,7 % ermittelt werden¹³.

Der Großteil der unterschiedlichen Ergebnisse bezieht sich somit auf die Gruppe 1, beziehungsweise die reinen FL 3B. Hierbei muss aber angemerkt werden, dass die Anzahl der untersuchten FL 3B-Fälle von Ott et al. mit $n = 4$ sehr niedrig war¹³.

Insgesamt sprechen beide Arbeiten aber dafür, dass sich die FL 1 und FL 2 in ihren immunhistochemischen und zytogenetischen Eigenschaften deutlich von den FL 3B unterscheiden. Die FL 3A, die nach dem aktuellem Stand zusammen mit den FL 3B in eine gemeinsame Gruppe der FL 3 zusammengefasst werden, ähneln in ihren Charakteristika aber deutlich mehr den FL 1 und FL 2, so dass eine Einteilung in centrozytische (FL 1 bis FL 3A; Gruppe A) und centroblastische (FL 3B; Gruppe B) FL, wie von Ott et al. in ihrer Studie vorgeschlagen wird, sinnvoll erscheint¹³.

Die erhobenen biologischen Daten beider Arbeiten sprechen außerdem dafür, dass die FL 3 keine einheitliche Gruppe darstellen, und eine Einteilung, wie sie die WHO vornimmt, in FL 3A, die phänotypisch eher den FL 1 und FL 2 zuzurechnen sind, und FL 3B mit einer Verwandtschaft zu DLBCL, gerechtfertigt ist¹³.

Während bei Ott et al. (2002) die Charakterisierung und Differenzierung der FL 3 im Mittelpunkt der Arbeit stand, untersuchten Katzenberger et al. in einer Studie aus dem Jahr 2004 insbesondere den BCL6 3q27 Genlocus bei reinen FL 3B und FL 3B mit DLBCL-Komponente im Vergleich zu DLBCL^{13,14}.

Dennoch beschreiben Katzenberger et al. in ihrer Arbeit auch Ergebnisse zur Proteinexpression von BCL2, BCL6, CD10, p53 und cIg, und zur BCL2/IGH-Translokation von FL 1 bis 3A und auch reinen FL 3B¹⁴.

Für die FL 1 bis 2 und FL 3A beschreiben Katzenberger et al. eine sehr hohe Proteinexpression für BCL2 (100 % und 87 %), BCL6 (100 % und 86 %) und CD10 (100 % und 96 %). Niedrigere Werte mit 60 % für alle drei Proteine wurden für die reinen FL 3B gezeigt. Während sich keine Expression (0 %) von p53 bei FL 1 bis 2 und reinen FL 3B fand, konnte eine geringe Frequenz (13 %) bei FL 3A festgestellt werden. Für die zytoplasmatischen Leichtketten (cIg) wurden für FL 1 bis 2 niedrige (13 %) und für FL 3A moderate (41 %) Werte gefunden. Alle FL 3B-Fälle (100 %) waren positiv für cIg¹⁴.

In der FISH-Analyse konnten für die reinen FL 3B sowohl keine Brüche im BCL2-, als auch im BCL6-Genlokus gezeigt werden (0 %). FL 1 bis 2 und FL 3A wiesen allerdings eine hohe Bruch-Frequenz für BCL2 auf (88 % und 64 %). Für BCL6 waren die FL 1 bis 2 ebenso wie die FL 3B negativ (0 %), die FL 3A leicht positiv (17 %)¹⁴.

Somit konnte auch in der Arbeit von Katzenberger et al. gezeigt werden, dass FL 3A viele Charakteristika der FL 1 und FL 2 zeigen, und vor allem in der hohen Frequenz der BCL2/IGH t(14;18)(q21;q32) Translokation übereinstimmen, während FL 3B andere immunhistochemische und zytogenetische Eigenschaften aufweisen¹⁴.

Außerdem konnte von Katzenberger et al. festgestellt werden, dass der Bruchpunkt BCL6 3q27 vor allem bei transformierten FL 3B und FL 3B mit DLBCL-Komponente gefunden wird, und diese FL 3B somit eine enge Beziehung zu den DLBCL zeigen. Interessantweise konnte sogar gezeigt werden, dass FL 3B mit DLBCL-Anteilen eine höhere Frequenz einer BCL6-Aberration aufweisen als reine DLBCL. Für reine FL 3B hingegen konnte kein Bruch im BCL6-Gen festgestellt werden¹⁴.

Katzenberger et al. beschreiben für eine BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation eine Frequenz von 88 % für FL 1 und FL 2, für FL 3A von 64 %. Diese Ergebnisse entsprechen in etwa den Daten der vorliegenden Arbeit mit 77,8 % in der Gruppe 3 der FL 1, FL 2 und FL 3A. Während Katzenberger et al. die BCL2/IGH-Translokation bei reinen FL 3B nicht feststellen konnten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein sehr niedriger Wert von 8,7 % in der Gruppe 1 (reine FL 3B) ermittelt¹⁴.

Katzenberger et al. konnten zwar einerseits für FL 1 bis 2 keinen Bruch im BCL6-Gen (0 %) zeigen, aber andererseits für FL 3A eine BCL6-Bruchfrequenz von 17 % nachweisen, welche in etwa der BCL6-Frequenz (22,2 %) der Gruppe 3 (FL 1, FL 2 und

FL 3A) in der vorliegenden Arbeit entspricht. Für die reinen FL 3B unterschieden sich die Ergebnisse aber deutlich: Katzenberger et al. konnten keinen Bruch in BCL6 feststellen, während ein BCL6-Bruch in der vorliegenden Arbeit in 21,7 % der Fälle auftrat (siehe Tabelle 27)¹⁴.

Tabelle 27: Vergleich der zytogenetischen und immunhistochemischen Daten der Arbeit von Katzenberger et al. (2004)¹⁴ mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit

	Katzenberger et al. ¹⁴			vorliegende Arbeit	
	FL 1 und FL 2	FL 3A	FL 3B - DLBCL	Gruppe 3 FL 1, FL 2, FL 3A	Gruppe 1 reine FL 3B
Immunhistochemie					
BCL2 [%]	100	87	60	77,8	80,0
BCL6 [%]	100	86	60	100,0	85,7
CD10 [%]	100	96	60	77,8	40,0
p53 [%]	0	13	0	11,1	47,6
cIg [%]	13	41	100	33,3	57,1
FISH					
BCL2 [%]	88	64	0	77,8	8,7
BCL6 [%]	0	17	0	22,2	21,7

Die Gruppe 2 der vorliegenden Arbeit findet in der Studie von Katzenberger et al. (2002) keinen direkten Vergleich¹⁴.

In ihrer Arbeit weisen Katzenberger et al. auch daraufhin, dass es sich bei den reinen FL 3B unter Umständen um eine eigene Variante der FL handeln könnte, da diese seltene Gruppe weder BCL2-Translokationen noch BCL6-Aberrationen aufweisen würde. Allerdings konnte diese Annahme in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da sich bei den 23 untersuchten reinen FL 3B eine niedrige Frequenz von 8,7 % für eine BCL2/IGH-Translokation und eine Aberrations-Häufigkeit von 21,7 % für Bruchereignisse im BCL6-Gen zeigte. Der Prozentwert für BCL2 war wie zu erwarten niedrig ausgefallen, und für BCL6 konnte kein deutlicher Unterschied zu der Häufigkeit (22,2 %) bei FL 1, FL 2 oder FL 3A festgestellt werden. Außerdem bleibt anzumerken, dass die Anzahl der von Katzenberger et al. untersuchten reinen FL 3B mit n = 5 relativ gering war¹⁴.

Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit konnten Katzenberger et al. keine positive Korrelation für das Vorhandensein einer BCL6-Alteration und einer Expression des BCL6-Proteins feststellen. Schon im Jahr 2002 konnte in einer Arbeit von Jardin et al. gezeigt werden, dass die Expression von BCL6 unabhängig von einem Rearrangement des 3q27-Genlokus bei Lymphomen ist^{14,24}.

Bosga-Bouwer et al. untersuchten in einer Arbeit aus dem Jahr 2003 insgesamt 32 Fälle, die sie als FL 3B klassifizierten, und konnten diese Fälle in drei verschiedene Gruppen einteilen. In der Gruppe I fanden sich Fälle mit einer BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation, ohne einen Bruch im BCL6-Gen (3q27) (n = 13). Die Fälle der Gruppe II waren sowohl negativ für eine BCL2/IGH-Translokation als auch einen BCL6-Bruch (n = 9), und die Fälle Gruppe III zeigten nur ein Bruchereignis für BCL6, ohne dass eine BCL2/IGH-Translokation vorlag (n = 10). In dieser Untersuchung konnten keine Fälle beobachtet werden, in denen sowohl eine t(14;18)(q32;q21) Translokation als auch ein 3q27-Bruch vorlag. Die Autoren postulierten daher, dass sich eine BCL2/IGH-Translokation und ein Bruch in BCL6 gegenseitig ausschließen. Zudem wurde angenommen, dass FL 3B mit Nachweis einer BCL2/IGH-Translokation wahrscheinlich zur selben Tumorentität gehören würden, wie die FL der Grade 1, 2 und 3A. FL 3B ohne BCL2/IGH-Translokation aber mit BCL6-Bruchereignis schienen dagegen eher mit der Gruppe der DLBCL verwandt zu sein²¹.

Überprüft man die vorliegende Arbeit nach der von Bosga-Bouwer et al. beschriebenen Einteilung erhält man folgende Ergebnisse²¹:

In der Gruppe 1 der reinen FL 3B liegt ein einziger BCL2 positiver, BCL6 negativer Fall vor, und es existieren 17 Fälle, die für BCL2 und BCL6 negativ sind. Vier Fälle mit einer Translokation von BCL6 ohne BCL2-Bruchereignis konnten aufgedeckt werden. Allerdings findet sich ein Fall #323, der für alle getesteten Sonden (BCL2, BCL6, MYC und IGH) positiv ist.

Die Gruppe 2 der „intermediären“ FL 3 setzt sich aus sechs Fällen mit BCL2- aber ohne BCL6-Bruch, aus sieben Fällen ohne BCL2- oder BCL6-Bruch und zwei Fällen mit einem alleinigen Bruchereignis in BCL6 zusammen.

Sechs Fälle der Gruppen 3 sind positiv sowohl für BCL2 als auch für BCL6. Ein Fall zeigt weder BCL2- noch BCL6-Bruch, und ein weiterer ist nur für BCL6 positiv. In einem Fall der Gruppe 3 (#347) finden sich Brüche sowohl in BCL2 und BCL6 als auch in IGH.

In der vorliegenden Arbeit finden sich FL 3B sowohl in der Gruppe 1 als auch in der Gruppe 2 wieder. Vergleicht man diese beiden Gruppen nach der von Bosga-Bouwer et al. vorgegebenen Einteilung, stellt man fest, dass sich der Großteil der BCL2 positiven und BCL6 negativen Fälle in der Gruppe 2 findet (6 von 7 in den Gruppen 1 und 2). Es könnte somit angenommen werden, dass sich die BCL2 positiven, BCL6 negativen Fälle der Gruppe I nach Bosga-Bouwer et al. am ehesten der Gruppe 2 der vorliegenden Arbeit zuordnen ließen²¹.

Bosga-Bouwer et al. konnten durch immunhistochemische Färbung aller untersuchten FL 3B für die Proteinexpression von BCL2 und BCL6 Prozentwerte von 93,8 % beziehungsweise 100,0 % bestimmen. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl für die Gruppe 1 mit 80,0 % beziehungsweise 85,7 %, als auch für die Gruppe 2 mit 69,2 % und 100,0 % nur bedingt bestätigt werden²¹.

Eine positive Korrelation zwischen einer BCL2-Proteinexpression und dem Vorhandensein einer BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation konnte von Bosga-Bouwer et al. (2003) für die untersuchten FL 3B nicht festgestellt werden. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte keine derartige positive Korrelation für die Gruppe 1 (reine FL 3B) und auch nicht für die anderen beiden Gruppen gezeigt werden. Allerdings konnte beobachtet werden, dass eine Übereinstimmung der BCL2-Expression und der BCL2/IGH-Translokation von Gruppe 1 bis Gruppe 3 zunahm²¹ (siehe Tabelle 22, Kapitel 3.3.3).

In einer weiteren Studie von Bosga-Bouwer et al. aus dem Jahr 2006 wurde die Einteilung der ersten Studie zur Charakterisierung der FL 3B übernommen: eine erste Gruppe mit Bruch im BCL6-Gen ohne BCL2/IGH-Translokation (Gruppe III, n = 10), eine zweite Gruppe ohne BCL6-Bruch und ohne BCL2-Translokation (Gruppe II, n = 9) und eine dritte Gruppe mit BCL2/IGH-Translokation aber ohne BCL6-Bruchereignis

(Gruppe I, n = 11). Alle Fälle wurden mittels FISH auf einen Bruch im Proto-Onkogen MYC und auf die immunhistochemische Expression von BCL2, BCL6, CD10 und p53 untersucht²⁰.

Allerdings stellten Bosga-Bouwer et al. (2006) fest, dass sich die drei zytogenetisch unterschiedlichen Subgruppen des FL 3B nicht bedeutend in der Häufigkeit eines MYC-Bruchs oder der Proteinexpression von BCL2, BCL6 und p53 unterschieden. Einzig eine höhere Expression von CD10 und eine höhere Frequenz von Zugewinnen im Chromosom 7 in der Gruppe der BCL6 negativen, BCL2 positiven FL 3B konnte als Unterscheidungsmerkmal zu den anderen Subgruppen festgestellt werden. Da eine starke CD10-Proteinexpression und Zugewinne im Chromosom 7 typische Merkmale der indolenten FL darstellen, erklären die Autoren, dass BCL2 positive, BCL6 negative FL 3B (Gruppe III) eine engere Verwandtschaft zu den FL 1 bis 3A aufweisen, als die BCL2 und BCL6 negativen FL 3B (Gruppe II), beziehungsweise ausschließlich BCL6 positiven FL 3B (Gruppe I), die somit dem DLBCL nahe stehen würden²⁰.

In der vorliegenden Arbeit finden sich in der Gruppe 1 der reinen FL 3B vier Fälle mit einem BCL6-Bruch und ohne BCL2-Translokation. Es liegen 17 Fälle vor, die weder BCL2- noch BCL6-Brüche zeigen. Nur ein Fall weist eine BCL2/IGH-Translokation auf, ohne ein BCL6-Bruchereignis. Der Fall #323 ist positiv für Bruchpunkte in BCL2, BCL6, MYC und IGH.

Ergänzt man die Fälle der Gruppe 2 (FL 3A, FL 3B, FL 3U) so kommen in der Gruppe I nach Bosga-Bouwer et al. weitere zwei Fälle hinzu, in der Gruppe II weitere sieben Fälle und in der Gruppe III weitere sechs Fälle²⁰.

Wurden diese Fälle auf die Häufigkeit eines MYC-Bruchs und die Expression von BCL2, BCL6, p53 untersucht, so konnten wie bei Bosga-Bouwer et al. keine bedeutenden Unterschiede in den Gruppen festgestellt werden. Interessanterweise konnten die Prozentangaben für CD10 von Bosga-Bouwer et al. nicht bestätigt werden, so dass sich auch hier kein bedeutenden Unterschied zwischen den Subgruppen zeigte²⁰.

Wie von Bosga-Bouwer et al. (2006) festgestellt wurde, konnte durch eine Einteilung der FL 3B nach dem Vorhandensein, beziehungsweise dem Fehlen eines Bruchpunkts im BCL2 oder BCL6-Genlokus keine handfesten Unterscheidungsmerkmale der einzelnen Gruppen beschrieben werden²⁰.

Im Gegensatz zu dieser Einteilung von Bosga-Bouwer et al. konnten sowohl in den Arbeiten von Ott et al. und Katzenberger et al. gezeigt werden, dass eine Unterteilung der FL 3B in FL 3B mit DLBCL-Anteilen und ohne DLBCL-Anteile eindeutige Unterscheidungsmerkmale liefert, insbesondere in Hinsicht auf den BCL6-Bruchpunkt^{13,14,20}.

Auch eine Einteilung der drittgradigen FL wie sie in der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde, mit einer Gruppe 1 von reinen FL 3B auf der einen Seite, und einer „intermediären“ Gruppe 2 (FL 3A, FL 3B und FL 3U, insbesondere Kombinationen aus den Genannten) auf der anderen Seite, konnte anhand FISH- und immunhistochemischen Untersuchungsergebnissen eine gute Differenzierung der beiden Gruppen zeigen. Allerdings werden die Fälle der Gruppe 2 weniger durch zytogenetische oder immunhistochemische Eigenschaften charakterisiert, als vielmehr durch die Schwierigkeit einer korrekten histopathologischen Zuordnung dieser Fälle in die Gruppen 1 und 3.

Aufgrund dieser Arbeiten erscheint eine Einteilung der Follikulären Lymphome in zentrozytische (FL 1 bis FL 3A), intermediäre FL 3, die histopathologisch nicht eindeutig den FL 3A oder FL 3B zuzuordnen sind, und zentroblastische FL 3B sinnvoll. Eine weitere Unterteilung der FL 3B in reine FL 3B (ohne DLBCL-Anteil) und FL 3B mit DLBCL-Anteilen stellt eine sinnvolle Ergänzung dar. Sämtliche der genannten Subgruppen lassen sich durch zytogenetische und immunhistochemische Untersuchungen differenzieren (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Zytogenetische und immunhistochemische Unterscheidungsmerkmale verschiedener Subgruppen Follikulärer Lymphome (FL)

Gruppe	FISH	Immunhistochemie
Zentrozytische FL (FL 1, FL 2 und FL 3A)	BCL2 hoch (64 - 86 %)* ¹ BCL6 niedrig (0 - 22,2 %)	BCL2 sehr hoch (73 - 100 %) CD10 sehr hoch (77,8 - 100 %) p53 sehr niedrig (0 - 13 %) cIg niedrig (0 - 41 %)
Intermediäre FL (FL 3A, FL 3B und FL 3U, insbesondere Kombinationen aus den Genannten)	BCL2 mittelgradig (40,0 %) BCL6 niedrig (13,3 %)	BCL2 mittelgradig (69,2 %) CD10 mittelgradig (35,7 %) p53 sehr niedrig (7,7 %) cIg niedrig (7,7 %)
Zentroblastische FL		
Reine FL 3B (FL 3B - DLBCL)	BCL2 sehr niedrig (0 - 8,7 %) BCL6 niedrig (0 - 21,7 %)	BCL2 mittelgradig (50 - 80,0 %) CD10 hoch (40 - 75 %) p53 mittelgradig (0 - 47,6 %) cIg hoch (57,1 - 100 %)
FL 3B + DLBCL	BCL2 niedrig (5 - 17%) BCL6 hoch (55 - 58%)	BCL2 hoch (75 - 86 %) CD10 mittelgradig (32 - 42 %) p53 hoch (36 - 42 %) cIg mittelgradig (33 - 64 %)

*¹ Sämtliche Prozentwerte ergeben sich aus der folgenden Tabelle 29.

Tabelle 29: Ergebnisse von immunhistochemischen und FISH-Untersuchungen verschiedener Arbeiten aufgeteilt nach Subgruppen Follikulärer Lymphome (FL)

		FL 1 bis FL 3A	intermediäre FL	FL3B - DLBCL	FL3B + DLBCL
BCL2- Bruchpunkt [%]	Ott et al. (2002) ¹³	73 - 86		0	17
	Katzenberger et al. (2006) ¹⁴	64 - 88		0	5
	vorliegende Arbeit	77,8	40,0	8,7	
BCL6- Bruchpunkt [%]	Ott et al. (2002) ¹³	3 - 18		0	58
	Katzenberger et al. (2006) ¹⁴	0 - 17		0	55
	vorliegende Arbeit	22,2	13,3	21,7	
BCL2- Protein [%]	Ott et al. (2002) ¹³	73 - 100		50	75
	Katzenberger et al. (2006) ¹⁴	87 - 100		60	86
	vorliegende Arbeit	77,8	69,2	80,0	
CD10 [%]	Ott et al. (2002) ¹³	97 - 100		75	42
	Katzenberger et al. (2006) ¹⁴	96 - 100		60	32
	vorliegende Arbeit	77,8	35,7	40,0	
p53 [%]	Ott et al. (2002) ¹³	0 - 9		0	42
	Katzenberger et al. (2006) ¹⁴	0 - 13		0	36
	vorliegende Arbeit	11,1	7,7	47,6	
cIg [%]	Ott et al. (2002) ¹³	0 - 3		75	33
	Katzenberger et al. (2006) ¹⁴	13 - 41		100	64
	vorliegende Arbeit	33,3	7,7	57,1	

In der vorliegenden Arbeit wurde neben den „typischen“ genetischen Bruchpunkten BCL2 (vor allem bei FL 1 bis FL 3A) und BCL6 (insbesondere bei FL 3B) auch der MYC-Genlocus 8q24 untersucht, und es konnte festgestellt werden, dass in allen drei Gruppen erstaunlich hohe Prozentsätze von Bruchereignissen dieses Gens in FL gefunden wurden.

Die MYC-Aberration findet sich vor allem in Burkitt-Lymphomen, kann aber auch weniger häufig (5 bis 10 % der Fälle) bei DLBCL, und transformierten FL auftreten^{4,13}. Follikuläre Lymphome können in 25 bis 60 % der Fälle in ein hoch malignes DLBCL übergehen (Transformation), und in 8 % dieser Transformationen wird ein MYC-Bruchpunkt beschrieben^{2,6}.

Da es sich aber in allen Gruppen, insbesondere der Gruppe 1 der reinen FL 3B, um nicht-transformierte FL ohne DLBCL-Komponente handelt, ist es bemerkenswert, dass in allen Gruppen relativ hohe Prozentwerte gefunden wurden. Interessanterweise fanden sich in den Gruppen 1 und 3 ähnlich hohe Prozentwerte (21,7 und 22,2 %), während die „intermediären“ FL der Gruppe 2 einen etwas niedrigeren Wert zeigten (13,3 %).

Bosga-Bouwer et al. (2006) untersuchen in ihrer Arbeit über FL 3B auch den MYC-Genlocus. In vier von 26 untersuchten Fällen (15,4%) konnten Bosga-Bouwer et al. einen Bruchpunkt in MYC 8q24 nachweisen²⁰.

In der vorliegenden Arbeit finden sich insgesamt neun Fälle, die einen Bruch im MYC-Genlocus aufweisen. Fünf Fälle in der Gruppe 1 und jeweils zwei Fälle in den Gruppen 2 und 3 (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: FISH-Ergebnisse für Bruchpunkte im MYC 8q24-Genlokus und Ergebnisse der Immunhistochemie für BCL2, BCL6, CD10, IRF4/MUM1, p53 und cIg

Fallnummer	Gruppe	MYC 8q24 [%]	BCL2-Protein [%]	BCL6-Protein [%]	CD10	IRF4/MUM1	p53 [%]	cIg
#311	1	+ (50)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
#314	1	+ (39)	- (0)	+ (80)	+	-	+ (50)	-
#318	1	+ (49)	+ (100)	+ (90)	-	n.a.	+ (90)	+
#319	1	+ (76)	+ (100)	- (10)	n.a.	n.a.	- (10)	-
#323	1	+ (52)	+ (100)	+ (70)	+	-	- (10)	+
#328	2	+ (55)	- (0)	+ (70)	+	-	- (10)	-
#332	2	+ (78)	+ (100)	+ (90)	+	-	- (10)	-
#342	3	+ (71)	+ (100)	+ (80)	+	-	- (10)	-
#343	3	+ (82)	+ (100)	+ (70)	+	-	- (10)	+

+ \triangleq positiv

- \triangleq negativ

n.a. \triangleq nicht analysiert

In der Gruppe 1 waren drei der MYC positiven Fälle auch positiv für das BCL2-Protein (3 von 4; 75,0 %), ein Fall war negativ für BCL2. Die Gruppe 2 war in 50,0 % der Fälle MYC- und BCL2-Protein positiv (1 von 2; 50,0 %) und in 50,0 % MYC positiv aber für das BCL2-Protein negativ (1 von 2; 50,0 %). Beide Fälle in der Gruppe 3 waren sowohl positiv für einen MYC-Bruch als auch für die BCL2-Proteinexpression (2 von 2; 100,0%).

Bei Bosga-Bouwer et al. (2006) waren alle vier MYC positiven FL 3B-Fälle auch gleichzeitig positiv für das BCL2-Protein (4 von 4; 100,0 %) ²⁰.

Bis auf einen Fall waren sämtliche MYC positiven Fälle der vorliegenden Arbeit auch positiv für das BCL6-Protein. Nur in einem Fall der Gruppe 1 war die BCL6-Expression negativ, trotz einer MYC-Positivität des Falls (3 von 4; 75,0%).

Alle vier MYC positiven FL 3B-Fälle bei Bosga-Bouwer et al. waren gleichzeitig positiv für das BCL6-Protein (4 von 4; 100,0%) ²⁰.

Während die Gruppen 2 und 3 für einen Bruch im MYC-Gen und gleichzeitig für eine Expression des Oberflächenmarkers CD10 positiv waren (2 von 2; 100,0 %), konnte ein Fall der Gruppe 1 als negativ für CD10 beschrieben werden (2 von 3; 66,7 %).

Bosga-Bouwer et al. fanden in ihrer Untersuchung unter drei MYC positiven FL 3B-Fällen ebenfalls einen Fall, der negativ für CD10 war (2 von 3; 66,7 %) ²⁰.

Für p53 waren zwei Fälle der Gruppe 1 (2 von 4, 50,0 %), kein Fall der Gruppe 2 (0 von 2; 0,0%) und ein Fall der Gruppe 3 (1 von 2; 50,0 %) positiv, und gleichzeitig positiv für einen MYC-Bruch.

Bei Bosga-Bouwer et al. waren alle drei MYC positiven Fälle, die auch ein Ergebnis für p53 erbracht hatten, positiv für eben diesen Marker (3 von 3; 100,0 %) ²⁰.

Alle sechs untersuchten Fälle, die MYC positiv waren und für die ein immunhistochemisches Ergebnis für IRF4/MUM1 gefunden wurde, waren negativ für diesen Marker (0 von 6; 0,0 %)

Ein monotypisches cytoplasmatisches Ig (cIg) konnte in zwei Fällen der Gruppe 1 (2 von 4; 50,0 %), in keinem Fall der Gruppe 2 (0 von 2; 0,0 %) und in einem Fall der Gruppe 3 (1 von 2; 50,0 %) bei MYC positiven Fällen nachgewiesen werden.

Tabelle 31: Vergleich immunhistochemischer Ergebnisse für MYC positive FL 3B (Gruppe 1) in der Arbeit von Bosga-Bouwer et al (2006) ²⁰ und in der vorliegenden Arbeit

	Bosga-Bouwer et al. ²⁰	vorliegende Arbeit
BCL2-Protein [%]	100,0	75,0
BCL6-Protein [%]	100,0	75,0
CD10 [%]	66,7	66,7
p53 [%]	100,0	50,0
IRF4/MUM1 [%]		0,0
cIg [%]		50,0

Follikuläre Lymphome Grad 3B, die in der FISH-Untersuchung positiv für einen Bruch im MYC-Genlokus 8q24 waren, zeigten in der Immunhistochemie für die Proteinexpression von BCL2, BCL6, CD10 und p53 bei Bosga-Bouwer et al. (2006) und in der vorliegenden Arbeit somit sehr ähnliche Ergebnisse, allerdings war die Anzahl der untersuchten Fälle in beiden Arbeiten mit n = 4 beziehungsweise n = 5 sehr gering ²⁰.

In der vorliegenden Arbeit wurden insbesondere reine FL 3B ohne diffuse Anteile untersucht, und somit konnten nur eingeschränkt Aussagen zu den Unterschieden der reinen FL 3B und den FL 3B mit diffusen Anteilen (FL 3B + DLBCL) gemacht werden. In vier der insgesamt 27 FL wurde in einem der drei unabhängig voneinander durchgeführten Diagnosedurchgänge die Diagnose eines anteiligen DLBCL gestellt. Nur in einem Fall fand sich der Zusatz „+ DLBCL“ in der abschließenden Diagnose (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32: Fälle mit DLBCL-Anteil in der histologischen Diagnose

Fallnummer	Gruppe	Diagnosen	BCL2 [%]	BCL6 [%]	MYC [%]	IGH [%]
#310	1	n.a. CB folliculär* ¹ FL 3B + DLBCL	- (5)	+ (15)	- (12)	+ (21)
#318	1	FL 3B + DLBCL FL 3B FL 3B	- (4)	- (4)	+ (49)	+ (82)
#334	2	FL 3B + DLBCL FL 3B FL 3A	- (1)	- (5)	- (7)	- (16)
#341	3	FL 3A; DLBCL FL 3A LCC FL 1 - FL 2 LCC	+ (45)	- (7)	- (8)	+ (51)

+ \triangleq positiv

- \triangleq negativ

n.a. \triangleq nicht analysiert

Entsprechend der genannten Studien würde man für FL 3B + DLBCL in 55 bis 58 % der Fälle eine BCL6-Translokation und in nur 5 bis 17 % der Fälle eine BCL2/IGH-Translokation erwarten.

Nur für den Fall #310 konnte die zu erwartende Bruch-Kombination aufgezeigt werden, und dieser Fall war der einzige, der im finalen Diagnosedurchgang als FL 3B + DLBCL beschrieben wurde. Für diesen Fall konnte die BCL6/IGH t(3;14)(q27;q32)

Translokation auch nicht mittels FISH festgestellt werden, sondern wurde durch die konventionelle Zytogenetik nachgewiesen.

Untersuchte man im Umkehrschluss sämtliche Fälle, die eine nach Studienlage typische Bruchkombination (für BCL2 negativ und für BCL6 positiv) zeigten, stellte man fest, dass diese sechs Fälle unspezifisch aus allen drei Gruppen stammten.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von CD5, CD10 und CD20 entsprachen voll den Erwartungen für FL.

Über alle Gruppen hinweg lag der Anteil der CD5 positiven Fälle bei unter 10 %^{2,3,4}.

Der Anteil an CD10 positiven Fällen lag zwar mit 45,8 % in allen Gruppen unter den aus der Fachliteratur zu erwartenden 60 %, allerdings ist bekannt, dass höhergradige Lymphome CD10 mit geringerer Frequenz ausbilden. Eine genauere Analyse der Gruppen zeigt dann auch, dass die Häufigkeit von CD10 mit höherem Lymphom-Grad abfällt. Bei einer Untersuchung, die insbesondere hochgradige Lymphome untersucht, ist somit ein niedrigerer Wert für die Frequenz von CD10 über alle Gruppen hinweg zu erwarten^{2,4,6,12}.

CD20 als Pan-B-Zell-Marker soll bei allen Tumorzellen eines B-Zell-Lymphoms positiv ausfallen^{2,4,7}.

Die immunhistologische Testung auf IRF4/MUM1 erbringt ein den Literatur-Recherchen entsprechendes Ergebnis. Über alle untersuchten Fälle zeigt sich, dass eine bestimmte Gruppe FL statt der häufigen CD10-Positivität eine Ausbildung von IRF4/MUM1 aufweist (CD10 - und IRF4/MUM1 +). Diese Variation findet sich vermehrt bei den höhergradigen Lymphomen, allerdings in geringerem Ausmaße (< 50 % der Fälle) als der Phänotyp CD10 + und IRF4/MUM1 -^{2,6,12}.

Die Bestimmung des Proliferationsindex mit dem Marker Ki67 erbrachte die zu erwartenden Ergebnisse. Mit steigendem Tumorgrad erhöhte sich auch der Anteil von Fällen mit einer Proliferationsfraktion, die über 20 % lag².

Die Färbungen für die zytoplasmatischen Immunglobulin-Leichtketten (cIg) zeigte eine niedrigere Positivität der Fälle als zu erwarten gewesen wäre. Nur 16 von 43 Fällen (16 von 43; 37,2 %) sind positiv für cIg, während ein Prozentwert von über 50 % zu erwarten gewesen wäre. Allerdings bezieht sich dieser Erwartungswert auf zytoplasmatische und Oberflächen-Immunglobuline, so dass der niedrige Prozentwert durchaus gerechtfertigt ist^{2,6}.

Das Verhältnis der Häufigkeiten von kappa (κ) zu lambda (λ) mit 3 zu 1 liegt über dem Wert für die normale B-Zell-Reifung mit 2 zu 1, doch ist bekannt, dass sich das Verhältnis bei malignen Prozessen häufig ändert^{3,4}.

Interessanterweise finden sich 91,7 % (11 von 12; 91,7 %) der kappa (κ) positiven Fälle in der Gruppe 1 der reinen FL 3B, und 75,0 % (3 von 4; 75,0 %) der lambda (λ) positiven Fälle außerhalb dieser Gruppe.

Die immunhistologische Testung auf TCL1 erbrachte keine auffälligen Resultate. Eine Färbung für TCL1 zeigte ich insgesamt und in den einzelnen Gruppen in etwa 50 % der untersuchten Fälle. Eine Korrelation zu einem anderen untersuchten Parameter konnte nicht festgestellt werden.

Insgesamt konnte die vorliegende Arbeit die meisten genetischen und immunhistochemischen Charakteristika der FL, insbesondere der FL 3B, die bereits in anderen Arbeiten festgestellt wurden bestätigen.

Die reinen FL 3B unterscheiden sich durch eine erhöhte Proliferationsfraktion und einen erhöhten Anteil an CD10 negativen, IRF4/MUM1 positiven Fällen von den FL 1 bis 3A, aber das wichtigste Unterscheidungsmerkmal bleibt das Fehlen einer BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation. Ein wirklich bedeutender Unterschied in der Häufigkeit einer BCL6- oder MYC-Translokation zwischen FL 3B und FL 1 bis 3A war nicht zu finden.

Die Frage ob FL 3B eine engere Verwandtschaft zu den DLBCL oder den FL aufweisen wird erheblich diskutiert.

In einer ausführlichen Gen-Expressions-Analyse konnten Piccaluga et al. (2002) feststellen, dass das folliculäre Lymphom tatsächlich eine eigene Lymphom-Entität mit einem Ursprung aus der Keimzentrums-B-Zelle ist, und dass einerseits FL 1 bis FL 3A, als auch FL 3B andererseits jeweils eine homogene Subgruppe darstellen. Es wird aber explizit daraufhin gewiesen, dass FL 3B eine deutlich engere Verwandtschaft zu den niedriggradigeren FL als zu den Keimzentrums-DLBCL zeigen²³.

Aufgrund dieser Feststellungen sprechen sich Piccaluga et al. für eine vereinfachte Einteilung der FL aus, mit FL ohne große Keimzentrum-B-Zellen, also erhaltener Reifung zu Zentrozyten (FL 1 bis FL 3A) auf der einen Seite und FL mit großen, blastischen Keimzentrumszellen (FL 3B) auf der anderen Seite, wie sie bereits von der Arbeitsgruppe Ott et al. in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2002 beschrieben wurde^{13,23}.

5. Zusammenfassung

Das Follikuläre Lymphom (FL) ist nach dem Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom in der westlichen Welt. Die aktuelle WHO-Klassifikation für Tumoren der Hämatopoetischen und Lymphoiden Gewebe aus dem Jahr 2008 unterteilt dieses maligne Lymphom nach Histologie und Wachstumsmuster in vier Gruppen, FL 1 bis FL 3A und FL 3B. Obwohl die FL 1 und FL 2 zu den indolenten Tumoren gezählt werden, und FL 3A und FL 3B tendenziell eher als aggressiv gelten, so wurde in einigen Studienarbeiten gezeigt, dass das FL 3A aufgrund seiner immunhistologischen und genetischen Charakteristika, insbesondere dem Vorhandensein der BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation, eher den low-grade-Lymphomen (FL 1 und FL 2) nahe steht, während das FL 3B durchaus Eigenschaften des DLBCL, wie das Fehlen einer BCL2/IGH-Translokation und das vermehrte Auftreten von Aberrationen des BCL6-Gens, zeigt. In verschiedenen Arbeiten wurde des Weiteren eine Einteilung in reine FL 3B und FL 3B mit Anteilen eines DLBCL (+ DLBCL) vorgenommen, da sich auch diese beiden Subgruppen durch unterschiedliche Proteinexpression und genetische Eigenschaften auszeichnen würden.

In der vorliegenden Arbeit wurden insbesondere FL 3B ohne DLBCL-Anteile auf ihre immunhistologischen und genetischen Eigenschaften untersucht. Hierzu wurde mittels Immunhistochemie die Proteinexpression von BCL2, BCL6, CD5, CD10, CD20, IRF4/MUM1, TCL1, Ki67, p53, kappa (κ) und lambda (λ) analysiert, und mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) die Häufigkeit der BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21), BCL6/IGH t(3;14)(q27;q32) und MYC/IGH t(8;14)(q24;q32) Translokationen bestimmt.

Um eine größtmögliche Fallzahl der Lymphome zu untersuchen, wurde die Hochdurchsatztechnik der Tissue Microarrays (TMAs) verwendet.

In einem ersten Schritt wurden TMAs von FL, DLBCL und MALT-Lymphomen (Mucosa Associated Lymphoid Tissue-Lymphom) mit einer Gesamtzahl von 45 Fällen mittels FISH auf Aberrationen des BCL2-, BCL6, MYC und IGH-Gens untersucht, und die gewonnenen Ergebnissen mit bereits vorhandenen Daten der konventionellen Zytologie abgeglichen.

Gemessen am Gold-Standard der konventionellen Zytogenetik erbrachten die FISH-Untersuchungen zufriedenstellende Ergebnisse mit guter Sensitivität und Spezifität. Durch die erfolgreiche Anwendung der TMA-Technik konnten große Fallzahlen mit relativ geringem zeitlichem und materiellem Aufwand analysiert werden. Somit empfahl sich eine Kombination der FISH- und TMA-Techniken zur detaillierten Charakterisierung der reinen FL 3B.

In einem zweiten Schritt wurden 47 Fälle von FL der Grade 1, 2, 3A und 3B auf einem speziell angefertigten TMA und im Vollschnitt auf ihre immunhistologischen und genetischen Eigenschaften untersucht, insbesondere die Charakteristika der reinen FL 3B ohne Anteile eines DLBCL standen im Fokus der Untersuchung.

Die FISH-Untersuchungen auf Translokationen von BCL2, BCL6, MYC und IGH erbrachten nur für die BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation einen bedeutenden Unterschied der Frequenz zwischen FL 3B und den FL 1 bis 3A. Für die Häufigkeit der Bruchpunkte BCL6 und MYC zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen FL unterschiedlicher Grade.

Unter den durchgeführten immunhistologischen Färbungen zeigten insbesondere CD10 und IRF4/MUM1 unterschiedliche Ergebnisse für die verschiedenen FL. Während eine Expression des Markers CD10 deutlich häufiger bei den low-grade-Lymphomen zu finden war, konnte IRF4/MUM1 gehäuft bei den reinen FL 3B exprimiert gefunden werden. Gerade bestimmte Kombination beider Marker zeigte sich entweder häufig in der Gruppe der reinen FL 3B (CD10 - und IRF4/MUM1 +) oder in der Gruppe der FL 1 bis 3A (CD10 + und IRF4/MUM1 -).

Ein weiterer immunhistochemische Marker, dessen Expression sich vermehrt bei den reinen FL 3B fand, war p53. Auch der Proliferationsindex-Marker Ki67 zeigte eine erhöhte Proliferationsrate bei den reinen FL 3B.

Während die Häufigkeit einer Reaktivität für BCL6 von den low-grade-Lymphomen zu den reinen FL 3B hin abfiel, stieg die Proteinexpression von BCL2 über die Gruppen hinweg an, allerdings nicht in dem in der Fachliteratur beschriebenen Ausmaß.

Bei den untersuchten Fällen konnte vermehrt eine zytoplasmatische Expression der Leichtkette kappa (κ) bei den FL 3B und der Leichtkette lambda (λ) bei den FL 1 und FL 2 festgestellt werden.

Für CD5 konnte ein nur sehr dezenter Rückgang der Häufigkeit von den low-grade-Lymphomen über FL 3A zu den reinen FL 3B gezeigt werden.

Die Proteinexpression von CD20 lag, wie bei B-Zell-Tumoren zu erwarten war, in allen Gruppen bei 100 %. Eine Untersuchung auf den Marker TCL1 zeigte keine großen Unterschiede in der Ausprägung zwischen den verschiedenen Graden der FL.

Das FL 3A und das FL 3B unterschieden sich insbesondere durch das Vorhandensein, beziehungsweise durch das Fehlen der BCL2/IGH t(14;18)(q32;q21) Translokation. Aber auch hinsichtlich der Proteinexpression unterschieden sich die FL 3 voneinander, während das FL 3A sehr ähnliche Eigenschaften zeigte wie das FL 1 und FL 2.

Die untersuchten, reinen FL 3B zeigten allerdings auch keine erhöhten Frequenzen von BCL6/IGH- und MYC/IGH-Translokationen, wie sie gehäuft in DLBCL vorkommen. Eine nahe Verbindung zu den DLBCL bleibt somit nur den FL 3B mit DLBCL-Anteil vorbehalten.

Eine Einteilung der FL wie sie von Ott et al. (2002) und Piccaluga et al. (2008) vorgeschlagen wird, mit FL ohne große Keimzentrums-B-Zellen (FL 1 bis FL 3A) auf der einen Seite und FL mit großen, blastischen Keimzentrumszellen (FL 3B) auf der anderen Seite, scheint somit durchaus sinnvoll. Eine weitere Unterteilung der FL 3B in FL mit großen Keimzentrumszellen ohne DLBCL-Anteil (FL 3 - DLBCL) und mit DLBCL-Anteil (FL 3B + DLBCL) wäre eine wertvolle Ergänzung^{13,23}.

Ob dieser Einteilung eine pathologische und insbesondere klinische Relevanz zukommt, muss noch geklärt werden.

Literaturverzeichnis

- ¹ Böhling K.J., Lepenies J., Witt K. *“Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie” Elsevier GmbH, München, 137-141 (2004).*
- ² Swerdlow S.H. et al. *“WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues” IARC, Lyon, 158-166, 214-217, 220-226, 233-246 (2008).*
- ³ Dabbs D. *“Diagnostic Immunohistochemistry” Churchill Livingstone, New York Edinburgh London, 137-150 (2006).*
- ⁴ Ioachim H.L., Medeiros L.J. *“Lymph Node Pathology” Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 64-71, 294-300, 391-405, 423-430 (2009).*
- ⁵ Mason D., Gatter, K. *“Lymphoma Classification”, DakoCytomation Danmark A/S, Glostrup, 6-11, 20 (2003).*
- ⁶ Canellos G., Lister T.A., Young B. *“The Lymphomas” Elsevier Inc., Philadelphia, 8-14, 110-123, 348-365 (2006).*
- ⁷ Weiss L.M. *“Lymph Nodes” Cambridge University Press, Cambridge New York Melbourne, 144-156 (2008).*
- ⁸ Cheng L., Zhang D.Y. *“Molecular Genetic Pathology” Humana Press, Totowa, 306-309, 351-353, 667-672 (2008).*
- ⁹ Wagener C. *“Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren” Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 38-53, 126-129, 165-168 (1999).*
- ¹⁰ Coleman W.B., Tsongalis G.J. *“Molecular Diagnostics - For the Clinical Laboratorian”, Humana Press, Totowa, 193-199, 395 (2005).*

- ¹¹ *The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project "A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma", Blood 89, 3909-3918 (1997).*
- ¹² *Karube K. et al. "CD10/MUM1⁺ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features" Blood 109, 3076-3079 (2007).*
- ¹³ *Ott G. et al. "Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3" Blood, 99, 3806-3812 (2002).*
- ¹⁴ *Katzenberger T. et al. "Cytogenetic Alterations Affecting BCL6 Are Predominantly Found in Follicular Lymphomas Grade 3B with a Diffuse Large B-Cell Component" American Journal of Pathology, 165, 481-490 (2004).*
- ¹⁵ *Ventura R.A. et al. "FISH Analysis for the Detection of Lymphoma-Associated Chromosomal Abnormalities in Routine Paraffin-Embedded Tissue" Journal of Molecular Diagnostics 8, 141-151 (2006).*
- ¹⁶ *Kusam S. et al. "BCL6 cooperates with CD40 stimulation and loss of p53 function to rapidly transform primary B cells" International Journal of Cancer 125, 977-981 (2009).*
- ¹⁷ *Herling M. et al. "High TCL1 expression and intact T-cell receptor signaling define a hyperproliferative subset of T-cell prolymphocytic leukemia" Blood, 111, 328-337 (2008).*
- ¹⁸ *De Jong D., Rosenwald A. et al. "Immunohistochemical Prognostic Markers in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Validation of Tissue Microarray As a Prerequisite for Broad Clinical Applications – A Study From the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium" Journal of Clinical Oncology, 25, 805-812 (2007).*

- ¹⁹ Haralambieva E. et al. "Detections of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections" *American Journal of Pathology*, 198, 163-170 (2002).
- ²⁰ Bosga-Bouwer A.G. et al. "Molecular, cytogenetic and immunophenotypic characterization of follicular lymphoma grade 3B; a separate entity or part of the spectrum of diffuse large B-cell lymphoma or follicular lymphoma?" *Human Pathology*, 37, 528-533 (2006).
- ²¹ Bosga-Bouwer A.G. et al. "Follicular Lymphoma Grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive" *Blood*, 101, 1149-1154 (2003).
- ²² Gu K. et al. "t(14;18)-negative Follicular Lymphomas Are Associated with a High Frequency of BCL6 Rearrangement at the Alternative Breakpoint Region" *Modern Pathology*, 22, 1251-1257 (2009).
- ²³ Piccaluga P.P. et al. "Gene expression analysis provides a potential rationale for revising the histological grading of follicular lymphomas" *Haematologica*, 93, 1033-1038 (2008).
- ²⁴ Jardin F. et al. "Follicle center lymphoma is associated with significantly elevated levels of BCL-6 expression among lymphoma subtypes, independent of chromosome 3q27 rearrangements" *Leukemia*, 16, 2318-2325 (2002).

Publikationen in Zusammenhang mit dieser Arbeit

Horn H., Schmelter C., Leich E., Salaverria I., Katzenberger T., Ott M., Kalla J., Romero M., Siebert R., Rosenwald A., Ott G. "Follicular Lymphoma Grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles" Haematologica, June 9, 2011, Epub ahead of print.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald und Herrn Prof. Dr. med. Hans Konrad Müller-Hermelink danke ich für die Möglichkeit diese Inaugural-Dissertation am Institut für Pathologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. German Ott für die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Themas. Sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit, die fortwährende konstruktive Unterstützung und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen ermöglichten erst die Umsetzung dieser Dissertation.

Frau Dr. rer. nat. Heike Horn danke ich für die ermutigende Zusprache, die hervorragende fachliche Betreuung und die persönliche Unterstützung während der Bearbeitung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Thomas Haaf für die Übernahme des Korreferats.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch für die immer hilfsbereite Unterstützung und die konstruktive Zusammenarbeit mit allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern am Pathologischen Institut.

Frau Heike Brückner, Frau Irina Eichelbrönnner und Frau Theodora Nedeva danke ich für die kompetente und tatkräftige Unterstützung in allen zytogenetischen Fragen und insbesondere für eine immer angenehme Arbeitsatmosphäre. Bei Frau Doris Hetzer bedanke ich mich für die Hilfe bei der Erstellung des Tissue Microarray. Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. med. Elena Hartmann und Frau Dr. rer. nat. Ellen Leich für viele wertvolle fachliche Ratschläge.

Ich danke meinen Freunden aus Würzburg und Ingolstadt für wohlthuenden Ausgleich in der Freizeit. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Jan Allmanritter mit dem ich den ganzen Weg dieser und seiner Dissertation gemeinsam gegangen bin.

Mein größter Dank gilt aber meiner Familie, meinem Vater, meiner Mutter und meinen Brüdern Alexander und Nicolas, denen ich noch für so vieles mehr danke als für die immerwährende Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Schmelter
Vorname: Christopher Michael
Geburtsdatum: 19. Juni 1984
Geburtsort: Ingolstadt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Eltern: Dr. rer. pol. Heinrich Robert Schmelter
Gabriele Elfriede Schmelter (geborene Laufenberg)

Schulbildung

1990 - 1995 Ausbildung an der Grundschule Gerolfing
1995 - 2003 Ausbildung an dem Christoph-Scheiner-Gymnasium Ingolstadt
Mai 2003 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Wehersatzdienst

2003 - 2004 Zivildienst auf der Anästhesiologischen Intensivstation
des Klinikum Ingolstadt

Hochschulbildung

2004 - 2006 Studium der Humanmedizin in der Vorklinik
an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
März 2006 Bestandener Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006 - 2010 Studium der Humanmedizin in der Klinik
an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Oktober 2010 Bestandene Ärztlichen Prüfung
November 2010 Approbation als Arzt

Lebenslauf

Facharztweiterbildung

seit Dezember 2010 Assistenzarzt in der Weiterbildung
am Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie
am Klinikum Ingolstadt

Inaugural-Dissertation

seit 2006 Anfertigung einer Inaugural-Dissertation
am Institut für Pathologie
der Universität Würzburg

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät vorgelegt, mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erwerben.

Ich habe noch nie versucht, einen akademischen Grad zu erwerben, es wurde mir auch kein solcher entzogen.

Gegen mich ist kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.