

Aus dem Institut für Humangenetik  
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Siebert)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

BRUCHEREIGNISSE IN DEN ONKOGENORTEN *BCL2*, *BCL6* UND *MYC* BEI AG-  
GRESSIVEN B-ZELL-LYMPHOMEN IM KINDESALTER: MOLEKULARZYTogene-  
TISCHE ANALYSEN IM RAHMEN DER NHL-BFM-STUDIE

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

FRIEDERIKE MARIE MAHN  
aus Lübeck

Kiel 2010

1. Berichtstatter:	Prof. Dr. med. Reiner Siebert
2. Berichtstatter:	PD Dr. med. Wolfram Klapper
Tag der mündlichen Prüfung:	03.06.2010
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	03.06.2010
gez.	Prof. Dr. med. Werner Grote (Vors. d. Prüfungskom.)

Meinen Eltern

von Herzen

**INHALTSVERZEICHNIS**

	<b>Seite</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Lymphome bei Kindern	1
1.1.1 Lymphome bei Kindern: Epidemiologie	1
1.1.2 Lymphome bei Kindern: Klinik und Diagnosestellung	3
1.1.3 Lymphome bei Kindern: Therapie und Prognose	3
1.2 Diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL)	4
1.2.1 Genetik diffus großzelliger B-Zell-Lymphome	5
1.3 Burkitt-Lymphome (BL)	7
1.4 Techniken zur Untersuchung von Lymphomen	8
1.4.1 Immunhistochemische Methoden	8
1.4.2 Genexpressionsbestimmung	9
1.4.3 Zytogenetische Methoden	9
1.4.4 Interphase-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	9
1.5 Ziele dieser Arbeit	10
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
2.1 Untersuchungsmaterial	11
2.1.1 Materialien für Kontrollen	11
2.1.2 Lymphome	11
2.1.3 Ethikvoten	13
2.2 Materialien	13
2.2.1 Chemikalien	13
2.2.2 Geräte	14
2.2.3 Puffer und Lösungen	14
2.2.4 Sonden	16
2.2.4.1 LSI <sup>®</sup> MYC Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	16
2.2.4.2 LSI <sup>®</sup> BCL2 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	17
2.2.4.3 LSI <sup>®</sup> BCL6 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	18
2.2.4.4 Kreatech Poseidon <sup>™</sup> Repeat Free <sup>™</sup> BCL6 (3q27) Break Probe	18

2.2.4.5	Abbott / Vysis IGH SA Sonde	19
2.3	Methoden	20
2.3.1	Prinzip der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	20
2.3.2	Generierung von direkt markierten Sonden	20
2.3.3	Herstellung von Auftropfpräparaten für FISH aus Zellsuspensionen	21
2.3.4	Aufbereitung von Paraffinpräparaten für FISH	21
2.3.5	Hybridisierung	22
2.3.6	Waschen der Präparate und Eindecken	22
2.4	Auswertung und Dokumentation	23
2.5	Statistische Auswertungen	25
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
3.1	Etablierung eines Interphase-FISH-Assays zum gleichzeitigen Nachweis von <i>MYC</i> -Bruchereignissen und <i>IGH-MYC</i> -Fusionen	27
3.1.1	Auswahl der Sonden	27
3.1.2	Kontrolluntersuchungen	27
3.2	Nachweis chromosomaler Translokationen bei selektierten pädiatrischen Lymphomen mit Langzeitremissionen bzw. Frührezidiven/Therapieresistenz (sogenanntes „Extremkollektiv“) 30	
3.2.1	Nachweis von Bruchereignissen im <i>MYC</i> -Genort und Nachweis der Translokation t(8;14) mittels Interphase-FISH im Extremkollektiv	31
3.2.2	Nachweis von Bruchereignissen im <i>BCL2</i> -Genort mittels Interphase-FISH im Extremkollektiv	33
3.2.3	Nachweis von Bruchereignissen im <i>BCL6</i> -Genort mittels Interphase-FISH im Extremkollektiv	34
3.2.4	Deskriptive Auswertung der molekularzytogenetischen Untersuchungsergebnisse des Extremkollektivs	35
3.3	Nachweis chromosomaler Translokationen bei pädiatrischen Lymphomen aus der NHL-BFM-Studie	36
3.3.1	Nachweis von Bruchereignissen im <i>MYC</i> -Genort und der Translokation t(8;14) mittels Interphase-FISH im NHL-BFM-Studienkollektiv	36
3.3.2	Nachweis von Bruchereignissen im <i>BCL2</i> -Genort mittels Interphase-FISH im NHL-BFM-Studienkollektiv	37

3.3.3	Nachweis von Bruchereignissen im <i>BCL6</i> -Genort mittels Interphase-FISH im NHL-BFM-Studienkollektiv	37
3.3.4	Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit epidemiologischen und klinischen Charakteristika innerhalb der BFM-Studie	38
3.3.4.1	Geschlechterverhältnisse der untersuchten DLBCL	39
3.3.4.2	Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde des <i>MYC</i> -Genortes mit epidemiologischen und klinischen Charakteristika	39
3.3.4.3	Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde des <i>BCL6</i> -Genortes mit epidemiologischen und klinischen Charakteristika	40
3.3.5	Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit histopathologischen Charakteristika	41
3.3.6	Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit immunhistochemischen Charakteristika	42
3.3.7	Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit dem klinischen Verlauf	43
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>45</b>
4.1	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung zum Nachweis chromosomaler Veränderungen bei lymphatischen Neoplasien	45
4.1.1	Aufbau von Interphase-FISH-Systemen	45
4.1.2	Etablierung von Nachweisgrenzen für FISH-Systeme	46
4.1.3	Der Stellenwert paraffinbasierten Untersuchungsmaterials für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	47
4.2	Die Bedeutung der prospektiven, randomisierten NHL-BFM-Studie für die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit	48
4.3	Die Bedeutung chromosomaler Bruchereignisse bei selektierten pädiatrischen Lymphomen mit Frührezidiven/Therapieresistenz bzw. Langzeitremissionen (Extremkollektiv) sowie bei pädiatrischen Lymphomen aus der NHL-BFM-Studie	48
4.3.1	Bruchereignisse im <i>MYC</i> -Genlocus bzw. Translokationen t(8;14) in pädiatrischen Lymphomen	48
4.3.2	Bruchereignisse im <i>BCL2</i> -Genlocus in pädiatrischen Lymphomen	50
4.3.3	Bruchereignisse im <i>BCL6</i> -Genlocus in pädiatrischen Lymphomen	51

4.4	Beurteilung der statistischen Auswertungen der molekularzytogenetischen Untersuchungsergebnisse des BFM-Kollektivs	52
4.4.1.1	Geschlechterverhältnisse der untersuchten DLBCL	52
4.4.1.2	Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde des <i>MYC</i> -Genortes mit epidemiologischen und klinischen Daten	52
4.4.1.3	Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde des <i>BCL6</i> -Genortes mit epidemiologischen und klinischen Daten	52
4.4.2	Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit histopathologischen und immunhistochemischen Charakteristika	53
4.4.3	Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit dem klinischen Verlauf	54
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	55
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>89</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF UND VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>90</b>
9.1	Lebenslauf	90
9.2	Veröffentlichungen	92

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ABC	aktivierter B-Zell-Typ („activated B-cell type“)
Abb.	Abbildung
add	zusätzliches chromosomales Material („additional chromosomal material“)
AIDS	erworbenes Immundefizienz-Syndrom („aquired immunodeficiency syndrome“)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
<i>BCL2</i>	B-Zell-Lymphom-Gen 2 („B-cell lymphoma 2“)
<i>BCL6</i>	B-Zell-Lymphom-Gen 6 („B-cell lymphoma 6“)
BL	Burkitt-Lymphom
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
CD	Cluster of Differentiation (immunphänotypische Merkmale von Zellen)
cDNA	Komplementäre DNA („complementary DNA“)
CGH	vergleichende genomische Hybridisierung („comparative genomic hybridization“)
Co	Co-Lokalisation
Cot-1-DNA	DNA mit hohem Anteil repetitiver Sequenzen
DAPI	4,6-Diaminido-2-phenylindoldihydrochlorid
del	deletiertes chromosomales Material
der	derivatives Chromosom
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom („diffuse large B-cell lymphoma“)
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleid acid“)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EFS	Ereignis-freies Überleben („event-free survival“)
Etc.	et cetera
FAB	French-American-British
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FL	follikuläres Lymphom
GCB	Keimzentrums-B-Zell-Typ („germinal center B-cell type“)
Geschl.	Geschlecht
H-GAL	humanes Keimzentrums-assoziiertes Lymphom-Protein („human germinal center-associated lymphoma protein“)



HLA	humanes Leukozytenantigen („human leukocyte antigen“)
Ig	Immunglobulin
IgH	schwere Kette des Immunglobulins
IH	Immunhistochemie
ins	inseriertes chromosomales Material
ish	In-Situ-Hybridisierung
k.A.	keine Angabe
Kb	Kilobasen
LDH	Lactatdehydrogenase
LSI	Lokus-spezifische Probe („locus-specific identifier“)
M	molar
männl.	männlich
mar	Markerchromosom
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
MI-FISH	Multicolor interphase FISH
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Anzahl
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Nr.	Nummer
nuc	Kern („nuclear“)
o.g.	oben genannt/e/es
p	kurzer Arm des Chromosoms
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMBCL	primär mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom („primary mediastinal large B-cell lymphoma“)
q	langer Arm des Chromosoms

## VII

RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleid acid“)
rpm	Rotationen pro Minute („rotations per minute“)
SD	Standardabweichung
SHM	somatische Hypermutation
sog.	sogenannte/es
Tab.	Tabelle
t(8;14)	Translokation (Austausch) von Bereichen der Chromosomen 8 und 14
u.a.	unter anderem
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
weibl.	weiblich
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Lymphome bei Kindern

#### 1.1.1 Lymphome bei Kindern: Epidemiologie

Lymphome stellen bei Kindern in der Bundesrepublik Deutschland nach Leukämien und ZNS-Tumoren die dritthäufigste Entität bösartiger Krebserkrankungen dar (Jahresbericht des Deutschen Kinderkrebsregisters 2006/07, <http://www.kinderkrebsregister.de>, Zugriff vom 20.07.2008). Für den Zeitraum von 1997 bis 2006 betrug der relative Anteil von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) 5,5% an allen im Deutschen Kinderkrebsregister verzeichneten Fällen maligner Neoplasien, so dass diese in der Gesamtschau an vierter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter standen. Das etwas seltenere Hodgkin-Lymphom rangierte mit 4,9% an siebter Stelle. Einen Überblick über die Neuerkrankungen lymphatischer Neoplasien (exklusive lymphatischer Leukämien) im Kindes- und Jugendalter liefert die Tabelle 1.1.1a.

**Tab. 1.1.1a:** Zahl der Neuerkrankungen und Inzidenzen lymphatischer Neoplasien (exklusive lymphatischer Leukämien) in der BRD im Zeitraum 1997 – 2006 (alle Angaben Deutsches Kinderkrebsregister)

Art der Neoplasien	Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr / Inzidenz
Gesamte lymphatische Neoplasien (exklusive lymphatischer Leukämien)	215 / 1,7/100.000
Non-Hodgkin-Lymphome	124 / 1,0/100.000
<b>Von NHL betroffene Altersgruppen</b>	<b>Inzidenz</b>
Säuglinge	0,2/100.000
1 – 4 Jahre	0,7/100.000
5 – 9 Jahre	1,2/100.000
10 – 14 Jahre	1,1/100.000

In den letzten 30 Jahren ist ein Anstieg der Neuerkrankungen bei den NHL zu beobachten; die Gesamtinzidenz stieg von 0,7/100.000 im Jahr 1980 auf 1,0/100.000 im Jahr 2006 (alle Angaben Deutsches Kinderkrebsregister). Kinder, die unter angeborenen oder erworbenen (z.B. AIDS) Immundefekten leiden sowie Patienten unter immunsuppressiver Therapie haben ein erhöhtes Risiko, ein NHL zu entwickeln (Morrell et al. 1986; Filipovich et al. 1992;

Knowles 1999; Biggar et al. 2000; Mustillo et al. 2008).

Ebenso wie die adulten Non-Hodgkin-Lymphome werden auch die kindlichen NHL nach der WHO-Klassifikation von 2008 (Swerdlow et al. 2008) eingeteilt, welche eine Nachfolgeklassifikation der älteren Kiel-Klassifikation der Lymphome (Lennert et al. 1975), der REAL-Klassifikation (Harris et al. 1994) sowie der WHO-Erstversion von 2001 (Jaffe et al. 2001) darstellt. Sie klassifiziert die lymphatischen Neoplasien unter Berücksichtigung der Morpho-

logie, der zellulären Herkunft, des klinischen Bildes sowie der zytogenetischen und immunphänotypischen Eigenschaften (Jaffe et al. 2001).

NHL repräsentieren eine recht heterogene Gruppe maligner Erkrankungen des lymphatischen Systems. Der Hauptanteil der pädiatrischen NHL entwickelt sich aus B-Zellen (daher B-NHL) und stellt meist hochmaligne, d.h. schnell wachsende, aggressive Lymphome dar (Morton et al. 2006). Die Verteilung der verschiedenen Entitäten der NHL bei Kindern und Jugendlichen unterscheidet sich deutlich von der bei erwachsenen Erkrankten (Sandlund et al. 1996). Während bei Erwachsenen die zahlreichen bekannten Subtypen nebeneinander vorkommen, verteilen sich die meisten Fälle der pädiatrischen Lymphome auf die vier häufigsten Formen der pädiatrischen NHL: Auf Burkitt-Lymphome (40%), diffus großzellige B-Zell-Lymphome (20%), anaplastisch großzellige Lymphome (10%) sowie lymphoblastische Lymphome (30%). In der Tabelle 1.1.1b erfolgt die Darstellung dieser Entitäten unter Berücksichtigung ihres B- bzw. T-Zell-Ursprungs.

**Tab. 1.1.1b:** Bei Kindern häufig auftretende Non-Hodgkin-Lymphome (nach Cairo et al. 2003; 2005; Sandlund et al. 1996)

<b>B-Zell-Neoplasien (ca. 63%)</b>		<b>T-Zell-Neoplasien (ca. 37%)</b>	
<b>Vorläufer-B-Zell-Lymphome</b>	<b>Reife (periphere) B-Zell-Lymphome</b>	<b>Vorläufer-T-Zell-Lymphome</b>	<b>Reife (periphere) T-Zell-Lymphome</b>
- B-lymphoblastisches Lymphom/Leukämie (ca. 3%)	- Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (ca. 20%) - Burkitt-Lymphom/Leukämie (ca. 40%)	- T-lymphoblastisches Lymphom/Leukämie (ca. 27%)	- Anaplastisches großzelliges Lymphom (ca. 10%)

Zu beobachten ist in allen Altersgruppen ab dem ersten Lebensjahr eine erhöhte Inzidenz der NHL bei Jungen gegenüber weiblichen Gleichaltrigen. So zeigte die Erhebung des Kinderkrebsregisters für den o.g. Zeitraum ein Inzidenzverhältnis von Jungen zu Mädchen für die Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome von 2,4:1 (<http://www.kinderkrebsregister.de>, Zugriff vom 20.07.2008). Allerdings variiert das Geschlechterverhältnis bei den verschiedenen Formen der NHL je nach Typus. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, welche Gründe es für das höhere Risiko von Jungen für lymphatische Neoplasien gibt.

Ebenso wie das Geschlechterverhältnis variieren die bevorzugt erkrankten Altersgruppen zwischen den einzelnen Entitäten. Altersmediane zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schwanken je nach Subtyp zwischen 8,0 und 13,2 Jahren (Burkhardt et al. 2005).

### **1.1.2 Lymphome bei Kindern: Klinik und Diagnosestellung**

Aufgrund des schnellen Wachstums der pädiatrischen Lymphome besteht ein durchschnittliches Intervall von vier bis acht Wochen zwischen den ersten klinischen Symptomen und der Diagnosestellung. Die klinischen Symptome sind abhängig von der primär befallenen Region, hierzulande liegen als klinische Manifestation meist schmerzlose, periphere zervikale Lymphknotenschwellungen vor (Lentze et al. 2003). 33% der Kinder unter 14 Jahren und 57% der 15 - 18-Jährigen, die an einem NHL erkranken, weisen klassische B-Symptome auf: Gewichtsverlust von >10% innerhalb von sechs Monaten, unklares Fieber über 38°C, Nachtschweiß und Abgeschlagenheit (Klapper et al. 2008).

Diagnostische Maßnahmen stellen eine Knochenmarkspunktion sowie Punktionen maligner Körperhöhlenergüsse dar. Anhand der zytomorphologischen und immunphänotypischen Auswertung des gewonnenen Zellmaterials aus Knochenmark oder Exsudat kann eine Diagnosestellung erfolgen. Als weitere Möglichkeit der Diagnosestellung bestehen histologische und immunhistochemische Untersuchungen eines betroffenen, bioptisch entnommenen Lymphknotens oder eines anderen betroffenen Gewebes. Die Stadieneinteilung der Erkrankung bei Kindern und Jugendlichen erfolgt nach weitergehenden Staging-Untersuchungen analog der St.-Jude's-Modifikation der Ann-Arbor-Klassifikation (Murphy 1980).

### **1.1.3 Lymphome bei Kindern: Therapie und Prognose**

Da der Hauptanteil der pädiatrischen Lymphome aus hochmalignen, chemotherapiesensitiven Lymphomen besteht, haben sich Therapieansätze mit Zytostatika in der Behandlung etabliert. Im Laufe der Zeit kristallisierten sich Behandlungsmodalitäten für drei Hauptgruppen heraus: Lymphoblastische Lymphome, reife B-Zell-Neoplasien und anaplastische großzellige Lymphome, für die jeweils unterschiedliche Therapieregime entwickelt wurden (Reiter et al. 1994, 1995, 1999, 2000; Woesmann et al. 2005). Grundgerüste der Therapie entstanden, welche jeweils in Studien modifiziert wurden. Da nahezu alle Kinder und Jugendliche, die in den letzten 20 Jahren in Deutschland, Österreich und der Schweiz an einem NHL erkrankten, im Rahmen von Studien der Berlin-Frankfurt-Münster-Gruppe (BFM group) mit einheitlichen Regimen therapiert wurden, können die Ergebnisse als repräsentativ und vergleichbar erachtet werden (Burkhardt et al. 2005).

Die Prognose für an NHL erkrankte Kinder ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 90% gut. In den letzten 30 Jahren verbesserten sich die Überlebenschancen deutlich; für den Zeitraum 1980-1984 lag die 5-Jahres-Überlebensrate noch bei 80% (<http://www.kinderkrebsregister.de>, Zugriff vom 20.07.2008). Die Tabelle 1.1.3 gibt Auskunft

über die 5- und 10-Jahres-Überlebensraten pädiatrischer Lymphome in den letzten Jahrzehnten. Bei Kindern mit NHL wurden in den letzten drei Jahrzehnten durch stetig optimierte Behandlungsstrategien laufend bessere Therapieergebnisse erzielt (Eden et al. 1992; Patte et al. 1992, 2001; Reiter et al. 1994, 1995, 1999, 2000; Tubergen et al. 1995; Bowman et al. 1996; Link et al. 1997; Brugieres et al. 1998; Atra et al. 2000; Cairo et al. 2002; Williams et al. 2002, Marky et al. 2004).

**Tab. 1.1.3:** 5- und 10-Jahres-Überlebensraten pädiatrischer Lymphome von 1980 bis 2004 nach Angaben des Deutschen Kinderkrebsregisters (<http://www.kinderkrebsregister.de>, Zugriff vom 20.07.2008). Grau hinterlegte Felder kennzeichnen eine prognostische Rate unter unvollständigem Follow-Up.

Jahr der Diagnose	5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit	10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit
1980-1984	80%	79%
1985-1989	86%	85%
1990-1994	91%	90%
1995-1999	91%	90%
2000-2004	92%	91%

## 1.2 Diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL)

Während diffus großzellige Lymphome bei Kindern mit einem Gesamtanteil von 20% an dritter Stelle nach Burkitt- und B-lymphoblastischen Lymphomen rangieren, stellen sie bei Erwachsenen mit 21% aller lymphatischen Neoplasien den am häufigsten auftretenden Lymphomtyp dar (Morton et al. 2006). Bei Kindern, bei denen ein Geschlechterverhältnis von 1,7:1 zugunsten der Jungen vorliegt, beträgt das durchschnittliche Erkrankungsalter 11,4 Jahre (Burkhardt et al. 2005). Bei Erwachsenen liegt der Erkrankungsmedian in der siebten Dekade (Jaffe et al. 2001).

Die physiologische B-Zell-Reifung erfolgt in mehreren Schritten. Bei den frühen Reifungsprozessen im Knochenmark finden Umlagerungen in den VDJ-Gensegmenten der B-Zellen statt, die der Vielfältigkeitserzeugung der produzierten Immunglobuline dienen. Anschließend wandern die Zellen in die Keimzentren lymphatischer Gewebe ein. Durch Umlagerungen in den C-Gensegmenten finden hier Klassenwechsel der Immunglobuline statt. Bei der ablaufenden Keimzentrumreaktion werden außerdem in den für Immunglobulinketten kodierenden Genabschnitten der B-Zellen sogenannte somatische Hypermutationen (SHM) eingeführt, die zu einer hohen Antigenaffinität und Diversität der entstehenden Immunglobuline führen (Klein et al. 1998). Alle diese Prozesse bieten gleichzeitig aufgrund der zahlreichen Umlage-

rungs- und Fusionsprozesse der DNA Möglichkeiten für chromosomale Translokationen und Mutagenese (Hiddemann et al. 2004).

Es wird angenommen, dass DLBCL aus Antigen-exponierten B-Zellen entstehen, die in Keimzentren lymphatischer Gewebe eingewandert sind oder diese durchwandert haben. Es existieren sowohl die de novo-Entstehung von DLBCL als auch die fast ausschließlich bei Erwachsenen auftretende sekundäre Transformation aus niedrigmalignen (z.B. folliculären) Lymphomen in hochmaligne DLBCL (Jaffe et al. 2001). Histopathologisch erscheint das betroffene lymphatische Gewebe von großen B-Zell-Blasten unter Ersatz der ursprünglichen Gewebearchitektur diffus infiltriert (Reiter und Klapper 2008). Die WHO-Klassifikation von 2001 sieht eine morphologische Einteilung in fünf Varianten vor: Zentroblastisch, immunoblastisch, T-Zell-/Histiozyten-reich, anaplastisch oder nicht genauer spezifiziert (Jaffe et al. 2001). Häufig wird das primär mediastinale großzellige B-Zell-Lymphom (PMBCL) den DLBCL zugerechnet, wobei es sich jedoch um eine eigene Entität handelt, die sich aus im Thymus angesiedelten B-Zellen entwickelt (Isacson et al. 1987) und in der WHO-Klassifikation von 2001 als separate Kategorie aufgeführt ist.

Mit der Etablierung von Genexpressionsuntersuchungen sind Analysen der adulten DLBCL erfolgt, die diesen Lymphomtyp in drei klinisch relevante Subtypen differenzieren konnten. Etwa 50% der adulten DLBCL zählen demnach zum Keimzentrums-B-Zell-Typ (germinal center B-cell type, GCB); diese haben gegenüber den DLBCL vom aktivierten-B-Zell-Typ (activated B-cell type, ABC) und dem PMBCL eine deutliche bessere Prognose (Rosenwald et al. 2002). Mithilfe der Immunhistochemie lassen sich GCB-Lymphome definieren durch CD10-Positivität oder den Phänotyp  $CD10^-/BCL6^+/MUM-1^-$  (Hans et al. 2004). Bei Kindern ist der Anteil der GCB in der Immunhistochemie mit etwa 80% deutlich höher als bei Erwachsenen (Oschlies et al. 2006; Miles et al. 2008). Bisher gibt es wenige immunhistochemische Analysen pädiatrischer Lymphome (Dave et al. 2004; Frost et al. 2004; Oschlies et al. 2006). Diese zeigten, dass analog zur Dominanz des GCB-Typs die meisten DLBCL CD10 und BCL6 exprimieren.

### 1.2.1 Genetik diffus großzelliger B-Zell-Lymphome

Bei DLBCL sind einige genetische Aberrationen bekannt, die jeweils zu gewissen Prozentsätzen auftreten. In etwa 85% der adulten Fälle lassen sich klonale chromosomale Veränderungen feststellen (Cigudosa et al. 1999). Bei den drei häufig deregulierten Genen *BCL6*, *BCL2* und *MYC* besteht der gemeinsame Pathomechanismus in einer Chromosomentranslokation, infolge derer diese Gene unter den Einfluss regulatorischer Elemente der Immunglobulingene

geraten. Es kommt dadurch zu einer inadäquaten Expression der betreffenden Gene (Abramson und Shipp 2005). Die häufigsten genetischen Aberrationen bei adulten DLBCL betreffen in etwa 35-40% der Fälle das *BCL6*-Gen in der Chromosomenregion 3q27 (Pasqualucci et al. 2003). Deregulationen des *BCL6*-Gens führen unter anderem zu einer unzureichenden Differenzierung der Lymphomzellen (Shaffer et al. 2002) und einer Proliferationssteigerung der betroffenen B-Zellen (Shvarts et al. 2002).

Für pädiatrische Fälle sind bisher nur wenige genetische Analysen durchgeführt worden, in denen jedoch *BCL6*-Translokationen im Gegensatz zu adulten Fällen nicht nachgewiesen wurden (Dave et al. 2004). Ebenfalls scheinen Brüche des *BCL2*-Gens (18q21) beziehungsweise Translokationen dieses Gens auf Immunglobulinloci bei kindlichen DLBCL praktisch nicht aufzutreten (Dave et al. 2004; Oschlies et al. 2006), obwohl diese meist dem GCB-Typ zugehörig sind. Bei adulten DLBCL findet sich eine Translokation t(14;18) in etwa 15% aller Fälle, und zwar fast ausschließlich bei GCB-Typen (Iqbal et al. 2004). Das BCL2-Protein ist ein antiapoptotisches Genprodukt, das normalerweise in Keimzentrumszellen herunterreguliert ist, da der Hauptteil der Zellen regelhaft der Apoptose anheim fallen muss.

In 7-15% aller adulten DLBCL findet sich eine Deregulation des *MYC*-Gens (Kramer et al. 1998), welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert. Im Rahmen einer Translokation t(8;14) gelangt es unter den Einfluss eines Immunglobulinpromoters, woraus eine Überexpression des Gens und folglich eine massive Proliferationssteigerung der Tumorzellen resultiert (Ladanyi et al. 1991). Bisher nahm man an, dass *MYC*-Umlagerungen bei kindlichen DLBCL Raritäten darstellen (Dave et al. 2004), in einer neueren Untersuchung wiesen jedoch 34% der untersuchten pädiatrischen DLBCL Rearrangements des *MYC*-Genlokus auf (Poirel et al. 2009). Reife adulte B-Zell-Lymphome mit *MYC*-Umlagerungen, die kein molekulares Profil eines Burkitt-Lymphoms besitzen - und dazu gehören auch die meisten DLBCL - weisen nach neuesten Erkenntnissen eine signifikant schlechtere 5-Jahresüberlebensrate auf als vergleichbare Fälle ohne Umlagerungen (Hummel et al. 2006; Klapper et al. 2008).

Die Prognose diffus großzelliger B-Zell-Lymphome ist bei Kindern mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 90% wesentlich besser als bei Erwachsenen, bei denen die Heilungsrate unter Anthracyclin-basierter Therapie 35-60% beträgt (Coiffier 2001; Woessmann et al. 2005). Die Tabelle 1.2 zeigt wesentliche Unterschiede zwischen pädiatrischen und adulten DLBCL bezüglich genetischer, immunhistochemischer und prognostischer Eigenschaften.



**Tab. 1.2:** Unterschiede zwischen adulten und pädiatrischen DLBCL

	<b>Adulte DLBCL</b>	<b>Pädiatrische DLBCL</b>
<b>Genetik</b>	<i>BCL6</i> -Gen-Aberrationen in ca. 35-40% der Fälle (Pasqualucci et al. 2003)	<i>BCL6</i> -Aberrationen stellen Raritäten dar (Dave et al. 2004)
	<i>BCL2</i> -Aberrationen in Form der Translokation t(14;18) in etwa 15% der Fälle fast ausschließlich bei DLBCL vom GCB-Typ (Iqbal et al. 2004)	<i>BCL2</i> -Brüche bzw. -Translokationen scheinbar nicht existent (Dave et al. 2004; Oschlies et al. 2006)
	<i>MYC</i> -Gen-Deregulation in 15% der DLBCL (Kramer et al. 1998)	<i>MYC</i> -Umlagerungen stellen Raritäten dar (Dave et al. 2004) bzw. 34% der Fälle (Poirel et al. 2009)
<b>Immunhistochemie</b>	Überexpression von <i>BCL6</i> prognostisch günstig (Lossos et al. 2001) (umstritten)	Kein signifikanter, günstiger prognostischer Effekt einer <i>BCL6</i> -Überexpression (Oschlies et al. 2006)
	Überexpression von <i>BCL2</i> prognostisch ungünstig (Gascoyne et al. 1997; Kramer et al. 1998) (umstritten)	Kein prognostischer Einfluss einer <i>BCL2</i> -Überexpression (Oschlies et al. 2006)
	50% GCB-Typ (Rosenwald et al. 2002)	80% GCB-Typ (Oschlies et al. 2006)
<b>Prognose</b>	Heilungsrate unter Anthracyclin-basierter Therapie 35-60% (Coiffier 2001)	5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 90% (Laver et al. 2005; Woessmann et al. 2005)

### 1.3 Burkitt-Lymphome (BL)

Das hochmaligne, schnell wachsende Burkitt-Lymphom (BL) stellt in unseren Breiten mit einem Anteil von 40% das häufigste Lymphom im Kindesalter dar (Cairo et al. 2003, 2005; Sandlund et al. 1996), während sein Anteil bei Erwachsenen nur 1-2% beträgt (Jaffe et al. 2001). Es ist im Kindesalter die wichtigste Differenzialdiagnose zum diffus großzelligen B-Zell-Lymphom und zeigt mit diesem z.T. morphologische Übereinstimmungen, die eine histopathologische Diskrimination zwischen beiden Entitäten sehr erschweren können (Klapper et al. 2008).

Es werden drei Varianten des BL unterschieden. Die erste Form, das zu 90% mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziierte endemische Burkitt-Lymphom, tritt vorwiegend in Äquatorialafrika auf und stellt dort die häufigste bösartige Erkrankung des Kindesalters dar (Shiramizu et al. 1991). Die zweite Form, das sporadische BL, wird weltweit beschrieben und bezeichnet u.a. die bei Kindern hierzulande auftretenden Fälle. Das mittlere Erkrankungsalter bei Kindern liegt bei 8,4 Jahren, Jungen sind 4,5 mal häufiger betroffen als Mädchen (Burkhardt et al. 2005). Erwachsene Erkrankte, zu 70% Männer, sind durchschnittlich 30 Jahre alt

(Anon 1982). Weniger als 30% der sporadischen BL sind EBV-assoziiert (Gutierrez et al. 1992; Anwar et al. 1995). Die dritte Form, das Immundefizienz-assoziierte BL, wird meist in Zusammenhang mit einer HIV-Infektion oder unter immunsuppressiver Therapie nach Transplantation beobachtet (Hiddemann et al. 2004). Das EBV-Genom wird hier zu 25-40% nachgewiesen (Raphael et al. 1991).

Die WHO-Einteilung von 2001 sieht neben dem klassischen BL als weitere morphologische Varianten das atypische BL / Burkitt-ähnliche Lymphom und das BL mit plasmazytischer Differenzierung vor. Charakteristisch für das klassische BL ist das sog. Sternenhimmelmuster („starry sky“ pattern), gestaltet durch zahlreiche Makrophagen, die apoptotische Tumorzellen (monomorphe B-Zellen mittlerer Größe) phagozytieren. Das atypische BL/Burkitt-ähnliche Lymphom zeigt im Gegensatz zum klassischen BL einen größeren Pleomorphismus der Zellkerngrößen und -formen.

In der WHO-Klassifikation von 2001 ist neben der Morphologie auch der Immunphänotyp des BL berücksichtigt. Die Expression von CD10 und BCL6 deutet auf einen Keimzentrumsursprung des Tumors hin. Fast 100% der Zellen zeigen aufgrund der hohen Proliferationsrate des Tumors eine positive Färbung für den proliferationsassoziierten Marker Ki-67 (Hui et al. 1988; Harris et al. 1999).

In quasi allen Fällen des Burkitt-Lymphoms findet man die pathogenetisch wichtige Translokation des *MYC*-Gens (Locus 8q24) auf den Immunglobulin-Schwerkettenlocus 14q32 (80%) bzw. auf den Leichtkettenlocus Kappa 2p12 (15%) oder Lambda in 22q11 (5%), die zu einer Überexpression des Protoonkogens führt (Jaffe et al. 2001).

Unter der Verwendung von Chemotherapieschemata, die auf Methotrexat und Cytarabin basieren, lassen sich sporadische Burkitt-Lymphome bei Kindern zu 90% und bei Erwachsenen zu etwa 70% heilen (Diviné et al. 2005). Derzeit werden DLBCL und BL bei Kindern mit dem gleichen Schema therapiert; bei Erwachsenen werden die Entitäten unterschiedlich behandelt.

## **1.4 Techniken zur Untersuchung von Lymphomen**

### **1.4.1 Immunhistochemische Methoden**

Die Immunhistochemie (IHC) ermöglicht eine Untersuchung der Proteinexpression in Zellen mithilfe von Antikörpern. Diese lagern sich an bestimmte Protein-Epitope an und können mit Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Die angefärbten Epitope und deren Färbintensität, die der Quantität der Proteinexpression folgt, sind unter dem Mikroskop detektabel. Mittlerweile

gibt es zahlreiche Antikörper, die einen Nachweis einer großen Zahl verschiedener Proteine erlauben.

#### **1.4.2 Genexpressionsbestimmung**

Um molekulare Eigenschaften eines Lymphomtyps zu analysieren und somit ein für diesen Typ charakteristisches Profil zu erstellen, hat sich in den letzten Jahren die Genexpressionsanalyse in verschiedenen Studien als praktikabel erwiesen. Die Hoffnung, durch molekulare Genexpressionsanalysen morphologisch ähnlicher und schwer differenzierbarer Lymphomentitäten (z.B. Burkitt-Lymphome und diffus großzellige B-Zell-Lymphome) deren Diagnose präziser und reproduzierbarer zu machen, wurde in bisher durchgeführten Studien bestätigt (Hummel et al. 2006; Klapper et al. 2008).

#### **1.4.3 Zytogenetische Methoden**

Die klassische zytogenetische Untersuchung erlaubt mithilfe von Bänderungsfärbetechniken eine Übersicht über alle Chromosomen in deren Anzahl, Gestalt und Bandenstruktur. Sie ist bei der Analyse von Lymphomen für einen Überblick über numerische oder sichtbare strukturelle Aberrationen geeignet.

#### **1.4.4 Interphase-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)**

Bei dieser molekularzytogenetischen Technik werden fluoreszenzmarkierte, einzelsträngige DNA-Sonden auf zu untersuchendes Material aufgetragen. Es eignen sich dazu sowohl Zellen aus Zellkulturen als auch paraffinbasierte Gewebeschnitte. Es sind im Gegensatz zur klassischen zytogenetischen Untersuchung keine Mitosen erforderlich, da die Technik bei Interphasezellen angewendet werden kann. Die angewendeten DNA-Sonden werden je nach Fragestellung ausgewählt und bestehen aus spezifischen DNA-Sequenzen, die sich nach Denaturierung bei Hitzeeinwirkung an komplementäre DNA-Abschnitte der untersuchten Zellen anlagern und unter einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können. Einzelne Lymphomentitäten können mithilfe dieser Technik gezielt auf häufige, wiederkehrende Translokationen untersucht werden. Die entscheidenden Vorteile der FISH-Methode liegen in der Vielseitigkeit der Untersuchungsmaterialien, der Möglichkeit der Interphasenanalyse und der hohen Sensitivität dieser Technik (Mancini et al. 2000). Ihr Nachteil besteht darin, dass nur spezifische Veränderungen nachgewiesen werden können, nach denen gezielt gefahndet wird. Letztendlich ist und bleibt die zytogenetische Untersuchung einer lymphatischen Neoplasie jedoch

Goldstandard und sollte im Rahmen der Diagnostik immer durchgeführt werden (Martin-Subero et al. 2003).

Die Interphase-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung wiederkehrender chromosomaler Aberrationen in pädiatrischen B-NHL genutzt. Die Vorteile der Technik, paraffinbasiertes Material zuverlässig mit hoher Sensitivität und bei Verwendung von Tissue Micro Arrays zeitsparend und kostenminimierend zu untersuchen, sprachen für die Anwendung der FISH-Technik in dieser Arbeit (siehe Kap. 4.1).

### 1.5 Ziele dieser Arbeit

Bisher sind wenige Studien zu pädiatrischen Lymphomen durchgeführt worden, die an repräsentativen Kollektiven genetische und immunhistochemische Eigenschaften und deren Korrelationen mit klinischen Parametern untersucht haben. Erkenntnisse zu Pathogenese und Eigenschaften der Lymphome können helfen, ihre Biologie zu verstehen und in Zukunft Therapien noch weiter zu optimieren.

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war die molekularzytogenetische Charakterisierung reifer pädiatrischer B-Zell-Lymphome, insbesondere die Bestimmung der Häufigkeit und der Bedeutung wiederkehrender Bruchereignisse in den Genorten *MYC*, *BCL2* und *BCL6*.

Konkrete Ziele der vorliegenden Arbeit waren im Einzelnen:

1. Die Etablierung eines Interphase-FISH-Systems zum gleichzeitigen Nachweis eines Bruches im *MYC*-Genort und der Translokation auf den *IGH*-Genort zur Differenzierung von *IGH-MYC*- (entsprechend t(8;14)) und non-*IGH-MYC*-Translokationen
2. Die vergleichende Untersuchung der Häufigkeiten von Bruchereignissen im *MYC*-Locus und der Translokation t(8;14) sowie von Bruchereignissen der Gene *BCL2* und *BCL6* mittels Interphase-FISH bei pädiatrischen Lymphomen mit Langzeitremissionen bzw. Frührezidiven/Therapieresistenz (sogenanntes „Extremkollektiv“)
3. Die Untersuchung der Häufigkeiten von Bruchereignissen im *MYC*-Locus und der Translokation t(8;14) und von Bruchereignissen der Gene *BCL2* und *BCL6* mittels Interphase-FISH bei pädiatrischen Lymphomen aus der NHL-BFM-Studie
4. Die Korrelation der Befunde der molekularzytogenetischen Untersuchungen mit epidemiologischen, histopathologischen, immunhistochemischen und klinischen Charakteristika sowie den klinischen Verläufen der pädiatrischen Lymphome.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Untersuchungsmaterial**

#### **2.1.1 Materialien für Kontrollen**

Zur Evaluation des FISH-Assays zum gleichzeitigen Nachweis von *MYC*-Brüchen und *IGH*-Translokationen wurden zu Kontrollzwecken zum einen in Carnoys-Fixativ asservierte Zellen fünf gesunder Probanden (Negativkontrollen) in Form von Auftropfpräparaten untersucht. Zum anderen wurden fünf Positivkontrollen von Lymphomen mit bekannter Translokation t(8;14) angefertigt; darunter die Burkitt-Zelllinien Raji, Daudi und Namalwa, außerdem zwei t(8;14)-positive Lymphome aus Routineuntersuchungen an Knochenmark und Lymphknoten. Sämtliches zytogenetisches Material stammte aus dem Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel. Die Karyotypen der verwendeten Positivkontrollen sind in der Tabelle A2.1 im Anhang der Arbeit dargestellt.

#### **2.1.2 Lymphome**

Alle histopathologischen Präparate der in dieser Arbeit untersuchten B-Zell-Lymphome wurden von der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel (kommissarischer Direktor: PD. Dr. med. Wolfram Klapper) zur Verfügung gestellt und dort simultan histopathologischen und immunhistochemischen Diagnostiken unterzogen. Dieses Probenmaterial war zuvor im Rahmen der NHL-BFM-Studie in den Jahren 1991 bis 2005 von anderen universitären, kommunalen, frei praktizierenden Pathologischen Instituten, onkologischen Kliniken oder Hämatonkologen befundet worden und dem Institut für Pathologie in Kiel zur weiteren referenzpathologischen Untersuchung übergeben worden. In dieser Arbeit wurde ein Kollektiv der NHL-BFM-Studie untersucht, das 87 diffus großzellige Lymphome, sechs Burkitt-Lymphome und 13 folliculäre Lymphome von Patienten im Alter zwischen 3 und 17 Jahren umfasste.

Des Weiteren wurde in Form einer retrospektiven Fall-Kontroll-Untersuchung ein Extremkollektiv (pädiatrische Lymphome mit Langzeitremissionen versus Fälle mit Frührezidiven bzw. Therapieresistenz) ausgewertet. Hiermit sollte untersucht werden, ob Korrelationen zwischen bestimmten chromosomalen Aberrationen und günstigen oder ungünstigen klinischen Verläufen pädiatrischer Lymphome bestehen. Das Extremkollektiv umfasste 76 primäre, paraffingebettete Biopsien (43 BL, 19 DLBCL, 10 PMBCL, 4 nicht näher klassifizierte high-grade B-Zell-Neoplasien). Diese Präparate, unterschiedlichen Studienprotokollen der Jahre 1992 bis 2005 zugehörig, stammten aus Referenzuntersuchungen lymphatischer Neoplasien. Je nach

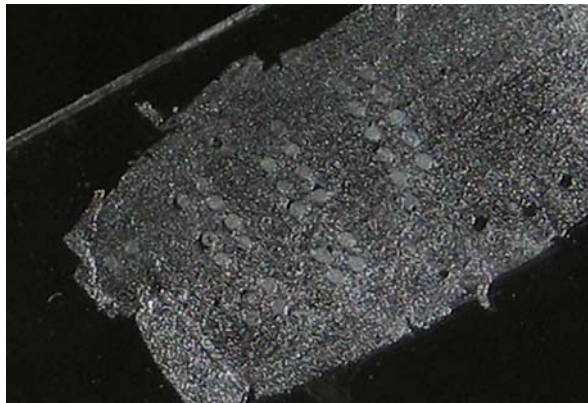
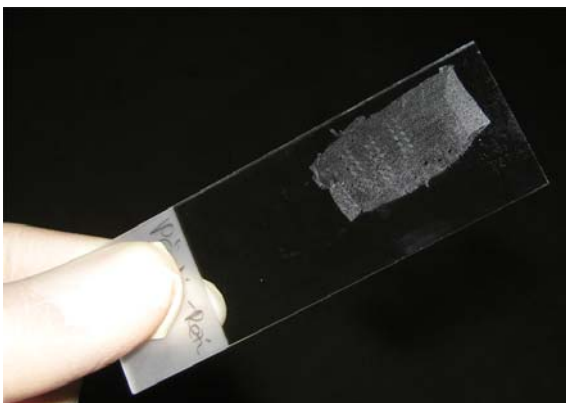
klinischem Verlauf wurden sie in zwei unterschiedliche Patientengruppen zu jeweils 38 Fällen eingeteilt. Patienten der einen Gruppe, die im Krankheitsverlauf eine Langzeitremission gezeigt hatten, wurden mit Patienten der anderen Gruppe, die Frührezidive oder eine Therapieresistenz erlitten hatten, gegenübergestellt, um einen Vergleich dieser beiden Gruppen zu ermöglichen. In diesem sog. „Matching“ wurden Patienten mit vergleichbaren Diagnosen, vergleichbaren Alters und gleichen Geschlechts auf beide Gruppen zu gleichen Anteilen verteilt.

Elf der insgesamt 76 Lymphome des Extremkollektivs wurden auch im Kollektiv der NHL-BFM-Studie aufgeführt und somit doppelt untersucht. Dies muss bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Alle Untersuchungsergebnisse bei diesen Lymphomen in beiden Kollektiven stimmten miteinander überein.

Die Diagnosen der in dieser Arbeit untersuchten Lymphome wurden primär histopathologisch gestellt; alle Fälle wurden von mindestens zwei Pathologen begutachtet und nach der WHO-Klassifikation von 2001 klassifiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft und Aufbereitung der Biopsien unterschieden sich diese in Größe und Qualität.

Sämtliches Untersuchungsmaterial der NHL-BFM-Studie und der Extremkollektive lag als histologisch aufgearbeitetes Lymphknotengewebe oder Tumor in Form sog. Tissue Micro Arrays (kurz TMAs, siehe Abbildung 2.1) vor. Ein einzelner Objektträger enthielt hierbei je nach Design das aufgearbeitete Probenmaterial von etwa 20 Fällen in jeweils einzelnen, ca. 0,6 mm im Durchmesser großen Arealen, sog. Cores. Der Karyotyp, der histologische Typ des Lymphoms, das Geschlecht des Patienten oder andere relevante Daten waren zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung mittels der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung bekannt, um eine Beeinflussung der Untersucher zu vermeiden.

**Abb. 2.1:** Tissue Micro Array (TMA): links ist ein Objektträger vor der Entparaffinisierung mit aufgetragenen Proben (Cores) abgebildet, rechts sind die einzelnen runden Cores größer dargestellt.



### 2.1.3 Ethikvoten

Das im Rahmen der Diagnosefindung entnommene und untersuchte Material der Patienten wurde gemäß der Studienprotokolle der NHL-BFM-Studien und der entsprechenden Einverständniserklärungen in dieser Arbeit zu Forschungszwecken verwandt. Zentrale und periphere Ethik-Voten liegen für die Studien der NHL-BFM-Studiengruppe vor. Die Analysen erfolgten im Rahmen des Verbundprojektes „Molekulare Mechanismen bei Lymphomen“, zu dem ein positives Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel vorliegt (Aktenzeichen D 403/05).

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Chemikalien

Allgemein gebräuchliche Chemikalien wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen, BRD) und der Firma Merck (Darmstadt, BRD) bezogen und sind nicht im Einzelnen aufgeführt.

Aqua Dest: Ampuwa Spüllösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg, BRD

Cot-1 DNA, humane (1mg/ml): Invitrogen, Carlsbad CA, USA

Citrat: Merck, Darmstadt, BRD

DABCO: Sigma, Deisenhofen, BRD

DAPI-Stammlösung (4,6 Diamino-2phenylindole): Serva, Heidelberg, BRD

Dextransulfat 50%: Oncor, Heidelberg, BRD

EDTA: Merck, Darmstadt, BRD

Eisessig (Essigsäure 100%): Merck, Darmstadt, BRD

Ethanol: Merck, Darmstadt, BRD

Formamid: Life Technologies, Eggenstein, BRD

Glycerin: Merck, Darmstadt, BRD

Igepal: Sigma, Deisenhofen, BRD

Magermilchpulver: Nestlé, Frankfurt, BRD

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Merck, Darmstadt, BRD

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Merck, Darmstadt, BRD

NaN<sub>3</sub>: Merck, Darmstadt, BRD

Natriumacetat: Merck, Darmstadt, BRD

Natriumcitrat: Merck, Darmstadt, BRD

Natronlauge: Merck, Darmstadt, BRD

Paraformaldehyd: Serva, Heidelberg, BRD

Pepsin: Sigma, Deisenhofen, BRD

Photokleber: Rubber cement-Fixogum: Marabu, Tamm, BRD

Roti®-Histol: Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Salzsäure: Merck, Darmstadt, BRD

### 2.2.2 Geräte

Automatisches Aufarbeitungsgerät für FISH-Protokolle (in dieser Arbeit für Wasch- und DAPI- Färbeprozesse der Präparate genutzt): Vysis VP 2000 Processor, Abbott / Vysis, Inc., Downers Grove, USA

Filtersätze für das Fluoreszenzmikroskop: AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop Axioskop: Zeiss, Oberkochen bzw. Göttingen, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop AXIO Imager.A1: Zeiss, Oberkochen bzw. Göttingen, Deutschland

ISIS Software: MetaSystems, Altusheim, Deutschland

Mikroskopkamera: IMAC CCD S 30

Schnellkochtopf: Tefal Clipso 6 Liter, Art.-Nr. 4113.40

Thermotron: Thermotron Industries, Holland, USA

Wasserbad: Julabo, Seelbach, Deutschland

Zentrifugen:

- Biofuge 22R: Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
- CL-J6B: Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland
- Sorvall Super T 21: Sorvall Products L.P., Newtown, CT, USA

### 2.2.3 Puffer und Lösungen

#### Antifade-Lösung:

Die Lösung, bestehend aus 90 Milliliter (ml) Glycerin und 10 ml PN-Puffer, der 23 mg/ml DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktan) enthält, wurde gekühlt bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

#### Carnoy's Fixativ:

Methanol und Eisessig wurden im Verhältnis 3:1 unter vorsichtigem Schütteln vermischt.



Citratpuffer:

2,1 g Citrat wurde mit 5,4 ml Natronlauge versetzt und anschließend unter Rühren mit Aqua dest. auf die Volumenmenge von einem Liter aufgefüllt.

DAPI-Lösung:

20 µl DAPI-Stammlösung wurde mit 60 ml 2x SSC versetzt und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

DAPI-Stammlösung:

0,2 mg DAPI wurde in 1 ml Aqua bidest. gelöst und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Mastermix:

Gemischte Lösung mit einem pH-Wert von 7,5, bestehend aus 50% Formamid, 10% Dextran-Sulfat und 2x SSC.

Paraformaldehydlösung:

In 60 ml Aqua dest. wurde 1 g Paraformaldehydpulver gelöst. Anschließend wurde die Lösung nach Versatz mit fünf Tropfen 10 N NaOH auf 70°C bis 100°C erhitzt, bis sie klar erschien. Der pH-Wert wurde nach Zugabe von 10 ml 100 mM MgCl<sub>2</sub> zwischen 7,0 und 7,5 eingestellt, das Volumen wurde mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

PN-Puffer:

0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wurde mit 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 800 ml Aqua dest. gelöst, auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

PNM-Puffer:

1000 ml PN-Puffer wurden mit 50 g Magermilchpulver und 0,2 g NaN<sub>3</sub> versetzt. Diese Lösung wurde für 1-2 Stunden auf 37°C erhitzt und anschließend 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der nun vom Sediment der Suspension abgetrennt war, ergab den PNM-Puffer, welcher bei Lagerung bei 4°C ein halbes Jahr haltbar war.

SSC-Lösung (20x):

0,3 M Natriumcitrat wurde mit 3 M NaCl in 800 ml Aqua dest. gelöst, auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt. Entsprechende Verdünnungen dieser 20-fachen Lösung ergaben die benötigten 0,1x-Lösung bzw. die 2x-Lösung.

Verdaulösung:

5 mg Pepsin wurden unter Zusatz von 0,5 ml 2 M Salzsäure in 99 ml Aqua dest. gelöst.

Waschlösung I:

2 ml 20 x SSC-Lösung sowie 300 µl Igepal wurden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

Waschlösung II:

10 ml 20 x SSC-Lösung sowie 100 µl Igepal wurden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

**2.2.4 Sonden**

Die für die Untersuchungen in dieser Arbeit verwendeten Sonden waren zum einen kommerzielle Fluoreszenzsonden, zum anderen für experimentelle Zwecke von der Firma Abbott / Vysis hergestellte, zum Zeitpunkt der Anfertigung der Arbeit nicht kommerziell verfügbare Sonden. Die laborspezifischen Cut-off-Werte sind bei den *BCL2*- und *BCL6*-Break-Apart-Sonden jeweils angegeben. Sämtliche Grafiken wurden von der Autorin selbst erstellt (Grundlagen: „Vysis Product Catalogue 2002-2003“ und <http://www.poseidondiagnosics.com>).

Für die Untersuchungen dieser Arbeit genutzte kommerzielle Sonden:

**2.2.4.1 LSI<sup>®</sup> MYC Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abb. 2.2.4a)**

Hersteller: Abbott / Vysis, Inc., Downers Grove, USA

Signalbild: Break-Apart-Bild bei Bruchgeschehen im Genlocus

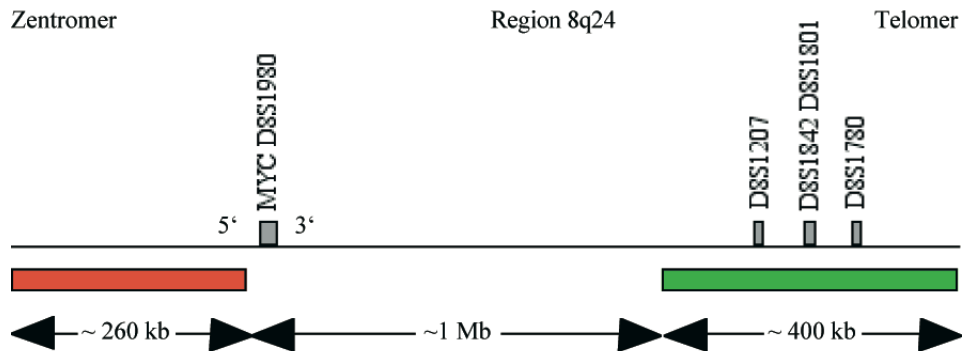
Farbe: SpectrumOrange<sup>™</sup> (SO) / SpectrumGreen<sup>™</sup> (SG)

Sondenbeschreibung / Hybridisierungsorte:

Die Sonde besteht aus zwei einzelnen Sonden, welche an entgegengesetzten Seiten des Gens *MYC* auf dem langen Arm des Chromosoms 8 hybridisieren (Region 8q24) und das Gen somit flankieren. Die in 5'-Richtung des Genortes gelegene Sonde fluoresziert im orange-roten Farbspektrum, die in 3'-Richtung hybridisierende Sonde fluoresziert im grünen Farbspektrum. Der Abstand vom *MYC*-Genort für die etwa 260 kb lange orange-rote 5'-Sonde ist nicht

genau bekannt, geschätzt wird eine Entfernung unter 140 kb. Die etwa 400 kb große grüne Sonde liegt etwa 1 Mb in 3'-Richtung vom *MYC*-Genort entfernt.

**Abb. 2.2.4a:** Abbott / Vysis LSI<sup>®</sup> MYC Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (modifiziert nach „Vysis Product Catalogue 2002-2003“)



#### 2.2.4.2 LSI<sup>®</sup> BCL2 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abb. 2.2.4b)

Hersteller: Abbott / Vysis, Inc., Downers Grove, USA

Signalbild: Break-Apart-Bild bei Bruchgeschehen im Genlocus

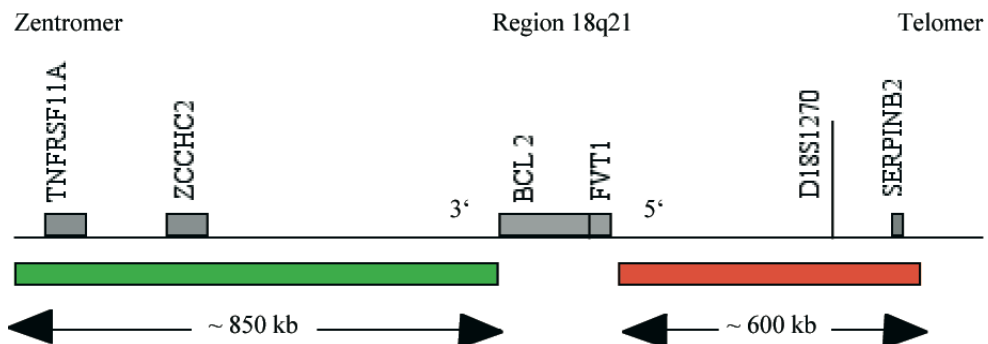
Farbe: SpectrumOrange<sup>™</sup> (SO) / SpectrumGreen<sup>™</sup> (SG)

Sondenbeschreibung / Hybridisierungsorte:

Auch diese Sonde besteht aus zwei einzelnen Sonden, welche den Genort des *BCL2*-Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 18 flankieren (Region 18q21). In 3'-Richtung proximal vom *BCL2*-Gen liegt eine etwa 850 kb große grüne Sonde; auf der anderen Seite wird das Gen von einer etwa 600 kb großen orange-roten Sonde flankiert.

Cut-off-Wert: 2,07%

**Abb. 2.2.4b:** Abbott / Vysis LSI<sup>®</sup> BCL2 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (modifiziert nach „Vysis Product Catalogue 2002-2003“)



### 2.2.4.3 LSI<sup>®</sup> BCL6 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abb. 2.2.4c)

Hersteller: Abbott / Vysis, Inc., Downers Grove, USA

Signalbild: Break-Apart-Bild bei Bruchgeschehen im Genlocus

Farbe: SpectrumOrange<sup>™</sup> (SO) / SpectrumGreen<sup>™</sup> (SG)

Sondenbeschreibung / Hybridisierungsorte:

Diese Sonde besteht ebenfalls aus zwei einzelnen Sonden, die in der Region 3q27 beidseits des *BCL6*-Gens hybridisieren. Es handelt sich dabei um eine 300 kb große orange-rote Sonde in 3'-Richtung des Gens und eine 600 kb große grüne Sonde in 5'-Richtung. Zwischen diesen zwei Sonden liegt eine Lücke von etwa 42 kb, in der auch das gesamte *BCL6*-Gen lokalisiert ist.

Cut-off-Wert: 2,07%

**Abb. 2.2.4c:** Abbott / Vysis LSI<sup>®</sup> BCL6 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (modifiziert nach „Vysis Product Catalogue 2002-2003“)



### 2.2.4.4 Kreatech Poseidon<sup>™</sup> Repeat Free<sup>™</sup> BCL6 (3q27) Break Probe (Abb. 2.2.4d)

Hersteller: Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande

Signalbild: Break-Apart-Bild bei Bruchgeschehen im Genlocus

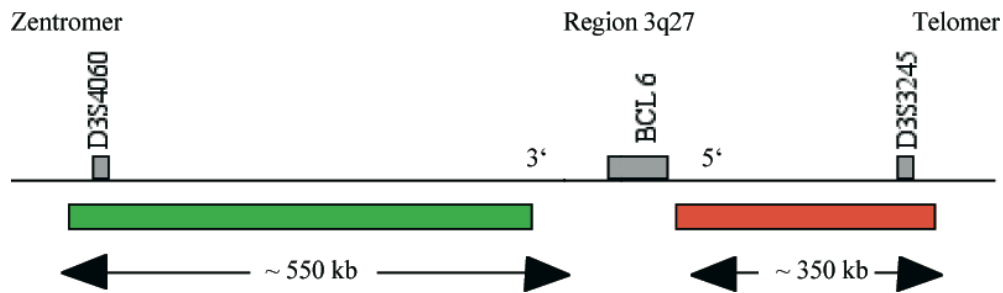
Farbe: PlatinumBright550 (rot) / PlatinumBright495 (grün)

Sondenbeschreibung / Hybridisierungsorte:

Diese Sonde ist der Abbott / Vysis-*BCL6*-Sonde sehr ähnlich. Sie besteht aus einer in 5'-Richtung des Gens hybridisierenden, etwa 350 kb großen roten Sonde und einer in 3'-Richtung hybridisierenden, etwa 550 kb großen grünen Sonde. Sie flankieren das *BCL6*-Gen mit seinen bekannten typischen und alternativen Bruchpunkten.

Cut-off-Wert: In Untersuchungen gesunder Kontrollen mit der Kreatech *BCL6*-Sonde im Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel, konnten keine Bruchereignisse nachgewiesen werden, so dass ein theoretischer Cut-off-Wert der Sonde von 0% vorlag. Um falsch positive Befunde zu vermeiden, wurde die Nachweisgrenze bei 4% festgelegt.

**Abb. 2.2.4d:** Kreatech Poseidon™ Repeat Free™ BCL6 (3q27) Break Probe (modifiziert nach <http://www.poseidondiagnosics.com>)



Für die Untersuchungen dieser Arbeit genutzte experimentelle Sonde:

#### 2.2.4.5 Abbott / Vysis IGH SA Sonde (Abb. 2.2.4e)

Hersteller: Abbott / Vysis, Inc., Downers Grove, USA

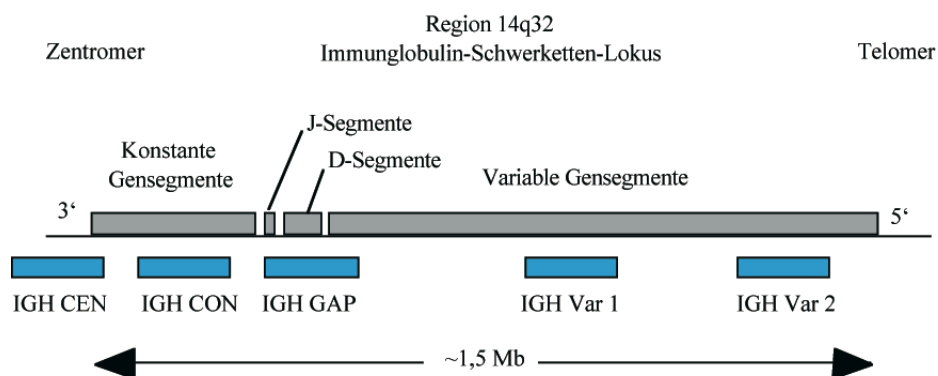
Signalbild: einfaches fluoreszierendes Signalbild des *IGH*-Locus

Farbe: SpectrumAqua™ (SA)

Sondenbeschreibung / Hybridisierungsorte:

Die blau fluoreszierende Sonde besteht aus fünf einzelnen Sonden (*IGH* CEN SA, *IGH* CON SA, *IGH* GAP SA, *IGH* Var 1 SA, *IGH* Var 2 SA), die an unterschiedlichen Regionen des *IGH*-Genlocus hybridisieren und in einer Zelle gemeinsam zwei für den Untersucher sichtbare fluoreszierende Signale bei zwei intakten Genloci liefern.

**Abb. 2.2.4e:** Abbott / Vysis IGH SA Sonde



## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Prinzip der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Bei der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung macht man sich die Basenpaarung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden mit komplementären zellulären DNA-Abschnitten in Meta- und Interphasezellen zunutze. Durch Aufschmelzung (Denaturierung) wird sowohl die doppelsträngige zelluläre DNA als auch die Sonden-DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten. Existieren nun zueinander komplementäre Sequenzen von Sonden- und Zell-DNA, so lagern sich diese bei anschließender Abkühlung der Proben (Renaturierung) aneinander. Somit wird die markierte Sonden-DNA in nukleäre DNA angelagert; es entsteht also entsprechend der komplementären Basenabfolge ein Hybrid aus Sonden-DNA und zu untersuchender Kern-DNA. Um nicht gebundene, überschüssige Sonden zu entfernen, unterzieht man das Probenmaterial mehreren Waschvorgängen und entfernt so außerdem unspezifische Anlagerungen.

Die in dieser Arbeit verwendete Sonden-DNA bestand ausschließlich aus direkt fluoreszenzmarkierten Nukleotiden, so dass sich Hybridisierungen der Sonden auf der zellulären DNA in der Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop direkt nachweisen ließen. Es waren keine weiteren Markierungstechniken notwendig.

### 2.3.2 Generierung von direkt markierten Sonden

Zur Untersuchung der *IGH-MYC*-Gentranslokationen wurde neben der kommerziellen *MYC* Break Apart Sonde ein Gemisch aus fünf Einzelsonden für den *IGH*-Genort (Abbott / Vysis®) genutzt (s.o.). Diese Einzelsonden waren mit Spectrum Aqua markiert. Durch diese Kombination konnten *MYC*-Brüche und -Gentranslokationen auf den *IGH*-Genlocus gleichzeitig nachgewiesen werden.

Pro Gesamtvolumen von 30 µl MasterMix wurden 0,22 µl *IGH* CEN SA; 0,23 µl *IGH* CON SA; 0,27 µl *IGH* GAP SA; 0,22 µl *IGH* Var 1 SA und 0,26 µl *IGH* Var 2 SA mit 15 µl Cot-1-DNA, 1,9 µl NaAc und 51,25 µl 100% Ethanol vermischt und anschließend 30 min bei 17000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes und Trocknen des Pellets wurden 6 µl H<sub>2</sub>O, 21 µl *MYC*-Sonden-Puffer (Abbott) und 3 µl *MYC* Break Apart Probe hinzugefügt.

Die Präparation der direkt markierten Sonden erfolgte bei möglichst schwachen Lichtverhältnissen, um eine Einbuße der Leuchtkraft der empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden und somit eine gute Auswertbarkeit zu ermöglichen.

### **2.3.3 Herstellung von Auftropfpräparaten für FISH aus Zellsuspensionen**

Für die Kontrolluntersuchungen an fünf *IGH-MYC*-positiven Lymphomen wurden die jeweiligen Zellsuspensionen, die in Carnoys-Fixativ bei -20 °C lagerten, in einer Thermotron-Klimakammer auf handelsübliche Glasobjektträger aufgetropft. Bei dieser Auftropftechnik wurden mit Hilfe einer Pipette einzelne, wenige Tropfen der Suspension aus größtmöglicher Höhe auf abgegrenzte Bereiche des Objektträgers getropft und anschließend getrocknet. In der Thermoton-Klimakammer herrschte eine Umgebungstemperatur von 22 °C, was für die schonende Trocknung und die Erhaltung der Inter- und Metaphasekerne ideale Bedingungen darstellt.

Anschließend wurden die getrockneten Präparate unter einem Lichtmikroskop nach geeigneten Arealen zur Hybridisierung abgesucht. Dabei waren die Areale von Interesse, die neben einer intakten Zellmorphologie und geeigneter Zelldichte möglichst viele Metaphasen enthielten. Diese Areale wurden mit einem Diamantschreiber auf der Unterseite des Glases markiert. Um die Präparate auf die Hybridisierung vorzubereiten, wurden diese in eine Küvette mit Verdau-Lösung gestellt und bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert. Auf einen kurzen Waschprozess in Aqua dest. folgte eine zweiminütige Fixierung in Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschprozess in Aqua dest. wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 85%, absolut, jeweils 5 Minuten) dehydriert, daraufhin für etwa 30 Minuten luftgetrocknet.

### **2.3.4 Aufbereitung von Paraffinpräparaten für FISH**

Um das in Paraffin eingebettete, Formalin-fixierte Untersuchungsmaterial mit fluoreszierenden DNA-Sonden zu hybridisieren, wurden die Präparate zunächst entparaffiniert, wofür sie drei mal für eine Dauer von je fünf Minuten in einer Küvette mit Roti®-Histol bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Daraufhin wurden die Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (absolut, 85%, 70% Ethanol für jeweils fünf Minuten) und für fünf Minuten in Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde in einem Schnellkochtopf ein Liter Citratpuffer bis zum Kochen erhitzt, die Objektträger wurden hineingestellt, der Topf verschlossen und der Druckaufbau auf höchster Stufe vorgenommen. Nach Erreichen des höchsten Druckniveaus wurde dieses für 160 Sekunden aufrechterhalten. Daraufhin wurde der Topf unter fließendem, kalten Wasser abgekühlt und der Dampf entwich bei Öffnen des Ventils. Der Deckel wurde geöffnet, etwa zwei Liter Leitungswasser wurden der Pufferlösung und den Objektträgern zugegeben, anschließend wurden diese aus dem Topf genommen und bei Raumtemperatur zwei Minuten in Aqua dest. gestellt.

Dann wurden die Objektträger daraufhin für 30 Minuten in der Verdauung bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate für eine Minute in Aqua dest. gewaschen.

Zur Fixierung wurden die Objektträger zwei Minuten in 1% Paraformaldehyd-Lösung gestellt und anschließend erneut für eine Minute in Aqua dest. gewaschen. Es erfolgte daraufhin eine Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70%, 85%, absolut für jeweils zwei Minuten) und die Trocknung der Präparate an der Luft für etwa 10 Minuten.

### **2.3.5 Hybridisierung**

Zur Hybridisierung wurden bei Auftropfpräparaten 1,3 µl der direkt markierten Sondenlösung auf das zuvor markierte Areal pipettiert, dieses wurde mit einem runden Deckgläschen abgedeckt und mit Photokleber (Fixogum) verschlossen. Proben- und Ziel-DNA wurden im Wasserbad bei 75°C für 7 Minuten denaturiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C in einer Metallbox hybridisiert.

Für eine Hybridisierung von TMAs wurden 8 µl FISH-Probe auf den Objektträger pipettiert; dieser wurde anschließend mit einem quadratischen Deckglas versehen und mit Photokleber verschlossen. Die Denaturierung der Proben- und Ziel-DNA erfolgte in einer Metallbox im Wasserbad bei 85°C für 30 Minuten, die Hybridisierung im Brutschrank bei 37°C über einen Zeitraum von 3 Nächten.

### **2.3.6 Waschen der Präparate und Eindecken**

Nach Entfernen des Photoklebers und des Deckgläschens wurden die Präparate für zwei Minuten bei 71°C im Waschpuffer I inkubiert. Nach anschließender einminütiger Inkubation im Waschpuffer II bei Raumtemperatur wurden die Präparate in 2 x SSC gestellt. Zur Gegenfärbung der Zellkerne mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff erfolgte eine Inkubation der Präparate für fünf Minuten in DAPI-Lösung und eine anschließende erneute Spülung in 2 x SSC. Diese erforderlichen Wasch- und DAPI-Färbeprozesse wurden mithilfe des automatischen Aufarbeitungsgerätes VP 2000 Processor durchgeführt, das diese Prozesse nach vorgegebenen und programmierten Protokollen automatisch durchführte.

Abschließend wurden die Objektträger mit zwei Tropfen Antifade-Lösung versehen und mit einem Deckglas abgedeckt.

Alle Arbeitsschritte erfolgten ebenso wie die Anfertigung der Sonden möglichst zügig und lichtgeschützt, um ein vorzeitiges Ausleuchten der Sonden zu verhindern.



## 2.4 Auswertung und Dokumentation

Die fluoreszierenden Hybridisierungssignale wurden sowohl in den Auftropfpräparaten als auch in den Gewebeschnitten mit den Zeiss Fluoreszenzmikroskopen Axioskop bzw. AXIO Imager.A1 und geeigneten Filtersätzen der Firma AHF ausgewertet. Eine Bilddokumentation erfolgte mithilfe der IMAC CCD S 30-Mikroskopkamera und der ISIS-Software der Firma MetaSystems.

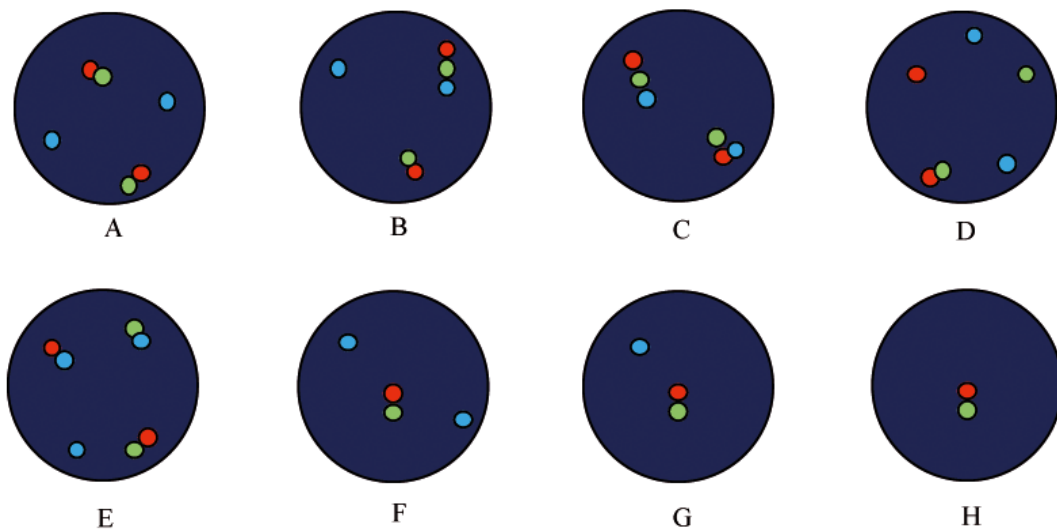
Bei jeweils intakten Genloci *MYC*, *BCL2* und *BCL6* waren bei der Anwendung der Break-Apart-Sonden in der Auswertung je zwei co-lokalisierte Signale zu erwarten. Kam es in einem Genlocus zu einem Bruchereignis, so wichen die Signale auseinander. In dem in dieser Arbeit etablierten Assay wurde zudem die Translokation des *MYC*-Gens auf den *IGH*-Locus untersucht. In einem positiven Fall war eine Fusion der Signale zu erkennen, also neben einem co-lokalisierendem rot-grünen Signal war je ein „neu co-lokalisierendes“ blau-grünes und blau-rotes Signal sichtbar (Abb. 2.4 E). Bedingt durch eine physikalische Distanz zwischen den flankierenden Sonden konnte jedoch auch bei intakten Genloci ein kleiner Spalt zwischen den Signalen erkennbar sein. Um eine Fehlinterpretation solcher physiologischer Signalkonstellationen als Bruchereignis im Sinne einer *MYC-IGH*-Translokation zu verhindern, wurden spezifische Nachweisgrenzen ermittelt. Hierzu wurde in den Zellen einer Negativkontrolle der Signalabstand optisch in Relation zur Größe eines Signaldurchmessers von zwei unabhängigen Auswertern geschätzt. In allen fünf Kontrollen galten Signalabstände größer als zwei Signaldurchmesser für Signaldeviation bzw. Abstände kleiner als ein Durchmesser für eine Signalfusion als abnorm. Aus den erhaltenen Daten der Auswertung von insgesamt 500 Zellen gesunder Probanden wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der falsch-positiven Zellen (d.h. Signalkonstellationen mit Abständen von mehr als zwei Signalen bei einem Bruchereignis oder weniger als ein Signal bei einer Fusion) ermittelt. Die möglichen Signalkonstellationen der verwendeten Sonden sind in Abb. 2.4 aufgeführt. Der errechnete Mittelwert plus drei Standardabweichungen wurde, wie allgemein üblich, als untere Nachweisgrenze definiert (Bentz et al. 1994). Von einem als pathologisch zu wertenden klonalen Bruchereignis wurde dann ausgegangen, wenn innerhalb einer Biopsieprobe der Prozentsatz der Zellen mit abnormen Signalabständen über dieser unteren Nachweisgrenze lag.

Da zum Einsatz der Sonden Abbott / Vysis LSI<sup>®</sup> BCL2, Abbott / Vysis LSI<sup>®</sup> BCL6 sowie Kreatech Poseidon<sup>™</sup> Repeat Free<sup>™</sup> BCL6 in der Routinediagnostik bereits Kontrolluntersuchungen im Institut für Humangenetik des UKSH, Campus Kiel, durchgeführt worden waren und eine für experimentelle Zwecke ausreichende Validität und Reliabilität gewährleistet war,

waren weitere Kontrolluntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht notwendig. Entsprechende Cut-off-Werte sind bei der Beschreibung der Sonden angegeben (Kap. 2.2.4).

Bei der Auswertung der Lymphom-TMAs wurden, sofern möglich, die Signalkonstellationen von 100 Interphasezellkernen erhoben. Da die gleichzeitige Auswertung von rot-grünen und blauen Signalen den Einsatz zwei verschiedener Filter erforderte und dies einen großen technischen Aufwand bedeutete, wurde bei einem *MYC*-Bruch die Fusion von blauen und roten bzw. blauen und grünen Signalen in lediglich zwanzig Zellen mit *MYC*-Split ausgewertet. Die restlichen Zellen wurden unter Einsatz nur eines Filters anschließend in ihren Signalkonstellationen der *MYC*-Sonde ausgezählt. Um untersucherabhängige Fehler auszuschließen, wurden die Präparate von einem zweiten Untersucher (Dr. S. Gesk, Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel) auf Signaldistanzen größer als zwei Signalabstände geprüft. Die Erstuntersuchungsergebnisse wurden dabei in sämtlichen Fällen bestätigt. Von jedem auswertbaren Präparat wurden unter Einsatz beider Filter mindestens zwei repräsentative Fotos angefertigt.

**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung möglicher Signalkonstellationen für verschiedene Aberrationen im *MYC*-Gen unter möglicher Beteiligung des *IGH*-Locus in Interphasezellkernen mit dem in der vorliegenden Arbeit etablierten FISH-Assay. Rot-grüne, im Normalfall colokalisierte Signale markieren den *MYC*-Genlocus, blaue Signale markieren den *IGH*-Locus. A: Normale Konstellation; zwei colokalisierte (Co-) *MYC*-Signale, zwei separate blaue *IGH*-Signale. B: Normale *MYC*-Verhältnisse mit einfacher Fusion des blauen *IGH*-Signals (in gesunden Kontrollen lagebedingte optische Fusion, also falsch positiv). C: Normale *MYC*-Verhältnisse mit doppelter Fusion der blauen *IGH*-Signale (in gesunden Kontrollen ebenfalls optische Fusion, also falsch positiv). D: Bruchereignis im *MYC*-Genlocus ohne Translokation auf den *IGH*-Locus; ein Co-Signal, jeweils ein einzelnes rotes und grünes Signal („Split“), zwei davon unabhängige blaue Signale. E: Bruchereignis im *MYC*-Genlocus mit Translokation auf den *IGH*-Locus; ein Co-Signal, ein rot-blaues und ein grün-blaues Fusionssignal und ein einzelnes blaues Signal. F-H: Beispiele für mögliche Konstellationen, die meist durch Schnittartefakte oder Deletionen zustande kommen: F: fehlendes zweites Co-Signal. G: fehlendes zweites Co-Signal und fehlendes zweites *IGH*-Signal. H: fehlende zweite Co-Signale und *IGH*-Signale.



## 2.5 Statistische Auswertungen

Alle Ergebnisse der molekularzytogenetischen, histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen am Untersuchungsmaterial dieser Arbeit wurden im August 2007 in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Universität Schleswig-Holstein, Campus Kiel zusammengestellt und der NHL-BFM-Studienzentrale Giessen zur statistischen Auswertung übergeben. Herr Dr. Martin Zimmermann von der medizinischen Hochschule Hannover (Abteilung NHL-BFM-Studienzentrale) wertete die Ergebnisse der Untersuchungen statistisch aus und korrelierte diese sowohl untereinander als auch mit den klinischen, epidemiologischen und prognostischen Parametern der Studienteilnehmer.

Die Dauer des Ereignis-freien Überlebens (event-free survival, EFS) der Studienteilnehmer ist definiert als der Zeitraum von Diagnosestellung bis zum Zeitpunkt des ersten Ereignisses

(Therapieversagen, Tod jeglicher Ursache, Entwicklung eines Sekundärmalignoms) oder bei ausbleibendem Zwischenfall bis zum letzten verzeichneten Kontakt mit den Studienkliniken. Die Wahrscheinlichkeiten des EFS wurden mithilfe der Kaplan-Meier-Methode und Standardabweichungen nach Greenwood berechnet und mittels des log-rank-Tests (Kalbfleisch und Prentice 2005) bzw. des Gray-Tests für kumulative Inzidenzen verglichen. Unterschiede in der Verteilung individueller Parameter zwischen den gebildeten Studienteilnehmergruppen wurden mit dem Fisher-Exakt-Test oder dem  $\chi^2$ -Test analysiert. Die statistische Analyse wurde mit dem SAS-Programm durchgeführt (SAS-PC, Version 9.1; SAS Institute, Cary, NC). Zur statistischen Berechnung wurde durch Herrn Dr. Zimmermann ein DLBCL-Fall aus dem Kollektiv ausgeschlossen, da der betreffende Patient aufgrund eines follikulären Zweitlymphoms doppelt aufgeführt und untersucht wurde. Daher weicht die Zahl der DLBCL-Fälle in den statistischen Berechnungen stets um einen Fall von der Zahl der molekulargenetischen Ergebnisse dieser Arbeit ab.

### 3. ERGEBNISSE

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein neuer Drei-Farb-Interphase-FISH-Assay zum gleichzeitigen Nachweis von Brüchen im *MYC*-Genort und Translokationen mit Beteiligung des *IGH*-Genortes etabliert. Mit diesem sowie mit kommerziellen FISH-Sonden zur Detektion von Bruchereignissen in den Genorten *BCL2* und *BCL6* wurden aggressive, pädiatrische B-Zell-Lymphome zum einen aus einem hinsichtlich des Krankheitsverlaufs zusammengestellten Extremkollektiv, zum anderen aus einem unselektierten Kollektiv der NHL-BFM-Studie untersucht. Die Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchungen der NHL-BFM-Studienpräparate wurden mit immunhistochemischen Befunden und klinischen Variablen korreliert.

#### 3.1 Etablierung eines Interphase-FISH-Assays zum gleichzeitigen Nachweis von *MYC*-Brüchen und *IGH-MYC*-Fusionen

##### 3.1.1 Auswahl der Sonden

Um den gleichzeitigen Nachweis eines Bruchereignisses im *MYC*-Genort und einer Translokation des Bruchelementes auf den *IGH*-Genort zu führen, wurde ein Drei-Farb-Interphase-FISH-Assay etabliert. Eine blau markierte, den Genort überspannende *IGH*-Sonde wurde dazu mit einer rot-grün markierten *MYC* Dual Color Break-Apart-Sonde kombiniert (Beschreibung der Sonden siehe Kap. 2.2.4).

##### 3.1.2 Kontrolluntersuchungen

Bei intakten *MYC*-Genorten blieben die beiden rot-grünen Signale des Drei-Farben-*IGH-MYC*-Assays colokalisiert. Außerdem waren bei intakten *IGH*-Genorten zwei davon unabhängige blaue Signale sichtbar. Das Auseinanderweichen eines roten und grünen Signals, ein sogenannter „Split“, trat bei einem Bruchereignis in der Region des *MYC*-Genortes auf. Bei einer Translokation des *MYC*-Locus auf den *IGH*-Locus waren jeweils ein rotes und ein grünes *MYC*-Signal mit einem „gesplitteten“ blauen *IGH*-Signal fusioniert, ein colokalisiertes rot-grünes Signal blieb bestehen. Auch ein *MYC*-Bruch ohne Beteiligung des *IGH*-Locus war möglich. In diesem Fall waren neben einem intakten, colokalisierten *MYC*-Signal ein gespaltenes *MYC*-Signal sowie zwei intakte blaue, nicht fusionierte *IGH*-Signale erkennbar.

Wie unter 2.4 beschrieben, wurde aus den falsch-positiven Ereignissen in den Kontrolluntersuchungen gesunder Zellen eine untere Nachweisgrenze für bestimmte Signalkonstellationen berechnet. Von einem als pathologisch zu wertenden klonalen Bruchereignis wurde dann aus-

gegangen, wenn innerhalb eines Biopsats der Prozentsatz der Zellen mit abnormen Signalmustern über dieser unteren Nachweisgrenze lag.

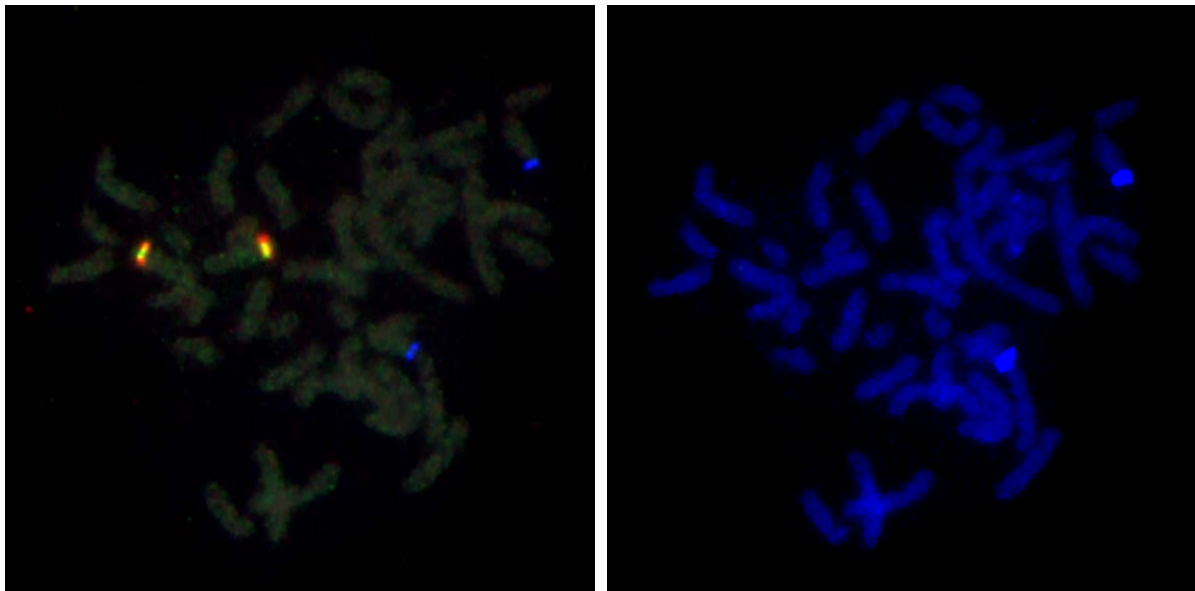
Für die verschiedenen Signalkonstellationen sind ihre jeweiligen Nachweisgrenzen (der sog. Cut-off-Wert) in Tab. 3.1.2a aufgeführt. Die Cut-off-Werte für einen Split eines rot-grünen Signals bei zwei singulären blauen Signalen sowie für einen Split mit Fusion eines blau-grünen Signals betragen jeweils 1,5%. Die Nachweisgrenze für lediglich ein colokalisiertes Signal mit zwei singulären blauen Signalen betrug 2%. In den Abbildungen 3.1.2a und 3.1.2b sind FISH-Analysen mit dem t(8;14)-Assay in gesunden Kontrollen dargestellt.

**Tab. 3.1.2a:** Kontrolluntersuchungen mit dem t(8;14)-Interphase-FISH-Assay

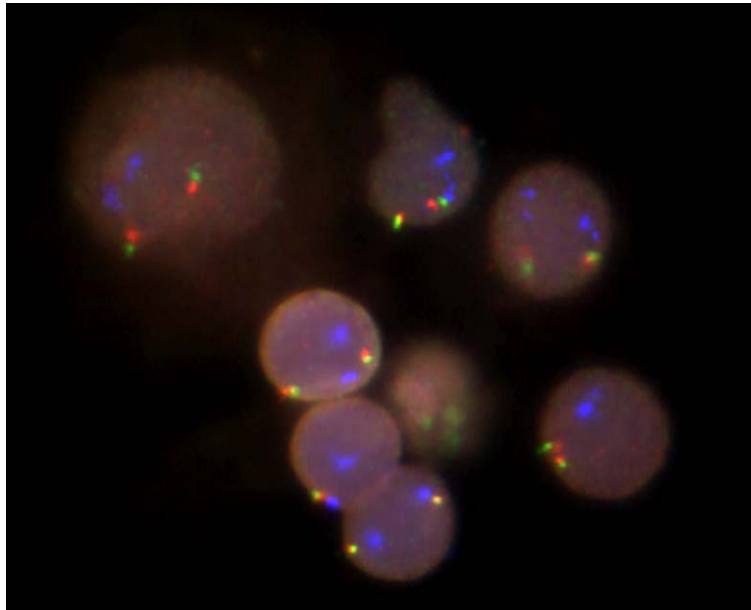
Kontrolle Nr.	Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen						Gesamt n
	2RG 2B	1RG 1RGB 1B	1RG 1R 1G 2B	1RG 1R 1B 1GB	1RGB 1RGB	1RG 2B	
1	89%	10%	1%	0	0	0	100
2	84%	13%	0	1%	2%	0	100
3	88%	10%	0	0	1%	1%	100
4	83%	15%	0	0	2%	0	100
5	82%	14%	0	0	3%	1%	100
Mittelwert	85,2%	12,4%	0,2%	0,2%	1,6%	0,4%	
SD	3,1%	2,3%	0,4%	0,4%	1,1%	0,5%	
<b>Cut-off (Nachweis- grenze)</b>			<b>1,5%</b>	<b>1,5%</b>		<b>2,0%</b>	

Legende: n = Gesamtzellzahl, R = einfaches rotes Signal, RG = rot-grünes colokalisiertes Signal, RGB = rot-grün-blau colokalisiertes Signal usw., SA = Signalabstand, SD = Standardabweichung

**Abb. 3.1.2a und 3.1.2b:** Links FISH-Analyse mit dem t(8;14)-Assay in einer Metaphase der Kontrolle Nr. 3, rechts dieselbe FISH-Analyse in DAPI-DNA-Färbung



**Abb. 3.1.2c:** FISH-Analyse mit dem t(8;14)-Assay in Interphasezellkernen der Kontrolle Nr. 5



**Legende zu den Abbildungen 3.1.2a, 3.1.2b und 3.1.2c:** Es sind jeweils zwei colokalisierte rot-grüne Signale (optisch zu gelb fusioniert) der beiden *MYC*-Genloci auf den Chromosomen 8 zu erkennen, außerdem unabhängig davon zwei blaue *IGH*-Signale auf den beiden Chromosomen 14. In der Abb. 3.1.2b erscheinen die Chromosomen durch DAPI-Färbung zur besseren Orientierung in blau.

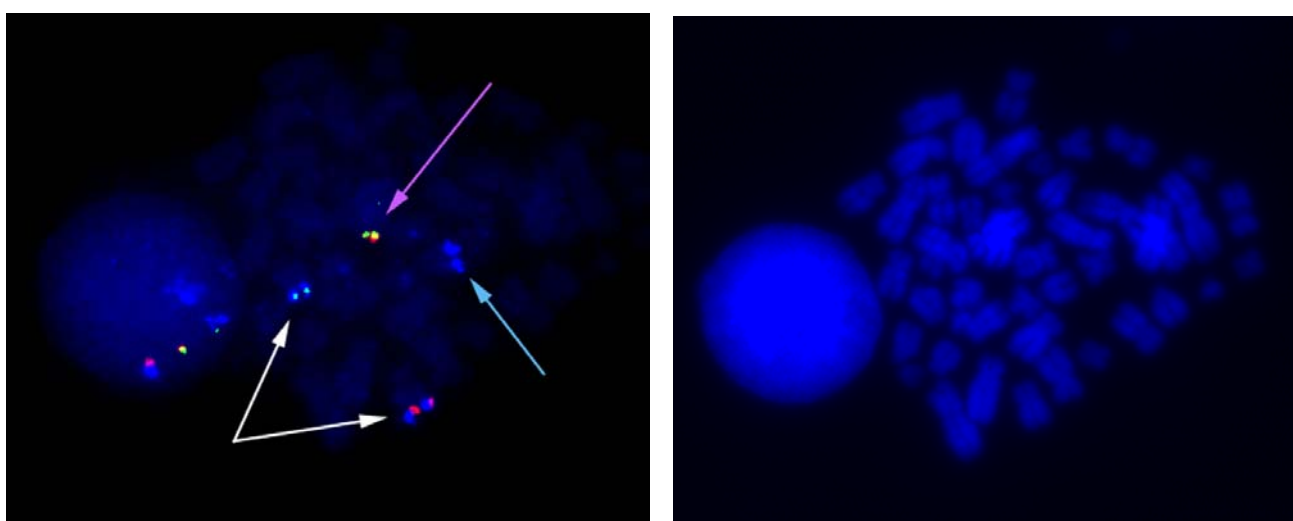
Als Positivkontrollen für den neu etablierten FISH-Assay zum gleichzeitigen Nachweis eines *MYC*-Bruchs und der Translokation auf den *IGH*-Locus wurden fünf Lymphome mit bekannter Translokation t(8;14) bzw. *IGH-MYC*-Fusion untersucht. Obwohl zahlreiche Variationen der aberranten Signalkonstellationen auftraten, war in allen Fällen mit bekannter Translokation t(8;14) ein signifikanter Anteil von Zellen mit auf Bruch- und Translokationsereignisse hinweisenden Signalen nachweisbar. In der Zelllinie Daudi zeigten 97%, in den Zelllinien Namalwa und Raji jeweils 100% der Zellen eine auf einen *MYC*-Bruch und eine *IGH-MYC*-Fusion hinweisende Signalkonstellation. Im Fall 1 wiesen 53% der untersuchten Zellen *MYC-IGH*-Translokationen auf. 91% der Zellen des Falles 2 zeigten *MYC-IGH*-Translokationen. Somit erwies sich der Interphase-FISH-Assay in den Kontrolluntersuchungen als zuverlässige Methode zum gleichzeitigen Nachweis von Bruchereignissen im *MYC*-Genlocus und Translokationen auf den *IGH*-Locus.

Die genaue Darstellung der Signalkonstellationen der Positivkontrollen ist in der Tabelle A3.1.2 im Anhang dargestellt. In den Abbildungen 3.1.2c und 3.1.2d ist der t(8;14)-Assay in der Verwendung auf t(8;14)-positiven Kontrollpräparaten dargestellt.

**Tab. 3.1.2b:** Anzahl der unter Verwendung des FISH-t(8;14)-Assays für *MYC*-Bruchereignisse positiven Zellen in den Kontrollen mit bekannter t(8;14)

Positivkontrolle mit t(8;14), je 100 Zellen	Zellen mit <i>MYC</i> -Bruchereignis und <i>IGH-MYC</i> -Fusion	Zellen ohne <i>MYC</i> -Bruchereignis
Daudi	97%	3%
Namalwa	100%	0%
Raji	100%	0%
Positivkontrolle 1	53%	47%
Positivkontrolle 2	91%	9%

**Abb. 3.1.2c und 3.1.2d:** links eine FISH-Analyse mit dem t(8;14)-Assay in einem Metaphasezellkern der Positivkontrolle 2, rechts dieselbe Metaphase in DAPI-DNA-Färbung



**Legende zu Abb. 3.1.2c:** Links ist ein colocalisiertes rot-grünes *MYC*-Signal erkennbar (violetter Pfeil) sowie ein jeweils mit einem blauen Signal fusioniertes rotes und grünes Signal (weiße Pfeile). Diese Konstellation deutet auf eine *MYC-IGH*-Fusion hin. Ein singuläres blaues Signal repräsentiert den einen intakten *IGH*-Locus (blauer Pfeil). Rechts ist zur Orientierung dieselbe Metaphase mit blau fluoreszierendem DAPI-Farbstoff angefärbt.

### 3.2 Nachweis chromosomaler Translokationen bei selektierten pädiatrischen Lymphomen mit Langzeitremissionen bzw. Frührezidiven/Therapieresistenz (sogenanntes „Extremkollektiv“)

Für die Analyse der insgesamt 76 pädiatrischen Lymphome mit Langzeitremissionen (n=38) bzw. Frührezidiven oder Therapieversagen (n=38) wurden Interphase-FISH-Assays zum Nachweis von Bruchereignissen der Genorte *MYC* in 8q24, *IGH* in 14q32, *BCL6* in 3q27 und *BCL2* in 18q21, wie sie wiederkehrend in hochmalignen B-Zell-Lymphomen beschrieben sind, eingesetzt.



### 3.2.1 Nachweis von Bruchereignissen im *MYC*-Genort und Nachweis der Translokation t(8;14) mittels Interphase-FISH im Extremkollektiv

Für die *IGH-MYC*-Drei-Farben-Sonde waren 41 der insgesamt 76 Fälle (54%) auswertbar. Im Kollektiv der Therapieresistenz- bzw. Rezidivfälle waren 17 von 38 Fällen auswertbar (45%). Unter diesen fanden sich sechs Fälle mit Translokationen t(8;14) (5 BL, 1 DLBCL). Drei Fälle (2 BL, 1 DLBCL) zeigten *MYC*-Brüche ohne eine Beteiligung des *IGH*-Locus. Mit Ausnahme eines Falles zeigten alle BL einen *MYC*-Bruch. Insgesamt wiesen also 53% der Rezidiv- bzw. therapieresistenten Lymphome *MYC*-Bruchereignisse auf.

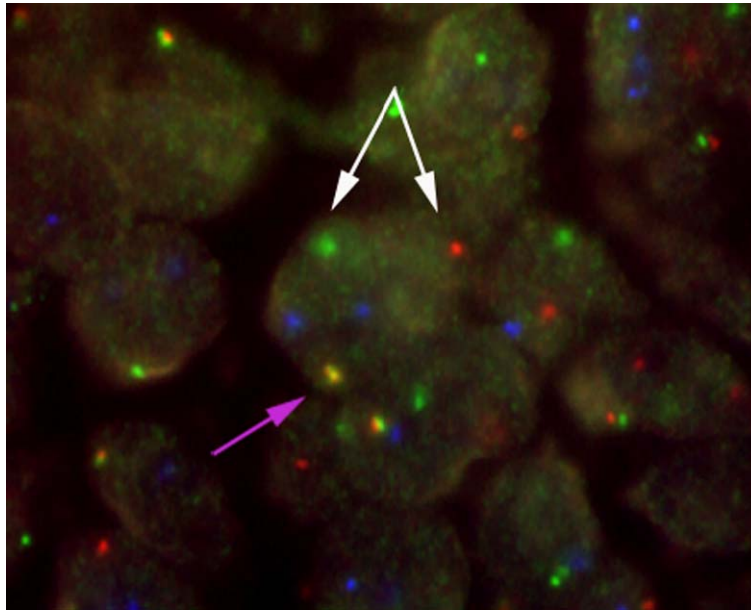
Im Kollektiv der Langzeitremissionen waren 24 von 38 Fällen auswertbar (63%). Unter den analysierbaren Fällen fanden sich 15 Fälle (11 BL, 3 DLBCL, 1 nicht näher klassifizierte high-grade B-Zell-Neoplasie) mit Translokationen t(8;14) (63% aller ausgewerteten Fälle). *MYC*-Brüche ohne Beteiligung des *IGH*-Locus traten nicht auf. Elf von 16 histologisch diagnostizierten Burkitt-Lymphomen zeigten einen *MYC*-Bruch.

Die Untersuchungsergebnisse der Therapieresistenz- bzw. Rezidivfälle und der Remissionsfälle sind in Tabelle 3.2.1 dargestellt. Die einzelnen Fälle mit entsprechenden Diagnosen, Geburtsjahr, Geschlecht und Jahr der Erstdiagnose sowie die Signalkonstellationen der für einen *MYC*-Bruch positiven Fälle sind im Anhang in den Tabellen A3.2.1a - A3.2.1d aufgeführt. In den Abbildungen 3.2.1a und 3.2.1b ist der t(8;14)-Assay in der Verwendung auf zwei positiven Fällen dargestellt.

**Tab. 3.2.1:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Therapieresistenz bzw. Rezidivfälle und der Langzeitremissionen mit dem t(8;14)-Assay

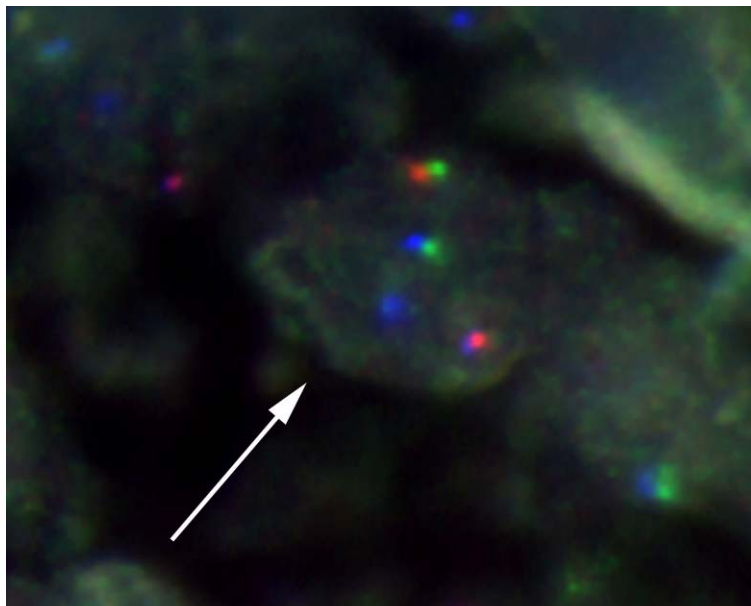
	<b>Fälle mit primärer Therapieresistenz bzw. Rezidiv (n=38)</b>	<b>Fälle mit Langzeitremission (n=38)</b>
<b>Auswertbare Fälle</b>	17 (45%) 6 DLBCL, 8 BL, 3 PMBCL	24 (63%) 5 DLBCL, 16 BL, 2 PMBCL, 1 High-grade-B-Zell-Neoplasie
<b>Nicht auswertbare Fälle</b>	21 (55%)	14 (37%)
<b>Fälle mit <i>MYC</i>-Bruchereignissen</b>	9 / 17 (53%)	15 / 24 (63%)
<b>Fälle mit Translokationen t(8;14)</b>	5 BL, 1 DLBCL	11 BL, 3 DLBCL, 1 High-grade-B-Zell-Neoplasie
<b>Fälle mit <i>MYC</i>-Brüchen ohne t(8;14)</b>	2 BL, 1 DLBCL	-
<b>BL mit <i>MYC</i>-Brüchen</b>	7 / 8 (88%)	11 / 16 (69%)
<b>DLBCL mit <i>MYC</i>-Brüchen</b>	2 / 6 (33%)	3 / 5 (60%)

**Abb. 3.2.1a:** FISH-Analyse des Falls 29 (Rezidiv-/Therapieresistenzkollektiv) mit dem t(8;14)-Assay



**Legende zu Abb. 3.2.1a:** Es liegt ein *MYC*-Bruch ohne Beteiligung des *IGH*-Genortes vor. Erkennbar sind ein colokalisiertes *MYC*-Signal (violetter Pfeil) sowie je ein grünes und ein rotes Signal (weiße Pfeile). Davon unabhängig sind zwei isoliert liegende blaue *IGH*-Signale ohne Anhalt für eine *MYC-IGH*-Fusion sichtbar.

**Abb. 3.2.1b:** FISH-Analyse des Falls 3 (Langzeitremissionskollektiv) mit dem t(8;14)-Assay



**Legende zu Abb. 3.2.1b:** Mit einem weißen Pfeil ist eine Zelle markiert, in der sich ein colokalisiertes rot-grünes *MYC*-Signal sowie ein gespaltenes *MYC*-Signal mit fusionierten blauen *IGH*-Anteilen befinden. Das einzelne blaue Signal stellt den intakten *IGH*-Locus dar.

### 3.2.2 Nachweis von Bruchereignissen im *BCL2*-Genort mittels Interphase-FISH im Extremkollektiv

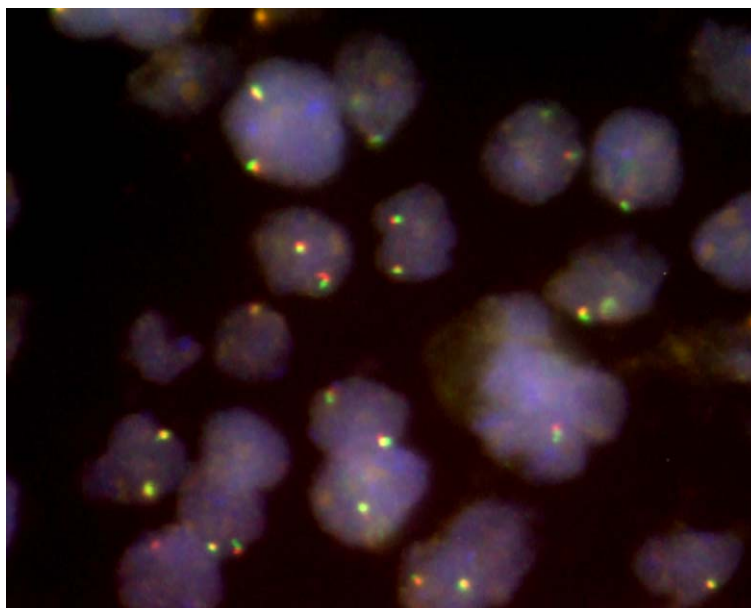
Hinsichtlich Bruchereignissen in der *BCL2*-Genregion waren von 76 Fällen 44 (58%) auswertbar. Es zeigte sich in keinem dieser Fälle ein *BCL2*-Bruch. Bei je einem Therapieresistenz-/Rezidivfall und einem Langzeitremissionsfall waren *BCL2*-Genamplifikationen detektierbar (jeweils vier bis acht Co-Lokalisationssignale).

Die Untersuchungsergebnisse beider Kollektive sind in Tabelle 3.2.2 aufgeführt. Die Tabellen A3.2.2a und A3.2.2b im Anhang geben Auskunft über die einzelnen untersuchten Fälle; in der Abbildung 3.2.2 ist eine FISH-Analyse mit der *BCL2*-Break-Apart-Sonde an einem negativen Fall dargestellt.

**Tab. 3.2.2:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Extremkollektive der Therapieresistenz- bzw. Rezidivfälle und der Langzeitremissionen mit der Abbott / Vysis LSI® *BCL2*-Break Apart-Sonde

	<b>Fälle mit primärer Therapieresistenz bzw. Rezidiv (n=38)</b>	<b>Fälle mit Langzeitremission (n=38)</b>
<b>Auswertbare Fälle</b>	21 (55%) 6 DLBCL, 10 BL, 4 PMBCL, 1 High-grade B- Neoplasie	23 (61%) 6 DLBCL, 15 BL, 2 PMBCL, 1 High-grade-B-Neoplasie
<b>Nicht auswertbare Fälle</b>	17 (45%)	15 (39%)
<b>Fälle mit <i>BCL2</i>-Brüchen</b>	0 / 21	0 / 23
<b>Fälle mit <i>BCL2</i>-Genamplifikationen</b>	1 / 21 (DLBCL)	1 / 23 (DLBCL)

**Abb. 3.2.2:** FISH-Analyse des Falls 2 (Langzeitremissionskollektiv) mit der *BCL2*-Break-Apart-Sonde



**Legende zu Abb. 3.2.2:** Zu erkennen sind jeweils zwei colokalisierte rot-grüne *BCL2*-Signale (normale Signal-Konstellation).

### 3.2.3 Nachweis von Bruchereignissen im *BCL6*-Genort mittels Interphase-FISH im Extremkollektiv

Hinsichtlich Bruchereignissen in der *BCL6*-Genregion waren von den insgesamt 76 Fällen 38 (50%) auswertbar. Im Kollektiv der Therapieresistenz- bzw. Rezidivfälle waren 19 der 38 Fälle auswertbar. In zwei Fällen (1 DLBCL, 1 PMBCL) konnte ein *BCL6*-Bruch nachgewiesen werden.

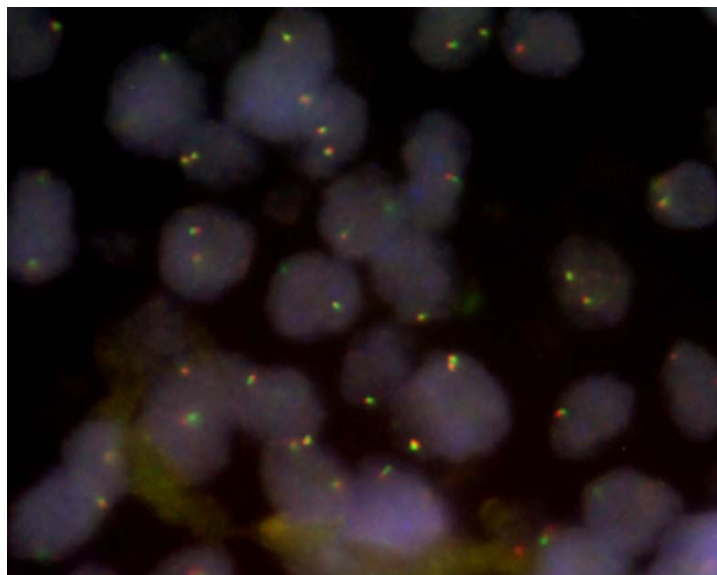
Im Extremkollektiv der Langzeitremissionen waren 19 von 38 (50%) Präparaten auswertbar. Keiner der 19 Fälle zeigte ein Bruchereignis im *BCL6*-Genort.

Die Untersuchungsergebnisse beider Kollektive sind in Tabelle 3.2.3 aufgeführt. In den Tabellen A3.2.3a – A3.2.3c im Anhang der Arbeit sind die einzelnen Fälle sowie die Signal-Konstellationen der beiden *BCL6*-Bruch-positiven Fälle dargestellt. Die Darstellung der *BCL6*-Break-Apart-Sonde in einem Präparat ohne Bruchereignis ist in Abbildung 3.2.3 wiedergegeben.

**Tab. 3.2.3:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Therapieresistenz bzw. Rezidivfälle und der Langzeitremissionen mit der Kreatech Poseidon™ *BCL6*-Break Apart-Sonde

	<b>Fälle mit primärer Therapieresistenz bzw. Rezidiv (n=38)</b>	<b>Fälle mit Langzeitremission (n=38)</b>
<b>Auswertbare Fälle</b>	19 (50%) 5 DLBCL, 11 BL, 2 PMBCL, 1 High-grade-B-Zell-Neoplasie	19 (50%) 3 DLBCL, 14 BL, 1 PMBCL, 1 High-grade-B-Zell-Neoplasie
<b>Nicht auswertbare Fälle</b>	19 (50%)	19 (50%)
<b>Fälle mit <i>BCL6</i>-Bruch</b>	1 DLBCL, 1 PMBCL	0
<b>DLBCL mit <i>BCL6</i>-Bruch</b>	1 / 5 (20%)	0 / 3

**Abb. 3.2.3:** FISH-Analyse des Falles 27 (Langzeitremissionskollektiv) mit der Kreatech Poseidon™ *BCL6*-Break Apart-Sonde



**Legende zu Abb. 3.2.3:** Zu erkennen sind jeweils zwei colokalisierte rot-grüne *BCL6*-Signale (normale Signalanordnung).

### 3.2.4 Deskriptive Auswertung der molekularzytogenetischen Untersuchungsergebnisse des Extremkollektivs

Während in den *BCL2*-Genorten im gesamten Extremkollektiv keine Bruchereignisse nachzuweisen waren, fanden sich in beiden Untergruppen *MYC*-Bruchereignisse. Eine Translokation t(8;14) trat zu 35% bei der Rezidivkohorte (5 BL, 1 DLBCL) und zu 63% bei der Remissionskohorte (11 BL, 3 DLBCL, 1 High-grade B-Neoplasie) auf. *MYC*-Brüche ohne t(8;14), also vermutlich Brüche mit einer Translokation auf einen Leichtkettenlocus, fanden sich zu

18% ausschließlich bei der Rezidivkohorte. Dies entsprach 3 Fällen, worunter sich ein DLBCL und zwei Burkitt-Lymphome befanden.

Die *BCL6*-Genregion betreffende Bruchereignisse fanden sich in 11% der Rezidivkohorte, dies entsprach zwei Fällen. In der Remissionskohorte waren keine Bruchereignisse nachweisbar. Der Unterschied in der Verteilung war allerdings nicht signifikant (p-Wert 0.243 im Fisher's Exact Test).

### **3.3 Nachweis chromosomaler Translokationen bei pädiatrischen Lymphomen aus der NHL-BFM-Studie**

Für diese Arbeit wurden 106 aggressive pädiatrische B-Zell-Lymphome aus dem Kollektiv der NHL-BFM-Studie mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung auf Bruchereignisse in den *MYC*-, *BCL2*- und *BCL6*-Genorten untersucht. Es konnten durchschnittlich 74% der 106 Fälle ausgewertet werden. Das untersuchte Kollektiv zeichnete sich insbesondere durch die fehlende Selektion und durch seine Repräsentativität aus, da fast alle an einem Lymphom erkrankten Kinder im deutschsprachigen Raum in die NHL-BFM-Studie eingeschlossen werden.

#### **3.3.1 Nachweis von Bruchereignissen im *MYC*-Genort und der Translokation t(8;14) mittels Interphase-FISH im NHL-BFM-Studienkollektiv**

Unter der Verwendung des neu etablierten t(8;14)-Assays waren 68 von 106 Fällen (64%) auswertbar (54 DLBCL, 5 BL, 9 FL).

Unter den untersuchten FL fanden sich keine Bruchereignisse, wohingegen alle 5 in dieser Serie analysierbaren BL einen *MYC*-Bruch aufwiesen. Bei 3 BL war zudem die Translokation t(8;14) detektierbar; 2 BL mit *MYC*-Bruchereignis zeigten keine *MYC*-*IGH*-Translokation. Unter den 54 auswertbaren DLBCL zeigten 3 ein Bruchereignis im *MYC*-Genort (6%), diese zeigten alle eine Translokation t(8;14).

Die histologischen Diagnosen der untersuchten Lymphome und die Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung mit dem t(8;14)-Assay sowie die verschiedenen Signalkonstellationen der Fälle mit Bruchereignissen sind im Anhang in den Tabellen A3.3.1a und A3.3.1b dargestellt. In der Tabelle 3.3.1 sind die Untersuchungsergebnisse des Kollektivs aufgeführt.

**Tab. 3.3.1:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Präparate der NHL-BFM Studie mit dem t(8;14)-FISH-Assay

	NHL-BFM-Studienkollektiv (n=106)
<b>Auswertbare Fälle</b>	68 (64%) 54 DLBCL, 5 BL, 9 FL
<b>Nicht auswertbare Fälle</b>	38 (36%)
<b>Anteil der Fälle mit <i>MYC</i>-Bruchereignissen</b>	8 / 68 (12%)
<b>Fälle mit Translokationen t(8;14) / <i>IGH-MYC</i>-Fusion</b>	3 BL, 3 DLBCL
<b>Fälle mit <i>MYC</i>-Brüchen ohne t(8;14)</b>	2 BL
<b>BL mit <i>MYC</i>-Brüchen</b>	5 / 5 (100%)
<b>DLBCL mit <i>MYC</i>-Brüchen</b>	3 / 54 (6%)

### 3.3.2 Nachweis von Bruchereignissen im *BCL2*-Genort mittels Interphase-FISH im NHL-BFM-Studienkollektiv

Hinsichtlich Bruchereignissen in der *BCL2*-Genregion waren 80 von 106 Fällen (75%) auswertbar (67 DLBCL, 3 BL und 10 FL). In keinem der untersuchten Präparate war ein Bruchereignis im *BCL2*-Locus diagnostizierbar. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 3.3.2 veranschaulicht, in der Tabelle A3.3.2a im Anhang sind die Ergebnisse der einzelnen Fälle einsehbar.

**Tab. 3.3.2:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Präparate der BFM-Studie mit der Abbott / Vysis LSI® *BCL2*-Break Apart-Sonde

	NHL-BFM-Studienkollektiv (n=106)
<b>Auswertbare Fälle</b>	80 (75%) 67 DLBCL, 3 BL, 10 FL
<b>Nicht auswertbare Fälle</b>	26 (25%)
<b>Fälle mit <i>BCL2</i>-Brüchen</b>	0 / 80

### 3.3.3 Nachweis von Bruchereignissen im *BCL6*-Genort mittels Interphase-FISH im NHL-BFM-Studienkollektiv

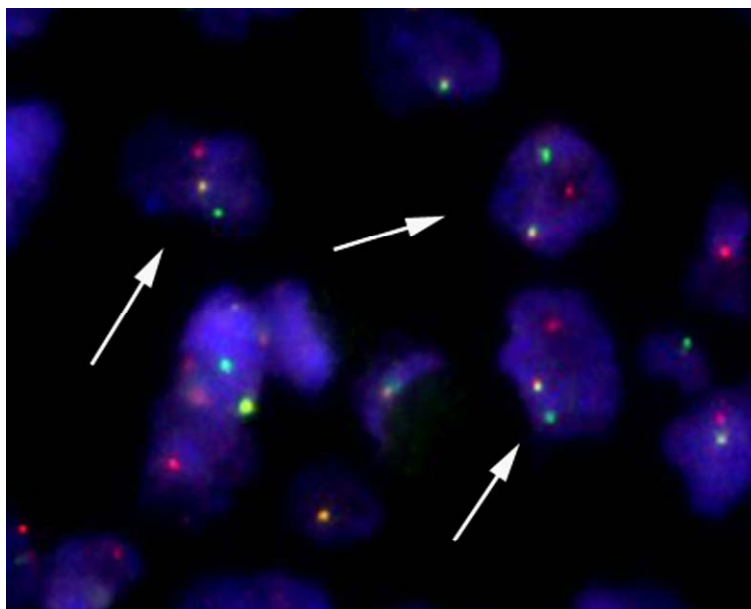
Für die *BCL6*-Break-Apart-Sonde waren 83 von 106 Lymphomen (82%) auswertbar. 2 von 11 (18%) folliculären Lymphomen, die histopathologisch auch diffus großzellige Anteile zeigten, und 6 von 68 (9%) DLBCL zeigten Bruchereignisse im *BCL6*-Locus. Die molekularzytogenetischen Untersuchungsergebnisse sind in der Tabelle 3.3.3 dargestellt, ein Bild des Bruch-positiven Falles Nr.76 ist in der Abbildung 3.3.3 gezeigt. In den Tabellen A3.3.3a und

A3.3.3b im Anhang sind die Fälle im Einzelnen und die Signalkonstellationen der positiven Fälle aufgeführt.

**Tab. 3.3.3:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Präparate der NHL-BFM-Studie mit der Abbott / Vysis LSI<sup>®</sup> *BCL6*-Break Apart-Sonde

	NHL-BFM-Studienkollektiv (n=106)
<b>Auswertbare Fälle</b>	83 (82%) 68 DLBCL, 4 BL, 11 FL
<b>Nicht auswertbare Fälle</b>	23 Fälle (18%)
<b>Fälle mit <i>BCL6</i>-Brüchen</b>	6 DLBCL, 2 FL
<b>DLBCL mit <i>BCL6</i>-Brüchen</b>	6 / 68 (9%)
<b>FL mit <i>BCL6</i>-Brüchen</b>	2 / 11 (18%)

**Abb. 3.3.3:** FISH-Analyse des BFM-Falles 76 mit der *BCL6*-Break Apart-Sonde



**Legende zu Abb. 3.3.3:** Dargestellt sind ein colocalisiertes rot-grünes Signal und je ein einzelnes rotes und grünes Signal. Die Zellkerne mit Bruchereignissen sind mit Pfeilen markiert.

### 3.3.4 Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit epidemiologischen und klinischen Charakteristika innerhalb der NHL-BFM-Studie

Die vorliegenden Ergebnisse der Interphase-FISH-Analysen wurden durch die NHL-BFM-Studienzentrale mit den epidemiologischen Patientendaten korreliert. Da sich unter sämtlichen untersuchten Fällen kein *BCL2*-Bruch befand, wurden statistische Auswertungen und Korrelationen lediglich zu *MYC*- und *BCL6*-Bruchereignissen durchgeführt. Die Translokationen auf Schwerketten- oder Leichtkettenloci bei *MYC*-Brüchen wurden dabei nicht berücksich-



sichtigt. Neben dem Gesamtkollektiv einschließlich BL und FL wurde auch selektiv das DLBCL-Kollektiv statistisch analysiert, um Eigenschaften dieser Entität genauer zu untersuchen.

#### **3.3.4.1 Geschlechterverhältnisse der untersuchten DLBCL**

Bezüglich der Geschlechtsverteilung ließ sich für das gesamte im *MYC*-Untersuchungsgang untersuchte Kollektiv mit 48 betroffenen Jungen und 19 betroffenen Mädchen ein Geschlechterverhältnis von 2,53:1 zugunsten der männlichen Erkrankten erheben. Im alleinigen Kollektiv der DLBCL betrug das Verhältnis 2,12:1. Im *BCL6*-Untersuchungsgang wurde für alle Lymphome ein Geschlechterverhältnis von 2,15:1 zugunsten der Jungen erhoben, unter den DLBCL lag das Geschlechterverhältnis bei 1,79:1.

Signifikante Unterschiede in der Verteilung der Bruchereignisse in den *MYC*- und *BCL6*-Genorten zwischen Jungen und Mädchen fanden sich nicht.

In den Tabellen A3.3.4.1a – A3.3.4.1d im Anhang sind die Einzelheiten der Geschlechterverteilung dargestellt.

#### **3.3.4.2 Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde des *MYC*-Genortes mit epidemiologischen und klinischen Charakteristika**

Die Stadienverteilung der Lymphome des Gesamtkollektivs zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen *MYC*-Bruch-positiven und -negativen Fällen ( $p < 0.001$ ). Während Lymphome ohne Bruchereignis zum großen Teil in den Stadien II und III diagnostiziert wurden, konnten die Lymphome mit Bruchereignis hauptsächlich bereits in den Stadien I und II entdeckt werden. Auch im alleinigen DLBCL-Kollektiv war die Stadienverteilung signifikant unterschiedlich bei allerdings nur drei *MYC*-Bruch-positiven Fällen ( $p = 0.031$ ). Hier wurde jeweils ein Lymphom mit Bruchereignis in den Stadien I, II und IV entdeckt, während 80% der insgesamt 50 Lymphome ohne Bruchereignis in den Stadien II und III entdeckt wurden.

Im Gesamtkollektiv zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich erhöhter LDH-Werte zwischen Lymphomen mit und ohne *MYC*-Bruchereignis ( $p = 0.02$ ). Fälle mit Bruchereignissen im *MYC*-Locus zeigten einen höheren Anteil von Fällen mit LDH-Werten von mindestens 500 U/L und mehr. Für die LDH-Werte gab es in der DLBCL-Gruppe ohne den eliminierten Anteil der Burkitt-Lymphome keine signifikanten Verteilungsunterschiede ( $p = 0.336$ ).

Eine Aufzählung aller signifikant bzw. nicht signifikant mit einem Bruchereignis im *MYC*-Genort assoziierten Parameter findet sich in den Tabellen 3.3.4.2a und 3.3.4.2b.

Im Anhang in den Tabellen A3.3.4.2a - A3.3.4.2f sind epidemiologische und klinische Charakteristika der molekularzytogenetisch untersuchten Lymphome im Einzelnen aufgeführt.

**Tab. 3.3.4.2a:** Epidemiologische und klinische Charakteristika der Lymphome im Gesamtkollektiv mit und ohne Bruchereignis im *MYC*-Genort

	<b><i>MYC</i>- Bruchereignis</b>	<b>Kein <i>MYC</i>- Bruchereignis</b>	<b>Gesamt N</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Männl. Geschlecht</b>	6 (75%)	42 (71%)	48	1.000
<b>Weibl. Geschlecht</b>	2 (25%)	17 (29%)	19	
<b>Erkrankungsalter (Mittelwert in Jahren)</b>	10,06	10,97	10,86	0.608
<b>Stadien I/II</b>	4 (50%)	37 (63%)	41	<0.001
<b>Stadien III/IV</b>	2 (25%)	22 (37%)	24	
<b>B-ALL</b>	2 (25%)	-	2	
<b>LDH-Wert <math>\geq 500</math> U/l</b>	4 (50%)	6 (11,3%)	10	0.02

**Tab. 3.3.4.2b:** Epidemiologische und klinische Charakteristika der untersuchten DLBCL mit und ohne Bruchereignis im *MYC*-Genort

	<b><i>MYC</i>- Bruchereignis</b>	<b>Kein <i>MYC</i>- Bruchereignis</b>	<b>Gesamt N</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Männl. Geschlecht</b>	1 (33%)	35 (70%)	36	0.238
<b>Weibl. Geschlecht</b>	2 (67%)	15 (30%)	17	
<b>Erkrankungsalter (Mittelwert in Jahren)</b>	11,72	10,89	10,94	0.603
<b>Stadien I/II</b>	2 (67%)	30 (60%)	32	0.031
<b>Stadien III/IV</b>	1 (33%)	20 (40%)	21	
<b>LDH-Wert <math>\geq 500</math> U/l</b>	1 (33%)	5 (11%)	6	0.336

### 3.3.4.3 Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde des *BCL6*-Genortes mit epidemiologischen und klinischen Charakteristika

In der Altersverteilung der *BCL6*-Bruch-positiven Fälle zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Gegensatz zu Bruch-negativen Fällen ( $p=0.016$ ). Ein deutlich höheres Erkrankungsalter von durchschnittlich 14,34 Jahren bei *BCL6*-Brüchen versus 10,73 Jahren bei fehlenden Bruchereignissen war festzustellen. Unter den DLBCL bestand ebenfalls ein signi-

fikanter Unterschied zwischen Patienten ohne und mit *BCL6*-Brüchen, hier lag das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 10,79 Jahren versus 15,78 Jahren ( $p=0.005$ ).

Eine Aufzählung aller signifikant bzw. nicht signifikant mit einem Bruchereignis im *BCL6*-Genort assoziierten Parameter findet sich in den Tabellen 3.3.4.3a und 3.3.4.3b.

Im Anhang in den Tabellen A3.3.4.3a - A3.3.4.3f sind epidemiologische und klinische Charakteristika der molekularzytogenetisch untersuchten Lymphome im Einzelnen aufgeführt.

**Tab. 3.3.4.3a:** Epidemiologische und klinische Charakteristika der Lymphome im Gesamtkollektiv mit und ohne Bruchereignis im *BCL6*-Genort

	<i>BCL6</i> - Bruchereignis	Kein <i>BCL6</i> - Bruchereignis	Gesamt N	p-Wert
Männl. Geschlecht	5 (63%)	51 (69%)	56	0.704
Weibl. Geschlecht	3 (37%)	23 (31%)	26	
Erkrankungsalter (Mittelwert in Jahren)	14,34	10,73	11,08	0.016
Stadien I/II	5 (63%)	46 (62%)	51	0.987
Stadien III/IV	3 (37%)	27 (37%)	30	
B-ALL	-	1 (1%)	1	
LDH-Wert $\geq 500$ U/l	2 (29%)	11 (17%)	13	0.601

**Tab. 3.3.4.3b:** Epidemiologische und klinische Charakteristika der untersuchten DLBCL mit und ohne Bruchereignis im *BCL6*-Genort

	<i>BCL6</i> - Bruchereignis	Kein <i>BCL6</i> - Bruchereignis	Gesamt N	p-Wert
Männl. Geschlecht	4 (67%)	39 (64%)	43	1.000
Weibl. Geschlecht	2 (33%)	22 (36%)	24	
Erkrankungsalter (Mittelwert in Jahren)	15,78	10,79	11,23	0.005
Stadien I/II	4 (67%)	36 (59%)	40	0.876
Stadien III/IV	2 (33%)	25 (41%)	27	
LDH-Wert $\geq 500$ U/l	1 (20%)	9 (17%)	10	1.000

### 3.3.5 Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit histopathologischen Charakteristika

Die ermittelten molekularzytogenetischen Befunde wurden mit den drei im BFM-Studienkollektiv vertretenen histopathologischen Lymphomentitäten (DLBCL, BL, FL) korreliert. Statistisch signifikant war die Verteilung des *MYC*-Bruchereignisses innerhalb der Entitäten: Während 100% der Burkitt-Lymphome einen *MYC*-Bruch aufwiesen, waren nur in

5,7% der DLBCL *MYC*-Bruchereignisse nachweisbar ( $p < 0.001$ ). Unter den FL gab es keinen Fall mit *MYC*-Bruchereignis.

Die Verteilung der Brüche im *BCL6*-Genort innerhalb der einzelnen Entitäten zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p = 0.505$ ). Zu den verschiedenen Entitäten und deren *MYC*- bzw. *BCL6*-Bruchereignissen geben die Tabellen 3.3.5a und 3.3.5b sowie die Tabellen A3.3.5a und A3.3.5b im Anhang der Arbeit Auskunft.

**Tab. 3.3.5a:** Histopathologische Entitäten und Verteilung der Bruchereignisse im *MYC*-Genort

	<i>MYC</i> -Bruchereignis	Kein <i>MYC</i> -Bruchereignis	Gesamt N	p-Wert
Diagnose				
Burkitt	5 (100,0%)	-	5	<0.001
DLBCL	3 (6%)	50 (94%)	53	
FL	-	9 (100%)	9	

**Tab. 3.3.5b:** Histopathologische Entitäten und Verteilung der Bruchereignisse im *BCL6*-Genort

	<i>BCL6</i> -Bruchereignis	Kein <i>BCL6</i> -Bruchereignis	Gesamt N	p-Wert
Diagnose				
Burkitt	-	4	4	0.505
DLBCL	6 (9%)	61 (91%)	67	
FL	2 (18%)	9 (82%)	11	

### 3.3.6 Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit immunhistochemischen Charakteristika

Auch die im Institut für Pathologie des UKSH, Campus Kiel, erhobenen immunhistochemischen Befunde für die untersuchten DLBCL wurden mit Bruchereignissen in den *MYC*- und *BCL6*-Genorten korreliert.

Sämtliche immunhistochemische Marker (CD5, CD10, CD20, BCL2, BCL2int, BCL6, MUM-1, HLA-DR, H-GAL) zeigten keinen statistisch signifikanten Verteilungsunterschied zwischen Fällen mit und ohne *MYC*-Bruchereignis; sie sind im Anhang in Tabelle A3.3.6a aufgeführt.

In der Korrelation der immunhistochemischen Marker mit Bruchereignissen im *BCL6*-Genort der untersuchten DLBCL war ein Trend für den Marker MUM-1 erkennbar, der bei 100% aller DLBCL mit *BCL6*-Bruch und nur zu rund 60% bei Lymphomen ohne Bruch positiv war ( $p = 0.082$ ). Statistisch signifikante Unterschiede bot der Marker CD5 ( $p = 0.003$ ). Der Anteil der Fälle mit *BCL6*-Bruchereignis war unter den CD5-positiven Lymphomen höher als unter

den CD5-negativen Fällen. Auch für den Marker CD10, für den DLBCL mit *BCL6*-Bruchereignis relativ gesehen häufiger negativ waren als Fälle ohne Bruchereignis, wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ( $p=0.005$ ). Alle mit *BCL6*-Bruchereignissen in DLBCL assoziierte immunhistochemische Marker sind in der Tabelle 3.3.6 dargestellt.

Immunhistochemische Marker, die keinen statistisch signifikanten Verteilungsunterschied zwischen Fällen mit und ohne *BCL6*-Bruchereignis zeigten, sind im Anhang in der Tabelle A3.3.6b aufgeführt.

**Tab. 3.3.6:** Mit einem Bruchereignis im *BCL6*-Genort bei DLBCL assoziierte immunhistochemische Marker

	<i>BCL6</i> - Bruchereignis	Kein <i>BCL6</i> - Bruchereignis	Gesamt N	p-Wert
MUM-1 positiv	6 (15%)	33 (85%)	39	0.082
MUM-1 negativ	-	21 (100%)	21	
CD5 positiv	3 (75%)	1 (25%)	4	0.003
CD5 negativ	3 (6%)	48 (94%)	51	
CD10 positiv	1 (3%)	32 (97%)	33	0.005
CD10 negativ	4 (44%)	5 (56%)	9	

### 3.3.7 Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit dem klinischen Verlauf

Die molekularzytogenetischen Ergebnisse der Studienpatienten wurden mit den in der Studienzentrale archivierten klinischen Verlaufsdaten korreliert. Es wurden dabei das Ereignisfreie Überleben (event-free survival, EFS) über fünf und zehn Jahre analysiert und die Wahrscheinlichkeiten für Zwischenfälle innerhalb der Patientengruppen untersucht. Patienten mit *BCL6*-Bruchereignissen zeigten im Fünf-Jahres-Zeitraum keine Auffälligkeiten im EFS. Bei Lymphomen mit *MYC*-Bruchereignis konnte ein schwacher Trend eines schlechteren Outcomes festgestellt werden ( $p=0.068$ ).

Für den Zeitraum von zehn Jahren gab es für die Gruppen der Patienten mit und ohne *MYC*-Bruch keinen statistisch signifikanten Unterschied im EFS. Im Vergleich der *BCL6*-Bruch-positiven und -negativen Lymphome war über den 10-Jahres-Zeitraum die Tendenz einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Nichtansprechens bzw. eines Rezidivs für die *BCL6*-Bruch-positiven Lymphome bei Protokollpatienten ( $p=0.067$ ) sowie bei DLBCL-Patienten erkennbar ( $p=0.057$ ).

Die zwei im Extremkollektiv ausschließlich in der Gruppe der Fälle mit Therapieresistenz- bzw. Rezidiv enthaltenen Fälle mit *BCL6*-Bruch bestätigen die in diesem Kollektiv gewonnenen Ergebnisse, wobei einer der beiden Fälle des Extremkollektivs auch im NHL-BFM-Kollektiv

enthalten ist.

In der Tabelle A3.3.7 im Anhang sind die Daten der Korrelationen für den Zeitraum von 10 Jahren bei Patienten mit und ohne *BCL6*-Bruch dargestellt.

## **4. DISKUSSION**

Ziele dieser Arbeit waren die Etablierung eines Interphase-FISH-Systems zum Nachweis der Translokation t(8;14) in lymphatischen Neoplasien und dessen Verwendung zur Untersuchung eines Extremkollektivs pädiatrischer B-Zell-Lymphome und eines Studienkollektivs aus der NHL-BFM-Studie. Des Weiteren sollten sämtliche Lymphome mittels FISH auf Bruchereignisse in den Genloci *BCL2* und *BCL6* untersucht werden. Um Korrelationen zwischen Bruchereignissen in Fällen des NHL-BFM-Kollektivs und epidemiologischen, klinischen, histologischen und immunhistochemischen Eigenschaften sowie den klinischen Verläufen der betreffenden Lymphome zu identifizieren, wurden die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

### **4.1 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung zum Nachweis chromosomaler Veränderungen bei lymphatischen Neoplasien**

#### **4.1.1 Aufbau von Interphase-FISH-Systemen**

Um den Nachweis chromosomaler Bruchereignisse unter Verwendung der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung zu führen, gibt es zwei verschiedene Ansätze des Sondaufbaus. Zum einen besteht die Möglichkeit eines Co-Lokalisations-Assays, bei dem eine Sonde am Bruchpunkt des einen in die Translokation involvierten Chromosoms und eine zweite, anders gefärbte Sonde am Bruchpunkt des anderen beteiligten Chromosoms hybridisiert. Erscheinen die eigentlich getrennt liegenden Signale in Interphase- oder Metaphasezellen colokalisiert, kennzeichnet dies eine vorliegende Translokation der Chromosomenanteile. Je nach Proben-design kann die Auswertbarkeit durch eine hohe Rate an zufälligen Überlappungen beeinträchtigt werden (Sinclair et al. 1997; Vaandrager et al. 2000). Ein weiteres Problem dieser Assays besteht in der Möglichkeit von Onkogenen, auf unterschiedliche Chromosomen zu translozieren, so dass ein Assay daher nur eine spezielle Translokationsform nachweisen kann. Für Genorte, für die verschiedene Translokationspartner denkbar sind, ist es daher von Vorteil, einen Break-Apart-Assay zu wählen. Hierbei kommen eine oder mehrere Sonden zum Einsatz, die den Bruchpunkt eines der beteiligten Chromosomen überspannen oder auf beiden Seiten flankieren (Vaandrager et al. 2000). Bei einem Bruch im Genort oder einer Translokation werden die Signale gespalten, so dass Bruchereignisse in Genloci unabhängig von variablen Translokationspartnern nachweisbar sind. In bisher durchgeführten Studien zeigte sich, dass Break-Apart-FISH-Assays zum Nachweis chromosomaler Bruchereignisse nur sehr geringe Raten falsch positiver Ergebnisse aufweisen (Taniwaki et al. 1995; Coignet et al. 1996; Sinclair et al. 1997; Bergh et al. 2000; Mancini et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde jetzt ein dreifarbigiger FISH-Assay etabliert, der einzeitig sowohl einen Informationsgewinn über *MYC*-Bruchereignisse als auch über den in 80% der Fälle beteiligten Translokationspartner *IGH* ermöglichte (Jaffe et al. 2001).

Der Informationsgewinn der Interphase-FISH-Technik steigt signifikant bei Nutzung mehrerer unterschiedlich gefärbter Sonden (Sokolova et al. 2000; Martín-Subero et al. 2001). Je mehr Kriterien zur Diagnostik eines abnormen Zellgenotyps herangezogen werden, desto geringer fällt theoretisch die falsch-positive Rate in Kontrolluntersuchungen aus und desto höher ist die Sensitivität eines Assays (Sinclair et al. 1997). Die Anwendung mehrfarbiger FISH-Assays mit mehreren Signalen birgt jedoch andererseits durch die zunehmende Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Überlappung der Signale auch die Gefahr, eine höhere Rate falsch-positiver Zellen zu generieren. José Ignacio Martín-Subero näherte sich in seiner Dissertation 2001 diesem Problem mit einer mathematischen Formel auf der Grundlage von Durchschnittswerten an, nach deren Berechnung für das in dieser Arbeit etablierte Assay eine zufällige Signalfusion der Signale bei intakten *MYC*- und *IGH*-Genloci bei etwa 11% der Zellen möglich ist. Eine zufällige Signalfusion eines gesplitteten Einzelsignals mit einem anderen Signal in einer Zelle mit Bruchereignis ist nach Berechnung mit der genannten Formel bei etwa 4% der Zellen möglich (Martín-Subero 2001).

#### **4.1.2 Etablierung von Nachweisgrenzen für FISH-Systeme**

Abhängig vom physikalischen Abstand zwischen den verwendeten Sonden, ihrer Größe und dem Kondensationszustand der Chromosomen können die Signale flankierender Sonden auch bei intaktem Genort eine bestimmte Distanz aufweisen. Um falsch-positive sowie falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden, sollten für jede neu etablierte Sonde für jedes Labor spezifische Nachweisgrenzen ermittelt werden.

In den Kontrolluntersuchungen des t(8;14)-Assays trat die Konstellation eines gebrochenen *MYC*-Signals mit Translokation auf den *IGH*-Locus nicht auf. Nach in Kap. 4.1.1 erklärtem Mechanismus lag durch Festlegung mehrerer Kriterien eine sehr hohe Sensitivität für diese Form der Aberration vor. Da in den untersuchten gesunden Kontrollen dieses Ereignis nicht nachweisbar war, betrug die Nachweisgrenze de facto 0%. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nachweisgrenze dieses Ereignisses willkürlich bei 4% festgelegt. Dies erlaubte die Detektion geringer Tumorzellmassen bei gleichzeitig größtmöglicher Sensitivität und lag unterhalb der errechneten Nachweisgrenze für eine zufällige Signalfusion (Martín-Subero 2001). Auch die Arbeitsgruppe um P.B. Sinclair konnte 1997 in einem Drei-Farb-FISH-Assay zum Nach-



weis der Translokation t(9;22) keinen falsch-positiven Fall in Kontrolluntersuchungen ermitteln. Sie kalkulierte für ihr etabliertes Assay Nachweisgrenzen von unter einem Prozent.

Für manche FISH-Assays stellen bei der Untersuchung von Gewebeschnitten auftretende Schnittartefakte ein Problem dar. Es kann, insbesondere bei einfarbigen Sonden, die numerische Veränderungen nachweisen, zu falsch-positiven Ergebnissen durch fehlende Signale kommen, da Zellkernanteile durch den Schnittprozess verloren gehen. Hier bestehen höhere Nachweisgrenzen, so dass Kontrollen an gesunden Gewebeschnitten notwendig sind, um den Anteil reiner Schnittartefakte zu verifizieren. Für Break-Apart-Sonden ist der Einfluss von Schnittartefakten erheblich kleiner, da nach Signaltrennungen gefahndet wird und eine zufällige Schnittebene auf Höhe einer potentiellen Bruchebene in zahlreichen Zellen eines Präparates unwahrscheinlich ist. Kontrolluntersuchungen können daher auch an Auftropfpräparaten durchgeführt werden, wodurch Kosten, Material- und Zeitaufwand gespart werden können.

#### **4.1.3 Der Stellenwert paraffinbasierten Untersuchungsmaterials für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung**

Die FISH-Analyse gelangte vor etwa zehn Jahren in der Untersuchung paraffinbasierter Biopsien erstmals zur Anwendung (Cataldo et al. 1999) und wird mittlerweile auch als diagnostisches Instrument in der Routineuntersuchung paraffinbasierter Proben genutzt. Die Aufarbeitung von Paraffinpräparaten für eine FISH-Analyse erfordert eigene Protokolle und ist im Vergleich zu Auftropfpräparaten wesentlich zeitintensiver. Ökonomisch günstig ist daher die Verwendung von Tissue Micro Arrays (wie in dieser Arbeit geschehen).

Die Auswertbarkeit der TMA-Paraffinpräparate schwankte in dieser Arbeit zwischen 45% und 82%; im Durchschnitt waren 61% der Fälle analysierbar. Es zeigte sich, dass die einzelnen TMA-Präparate in den Aufbereitungsprozessen unterschiedlich beständig waren, was deren Auswertbarkeit beeinflusste. Ein Grund für diese Unterschiede in der Qualität der Präparate mögen die unterschiedlichen Fixierungsmethoden und Paraffinqualitäten der bei multizentrischen Studien unterschiedlichen pathologischen Labors sein. Hinzu kommt, dass Tumoren per se eine hohe Variabilität aufweisen und in der Qualität und Beständigkeit unterschiedlich sind. Andere, die Qualität und Auswertbarkeit der Präparate unter Verwendung der FISH-Technik beeinflussende Faktoren stellen die Zeit zwischen der operativen Entnahme und Fixation der Biopsie, die Größe der Biopsie und die Lagerungsbedingungen der Präparate nach Fixation dar (Srinivasan et al. 2002). Auch diese Faktoren können bei den Präparaten dieser Arbeit sehr unterschiedlich gewesen sein.

## **4.2 Die Bedeutung der prospektiven, randomisierten NHL-BFM-Studie für die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit**

Bei den Studien der NHL-BFM-Gruppe handelt es sich um prospektive, randomisierte Studien. Da sie nahezu alle im deutschsprachigen Raum erkrankten Kinder einschließen, sind sie als populationsbasierend zu bezeichnen. Das prospektive Studiendesign dieser Arbeit ermöglichte es, die Primärlymphome eines großen Bestandes an Lymphomen zu untersuchen und die Langzeitverläufe eines ungefilterten, für eine Population repräsentativen Kollektivs mit den Untersuchungsergebnissen zu korrelieren.

FISH-Analysen an Material aus prospektiven, randomisierten Studien sind bisher kaum durchgeführt worden. Lediglich die Forschungsgruppe um Ilse Oschlies untersuchte 2006 50 diffus großzellige pädiatrische Lymphome aus der NHL-BFM-Studie auf Translokationen t(14;18) mit Beteiligung des *BCL2*-Genortes (Oschlies et al. 2006). Überschneidungen im Patientenkollektiv mit dem Untersuchungskollektiv der vorliegenden Arbeit sind sehr wahrscheinlich.

In dieser Arbeit ist erstmalig eine derart umfassende FISH-Analyse von pädiatrischen, diffus großzelligen Lymphomen aus einer prospektiven, randomisierten Studie durchgeführt worden.

## **4.3 Die Bedeutung chromosomaler Bruchereignisse bei selektierten pädiatrischen Lymphomen mit Frührezidiven/Therapieresistenz bzw. Langzeitremissionen (Extremkollektiv) sowie bei pädiatrischen Lymphomen aus der NHL-BFM-Studie**

### **4.3.1 Bruchereignisse im *MYC*-Genlocus bzw. Translokationen t(8;14) in pädiatrischen Lymphomen**

Im untersuchten Extremkollektiv traten in beiden Gruppen unter den ausgewerteten DLBCL *MYC*-Bruchereignisse auf. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen von 33% versus 60% ist in seiner Aussagekraft bei recht geringen Fallzahlen von sechs bzw. fünf DLBCL vorsichtig zu beurteilen. Auch der eine Fall eines *MYC*-Bruchereignisses ohne Translokation t(8;14) im Kollektiv der Therapieresistenz-/Rezidivfälle scheint aufgrund der geringen Fallzahl von eingeschränkter Bedeutung.

6% der 54 untersuchten DLBCL der NHL-BFM-Studie wiesen eine Translokation t(8;14) auf. Dieses Ergebnis weicht deutlich von den Ergebnissen des Extremkollektivs ab, bei denen 33% bzw. 60% der DLBCL-Fälle *MYC*-Bruchereignisse aufwiesen. Allerdings lagen bei der Untersuchung des Extremkollektivs recht geringe Fallzahlen vor. Sicherlich ermöglicht die Untersuchung des vorliegenden NHL-BFM-Studienkollektivs ein repräsentativeres Ergebnis.

Literaturquellen zu Bruchereignissen im *MYC*-Genlocus bei pädiatrischen DLBCL geben einen Anteil von 8% positiver Fälle an (Dave et al. 2004). Wolfram Klapper und Mitarbeiter stellten unter 14 pädiatrischen DLBCL, die anhand ihres molekularen Profils klassifiziert waren, einen Fall mit einer Translokation t(8;14) fest, was einem Anteil von 7% entspricht (Klapper et al. 2008). Insgesamt ist ein Vergleich der Ergebnisse aufgrund der wenigen Publikationen schwierig. Möglicherweise sind jedoch *MYC*-Translokationen in pädiatrischen DLBCL ähnlich häufig wie in adulten, für die *MYC*-Translokationen in 5-15% der Fälle angegeben werden (Kramer et al. 1998; Lossos 2005; Klapper et al. 2008).

Sechs von 24 Burkitt-Lymphomen des Extremkollektivs (vier atypische, zwei klassische BL) zeigten kein Bruchereignis im *MYC*-Genort. Aufgrund der Validität der genutzten Sonden und der Auswertung durch zwei unabhängige Untersucher ist nicht von technischen Fehlern seitens der Aufarbeitung oder Analyse nach dem Zeitpunkt der Biopsatfixation auszugehen. Eine simple Erklärung wäre ein untersuchtes Biopsat von Gewebe außerhalb des Tumorklons. In so großer Zahl scheint eine solche Treffunsicherheit bei der Biopsiegewinnung jedoch unwahrscheinlich. Zum Zeitpunkt der Stellung der morphologischen Diagnose waren keine molekularzytogenetischen Untersuchungen erfolgt, so dass sich retrospektiv nach Untersuchung des *MYC*-Genlocus zumindest an den Diagnosen der atypischen Fälle Zweifel ergeben. Die Differenzierung zwischen klassischen und atypischen Burkitt-Lymphomen und diffus großzelligen Lymphomen ist nicht immer präzise möglich; die Übereinstimmung in der pathologischen Diagnose beträgt bei hämatopathologischen Experten laut Studienlage 53% (Anon 1997; Magrath et al. 2001). Vor dem Hintergrund der Publikationen zu Genexpressionsanalysen bei Burkitt-Lymphomen in der letzten Zeit ist auch zu diskutieren, ob es sich bei diesen Fällen möglicherweise um molekular anders strukturierte Lymphome handelte. Wolfram Klapper und Mitarbeiter fertigten 2008 Genexpressionsanalysen 65 reifer B-Zell-Lymphome von Kindern an, wobei zwei von 26 klassischen Burkitt-Lymphomen aufgrund eines abweichenden molekularen Profils in eine Intermediärgruppe reklassifiziert wurden. Außerdem wurden fünf von 16 (31%) morphologisch diagnostizierten diffus großzelligen Lymphomen als Burkitt-Lymphome reklassifiziert. Nur drei dieser fünf Lymphome waren trotz ihres molekularen Burkitt-Profiles *MYC*-Bruch-positiv (Klapper et al. 2008). Somit können also auch Fälle mit eindeutigem, molekularem BL-Profil Abwesenheiten von *MYC*-Translokationen aufweisen. Auch Michael Hummel und Mitarbeiter stießen 2006 bei der FISH-Analyse des *MYC*-Genortes bei 43 molekular identifizierten adulten Burkitt-Lymphomen auf vier Fälle, die keine Bruchereignisse im *MYC*-Genlocus aufwiesen (Hummel et al. 2006). Zu überlegen ist, ob eventuell abgesehen von Translokationen Veränderungen des *MYC*-Gens vorliegen

können (Insertionen, Deletionen usw.), die selbiges deregulieren und zum Bild eines Burkitt-Lymphoms führen, aber mit konventionellen Break-Apart-Sonden nicht detektierbar sind. Eleonora Leucci und ihre Mitarbeiter untersuchten 2008 ein Kollektiv 35 klassischer Burkitt-Lymphome, in dem sich fünf Fälle befanden, die allerdings in der FISH-Analyse keinen *MYC*-Bruch aufwiesen (Leucci et al. 2008). Sie fanden bei näherer Untersuchung des Kollektivs einige Vertreter einer Klasse kleiner Ribonukleinsäuren (miRNA), die scheinbar die Genexpression auf dem postskriptionellen Level am Zielgen *MYC* beeinflussen können und in den Fällen ohne *MYC*-Translokation verändert waren. Letztendlich gibt es also verschiedene Ansätze, die erklären könnten, warum in den beiden Extremkollektiven sechs morphologische Burkitt-Lymphome vorhanden waren, bei denen mittels FISH-Analyse kein *MYC*-Bruchereignis nachweisbar war.

Bei allen im NHL-BFM-Kollektiv vorhandenen Burkitt-Lymphomen war ein *MYC*-Bruchereignis detektierbar. Bei drei der fünf BL-Fälle konnte der *IGH*-Locus als Translokationspartner identifiziert werden, was einem Anteil des *IGH*-Locus als Translokationspartner von 60% entspricht. Publierte Daten geben den *IGH*-Locus als Translokationspartner in 80% der Burkitt-Lymphom-Fälle an (Jaffe et al. 2001). Unter Berücksichtigung der Fallzahlen stehen die Ergebnisse dieser Arbeit damit weitgehend in Übereinstimmung.

#### **4.3.2 Bruchereignisse im *BCL2*-Genlocus in pädiatrischen Lymphomen**

Bei keinem untersuchten Lymphom dieser Arbeit konnte ein Bruchereignis im *BCL2*-Genlocus nachgewiesen werden. Diese Abwesenheit von *BCL2*-Bruchereignissen bei pädiatrischen DLBCL deckt sich mit den bisher in der Literatur publizierten Erfahrungen. Ilske Oshlies und Mitarbeiter untersuchten 2006 mittels Interphase-FISH 50 DLBCL ohne Hinweise auf die Translokation t(14;18), bei der das *BCL2*-Gen in die Nachbarschaft des *IGH*-Locus verlagert wird (Oshlies et al. 2006). Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die in Oshlies' Arbeit untersuchten Fälle aus dem Zeitraum von 1991 bis 2005 stammen, so dass Überschneidungen mit dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektiv denkbar sind. Die Forschungsgruppe um Bhavana J. Dave fand 2004 in ihrem aus zwölf pädiatrischen und adoleszenten DLBCL bestehenden Kollektiv einen Fall einer Translokation t(14;18) (Dave et al. 2004). Dieser Fall betraf eine 19-jährige Patientin mit einem PMBCL, wobei zu diskutieren ist, ob deren Alter nicht schon die Beurteilung als adultes Lymphom rechtfertigt. Im Gegensatz zu pädiatrischen DLBCL treten *BCL2*-Bruchereignisse bei adulten DLBCL in Form einer Translokation t(14;18) in etwa 15% der Fälle auf (Iqbal et al. 2004). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied zwischen pädiatrischen und adulten DLBCL liegt in der Gene-

se adulter DLBCL, die sich aus eventuell unentdeckten niedrigmalignen B-Zell-Lymphomen entwickeln können. Besonders indolente niedrigmaligne folliculäre Lymphome, die bei Erwachsenen in bis zu 90% der Fälle die Translokation t(14;18) mit Beteiligung des *BCL2*-Gens tragen, können in DLBCL transformieren (Advani et al. 2004; Hiddemann et al. 2004). Vor diesem Hintergrund stellt auch die Abwesenheit eines *BCL2*-Bruchereignisses bei den zehn in dieser Arbeit untersuchten pädiatrischen folliculären Lymphomen einen interessanten und zu hinterfragenden Aspekt dar.

In beiden Gruppen des Extremkollektivs befand sich jeweils ein DLBCL mit einer *BCL2*-Amplifikation. Prozentual entsprach das Auftreten der *BCL2*-Amplifikation innerhalb der untersuchten DLBCL 17%. In der Literatur sind für adulte DLBCL *BCL2*-Amplifikationen in 24% der Fälle angegeben (Gascoyne et al. 1997; Kramer et al. 1998). Veröffentlichte Angaben zu *BCL2*-Genamplifikationen bei kindlichen DLBCL existieren bisher nicht. Durch die gleiche Verteilung der Fälle auf beide Kollektive und die geringe Fallzahl erübrigt sich ein Rückschluss auf die Bedeutung einer Amplifikation für den klinischen Verlauf der betreffenden Lymphome.

#### **4.3.3 Bruchereignisse im *BCL6*-Genlocus in pädiatrischen Lymphomen**

Zwei im Kollektiv der Therapieresistenz-/Rezidivfälle vorhandene Lymphome zeigten Bruchereignisse im *BCL6*-Genlocus. Wegen der geringen Fallzahl in einem Extremkollektiv ist nicht von einem statistisch signifikanten Verteilungsunterschied auszugehen.

Im NHL-BFM-Kollektiv betrug der Anteil der für ein Bruchereignis im *BCL6*-Genort positiven DLBCL 9%. Dieses Ergebnis ist, die geringe Fallzahl berücksichtigend, mit dem Anteil positiver Fälle des Extremkollektivs (13%) vergleichbar.

Bisherige FISH-Analysen des *BCL6*-Genlocus bei 12 kindlichen und jugendlichen diffus großzelligen Lymphomen konnten keine Bruchereignisse nachweisen (Dave et al. 2004). Bei Erwachsenen betreffen dagegen die häufigsten genetischen Abnormalitäten bei DLBCL das *BCL6*-Gen in der Chromosomenregion 3q27. Sie treten in etwa 35-40% der Fälle bei Erwachsenen auf (Pasqualucci et al. 2003). Bisher ist nicht geklärt, warum *BCL6*-Veränderungen, die bei Erwachsenen so häufig auftreten, bei kindlichen DLBCL wesentlich seltener sind.

#### **4.4 Beurteilung der statistischen Auswertungen der molekularzytogenetischen Untersuchungsergebnisse des NHL-BFM-Kollektivs**

##### **4.4.1.1 Geschlechterverhältnisse der untersuchten DLBCL**

Die statistisch erhobenen Geschlechterverhältnisse unterscheiden sich im *MYC*- und *BCL6*-Untersuchungsgang geringfügig, da nur die Lymphome erfasst wurden, die jeweils auswertbar waren. Es bestätigte sich innerhalb der DLBCL des NHL-BFM-Kollektivs eine bisher ungeklärte deutliche Dominanz des männlichen Geschlechts. Im *MYC*-Untersuchungsgang ließ sich ein Verhältnis von 2,12:1, im *BCL6*-Untersuchungsgang ein Verhältnis von 1,79:1 zugunsten der Jungen erheben. In der Literatur finden sich Angaben zwischen 1,63:1 (Miles et al. 2008, 79 DLBCL aus der FAB-Studiengruppe) und 2:1 (Reiter und Klapper 2008), die mit den Ergebnissen dieser Arbeit weitestgehend übereinstimmen.

##### **4.4.1.2 Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde des *MYC*-Genortes mit epidemiologischen und klinischen Daten**

Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose betrug innerhalb der auf *MYC*-Bruchereignisse untersuchten DLBCL 10,9 Jahre. In der Literatur ist für DLBCL ein mittleres Erkrankungsalter von 11,4 Jahren angegeben (Reiter und Klapper 2008). Somit stimmen die Angaben zum durchschnittlichen Erkrankungsalter weitgehend überein.

Einen deutlichen Verzerrungseffekt im Gesamtkollektiv durch die vorhandenen Burkitt-Lymphome schien es bei der Korrelation von *MYC*-Bruchereignissen und den Lactatdehydrogenase (LDH)-Werten im Serum der Patienten gegeben zu haben. Burkitt-Lymphome sind aufgrund ihrer schnell wachsenden Tumormasse in 46% der Fälle mit einem LDH-Wert von mindestens 500 U/l assoziiert, im Gegensatz dazu weisen nur 14% aller DLBCL entsprechend hohe Werte auf (Reiter und Klapper 2008). Nach Elimination der Burkitt-Lymphome aus dem Kollektiv bestand für die Gruppe der DLBCL kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Fällen mit und ohne *MYC*-Bruchereignis.

##### **4.4.1.3 Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde des *BCL6*-Genortes mit epidemiologischen und klinischen Daten**

Das mittlere Erkrankungsalter bei Erstdiagnose aller DLBCL betrug 11,2 Jahre. Dieser Wert stimmt mit Literaturangaben von 11,4 Jahren überein (Reiter und Klapper 2008). Kinder, deren Lymphom ein *BCL6*-Bruchereignis aufwies, waren signifikant älter als die Kinder, deren Lymphom kein Bruchereignis aufwies. Aus diesen signifikanten Unterschieden im Erkrankungsalter lässt sich die Theorie ableiten, dass möglicherweise *BCL6*-Bruchereignisse, die bei

Erwachsenen die häufigste Aberration in DLBCL darstellen, bei Kindern mit einem höheren biologischen Alter in Verbindung stehen. Es gibt bisher keine Publikation, in der vergleichbare Untersuchungen erfolgt sind, so dass diese Ergebnisse nicht ausführlicher verglichen werden können. Warum *BCL6*-Bruchereignisse bei jüngeren Kindern nicht bzw. seltener auftreten, ist bislang ungeklärt.

#### **4.4.2 Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit histopathologischen und immunhistochemischen Charakteristika**

Ein deutlicher Unterschied bestand zwischen *MYC*-Bruchereignissen der unterschiedlichen Entitäten und der histopathologischen Diagnose insofern, als dass Bruchereignisse zu 100% bei Burkitt-Lymphomen, jedoch nur zu 5,7% bei DLBCL und bei FL gar nicht auftraten. Diese Signifikanz ist nicht verwunderlich, da seit langem bekannt ist, dass die Translokation des *MYC*-Gens auf einen Immunglobulinlocus für Burkitt-Lymphome charakteristisch ist (Jaffe et al. 2001).

Statistisch signifikante Unterschiede in der Expression diverser Proteine ergaben sich für DLBCL mit und ohne *BCL6*-Bruchereignisse. 80% der DLBCL mit *BCL6*-Bruchereignis waren CD10 (Marker für B-Keimzentrumszellen)-negativ, DLBCL ohne Bruchereignis waren zu 86% CD10-positiv. CD10 gilt als wichtiger Parameter in der Einordnung von diffus großzelligen Lymphomen in die Gruppen des Keimzentrums-B-Zell-Typ (GCB-Typ) oder des Non-GCB-Typ bzw. des aktivierten-B-Zell-Typ (ABC-Typ). Etwa 50% der adulten DLBCL und etwa 80% der pädiatrischen DLBCL (Oschlies et al. 2006; Miles et al. 2008) gehören zum bei Erwachsenen prognostisch günstigeren GCB-Typ (Rosenwald et al. 2002). Bei Kindern konnte bisher kein signifikanter Unterschied bzw. nur ein ähnlicher Trend in der Prognose festgestellt werden (Oschlies et al. 2006; Miles et al. 2008).

Nach der Definition von Christine P. Hans und Mitarbeitern galten vier der sechs DLBCL mit *BCL6*-Bruchereignis als Non-GCB, ein Fall blieb fraglich Non-GCB und ein Fall war dem GCB-Typ zuzuordnen. Die Darstellung der Fälle ist in Tabelle 4.5.2 aufgeführt. Unter Berücksichtigung der Fallzahl ist hier eine Abweichung vom üblichen Anteil von etwa 80% GCB unter pädiatrischen DLBCL erkennbar. Javeed Iqbal und Mitarbeiter veröffentlichten 2007 eine Untersuchung, aus der hervorging, dass *BCL6*-Translokationen bei adulten DLBCL häufiger im Non-GCB-Typ, auftreten (Iqbal et al. 2007). Dieses könnte nach vorliegenden Ergebnissen möglicherweise auch für die untersuchten pädiatrischen DLBCL gelten.

**Tab. 4.5.2:** Darstellung der immunhistochemischen Eigenschaften der sechs DLBCL mit *BCL6*-Bruchereignis

Fall-Nr.	Mum-1-Expression	CD10-Expression	BCL6-Expression	CD5-Expression	Typ
4	+	-	+	+	Non-GCB
7	+	-	+	+	Non-GCB
11	+	-	+	-	Non-GCB
61	+	Nicht auswertbar	+	-	Fraglich Non-GCB
73	+	+	+	+	GCB
76	+	-	+	-	Non-GCB

Auch die Färbung für den Marker CD5 wies signifikante Unterschiede in der Verteilung auf. Unter den CD5-positiven Fällen war der Anteil von Lymphomen mit Bruchereignissen relativ gesehen größer als der Anteil von Fällen ohne Bruchereignisse. Bei Erwachsenen zählen CD5-positive DLBCL in 82% der Fälle zum Non-GCB-Typ (Yamaguchi et al. 2008).

Der Marker Mum-1 (Marker für späte Keimzeldifferenzierung bzw. für frühes post-Keimzentrumsniveau (Falini et al. 2000) wies Tendenzen einer ungleichen Verteilung auf. 100% der Fälle mit Bruchereignis wurden für diesen Marker positiv gefärbt. Mum-1 ist ein wichtiger Parameter zur Einordnung von DLBCL (s.o.), seine Expression ist bei Erwachsenen mit einer schlechteren Prognose korreliert (Chang et al. 2004). Interessant ist, dass die vorliegenden Ergebnisse im Einklang mit den Untersuchungsergebnissen aus der Arbeitsgruppe um Rodney Miles stehen, die 2008 in einer Untersuchung von 79 pädiatrischen DLBCL eine Assoziation von CD10-negativen und BCL6-positiven Fällen mit einer Mum-1-Expression in 90% der Fälle beobachtete (Miles et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Rolle der CD5- und CD10-Marker bei pädiatrischen Lymphomen untersucht, so dass Vergleiche mit anderen Arbeiten nicht möglich sind.

#### 4.4.3 Korrelation der molekularzytogenetischen Befunde mit dem klinischen Verlauf

Der fehlende Unterschied für das Zwischenfalls-freie Überleben (EFS) zwischen DLBCL-Patienten mit und ohne Bruchereignissen im *MYC*-Genlocus steht im Kontrast zu der Bedeutung eines *MYC*-Bruchereignisses bei Erwachsenen. Michael Hummel und Mitarbeiter ermittelten 2006 eine signifikant schlechtere Prognose für erwachsene Patienten mit DLBCL, sofern der Tumor ein *MYC*-Bruchereignis aufwies (Hummel et al. 2006). Die vorliegende Untersuchung konnte einen ähnlichen Einfluss bei Kindern nicht bestätigen. Weitere Untersuchungen an pädiatrischen Lymphomen sind bisher nicht publiziert.

Für Fälle mit nachgewiesenen *BCL6*-Bruchereignissen zeigte sich über den Zeitraum von zehn Jahren ein Trend zur Prognoseverschlechterung. Dies wird auch durch die zwei



Lymphome mit *BCL6*-Bruchereignis in der Gruppe der Therapieresistenz-/Rezidivfälle im Extremkollektiv bestätigt. Über den Einfluss von *BCL6*-Rearrangements bei Erwachsenen herrscht kein Konsens (Iqbal et al. 2007). Es existieren sowohl Publikationen, die Trends für einen günstigen als auch ungünstigen prognostischen Einfluss ermittelt haben (Jerkeman et al. 2002; Barrans et al. 2002).

Aus den bisherigen Erkenntnissen ergibt sich die Vermutung, dass *BCL6*-Bruchereignisse bei pädiatrischen DLBCL möglicherweise in Verbindung mit einem höheren biologischen Alter (siehe Kap. 4.4.1.2) und einer schlechteren Prognose in Bezug auf das EFS der betroffenen Patienten stehen. Auch das häufigere Auftreten des bei Erwachsenen prognostisch ungünstigen Non-GCB-Typs und die Assoziation mit eventuell prognostisch ungünstigen CD5- und MUM-1-Expressionen sind Aspekte, die diese Überlegung unterstützen könnten. Denkbar ist daher eine Genese der DLBCL mit *BCL6*-Bruchereignis, die erst ab einem gewissen biologischen Alter auftritt, den Verhältnissen bei Erwachsenen ähnelt und bei jüngeren Kindern praktisch nicht auftritt.

#### **4.5 Schlussfolgerung und Ausblick**

Sämtliche in der Zielsetzung der Arbeit aufgeführten Punkte wurden erfüllt. Dank eines bisher einzigartigen, repräsentativen Umfangs an Studienpatienten konnten Erkenntnisse über die Häufigkeiten von Bruchereignissen in den Genorten *MYC*, *BCL2* und *BCL6* bei pädiatrischen Lymphomen und Erkenntnisse über weitere Eigenschaften der von Bruchereignissen betroffenen Lymphome gewonnen werden:

Lymphome mit Bruchereignissen im *MYC*-Genort wurden signifikant häufiger in früheren Stadien entdeckt, histopathologisch waren diese *MYC*-Bruchereignisse eindeutig mit Burkitt-Lymphomen assoziiert. Kinder, deren Lymphom ein Bruchereignis im *BCL6*-Genlocus aufwies, waren signifikant älter als Kinder mit Lymphomen ohne Bruchereignis. In der immunohistochemischen Analyse waren diese Fälle signifikant häufiger mit CD10-Negativität und CD5-Positivität assoziiert und zeigten einen statistischen Trend zur MUM-1-Positivität. Die von *BCL6*-Brüchen betroffenen Fälle zeigten über den Zeitraum von zehn Jahren den Trend zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs oder einer Therapieresistenz gegenüber den nicht betroffenen Fällen.

Sicherlich sollten in der vorliegenden Arbeit stets die recht geringen Fallzahlen der von Bruchereignissen betroffenen Fälle berücksichtigt werden. Allerdings sind pädiatrische Lymphome aufgrund ihrer relativ geringen Inzidenz selten. Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv stellte zum Zeitpunkt der Untersuchung das bis dato weltweit größte, mit der Inter-

phase-FISH-Technik auf Bruchereignisse untersuchte Kollektiv pädiatrischer Lymphome dar. Dies wird auch an der geringen Zahl entsprechender Publikationen in der Vergangenheit deutlich.

Die Anwendung der Interphase-FISH-Technik auf paraffinbasierten Präparaten ist heutzutage dank umfangreicher Erfahrung in vielen Labors etabliert. Allerdings sind gewisse Faktoren in der Anwendung und Auswertung zu berücksichtigen. Eine Zielsetzung für die Zukunft könnte eine Optimierung der Aufbereitungs- und Präparationsmethoden darstellen, um eine bessere Auswertbarkeit zu ermöglichen.

In Bezug auf die inhaltlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheint es notwendig, zur weiteren Klärung der Zusammenhänge fortführende Untersuchungen und Analysen mit gezielten Fragestellungen durchzuführen. Zudem erscheint die Ergänzung der Untersuchung durch Techniken wie CGH (vergleichende genomische Hybridisierung), die in der Anwendung auf paraffinbasierten Biopsien in der Erprobung steht, und Genexpressionsanalysen sinnvoll. Einige Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf biologische Eigenarten bestimmter Lymphome, mit deren Kenntnis die Therapie dieser Fälle und somit die Prognose der Patienten in Zukunft verbessert werden kann. Non-GCB-DLBCL könnten in Zukunft z.B. mit Therapien, die am NFkappaB-System angreifen, behandelt werden (Lam et al. 2005). Gezielte Untersuchungen an speziellen Kollektiven könnten dazu weiteren Informationsgewinn erbringen. Zudem würde die Untersuchung eines noch größeren Kollektivs die statistische Aussage und Sicherheit erhöhen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) rangieren an vierter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter. Die Prognose der pädiatrischen NHL-Patienten hat sich in den letzten Jahren stetig verbessert. Noch sind die Eigenschaften pädiatrischer Lymphome hinsichtlich ihrer Biologie und Genese jedoch deutlich schlechter erforscht als die adulter Lymphome. Bisher sind wenige groß angelegte Untersuchungen zu genetischen und immunhistochemischen Eigenschaften von NHL bei Kindern publiziert worden.

Um ein großes Kollektiv pädiatrischer B-NHL auf spezifische, wiederkehrende genetische Veränderungen hin zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Interphase-FISH-Assay zur Detektion der Translokation t(8;14) etabliert und in Kontrollen validiert. Dieser neue Assay sowie zwei kommerzielle FISH-Sonden zur Untersuchung der Genorte *BCL2* und *BCL6* wurden zunächst in einem sog. „Extremkollektiv“ kindlicher Lymphome, in dem eine Gruppe von 38 Fällen mit Langzeitremissionen einer Gruppe von 38 Fällen mit Therapieversagern bzw. Rezidiven gegenübergestellt war, angewandt. Insgesamt wurden hierbei 32 Burkitt-Lymphome (BL), 19 diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL), 10 primär mediastinale B-Zell-Lymphome (PMBCL) und vier high-grade-B-Zell-Neoplasien untersucht. Außerdem wurde mit den gleichen FISH-Sonden ein B-NHL-Kollektiv mit 6 BL, 87 DLBCL und 13 follikulären Lymphomen (FL) aus der NHL-BFM-Studie (deutschlandweite Studie zur Therapie von Lymphomen im Kindesalter) untersucht. In einer statistischen Korrelation der Untersuchungsergebnisse mit Studiendaten wurden Zusammenhänge zwischen Bruchereignissen in bestimmten Genorten und epidemiologischen, histopathologischen, immunhistochemischen und klinischen Eigenschaften der untersuchten Lymphome ermittelt.

In der Untersuchung des Extremkollektivs konnten keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit von Bruchereignissen in den Genorten *MYC*, *BCL2* und *BCL6* zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Es bestätigte sich die Beobachtung anderer Arbeitsgruppen, dass *BCL2*-Bruchereignisse scheinbar bei pädiatrischen DLBCL nicht auftreten.

Innerhalb des BFM-Kollektivs konnten *MYC*-Bruchereignisse und Translokationen t(8;14) sowohl bei allen untersuchten Burkitt-Lymphomen als auch bei 6% der DLBCL nachgewiesen werden. *BCL6*-Bruchereignisse traten in 9% der DLBCL und in 18% der FL auf. Auch in diesem Kollektiv konnte kein *BCL2*-Bruchereignis nachgewiesen werden.

Die statistische Auswertung der Daten ergab, dass Lymphome mit Bruchereignissen im *MYC*-Genort signifikant häufiger in früheren Stadien entdeckt wurden. Histopathologisch waren *MYC*-Bruchereignisse mit Burkitt-Lymphomen assoziiert. Kinder, deren Lymphom ein Bruchereignis im *BCL6*-Genlocus aufwies, waren signifikant älter als Kinder mit Lymph-

omen ohne Bruchereignis. In der immunhistochemischen Analyse waren diese Fälle signifikant häufiger mit CD10-Negativität und CD5-Positivität assoziiert und zeigten einen statistischen Trend zur MUM-1-Positivität. Mindestens vier von sechs betroffenen DLBCL wiesen einen Non-GCB-Typus auf. Die Lymphome mit *BCL6*-Brüchen zeigten über den Zeitraum von zehn Jahren den Trend zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs oder einer Therapieresistenz gegenüber den Lymphomen ohne *BCL6*-Brüche.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das neu etablierte Interphase-FISH-Assay zur Detektion der Translokation t(8;14) in lymphatischen Neoplasien auch für Routinezwecke eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass in Zukunft Bruchereignisse im *BCL6*-Genort als prognostische Marker für pädiatrische bzw. adoleszente Lymphome genutzt werden könnten. Auch die anscheinend altersgebundenen Bruchereignisse in den Genorten *BCL2* und *BCL6* könnten eine neue Gliederung der Lymphome erfordern, die eine neue Therapiegruppierung nach morphologischen und genetischen Eigenschaften nach sich ziehen könnte.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Abramson, J.S., Shipp, M.A. (2005): Advances in the biology and therapy of diffuse large B-Zell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood*, 106, 1164-74.

Advani, R., Rosenberg, S.A., Horning, S.J. (2004): Stage I and II follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term follow-up of no initial therapy. *J. Clin. Oncol*, 22, 1454-9.

Anon (1982): National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*, 49, 2112-35.

Anon (1997): A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*, 89, 3909-18.

Anwar, N., Kingma, D.W., Bloch, A.R., Mourad, M., Raffeld, M., Franklin, J., Magrath, I., el Bolkainy, N., Jaffe E.S. (1995): The investigation of Epstein-Barr viral sequences in 41 cases of Burkitt's lymphoma from Egypt: epidemiologic correlations. *Cancer*, 76, 1245-52.

Atra, A., Imeson, J.D., Hobson, R., Gerrard, M., Hann, I.M., Eden, O.B., Carter, R.L., Pinkerton, C.R. (2000): Improved outcome in children with advanced stage B-cell non-Hodgkin's lymphoma (B-NHL): results of the United Kingdom Children Cancer Study Group (UKCCSG) 9002 protocol. *Br. J. Cancer*, 82, 1396-402.

Barrans, S.L., O'Connor, S.J., Evans, P.A., Davies, F.E., Owen, R.G., Haynes, A.P., Morgan, G.J., Jack, A.S. (2002): Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol*, 117, 322-32.

Bentz, M., Cabot, G., Moos, M., Speicher, MR., Ganser, A., Lichter, P., Döhner, H. (1994): Detection of chimeric BCR-ABL genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia by in situ hybridisation. *Blood*, 83, 1922-8.

Bergh von, A., Emanuel, B., Zelderren-Bhola, van S., Smetsers, T., Soest, van R., Stul, M., Vranckx, H., Schuurin, E., Hagemeijer, A., Kluin, P. (2000): A DNA probe combination for improved detection of MLL/11q23 breakpoints by double-color interphase-FISH in acute leukemias. *Genes Chromosomes Cancer*, 28, 14-22.

Biggar, R.J., Frisch, M., Goedert, J.J. (2000): Risk of cancer in children with AIDS. AIDS-Cancer Match Registry Study Group. *JAMA*, 284, 205-9.

Bowman, W.P., Shuster, J.J., Cook, B., Griffin, T., Behm, F., Pullen, J., Link, M., Head, D., Carroll, A., Berard, C., Murphy, S. (1996): Improved survival for children with B-cell acute lymphoblastic leukemia and stage IV small noncleaved-cell lymphoma: a pediatric oncology group study. *J. Clin. Oncol*, 14, 1252-61.

Brugieres, L., Deley, M.C., Paquement, H., Meguerian-Bedoyan, Z., Terrier-Lacombe, M.J., Robert, A., Pondarre, C., Leverger, G., Devalck, C., Rodary, C., Delsol, G., Hartmann, O. (1998): CD30(+) anaplastic large-cell lymphoma in children: analysis of 82 patients enrolled in two consecutive studies of the French Society of Pediatric Oncology. *Blood*, 92, 3591-8.

- Burkhardt, B., Zimmermann, M., Oschlies, I., Niggli, F., Mann, G., Parwaresch, R., Riehm, H., Schrappe, M., Reiter, A. (2005): The impact of age and gender on biology, clinical features and treatment outcome of non-Hodgkin lymphoma in childhood and adolescence. *Br. J. Haematol*, 131, 39-49.
- Cairo, M.S., Krailo, M.D., Morse, M., Hutchinson, R.J., Harris, R.E., Kjeldsberg, C.R., Kadin, M.E., Radcliff, E., Steinherz, L.J., Morris, E., Finlay, J.L., Meadows, A.T. (2002): Long-term follow-up of short intensive multiagent chemotherapy without high-dose methotrexate ('Orange') in children with advanced non-lymphoblastic non-Hodgkin lymphoma: a Children's Cancer Group Report. *Leukemia*, 16, 594-600.
- Cairo, M.S., Raetz, E., Perkins, S.L. (2003): Non-Hodgkin lymphoma in children. In: Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., Frei, E. III, editors. *Cancer Medicine* E. 6. B C Decker, Inc, London.
- Cairo, M.S., Raetz, E., Lim, M.S., Davenport, V., Perkins, S.L. (2005): Childhood and adolescent non-Hodgkin lymphoma: new insights in biology and critical challenges for the future. *Pediatr. Blood Cancer*, 45, 753-69.
- Cataldo, K.A., Jalal, S.M., Law, M.E., Ansell, S.M., Inwards, D.J., Fine, M., Arber, D.A., Pulford, K.A., Strickler, J.G. (1999): Detection of t(2;5) in anaplastic large cell lymphoma: comparison of immunohistochemical studies, FISH, and RT-PCR in paraffin-embedded tissue. *Am. J. Surg. Pathol*, 23, 1386-92.
- Chang, C.C., McClintock, S., Cleveland, R.P., Trzpuć, T., Vesole, D.H., Logan, B., Kajdacsy-Balla, A., Perkins, S.L. (2004): Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol*, 28, 464-70.
- Cigudosa, J.C., Parsa, N.Z., Louie, D.C., Filippa, D.A., Jhanwar, S.C., Johansson, B., Mitelman, F., Chaganti, R.S. (1999): Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 25, 123-33.
- Coiffier, B. (2001): Diffuse large cell lymphoma. *Curr. Opin. Oncol*, 13, 325-34.
- Coignet, L.J., Schuurin, E., Kibbelaar, R.E., Raap, T.K., Kleiverda, K.K., Bertheas, M.F., Wiegant, J., Beverstock, G., Kluin, P.M. (1996): Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double-color fluorescence in situ hybridization. *Blood*, 87, 1512-9.
- Dave, B.J., Weisenburger, D.D., Higgins, C.M., Pickering, D.L., Hess, M.M., Chan, W.C., Sanger, W.G. (2004): Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization studies of diffuse large B-cell lymphoma in children and young adults. *Cancer Genet. Cytogenet*, 153, 115-21.
- Diviné, M., Casassus, P., Koscielny, S., Bosq, J., Sebban, C., Le Maignan, C., Stamattoulas, A., Dupriez, B., Raphael, M., Pico, J.L., Ribrag, V., GELA, GOELAMS (2005): Burkitt lymphoma in adults: a prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. *Ann. Oncol*, 16, 1928-35.
- Eden, O.B., Hann, I., Imeson, J., Cotterill, S., Gerrard, M., Pinkerton, C.R. (1992): Treatment of advanced stage T cell lymphoblastic lymphoma: results of the United Kingdom Children Cancer Study Group (UKCCSG) protocol 8503. *Br. J. Haematol*, 82, 310-6.

Falini, B., Fizzotti, M., Pucciarini, A., Bigerna, B., Marafioti, T., Gambacorta, M., Pacini R., Alunni, C., Natali-Tanci, L., Ugolini, B., Sebastiani, C., Cattoretti, G., Pileri, S., Dalla-Favera, R., Stein, H. (2000): A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*, 95, 2084-92.

Filipovich A.H., Mathur, A., Kamat, D., Shapiro, R.S. (1992): Primary immunodeficiencies: genetic risk factors for lymphoma. *Cancer Res*, 52, 5465-7.

Frost, M., Newell, J., Lones, M.A., Tripp, S.R., Cairo, M.S., Perkins, S.L. (2004): Comparative Immunohistochemical Analysis of Pediatric Burkitt Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol*, 121, 384-92.

Gascoyne, R.D., Adomat, S.A., Krajewski, S., Krajewska, M., Horsman, D.E., Tolcher, A.W., O'Reilly, S.E., Hoskins, P., Coldman, A.J., Reed, J.C., Connors, J.M. (1997): Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90, 244-51.

Gutierrez, M.I., Bhatia, K., Barriga, F., Diez, B., Muriel, F.S., de Andreas, M.L., Epelman, S., Risueno, C., Magrath, I.T. (1992): Molecular epidemiology of Burkitt's lymphoma from South America: differences in breakpoint location and Epstein-Barr virus association from tumors in other world regions. *Blood*, 79, 3261-6.

Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Campo, E., Braziel, R.M., Jaffe, E.S., Pan, Z., Farinha, P., Smith, L.M., Falini, B., Banham, A.H., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Connors, J.M., Armitag, J.O., Chan, W.C. (2004): Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103, 275-82.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peters, C., Falini, B., Gatter, K.C., Grogan, T.M., Isaacson, P.G., Knowles, D.M., Mason, D.Y., Müller-Hermelink, H.K., Pileri, S.A., Piris, M.A., Ralfkiaer, E., Warnke, R.A. (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84, 1361-92.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Müller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., Bloomfield, C.D. (1999): World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J. Clin. Oncol*, 17, 3835-49.

Hiddemann, W., Dreyling, M., Stein, H. (2004): *Lymphome: Neue Erkenntnisse und Therapiestrategien*. 1. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart.

Hui, P.K., Feller, A.C., Lennert, K. (1988): High-grade non-Hodgkin's lymphoma of B-cell type. High-grade non-Hodgkin's lymphoma of B-cell type. I. Histopathology. *Histopathology*, 12, 127-43.

Hui, P.K., Feller, A.C., Lennert, K. (1988): High-grade non-Hodgkin's lymphoma of B-cell type. High-grade non-Hodgkin's lymphoma of B-cell type. I. Histopathology. *Histopathology*, 12, 127-43.

Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T.F.E., Bernd, H.W., Cogliatti, S.B., Dierlamm, J., Feller, A.C., Hansmann, M.L., Haralambieva, E., Harder, L., Hasenclever, D., Kühn, M., Lenze, D., Lichter, P., Martin-Subero, J.I., Möller, P., Müller-Hermelink, H.K., Ott, G., Parwaresch, R.M., Pott, C., Rosenwald, A., Rosolowski, M., Schwaenen, C., Stürzenhofecker, B., Szczepanowski, M., Trautmann, H., Wacker, H.H., Spang, R., Loeffler, M., Trümper, L., Stein, H., Siebert, R., for the Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe (2006): A Biologic Definition of Burkitt's Lymphoma from Transcriptional and Genomic Profiling. *N. Engl. J. Med.*, 354, 2419-30.

Iqbal, J., Sanger, W.G., Horsman, D.E., Rosenwald, A., Pickering, D.L., Dave, B., Dave, S., Xiao, L., Cao, K., Zhu, Q., Sherman, S., Hans, C.P., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Gascoyne, R.D., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Delabie, J., Braziel, R.M., Jaffe, E.S., Campo, E., Lynch, J.C., Connors, J.M., Vose, J.M., Armitage, J.O., Grogan, T.M., Staudt, L.M., Chan, W.C. (2004): *BCL2* translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Pathol.*, 165, 159-66.

Iqbal, J., Greiner, T.C., Patel, K., Dave, B.J., Smith, L., Ji, J., Wright, G., Sanger, W.G., Pickering, D.L., Jain, S., Horsman, D.E., Shen, Y., Fu, K., Weisenburger, D.D., Hans, C.P., Campo, E., Gascoyne, R.D., Rosenwald, A., Jaffe, E.S., Delabie, J., Rimsza, L., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Connors, J.M., Vose, J.M., McKeithan, T., Staudt, L.M., Chan, W.C. and Leukemia/ Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP) (2007): Distinctive patterns of *BCL6* molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 21, 2332-43.

Isaacson, P.G., Norton, A.J., Addis, B.J. (1987): The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet*, 2, 1488-91.

Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Vardiman, J.W., eds. (2001): Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: The World Health Organisation of Tumours. IARC Press, Lyon.

Jerkeman, M., Aman, P., Cavallin-Stahl, E., Torlakovic, E., Akerman, M., Mitelman, F., Fioretos, T. (2002): Prognostic implications of *BCL6* rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma--a Nordic Lymphoma Group study. *Int. J. Oncol.*, 20, 161-5.

Kalbfleisch, J., Prentice, R.L. (2005): The Statistical Analysis of Failure Time Data. John Wiley, New York.

Klapper W., Szczepanowski, M., Burkhardt, B., Berger, H., Rosolowski, M., Bentink, S., Schwaenen, C., Wessendorf, S., Spang, R., Moller, P., Hansmann, M.L., Bernd, H.W., Ott, G., Hummel, M., Stein, H., Loeffler, M., Trumper, L., Zimmermann, M., Reiter, A., Siebert, R. (2008): Molecular profiling of pediatric mature B-cell lymphoma treated in population-based prospective clinical trials. *Blood*, 112, 1374-81.

Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K., Küppers, R. (1998): Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol. Rev.*, 162, 261-80.



Knowles, D.M. (1999): Immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. *Mod. Pathol*, 12, 200-17.

Kramer, M.H., Hermans, J., Wijburg, E., Philippo, K., Geelen, E., van Krieken, J.H., de Jong, D., Martense, E., Schuurin, E., Kluin, P.M. (1998): Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 92, 3152-62.

Ladanyi, M., Offit, K., Jhanwar, S.C., Filippa, D.A., Chaganti, R.S. (1991): MYC rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood*, 77, 1057-63.

Lam, L.T., Davis, R.E., Pierce, J., Hepperle, M., Xu, Y., Hottelot, M., Nong, Y., Wen, D., Adams, J., Dang, L., Staudt, L.M. (2005): 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*, 11, 28-40.

Lennert, K., Stein, H., Kaiserling, E. (1975): Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br. J. Cancer*, 31 (Suppl 2), 29-43.

Lentze, M.J., Schulte, F.J., Schaub, J., Spranger, J. (2003): *Pädiatrie. Grundlagen und Praxis*. 2. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg.

Leucci, E., Cocco, M., Onnis, A., De Falco, G., van Cleef, P., Bellan, C., van Rijk, A., Nyagol, J., Byakika, B., Lazzi, S., Tosi, P., van Krieken, H., Leoncini, L. (2008): MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J. Pathol*, 216, 440-50.

Link, M.P., Shuster, J.J., Donaldson, S.S., Berard, C.W., Murphy, S.B. (1997): Treatment of children and young adults with early-stage non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med*, 337, 1259-66.

Lossos, I.S., Jones, C.D., Warnke, R., Natkunam, Y., Kaizer, H., Zehnder, J.L., Tibshirani, R., Levy, R. (2001): Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 98, 945-51.

Lossos, I.S. (2005): Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol*, 23, 6351-7.

Magrath, I., Jaffe, E.S., Bhatia, K. (2001): Burkitt's lymphoma. In: Knowles, D.M. ed. *Neoplastic hematopathology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Mancini, M., Cedrone, M., Diverio, D., Emanuel, B., Stul, M., Vranckx, H., Brama, M., De Cuia, M.R., Nanni, M., Fazi, F., Mecucci, C., Alimena, G., Hagemeijer, A. (2000): Use of dual-color interphase FISH for the detection of inv(16) in acute myeloid leukemia at diagnosis, relapse and during follow-up: a study of 23 patients. *Leukemia*, 14, 364-8.

Mancini, M., Cedrone, M., Diverio, D., Emanuel, B., Stul, M., Vranckx, H., Brama, M., De Cuia, M.R., Nanni, M., Fazi, F., Mecucci, C., Alimena, G., Hagemeijer, A. (2000): Use of dual-color interphase FISH for the detection of inv(16) in acute myeloid leukemia at diagnosis, relapse and during follow-up: a study of 23 patients. *Leukemia*, 14, 364-8.

- Marky, I., Bjork, O., Forestier, E., Jonsson, O.G., Perkkio, M., Schmiegelow, K., Storm-Mathiesen, I., Gustafsson, G. (2004): Intensive chemotherapy without radiotherapy gives more than 85% event-free survival for non-Hodgkin lymphoma without central nervous involvement: a 6-year population-based study from the nordic society of pediatric hematology and oncology. *J. Pediatr. Hematol. Oncol*, 26, 555-60.
- Martín-Subero, J.I. (2001): Development of the Multicolor Fiction Technique. Biochem. Diss., Department of Genetics, University of Navarra.
- Martín-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Chudoba, I., Luhmann, B., Grote, W., Novo, F.J., Calasanz, F.J., Siebert, R. (2001): Multicolor interphase FISH for the detection of recurrent chromosomal translocations in lymphoid neoplasms. *Onkologie*, 24 (Suppl 6), 100.
- Martín-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Grote, W., Siebert, R. (2003): Interphase cytogenetics of hematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anti-cancer Res*, 23, 1139-48.
- Miles, R.R., Raphael, M., McCarthy, K., Wotherspoon, A., Lones, M.A., Terrier-Lacombe, M.J., Patte, C., Gerrard, M., Auperin, A., Sposto, R., Davenport, V., Cairo, M.S., Perkins, S.L. (2008): Pediatric diffuse large B-cell lymphoma demonstrates a high proliferation index, frequent c-Myc protein expression, and a high incidence of germinal center subtype: Report of the French-American-British (FAB) international study group. *Pediatr. Blood Cancer*, 51, 369-74.
- Morrell, D., Cromartie, E., Swift, M. (1986): Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia. *J. Natl. Cancer Inst*, 77, 89-92.
- Morton, L.M., Wang, S.S., Devesa S.S., Hartge, P., Weisenburger D.D., Linet, M.S. (2006): Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107, 265-76.
- Murphy, S.B. (1980): Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults. *Semin. Oncol*, 7, 332-9.
- Mustillo, P., Bajwa, R.P., Termuhlen, A.M., Nicol K., Scherzer, R., Jaffe R., Filipovich A.H., Gross, T.G. (2008): Tumor immune surveillance defect of X-linked severe combined immunodeficiency is not Epstein-Barr virus specific. *Pediatr. Blood Cancer*, 51, 706-9.
- Oschlies, I., Klapper, W., Zimmermann, M., Krams, M., Wacker, H.H., Burkhardt, B., Harder, L., Siebert, R., Reiter, A., Parwaresch, R. (2006): Diffuse large B-cell lymphoma in pediatric patients belongs predominantly to the germinal-center type B-cell lymphomas: a clinicopathologic analysis of cases included in the German BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) Multi-center Trial. *Blood*, 107, 4047-52.
- Pasqualucci, L., Bereschenko, O., Niu, H., Klein, U., Basso, K., Guglielmino, R., Cattoretti, G., Dalla-Favera, R. (2003): Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk. Lymphoma*, 44 (suppl3), 5-12.

Patte, C., Kalifa, C., Flamant, F., Hartmann, O., Brugieres, L., Valteau-Couanet, D., Bayle, C., Caillaud, J.M., Lemerle, J. (1992): Results of the LMT81 protocol, a modified LSA2L2 protocol with high dose methotrexate, on 84 children with non-B-cell (lymphoblastic) lymphoma. *Med. Pediatr. Oncol*, 20, 105-13.

Patte, C., Auperin, A., Michon, J., Behrendt, H., Leverger, G., Frappaz, D., Lutz, P., Coze, C., Perel, Y., Raphael, M., Terrier-Lacombe, M.J. (2001): The Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. *Blood*, 97, 3370-9.

Poirel, H.A., Cairo, M.S., Heerema, N.A., Swansbury, J., Aupérin, A., Launay, E., Sanger, W.G., Talley, P., Perkins, S.L., Raphael, M., McCarthy, K., Sposto, R., Gerrard, M., Bernheim, A., Patte, C., FAB/LMB 96 International Study Committee (2009): Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Leukemia*, 23, 323-31.

Raphael, M., Gentilhomme, O., Tulliez, M., Byron, P.A., Diebold, J. (1991): Histopathologic features of high-grade non-Hodgkin's lymphomas in acquired immunodeficiency syndrome. The French Study Group of Pathology for Human Immunodeficiency Virus-Associated Tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med*, 115, 15-20.

Reiter, A., Schrappe, M., Tiemann, M., Parwaresch, R., Zimmermann M., Yakisan, E., Dopfer, R., Bucsky, P., Mann, G., Gadner, H., Riehm, H. (1994): Successful treatment strategy for Ki-1 anaplastic large-cell lymphoma of childhood: a prospective analysis of 62 patients enrolled in three consecutive Berlin-Frankfurt-Munster group studies. *J. Clin. Oncol*, 12, 899-908.

Reiter, A., Schrappe, M., Parwaresch, R., Henze, G., Muller-Wehrich, S., Sauter, S., Sykora, K.W., Ludwig, W.D., Gadner, H., Riehm, H. (1995): Non-Hodgkin's lymphomas of childhood and adolescence: results of a treatment stratified for biologic subtypes and stage – a report of the Berlin-Frankfurt-Munster group. *J. Clin. Oncol*, 13, 359-72.

Reiter, A., Schrappe, M., Tiemann, M., Ludwig, W.D., Yakisan, E., Zimmermann, M., Mann, G., Chott, A., Ebell, W., Klingebiel, T., Graf, N., Kremens, B., Muller-Wehrich, S., Pluss, H.J., Zintl, F., Henze, G., Riehm, H. (1999): Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood*, 94, 3294-306.

Reiter, A., Schrappe, M., Ludwig, W.D., Tiemann, M., Parwaresch, R., Zimmermann, M., Schirg, E., Henze, G., Schellong, G., Gadner, H., Riehm, H. (2000): Intensive ALL-type therapy without local radiotherapy provides a 90% event-free survival for children with T-cell lymphoblastic lymphoma: a BFM group report. *Blood*, 95, 416-21.

Reiter, A., Klapper, W. (2008): Recent advances in the understanding and management of diffuse large B-cell lymphoma in children. *Br. J. Haematol*, 142, 329-47.

Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltneane, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Powell, J., Duffey, P.L., Longo, D.L., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Montserrat, E., López-Guillermo, A., Grogan, T.M., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T., Staudt, L.M. (2002): The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med*, 346, 1937-47.

Sandlund, J.T., Downing, J.R., Crist, W.M. (1996): Non-Hodgkin's lymphoma in childhood. *N. Engl. J. Med*, 334, 1238-48.

Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltneane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., Staudt, L.M. (2002): Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*, 17, 51-62.

Shiramizu, B., Barriga, F., Neequaye, J., Jafri, A., Dalla-Favera, R., Neri, A., Gutierrez, M., Levine, P., Magrath, I. (1991): Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. *Blood*, 77, 1516-26.

Shvarts, A., Brummelkamp, T.R., Scheeren, F., Koh, E., Daley, G.Q., Spits, H., Bernards, R. (2002): A senescence rescue screen identifies BCL6 as an inhibitor of anti-proliferative p19(ARF)-p53 signaling. *Genes Dev*, 16, 681-6.

Sinclair, P.B., Green, A.R., Grace, C., Nacheva, E.P. (1997): Improved sensitivity of BCR-ABL detection: a triple-probe three-color fluorescence in situ hybridization system. *Blood*, 90, 1395-402.

Sokolova, I.A., Halling, K.C., Jenkins, R.B., Burkhardt, H.M., Meyer, R.G., Seelig, S.A., King, W. (2000): The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J. Mol. Diagn*, 2, 116-23.

Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S. (2002): Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol*, 161, 1961-71.

Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W (2008): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. IARC Press, Lyon.

Taniwaki M., Nishida, K., Ueda, Y., Misawa, S., Nagai, M., Tagawa, S., Yamagami, T., Sugiyama, H., Abe, M., Fukuhara, S., Kashima, K. (1995): Interphase and metaphase detection of the breakpoint of 14q32 translocations in B-cell malignancies by double-color fluorescence in situ hybridization. *Blood*, 85, 3223-8.

Tubergen, D.G., Krailo, M.D., Meadows, A.T., Rosenstock, J., Kadin, M., Morse, M., King, D., Steinherz, P.G., Kersey, J.H. (1995): Comparison of treatment regimes for pediatric lymphoblastic non-Hodgkin's lymphoma: a Childrens Cancer Group Study. *J. Clin. Oncol*, 13, 1368-76.

Vaandrager, J.W., Schuurin, E., Raap, T., Philippo, K., Kleiverda, K., Kluin, P. (2000): Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer*, 27, 85-94.

Williams, D.M., Hobson, R., Imeson, J., Gerrard, M., McCarthy, K., Pinkerton, C.R. (2002): Anaplastic large cell lymphoma in childhood: analysis of 72 patients treated on the United Kingdom Children's Cancer Study Group chemotherapy regimens. *Br. J. Haematol*, 117, 812-20.

Woessmann, W., Seidemann, K., Mann, G., Zimmermann, M., Burkhardt, B., Oschlies, I., Ludwig, W.D., Klingebiel, T., Graf, N., Gruhn, B., Juergens, H., Niggli, F., Parwaresch, R., Gadner, H., Riehm, H., Schrappe, M., Reiter, A. (2005): The impact of the methotrexate administration schedule and dose in the treatment of children and adolescents with B-cell neoplasms – a report of the BFM group study NHL-BFM95. *Blood*, 105, 948-58

Yamaguchi, M., Nakamura, N., Suzuki, R., Kagami, Y., Okamoto, M., Ichinohasama, R., Yoshino, T., Suzumiya, J., Murase, T., Miura, I., Ohshima, K., Nishikori, M., Tamaru, J.I., Taniwaki, M., Hirano, M., Morishima, Y., Ueda, R., Shiku, H., Nakamura, S. (2008): De novo CD5<sup>+</sup> diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. *Haematologica*, 93, 1195-202.

## 7. ANHANG

Tab. A2.1: Karyotypen der Zelllinien Raji, Daudi und Namalwa sowie der Routinefälle 1 und 2

Positiv-Kontrolle	Karyotyp
Raji	89(80-91)<4n>XXYY, -4, -9, -12, -16, -18, -21, +3mar, add(4)(q35), add(6)(q27)x2, t(8;14)(q24;q32), der(8)t(8;14) (q24;q32)add(8)(?p12), del(9)(p23), der(14)t(8;14)(q24;q32)
Daudi	46(45-48)<2n>XY/XXY, +7, -9, t(8;14)(q24;q32)
Namalwa	44(43-46)<2n>X, -Y, -5, -6, +7, -10, -13, -21, +3mar, ins(1;?)(p11;?), ins(3)(q11q29), der(5)t(1;5)(q25;q35), del(8)(p22), der(14)t(14;?)(p11;?), der(15)t(15;21)(p11;q11)
1	46,XY,dup(1)(q12q31),t(8;14)(q24;q32)[4]/46,XY[1]
2	46,XY,t(8;14)(q24;q32)[15]

Legende: mar=, add= added (zusätzlich), del= deleted (entfernt), der= derivative (abgeleitet), nuc= nuclear (Zellkern-), ish= in situ hybridization, ins= inserted (eingefügt)

Tab. A3.1.2: FISH-Analyse mit dem t(8;14)- Assay an positiven Fällen mit t(8;14)

Kontrolle	Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen							Gesamt n
	2RG 2B	1RG 1R 1G 2B	1RG 1R 1GB 1B	1RG 1RB 1G 1B	1RG 1RB 1GB 1B	1RG 1RB 1GB	1RG 1R 1G 3B	
Daudi	3%	0%	4%	0%	92%	1%	0%	100
1	47%	0%	0%	1%	47%	5%	0%	100
2	9%	0%	0%	0%	90%	0%	1%	100

Kontrolle	Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen				Gesamt n
	1 RG 2RGB 1RB 2B	1RG 2RGB 1RB 3B	1RG 2RGB 1RB 4B	1RG 2RGB 1RB 5B	
Namalwa	14%	33%	52%	1%	100

Kontrolle	Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen					
	1RG 1-2RB 1-2B	1RG >2GB 1-2RB 1-2B	1RG 1-2GB >2RB 1-2B	1RGB 1GB 2RB	2RG 1-2GB 1-2RB 1-2B	2RG >2GB 1- 2RB 1-2B
Raji	7%	1%	2%	1%	39%	3%

Kontrolle	Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen					Gesamt N
	2RG 1-2GB >2RB 1-2B	andere Kon- stellationen mit 2RG	3RG 1-2GB 1-2RB 1-2B	3RG >2GB 1-2RB 1-2B	andere mit 3RG	
Raji	11%	13%	16%	4%	3%	100

In den folgenden Tabellen sind die Daten der Geburtsjahre der Patienten sowie das Jahr der Diagnose angegeben. In den Fällen der NHL-BFM-Studie lagen der BFM-Studienzentrale die genauen Geburts- und Erstdiagnosedaten zur statistischen Berechnung vor.

**Tab. A3.2.1a und A3.2.1b:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Therapieresistenz- bzw. Rezidivfälle und der Langzeitremissionen aus den Fällen der Pathologie des UKSH (Campus Kiel) mit dem t(8;14)-Assay

Legende: aBL= atypisches Burkitt-Lymphom, BL= Burkitt-Lymphom, DLBCL= diffus großzelliges Lymphom, High-grade B= nicht näher klassifizierte high-grade B-Zell-Neoplasie, PMBCL= primär mediastinales diffus großzelliges B-Zell-Lymphom

Rezidiv-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
1	M	1992	2003	BL	Nicht auswertbar
2	M	1992	2004	High-grade B	Nicht auswertbar
<b>3</b>	<b>W</b>	<b>1982</b>	<b>1998</b>	<b>aBL</b>	<b>MYC-Split mit t(8;14)</b>
4	W	1982	1998	High-grade B	Nicht auswertbar
5	M	1992	1998	DLBCL	Kein MYC-Split
<b>6</b>	<b>M</b>	<b>1992</b>	<b>1998</b>	<b>aBL</b>	<b>MYC-Split mit t(8;14)</b>
7	M	1984	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
8	M	1984	2001	PMBCL	Kein MYC-Split
9	W	1981	1997	DLBCL	Nicht auswertbar
10	W	1981	1997	DLBCL	Nicht auswertbar
<b>11</b>	<b>M</b>	<b>1987</b>	<b>1993</b>	<b>DLBCL</b>	<b>MYC-Split ohne t(8;14)</b>
12	M	1987	1993	DLBCL	Core nicht vorhanden
<b>13</b>	<b>M</b>	<b>1991</b>	<b>1998</b>	<b>aBL</b>	<b>MYC-Split mit t(8;14)</b>
14	M	1991	1999	aBL	Nicht auswertbar
15	W	1990	2001	PMBCL	Nicht auswertbar
16	W	1990	2002	PMBCL	Nicht auswertbar
17	W	1988	2000	PMBCL	Kein MYC-Split
18	M	1990	2003	PMBCL	Kein MYC-Split
19	M	1978	2002	DLBCL	Kein MYC-Split
20	W	1975	1992	PMBCL	Nicht auswertbar
21	W	1977	1992	BL	Nicht auswertbar
<b>22</b>	<b>M</b>	<b>1981</b>	<b>1992</b>	<b>BL</b>	<b>MYC-Split mit t(8;14)</b>
23	M	1981	1993	BL	Nicht auswertbar
24	W	1984	1995	BL	Nicht auswertbar
25	W	1980	1995	BL	Kein MYC-Split
26	M	1984	1995	High-grade B	Kein MYC-Split
27	M	1991	2001	BL	Nicht auswertbar
28	M	1986	2001	DLBCL	Kein MYC-Split
<b>29</b>	<b>M</b>	<b>1997</b>	<b>2003</b>	<b>aBL</b>	<b>MYC-Split ohne t(8;14)</b>
30	M	1992	1998	BL	Nicht auswertbar
31	M	1985	1998	BL	Nicht auswertbar
<b>32</b>	<b>M</b>	<b>1996</b>	<b>2002</b>	<b>BL</b>	<b>MYC-Split ohne t(8;14)</b>
33	M	1989	2002	BL	Nicht auswertbar
34	W	1983	1998	BL	Nicht auswertbar
<b>35</b>	<b>M</b>	<b>1989</b>	<b>2003</b>	<b>BL</b>	<b>MYC-Split mit t(8;14)</b>
<b>36</b>	<b>M</b>	<b>1995</b>	<b>2004</b>	<b>DLBCL</b>	<b>MYC-Split mit t(8;14)</b>
37	W	1997	2005	BL	Nicht auswertbar
38	M	1986	2001	DLBCL	Kein MYC-Split

Remissions-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
1	M	1992	1998	aBL	Kein <i>MYC</i> -Split
2	M	1991	1998	aBL	Kein <i>MYC</i> -Split
<b>3</b>	<b>M</b>	<b>1993</b>	<b>1997</b>	<b>BL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
<b>4</b>	<b>W</b>	<b>1996</b>	<b>2001</b>	<b>BL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
5	W	1988	1998	aBL	Kein <i>MYC</i> -Split
6	M	1986	1998	BL	Nicht auswertbar
<b>7</b>	<b>M</b>	<b>1996</b>	<b>2003</b>	<b>BL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
<b>8</b>	<b>M</b>	<b>1989</b>	<b>2002</b>	<b>BL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
9	W	1978	1992	PMBCL	Nicht auswertbar
10	W	1989	2003	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
11	W	1989	1998	PMBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
12	W	1993	1998	aBL	Kein <i>MYC</i> -Split
13	W	1986	2003	DLBCL	Nicht auswertbar
14	M	1986	1999	PMBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
15	M	1989	1992	DLBCL	Nicht auswertbar
16	M	1987	2002	BL	Nicht auswertbar
17	M	1990	1994	BL	Nicht auswertbar
<b>18</b>	<b>W</b>	<b>1984</b>	<b>2002</b>	<b>DLBCL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
19	M	1987	1994	BL	Nicht auswertbar
20	M	1989	2002	aBL	Nicht auswertbar
<b>21</b>	<b>W</b>	<b>1988</b>	<b>1995</b>	<b>DLBCL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
22	M	1983	2002	DLBCL	Nicht auswertbar
<b>23</b>	<b>M</b>	<b>1991</b>	<b>2003</b>	<b>aBL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
<b>24</b>	<b>M</b>	<b>1987</b>	<b>1998</b>	<b>High-grade B</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
<b>25</b>	<b>M</b>	<b>1990</b>	<b>2002</b>	<b>BL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
26	M	1983	1997	PMBCL	Nicht auswertbar
<b>27</b>	<b>M</b>	<b>1997</b>	<b>2001</b>	<b>BL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
<b>28</b>	<b>M</b>	<b>1996</b>	<b>2004</b>	<b>BL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
29	M	1990	1997	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
30	M	1984	1999	BL	Nicht auswertbar
31	M	1995	1998	BL	Nicht auswertbar
<b>32</b>	<b>M</b>	<b>1993</b>	<b>2001</b>	<b>aBL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
<b>33</b>	<b>M</b>	<b>1980</b>	<b>2002</b>	<b>DLBCL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
<b>34</b>	<b>W</b>	<b>1991</b>	<b>1997</b>	<b>BL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
35	M	1995	2003	BL	Kein <i>MYC</i> -Split
<b>36</b>	<b>W</b>	<b>1992</b>	<b>2000</b>	<b>BL</b>	<b><i>MYC</i>-Split mit t(8;14)</b>
37	M	1986	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
38	M	1981	1998	aBL	Nicht auswertbar



**Tab. A3.2.1c:** Signalkonstellationen der *MYC*-Bruch-positiven Fälle im Extremkollektiv der Therapieresistenz- bzw. Rezidivfälle unter Verwendung des t(8;14)-Assay

Rezidiv-Fall Nr.	Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen										Gesamt n
	2RG	1RG	3RG	1RG 1R	1RG 1R	1RG 1G	1R 1G	1R	1G	2RG 1R 1G	
3	10 (10%)	4 (4%)	0	56 (56%)	6 (6%)	8 (8%)	10 (10%)	2 (2%)	4 (4%)	0	100
6	8 (7%)	2 (2%)	0	65 (58%)	7 (6%)	10 (9%)	18 (16%)	2 (2%)	0	0	112
11	6 (6%)	13 (13%)	0	28 (28%)	9 (9%)	8 (8%)	12 (12%)	15 (15%)	9 (9%)	0	100
13	11 (11%)	2 (2%)	0	52 (52%)	7 (7%)	5 (5%)	20 (20%)	3 (3%)	0	0	100
22	8 (7%)	8 (7%)	0	37 (37%)	8 (7%)	15 (15%)	15 (15%)	5 (5%)	5 (5%)	0	101
29	2 (2%)	9 (9%)	0	33 (34%)	9 (9%)	10 (10%)	22 (22%)	5 (5%)	8 (8%)	0	98
32	10 (10%)	5 (5%)	1 (1%)	27 (27%)	10 (10%)	8 (8%)	17 (17%)	13 (13%)	9 (9%)	0	100
35	1 (1%)	17 (15%)	0	32 (28%)	10 (9%)	11 (10%)	25 (22%)	11 (10%)	7 (6%)	0	114
36	3 (2%)	22 (18%)	0	23 (19%)	15 (12%)	14 (11%)	24 (19%)	13 (10%)	10 (8%)	0	124

**Tab. A3.2.1d:** Signalkonstellationen der *MYC*-Bruch-positiven Fälle im Extremkollektiv der Langzeitremissions-Fälle unter Verwendung des t(8;14)-Assay

Remissions-Fall Nr.	Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen										Gesamt n
	2RG	1RG	3RG	1RG 1R 1G	1RG 1R	1RG 1G	1R 1G	1R	1G	2RG 1R 1G	
3	5 (5%)	14 (14%)	0	31 (31%)	10 (10%)	18 (18%)	13 (13%)	3 (3%)	5 (5%)	0	99
4	10 (10%)	16 (16%)	0	34 (34%)	8 (8%)	14 (14%)	10 (10%)	6 (6%)	2 (2%)	0	100
7	10 (10%)	7 (7%)	0	37 (35%)	14 (13%)	6 (6%)	23 (22%)	6 (6%)	2 (2%)	0	105
8	6 (6%)	6 (6%)	0	44 (44%)	10 (10%)	13 (13%)	12 (12%)	3 (3%)	6 (6%)	0	100
18	4 (4%)	6 (6%)	0	34 (33%)	16 (16%)	6 (6%)	18 (18%)	14 (14%)	5 (5%)	0	103
21	8 (8%)	19 (19%)	0	27 (27%)	8 (8%)	11 (11%)	11 (11%)	10 (10%)	6 (6%)	0	100
23	7 (7%)	16 (16%)	0	23 (23%)	8 (8%)	9 (9%)	18 (18%)	10 (10%)	9 (9%)	0	100
24	12 (12%)	17 (17%)	0	31 (31%)	7 (7%)	10 (10%)	11 (11%)	7 (7%)	5 (5%)	0	100
25	2 (2%)	16 (14%)	0	32 (29%)	8 (7%)	15 (14%)	19 (17%)	8 (7%)	11 (10%)	0	111
27	6 (6%)	10 (11%)	0	32 (34%)	8 (8%)	8 (8%)	15 (16%)	8 (8%)	8 (8%)	0	95
28	9 (9%)	11 (11%)	0	30 (30%)	3 (3%)	14 (14%)	17 (17%)	10 (10%)	5 (5%)	2 (2%)	101
32	10 (10%)	11 (11%)	0	34 (33%)	10 (10%)	9 (9%)	18 (18%)	3 (3%)	6 (6%)	1 (1%)	102
33	8 (8%)	15 (15%)	1 (1%)	40 (40%)	6 (6%)	6 (6%)	13 (13%)	4 (4%)	5 (5%)	2 (2%)	100

Remissions-Fall Nr.	Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen										Gesamt n
	2RG	1RG	3RG	1RG 1R 1G	1RG 1R	1RG 1G	1R 1G	1R	1G	2RG 1R 1G	
34	18 (17%)	14 (14%)	6 (6%)	28 (27%)	8 (8%)	5 (5%)	9 (9%)	9 (9%)	3 (3%)	3 (3%)	103
36	11 (11%)	8 (8%)	0	31 (31%)	11 (11%)	7 (7%)	13 (13%)	12 (12%)	7 (7%)	0	100

**Tab. 3.2.2a und 3.2.2b:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Extremkollektivs der Therapieresistenz- bzw. Rezidivfälle und der Langzeitremissionen mit der Abbott / Vysis LSI<sup>®</sup> *BCL2*-Break Apart-Sonde

Rezidiv-Fall Nr.	Geschlecht	Geburts-jahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
1	M	1992	2003	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
2	M	1992	2004	High-grade B	Nicht auswertbar
3	W	1982	1998	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split
4	W	1982	1998	High-grade B	Nicht auswertbar
5	M	1992	1998	DLBCL	Core nicht vorhanden
6	M	1992	1998	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split
7	M	1984	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
8	M	1984	2001	PMBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
9	W	1981	1997	DLBCL	Nicht auswertbar
10	W	1981	1997	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split, Genamplifikation (4-8 Co-Signale)
11	M	1987	1993	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
12	M	1987	1993	DLBCL	Core nicht vorhanden
13	M	1991	1998	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split
14	M	1991	1999	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split
15	W	1990	2001	PMBCL	Nicht auswertbar
16	W	1990	2002	PMBCL	Nicht auswertbar
17	W	1988	2000	PMBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
18	M	1990	2003	PMBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
19	M	1978	2002	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
20	W	1975	1992	PMBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
21	W	1977	1992	BL	Nicht auswertbar
22	M	1981	1992	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
23	M	1981	1993	BL	Nicht auswertbar
24	W	1984	1995	BL	Nicht auswertbar
25	W	1980	1995	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
26	M	1984	1995	High-grade B	Kein <i>BCL2</i> -Split
27	M	1991	2001	BL	Nicht auswertbar
28	M	1986	2001	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
29	M	1997	2003	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split
30	M	1992	1998	BL	Nicht auswertbar
31	M	1985	1998	BL	Nicht auswertbar
32	M	1996	2002	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
33	M	1989	2002	BL	Nicht auswertbar
34	W	1983	1998	BL	Nicht auswertbar
35	M	1989	2003	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
36	M	1995	2004	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
37	W	1997	2005	BL	Nicht auswertbar
38	M	1986	2001	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split

Remissions-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
1	M	1992	1998	aBL	Core nicht vorhanden
2	M	1991	1998	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split
3	M	1993	1997	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
4	W	1996	2001	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
5	W	1988	1998	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split
6	M	1986	1998	BL	Nicht auswertbar
7	M	1996	2003	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
8	M	1989	2002	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
9	W	1978	1992	PMBCL	Nicht auswertbar
10	W	1989	2003	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
11	W	1989	1998	PMBCL	Nicht auswertbar
12	W	1993	1998	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split
13	W	1986	2003	DLBCL	Nicht auswertbar
14	M	1986	1999	PMBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
15	M	1989	1992	DLBCL	Nicht auswertbar
16	M	1987	2002	BL	Nicht auswertbar
17	M	1990	1994	BL	Nicht auswertbar
18	W	1984	2002	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split, Genamplifikation (4-8 Co-Signale)
19	M	1987	1994	BL	Core nicht vorhanden
20	M	1989	2002	aBL	Nicht auswertbar
21	W	1988	1995	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
22	M	1983	2002	DLBCL	Nicht auswertbar
23	M	1991	2003	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split
24	M	1987	1998	High-grade B	Kein <i>BCL2</i> -Split
25	M	1990	2002	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
26	M	1983	1997	PMBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
27	M	1997	2001	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
28	M	1996	2004	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
29	M	1990	1997	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
30	M	1984	1999	BL	Nicht auswertbar
31	M	1995	1998	BL	Nicht auswertbar
32	M	1993	2001	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split
33	M	1980	2002	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
34	W	1991	1997	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
35	M	1995	2003	BL	Kein <i>BCL2</i> -Split
36	W	1992	2000	BL	Nicht auswertbar
37	M	1986	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
38	M	1981	1998	aBL	Kein <i>BCL2</i> -Split

**Tab. A3.2.3a und A3.2.3b:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Therapieresistenz- bzw. Rezidivfälle und der Langzeitremissionen mit der Kreatech Poseidon™ *BCL6*-Break Apart-Sonde

Rezidiv-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
1	M	1992	2003	BL	Nicht auswertbar
2	M	1992	2004	High-grade B	Nicht auswertbar
3	W	1982	1998	aBL	Kein <i>BCL6</i> -Split
4	W	1982	1998	High-grade B	Nicht auswertbar
5	M	1992	1998	DLBCL	Core nicht vorhanden
6	M	1992	1998	aBL	Kein <i>BCL6</i> -Split

Rezidiv-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
7	M	1984	1998	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
8	M	1984	2001	PMBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
9	W	1981	1997	DLBCL	Nicht auswertbar
10	W	1981	1997	DLBCL	Nicht auswertbar
11	M	1987	1993	DLBCL	Nicht auswertbar
12	M	1987	1993	DLBCL	Core nicht vorhanden
13	M	1991	1998	aBL	Kein <i>BCL6</i> -Split
14	M	1991	1999	aBL	Kein <i>BCL6</i> -Split
15	W	1990	2001	PMBCL	Nicht auswertbar
16	W	1990	2002	PMBCL	Nicht auswertbar
17	W	1988	2000	PMBCL	Nicht auswertbar
<b>18</b>	<b>M</b>	<b>1990</b>	<b>2003</b>	<b>PMBCL</b>	<b><i>BCL6</i>-Split</b>
19	M	1978	2002	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
20	W	1975	1992	PMBCL	Nicht auswertbar
21	W	1977	1992	BL	Kein <i>BCL6</i> -Split
22	M	1981	1992	BL	Kein <i>BCL6</i> -Split
23	M	1981	1993	BL	Nicht auswertbar
24	W	1984	1995	BL	Nicht auswertbar
25	W	1980	1995	BL	Kein <i>BCL6</i> -Split
26	M	1984	1995	High-grade B	Kein <i>BCL6</i> -Split
27	M	1991	2001	BL	Nicht auswertbar
28	M	1986	2001	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
29	M	1997	2003	aBL	Kein <i>BCL6</i> -Split
30	M	1992	1998	BL	Kein <i>BCL6</i> -Split
31	M	1985	1998	BL	Nicht auswertbar
32	M	1996	2002	BL	Kein <i>BCL6</i> -Split
33	M	1989	2002	BL	Nicht auswertbar
34	W	1983	1998	BL	Nicht auswertbar
35	M	1989	2003	BL	Kein <i>BCL6</i> -Split
36	M	1995	2004	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
37	W	1997	2005	BL	Nicht auswertbar
<b>38</b>	<b>M</b>	<b>1986</b>	<b>2001</b>	<b>DLBCL</b>	<b><i>BCL6</i>-Split</b>

Remissions-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
1	M	1992	1998	aBL	Core nicht vorhanden
2	M	1991	1998	aBL	Kein <i>BCL6</i> -Split
3	M	1993	1997	BL	Kein <i>BCL6</i> -Split
4	W	1996	2001	BL	Kein <i>BCL6</i> -Split
5	W	1988	1998	aBL	Nicht auswertbar
6	M	1986	1998	BL	Nicht auswertbar
7	M	1996	2003	BL	Kein <i>BCL6</i> -Split
8	M	1989	2002	BL	Kein <i>BCL6</i> -Split
9	W	1978	1992	PMBCL	Nicht auswertbar
10	W	1989	2003	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
11	W	1989	1998	PMBCL	Nicht auswertbar
12	W	1993	1998	aBL	Kein <i>BCL6</i> -Split
13	W	1986	2003	DLBCL	Nicht auswertbar
14	M	1986	1999	PMBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
15	M	1989	1992	DLBCL	Nicht auswertbar
16	M	1987	2002	BL	Nicht auswertbar
17	M	1990	1994	BL	Nicht auswertbar

Remissions-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
18	W	1984	2002	DLBCL	Nicht auswertbar
19	M	1987	1994	BL	Core nicht vorhanden
20	M	1989	2002	aBL	Nicht auswertbar
21	W	1988	1995	DLBCL	Kein BCL6-Split
22	M	1983	2002	DLBCL	Nicht auswertbar
23	M	1991	2003	aBL	Kein BCL6-Split
24	M	1987	1998	High-grade B	Kein BCL6-Split
25	M	1990	2002	BL	Kein BCL6-Split
26	M	1983	1997	PMBCL	Core nicht vorhanden
27	M	1997	2001	BL	Kein BCL6-Split
28	M	1996	2004	BL	Kein BCL6-Split
29	M	1990	1997	DLBCL	Kein BCL6-Split
30	M	1984	1999	BL	Nicht auswertbar
31	M	1995	1998	BL	Nicht auswertbar
32	M	1993	2001	aBL	Kein BCL6-Split
33	M	1980	2002	DLBCL	Nicht auswertbar
34	W	1991	1997	BL	Kein BCL6-Split
35	M	1995	2003	BL	Kein BCL6-Split
36	W	1992	2000	BL	Kein BCL6-Split
37	M	1986	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
38	M	1981	1998	aBL	Nicht auswertbar

**Tab. A3.2.3c:** Signalkonstellationen der *BCL6*-Bruch-positiven Fälle unter den Therapieresistenz- bzw. Rezidivfällen bei Verwendung der Kreatech Poseidon™ *BCL6*- Break Apart-Sonde

Rezi-div-Fall Nr.	Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen										Gesamt n
	2RG	1RG	3RG	1RG 1R 1G	1RG 1R	1RG 1G	1R 1G	1R	1G	2RG 1R 1G	
18	21 (27%)	16 (20%)	0	11 (14%)	7 (9%)	7 (9%)	8 (10%)	7 (9%)	2 (3%)	0	79
38	33 (34%)	27 (28%)	0	13 (14%)	3 (3%)	6 (6%)	4 (4%)	4 (4%)	6 (6%)	0	96

**Tab. A3.3.1a:** Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung der Präparate der BFM-Studie mit dem t(8;14)-Assay

BFM-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
1	W	1980	1991	DLBCL	Core nicht vorhanden
2	W	1988	1993	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
3	M	1979	1993	FL	Core nicht vorhanden
4	W	1977	1993	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
5	M	1982	1995	FL	Nicht auswertbar
6	M	1985	1995	DLBCL	Nicht auswertbar
7	M	1978	1995	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
8	W	1981	1996	DLBCL	Nicht auswertbar
9	M	k.A.	1996	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
10	M	1985	1996	DLBCL	Core nicht vorhanden
11	W	1981	1997	DLBCL	Nicht auswertbar
12	W	k.A.	1997	DLBCL	Nicht auswertbar
13	M	1981	1997	DLBCL	Nicht auswertbar
14	M	1986	1998	DLBCL	Nicht auswertbar

<b>BFM-Fall Nr.</b>	<b>Ge- schlecht</b>	<b>Geburts- jahr</b>	<b>Jahr der Diagnose</b>	<b>Histologische Diagnose</b>	<b>Molekularzytogenetisches Ergebnis</b>
15	M	1992	1998	DLBCL	Kein MYC-Split
16	M	1984	2002	FL	Kein MYC-Split
17	M	1985	1993	FL	Nicht auswertbar
18	M	1986	1994	DLBCL	Kein MYC-Split
19	M	1984	1994	DLBCL	Kein MYC-Split
20	M	1988	1995	DLBCL	Kein MYC-Split
21	M	1979	1995	DLBCL	Nicht auswertbar
22	M	1980	1995	DLBCL	Kein MYC-Split
23	M	1988	1995	DLBCL	Kein MYC-Split
24	M	1982	1995	DLBCL	Kein MYC-Split
25	M	1988	1995	DLBCL	Kein MYC-Split
26	M	1987	1995	FL	Nicht auswertbar
27	W	1987	1995	DLBCL	Nicht auswertbar
28	M	1984	1993	DLBCL	Kein MYC-Split
29	M	1982	1991	FL	Kein MYC-Split
30	W	1985	1991	DLBCL	Kein MYC-Split
31	W	1988	1991	DLBCL	Nicht auswertbar
32	W	1975	1992	DLBCL	Nicht auswertbar
33	M	1984	1996	DLBCL	Core nicht vorhanden
34	M	1986	1996	DLBCL	Kein MYC-Split
35	M	1987	1996	DLBCL	Kein MYC-Split
36	M	1990	1996	FL	Kein MYC-Split
37	M	1990	1997	FL	Kein MYC-Split
38	M	1983	1997	DLBCL	MYC-Split mit t(8;14)
39	W	1988	1997	FL	Kein MYC-Split
40	W	1987	1997	DLBCL	Kein MYC-Split
41	M	1988	1997	DLBCL	Kein MYC-Split
42	M	1985	1998	BL	MYC-Split ohne t(8;14)
43	W	1993	1998	DLBCL	Kein MYC-Split
44	W	1987	1998	DLBCL	MYC-Split mit t(8;14)
45	M	1984	1998	DLBCL	Kein MYC-Split
46	M	1987	1999	BL	Core nicht vorhanden
47	M	1984	2000	FL	Kein MYC-Split
48	M	1987	2003	FL	Kein MYC-Split
49	M	1981	1997	BL	MYC-Split mit t(8;14)
50	M	1993	1997	BL	MYC-Split mit t(8;14)
51	M	1989	1997	BL	MYC-Split mit t(8;14)
52	M	1996	2004	DLBCL	Kein MYC-Split
53	W	1985	2004	DLBCL	Core nicht vorhanden
54	W	1988	2004	DLBCL	Nicht auswertbar
55	M	1992	2005	DLBCL	Nicht auswertbar
56	M	1995	2005	DLBCL	Nicht auswertbar
57	M	1990	2004	DLBCL	Nicht auswertbar
58	M	1994	2004	DLBCL	Kein MYC-Split
59	M	1990	2005	FL	Kein MYC-Split
60	W	1989	2003	DLBCL	Kein MYC-Split
61	M	1987	2003	DLBCL	Kein MYC-Split
62	W	1989	1998	DLBCL	Core nicht vorhanden
63	M	1983	2001	DLBCL	Kein MYC-Split
64	M	1986	2001	DLBCL	Kein MYC-Split
65	M	1984	1999	DLBCL	Nicht auswertbar
66	W	1986	2003	DLBCL	Nicht auswertbar
67	M	1984	1999	DLBCL	Kein MYC-Split
68	W	1989	1999	DLBCL	Nicht auswertbar
69	W	1993	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
70	W	1988	2000	DLBCL	Kein MYC-Split
71	M	1993	2001	DLBCL	Kein MYC-Split

<b>BFM-Fall Nr.</b>	<b>Ge- schlecht</b>	<b>Geburts- jahr</b>	<b>Jahr der Diagnose</b>	<b>Histologische Diagnose</b>	<b>Molekularzytogenetisches Ergebnis</b>
<b>72</b>	<b>M</b>	<b>1997</b>	<b>2002</b>	<b>BL</b>	<b><i>MYC-Split ohne t(8;14)</i></b>
73	M	1988	2003	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
74	M	1991	2002	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
75	M	1987	2000	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
76	M	1986	2001	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
77	M	1997	2005	DLBCL	Core nicht vorhanden
78	W	1981	1999	DLBCL	Nicht auswertbar
79	W	1987	2000	FL	Kein <i>MYC</i> -Split
80	W	1988	2004	DLBCL	Core nicht vorhanden
81	W	1994	2000	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
82	M	1984	2001	DLBCL	Nicht auswertbar
83	M	1981	1999	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
84	M	1997	2001	DLBCL	Nicht auswertbar
85	M	1981	1999	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
86	W	1990	1999	DLBCL	Nicht auswertbar
87	M	1993	2001	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
88	M	1991	1999	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
89	M	1985	2001	DLBCL	Nicht auswertbar
90	W	1986	1999	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
91	M	1989	1999	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
92	M	1984	2000	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
93	M	1991	2001	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
94	W	1992	2002	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
95	W	1991	2000	DLBCL	Nicht auswertbar
96	M	1991	2003	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
<b>97</b>	<b>W</b>	<b>1991</b>	<b>2002</b>	<b>DLBCL</b>	<b><i>MYC-Split mit t(8;14)</i></b>
98	M	1995	1999	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
99	W	1993	2001	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
100	W	1985	2001	DLBCL	Nicht auswertbar
101	M	1986	2000	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
102	W	1986	2000	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
103	W	1991	2002	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
104	M	1995	2003	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
105	W	1993	2000	DLBCL	Kein <i>MYC</i> -Split
106	M	1994	2000	DLBCL	Nicht auswertbar

**Tab. A3.3.1b:** Signalkonstellationen der MYC-Bruch-positiven Präparate der BFM-Studie unter der Verwendung des t(8;14)-Assay

BFM-Fall Nr.	Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen										Gesamt n
	2RG	1RG	3RG	1RG 1R 1G	1RG 1R	1RG 1G	1R 1G	1R	1G	2RG 1R 1G	
38	4 (4%)	20 (20%)	0	30 (30%)	12 (12%)	12 (12%)	16 (16%)	4 (4%)	2 (2%)	0	100
42	7 (7%)	12 (11%)	0	33 (31%)	11 (10%)	5 (5%)	19 (18%)	10 (10%)	8 (8%)	0	105
44	26 (26%)	21 (21%)	2 (2%)	16 (16%)	8 (8%)	9 (9%)	4 (4%)	4 (4%)	6 (6%)	3 (3%)	99
49	14 (14%)	11 (11%)	0	29 (29%)	5 (5%)	7 (7%)	13 (13%)	6 (6%)	15 (15%)	0	100
50	6 (6%)	21 (21%)	1 (1%)	24 (24%)	6 (6%)	14 (14%)	14 (14%)	8 (8%)	6 (6%)	0	100
51	10 (10%)	17 (17%)	0	22 (22%)	7 (7%)	8 (8%)	14 (14%)	12 (12%)	10 (10%)	0	100
72	5 (5%)	8 (8%)	0	34 (32%)	10 (10%)	14 (13%)	19 (18%)	7 (7%)	7 (7%)	1 (1%)	105
97	6 (6%)	13 (13%)	0	30 (30%)	12 (12%)	10 (10%)	15 (15%)	5 (5%)	8 (8%)	0	99

**Tab. A3.3.2a:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Präparate der BFM-Studie mit der Abbott / Vysis LSI<sup>®</sup> *BCL2*-Break Apart-Sonde

BFM-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
1	W	1980	1991	DLBCL	Core nicht vorhanden
2	W	1988	1993	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
3	M	1979	1993	FL	Core nicht vorhanden
4	W	1977	1993	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
5	M	1982	1995	FL	Nicht auswertbar
6	M	1985	1995	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
7	M	1978	1995	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
8	W	1981	1996	DLBCL	Nicht auswertbar
9	M	k.A.	1996	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
10	M	1985	1996	DLBCL	Core nicht vorhanden
11	W	1981	1997	DLBCL	Nicht auswertbar
12	W	k.A.	1997	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
13	M	1981	1997	DLBCL	Core nicht vorhanden
14	M	1986	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
15	M	1992	1998	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
16	M	1984	2002	FL	Kein <i>BCL2</i> -Split
17	M	1985	1993	FL	Nicht auswertbar
18	M	1986	1994	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
19	M	1984	1994	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
20	M	1988	1995	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
21	M	1979	1995	DLBCL	Nicht auswertbar
22	M	1980	1995	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
23	M	1988	1995	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
24	M	1982	1995	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
25	M	1988	1995	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
26	M	1987	1995	FL	Kein <i>BCL2</i> -Split
27	W	1987	1995	DLBCL	Nicht auswertbar
28	M	1984	1993	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split



<b>BFM-Fall Nr.</b>	<b>Ge- schlecht</b>	<b>Geburts- jahr</b>	<b>Jahr der Diagnose</b>	<b>Histologische Diagnose</b>	<b>Molekularzytogenetisches Ergebnis</b>
29	M	1982	1991	FL	Kein BCL2-Split
30	W	1985	1991	DLBCL	Kein BCL2-Split
31	W	1988	1991	DLBCL	Kein BCL2-Split
32	W	1975	1992	DLBCL	Nicht auswertbar
33	M	1984	1996	DLBCL	Core nicht vorhanden
34	M	1986	1996	DLBCL	Kein BCL2-Split
35	M	1987	1996	DLBCL	Nicht auswertbar
36	M	1990	1996	FL	Kein BCL2-Split
37	M	1990	1997	FL	Kein BCL2-Split
38	M	1983	1997	DLBCL	Kein BCL2-Split
39	W	1988	1997	FL	Kein BCL2-Split
40	W	1987	1997	DLBCL	Kein BCL2-Split
41	M	1988	1997	DLBCL	Core nicht vorhanden
42	M	1985	1998	BL	Nicht auswertbar
43	W	1993	1998	DLBCL	Kein BCL2-Split
44	W	1987	1998	DLBCL	Kein BCL2-Split
45	M	1984	1998	DLBCL	Kein BCL2-Split
46	M	1987	1999	BL	Nicht auswertbar
47	M	1984	2000	FL	Kein BCL2-Split
48	M	1987	2003	FL	Kein BCL2-Split
49	M	1981	1997	BL	Nicht auswertbar
50	M	1993	1997	BL	Kein BCL2-Split
51	M	1989	1997	BL	Kein BCL2-Split
52	M	1996	2004	DLBCL	Kein BCL2-Split
53	W	1985	2004	DLBCL	Core nicht vorhanden
54	W	1988	2004	DLBCL	Kein BCL2-Split
55	M	1992	2005	DLBCL	Kein BCL2-Split
56	M	1995	2005	DLBCL	Kein BCL2-Split
57	M	1990	2004	DLBCL	Nicht auswertbar
58	M	1994	2004	DLBCL	Kein BCL2-Split
59	M	1990	2005	FL	Kein BCL2-Split
60	W	1989	2003	DLBCL	Kein BCL2-Split
61	M	1987	2003	DLBCL	Kein BCL2-Split
62	W	1989	1998	DLBCL	Kein BCL2-Split
63	M	1983	2001	DLBCL	Kein BCL2-Split
64	M	1986	2001	DLBCL	Kein BCL2-Split
65	M	1984	1999	DLBCL	Kein BCL2-Split
66	W	1986	2003	DLBCL	Nicht auswertbar
67	M	1984	1999	DLBCL	Kein BCL2-Split
68	W	1989	1999	DLBCL	Kein BCL2-Split
69	W	1993	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
70	W	1988	2000	FL	Kein BCL2-Split
71	M	1993	2001	DLBCL	Kein BCL2-Split
72	M	1997	2002	BL	Kein BCL2-Split
73	M	1988	2003	DLBCL	Kein BCL2-Split
74	M	1991	2002	DLBCL	Kein BCL2-Split
75	M	1987	2000	DLBCL	Kein BCL2-Split
76	M	1986	2001	DLBCL	Kein BCL2-Split
77	M	1997	2005	DLBCL	Kein BCL2-Split
78	W	1981	1999	DLBCL	Kein BCL2-Split
79	W	1987	2000	FL	Kein BCL2-Split
80	W	1988	2004	DLBCL	Nicht auswertbar
81	W	1994	2000	DLBCL	Kein BCL2-Split
82	M	1984	2001	DLBCL	Kein BCL2-Split
83	M	1981	1999	DLBCL	Kein BCL2-Split
84	M	1997	2001	DLBCL	Kein BCL2-Split
85	M	1981	1999	DLBCL	Kein BCL2-Split

BFM-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
86	W	1990	1999	DLBCL	Nicht auswertbar
87	M	1993	2001	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
88	M	1991	1999	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
89	M	1985	2001	DLBCL	Nicht auswertbar
90	W	1986	1999	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
91	M	1989	1999	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
92	M	1984	2000	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
93	M	1991	2001	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
94	W	1992	2002	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
95	W	1991	2000	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
96	M	1991	2003	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
97	W	1991	2002	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
98	M	1995	1999	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
99	W	1993	2001	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
100	W	1985	2001	DLBCL	Nicht auswertbar
101	M	1986	2000	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
102	W	1986	2000	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
103	W	1991	2002	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
104	M	1995	2003	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
105	W	1993	2000	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split
106	M	1994	2000	DLBCL	Kein <i>BCL2</i> -Split

**Tab. A3.3.3a:** Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchung der Präparate der BFM-Studie mit der Abbott / Vysis LSI<sup>®</sup> *BCL6*-Break Apart-Sonde

BFM-Fall Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Histologische Diagnose	Molekularzytogenetisches Ergebnis
1	W	1980	1991	DLBCL	Core nicht vorhanden
2	W	1988	1993	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
3	M	1979	1993	FL	Core nicht vorhanden
<b>4</b>	<b>W</b>	<b>1977</b>	<b>1993</b>	<b>DLBCL</b>	<b><i>BCL6</i>-Split</b>
5	M	1982	1995	FL	Kein <i>BCL6</i> -Split
6	M	1985	1995	DLBCL	Nicht auswertbar
<b>7</b>	<b>M</b>	<b>1978</b>	<b>1995</b>	<b>DLBCL</b>	<b><i>BCL6</i>-Split</b>
8	W	1981	1996	DLBCL	Nicht auswertbar
9	M	k.A.	1996	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
10	M	1985	1996	DLBCL	Core nicht vorhanden
<b>11</b>	<b>W</b>	<b>1981</b>	<b>1997</b>	<b>DLBCL</b>	<b><i>BCL6</i>-Split</b>
12	W	k.A.	1997	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
13	M	1981	1997	DLBCL	Core nicht vorhanden
14	M	1986	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
15	M	1992	1998	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
<b>16</b>	<b>M</b>	<b>1984</b>	<b>2002</b>	<b>FL</b>	<b><i>BCL6</i>-Split</b>
17	M	1985	1993	FL	Nicht auswertbar
18	M	1986	1994	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
19	M	1984	1994	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
20	M	1988	1995	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
21	M	1979	1995	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
22	M	1980	1995	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
23	M	1988	1995	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
24	M	1982	1995	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
25	M	1988	1995	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
26	M	1987	1995	FL	Kein <i>BCL6</i> -Split
27	W	1987	1995	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split
28	M	1984	1993	DLBCL	Kein <i>BCL6</i> -Split

<b>BFM-Fall Nr.</b>	<b>Ge- schlecht</b>	<b>Geburts- jahr</b>	<b>Jahr der Diagnose</b>	<b>Histologische Diagnose</b>	<b>Molekularzytogenetisches Ergebnis</b>
29	M	1982	1991	FL	Kein BCL6-Split
30	W	1985	1991	DLBCL	Kein BCL6-Split
31	W	1988	1991	DLBCL	Kein BCL6-Split
32	W	1975	1992	DLBCL	Kein BCL6-Split
33	M	1984	1996	DLBCL	Core nicht vorhanden
34	M	1986	1996	DLBCL	Kein BCL6-Split
35	M	1987	1996	DLBCL	Kein BCL6-Split
36	M	1990	1996	FL	Kein BCL6-Split
37	M	1990	1997	FL	Kein BCL6-Split
38	M	1983	1997	DLBCL	Kein BCL6-Split
39	W	1988	1997	FL	BCL6-Split
40	W	1987	1997	DLBCL	Kein BCL6-Split
41	M	1988	1997	DLBCL	Core nicht vorhanden
42	M	1985	1998	BL	Nicht auswertbar
43	W	1993	1998	DLBCL	Kein BCL6-Split
44	W	1987	1998	DLBCL	Kein BCL6-Split
45	M	1984	1998	DLBCL	Kein BCL6-Split
46	M	1987	1999	BL	Nicht auswertbar
47	M	1984	2000	FL	Kein BCL6-Split
48	M	1987	2003	FL	Kein BCL6-Split
49	M	1981	1997	BL	Kein BCL6-Split
50	M	1993	1997	BL	Kein BCL6-Split
51	M	1989	1997	BL	Kein BCL6-Split
52	M	1996	2004	DLBCL	Kein BCL6-Split
53	W	1985	2004	DLBCL	Core nicht vorhanden
54	W	1988	2004	DLBCL	Kein BCL6-Split
55	M	1992	2005	DLBCL	Kein BCL6-Split
56	M	1995	2005	DLBCL	Kein BCL6-Split
57	M	1990	2004	DLBCL	Nicht auswertbar
58	M	1994	2004	DLBCL	Kein BCL6-Split
59	M	1990	2005	FL	Kein BCL6-Split
60	W	1989	2003	DLBCL	Kein BCL6-Split
61	M	1987	2003	DLBCL	BCL6-Split
62	W	1989	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
63	M	1983	2001	DLBCL	Kein BCL6-Split
64	M	1986	2001	DLBCL	Kein BCL6-Split
65	M	1984	1999	DLBCL	Kein BCL6-Split
66	W	1986	2003	DLBCL	Nicht auswertbar
67	M	1984	1999	DLBCL	Kein BCL6-Split
68	W	1989	1999	DLBCL	Kein BCL6-Split
69	W	1993	1998	DLBCL	Nicht auswertbar
70	W	1988	2000	DLBCL	Kein BCL6-Split
71	M	1993	2001	DLBCL	Kein BCL6-Split
72	M	1997	2002	BL	Kein BCL6-Split
73	M	1988	2003	DLBCL	BCL6-Split
74	M	1991	2002	DLBCL	Kein BCL6-Split
75	M	1987	2000	DLBCL	Kein BCL6-Split
76	M	1986	2001	DLBCL	BCL6-Split
77	M	1997	2005	DLBCL	Core nicht vorhanden
78	W	1981	1999	DLBCL	Kein BCL6-Split
79	W	1987	2000	FL	Kein BCL6-Split
80	W	1988	2004	DLBCL	Core nicht vorhanden
81	W	1994	2000	DLBCL	Kein BCL6-Split
82	M	1984	2001	DLBCL	Kein BCL6-Split
83	M	1981	1999	DLBCL	Kein BCL6-Split
84	M	1997	2001	DLBCL	Kein BCL6-Split
85	M	1981	1999	DLBCL	Kein BCL6-Split

<b>BFM-Fall Nr.</b>	<b>Ge-schlecht</b>	<b>Geburts-jahr</b>	<b>Jahr der Diagnose</b>	<b>Histologische Diagnose</b>	<b>Molekularzytogenetisches Ergebnis</b>
86	W	1990	1999	DLBCL	Nicht auswertbar
87	M	1993	2001	DLBCL	Kein BCL6-Split
88	M	1991	1999	DLBCL	Kein BCL6-Split
89	M	1985	2001	DLBCL	Kein BCL6-Split
90	W	1986	1999	DLBCL	Kein BCL6-Split
91	M	1989	1999	DLBCL	Kein BCL6-Split
92	M	1984	2000	DLBCL	Kein BCL6-Split
93	M	1991	2001	DLBCL	Kein BCL6-Split
94	W	1992	2002	DLBCL	Kein BCL6-Split
95	W	1991	2000	DLBCL	Kein BCL6-Split
96	M	1991	2003	DLBCL	Nicht auswertbar
97	W	1991	2002	DLBCL	Kein BCL6-Split
98	M	1995	1999	DLBCL	Kein BCL6-Split
99	W	1993	2001	DLBCL	Kein BCL6-Split
100	W	1985	2001	DLBCL	Nicht auswertbar
101	M	1986	2000	DLBCL	Kein BCL6-Split
102	W	1986	2000	DLBCL	Kein BCL6-Split
103	W	1991	2002	DLBCL	Kein BCL6-Split
104	M	1995	2003	DLBCL	Kein BCL6-Split
105	W	1993	2000	DLBCL	Kein BCL6-Split
106	M	1994	2000	DLBCL	Kein BCL6-Split

**Tab. A3.3.3b:** Signalkonstellationen der *BCL6*-Bruch-positiven Präparate der BFM-Studie unter der Verwendung der Abbott / Vysis LSI® *BCL6*-Break Apart-Sonde

<b>BFM-Fall Nr.</b>	<b>Anzahl der Zellen mit verschiedenen Signalkonstellationen</b>										<b>Gesamt n</b>
	<b>2RG</b>	<b>1RG</b>	<b>3RG</b>	<b>1RG 1R 1G</b>	<b>1RG 1R</b>	<b>1RG 1G</b>	<b>1R 1G</b>	<b>1R</b>	<b>1G</b>	<b>2RG 1R 1G</b>	
<b>4</b>	26 (26%)	19 (19%)	0	15 (15%)	7 (7%)	8 (8%)	10 (10%)	7 (7%)	8 (8%)	0	100
<b>7</b>	25 (24%)	21 (20%)	3 (3%)	16 (15%)	11 (10%)	13 (12%)	8 (8%)	4 (4%)	5 (5%)	0	106
<b>11</b>	38 (36%)	19 (18%)	0	12 (11%)	9 (9%)	7 (7%)	11 (10%)	6 (6%)	2 (2%)	1 (1%)	105
<b>16</b>	24 (24%)	20 (20%)	0	18 (18%)	2 (2%)	8 (8%)	12 (12%)	5 (5%)	8 (8%)	1 (1%)	98
<b>39</b>	39 (36%)	23 (22%)	18 (17%)	11 (10%)	4 (4%)	3 (3%)	3 (3%)	2 (2%)	2 (2%)	2 (2%)	107
<b>61</b>	41 (41%)	20 (20%)	18 (18%)	9 (9%)	4 (4%)	5 (5%)	2 (2%)	2 (2%)	0	0	101
<b>73</b>	22 (20%)	23 (21%)	5 (5%)	17 (15%)	7 (6%)	10 (9%)	11 (10%)	7 (6%)	8 (7%)	0	110
<b>76</b>	34 (33%)	26 (25%)	0	6 (6%)	8 (8%)	11 (11%)	8 (8%)	5 (5%)	5 (5%)	0	103

**Tab. A3.3.4.1a:** Geschlechtsverteilung aller untersuchten Lymphome bei *MYC*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(Fisher)= = 1.000	Kein Bruch		Bruch		Alle
	N	%	N	%	N
Geschl.					
Männl.	42	71,2	6	75	48
Weibl.	17	28,8	2	25	19

**Tab. A3.3.4.1b:** Geschlechtsverteilung der untersuchten DLBCL bei *MYC*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(Fisher)= 0.238	Kein Bruch		Bruch		Alle
	N	%	N	%	N
Geschl.					
Männl.	35	70,0	1	33,3	36
Weibl.	15	30,0	2	66,7	17

**Tab. A3.3.4.1c:** Geschlechterverteilung aller untersuchten Lymphome bei *BCL6*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(Fisher)= 0.704	Kein Bruch		Bruch		Alle
	N	%	N	%	N
Geschl.					
Männl.	51	68,9	5	62,5	56
Weibl.	23	31,1	3	37,5	26

**Tab. A3.3.4.1d:** Geschlechterverteilung der untersuchten DLBCL bei *BCL6*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(Fisher)= 1.000	Kein Bruch		Bruch		Alle
	N	%	N	%	N
Geschl.					
Männl.	39	63,9	4	66,7	43
Weibl.	22	36,1	2	33,3	24

**Tab. A3.3.4.2a:** Altersverteilung aller untersuchten Lymphome bei *MYC*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p= 0.608	Kein Bruch	Bruch	Alle
Alter (Jahre)			
Mittelwert	10,97	10,06	10,86
Median	9,98	10,83	10,17
Minimum	4,6	4,2	4,2
Maximum	17,9	15,5	17,9
Gesamtzahl	59	8	67
N			

**Tab. A3.3.4.2b:** Altersverteilung der untersuchten DLBCL bei *MYC*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p= 0.603	Kein Bruch	Bruch	Alle
Alter (Jahre)			
Mittelwert	10,89	11,72	10,94
Median	9,91	11,49	10,17
Minimum	4,6	10,2	4,6
Maximum	17,9	13,5	17,9
Gesamtzahl	50	3	53
N			

**Tab. A3.3.4.2c:** Stadienverteilung aller untersuchten Lymphome bei *MYC*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(chi)= 0.001	Kein Bruch		Bruch		Gesamt N
	N	%	N	%	
Stadium					
Stage I	11	18,6	2	25,0	13
Stage II	26	44,1	2	25,0	28
Stage III	21	35,6	1	12,5	22
Stage IV	1	1,7	1	12,5	2
B-ALL	-	-	2	25,0	2

**Tab. A3.3.4.2d:** Stadienverteilung der untersuchten DLBCL bei *MYC*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(chi)= 0.031	Kein Bruch		Bruch		Gesamt N
	N	%	N	%	
Stadium					
Stage I	9	18,0	1	33,3	10
Stage II	21	42,0	1	33,3	22
Stage III	19	38,0	-	-	19
Stage IV	1	2,0	1	33,3	2

**Tab. A3.3.4.2e:** LDH-Werte aller untersuchten Lymphome bei *MYC*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(Fisher)= 0.02	Kein Bruch		Bruch		Gesamt N
	N	%	N	%	
LDH (U/L)					
LDH<500	47	88,7	4	50,0	51
LDH≥500	6	11,3	4	50,0	10

**Tab. A3.3.4.2f:** LDH-Werte der untersuchten DLBCL bei *MYC*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(Fisher)= 0.336	Kein Bruch		Bruch		Gesamt N
	N	%	N	%	
LDH (U/L)					
LDH<500	40	88,9	2	66,7	42
LDH≥500	5	11,1	1	33,3	6

**Tab. A3.3.4.3a:** Altersverteilung aller untersuchten Lymphome bei *BCL6*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p= 0.016	Kein Bruch		Alle
	Bruch	Bruch	
Alter (Jahre)			
Mittelwert	10,73	14,34	11,08
Median	9,91	15,28	10,34
Minimum	3,6	9,3	3,6
Maximum	17,9	17,6	17,9
Gesamtzahl	74	8	82
N			

**Tab. A3.3.4.3b:** Altersverteilung der untersuchten DLBCL bei *BCL6*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p= 0.005	Kein Bruch		Alle
	Bruch	Bruch	
Alter (Jahre)			
Mittelwert	10,79	15,78	11,23
Median	9,98	15,73	10,37
Minimum	3,6	14,3	3,6
Maximum	17,9	17,6	17,9
Gesamtzahl	61	6	67
N			

**Tab. A3.3.4.3c:** Stadienverteilung aller untersuchten Lymphome bei *BCL6*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(chi)= 0.987	Kein Bruch		Bruch		Gesamt N
	N	%	N	%	
Stadium					
Stage I	15	20,3	2	25,0	17
Stage II	31	41,9	3	37,5	34
Stage III	26	35,1	3	37,5	29
Stage IV	1	1,4	-		1
B-ALL	1	1,4	-		1

**Tab. A3.3.4.3d:** Stadienverteilung der untersuchten DLBCL bei *BCL6*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(chi)= 0.876	Kein Bruch		Bruch		Gesamt N
	N	%	N	%	
Stadium					
Stage I	12	19,7	2	33,3	14
Stage II	24	39,3	2	33,3	26
Stage III	24	39,3	2	33,3	26
Stage IV	1	1,6	-		1

**Tab. A3.3.4.3e:** LDH-Werte aller untersuchten Lymphome bei *BCL6*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(Fisher)= 0,601	Kein Bruch		Bruch		Gesamt N
	N	%	N	%	
LDH (U/L)					
LDH<500	55	83,3	5	71,4	60
LDH≥500	11	16,7	2	28,6	13

**Tab. A3.3.4.3f:** LDH-Werte der untersuchten DLBCL bei *BCL6*-Bruch-negativen und -positiven Fällen

p(Fisher)= 1.000	Kein Bruch		Bruch		Gesamt
	N	%	N	%	N
LDH (U/L)					
LDH<500	45	83,3	4	80,0	49
LDH≥500	9	16,7	1	20,0	10

**Tab. A3.3.5a:** Histopathologische Entitäten und Verteilung der Bruchereignisse im *MYC*-Genort

p(chi) <0.001	Kein Bruch		<i>MYC</i> -Bruch		Gesamt
	N	%	N	%	N
Diagnose					
Burkitt	-	-	5	100,0	5
DLBCL	50	94,3	3	5,7	53
FL	9	100,0	-	-	9

**Tab. A3.3.5b:** Histopathologische Entitäten und Verteilung der Bruchereignisse im *BCL6*-Genort

P(chi)= 0.505	Kein Bruch		<i>BCL6</i> -Bruch		Gesamt
	N	%	N	%	N
Diagnose					
Burkitt	4	100,0	-	-	4
DLBCL	61	91,0	6	9	67
FL	9	81,8	2	18,2	11



**Tab. A3.3.6a:** Nicht signifikant mit einem Bruchereignis im *MYC*-Genort bei DLBCL assoziierte immunhistochemische Marker

	<b><i>MYC</i>- Bruchereignis</b>	<b>Kein <i>MYC</i>- Bruchereignis</b>	<b>Gesamt N</b>	<b>p-Wert</b>
CD5 positiv	-	3 (100%)	3	1.000
CD5 negativ	3 (7%)	40 (93%)	43	
CD10 positiv	2 (8%)	24 (92%)	26	1.000
CD10 negativ	-	6 (100%)	6	
CD20 positiv	2 (4%)	45 (96%)	47	1.000
CD20 negativ	-	1 (100%)	1	
BCL2 positiv	-	27 (100%)	27	0.904
BCL2 negativ	3 (13%)	20 (87%)	23	
BCL2int positiv	-	8 (100%)	8	1.000
BCL2int negativ	3 (7%)	39 (93%)	42	
BCL6 positiv	2 (5%)	38 (95%)	40	1.000
BCL6 negativ	-	5 (100%)	5	
Mum-1 positiv	-	33 (100%)	33	0.093
Mum-1 negativ	2 (13%)	13 (87%)	15	
HLA-DR positiv	2 (5%)	38 (95%)	40	1.000
HLA-DR negativ	-	6 (100%)	6	
H-GAL positiv	2 (5%)	38 (95%)	40	1.000
H-GAL negativ	-	6 (100%)	6	

**Tab. A3.3.6b:** Nicht signifikant mit einem Bruchereignis im *BCL6*-Genort bei DLBCL assoziierte immunhistochemische Marker

	<b><i>BCL6</i>- Bruchereignis</b>	<b>Kein <i>BCL6</i>- Bruchereignis</b>	<b>Gesamt N</b>	<b>p-Wert</b>
CD20 positiv	4 (7%)	55 (93%)	59	1.000
CD20 negativ	-	1 (100%)	1	
BCL2 positiv	4 (12%)	29 (88%)	33	0.357
BCL2 negativ	1 (3%)	29 (97%)	30	
BCL2int positiv	1 (10%)	9 (90%)	10	1.000
BCL2int negativ	4 (8%)	49 (92%)	53	
BCL6 positiv	6 (12%)	44 (88%)	50	1.000
BCL6 negativ	-	7 (100%)	7	
HLA-DR positiv	5 (9%)	48 (91%)	53	0.541
HLA-DR negativ	1 (14%)	6 (86%)	7	
H-GAL positiv	2 (9%)	20 (91%)	22	0.130
H-GAL negativ	1 (100%)	-	1	

**Tab. A3.3.6:** Immunhistochemische Marker mit statistischen Tendenzen bzw. signifikanten Verteilungsunterschieden bei Fällen mit und ohne *BCL6*-Bruchereignis

	Kein <i>BCL6</i> -Bruch		<i>BCL6</i> -Bruch		Gesamt	p-Wert (Fisher)
	N	%	N	%	N	
MUM-1						
negativ	21	100,0	-	-	21	0.082
positiv	33	84,6	6	15,4	39	
CD5						
negativ	48	94,1	3	5,9	51	0.003
positiv	1	25,0	3	75,0	4	
CD10						
negativ	5	55,6	4	44,4	9	0,005
positiv	32	97,0	1	3,0	33	

**Tab. A3.3.7:** Wahrscheinlichkeiten für Nichtansprechen/Rezidiv und andere Ereignisse bei Protokollpatienten und DLBCL-Patienten mit und ohne *BCL6*-Bruch im zehn-Jahres-Zeitraum

	Anzahl N	Zwischenfalls- freies Überleben	Anderes Ereignis	Nichtanspre- chen/ Rezidiv	p-Wert (Gray)
Alle Patienten					
Kein Bruch	74	0.88385	0.035	0.081	AE p=0.541
Bruch	8	0.75000	0.000	0.250	NA/R p=0.130
Protokollpatienten					
Kein Bruch	66	0.92424	0.015	0.061	AE p=0.566
Bruch	8	0.75000	0.000	0.250	NA/R p=0.067
DLBCL					
Kein Bruch	61	0.87432	0.044	0.082	AE p=0.754
Bruch	6	0.66667	0.000	0.333	NA/R p=0.057

## 8. DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Reiner Siebert für die mir gebotene Gelegenheit, am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Kiel) zu promovieren, danken. Seine Unterstützung und konstruktive Kritik haben zu dem Gelingen dieser Arbeit ebenso beigetragen wie die allseitige Hilfsbereitschaft und das herzliche Arbeitsklima innerhalb seiner Arbeitsgruppe.

Frau Claudia Becher, Frau Dorit Schuster und Frau Magret Ratjen danke ich sehr herzlich für ihre Hilfe bei der Einführung in die Labormethoden und die nette Arbeitsatmosphäre im Labor.

Herrn PD Dr. med. Wolfram Klapper aus dem Institut für Pathologie der Universität Schleswig-Holstein, Campus Kiel, möchte ich ganz herzlich für die Bereitstellung der Präparate danken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Iñaki Martín-Subero und ganz besonders Herrn Dr. med. Stefan Gesk, die sich nicht nur als zweite Untersucher zur Kontrolle der Ergebnisse zur Verfügung stellten, sondern mir auch jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und eine exzellente Betreuung gewährleisteten.

Herrn C.P. Blohm danke ich für seine jederzeit freundliche und kompetente technische Unterstützung.

## 9. LEBENSLAUF UND VERÖFFENTLICHUNGEN

### 9.1 Lebenslauf

#### **Persönliche Daten:**

Name: Friederike Mahn  
 Geburtsdatum, -ort: 31.08.1982, Lübeck  
 Familienstand: ledig  
 Nationalität: deutsch  
 Eltern: Ernst-Martin Mahn  
 Heidi Mahn, geb. Krümmel

#### **Schulbildung:**

1989 – 1993 Grundsulzeit in der Stadtschule Travemünde  
 1993 – 2002 Besuch des Trave-Gymnasiums zu Lübeck  
 06. 2002 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am Trave-Gymnasium zu Lübeck

#### **Studium der Humanmedizin:**

WS 2002 – SS 2004 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
 08. 2004 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung  
 WS 2004 – SS 2008 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
 05. 2009 Erfolgreicher Abschluss des Studiums der Humanmedizin mit Bestehen des zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

#### **Famulaturen:**

03. 2005 Abteilung für Innere Medizin des Krankenhauses St. Elisabeth, Oberschwabenklinik Ravensburg (Direktion: Prof. Dr. med. Günther J. Wiedemann)  
 08. 2005 Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktion: Prof. Dr. med. Reiner Siebert)

03. 2006 Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktion: Prof. Dr. med. Günther Deuschl)
08. 2006 Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie des Städtischen Krankenhauses Kiel (Direktion: Prof. Dr. med. Ilka Vogel)
09. 2006 Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktion: Prof. Dr. med. Walter Jonat)

**Praktisches Jahr****(08. 2007 - 07. 2008):**

- |                            |  |
|----------------------------|--|
| 1. Tertial: Chirurgie      | Kantonsspital Winterthur, Schweiz                    |
| 2. Tertial: Neurologie     | Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel |
| 3. Tertial: Innere Medizin | Klinikum Itzehoe                                     |

## 9.2 Veröffentlichungen

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

### Originalartikel

Oschlies, I., Salaverria, I., **Mahn, F.**, Meinhardt, A., Zimmermann, M., Woessmann, W., Burkhardt, B., Gesk, S., Krams, M., Reiter, A., Siebert, R., Klapper, W. (2009): Pediatric follicular lymphoma - a clinico-pathological study of a population-based series of patients treated within the NHL-BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) multicenter trials. *Haematologica*, Aug 13. [Epub ahead of print]