

Aus dem Institut für Humangenetik

(Direktor: Prof. Dr. med. R. Siebert)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**TRANSLOKATIONSPARTNER DES  
IMMUNGLOBULINSCHWERKETTENGENS IN REIFEN  
AGGRESSIVEN B-ZELL-LYMPHOMEN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**SASKIA JANINA SCHWARZ**

aus Goslar

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Siebert, Institut für Humangenetik

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Claviez, Klinik für Allgemeine Pädiatrie

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b> _____	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>Abkürzungen</b> _____	<b>IV</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> _____	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Lymphome</b>	<b>1</b>
1.1.1	Aggressive B-Zell-Lymphome	1
<b>1.2</b>	<b>Genetische Aberrationen in der Lymphomentstehung</b>	<b>3</b>
1.2.1	Chromosomale Translokationen	3
1.2.2	Bedeutung des Immunglobulinschwerketten ( <i>IGH</i> )-Genorts für die Lymphomentstehung	4
1.2.2.1	Immunglobuline als Teil des menschlichen Immunsystems	4
1.2.2.2	<i>IGH</i> -Translokationen in B-Zell-Lymphomen	6
1.2.3	Nachweis chromosomaler Translokationen mittels Fluoreszenz- in-situ-Hybridisierung (FISH)	8
<b>1.3</b>	<b>Das Netzwerk „Molekulare Mechanismen bei malignen     Lymphomen“</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> _____	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>12</b>
2.1.1	Patientenkollektiv und Tumormaterial	12
2.1.2	Chemikalien, Enzyme, Reagenzien	13
2.1.3	Lösungen und Puffer	13
2.1.4	Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	14
2.1.5	Sonstige Ge- und Verbrauchsmaterialien	15
2.1.6	Geräte und Software	16

<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>17</b>
2.2.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	17
2.2.1.1	Aufbereitung und Lagerung der Gewebeproben	17
2.2.1.2	Kontrollen	17
2.2.1.3	Verdau des Probenmaterials	18
2.2.1.4	Denaturierung und Hybridisierung mit dem Sondenmix	18
2.2.1.5	Waschschritte, Färbung, Eindecken	19
2.2.2	Auswertung am Fluoreszenzmikroskop	20
2.2.2.1	Mikroskopeinstellungen	20
2.2.2.2	Auswertekriterien und Dokumentation	20
2.2.2.3	Mögliche Signalkonstellationen bei der FISH-Analyse des <i>IGH</i> -Genorts	21
2.2.2.3.1	Break-apart-Sonden	21
2.2.2.3.2	Dual-fusion-Sonden	23
2.2.2.4	Ergebnisinterpretation und -analyse	25
2.2.3	Bioinformatische Analyse	25
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Beschreibung der untersuchten Kohorte</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Bruch des Immunglobulinschwerketten-Genorts</b>	<b>28</b>
3.2.1	Vorkommen im Hauptkollektiv	28
3.2.2	Vorkommen im Nebenkollektiv	30
<b>3.3</b>	<b>Bioinformatische Analyse zur Detektion von <i>IGH</i>-Partner</b>	<b>30</b>
3.3.1	Analyse mit einem p-Wert $\leq 0,01$ und $\leq 0,05$	30
<b>3.4</b>	<b>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit ergänzenden Sonden zur Detektion von <i>IGH</i>-Translokationspartnern</b>	<b>32</b>
3.4.1	Fälle aus der Gruppe mit einem p-Wert $\leq 0,01$	33
3.4.2	Fälle aus der Gruppe mit einem p-Wert $\leq 0,05$	33

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>35</b>
4.1	<b>Methodische Aspekte</b>	35
4.1.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Kryoschnitten	35
4.1.1.1	Anwendungen zur Detektion von Bruchpunkten	36
4.1.1.2	Anwendungen zur Identifizierung von Translokationspartnern	37
4.2	<b>Patientenkollektiv</b>	37
4.3	<b>Immunglobulinschwerketten-Genort</b>	38
4.3.1	Bruchpunkte in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen	38
4.3.2	Translokationspartner in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen und deren Bedeutung	38
4.3.3	Mögliche diagnostische und prognostische Bedeutung von Translokationen in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen	39
4.4	<b>Fazit und Ausblick</b>	39
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>57</b>

## Abkürzungen

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ABC</b>	activated B-cell-like/der aktivierten B-Zelle ähnelnd
<b>abs.</b>	absolut
<b>Array-CGH</b>	microarray-based comparative genomic hybridization/Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung
<b>BAP-Sonde</b>	Break-apart-Sonde/Bruchpunkt-Sonde
<b>BFM-Studie</b>	Berlin-Frankfurt-Münster-Studie
<b>BL</b>	Burkitt-Lymphom
<b>Bsp.</b>	Beispiel
<b>C</b>	constant/konstant
<b>CHOP</b>	Therapieschema mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon
<b>CLL</b>	Chronisch lymphatische Leukämie
<b>D</b>	diversity/Vielfältigkeit
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>dest.</b>	destilliert
<b>DLBCL</b>	diffuse large B-cell lymphoma/Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure
<b>EBV</b>	Epstein-Barr-Virus
<b>Fab</b>	Antigen-bindender Abschnitt eines Antikörpers
<b>Fc</b>	konstanter Abschnitt eines Antikörpers
<b>FISH</b>	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
<b>FL</b>	Follikuläres Lymphom
<b>GCB</b>	germinal center B-cell-like/der sich im Keimzentrum befindlichen B-Zelle ähnelnd
<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>H</b>	heavy/schwer
<b>IG</b>	Immunglobulin
<b>IGH</b>	Immunoglobulin Heavy Chain/Immunglobulinschwerkette
<b>IL</b>	Illinois
<b>J</b>	joining/Verbindungsstelle
<b>L</b>	light/leicht

## Abkürzungen

---

<b>LSI</b>	Locus spezifische Identifikationssonde
<b>M</b>	molar
<b>MALT</b>	Mucosa-associated-tissue/Schleimhaut-assoziiertes Gewebe
<b>mBL</b>	molekulares Burkitt-Lymphom
<b>Min.</b>	Minute
<b>mind.</b>	mindestens
<b>MMML</b>	Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen (Forschungsprojekt der Deutschen Krebshilfe)
<b>MPI</b>	Max-Planck-Institut
<b>NFKB</b>	Nuclear Factor Kappa B/Kernfaktor Kappa B
<b>NK</b>	Natürliche Killerzelle
<b>NOS</b>	Not otherwise specified/nicht näher bezeichnet
<b>o.n.A.</b>	ohne nähere Angaben
<b>PAP</b>	Pathway activation pattern/Muster für die Aktivierung eines Signalwegs
<b>PCR</b>	Polymerase-Chain-Reaction/Polymerasekettenreaktion
<b>PM</b>	primary mediastinal/primär mediastinal
<b>PMBCL</b>	primary mediastinal B-cell lymphoma/Primär mediastinales B-Zell- Lymphom
<b>PTLD</b>	post-transplant lymphoproliferative disorder/Posttransplantations- lymphoproliferative Erkrankungen
<b>R-CHOP</b>	Therapieschema mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon und Rituximab
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SG</b>	Spectrum green/Spektrum Grün
<b>S.-H.</b>	Schleswig-Holstein
<b>SO</b>	Spectrum orange/Spektrum Orange
<b>sog.</b>	sogenannte/r/s
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>UKSH</b>	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
<b>USA</b>	United States of America/Vereinigte Staaten von Amerika
<b>V</b>	variable/variabel
<b>WHO</b>	World Health Organization/Weltgesundheitsorganisation
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Lymphome

Lymphome sind maligne Neoplasien des lymphatischen Systems, die ihren Ursprung von den Zellen der lymphatischen Organe nehmen und in scheinbar allen Stadien der Lymphopoese entstehen können. Durch unterschiedliche morphologische und genetische Varianten erweisen sich Lymphome als eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen [Stein *et al.*, 2008]. In der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2008 werden Lymphome unter Berücksichtigung der Morphologie, des Immunphänotyps und ihrer genetischen Eigenschaften in folgende Untergruppen eingeteilt: Precursor B- bzw. T-Zell-Lymphome/Leukämien, Reifzellige B-Zell-Lymphome, Reife/Periphere T-Zell-Lymphome und neoplastische NK-Zell-Erkrankungen, Hodgkin-Lymphome, Histiozytische und dendritische Neoplasien sowie Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankungen (PTLD) [Campo *et al.*, 2011; Swerdlow *et al.*, 2008]. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen. Der Anteil dieser an der Gesamtheit aller Krebsneuerkrankungen des Jahres 2006 in Deutschland lag für die weibliche Bevölkerung bei 3,2%, für die männliche Bevölkerung bei 2,8% [Husmann *et al.*, 2010; *www.rki.de*]. Obwohl das mediane Erkrankungsalter der Lymphome jenseits der 6. Lebensdekade liegt, erkranken auch Kinder an diesen Tumoren. Dabei handelt es sich größtenteils um sehr aggressive Lymphomsubtypen [Bertz *et al.*, 2010; Husmann *et al.*, 2010; Morton *et al.*, 2005].

### 1.1.1 Aggressive B-Zell-Lymphome

In dieser Arbeit stehen vor allem drei Formen aggressiver reifzelliger B-Zell-Lymphome im Vordergrund: Das *Diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL)*, das *Follikuläre Lymphom Grad IIIa/b (FL)* und das *Primär mediastinale B-Zell-Lymphom (PMBCL)*.

Mit einem Anteil von 30-40% an der Gesamtheit aller Lymphome stellt das DLBCL die häufigste Lymphomentität im Erwachsenenalter dar. Es ist eine sowohl biologisch als auch klinisch sehr heterogene Gruppe der reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen [Alizadeh *et al.*, 2000; Hummel *et al.*, 2006; *The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project*, 1997]. Morphologisch unterscheidet man den centroblastischen, den immunoblastischen und den anaplastischen Typ. Eine weitere Klassifikation orientiert sich an der Genexpression, die je nach Entwicklungsstadium der (ehemals nicht-pathologischen) Ursprungszelle des Lymphoms variiert. Auf dieser Grundlage ergeben sich die folgenden drei Subtypen: Das *germinal center B-cell-like (GCB) DLBCL*, das *activated B-cell-like (ABC) DLBCL* und das *primary mediastinal (PM) B-Zell-Lymphom*. Diese unterscheiden sich unter anderem

hinsichtlich ihrer Lokalisation, Altersverteilung und Prognose [Alizadeh et al., 2000; Klapper et al., 2008; Oschlies et al., 2006; Rosenwald et al., 2002]. Die Einschätzung der Prognose und die individuelle Therapieauswahl orientieren sich am sog. IPI-Score, dem „Internationalen prognostischen Index“. Dieser berücksichtigt das Patientenalter, das Tumorstadium, den Extranodalstatus, den Wert der Laktatdehydrogenase im Serum und den Allgemeinzustand des Patienten und bildet auf diese Weise vier unterschiedliche Risikogruppen [The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993; Ziepert et al., 2010]. Aktuelle Therapieansätze bestehen aus einer Chemotherapie nach dem sog. CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon) und dem Einsatz des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab (R-CHOP-Schema) bei CD20-positiven Lymphomen [Coiffier et al., 2005; Habermann et al., 2006; Persky et al., 2008]. Trotz deutlich verbesserter 5-Jahres-Überlebensrate durch Anwendung des R-CHOP-Schemas, kommt es jedoch noch immer bei etwa 25% der Patienten zu einem Therapieversagen [Coiffier et al., 2010; Feugier et al., 2005].

Das Follikuläre Lymphom (FL) ist charakterisiert durch eine Proliferation von sich normalerweise im Follikelzentrum befindlichen und dort reifenden B-Zellen [Küppers et al., 1999]. Je nach Anteil der Zentroblasten und Zentrozyten werden bei dieser Entität die Grade I-IIIa/b unterschieden, wobei ein höherer Anteil an Zentroblasten mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet sein soll [Campo et al., 2011; Harris et al., 1994]. Eine typische genetische Veränderung, die etwa 80% aller Follikulären Lymphome aufweisen, ist die Translokation t(14;18). Diese führt zu einer vermehrten Expression des Antiapoptosefaktors BCL2 und verhilft den Zellen auf diese Weise zu ungehindertem Wachstum [Cleary et al., 1986; Huang et al., 2002; Willis et al., 2000; Yunis et al., 1982]. Der klinische Verlauf eines Follikulären Lymphoms kann individuell variieren und die Prognose reicht von einer normalen Lebenserwartung bis zu einer raschen Progression mit schlechtem Outcome [Schwaenen et al., 2009]. Als zuverlässigster Prognosefaktor wird der sog. FLIPI, der „Internationale prognostische Index für Follikuläre Lymphome“, herangezogen. Bei diesem werden, ähnlich dem IPI-Score, Basisparameter des Patienten bewertet und drei Risikogruppen gebildet [Solal-Céligny et al., 2004]. Je nach individuellem Risikoprofil werden unterschiedliche Therapieprinzipien angewandt. Hierzu zählen unter anderem das bereits erwähnte R-CHOP-Schema, das Alkylanz Bendamustin, aber auch das sog. „Watch-and-Wait“-Prinzip [Ghielmini, 2010; Rummel, 2010].

Das Primär mediastinale B-Zell-Lymphom (PMBCL) stellt eine weitere eigenständige Tumorentität unter den reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen dar [Harris et al., 1994]. Die

lokal invasive Ausbreitung im vorderen Mediastinum kann zu einer Kompression intrathorakaler Strukturen führen, sodass die Mehrzahl der Patienten klinisch mit Brustschmerz, Dyspnoe, einem oberen Vena-cava-Syndrom oder Pleuraergüssen auffällt [Levitt *et al.*, 1982; Lichtenstein *et al.*, 1980]. Im Gegensatz zu den meisten anderen reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen hat das Primär mediastinale B-Zell-Lymphom seinen Altersgipfel bei Erstdiagnose bereits in der dritten Lebensdekade. Dabei sind vermehrt junge Frauen betroffen [Harris *et al.*, 1994; Jacobson *et al.*, 1988]. Die heute erfolgversprechendste Therapie für Patienten mit einem PMBCL stellt auch hier die Chemotherapie nach dem R-CHOP-Schema dar [Schneider *et al.*, 2011]. Teilweise wird diese mit einer anschließenden konsolidierenden Strahlentherapie des Mediastinums kombiniert [Jacobson *et al.*, 1988; Levitt *et al.*, 1982]. Eine große Tumormasse zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gilt als negativer prognostischer Faktor [Jacobson *et al.*, 1988].

Sämtliche hier genannten Therapieansätze beziehen sich auf die Behandlung reifer aggressiver B-Zell-Lymphome im Erwachsenenalter. Erkrankte Kinder werden deutschlandweit nach einheitlichen Therapieprotokollen der Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Studie behandelt. Dabei kommen unter anderem Methotrexat, Dexamethason, Oxazaphorin, Etoposid und Doxorubicin zur Anwendung. Weitere kindliche Therapieansätze sehen die intrathekale Medikamentenapplikation oder eine Stammzelltransplantation vor [Reiter *et al.*, 1999].

### **1.2 Genetische Aberrationen in der Lymphomentstehung**

Die Mehrzahl der heute bekannten B-Zell-Malignome weist wiederkehrende und zum Teil krankheitsspezifische chromosomale Aberrationen auf, die eine Rolle in der Tumorentwicklung spielen. Diese können sowohl einzelne Chromosomenregionen als auch ganze Chromosomen betreffen [Küppers *et al.*, 1999; Willis *et al.*, 2000]. Zu den sogenannten strukturellen Chromosomenstörungen gehören neben Deletionen (Verlust eines durch Bruchpunkte aus dem Chromosom herausgetrennten Segments) und Duplikationen (Verdopplung eines normalerweise einfach vorliegenden Chromosomensegments) auch die hier im Vordergrund stehenden chromosomalen Translokationen [Moore *et al.*, 1963; Willis *et al.*, 2000].

#### **1.2.1 Chromosomale Translokationen**

Das Erbgut menschlicher Zellen besteht, mit Ausnahme der Keimzellen, aus 46 Chromosomen [Tjio *et al.*, 1956] bzw. 22 Autosomenpaaren plus zwei

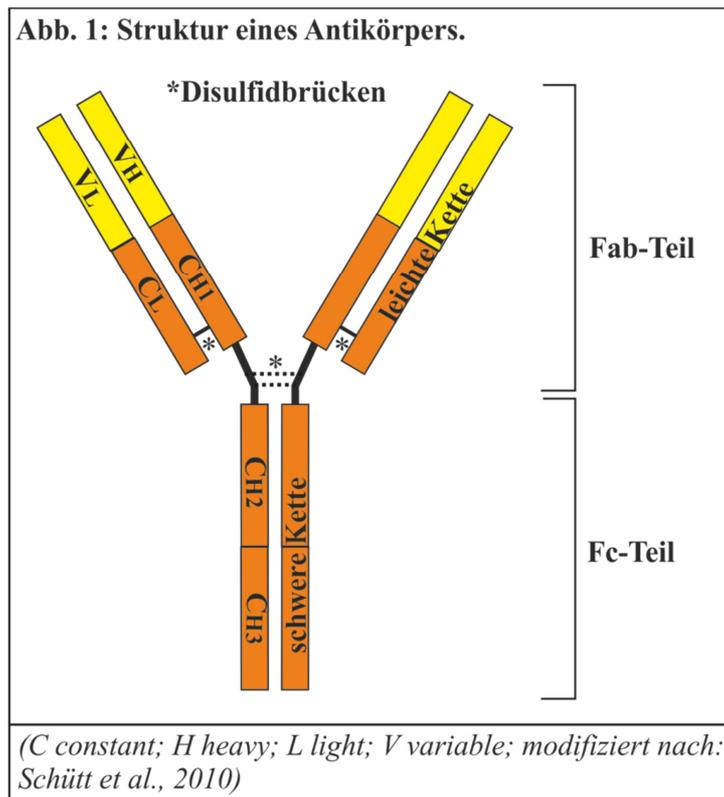
Geschlechtschromosomen. Bei einer Translokation werden DNA-Fragmente zwischen den Chromosomen eines Chromosomensatzes ausgetauscht [Willis *et al.*, 2000]. Findet dieser Austausch zwischen zwei nicht homologen Chromosomen statt, so spricht man von einer reziproken Translokation. Als balanciert wird eine Translokation bezeichnet, wenn durch diese weder ein Zugewinn noch ein Verlust genetischen Materials entsteht [Schaaf *et al.*, 2008]. In Tumoren gehen einige Gene Translokationen mit diversen Translokationspartnern ein. Ein Beispiel hierfür ist das Immunglobulinschwerkettengen auf Chromosom 14 [Willis *et al.*, 2000].

### **1.2.2 Bedeutung des Immunglobulinschwerketten (*IGH*)-Genorts für die Lymphomentstehung**

#### **1.2.2.1 Immunglobuline als Teil des menschlichen Immunsystems**

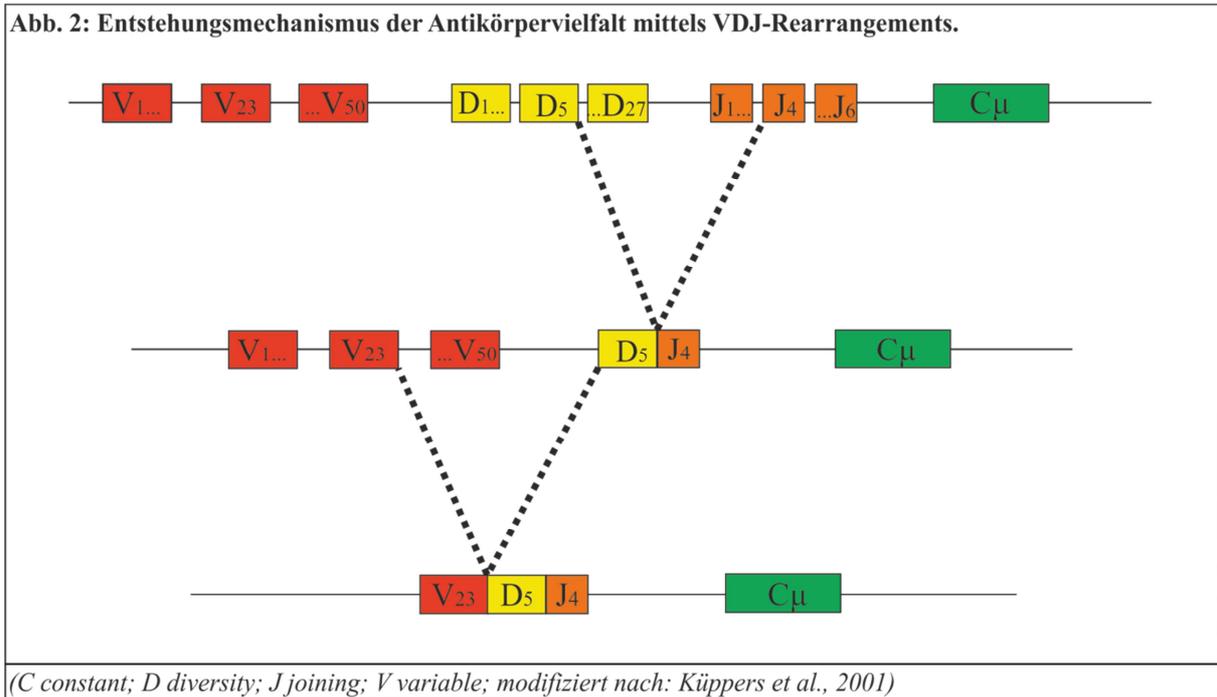
Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind ein bedeutender Bestandteil des menschlichen adaptiven Immunsystems und werden von B-Lymphozyten, insbesondere Plasmazellen, produziert und sezerniert [Edelman *et al.*, 1969; Schütt *et al.*, 2010]. Durch die spezifische Bindung eines Antikörpers an sein Antigen wird eine Immunreaktion gegen dieses eingeleitet [Maizels *et al.*, 1982]. Als Antigene können Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Nukleinsäuren oder auch Kunststoffe wirken. Die Antikörper binden jedoch immer nur an einen kleinen Bereich des entsprechenden Antigens, an das Epitop bzw. die antigene Determinante [Schütt *et al.*, 2010]. Dabei spielt auch der besondere Aufbau der Immunglobuline eine Rolle. Den Grundbaustein bildet eine Y-förmige Struktur, die aus zwei sog. schweren Ketten (H) besteht, an die wiederum über Disulfidbrücken jeweils eine sog. leichte Kette (L) gekoppelt ist (siehe *Abb. 1*) [Edelman *et al.*, 1969]. Jede dieser leichten und schweren Ketten besteht neben einer variablen Region (V) zusätzlich aus einer bzw. drei (schwere Kette) konstanten Regionen (C) [Edelman *et al.*, 1969]. Die Arme der Y-Struktur bilden den sogenannten Fab-Teil, bestehend aus den leichten Ketten, dem variablen und einem konstanten Teil der beiden Schwereketten. Über diesen können die Antikörper spezifisch ihre Antigene binden. Der Stamm des Antikörpers, auch Fc-Teil genannt, der nur aus konstanten Regionen der Schwereketten besteht, hat eine Effektorfunktion und löst nach Bindung des Antigens an den Fab-Teil über verschiedene Mechanismen die Immunreaktion aus [Edelman *et al.*, 1969]. Je nach Fc-Teil werden beim Menschen fünf Antikörperisotypen unterschieden: IgM, IgG, IgA, IgE und IgD. Diese unterscheiden sich in ihrer Struktur, ihrem Vorkommen im Gesamtorganismus des Menschen und in der Immunreaktion, die sie

auslösen. Bei den Leichtketten wird zwischen einem  $\kappa$ - und einem  $\lambda$ -Typ unterschieden [Maizels et al., 1999; Schütt et al., 2010].



In dieser Arbeit soll der Fokus auf dem Genort für die Immunglobulinschwerkette, kurz *IGH*-Locus, liegen. Dieser befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 14 in der Bande q32 [McBride et al., 1982]. Der variable Teil der Immunglobulinschwerkette besteht aus einem V (variable)-, einem D (diversity)- und einem J (joining)-Element, die mit der C (constant)-Region der Schwerkette verbunden sind [Maizels et al., 1999]. Betrachtet man den *IGH*-Locus in der Keimbahnkonfiguration, so stellt sich eine Art Baukastenprinzip dar (siehe Abb. 2). Neben etwa 50  $V_H$ -Elementen liegen 27  $D_H$ -Elemente, auf die wiederum 6  $J_H$ -Elemente und 9 C-Elemente folgen [Küppers et al., 2001]. Aus diesem Repertoire wird während des sog. VDJ-Rearrangements die variable Region der späteren Schwerkette gebildet. Dies geschieht, indem zufällig jeweils eines der Elemente ausgewählt und mit den anderen zu einem VDJ-Segment gekoppelt wird, während die restlichen Elemente als Exzisionszirkel herausgeschnitten werden [Gellert et al., 1992; Küppers et al., 2001]. Dieses VDJ-Segment wird dann nach der Transkription mit einem der C-Elemente kombiniert [Küppers et al., 2001].

Abb. 2: Entstehungsmechanismus der Antikörpervielfalt mittels VDJ-Rearrangements.



Nach erstmaliger Bindung des spezifischen Antigens und Stimulation der B-Zelle durch eine T-Helferzelle wird mittels kleiner Punktmutationen im antigenbindenden Teil die Affinität des Antikörpers zum Antigen verändert. Nur die B-Zellen, deren Antikörper durch diese sog. somatische Hypermutation eine erhöhte Antigenaffinität erhalten haben, werden im Keimzentrum der sekundären lymphatischen Organe positiv selektioniert. Sie überleben und produzieren den entsprechenden Antikörper [Küppers et al., 2001; Maizels et al., 1999]. Die somatische Hypermutation und das beschriebene VDJ-Rearrangement stellen nur zwei Ursachen für die Antikörpervielfalt im menschlichen Körper dar. Ein weiterer Mechanismus ist die sog. „class switch recombination“. Dabei kommt es, durch Entfernung von Segmenten aus dem Fc-Teil der Schwereketten, zu einem Wechsel des Antikörperisotyps [Küppers et al., 2001; Maizels et al., 1999]. Eine Gemeinsamkeit der drei genannten Mechanismen ist die Initiierung von Doppelstrangbrüchen im Immunglobulinschwerkettengenort [Küppers et al., 1999].

### 1.2.2.2 IGH-Translokationen in B-Zell-Lymphomen

Reziproke, balancierte chromosomale Translokationen mit Beteiligung des beschriebenen Immunglobulinschwerkettengenorts sind ein Charakteristikum vieler reifer B-Zell-Lymphome [Küppers et al., 2001; Lenz et al., 2007]. Teilweise sind IGH-Translokationen mit einem bestimmten Partner typisch für spezifische Lymphom-Subtypen (siehe Tab. 1) [Küppers et al., 2001].

<b>Tab. 1: Typische Translokationen in B-Zell-Lymphomen.</b>		
<b>Lymphom-Entität</b>	<b>Chromosomale Aberrationen</b>	<b>Involvierte Gene</b>
Burkitt-Lymphom	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC/IGH</i> <i>IGK/MYC</i> <i>MYC/IGL</i>
Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom	t(3q27) t(14q32) t(14;18)(q32;q21) t(8;14)(q24;q32) und Varianten	<i>BCL6</i> <i>IGH</i> <i>IGH/BCL2</i> <i>MYC/IGH (IGL/IGK)</i>
Follikuläres Lymphom	t(14;18)(q32;q21) und Varianten t(3;14)(q27;q32)	<i>IGH/BCL2 (IGL/IGK)</i> <i>BCL6/IGH</i>
MALT Lymphom	t(11;18)(q21;q21) t(14;18)(q32;q21) t(1;14)(p22;q32)	<i>API2/MALT1</i> <i>IGH/MALT1</i> <i>BCL10/IGH</i>
Mantelzell-Lymphom	t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1/IGH</i>
<i>(Modifiziert nach: Chaganti et al, 2000; Ventura et al., 2006; MALT mucosa associated lymphatic tissue; in dieser Tabelle wurden nur B-Zell-Lymphome berücksichtigt, bei denen die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Gewebeschnitten regelmäßig durchgeführt wird (der Methodik dieser Arbeit entsprechend))</i>		

Während einige Translokationen (fast) nur in einer einzigen Tumorentität vorkommen und somit als diagnostischer Marker eingesetzt werden können, gibt es wiederum andere Translokationen, die gleichzeitig in mehreren Lymphomen zu finden sind [Willis et al., 2000]. Beispielsweise ist die Translokation t(14;18)(q32;q21) mit *BCL2* als Translokationspartner des *IGH*-Gens in etwa 80% aller adulten Follikulären Lymphome nachweisbar, jedoch findet man diese Translokation auch in etwa 20% der hier ebenfalls untersuchten DLBCLs. Die Translokation t(8;14)(q24;q32) (*MYC* als Translokationspartner des *IGH*-Gens) wiederum tritt nicht nur in etwa 10% aller DLBCLs oder einer ihrer Varianten auf, sondern stellt quasi ein Beispiel für Lymphom-typische Translokationen dar: Sie lässt sich in allen Burkitt-Lymphomen nachweisen [Dalla-Favera et al., 1982; Willis et al., 2000]. Während diese Translokationen bei einigen Lymphomentitäten einen scheinbar großen Anteil an der Lymphominitiation haben, treten sie in anderen Lymphomen erst im Verlauf der Erkrankung auf und führen, beispielsweise durch zusätzliche Aktivierung eines Apoptoseinhibitors, zur Progression der Erkrankung [De Jong et al., 1988; Willis et al., 2000]. Durch die Positionierung der entsprechenden Gene neben dem Immunglobulinschwerkettengen kommt es in den meisten Fällen zum Verlust normaler Kontrollmechanismen und infolge dessen zu dysregulierter Transkription und Überexpression von Genen [Cleary et al., 1986; Meyer et al., 1983]. In B-Zellen mit aktiver somatischer Hypermutation sind außerdem Mutationen im translozierten Gen möglich, welche anschließend zum neoplastischen Phänotyp beitragen

[Willis *et al.*, 2000]. In Follikulären Lymphomen mit einer Translokation t(14;18) wird die Transformation in ein höhergradiges Lymphom beispielsweise mit Mutationen im translozierten *BCL2*-Gen assoziiert [De Jong *et al.*, 1988; Matolscy *et al.*, 1996; Willis *et al.*, 2000]. Die Beobachtung, dass Lymphom-typische Translokationen, beispielsweise t(14;18)(q32;q21), in geringer Zahl auch in gesunden menschlichen Zellen vorkommen, lässt vermuten, dass neben den *IG*-Translokationen noch weitere Veränderungen im Genom notwendig sind, damit es endgültig zur Entwicklung eines Lymphoms kommt [Summers *et al.*, 2001]. Dieser sog. „Second Hit“ könnte beispielsweise aus der zusätzlichen Aktivierung eines dominanten Onkogens oder aber der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bestehen [Willis *et al.*, 2000]. Betrachtet man die Translokationspartner des *IGH*-Locus, die in Lymphomen nachzuweisen sind, so fällt auf, dass diese häufig an einem der folgenden vier Mechanismen der Zellregulierung beteiligt sind: Apoptose, Zell-Zyklus-Regulierung, NF $\kappa$ B-Aktivierung und Signaltransduktion über Zelloberflächenrezeptoren [Willis *et al.*, 2000]. Dadurch hat eine *IG*-Translokation nicht nur direkte Auswirkungen auf die Transkription des jeweiligen Translokationspartners, sondern indirekt auch auf viele Signalwege, die von diesem ausgehen bzw. von diesem reguliert und kontrolliert werden.

### **1.2.3 Nachweis chromosomaler Translokationen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Um die beschriebenen Lymphom-typischen genetischen Aberrationen wie Brüche oder Translokationen einzelner Genorte nachzuweisen, kann die sogenannte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) angewendet werden. Mit der FISH können sowohl sich in der Mitose befindliche Metaphasezellen als auch nicht-mitotische Interphasekerne analysiert werden [Cremer *et al.*, 1986].

In der FISH-Technik wird sich die natürliche Eigenschaft der doppelsträngigen DNA zu Nutze gemacht, sich im einzelsträngigen Zustand mit komplementären DNA-Molekülen zusammen zu lagern [Schaaf *et al.*, 2008]. Nach einer Denaturierungsphase, die zur Auftrennung des DNA-Doppelstrangs führt, wird den Zellen eine mittels Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonde hinzugefügt. Diese ist exakt komplementär zu einem bestimmten Bereich des Genoms, beispielsweise zu einem einzelnen Gen. In der anschließenden Hybridisierungsphase bindet sie den entsprechenden DNA-Bereich, sodass sich dieser unter dem Fluoreszenzmikroskop später in Form farbiger Signale darstellt [Gall *et al.*, 1969; Ventura *et al.*, 2006]. Für Untersuchungen auf Bruchpunkte in einem bestimmten Genort werden

beispielsweise Gen- bzw. Locus-spezifische Sonden nach dem Prinzip der Break-apart-Sonde verwendet (siehe *Material und Methoden 2.1.4.1*) [Cremer et al., 1986; Ventura et al., 2006].

### **1.3 Das Netzwerk „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“**

Die für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren eingegliedert in das Teilprojekt C4 „Identifizierung chromosomaler Aberrationen in Lymphomen“ des deutschlandweiten Verbundprojekts „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“ (MMML) der Deutschen Krebshilfe. Ziel des MMML-Projekts ist es, genauere Erkenntnisse über die Lymphomentstehung auf molekularer Ebene zu erhalten. Ein Schwerpunkt ist die Suche nach bisher unbekanntem Lymphom-typischen chromosomalen Aberrationen, in deren Rahmen auch versucht wird, neue Translokationspartner des Immunglobulinschwerkettengens auf Chromosom 14 zu identifizieren [[www.lymphome.de](http://www.lymphome.de)].

Zu Beginn des MMML-Projekts untersuchten Hummel et al. (2006) 220 reife aggressive B-Zell-Lymphome mittels Immunhistochemie (CD20, CD3, Ber-Mac3, CD10, Ki-67), Genexpressionsanalysen (ABC, GCB, PM), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Sonden für die Detektion von *MYC*-, *IGH*- und *BCL6*-Bruchpunkten sowie *IGH/MYC*-, *IGH/BCL2*-, *MYC/IGK*- und *MYC/IGL*-Fusionen) und Array-CGH. Resultat dieser Studie war eine genauere molekulare Definition des Burkitt-Lymphoms (mBL vs. non-mBL) und die Abgrenzung weiterer Untergruppen innerhalb der reifen aggressiven B-Zell-Lymphome (*MYC*-simple, *MYC*-complex und *MYC*-negative Lymphome). Diese Untergruppen wurden durch die weitere Analyse klinischer Daten (Alter, Tumorstadium, 5-Jahres-Überlebensrate) näher charakterisiert, sodass beispielsweise ein Bruch im *MYC*-Gen in Nicht-Burkitt-Lymphomen mit einer schlechten Prognose assoziiert werden konnte. Klapper et al. (2008) führten die genannten Untersuchungen ergänzend an 65 kindlichen (Patientenalter  $\leq 18$  Jahre) reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen durch. Ziel war es, eventuelle Unterschiede zwischen reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen in der adulten und in der pädiatrischen Studienpopulation aufzudecken und so möglicherweise bekannte biologische Unterschiede, beispielsweise die Geschlechterverteilung, erklären zu können. Bentink et al. (2008) befassten sich erneut mit den bereits von Hummel et al. untersuchten Fällen, analysierten diese jedoch mit Blick auf sog. pathway activation patterns (PAPs). Auf der Basis verschiedener Konstellationen von Signalwegaktivierungen konnten innerhalb der reifen aggressiven B-Zell-Lymphome neben dem Burkitt-Lymphom noch vier weitere Gruppen unterteilt werden (PAP-1 bis PAP-4). Diese zeigten neben unterschiedlichen biologischen Eigenschaften auch Unterschiede in ihren genetischen Aberrationen und der jeweiligen Prognose. Mittels FISH,

Array-CGH und Transkriptionsanalysen untersuchten *Dierlamm et al. (2008)* in 116 Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen speziell die Folgen eines *MALT1*-Zugewinns auf Chromosom 18q21 für die Genexpression und die klinischen Parameter. Dabei konnte der *MALT1*-Zugewinn mit einer erhöhten Expression anderer auf Chromosom 18q liegender Gene, mit dem Vorliegen des ABC-Lymphomtyps, mit einer vermehrten *BCL2*-Expression und fraglich auch mit einer negativen Prognose der entsprechenden Lymphome assoziiert werden. In der Arbeit von *Schwaenen et al. (2008)* wurde ein besonderes Augenmerk auf die Gruppe der Follikulären Lymphome gelegt. Mittels Array-CGH wurden 128 Fälle auf genetische Aberrationen untersucht und mit den jeweiligen klinischen Daten und RNA-Expressionsleveln korreliert. Das Ziel hierbei war unter anderem, Grundlagen für eventuelle neue prognostische Marker bei Follikulären Lymphomen zu schaffen. Als epigenetischen Ansatz analysierten *Martin-Subero et al. (2008)*, basierend auf Microarray-Untersuchungen, das DNA-Methylierungsmuster in 83 reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen der bisherigen Studienpopulation. Dieses wurde anschließend in Relation zu den morphologischen, genetischen und transkriptionellen Eigenschaften der entsprechenden Lymphome gesetzt. Dabei wurden 56 Gene identifiziert, die in allen untersuchten Lymphomen, unabhängig von phänotypischen oder genetischen Eigenschaften, de novo methyliert vorlagen. Zusätzlich stieß man auf 22 Gene, bei denen dies nur in bestimmten Lymphomsubtypen der Fall war und die somit ein Potenzial als diagnostische Marker haben. Viele der von *Martin-Subero et al.* identifizierten Gene spielen auch in embryonalen Stammzellen eine Rolle, wo sie normalerweise durch sog. PcG-Proteine unterdrückt werden. *Salaverria et al. (2011)* gelang die Identifizierung eines neuen Translokationspartners des *IG*-Gens in reifen B-Zell-Lymphomen. In 20 von 427 mittels FISH analysierten Lymphomen konnte eine Fusion des Immunglobulins mit dem Onkogen *IRF4* nachgewiesen werden. Das Vorhandensein dieser *IG/IRF4*-Fusion, die größtenteils in DLBCLs vom GCB-Typ auftrat, konnte mit einem jungen Patientenalter und einem guten Outcome assoziiert werden. Auf der Grundlage dieses Ergebnisses stellten *Salaverria et al. (2011)* die Hypothese auf, dass die prognostischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen auf die Vielfältigkeit der Tumorbiologie in Lymphomen zurückzuführen sei.

Die aufgeführten Studien im Rahmen des MMML-Projekts haben bereits die enorme Heterogenität der Lymphome gezeigt und dienen als Grundlage für diese Arbeit. Klinisch erhobene Daten (Geschlecht, Alter, Diagnose) des MMML-Kollektivs sowie die Ergebnisse von FISH- und Genexpressionsanalysen sollen hier unter dem Aspekt der *IGH*-Translokationen aufgearbeitet und miteinander korreliert werden.

#### 1.4 Fragestellung

Da sich gezeigt hat, dass *IGH*-Translokationen in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen sehr häufig sind [Lenz *et al.*, 2007], kann davon ausgegangen werden, dass in dieser Lymphomentität neben den bereits bekannten Translokationspartnern des *IGH*-Gens (z.B. *BCL2*, *MYC* oder *BCL6*) weitere bisher unbekannte Partner existieren. Diese Arbeit widmet sich nun der Frage, ob durch die Kombination von FISH- und Genexpressionsanalysen neue Translokationspartner identifiziert werden können und ob eine Assoziation dieser Partnergene mit spezifischen klinischen Verläufen oder Tumorcharakteristika möglich ist. Hierfür sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Befinden sich im Kollektiv der MMML-Studie Lymphome, die einen *IGH*-Bruch aufweisen und bei denen der Translokationspartner des *IGH*-Genorts noch unbekannt ist?
- Wie sind diese Fälle in den unterschiedlichen Geschlechter-, Alters- und Diagnosegruppen sowie unter den verschiedenen Genexpressionstypen (ABC, GCB) vertreten? Gibt es Präferenzen für bestimmte Gruppen?
- Weisen die Lymphome mit *IGH*-Bruch und unbekanntem Translokationspartner eine vermehrte Expression einzelner Kandidatengene auf, die als Onkogene bei Lymphomen beschrieben sind?
- Können in diesen vermehrt exprimierten Genen in den betroffenen Fällen Bruchpunkte oder sogar eine Translokation mit Beteiligung des *IGH*-Gens nachgewiesen werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenkollektiv und Tumormaterial

Sämtliche Gewebeproben, die im Rahmen dieser Dissertation mittels FISH untersucht wurden, entstammen dem Deutsche Krebshilfe Projekt „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“ (MMML). Einschlusskriterium für besagte MMML-Studie war die Diagnose eines reifen aggressiven B-Zell-Lymphoms, die mittels Begutachtung durch sieben unabhängige Hämatopathologen gesichert wurde. Es galten außerdem folgende Ausschlusskriterien:

- Revision der Diagnose eines reifen aggressiven B-Zell-Lymphoms
- Vorliegen einer HIV-Infektion
- Gewebeentnahme zum Zeitpunkt eines Rezidivs

Zu Beginn dieser Arbeit umfasste das Kollektiv der MMML-Studie 962 Proben. Diese wurden im Rahmen des C4-Teilprojekts bereits durch Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik untersucht. Für das sogenannte „Hauptkollektiv“ der vorliegenden Dissertation wurden 143 Fälle ausgewählt und mittels FISH analysiert, die folgende Kriterien erfüllten:

- Ausschluss der Lymphom-typischen Translokationen wie t(8;14) oder t(14;18)
- Fehlende Untersuchung auf *IGH*-Bruchpunkte
- Vorliegen einer der folgenden Diagnosen:
  - Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)
  - Follikuläres Lymphom (FL) Grad IIIa/b
  - Hochmalignes B-Zell-Lymphom
  - Primär mediastinales B-Zell-Lymphom (PMBCL)

Zusätzlich wurden als „Nebenkollektiv“ 21 weitere Fälle der MMML-Kohorte untersucht, die nicht den oben genannten Diagnosegruppen zugeordnet werden konnten. Diese wurden mit den gleichen Methoden analysiert wie das Hauptkollektiv dieser Arbeit.

Für die Untersuchungen im Rahmen der MMML-Studie liegt ein positives Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vor (D403/05, siehe *Anhang A3*).

### **2.1.2 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien**

Aqua ad iniectabilia Braun (BRAUN Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

DAPI (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

dest. H<sub>2</sub>O (BRAUN Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Ethanol (Th. Geyer, Berlin, Deutschland)

Hybridisierungspuffer (LSI Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer, Abbott GmbH & Company KG, Wiesbaden, Deutschland)

Igepal CA-630 (Th. Geyer, Berlin, Deutschland)

5N NaOH (Th. Geyer, Berlin, Deutschland)

Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Protease (Abbott GmbH & Company KG, Wiesbaden, Deutschland)

Proteaspuffer (Abbott GmbH & Company KG, Wiesbaden, Deutschland)

Rotihistol (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

20 x SSC Buffer Ultra Pure (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

VECTASHIELD® Mounting Medium H-1000 (Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom)

### **2.1.3 Lösungen und Puffer**

#### **0,01 M Citratpuffer für Paraffin-FISH (pH 6,0)**

2,1 g Citronensäure (hydriert) bzw.

2,3 g Citronensäure (dehydriert) wurden in

800 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst, um

5,4 ml 5N NaOH ergänzt und mit

dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt.

#### **DAPI-Gebrauchslösung**

500 µl DAPI-Stammlösung wurden in 500 ml 2 x SSC gegeben.

#### **DAPI-Stammlösung**

0,2 mg DAPI/ml dest. H<sub>2</sub>O wurden ineinander gelöst.

#### **70% iges Ethanol**

700 ml Ethanol abs. und

300 ml dest. H<sub>2</sub>O wurden miteinander vermischt.

### **80% iges Ethanol**

800 ml Ethanol abs. und  
200 ml dest. H<sub>2</sub>O wurden miteinander vermischt.

### **1% iges Paraformaldehyd**

10 g Paraformaldehyd und  
1000 ml dest. H<sub>2</sub>O  
wurden bis zur vollständigen Lösung auf der Heizplatte erwärmt.

### **Proteaselösung**

1 Röhrchen Protease (500 mg) und  
1 Flasche Proteasepuffer (500ml) wurden ineinander gelöst.

### **2 x SSC**

20 x SSC wurde im Verhältnis von 1:10 mit dest. H<sub>2</sub>O verdünnt.

### **Waschpuffer 1**

20 ml 20 x SSC und  
3 ml Igepal wurden mit  
dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt.

### **Waschpuffer 2**

100 ml 20 x SSC und  
1000 µl Igepal wurden mit  
dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml aufgefüllt.

## **2.1.4 Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

### **Detektion eines *IGH*-Bruchpunkts:**

IGH:14q32:Vysis® LSI® IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)

### **Detektion einer *IGH/CCND1*-Fusion:**

Vysis® LSI® IGH/CCND1 XT Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)

**Detektion einer IGH/MALT-Fusion:**

Vysis®LSI® IGH/MALT t(14;18)(q32;q21) Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe  
(Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)

**Tab. 2: FISH-Sonden, die im Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität Kiel am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein hergestellt wurden.**

Mutation	Lokalisation	Klonbibliothek/-name	Referenz
<i>MUC1</i> -Bp.	1q21	RP1-35A12 SG, RP1-280O9 SO	Weng et al., 2003
<i>BCL11A/REL</i> -Fusion	2p13-16	<i>BCL11A</i> (SO): RP11-158i21, RP11-440P5(=AC 009970) <i>REL</i> (SG): RP11-373L24, RP11-498o5	Martín-Subero et al., 2002
<i>CDK6</i> -Bp.	7q21	RP5-1099C19 SO, CTB-104I4 SG	Siebert et al., unpubliziert
<i>NFKB2</i> -Bp.	10q24~25	RP11- 156M10 SG, RP11-242B12 SO, RP11-412G16 SO	Siebert et al., unpubliziert
<i>CCND2</i> -Bp.	12p13	RP11-388F6 SG, RP11-578L13 SO	Gesk et al., 2006
<i>ZFP36L1</i> -Bp.	14q24	RP11-179B8 SO, RP11-65A20 SG	Nagel et al., 2009
<i>IGH/BCL6</i> -Fusion	14q32, 3q27	<i>BCL6</i> (SG): RP11-528E8, RP11-690C3 <i>IGH</i> (SO):dist. RP11-683L4, CTD-2011A5, RP11-141i7 prox. RP11-150i16, RP11-817G24, RP11-937M13	Sanchez-Izquierdo et al., 2001
<i>CCNE1</i> -Bp.	19q12	RP11-345J21 SG, RP11-17N20 SO	Nagel et al., 2009
<i>BCL3</i> -Bp.	19q13.2	RP11-21J15 SG, CTD-129P6 SO	Martín-Subero et al., 2006

(Bp. Bruchpunkt; FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; SG Spectrum green; SO Spectrum orange)

**2.1.5 Sonstige Ge- und Verbrauchsmaterialien**

Codierplättchen, weiß (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Deckgläser, 24 x 60 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)

Deckgläser, D 10 mm, Stärke 1, rund (Th. Geyer, Berlin, Deutschland)

Diamantschreibstift (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

Fixogum (Marabu GmbH & Co KG, Bietigheim-Bissingen, Deutschland)

Fluoreszenzfilter (Firma AHF Analysenteknik AG, Tübingen, Deutschland)

Glasküvetten (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

Metallboxen (Edelstahlschalen mit Knopfdeckel, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)

Mikro-Schraubröhren 1,5 ml, PP (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Immersionsöl nach DIN ISO-8036-1 (Th. Geyer, Berlin, Deutschland)

Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, Deutschland)

Pipettenspitzen 10 µl ohne Filter Typ D (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Präpariernadel (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

Schnellkochtopf (Clipso, Firma Tefal, Offenbach, Deutschland)

### 2.1.6 Geräte und Software

<b>Tab. 3: Typbezeichnung und Herstellerangabe der verwendeten Geräte und Software.</b>		
<b>Gerät</b>	<b>Typbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank	Function Line	Heraeus, Hanau, Deutschland
FISH-Waschautomat	VP2000 Processor	Abott/Vysis, Downers Grove, IL, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 50	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager A1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fotosoftware für Fluoreszenzmikroskope	ISIS 3.0 FISH Imaging System	MetaSystems, Altusheim, Deutschland
Gefrierschrank	-	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Objektiv (Fluoreszenzmikroskop)	PLAN-APOCHROMAT 63x/1,40 Oil 440760 03	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektiv (Fluoreszenzmikroskop)	PLAN-APOCHROMAT 63x/1,40 Oil 440760 (1100-829)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Objektiv (Fluoreszenzmikroskop)	PLAN-APOCHROMAT 63x/1,40 Oil Dic 40760 02	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Software für VP2000	-	Abott/Vysis, Downers Grove, IL, USA
Wasserbad	-	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Pipette	eppendorf "Reference", 0,5-10µl, autoclavable	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>(FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; IL Illinois)</i>		

## 2.2 Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Methoden wurden nach den aktuellen Standardarbeitsanweisungen des Instituts für Humangenetik in Kiel durchgeführt.

### 2.2.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

#### 2.2.1.1 Aufbereitung und Lagerung der Gewebeproben

Um die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durchführen zu können, wurden aus den gewonnenen Gewebebiopsien bzw. Tumorsektaten im jeweils ortsansässigen Institut für Pathologie Kryoschnitte von etwa 5 µm Dicke angefertigt und auf Eis an das Institut für Humangenetik nach Kiel geliefert. Bis zur Weiterverarbeitung mittels FISH wurden die Kryoschnitte bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.1.2 Kontrollen

Vor dem ersten Gebrauch wurden die regelmäßig diagnostisch eingesetzten DNA-Sonden durch Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik nach Standardprotokoll kontrolliert und die Nachweisgrenzen für die typischen Signalkonstellationen festgelegt. Dies erfolgte an fünf Kontrollen mit normalem Karyotyp und fünf pathologischen Kontrollen mit bekanntem aberranten Karyotyp durch Auszählung von jeweils mindestens 100 Zellen (festgelegte Nachweisgrenzen siehe *Tab. 4*, Beispiel eines Validierungsprotokolls siehe *Anhang A1*).

<b>Tab. 4: Nachweisgrenzen der in dieser Arbeit verwendeten FISH-Sonden.</b>		
<b>Nachzuweisende Mutation</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Nachweisgrenze der verwendeten Sonde (in %)</b>
<i>MUC1</i> -Bruchpunkt	1q21	5*
<i>BCL11A</i> -Bruchpunkt	2p13-16	5*
<i>CDK6</i> -Bruchpunkt	7q21	5
<i>NFKB2</i> -Bruchpunkt	10q24	5*
<i>CCND2</i> -Bruchpunkt	12p13	5
<i>ZFP36L1</i> -Bruchpunkt	14q24	3
<i>IGH</i> -Bruchpunkt	14q32	5
<i>IGH/BCL6</i> -Fusion	14q32, 3q27	5*
<i>IGH/CCND1</i> -Fusion	14q32, 11q13	5
<i>IGH/MALT</i> -Fusion	14q32, 18q21	5
<i>CCNE1</i> -Bruchpunkt	19q12	5*
<i>BCL3</i> -Bruchpunkt	19q13.2	5
(* Die Nachweisgrenzen dieser Sonden wurden aufgrund der Seltenheit der Bruchpunkte nicht final bestimmt, jedoch auf 5% festgelegt; FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)		

### 2.2.1.3 Verdau des Probenmaterials

Der Verdau der zu hybridisierenden Präparate wurde im *VP2000 Processor* durchgeführt. Dieser vorbereitende Arbeitsschritt diente dazu, störenden Fluoreszenzhintergrund zu vermeiden und den Transfer der DNA-Sonden zu der im Zellkern befindlichen DNA zu ermöglichen. Als Verdauungsenzym wurde eine Protease verwendet. Diese entfernte unter anderem Bestandteile des Zytoplasmas und optimierte so die Sondenpermeabilität in den Zellkern. Zur Vorbereitung auf den Proteaseverdau wurden die Objektträger mit den jeweiligen Kryoschnitten zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und luftgetrocknet. Anschließend wurde der Abschnitt, auf dem sich das Tumormaterial befand, auf der Rückseite des Objektträgers mit einem Diamantschreibstift gekennzeichnet und die Präparate in den Ständer des *VP2000 Processor* gestellt. Für den anschließenden Verdau wurde das Programm *FISH Routine Protease* ausgewählt, welches aus folgenden Zwischenschritten bestand:

5 Min.	Protease	37 °C
1 Min.	H <sub>2</sub> O	RT
2 Min.	1% Paraformaldehyd	RT
1 Min.	H <sub>2</sub> O	RT
2 Min.	70% Ethanol	RT
2 Min.	80% Ethanol	RT
2 Min.	Ethanol abs.	RT
5 Min.	Trocknen	RT

### 2.2.1.4 Denaturierung und Hybridisierung mit dem Sondenmix

Nach abgeschlossenem Proteaseverdau wurden die Präparate mit der je nach Fragestellung ausgewählten DNA-Sonde hybridisiert (Bsp.: Frage nach dem Vorhandensein eines *IGH*-Bruchpunkts → Verwendung der Sonde *IGH:14q32:Vysis® LSI® IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe*). Für diesen Arbeitsschritt wurde in einem Mikro-Schraubröhrchen zunächst der benötigte „Mastermix“ aus folgenden Bestandteilen angemischt:

- 1 µl der Sonde aus dem entsprechenden Sonden-Kit
- 2 µl dest. H<sub>2</sub>O
- 7 µl LSI-Hybridisierungspuffer

Anschließend wurde mit der Pipette eine Menge von je 1,5 µl Mastermix auf die anfangs mittels Diamantschreibstift markierten Hybridisierungsfelder gegeben, der Hybridisierungsbereich mit einem runden Deckgläschen abgedeckt und dieses wiederum mit *Fixogum*-Kleber an den Rändern luftdicht verschlossen. Die so vorbereiteten Objektträger wurden anschließend gemeinsam mit einem feuchten Tuch in einen Metallkasten gelegt und für sieben Minuten in ein Wasserbad von 80 °C ± 2 °C gegeben. Dieser Vorgang diente dazu, die DNA-Doppelstränge in den Zellkernen aufzubrechen. Im Folgezeitraum von 18-48 Stunden wurde der Metallkasten mit den Präparaten dann bei 37 °C in einem Brutschrank gelagert, sodass die DNA-Sonden an die jeweils komplementären DNA-Sequenzen im Zellkern binden konnten.

### 2.2.1.5 Waschschritte, Färbung, Eindecken

Um die Präparate von nicht gebundener sowie unspezifisch gebundener Sonden-DNA zu befreien, wurden diese im Anschluss an die Hybridisierungsphase mehreren Waschschritten unterzogen. Hierfür wurden das *Fixogum* und das Deckgläschen mit Hilfe einer Präpariernadel entfernt und die Objektträger zum Schutz vor Austrocknung bis zur Weiterverarbeitung in 2xSSC-Puffer gestellt. Für den Waschvorgang und die anschließende Färbung mit DAPI wurde das Programm *Waschen Routine* im *VP2000 Processor* verwendet:

2 Min.	Waschpuffer 1	72 °C
1 Min.	Waschpuffer 2	RT
1 Min.	2xSSC	RT
5 Min.	DAPI	RT
Mind. 1 Min.	2xSSC	RT

Die zweite Zeit im 2xSSC konnte beliebig variiert werden, da dieser Arbeitsschritt nur zum Schutz vor Austrocknung bis zur Weiterverarbeitung diente. Zum Eindecken der Präparate wurde je ein Tropfen *Vectashield Mounting Medium* auf ein Deckglas gegeben und der Objektträger mit dem Hybridisierungsfeld nach unten zeigend in das Medium gelegt. Nach der Entfernung von überschüssigem Medium und Luftblasen durch leichten Druck wurden die Objektträger bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop bei Raumtemperatur in Dunkelheit gelagert.

In einem Fall wurde ein Paraffinschnitt analysiert. Die Vorbereitung und Hybridisierung erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik nach Standardprotokollen.

## **2.2.2 Auswertung am Fluoreszenzmikroskop**

### **2.2.2.1 Mikroskopeinstellungen**

Die Auswertung der mittels FISH hybridisierten Kryoschnitte wurde an Fluoreszenzmikroskopen unter der Verwendung des Objektivs *PLAN-APOCHROMAT 63x/1,40 Oil* durchgeführt. Als Filter wurden geeignete Fluoreszenzfilter verwendet, je nach Fluoreszenzfarbstoff für *Spectrum Orange* oder *Spectrum Green* und für DAPI.

### **2.2.2.2 Auswertekriterien und Dokumentation**

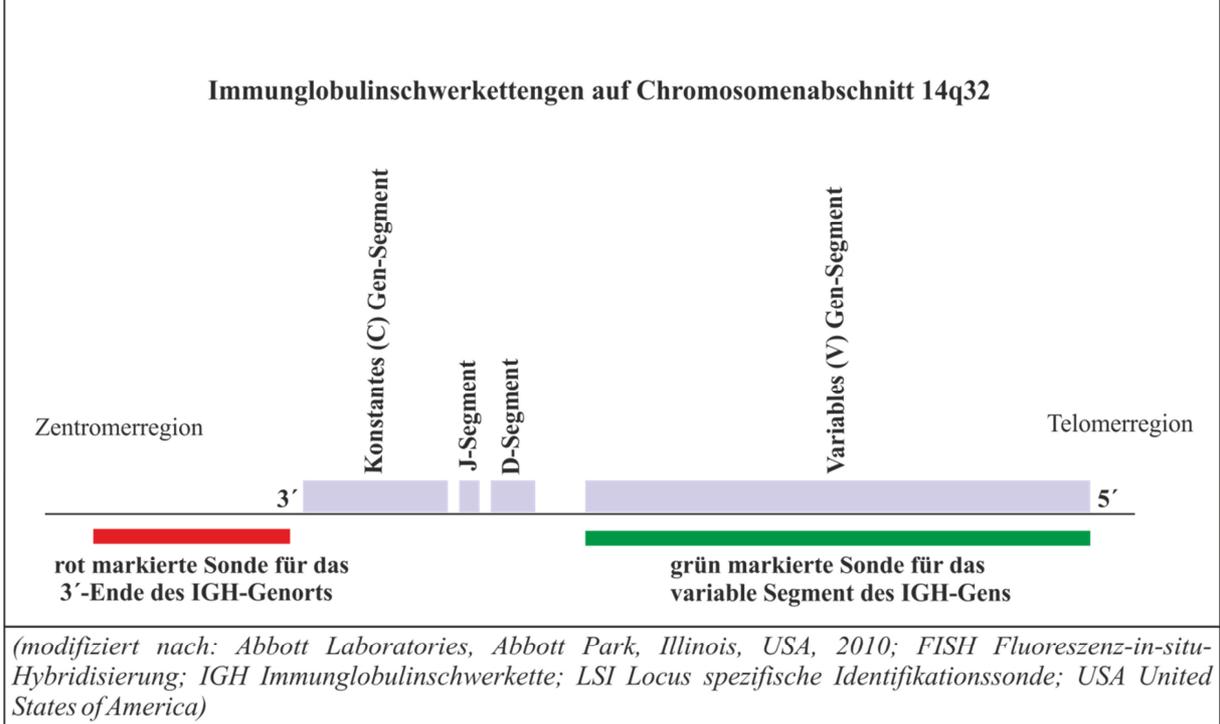
Für diese Arbeit wurden über 150 Präparate mittels FISH analysiert. Dabei wurde jeweils das gesamte Präparat beurteilt. Ausgewertet und in die Statistik aufgenommen wurden nur Präparate, bei denen die Signale einzeln zu identifizieren und den Zellkernen zuzuordnen waren. Bei zu geringer Leuchtstärke der Signale, störendem Fluoreszenzhintergrund oder zu starker Verschmutzung eines Präparates wurde das Deckglas vom Objektträger entfernt und die FISH erneut durchgeführt oder es wurde, falls vorhanden, ein neuer Kryoschnitt desselben Tumors verwendet. Da es bei Kryoschnitten häufig zu Überlagerungen bzw. einer sehr hohen Gewebedichte kommt, wurde in dieser Arbeit keine festgelegte Anzahl an Zellkernen ausgewertet (beispielsweise 3x100 Zellen), sondern das Signalvorkommen im gesamten Präparat bewertet. Die Auswertung wurde unabhängig durch erfahrene Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik durchgeführt und die jeweiligen Ergebnisse miteinander abgeglichen. Kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen, wurde das entsprechende Präparat erneut ausgewertet und bei weiterhin bestehenden Ergebnisdifferenzen eine dritte Person für eine weitere unabhängige Auswertung hinzugezogen. Die Ergebnisdokumentation beinhaltete für jedes Präparat das Hybridisierungsdatum, die Namen der hybridisierenden und der auswertenden Person, das Auswertedatum, die laborinterne Nummer des Patienten, die Materialart, den Namen der hybridisierten Sonden, den Sondenhersteller sowie die einzelnen Ergebnisse der auswertenden Personen. Des Weiteren wurden von jedem Präparat mindestens zwei repräsentative Fotos erstellt. Hierfür wurden Bereiche mit einer ausreichenden Menge an klar voneinander abgrenzbaren Zellen, deutlichen Signalen und wenig Fluoreszenzhintergrund oder Schmutz fotografiert und zur Dokumentation digital gespeichert. Dabei wurde das Programm *ISIS 3.0 FISH Imaging System* verwendet.

### 2.2.2.3 Mögliche Signalkonstellationen bei der FISH-Analyse des *IGH*-Genorts

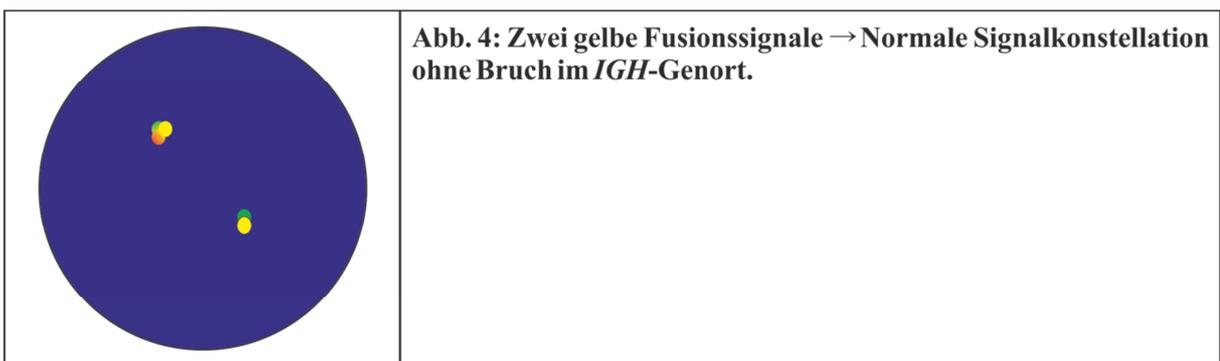
#### 2.2.2.3.1 Break-apart-Sonden

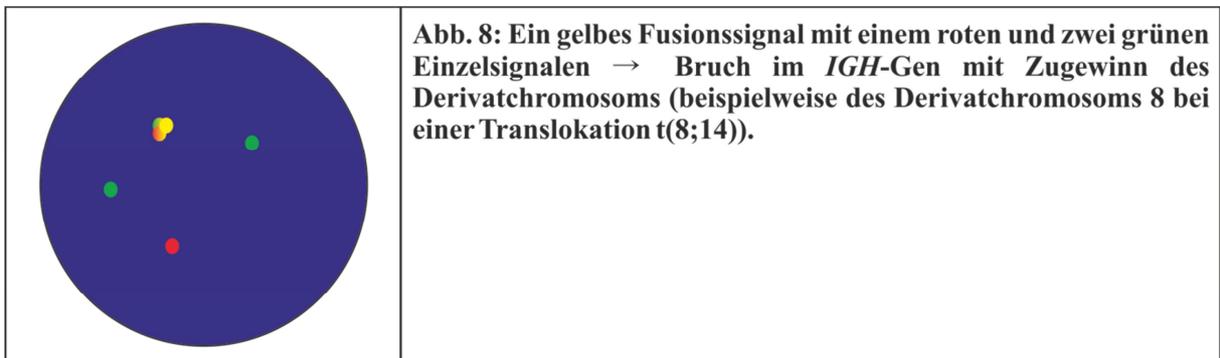
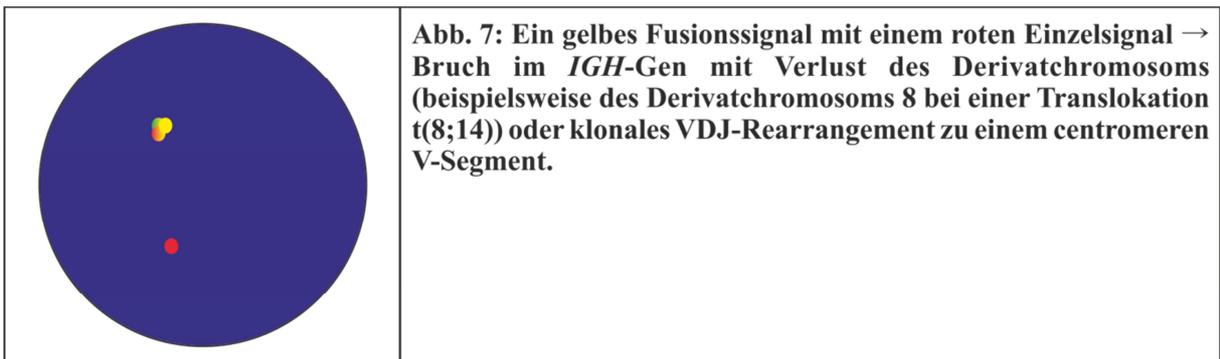
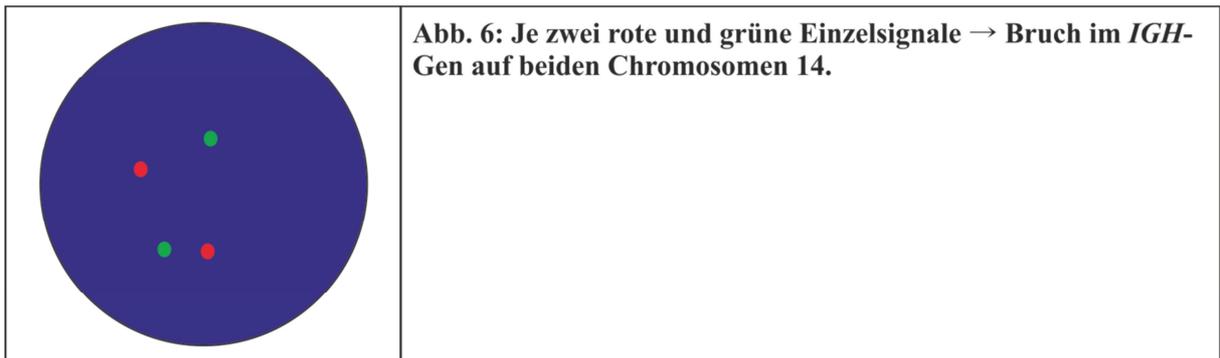
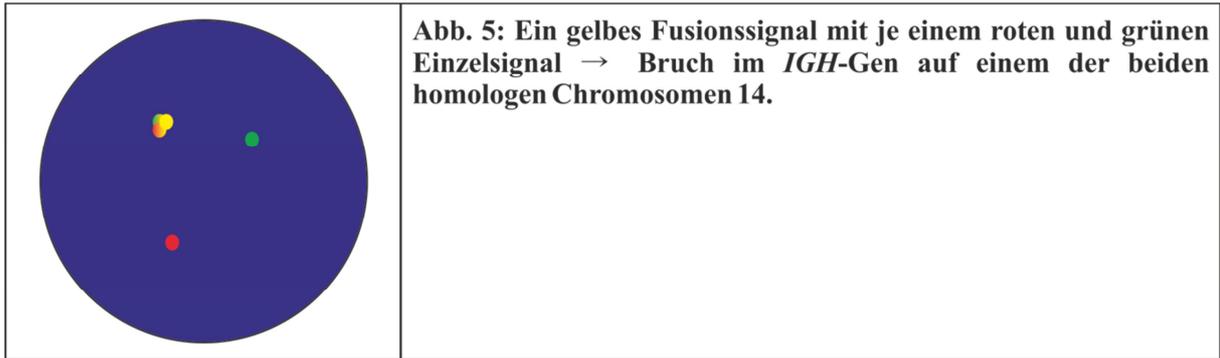
Bei dieser Sondenform binden eine rot und eine grün markierte Sonde so an ein Chromosom, dass die Bruchpunktregion eines bestimmten Genorts „eingerahmt“ wird (Bsp. siehe *Abb. 3*).

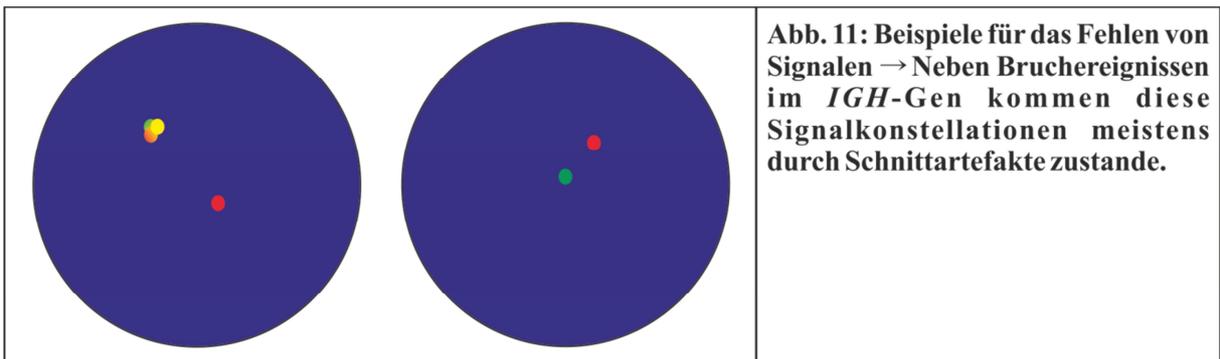
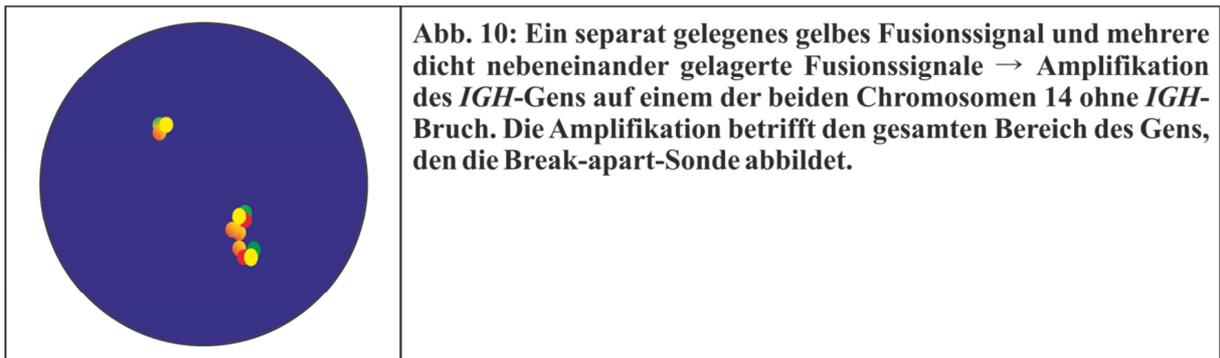
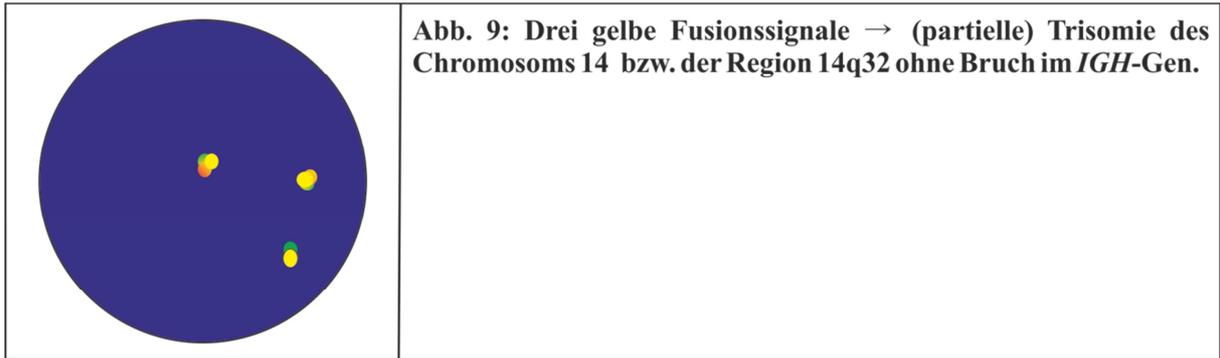
**Abb. 3: Prinzip der Break-apart-Sonden am Beispiel einer FISH-Sonde zum Nachweis von Bruchpunkten im *IGH*-Gen auf Chromosom 14 (LSI *IGH* Dual Color, Break Apart).**



Mit einer sog. Break-apart-Sonde wurden in dieser Arbeit die Gene *IGH*, *ZFP36L1*, *BCL3*, *BCL11A/REL*, *CDK6*, *CCND2*, *CCNE1*, *MUC1* und *NFKB2* auf Bruchpunkte untersucht. Im Folgenden werden mögliche Signalkonstellationen am Beispiel einer Break-apart-Sonde erläutert, die den *IGH*-Genort auf Chromosom 14 darstellt (modifiziert nach *Ventura et al, 2006*):







Sowohl bei den oben dargestellten als auch bei den folgenden Abbildungen handelt es sich um mögliche Signalkonstellationen. Diese können, einzeln betrachtet, wiederum in unterschiedlichsten Varianten und Kombinationen auftreten.

### 2.2.2.3.2 Dual-fusion-Sonden

Auch bei dieser Sondenform werden eine rot und eine grün markierte Sonde verwendet. Diese binden jedoch jeweils an einen Genort auf unterschiedlichen Chromosomen. Mittels Dual-fusion-Sonden wurden in dieser Arbeit Fusionen der Gene *IGH/CCND1*, *IGH/MALT* und *IGH/BCL6* untersucht.

Im Folgenden werden mögliche Signalkonstellationen anhand einer Dual-fusion-Sonde zum Nachweis von *IGH*(grün)/*MALT*(rot)-Fusionen (t(14;18)) erläutert (modifiziert nach Ventura et al, 2006):

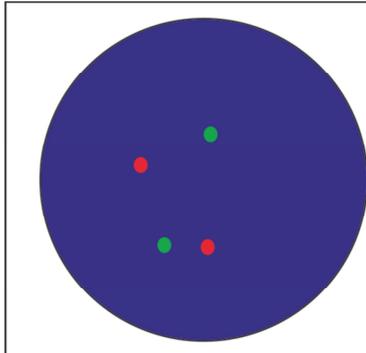


Abb. 12: Je zwei rote und grüne Einzelsignale → Normale Signalkonstellation ohne *IGH/MALT*-Fusion.

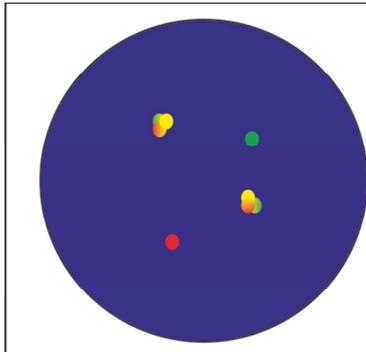


Abb. 13: Zwei gelbe Fusionssignale und je ein rotes und grünes Einzelsignal → Einfache reziproke Translokation t(14;18) mit daraus resultierender *IGH/MALT*-Fusion.

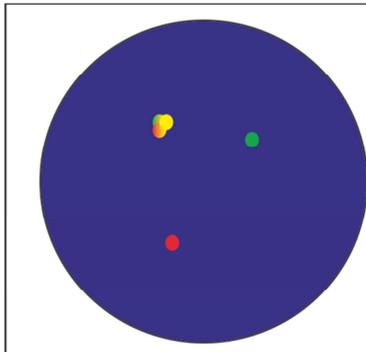


Abb. 14: Ein gelbes Fusionssignal mit je einem roten und grünen Einzelsignal → Einfache reziproke Translokation t(14;18) mit *IGH/MALT*-Fusion und Verlust eines Derivatchromosoms (in diesem Beispiel eines der Derivatchromosomen 14 oder 18). Die gleiche Signalkonstellation kann jedoch auch durch ein Schnittartefakt entstehen.

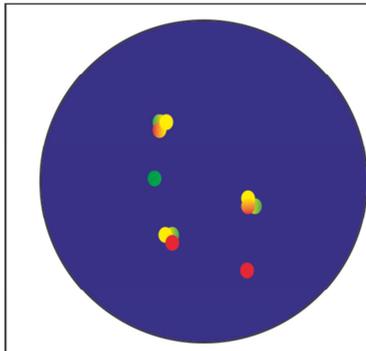
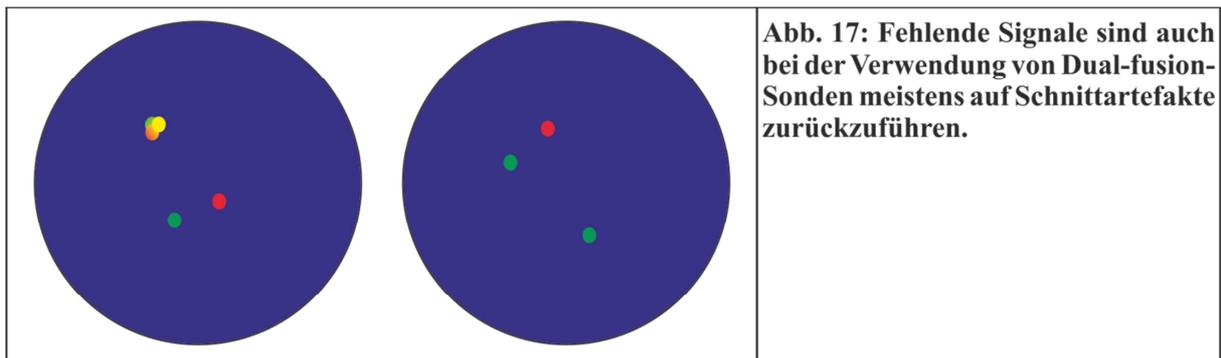
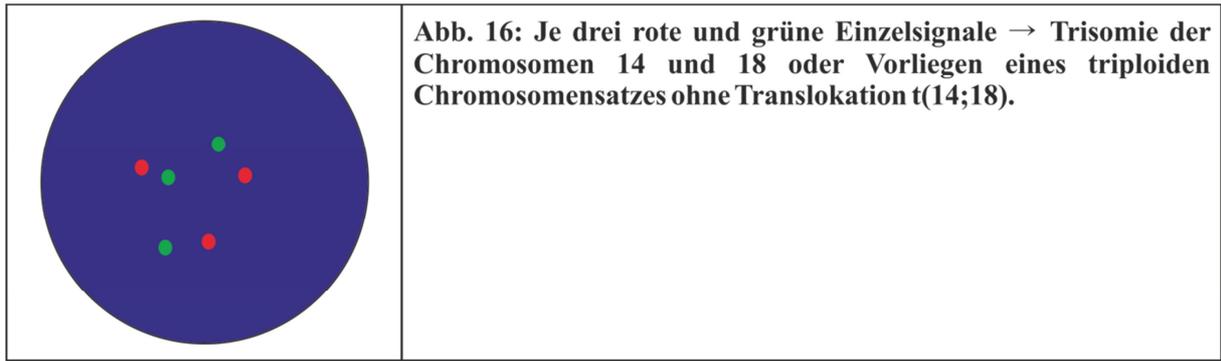


Abb. 15: Drei gelbe Fusionssignale und je ein rotes und grünes Einzelsignal → Einfache reziproke Translokation t(14;18) mit *IGH/MALT*-Fusion und Zugewinn eines Derivatchromosoms (in diesem Fall Derivatchromosom 14 oder 18).



#### 2.2.2.4 Ergebnisinterpretation und -analyse

Grundlage für die Ergebnisauswertung war, dass bei den verwendeten Gewebeproben nach den Einschlusskriterien der MMML-Studie in der Regel ein Tumorzellgehalt von 70% vorlag. Somit waren eventuell vorhandene klonale Translokationen nicht nur in vereinzelt Zellen sondern in einem Großteil des hybridisierten Areals zu finden. Es wurde jeweils das gesamte hybridisierte Areal unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Dabei wurde nach Abschnitten gesucht, in denen helle, einzelne Signale zu erkennen waren und man bei möglichst wenig Hintergrundintensität einzelne Kerne klar voneinander abgrenzen konnte. Diese Areale wurden für die Auswertung herangezogen. Abschnitte, in denen die Kerne nicht eindeutig voneinander abgegrenzt werden konnten und/oder sich die Kerne aufgrund sehr hoher Zelldichte stark überlappten, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt [nach Ventura et al., 2006].

#### 2.2.3 Bioinformatische Analyse

Ausgangspunkt für den hier zusätzlich gewählten bioinformatischen Ansatz war die Annahme, dass Gene stärker exprimiert werden, wenn sie Translokationspartner des *IGH*-Gens auf Chromosom 14 sind [Cleary et al., 1986; Meyer et al., 1983]. Da man die Fälle, die in der ersten FISH-Analyse einen *IGH*-Bruch aufgewiesen hatten, aufgrund der Kosten, des

zeitlichen Aufwands und der Materialmenge nicht auf sämtliche bekannte Translokationspartner des *IGH*-Gens durchuntersuchen konnte, wurde der Weg über die Genexpressionsanalyse gewählt. Weil alle hier untersuchten Gewebeproben aus dem MMML-Projekt der Deutschen Krebshilfe stammten, lagen zu den 164 untersuchten Fällen bereits Genexpressionsanalysen vor (*Hummel et al., 2006*). Durch Mitarbeiter der bioinformatischen Arbeitsgruppe des MMML-Projekts (C. Kohler, Prof. R. Spang; Institut für funktionelle Genomik, Regensburg) wurden die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen jetzt in Bezug zu denen der FISH-Analysen gesetzt. Dabei wurden für 27 bekannte Onkogene (genaue Auflistung der überprüften Gene siehe *Anhang A2*) die 1% bzw. 5% Fälle des MMML-Projekts herausgefiltert, die für das entsprechende Gen die höchste Expression aufwiesen. Dies geschah jeweils mit einer über den p-Wert determinierten Nachweisgrenze (p-Wert  $\leq 0,01$  = stringente Selektion und p-Wert  $\leq 0,05$  = weniger stringente Selektion). Bekam eine Tumorprobe für die Expression eines Onkogens einen p-Wert  $\leq 0,01$  bzw.  $\leq 0,05$  zugeteilt, bedeutete es, dass 99% bzw. 95% der Fälle in der MMML-Kohorte eine geringere Expressionsrate für das jeweilige Onkogen aufwiesen als diese Probe. Anschließend wurde überprüft, ob sich unter diesen Fällen mit vermehrter Genexpression auch Tumorproben befanden, bei denen in der hier durchgeführten FISH-Analyse ein *IGH*-Bruch nachgewiesen worden war. Wenn das der Fall war, wurde die entsprechende Gewebeprobe weiterführend auf mögliche Bruchpunkte oder Fusionen untersucht. Eine Probe mit sehr hohem Expressionslevel des *CCND2*-Gens wurde beispielsweise ergänzend mit einer FISH-Sonde für *CCND2*-Bruchpunkte untersucht. Hierfür kamen jeweils neue Kryoschnitte der entsprechenden Tumore zum Einsatz.

### 3 Ergebnisse

Die Kernfrage dieser Arbeit war, ob sich in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen zusätzlich zu den bereits bekannten Translokationen des Immunglobulinschwerkettengens, wie beispielsweise der t(8;14) oder der t(14;18), weitere *IGH*-Translokationen mit bisher unbekanntem Translokationspartnern identifizieren lassen. Grundlage dieses Ansatzes waren die Ergebnisse von *Lenz et al.* (2007), wonach *IGH*-Translokationen in dieser Lymphomentität häufig sind.

Unter der Annahme, dass Gene, die aufgrund einer Translokation neben den *IGH*-Genort positioniert sind, vermehrt exprimiert werden, wurde hier eine Methodenkombination aus FISH- und Genexpressionsanalyse angewandt [*Cleary et al.*, 1986; *Meyer et al.*, 1983].

#### 3.1 Beschreibung der untersuchten Kohorte

Nach Anwendung der unter 2.1.1 genannten Ein- und Ausschlusskriterien wurden von den 962 Gewebeproben der MMML-Studie insgesamt 160 für das Hauptkollektiv dieser Arbeit herangezogen. Bei allen Fällen waren in vorausgegangenen Untersuchungen bereits typische Translokationen wie die t(8;14) und die t(14;18) ausgeschlossen worden, die Analyse bezüglich eines *IGH*-Bruchs stand jedoch noch aus. Es lag außerdem jeweils eine der vier hier untersuchten Lymphomentitäten (DLBCL, FL Grad IIIa/b, Primär mediastinales DLBCL, hochmalignes B-Zell-Lymphom) vor. Da von 17 Tumorproben keine Kryoschnitte mehr existierten, bestand das endgültige Hauptkollektiv aus insgesamt 143 Fällen.

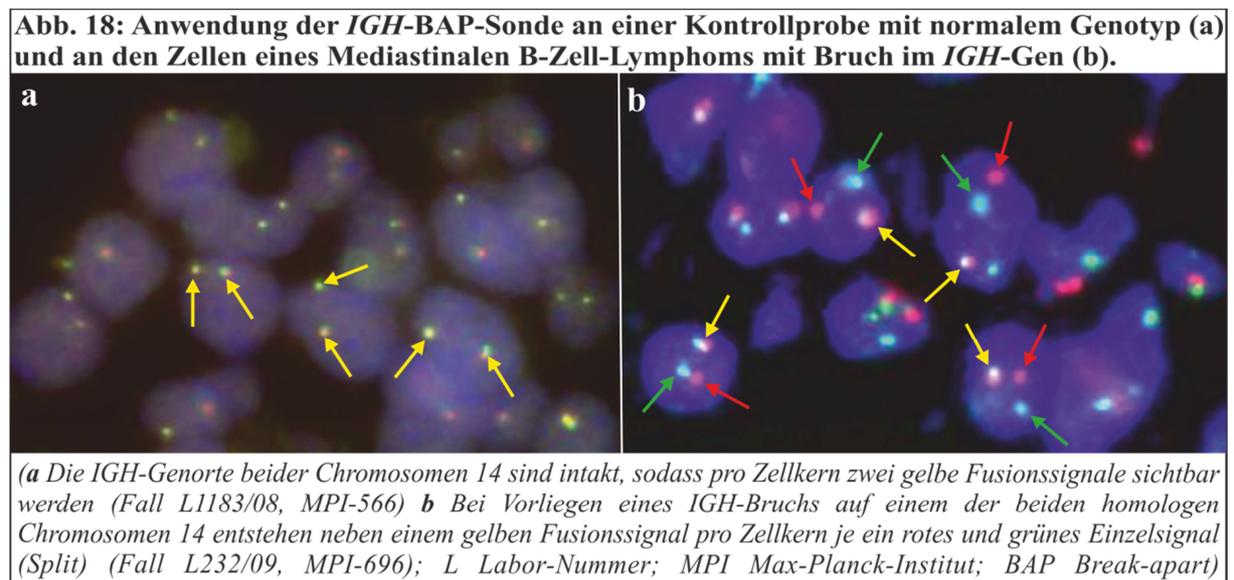
Für 141 bzw. 140 dieser untersuchten Gewebeproben lagen Angaben über das Geschlecht und das Alter der Patienten vor, der jeweilige Genexpressionstyp war in 120 Fällen bestimmt worden (siehe *Tab. 5*): Im sogenannten „Hauptkollektiv“, bestehend aus 143 Fällen, stellte sich ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis dar. Das Durchschnittsalter lag bei 58 Jahren. Die am häufigsten gestellte Diagnose war die des Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (102 Fälle), gefolgt von einem Follikulären Lymphom Grad IIIa/b, welches bei 15 Patienten vorlag. 80 Tumorproben wiesen den sogenannten GCB-Expressionstyp auf.

Aus den 962 Proben des MMML-Kollektivs wurden zusätzlich 21 Fälle ausgewählt und analysiert, deren Diagnosen keiner der 4 genannten Einschlussdiagnosen entsprachen. Dieses „Nebenkollektiv“ diente als Vergleichsgruppe und setzte sich bezüglich Patientenalter, Geschlechterverteilung, Diagnosen und Genexpressionstypen wie folgt zusammen: Mit einem Alter von 42 bis 86 Jahren bei Erstdiagnose betrug das Durchschnittsalter 63 Jahre. Über die Hälfte (57%) der Fälle im Nebenkollektiv wiesen ein Follikuläres Lymphom Grad 1 oder 2 auf. Weitere Diagnosen waren B-Zell-Lymphom ohne nähere Angaben (2), klassischer M.

Hodgkin (1), Mantelzell-Lymphom (1), Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (2) und Plasmozytom (3). In 10 von 19 Proben mit vorhandenen Daten lag eine Genexpression vom GCB-Typ vor.

### 3.2 Bruch des Immunglobulinschwerketten-Genorts

Auf der Suche nach neuen Translokationspartnern des *IGH*-Gens in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen wurden zunächst alle 143 eingeschlossenen Fälle sowie die 21 Gewebeproben des Nebenkollektivs mittels FISH-Analyse auf Bruchpunkte im *IGH*-Gen untersucht. *Abb. 18* zeigt beispielhaft zwei Signalkonstellationen, welche im Rahmen dieser Arbeit bei der Verwendung von Break-apart-Sonden beobachtet wurden.



#### 3.2.1 Vorkommen im Hauptkollektiv

In 42 der 143 untersuchten reifen aggressiven B-Zell Lymphome konnte mittels FISH ein Bruch im Genort der Immunglobulinschwerkette auf Chromosom 14 nachgewiesen werden. Dies entsprach einem Anteil von 29% am gesamten Hauptkollektiv. *Tab. 5* stellt das Vorkommen der einzelnen Geschlechter-, Alters-, Diagnose- und Genexpressionsuntergruppen innerhalb des Hauptkollektivs dar und vergleicht diesbezüglich die Fälle mit und ohne *IGH*-Bruch.

**Tab. 5: Verteilung von Geschlecht, Alter, Diagnosen und Genexpressionstypen in der Patientengruppe mit *IGH*-Bruch im Vergleich zum gesamten Hauptkollektiv und zur Patientengruppe ohne *IGH*-Bruch.**

	Hauptkollektiv		Fälle ohne <i>IGH</i> -Bruch		Fälle mit <i>IGH</i> -Bruch	
	Anzahl	Anteil *	Anzahl	Anteil *	Anzahl (Anteil an Untergruppe)	Anteil *
<b>Gesamtanzahl</b>	143	100%	101	100%	42	100%
<b>Geschlecht</b>						
Weiblich	72	50%	50	49%	22 (31%)	52%
Männlich	69	48%	50	49%	19 (28%)	45%
Keine Angaben	2	2%	1	2%	1 (50%)	3%
Gesamt	143	100%	101	100%	42	100%
<b>Alter</b>						
≤ 14 Jahre	3	2%	3	3%	0 (0%)	0%
15 - 18 Jahre	1	1%	1	1%	0 (0%)	0%
> 18 Jahre	136	95%	95	94%	41 (30%)	98%
Keine Angaben	3	2%	2	2%	1 (33%)	2%
Gesamt	143	100%	101	100%	42	100%
<b>Diagnose</b>						
B-Zell-Lymphom, hochmaligne	13	9%	12	12%	1 (8%)	2%
Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	102	71%	69	68%	33 (32%)	79%
Follikuläres Lymphom Grad IIIa/b	15	11%	9	9%	6 (40%)	14%
Primär mediastinales großzelliges B-Zell- Lymphom	13	9%	11	11%	2 (15%)	5%
Gesamt	143	100%	101	100%	42	100%
<b>Genexpressionstyp</b>						
ABC	40	27%	33	33%	7 (18%)	17%
GCB	80	54%	54	53%	26 (33%)	62%
Keine Angaben	23	16%	14	14%	9 (39%)	21%
Gesamt	143	100%	101	100%	42	100%

(\* Die Darstellung der Prozentsätze ohne Dezimalstellen kann in Einzelfällen zu Rundungsfehlern führen; ABC activated B-cell-like; GCB germinal center B-cell-like)

### 3.2.2 Vorkommen im Nebenkollektiv

Zusätzlich zu den 143 Fällen des Hauptkollektivs wurden 21 weitere Tumorproben mittels FISH analysiert (siehe Abschnitt 2.1.1). Fünf Fälle dieses Nebenkollektivs zeigten einen *IGH*-Bruch auf Chromosom 14, was einem Anteil von 24% entsprach (Tab. 6).

<b>Tab. 6: Geschlecht, Alter und Diagnosen der Fälle mit <i>IGH</i>-Bruch im Nebenkollektiv.</b>			
<b>MPI-Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Diagnose</b>
MPI-715	w	73	Plasmozytom o.n.A.
MPI-631	m	47	Follikuläres Lymphom Grad 1
MPI-681	w	84	Plasmozytom o.n.A.
MPI-422	m	52	Mantelzell-Lymphom
MPI-519	w	79	Follikuläres Lymphom Grad 1
<i>(ABC activated B-cell-like; GCB germinal center B-cell-like; m männlich; MPI Max-Planck-Institut; o.n.A. ohne nähere Angaben; w weiblich)</i>			

### 3.3 Bioinformatische Analyse zur Detektion von *IGH*-Partnern

Aufgrund der Annahme, dass eine Fusion mit dem *IGH*-Gen auf Chromosom 14 zu einer vermehrten Expression des jeweiligen Gens führt [Cleary et al., 1986; Meyer et al., 1983], wurden in dieser Arbeit FISH- und Genexpressionsanalyse miteinander kombiniert. Alle 47 *IGH*-Bruch-positiven Fälle (42 aus dem Hauptkollektiv plus fünf aus dem Nebenkollektiv) wurden bezüglich einzelner Onkogene (genaue Liste siehe Anhang A2) mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen abgeglichen. Diese waren bereits im Vorfeld für die MMML-Studie durchgeführt worden. Mittels bioinformatischer Datenanalyse wurde jetzt überprüft, ob Fälle mit nachgewiesenem *IGH*-Bruch eines der ausgewählten Onkogene vermehrt exprimieren. Dabei wurden für 27 mögliche Onkogene jeweils die 1% bzw. 5% aller MMML-Fälle mit der stärksten Genexpression bestimmt. Auf diese Weise wurden Fälle mit besonders hohen Expressionsraten herausgefiltert und die Gruppe möglicher *IGH*-Translokationspartner in Form der vermehrt exprimierten Onkogene weiter eingegrenzt.

#### 3.3.1 Analyse mit einem p-Wert $\leq 0,01$ und $\leq 0,05$

Zwölf (29%) der 42 *IGH*-Bruch-positiven Fälle aus dem Hauptkollektiv zählten zu dem 1% aller MMML-Fälle mit der höchsten Expressionsrate für eines der 27 überprüften Onkogene (siehe Tab. 7).

<b>Tab. 7: Anzahl der Fälle mit <i>IGH</i>-Bruch aus dem Hauptkollektiv, die für einzelne Onkogene die höchsten Expressionsraten aufwiesen (bezogen auf das Gesamtkollektiv der MMML-Studie).</b>		
<b>Analysiertes Onkogen</b>	<b>p-Wert ≤ 0,01 (Anzahl)</b>	<b>p-Wert ≤ 0,05 (Anzahl)</b>
<i>CCND2</i>	1	6
<i>FCGR2B</i>	0	6
<i>CCND1</i>	4	5
<i>MUC1</i>	1	5
<i>NFKB2</i>	1	5
<i>ZFP36L1</i>	1	5
<i>BCL2</i>	0	3
<i>BCL11A</i>	0	3
<i>DDX6</i>	0	3
<i>MALT1</i>	1	3
<i>BCL3</i>	1	2
<i>BCL6</i>	0	2
<i>CCNE1</i>	1	2
<i>CDK6</i>	0	2
<i>IGLV4-60</i>	0	2
<i>PAX5</i>	0	2
<i>YSK4</i>	1	2
<i>BCL7A</i>	0	1
<i>CCND3</i>	0	1
<i>LOC100293713</i>	0	1
Gesamt	12	61
<i>(MMML Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen)</i>		

Sieben dieser Fälle wurden daraufhin weiterführend mittels FISH analysiert. Dabei wurde nach chromosomalen Aberrationen mit Beteiligung des jeweils vermehrt exprimierten Gens gesucht. Mit entsprechenden FISH-Sonden wurde auf *IGH/CCND1*- und *IGH/MALT*-Fusionen sowie auf Bruchpunkte in den Genorten von *CCND2*, *ZFP36L1*, *CCNE1* und *MUC1* getestet. In sechs der sieben weiter untersuchten Fälle handelte es sich um Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome vom centroblastischen Typ.

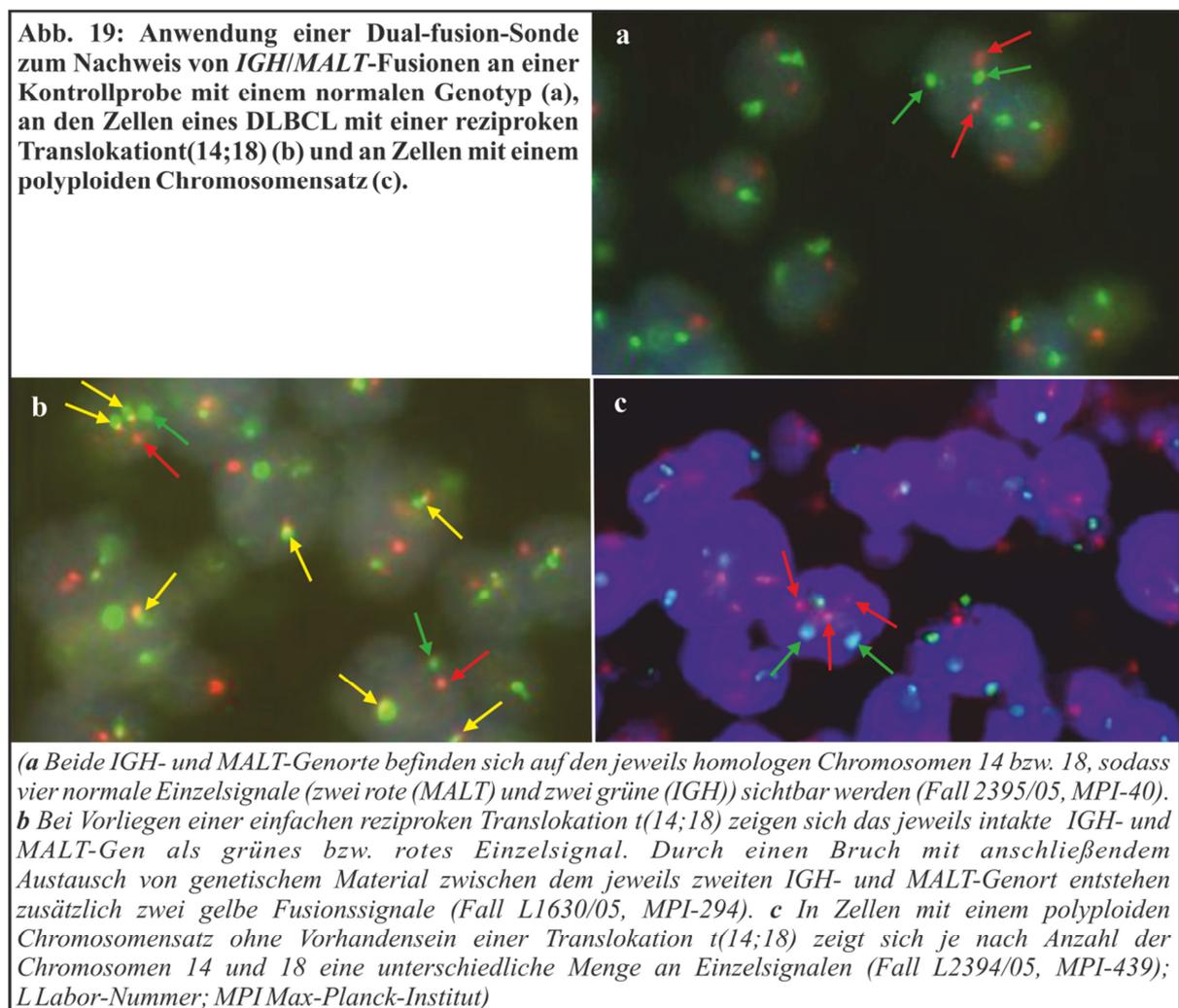
Zu den 5% aller MMML-Fälle mit der höchsten Expressionsrate für einzelne oder mehrere Onkogene zählten insgesamt 30 (einschließlich der oben genannten 12) Fälle mit *IGH*-Bruch des untersuchten Hauptkollektivs (siehe *Tab. 7*). Dies entsprach einem Anteil von 74% an allen 42 *IGH*-Bruch-positiven Tumorproben. Von diesen 30 Fällen wurden zwölf mittels FISH-Analyse ergänzend auf einzelne Fusionen oder Bruchpunkte getestet (zusätzlich zu den oben genannten sieben Fällen). Dabei wurde durch den Einsatz von Dual-fusion-Sonden nach *IGH/BCL6*-, *IGH/MALT*- und *IGH/CCND1*-Fusionen und mit Hilfe von Break-apart-Sonden nach Bruchpunkten in den Genen *MUC1*, *BCL3*, *BCL11A*, *NFKB2* und *CCND2* gesucht. In

acht dieser zwölf Fälle lag die Diagnose eines Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms vom centroblastischen Typ vor. Die Gesamtsumme von 61 in *Tab. 7* ergibt sich daraus, dass in einigen Tumorproben eine erhöhte Expressionsrate für gleichzeitig mehrere Gene nachgewiesen wurde.

Für keinen der fünf *IGH*-Bruch-positiven Fälle aus dem Nebenkollektiv (siehe *Tab. 6*) konnte eine stark erhöhte Expressionsrate bezüglich eines der überprüften Onkogene nachgewiesen werden.

### 3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit ergänzenden Sonden zur Detektion der *IGH*-Translokationspartner

Fälle mit nachgewiesenem *IGH*-Bruch wurden zusätzlich mittels Dual-fusion-Sonden auf mögliche Genfusionen untersucht. Dabei zeigten sich unter anderem die in *Abb. 19* dargestellten Signalkonstellationen.



3.4.1 Fälle aus der Gruppe mit einem p-Wert  $\leq 0,01$ Tab. 8: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an den Fällen mit einem p-Wert  $\leq 0,01$ .

MPI-Nr.	Vermehrte Expression von	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung					
		<i>IGH/CCND1</i> -Fusion	<i>CCND2</i> -Bp.	<i>ZFP36L1</i> -Bp.	<i>IGH/MALT</i> -Fusion	<i>CCNE1</i> -Bp.	<i>MUC1</i> -Bp.
294	<i>CCND1</i>	pos					
440	<i>CCND1</i>	pos					
418	<i>CCND2</i>		neg				
655	<i>CCNE1</i>					neg	
548	<i>MALT</i>				neg		
550	<i>MUC1</i>						neg
179	<i>ZFP36L1</i>			neg			

(Bp. Bruchpunkt; neg negativ; MPI Max-Planck-Institut; Nr. Nummer; pos positiv)

Insgesamt zwei der sieben getesteten Fälle zeigten eine *IGH/CCND1*-Fusion. Bei diesen handelte es sich um DLBCLs vom centroblastischen Typ. In den restlichen fünf Tumorproben konnten mittels der hier verwendeten Sonden keine Translokation bzw. kein Bruch des entsprechenden Kandidaten-Partnergens nachgewiesen werden (siehe Tab. 8).

3.4.2 Fälle aus der Gruppe mit einem p-Wert  $\leq 0,05$ Tab. 9: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an den Fällen mit einem p-Wert  $\leq 0,05$ .

MPI-Nr.	Vermehrte Expression von	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung							
		<i>CCND2</i> -Bp.	<i>IGH/CCND1</i> -Fusion	<i>MUC1</i> -Bp.	<i>BCL11A</i> -Bp.	<i>IGH/BCL6</i> -Fusion	<i>NFKB2</i> -Bp.	<i>IGH/MALT</i> -Fusion	<i>BCL3</i> -Bp.
566	<i>BCL3</i>								neg
439	<i>BCL6</i>					neg			
440	<i>BCL11A</i>				neg				
696	<i>BCL11A</i>				neg				
678	<i>CCND1</i>		neg						
277	<i>CCND2</i>	neg							
347	<i>CCND2</i>	neg							
566	<i>CCND2</i>	neg							
664	<i>MALT</i>							pos	
548	<i>MUC1</i>			neg					
312	<i>NFKB2</i>						neg		
379	<i>NFKB2</i>						neg		

(Bp. Bruchpunkt; MPI Max-Planck-Institut; neg negativ; Nr. Nummer; pos positiv)

Bei einem der zwölf getesteten Fälle aus dieser Gruppe zeigte sich in den ergänzenden Untersuchungen eine *IGH/MALT*-Fusion. Dabei handelte es sich ebenfalls um ein Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom vom centroblastischen Typ. In den übrigen Tumorproben konnten mit Hilfe der ausgewählten FISH-Sonden keine Translokation bzw. kein Bruch der entsprechenden Gene nachgewiesen werden (siehe *Tab. 9*).

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, neue Translokationspartner des Immunglobulinschwerkettengens auf Chromosom 14 in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen zu identifizieren. Dazu wurden zunächst mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung 143 Fälle, in denen die häufigsten Translokationen (beispielsweise die t(8;14) und die t(14;18)) bereits ausgeschlossen worden waren, auf das Vorhandensein eines *IGH*-Bruchs getestet. Alle untersuchten Tumorproben entstammten dabei dem Kollektiv des MMML-Projekts der Deutschen Krebshilfe, welches die molekularen Mechanismen in malignen Lymphomen erforscht. Um Fälle mit einem nachgewiesenen *IGH*-Bruch im Anschluss gezielt auf bisher unbekannte Translokationspartner untersuchen zu können, wurden zusätzlich die Ergebnisse der im Vorfeld bereits durchgeführten Genexpressionsanalysen herangezogen. Grundlage für dieses Vorgehen war die Annahme, dass die Positionierung eines Gens neben den *IGH*-Genort zu einer Überexpression dieses Gens führt [Cleary et al., 1986; Meyer et al., 1983]. Gewebeproben mit stark erhöhter Expressionsrate für einzelne oder mehrere der 27 überprüften Onkogene wurden anschließend gezielt auf Fusionen des Immunglobulinschwerkettengens mit dem entsprechenden Onkogen bzw. auf Brüche dieses Onkogens getestet. Mit dieser Herangehensweise konnte in zwei Fällen eine *IGH/CCND1*-Fusion nachgewiesen werden. Eine weitere Tumorprobe wies eine *IGH/MALT*-Fusion auf. Die hier angewandte Methodik eignet sich somit durchaus für die Suche nach Translokationspartnern eines Gens. Die Tatsache, dass das hier untersuchte Studienkollektiv bereits vorselektiert war (die häufigsten Translokationen waren bereits ausgeschlossen worden) und dennoch 29% der untersuchten Gewebeproben einen *IGH*-Bruch aufwiesen, untermauert außerdem die Existenz weiterer bisher unbekannter Translokationspartner des *IGH*-Gens in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen.

### 4.1 Methodische Aspekte

#### 4.1.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Kryoschnitten

Ein großer Vorteil der durchgeführten FISH-Analyse liegt in der Anwendbarkeit sowohl an jahrelang gelagerten Gewebeschnitten als auch an frischem Tumormaterial [Chang et al., 2009]. Zusätzlich machen die Durchführbarkeit an Interphasezellen (somit sind nicht zwingend Metaphasezellen erforderlich) und die Möglichkeit der direkten mikroskopischen Auswertung die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Methode der Wahl für die Detektion chromosomaler Translokationen. Im Rahmen des MMML-Projekts wurden sämtliche

Gewebebiopsien bzw. Tumorsektate in Form von Kryoschnitten gelagert. Dabei können unter dem Mikroskop ausgewertete Zellen direkt dem entsprechenden Areal im Tumor bzw. im Gewebe zugeordnet werden [Belaud-Rotureau *et al.*, 2002]. Die teils starke Zellüberlappung in den Gewebeschnitten erschwerte grundsätzlich die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Um dennoch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Schnitte komplett analysiert (keine Begrenzung auf 100 ausgewertete Zellen pro Präparat) und das Augenmerk besonders auf Tumorareale gelegt, in denen die Signale eindeutig einzelnen Zellen zugeordnet werden konnten. Bei schlechter Qualität in Form eines starken Fluoreszenzhintergrundes oder einer extrem schwachen Signalstärke wurden die Präparate stets ein zweites Mal hybridisiert. Bei anhaltend schlechter Qualität kam ein neuer Kryoschnitt des entsprechenden Tumors zum Einsatz. Auf diese Weise konnten alle 143 vorgesehenen Fälle aussagekräftig ausgewertet werden.

#### **4.1.1.1 Anwendung zur Detektion von Bruchpunkten**

Bereits 1995 zeigten Taniwaki *et al.*, dass die FISH-Analyse an Interphasekernen mit zweifarbigen Break-apart (BAP)-Sonden eine gute und schnelle Methode zur Detektion von Bruchpunkten im *IGH*-Genort 14q32 darstellt (45% - 74% Splitsignale in Tumorzellen gegenüber 4% - 5% in normalen Kontrollzellen). Ein Bruch im entsprechenden Gen wird bei Anwendung dieser Sondenform relativ eindeutig in Form einzelner grüner und roter Signale sichtbar (Cut-off-Wert 1% - 5% bei einem Signalabstand von 2 - 3 Signaldurchmessern) [Cremer *et al.*, 1986; van Rijk *et al.*, 2008; Ventura *et al.*, 2006]. Zeppa *et al.* konnten 2012 erneut die höhere Sensitivität der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung gegenüber PCR-Methoden bei der Detektion von *IGH*-Bruchpunkten zeigen. Ein weiterer Vorteil entsteht bei der kombinierten Anwendung von Break-apart- und Dual-fusion-Sonden: Nachdem mittels einer BAP-Sonde zunächst der Bruch eines Gens nachgewiesen wird, kann man anschließend mithilfe einer Dual-fusion-Sonden gezielter nach Translokationen suchen, an denen das „gebrochene“ Gen beteiligt ist [van Rijk *et al.*, 2008]. Auf diese Weise können Translokationen detektiert werden, ohne dass von Beginn an beide Translokationspartner bekannt sein müssen. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit BAP-Sonden stellt somit eine grundlegende Methode für die Suche nach unbekanntem Translokationspartnern des *IGH*-Gens dar [van Rijk *et al.*, 2008].

Der bedeutendste Nachteil der FISH mit Break-apart-Sonden beispielsweise gegenüber der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist die Tatsache, dass keine Angaben zur genauen Lokalisation des Bruchpunkts innerhalb des Genorts gemacht werden können [Barrans *et al.*,

2003]. Diese Fragestellung stand jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch nicht im Vordergrund.

#### **4.1.1.2 Anwendung zur Identifizierung von Translokationspartnern**

Für die Identifizierung neuer Translokationspartner des *IGH*-Gens wurden in dieser Arbeit neben den oben diskutierten BAP-Sonden (siehe 4.1.1.1) auch sogenannte Dual-fusion-Sonden eingesetzt.

Bereits 1998 zeigten *Siebert et al.*, dass die Translokation t(11;14) in Mantelzelllymphomen durch die Anwendung der FISH-Analyse mit Dual-fusion-Sonden an Interphasekernen wesentlich zuverlässiger detektiert wird als mit diversen molekulargenetischen Verfahren. Dies begründet sich unter anderem in der Tatsache, dass das Ergebnis der FISH-Analyse im Vergleich zur Chromosomen-, Southern Blot- oder PCR-Analyse weniger abhängig von der genauen Bruchpunktkalisation innerhalb des *IGH*-Genorts ist [*Siebert et al.*, 1998]. Auch *Belaud-Rotureau et al.* wiesen 2002 für die FISH mit Dual-fusion-Sonden eine deutlich höhere Sensitivität nach als man sie bei PCR-Techniken findet (Sensitivität 97% versus 37% für die Translokation t(11;14) in Mantelzelllymphomen). Dass die FISH-Technik auch in der Anwendung an archivierten Geweben hochsensitiv ist, konnten *Barrans et al.* 2003 anhand einer *IGH/BCL2*-Sonde (Nachweisgrenze 5%) zeigen. Zusätzlich liegt ein grundsätzlicher Vorteil bei den Dual-fusion-Sonden darin, dass gleich zwei Prinzipien der FISH-Analyse, das sogenannte Signal-Splitting und die Entstehung eines Fusionssignals, miteinander kombiniert werden. Dies führt im Vergleich mit der PCR-Analyse zu einer Reduktion falsch-negativer Ergebnisse (0% versus 40% falsch-negative Ergebnisse) [*Barrans et al.*, 2003].

## **4.2 Patientenkollektiv**

Das „Hauptkollektiv“ dieser Arbeit bildeten 143 Fälle reifer aggressiver B-Zell-Lymphome. Bei diesen handelte es sich um eine bereits vorselektierte Gruppe, die aus den zur Verfügung stehenden 962 Fällen der MMML-Kohorte zusammengestellt wurde (Ein- und Ausschlusskriterien siehe *Material und Methoden 2.1.1*). In früheren Studien zu *IGH*-Translokationspartnern in Lymphomen wurden ähnliche Fallzahlen herangezogen. Beispielsweise untersuchten *Martin-Subero et al.* (2006) 232 klassische Hodgkin-Lymphome um das Vorhandensein von *IGH*-Aberrationen in dieser Lymphomentität genauer zu analysieren und konnten mit dem *MHC2TA*-Gen einen möglichen Translokationspartner identifizieren. *Szymanowska et al.* (2008) arbeiteten mit 94 klassischen Hodgkin-Lymphomen und *Tamura et al.* (2001) wählten eine Fallzahl von 173 B-Zell-Lymphomen aus. Das

Kollektiv von *Lenz et al. (2007)* zur Untersuchung der sogenannten „class switch recombination“ von Immunglobulinen in Lymphomen umfasste 92 Patienten mit einem DLBCL und 17 Fälle von MALT Lymphomen. Somit kann das hier untersuchte Kollektiv aus 143 bereits vorselektierten Fällen durchaus als ausreichend angesehen werden. Ein möglicher Kritikpunkt in Bezug auf die untersuchte Fallzahl ist die Tatsache, dass sich die hier analysierten Fälle auf vier Diagnosegruppen aufteilen und nicht einer einzelnen Lymphomentität zugeordnet werden können.

### **4.3 Immunglobulinschwerketten-Genort**

#### **4.3.1 Bruchpunkte in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen**

In 29% der 143 getesteten Fälle konnte mittels FISH-Analyse ein Bruch im Immunglobulinschwerketten-Genort auf Chromosom 14 nachgewiesen werden. Möchte man dieses Ergebnis mit denen anderer Studien vergleichen, so ist die Tatsache, dass in dieser Arbeit Fälle mit häufigen Translokationen [t(8;14) und t(14;18)] bereits im Vorfeld aus dem Kollektiv herausselektiert wurden, von großer Bedeutung. *Bernicot et al. (2005)* wiesen beispielsweise in 46% der von ihnen analysierten DLBCLs (n=26) Veränderungen des *IGH*-Gens nach. Der Anteil der Translokation t(14;18) an der Gesamtheit der nachgewiesenen *IGH*-Mutationen betrug jedoch 42%. In einer Arbeit von *Pervez et al. (2009)* wurde diese Translokation sogar in 38,9% der untersuchten Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (n=90) nachgewiesen. Der im Vergleich „niedrige“ Anteil der *IGH*-Brüche an den hier untersuchten Fällen (29% im Hauptkollektiv, 32% in der Gruppe der DLBCLs), lässt sich somit durch die Vorselektion der untersuchten Kohorte begründen. Berücksichtigt man diese speziellen Studienbedingungen, unterstützen die nachgewiesenen *IGH*-Brüche vielmehr die Hypothese, dass das Immunglobulinschwerkettengen in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen mit mehr Translokationspartnern interagiert als bisher bekannt.

#### **4.3.2 Translokationspartner in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen und deren Bedeutung**

Um den Kreis potenzieller Translokationspartner weiter eingrenzen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals FISH- und Genexpressionsanalyse miteinander kombiniert. Dabei wurden 27 sogenannte Protoonkogene herangezogen (Tabelle siehe *Anhang A2*) und für alle Fälle mit nachgewiesenem *IGH*-Bruch das Expressionsniveau dieser möglichen Onkogene analysiert. 30 der 42 *IGH*-Bruch-positiven Fälle des Hauptkollektivs gehörten zu den 5% aller MMML-Fälle mit der höchsten Expressionsrate für einzelne oder mehrere dieser

Gene. Einige der Fälle wurden daraufhin auf Translokationen des *IGH*-Gens mit dem entsprechenden Onkogen untersucht. Durch die hier angewandte Methodik konnte in zwei Fällen eine *IGH/CCND1*-Fusion, in einem weiteren Fall eine *IGH/MALT*-Fusion nachgewiesen werden, sodass die Kombination aus FISH- und Genexpressionsanalyse als sinnvoller Ansatz für die weitere Suche nach *IGH*-Translokationspartnern anzusehen ist.

Da eine Translokation t(11;14) mit der daraus resultierenden *CCND1*-Überexpression in nahezu allen Mantelzelllymphomen und nur selten in einigen aggressiven Formen der CLL oder des Multiplen Myeloms nachgewiesen werden kann [Campo *et al.*, 1999; Raffeld *et al.*, 1991], ist davon auszugehen, dass es sich bei den zwei Tumorproben mit nachgewiesener *IGH/CCND1*-Fusion eventuell um transformierte Mantelzelllymphome handelt.

#### **4.3.3 Mögliche diagnostische und prognostische Bedeutung von Translokationen in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen**

Bereits in vorausgegangenen Studien konnte der Einfluss genetischer Tumoreigenschaften auf den Verlauf und die Prognose einer Lymphomerkrankung nachgewiesen werden. Alizadeh *et al.* (2000) zeigten, dass Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome vom GCB-Genexpressionstyp mit einer deutlich besseren Prognose vergesellschaftet sind als diejenigen vom ABC-Typ. Jedoch wurde auch deutlich, dass die enorme Heterogenität der DLBCLs nicht alleine auf den unterschiedlichen Genexpressionstypen beruhen kann, sodass weiterhin nach sogenannten Schlüsselgenen gesucht wird, die den Krankheitsverlauf mitbestimmen. Rosenwald *et al.* zeigten 2002, dass sich die typische Translokation t(14;18), die mit einer erhöhten *BCL2*-Expression assoziiert ist, ausschließlich in DLBCLs vom GCB-Typ nachweisen lässt. Auch die Tatsache, dass Zielgene des antiapoptotischen NF $\kappa$ B in Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen vom ABC-Typ vermehrt und in jenen vom GCB-Typ vermindert exprimiert werden [Davis *et al.*, 2001], unterstützt die Annahme, dass einzelne Gene den Verlauf einer Lymphomerkrankung spezifisch beeinflussen können. Durch eine Translokation mit dem hier untersuchten Immunglobulinschwerkettengen als Partner könnten diese Gene überexprimiert sein [Cleary *et al.*, 1986; Meyer *et al.*, 1983]. Diese Arbeit liefert somit eine Basis für die weitere Suche nach Faktoren, die die Risikostratifizierung reifer aggressiver B-Zell-Lymphome beeinflussen.

#### **4.4 Fazit und Ausblick**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Immunglobulinschwerkettengen auf Chromosom 14 neben den bereits bekannten und häufigen Translokationen t(8;14) und

t(14;18) auch Translokationen mit bisher unbekanntem Partnergenen eingeht. Ein knappes Drittel der hier untersuchten 143 Fälle des Hauptkollektivs (bei denen die genannten häufigen Translokationen im Vorfeld bereits ausgeschlossen worden waren) wurde mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung positiv auf einen *IGH*-Bruch getestet. Im Rahmen dieser Arbeit konnten noch keine neuen Translokationspartner identifiziert werden, was auf die hier gewählte Strategie zurückzuführen ist. Dennoch unterstützen die hier präsentierten Ergebnisse das Vorhandensein dieser unbekanntem Translokationspartner und liefern so eine Grundlage für zukünftige Studien. Die Kombination aus FISH- und Genexpressionsanalyse stellte sich als sinnvolle Methode für die Suche nach *IGH*-Translokationspartnern heraus. Im Rahmen von Genomprojekten, wie sie beispielsweise durch das „International Cancer Genome Consortium“ (ICGC) koordiniert werden, und durch detailliertere Untersuchungen an weiteren Fällen (möglicherweise durch die Kombination mit PCR-Analysen) wird man in nächster Zeit neue *IGH*-Translokationspartner in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen entschlüsseln. Lassen sich diese dann zusätzlich mit bestimmten Krankheitsverläufen in Verbindung bringen, kann sowohl die Diagnose- und Prognosestellung als auch die Therapieplanung im individuellen Patientenfall sicher weiter verbessert werden. Dem individuellen Risikoprofil ihres Tumors entsprechend, könnten Patienten dann bereits früher einer für sie adäquaten Therapie zugeführt werden.

## 5 Zusammenfassung

Krankheitsspezifische chromosomale Aberrationen spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von B-Zell-Lymphomen und gewinnen auch hinsichtlich neuer Therapieansätze zunehmend an Bedeutung. Die Kernfrage dieser Arbeit war, ob in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen neben den bereits bekannten Translokationen weitere Translokationspartner des *IGH*-Gens auf Chromosom 14 existieren und identifiziert werden können. Für diese Fragestellung wurden FISH- und Genexpressionsanalyse miteinander kombiniert.

Das „Hauptkollektiv“ bestand aus 143 Patienten mit reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen, die zur sogenannten MMML-Kohorte gehören, einer Studie der Deutschen Krebshilfe. Diese untersucht molekulare Mechanismen in malignen Lymphomen und bildete die Grundlage der vorliegenden Arbeit. Hierfür wurden Fälle der MMML-Studie, bei denen die häufigsten in Lymphomen bekannten Translokationen (t(8;14) und t(14;18)) bereits ausgeschlossen worden waren, zunächst mittels FISH-Analyse auf *IGH*-Brüche getestet. 42 der 143 analysierten Fälle wiesen einen Bruch im Genort der Immunglobulinschwerkette auf. Für diese Tumorproben wurden anschließend die RNA-Expressionsraten von 27 ausgewählten Onkogenen überprüft. Die hierfür notwendigen Genexpressionsanalysen waren bereits im Rahmen der MMML-Studie durchgeführt worden. 30 von 42 Tumorproben mit *IGH*-Bruch gehörten zu den 5% des MMML-Kollektivs mit der höchsten Expressionsrate für einzelne oder mehrere der überprüften Onkogene. 19 dieser Fälle mit erhöhten Genexpressionsraten wurden daraufhin mittels FISH-Analyse auf *IGH*-Translokationen mit Beteiligung des entsprechenden Onkogens untersucht. Dabei konnten zwei Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome mit *IGH/CCND1*-Fusion (höchstwahrscheinlich handelte es sich dabei somit um transformierte Mantelzelllymphome) sowie ein Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit *IGH/MALT*-Fusion nachgewiesen werden.

Insgesamt 21 zusätzliche Fälle der MMML-Kohorte, deren Lymphomdiagnosen von denen des „Hauptkollektivs“ abwichen, bildeten das sogenannte „Nebenkollektiv“. An diesem wurden ebenfalls die geschilderten Untersuchungsschritte durchgeführt. Dabei wurden fünf *IGH*-Brüche nachgewiesen, jedoch wies keiner dieser Fälle eine stark erhöhte Expressionsrate für eines der untersuchten Onkogene auf.

Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit noch keine neuen *IGH*-Translokationspartner in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen identifiziert werden konnten, hat sich dennoch gezeigt, dass die gewählte Kombination aus FISH- und Genexpressionsanalyse eine geeignete Methode für die Suche sowohl nach bekannten als auch nach unbekanntem Translokationen darstellt.

Insbesondere die Tatsache, dass während der Zusammenstellung des Studienkollektivs die Fälle mit häufigen Translokationen bereits herausgefiltert worden waren und trotzdem in 29% der untersuchten Lymphome ein *IGH*-Bruch nachgewiesen werden konnte, untermauert die Existenz weiterer *IGH*-Translokationspartner in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen. Im Rahmen von Genomprojekten werden diese in zeitnaher Zukunft entschlüsselt werden können.

## 6 Literaturverzeichnis

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM: Distinct types of diffuse large b-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403(6769), 503-511(2000)

Arber DA: Molecular diagnostic approach to non-Hodgkin's lymphoma. *J. Mol. Diagn.* 2(4), 178-190(2000)

Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Owen RG, Morgan GJ, Jack AS: The detection of t(14;18) in archival lymph nodes: development of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method and evaluation by comparison with polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.* 5(3), 168-175(2003)

Belaud-Rotureau MA, Parrens M, Dubus P, Garroste JC, de Mascarel A, Merlio JP: A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. *Mod. Pathol.* 15(5), 517-525(2002)

Bentink S, Wessendorf S, Schwaenen C, Rosolowski M, Klapper W, Rosenwald A, Ott G, Banham AH, Berger H, Feller AC, Hansmann ML, Hasenclever D, Hummel M, Lenze D, Möller P, Stuerzenhofecker B, Loeffler M, Truemper L, Stein H, Siebert R, Spang R; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe: Pathway activation patterns in diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia* 22(9), 1746-1754(2008)

Bernicot I, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Morice P, Abgrall JF, Berthou C, Morel F, De Braekeleer M: Characterization of IGH rearrangements in non-Hodgkin's B-cell lymphomas by fluorescence in situ hybridization. *Anticancer Res.* 25(5), 3179-3182(2005)

Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth BM, Wolf U: Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland – Entwicklung der Prävalenz zwischen 1990 und 2010, 1. Auflage 2010, S. 140 ff., Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert-Koch-Institut (Hrsg.), Berlin

Buño I, Nava P, Alvarez-Doval A, Alvarez-Rodríguez F, Díez-Martín JL, Menárguez J: Lymphoma associated chromosomal abnormalities can easily be detected by FISH on tissue imprints. An underused diagnostic alternative. *J. Clin. Pathol.* 58(6), 629-633(2005)

Campo E, Raffeld M, Jaffe ES: Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol.* 36(2), 115-27(1999)

Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES: The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117(19), 5019-5032(2011)

Chaganti RS, Nanjangud G, Schmidt H, Teruya-Feldstein J: Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance. *Semin. Hematol.* 37(4), 396-411(2000)

Chang CM, Schroeder JC, Huang WY, Dunphy CH, Baric RS, Olshan AF, Dorsey KC, Dent GA, Cerhan JR, Lynch CF, Rothman N, Cantor KP, Blair A: Non-Hodgkin lymphoma (NHL) subtypes defined by common translocations: utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in a case-control study. *Leuk. Res.* 34(2), 190-195(2010)

Cleary ML, Smith SD, Sklar J: Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 47(1), 19-28(1986)

Coiffier B: State-of-the-art therapeutics: diffuse large b-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 23, 6387-6393(2005)

Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepage G, Plantier I, Castaigne S, Lefort S, Marit G, Macro M, Sebban C, Belhadj K, Bordessoule D, Fermé C, Tilly H: Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 116(12), 2040-2045(2010)

Cremer T, Landegent J, Brückner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M: Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum. Genet.* 74(4), 346-352(1986)

Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM: Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 79(24), 7824-7827(1982)

Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM: Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated b-cell-like diffuse large b-cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* 194(12), 1861-1874(2001)

De Jong D, Voetdijk BM, Beverstock GC, van Ommen GJ, Willemze R, Kluin PM: Activation of the c-myc oncogene in a precursor-b-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 318(21), 1373-1378(1988)

Dierlamm J, Murga Penas EM, Bentink S, Wessendorf S, Berger H, Hummel M, Klapper W, Lenze D, Rosenwald A, Haralambieva E, Ott G, Cogliatti SB, Möller P, Schwaenen C, Stein H, Löffler M, Spang R, Trümper L, Siebert R; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe: Gain of chromosome region 18q21 including the MALT1 gene is associated with the activated b-cell-like gene expression subtype and increased BCL2 gene dosage and protein expression in diffuse large b-cell lymphoma. *Haematologica* 93(5), 688-696(2008)

Diviné M, Casassus P, Koscielny S, Bosq J, Sebban C, Le Maignan C, Stamattoulas A, Dupriez B, Raphaël M, Pico JL, Ribrag V; GELA; GOELAMS: Burkitt lymphoma in adults: a prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. *Ann. Oncol.* 16, 1928-1935(2005)

Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U, Waxdal MJ: The covalent structure of an entire gamma G immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63(1), 78-85(1969)

Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, Christian B, Lepage E, Tilly H, Morschhauser F, Gaulard P, Salles G, Bosly A, Gisselbrecht C, Reyes F, Coiffier B: Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 23(18), 4117-4126(2005)

Fisher RI, Miller TP, O'Connor OA: Diffuse aggressive lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 221-236(2004)

Flowers CR, Sinha R, Vose JM: Improving outcomes for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *CA Cancer J Clin.* 60(6), 393-408(2010)

Friedberg JW, Fisher RI: Diffuse large b-cell lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 22(5), 941-952(2008)

Gall JG, Pardue ML: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 63(2), 378-383(1969)

Gellert M: Molecular analysis of V(D)J recombination. *Annu. Rev. Genet.* 26, 425-446(1992)

Gesk S, Klapper W, Martín-Subero JI, Nagel I, Harder L, Fu K, Bernd HW, Weisenburger DD, Parwaresch R, Siebert R: A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 108(3), 1109-1110(2006)

Ghielmini M: Follicular lymphoma. *Ann. Oncol.* 21 Suppl 7, vii151-vii153(2010)

Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, Dakhil SR, Woda B, Fisher RI, Peterson BA, Horning SJ: Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large b-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 24(19), 3121-3127(2006)

Heim S, Mitelman F, Siebert R: *Cancer Cytogenetics*, 3. Auflage 2009, Kap.10: Mature b- and t-cell neoplasms and Hodgkin lymphoma, Wiley-Blackwell, New York

Horn H, Schmelter C, Leich E, Salaverria I, Katzenberger T, Ott MM, Kalla J, Romero M, Siebert R, Rosenwald A, Ott G: Follicular lymphoma grade 3b is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles. *Haematologica* 96(2011)

Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL, Lynch JC, Armitage JO, Warnke RA, Alizadeh AA, Lossos IS, Levy R, Chan WC: The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large b-cell lymphoma with a germinal center b-cell gene expression profile. *Blood* 99(7), 2285-2290(2002)

Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, Bernd HW, Cogliatti SB, Dierlamm J, Feller AC, Hansmann ML, Haralambieva E, Harder L, Hasenclever D, Kühn M, Lenze D, Lichter P, Martin-Subero JI, Möller P, Müller-Hermelink HK, Ott G, Parwaresch

RM, Pott C, Rosenwald A, Rosolowski M, Schwaenen C, Stürzenhofecker B, Szczepanowski M, Trautmann H, Wacker HH, Spang R, Loeffler M, Trümper L, Stein H, Siebert R; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe: A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N. Engl. J. Med.* 354(23), 2419-2430(2006)

Husmann G, Kaatsch P, Katalinik A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends, 7. Auflage 2010, S. 100 ff., Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.), Berlin

Jacobson JO, Aisenberg AC, Lamarre L, Willett CG, Linggood RM, Miketic LM, Harris NL: Mediastinal large cell lymphoma. An uncommon subset of adult lymphoma curable with combined modality therapy. *Cancer* 62(9), 1893-1898(1998)

Kearney L: The impact of the new fish technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* 104(4), 648-658(1999), Review

Klapper W, Szczepanowski M, Burkhardt B, Berger H, Rosolowski M, Bentink S, Schwaenen C, Wessendorf S, Spang R, Möller P, Hansmann ML, Bernd HW, Ott G, Hummel M, Stein H, Loeffler M, Trümper L, Zimmermann M, Reiter A, Siebert R; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe: Molecular profiling of pediatric mature b-cell lymphoma treated in population-based prospective clinical trials. *Blood* 112(4), 1374-1381(2008)

Klein U, Rajewsky K, Küppers R: Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood b-cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) b-cells. *J. Exp. Med.* 188(9), 1679-1689(1998)

Kompetenznetz Maligne Lymphome e.V., Sprecher und V.i.S.d.P. nach §10 Abs.3 MDStV: Prof. Dr. Michael Hallek, Köln, 2010, Internetpräsenz [www.lymphome.de](http://www.lymphome.de)

Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K: Cellular origin of human b-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 341(20), 1520-1529(1999)

Küppers R, Dalla-Favera R: Mechanisms of chromosomal translocations in b-cell lymphomas. *Oncogene* 20(40), 5580-5594(2001), Review

Lenz G, Nagel I, Siebert R, Roschke AV, Sanger W, Wright GW, Dave SS, Tan B, Zhao H, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Campo E, Jaffe ES, Smeland EB, Fisher RI, Kuehl WM, Chan WC, Staudt LM: Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated b-cell-like diffuse large b-cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 204(3), 633-643(2007)

Levitt LJ, Aisenberg AC, Harris NL, Linggood RM, Poppema S: Primary non-Hodgkin's lymphoma of the mediastinum. *Cancer* 50(11), 2486-2492(1982)

Lichtenstein AK, Levine A, Taylor CR, Boswell W, Rossman S, Feinstein DI, Lukes RJ: Primary mediastinal lymphoma in adults. *Am. J. Med.* 68(4), 509-514(1980)

McBride OW, Battey J, Hollis GF, Swan DC, Siebenlist U, Leder P: Localization of human variable and constant region immunoglobulin heavy chain genes on subtelomeric band q32 of chromosome 14. *Nucleic Acids Res.* 10(24), 8155-8170(1982)

Maizels N: Immunoglobulin class switch recombination: will genetics provide new clues to mechanism? *Am. J. Hum. Genet.* 64(5), 1270-1275(1999), Review

Marcheselli L, Marcheselli R, Bari A, Liardo E, Morabito F, Baldini L, Brugiattelli M, Merli F, Renzo ND, Sacchi S: Radiation therapy improves treatment outcome in patients with diffuse large b-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma*(2011)

Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Hansmann ML, Dyer MJ, Siebert R: Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99(4), 1474-1477(2002)

Martín-Subero JI, Wlodarska I, Bastard C, Picquetot JM, Höppner J, Giefing M, Klapper W, Siebert R: Chromosomal rearrangements involving the BCL3 locus are recurrent in classical Hodgkin and peripheral t-cell lymphoma. *Blood* 108(1), 401-402(2006)

Martín-Subero JI, Klapper W, Sotnikova A, Callet-Bauchu E, Harder L, Bastard C, Schmitz R, Grohmann S, Höppner J, Riemke J, Barth TF, Berger F, Bernd HW, Claviez A, Gesk S, Frank GA, Kaplanskaya IB, Möller P, Parwaresch RM, Rüdiger T, Stein H, Küppers R, Hansmann ML, Siebert R; Deutsche Krebshilfe Network Project Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas: Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 66(21), 10332-10338(2006)

Martín-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, Wickham-Garcia E, Rosolowski M, Richter J, Lopez-Serra L, Ballestar E, Berger H, Agirre X, Bernd HW, Calvanese V, Cogliatti SB, Drexler HG, Fan JB, Fraga MF, Hansmann ML, Hummel M, Klapper W, Korn B, Küppers R, Macleod RA, Möller P, Ott G, Pott C, Prosper F, Rosenwald A, Schwaenen C, Schübeler D, Seifert M, Stürzenhofecker B, Weber M, Wessendorf S, Loeffler M, Trümper L, Stein H, Spang R, Esteller M, Barker D, Hasenclever D, Siebert R; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe: New insights into the biology and origin of mature aggressive b-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood* 113(11), 2488-2497(2009)

Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, Knowles DM: Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood* 88(10), 3937-3944(1996)

Meyer G, Nicoli J: Cancers, oncogenesis and oncogenes. *Med Trop (Mars)* 43(3), 217-225(1983)

Moore KL, Hay JC: Human Chromosomes: II. Preparation, Analysis and Diagnostic Implications of Abnormalities. *Can. Med. Assoc. J.* 88(21), 1071-1079(1963)

Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS: Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107(1), 265-276(2006)

Nagel I, Akasaka T, Klapper W, Gesk S, Böttcher S, Ritgen M, Harder L, Kneba M, Dyer MJ, Siebert R: Identification of the gene encoding cyclin E1 (CCNE1) as a novel IGH translocation partner in t(14;19)(q32;q12) in diffuse large b-cell lymphoma. *Haematologica* 94(7), 1020-1023(2009)

Nagel I, Bug S, Tönnies H, Ammerpohl O, Richter J, Vater I, Callet-Bauchu E, Calasanz MJ, Martinez-Climent JA, Bastard C, Salido M, Schroers E, Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Majid A, Dyer MJ, Siebert R: Biallelic inactivation of TRAF3 in a subset of b-cell lymphomas with interstitial del(14)(q24.1q32.33). *Leukemia* 23(11), 2153-2155(2009)

Nakamura S, Ye H, Bacon CM, Goatly A, Liu H, Kerr L, Banham AH, Streubel B, Yao T, Tsuneyoshi M, Savio A, Takeshita M, Dartigues P, Ruskoné-Fourmestreaux A, Matsumoto T, Iida M, Du MQ: Translocations involving the immunoglobulin heavy chain gene locus predict better survival in gastric diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 14(10), 3002-3010(2008)

Oschlies I, Klapper W, Zimmermann M, Krams M, Wacker HH, Burkhardt B, Harder L, Siebert R, Reiter A, Parwaresch R: 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) Multicenter Trial. *Blood* 107(10), 4047-4052(2006)

Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rüdiger T, Wilhelm M, Kalla J, Rosenwald A, Müller JG, Ott MM, Müller-Hermelink HK: Cytomorphologic, immunohistochemical and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 99(10), 3806-3812(2002)

Patte C, Auperin A, Gerrard M, Michon J, Pinkerton R, Sposto R, Weston C, Raphael M, Perkins SL, McCarthy K, Cairo MS; FAB/LMB96 International Study Committee: Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood* 109(7); 2773-2780(2007)

Persky DO, Unger JM, Spier CM, Stea B, LeBlanc M, McCarty MJ, Rimsza LM, Fisher RI, Miller TP; Southwest Oncology Group: Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-stage aggressive b-cell lymphoma: Southwest Oncology Group study 0014. *J. Clin. Oncol.* 26(14), 2258-2263(2008)

Pervez S, Nasir MI, Moatter T, Ahsan A, Haq A, Siddiqui T. Characterization of genetic lesions in apoptosis-regulating and proliferation control genes in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Cancer Res Ther.* 5(4), 254-262(2009)

Pfreundschuh M, Truemper L, Gill D, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Walewski J, Zinzani P-L, Loeffler M: First analysis of the completed Mabthera International (Mint) trial in young patients with low-risk diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): addition of rituximab to a CHOP-like regimen significantly improves outcome of all patients with the identification of a very favorable subgroup with IPI=O and no bulky disease. In: Abstracts of the 46th Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, 157(2004)

Preiß J, Dornoff W, Hagmann FG, Schmieder A: Taschenbuch Onkologie 2010/11, München: Zuckschwerdt-Verlag GmbH, 15. überarbeitete Auflage, Onlineversion

Renné C, Martín-Subero JI, Hansmann ML, Siebert R: Molecular cytogenetic analyses of immunoglobulin loci in nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma reveal a recurrent IGH-BCL6 juxtaposition. *J. Mol. Diagn.* 7(3), 352-356(2005)

Raffeld M, Jaffe ES: bcl-1, t(11;14) and mantle cell-derived lymphomas. *Blood* 78(2), 259-263(1991)

Reiter A, Schrappe M, Tiemann M, Ludwig WD, Yakisan E, Zimmermann M, Mann G, Chott A, Ebelt W, Klingebiel T, Graf N, Kremens B, Müller-Wehrich S, Plüss HJ, Zintl F, Henze G, Riehm H. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood* 94(10), 3294-3306(1999)

Robert-Koch-Institut Berlin. Datenbankabfragen: Daten zur Krebsinzidenz und -mortalität in Deutschland, Internetpräsenz [www.rki.de](http://www.rki.de), abgerufen Juli 2010, letzte Aktualisierung Januar 2010.

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large b-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 346(25), 1937-1947(2002)

Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, Chan WC, Zhao T, Haioun C, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Campo E, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Connors JM, Braziel R, Grogan TM, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Chiorazzi M, Zhao H, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Staudt LM: Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large b-cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J. Exp. Med.* 198(6), 851-862(2003)

Rummel M: Reassessing the standard of care in indolent lymphoma: a clinical update to improve clinical practice. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 8 Suppl. 6, 1-14(2010), Review

Salaverria I, Philipp C, Oschlies I, Kohler CW, Kreuz M, Szczepanowski M, Burkhardt B, Trautmann H, Gesk S, Andrusiewicz M, Berger H, Fey M, Harder L, Hasenclever D, Hummel M, Loeffler M, Mahn F, Martin-Guerrero I, Pellissery S, Pott C, Pfreundschuh M, Reiter A, Richter J, Rosolowski M, Schwaenen C, Stein H, Trümper L, Wessendorf S, Spang R, Küppers R, Klapper W, Siebert R; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe; German High-Grade Lymphoma Study Group; Berlin-Frankfurt-Münster-NHL trial group: Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood* 118(1), 139-147(2011)

Sanchez-Izquierdo D, Siebert R, Harder L, Marugan I, Gozzetti A, Price HP, Gesk S, Hernandez-Rivas JM, Benet I, Solé F, Sonoki T, Le Beau MM, Schlegelberger B, Dyer MJ, Garcia-Conde J, Martinez-Climent JA: Detection of translocations affecting the BCL6 locus

in b-cell non-Hodgkin's lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization. *Leukemia* 15(9), 1475-1484(2001)

Schaaf C, Zschocke J: *Basiswissen Humangenetik*, 1. Auflage 2008, S. 46 ff., S. 200 ff., Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Schneider T, Tóth E, Lovey J, Molnár Z, Deák B, Várady E, Csomor J, Matolcsy A, Lengyel Z, Petri K, Gaudi I, Rosta A: Standard CHOP immuno-chemotherapy for primary mediastinal lymphomas. *Orv. Hetil.* 152(19), 735-742(2011)

Schütt C, Bröker B: *Grundwissen Immunologie*, 3. Auflage 2010, S. 7 ff., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Schwaenen C, Viardot A, Berger H, Barth TF, Bentink S, Döhner H, Enz M, Feller AC, Hansmann ML, Hummel M, Kestler HA, Klapper W, Kreuz M, Lenze D, Loeffler M, Möller P, Müller-Hermelink HK, Ott G, Rosolowski M, Rosenwald A, Ruf S, Siebert R, Spang R, Stein H, Truemper L, Lichter P, Bentz M, Wessendorf S; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe: Microarray-based genomic profiling reveals novel genomic aberrations in follicular lymphoma which associate with patient survival and gene expression status. *Genes Chromosomes Cancer* 48(1), 39-54(2009)

Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zühlke-Jenisch R, Plendl H, Metzke S, Joos S, Zucca E, Weber-Matthiesen K, Roggero E, Grote W, Schlegelberger B: Application of interphase cytogenetics for the detection of t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphomas. *Ann Oncol.* 9(5), 519-526(1998)

Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia E, Doyen C, Federico M, Fisher RI, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haioun C, LeBlanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Milpied N, Morel P, Mounier N, Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, Montserrat E: Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 104(5), 1258-1265(2004)

Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKC, Gatter KC, Campo E: Diffuse large b-cell lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Vol. 4 of World Health Organisation classification of tumours 2008, France: IARC Press, Lyon

Summers KE, Goff LK, Wilson AG, Gupta RK, Lister TA, Fitzgibbon J: Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 19(2), 420-424(2001)

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: Vol. 4 of World Health Organisation classification of tumours 2008, France: IARC Press, Lyon

Szymanowska N, Klapper W, Gesk S, Küppers R, Martín-Subero JI, Siebert R: BCL2 and BCL3 are recurrent translocation partners of the IGH locus. *Cancer Genet Cytogenet.* 186(2), 110-114(2008)

Tamura A, Miura I, Iida S, Yokota S, Horiike S, Nishida K, Fujii H, Nakamura S, Seto M, Ueda R, Taniwaki M: Interphase detection of immunoglobulin heavy chain gene translocations with specific oncogene loci in 173 patients with B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 129(1), 1-9(2001)

Taniwaki M, Nishida K, Ueda Y, Misawa S, Nagai M, Tagawa S, Yamagami T, Sugiyama H, Abe M, Fukuhara S et al.: Interphase and metaphase detection of the breakpoint of 14q32 translocations in B-cell malignancies by double-color fluorescence in situ hybridization. *Blood* 85(11), 3223-3228(1995)

The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 89, 3909-3918(1997)

The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 329(14), 987-994(1993)

Tjio TH, Levan A: The chromosome number in man. *Hereditas* 42, 1-6(1956) und *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130(6),722(1978)

Todeschini G, Secchi S, Morra E, Vitolo U, Orlandi E, Pasini F, Gallo E, Ambrosetti A, Tecchio C, Tarella C, Gabbas A, Gallamini A, Gargantini L, Pizzuti M, Fioritoni G, Gottin L, Rossi G, Lazzarino M, Menestrina F, Paulli M, Palestro M, Cabras MG, Di Vito F, Pizzolo G: Primary mediastinal large b-cell lymphoma (PMLBCL): long-term results from a retrospective multicentre Italian experience in 138 patients treated with CHOP or MACOP-B/VACOP-B. *Br. J. Cancer* 90(2), 372-376(2004)

Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, Philippo K, Kleiverda K, Kluin P: Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer* 27(1), 85-94(2000)

van Rijk A, Mason D, Jones M, Cabeçadas J, Crespo M, Cigudosa JC, Garcia JF, Leoncini L, Cocco M, Hansmann ML, Mottok A, Copie Bergman C, Baia M, Anagnostou D, Pouliou E, Hamilton Dutoit S, Hjøllund Christiansen M, Svenstrup Poulsen T, Hauge Matthiesen S, van Dongen J, van Krieken JH: Translocation detection in lymphoma diagnosis by split-signal FISH: a standardised approach. *J. Hematop.* 1(2), 119-126(2008)

Ventura RA, Martín-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, Siebert R: FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J. Mol. Diagn.* 8(2), 141-151(2006), Review

Weng L, Gesk S, Martín-Subero JI, Harder L, Schlegelberger B, Grote W, Siebert R, Dyer MJ: Interphase cytogenetic characterization of aberrations in the long arm of chromosome 1 in b-cell lymphoid malignancies. *Cancer Genet. Cytogenet.* 144(1), 83-84(2003)

Willis TG, Dyer MJ: The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of b-cell malignancies. *Blood* 96(3), 808-822(2002), Review

Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A: Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 307(20), 1231-1236(1982)

Zeppa P, Sosa Fernandez LV, Cozzolino I, Ronga V, Genesio R, Salatiello M, Picardi M, Malapelle U, Troncone G, Vigliar E: Immunoglobulin heavy-chain fluorescence in situ hybridization-chromogenic in situ hybridization DNA probe split signal in the clonality assessment of lymphoproliferative processes on cytological samples. *Cancer Cytopathol.* doi: 10.1002/cncy.21203(2012)

Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, Loeffler M: Standard International Prognostic Index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ b-cell lymphoma in the rituximab era. *J. Clin. Oncol.* 28(14), 2373-2380(2010)

7 Anhang

**Anhang A1: Validierungsprotokoll der verwendeten FISH-Sonde zum Nachweis von Brüchen im IGH-Gen auf Chromosom 14.**

	<b>Institut für Humangenetik Campus Kiel</b>	<b>Validierungsprotokoll FISH-Sonde IGH BAP Sonde</b>	Nummer:	FISH 3115
			Version:	01
			Seite:	1/1
			Datum:	11.12.09

**Achtung: Ausgedruckte Dokumente unterliegen NICHT dem Änderungsservice!**

**Sonden-Name:** [Vysis LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe](http://international.abbottmolecular.com) Vysis

(<http://international.abbottmolecular.com>)

Region: 14q32

Durchführung: entsprechend SAA FISH

Validierung an: Interphasen: x Metaphasen: x

Kontroll-Nr. (K)/ Fall-Nr (L): Kulturbezeichnung	Material	Normalkontrolle (NK)/Diagnose (Partieller) Karyotyp	Ausgewertete Zellkerne	Auswertung					Andere Signal- konstellationen	Bewertung	
				2 F	1F + 1S	3F	1F	1F + 1g			
K250509	pB	NK	46,XX	100	100	-	-	-	-	-	normal
K260509	pB	NK	46,XX	100	100	-	-	-	-	-	normal
K310509	pB	NK	46,XY	100	100	-	-	-	-	-	normal
K280509	pB	NK	46,XX	100	100	-	-	-	-	-	normal
K290509	pB	NK	46,XY	100	100	-	-	-	-	-	normal
Errechnete NWG in %						0	0	0	0	0	
L1230/09 Ausstrich	KM	ALL	+14	100	55	-	45	-	-	-	Zugewinn im IGH-Genort
L738/09A	KM	CLL	t(3;14)(q21;q32)	100	45	51	-	-	4	-	Bruchereignis im IGH-Genort
L532/09A	pB	CLL	t(5;14)(p15;q32)	100	9	91	-	-	-	-	Bruchereignis im IGH-Genort
L300/09A	KM	CLL	del(14)(q21q32)	100	34	-	-	66	-	-	14q-Deletion
L1725/08A	KM	CLL	t(14;18)(q32;q21)	100	55	45	-	-	-	-	Bruchereignis im IGH-Genort

\*Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse wurde die NWG auf 5% festgesetzt.

Freigabe am 11.12.09  
durch Dr. Gesk .....

Abkürzungen und Definitionen: SDM = Standarddurchmesser; NWG = Nachweisgrenze; F = Fusion; S = Split; r = rot; g = grün; b = blau; Split = Signalabstand größer als /gleich 3 SDM; Fusion = Signalabstand 0-2 SDM; KM = Knochenmark; pB = peripheres Blut (Lymphozyten); Abkürzungen der klinischen Diagnosen entsprechend WHO; Kontrollen = Probanden mit regelrechtem Chromosomensatz ohne Hinweis auf hämatologische Erkrankungen.

Die korrekte chromosomale Lokalisation aller Sonden wurde an jeweils mindestens zwei Metaphasen aller Kontrollen geprüft, dokumentiert und nur bei korrekter Lokalisation verwendet.

Dokumentation: Im Raum bd15 sind die Fotos über den Fallnamen auf den Computern an den Fluoreszenzmikroskopen in der ISIS-Software (Metasystems) im Ordner TU dokumentiert.

(FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; IGH Immunglobulinschwerkette)

**Anhang A2: Mögliche Onkogene, deren Expression in den Fällen mit *IGH*-Bruch analysiert wurde.**

Gen	Sondenbezeichnungen auf dem Affymetrix U133A Array	(Fortsetzung Anhang A2)	
<i>BCL2</i>	203685_at 203684_s_at 207004_at 207005_s_at	<i>IGL</i>	209138_x_at 216846_at 216851_at 216852_x_at
<i>BCL3</i>	204907_s_at 204908_s_at		216853_x_at 216708_x_at
<i>BCL6</i>	203140_at 215990_s_at		216984_x_at 216566_at
<i>BCL7A</i>	203795_s_at 203796_s_at	<i>LOC100293713</i>	217235_x_at
<i>BCL8</i>		<i>MALT1</i>	208309_s_at
<i>BCL10</i>	205263_at		210017_at
<i>BCL11A</i>	210347_s_at 219497_s_at 219498_s_at	<i>MUC1</i>	210018_x_at 207847_s_at 213693_s_at
<i>CCND1 (BCL1)</i>	214019_at 208711_s_at 208712_at	<i>MYC</i>	211695_x_at 202431_s_at
<i>CCND2</i>	200951_s_at 200952_s_at 200953_s_at	<i>NFKB2 (LYT10)</i>	209636_at 207535_s_at 211524_at
<i>CCND3</i>	201700_at	<i>PAFAH1A2</i>	
<i>CCNE1</i>	213523_at	<i>PAX5</i>	206802_at
<i>CDK6</i>	207143_at 214160_at	<i>RCK</i>	
<i>DDX6</i>		<i>SPIB</i>	205861_at
<i>FCGR2B</i>	210889_s_at	<i>YSK4</i>	
<i>FOXP1</i>	211396_at 215221_at	<i>ZFP36L1</i>	211962_s_at 211965_at 213277_at
<i>IGL</i>	215777_at		213284_at
	216301_at		
	211655_at		
	215121_x_at		
	215379_x_at		
	215214_at		

**Anhang A3: Stellungnahme der zuständigen Ethik-Kommission.**

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**



**ETHIK-KOMMISSION**

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Schwanenweg 20  
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09  
Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum:

Herrn  
PD Dr. R. Siebert  
Institut für Humangenetik  
Schwanenweg 24  
24105 Kiel

09.02.2005

**AZ.: D 403/05**

**Studienplan: Verbundprojekt "Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen"**

Studienprotokoll, Patienteninformation und Einverständniserklärung vom 19. 11.2005

**Leiter der Studie: Prof. L. Trümper, Göttingen**

**Antragsteller: PD. Dr. R. Siebert, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel**

**Datum des Antrages: 05.02.2005**

Lieber Herr Siebert,

nach den Verfahrensgrundsätzen des Arbeitskreises Medizinischer Ethik-Kommissionen in der Bundesrepublik Deutschland erkennt die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel nach Durchsicht der Unterlagen durch mich als Vorsitzenden das Votum der Ethik-Kommission der Georg-August-Universität Göttingen vom 27.01.2005 an. Sie haben damit Ihre berufsethischen und berufsrechtlichen Pflichten erfüllt.

Wir bitten Sie, unsere Kommission über wesentliche Änderungen des Protokolls (Amendments) zu unterrichten und das Ende der Studie mitzuteilen, einschließlich eines kurzen abschließenden Berichts mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind  
Ich wünsche Ihnen für die Bearbeitung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Prof. Dr. med. Jürgen Schaub  
Vorsitzender der Ethik-Kommission  
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel

### **8 Danksagung**

Ich möchte mich zunächst recht herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Reiner Siebert dafür bedanken, dass er sich in jeder noch so stressigen Minute Zeit für ein Gespräch genommen hat und mir dabei stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitarbeiterinnen des FISH-Labors im Institut für Humangenetik in Kiel, die mich in die Geheimnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eingewiesen haben. Ganz besonders möchte ich mich bei Claudia Becher bedanken, die sich als zweite Auswerterin alle 164 Präparate angeschaut hat. Und auch Margret Rathjen, Ulla Schnaidt und Raina Zühlke-Jenisch hatten immer ein offenes Ohr für mich und waren mir in so manchen Momenten der Zeitknappheit eine große Hilfe.

Für die Unterstützung bei der bioinformatischen Verarbeitung meiner Daten gehört ein weiteres Dankeschön Prof. R. Spang und C. Kohler aus dem Institut für funktionelle Genomik in Regensburg.

Bedanken möchte ich mich aber vor allem bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich über die gesamte Zeit des Studiums und auch darüber hinaus begleitet und mich in all meinen Vorhaben immer unterstützt und bestätigt haben.

## 9 Lebenslauf

**Name:** Saskia Janina Schwarz

**Geboren:** 02.12.1986 in Goslar

### **Berufliche Ausbildung:**

- Seit 07/2014** Asklepios Klinikum Hamburg Harburg, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Assistenzärztin in Weiterbildung zum Facharzt für Psychiatrie und Psychotherapie
- 02/2013-06/2014** Schön Klinik Hamburg Eilbek, Neurozentrum
- 2012** Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Seit 10/2009** Medizinische Doktorandin am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) in Kiel, Promotionsthema: *IGH*-Translokationen in reifen aggressiven B-Zell-Lymphomen
- 2008** Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2006-2012** Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Deutschland

### **Praktisches Jahr**

- 04-07/2012** Städtisches Krankenhaus Kiel, Klinik für Chirurgie
- 12/2011-04/2012** UKSH Kiel, Klinik für Neurologie
- 08-12/2011** Asklepios Westklinikum Hamburg, Klinik für Innere Medizin

### **Famulaturen**

- 09/2010** Asklepios Westklinikum Hamburg, Klinik für Innere Medizin, Station für anthroposophische Medizin
- 08/2010** Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster, Klinik für Neurologie
- 02-03/2010** UKSH Kiel, Klinik für Dermatologie
- 10/2009** Dr. Bandholz und Dr. Boetius-Thomsen, Kiel, Praxis für Dermatologie
- 03/2009, 09/2009** UKSH Kiel, Institut für Humangenetik
- 02-03/2009** Allgemeinarztpraxis Peters, Bordesholm
- 1997-2006** Gymnasium, Klaus-Groth-Schule Neumünster

Hamburg, den 18.12.2014