

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

**Molekulargenetische Untersuchung der chromosomalen
Translokation t(11;14)(q13;q32) im Marginalzonen-B-Zell-Lymphom
der Milz**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Elke Lenz
aus Eckental

Würzburg, Dezember 2002

Referentin: Frau Priv.-Doz. M.M.Ott

Koreferent: Herr Prof. Dr. med. H.K. Müller-Hermelink

Dekan: Herr Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2003

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Das lymphatische Gewebe	1
1.1.1	Funktionen	1
1.1.2	Die Lymphozyten	1
1.1.3	Allgemeiner Aufbau lymphatischer Organe	2
1.1.4	Die Milz und ihre Besonderheiten	2
1.2	Maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems	3
1.2.1	Einteilung und Klassifikation	3
1.2.2	Maligne Lymphome der Milz	4
1.2.3	Immunphänotypische und cyto genetische Eigenschaften splenischer Lymphome	6
1.3	Problemstellung	9
2.	Material und Methoden	10
2.1	Herkunft des Materials	10
2.2	Die DNA-Extraktion	10
2.2.1	DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe	10
2.2.2	DNA-Extraktion aus Frischmaterial	11
2.3	Die Polymerase-Ketten-Reaktion	11
2.3.1	Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion	11
2.3.2	PCR zum Nachweis eines <i>BCL-1</i> Rearrangements	12
2.3.3	PCR zum Nachweis des β -Globin-Gens	14
2.4	Die Gel-Elektrophorese	15
2.4.1	Das Prinzip der Gel-Elektrophorese	15
2.4.2	Das Agarose-Gel	15
2.4.3	Durchführung der Elektrophorese	16
2.5	Geräte	16
2.6	Puffer und Lösungen	17
2.7	Reagenzien und Chemikalien	18
2.7.1	Enzyme	18
2.7.2	DNA-Längenmarker	18
2.7.3	Oligonucleotide	19
3.	Ergebnisse	20
3.1	Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (MZBCL)	20
3.2	Mantelzell-Lymphom (MCL)	21
3.3	Chronische lymphatische Leukämie (CLL)	22
3.4	Harzell-Leukämie (HCL)	22
3.5	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBL)	23
3.6	Folikuläres Lymphom (FL)	24

4.	Diskussion	25
4.1	Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (MZBCL)	25
4.2	Mantelzell-Lymphom (MCL)	26
4.3	Chronische lymphatische Leukämie (CLL)	27
4.4	Haarzell-Leukämie (HCL)	27
4.5	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBL)	28
4.6	Follikuläres Lymphom (FL)	28
5.	Zusammenfassung	29
6.	Literaturverzeichnis	31
7.	Abkürzungen	38

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Das lymphatische Gewebe

1.1.1 Funktionen

Das lymphatische Gewebe des Menschen schützt den Organismus vor schädlichen Einflüssen von außerhalb wie innerhalb. Das Immunsystem kann körpereigene Strukturen (sog. Antigene) von fremden unterscheiden und diese gezielt eliminieren. Die dabei ablaufenden Reaktionen werden als Immunreaktionen bezeichnet. Die Zellen, die zur spezifischen Immunantwort befähigt sind, sind in erster Linie Lymphozyten sowie deren Aktivierungs- und Differenzierungsformen. Sie haben ihren Sitz in den Organen des lymphatischen Systems oder sie zirkulieren frei im Blut. Diese Organe lassen sich in nodale (Lymphknoten) und primär extranodale (Milz, Tonsillen) einteilen. Sekundär kann sich lymphatisches Gewebe z.B. bei chronischen Entzündungen der Magenschleimhaut oder der Speicheldrüsen extranodal entwickeln.

1.1.2 Die Lymphozyten

Die Lymphozyten lassen sich nach Herkunft und Funktion in zwei große Gruppen unterteilen, in die B- und in die T-Lymphozyten. Während sich der größte Teil der B-Lymphozyten innerhalb der lymphatischen Organe befindet, zirkuliert die Hauptmasse der T-Lymphozyten frei im peripheren Blut. Als gemeinsames Merkmal weisen beide Gruppen von Lymphozyten an ihrer Oberfläche Rezeptoren auf, mit deren Hilfe sie Antigene erkennen können. Die nach dem Antigenkontakt folgende Immunantwort unterscheidet sich jedoch grundsätzlich.

Die B-Lymphozyten wandeln sich über das Stadium der Immunoblasten in Plasmazellen um, welche spezifische Antikörper produzieren, oder sie stehen als Gedächtniszellen für eine erneute Immunreaktion mit dem gleichen Antigen zur Verfügung. Diese Form der Immunantwort heißt humorale Immunreaktion.

Die T-Lymphozyten erkennen ebenfalls Antigene mit den auf ihrer Oberfläche liegenden Rezeptoren, jedoch benötigen die hierzu die Hilfe der sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen, welche die Antigene aufarbeiten und an ihrer Oberfläche präsentieren. Die T-Lymphozyten sind Träger der zellulären Immunreaktion, weil sie Antigene durch Bindung an

ihre Zelloberfläche unschädlich machen (zytotoxische Zellen). Die Helfer- und Suppressor-Zellen, die ebenfalls der T-Zell-Linie angehören, sind unverzichtbar für eine reibungslose Interaktion der beiden Lymphozytenklassen. Schließlich können auch T-Zellen, analog den B-Zellen, als Gedächtniszellen für eine erneute Immunreaktion zur Verfügung stehen.

1.1.3 Allgemeiner Aufbau lymphatischer Organe

Lymphatische Organe weisen in ihrem Aufbau grundsätzliche Gemeinsamkeiten auf. Dabei sind die Areale von T- und B-Zellpopulationen jeweils klar definiert. Für die Differenzierung naiver B-Zellen aus dem Knochenmark sind die Lymphfollikel eine entscheidende Grundstruktur, welche je nach Abwehrlage in allen lymphatischen Geweben auftritt. Je nach Aktivierungsform unterscheidet man Primärfollikel und Sekundärfollikel. Letztere imponieren als eine organisch und nach funktionellen Gesichtspunkten aufgebaute Struktur, die sich in verschiedene Zonen einteilen lässt. So treten naive B-Zellen aus dem Knochenmark zunächst in die Mantelzone eines Lymphfollikels ein. Im Keimzentrum kommt es schließlich zu einem durch follikuläre dendritische Reticulumzellen vermittelten Antigenkontakt der jetzt sogenannten Centroblasten. Diese differenzieren sich durch verschiedene Schritte der Proliferation, somatische Mutationen und Antigenselektion zu Centrocyten, welche sich in der sog. „hellen Zone“ finden. Nach diesen stark vereinfacht und kurz dargestellten Stadien der Reifung gelangen die B-Zellen schließlich in die Pulpa, wo sie als Plasmazellen, bzw. Gedächtniszellen vorliegen.

1.1.4 Die Milz und ihre Besonderheiten

Die Milz ist, anders als z. B. die Lymphknoten, direkt in den Blutkreislauf eingeschaltet und übt hier eine Filterfunktion aus, indem sie maßgeblich am Abbau von roten und weißen Blutzellen beteiligt ist. Des Weiteren besitzt sie im Gegensatz zu den Lymphknoten keine afferenten Lymphgefäße. Gemeinsam mit den übrigen lymphatischen Geweben ist die Milz als das größte lymphatische Organ dazu befähigt, an den ablaufenden Immunreaktionen teilzunehmen, aktivierte Lymphozyten zu produzieren und diese ins Blut abzugeben. Das Milzparenchym lässt sich in rote und weiße Pulpa unterteilen, wobei sich in der roten Pulpa vor allem Blutzellen und Zellen, die der bakteriellen (Thymus-unabhängigen) Abwehr dienen,

wie Makrophagen, B-Zellen sowie T-Zellen vom gamma / delta Typ, finden. Die weiße Pulpa hingegen stellt das eigentliche lymphatische Gewebe der Milz dar. Sie setzt sich zusammen aus Lymphfollikeln und den periarteriellen Lymphscheiden (PALS). Letztere sind die T-Zell-Region der Milz und bestehen zum größten Teil aus T-Helferzellen und einigen Suppressorzellen. In den Lymphfollikeln wiederum überwiegen die B-Zellen in den verschiedenen Stadien ihrer Ausreifung. Als Besonderheit der Milz schließt sich an die im Lymphknoten randbildende Mantelzone eine Marginalzone an, welche die Grenze zur roten Pulpa darstellt. Die Marginalzone ist eine Eigenheit der Lymphfollikel in der Milz von Säugetieren und Menschen¹. Sie setzt sich vorwiegend zusammen aus mittelgroßen B-Lymphozyten mit einer mäßigen Menge hellem Zytoplasma², welche Merkmale von Gedächtniszellen aufweisen³. Auch wenn sich derartige Zellen in den Peyer-Plaques des Gastrointestinaltrakts⁴, sowie in anderer Anordnung in Sekundärfollikeln der Lymphknoten⁵ ⁶ ⁷ finden, so herrschen für die Lymphozyten der splenischen Marginalzone aufgrund der strukturellen und funktionellen Besonderheiten der Milz Bedingungen, die mit der Situation in nodalen und extranodalen Lymphfollikeln nicht vergleichbar sind. So spielt die Marginalzone eine große Rolle in der immunologischen Aktivität der Milz. Durch ihren Reichtum an Kapillaren kommen die Zellen des Immunsystems hier permanent mit angespülten Antigenen in Kontakt und bringen die Immunreaktion in Gang, während außerhalb der Milz gelegenes lymphatisches Gewebe keinen direkten Kontakt zum Blutkreislauf hat. Aktivierte B-Zellen gelangen aus der Marginalzone, wie bereits erwähnt, zur weiteren Differenzierung in das Keimzentrum und können wie alle immunkompetenten Zellen von der Milz direkt ins Blut abgegeben werden.

1.2 Maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems

1.2.1 Einteilung und Klassifikation

Die neoplastischen Erkrankungen des lymphatischen Systems werden als maligne Lymphome bezeichnet, welche sich in zwei große Gruppen einteilen lassen.

Die Gruppe der Hodgkin-Lymphome ist durch das Auftreten charakteristischer Hodgkin- und Sternberg-Reed-Riesenzellen gekennzeichnet. Die zweite und klinisch bedeutendere Gruppe bilden die Non-Hodgkin-Lymphome, welche sich in zahlreiche Untergruppen unterteilen lassen.

Diesbezüglich stellte der Vergleich verschiedener Studien ein großes Problem dar, da bis vor wenigen Jahren eine große Anzahl verschiedener Klassifikationen zur Einteilung dieser Untergruppen in Gebrauch war.

Die bis vor kurzem in Deutschland am häufigsten gebrauchte Einteilung ist die Kiel-Klassifikation⁸. Als Grundlage der Klassifikation diente die Vermutung, dass jeder Neoplasie ein bestimmtes Reifestadium der Lymphopoese zugrunde liegt. Außerdem wurden die verschiedenen Neoplasmen je nach Wachstumstendenz hochmalignen und niedrigmalignen Untergruppen zugeordnet. Die Erkenntnis, dass auch der Ort der Primärlokalisierung entscheidend für die Lymphomgenese ist, sowie die Einsicht in die Notwendigkeit eines internationalen Konsens führte zu einem neuen Versuch der Klassifikation von malignen Lymphomen, nämlich der REAL-Klassifikation⁹. Unter anderem unter dem Aspekt der internationalen Vereinheitlichung der Nomenklatur ließ man hier zytogenetische, immunhistochemische und klinische Erkenntnisse in die Einteilung mit einfließen. Die REAL-Klassifikation diente als Grundlage der jetzt generell akzeptierten WHO-Klassifikation²⁵ und hat sich seit ihrer Einführung bemerkenswert gut bewährt und durchgesetzt.

1.2.2 Maligne Lymphome der Milz

Da die Milz, wie bereits erwähnt, ein Hauptorgan des lymphatischen Systems darstellt, ist sie bei malignen Lymphomen im Rahmen einer hämatogenen Streuung häufig sekundär infiltriert^{10 11}. Besonders erwähnenswert sind diesbezüglich die chronisch-lymphatische Leukämie (CLL), die Prolymphozyten-Leukämie (PLL) sowie die Haarzell-Leukämie (HCL). Obwohl Berichte über primär splenische Lymphome bis ins Jahr 1945 zurückreichen¹², spielt die Milz als Entstehungsort maligner Erkrankungen nur selten eine Rolle^{13 14 15 16 17 18 19 20 21}. Die größte Schwierigkeit bei der Beurteilung primär splenischer Lymphome war das Fehlen einer allgemein akzeptierten und verwendeten Definition, so dass Vergleiche verschiedener bereits bestehender Studien zusätzlich erschwert wurden.

So galt bei einigen Autoren der alleinige Befall der Milz durch ein malignes Lymphom ohne weitere Manifestation bei sechsmonatiger Rezidivfreiheit nach Splenektomie als Korrelat eines primär splenischen Lymphoms¹⁴.

An anderer Stelle wurden die Kriterien weiter gefasst und neben einer Infiltration der Milz inklusive der hilären Lymphknoten auch ein Befall der Leber und derer hilärer Lymphknoten als Symptome eines malignen Lymphoms mit Entstehungsort in der Milz angesehen¹³.

Andere Autoren bezeichneten alle malignen Lymphome, bei welchen die Splenomegalie im Vordergrund steht, als primär splenische Lymphome¹⁵.

Ein weiterer Vorschlag ging dahin, alle malignen Lymphome mit Splenomegalie, ohne Adenopathie, aber mit Zytopenie einer, zweier oder aller drei Blutzell-Linien als primär splenische Lymphome zu bezeichnen¹⁷.

Eine letzte Gruppe schließlich lehnte die Bezeichnung „primär splenisches Lymphom“ ganz ab und schlug eine Klassifikation als „maligne Lymphome mit dominierender Splenomegalie“ vor¹⁸.

Aufgrund der bereits beschriebenen Besonderheiten des splenischen lymphatischen Gewebes mit dem engen direkten Kontakt zum Blutkreislauf und dem Fehlen afferenter Lymphgefäße liegt jedoch die Vermutung nahe, dass sich unter diesen Voraussetzungen primär splenische Lymphome bilden können, und dass sich diese von Lymphomen mit anderem Entstehungsort unterscheiden. Darüber hinaus scheinen primär splenische Lymphome, insbesondere das Immunocytom, frühzeitig zu einer Knochenmarkbeteiligung zu führen^{17 19} und lange Zeit klinisch asymptomatisch zu verlaufen. Bei Diagnosestellung liegt daher häufig bereits eine generalisierte Erkrankung vor, was die Identifikation der Milz als Entstehungsort des Lymphoms erschwert.

Die Erstbeschreibung eines malignen Lymphoms mit splenischem Ursprung erfolgte 1987 als splenisches Lymphom mit zirkulierenden villösen Lymphozyten (SLVL)²². Anschließend beschrieben Schmid et al. 1992 das splenische Marginalzonenlymphom²⁸. Isaacson postulierte 1994, dass es sich bei beiden Lymphomen um ein und dieselbe Entität handelt^{23 24}. Dies führte zur Einführung des Begriffs „Splenisches Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (MZBCL)“. Diese Tumoren werden als splenisches MZBCL mit oder ohne villöse Lymphozyten in der WHO-Klassifikation gemeinsam mit dem nodalen MZBCL mit oder ohne monocytoide Zellen (dem früheren monocytoiden B-Zell-Lymphom) und dem Lymphom des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe, dem MALT-Lymphom geführt^{4 25 26 27 28 29 30 31 32}. Verschiedene Studien weisen auf den Memory-Zell Charakter des splenischen MZBCL hin³.

Das wichtigste histologische Kriterium des splenischen MZBCL, das v.a. bei älteren Erwachsenen auftritt, und meist zu einer massiven Splenomegalie führt, ist die konzentrische Proliferation um ein residuales oder schließlich zerstörtes Follikelzentrum^{28 33}. Dabei findet

sich oft eine bizonale Differenzierung mit kleinen Zellen im Zentrum und größeren Zellen, die solchen der Marginalzone ähneln, in der Peripherie. In der Diagnostik gilt es stets, das splenische MZBCL gegen andere B-Zell-Lymphome abzugrenzen, welche ihrerseits häufig die Milz befallen und Ähnlichkeiten in der Morphologie aufweisen können. Dazu zählen vor allem die CLL, das lymphoplasmazytoide Immunozytom, das Mantelzell-Lymphom (MCL) und das folliculäre Lymphom (FL).

1.2.3 Immunphänotypische und cytogenetische Eigenschaften splenischer Lymphome

Die Zellen des splenischen MZBCL weisen die Oberflächenmerkmale von reifen B-Zellen auf, d.h. sie reagieren grundsätzlich positiv mit Antikörpern gegen CD20, CD21, CD22, CD24 und ALP, meist positiv mit Antikörpern gegen Oberflächen-IgM, und auch häufig positiv mit Antikörpern gegen Oberflächen-IgD. Gelegentlich werden CD5, CD23 und DBA44 exprimiert. CD10 ist immer negativ^{9 23 28 30 34 35 36 37}.

Die CLL, die – wie bereits dargestellt – ebenfalls zu einer ausgeprägten Splenomegalie führen kann, exprimiert typischerweise CD5 und CD23, reagiert jedoch meist negativ mit Antikörpern gegen CD22 und DBA44^{9 35 36}.

Die Zellen des MCL, welches häufig differentialdiagnostische Probleme bereitet, tragen die Antigene CD5, CD43, KiB3 und ALP. Nachweisen lassen sich ebenfalls Oberflächen-IgM und /-IgD, sowie Cyclin D1^{9 28 30 34}.

Das folliculäre Lymphom wiederum exprimiert CD10 und bcl-2, nur manchmal lässt sich in diffusen Arealen auch CD23 nachweisen²⁸.

Neben charakteristischen immunhistochemischen Profilen weisen zahlreiche maligne Lymphome cytogenetische Besonderheiten auf, die z.T. streng mit spezifischen Entitäten korrelieren. Häufig führen genetische Veränderungen im Bereich von sog. Protoonkogenen, bzw. Tumorsuppressorgenen, welche eine wichtige Kontrollfunktion hinsichtlich des Wachstums und der Differenzierung einer Zelle ausüben, zu einem Funktionsverlust und einer daraus resultierenden ungehemmten Zellproliferation. So zeigt sich eine starke Assoziation zwischen der chromosomalen Translokation t(8;14) (q24;q32), welche zu einem Rearrangement des c-myc Onkogens führt, und dem Burkitt-Lymphom^{38 39}.

Das *BCL2* Rearrangement findet sich nach der Translokation t(14;18) (q32;q21) und ist hochspezifisch für das folliculäre Lymphom^{40 41 42}.

Bei Lymphomen vom MALT-Typ ist gehäuft die chromosomale Translokation t(11;18)(q21;q21) nachzuweisen⁵³.

Die Erstbeschreibung einer weiteren cytogenetischen Besonderheit erfolgte 1984 im Rahmen der Untersuchung von leukämischen B-Zell-Lymphomen, die zunächst als B-CLL diagnostiziert wurden und eine Translokation t(11;14) aufwiesen⁴³. Die Bruchpunktregion auf dem Chromosom 11q13 wurde als *BCL1* bezeichnet, ein Akronym für „B-Zell-Lymphom/Leukämie 1“. Im Rahmen des Bemühens um ein einheitliches Klassifikationssystem konnte später jedoch eine Assoziation der t(11;14)(q13;q32) zum Mantelzell-Lymphom (centrocytisches Lymphom nach Kiel) verifiziert werden^{46 49 50}.

<u>Lymphom-Entität</u>	<u>Translokation</u>
Burkitt-Lymphom	t(8;14)(q24;q32)
Follikuläres Lymphom	t(14;18)(q32;q21)
MALT-Lymphom	t(11;18)(q21;q21)
Mantelzell-Lymphom	t(11 ;14)(q13 ;q32)

Tab. 1 : rekurrente chromosomale Translokationen bei malignen Lymphomen

Häufiger Translokationspartner der oben genannten Translokationen ist das Chromosom 14 und hier der Locus q32, wo die Schwerkettenregion der Immunglobulin-Gene kodiert wird. Während der frühen B-Lymphozyten Reifung findet hier das Rearrangement der Immunglobulin-Gene mit Hilfe der Rekombinase Enzyme statt. Für diese Enzyme wird auch eine Rolle für das Zustandekommen der genannten Translokationen diskutiert^{44 45}. Durch die Juxtaposition der genannten Onkogene in den Schwerkettenloкус der Immunglobuline kommt es zu deren Überexpression durch den Einfluss der hier lokalisierten Enhancer-Sequenzen.

Die Bruchpunkte in der *BCL1* Region auf Chromosom 11q13 sind über 120kb gestreut und treten gehäuft in verschiedenen Clustern auf. Die meisten Bruchpunkte sind im Bereich der MTC (major translocation cluster)-Region^{46 47} lokalisiert.

Das Onkogen, welches durch das *BCL1* Rearrangement dereguliert wird, wurde zunächst als „PRAD1“ identifiziert. Es wurde zuvor isoliert aus benignen Adenomen der Nebenschilddrüse sowie aus manchen Formen des Mamma-Carcinoms und ist maximal 120 Kilobasen von der *BCL1* Region entfernt gelegen^{48 49 50}. PRAD1, heute als Cyclin D1-Gen bezeichnet, codiert für ein Protein aus der Gruppe der Cycline, welches eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zell-Zyklus, speziell für den Übergang der G in die S1- Phase spielt.

Cyclin D1 findet sich in einigen epithelialen und mesenchymalen Geweben, jedoch nicht in reifen B-Lymphozyten⁵¹. In normalen Lymphozyten findet diese Zell-Zyklus Regulation durch Cyclin D2 und D3 statt⁵². Deren Expression wird in Zellen maligner Lymphome, welche eine Überexpression von Cyclin D1 aufweisen, supprimiert⁵³.

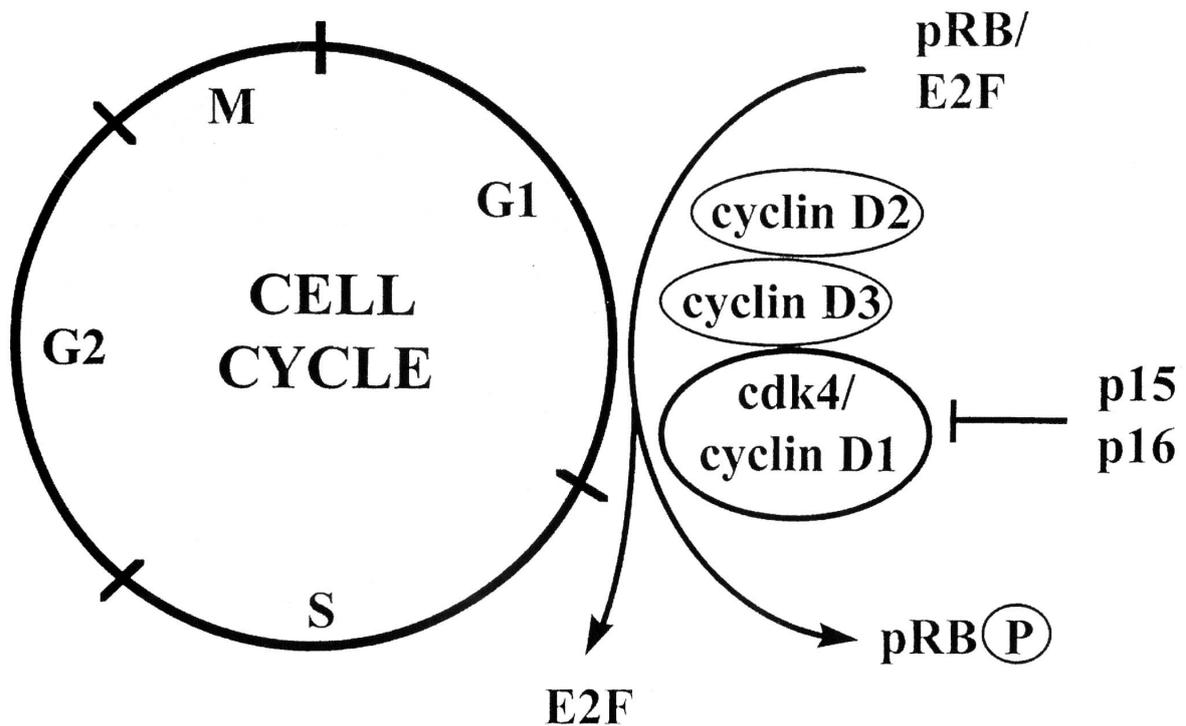


Abb.1: Beeinflussung des Übergangs aus der G1 in die S-Phase des Zellzyklus, in normalen Lymphozyten durch Cyclin D2 und Cyclin D3, in Zellen mit t(11;14) durch überexprimiertes Cyclin D1, welches zur Suppression von Cyclin D2 und Cyclin D3 führt.⁵⁴

Das *BCL1* Rearrangement, welches sich durch das Southern Blot Verfahren oder mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachweisen lässt, zeigt eine starke Assoziation mit dem centrocytischen Lymphom^{50 55} und kann in ca. 50% der Fälle dieser Erkrankung nachgewiesen werden^{46 56 57}. Wesentlich seltener tritt ein *BCL1* Rearrangement in anderen lymphoproliferativen Erkrankungen, wie der CLL^{58 59}, der HCL oder dem Multiplen Myelom auf, bei welchen der Nachweis nur in Einzelfällen gelingt. Widersprüchliche Angaben existieren bezüglich des *BCL1* Rearrangements bei Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen. Während sich viele Autoren einig sind, dass ein *BCL1* Rearrangement nicht zu den

cytogenetischen Eigenschaften des Marginalzonen-Lymphoms zählt^{25 28}, berichten einige über den Nachweis einer Translokation t(11;14) (q13;q32) in bis zu 15% der Fälle von SLVL^{60 61 62}.

1.2.4 Problemstellung

Nachdem von verschiedenen Arbeitsgruppen über das Auftreten der Translokation t(11;14) oder *BCL1* Rearrangement in splenischen Lymphomen berichtet wurde, einheitliche Klassifikationen aber noch fehlten und zunächst die vergleichende Analyse erschwert schien, sollte in der vorgelegten Dissertation im Rahmen einer Reklassifikation splenischer Lymphome die echte Inzidenz des *BCL-1* Rearrangements festgestellt werden. Nach einer histologischen Neueinteilung sollten die Ergebnisse mit denen der Immunhistologie und der Cytogenetik korreliert werden. Die Daten sollten ferner im Hinblick auf die Bedeutung des *BCL1* Rearrangements in anderen Lymphomen, speziell dem Mantelzell-Lymphom diskutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft des Materials

Untersucht wurden insgesamt 83 maligne Lymphome. Das Material zur Untersuchung durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Immunhistochemie stand zum größten Teil in Form von formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebestücken zur Verfügung. Lediglich in 10 Fällen konnte auf tiefgekühltes Nativmaterial zurückgegriffen werden. Alle Proben stammen aus der Gewebekbank des Referenzzentrums für Lymphknotenpathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg.

2.2 Die DNA-Extraktion

Für die Durchführung einer PCR wird als Ausgangssubstanz genomische DNA benötigt. Um diese zu erhalten, ist es notwendig, die sie umgebenden Zellbestandteile zu entfernen. Dies geschieht in mehreren Schritten, die sich je nach Art der Konservierung des Gewebes unterscheiden.

2.2.1 DNA-Extraktion aus formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe

Je nach Größe der eingebetteten Gewebestücke wurden zunächst 5 – 15 Schnitte von je 6µm Dicke von den Paraffinblöcken abgehobelt. Um das Gewebe aus dem Paraffin herauszulösen, wurde das abgehobelte Material mit je 1 ml Xylol versetzt und 30 min. bei Raumtemperatur im Rüttler durchmischt. Anschließend wurden die Proben 10 min. zentrifugiert und die Überstände vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette von den Pellets abgenommen. Diese Auswaschung des Paraffins mit Xylol wurde jeweils insgesamt dreimal durchgeführt. Im Anschluss wurden die Pellets mit je 1 ml Ethanol übergossen und weitere 30 min. bei Raumtemperatur suspendiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation wurden die Überstände dekantiert, bevor die Waschung mit Ethanol weitere zweimal wiederholt wurde.

Anschließend wurden die Pellets ca. 20 bis 25 min. in der Speed vac. getrocknet.

Um die DNA aus dem trockenen nun paraffinfreien Gewebe herauszulösen, wurden die Proben, je nach Größe der Pellets, mit 50 bis 150 µl Digestionspuffer versetzt. Jeder Probe

wurde nun Proteinase K (2mg/ml) zugesetzt, wobei pro 100 µl Puffer 5µl Proteinase K verwendet wurden. Die Proben wurden gründlich gevortext und über Nacht bei 55°C inkubiert. Zuletzt wurde die Proteinase K während 8 bis 10 min. bei 95°C denaturiert und die Proben bis zum weiteren Gebrauch bei –20°C gelagert.

2.2.2 DNA-Extraktion aus Frischmaterial

Das vorliegende Material lag als Nativmaterial vor, welches lediglich durch die Lagerung bei –80°C fixiert war. Der Schritt des Auswaschens des Fixationsmaterials konnte daher entfallen. Um die DNA aus dem Gewebe zu extrahieren, wurden zunächst im Kryostat von den tiefgefrorenen Gewebestücken je nach Größe 5 bis 7 Scheiben von je 10 µm Dicke abgehobelt. Nach dem Auftauen wurde jeder Probe 50 bis 150 µl Digestionspuffer zugesetzt und Proteinase K (2mg/ml) hinzugefügt, pro 100 µl Puffer je 5µl Proteinase K. Nach dem Vortexen der Proben erfolgte die Inkubation über Nacht bei 55°C. Abschließend wurde die Proteinase K während 8 bis 10 min. bei 95°C denaturiert und die Proben bei –20°C gelagert.

2.3 Die Polymerase-Ketten-Reaktion

2.3.1 Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zum Nachweis auch kleiner Mengen spezifischer DNA- Abschnitte, wobei man sich das Prinzip der semikonservativen DNA-Replikation zunutze macht.

Voraussetzung für die Durchführung einer PCR ist die Kenntnis der Sequenz zweier Anfangsstücke, sogenannter Oligonucleotid-Primer, zwischen welchen der nachzuweisende DNA-Abschnitt liegt. Diese sind gegenläufig an den komplementären DNA-Strängen gebunden.

Zunächst werden diese komplementären DNA-Stränge bei 94°C aufgespalten (sog. „Denaturation“). Anschließend lagern sich die im Überschuß zugegebenen Oligonucleotid-Primer bei einer Temperatur von 60°C an die als Matrize dienenden DNA-Stränge an (sog. „Annealing“). Die anschließende Elongation der neu zu bildenden DNA erfolgt mit Hilfe

einer DNA-Polymerase bei geeigneter Temperatur (hier:71°C) unter Anwesenheit einer genügenden Anzahl von Nucleotiden.

Diese Schritte der Denaturierung, des Annealings und der Elongation der DNA-Stränge werden je nach Syntheseprodukt 20 bis 50mal wiederholt, so daß nach Ende der Zyklen der gewünschte DNA-Abschnitt um ein vielfaches amplifiziert vorliegt und zur weiteren Analyse beispielsweise mittels Elektrophorese zur Verfügung steht.

Durch Verwendung der thermostabilen DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus*, das bevorzugt in heißen Quellen vorkommt, ist eine Automatisierung der PCR möglich, da diese sog. „Taq-Polymerase“ auch die Denaturierungs-Temperatur von 94°C unbeschadet übersteht, und daher nicht nach jedem Zyklus neu zugegeben werden muß.

2.3.2 PCR zum Nachweis eines *BCL1* Rearrangements

Um ein *BCL1* Rearrangement durch PCR nachzuweisen, bedient man sich einer Variante des oben beschriebenen Verfahrens. Bei dieser sog. „semi-nested“ PCR werden zwei komplette Durchläufe mit insgesamt drei Primern durchgeführt⁶³.

Zunächst werden 3 µl einer DNA-Probe in einem Eppendorf-Cup mit 45 µl Öl überschichtet und 4 min. bei 94°C denaturiert, wobei das Öl als Schutz vor dem Verdampfen der Probe dient. Um die eigentliche PCR in Gang zu bringen und um einen reibungslosen Ablauf der einzelnen Schritte zu gewährleisten, ist die Anwesenheit einiger Stoffe notwendig, die aus Gründen der Vereinfachung zu einem sog. „Master-Mix“ zusammengefaßt und anschließend als Mischung zu den DNA-Proben gegeben werden.

Dieser Master-Mix 1 setzt sich wie folgt zusammen:

28,32 µl destilliertes Wasser

5 µl PCR-Puffer

4,5 µl MgCl (25mM)

8 µl Chase

0,5 µl Primer 1

0,5 µl Primer 2

0,18 µl Taq-Polymerase

Von diesem Master-Mix werden je 47 μl zu jeder DNA-Probe unter das Öl gegeben.

Die DNA wird nun nochmals für 1 min. bei 94°C denaturiert, bevor die Proben für 1 min. bei 60°C zum Annealing der Primer inkubiert werden. Die Elongation der neu zu bildenden DNA-Stränge findet anschließend während 1,5 min. bei 72°C statt.

Um eine ausreichende Menge des gewünschten DNA-Segments zu erhalten, wird dieser Zyklus 25mal wiederholt.

Nach diesen 25 Zyklen schließt sich nochmals eine 10minütige Phase von 72°C an, in welcher die Elongation aller begonnenen DNA-Duplikate abgeschlossen wird.

Das während dieser PCR entstandene „Reaktionsprodukt“ dient nun als DNA-Probe für den zweiten Durchgang der „semi-nested“ PCR.

Hierzu werden 3 μl der DNA-Probe aus dem ersten Teil der PCR in einem neuen Eppendorf-Cup mit 45 μl Öl überschichtet und anschließend während 4 min. bei 94°C denaturiert. Ebenso wie beim ersten Durchgang wird nun ein Master-Mix zugegeben, welcher sich nur durch den Austausch von Primer 2 gegen Primer 3 unterscheidet.

Master-Mix 2 :

28,32 μl destilliertes Wasser

5 μl PCR-Puffer

4,5 μl MgCl (25mM)

8 μl Chase

0,5 μl Primer 1

0,5 μl Primer 3

0,18 μl Taq-Polymerase

Nach Zugabe des Master-Mix zur DNA-Probe unter das Öl werden die 25 Zyklen des ersten Teils der PCR wiederholt. Abschließend erfolgt wiederum eine 10minütige Phase der Elongation bei 72°C.

Die während der beiden Teilschritte dieser PCR amplifizierten DNA-Abschnitte stehen nun zur weiteren Analyse zur Verfügung.

2.3.3 PCR zum Nachweis des β -Globin Gens

Bei dieser PCR handelt es sich um eine einfache PCR zum Nachweis eines stets vorhandenen sog. „Housekeepergens“, des β -Globin Gens, die nur zu Kontrollzwecken durchgeführt wird. Der Nachweis des β -Globin Gens beweist im Falle des fehlenden *BCL1* Rearrangements das Vorhandensein von amplifizierbarer DNA in der untersuchten Probe. Je nach Fixierungsbedingungen ist von einer unterschiedlich starken Degradierung der DNA im Gewebe auszugehen.

Nachdem 3 μ l einer DNA-Probe in einem Eppendorf-Cup mit 45 μ l Öl überschichtet und bei 94°C während 4 min. denaturiert worden sind, erfolgt die Zugabe des Master-Mix.

Der Master-Mix setzt sich wie folgt zusammen:

28,8 μ l destilliertes Wasser

5 μ l PCR Puffer

4 μ l MgCl (25mM)

8 μ l Chase

1 μ l Primer up

1 μ l Primer down

0,2 μ l Taq-Polymerase

Nachdem der Master-Mix zu den DNA-Proben unter das Öl gegeben worden ist, erfolgt eine nochmalige Denaturierung für 1 min. bei 94°C. Es schließt sich das Annealing der Primer während 1 min. bei 55°C an, worauf die Phase der Elongation der neu zu bildenden DNA-Stränge für 4 min. bei 72 °C folgt.

Nach Ablauf von 45 Zyklen werden die Proben abschließend für weitere 10 min. bei 72°C inkubiert, um die Elongation der neuen DNA-Abschnitte zu beenden.

Die Proben können nun auf das Vorhandensein des β -Globin-Gens untersucht werden.

2.4 Die Gel-Elektrophorese

2.4.1 Das Prinzip der Gel-Elektrophorese

Die Elektrophorese erlaubt eine genauere Charakterisierung der in der PCR gewonnenen Produkte anhand ihrer Größe bzw. ihres Gewichts. Man nutzt bei diesem Verfahren die Ladungseigenschaften der DNA, aufgrund welcher sich DNA im elektrischen Feld in Richtung der Anode bewegt. Je kleiner und damit leichter ein DNA-Fragment ist, um so schneller und weiter findet diese Wanderung statt. Dies hat eine Auftrennung der verschiedenen DNA-Bestandteile einer Probe nach ihrem Gewicht und damit nach ihrer Größe zur Folge. Um dies sichtbar zu machen, wird dem Gel, auf welchem diese Wanderung stattfindet, Ethidium-Bromid beigefügt, an welches sich die DNA Fragmente binden. Gleich große Fragmente sind dann unter UV-Licht als leuchtende Streifen, sog. Banden sichtbar. Um die Größe der Fragmente einer Bande zu bestimmen, setzt man neben den zu untersuchenden Proben eine Mischung von Basenpaaren verschiedener, jeweils definierter Größe ein. Der Vergleich der erhaltenen Banden der untersuchten Proben mit denen der Basenpaar-Mischung lässt eine Identifikation der Gene bzw. DNA-Fragmente über die Bestimmung ihrer Größe / ihres Gewichts zu.

2.4.2 Das Agarose-Gel

Je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente werden verschieden konzentrierte Gele benötigt. Bei den im Rahmen der vorgelegten Arbeit durchgeführten Formen der PCR sind 2%ige Agarose-Gele ausreichend.

Um dieses herzustellen werden 100 ml $\frac{1}{2}$ TBE-Puffer mit 2 mg Agarose für ca. 2 min in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Zugabe von 5 μ l Ethidium-Bromid werden je ca. 16 ml der noch flüssigen Agarose-Mischung auf Glasscheiben von 7 mal 10 cm Größe aufgebracht. Durch Eintauchen eines Kunststoffkammes in das noch flüssige Gel etwa 1 cm vom langen Rand der Glasplatte entfernt entstehen Kammern im Gel, sog. Slots, in welche die DNA-Proben einpipetiert werden können. Nach Abkühlen der Agarose-Mischung ist das Gel fest und der Kamm kann entfernt werden.

2.4.3 Durchführung der Elektrophorese

Das Gel wird in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit $\frac{1}{2}$ TBE-Puffer bedeckt. Zu beachten ist, dass die nach oben offenen Slots in Richtung der Kathode gelegen sind. Von den in der PCR gewonnenen DNA-Proben werden je 5,5 μ l mit Blaupuffer vermischt und mit Hilfe einer Pipette in jeweils ein eigenes Slot eingebracht. In ein weiteres Slot werden 2 μ l des Basenpaar-Puffers gegeben, nachdem auch dieser mit Blaupuffer vermischt worden ist. Der Blaupuffer ermöglicht es, die Wanderung der DNA während der Elektrophorese auch ohne UV-Licht zu beobachten.

Die Elektrophorese wird durch Aufbau einer elektrischen Spannung von 125 mV in Gang gesetzt. Nach 35 bis 40 min., wenn die Proben etwa $\frac{2}{3}$ des Gels durchwandert haben, wird der elektrische Strom unterbrochen und das Gel aus der Kammer genommen. Unter UV-Licht lassen sich im Falle einer Amplifikation eines Gens bzw. eines DNA-Fragments die entsprechenden Banden erkennen und deren Größe kann durch Vergleich mit den Banden des Basenpaar-Puffers abgeschätzt werden.

2.5 Geräte

DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer
Mikrotom	Reichert-Jung
Thermoblock	Liebisch
Mikroliter-Zentrifuge	Hettich
Elektrophorese Gelkammersystem GNA-100	Pharmacia
Gelkammer	Eigene Werkstatt
SpeedVac	SAVANT
Reagenzglasschüttler Vortex Genie	Bender&Hobein AG
Transilluminator UVT 20M/W	Herolab
UV-bestrahlbarer Arbeitsplatz	Eigene Werkstatt
Brutschrank	Heraeus
Waage	Sartorius
Mikrowellenherd	Bauknecht
Stromversorgungsgerät GPS 200/400	Pharmacia
Schüttler	IKA-Vibrax

Warmwasserbehälter	Hartenstein Laborbedarf
Autoklav	Hartenstein Laborbedarf
Gefrierschneider Frigocut 2800 N	Reichert-Jung
Magnetrührer	Hartenstein

Die verwendeten Pipetten, Pipettenspitzen, Erlenmeyerkolben, Reagenzgläser und Safelock-Caps lieferten die Firmen BRAND und Eppendorf. Die Sterifilter-Tips mit „Non-Self-Sealing-Filter“ wurden von BIOzym bezogen.

2.6 Puffer und Lösungen

10xTBE	216g Tris 110g Borsäure 80ml 0,5M EDTA pH 8 Auf 2000ml Aqua bidest
Digestionspuffer	50mM KCl 10mM Tris-HCl pH 8,3 2,5nM MgCl ₂ 0,1mg/ml Gelatine 0,45% Nonidet P40 0,45% Tween 20
Blaustoff	4,0g Sucrose 40% 0,03g Bromphenolblau 2,0ml 250mM EDTA In 6,0ml Aqua bidest

Chase
12,5µl dATP, 100mM pH 7,5
12,5µl dGTP, 100mM pH 7,5
12,5µl dTTP, 100mM pH 7,5
12,5µl dCTP, 100mM pH 7,5
Auf 950µl Aqua bidest

2.7 Reagenzien und Chemikalien

Agarose
Bromphenolblau
EDTA 25 mM pH 8
96% Ethanol
Ethidiumbromid 10mg/ml
96% Xylol
Tris/HCl 10mM
Taq-Polymerase mit Puffersystem
Aqua ad injectabilia
Mineralöl M5904

Sigma

Amersham

Die verwendeten Chemikalien lieferten die Firmen Sigma, B. Braun Melsungen, ROTH und GIBCO BRL.

2.7.1 Enzyme

Proteinase K 10mg/ml
Taq-DNA-Polymerase 5U/µl
Die Enzyme wurden von der Firma Biolabs bezogen.

2.7.2 DNA-Längenmarker

123 bp DNA-Leiter 1 µg/µl

2.7.2 Oligonucleotide

β -Globin Primer

TIB Molbiol

Primer up (40pmol/ μ l)

5' AAG TGT TGT TCC ACT GCC AAA 3'

Primer down (40 pmol/ μ l)

5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'

BCL1 Primer

TIB Molbiol

Primer 1 (JH consensus) (40pmol/ μ l)

5' AAC TGC AGA GGA GAC GGT GAC 3'

Primer 2 (40pmol/ μ l)

5' CTA CTG AAG GAC TTG TGG GTT GCT 3'

Primer 3 (40pmol/ μ l)

5' ATA TTC GGT TAG ACT GTG ATT AGC 3'

3. Ergebnisse

Untersucht wurden insgesamt 83 maligne Lymphome, darunter 29 MZBCL, 18 MCL, 13 CLL, 6 Haarzell-Leukämien, 13 diffuse großzellige B-Zell-Lymphome und 4 folliculäre Lymphome.

3.1 Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (MZBCL)

Von den 29 Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen wurden 23 mittels PCR auf ein *BCL1* Rearrangement untersucht, welches in keinem der 23 Fälle nachgewiesen werden konnte. In allen Fällen konnte aber das β -Globin Gen amplifiziert werden. In den übrigen 6 Proben konnte mittels β -Globin PCR keine amplifizierbare DNA nachgewiesen werden. Der Nachweis von CD5 gelang nur in 6 der 28 daraufhin untersuchten Fälle, wobei in allen 6 positiven Fällen eine *BCL1* PCR durchgeführt worden war. Jedoch konnte in einem CD5 positiven Fall zytogenetisch der Nachweis einer t(11;14) erbracht werden. CD10 konnte in keiner der 27 untersuchten Proben nachgewiesen werden. Eine CD23-Expression lag in 7 der 29 untersuchten Fälle vor. In 4 Fällen lag eine Koexpression von CD5 und CD23 vor. IgD konnte von 25 untersuchten Fällen in 18 dargestellt und in 7 nicht nachgewiesen werden. Cyclin D1 wurde von keinem der 26 zu dessen Anfärbung bearbeiteten Fälle exprimiert, worunter sich alle 6 CD5-positiven Proben befanden.

<u>Antigen</u>	<u>positiv</u>	<u>negativ</u>	<u>nicht analysiert</u>
CD5	6 (20,7%)	22 (75,9%)	1
CD10	0	27 (93,1%)	2
CD23	7 (24,1%)	22 (75,9%)	0
IgD	18 (62%)	7 (24,1%)	4
Cyclin D1	0	26 (89,7%)	3

Tab. 2: Immunhistochemische Ergebnisse bei MZBCL

3.2 Mantelzell-Lymphom (MCL)

Bei allen 18 Mantelzell-Lymphomen, darunter 11 nodale und 7 splenische Lymphome, wurde eine *BCL1* PCR durchgeführt, wobei ein *BCL1* Rearrangement in 10 Fällen (55,5%) festgestellt werden konnte und in 8 Fällen negativ ausfiel. Von den nodalen Fällen des MCL konnte ein *BCL1* Rearrangement in 8 der 11 Fälle (72,7%), in den splenischen in 2 von 7 (28,6%) Fällen nachgewiesen werden. Der Nachweis von CD5 konnte in allen 18 Fällen positiv geführt werden. CD10 konnte in keinem der 18 untersuchten Fälle dargestellt werden. Alle 18 Mantelzell-Lymphome wurden auf CD23 untersucht, welches jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. 16 Proben wurden auf eine Cyclin D1 Expression untersucht, welche in 15 Fällen ein positives Ergebnis erbrachte, darunter auch 9 Proben mit dem Nachweis eines *BCL1* Rearrangements.

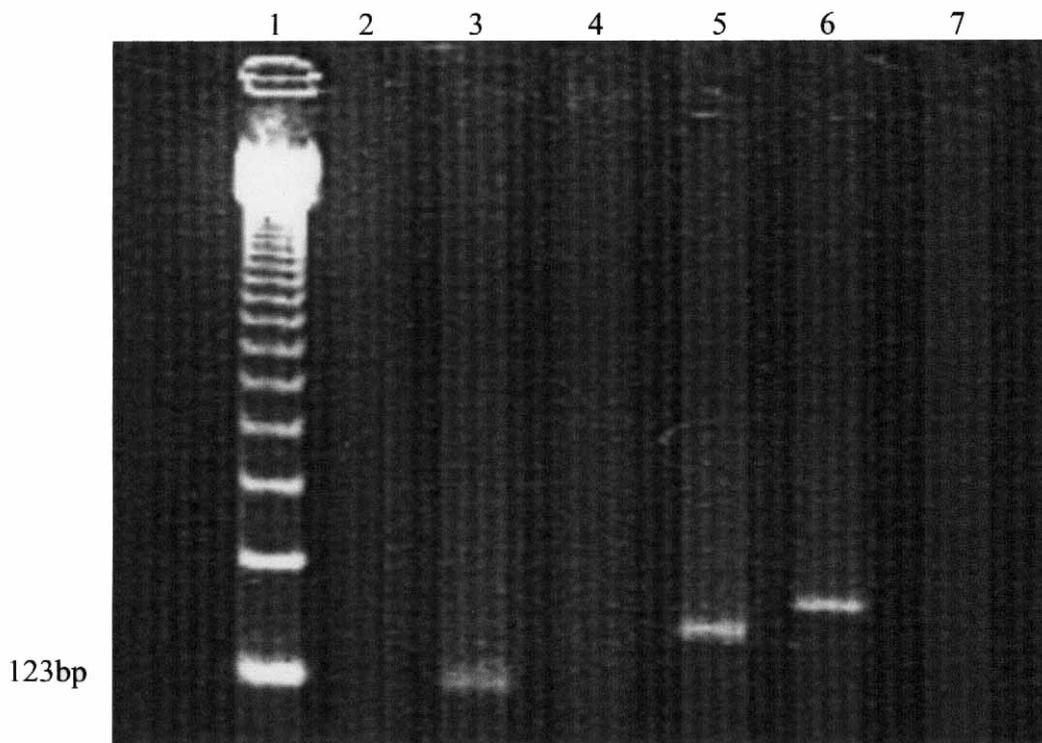


Abbildung 2: Darstellung des Amplifikationsproduktes der *BCL1* PCR mittels Gel-Elektrophorese

1: 123bp-Leiter, 2 und 4: MCL ohne *BCL1* Rearrangement, 3 und 5: MCL mit *BCL1* Rearrangement, 6: Positivkontrolle, 7: Negativkontrolle

<u>Antigen</u>	<u>positiv</u>	<u>negativ</u>	<u>nicht analysiert</u>
CD5	18 (100%)	0	0
CD10	0	18 (100%)	0
CD23	0	18 (100%)	0
Cyclin D1	15 (83,3%)	1 (5%)	2

Tab. 3: Immunhistochemische Ergebnisse bei MCL

3.3 CLL

In allen 13 Proben der CLL wurde eine *BCL1* PCR durchgeführt, ein *BCL1* Rearrangement fand sich in keiner der DNA-Proben, aus welchen sich in allen Fällen das β -Globin Gen amplifizieren ließ.

Eine CD5 Expression konnte in 11 der 13 untersuchten Fälle dargestellt werden. Dagegen konnte CD10 in keinem der 11 bearbeiteten Fälle nachgewiesen werden. Der Nachweis von CD23 konnte in 11 der 13 Fälle positiv geführt werden, in 2 gelang er nicht. Cyclin D1 konnte in keiner der 9 analysierten Proben angefärbt werden, darunter 7 CD5-positive und 2 CD5-negative Proben.

<u>Antigen</u>	<u>positiv</u>	<u>negativ</u>	<u>nicht analysiert</u>
CD5	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0
CD10	0	11 (84,6%)	2
CD23	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0
Cyclin D1	0	9 (69,2%)	4

Tab. 4: Immunhistochemische Ergebnisse bei CLL

3.4 Haarzell-Leukämie (HCL)

Mit 5 der 6 Fälle einer HCL wurde eine *BCL1* PCR durchgeführt. Obwohl sich auch hier in allen Fällen das β -Globin Gen fand, konnte ein *BCL1* Rearrangement nicht nachgewiesen werden. In der 6. Probe konnte mittels PCR zum Nachweis des β -Globin Gens keine

amplifizierbare DNA gefunden werden. CD5 wurde in 5 Fällen untersucht, konnte aber in keinem nachgewiesen werden. CD10 konnte in den 4 untersuchten Proben nicht dargestellt werden. Ebenso gelang die Darstellung von CD23 in den 4 untersuchten Fällen nicht. Auch die Expression von Cyclin D1 konnte in den 5 aufgearbeiteten Fällen nicht nachgewiesen werden.

<u>Antigen</u>	<u>positiv</u>	<u>negativ</u>	<u>nicht analysiert</u>
CD5	0	5 (83,3%)	1
CD10	0	4 (66,7%)	2
CD23	0	4 (66,7%)	2
Cyclin D1	0	5 (83,3%)	1

Tab.5: Immunhistochemische Ergebnisse bei HCL

3.5 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBL)

10 der 13 Proben der großzelligen B-Zell-Lymphome wurden mittels PCR auf ein *BCL1* Rearrangement geprüft, welches sich jedoch in keinem der 10 Fälle nachweisen ließ. In den 3 nicht untersuchten Fällen war mittels β -Globin-PCR keine amplifizierbare DNA nachweisbar. CD5 konnte lediglich in einem der 13 untersuchten Fälle nachgewiesen werden. Das CD10 Antigen konnte ebenfalls nur in einer der 13 Proben festgestellt werden. Auch CD23 konnte in allen 13 diesbezüglich bearbeiteten Proben nicht dargestellt werden. Von 11 untersuchten Proben fand sich eine IgD-Expression lediglich in einem Fall. Die Expression von Cyclin D1 konnte in keinem der 13 bearbeiteten Fälle nachgewiesen werden.

<u>Antigen</u>	<u>positiv</u>	<u>negativ</u>	<u>nicht analysiert</u>
CD5	1 (7,7%)	12 (92,3%)	0
CD10	1 (7,7%)	12 (92,3%)	0
CD23	0	13 (100%)	0
IgD	1 (7,7%)	10 (76,9%)	2
Cyclin D1	0	13 (100%)	0

Tab. 6 : Immunhistochemische Ergebnisse bei diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom

3.6 Follikuläres Lymphom (FL)

Von den 4 Fällen des FL wurden 2 mit Hilfe der PCR auf ein *BCL1* Rearrangement untersucht, welches sich in keinem Fall nachweisen ließ. In den übrigen 2 Proben war keine amplifizierbare DNA nachweisbar. Eine Expression von CD5 und CD23, auf welche jeweils 3 Proben untersucht wurden konnte nicht dargestellt werden. CD10 hingegen war in 2 der 3 diesbezüglich bearbeiteten Fällen positiv. Hinsichtlich der Expression von IgD und CyclinD1 wurde nur ein Fall untersucht, bei welchem sich beide Merkmale nicht darstellen ließen.

<u>Antigen</u>	<u>positiv</u>	<u>negativ</u>	<u>nicht analysiert</u>
CD5	0	3 (75%)	1
CD10	2 (50%)	1	1
CD23	0	3 (75%)	1
IgD	0	1	3
Cyclin D1	0	1	3

Tab. 7: Immunhistochemische Ergebnisse bei FL

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die molekulargenetische und immunhistochemische Charakterisierung des splenischen Marginalzonen-Lymphoms, insbesondere unter dem Aspekt des in der Literatur gelegentlich beschriebenen Nachweises des *BCL1* Rearrangements. Zu diesem Zweck wurden zunächst alle in Frage kommenden archivierten Gewebeproben des Lymphknoten-Referenz-Zentrums des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg erneut histologisch untersucht und analog der REAL/WHO-Klassifikation^{9 25} den einzelnen Entitäten neu zugeteilt. Bereits durchgeführte Diagnostik wurde überprüft und deren Ergebnisse erfasst. Noch ausstehende Untersuchungen wurden bei ausreichend vorhandenem Material im Rahmen dieser Arbeit ergänzt.

4.1 Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (MZBCL)

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte nach oben genannter Reklassifikation auf 29 Fälle eines splenischen MZBCL zurückgegriffen werden. Dabei konnte in keinem der 26 darauf untersuchten Fälle ein *BCL1* Rearrangement nachgewiesen werden. Eine CD5-Positivität fand sich in 6 von 28, eine CD23-Positivität in 7 von 29 Fällen. CD10 und Cyclin D1 wurde von keinem untersuchten Fall exprimiert. IgD wiederum ließ sich in 18 der 25 daraufhin bearbeiteten Fälle darstellen. Eine Koexpression von CD5 und CD23 lag in 4 Fällen vor. Vergleicht man diese Ergebnisse mit bereits durchgeführten Studien, sieht man sich mit z.T. widersprüchlichen Daten konfrontiert. Während einige Studien das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bezüglich des *bcl-1* Rearrangements bestätigen und es nicht als Merkmal des MZBCL ansehen^{26 28}, wird an anderer Stelle ein *BCL1* Rearrangement, bzw. eine Translokation t(11;14)(q13;q32) bei MZBCL in bis zu 15% der Fälle beschrieben^{60 61 62}. Mittels der hier angewandten, etablierten PCR zum Nachweis eines *BCL1* Rearrangements fand sich kein Hinweis auf eine Translokation t(11;14), auch eine Cyclin D1 Expression als immunhistochemisches Korrelat dieser genetischen Besonderheit ließ sich nicht nachweisen. Dies gelang auch nicht bei den 6 CD5 positiven Fällen, bei welchen schon aufgrund des immunhistochemischen Profils ein Mantelzell-Lymphom ausgeschlossen werden sollte⁶². Es stellt sich daher die Frage, ob alle der hier sowie der in den genannten Studien untersuchten Lymphome tatsächlich dem MZBCL zuzuordnen sind. Möglicherweise sind CD5 positive

Fälle von MZBCL mit dem Nachweis einer t(11;14) dem MCL zuzuordnen. Dabei wäre durchaus von einem jeweils primär splenischem Ursprung des Lymphoms auszugehen. Zu berücksichtigen ist hierbei sicherlich auch, dass es sich bei den MZBCL nicht um eine homogene Gruppe handelt, sondern dass sich hierunter auch Lymphome finden, die bereits morphologisch anderen Entitäten, so z.B. der CLL ähneln. Solche Tumoren zeigen oft kleinere Infiltratzellen mit rundlichem Kern und einer deutlichen Beteiligung der roten Pulpa. Ähnlichkeiten ergeben sich z.T. auch bezüglich der immunhistochemischen Eigenschaften. Zwar ist die gelegentliche Expression von CD5 und CD23 bei MZBCL bekannt³⁵, in erster Linie ist diese Koexpression aber als Eigenschaft der CLL anzusehen. In 4 Fällen der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten MZBCL konnte eine Koexpression von CD5 und CD23 gefunden werden. Das Infiltratmuster im Hiluslymphknoten entsprach in diesen Fällen jedoch nicht einer CLL sondern einem MZBCL.

4.2 Mantelzell-Lymphom (MCL)

In allen 18 zur Verfügung stehenden Proben eines MCL wurde eine *BCL1* PCR durchgeführt, welche ein Rearrangement in 10 Fällen (55,5%) nachweisen ließ. Dies unterstreicht die starke Assoziation dieser genetischen Anomalie mit dem MCL^{50 55}. Cyclin D1 konnte in 15 von 16 Proben dargestellt werden. Auffallend ist auch die Expression von Cyclin D1 in 6 Fällen, in welchen ein *BCL1* Rearrangement nicht nachgewiesen werden konnte. In solchen auch publizierten Fällen⁵⁷ liegt offensichtlich eine Translokation t(11;14) (q13;q32) vor, ohne dass das *BCL1* Rearrangement mit Hilfe der hier verwendeten PCR nachzuweisen ist. Ursächlich hierfür sind vermutlich Bruchpunkte außerhalb der mittels PCR erfassbaren Bruchpunktregionen. In einem Teil der Fälle, bei denen die Splenomegalie und die Knochenmarksbeteiligung als Primärsymptomatik des Lymphoms vorlagen, muss durchaus eine primäre Tumorgenese in der Milz diskutiert werden. Die t(11;14) als wichtige genetische Voraussetzung für eine pathologische Proliferation wird im Rahmen einer pathologische Rekombination in der frühen B-Zell-Reifung so zeitig erworben, dass sie rein hypothetisch auch beim Eintritt entsprechender Zellen in die Marginalzone wirksam werden könnte. Dies erscheint insbesondere unter dem Aspekt denkbar, dass Fälle von MCL beschrieben wurden, welche klinisch mit massiver Splenomegalie und Leukocytose, jedoch ohne periphere Lymphadenopathie imponierten⁶⁴. Zu berücksichtigen ist hierbei sicherlich auch, dass bei MCL mit Cyclin D1 Expression mit einer schlechten Prognose und einer raschen

Tumorprogression zu rechnen ist⁶⁵, was im weiteren Krankheitsverlauf eine Identifikation des Entstehungsortes der Erkrankung erheblich erschwert. Es ist aber zu diskutieren, dass sich Tumore der gleichen Entität mit verschiedenen Entstehungsorten aufgrund der unterschiedlichen vorherrschenden Rahmenbedingungen anders entwickeln und somit möglicherweise unterschiedliche biologische Merkmale aufweisen.

4.3 Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die chronische lymphatische Leukämie zeigt nahezu in allen Fällen eine Beteiligung der Milz. Das Bild entspricht einem hämatogenen Befallsmuster über die weiße Pulpa und entlang der Pinselarterien sowie dann meist starker Ausbreitung in die rote Pulpa. In allen 13 der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fälle einer CLL wurde eine *BCL1* PCR mit negativem Ergebnis durchgeführt. Diese Beobachtung deckt sich mit der Erfahrung, dass in der CLL neben numerischen Aberrationen, insbesondere einer Trisomie 12, strukturelle Alterationen im Bereich 13q14 eine Rolle spielen^{66 67}, was auf einen vollständig differenten Entstehungsmodus hinweist. Eine Expression von CD5 fand sich in 11 von 13 Fällen, CD23 wurde von 11 der 13 untersuchten Fälle exprimiert. Eine Koexpression von CD5 und CD23 konnte in 10 Fällen dargestellt werden. CD10 war in allen 11 diesbezüglich untersuchten Proben negativ. Der Nachweis einer Koexpression von CD5 und CD23 ist ein wichtiges Kriterium zur Diagnosestellung einer CLL zu sein^{35 68}.

4.4 Haarzell-Leukämie (HCL)

Die Haarzellenleukämie (HCL) ist nach der Morphologie eine der roten Milzpulpa zuzuordnende Neoplasie. Der starken Assoziation zu den sinusoidalen Strukturen entspricht auch die stets vorhandene Knochenmarksbeteiligung.

In 5 der 6 hier untersuchten Fälle konnte eine *BCL1* PCR durchgeführt werden, welche durchweg negativ ausfiel. Eine Cyclin D1 Expression konnte immunhistochemisch nicht dargestellt werden. Auf RNA-Ebene ist die Überexpression von Cyclin D1 für die HCL nachgewiesen⁶⁹. Der fehlende Nachweis eines *BCL-1* Rearrangements passt zu der Überlegung, dass die – auf Proteinebene kaum erkennbare – Überexpression von Cyclin D1 in der HCL auf einen differenten Pathomechanismus zurückzuführen ist.

4.5 Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (DLBL)

In 10 der 13 vorliegenden Fälle eines diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms (DLBL) konnte eine PCR zum Nachweis eines *BCL1* Rearrangements durchgeführt werden, welche jedoch stets negativ ausfiel. Ausgedehnte Nekrosenbildung und regressive Veränderungen bei dieser heterogenen Gruppe von hochmalignen Lymphomen erschwerten die biologische Charakterisierung. Cyclin D1 konnte in keinem der 13 Fälle nachgewiesen werden. Ein Fall war CD10 positiv als Hinweis auf eine Keimzentrumsdifferenzierung. Ein weiterer CD5 positiver Fall passt in eine kürzlich beschriebene Gruppe CD5 positiver großzelliger B-Zell-Lymphome, bei denen auch in einer größeren Serie das Auftreten von t(11;14)(q13/q32) ausgeschlossen werden konnte⁷⁰. Der Nachweis einer Expression von IgD gelang in einem von 11 diesbezüglich analysierten Fällen. Eine Translokation t(11;14) mit konsekutiver Cyclin D1 Expression scheint für die Genese der diffusen großzelligen Lymphome, welche häufig primär in der Milz entstehen, keine wesentliche Rolle zu spielen. Vielmehr ist von einer heterogenen Tumorgruppe auszugehen, die von unterschiedlichen B-Zell-Differenzierungsstadien abgeleitet werden kann⁷¹. Je nach Infiltrationsmuster können aber Rückschlüsse auf eine Genese in oder außerhalb der Milz gezogen werden. Singuläre, große Tumorknoten implizieren offenbar einen primär milzeigenen Tumor, während multiple, kleine an den Lymphfollikeln der weißen Pulpa orientierte Infiltrate auf eine hämatogene Streuung eines primär außerhalb der Milz entstandenen Tumor hindeuten.

4.6 Follikuläres Lymphom

Unter den im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Lymphomen befanden sich 4 Fälle eines follikulären Lymphoms. Ein *BCL1* Rearrangement konnte in den beiden Fällen, in welchen eine PCR durchgeführt werden konnte, nicht dargestellt werden. CD5 und CD23 wurde in von keiner der jeweils 3 daraufhin untersuchten Proben exprimiert, wohingegen die Expression von CD10 in 2 der 3 diesbezüglich bearbeiteten Fälle gezeigt werden konnte. Cyclin D1 und IgD wurden von den Zellen des jeweils einzigen untersuchten Fall nicht exprimiert. Gerade das follikuläre Lymphom ist ein ebenfalls durch eine hochcharakteristische Translokation gekennzeichneter Tumor. Die t(14;18)(q32;q21) und das damit verbundene Rearrangement des *BCL2* Gens führt zu einer deregulierten Expression des BCL2-Proteins^{40 41 42}.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 83 maligne Lymphome mit Hilfe molekulargenetischer und immunhistochemischer Methoden untersucht.

Im Vordergrund standen hierbei 29 Fälle eines splenischen MZBCL. Frühere Berichte in der Literatur über ein *BCL1* Rearrangement, bzw. einer Cyclin D1 Expression konnten hierbei nicht bestätigt werden. Auch in Fällen mit einer Positivität für CD5, bei welchen aufgrund des Immunphänotyps ein MCL auszuschließen war, wurde ein negatives Ergebnis erzielt, wobei eine CD5 Expression insgesamt in MZBCL mit 6/28 Fällen (21,4%) sehr selten vorlag.

In den 18 Fällen eines MCL hingegen konnte ein *BCL1* Rearrangement in 55,5% dargestellt werden. Auch die Cyclin D1 Expression fand sich in mehr als der Hälfte der untersuchten Fälle. Wenngleich die primäre Lokalisation nicht in allen splenischen MCL zu sichern war, spricht das Ergebnis doch für einen gleichartigen Entstehungsmechanismus des Tumors in der Milz und im Lymphknoten.

Ein besonderes Problem stellt der Nachweis der t(11;14) in MZBCL auf zytogenetischer Ebene dar. Das fehlende Rearrangement spricht für einen differenten Bruchpunkt. Nicht ausgeschlossen werden kann hier eine Translokation in der späteren B-Zell-Differenzierung, wie sie beim Plasmozytom beobachtet wurde⁷². Da der Tumor CD5 positiv war, muss hier aber auch die Möglichkeit eines seiner Natur nach primär splenischen MCL diskutiert werden.

Erwartungsgemäß konnte in keinem Fall einer CLL das *BCL1* Rearrangement nachgewiesen werden. Es handelt sich um eine zytogenetisch und immunhistochemisch differente, bereits morphologisch abgrenzbare Entität, die gleichwohl offenbar auch primär in der Milz entstehen kann.

Auch in den kontrollmäßig parallel untersuchten weiteren B-Zell-Lymphom-Entitäten wie der HCL, dem follikulärem Lymphom sowie den diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen konnte ebenfalls kein Hinweis auf eine t(11;14) gefunden werden. Hier ergibt sich allerdings neben einem vor allem in der HCL typischen Antikörperprofil jeweils ein klares morphologisches Bild.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der molekulargenetische Nachweis einer Translokation t(11;14)(q13;q32) durch ein *BCL1* Rearrangement ein wichtiger Hinweis auf das Vorliegen eines MCL darstellt. Dabei liegt das größte Problem in der weiten Bruchpunktstreuung, die eine vollständige Erfassung der Translokationen bei der nur kurzen DNA-Länge im PCR-Produkt erschwert. Alternativ ist hier eine Analyse mittels Fluoreszenz-

in-situ-Hybridisierung (FISH) zu erwägen. Diese erfordert zwar Frischmaterial oder leukämische Zellen des peripheren Blutes, ist aber aufgrund der weitüberspannenden Sonden sensibler als die PCR-Methode⁷³. Die aus der t(11;14) resultierende Expression von Cyclin D1 spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und Progression. In der Milz liegen offenbar vergleichbare Mechanismen der Tumorentstehung vor wie im Lymphknoten. Die nur zytogenetisch nachgewiesene t(11;14) in zwei Fällen CD5 positiver Fälle mit Morphologie eines SMZL bedarf zum näheren Verständnis einer Bruchpunktanalyse.

6. Literaturverzeichnis

- ¹ Hsu SM. Phenotypic expression of B-lymphocytes; III. Marginal zone B-cells in the spleen are characterized by the expression of Tac and Alkaline Phosphatase.
J Immunol 1985; 135: 123- 130
- ² Kumumaratne DS, Bazin H, MacLennan ICM. Marginal zones: the major B-cell compartment in rat spleens.
Eur J Immunol 1981; 11: 858- 864
- ³ Dunn-Walters DK, Isaacson PG, Spencer J. Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B-cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B-cells.
J Exp Med 1995; 182: 559- 566
- ⁴ Spencer J, Finn T, Pulford KAF, Mason DY, Isaacson PG. The human gut contains a novel population of B-lymphocytes which resemble marginal zone cells.
Clin Exp Immunol 1985; 62: 607- 612
- ⁵ Stein H, Lennert K, Mason DY, Liangru S, Ziegler A. Immature sinus histiocytes. Their identification as a novel B-cell population.
Am J Pathol 1984; 117: 44- 52
- ⁶ Van den Oord JJ, De Wolf-Peeters C, Desmet VJ. Marginal zone cells in the lymph node (letter).
Hum Pathol 1989; 20: 1225- 1226
- ⁷ Van den Oord JJ, De Wolf-Peeters C, Desmet VJ. The marginal zone in the human reactive lymph node.
Am J Clin Pathol 1986; 475- 479
- ⁸ Lennert K. Malignant lymphomas other than Hodgkin's Disease.
Berlin: Springer Verlag, 1978
- ⁹ Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TH, Isaacson PG, Knowels DM, Mason DY, Müller-Hermelink HK, Pileri S, Piris MA, Ralfkier E, Warnke RA. A revised European-American Classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group.
Blood 1994; 84: 1361- 1392
- ¹⁰ Glatstein E, Guernsey JM, Rosenberg SA. The value of laparotomy and splenectomy in the staging of Hodgkin's Disease.
Cancer 1969; 24: 709- 718
- ¹¹ Kim H, Dorfmann RF. Morphological studies of 84 untreated patients subjected to laparotomy for the staging of Non-Hodgkin's Lymphomas.
Cancer 1974; 33: 657- 674

- ¹² Bostick WB. Primary splenic lymphomas.
Am J Pathol 1945; 21: 1143- 1165
- ¹³ Ahmann DL, Kiely JM, Harrison EG, Payne WS. Malignant lymphoma of the spleen: A review of 49 cases in which the diagnosis was made by splenectomy.
Cancer 1966; 19: 461- 469
- ¹⁴ Das Gupta T, Coombes BC, Brasfield RD. Primary malignant neoplasms of the spleen.
Surg Gynecol Obstet 1969; 120: 947- 960
- ¹⁵ Skarin T, Davey FR, Moloney WC. Lymphosarkoma of the spleen.
Arch Intern Med 1971; 127: 259- 265
- ¹⁶ Davey FR, Skarin AT, Molony WC. Pathology of splenic lymphoma.
Am J Clin Pathol 1973; 59: 95- 103
- ¹⁷ Kraemer BB, Osborne BM, Butler J. Primary splenic presentation of malignant lymphoma and related disorders: study of 49 cases.
Cancer 1984; 54: 1606- 1619
- ¹⁸ Narang S, Wolf BC, Neiman RS. Malignant lymphoma presenting with prominent splenomegaly; a clinicopathologic study with special reference to intermediate cell lymphoma.
Cancer 1985; 55: 1948- 1957
- ¹⁹ Audouin J, Diebold J, Schwartz H, Le Tourneau A, Bernadou A, Zittoun R. Malignant lymphoplasmatic lymphoma with prominent splenomegaly (primary lymphoma of the spleen).
J Pathol 1988; 155: 17-33
- ²⁰ Falk S, Stutte HJ. Primary malignant lymphoma of the spleen. A morphologic and immunohistochemical study of 17 cases.
Cancer 1990; 66: 2616-2619
- ²¹ Dacie JV, Brain MC, Harrison CV, Lewis SM, Worlledge SM. „Non tropical splenomegaly” (primary hypersplenism); a review of 10 cases and their relationship to malignant lymphomas.
Br J Haematol 1969; 17: 317- 333
- ²² Melo JV, Hedge U, Parreira A, Thompson I, Lampert IA, Catosky D. Splenic B-cell lymphoma with circulating villous lymphocytes: differential diagnosis of B-cell-leukemias with large spleens.
J Clin Pathol 1987; 40: 642- 651
- ²³ Isaacson PG, Matutes E, Burke M, Catovsky D. The histopathology of splenic lymphomas with villous lymphocytes.
Blood 1994; 84: 3828- 3834

- ²⁴ Rosso R, Neiman RS, Pauli M, Boveri E, Kindl S, Magrini U, Barosi G. Splenic marginal zone cell lymphoma; report of an indolent variant without massive splenomegaly presumably representing an early phase of the disease.
Hum Pathol 1995; 26 39- 46
- ²⁵ Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J. Lymphoma classification – from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms.
Annals of Oncology 2000; Suppl. Nr. S3-S20
- ²⁶ Dierlamm J, Pittaluga S, Wlodarska I, Stuhl M, Thomas J, Boogaerts M, Michaux L, Driessen A, Mecucci C, Casoiman JJ, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe H. Marginal zone B-cell lymphoma of different sites share similar cytogenetic and morphologic features.
Blood 1996; 87: 299- 307
- ²⁷ Sheibani K, Sohn CC, Burke JS, Winberg CD, Wu AM, Rappaport H. Monocytoid B-cell lymphoma. A novel B-cell neoplasm.
Am J Pathol 1986; 124: 310- 318
- ²⁸ Schmid C, Kirkham N, Diss T. Splenic Marginal zone cell lymphoma.
Am J Surg Pathol 1992; 16: 455- 466
- ²⁹ Van den Oord JJ, De Wolf-Peeters C, De Vos R. Immature sinus histiocytosis. Light and electron microscopic features, immunologic phenotype and relationship with marginal zone lymphocytes.
Am J Pathol 1985; 118: 266- 267
- ³⁰ Piris WA, Rivas CA, Morente M, Cruz MA, Rublo C, Oliva H. Monocytoid B-cell lymphoma, a tumor related to the marginal zone.
Histopathology 1988; 12: 383- 392
- ³¹ Isaacson PG, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue: A distinctive type of B-cell lymphoma.
Cancer 1983; 52: 1410-1416
- ³² Myhre MJ, Isaacson PG. Primary B cell gastric lymphoma – a reassessment of its histogenesis.
J Pathol 1987; 152: 1- 11
- ³³ Lukes RJ, Collins RB. Tumors of the haematopoietic system. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathol 1992, 157- 161
- ³⁴ Van Krieken JHJM, von Schilling C, Kluin M, Lennert K. Splenic marginal zone lymphocytes and related cells in the lymph node: a morphologic and immunohistochemical study.
Hum Pathol 1989; 20: 320- 325
- ³⁵ Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders.
Blood 1994; 83: 1558- 1562

- ³⁶ Salomon-Nguyen F, Valensi F, Troussard X, Flandrin G. The value of the monoclonal antibody, DBA44, in the diagnosis of B-lymphoid disorders. *Leuk Res* 1996; 20: 909- 913
- ³⁷ Oscier DG, Matutes E, Gardiner A, Glide S, Mould S, Brito-Babapulle V, Ellis J, Catovsky D. Cytogenetic studies in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol* 1993; 85: 487- 491
- ³⁸ Zech L, Haglund V, Nilson V, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell-lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphoma. *Int J Cancer* 1976; 17: 47-56
- ³⁹ Dalla-Favara R, Brebni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7824- 7827
- ⁴⁰ Cotter FE. The role of the bcl-2 gene in lymphoma. *Br J Haematol* 1990; 75: 449- 453
- ⁴¹ Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228: 1440- 1443
- ⁴² Ngan BY, Chen-Levy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML. Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *N Engl J Med* 1988; 318: 1638- 1644
- ⁴³ Tsujimoto Y, Yunis J, Onotato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 1984; 224: 1403- 1406
- ⁴⁴ Haluska FG, Finver S, Tsujimoto Y, Croce CM. The t(8;14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-j joining. *Nature* 1986; 324: 158- 160
- ⁴⁵ Tycko B, Slar J: Chromosomal translocation in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinase model. *Cancer cells* 1990; 2: 1- 8
- ⁴⁶ Williams ME, Meeker TC, Swerdlow SH. Rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus in centrocytic lymphoma: analysis with multiple breakpoint probes. *Blood* 1991; 78: 493- 498
- ⁴⁷ De Boer CJ, Loyson S, Kluin PM, Kluin-Nelemans HC, Schuurin E, van Krieken JH. Multiple breakpoints within the bcl-1 locus in b-cell lymphoma: rearrangements of the Cyclin D1 gene. *Cancer Research* 1993; 53: 4148- 4152

- ⁴⁸ Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Arnold A. A novel cyclin encoded by a bcl-1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991; 350: 512- 515
- ⁴⁹ Rosenberg CL, Wong E, Petty EM, Bale AE, Tsujimoto Y, Harris NL, Arnold A. PRAD1, a candidate bcl-1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9638- 9642
- ⁵⁰ Williams ME, Swerdlow SH, Rosenberg CL, Arnold A. Characterization of chromosome 11 translocation breakpoints at the bcl-1 and PRAD1 loci in centrocytic lymphoma. *Cancer Res* 1992; 52: 5541s- 5544s
- ⁵¹ Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cell cycle-related variation and tissue-restricted expression of cyclin D1 protein. *J Pathol* 1994; 172: 237- 245
- ⁵² Ando K, Ajchenbaum-Cymbalista F, Griffin JD. Regulation of G1/S transition by cyclins D2 and D3 in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9571-9575
- ⁵³ Ott MM, Bartkova J, Bartek J, Dürr A, Fischer L, Ott G, Müller-Hermelink HK, Kreipe H. Cyclin D1 Expression in Mantle Cell Lymphoma is accompanied by downregulation of cyclin D3 and is not related to the proliferative activity. *Blood* 1997; 90: 3159- 3154
- ⁵⁴ Dreyling MH, Bullinger L, Ott G, Stilgenbauer S, Müller-Hermelink HK, Bentz M, Hiddemann W, Döhner H. Alterations of the Cyclin D1/ p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 1997; 57: 4608-4614
- ⁵⁵ Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E, Rozman C, Cardesa A. PRAD1/ Cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994; 84: 2726- 2732
- ⁵⁶ Ott MM, Ott G, Kuse R, Porowski P, Gunzer U, Feller AC, Müller-Hermelink HK. The anaplastic variant of centrocytic lymphoma is marked by frequent rearrangements of the bcl-1 gene and high proliferation indices. *Histopathology* 1994; 24: 329- 334
- ⁵⁷ Ott MM, Helbing A, Ott G, Bartek J, Fischer L, Dürr A, Kreipe H, Müller-Hermelink HK. Bcl-1 rearrangement and cyclin D1 protein expression in mantle cell lymphoma. *J Pathol* 1996; 179: 238- 242
- ⁵⁸ Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphopoietic leukaemia defined by specific chromosomal abnormalities. *New England Journal of Medicine* 1990; 323: 720-724
- ⁵⁹ Hernandez JM, Mecucci C, Criel A, Meeus P, Michaux L, Van Hoof A, Verhoef G, Louwagie A, Scheiff JM, Michaux JL, Boogaerts M, Van den Berghe H. *Leukemia* 1995; 9: 2140-2146

- ⁶⁰ Jadayel D, Matutes E, Dyer MJS, Brito-Babapulle V, Khohkar T, Oscier D, Catovsky D. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: analysis of bcl-1 rearrangements and expression of the cyclin D1 gene. *Blood* 1994; 83: 3664- 3671
- ⁶¹ Oscier DG, Matutes E, Gardiner A, Glide S, Mould S, Brito-Babaapulle V, Ellis J, Catovsky D. Cytogenetic studies in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol* 1993; 85: 487- 491
- ⁶² Troussard X, Mauvieux L, Radford-Weiss I, Rack K, Valensi F, Garand R, Vekemans M, Flandrin G, Macintyre EA. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a Groupe francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC) study. *BR J Haematol* 1998; 101: 712- 721
- ⁶³ Rimokh R, Berger F, Delsol G, Dignonet I, Rouault JP, Tigaud JD, Gadoux M, Coiffier B, Bryon PA, Magaud JP. Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood* 1994; 83: 1871-1875
- ⁶⁴ Molina TJ, Delmer A, Cymbalista F, Le Tourneau A, Perrot JY, Ramond S, Marie JP, Audouin J, Zittoun R, Diebold J. Mantle cell lymphoma, in leukaemic phase with prominent splenomegaly. A report of eight cases with similar clinical presentation and aggressive outcome. *Virchows Arch* 2000; 437: 591-598
- ⁶⁵ Yatabe Y, Suzuki R, Tobianai K, Matsuno Y, Ichinohasama R, Okamoto M, Yamaguchi M, Tamaru JI, Uike N, Hashimoto Y, Morishima Y, Suchi T, Seto M, Nakamura S. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1 positive MCL and cyclin D1 negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* 2000; 95: 2253-2261
- ⁶⁶ Fitchett M, Griffiths MJ, Oscier DG, Jonson S, Seabright M. Chromosome abnormalities involving band 13q14 in hematologic malignancies *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 24: 143-150
- ⁶⁷ Stilgenbauer S, Döhner H, Bulgay-Mörschel M, Weitz S, Bentz M, Lichter P. High frequency of monoallelic retinoblastoma gene deletion in B-cell chronic lymphocytic leukemia shown by interphase cytogenetics. *Blood* 1993, 81: 2118-2124
- ⁶⁸ Ott MM. Non-Hodgkin-Lymphome in der Milz: Untersuchungen zur Prävalenz, Histopathologie und Pathogenese. *Habilitationsschrift, Würzburg* 2000
- ⁶⁹ Specht K, Kremer M, Müller U, Dirnhofer S, Rosemann M, Hofler H, Quintanilla-Martinez L, Fend F. Identification of Cyclin D1 mRNA Overexpression in B-Cell Neoplasias by Real-Time Reverse Transcription-PCR of Microdissected Paraffin Sections. *Clin Cancer Res* 2002; 8(9): 2902-2911

⁷⁰ Katzenberger T, Lohr A, Schwarz S, Dreyling M, Schoof J, Nickenig C, Stilgenbauer S, Kalla J, Ott M M, Müller-Hermelink HK, Ott G. Genetic analysis of de novo CD5 positive diffuse large B-cell lymphomas suggests an origin from a somatically mutated CD5+ progenitor B cell.
Blood 2002

⁷¹ Alizadeh AA et al. Distinct types of diffuse large cell lymphomas identified by gene expression profiling.
Nature 2000; 403: 503-511

⁷² Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process.
Blood 1998; 91: 3-21

⁷³ Siebert R et al. Application of interphase cytogenetics for the detection of t(11;14)(q13;q32) in antle cell lymphomas.
Annals of Oncology 1998; 5:519-526

7. Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BCL1/2	B-cell lymphoma 1/2
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CTP	Cytidintriphosphat
DLBL	diffuses großzelliges B-Zell Lymphom
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FL	follikuläres Lymphom
GTP	Guanosintriphosphat
HCL	Haarzell-Leukämie
MCL	Mantelzell-Lymphom
MTL	mjor translocation cluster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PRAD1	parathyreoid adenoma
SLVL	splenisches Lymphom mit villösen Lymphozyten
TAE	Trisacetat EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Trisbotate EDAT
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl 1,3-propandiol
TTP	Thymidintriphosphat

Danksagung

Frau Priv.-Doz. Dr. med. M.M. Ott danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink danke ich für die Übernahme des Koreferates sowie für die Möglichkeit zur Durchführung der laborchemischen Experimente im Institut für Pathologie der Universität Würzburg.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. C. Hallas, Frau Dr. S. Müller-Deubert, Frau B. Wagner sowie Frau Dr. A. Wilisch für ihre unermüdliche Geduld und Hilfsbereitschaft während meiner experimentellen Laborarbeiten.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern für die vielfältige Unterstützung während meiner Dissertation und der gesamten Studienzeit, sowie meinem Ehemann für die Geduld und Unterstützung während der Fertigstellung der Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Lenz
Vorname: Elke
Geburtsdatum/-ort: 27.09.1972, München
Anschrift: Peter-Scholzen-Str.27
54296 Trier
Familienstand: verheiratet, Ehemann Ralph Press, geb. 24.1.1966,
Goldschmiedemeister
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung:

1979 - 1981 Grundschole in Berching i.d. Opf.
1981 - 1983 Grundschole in Eckental
1983 - 1992 Emil-von-Behring-Gymnasium, Spardorf
08.07.1992 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

1992 - 1994 Vorklinische Medizin, Universität Regensburg
14.09.1994 Ärztliche Vorprüfung, Note: befriedigend
1994 - 1998 Klinische Medizin, Universität Würzburg
29.08.1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: befriedigend
25.03.1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: gut
1998 - 1999 Praktisches Jahr, Mutterhaus d. Borromäerinnen, Trier
12.04.1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: gut

Praktisches Jahr:

20.04.98-28.03.99 Mutterhaus der Borromäerinnen, Trier
Wahlfach Gynäkologie

AiP:

1.6.1999-30.11.2000 Gefäßchirurgie, Mutterhaus der Borromäerinnen, Trier

Assistenzarztzeit:

1.12.00-31.03.02 Chirurgie, Clemens-August-Krankenhaus, Bitburg
seit 1.04.2002 Chirurgie, Brüderkrankenhaus, Trier

Trier, 27.12.2002



