

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

**Genetische Charakterisierung diffuser großzelliger B-Zell Lymphome vom
Keimzentrumstyp, vom aktivierten B-Zelltyp und von primär mediastinalen
diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen**

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

vorgelegt von

Philipp Jehn
aus Würzburg

Würzburg, im Juni 2007

Referent: Priv. Doz. Dr. med. A. Zettl

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

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24. August 2007

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Tumorentstehung	1
1.2 Stadien der B-Zellreifung	2
1.3 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome – Definition	3
1.4 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome im Wandel der Lymphomklassifikationen...	5
1.5 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome – WHO-Klassifikation	8
1.6 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome verhalten sich klinisch heterogen.....	9
1.7 Immunphänotypisierung der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome.....	12
1.8 Genexpressionsanalysen der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome.....	13
1.9 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome – CGH-Arbeiten.....	20
1.10 Grundprinzipien der CGH	24
1.11 Fragestellungen.....	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Herkunft des untersuchten Materials.....	26
2.2 Bestimmung der Menge an Tumor-DNA.....	27
2.3 RNase-Verdau	27
2.4 Nick-Translation.....	28
2.5 Komparative Genomische Hybridisierung (CGH).....	29
2.6 Bildaufnahme und Bildauswertung	30
2.7 Statistische Analysen.....	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Genetische Alterationen des Gesamtkollektivs der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome.....	32
3.2 Genetische Alterationen der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome vom Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL)	32
3.3 Genetische Alterationen der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome vom aktivierten B-Zelltyp (ABC-DLBCL)	35

3.4 Genetische Alterationen der primär mediastinalen diffusen großzelligen B-Zell Lymphome (PMBCL)	38
3.5 GCB-DLBCL, ABC-DLBCL und PMBCL unterscheiden sich genetisch signifikant	40
4. Diskussion.....	45
4.1 Mittels Genexpression definierte Subtypen von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen unterscheiden sich genetisch signifikant.....	45
4.2 Chromosomale Imbalanzen bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen vom Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL)	47
4.3 Chromosomale Imbalanzen bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen vom aktivierten B-Zelltyp (ABC-DLBCL)	49
4.4 Chromosomale Imbalanzen bei primär mediastinalen diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen (PMBCL)	52
5. Zusammenfassung	54
6. Literaturangaben.....	56
7. Abkürzungen.....	79
8. Anhang.....	81

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Tumorentstehung

Die Entstehung von Tumoren ist das Resultat einer klonalen Dysregulation des Zellwachstums, die zu einer Unabhängigkeit der betroffenen Zellen von äußeren Einflüssen führt und eine autonome Zellproliferation zur Folge hat. Es werden sechs Arten von Störungen der Regulation des Zellwachstums diskutiert, die als entscheidend für die Entstehung maligner Tumoren angesehen werden: Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Unabhängigkeit von externen, wachstumsfördernden Signalen, unbegrenzte Replikationsfähigkeit, Apoptoseresistenz, Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung sowie Tumorneoangiogenese [1].

Veränderungen am Genom einer Zelle stellen die wesentliche Grundlage für klonale Dysregulationen der Zellproliferation dar, die nach derzeitigem Verständnis in einem Mehrstufenprozess durch genetische Instabilität entstehen. Bei derartigen Veränderungen handelt es sich zum einen um numerische chromosomale Aberrationen, die sowohl durch Zugewinn als auch durch Verlust von genetischem Material gekennzeichnet sind, zum anderen um strukturelle Veränderungen, die durch Chromosomenbrüche im Genom der Tumorzellen auftreten können. Des Weiteren kann die Integrität des Genoms auf genetischer Ebene durch Mutationen oder Genamplifikationen gestört werden.

Die hierdurch bedingten Veränderungen des zellulären Genoms können zum einen zu einer unkontrollierten Aktivierung von wachstumsfördernden Genen (sog. Onkogenen), zum anderen zu einem Funktionsverlust von wachstumshemmenden Genen (sog. Tumorsuppressorgenen) führen. Ferner können Gene, die den Zelltod (Apoptose) oder die DNA-Reparatur regulieren, in ihrer Funktion gestört werden. Die mögliche Folge ist autonomes, neoplastisches Wachstum.

Die Untersuchung des genetischen Materials von Tumorzellen ermöglicht somit Einblicke in Genomabschnitte, die bei der Entstehung von Tumoren, wie den Lymphomen, von entscheidender Bedeutung sind. Im Zentrum der vorliegenden Arbeit standen genetische Veränderungen bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen.

1.2 Stadien der B-Zellreifung

Diffuse großzellige B-Zell Lymphome („diffuse large B-cell lymphoma“; DLBCL) gehören zur Gruppe der reifen B-Zellneoplasien, einer Untergruppe der Non-Hodgkin Lymphome. Diese sind durch klonale Proliferation von B-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien gekennzeichnet [2]. Die normale B-Zellentwicklung beginnt dabei mit der Reifung sog. Vorläufer-B-Zellen (Lymphoblasten) zu naiven B-Zellen (Lymphozyten), die in der Blutbahn zirkulieren und sich in lymphatischen Geweben, wie beispielsweise den Lymphknoten, ansiedeln können [3; 4]. Dort durchlaufen sie nach Antigenkontakt (Aktivierung) eine Reihe blastärer Transformationstadien, proliferieren und reifen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und B-Gedächtniszellen [5]. Die aktivierte B-Zelle kann hierbei prinzipiell zwei Wege der Zelldifferenzierung durchlaufen. Entweder sie verbleibt in der Parakortex des Lymphknotens und reift dort im Rahmen einer primären Immunantwort zur Plasmazelle, oder aber sie wandert ins Zentrum eines primären Lymphfollikels. Gemeinsam mit dort ortsständigen dendritischen Zellen und Makrophagen bildet sie das sog. Keimzentrum (sekundärer Lymphfollikel), in welchem somatische Hypermutation und Rekombination stattfinden [6; 7]. Die hochproliferativen Zellen eines solchen Keimzentrums werden als Zentroblasten bezeichnet, welche im Rahmen der sekundären Immunantwort als Zentrozyten ebenfalls weiter zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen reifen.

1.3 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome - Definition

DLBCL zerstören als reife B-Zellneoplasien die Lymphknotenarchitektur bzw. das extranodale Gewebe in einem diffusen Wachstumsmuster [2]. Bis zu 40 % der DLBCL manifestieren sich primär außerhalb des Lymphknotens, meist im Bereich des Gastrointestinaltraktes [8]. Einige Entitäten, wie beispielsweise das primär mediastinale großzellige B-Zell Lymphom (PMBCL), sind über ihre bevorzugte initiale, extranodale Lokalisation, in diesem Fall das Mediastinum, definiert [9; 10]. Somit spielen in der Definition der DLBCL sowohl histologisch- als auch klinisch-morphologische Gesichtspunkte eine wesentliche Rolle.

DLBCL sind durch eine diffuse Proliferation großer blastärer, neoplastischer, lymphoider Zellen der B-Zellreihe gekennzeichnet. Als vermutete Ausgangszellen klonaler Dysregulation werden nach derzeitigem Kenntnisstand periphere B-Zellen mit Ursprung im Keimzentrum oder einer dem Keimzentrum nachgeschalteten Differenzierungsstufe angesehen [2]. So setzen sich die Tumoren histologisch in wechselndem Verhältnis hauptsächlich aus Zentroblasten und Immunoblasten sowie einigen weiteren Zellen unterschiedlicher Häufigkeit (u.a. anaplastische Zellen, T-Zellen, Histiozyten, Zellen mit plasmazytoider Differenzierung) zusammen. Bei den neoplastischen Zellen handelt es sich meist um sehr große Zellen, deren Kerngröße oftmals die Größe eines Makrophagen oder die zweier Lymphozyten überschreitet. Es findet sich in Abhängigkeit vom vorherrschenden Zelltyp ein wechselnder Anteil amphiphilen oder basophilen Zytoplasmas [2]. Aufgrund dieser morphologischen Variabilität ist daher der Einsatz immunhistochemischer und molekulargenetischer Methoden zur besseren Differenzierung oftmals unabdingbar. Je nach vorherrschendem Zelltyp werden verschiedene histologisch-morphologische Varianten unterschieden, auf die jedoch an anderer Stelle näher eingegangen werden soll. Die transformierten lymphoiden Zellen unterliegen dabei einer meist derart ausgeprägten zytologischen Varianz, dass die diagnostische Reproduzierbarkeit erheblich erschwert ist [2; 8].

PMBCL sind als Subtyp der DLBCL ebenfalls durch eine diffuse Proliferation neoplastischer B-Zellen, welche sich jedoch vermutlich nicht von peripheren B-Zellen, sondern von B-Zellen des Thymus ableiten, gekennzeichnet [11; 12]. Die rein

histologische Abgrenzung gestaltet sich auch in dieser Gruppe häufig schwierig. Charakteristisch für diese Tumorentität ist eine oftmals ausgeprägte fibrotische Umgebungsreaktion [2]. Es besteht daher in vielen Fällen zytologisch Ähnlichkeit mit Lymphomen anderer DLBCL-Subtypen bzw. deren morphologischen Varianten. Die Identifikation thymischer Überreste im Tumorgewebe kann hierbei durch immunhistochemische Untersuchungen erleichtert werden.

In einigen Fällen können im Tumorgewebe der PMBCL auch Riesenzellen, ähnlich den Sternberg-Riesenzellen des Hodgkin-Lymphoms, gefunden werden, weshalb auch im Hinblick auf die meist ausgeprägte Sklerosierung eine enge Verwandtschaft dieses B-Zell Lymphoms zum nodulär sklerosierenden, klassischen Hodgkin-Lymphom diskutiert wird [13; 14; 15]. Auch werden in der Literatur Fälle beschrieben, welche histologisch sowohl Anteile eines PMBCL als auch solche eines klassischen Hodgkin-Lymphoms (sog. „Grauzonen-Lymphome“) enthalten [16; 17].

Die hier beschriebene morphologische Varianz mit daraus resultierender hoher Inter- und Intra-Observer-Diskrepanz in der Diagnostik stellte daher bereits zu Beginn der Entwicklung der Klassifikationsschemata maligner Non-Hodgkin Lymphome ein großes Problem für den Untersucher dar und besteht bis heute. Die morphologische Vielfalt der DLBCL einerseits, die ausgeprägte Varianz im Wachstumsverhalten andererseits sowie das Bestreben, die histologische Variabilität mit dem heterogenen klinischen Verhalten dieser Tumoren zu korrelieren, führte somit zu vielfältigen Klassifikationsversuchen, von denen die wichtigsten im Folgenden besprochen werden.

1.4 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome im Wandel der Lymphomklassifikationen

Auch heutzutage erfolgt die Klassifikation maligner Lymphome vorwiegend nach histologisch-morphologischen Gesichtspunkten. Durch die beschriebene Variabilität ist es daher nicht verwunderlich, dass insbesondere die Einordnung der DLBCL innerhalb dieser Lymphomklassifikationen einem ständigen Wandel unterlag.

Meilensteine auf dem Weg zu einer einheitlichen und reproduzierbaren Klassifikation der DLBCL waren die von Lennert im Jahr 1974 eingeführte und 1988 aktualisierte, vorwiegend in den europäischen Ländern verwendete Kiel-Klassifikation, die hauptsächlich auf zytologischen Kriterien beruhte [18; 19; 20]. Im Kern wurde zwischen niedrig- und hochmalignen Lymphomen unterschieden, die entweder im Falle niedriger Malignität weitgehend aus „Zyten“, im Falle hoher Malignität aus „Blasten“ bestanden. Die heutige Bezeichnung DLBCL fand sich in dieser Klassifikation noch nicht. Tumoren dieser Kategorie wurden von Lennert unter dem weiten Begriff „hochmaligne Lymphome vom B-Zelltyp“ eingeordnet. Hierbei unterschied er u.a. das „zentroblastische Lymphom“, das „immunoblastische Lymphom vom B-Zelltyp“, das „großzellig-anaplastische Lymphom vom B-Zelltyp (Ki-1+)“ sowie einige weitere Subtypen und morphologische Varianten. Unter dem Begriff „seltene und mehrdeutige Typen von B-Zell Lymphomen“ fand sich in der Kiel-Klassifikation auch erstmals der Terminus „großzelliges, sklerosierendes B-Zell Lymphom des Mediastinum“ (heute: PMBCL). Allen diesen von ihm definierten Tumorentitäten war dabei gemein, dass sie sich aus verschiedenen Zelltypen (in der Regel Zentroblasten und Immunoblasten bzw. deren Vorläuferzellen) zusammensetzen. Im Falle des „großzelligen, sklerosierenden B-Zell Lymphoms des Mediastinum“ wurde außerdem der Primärlokalisierung des Tumors sowie der Umgebungsreaktion Rechnung getragen [19; 20].

In den USA und anderen Ländern stand hingegen die weitgehend auf klinischem Verlauf, Prognose und therapeutischer Beeinflussbarkeit beruhende „Working Formulation of Non-Hodgkin’s Lymphomas for Clinical Usage“ im Vordergrund, welche auf Ergebnissen ehemaliger Behandlungsprotokolle aus den 70er Jahren begründet war [21]. In dieser Klassifikation unterschied man in Abhängigkeit vom zu erwartenden klinischen Verlauf „maligne Lymphome niedrigen, mittleren und hohen

Malignitätsgrades". Nach heutigem Verständnis lassen sich wohl am zutreffendsten die Begriffe einiger „maligner Lymphome von mittlerem Malignitätsgrad“, mit ihren Varianten „gemischt klein- und großzellig diffus“, „großzellig diffus mit gespaltenen („cleaved“) Zellkernen“ und „großzellig diffus mit nicht gespaltenen („non-cleaved“) Zellkernen“, sowie ein „malignes Lymphom von hohem Malignitätsgrad“, mit der Variante „großzellig, immunoblastisch mit plasmazytoidem oder klarzelligem Anteil“, der Gruppe der DLBCL zuordnen. Für die in der Kiel-Klassifikation definierten Entitäten „großzellig-anaplastisches Lymphom“ und „großzelliges, sklerosierendes B-Zell Lymphom des Mediastinums“ existierten jedoch keine äquivalenten bzw. vergleichbaren Begriffe [21]. Bereits zu diesem Zeitpunkt zeigte sich daher deutlich, dass die Verwendung unterschiedlicher, rein morphologisch begründeter Klassifikationsschemata in verschiedenen Ländern erhebliche Schwierigkeiten in der diagnostischen Reproduzierbarkeit mit sich bringt.

Die International Lymphoma Study Group (ILSG), ein Zusammenschluss vorwiegend amerikanischer und europäischer Hämatopathologen, veröffentlichte aus diesem Grund im Jahr 1994 die sog. REAL-Klassifikation, die neben einigen neuen Tumorentitäten auch erstmals immunhistochemische und genetische Kriterien mit berücksichtigte [8]. Grundsätzlich wurde hierbei versucht, den allgemein akzeptierten Grundsatz der Definition von Tumoren nach ihrer Differenzierung (z.B. B-Zellen vs. T-Zellen) und ihrem Entstehungsort zu berücksichtigen und damit jedem Tumor eine normale Differenzierungsform lymphatischer Zellen (sog. normale Ausgangszelle) gegenüberzustellen. So fanden sich in dieser Klassifikation erstmals die Begriffe „diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL)“ und „primäres mediastinales (thymisches) großzelliges B-Zell Lymphom (PMBCL)“ als Sammelbegriffe für die heterogene Gruppe großzelliger Lymphome, welche vorwiegend aus Zentro- und Immunoblasten bestehen. Postulierte normale Ausgangszellen waren im Falle der DLBCL proliferierende periphere B-Zellen sowie im Falle der PMBCL thymische (medulläre) B-Zellen. Innerhalb der Gruppe der DLBCL wurden dabei wiederum mehrere histologisch-morphologische Varianten, analog der Kiel-Klassifikation (z.B. zentroblastisch monomorph), unterschieden [8]. Die REAL-Klassifikation stellte somit zwar einen konzeptionellen Fortschritt in der Klassifikation maligner Non-Hodgkin

Lymphome dar, wurde jedoch in vielerlei Hinsicht nur als eine Weiterentwicklung der bestehenden Kiel-Klassifikation aufgefasst.

Erst im Jahr 2001 wurde die aktualisierte und bis heute allgemeingültige Klassifikation der Lymphome und lymphoproliferativen Erkrankungen durch die WHO veröffentlicht, die neben zytologisch-morphologischen Kriterien auch klinisch relevante Daten sowie neueste Erkenntnisse der Immunphänotypisierung, der Molekularbiologie und der Zytogenetik berücksichtigt [2]. Auch findet die Zuschreibung gewisser Ursprungszellen („cells of origin“) zu den aus ihnen entstehenden Lymphomentitäten in dieser Klassifikation besondere Berücksichtigung. So erfolgt beispielsweise innerhalb der B- und T-Zellneoplasien die weitere Differenzierung in Neoplasien aus sog. Vorläuferzellen („precursor cells“) und solchen aus reifen Zellen („mature cells“). Nach derzeitigem Kenntnisstand gehören sowohl die DLBCL als auch die PMBCL neben einigen weiteren Lymphomentitäten, wie beispielsweise dem folliculären Lymphom, in diese letztgenannte Gruppe. Postulierte Ursprungszellen sind, ähnlich der REAL-Klassifikation, im Falle der DLBCL periphere B-Zellen (mit Ursprung aus dem Keimzentrum oder einer dem Keimzentrum nachgeschalteten Differenzierungsstufe) sowie im Falle der PMBCL thymische B-Zellen. Innerhalb der DLBCL werden insgesamt sechs, teils nur immunhistochemisch differenzierbare, morphologische Varianten (zentroblastisch (monomorph, polymorph, multilobuliert), immunoblastisch, T-Zell-reich, anaplastisch, plasmablastisch, B-immunoblastisch mit Expression der ALK-1) sowie einige Grenzfälle (z.B. Burkitt-like) unterschieden. Die PMBCL werden als eine von mehreren klinisch definierten Varianten den DLBCL zugerechnet [2].

Die zwei wesentlichen Probleme in der Charakterisierung maligner Lymphome sind jedoch auch nach dieser letzten Klassifikation nicht eindeutig gelöst. So gelten zum einen noch immer viele DLBCL als „histologisch nicht klassifizierbar“, zum anderen besteht weiterhin das Problem der diagnostischen Reproduzierbarkeit. Denn trotz Einsatz immunhistochemischer und molekulargenetischer Methoden stützt sich auch heutzutage ein Großteil der Diagnostik auf die subjektive histologisch-morphologische Beurteilung des Verhältnisses von insbesondere Zentroblasten zu Immunoblasten innerhalb des Tumors. Es steht somit außer Frage, dass der Begriff DLBCL nur als Sammelbegriff für eine Fülle unterschiedlicher Tumorentitäten stehen kann.

1.5 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome – WHO-Klassifikation

Basierend auf der aktualisierten WHO-Klassifikation werden derzeit sechs histomorphologische Varianten der DLBCL sowie einige Grenzfälle unterschieden [22].

Das DLBCL vom *zentroblastischen Typ* als häufigste Form der DLBCL besteht in seinem Hauptanteil aus Zentroblasten. Je nach prozentuaem Verhältnis der Zentroblasten zu anderen vorhandenen Zellen (insbesondere Immunoblasten) im Tumorgewebe werden verschiedene Formen unterschieden. Als zentroblastisch monomorph werden Tumoren mit einem Anteil von über 90 % Zentroblasten bezeichnet. Steigt der Anteil an Immunoblasten über 10 %, handelt es sich um einen zentroblastisch polymorphen Subtyp. Herrschen hingegen Zellen mit deutlich lobulierter (läppchenartiger) Kernstruktur vor, spricht man vom sog. zentroblastisch multilobulierten Typ.

Das DLBCL vom *immunoblastischen Typ* besteht zu über 90 % aus Immunoblasten. Auch Immunoblasten mit plasmazytoider Differenzierung oder Lymphozyten können vorkommen. Der Anteil an Zentroblasten muss sich per definitionem jedoch auf weniger als 10 % belaufen.

Das *T-Zell- bzw. Histiozyten-reiche* DLBCL zeichnet sich durch seinen überwiegenden Anteil an nicht neoplastischen T-Zellen bzw. Histiozyten aus (60-90 %). Eingestreut finden sich großzellige B-Lymphozyten unterschiedlichster Morphologie, wie z.B. Zentroblasten, Immunoblasten oder anaplastische Zellen.

Das DLBCL vom *anaplastischen Typ* ist charakterisiert durch sehr große, entdifferenzierte Zellen mit pleomorphen, teils bizarren Kernformen. Riesenzellen können vorkommen. Das Wachstumsmuster gleicht aufgrund der kohäsiven Zellverbände oftmals dem eines Karzinoms.

Einige seltene Varianten, wie das DLBCL vom *B-immunoblastischen Typ mit Expression der ALK-1* und das *plasmablastische* DLBCL, sind morphologisch nur durch immunhistochemische Zusatzuntersuchungen zu unterscheiden [22].

DLBCL beinhalten somit verschiedene morphologische Varianten (immunoblastisch, zentroblastisch, etc.), deren diagnostische Reproduzierbarkeit jedoch noch immer als

gering einzuschätzen ist [8]. Insbesondere der klinische Nutzen einer derartigen histologischen Subtypisierung ist umstritten, auch wenn beispielsweise einige Immunoblasten-reiche Tumoren in verschiedenen Studien eine schlechtere Prognose zu haben scheinen als andere [23; 24; 25; 26]. Die beschriebenen Schwierigkeiten deckten daher schon früh die Notwendigkeit auf, neben der histologisch-morphologischen auch der klinischen Heterogenität besondere Beachtung zu schenken.

1.6 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome verhalten sich klinisch heterogen

Die Gruppe der DLBCL ist die weltweit häufigste Lymphomentität bei Erwachsenen. Epidemiologisch lassen sich ihr ca. 30-40 % der malignen Non-Hodgkin Lymphome in den westlichen Industrienationen zurechnen. In Entwicklungsländern ist ihr Anteil sogar noch höher einzuschätzen [2]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ungefähr 60-70 Jahren. Es werden jedoch auch Verläufe bei weit jüngeren Patienten beobachtet [27; 28]. So liegt der Altersdurchschnitt in der Gruppe der PMBCL bei ca. 30-40 Jahren [10; 29]. Männer scheinen bei insgesamt ansteigender Inzidenz etwas häufiger betroffen zu sein als Frauen [27]. Auch hier bilden die PMBCL, die vorwiegend bei Frauen auftreten, eine Ausnahme [10]. Die verschiedenen Formen der DLBCL sind sowohl in ihrer klinischen Präsentation als auch in ihrem Verlauf durch eine außerordentliche Heterogenität gekennzeichnet.

DLBCL können sowohl primär de novo als auch sekundär aus einer bereits vorhandenen lymphatischen Neoplasie, wie z.B. dem folliculären Lymphom (FL) [30] oder der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp [31], entstehen. Auch wurden bei Patienten mit klassischen Hodgkin-Lymphomen Zweitmalignome vom Typ der PMBCL in der Vergangenheit beschrieben [32; 33]. Die Tumoren können sich dabei sowohl primär innerhalb des Lymphknotens (nodal) als auch an jeder anderen Stelle des Organismus (extranodal) manifestieren. Bei den PMBCL zeigt sich das primäre Tumorwachstum anfangs ausschließlich auf das Mediastinum begrenzt. Jedoch können die Zellen von dort auch andere thorakale Strukturen infiltrieren bzw. in andere

extrathorakale Gewebe, wie z.B. die Nieren oder das ZNS [34], disseminieren. Allgemein zeigt sich bei Patienten mit Tumoren vom Typ der DLBCL zu Beginn der Erkrankung ein rasches lokalisiertes Wachstum der Tumorzellmasse, die sich meist erst im fortgeschrittenen Verlauf symptomatisch manifestiert. Zum Zeitpunkt der Diagnose besteht daher bei vielen Patienten bereits ein disseminiertes Geschehen [2].

Im Hinblick auf die therapeutische Beeinflussbarkeit lassen sich ebenfalls deutliche Unterschiede innerhalb der Gruppe der DLBCL feststellen. So sprechen zwar die meisten Patienten auf eine initiale Polychemotherapie an, gelangen jedoch in der Mehrzahl der Fälle nicht in eine dauerhafte Remission oder erliegen der Erkrankung im weiteren Verlauf [35]. Dabei zeigen sich für Tumoren vom Typ der DLBCL große Unterschiede bezüglich der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit, welche im Mittel 46 % beträgt. 30-40 % der Tumoren können mit einer Anthracyclin-basierten Chemotherapie geheilt werden [36]. Für Tumoren der Gruppe der PMBCL liegt die dauerhafte Remissionsrate nach Chemotherapie mit 64 % sogar noch deutlich höher [15]. Die Wahl der Therapie basiert neben Alter und Konstitution des Patienten im Wesentlichen auf der Stadieneinteilung der Erkrankung nach Ann Arbor (Stadium I und II: lokalisiertes Wachstum; Stadium III und IV: fortgeschrittenes, disseminiertes Wachstum), welche ursprünglich für das Staging des Morbus Hodgkin entwickelt wurde [37; 38]. Die prognostische Aussagekraft dieser Einteilung ist jedoch bei Non-Hodgkin Lymphomen, wie den DLBCL, im Vergleich zum Morbus Hodgkin als gering einzuschätzen [39]. Des Weiteren stellt auch der Leistungszustand des Patienten einen Anhaltspunkt für das therapeutische Vorgehen dar. Dieser kann grob prozentual mittels des sog. Karnofsky-Index (100-10 %: symptomlos bis moribund), oder aber über die ECOG-Skala (0-4: normal bis ständig bettlägerig) beurteilt und für die Wahl der Therapie sowie die Abschätzung der Prognose herangezogen werden [40; 41]. Therapeutisch gilt dabei noch immer die Behandlung nach dem sog. CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison), derzeit in Kombination mit einem monoklonalen Antikörper gegen das B-Zell-assoziierte Antigen CD20 (z.B. Rituximab), als der Goldstandard [36; 42].

Die beschriebenen unterschiedlichen klinischen Verläufe der DLBCL sowie ihr variables Ansprechen auf eine bestimmte Therapie machen deutlich, dass eine

prognostische Abschätzung des Krankheitsverlaufs im individuellen Fall überaus schwierig ist. Die Einschätzung des individuellen Risikos gemäß dem internationalen prognostischen Index (IPI-Score), basierend auf verschiedenen klinischen Parametern (Alter, Lactatdehydrogenase-Spiegel, (Mobilitäts-)Status des Patienten, Tumorstaging, extranodaler Lymphombefall), liefert hierbei für die Gruppe der DLBCL lediglich einen begrenzten Anhalt. Denn trotz Etablierung des Index im klinischen Alltag zeigen Patienten der vermeintlich selben Erkrankung bei gleichem IPI-Score oftmals völlig unterschiedliche Krankheitsverläufe [43; 44].

Dies führte bereits in der Vergangenheit zu der Annahme, dass die klinische Variabilität im Krankheitsverlauf der DLBCL evtl. auf bislang unbekanntem, molekularem Unterschieden beruht. Neben der histologisch-morphologischen Differenzierung, die auch heute noch immer eine wesentliche Säule in der Diagnostik der DLBCL darstellt, sind daher v.a. die immunophänotypische und die molekulargenetische Charakterisierung eventueller Subtypen Gegenstand derzeitiger Studien.

1.7 Immunphänotypisierung der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome und Abgrenzung der Subtypen

Immunphänotypisch zeigen sich die DLBCL als Gruppe mit Expression verschiedenster Oberflächenmarker („cluster of differentiation“; CD). So werden von diesen gewöhnlich als Antigene der B-Zell-Linie die Oberflächenmarker CD19, CD20 und CD79a exprimiert [2; 45]. Das Transmembranprotein CD20 wird hierbei vom Stadium der Vorläufer-B-Zelle bis hin zur prä-plasmazellulären Differenzierung [46], das Immuglobulin-assoziierte Antigen CD79a sogar bis zum Plasmazell-Stadium exprimiert [47]. So kann in terminal differenzierten DLBCL mit immunoblastischer oder plasmablastischer Morphologie CD20 bereits negativ sein, CD79a hingegen noch nachgewiesen werden. Von Tumoren der Gruppe der PMBCL werden CD19, CD20 und CD79a ebenfalls exprimiert [17]. Zusätzlich lässt sich bei diesen jedoch als weiterer wichtiger Marker CD23 bei einer Vielzahl der Fälle nachweisen [48].

In bis zu 10 % der Fälle wird CD5 bei DLBCL nachgewiesen [3; 49]. Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass CD5 hierbei eher bei primären (de novo) als bei sekundären (transformierten) Tumoren gefunden wird. CD5-positive Primärtumoren scheinen vornehmlich bei älteren Patienten, insbesondere Frauen, aufzutreten und mit einem höheren Risiko gemäß IPI-Score sowie häufigerem extranodalen Befall zu korrelieren. Die Tumormorphologie entspricht in diesen Fällen häufig einem zentroblastischen DLBCL. Außerdem exprimieren sie in der Regel nicht CD10, ein Keimzentrum-assoziiertes Antigen, sind jedoch für das Protein Bcl-6, ebenfalls ein Marker germinaler B-Zellen, positiv [50; 51; 52; 53; 54]. Die Überlebensraten CD5-positiver Fälle zeigen sich insgesamt schlechter als die CD5-negativer Tumoren [50; 53].

1.8 Genexpressionsanalysen von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen

Die cDNA-microarray-Technologie erlaubt über die Analyse exprimierter Gene maligner Tumoren (sog. Genexpressionsprofil) die Charakterisierung maligner Zellen [55; 56; 57]. Basierend auf der Annahme, dass sich die Gruppe der DLBCL aufgrund ihrer klinischen und immunophänotypischen Heterogenität in verschiedene Subtypen unterscheiden lässt, entwickelten Alizadeh et al. einen speziell für diese malignen Lymphome konstruierten cDNA-microarray, welcher Aufschluss über eventuelle gemeinsame Genexpressionsprofile dieser Subgruppen sowie die ihnen zugrunde liegenden Pathomechanismen bringen sollte [58].

Als Genexpressionssignatur galt dabei eine Gruppe von Genen, welche charakteristischerweise entweder von einem bestimmten Zelltyp (z.B. einer B-Zelle) oder aber während einer biologischen zellulären Reaktion (z.B. der zellulären Proliferation) vermehrt exprimiert wird. Mithilfe eines sog. „Lymphochips“ wurden Genexpressionssignaturen bestimmter Gene, welche in lymphoiden Zellen exprimiert werden, und solche, welche in immunologischen oder karzinogenen Prozessen eine Rolle spielen, untersucht [59]. Für die Gruppe der DLBCL konnte gezeigt werden, dass sich die von den Tumoren exprimierten Gene, verglichen mit Proben normaler, nicht tumoröser Zelllinien unterschiedlicher Differenzierungsstadien (z.B. germinale B-Zelle, aktivierte B-Zelle), gewissen Genexpressionssignaturen normaler Zellen zuordnen lassen. Diese wurden entweder nach dem Zelltyp, in welchem die Gene vorrangig exprimiert werden (z.B. T-Zellsignatur), oder aber nach dem biologischen Prozess, in welchem sich die exprimierten Gene gehäuft finden (z.B. Proliferationssignatur), benannt [59]. Für die DLBCL fanden sich vorwiegend Gene der Proliferations- (z.B. Ki-67), der Lymphknoten- (z.B. FGF-7, einem Wachstumsfaktor für Fibroblasten) und der Keimzentrumssignatur (z.B. CD10, BCL-6). Gene der T-Zellsignatur (z.B. CD3) fanden sich hingegen nur bei einigen der untersuchten Tumoren. Interessanterweise ließen sich die Signaturen innerhalb des Gesamtkollektivs der untersuchten DLBCL in unterschiedlicher Häufigkeit nachweisen und hierdurch die Tumoren in zwei große Subgruppen gemeinsamer Genexpressionsprofile aufteilen. Solche, welche vorrangig Gene von B-Zellen der Keimzentrumsreaktion (GCB-DLBCL), und solche, die Gene

(in vitro) aktivierter B-Zellen (ABC-DLBCL) exprimieren [59]. Bei Korrelation des klinischen Verlaufs mit den mittels Genexpressionsanalyse definierten DLBCL-Subgruppen zeigte sich, dass nach 5 Jahren 76 % der Patienten mit GCB-DLBCL, hingegen nur noch 16 % der mit ABC-DLBCL am Leben waren (s. Abbildung 1). Dieser bemerkenswerte Unterschied im klinischen Verlauf legte daher die Vermutung nahe, dass es sich bei den beiden entdeckten Subtypen der DLBCL um unterschiedliche Erkrankungen handelt [59].

Abbildung 1: Genexpressionsanalysen und klinischer Verlauf von Tumoren der Gruppen GCB- und ABC-DLBCL (aus: ALIZADEH et al., 2000)

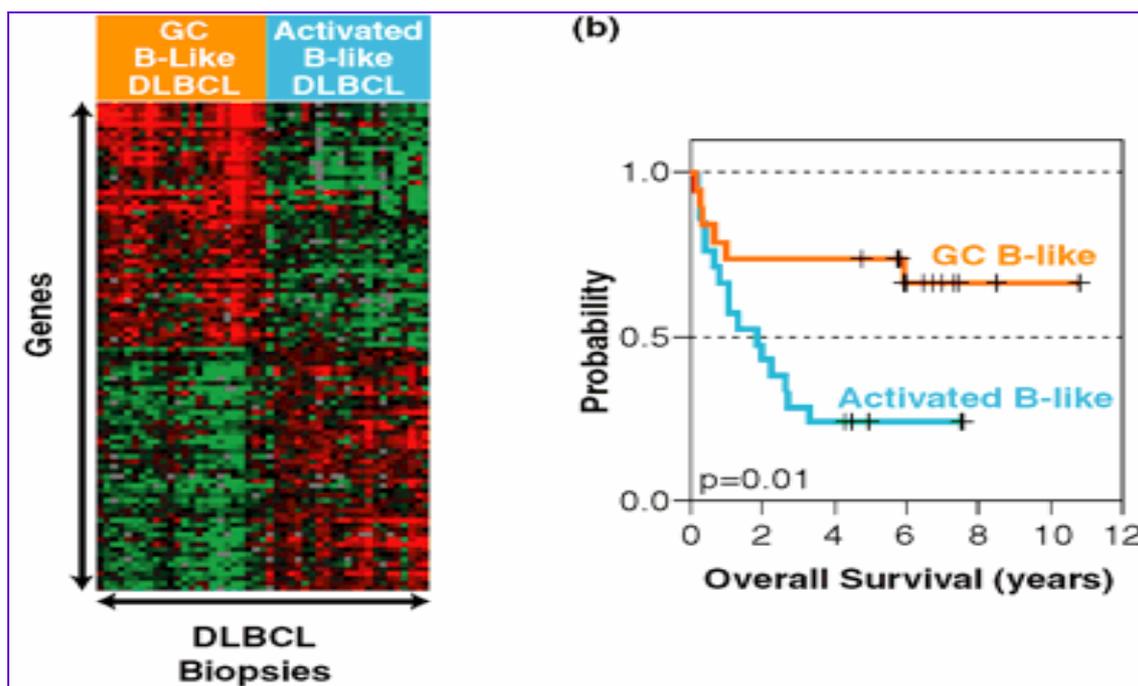


Abbildung 1:

Linke Bildhälfte: Genexpressionsmuster der GCB- und ABC-DLBCL; Spalten: Tumorfälle; Reihen: untersuchte Gene; rote Bereiche: vermehrte Expression von Genen; grüne Bereiche: verminderte Expression von Genen; Rechte Bildhälfte: Überlebenskurven der Patienten mit GCB- und ABC-DLBCL im Vergleich; x-Achse: Jahre nach Diagnose; y-Achse: Überlebenswahrscheinlichkeit

In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2000, basierend auf Untersuchungen an 14 Tumoren der beiden Subgruppen GCB- und ABC-DLBCL, zeigten Lossos et al., dass sich neben Genen der bereits erwähnten Signaturen auch Mutationen in den Genen der Immunglobulin-Schwerketten, deren Rekombination typischerweise in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe stattfindet und sich bei vielen der lymphatischen Tumoren nachweisen lässt [60; 61], einem bestimmten DLBCL-Subtyp zuordnen lassen [61]. So fanden sich in dieser Arbeit somatische Mutationen ausschließlich bei Tumoren der Gruppe der GCB-DLBCL, was die Vorstellung, es handele sich bei beiden Subtypen um Tumoren unterschiedlicher Differenzierungsstadien, weiter untermauerte [61].

Rosenwald griff in seiner Studie aus dem Jahr 2002 ebenfalls die von Alizadeh beschriebenen Ergebnisse und damit die Annahme, es gebe innerhalb der Gruppe der DLBCL unterschiedliche Subtypen, auf [62]. Ziel der Arbeit war es, mithilfe der Genexpressionsanalyse prognostische Markergene zu finden, welche sich als unabhängig vom, im klinischen Alltag gebräuchlichen, Internationalen Prognostischen Index (IPI) erweisen. Dieser erlaubt es nämlich bisweilen nicht, Patienten mit DLBCL einem eindeutigen Therapieregime zuzuordnen [63]. Hierbei wurden zunächst die von Alizadeh beschriebenen Subgruppen der DLBCL mittels Genexpressionsanalyse anhand 100 festgelegter Markergene erneut analysiert und die Tumoren drei großen Gruppen unterschiedlicher Expressionsmuster zugeordnet. In der ersten fanden sich solche mit hoher Expression von Genen, welche charakteristisch für B-Zellen des Keimzentrums waren (GCB-DLBCL), in der zweiten solche, welche vorwiegend Gene von aktivierten B-Zellen exprimierten (ABC-DLBCL). Der dritten Gruppe (Type 3-DLBCL) wurden Tumoren zugeordnet, die weder eindeutig der einen noch der anderen Gruppe zugeordnet werden konnten bzw. deren Expressionsprofil nicht stark genug war [62].

Die Subgruppen unterschieden sich signifikant in zwei onkogenetischen Merkmalen: der von folliculären Lymphomen bekannten Translokation t(14;18), welche zu einer Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 führt, sowie einer Amplifikation des c-REL-Lokus auf Chromosom 2. Diese beiden Merkmale fanden sich für die DLBCL ausschließlich in der Gruppe der GCB-DLBCL, was neben der Beobachtung, dass die Subtypen der DLBCL unterschiedliche klinische Verläufe aufwiesen, die

Ansicht festigte, es handele sich bei den beschriebenen Subgruppen um eigenständige Krankheitsentitäten, welche auf unterschiedlichen onkogenetischen Mechanismen beruhen [59; 64].

Klinisch war ein signifikant höherer Anteil der Patienten mit ABC-DLBCL älter als 60 Jahre und hatte einen ECOG-Status > 1 , korrelierte jedoch nicht mit den Risikogruppen des IPI. Analog zu Alizadeh war der klinische Verlauf der Patienten mit ABC-DLBCL sowie den von Rosenwald zusätzlich definierten Type 3-DLBCL signifikant schlechter als der von Patienten mit GCB-DLBCL. Da trotz des beschriebenen Unterschiedes im klinischen Verlauf einige Patienten mit ABC-DLBCL dennoch auf eine multimodale Chemotherapie ansprachen, auf der anderen Seite solche mit GCB-DLBCL ein Restrisiko von 36 % hatten, innerhalb der folgenden 3 Jahre nach Behandlung zu versterben, versuchte die Arbeitsgruppe individuelle Markergene zu finden, deren Expression besser mit dem klinischen Verlauf korreliert bzw. deren Nachweis eine zuverlässige prognostische Abschätzung erlaubt [62].

Hierzu wurden die Tumorgene, ähnlich der Studie von Alizadeh, hierarchisch geclustert, um sie erneut den bereits beschriebenen Genexpressionssignaturen zuzuordnen [59]. Es fanden sich 16 Gene (u.a. BCL-6), die signifikant mit dem klinischen Verlauf korrelierten und sich vier Genexpressionssignaturen (Proliferations-, Lymphknoten-, Keimzentrums-, MHC-Klasse II-Signatur) zuordnen ließen, sowie ein von diesen Signaturen unabhängiges Gen BMP6 [62]. Anhand eines Score- bzw. Ranking-Systems, basierend auf den Expressionsdaten der beschriebenen Gene, ließen sich die Patienten vier Quartilen zuordnen, die in ihrer Prognose unterschiedliche 5-Jahresüberlebensraten aufwiesen. Ein hoher Summenwert deutete hierbei auf einen prognostisch ungünstigen Verlauf hin [62]. Der Score zeigte diesbezüglich die höchsten Werte für die Gruppe der ABC-DLBCL, die niedrigsten für diejenige der GCB-DLBCL, was mit dem beobachteten klinischen Verlauf in Einklang stand. Für die Gruppe der Type 3-DLBCL lagen die Werte im mittleren Bereich. Somit ließ sich das Patientengut jeder einzelnen DLBCL-Subgruppe einem gewissen Risikopotential zuordnen. Der genexpressionsbasierte Score erwies sich dabei als unabhängig vom bislang gebräuchlichen IPI [62].

Es zeigte sich, dass Gene der Proliferationssignatur die sicherste Vorhersage eines zu erwartenden schlechten klinischen Verlaufs erlauben, was sich mit den Ergebnissen früherer Studien deckte [65; 66]. Gene der MHC-Klasse II- und der Lymphknotensignatur, welche normalerweise mit der physiologischen Immunantwort assoziiert sind, wiesen hingegen auf einen prognostisch günstigen Verlauf hin. Dabei scheinen die Gene der MHC-Klasse II-Signatur vermutlich eine Rolle bei der Antigenpräsentation [67], diejenigen der Lymphknotensignatur eine bei extrazellulären Abwehrreaktionen, beispielsweise als Mediatoren fibrotischer Reaktionen [68], zu spielen.

Neben der Feststellung, dass der klinische Verlauf zwischen den drei Subgruppen der DLBCL differierte, wurde weiterhin untersucht, ob die Gene des genexpressionsbasierten prognostischen Scores in unterschiedlichem Ausmaß innerhalb der Subtypen exprimiert werden. Hierbei zeigte sich, dass innerhalb der GCB-DLBCL hauptsächlich Gene der Keimzentrumssignatur, in der der ABC-DLBCL solche der Proliferationssignatur sowie das Gen BMP6 exprimiert werden. Innerhalb der ABC-DLBCL ließen sich hingegen kaum Expressionen der Lymphknotensignatur detektieren. Gene der MHC-Klasse II-Signatur fanden sich bei allen drei von Rosenwald definierten Subtypen. Die Keimzentrumssignatur erscheint hierbei besonders erwähnenswert, da GCB-DLBCL, bei denen diese Signatur gehäuft nachweisbar ist, eine deutlich herabgesetzte Aktivität des NF-kappa B-Signalweges aufweisen, welcher der Apoptose von Zellen und somit dem chemotherapeutisch induzierten Zelltod entgegenwirkt [69; 70]. Tumoren dieser Gruppe scheinen daher einer konventionellen Therapie zugänglicher als beispielsweise Tumoren der Gruppe der ABC-DLBCL, bei denen dieser Signalweg konstitutiv aktiviert ist [69]. Für diese erwies sich aktuell, im Gegensatz zu GCB-DLBCL, ein gezielter therapeutischer Eingriff in die NF-kappa B-Kaskade als ausgesprochen toxisch [71].

Im Jahr 2004 konnten sechs Gene identifiziert werden, deren Expression auf den zu erwartenden klinischen Verlauf schließen und damit die Prognose abschätzen lassen [72]. Die besten Korrelationen fanden sich für die Gene LMO2 und BCL-6 (Marker der Keimzentrumssignatur), FN1 (Marker der Lymphknotensignatur) sowie CCND2, SCYA3 und BCL-2 (Marker der Signatur aktivierter B-Zellen). Die drei erstgenannten

Gene waren hierbei mit einem guten, die anderen hingegen mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert. Dabei deckte sich insbesondere die vermehrte Expression von BCL-6, welche sich bereits mehrfach bei Tumoren des Keimzentrums, wie den GCB-DLBCL, nachweisen ließ [73; 74], mit dem diese Tumoren kennzeichnenden besseren klinischen Verlauf. Der aus den oben genannten Genen abgeleitete Score zur prognostischen Einschätzung erwies sich ebenfalls, wie in der Arbeit von Rosenwald [62], als unabhängig vom IPI [72].

Interessanterweise ergaben Genexpressionsanalysen der primär mediastinalen diffusen großzelligen B-Zell Lymphome (PMBCL), dass sich diese auf molekulargenetischer Ebene von den anderen DLBCL (GCB- und ABC-DLBCL) unterscheiden [15]. So konnten neben den zwei Genen MAL und FIG1, die als Gene der intrazellulären Signaltransduktion bereits in früheren Studien Erwähnung fanden [75; 76], weitere 35 Gene identifiziert werden, die gehäuft von PMBCL exprimiert werden. Diese wurden in einer sog. PMBCL-Signatur, ähnlich den bereits erwähnten Genexpressionssignaturen der DLBCL, zusammengefasst, was es erstmals ermöglichte, neben Tumoren der Subgruppen GCB- und ABC-DLBCL auch solche vom Typ der PMBCL diagnostisch durch ihre charakteristische Expression von Genen als eigene Entität zu unterscheiden [15].

Bei Auswertung der Gene der PMBCL-Signatur fiel auf, dass zwei dieser Gene, CD30 und TARC, bereits in früheren Arbeiten bei anderen lymphatischen Tumoren, den Hodgkin-Lymphomen, nachgewiesen wurden [77; 78]. Nach Vergleich weiterer Gene dieser Signatur mit den Studienergebnissen an Zellen klassischer Hodgkin-Lymphome [79] zeigte sich, dass beide Tumorentitäten eine Vielzahl von Genen in gleicher Weise exprimieren. So ließ sich in beiden Gruppen u.a. eine erhöhte Expression der bereits beschriebenen Gene MAL und FIG1 nachweisen [15]. Interessanterweise fand sich weiterhin eine vermehrte Expression von Genen, welche als Mitglieder der TNF-Familie, analog den Untersuchungen an Tumoren vom Typ der ABC-DLBCL, zur Aktivierung des NF-kappa B-Signalweges und damit zu einer erhöhten Apoptoseresistenz der Zellen beitragen [15]. Als Beispiele hierfür seien die Gene TARC, STAT1 und TRAF1 aufgeführt [80; 81]. Von besonderem Interesse scheinen auch die auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 lokalisierten Gene JAK2, PDL1,

PDL2 und SCMARCA2 zu sein [15]. PDL1 und PDL2 kodieren hierbei für Proteine, welche Einfluss auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort gegenüber entarteten Zellen sowie auf die interzelluläre Zytokin-vermittelte Kommunikation haben [82; 83; 84; 85]. Veränderungen innerhalb dieses immunologischen Netzwerkes könnten daher ein Wachstum der malignen B-Zellen innerhalb des Thymus bzw. der mediastinalen Region mit Ausbleiben einer T-Zellantwort zur Folge haben. Die genaue pathogenetische Rolle von JAK2, einer für die Zytokin-vermittelte Signaltransduktion bedeutsamen Tyrosin-Kinase [86], sowie von SMARCA2, einem Regulatorgen des Chromatins, ist hingegen noch nicht eindeutig geklärt. Andere Gene der PMBCL-Signatur (wie z.B. jene für die bei PMBCL und DLBCL häufig exprimierte Oberflächenmarker CD19 und CD20) ließen sich in der Vergangenheit nicht bei klassischen Hodgkin-Lymphomen detektieren. PMBCL und Hodgkin-Lymphome scheinen daher zwar einige, jedoch nicht alle Gene in gleicher Weise zu exprimieren und gemeinsame onkogenetische Pathomechanismen zu teilen [15].

Einige weitere interessante Ansätze bezüglich der Expression von Genen innerhalb der Gruppe der PMBCL sowie einer möglichen molekulargenetischen Verwandtschaft zu klassischen Hodgkin-Lymphomen finden sich in den Arbeiten von Savage und Palanisamy et al. [14; 87]. In diesen wurde u.a. gezeigt, dass von einem Großteil der PMBCL verstärkt das Keimzentrum-assoziierte Protein Bcl-6 exprimiert wird, was eine zelluläre Verwandtschaft dieser Entität mit Zellen, die das Keimzentrum in ihrer Differenzierung bereits durchlaufen haben, vermuten lässt [87]. Außerdem konnte eine vermehrte Expression von Komponenten der intrazellulären Zytokinkaskade, wie dem Rezeptor für Interleukin 13, einem Protein der Zellproliferation, sowie den bereits erwähnten Genen der TNF-Familie JAK2, STAT1 und TRAF1, nachgewiesen werden [14]. Eine vermehrte Expression von FIG1 fand sich dabei analog den Ergebnissen von Rosenwald et al. [15]. Somit deuten auch die Expressionsdaten dieser Arbeiten auf Gemeinsamkeiten in der Pathogenese der beiden Tumorentitäten hin [14].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beschriebenen Genexpressionsanalysen von Tumoren, insbesondere die Studien von Alizadeh und Rosenwald, einen wesentlichen Beitrag in der molekulargenetischen Charakterisierung und Definition von DLBCL-Subtypen geleistet haben [15; 59; 62]. Die den unterschiedlichen DLBCL-

Subtypen zugrunde liegenden chromosomalen Imbalanzen, speziell der GCB- und ABC-DLBCL, sind jedoch bislang weitgehend unbekannt. Eine genaue Analyse derartiger Imbalanzen ist daher von besonderem Interesse.

1.9 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome - CGH-Arbeiten

Der Nachweis rekurrenter genetischer Aberrationen bei Tumoren der Gruppe der DLBCL war seit Einführung der CGH immer wieder Gegenstand verschiedener Studien. Erste genetische Analysen von DLBCL zeigten hierbei Amplifikationen der chromosomalen Region 2p13-p15 [88], dem Lokus des Proto-onkogens REL [89]. Es sei jedoch angemerkt, dass es sich bei dieser Arbeit lediglich um die Untersuchung einer geringen Fallzahl von DLBCL extranodaler Lokalisation handelte. Hingegen wurde in einer Studie von Monni et al. aus dem Jahr 1996 erstmals ein größeres Kollektiv von 32 Tumoren mittels CGH untersucht [90]. Als rekurrente genetische Veränderungen fanden sich Zugewinne auf den Chromosomen X, 1q, 7, 3, 6p, 11, 12 und 18 sowie Verluste auf den Chromosomen 6q, X, 1p und 8p. Amplifikationen ließen sich in den Regionen 6p23-pter, 10p12-p14, 17p11, 18q21-qter und Xq22-qter nachweisen [90]. Ebenfalls Monni et al. untersuchten im Jahr 1997 weitere 26 Tumoren der Gruppe der DLBCL [91]. Hierbei wurden bei rund einem Drittel der Fälle Amplifikationen auf Chromosom 18q nachgewiesen, dem Lokus von BCL-2. Das Protein Bcl-2 konnte in der Vergangenheit bereits bei bis zu 30 % der DLBCL vermehrt exprimiert nachgewiesen werden [92; 93]. Auch zeigten Tumoren mit einem Zugewinn auf Chromosom 18q eine vermehrte Expression des Proteins Bcl-2 [91].

Ein Jahr später analysierten Rao et al. 20 weitere Tumoren vom Typ der DLBCL. Es fanden sich bei 6 Fällen Amplifikationen der chromosomalen Regionen 1q21-q23, 2p12-p16, 8q24, 9q34, 12q12-q14, 13q32, 16p12, 18q21-q22 und 22q12 [94]. Innerhalb des Tumorkollektivs wurde weiterhin eine vermehrte Expression der Gene BCL-2 (Lokus 18q21), REL (Lokus 2p14-p16) und MYC (Lokus 8q24) nachgewiesen [94].

Stokke et al. veröffentlichten im Jahr 2001 eine Publikation über die CGH-Analyse von 94 Non-Hodgkin Lymphomen, darunter 17 Tumoren der Gruppe der DLBCL. Es fanden sich zahlreiche genetische Aberrationen, wie Zugewinne auf den Chromosomen 3q, 6p, 7p, 8q, 12q, 17q und 18q sowie Verluste auf den Chromosomen 1p, 6q, 8p, 9p, 11q, 13q und 17p [95]. Interessanterweise zeigten sich insbesondere die Zugewinne auf Chromosom 6p innerhalb des Gesamtkollektivs signifikant häufiger. Nach Korrelation der detektierten Aberrationen mit dem klinischen Verlauf erwiesen sich dabei die Tumoren mit einem Zugewinn auf Chromosom 6p als solche mit ungünstiger Prognose [95].

Ebenfalls eine Reihe genetischer Aberrationen konnten Berglund et al. in ihrer Analyse von 54 Tumoren der Gruppe der DLBCL im Jahr 2002 nachweisen. So fanden sich gehäuft Zugewinne der Regionen Xq25-26, 13q22, 12cen-q14, 2q24-25, 7 und 18q12-21 sowie Verluste der Regionen 8p22-pter, 1p34-pter, 6q23-qter, 17p12-pter, 22q und 9p23-pter [96]. Es zeigte sich bei Korrelation dieser Alterationen mit dem klinischen Stadium der Tumorerkrankungen, dass sich Verluste von Chromosom 22q signifikant häufiger bei fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung, Zugewinne auf Chromosom 18q21 hingegen vorwiegend bei Tumorrezidiven nachweisen lassen [96].

Mittels Matrix-CGH, einer microarray-basierten Variante der konventionellen CGH, konnten Wessendorf et al. weitere, bisher nicht veröffentlichte, chromosomale Veränderungen nachweisen. Es handelte sich hierbei um Amplifikationen der chromosomalen Regionen 2p13, 9p13-p21 und 12q24, welche innerhalb eines Kollektivs von 13 DLBCL detektiert wurden [97].

Wie bereits eingangs erwähnt, exprimieren einige Tumoren vom Typ der DLBCL CD10 als Keimzentrum-assoziierten Oberflächenmarker. Zhang et al. untersuchten im Jahr 2004 19 Fälle dieser CD10-positiven Tumoren auf genetische Aberrationen [98]. Die häufigsten Zugewinne fanden sich hierbei auf den Chromosomen 1q, 7, 12, 18 und X. Verluste ließen sich hingegen auf den Chromosomen 1p, 6q, 16 und 17 nachweisen. Amplifikationen wurden in den Regionen 12q14-22 und Xq25-qter detektiert [98]. Der Vergleich dieser chromosomalen Aberrationen mit solchen, die sich in früheren Studien bei Tumoren der Gruppe der DLBCL sowie bei folliculären Lymphomen und transformierten DLBCL fanden, ließen die Autoren vermuten, dass es sich bei den

CD10-positiven DLBCL möglicherweise um eine eigene Entität handelt. Insbesondere die Zugewinne auf Chromosom 1, die Verluste auf den Chromosomen 16 und 17 sowie das Fehlen von Verlusten auf den Chromosomen 3q und 8p wurden dabei diesem vermeintlichen Subtyp zugeordnet [98]. Mit Tumoren eines anderen speziellen immunhistochemischen Phänotyps, den sog. CD5-positiven bzw. CD5-negativen DLBCL, beschäftigten sich Tagawa et al. ebenfalls im Jahr 2004 [99]. Im Gesamtkollektiv der 70 Tumoren fanden sich Zugewinne der chromosomalen Regionen 1q21-q31, 1q32, 3p25-q29, 5p13, 6p21-p25, 7p22-q31, 8q24, 11q23-q24, 12q13-q21, 16p13, 18 und X. Genetische Verluste zeigten sich hingegen in den Regionen 1p36, 3p14, 6q14-q25, 6q27, 9p21 und 17p11-p13 [99]. Bei Vergleich der CD5-positiven und CD5-negativen Tumoren erwiesen sich die Zugewinne von 10p14-p15 und 19q13 sowie die Verluste von 1q43-q44 und 8p23 dabei als charakteristisch für die CD5-exprimierenden DLBCL [99]. In der Arbeit von Katzenberger et al. zeigten sich hingegen Zugewinne auf den Chromosomen 16p und 18q als typisch für CD5-positive Tumoren [54]. Insgesamt war die Expression dieses Oberflächenmarkers im Gegensatz zu CD5-negativen Fällen, wie bereits erwähnt, mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert [53]. Sowohl die charakteristischen genetischen Veränderungen als auch das klinische Verhalten ließen daher die Vermutung zu, dass es sich bei CD5-positiven Tumoren ebenfalls um eine eigene Entität innerhalb der DLBCL handelt.

Karnan et al. griffen in ihrer Studie diesen Gedanken auf und analysierten mittels CGH 70 Tumoren vom Typ CD5-positiver sowie CD5-negativer DLBCL [100]. Im Gesamtkollektiv fanden sich Zugewinne auf den Chromosomen 3q, 9p, 12q, 13q und 18q sowie Verluste auf 1p, 6q, 17p und 19p. Für Tumoren der Gruppe CD5-positiver DLBCL konnten charakteristische Zugewinne der chromosomalen Regionen 11q21-q24 und 16p, für solche vom Typ der CD5-negativen Tumoren Verluste auf Chromosom 16p detektiert werden [100]. Aufgrund der selektiv bei CD5-positiven DLBCL gefundenen genetischen Alterationen wurde daher von den Autoren ebenfalls die Theorie vertreten, es handele sich bei diesen Tumoren um einen eigenen Subtyp [100]. Neben Tumoren der Gruppe der DLBCL sind auch PMBCL in der Vergangenheit Gegenstand vereinzelter CGH-Arbeiten gewesen. Die bisherigen Ergebnisse dieser

Arbeiten bzw. die in ihnen mittels CGH detektierten chromosomalen Aberrationen sollen daher im Folgenden kurz dargestellt werden.

Erste Ergebnisse bezüglich der genetischen Charakterisierung dieser Tumoren finden sich hierbei in den Arbeiten von Joos et al. aus dem Jahr 1996 [101] sowie von Bentz et al. aus dem Jahr 2001 [102], welche teils identische chromosomale Veränderungen nachweisen konnten. So fanden sich v.a. Zugewinne auf Chromosom 9p signifikant häufiger und erwiesen sich damit als charakteristisch für die PMBCL [101; 102]. Weitere chromosomale Veränderungen ließen sich als Zugewinne auf den Chromosomen 2, 12 und X nachweisen. Für die letztgenannten zeigte sich jedoch keine erhöhte Signifikanz gegenüber den bei DLBCL detektierten Aberrationen [101; 102]. Ebenfalls bei beiden Gruppen wurden außerdem Amplifikationen der chromosomalen Regionen 2p13-p15 bzw. 2p13-p16 detektiert [101; 102].

Zwei weitere Studien bestätigten diese Beobachtungen durch die Analyse von Tumoren der Gruppe der PMBCL bzw. den Vergleich dieser Tumoren mit solchen vom Typ der DLBCL [87; 103]. So fanden sich in der Arbeit von Scarpa et al. bei einem relativ kleinen Tumorkollektiv v.a. Zugewinne auf den Chromosomen 9p und X [103]. Bei Vergleich der PMBCL mit Tumoren vom Typ der DLBCL detektierten Palanisamy et al. Zugewinne auf den Chromosomen 10, 21 und 22 sowie Verluste auf den Chromosomen 11, 13 und 18 ausschließlich in der Gruppe der PMBCL. Bei den DLBCL zeigten sich auf der anderen Seite Zugewinne auf den Chromosomen 8, 11, 15 und 16 sowie Verluste auf den Chromosomen 5, 10, 15, 16, 17 und 20 [87]. Bei Vergleich der Chromosomen, welche in beiden Kollektiven Aberrationen aufwiesen, stellten sich für die Gruppe der PMBCL Zugewinne auf den Chromosomen 9, 19 und X sowie Verluste auf Chromosom 4, für die der DLBCL hingegen Zugewinne auf den Chromosomen 3 und 7q als signifikant häufiger heraus [87]. Amplifikationen wurden in beiden Gruppen gehäuft in der Region 2p13-p15 sowie in geringerer Anzahl bei 6p21, 12q13 und 18q21 detektiert [87].

Die hier beschriebenen Arbeiten zeigen, dass sich innerhalb der Gruppe der DLBCL charakteristische und rekurrente Aberrationen mittels CGH nachweisen lassen. Neue Aspekte der Genexpressionsanalysen von Alizadeh und Rosenwald in der Subtypisierung der DLBCL [59; 62] blieben jedoch in diesen Studien bisher

unberücksichtigt. So liegen bislang keine Arbeiten vor, die sich gezielt mit chromosomalen Veränderungen der beiden DLBCL-Subtypen GCB- und ABC-DLBCL beschäftigen haben. Ebenso sind genetische Aberrationen innerhalb der Gruppe der PMBCL nur in äußerst geringen Fallzahlen analysiert worden. Die Untersuchung eines großen Kollektivs dieser drei Subgruppen mittels CGH unter Berücksichtigung der genexpressionsbasierten Subtypisierung ist daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.10 Grundprinzipien der CGH

Die komparative genomische Hybridisierung („comparative genomic hybridization“; CGH) wurde erstmals 1992 von Kallioniemi beschrieben [104]. Es handelt sich hierbei um eine molekulargenetische Methode, mit der Zugewinne und Verluste von genetischem Material, entsprechend numerischen chromosomalen Aberrationen eines Tumors, durch Vergleich der Tumor-DNA mit DNA aus nicht neoplastischem Gewebe ermittelt werden können. Nach unterschiedlicher Markierung der Normal- und Tumor-DNA und Kohybridisierung auf normale humane Metaphasen können anhand der jeweiligen Signalverhältnisse Gewinne und Verluste von genetischem Material nachgewiesen werden. Nach Untersuchung mehrerer Fälle ergibt sich ein Aberrationsmuster der Tumorentität [105]. Chromosomenabschnitte, die Verluste von genetischem Material aufweisen, können hierbei Hinweise auf die Lokalisation eines in der Pathogenese des jeweiligen Tumors bedeutenden Tumorsuppressorgens geben. Amplifikationen sowie chromosomale Regionen, die einen Zugewinn von genetischem Material aufweisen, können Onkogene beinhalten, die in der Tumorgenese von Bedeutung sind.

Die CGH hat sich als rasche und umfassende genetische Screening-Methode erwiesen, die sowohl an Frisch- als auch an Paraffinmaterial angewendet werden kann. Balancierte chromosomale Veränderungen, wie Inversionen oder auch Translokationen, sind mit der Methode der CGH nicht darstellbar. Limitiert ist die Methode weiterhin durch die Auflösung, die je nach Autor mit 2 bis 10 Mb bei Amplifikationen sowie

größer als 10 Mb bei Deletionen angegeben wird. Ausnahme hierbei sind sog. High-level-Amplifikationen, die je nach Amplifikationsgrad auch schon im Bereich von weniger als 1 Mb darstellbar sind [106; 107; 108].

1.11 Fragestellungen

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation bestand in der Charakterisierung chromosomaler Aberrationen der verschiedenen, mittels Genexpressionsanalysen definierten Subgruppen der DLBCL durch komparative genomische Hybridisierung. Zum einen sollte nachgewiesen werden, ob Tumoren vom Typ der DLBCL, wie andere Neoplasien, rekurrente Zugewinne und Verluste an genetischem Material aufweisen, die Rückschlüsse auf die Pathogenese der Tumoren ermöglichen, zum anderen sollte überprüft werden, ob den verschiedenen, mittels Genexpressionsanalysen definierten Subtypen charakteristische und möglicherweise die Entitäten definierende chromosomale Veränderungen zugrunde liegen. Gegenstand der CGH-Untersuchung waren hierbei diffuse großzellige B-Zell Lymphome vom Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL), vom aktivierten B-Zelltyp (ACB-DLBCL) sowie primär mediastinale B-Zell Lymphome (PMBCL).

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft des untersuchten Materials

Im Rahmen der Dissertation wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elias Campo (Hospital Clinic, Barcelona) Gewebe von 184 Patienten untersucht. Zugesandt wurde die bereits aus Frischmaterial nach dem Standardextraktionsverfahren extrahierte und aufgereinigte Tumor-DNA. Es handelte sich dabei um DNA, die zeitgleich mit mRNA des identischen Gewebematerials isoliert wurde. Die Tumoren waren in einer von uns unabhängigen Untersuchung der Proben mittels cDNA-microarray-Technologie bereits ihrem jeweiligen Subtyp (GCB-DLBCL, ABC-DLBCL, PMBCL) zugeordnet worden [62]. Alle untersuchten Tumoren wurden im Vorfeld der Subtypisierung gemäß der allgemein gültigen WHO-Klassifikation histologisch klassifiziert. Somit lagen uns sowohl der jeweilige Subtyp, die jeweilige histologische Diagnose als auch die klinischen Daten vor. Das Material der zu analysierenden Proben wurde uns von 7 beteiligten Instituten zugesandt. Eine Auflistung der beteiligten Einrichtungen sowie die von ihnen zugesandte Fallzahl finden sich in der nachfolgenden Tabelle (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Herkunft des untersuchten Materials

<u>Institute und beteiligte Einrichtungen</u>	<u>Anzahl der zugesandten Fälle</u>
Southwest Oncology Group, Tuscon, USA	32 Fälle
British Columbia Cancer Center, Vancouver, Kanada	40 Fälle
University of Nebraska, Omaha, USA	33 Fälle
Radium Hospital, Oslo, Norwegen	27 Fälle
Institut für Pathologie, Universität Würzburg, Deutschland	23 Fälle
Hospital Clinic, Barcelona, Spanien	14 Fälle
National Cancer Institute, Washington, USA	15 Fälle

87 Fälle eines GCB-DLBCL, 78 Fälle eines ABC-DLBCL und 19 Fälle eines PMBCL wurden mittels CGH untersucht.

Histologisch handelte es sich im Gesamtkollektiv um 88 Fälle eines DLBCL vom zentroblastisch monomorphen, 36 Fälle eines DLBCL vom zentroblastisch polymorphen, 16 Fälle eines DLBCL vom immunoblastischen und 8 Fälle eines DLBCL vom plasmablastischen Typ. Des Weiteren wurden 2 Fälle als T-Zell-reich und 8 Fälle als Burkitt-ähnlich eingestuft. 1 Fall zeigte die morphologischen Charakteristika eines DLBCL vom anaplastischen Typ. 25 Gewebeprobe(n) konnte(n) im Vorfeld keine histologische Diagnose zugeordnet werden (nicht klassifizierbar).

Bei allen Fällen handelt es sich um primäre (de novo) Tumoren. Das Durchschnittsalter der Patienten belief sich auf 59 Jahre (14-88 Jahre). Männer stellten einen leicht höheren Anteil am Untersuchungsgut als Frauen (98 ♂ vs. 84 ♀).

2.2 Bestimmung der Menge an Tumor-DNA

Die Menge Tumor-DNA in der zugesandten Probe wurde semiquantitativ mittels elektrophoretischer Auftrennung im Ethidiumbromid gefärbten 0,8 % Agarosegel durch Vergleich der Tumor-DNA mit einer Probe bekannten DNA-Gehaltes bestimmt.

2.3 RNase-Verdau

Zur Reduktion des Anteils an RNA in den zu untersuchenden Fällen wurde ein RNase-Verdau durchgeführt. Hierbei erfolgte nach elektrophoretischer Feststellung des RNA-Gehaltes der Proben im Ethidiumbromid gefärbten 0,8 % Agarosegel die Zugabe von RNase mit Inkubation der Proben über 2-3 Stunden bei 37 °C im Heizblock. Die zugegebene Menge an RNase sowie die Inkubationszeit wurden jeweils abhängig vom festgestellten RNA-Gehalt gewählt. Nach erneuter elektrophoretischer Kontrolle des

Restgehaltes an RNA im Ethidiumbromid gefärbten 0,8 % Agarosegel erfolgte ggf. die Fortsetzung des Verdaus oder jedoch das Wegfrieren der Proben bei -20 °C bis zum Beginn der Nick-Translation.

2.4 Nick-Translation

Um die extrahierte Tumor- und Normal-DNA zu markieren, erfolgte eine sog. Nick-Translation nach dem CGH Protokoll des Lymphoma/ Leukemia Molecular Profiling Project (LLMPP). Hierbei wurde der Nick-Translation-Kit der Firma Vysis (Vysis, Inc., Downers Grove, IL) verwendet.

Die Tumor-DNA wurde mit dUTP SpectrumGreen, die Normal-DNA, gewonnen aus Plazentafrischgewebe, mit SpectrumRed markiert. Für einen Nick-Ansatz von 50 µl (ausreichend für eine Hybridisierung) waren 5 µl Tumor- sowie 5 µl Normal-DNA, 15,5 µl Aqua dest., 10 µl 0,1 mM dNTP mix (Ansatz für 600 µl dNTP mix-Stocklösung: je 200 µl 0,3 mM dATP, dCTP, dGTP), 5 µl 0,1 mM dTTP (Ansatz für 600 µl dTTP-Stocklösung: 200 µl 0,3 mM zu 400 µl Aqua dest.), je 2,5 µl 0,2 mM dUTP SpectrumGreen (Ansatz für 50 µl SpectrumGreen-Stocklösung: 5 µl 1 mM dUTP SpectrumGreen zu 45 µl Aqua dest.) und SpectrumRed (Ansatz für 50 µl SpectrumRed-Stocklösung: 5 µl 1 mM dUTP SpectrumRed zu 45 µl Aqua dest.), 5 µl 10x Nick-Translationspuffer sowie 7 µl Nick-Translationsenzym (DNase und DNA Polymerase) notwendig. Die Nick-Translation wurde über 30 min im Kühlwasserbad bei 16 °C durchgeführt. Hierbei wurde die Menge des verwendeten Nick-Translationsenzym so gewählt, dass am Ende der Nick-Translation DNA-Fragmente einer Länge zwischen 500 und 1000 Basenpaaren vorlagen. Die Fragmentlänge wurde durch Elektrophorese auf einem Ethidiumbromid gefärbten 0,8 % Agarosegel kontrolliert. Betrug die Länge der Nick-Produkte mehr als 1000 Basenpaare, erfolgte ein von der Fragmentlänge des Nick-Produkts abhängiger Nachverdau. Der Abbruch der Nick-Translation erfolgte durch Erhitzen des Reagenz über 10 min bei 70 °C auf dem Heizblock sowie anschließendes Abkühlen über 5 min bei 0 °C im Eisbehälter. Bei Bedarf erfolgte an

dieser Stelle die Unterbrechung des CGH-Protokolls durch Wegfrieren des Nick-Produkts bei -20 °C bis zur Fortführung der Hybridisierung.

2.5 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Pro Hybridisierungsansatz wurden 45 µl mit SpectrumGreen markierte Tumor-DNA sowie 45 µl mit SpectrumRed markierte Normal-DNA benötigt. Ferner wurden pro Hybridisierungsansatz 10 µl Cot-1 DNA (Roche Diagnostics Mannheim) eingesetzt, um ubiquitär vorkommende hochrepetitive DNA-Sequenzen abzudecken. Tumor-DNA, Normal-DNA und Cot-1 DNA wurden gemischt und durch Zugabe von 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 250 µl eisgekühltem 100 % Ethanol über 30 min bei -70 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation über 15 Minuten bei 12000 U/ min und 4 °C wurde der Alkohol abpipettiert und das DNA-Pellet über 15 min bei 37 °C auf dem Heizblock getrocknet. Anschließend erfolgte die Resuspension der DNA in 7 µl deionisiertem Formamid über 30 min sowie in 7 µl Master Mix über weitere 30 min auf dem Rüttler. Die Hybridisierungsansätze wurden dann für 8 min bei 73 °C auf dem Heizblock denaturiert.

Parallel zur Probenvorbereitung wurden die bei -20 °C aufbewahrten Objektträger mit normalen humanen Metaphasen als Hybridisierungsmatrix (Vysis, Downers Grove, IL, USA) über 2 Stunden schrittweise auf 60 °C erwärmt und dann über 4 min bei 74 °C denaturiert. Die Denaturierungslösung bestand hierbei aus 49 ml deionisiertem Formamid, 7 ml 20x SSC sowie 7 ml Aqua dest. (pH 7,0). Anschließend wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 % und 100 % Ethanol) entwässert und luftgetrocknet. Nach Beschriftung der Objektträger konnten jeweils zwei Proben auf die zuvor mit einem Diamantstift markierten Hybridisierungsfelder aufgetragen werden. Nach Abdeckung mit Deckgläsern und Fixogum wurden die Objektträger über 3 Tage bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Objektträger nach Entfernung des Fixogums und der Deckgläser über je 2 min bei 70 °C im Wasserbad in Waschlösung A

(20 ml 20x SSC, 950 ml Aqua dest., 3ml NP-40, pH 7,0) und Waschlösung B (100 ml 20x SSC, 850 ml Aqua dest., 1 ml NP-40, pH 7,0) gewaschen. Zur Färbung der Chromosomenbänderung wurden den Waschlösungen zusätzlich vor Beginn des Waschvorganges je 50 µl 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) zugegeben. Abschließend wurden die Objektträger mit Antifadellösung (Vectashields, Vector Laboratories) eingedeckelt.

2.6 Bildaufnahme und Bildauswertung

Die digitale Bildauswertung wurde mit dem Programm ISIS (MetaSystems, Altlusheim) über ein angeschlossenes Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss Aalen) durchgeführt. Kriterien bei der Beurteilung der Qualität der Hybridisierung waren ein minimaler unspezifisch gefärbter Hintergrund, eine minimale Granularität der Chromosomen, helle und möglichst homogene Hybridisierungssignale über die gesamten Chromosomen sowie eine adäquate DAPI-Färbung zur Identifikation der Chromosomen [106; 108; 109; 110; 111]. Um DNA-Zugewinne und -Verluste zu bestimmen, wurden, entsprechend dem internationalen Standard, Schwellenwerte des Fluoreszenzverhältnisses festgelegt (obere Schwelle 1,25; untere Schwelle 0,75). High-level-Amplifikationen wurden als solche gewertet, wenn der Wert mehr als 1,5 betrug oder umschriebene chromosomale Banden ein sehr starkes Fluoreszenzsignal aufwiesen. Die Chromosomen 19, 20, 21, 22 und Y wurden nicht in die Untersuchung einbezogen, da diese zahlreiche repetitive Sequenzen und somit sehr kleine codierende Regionen aufweisen, welche für die CGH-Analyse als problematisch angesehen werden [112]. Pro Fall wurden zwischen 15 und 30 Metaphasen eingelesen. Die Gesamtheit der in dieser Arbeit mittels CGH detektierten Daten ist im Internet unter www.ncbi.nlm.nih.gov/sky einzusehen.

2.7 Statistische Analysen

Aufgrund der hohen Fallzahl untersuchter Tumoren in dieser Arbeit wurde eine sehr große Anzahl individueller chromosomaler Aberrationen detektiert. Es bestand daher die Gefahr, dass einige dieser Abnormitäten rein zufällig in der einen Gruppe signifikant häufiger erscheinen als in einer anderen. Um diese falsch positiven Ergebnisse auszuschließen, verwendeten wir einen schrittweisen Vertauschungstest [113; 114], welcher nominale p-Werte erzeugt, die zur Klärung und Validierung aufgestellter Hypothesen dienen. Dieser Test zieht die Korrelation der unterschiedlichen chromosomalen Aberrationen mit in Betracht. Signifikante Unterschiede in der Häufigkeit ihres Auftretens wurden mittels Chi-Square-Test aufgedeckt. Ein p-Wert $< 0,05$ galt als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Genetische Alterationen des Gesamtkollektivs der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome

184 im Vorfeld durch Genexpressionsanalysen subtypisierte DLBCL wurden von uns mittels CGH untersucht. Es handelte sich hierbei um 87 GCB-DLBCL (47 %), 78 ABC-DLBCL (42 %) und 19 PMBCL (11 %). Chromosomale Alterationen fanden sich in der Mehrzahl der untersuchten Fälle (142 Fälle, 77 %). Im Mittel unterschied sich die numerische Anzahl chromosomaler Aberrationen statistisch dabei nicht zwischen den einzelnen Subgruppen (GCB-DLBCL 3,1 +/- 3,7; ABC-DLBCL 4,5 +/- 4,5; PMBCL 3,3 +/- 2,7). Unter den 142 aberranten Fällen wurde in der Mehrzahl mehr als eine Imbalanz festgestellt (117 vs. 25 Fälle, 82 %). Im Restkollektiv konnten weder chromosomale Zugewinne noch Verluste nachgewiesen werden (42 Fälle, 23 %). Nachfolgend sind diejenigen rekurrenten Zugewinne und Verluste aufgeführt, die sich mit einer Häufigkeit von mindestens 10 % im jeweiligen Kollektiv nachweisen ließen. Detektierte chromosomale Amplifikationen wurden unabhängig von ihrer Häufigkeit berücksichtigt.

3.2 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome vom Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL)

Insgesamt wurden 87 GCB-DLBCL mittels CGH untersucht. Histologisch handelte es sich um 61 DLBCL vom zentroblastischen (51 Fälle zentroblastisch monomorph, 10 Fälle zentroblastisch polymorph), 5 DLBCL vom immunoblastischen sowie 3 DLBCL vom plasmablastischen Typ. 3 Fälle wurden als Burkitt-ähnlich und 1 Fall als T-Zell-reich eingestuft. 14 Fälle waren histologisch nicht klassifizierbar. 63 der untersuchten 87 Fälle (80 %) wiesen chromosomale Zugewinne oder Verluste auf. Bei 24 Fällen ließen sich keine genetischen Veränderungen nachweisen.

Zugewinne fanden sich auf Chromosom 12 (in 19 von 87 Fällen, 22 %; minimale Überlappungsregionen 12p (14 Fälle, 16 %), 12cen-q15 (18 Fälle, 20 %) und 12q23-qter (13 Fälle, 15 %)), Chromosom 2 (in 17 von 87 Fällen, 20 %; minimale Überlappungsregion 2p14-p16 (14 Fälle, 16 %)), Chromosom 7 (in 16 von 87 Fällen, 18 %; minimale Überlappungsregionen 7p (13 Fälle, 15 %) und 7q (13 Fälle, 15 %)), Chromosom X (in 14 von 87 Fällen, 16 %), Chromosom 6 (in 11 von 87 Fällen, 13 %; minimale Überlappungsregion 6p (11 Fälle, 13 %)), Chromosom 1 (in 10 von 87 Fällen, 11 %), Chromosom 8 (in 10 von 87 Fällen, 11 %; minimale Überlappungsregion 8q24-qter (8 Fälle, 10 %)), Chromosom 11 (in 10 von 87 Fällen, 11 %), Chromosom 13 (in 10 von 87 Fällen, 11 %; minimale Überlappungsregion 13q (10 Fälle, 11 %)), Chromosom 10 (in 9 von 87 Fällen, 10 %) sowie Chromosom 18 (in 9 von 87 Fällen, 10 %; minimale Überlappungsregion 18q21 (9 Fälle, 10 %)).

Amplifikationen ließen sich im Untersuchungsgut bei 19 von 87 Fällen (22 %) nachweisen. Sie fanden sich auf Chromosom 2 (2p14-p16, 7 Fälle), Chromosom X (Xp11, 2 Fälle; Xp22-pter und Xq22-q23, je 1 Fall), Chromosom 1 (1q31, 1 Fall), Chromosom 3 (3q18-qter, 2 Fälle), Chromosom 8 (8q24, 2 Fälle), Chromosom 10 (10q21 und 10q25-qter, je 1 Fall), Chromosom 17 (17p11, 2 Fälle), Chromosom 11 (11q23, 1 Fall), Chromosom 12 (12q12 und 12q14, je 1 Fall), Chromosom 15 (15cen-q14, 1 Fall) sowie Chromosom 18 (18q21, 1 Fall).

Verluste fanden sich auf Chromosom 6 (in 27 von 87 Fällen, 31 %; minimale Überlappungsregionen 6q12 (10 Fälle, 11 %), 6q13 (15 Fälle, 17 %), 6q14 (18 Fälle, 21 %), 6q15 (19 Fälle, 22 %), 6q16 (20 Fälle, 23 %), 6q21 (19 Fälle, 22 %), 6q22 (16 Fälle, 18 %), 6q23 (16 Fälle, 18 %), 6q24 (16 Fälle, 18 %), 6q25 (15 Fälle, 17 %), 6q26 (15 Fälle, 17 %) und 6q27 (15 Fälle, 17 %)) sowie Chromosom 13 (in 9 von 87 Fällen, 10 %).

Die folgende Abbildung 2 zeigt die detektierten chromosomalen Imbalanzen der untersuchten GCB-DLBCL als Chromosomenideogramm. Eine detaillierte Auflistung der Fälle im Einzelnen sowie der bei ihnen nachgewiesenen Zugewinne und Verluste findet sich im Anhang (s. Tabelle I).

Abbildung 2: Chromosomale Imbalanzen bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen vom Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL; n = 87)

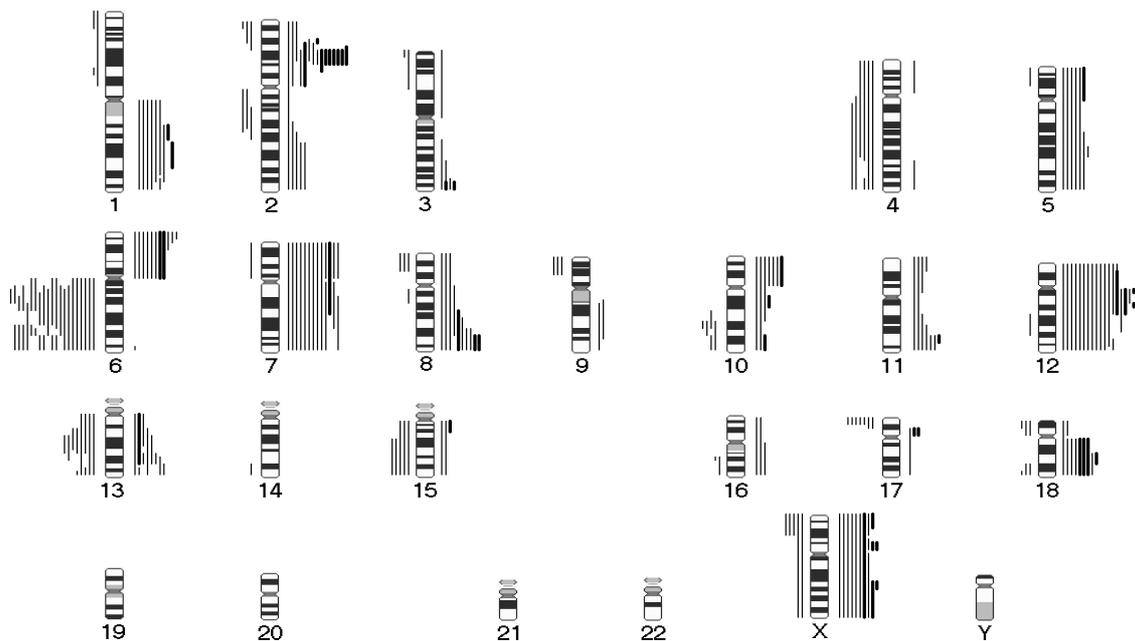


Abbildung 2:

Linien rechts der Chromosomenideogramme: Zugewinne von chromosomalem Material; Linien links der Chromosomenideogramme: Verluste von chromosomalem Material; dicke Linien: mehrfache Zugewinne/ Genamplifikationen

3.3 Diffuse großzellige B-Zell Lymphome vom aktivierten B-Zelltyp (ABC-DLBCL)

Insgesamt wurden 78 ABC-DLBCL mittels CGH untersucht. Histologisch handelte es sich um 48 DLBCL vom zentroblastischen (24 Fälle zentroblastisch monomorph, 24 Fälle zentroblastisch polymorph), 10 DLBCL vom immunoblastischen, 5 DLBCL vom plasmablastischen und 1 DLBCL vom anaplastischen Typ. 5 Fälle wurden als Burkitt-ähnlich und 1 Fall als T-Zell-reich eingestuft. 8 Fälle waren histologisch nicht klassifizierbar. 63 der untersuchten 78 Fälle (81 %) wiesen chromosomale Zugewinne oder Verluste auf. Bei 15 Fällen ließen sich keine genetischen Veränderungen nachweisen.

Zugewinne fanden sich auf Chromosom 3 (in 31 von 78 Fällen, 40 %; minimale Überlappungsregionen 3p (24 Fälle, 31 %), 3cen-q26 (24 Fälle, 31 %), 3q27-qter (26 Fälle, 33 %) sowie als Trisomie 3 (10 Fälle, 13 %)), Chromosom 18 (in 26 von 78 Fällen, 33 %; minimale Überlappungsregion 18q21 (26 Fälle, 33 %)), Chromosom 6 (in 15 von 78 Fällen, 19 %; minimale Überlappungsregion 6p (13 Fälle, 17 %)), Chromosom 2 (in 12 von 78 Fällen, 15 %; minimale Überlappungsregion 2p14-16 (12 Fälle, 15 %)), Chromosom X (in 12 von 78 Fällen, 15 %), Chromosom 1 (in 11 von 78 Fällen, 14 %; minimale Überlappungsregion 1q31 (9 Fälle, 12 %)), Chromosom 7 (in 10 von 78 Fällen, 13 %; minimale Überlappungsregionen 7q (10 Fälle, 13 %) und 7p (8 Fälle, 10 %)), Chromosom 8 (in 10 von 78 Fällen, 13 %; minimale Überlappungsregion 8q24-qter (8 Fälle, 10 %)), Chromosom 9 (in 9 von 78 Fällen, 12 %), Chromosom 5 (in 8 von 78 Fällen, 10 %), Chromosom 11 (in 8 von 78 Fällen, 10 %; minimale Überlappungsregion 11q23-qter (8 Fälle, 10 %)) sowie Chromosom 12 (in 8 von 78 Fällen, 10 %).

Amplifikationen ließen sich im Untersuchungsgut bei 19 von 78 Fällen (24 %) nachweisen. Sie fanden sich auf Chromosom 18 (18q21, 7 Fälle), Chromosom 6 (6p12-p21, 1 Fall; 6p21, 1 Fall; 6p24-pter, 1 Fall; 6q14, 1 Fall), Chromosom 10 (10q11, 1 Fall; 10q11-q21, 1 Fall; 10q23-q24, 1 Fall), Chromosom X (Xp22, 2 Fälle; Xq27-qter, 1

Fall), Chromosom 3 (3q28-qter, 2 Fälle), Chromosom 2 (2p15-16, 2 Fälle), Chromosom 14 (14q22, 2 Fälle), Chromosom 15 (15q21-q22 und 15q24-q25, je 1 Fall), Chromosom 17 (17q11-q12 und 17q23-qter, je 1 Fall), Chromosom 1 (1q31, 1 Fall), Chromosom 4 (4q13-q21, 1 Fall), Chromosom 8 (8p23-pter, 1 Fall), Chromosom 9 (9p24-pter, 1 Fall) sowie Chromosom 11 (11q23, 1 Fall).

Verluste fanden sich auf Chromosom 6 (in 35 von 78 Fällen, 45 %; minimale Überlappungsregionen 6q12 (11 Fälle, 14 %), 6q13 (16 Fälle, 21 %), 6q14 (18 Fälle, 23 %), 6q15 (22 Fälle, 28 %), 6q16 (26 Fälle, 33 %), 6q21 (31 Fälle, 40 %), 6q22 (30 Fälle, 38 %), 6q23 (28 Fälle, 36 %), 6q24 (26 Fälle, 33 %), 6q25 (23 Fälle, 29 %), 6q26 (23 Fälle, 29 %) und 6q27 (22 Fälle, 28 %)), Chromosom 17 (in 14 von 78 Fällen, 18 %; minimale Überlappungsregion 17p13-pter (14 Fälle, 18 %)), Chromosom 8 (in 8 von 78 Fällen, 10 %; minimale Überlappungsregion 8p23-pter (10 Fälle, 10 %)) sowie Chromosom 9 (in 8 von 78 Fällen, 10 %).

Die folgende Abbildung 3 zeigt die detektierten chromosomalen Imbalanzen der untersuchten ABC-DLBCL als Chromosomenideogramm. Eine detaillierte Auflistung der Fälle im Einzelnen sowie der bei ihnen nachgewiesenen Zugewinne und Verluste findet sich im Anhang (s. Tabelle II).

Abbildung 3: Chromosomale Imbalanzen bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen vom aktivierten B-Zelltyp (ABC-DLBCL; n = 78)

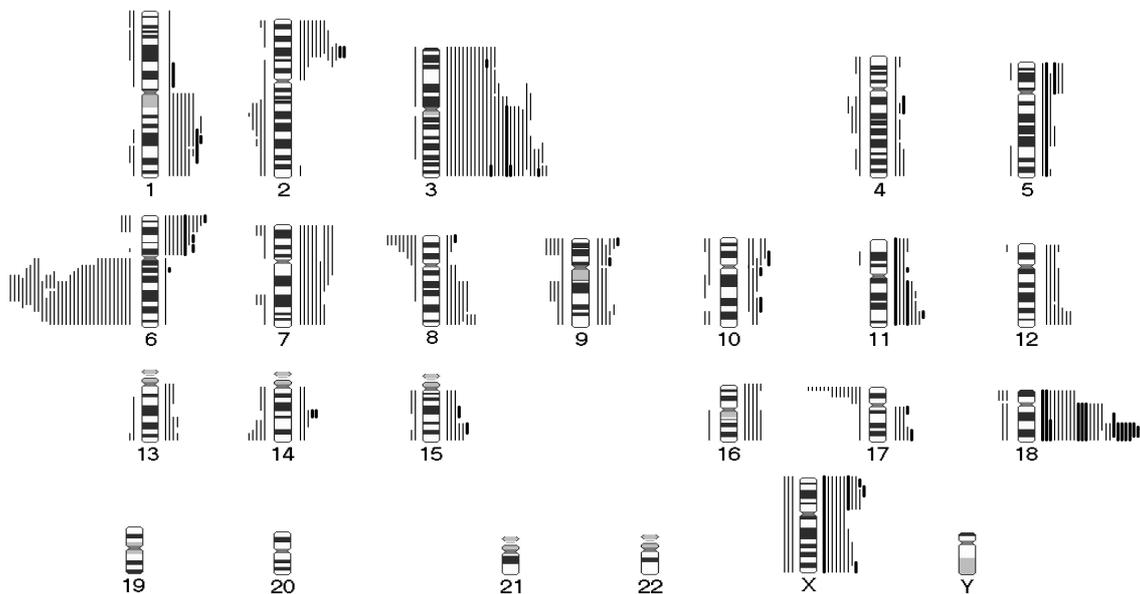


Abbildung 3:

Linien rechts der Chromosomenideogramme: Zugewinne von chromosomalem Material; Linien links der Chromosomenideogramme: Verluste von chromosomalem Material; dicke Linien: mehrfache Zugewinne bzw. Verluste/ Genamplifikationen

3.4 Primär mediastinale diffuse großzellige B-Zell Lymphome (PMBCL)

Insgesamt wurden 19 PMBCL mittels CGH untersucht. Histologisch handelte es sich um 15 DLBCL vom zentroblastischen (13 Fälle zentroblastisch monomorph, 2 Fälle zentroblastisch polymorph) sowie 1 DLBCL vom immunoblastischen Typ. 3 Fälle waren histologisch nicht klassifizierbar. 16 der untersuchten 19 Fälle (84 %) wiesen chromosomale Zugewinne oder Verluste auf. Bei 3 Fällen ließen sich keine genetischen Veränderungen nachweisen.

Zugewinne fanden sich auf Chromosom 2 (in 10 von 19 Fällen, 53 %; minimale Überlappungsregionen 2p14-p16 (9 Fälle, 47 %) und 2q34-qter (3 Fälle, 16 %)), Chromosom 9 (in 8 von 19 Fällen, 42 %; minimale Überlappungsregionen 9q (6 Fälle, 32 %) und 9p (7 Fälle, 37 %)), Chromosom 3 (in 3 von 19 Fällen, 16 %; minimale Überlappungsregion 3q27-qter (3 Fälle, 16 %)), Chromosom 18 (in 3 von 19 Fällen, 16 %; minimale Überlappungsregion 18q21 (3 Fälle, 16 %)), Chromosom X (in 3 von 19 Fällen, 16 %), Chromosom 4 (in 2 von 19 Fällen, 11 %), Chromosom 8 (in 2 von 19 Fällen, 11 %) sowie Chromosom 11 und 15 (in jeweils 2 von 19 Fällen, 11 %).

Amplifikationen ließen sich bei 5 von 19 Fällen (26 %) nachweisen. Sie fanden sich auf Chromosom 9 (9p24-pter, 2 Fälle), Chromosom 2 (2p14-p16, 1 Fall), Chromosom 3 (3q28-qter, 1 Fall), Chromosom 14 (14q22, 1 Fall), Chromosom 15 (15q22, 1 Fall) sowie Chromosom 17 (17p11, 1 Fall).

Verluste fanden sich auf Chromosom 8 (in 3 von 19 Fällen, 16 %; minimale Überlappungsregion 8p23-pter (3 Fälle, 16 %)), Chromosom 2 (in 2 von 19 Fällen, 11 %), Chromosom 4 (in 2 von 19 Fällen, 11 %; minimale Überlappungsregion 4q32-qter (2 Fälle, 11 %)), Chromosom 6 (in 2 von 19 Fällen, 11 %; minimale Überlappungsregion 6q24 (2 Fälle, 11 %)) sowie Chromosom 14 (in 2 von 19 Fällen, 11 %).

Die folgende Abbildung 4 zeigt die detektierten chromosomalen Imbalanzen der untersuchten PMBCL als Chromosomenideogramm. Eine detaillierte Auflistung der Fälle im Einzelnen sowie der bei ihnen nachgewiesenen Zugewinne und Verluste findet sich im Anhang (s. Tabelle III).

Abbildung 4: Chromosomale Imbalanzen bei primär mediastinalen diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen (PMBCL; n = 19)

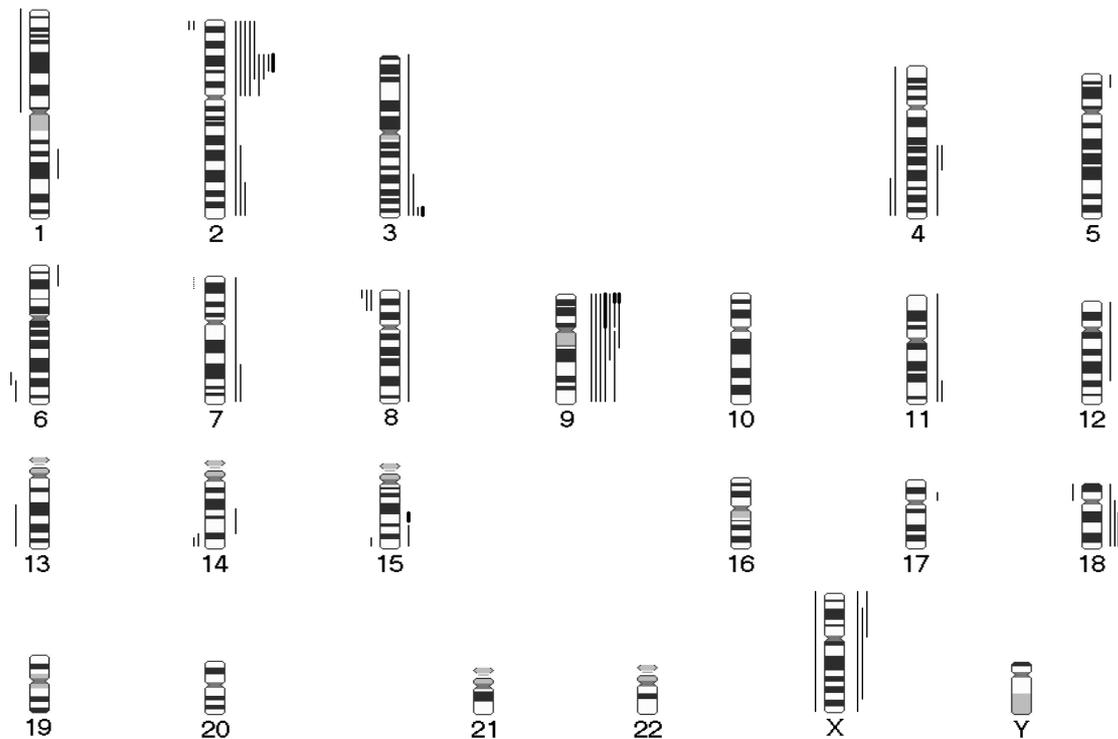


Abbildung 4:

Linien rechts der Chromosomenideogramme: Zugewinne von chromosomalem Material; Linien links der Chromosomenideogramme: Verluste von chromosomalem Material; dicke Linien: mehrfache Zugewinne/ Genamplifikationen.

3.5 GCB-DLBCL, ABC-DLBCL und PMBCL unterscheiden sich genetisch signifikant

Vergleicht man die Gruppen der GCB- und ABC-DLBCL bezüglich der bei ihnen detektierten chromosomalen Aberrationen, so zeigt sich, dass einige dieser Aberrationen bei einem der beiden Subtypen signifikant häufiger auftreten als andere. Für die Gruppe der GCB-DLBCL ließ sich ein Zugewinn auf Chromosom 12 (minimale Überlappungsregionen 12p (16 % vs 5 %, $p = 0,0241$) und 12cen-14q (21 % vs 5 %, $p = 0,0033$)) sowie ein Verlust auf Chromosom 13 (minimale Überlappungsregion 13cen-q21 (9 % vs 1 %, $p = 0,0254$)) signifikant häufiger nachweisen als in der Gruppe der ABC-DLBCL. Auf der anderen Seite fanden sich in der Gruppe der ABC-DLBCL signifikant häufiger Zugewinne auf Chromosom 3 (minimale Überlappungsregionen 3p (31 % vs 1 %, $p < 0,0001$), 3cen-q26 (31 % vs 2 %, $p < 0,0001$) und 3q27-qter (33 % vs 4 %, $p < 0,0001$)), Chromosom 14 (minimale Überlappungsregion 14q22 (6 % vs 0 %, $p = 0,0165$)) und Chromosom 18 (minimale Überlappungsregion 18q21 (35 % vs 10 %, $p = 0,0002$)) sowie Verluste auf Chromosom 6 (minimale Überlappungsregionen 6q21 (40 % vs 22 %, $p = 0,0125$), 6q22 (38 % vs 18 %, $p = 0,0041$), 6q23 (36 % vs 18 %, $p = 0,0111$) und 6q24 (33 % vs 18 %, $p = 0,0278$)) gegenüber der Gruppe der GCB-DLBCL (s. Tabelle 2). Beide Subgruppen der DLBCL (GCB- und ABC-DLBCL) zeigen somit für sie charakteristische chromosomale Aberrationen und unterscheiden sich daher eindeutig auf genetischer Ebene.

**Tabelle 2: Vergleich von Tumoren der Gruppen GCB-DLBCL und ABC-DLBCL:
minimale Überlappungsregionen signifikanter Zugewinne/ Verluste**

	GCB		ABC		Chi Square
	(n = 87)		(n = 78)		
ROI	n		n		
+ 3p	1	1 %	24	31 %	P < 0,0001
+ 3cen-q26	2	2 %	24	31 %	P < 0,0001
+ 3q27-qter	4	5 %	26	33 %	P < 0,0001
- 6q21	19	22 %	31	40 %	P = 0,0125
- 6q22	16	18 %	30	38 %	P = 0,0041
- 6q23	16	18 %	28	36 %	P = 0,0111
- 6q24	16	18 %	26	33 %	P = 0,0278
+ 12p	14	16 %	4	5 %	P = 0,0241
+ 12cen-q14	18	21 %	4	5 %	P = 0,0033
- 13cen-q21	8	9 %	1	1 %	P = 0,0254
+ 14q22	0	0 %	5	6 %	P = 0,0165
+ 18q21	9	10 %	27	35 %	P = 0,0002

Tabelle 2: Abkürzungen: n = Fallzahl, ROI = Region (region of interest), + = Zugewinn, - = Verlust

Vergleicht man weiterhin die untersuchten Fälle der Gruppe der PMBCL mit denen der GCB- und ABC-DLBCL, so ergeben sich auch hier signifikante Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens chromosomaler Aberrationen. So zeigte sich bei Korrelation der Gruppen der PMBCL und GCB-DLBCL, dass Zugewinne auf Chromosom 2 (minimale Überlappungsregion 2p14-p16 (47 % vs 16 %, p = 0,0027)), Chromosom 3 (minimale Überlappungsregion 3q27-qter (21 % vs 5 %, p = 0,0139)) und Chromosom 9 (minimale Überlappungsregionen 9p (37 % vs 0 %, p < 0,00001) und 9q (32 % vs 2 %, p < 0,00001)) sowie Verluste auf Chromosom 8 (minimale Überlappungsregion 8p (16 % vs 3 %, p = 0,035)) in der Gruppe der PMBCL signifikant häufiger nachzuweisen waren als in der Vergleichsgruppe. Auf der anderen Seite zeigte sich in der Gruppe der GCB-DLBCL ein Verlust in den minimalen Überlappungsregionen 6q13-6q22 auf Chromosom 6 (6q13: 17 % vs 0 %, p = 0,051; 6q14: 21 % vs 0 %, p < 0,05; 6q15: 22 %

vs 0 %, $p < 0,05$; 6q16: 23 % vs 0 %, $p < 0,05$; 6q21: 22 % vs 0 %, $p < 0,05$; 6q22: 18 % vs 0 %, $p < 0,05$) signifikant häufiger. Ein derartiger chromosomaler Verlust fand sich im Kollektiv der PMBCL bei keinem einzigen Fall (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Vergleich von Tumoren der Gruppen PMBCL und GCB-DLBCL: minimale Überlappungsregionen signifikanter Zugewinne/ Verluste

	PMBCL		GCB		Chi-Square
	(n = 19)		(n = 87)		
ROI	n		n		
+ 2p14-p16	9	47 %	14	16 %	P = 0,0027
+ 3q27-qter	4	21 %	4	5 %	P = 0,0139
- 6q13	0	0 %	15	17 %	P = 0,051
- 6q14	0	0 %	18	21 %	P < 0,05
- 6q15	0	0 %	19	22 %	P < 0,05
- 6q16	0	0 %	20	23 %	P < 0,05
- 6q21	0	0 %	19	22 %	P < 0,05
- 6q22	0	0 %	16	18 %	P < 0,05
- 8p	3	16 %	3	3 %	P = 0,035
+ 9p	7	37 %	0	0 %	P < 0,00001
+ 9q	6	32 %	2	2 %	P < 0,00001

Tabelle 3: Abkürzungen: n = Fallzahl, ROI = Region (region of interest), += Zugewinn, -= Verlust

Auch in der Gruppe der ABC-DLBCL wurde ein Verlust in der minimalen Überlappungsregion 6q13-q27 auf Chromosom 6 (6q13: 21 % vs 0 %, $p < 0,05$; 6q14: 23 % vs 0 %, $p < 0,05$; 6q15: 28 % vs 0 %, $p < 0,05$; 6q16: 33 % vs 0 %, $p < 0,05$; 6q21: 40 % vs 0 %, $p < 0,05$; 6q22: 38 % vs 0 %, $p < 0,05$; 6q23: 36 % vs 5 %, $p < 0,05$; 6q24: 33 % vs 11 %, $p < 0,05$; 6q25: 29 % vs 5 %, $p < 0,05$; 6q26: 29 % vs 5 %, $p < 0,05$; 6q27: 28 % vs 5 %, $p < 0,05$) signifikant häufiger nachgewiesen. Außerdem

zeigte sich, dass in der Gruppe der PMBCL neben einem Zugewinn in der minimalen Überlappungsregion 2p14-p16 (47 % vs 15 %, $p = 0,0024$) auch ein Zugewinn in Region 2q34-qter (16 % vs 1 %, $p = 0,043$) gegenüber den ABC-DLBCL signifikant häufiger zu finden war. In der Gruppe der ABC-DLBCL zeigte sich hingegen ein Zugewinn auf Chromosom 3 (minimale Überlappungsregion 3p (31 % vs 1 %, $p = 0,0227$)) sowie ein Verlust auf Chromosom 17 (minimale Überlappungsregion 17p (18 % vs 0 %, $p = 0,0459$)) signifikant häufiger (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich von Tumoren der Gruppen PMBCL und ABC-DLBCL: minimale Überlappungsregionen signifikanter Zugewinne/ Verluste

	PMBCL		ABC		Chi-Square
	(n = 19)		(n = 78)		
ROI	n		n		
+ 2p14-p16	9	47 %	12	15 %	P = 0,0024
+ 2q34-qter	3	16 %	1	1 %	P = 0,0043
+ 3p	1	5 %	24	31 %	P = 0,0227
- 6q13	0	0 %	16	21 %	P < 0,05
- 6q14	0	0 %	18	23 %	P < 0,05
- 6q15	0	0 %	22	28 %	P < 0,05
- 6q16	0	0 %	26	33 %	P < 0,05
- 6q21	0	0 %	31	40 %	P < 0,05
- 6q22	0	0 %	30	38 %	P < 0,05
- 6q23	1	5 %	28	36 %	P < 0,05
- 6q24	2	11 %	26	33 %	P < 0,05
- 6q25	1	5 %	23	29 %	P < 0,05
- 6q26	1	5 %	23	29 %	P < 0,05
- 6q27	1	5 %	22	28 %	P < 0,05
+ 9p	7	37 %	6	8 %	P < 0,0008
+ 9q	6	32 %	5	6 %	P < 0,0019
- 17p	0	0 %	14	18 %	P = 0,0459

Tabelle 4: Abkürzungen: n = Fallzahl, ROI = Region (region of interest), + = Zugewinn, - = Verlust

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass sich alle drei mittels Genexpressionsanalyse definierten DLBCL-Subtypen (GCB-DLBCL, ABC-DLBCL, PMBCL) genetisch signifikant unterscheiden. Im Einzelnen lassen sich folgende chromosomale Aberrationen zuordnen, die für die jeweilige Subgruppe charakteristisch sind:

- GCB-DLBCL: Zugewinne: 12p, 12cen-q14
- ABC-DLBCL: Zugewinne: 3p, 3cen-q26, 3q27-qter, 18q21; Verluste: 6q21-q24
- PMBCL: Zugewinne: 2p14-p16, 9p; Fehlen der Verluste: 6q13-q22

4. Diskussion

4.1 Mittels Genexpression definierte Subtypen von diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen unterscheiden sich genetisch signifikant

Seit Einführung der Lymphomklassifikationen im Jahr 1981 durch Karl Lennert hat die außerordentliche Heterogenität der Gruppe der DLBCL immer wieder zu Schwierigkeiten in der diagnostischen Reproduzierbarkeit geführt. Der Begriff DLBCL stellt auch heutzutage noch immer einen Sammelbegriff für eine Fülle an unterschiedlichen Tumorentitäten dar. Daher stellt der Versuch, in der Diagnostik neben rein morphologischen auch klinische, immunhistochemische und molekulargenetische Parameter zu berücksichtigen, einen wichtigen Schritt im Verständnis dieser großen Gruppe lymphatischer Tumoren dar.

Durch das Erstellen genetischer Expressionsprofile konnte kürzlich gezeigt werden, dass die heterogene Gruppe der DLBCL aus wenigstens drei verschiedenen Tumorentitäten besteht (diffuse großzellige B-Zell Lymphome vom Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL), diffuse großzellige B-Zell Lymphome vom aktivierten B-Zelltyp (ABC-DLBCL), primär mediastinale diffuse großzellige B-Zell Lymphome (PMBCL)), die sich in ihrem zellulären Ursprung, ihrem klinischen Verlauf und ihren onkogenen Mechanismen voneinander unterscheiden [14; 15; 59; 62; 115]. So scheinen Tumoren vom Typ der GCB-DLBCL ihren Ursprung von B-Zellen des Keimzentrums, die der ABC-DLBCL den ihren von aktivierten postgerminalen B-Zellen und die der PMBCL den ihren von thymischen B-Zellen zu nehmen [14; 15; 59; 62; 115]. Die klinischen Verläufe und damit die Heilungsraten innerhalb dieser Subgruppen unterscheiden sich dabei signifikant (5-Jahresüberlebensraten: ABC-DLBCL 30 %, GCB-DLBCL 59 %, PMBCL 64 %) [14; 15; 59; 62]. Außerdem werden den drei Gruppen verschiedene onkogene Mechanismen in ihrer Pathogenese zugeschrieben. So sind Amplifikationen von REL und Translokationen des Onkogens BCL-2 für die Gruppe der GCB-DLBCL charakteristisch und finden sich in keiner der anderen beiden Subgruppen [62; 64]. Auf der anderen Seite zeigt sich in den Gruppen der ABC-DLBCL und PMBCL häufig eine Aktivierung des NF-kappa B-Signaltransduktionsweges [14; 69; 71].

Im Gegensatz zu früheren Studien an Tumoren der Gruppe der DLBCL, bei denen keine vorherige genexpressionsbasierte Subtypisierung vorgenommen wurde, bestand das Ziel dieser Arbeit darin, genetische Veränderungen nicht dem Gesamtkollektiv der DLBCL, sondern den einzelnen Subtypen (GCB-DLBCL, ABC-DLBCL, PMBCL) zuzuordnen. Es ließen sich dabei mehrere chromosomale Aberrationen in unterschiedlicher Häufung bei den drei Subgruppen nachweisen.

So fand sich beispielsweise für die Gruppe der ABC-DLBCL ein Zugewinn des kurzen Arms von Chromosom 3 (minimale Überlappungsregion 3p) in 31 % der Fälle, hingegen in den Gruppen der GCB-DLBCL und PMBCL bei je nur einem Fall. Zugewinne auf dem langen Arm von Chromosom 3 (minimale Überlappungsregionen 3cen-q26 und 3q27-qter) zeigten sich ebenfalls signifikant gehäuft in der Gruppe der ABC-DLBCL. Verluste auf Chromosom 6 (minimale Überlappungsregionen 6q21-q22) konnten bei 38 % der ABC- sowie 18 % der GCB-DLBCL, jedoch bei keinem Fall der PMBCL nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass sich die mittels Genexpressionsanalyse definierten Subtypen in ihren chromosomalen Veränderungen unterscheiden und offenbar unterschiedliche pathogenetische Mechanismen aufweisen.

Andererseits zeigt die Tatsache, dass sich einige chromosomale Aberrationen zwar gehäuft in der einen, jedoch auch in geringer Anzahl in den beiden anderen Subgruppen fanden, dass neben unterschiedlichen auch möglicherweise gewisse gemeinsame onkogenetische Signalwege von den Tumoren besritten werden. So ließ sich ein Zugewinn auf Chromosom 18 (minimale Überlappungsregion 18q21) zwar signifikant gehäuft bei 35 % der ABC-DLBCL nachweisen, fand sich jedoch auch bei 10 % der GCB-DLBCL und 16 % der PMBCL. Ebenso zeigten sich die für die GCB-DLBCL charakteristischen Zugewinne auf Chromosom 12 (minimale Überlappungsregion 12cen-q15), welche bei 21 % dieser Tumoren detektiert wurden, auch in den anderen beiden Subgruppen (je 5 % der Fälle).

4.2 Chromosomale Imbalanzen bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen vom Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL)

GCB-DLBCL zeigten in unserer Analyse für sie charakteristische genetische Aberrationen. So ließen sich Zugewinne auf Chromosom 12 (minimale Überlappungsregionen 12p und 12cen-q14) signifikant häufiger und damit als charakteristisch für diesen Subtyp nachweisen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen früherer Arbeiten, welche Zugewinne dieser chromosomalen Region, wenn auch lediglich innerhalb eines durch Genexpressionsanalysen nicht näher subtypisierten Kollektivs an DLBCL, mittels CGH nachweisen konnten [87; 90; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100]. Auch wurden Zugewinne auf Chromosom 12 bereits bei anderen histologisch differenzierten Formen der Lymphome, wie den kleinzellig-lymphozytären Formen [95], den folliculären Lymphomen [116], den primär kutanen [117] sowie den gastrointestinalen Lymphomen [118; 119], nachgewiesen. Interessant scheint die Tatsache, dass Hough et al. in ihrer Studie zeigen konnten, dass sich Zugewinne auf Chromosom 12 (minimale Überlappungsregion 12q12-q14) bei aus folliculären Lymphomen transformierten DLBCL häufiger finden als bei de novo entstandenen DLBCL. Dies könnte auf eine mögliche Bedeutung der beteiligten Gene in der Transformation maligner Lymphome bzw. den Bezug der GCB-DLBCL zur Keimzentrumsreaktion hindeuten [120].

Auf Chromosom 12 (minimale Überlappungsregion 12q13-14) scheinen u.a. die Gene GLI (ein Gliom-assoziiertes pathogenetischer Faktor), SAS (ein bei Sarkomen amplifiziertes Transmembranprotein), CDK4 (ein Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor) und MDM2 eine besondere Rolle zu spielen, da sich Amplifikationen dieser Gene bereits in früheren Studien bei anderen Tumoren, wie beispielsweise Gliomen und Sarkomen, nachweisen ließen [121; 122; 123; 124]. Die genaue Funktion einiger der hier genannten Gene ist bislang unbekannt. Es scheint jedoch insbesondere MDM2, welches eine zentrale Rolle in der Stabilisation des Tumorsuppressorgens P53 einnimmt, von besonderer Bedeutung sein. So wurde es bereits in der Vergangenheit bei hochgradigen Non-Hodgkin Lymphomen überexprimiert nachgewiesen [125]. Eine mögliche Folge dessen könnte beispielsweise eine erhöhte Resistenz dieser Tumoren

gegenüber Chemotherapeutika sein. Auch scheint die vermehrte Expression häufig mit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung assoziiert zu sein [94].

Daneben könnte ein weiteres Gen für die Pathogenese der GCB-DLBCL eine Rolle spielen, das sog. B11. B11 dient als Inhibitor des Apoptoseproteins Bax und wirkt somit antiapoptotisch. In der Vergangenheit konnte an Zellen der Mamma gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von B11 dem Bax-induzierten Zelltod entgegenwirkt, indem es mit dem Onkoprotein Bcl-2 im Sinne einer Immortalisierung der Zelle interagiert [126].

Zu erwähnen ist weiterhin der gegenüber der Gruppe der ABC-DLBCL, nicht jedoch gegenüber der der PMBCL, signifikant gehäufte Verlust der chromosomalen Region 13cen-q21 (in 8 von 63 Fällen, 13 %), dessen Bande 13q14 für das Tumorsuppressorgen RB kodiert [127]. Rb ließ sich als eines der häufigsten Tumor-assoziierten Proteine in veränderter bzw. fehlender Form bereits mehrfach bei malignen Tumoren, wie Osteosarkomen [128] und Bronchialkarzinomen [129; 130] sowie einigen lymphatischen Neoplasien [131; 132; 133], nachweisen. Für der Gruppe der DLBCL wurden chromosomale Verluste der Region 13cen-q21 bislang jedoch lediglich in vereinzelten Studien beschrieben [95]. Dennoch könnte eine verminderte Expression des Gens eine wesentliche Rolle in der Tumorgenese der GCB-DLBCL spielen, da ein niedriger Anteil an exprimiertem Rb mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert zu sein scheint [127].

4.3 Chromosomale Imbalanzen bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen vom aktivierten B-Zelltyp (ABC-DLBCL)

ABC-DLBCL zeigten ebenfalls für sie charakteristische chromosomale Zugewinne und Verluste. So fanden sich Zugewinne auf Chromosom 3 (minimale Überlappungsregionen 3p, 3cen-q26 und 3q27-qter) und Chromosom 18 (minimale Überlappungsregion 18q21) signifikant häufiger als bei den anderen Subtypen der DLBCL. Ebenso erwiesen sich Verluste auf Chromosom 6 (minimale Überlappungsregion 6q21-q24) als charakteristisch für diese Untergruppe.

In früheren Arbeiten fanden sich Zugewinne sowohl auf Chromosom 3 [87; 90; 95; 96; 98; 99; 100] als auch auf Chromosom 18 [87; 90; 91; 94; 95; 96; 98; 99; 100; 134] bereits bei einer Vielzahl von DLBCL. Ebenso ließen sich die charakteristischen Verluste auf Chromosom 6 bereits in der Vergangenheit mehrfach nachweisen [90; 95; 98; 99; 100]. Es liegt daher nahe, dass Zugewinne auf den Chromosomen 3 und 18 sowie Verluste auf Chromosom 6 bzw. Veränderungen der in dieser Region befindlichen Gene einen möglichen Einfluss auf die molekulare Pathogenese der ABC-DLBCL haben.

Ein Gen, das in der chromosomalen Region 18q21-qter lokalisiert ist und ebenfalls in früheren Arbeiten als eines der Schlüsselgene der molekularen Pathogenese verschiedener Neoplasien Erwähnung fand, ist das antiapoptotisch wirkende Onkogen BCL-2. Es wurde ursprünglich, wie bereits eingangs erwähnt, im Zusammenhang mit einer, für folliculäre Lymphome charakteristischen und bei DLBCL in bis zu 30 % vorkommenden [92; 135; 136], chromosomalen Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ entdeckt [137]. Es zeigte sich jedoch, dass eine vermehrte Expression von BCL-2 nicht an eine derartige Translokation gekoppelt sein muss, sondern auch Ergebnis einer isolierten Amplifikation der chromosomalen Region auf Chromosom 18 sein kann [90; 138]. Monni et al. wiesen in ihrer Studie bereits eine derartige Assoziation nach [91]. Auch wurde ein isoliert erhöhter Expressionslevel von BCL-2 bei anderen lymphatischen Tumoren, wie beispielsweise Hodgkin-Lymphomen und testikulären Lymphomen, nachgewiesen [139; 140].

Berglund et al. fanden derartige Zugewinne der chromosomalen Region 18q21 in ihrer Arbeit signifikant häufiger bei Tumorrezidiven [96]. Im Gegensatz dazu wurden in der Studie von Wilson et al. erhöhte Spiegel des Proteins Bcl-2 als ein frühes Geschehen der Tumorprogression angesehen [141]. Unabhängig davon scheint jedoch eine vermehrte Expression von Bcl-2 durchweg mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert zu sein [136; 142; 143]. Es sei jedoch an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass Bcl-2 nicht bei allen Tumoren der Gruppe der DLBCL alleiniger Angriffspunkt von Aberrationen der Region 18q21 zu sein scheint, was durch Genexpressionsstudien an lymphatischen Tumoren des ZNS sowie an Tumoren vom Typ der PMBCL nachgewiesen werden konnte [87; 144]. Denn trotz detektiertem Zugewinn fand sich bei diesen keine vermehrte Expression des Gens BCL-2. Es scheinen daher auch bislang unbekannte kodierende Regionen auf Chromosom 18 bzw. deren Gene in der Tumorgenese der DLBCL eine Rolle zu spielen.

Verluste auf Chromosom 6 (minimale Überlappingsregion 6q21-q24) wurden in der Literatur, wie die Zugewinne auf den Chromosomen 3 und 18, ebenfalls bei einer Vielzahl von Tumoren beschrieben. So fanden sich Deletionen dieser Region bereits bei Speicheldrüsentumoren, malignen Melanomen und Nierenzellkarzinomen [145; 146; 147]. Auch konnten derartige chromosomale Verluste bei einigen lymphatischen Tumoren, wie der akuten lymphoblastischen und der chronischen B-Zellleukämie [148; 149] sowie bei gastrointestinalen [119; 150], primär kutanen [117] und orbitalen Lymphomen [151], nachgewiesen werden. Ein Gen, das in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnte, ist das Gen HDAC2, welches für eine die Transkription und den Zellzyklus kontrollierende Histon-Deacetylase kodiert. Eine verminderte bzw. fehlerhafte Expression des zugehörigen Proteins könnte somit u.a. in einem unkontrollierten Zellwachstum resultieren [152].

Eine ebenfalls in der Literatur häufig beschriebene chromosomale Aberration, ein Verlust der Region 17p13 [95; 96; 98; 99; 100; 134], Lokus des Tumorsuppressorgens P53, fand sich in unserer Arbeit zwar gehäuft (in 14 von 78 Fällen, 18 %), war jedoch nach Korrelation der Ergebnisse nicht als charakteristisch für die Entität der ABC-DLBCL anzusehen. So fand sich lediglich im Vergleich mit Tumoren der Gruppe der PMBCL, nicht jedoch mit solchen der GCB-DLBCL, eine signifikante Häufung dieser

Alteration. Aufgrund der Tatsache, dass ein Verlust von P53 eine zentrale Rolle in der Genese einer Vielzahl von Tumoren zu spielen scheint [150; 153; 154; 155] und dieser in bis zu 20 % der DLBCL über ein defektes Protein nachgewiesen werden kann, sei jedoch auf die Häufung dieser Deletion in der Subgruppe der ABC-DLBCL hingewiesen. Veränderungen des Gens P53 schienen in früheren Studien mit erhöhter Therapieresistenz und einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert zu sein [141; 156; 157; 158].

Interessanterweise erwies sich in der Studie von Rosenwald et al. die vermehrte Expression von BMP6, einem für ein Wachstumsfaktor-assoziiertes Zytokin kodierendes Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, als charakteristisch für die Gruppe der ABC-DLBCL [62]. Ebenso war die vermehrte Expression von Genen der Proliferationssignatur, wie beispielsweise c-MYC auf Chromosom 8 (Lokus 8q24) und Ki-67 auf Chromosom 10 (Lokus 10q25-qter), für diese Subgruppe als typisch beschrieben worden [59; 62]. Eine signifikante und damit charakteristische Häufung von Zugewinnen dieser Regionen ließ sich jedoch in unserer Arbeit nicht nachweisen. Somit scheint die Dysregulation von Genen nicht allein durch strukturelle, d.h. chromosomale Veränderungen bedingt bzw. erklärbar zu sein.

4.4 Chromosomale Imbalanzen bei primär mediastinalen diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen (PMBCL)

Ebenso wie GCB- und ABC-DLBCL zeigten PMBCL in unserer Arbeit für sie charakteristische Zugewinne und Verluste. So fanden sich chromosomale Zugewinne sowohl auf Chromosom 2 (minimale Überlappungsregion 2p14-p16) als auch auf Chromosom 9 (minimale Überlappungsregion 9p). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen früherer Studien, in denen diese chromosomalen Aberrationen bereits detektiert wurden [87; 101; 102; 103]. Zusätzlich wurden jedoch in der Vergangenheit auch Zugewinne auf Chromosom 6 [159], Chromosom 12 [101] und Chromosom X [17; 87; 101; 102; 103] als charakteristisch für diesen Subtyp beschrieben.

Ein Gen, das innerhalb der genannten Regionen eine zentrale Rolle zu spielen scheint, ist das für einen Transkriptionsfaktor kodierende REL, welches auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 in der Region 2p16 lokalisiert ist [101; 102]. REL führt hierbei zur Aktivierung des sog. NF-kappa B-Signalweges, welcher die Expression von Genen reguliert, die für die B-Zelldifferenzierung von Bedeutung sind. Zu diesen zählen beispielsweise solche für die Leichtketten von Immunglobulinen, den MHC-Klasse I-Komplex oder das beta 2-Mikroglobulin [160]. Die vermehrte bzw. fehlerhafte Expression dieser Gene konnte für die Gruppe der PMBCL bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden [101; 161]. Im Einklang hiermit stehen auch die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen, in denen REL bei derartigen Tumoren ebenfalls vermehrt exprimiert nachgewiesen werden konnte [14].

Ein weiteres Gen, welches sich in der chromosomalen Region 2p befindet, ist BCL-11A, ein Onkogen, welches möglicherweise als Repressor der Transkription, ähnlich dem Gen BCL-6, von Bedeutung ist. BCL-11A und BCL-6 interagieren dabei direkt miteinander und kontrollieren dieselbe Untergruppe von Genen in reifen B-Zellen, wobei der genaue molekulargenetische Mechanismus bislang jedoch unklar ist [162; 163].

Die detektierten Zugewinne bzw. Amplifikationen auf Chromosom 9p erwiesen sich in unserer Studie ebenfalls als eindeutig signifikant für die Gruppe der PMBCL.

Interessanterweise sind Zugewinne auf diesem Chromosom ausschließlich für eine weitere lymphatische Tumorentität, das klassische Hodgkin-Lymphom, als charakteristisch beschrieben worden [86]. Diese Tatsache würde neben den bereits eingangs erwähnten Ergebnissen der Genexpressionsanalysen den Hinweis auf eine eventuelle molekulargenetische Verwandtschaft dieser beiden Entitäten weiter untermauern [14; 15].

Gene, die innerhalb dieser Region liegen und somit eine Rolle in der molekularen Pathogenese spielen könnten, sind u.a. JAK2 und NF1B in Region 9p23-p24 [102]. JAK2 ist eine für die intrazelluläre Zytokin-abhängige Signaltransduktion mitverantwortliche Tyrosin-Kinase, welche eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren der sog. STAT-Familie aktiviert und somit direkten Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung der Zelle hat [164]. In einer früheren Studie konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass sich bei Hodgkin-Lymphomen für JAK2 tatsächlich Amplifikationen nachweisen lassen [86]. NF1B hingegen ist ein Gen, das für Proteine der Nuklear-Faktor-1-Familie, einer anderen Gruppe von Transkriptionsfaktoren, kodiert und sich in der Vergangenheit bei pleomorphen Adenomen der Speicheldrüsen [165] und Virus-induzierten Lymphomen [166] überexprimiert nachweisen ließ.

Weitere Gene, die eine Rolle in der Onkogenese der PMBCL spielen könnten, sind diejenigen für PDL1 und PDL2, Mitglieder der B7-Familie, welche für Regulatoren der T-Zell-vermittelten Immunantwort kodieren [82; 83; 84; 167], sowie SMARCA2, das, wie bereits erwähnt, vermutlich als Regulatorgen des Chromatins dient [15]. Alle drei Gene sind ebenfalls auf Chromosom 9 lokalisiert.

Außerdem wurde in der Literatur eine vermehrte Expression von CDKN2-alpha, einem Gen, das sowohl für einen Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitor als auch für ein Stabilisatorprotein des Gens P53 kodiert, beschrieben. Beide spielen in der Zellzykluskontrolle eine wichtige Rolle und könnten somit im Falle einer Aberration Ursache maligner Zelltransformationen sein. Der Locus für CDKN2-alpha befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 [168].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen früherer Arbeiten ließen sich in unserer Analyse keine rekurrenten Zugewinne auf Chromosom 6 [159] und Chromosom 12 [101] nachweisen.

5. Zusammenfassung

Diffuse großzellige B-Zell Lymphome (DLBCL) gehören zu den häufigsten lymphatischen Tumoren. Die histologische Klassifikation dieser großen Gruppe von Tumoren ist noch immer durch die mangelnde Reproduzierbarkeit in der Diagnostik geprägt. Außerdem verhalten sich DLBCL klinisch ausgesprochen heterogen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 184 DLBCL mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) untersucht. Die DLBCL waren im Vorfeld mittels cDNA-microarray-basierter Genexpressionsanalyse in solche vom Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL, 87 Fälle) sowie solche vom aktivierten B-Zelltyp (ABC-DLBCL, 78 Fälle) eingeteilt worden. Weiterhin enthielt das untersuchte Kollektiv primär mediastinale DLBCL (PMBCL, 19 Fälle). Die CGH sollte hierbei Aufschluss über rekurrente chromosomale Aberrationen geben.

Innerhalb der Gruppe der GCB-DLBCL fanden sich bei 80 % der Tumoren genetische Aberrationen. Zugewinne auf Chromosom 12 (minimale Überlappungsregionen 12p und 12cen-q14) wurden in 22 % der Fälle detektiert und erwiesen sich damit für diese Gruppe als signifikant. Tumoren vom Typ der ABC-DLBCL zeigten in 81 % der Fälle genetische Veränderungen. Für diesen Subtyp charakteristisch waren hierbei Zugewinne auf Chromosom 3 (minimale Überlappungsregionen 3p, 3cen-q26 und 3q27-qter), die sich in 40 % der Fälle fanden, sowie Zugewinne auf Chromosom 18 (minimale Überlappungsregion 18q21), welche in 33 % der Fälle nachgewiesen werden konnten. Ebenfalls für diesen Subtyp typisch waren Verluste auf Chromosom 6 (minimale Überlappungsregion 6q21-q24), die in 45 % der Fälle detektiert wurden. In der Gruppe der PMBCL zeigten sich in 84 % der Fälle genetische Aberrationen. Für diese Gruppe erwiesen sich hierbei insbesondere Zugewinne auf Chromosom 2 (minimale Überlappungsregion 2p14-p16), die sich in 53 % der Fälle fanden, sowie Zugewinne auf Chromosom 9 (minimale Überlappungsregion 9p), welche in 42 % der Fälle nachzuweisen waren, als charakteristisch. Bei Vergleich der PMBCL mit den beiden anderen Subtypen erwies sich weiterhin ein Fehlen von Verlusten auf Chromosom 6 (minimale Überlappungsregion 6q13-q22) als typisch.

Somit zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass sich die mittels Genexpressionsanalysen definierten Subtypen der DLBCL bezüglich ihrer rekurrenten genetischen Aberrationen signifikant unterscheiden. Diese sind für jede der einzelnen Subgruppen charakteristisch. Die Ergebnisse stützen daher die Annahme, dass die unterschiedlichen, mittels Genexpression definierten DLBCL-Subtypen jeweils eigenständige Tumorentitäten darstellen.

6. Literaturangaben

1. HANAHAHAN D, WEINBERG RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
2. JAFFE ES, HARRIS NL, STEIN H, VARDIMAN JW ET AL: World Health Organization classification of tumors: Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press 2001
3. KIPPS TJ: The CD5 B cell. *Adv Immunol* 1989, 47: 117-185
4. INGHIRAMI G, FOITL DR, SABICHI A, ZHU BY, KNOWLES DM: Autoantibody-associated cross-reactive idiotype-bearing human B lymphocytes: distribution and characterization, including VH gene and CD5 antigen expression. *Blood* 1991; 78: 1503-1515
5. MCHEYZER-WILLIAMS L, DRIVER D, MCHEYZER-WILLIAMS L M: Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 52-59
6. LIU YJ, ZHANG J, LANE PJ, CHAN EY, MACLENNAN IC: Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T-cell-dependent and T-cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2951-2962
7. MACLENNAN IC: Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 117-139
8. HARRIS NL, JAFFE ES, STEIN H, BANKS PM, CHAN JKC, CLEARY ML, DELSOL G, DE WOLF-PEETERS C, FALINI B, GATTER KC ET AL: A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994; 84: 1361

9. MOLLER P, LAMMLER B, EBERLEIN-GONSKA M, FEICHTER GE, HOFMANN WJ, SCHMITTECKERT H, OTTO HF: Primary mediastinal clear cell lymphoma of B-cell type. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1986; 409: 79-92
10. PERRONE T, FRIZZERA G, ROSAI J: Mediastinal diffuse large cell lymphoma with sclerosis. A clinicopathologic study of 60 cases. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 176-191
11. ISAACSON PG, NORTON AJ, ADDIS BJ: The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet* 1987; 2: 1488-1491
12. DAVIS RE, DORFMAN RF, WARNKE RA: Primary large cell lymphoma of the thymus: A diffuse B-cell neoplasm presenting as primary mediastinal lymphoma. *Hum Pathol* 1990; 21: 1262-1268
13. JAFFE ES, ZARATE-OSORNO A, MEIDEIROS LJ: The interrelationship of Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's lymphomas – lessons learned from composite and sequential malignancies. *Semin Diagn Pathol* 1992; 9: 297-303
14. SAVAGE KJ, MONTI S, KUTOK JL, CATTORETTI G ET AL: The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 102: 3871-3879
15. ROSENWALD A, WRIGHT G, KAREN L, XIN Y, ET AL: Molecular diagnosis of primary mediastinal B-cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B-cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003, 198: 851-862

16. JAFFE ES, MUELLER-HERMELINK HK: Relationship between Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's lymphomas. In Hodgkin's disease, Lippincott Williams & Wilkens, Philadelphia, 1999; PA 181-191
17. BARTH T, LEITHAEUSER F, JOOS S, BENTZ M, MOELLER P: Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: Where do we stand? *Lancet Oncol* 2002; 3: 229-234
18. LENNERT K: Morphology and classification of malignant lymphomas and so-called reticuloses. *Acta Neuropathol Suppl (Berl)* 1975; Suppl 6: 1-16
19. LENNERT K: Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome (nach der Kiel-Klassifikation). Springer-Verlag, Berlin, 1981
20. LENNERT K: Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome (nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation). Springer-Verlag, Berlin, 1990
21. PROJECT, T.N.-H.s.L.P.C.: National Cancer Institute sponsored study of classifications of Non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982; 49: 2112-2135
22. FELLER A, DIEBOLD J: Histopathology of nodal and extranodal Non-Hodgkin's lymphomas. Based on the WHO classification. Springer-Verlag Berlin 2004, PA 75-99
23. ENGELHARD M, BRITTINGER G, HUHN D ET AL: Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: Distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood* 1997; 89: 2291-2297

24. FERNANDEZ DE SEVILLA S, ROMAGOSA V, DOMINGO-CLAROS A ET AL: Diffuse large B-cell lymphoma: Is morphologic subdivision useful in clinical management? *Eur J Haematol* 1998; 60: 202-208
25. BARS J, DE JONG D, WILLEMSE E ET AL: Diffuse large B-cell Non-Hodgkin lymphomas: The clinical relevance of histological subclassification. *Br J Cancer* 1999; 79: 1770-1776
26. DIEBOLD J, ANDERSON J, ARMITAGE J ET AL: Diffuse large B-cell lymphoma: A clinicopathologic analysis of 444 cases classified according to the updated Kiel classification. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 97-104
27. THE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA CLASSIFICATION PROJECT: A clinical evaluation of the international lymphoma study group classification of Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 89: 3909-3918
28. ARMITAGE JO, WEISENBURGER DD: New approach to classifying Non-Hodgkin's lymphomas: Clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's lymphoma classification project. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2780-2795
29. CAZALS-HATEM D, LEPAGE E, BRICE P, FERRANT A ET AL: Primary mediastinal large B-cell lymphoma. A clinicopathologic study of 141 cases compared with 916 non-mediastinal large B-cell lymphomas, a Gela ("Groupe d'étude des lymphomes de l'adulte") study. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 877-888
30. HORNING SJ, ROSENBERG SA: The natural history of initially untreated low-grade Non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984; 311: 1471-1475
31. NAKAMURA N, ABE M: Richter syndrome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pathol Int* 2003; 53: 195-203

32. GONZALEZ C, MEDEIROS L, JAFFE E: Composite lymphoma. A clinicopathologic analysis of nine patients with Hodgkin's disease and B-cell Non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 81-89
33. ZARATE-OSORNO A, MEDEIROS L, JAFFE E: Non-Hodgkin's lymphomas arising in patients successfully treated for Hodgkin's disease. A clinical, histologic, and immunphenotypic study of 14 cases. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 885-895
34. BISHOP P, WILSON D, PEARSON D, JANIK J, JAFFE E, ELWOOD P: CNS involvement in primary mediastinal large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2479-2485
35. SHIPP M, HARRIS N, MAUCH P: The Non-Hodgkin's lymphomas. In De Vita Vt, Hellman S, Rosenberg S Eds. *Principles And Practice Of Oncology*. Philadelphia: Lippincott, 1997
36. COFFIER B: Diffuse large cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2001; 13: 325-334
37. CARBONE PP, KAPLAN HS, MUSSHOF K, SMITHERS DW, TUBIANA M: Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* 1971; 31: 1860-1861
38. LISTER TA, CROWTHER D, SUTCLIFFE SB, GLATSTEIN E, CANELLOS GP, YOUNG RC, ROSENBERG SA, COLTMAN CA, TURBIANA M: Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1630-1636
39. ROSENBERG SA: Validity of the Ann Arbor staging classification for the Non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat Rep* 1977; 61: 1023-1027

40. WAITS TM, GRECO FA, GREER JP, JOHNSON DH, WOLFF SN, STEIN RS ET AL: Effective therapy for poor-prognosis Non-Hodgkin's lymphoma with 8 weeks of high-dose-intensity combination chemotherapy. *J Clin Oncol* 1993; 11: 943-949
41. DENARDO GL, LAMBORN KR, DENARDO SJ, GOLDSTEIN DS, DOLBER-SMITH EG ET AL: Prognostic factors for radioimmunotherapy in patients with B-lymphocytic malignancies. *Cancer Res* 1995; 55: 5893-5898
42. COFFIER B, LEPAGE E, BRIERE J, HERBRECHT R, TILLY H, BOUABDALLAH R, MOREL P, VAN DEN NESTE E ET AL: Chop chemotherapie plus rituximab compared with chop alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *New Engl J Med*. 2002; 346: 235-242
43. THE INTERNATIONAL NON-HODGKIN'S LYMPHOMA PROGNOSTIC FACTORS PROJECT: A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329, 987-994
44. SHIPP M: Prognostic factors in aggressive Non-Hodgkin's lymphoma: Who has "high-risk" disease? *Blood* 1994; 83:1165-73
45. KNOWLES D: Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. In Knowles D Ed. *Neoplastic Hematopathology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; PA 93-226
46. CHANG K, ARBER D, WEISS L: CD20: A review. *Appl Immunohistochem* 1996; 4: 1-14

47. MASON D, CORDELL J, BROWN M ET AL: CD79a: A novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood* 1995; 86: 1453-1459
48. CALAMINICI M, PIPER K, LEE A, NORTON A: CD23 expression in mediastinal large B-cell lymphomas. *Histopathology* 2004; 45: 619-624
49. BURNS B, WARNKE R DOGGETT R, ROUSE R: Expression of a T-cell antigen by B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 1983; 113: 165-171
50. HARADA S, SUZUKI R, UEHIRA K ET AL: Molecular and immunological dissection of diffuse large B-cell lymphoma: CD5+, and CD5- with CD10+ groups may constitute clinically relevant subtypes. *Leukemia* 1999; 13: 1441-1447
51. YAMAGUCHI M, OHNO T, OKA K: De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: Clinical characteristics and therapeutic outcome. *Br J Haematol* 1999; 5: 1113-1139
52. KROFT S, HOWARD M, PICKER L, ANSARI M, AQUINO D, MCKENNA R: De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphomas – a heterogeneous group containing an unusual form of splenic lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2000
53. YAMAGUCHI M, SETO M, OKAMOTO M ET AL: De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: A clinicopathologic study of 109 patients. *Blood* 2002; 99: 815-822
54. KATZENBERGER T, LOHR A, SCHWARZ S ET AL: Genetic analysis of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphomas suggests an origin from a somatically mutated CD5+ progenitor B cell. *Blood* 2003; 101: 699-702

55. SCHENA M, SHALON D, DAVIS RW, BROWN PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complimentary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470
56. DE RISI J, PENLAND L, BROWN P ET AL: Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet* 1996; 14: 457-460
57. GOLUB TR ET AL: Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 229: 531-537
58. ALIZADEH AA, EISEN MB, DAVIS RE ET AL: The lymphochip: A specialized cDNA microarray for genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1999; 64: 71-8
59. ALIZADEH AA, EISEN MB, DAVIS RE ET AL: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-511
60. HSU F, LEVY R: Preferential use of the VH4 Ig gene family by diffuse large cell lymphoma. *Blood* 1995; 86: 3072-3082
61. LOSSOS I, OKADA C, TIBSHIRANI R, WARMKE R, VOSE J, GREINER T, LEVY R: Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000; 95: 1797-1803
62. ROSENWALD A, WRIGHT G, CHAN WC, CONNORS JM, CAMPO E, FISHER RI, GASCOYNE RD, MÜLLER-HERMELINK HK ET AL: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937-1947

63. SHPP MA, ABELOFF MD, ANTMAN KH ET AL: International consensus conference on high-dose therapy with hematopoietic stem cell transplantation in aggressive Non-Hodgkin's lymphomas: Report of the jury. *J Clin Oncol* 1999; 17: 423-429
64. HUANG J, SANGER W, GREINER T ET AL: The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002; 99: 2285-2290
65. GROGAN T, LIPPMAN S, SPIER C: Independent prognostic significance of the nuclear proliferation antigen in diffuse large-cell lymphoma as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood* 1988; 71: 1157-1160
66. SILVESTRINI R, COSTA A, BORRACHI P, GIARDINI R, RILKE F: Cell proliferation as a long-term prognostic factor in diffuse large cell lymphomas. *Int J Cancer* 1993; 71: 1157-1160
67. MILLER T, LIPPMAN S, SPIER C, SLYMEN D, GROGAN T: HLA-DR (Ia) immune phenotype predicts outcome for patients with diffuse large cell lymphoma. *J Clin Invest* 1988; 82: 370-372
68. GROTENDORST GR: Connective tissue growth factor: A mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 171-179
69. DAVIS RE, BROWN KD, SIEBENLIST U, STAUDT LM: Constitutive Nuclear Factor kappa B activity is required for survival of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *J Exp Med* 2001; 194: 1861-1874
70. BALDWIN AS: Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappa B. *J Clin Invest* 2001; 107: 241-246

71. LAM LT, DAVIS RE, PIERCE J ET AL: Small molecule inhibitors of I kappa B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 28-40
72. LOSSOS I, CZERWINSKI D, ALIZADEH A, WECHSER M, TIBSHIRANI R, BOTSTEIN D, LEVY R: Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *New Eng J Med* 2004; 350: 1828-1837
73. ONIZUKA T, MORIYAMA M, YAMOCHI T ET AL: Bcl-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood* 1995; 86: 28-37
74. ALLMAN D, JAIN A, DENT A ET AL: Bcl-6 expression during B-cell activation. *Blood* 1996; 87: 5257-5268
75. COPIE-BERGMAN C, BOULLAND M, DEHOULLE C, MOELLER P, FARCET J, DYER M, HAIOUN C, ROMEO P ET AL: Interleukin 4-induced gene 1 is activated in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101: 2756-2761
76. COPIE-BERGMAN C, PLONQUET A, ALONSO A, BOULLAND M, MARQUET J, DIVINE M, MOELLER P, LEROY K, GAULARD P: MAL expression in lymphoid cells: Further evidence for MAL as a distinct molecular marker of primary mediastinal large B-cell lymphomas. *Mod Pathol* 2002; 15: 1172-1180
77. STEIN H, GERDES J, SCHWAB U, LEMKE H, DIEHL V, MASON DY, BARTELS H, ZIEGLER A: Evidence for the detection of the normal counterpart of Hodgkin and Sternberg-Reed cells. *Hematol Oncol* 1983; 1: 21-29

78. PEH SC, KIM LH, POPPEMA S: TARC, a CC chemokine, is frequently expressed in classic Hodgkin's lymphoma but not in NLP Hodgkin's lymphoma, T-cell-rich B-cell lymphoma, and most cases of anaplastic large cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 925-929
79. KUPPERS R, KLEIN U, SCHWERING I, DISTLER V, BRAUNINGER A, CATTORETTI G, TU Y ET AL: Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest* 2003; 111: 529-537
80. ROY B, BHATTACHARJEE A, XU B, FORD D, MAIZEL AL, CATHCART MK: Il-13 signal transduction in human monocytes: Phosphorylation of receptor components, association with JAK's, and phosphorylation/ activation of STAT's. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 580-589
81. CHUNG J, PARK Y, YE H, WU H: All TRAF's are not created equal: Common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 2002; 115: 679-688
82. FREEMAN G, LONG A, IWAI Y, BOURQUE K ET AL: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192: 1027-1034
83. LATCHMAN Y, WOOD C, CHERNOVA T, CHAUDHARY D, BORDE M, CHERNOVA I, IWAI Y ET AL: PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2: 261-268
84. DONG H, STROME S, SALOMAO D, TAMURA H, HIRANO F, FLIES D, ROCHE P, LU J, ZHU G, TAMADA K ET AL: Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8: 793-800

85. DONG H, CHEN L: B7–H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity. *J Mol Med* 2003; 81: 281-287
86. JOOS S, KUEPPERS M, OHL S, VON BONIN F, MECHTERSHEIMER G, BENTZ M, MARYNEN P, MOELLER P, PFREUNDSCHUH M, TRUEMPER L, LICHTER P: Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Research* 2000; 60: 549-552
87. PALANISAMY N, ABOUL-ELELLA A, CHAGANTI S, HOULDSWORTH J, OFFIT K, LOUIE D ET AL: Similar patterns of genomic alterations characterize primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 33: 114-122
88. HOULDSWORTH J, MATHEW S, RAO P, DYOMINA K, LOUIE D, PARSA N, OFFIT K, CHAGANTI R: Rel proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* 1996; 87: 25-29
89. MATHEW S, MURTY V, DALLA-FAVERA R, CHAGANTI R: Chromosomal localization of genes encoding the transcription factors, c-rel, NF-kappa Bp50, NF-kappa Bp65, and Iy-10 by fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1993; 8: 191
90. MONNI O, JOENSUU H, FRANSSILA K, KNUUTILA S: DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma – comparative genomic hybridization study. *Blood* 1996; 87: 5269-5278
91. MONNI O, JOENSUU H, FRANSSILA K, KLEFSTROM J, ALITALO K, KNUUTILA S: Bcl-2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1997; 90: 1168-1174

92. WEISS LM, WARNKE RA, SKLAR J, CLEARY ML: Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987; 317: 1185
93. AISENBERG AC, WILKES BM, JACOBSON JO: The Bcl-2 gene is rearranged in many diffuse B-cell lymphomas. *Blood* 1988; 71: 969-972
94. RAO P, HOULDSWORTH J, DYOMINA: Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92: 234-240
95. STOKKE T, DE ANGELIS P, SMEDSHAMMER L, GALTELAND E, STEEN HB, SMELAND, EB, DELABIE J, HOLTE H: Loss of chromosome 11q21-23.1 and 17p and gain of chromosome 6p are independent prognostic indicators in B-cell Non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 2001; 85: 1900-1913
96. BERGLUND M, ENBLAD G, FLORDAL E, LUI W, BACKLIN C, THUNBERG U ET AL: Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Mod Pathol* 2002; 15: 807-817
97. WESSENDORF S, SCHWAENEN C, KOHLHAMMER H, KIENLE D, WROBEL G, BARTH T, NESSLING M, MOELLER P, DOEHNER H, LICHTER P, BENTZ M: Hidden gene amplifications in aggressive B-cell Non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 2003; 22: 1425-1429
98. ZHANG X, KARNAN S, TAGAWA H, SUZUKI R, TSUZUKI S, HOSOKAWA Y, MORISHIMA Y ET AL: Comparison of genetic aberrations in CD10+ diffused large B-cell lymphoma and follicular lymphoma by comparative genomic hybridization and tissue-fluorescence in situ hybridization. *Cancer Sci* 2004; 95: 809-814

99. TAGAWA H, TSUZUKI S, SUZUKI R, KARNAN S, OTA A, KAMEOKA Y, SUGURO M, MATSUO K, YAMAGUCHI M ET AL: Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of diffuse large B-cell lymphoma: Comparison between CD5-positive and CD5-negative cases. *Cancer Res* 2004; 64: 5948-5955
100. KARNAN S, TAGAWA H, SUZUKI R, SUGURO M, YAMAGUCHI M, OKAMOTO M, MORISHIMA Y, NAKAMURA S, SETO M: Analysis of chromosomal imbalances in de novo CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 77-81
101. JOOS S, OTANO-JOOS MI, ZIEGLER S, BRUEDERLEIN S, DU MANOIR S, BENTZ M, MOELLER P, LICHTER P: Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood* 1996; 87: 1571-1578
102. BENTZ M, BARTH T, BRUEDERLEIN S, BOCK D, SCHWERER MJ, BAUDIS M, JOOS S, VIARDOT A, FELLER AC, MUELLER-HERMELINK HK ET AL: Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): Comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 30: 393-401
103. SCARPA A, TARUSCIO D, SCARDONI M, IOSI F, PARADISI S, ENNAS M, RIGAUD G, MOORE P, MENESTRINA F: Nonrandom chromosomal imbalances in primary mediastinal B-cell lymphoma detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 203-209

104. KALLIONIEMI A, KALLIONEMI OP, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN F, PINKEL D: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821
105. PETERSEN I, PETERSEN S, BOCKMÜHL U, SCHWENDEL A, WOLF G, DIETEL M: Comparative Genomische Hybridisierung an Bronchialkarzinomen und ihrer Metastasen. *Verh Dtsch Ges Path* 1997; 81: 297-305
106. KALLIONIEMI OP, KALLIONEMI A, PIPER J, ISOLA J, WALDMAN FM, GRAY JW, PINKEL D: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1994; 10: 231-243
107. FOROZAN F, KARHU R, KONONEN J, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP: Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 1997; 13: 405-409
108. JAMES L: Comparative genomic hybridization as a tool in tumor cytogenetics. *J Pathol* 1999; 187: 385-395
109. LICHTER P, BENTZ M, DU MANOIR S, JOOS S: Comparative genomic hybridization. *Human chromosomes: Principles and techniques*, Ed. 2. Herausgegeben von RS Verma, A Baba. New York, McGraw-Hill 1995: 191-210
110. NACHEVA EP, GRACE CD, BITTNER M, LEDBETTER DH, JENKINS RB, GREEN AR: Comparative genomic hybridization: A comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 100: 93-105

111. WEISS MM, HERMSEN MAJA, MEIJER NCT, VAN GRIEKEN, BAAK JPA, KUIPERS EJ, VAN DIEST PJ: Comparative genomic hybridization. *J Clin Pathol: Molec Pathol* 1999; 52: 243-251
112. DU MANOIR S, SCHROCK E, BENTZ M, SPEICHER MR, JOOS S, RIED T, LICHTER P, CREMER T: Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; 19: 27-41
113. WESTPHAL PH, YOUNG SS: Resampling-based multiple testing. New York, Ny: Wiley; 1993
114. SIMON RM, KORN EL MCSHANE LM, RADMACHER MD, WRIGHT GW, ZHAO Y: Design and analysis of cDNA microarray investigations. New York, Ny; Springer-Verlag 2003
115. WRIGHT G, TAN B, ROSENWALD A, HURT EH, WIESTNER A, STAUDT LM: A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9991-9996
116. BENTZ M, WERNER C, DOEHNER H, JOOS S, BARTH T, SIEBERT R, SCHRODER M, STILGENBAUER S, FISCHER K, MOELLER P, LICHTER P: High incidence of chromosomal imbalances and gene amplifications in the classical follicular variant of follicle center lymphoma. *Blood* 1996; 88: 1437-1444
117. MAO X, LILLINGTON D, CHILD F, RUSSEL-JONES R, YOUNG B, WHITTAKER S: Comparative genomic hybridization analysis of primary cutaneous B-cell lymphomas: Identification of common genomic alterations in disease pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35: 144-155

118. CHAN W, WONG N, CHAN A ET AL: Consistent copy number gain in chromosome 12 in primary diffuse large cell lymphomas of the stomach. *Am J Pathol* 1998; 152: 11-16
119. BARTH T, DOHNER H, WERNER C ET AL: Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. *Blood* 1998; 91: 4321-4330
120. HOUGH R, GOEPEL J, ALCOCK H, HANCOCK B, LORIGAN P, HAMMOND D: Copy number gain at 12q12-14 may be important in the transformation from follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Cancer* 2001; 84: 499-503
121. KHATIB Z, MATSUSHIME H, VALENTINE M, SHAPIRO D, SHERR C, LOOK A: Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res* 1993; 53: 5535-5541
122. FISCHER U, MELTZER P, MEESE E: Twelve amplified and expressed genes localized in a single domain in glioma. *Hum Genet* 1996; 98: 625-628
123. REIFENBERGER G, REIFENBERGER J, ICHIMURA K, MELTZER P, COLLINS V: Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: Preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS and MDM2. *Cancer Res* 1994; 54: 4299-4303
124. BERNER J, FORUS A, ELKAHLOUN A, MELTZER P, FODSTAD O, MYKLEBOST O: Separate amplified regions encompassing CDK4 and MDM2 in human sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 17: 254-259

125. FINNEGAN M, GOEPEL J, ROYDS J, HANCOCK B, GOYNS M: Elevated levels of MDM2 and p53 expression are associated with high grade Non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Lett* 1994; 86: 215-221
126. XU Q, REED J: Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Molec Cell* 1998; 1: 337-346
127. SANCHEZ E, CHACON I, MUNOZ E ET AL: Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1931-1939
128. MILLER C, ASLO A, WON A, TAN M, LAMPKIN B, KOEFFLER H: Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 559-565
129. HENSEL C, HSIEH C, GAZDAR A, JOHNSON B, SAKAGUCHI A, NAYLOR S, LEE W, LEE E: Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small lung cell cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 3067-3072
130. PETERSEN I, BUJARD M, PETERSEN S, WOLF G, GOEZE A, SCHWENDEL A, LANGRECK H, GELLERT K ET AL: Patterns of imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1997; 57: 2331-2335
131. WEIDE R, DOWDING C, SUCAI B, BUNGEY J, CHASE A, GOLDMAN J: Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human high grade Non-Hodgkin's lymphoma cell line. *Br J Haematol* 1991; 78: 500-505

132. WEIDE R, TIEMANN M, PFLUGER K, KOPPLER H, PARVIZL B, WACKER H, KREIPE H, HAVEMANN K, PARWARESCH M: Altered expression of the retinoblastoma gene product in human high grade Non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 1994; 8: 97-101
133. GERADTS J, ANDRIKO J, ABBONDANZO S: Loss of tumor suppressor gene expression in high-grade but not in low-grade Non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 669-674
134. FRANKE S, WLODARSKA I, MAES B, VANDENBERGHE P, ACHTEN R, HAGEMEIJER A, DE WOLF-PEETERS C: Comparative genomic hybridization pattern distinguishes T-cell-/ histiocyte-rich B-cell lymphoma from nodular lymphocyte predominance Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 2002; 161: 1861-1867
135. JACOBSON J, WILKES B, KWAIATKOWSKI D, MEDEIROS L, AISENBERG A, HARRIS N: Bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer* 1993; 72: 231-236
136. GASCOYNE RD, ADOMAT SA, KRAJEWSKI S ET AL: Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 244-251
137. TSUJIMOTO Y, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM: Involvement of the Bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228: 1440-1443
138. PEZZELLA F, TSE AG, CORDELL JL, PULFORD KA, GATTER KC, MASON DY: Expression of the Bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137: 225-232

139. LOUIE D, KANT J, BROOKS J, REED J: Absence of t(14;18) major and minor breakpoints and of Bcl-2 protein overproduction in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1991; 139: 1231-1237
140. LAMBRECHTS A, LOOIJENGA L, VAN'T VEER M, VAN ECHTEN J, TIMENS W, OOSTERHUIS J: Lymphomas with testicular localization show a consistent Bcl-2 expression without a translocation t(14;18): A molecular and immunohistochemical study. *Br J Cancer* 1995; 71: 73-77
141. WILSON W, TERUYA-FELDSTEIN J, FEST T: Relationship of p53, Bcl-2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in Non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997; 89: 601-609
142. HILL ME, MACLENNAN KA, CUNNINGHAM DC ET AL: Prognostic significance of Bcl-2 expression and Bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell Non-Hodgkin's lymphoma: A british national lymphoma investigation study. *Blood* 1996; 88: 1046-1051
143. GASCOYNE R, KRAJEWSKA M, KRAJEWSKA S, CONNORS J, REED J: Prognostic significance of Bax protein expression in diffuse aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 3171-3178
144. WEBER T, WEBER R, KAULICH K ET AL: Characteristic chromosomal imbalances in primary central nervous system lymphomas of the diffuse large B-cell type. *Brain Pathol* 2000; 10: 73-84
145. STENMAN G, SANDROS J, MARK J, ERDSTROEM S: Partial 6q deletion in a human salivary gland adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 39: 153-156

146. MILLIKIN D, MEESE E, VOGELSTEIN B, WITKOWSKI C, TRENT J: Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5449-5453
147. MORITA R, SAITO S, ISHIKAWA J, OGAWA O, YOSHIDA O, YAMAKAWA K, NAKAMURA Y: Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q and 10q in renal carcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5817-5820
148. HAYASHI Y, RAIMONDI S, LOOK A, BEHM F, KITCHINGMAN G, PUI C, RIVERA G, WILLIAMS D: Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990; 76: 1626-1630
149. BENTZ M, HUCK K, DU MANOIR S, JOOS S, WERNER C, FISCHER K, DOEHNER H, LICHTER P: Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 1995; 85: 3610-3618
150. STAROSTIK P, GREINER A, SCHULTZ A, ZETTL A, PETERS K, ROSENWALD A, KOLVE M, MUELLER-HERMELINK H: Genetic aberrations common in gastric high-grade large B-cell lymphoma. *Blood* 2000; 95: 1180-1187
151. NESS G, LYBOEK H, ARNES J, RODAHL E: Chromosomal imbalances in lymphoid tumors of the orbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 9-14
152. WADE P: Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: Molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 693-698

153. LO COCO F, GAIDANO G, LOUIE D, OFFIT K, CHAGANTI R, DALLA-FAVERA R: P53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993; 82: 2289-2295
154. SANDER C, YANO T, CLARK H ET AL: P53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993; 82: 1994-2004
155. MARTINEZ-CLIMENT J, ALIZADEH A, SEGRAVES, BLES A D, RUBIO-MOSCARDO F, ALBERTSON D ET AL: Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 2003; 101: 3109-3117
156. GASCOYNE R: Pathologic prognostic factors in aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11: 847-862
157. ICHIKAWA A, KINOSHIA T, WATANABE T ET AL: Mutations of the p53 gene as prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *New Engl J Med* 1997; 337: 529-534
158. LEROY K, HAIOUN C, LEPAGE E ET AL: P53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol* 2002; 13: 1108-1115
159. RIGAUD G, MOORE PS, TARUSCIO D ET AL: Alteration of chromosome arm 6p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma, as identified by genome-wide allotyping. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 31: 191-195
160. BOSE HR: The Rel family: Models for transcriptional regulation and oncogenetic transformation. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1114:1

161. MOELLER P, HERRMANN B, MOLDENHAUER G, MOMBURG F: Defective expression of MHC class I antigens is frequent in B-cell lymphomas of high-grade malignancy. *Int J Cancer* 1987; 40: 32
162. LIU P, KELLER J, ORTIZ M ET AL: Bcl-11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol* 2003; 4: 525-532
163. SATTERWHITE E, SONOKI T, WILLIS T ET AL: The Bcl-11 gene family: involvement of Bcl-11a in lymphoid malignancies. *Blood* 2001; 98: 3413-3420
164. WEBER-NORDT R, MERTELSMANN R, FINKE J: The JAK-STAT pathway: Signal transduction involved in proliferation, differentiation and transformation. *Leuk Lymphoma* 1998; 28: 459-467
165. GEURTS J, SCHOENMAKERS E, ROIJER E, ASTROM A, STENMAN G, VEN DE VEN W: Identification of NF1B as recurrent translocation partner gene of HMGIC in pleomorphic adenomas. *Oncogene* 1998; 16: 865-872
166. ETHELBERG S, HALLBERG B, LOVMAND J, SCHMIDT J, LUZ A, GRUNDSTROM T, PEDERSEN FS: Second-site proviral enhancer alterations in lymphomas induced by enhancer mutants of SL3-3 murine leukemia virus: Negative effect of Nuclear Factor 1 binding site. *J Virol* 1997; 71: 1196-1206
167. DONG H, ZHU G, TAMADA K, CHEN L: B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and Interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5: 1365-1369
168. SCARPA A, MOORE PS, RIGAUD G, INGHIRAMI G, MONTRESOR M, MENEGAZZI M, TODESCHINI G, MENESTRINA F: Molecular features of primary mediastinal B-cell lymphoma: Involvement of p16INK4A, p53 and c-myc. *Br J Haematol* 1999; 107: 106-113

7. Abkürzungen

ampl	Amplifikation (amplification)
ABC-DLBCL	DLBCL vom aktivierten B-Zelltyp (activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bcl	Proto-Onkogen (B-cell lymphoma protein)
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
CGH	Komparative Genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization)
c-rel	Promoterprotein (cell-related protein)
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
del	Deletion (deletion)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (diffuse large B-cell lymphoma)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleoid acid)
DNAse	Desoxyribonuclease
dNTP mix	Desoxynucleotidtriphosphat-Mix
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
GCB-DLBCL	DLBCL vom Keimzentrumstyp (germinal centre like diffuse large B-cell lymphoma)
Ig	Immunglobulin
LLMPP	Lymphoma/ Leukemia Molecular Profiling Project
Mb	Megabasen
min	Minute
mM	Millimolar

mmol	Millimol
NF-kappa B	Transkriptionsfaktor (nuclear factor-kappa B)
NP-40	Tergitol (Type NP-40)
PMBCL	primär mediastinales DLBCL (primary mediastinal diffuse large B-cell lymphoma)
REAL	Revised European American Lymphoma Classification
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleoid acid)
RNAse	Ribonuclease
SSC	Natriumzitat (sodiumchloride sodium citrate)
U	Umdrehungen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

8. Anhang

Tabelle I Analysierte Fälle der GCB-DLBCL mit Zugewinnen/ Verlusten

Tabelle II Analysierte Fälle der ABC-DLBCL mit Zugewinnen/ Verlusten

Tabelle III Analysierte Fälle der PMBCL mit Zugewinnen/ Verlusten

Abbildung I Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines GCB-DLBCL

Abbildung II Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines ABC-DLBCL

Abbildung III Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines PMBCL

Tabelle I: Zugewinne und Verluste innerhalb der Gruppe der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome vom Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL)

Fall	Geschlecht	Alter	Histologie	Zugewinne	Amplifikationen	Verluste
L002	m	32	VII	-	-	6q13-q24
L003	w	70	I	-	2p14-p16, 2p22, 18q21, Xq22-q23	2p25-pter, 2cen-q23, 6q23-qter, 10q22-q23, 15q21-qter, 16q21-qter, 17p13-pter, 18p
L006	m	47	III	1q21-q42, 4q31-qter, 5, 10p, 13q31, Xq	12q12, 12q14, 15cen-q14	1p22, 4p, 4cen-q28, 13q33-qter, 18q22-qter, Xp21-pter
L009	m	85	I	11q14-qter, 18q	-	-
L013	m	32	II	-	-	-
L014	w	76	I	2q31-qter, 12	8q24	9p21-pter, 18q23-qter, Xp21-pter
L016	m	77	II	12, X	-	6q13-q16, 6q23-q24
L019	m	33	VI	7q, 12cen-q22, 13q31	-	-
L024	w	50	I	7	-	6q14-qter, 15q21-qter, 17p13-pter
L027	m	34	VII	2q22-qter, 10p, X	-	17p13-pter
L035	m	59	I	-	-	-
L041	m	45	VII	-	-	-
L045	m	75	I	-	-	-
L051	w	69	III	X	-	-
L054	m	78	VII	3q27-qter	Xp22-pter	17p13-pter
L057	w	48	VII	7, 12cen-p12, 12p13-pter, 12cen-q15, 13q33-qter, 18	2p14-p16	2p21-pter, 6q16-q21, 13cen-q22, 17p12-pter
L059	m	72	I	-	-	6cen-q22
L063	w	73	I	2, 12	-	-
L065	w	83	VII	-	-	-
L072	w	59	I	11p13-pter	-	6q22-qter, 15q
L074	w	59	I	12	-	-

Fall	Geschlecht	Alter	Histologie	Zugewinne	Amplifikationen	Verluste
L088	m	86	I	6p, 6q27-qter, 7, 9q13-q33, 10, 11q21-qter, 12p, 12cen-q24.2	-	6q13-q21, 6q24, 18p11.3-pter, 18q22-qter
L092	w	81	I	-	-	6q13-q22
L095	m	72	I	-	-	6q23-qter
L097	w	38	I	-	-	-
L098	m	63	I	18q	-	18p
L100	w	75	II	2p16-pter, 5, 7q21-qter, 9q21-qter, 11q23-qter, 13, X	-	7p, 14q31-qter
L103	m	58	I	13q12-q21	-	-
L104	m	71	I	Xp21-pter	-	4q33-qter
L105	w	88	I	12	-	6q15-q22
L108	m	52	IV	-	-	-
L109	m	43	I	2p, 12cen-q13, 18cen-q22, X	-	8cen-q13, 13q21-q31
L110	m	75	VII	Xcen-p11.4	17p11	-
L114	m	66	I	6p24-pter, 18q	-	6cen-q21
L115	m	43	I	1cen-q41, 3q21-qter, 7p, 8q23-qter, 11q23-qter, 12	-	5p14-pter
L118	w	72	IV	-	-	-
L119	m	24	I	5, 7, 15	-	-
L127	m	46	III	5q15-qter, 7p, 12	-	-
L130	w	55	I	-	-	-
L132	w	73	I	2p14-p21, 6p, 15	-	6q21-qter, X
L137	m	86	I	3p	2p14-p16	4
L142	m	38	VI	1q	-	6q25-qter
L145	m	56	II	-	-	-
L146	w	29	I	1q, 2p14-p16, 8	-	6q13-qter, 13q, Xp22.1-ter
L158	m	69	II	12, X	-	6cen-q21
L163	m	61	I	2cen-p16, 7p, 10p	-	4q, 6q25-qter
L173	w	43	I	-	17p11.1-p11.2	-
L177	w	50	I	6p, 7, 8, 10, 12cen-q15	2p13-p16	6q25-qter
L181	m	64	VII	11	-	-
L183	w	70	I	-	-	-
L197	w	34	VII	7, 8q23-qter, 12q24-	2p14-p16	4q13-qter, 6q14-q24,

Fall	Geschlecht	Alter	Histologie	Zugewinne	Amplifikationen	Verluste
				qter		10q23-q24, 12q21-q23, 13q14-q22, 13q34-qter
L199	w	60	I	2cen-p21, 2q24-qter, 7cen-q31, 18q21-qter	-	1p21-pter, 2p22-pter, 2cen-q22, 6q14-q16, 13q
L202	w	55	III	-	1q23-q25, 8q24-qter	-
L205	m	68	II	6p23-pter	-	-
L211	m	65	I	-	1q31-q32	-
L219	w	59	I	-	-	-
L222	m	72	III	-	-	-
L223	m	75	I	6p, 8q22-qter	2p14-p21	6q, 8p21-pter
L228	w	66	I	-	-	-
L229	w	55	II	-	10q21, 11q23	X
L234	w	52	I	-	-	-
L241	w	79	I	-	-	-
L245	w	58	V	-	-	-
L247	m	59	II	-	-	-
L248	m	42	I	12	-	6cen-q23
L252	w	33	II	-	-	-
L262	w	71	I	12	-	10q23-qter, 13q21-q22
L263	m	33	VI	-	Xp11.2-p11.4	-
L266	m	47	I	2p15-p22, 2q31-qter, 3q25-q27, 5p, 7, 8q21.2-qter, 10p, 11p, 12, 13cen-q31, 16, 17q, 17cen-p11, 18p, 18cen-q22	3q28-qter	3p21-pter, 8p21-pter, 17p13-pter
L267	m	52	I	-	-	9p22-pter, 13q
L279	w	41	VII	16q	-	2q14.2-q24, 4p, 4cen-q31.1, 6q, 9p21-pter, 17p12-pter
L294	m	76	VII	-	2p14-p16	1p35-pter, 15q
L312	m	49	I	-	-	-
L321	m	54	I	-	-	-
L324	m	67	I	1q, 13q32-qter	-	15q
L325	w	59	I	7, 8	-	13q14-q22
L394	m	61	I	1q, 4p, 5,	Xp11.1-p11.3	6q

Fall	Geschlecht	Alter	Histologie	Zugewinne	Amplifikationen	Verluste
				6p, 7p, 7cen-q22, 11		
L398	m	63	VII	16	-	-
L399	m	54	VII	5, 7, 10p, 10cen-q22	-	6q, 10q25- qter
L407	w	53	IV	-	-	-
L409	m	49	VII	1cen-q42, 5q23, 6p, 8cen-q23, 12p, 12cen- q15, 13q14- qter, 18q, Xq22-qter	3q28-qter, 10q25- qter	3p36-pter, 4, 8p21-pter, 10q23, 16q21
L419	w	77	I	6p, 11, X	-	-
L421	w	65	I	13q21-q31	-	-
L428	m	69	I	1q43-qter, 6p, 13q31- qter	-	6q
L430	w	70	II	-	-	-
L432	w	52	I	6p22-pter	-	6q
L433	w	79	I	-	-	-

Tabelle I: I = zentroblastisch monomorph (cb mono); II = zentroblastisch polymorph (cb poly); III = immunoblastisch; IV = plasmablastisch; V = T-Zell-reich; VI = Burkitt-ähnlich; VII = unklassifizierbar; m = männlich; w = weiblich

Tabelle II: Zugewinne und Verluste innerhalb der Gruppe der diffusen großzelligen B-Zell Lymphome vom aktivierten B-Zelltyp (ABC-DLBCL)

Fall	Geschlecht	Alter	Histologie	Zugewinne	Amplifikationen	Verluste
L005	w	71	I	1q, 7q, 8q24-qter, 11q22-qter, 12q23-qter	-	6q21-q24, 8p22-pter, 10q25-qter
L008	m	45	I	3p, 3cen-q26, 3q27-qter, 11q13-qter, 13q	6q14, 14q22-q23, 18q21.3-q22	1p31-p34.3, 2q21-q24, 4q21-q26, 6q21-qter, 14q32-qter, 15cen-q21, 17p
L012	m	64	IV	2p14-2p21, 3cen-p13, 3cen-q12, 3q27-qter, 4q28-qter, 8q, 11, 15q, 18q21.1-qter, Xq21-qter	11p11.2, 11q23	2q14.2-qter, 6p22-pter, 8p, 16q
L022	w	67	II	1q, 3q, 5p, 5q, 7, 8, 10q, 17q, 18q	6p21, 10q11.2-q21, Xp22.1	3p, 6q13-q23, 17p
L032	w	68	VII	12q24-qter, 18	-	-
L040	w	72	II	3cen-p12, 3q, 9q	18q12-q22	6q16-q21
L043	m	55	II	3q25-qter, 5p, 10p, 10q23-qter, 11q13-qter, 12q, 14q, X	2p15-p16, 9p12-p13, 10q11.2, 15q21-q22, Xq27-qter	1p, 2p21-pter, 2cen-p14, 2q, 3q12-q24, 4q13-q26, 6q13-qter, 7p21-pter, 10q21-q22, 12p13-pter, 15q25-qter
L044	m	79	VI	7, 11p15-pter, 11q23-qter, 12p13-pter, 12q22-qter, 15q23-qter, X	6p12-p21.1	6q, 9p22-pter, 13q33-qter
L050	m	34	II	6q	-	9p21-pter
L058	w	83	VI	1q21-q25, 1q32, 3cen-p14, 3cen-q27, 18	1q31	-
L062	m	66	VII	-	8p23-pter, 18q21-	-

					qter	
L064	w	62	II	3, 11q14-q21, 18	-	-
L066	w	75	II	-	-	-
L068	m	49	III	-	-	-
L069	m	68	II	2q36-qter, 6p, 10cen-p11.2, 10cen-q22, 11	-	6q
L076	w	56	I	1q, 2p15-pter, 16	-	6q16-q22, 9q21-q22, 17p13-pter
L078	m	38	III	1q, 2p16-pter, 5p, 6p, 7p, 7cen-q22, 13q22-qter, 16	-	-
L080	m	41	I	16q	-	6p22-pter, 6q14-q23
L081	m	62	III	-	2p14-p16	-
L086	m	46	II	3p14-p21, 3q, 5p, 17q, X	6p24-pter, Xp21-p22.1	1q32-q41, 6q13-qter, 10p13-pter, 17p13-pter, 18q
L089	w	75	VII	-	-	-
L093	m	68	I	3q, 18	-	7q31
L107	w	18	III	-	-	-
L116	m	35	II	6p, 7, X	-	6q, 17p13-pter
L117	m	65	I	1, 2p, 3, 7p, 7cen-q11.2, 8q21-qter, 15, Xp, Xq23-q27	-	8p21-pter, 9q21-qter, 17p12-pter
L120	w	63	IV	3q22-qter, 6p22-pter, 17q23-qter	-	8p12-pter
L124	m	67	I	-	-	7p
L125	w	69	II	-	-	-
L134	m	73	I	3, 18p, 18cen-q12.3	4q13-q21, 18q21-qter	-
L139	w	77	IV	6p	-	6q
L141	w	80	V	-	-	-
L144	m	53	II	3cen-p14, 3q	18q21-qter	6q16-q22, 7p21-pter
L147	m	14	I	3p, 9, X	-	17p12-pter
L151	m	45	VII	3p21-p24	-	2q22, 2q32, 9q21-q22
L152	m	50	II	2p13-pter, 3, 11, 13q33-qter	14q22-q23, 15q24-q25	6q21-q26, 14cen-q21, 14q24-qter, 17p12-pter
L154	w	61	VIII	-	-	-
L157	?	?	I	-	-	-
L161	m	56	II	3cen-p12,	-	4q31-q33

				3q, 8q21-q24.2, 18q		
L165	m	79	II	-	-	6q14-qter, 13q14-qter
L166	w	59	I	4q23-q27, 5q21-q23, 9p21-pter	-	-
L180	w	25	IV	-	-	6q13-qter, 8p22-pter, 10q25-qter
L182	w	58	I	2p13-p16, 3q, 10p, 12q24-qter, 18q	3q27-qter	4, 5q31-qter, 6q16-q22, 9, 14q, 15q, 17p13-pter
L185	w	74	II	-	-	-
L189	m	74	IV	8q23-qter	-	-
L190	m	40	II	10p12-pter, Xp11-p21	-	4q13-q21, 14q31-qter
L191	m	74	VI	1q25-q41, 3p22-pter, 3q25-q27, 9q31-q33, 13q, 16, 18cen-q21	3q28-qter	5p14-pter, 6q13-qter
L194	w	66	VII	12, 18q	-	11p12-p14, 17p12-pter, 18p11.2-pter
L195	m	62	VII	4, 6p22-pter, 8q, 9p22-pter, 15	-	1q25-q31, 6q21-qter, 8p21-pter, 17p12-pter, 18q
L198	w	64	I	1cen-q31, 6p, 12p, 12cen-q21	-	-
L200	w	72	I	-	-	-
L203	m	46	I	13q22-q31, 15q23-qter	-	6q21-qter
L207	w	76	III	6p21-pter, 7, 8q21-q23	-	8p22-pter, X
L208	w	72	I	3p, 18	-	-
L212	m	82	I	2p, 3cen-p12, 3q, 9p, 10p, 10cen-q24	18q21-q22	2q21-q31, 4p15-pter, 6q15-q21
L216	m	77	III	1cen-p22	-	6q
L221	m	72	II	-	-	6q
L224	m	39	II	3	-	-
L227	w	80	I	-	-	-
L230	w	66	II	3	-	-
L231	w	80	I	-	-	6q, X
L272	m	57	I	3, 13cen-q14, 18q	-	6q15-q21, 18p
L275	w	75	VII	1q32-qter, 5	-	-
L277	m	54	III	-	-	-

L281	m	50	III	3cen-p21, 3p25-pter, 6p23-pter, Xp	-	6q22-qter, 17p13-pter
L303	w	45	II	3q27-qter, 4p16-pter, 5q35-qter, 8p21-pter, 8q24-qter, 9q, 14q22- q24, 18q21- qter	-	-
L313	m	72	III	3, 4q31.1- qter, 18	-	6p22-pter, 6q23-qter
L316	m	70	VI	1cen-q31, 3, 7, 12, 18q	-	6cen-q24, 18p
L318	w	80	I	7p, 7cen- q21	17q11-q12, 18q21	6q22-qter, 7q31-qter, 9p21-pter
L396	w	65	II	2p14-p23, 4q21, 9q33- qter, 16, 17q, 18q21- qter, Xp	-	2p24-pter, 6cen- p12, 6q, 7q31, 8p, 8cen-q22, 9p21-pter, 10p, 10cen-q21, 17p13-pter
L400	w	56	VI	-	-	6q15-qter
L401	m	76	I	2p16-pter, 3q24-q26, 18q21-qter	17q23-qter	6q15-qter
L404	w	62	III	3	-	1p34.2-pter, 1q32-qter, 14q24-qter, X
L408	m	41	II	-	-	-
L413	w	62	VII	-	-	-
L415	m	60	I	-	-	-
L427	w	77	II	6p, 18	-	6q
L429	m	67	II	5cen-p14, 5cen-q23, X	-	-
L431	m	73	I	2p16-pter, 3q, 3cen- p23, 3p24- pter, 7q32- qter, 9cen- p23, 14q, 16p13.2- pter, 18, X	3p23, 9p24-pter, 10q23-q24	6cen-q24, 17

Tabelle II: I = zentroblastisch monomorph (cb mono); II = zentroblastisch polymorph (cb poly); III = immunoblastisch; IV = plasmablastisch; V = T-Zell-reich; VI = Burkitt-ähnlich; VII = unklassifizierbar; VIII = anaplastisch; m = männlich; w = weiblich; ? = unbekannt

Tabelle III: Zugewinne und Verluste innerhalb der Gruppe der primär mediastinalen diffusen großzelligen B-Zell Lymphome (PMBCL)

Fall	Geschlecht	Alter	Histologie	Zugewinne	Amplifikationen	Verluste
L025	m	75	I	-	-	-
L077	?	?	I	Xp	2p14-p16	8p23-pter
L091	w	31	II	2p	-	8p21-pter, 15q26-qter, X
L123	w	75	I	2q23-qter, 3, 9p, 9cen-q21, 12p, 12cen-q22	-	14q32-qter
L129	w	29	VII	9cen-q13, 9cen-p23	9p24-pter	-
L169	m	31	I	2p13-pter, 9q, Xcen-p21, Xcen-q26	-	-
L172	w	45	I	-	-	6q24-qter
L179	m	54	I	2	-	-
L213	m	53	I	-	-	-
L249	m	46	VII	1q24-q31, 2p13-p16, 4q24-qter, 6p22-pter	-	1p, 2p24-pter, 6q23-q24
L255	w	20	I	2p14-p16, 8, 9, 11q23-qter	-	-
L298	w	45	II	3q24-q27, 8q22-qter, 18q12-qter	3q28-qter, 14q22-q24, 17p11	4, 14q31-qter, 18p
L311	m	37	III	5p15-pter, 15q24-qter, 18q	-	-
L315	m	73	I	2cen-p16, 7	-	2p24-pter
L322	w	26	I	2p, 9p, 9q, X	15q22	8p21-pter, 13q21-qter
L397	w	30	I	-	-	-
L406	w	32	I	2p, 2q33-qter, 3q28-qter, 4q24-q27, 9, 11, 18	-	4q31-qter
L423	w	29	VII	9	-	-
L435	m	34	I	9cen-p23	9p24-pter	-

Tabelle III: I = zentroblastisch monomorph (cb mono); II = zentroblastisch polymorph (cb poly); III = immunoblastisch; IV = plasmablastisch; V = T-Zell-reich; VI = Burkitt-ähnlich; VII = unklassifizierbar; m = männlich; w = weiblich; ? = unbekannt

Abbildung I: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms vom Keimzentrumstyp (GCB-DLBCL)

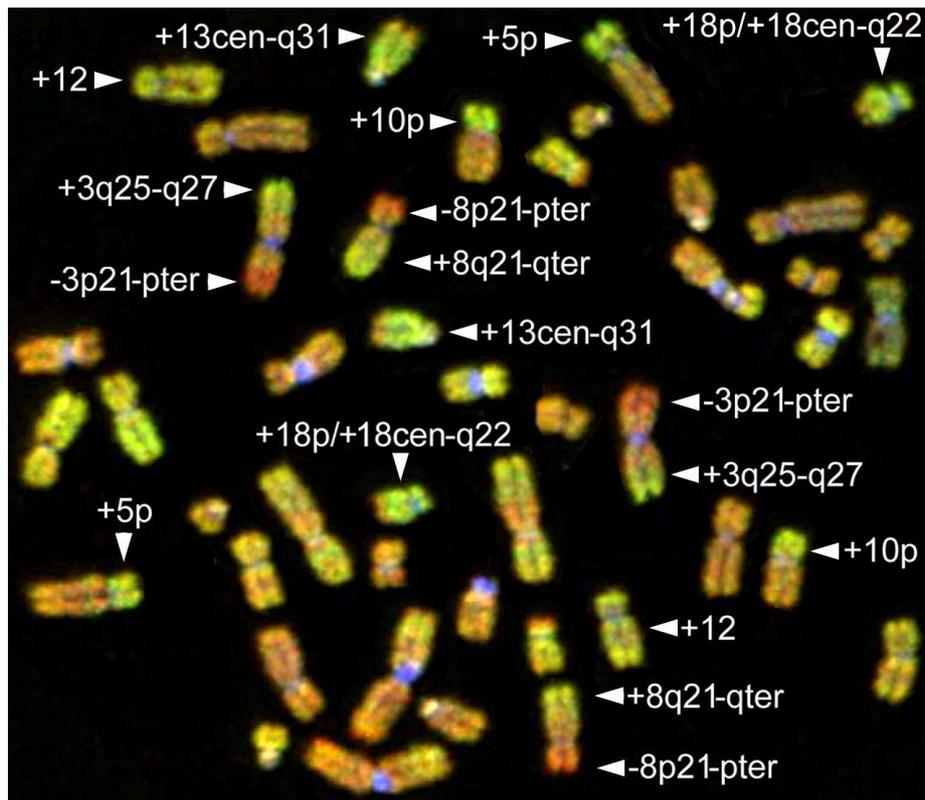


Abbildung I:

Die Abbildung zeigt den Fall L 266 S 444 eines GCB-DLBCL. Man erkennt die beschriebenen chromosomalen Aberrationen (Pfeile) an der verstärkten Grünfärbung bei Zugewinn (+3q25-q27, +5p, +8q21-qter, +10p, +12, +13cen-q31, +18p, +18cen-q22) sowie verstärkter Rotfärbung bei Verlust (-3p21-pter, -8p21-pter). Hierbei sind Zugewinne auf Chromosom 12, insbesondere den minimalen Überlappungsregionen 12p und 12cen-q14, für Lymphome vom Typ der GCB-DLBCL besonders typisch.

Abbildung II: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms vom aktivierten B-Zelltyp (ABC-DLBCL)

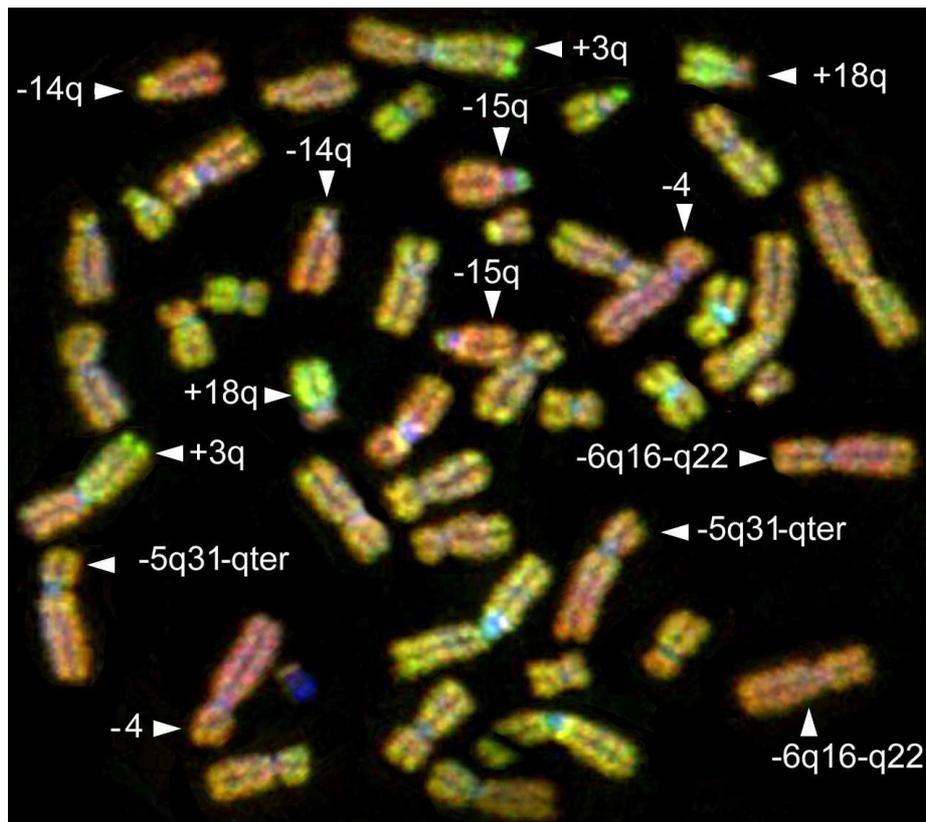


Abbildung II:

Die Abbildung zeigt den Fall L 182 S 541 eines ABC-DLBCL. Man erkennt die beschriebenen chromosomalen Aberrationen (Pfeile) an der verstärkten Grünfärbung bei Zugewinn (+3q, +18q) sowie verstärkter Rotfärbung bei Verlust (-4, -5q31-qter, -6q16-q22, -14q, +15q). Hierbei sind Zugewinne auf Chromosom 3 und Chromosom 18, insbesondere den minimalen Überlappungsregionen 3p, 3cen-q26, 3q27-qter und 18q21, sowie Verluste auf Chromosom 6, minimale Überlappungsregion 6q21-q24, für Lymphome vom Typ der ABC-DLBCL besonders typisch.

Abbildung III: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines primär mediastinalen diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms (PMBCL)

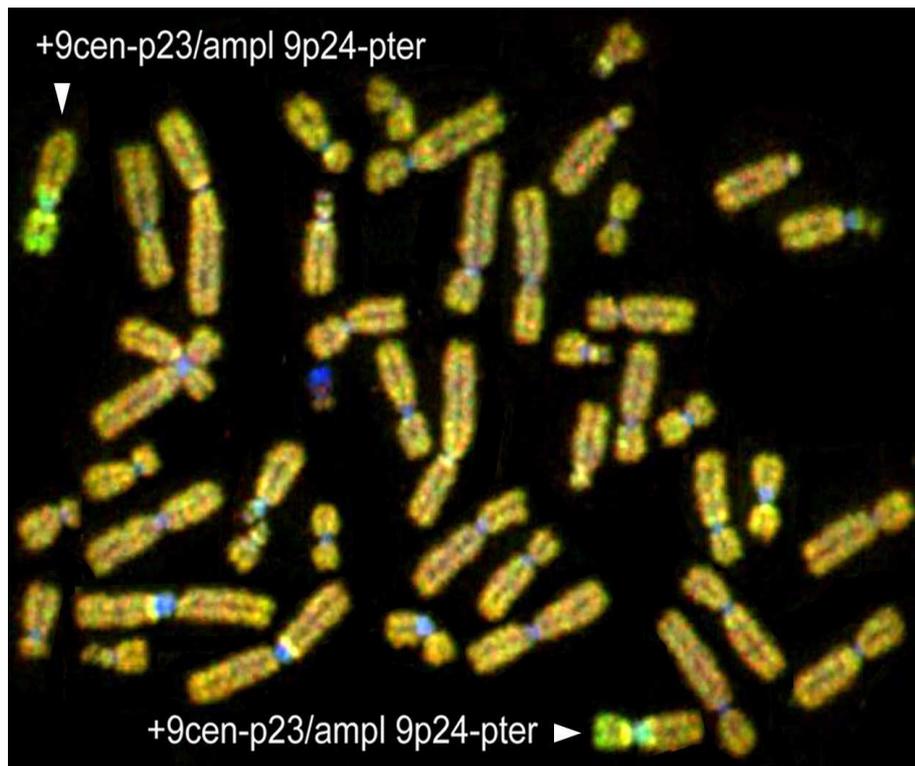


Abbildung III:

Die Abbildung zeigt den Fall L 129 S 570 eines PMBCL. Man erkennt die beschriebenen chromosomalen Aberrationen (Pfeile) an der verstärkten Grünfärbung bei Zugewinn bzw. Amplifikation (+9cen-p23, ampl 9p24-pter). Durch verstärkte Rotfärbung erkennbare Verluste sind nicht vorhanden. Hierbei sind Zugewinne auf Chromosomen 9, insbesondere der minimalen Überlappungsregion 9p, sowie das Fehlen von Verlusten auf Chromosom 6, minimale Überlappungsregion 6q13-q22, für Lymphome vom Typ der PMBCL besonders typisch.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Hans-Konrad Müller-Hermelink, Direktor des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg, für die Überlassung des Themas sowie seine tatkräftige Unterstützung während der Durchführung meiner Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Priv. Doz. Dr. med. Andreas Zettl, der mich anfangs sowohl in die Methodik des experimentellen Arbeitens im Labor einführte als auch später bei der Niederschrift der Dissertation tatkräftig unterstützte. Er war mir stets eine große Hilfe, die oftmals sicherlich weit über das übliche Maß hinausging.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich für ihren Rückhalt und die Möglichkeit, mein Studium in der schönen Stadt Würzburg absolvieren zu dürfen. Sie standen mir während meiner gesamten Studienzeit stets zur Seite und gaben mir Kraft, die vielfältigen Aufgaben zu bewältigen.

Lebenslauf

Am 26. März 1977 wurde ich als viertes Kind der Eheleute Dr. med. Eckhard und Ingrid Jehn, geborene Haas, in Braunschweig geboren. Nach dem Besuch der Grundschule sowie der Orientierungsstufe in Bückeburg wechselte ich 1989 auf das Gymnasium Adolfinum, wo ich 1996 das Abitur ablegte.

In der Zeit von Juli 1996 bis Juni 1998 absolvierte ich anfangs im Rahmen der allgemeinen Wehrpflicht, später im Verhältnis eines Soldaten auf Zeit (SaZ) eine zweijährige Ausbildung im Sanitätsdienst der Bundeswehr.

Zum Wintersemester 1998/ 1999 nahm ich mein Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf. Nach der Ärztlichen Vorprüfung im August 2000 legte ich im August 2001 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Danach begann ich mit meiner Dissertation am Pathologischen Institut der Universität Würzburg, bevor ich im August 2003 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegte.

Die Ausbildung im Praktischen Jahr absolvierte ich in der Abteilung für Chirurgie des Juliusspitals Würzburg, sowie der Medizinischen Poliklinik und dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg und legte im Oktober 2004 den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit Erhalt der Approbation in Würzburg ab.

Im Anschluss an das Studium der Humanmedizin begann ich zum Wintersemester 2004/ 2005 ein Zweitstudium der Zahnmedizin, welches für die Ausbildung zum Facharzt für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie unabdingbare Voraussetzung ist. Nach erfolgreicher Absolvierung des vorklinischen Studienabschnitts befinde ich mich derzeit im 6. Fachsemester (4. klinisches Semester).

Im Juni 2007 beendete ich die Arbeit an der humanmedizinischen Dissertation.

Würzburg, im Juni 2007

Philipp Jehn