

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

Klonale Evolution reifer B–Zell–Neoplasien unter Berücksichtigung ihrer  
zytogenetischen und molekularzytogenetischen Veränderungen

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

Vorgelegt von

LAURA THEIL  
aus Stade

Kiel (2016)

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Eva Maria Murga Penas

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Gramatzki

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.03.2017

Gez.: Prof. Dr. Ralph Lucius

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

## Abkürzungen

add	Addition (zusätzliches chromosomales Material unbekannter Herkunft)
BCL	B-Zell-Lymphom ( <i>B-cell lymphoma</i> )
BL	Burkitt-Lymphom
B-ALL	Burkitt-Leukämien
KM	Knochenmark
BFM-NHL	Berlin, Frankfurt, Münster, Non-Hodgkin Studiencenter
Bzw.	Beziehungsweise
<i>CCND1</i>	Cyclin D1
Cen	Zentromer
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CM	Konditioniertes Medium ( <i>conditioned medium</i> )
cp	Composite (Gesamtergebnis aller Metaphasen, da genauere Aufschlüsselung nicht möglich ist)
del	Deletion (Verlust von chromosomalem Material)
der	Derivatives (verändertes) Chromosom
DH	Double-Hit
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dup	Duplikation
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Follikuläres Lymphom
GZL	Grauzonen-Lymphom
i	Isochromosom
Ig	Immunglobulin
<i>IGH</i>	Immunglobulin Schwerekettenlocus ( <i>immunglobulin heavy chain gene</i> )
<i>IGκ</i>	Immunglobulin Leichtkettenlocus Kappa ( <i>immunglobulin light chain gene κ</i> )
<i>IGλ</i>	Immunglobulin Leichtkettenlocus Lambda ( <i>immunglobulin light chain gene λ</i> )
inv	Inversion
ISCN	<i>International System of Human Cytogenetic Nomenclature</i>
Ki-67	Proliferationsmarker
LB	Luria Broth
LK	Lymphknoten
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
mar	Markerchromosom (zytogenetisch nicht klassifizierbares Chromosom)
Mbp	Megabasenpaare
MCL	Mantelzell-Lymphom ( <i>mantle cell lymphoma</i> )
MIPI	<i>Mantle Cell International Prognostic Index</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
pB	Peripheres Blut
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PEST	Penicillin-Streptomycin
q	Langer Arm eines Chromosoms
REAL	<i>Revised-European-American-Lymphoma</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RT	Raumtemperatur
Sog.	So genannte
t	Translokation
μL	Mikroliter
UpM	Umdrehungen pro Minute

ÜN  
WHO  
z. B.

Über-Nacht-Kultur  
Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*)  
zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Klassifikation der lymphatischen Neoplasien .....	1
1.2. Rolle der <i>IGH</i> -, <i>IGκ</i> -, und <i>IGλ</i> -Loci in der Pathogenese reifer B-Zell Neoplasien .....	3
1.3. Diagnostisch relevante chromosomale Veränderungen reifer B-Zell Neoplasien .....	5
1.4. Bedeutung klonaler Evolution reifer B-Zell Neoplasien .....	7
1.5. Das Mantelzell-Lymphom (MCL) .....	8
1.6. Das Burkitt-Lymphom (BL) .....	10
1.7. Das B-Zell-Lymphom, nicht klassifizierbar, mit intermediären Merkmalen zwischen einem DLBCL und einem BL (Grauzonen-Lymphome) .....	11
1.8. Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) .....	12
1.9. Fragestellung .....	13
<b>2. Material</b> .....	<b>15</b>
2.1. Untersuchte Fälle .....	15
2.2. Materialien .....	16
2.2.1. Reagenzien .....	16
2.2.2. Verwendete Sonden für die Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)-Analysen .....	17
2.2.3. Verwendete Puffer und Lösungen .....	18
2.2.4. Kulturansätze .....	20
2.2.5. Verwendete Geräte und Software .....	20
<b>3. Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.1. Zytogenetische Untersuchungen reifer B-Zell Neoplasien mittels Chromosomen-Bänderungstechniken .....	22
3.1.1. Zellisolation aus peripherem Blut (pB), Knochenmark (KM), Pleura, Aszites, und Lymphknoten (LK) .....	22
3.1.2. Herstellung von Cytospinpräparaten und Ausstrichen aus pB und KM .....	23
3.1.3. Kultivierung isolierter Zellen und Aufarbeitung der Zellkulturen aus pB, KM, Pleura, Aszites und LK .....	24
3.1.4. Herstellung des konditionierten Medium (CM) für die Zellkulturen .....	25
3.1.5. Chromosomenpräparation, Chromosomen-Färbung und digitale Aufnahme der gebänderten Chromosomen .....	25
3.1.6. Auswertung der Chromosomen und Erstellung eines Karyotyps .....	27
3.1.7. Komplex aberranter chromosomaler Karyotyp und Karyotypkomplexität .....	27
3.2. Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)-Analysen bei reifen B-Zell Neoplasien .....	28
3.2.1. Bacterial Artificial Chromosome (BAC) für die Herstellung locuspezifischer DNA-Sonden .....	29
3.2.2. Isolierung der BAC-DNA aus einer Bakterienkultur .....	29
3.2.3. Fluoreszenzmarkierung der DNA mittels Random Priming .....	30
3.2.4. Aufreinigung der DNA-Sonden .....	30
3.2.5. Ethanol-Fällung mit Cot-1-DNA .....	31
3.2.6. Vorbehandlung der Objektträger .....	31
3.2.7. Hybridisierung der DNA-Sonden zur Ziel-DNA .....	32
3.2.8. Waschen .....	32
3.2.9. Auswertung FISH .....	32
3.3. Statistische Auswertung .....	33
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
4.1. Zytogenetische und FISH-Analyse bei MCL .....	35
4.1.1. Demographische Daten und Berechnung des progressionsfreien Intervalls von Diagnose bis zum Rezidiv bei MCL .....	35

4.1.2.	Identifikation sekundärer genetischer Veränderungen bei der Diagnose von MCL.....	35
4.1.3.	Identifikation sekundärer genetischer Veränderungen beim Rezidiv von MCL .....	39
4.1.4.	Vergleich der rekurrenten sekundären Aberrationen bei Diagnose und Rezidiv .....	43
4.1.5.	Komplexitätsvergleich zwischen Diagnose und Rezidiv .....	43
4.2.	Zytogenetische und FISH Analyse bei BL Patienten.....	46
4.2.1.	Demographische Daten und Berechnung des progressionsfreien Intervalls von Diagnose bis zum Rezidiv bei BL .....	46
4.2.2.	Identifikation sekundärer genetischer Veränderungen bei der Diagnose von BL .....	46
4.2.3.	Identifikation sekundärer genetischen Veränderungen beim Rezidiv von BL .....	48
4.2.4.	Vergleich der rekurrenten sekundären Aberrationen bei Diagnose und Rezidiv .....	49
4.2.5.	Komplexitätsvergleich zwischen Diagnose und Rezidiv .....	50
4.3.	Zytogenetische und FISH Analysen bei t(8;14)/MYC-IGH oder t(8;22)/MYC-IGλ positiven reifen B-Zell Lymphomen.....	53
4.3.1.	Demographische Daten und Berechnung des progressionsfreien Intervalls von Diagnose bis zum Rezidiv bei GZL und CLL .....	53
4.3.2.	Identifikation chromosomaler genetischen Veränderungen bei der Diagnose von t(8;14)/MYC-IGH oder t(8;22)/MYC-IGλ positiven reifen B-Zell Lymphomen .....	53
4.3.3.	Identifikation sekundärer genetischer Veränderungen beim Rezidiv von GZL und CLL .....	55
4.3.4.	Komplexitätsvergleich zwischen Diagnose und Rezidiv .....	57
4.4.	Vergleich der Demographie und der zytogenetischen Veränderungen von BL, MCL, CLL und GZL.....	59
4.5.	Klonale Entwicklung bei reifen B-Zell Neoplasien .....	61
4.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	63
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
5.1.	Wertstellung der Zytogenetik zur Analyse klonaler Evolution reifer B-Zell Neoplasien .....	65
5.2.	Zytogenetische Veränderungen bei reifen B-Zell Neoplasien .....	66
5.2.1.	MCL zeigen bei Diagnose eine hohe karyotypische Komplexität und eine lineare klonale Entwicklung .....	66
5.2.2.	BL zeigen bei Diagnose eine niedrige karyotypische Komplexität und eine lineare klonale Entwicklung .....	68
5.2.3.	Die t(8;14)/MYC-IGH oder t(8;22)/MYC-IGλ positive reife B-Zell Neoplasien zeigen eine hohe karyotypische Heterogenität bei Diagnose .....	70
5.2.4.	Zytogenetischer Vergleich reifer B-Zell Neoplasien und Identifikation der Kandidatengene .....	72
5.2.5.	Nachweis einer linearen evolutionären Entwicklung bei reifen B-Zell Neoplasien .....	74
5.3.	Fazit .....	74
5.4.	Ausblick .....	75
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>89</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>90</b>
<b>10.</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>91</b>

---

## 1. Einleitung

Vor 40 Jahrzehnten wurden die Chromosomen-Bänderungsmethoden möglich, mit denen man erstmalig Chromosomen und Chromosomenregionen eindeutig erkennen konnte (Caspersson et al. 1970). Dies stellte die Basis der zytogenetischen Analyse dar. Die erste chromosomale Veränderung, die bei Krebspatienten im Jahr 1959 identifiziert wurde, war das Philadelphia-Chromosom bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (Nowell et al. 1962). Daraufhin erfolgte im Jahr 1973 die Beschreibung des Philadelphia-Chromosoms als derivatives Chromosom 22 aus der Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$  (Rowley 1973). Das Philadelphia-Chromosom ist das erste Krebsgen, das bei einer menschlichen Krebserkrankung identifiziert wurde. Allerdings war die Translokation  $t(8;14)(q24;q32)/MYC-IGH$ , die charakteristisch für die Burkitt-Lymphome (BL) ist (Burkitt 1958, Manolov et al. 1972, Zech et al. 1976), die erste Translokation, die auf molekularer Ebene aufgeklärt wurde (Dalla-Favera et al. 1982, Taub et al. 1982). Seitdem hat die klassische Zytogenetik bedeutend zur Identifikation vieler chromosomaler Veränderungen beigetragen.

### 1.1. Klassifikation der lymphatischen Neoplasien

Die lymphatischen Neoplasien sind maligne Erkrankungen des lymphatischen Systems. Zum lymphatischen System gehören Lymphknoten und Lymphbahnen, Mandeln, Milz und der bei Kindern noch vorhandene Thymus, der für die Reifung der Blutzellen zuständig ist. Bei den lymphatischen Neoplasien unreifer lymphatischer Zellen (Leukämien) sind oft Knochenmark und peripheres Blut betroffen. Bei den lymphatischen Neoplasien reifer lymphatischer Zellen (Lymphomen) sind oft Lymphknoten, Knochenmark und Blut betroffen. Andere Organe können bei beiden Erkrankungen befallen sein. Das Risiko, an einer lymphatischen Neoplasie zu erkranken, steigt mit dem Alter an, ist jedoch schon im Kindesalter möglich.

Die Klassifikation von Lymphomen und Leukämien erfolgt anhand der Morphologie, des Immunphänotyps, genetischer Eigenschaften und klinischer Merkmale. Die Klassifikation der lymphatischen Neoplasien erfolgt nach der „*World Health Organization*“ (WHO)-Klassifikation lymphatischer und hämatopoetischer Neoplasien, die 2001 publiziert wurde und sich an der *Revised-European-American-Lymphoma* (REAL)-Klassifikation von 1994 orientierte (Jaffe et al. 2001, Harris et al. 1994). Die WHO-Klassifikation wurde 2008 aktualisiert (Swerdlow et al. 2008). Die Klassifikation der Lymphome nach Einteilung der WHO-Klassifikation von 2008, unter Berücksichtigung der Übersichtsarbeit von den WHO-

Editoren über die 2008–Klassifikation der lymphatischen Neoplasien, ist in Tabelle 1 dargestellt (Campo et al. 2011, Dürkop et al. 2011).

**Tabelle 1:** Klassifikation der Lymphome nach WHO–Klassifikation von 2008 (Swerdlow 2008, Campo et al. 2011, Dürkop et al. 2011)

<b>Vorläuferzellneoplasien</b>	<b>Reife B–Zell–Neoplasien</b>
B–lymphoblastische(s) Leukämie / Lymphom (B–LBL)	<b>Chronische lymphatische Leukämie / lymphozytisches Lymphom</b>
– B–LBL, nicht weiter spezifiziert	Prolymphozytenleukämie vom B–Zell–Typ
– B–LBL mit rekurrenten zytogenetischen / molekulargenetischen Anomalien	Splenisches Marginalzonenlymphom
– B–LBL mit einer t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR/ABL</i>	Haarzelleukämie
– B–LBL mit einer t(v;11q23); <i>MLL</i> umgelagert	<i>Splenisches B–Zell–Lymphom / Leukämie, nicht klassifizierbar</i>
– B–LBL mit einer t(12;21)(p13;q22); <i>TEL/AML1(ETV6–RUNX1)</i>	– <i>Splenisches diffuses kleinzelliges B–Zell–Lymphom der roten Pulpa</i>
– B–LBL mit Hyperdiploidie	– <i>Haarzelleukämievariante</i>
– B–LBL mit einer Hypodiploidie	Lymphoplasmozytisches Lymphom
– B–LBL mit einer t(5;14)(q31;q32); <i>(IL3–IGH)</i>	Waldenström–Makroglobulinämie
– B–LBL mit einer t(1;19)(q23;p13.3); <i>(E2A–PBX1; CF3/PBX)</i>	Schwerkettenkrankheiten
T–lymphoblastische (s) Leukämie / Lymphom	– $\alpha$ –Schwerkettenkrankheit
NK–Zell–lymphoblastische (s) Leukämie / Lymphom	– $\gamma$ –Schwerkettenkrankheit
	– $\mu$ –Schwerkettenkrankheit
	Plasmazellmyelom
	Solitäres Plasmozytom des Knochens
	Extraossäres Plasmazytom
	Extranodales Marginalzonenlymphom des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes (MALT Lymphom)
	Nodales Marginalzonenlymphom
	– <i>Pädiatrisches nodales Marginalzonenlymphom</i>
	Folikuläres Lymphom
	– <i>Pädiatrisches follikuläres Lymphom</i>
	– <i>Primäres intestinales follikuläres Lymphom</i>
	Primäres kutanes Follikelzentrumslymphom
<b>Hodgkin–Lymphom</b>	<b>Mantelzell–Lymphom</b>
Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin– Lymphom	Diffuses großzelliges B–Zell–Lymphom (DLBCL)
Klassisches Hodgkin–Lymphom	– DLBCL, NOS
– Nodulärsklerosierendes klassisches Hodgkin–Lymphom	– DLBCL–Subtypen
– Lymphozytenreiches klassisches Hodgkin–Lymphom	– T–Zell / histiozytenreiches großzelliges B–Zell–Lymphom
– Gemischtzelliges klassisches Hodgkin–Lymphom	– Primäres DLBCL des Zentralnervensystems (ZNS)
– Lymphozytenarmes klassisches Hodgkin–Lymphom	– Primär kutanes DLBCL, vom Beintyp
	– <i>EBV–positives DLBCL der Älteren</i>
	– DLBCL bei chronischer Entzündung
	– Lymphomatoide Granulomatose
	– Primär mediastinales (thymisches) großzelliges B–Zell–Lymphom
	– Intravaskuläres großzelliges B–Zell–Lymphom
	– ALK–positives großzelliges B–Zell–Lymphom
	– Großzelliges B–Zell–Lymphom auf dem Boden einer HHV8–assoziierten multizentrischen Castleman–Krankheit
	– Primäres Ergusslymphom
	<b>Burkitt–Lymphom</b>
	<b>B–Zell–Lymphom, nicht klassifizierbar, mit intermediären Merkmalen zwischen einem DLBCL und einem Burkitt–Lymphom</b>
	B–Zell–Lymphom, nicht klassifizierbar, mit intermediären Merkmalen zwischen einem DLBCL und einem klassischen Hodgkin–Lymphom

Die in kursiv geschriebenen histologischen Typen repräsentieren provisorische Entitäten. Für diese sah die WHO Arbeitsgruppe nicht genügend Kriterien erfüllt, um sie als eigenständige Tumorentitäten anzuerkennen. Die in fetter Schrift geschriebenen Lymphome werden in der vorliegenden Arbeit behandelt.



---

Die Lymphomentitäten werden nach Differenzierung und Reifegrad der Lymphomzellen (Vorläuferzellen oder reife Zellen) und Linienzugehörigkeit (B- oder T-Zell-Lymphome/Leukämien) eingeteilt. Zu den Vorläuferzell-Neoplasien gehören die B-, T- und NK-Zell-lymphoblastischen Lymphome/Leukämien. Als reife B-Zell Neoplasien werden die Hodgkin-Lymphome und die aus historischen Gründen noch sog. Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) angesehen. Die Mehrzahl der reifen B-Zell Neoplasien geht aus B-Zellen (>90%), die übrigen aus T- und NK-Zellen hervor (Swerdlow 2008, Jaffe 2009). Die Inzidenz reifer B-Zell Neoplasien lag in Deutschland 2010 bei 3,4 % aller Krebserkrankungen, Tendenz steigend. Die Erkrankungsrate lag 2010 bei 21,1/100.000 für Männer bzw. 18,3/100.000 für Frauen (RKI 2013). Eine Erklärung für die steigende Inzidenz konnte noch nicht gefunden werden. Das mittlere Erkrankungsalter lag in Deutschland für Männer bei 69 Jahren, und für Frauen bei 71 Jahren (RKI 2013).

## **1.2. Rolle der *IGH*-, *IGκ*-, und *IGλ*-Loci in der Pathogenese reifer B-Zell Neoplasien**

Die Reifung der B-Lymphozyten findet im Knochenmark, im peripheren Blut und in den lymphatischen Organen statt. B-Lymphozyten können eine riesige Anzahl unterschiedlicher Antigene erkennen, die eine große Vielfalt antigen-spezifischer Rezeptoren voraussetzt. Diese Variabilität wird durch die geregelte intrachromosomale Rekombination der Immunglobulin-Gene erreicht. Die Antigenrezeptoren der Immunglobuline sowie auch die Immunglobuline (Antikörper) bestehen aus Heterodimeren von zwei identischen schweren (H-Ketten) und zwei identischen leichten Polypeptidketten (L-Ketten). Der Immunglobulin Schwerkettenlocus (*IGH*) auf Chromosom 14q32 kodiert für die Schwerkette und für die Leichtketten kodieren jeweils die Immunglobulin Leichtkettenloci Kappa (*IGκ*) auf 2p12 und Lambda (*IGλ*) auf 22q11. Der *IGH*-Locus kodiert für 46 funktionelle  $V_H$  (*Variable*)-Segmente, 23 funktionelle  $D_H$  (*Diversity*)-Segmente und 6  $J_H$  (*Joining*)-Segmente. Jeweils ein ausgewähltes  $V_H$ -Gensegment wird mit einem ausgewählten  $D_H$ -Gensegment und einem ausgewählten  $J_H$ -Gensegmente rearrangiert. Dieser Prozess wird V(D)J-Rekombination genannt (Küppers 2005). Bei der V(D)J-Rekombination werden Doppelstrangbrüche in die genomischen Sequenzen der *IGH*-, *IGκ*- und *IGλ*-Loci durch Endonukleasen eingefügt (Jung et al. 2006). Hier besteht ein Risiko für chromosomale Translokationen und somit der Entwicklung eines Lymphoms. Die V(D)J-Rekombination findet noch im Knochenmark statt. Bei erfolgreicher Kombination der Gensegmente für eine schwere und eine leichte Kette ist die unreife B-Zelle in der Lage IgM zu synthetisieren und auf der Oberfläche zu präsentieren.

---

Die B-Lymphozyten mit funktionsuntüchtigen oder ungeeigneten Antigenrezeptoren (wie z. B. Autoantigene) gehen in die Apoptose. Nach dem Verlassen des Knochenmarks wandert die B-Zelle über das Blut zu den sekundären lymphatischen Organen, wie z.B. Lymphknoten, und erreicht diese als naive B-Zelle. Durch Kontakt mit einem passenden Antigen und kostimulatorischen Signalen von T-Zellen und dendritischen Zellen während der Wanderung, wird die B-Zelle aktiviert und dies führt zur klonalen Proliferation der B-Zelle und zur Ausbildung eines Keimzentrums im Lymphfollikel. Im Keimzentrum kann es zu weiteren Veränderungen kommen, dem Klassenwechsel und der somatischen Hypermutation. Bei dem Klassenwechsel wird durch Rekombination der konstanten Region (C-Segmente) des *IGH*-Lokus die Zusammensetzung der schweren Kette verändert, so dass einige B-Zellen nicht mehr die Isotypen IgM exprimieren, sondern IgG, IgA und Ig E. Bei der somatischen Hypermutation kommt es in den  $V_H$  Regionen der Immunglobulingene zu Punktmutationen. Dadurch wird die Antigen-Spezifität und -Affinität erhöht. Ist dies erfolgreich, differenzieren sich die B-Zellen entweder zu einer Antikörper produzierenden Plasmazelle oder zu einer langlebigen Gedächtniszelle und verlassen das Keimzentrum (Klein und Dalla-Favera 2008).

Die physiologischen Prozesse, die die B-Zelle während ihrer Reifung erfährt (V(D)J-Rekombination, Klassenwechsel und somatische Hypermutation) sind mit DNA-Doppelstrangbrüchen assoziiert und sind somit ein Risiko für chromosomale Translokationen (Willis und Dyer 2000). Einige dieser Translokationen sind charakteristisch für bestimmte Lymphomentitäten, wie die  $t(14;18)(q32;q21)/IGH-BCL2$ , die in etwa 70–90% der folliculären Lymphome (FL) nachweisbar ist. Diese Translokation führt zu der Fusion des *BCL2* Proto-Onkogens auf Chromosom 18 und des *IGH*-Locus auf Chromosom 14. Die  $t(14;18)/IGH-BCL2$  resultiert in der Überexpression des *BCL2*-Gens, welches zu einer Hemmung der Apoptose führt (Jäger et al 2000). Eine weitere rekurrente Veränderung bei reifen B-Zell Neoplasien stellt die Translokation  $t(3;14)(q27;q32)/BCL6-IGH$  mit Beteiligung des *BCL6*-Gens auf Chromosom 3 und des *IGH*-Locus dar. Die  $t(3;14)/BCL6-IGH$  tritt bei etwa einem Drittel der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL) und 10% der FL auf (Bastard et al. 1992). Bei extranodalen Marginalzonenlymphomen des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT-Lymphome) können die Translokationen  $t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1$  und  $t(1;14)(p22;q32)/BCL10-IGH$  vorkommen, die eine Beteiligung des *MALT1*-Gens, sowie des *BCL10*-Gens darstellen (Streubel et al. 2003, Murga Penas et al. 2003, Willis et al. 1999, Zhang et al. 1999). Beide Translokationen führen zu einer Deregulation des NF- $\kappa$ B, der ein Transkriptionsfaktor ist und

---

Bedeutung bei der Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes hat (Li und Verma 2002, Sagaert et al. 2006).

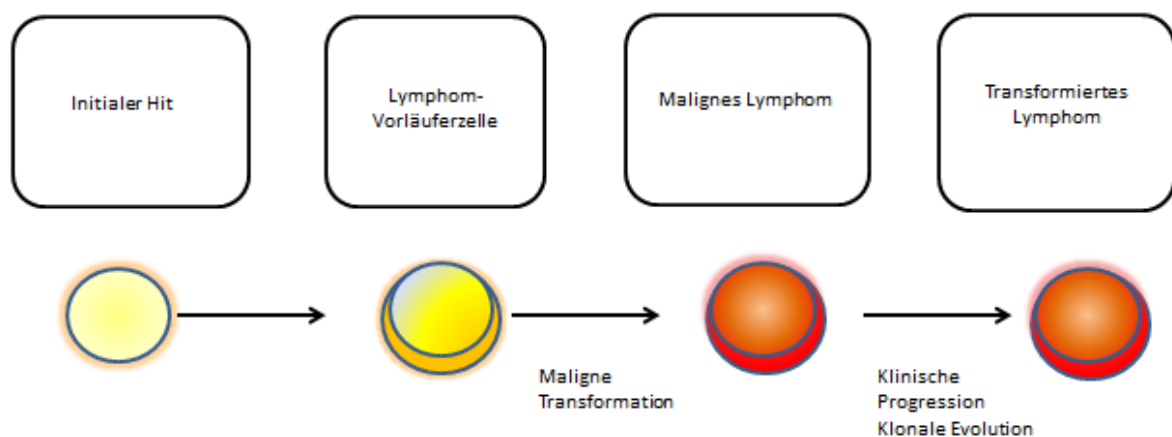
### **1.3. Diagnostisch relevante chromosomale Veränderungen reifer B-Zell Neoplasien**

In der Diagnostik reifer B-Zell Neoplasien stellen die pathologische Begutachtung, die Immunphänotypisierung sowie die genetische Analyse wichtige Verfahren dar, um z. B. die Lymphomentität festzustellen bzw. zu bestätigen, die Prognose einzuschätzen und über das Therapieregime zu entscheiden (Haferlach et al. 2007, Rosenwald und Ott 2008). Genetische Veränderungen sind in fast allen reifen B-Zell Neoplasien nachweisbar und umfassen Translokationen, Insertionen, Deletionen, Duplikationen, Amplifikationen, Inversionen und Punktmutationen. Es wird davon ausgegangen, dass die Tumorentwicklung in mehreren Schritten stattfindet und die Erkrankungen meistens von einer einzigen Zelle ausgehen, bei der eine genetische Veränderung (primäre Aberration) stattfand. Bei Nachkommen dieser Zelle können weitere Mutationen auftreten, die ebenfalls zu der kanzerogenen Entwicklung beitragen, wobei auch mehrere Tumorsubklone entstehen können. Durch die Mutation kann eine Umwandlung von einem Proto-Onkogen, das physiologischerweise vorkommt, zu einem Onkogen stattfinden. Proto-Onkogene kodieren häufig für Proteine, die die Zellproliferation oder Apoptose kontrollieren (Transkriptionsfaktoren wie *BCL6*, Apoptoseinhibitoren wie *BCL2* oder Wachstumsfaktoren) und deren Deregulation zur Tumorentwicklung führt. Proto-Onkogene können durch Translokationen in die Nähe von starken Transkriptionsverstärkern (z.B. *IGH*-, *IGK*- und *IGL*-Loci) verlagert werden und auf diese Weise zu Onkogen und überexprimiert werden (Croce 2008, Willis und Dyer 2000). Im Gegensatz zu Proto-Onkogenen führen Tumorsuppressorgene normalerweise durch Funktionsverlust zur Entstehung von Tumoren. Tumorsuppressorgene wie das *RBI*-Gen auf Chromosom 13q14 können dabei durch genetische Veränderungen wie Deletionen inaktiviert werden (Puiggros et al. 2014). In der Regel kodieren Tumorsuppressorgene für Proteine die z. B. den Zellzyklus regulieren oder die Apoptose induzieren (Sherr 2004).

Grundsätzlich wird zwischen primären und sekundären Aberrationen unterschieden. Die im Kapitel 1.2 erwähnten Translokationen *t(14;18)/IGH-BCL2* bei FL, *t(3;14)/BCL6-IGH* bei DLBCL sowie die *t(14;18)/IGH-MALT1* und *t(1;14)/BCL10-IGH* bei den MALT-Lymphomen stellen solche primären chromosomalen Veränderungen dar. Weitere primäre Veränderungen, von der in dieser Arbeit untersuchten reifen B-Zell Neoplasien, sind in den Kapiteln 1.5 bis 1.8 zu finden.

Primäre genetische Veränderungen, wie die Translokationen  $t(14;18)/IGH-BCL2$ ,  $t(3;14)/BCL6-IGH$ ,  $t(14;18)/IGH-MALT1$  und  $t(1;14)/BCL10-IGH$  treten früh in der Lymphomentwicklung auf und spielen wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung. Meistens führen diese Veränderungen noch nicht zu einem Ausbruch der Erkrankung. Erst weitere Alterationen, sekundäre Veränderungen, führen zu einer malignen Transformation (Abbildung 1) (Johansson et al 1996, Jares et al. 2012, Seto et al. 2013). Nicht nur Translokationen treten als primäre Veränderungen auf. Es treten z.B. Trisomien von Chromosom 12 (+12) und die prognostisch günstigen Deletionen des langen Armes von Chromosom 13 [del(13q)] bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) früh in der Entwicklung der Erkrankung auf (Döhner et al. 2000, Moreno und Montserrat 2008).

**Abbildung 1:** Mehrstufenmodell der Tumorentstehung am Beispiel der Entwicklung eines Lymphoms (nach Dyer und Siebert, 2009)



Sekundäre genetische Aberrationen treten erst während der späteren Tumorentwicklung auf und haben zum Teil Einfluss auf die Prognose. So kommen Deletionen und Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* auf Chromosom 17p13 [del(17p)] in einer Vielzahl reifer B-Zell Neoplasien und anderen hämatologischen sowie soliden Tumoren vor und gehen mit einer schlechten Prognose einher (Hernandez et al. 1996, Onciu et al. 2006, Salido et al. 2010, Cortelazzo et al. 2012, Amare et al. 2013, Bouska et al. 2014, Puiggros et al. 2014, Bödör und Reiniger 2016). Deletionen im langen Arm von Chromosom 11 [del(11q)] konnten bei Mantelzell-Lymphomen (MCL), CLL und BL nachgewiesen werden (Döhner et al. 2000, Cortelazzo et al. 2012, Puiggros et al. 2014, Murga Penas et al. 2014, Bödör und Reiniger 2016). Die del(13q) tritt rekurrent bei BL, MCL und FL auf und Deletionen in 6q [del(6q)] konnten in Marginalzonenlymphomen, CLL, MCL, DLBCL, FL und BL identifiziert werden (Döhner et al. 2000, Lones et al. 2004, Onciu et al. 2006, Parry-Jones et al. 2007, Nelson et

---

al. 2010, Salido et al. 2010, Cortelazzo et al. 2012, Kim et al. 2013, Bouska et al. 2014, Murga Penas et al. 2014). Weiterhin konnten Zugewinne von chromosomalen Regionen, z.B. Duplikationen des langen Arms von Chromosom 1 [dup(1q)], bei BL und DLBCL nachgewiesen werden (Lones et al. 2004, Onciu et al. 2006, Kim et al. 2013, Murga Penas et al. 2014).

Primäre lymphomspezifische Translokationen können auch als sekundäre Aberrationen in anderen Lymphomentitäten auftreten. Somit kann die für die FL charakteristische Translokation t(14;18)/*IGH-BCL2* und die für die BL charakteristische Translokation t(8;14)/*MYC-IGH* als sekundäre Veränderung bei DLBCL, MCL und CLL auftreten (Johansson et al., 1995; Moreno und Montserrat, 2008; Amare et al., 2013; Cortelazzo et al., 2012; Kim et al., 2013). Die t(14;18)/*IGH-BCL2* und die t(8;14)/*MYC-IGH* können auch gemeinsam in sog. Grauzonen-Lymphomen (GZL), auch als Double-Hit Lymphome (DH-Lymphome) bekannt, vorkommen. Die GZL haben eine sehr schlechte Prognose (Aukema et al., 2011). Sehr selten kann auch die für die MCL pathognomonische Translokation t(11;14)(q13;q32)/*CCND1-IGH* als sekundäre Aberration in CLL auftreten (De Braekeleer et al. 2016, Schliemann et al. 2016). Die Prognose einer t(14;18)/*IGH-BCL2* bei CLL wird kontrovers diskutiert, eine t(8;14)/*MYC-IGH* hat eine schlechte Prognose (Cavazzini 2008, De Braekeleer et al. 2016). Zuletzt zeigen spezifische chromosomale Veränderungen auch einen Einfluss auf die Krankheitsentwicklung, sodass ein komplexer Karyotyp, definiert als das Auftreten von drei oder mehr chromosomalen Aberrationen in einer Zelle, bei reifen B-Zell-Neoplasien mit einer eher ungünstigen Prognose einhergeht (Hummel et al., 2006, Poirel et al. 2009, Salido et al. 2010, Kim et al. 2013, Sarkozy et al. 2014).

#### **1.4. Bedeutung klonaler Evolution reifer B-Zell Neoplasien**

Die Unterscheidung zwischen primären und sekundären Veränderungen ist wichtig, um die evolutionäre Entwicklung darstellen zu können. Bei einigen Lymphomentitäten, z. B. bei der CLL, wurde bereits die Relevanz der klonalen Evolution gezeigt. Es wurde nachgewiesen, dass die Präsenz von -17/del(17p), einschließlich der Deletion des *TP53*-Gens, nicht nur in der klonalen Entwicklung, sondern auch in Subklonen ein schlechter prognostischer Marker ist (Landau et al. 2014, Rossi et al. 2014). Bei chromosomalen Veränderungen mit schlechter Prognose, wie -17/del(17p) bei der CLL, werden schon heute aggressivere Therapieansätze eingesetzt (Puiggros et al. 2014).

---

Bei der Entstehung von DLBCL wurde gezeigt, dass zwei Mechanismen zum Rezidiv führen können. Der erste Mechanismus führt zu einer linearen Entwicklung, in der der primäre Klon und die aus dem primären Klon abgeleiteten Subklone bei dem Rezidiv alle dieselben Veränderungen aufweisen. Allerdings besitzen die Tumorzellen im Rezidiv zusätzliche chromosomalen Veränderungen, die der primäre Klon nicht gezeigt hat. Der zweite Mechanismus geht von der Entstehung aus einer Vorläuferzelle aus, sodass sich das Rezidiv parallel entwickelt und die Zellen unterschiedliche Aberrationen aufweisen (Jiang et al. 2014). Bei den FL konnten die gleichen Wege, linearer Weg von dem Ursprungsklon und paralleler Weg von einer Vorläuferzelle, wie bei den DLBCL nachgewiesen werden (Berglund et al. 2006, Green et al. 2013, Pasqualucci et al. 2014).

Obwohl die Bedeutung klonaler Evolution vieler reifer B-Zell Neoplasien zunehmend aufgeklärt ist, ist unser Verständnis über die evolutionäre Entwicklung bei anderen Lymphomentitäten wie BL oder MCL noch nicht ausreichend beantwortet (Schmitz et al. 2012, Beà et al. 2013). In der Veröffentlichung von Beà, die die Lymphome per Genomsequenzierung untersuchte, konnten zwei MCL mit Rezidiven beschrieben werden. Es konnte eine Tumorprogression im Laufe der Erkrankung und eine Zunahme der Komplexität festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage der Bedeutung von sekundären genetischen Aberrationen in der klonalen Evolution von BL und MCL sowie auch in GZL und CLL nachgegangen.

### **1.5. Das Mantelzell-Lymphom (MCL)**

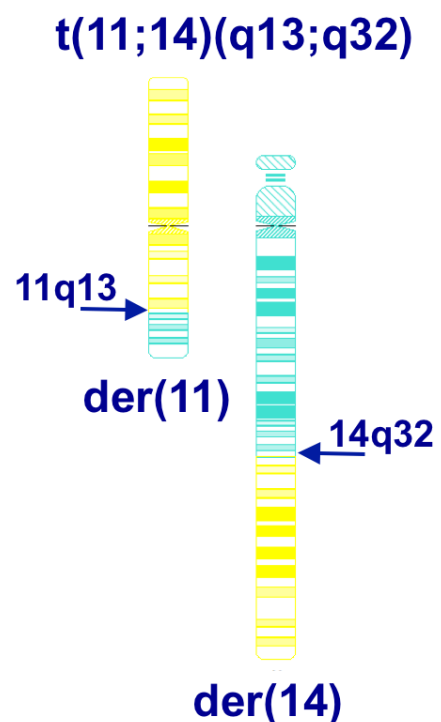
Das MCL wurde das erste Mal 1979 beschrieben und 1991 als eigenständige Entität anerkannt (Van Den Berghe et al. 1979, Raffeld und Jaffe 1991). Eine Klassifikation zur Einteilung des Schweregrades der Erkrankung ist die Ann-Arbor-Klassifikation, die die reifen B-Zell Neoplasien nach Befall der Lymphknotenregionen einteilt. Meistens liegt bei Diagnosestellung des MCL schon ein Stadium von III oder IV vor [Lymphknoten-Stationen (LK-Stationen) über und unter dem Zwerchfell betroffen/disseminierter Befall]. Das MCL hat eine schlechte Prognose mit einer mittleren Überlebenswahrscheinlichkeit von 3–5 Jahren (Nickenig et al. 2006, Dreyling und Hiddemann 2009, Cortelazzo et al. 2012). Dabei ist in vielen Fällen eine extranodale Manifestation vorhanden, besonders häufig sind das Knochenmark, weniger häufig die Milz und der Gastrointestinaltrakt betroffen (Fisher et al. 1996, Sarkozy et al. 2014). Inzwischen findet ein prognostischer Faktor Anwendung (MIPI), um zwischen hohem, mittlerem und niedrigem Risiko für die Aggressivität von MCL zu

unterscheiden. In diesen Faktor fließen das Alter, die LDH, der ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) Performance Status, und die Leukozytenzahl ein (Hoster et al., 2008). Zudem hat die Proliferationsrate (KI-67 Index) einen großen Einfluss auf die Prognose (Tiemann et al. 2005, Hoster et al. 2008). Männer sind häufiger betroffen als Frauen, der Altersmedian liegt bei ca. 60–65 Jahren (Bosch et al. 1998, Samaha et al. 1998, Katzenberger et al. 2008, Cortelazzo et al. 2012, Sarkozy et al. 2014). Initial sind bei Chemotherapie hohe Ansprechraten zu verzeichnen, jedoch zeigen sich häufig rasche Rezidive (Cortelazzo et al. 2012). Der bislang einzige kurative Therapieansatz ist die allogene Stammzelltransplantation, die aber aufgrund der schweren therapieassoziierten Nebenwirkungen, insbesondere Infektionen, lediglich im Rezidiv diskutiert wird (Tam et al. 2009).

Die pathognomonische Veränderung bei MCL ist die Translokation  $t(11;14)/CCND1-IGH$  (Abbildung 2). Dabei kommt es zur Juxtaposition des Cyclin D1-Gens (*CCND1*) auf Chromosom 11 an den Promotor des *IGH*-Locus auf Chromosom 14. Daraus resultiert eine Überexpression des *CCND1*-Gens, einem wesentlichen Kofaktor der Zellzyklusregulation (Rimokh et al. 1993, Lovec et al. 1994). Die  $t(11;14)/CCND1-IGH$  ist in beinahe aller MCL mittels der Technik der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH, siehe Kapitel 3.2 für Beschreibung der FISH-Technik) nachweisbar (Vaandrager et al. 1996, Sun et al. 2003).

In den wenigen  $t(11;14)/CCND1-IGH$ -negativen Fällen wurden Translokationen mit Beteiligung der *CCND2*- oder *CCND3*-Gene nachgewiesen (Fu et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass das alleinige Vorkommen der Translokation  $(11;14)/CCND1-IGH$  nicht ausreicht, um die Erkrankung auszulösen (Bodrug et al. 1994, Jares und Campo 2008). In Übereinstimmung hiermit finden sich in

vielen Fällen weitere sekundäre genetische Veränderungen, wie Deletionen in 1p, 6q, 8p, 9p, 11q, 13q, 17p und Zugewinne in 3q, 7p, 8q und 15q (Parry-Jones et al. 2007, Salaverria et al. 2008, Katzenberger et al. 2008, Sander et al. 2008, Espinet et al. 2010). Bei den chromosomalen Veränderungen hat der Verlust von *TP53* auf Chromosom 17 und ein



**Abbildung 2:** Graphische Darstellung der für die MCL charakteristischen Translokation. Die Bruchpunkte innerhalb des *CCND1*-Gens (11q13) und *IGH*-Locus (14q32) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Abbildung durch Cydas-Software erstellt (Hiller et al. 2005).

---

komplexer Karyotyp eine schlechte Prognose (Hernandez et al. 1996, Cortelazzo et al. 2012, Sarkozy et al. 2014)

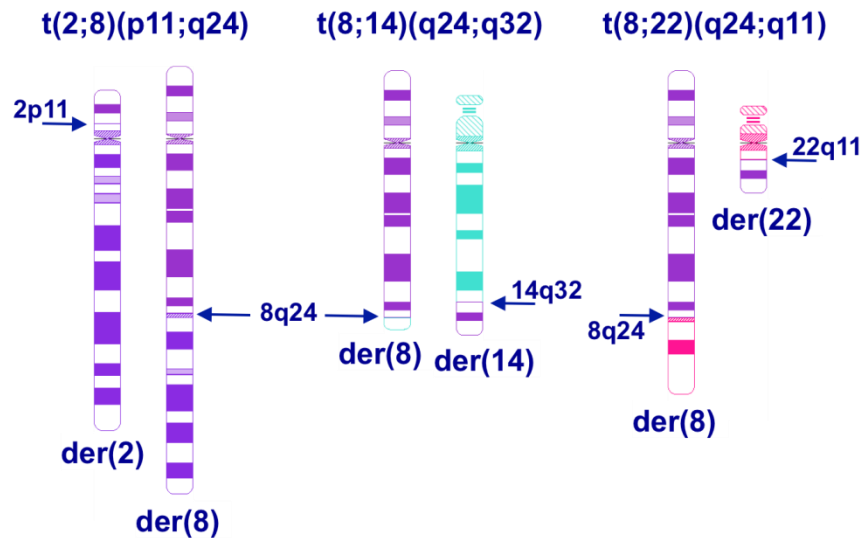
### **1.6. Das Burkitt-Lymphom (BL)**

Zuerst wurde das BL 1958 als „*Sarcoma involving the jaws in African children*“ beschrieben. BL oder ihre leukämischen Form, die akute lymphoblastische Leukämie der B-Zell Reihe (B-ALL), in Fällen mit mehr als 25% Knochenmarksbefall, kommen vor allem im Kindesalter vor, wobei sie 40% der B-Zell Neoplasien des Kindesalters ausmachen. BL werden aber auch im Erwachsenenalter mit einer Inzidenz von 1–5% beobachtet. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Burkhardt et al. 2011, Miles et al. 2012). Extranodale Manifestationen sind häufig, oft ist das Knochenmark betroffen (Perkins und Friedberg 2008). Man kann bei den BL drei klinische Varianten unterscheiden: das endemische BL, das sporadische BL und das HIV-assoziierte BL. Bei Kindern in den endemischen Malaria-Gebieten Äquatorialafrikas, Papua-Neuguineas und Südamerikas, dem sog. Malariagürtel, kommt die endemische Variante vor, die in über 90% der Fälle mit einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert ist (Blum et al. 2004, Brady et al. 2008, Moormann 2011, Rochford und Moormann 2015). Malaria soll ebenfalls zu einer Immunsuppression führen und so die Entstehung eines BL begünstigen (Shiramizu et al. 1991, Swerdlow et al. 2003). Es konnte bisher keine genaue Ursache des endemischen BL festgestellt werden (Wright 1967). Bei der sporadischen Variante des BL, die vereinzelt weltweit auftritt, konnten keine wesentlichen Risikofaktoren festgestellt werden und eine EBV-Infektion ist nur in 5–10% nachweisbar (Blum et al. 2004). Die Inzidenz des sporadischen BL liegt bei 1–2% aller lymphatischen Neoplasien bei Erwachsenen, wobei die Inzidenz bei Kindern zwischen 30–50% liegt (de Jong und Balagué Ponz 2011, Ward et al. 2014). Bei HIV tritt das BL häufiger auf als in der Normalbevölkerung und ein Drittel der Fälle sind positiv für EBV. Man geht davon aus, dass der Virus zu einer Immunsuppression führt und dies den Ausbruch eines BL begünstigt (Carbone et al. 2002).

Die typische Translokation in BL ist die  $t(8;14)/MYC-IGH$ , es kommen in selteneren Fällen auch die  $t(2;8)(p11;q24)/IGK-MYC$  und die  $t(8;22)(q24;q11)/MYC-IG\lambda$  vor (Abbildung 3). Die erste Beschreibung der Burkitt-Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  fand 1972 statt (Manolov et al. 1972, Zech et al. 1976). Das *MYC*-Gen auf Chromosom 8 kommt durch die Translokation auf Chromosom 14 bzw. die Chromosomen 2 oder 22, unter den Einfluss des Promotors des *IGH*-Locus bzw. der *IGK*- oder *IG\lambda*-Loci, durch die es überexprimiert wird



und so aus Proto-Onkogen ein Onkogen entsteht (Klapproth und Wirth 2010). Das *MYC*-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl anderer Gene reguliert und Zellzyklus, Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beeinflusst.



**Abbildung 3:** Graphische Darstellung der für die BL charakteristischen Translokationen. Die Bruchpunkte innerhalb des *IGK*-Locus (2p11), *MYC*- (8q24), *IGH*- (14q32) und *IGL*-Locus (22q11) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Abbildung durch Cydas-Software erstellt (Hiller et al. 2005).

Im Gegensatz zu anderen B-Zell Neoplasien ist bei BL wahrscheinlich allein die *MYC*-Translokation ursächlich für die Erkrankung (Aukema et al. 2014). Die BL zeigen meist wenige chromosomale Veränderungen (Hummel et al. 2006, Boerma et al. 2009, Seegmiller et al. 2010) und mit aggressiver Chemotherapie werden gute Langzeitüberlebensraten erreicht (Burkhardt et al. 2011). Sind initial bereits viele chromosomale Veränderungen nachweisbar, so verläuft die Erkrankung zumeist sehr aggressiv und die Prognose ist ungünstig (Hummel et al. 2006, Poirel et al. 2009). Rezidive sind selten, kommt es aber zu einem Rezidiv der Erkrankung, ist die Prognose dieser Patienten sehr ungünstig (Burkhardt et al. 2011, Woessmann 2013). In Studien von BL-Patienten und BL-Zelllinien konnten sekundäre Veränderungen in 11q, Zugewinne in 1q, Deletionen in 6q, in 13q und von 17p nachgewiesen werden (Lones et al. 2004, Onciu et al. 2006, Nelson et al. 2010, Murga Penas et al. 2014).

### 1.7. Das B-Zell-Lymphom, nicht klassifizierbar, mit intermediären Merkmalen zwischen einem DLBCL und einem BL (Grauzonen-Lymphome)

Die WHO-Klassifikation von 2008 der Lymphome hat eine vorläufige Kategorie für eine Gruppe von B-Zell Neoplasien anerkannt, die weder als BL noch als DLBCL klassifiziert werden können. Diese hoch-aggressiven Lymphome werden als B-Zell-Lymphome, nicht

---

klassifizierbar, mit intermediären Merkmalen zwischen einem DLBCL und einem BL bezeichnet (Swerdlow et al. 2008). Diese intermediären Lymphome, auch als Grauzonen-Lymphome (GZL) bekannt, kommen überwiegend bei Erwachsenen vor. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 51–65 Jahren, Erkrankungen im Kindesalter sind sehr selten (Oschlies et al. 2010, Aukema et al. 2011). GZL zeigen typische BL Charakteristika wie Translokationen mit Bruchereignis innerhalb des *MYC*-Gens, aber zeigen atypische zytomorphologische Merkmale für BL und ein kleineres Wachstum als ein BL. Auf molekularer Ebene zeigen die GZL ein Genexpressionsprofil mit einer intermediären Transkriptionssignatur, die Eigenschaften vom BL und DLBCL aufweisen (Dave et al. 2006, Hummel et al. 2006). Unter den GZL sind auch Fälle von den sog. Double-Hit (DH) Lymphomen, die sowohl einen *MYC*-Bruch als auch einen *BCL2*-Bruch aufweisen (Dave et al. 2006, Hummel et al. 2006). Die Translokation des *BCL2*-Gens zu dem *IGH*-Locus in der Translokation  $t(14;18)/IGH-BCL2$  oder in den varianten Translokationen  $t(2;18)/IG\kappa-BCL2$  und  $t(18;22)/BCL2-IG\lambda$  führt zu einer Überexpression des *BCL2*-Proteins, die die GZL charakterisiert (Swerdlow et al. 2008, Dürkop et al. 2011). Ein weiteres Merkmal der GZL ist die hohe Häufigkeit der Translokationen  $t(2;8)/IG\kappa-MYC$  und  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  im Vergleich zu der  $t(8;14)/MYC-IGH$  (Snuderl et al. 2010).

Da bei einigen Fällen von FL gleichzeitig ein DH oder sogar ein Tripple-Hit nachgewiesen wurde, deuten diese Fälle daraufhin, dass sich GZL aus FL mit einer  $t(14;18)/IGH-BCL2$  zu der zusätzlich eine *MYC*-Translokation hinzugekommen ist, entwickeln (Dürkop et al. 2011). GZL haben eine ungünstige Prognose (Aukema et al. 2011), daher ist die Identifikation dieser Lymphome und ihrer Differenzierung von BL und DLBCL von besonderer Bedeutung, da die Therapieansätze bei diesen Lymphomen sich von der BL und DLBCL unterscheiden.

### **1.8. Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL)**

Die CLL ist die häufigste leukämische Erkrankung im westlichen Teil der Welt. Die Erkrankung geht nach der Einteilung der WHO-Klassifikation von 2008 immer von B-Zellen aus (Campo et al. 2011). Die Inzidenz liegt bei 3–5 pro 100.000 Einwohner. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose liegt bei 70–75 Jahren, wobei Männer häufiger erkranken als Frauen. (Dores et al. 2007, Maurer und Hallek 2013). Die Prognose der Patienten mit CLL ist sehr variabel, chromosomale Aberrationen haben dabei eine entscheidende Rolle (Puiggros et al. 2014). Bei den CLL sind in seltenen Fällen die typischen Translokationen des BL (Translokationen des *MYC*-Gens) zu finden (Nelson et al. 2007). Risikofaktoren für die

---

Entstehung einer CLL sind nicht eindeutig identifiziert worden, eine familiäre Häufung wurde festgestellt (Albright et al. 2012, Slager et al. 2013). Prognostisch ungünstig sind ein niedriger Hämoglobin-Wert und eine niedrige Thrombozytenzahl (Binet et al. 1981). Häufige chromosomale Änderungen bei den CLL sind Deletionen in 6q, 11q, 13q, 17p und eine Trisomie 12 (Döhner et al. 2000).

Die *TP53*-Deletion aufgrund einer  $-17/\text{del}(17p)$  hat eine sehr schlechte Prognose, die  $\text{del}(11q)$  ist ebenfalls ein prognostischer Marker, der mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Die  $\text{del}(13q)$  hat hingegen eine günstigere Prognose (Döhner et al. 2000, Tam und Seymour 2014, Puiggros et al. 2014).

*IGH*-Translokationen oder deren Varianten sind bei CLL selten (ca. 5%). Die Prognose ist wahrscheinlich abhängig vom Translokationspartner. Die Translokation  $t(14;18)/IGH-BCL2$  soll keine schlechtere Prognose haben, jedoch soll die Translokation  $t(14;19)/IGH-BCL3$  eine schlechtere Prognose haben (Puiggros et al. 2014). Eine Translokation mit dem *IGλ*-Locus ist sehr selten. Die Translokation mit dem *IGκ*-Lokus ist noch seltener. Da meistens nicht nach der Präsenz einer Translokation mit Beteiligung des *IGλ*- oder des *IGκ*-Locus gesucht wird, ist die Translokation eventuell unterschätzt (Nguyen-Khac et al. 2011, De Braekeleer 2016). Translokationen mit einer *MYC*-Beteiligung sind sehr selten (weniger als 1%). Diese sollen eine schlechtere Prognose haben als CLL ohne *MYC*-Beteiligung (Puiggros et al. 2014).

## 1.9. Fragestellung

Durch die Identifikation von chromosomalen Veränderungen und den beteiligten Genen werden relevante Informationen erhoben, die zur Diagnose und Prognose reifer B-Zell Neoplasien maßgeblich beitragen. Während die primären, krankheitsspezifischen chromosomalen Veränderungen von reifen B-Zell Neoplasien, wie die  $t(11;14)/CCND1-IGH$  bei MCL oder die  $t(8;14)/MYC-IGH$  bei BL bekannt sind, sind unsere Kenntnisse über die Bedeutung sekundärer genetischer Alterationen und klonaler Evolution reifer B-Zell Neoplasien begrenzt. Die Kenntnis und der gezielte Nachweis sekundärer genetischer Veränderungen, die initial oder im Verlauf der Erkrankung auftreten, ist jedoch für die Einschätzung der Prognose des Patienten äußerst relevant. Man könnte aufgrund der chromosomalen Veränderungen Aussagen treffen, wie wahrscheinlich es zu einer Transformation (Übergang z.B. eines BL in ein DLBCL) oder zu einem Rezidiv kommt. Dies wäre auch für die Therapie entscheidend, da man bei initialer Diagnose schon eine vom Standard abweichende Therapie einleiten könnte, um ein Rezidiv zu vermeiden. Dies ist bis

---

heute bei den meisten reifen B-Zell Neoplasien noch nicht möglich. Die evolutionäre Entwicklung aufzuklären, ist ein erster Schritt in diese Richtung.

Die gewonnenen Daten sollen zur Einschätzung der Prognose der Patienten beitragen und zukünftig in Verbindung mit anderen Prognosefaktoren die Wahl einer risikoadaptierten Therapie in optimaler Weise ermöglichen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen verfolgten das Ziel die chromosomalen Veränderungen von reifen B-Zell Neoplasien mit einer t(11;14)/*CCND1-IGH* (MCL) und einer t(8;14)/*MYC-IGH* oder Varianten (BL, CLL und GZL) zu identifizieren und zu charakterisieren, um den Verlauf dieser Erkrankungen besser zu verstehen und somit eine bessere Einschätzung der Prognose der Patienten und die Wahl einer risikoadaptierten Therapie in optimaler Weise zu ermöglichen.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden

- 1) Welche primären und sekundären chromosomalen Veränderungen treten rekurrent bei den untersuchten reifen B-Zell Neoplasien (BL, CLL, GZL und MCL) auf?
- 2) Gibt es Unterschiede oder Gemeinsamkeiten bei den chromosomalen Veränderungen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten reifen B-Zell Neoplasien?
- 3) Ändert sich die genetische Komplexität der Karyotypen von Diagnose zu Rezidiv bei den reifen B-Zell Neoplasien?
- 4) Kann die genetische evolutionäre Entwicklung der untersuchten reifen B-Zell Neoplasien (BL, CLL, GZL und MCL) dargestellt werden?

---

## 2. Material

### 2.1. Untersuchte Fälle

In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten von 13 Patienten mit der Diagnose eines MCL, BL, CLL oder GZL eingeschlossen und ausgewertet. Die Verteilung der untersuchten reifen B-Zell Neoplasien ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Proben der Patienten wurden aus dem Archiv des Instituts für Humangenetik Kiel des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (UKSH Kiel) im Rahmen der Routine-Diagnostik-Untersuchungen entnommen.

In der Datenbank des Instituts für Humangenetik wurde nach Fällen mit denen für MCL und BL typischen Translokationen gesucht. Dies sind die  $t(11;14)/CCND1-IGH$  für die MCL und die  $t(8;14)/MYC-IGH$ ,  $t(2;8)/IG\kappa-MYC$  oder  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  für die BL. CLL und GZL wurden eingeschlossen, wenn sie in zwei Einsendungen die typischen BL *MYC*-Translokation ( $t(8;14)/MYC-IGH$ ,  $t(2;8)/IG\kappa-MYC$  oder  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$ ) aufwiesen und beide Einsendungen als CLL bzw. GZL klassifiziert waren. Bei den BL wurde vorhandenes Material von dem Leiter der Hämathopathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (UKSH Kiel), Herrn Prof. Dr. med. W. Klapper erneut begutachtet.

Als Einschlusskriterium mussten die folgenden Kriterien erfüllt sein:

1. Vorhandensein von mindestens 2 Einsendungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten desselben Patienten.
2. Die für die reife B-Zell Neoplasien spezifischen Translokationen,  $t(11;14)/CCND1-IGH$  für die MCL und  $t(8;14)/MYC-IGH$ ,  $t(2;8)/IG\kappa-MYC$  oder  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  für die BL, CLL und GZL, sollten in zwei Einsendungen vorhanden sein.
3. Um die klonale Evolution nachweisen zu können, wurden nur Patienten eingeschlossen, die in den verschiedenen Einsendungen unterschiedliche Chromosomenaberrationen aufwiesen.
4. Die Fälle reifer B-Zell Neoplasien mit Einzelzellaberrationen wurden dabei nicht berücksichtigt.
5. Es mussten die originalen Aufnahmen der Chromosomen-Bänderungsanalysen bei mindestens einer Einsendung vorhanden sein, um die Fälle zu validieren.
6. Fälle, die die Diagnose eines MCL, BL, CLL oder GZL nicht erfüllten, wurden ausgeschlossen.

**Tabelle 2:** Verteilung der ausgewählten Fälle reifer B-Zell Neoplasien nach genetischen Veränderungen

Translokation	Gesamt	Lymphomentität	Anzahl
t(11;14)/CCND1-IGH	5		
		MCL	5
MYC-Translokation	8		
		BL	5
		CLL	1
		GZL	2

## 2.2. Materialien

In diesem Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt. Allgemein gebräuchliche Utensilien wie z.B. Pipetten, Zellkulturflaschen, Glaswaren etc. wurden hier nicht explizit erwähnt.

### 2.2.1. Reagenzien

- Destilliertes Wasser (Alleman Pharma, Rimbach, Deutschland)
- Bioprime DNA-Labeling System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Chromomycin A3 (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
- Citronensäure (Th.Geyer, Renningen, Deutschland)
- Colcemid (Boehringer, Ingelheim, Deutschland)
- 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 4',6-Diamidin-2-phenylindol-2HCl (DAPI) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Dextransulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- dUTP spectrum green (1 mM) (Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)
- dUTP spectrum orange (1 mM) (Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)
- Eisessig (CH<sub>3</sub>COOH) (Th.Geyer, Renningen, Deutschland)
- Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (Merck, Renningen, Deutschland)
- Exo-Klenow-Fragment (Invitrogen)
- Fixogum Kleber (Marabu GmbH & CoKG, Tamm, Deutschland)
- Fötale Kälberserum (FKS) (PAA, Cölbe, Deutschland)
- Formamid deionisiert (Amresco, Solon, Ohio, USA)
- Giemsa (Th.Geyer, Renningen, Deutschland)
- Glycerol (Th.Geyer, Renningen, Deutschland)
- Chlorwasserstoff (HCl) 2 N (Merck, Darmstadt, Deutschland)

- Human Cot-1 DNA (1mg/ml) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Igepal CA-630 (Th.Geyer, Renningen, Deutschland)
- Kaliumchlorid (KCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Luria Broth (LB) Base (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Glutamin) (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Methanol (CH<sub>3</sub>OH) (Th.Geyer, Renningen, Deutschland)
- Methylgrün (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Natriumacetat (NaAc) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Penicillin-Streptomycin (PEST) (Gibco, Darmstadt, Deutschland)
- Perfectprep® Plasmid Maxi Kit (Eppendorf)
- PhasePrep™ BAC DNA Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Phytohämagglutinin (PHA-15) (Genzyme, Neu-Isenburg, Deutschland)
- Phosphate Buffered Saline (PBS)-Trockensubstanz (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Protease (Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)
- Protease-Puffer (Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)
- Pufferlösung mit pH 6,88 (Dinatriumhydrogenphosphat/Kaliumhydrogenphosphat) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- RPMI-1640 Medium (PAA, Cölbe, Deutschland)
- 20x SSC (Standard saline citrate) (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

### 2.2.2. Verwendete Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)-Analysen

**Tabelle 3:** Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sonden für die FISH-Analyse.

Kartiert auf	Gen	Sondenart	Name/Genort
Zentromer X	X Cen	Kommerzielle Sonde	Vysis® Cep X (DXZ1) <b>Spectrum Green (SG)</b> (Abbott/Vysis)
Zentromer Y	Y Cen	Kommerzielle Sonde	Vysis® Cep Y (DYZ3) <b>Spectrum Orange (SO)</b> (Abbott/Vysis)
1q23.1	<i>IRTA1/2</i>	Eigene Sonde	RP11-110J1 <b>SG</b> prox RP11-85G21 <b>SG</b> prox RP11-217A12 <b>SG</b> prox RP11-367J7 <b>SO</b> dist RP11-120D12 <b>SO</b> dist RP11-444M10 <b>SO</b> dist
8q24	<i>MYC</i>	Kommerzielle Sonde	Vysis® LSI® MYC Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott/Vysis)

11q22~23 Zentromer 11	<i>ATM</i> <i>FDX</i> 11 Cen	Kommerzielle Sonde Eigene Sonde Kommerzielle Sonde	Vysis® LSI® <b>ATM SO</b> FDX (RP11-420H22) <b>SG</b> CEP® 11 <b>Spectrum Aqua Probe</b> (Abbott/Vysis)
12q13 Zentromer 12	<i>CHOP</i> 12 Cen	Kommerzielle Sonde	Vysis® LSI® Chop (12q13) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott/Vysis)
13q14	<i>RBI</i>	Eigene Sonde	RP11-3420 <b>SG</b> prox RP11-480P3 <b>SG</b> prox RP11-369L4 <b>SG</b> prox RP11-175B12 <b>SO</b> dist RP11-58C16 <b>SO</b> dist RP11-233H19 <b>SO</b> dist
14q32	<i>IGH</i>	Kommerzielle Sonde	Vysis® LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott/Vysis)
17p13 17q23.1 Zentromer 17	<i>MPO</i> <i>TP53</i> 17 Cen	Kommerzielle Sonde	p53 (17p13)/ MPO (17q22) "ISO 17q (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande)
17p13	<i>TP53</i>	Kommerzielle Sonde	Vysis® TP53/CEP 17 FISH Probe Kit (Abbott/Vysis)
22q11	<i>IGλ</i>	Eigene Sonde	XTA-526G4 <b>SG</b> prox CTA-60B5 <b>SO</b> dist CTA-865E9 <b>SO</b> dist
<b>Fusionssonden</b>			
t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH</i> - <i>BCL2</i>	Kommerzielle Sonde	Vysis® LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe Kit (Abbott/Vysis)
t(11;14)(q11;q32)	<i>IGH</i> - <i>CCND1</i>	Kommerzielle Sonde	Vysis® LSI IGH/CCND1 Dual Color Dual Fusion Translocation Probes (Abbott/Vysis)
t(8;22)(q24;q11)	<i>IGλ</i> - <i>MYC</i>	Eigene Sonde	<b>IGλ:</b> XTA-526G4 <b>SG</b> CTA-60B5 <b>SG</b> CTA-865E9 <b>SG</b> <b>MYC:</b> RP11-1136L8 <b>SO</b> CTD-2267H22 <b>SO</b> CTD-3056o22 <b>SO</b> RP11-709E21 <b>SO</b> RP11-654o1 <b>SO</b>
t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC</i> - <i>IGH</i>	Kommerzielle Sonde	Vysis® LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-color Dual Fusion Probe Kit (Abbott/Vysis)

BAC—Klone wurden von der Firma Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) erworben. Cen, Zentromer; SG, Spektrum grün; SO, Spektrum orange.

### 2.2.3. Verwendete Puffer und Lösungen

- Antifade  
1,15 g DABCO  
45 ml Glycerol  
4 ml dest. Wasser  
1 ml 1M Tris HCL pH 8,0  
mit Magnetrührer gut mischen und löschen
- Carnoy's Fixativ  
150 ml Methanol  
50 ml Eisessig
- Chromomycin A3-Gebrauchslösung  
10 mg Chromomycin A3



- 
- 30 ml Puffer, pH 6,88
  - DAPI–Stammlösung  
10 mg DAPI  
50 ml dest. Wasser lösen
  - DAPI–Gebrauchslösung  
500 µl DAPI–Stammlösung  
500 ml 2x SSC
  - Giemsa–Gebrauchslösung  
6 ml Giemsa  
80 ml Puffer mit pH 6,88  
Filtrieren
  - Glycerin (Glycerol) 50%  
50 ml 99,8% Glycerin und 50 ml dest. Wasser mischen
  - LB–Medium  
20 g LB Base in 1000 ml dest. Wasser lösen  
Penicillin–Streptomycin hinzugeben
  - Mastermix 50%  
2,5 ml Formamid  
1,25 ml Dextransulfat 40%  
0,5 ml 20x SSC  
0,25 ml dest. Wasser
  - Mc Ilvaine´s Puffer  
153,6 ml Citronensäure 0,1 M  
96,4 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M  
auf pH–Wert 4 einstellen
  - Methylgrün–Stammlösung  
5,095 g Methylgrün  
250 ml mit Mc Ilvaine´s Puffer
  - Methylgrün–Gebrauchslösung  
2 ml Methylgrün–Stammlösung  
38 ml 0,1 M Citronensäure  
60 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - NaAc 3 M, pH 5  
40,82 g Natriumacetat–Trihydrat  
in ca. 80 ml dest. Wasser lösen  
pH auf 5,3 mit Natronlauge einstellen
  - Paraformaldehyd 1%  
10 g Paraformaldehyd  
in 1000 ml dest. Wasser zum Lösen auf Heizplatte erwärmen
  - PBS  
9,55 g Fertigpulver  
in 1 L Aqua dest. Auflösen

- 
- Waschpuffer 1  
20 ml 20xSSC  
3 ml Igepal ad 1000 ml dest. Wasser
  - Waschpuffer 2  
100 ml 20xSSC  
3 ml Igepal ad 1000 ml dest. Wasser
  - 2xSSC  
20xSSC  
1:10 mit dest. Wasser verdünnen
  - 1M Tris HCl pH 8,0  
60,55 g  $C_4H_{11}NO_3$   
in 400 ml dest. Wasser lösen  
mit HCl auf pH 8 einstellen  
500 ml dest. Wasser hinzugeben

#### **2.2.4. Kulturansätze**

- Über-Nacht-Medium (ÜN)  
400 ml RPMI 1640  
50 ml FKS  
50 ml CM  
5 ml Glutamin  
5 ml PEST
- 2-Tages-Medium (2d)  
350 ml RPMI 1640  
100 ml FKS  
50 ml CM  
5 ml Glutamin  
5 ml PEST
- CM-Ansatzmedium  
500 ml RPMI 1640  
125 ml FKS  
6,25 ml Glutamin  
6,25 ml PEST  
6,25 ml PHA-15

#### **2.2.5. Verwendete Geräte und Software**

- Lichtmikroskop (Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)
- Brutschrank (Kendro, Hanau, Deutschland)
- Bürker-Zählkammer (Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland)
- FISH-Waschautomat: VP2000 Prozessor (Abbott, Wiesbaden, Deutschland)

- 
- Fluoreszenz-Mikroskop: Zeiss-Axioskop, Zeiss-Axioplan und Zeiss-Axio-Imager (Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit Fluoreszenzfilter (Fa. AHF Analysentechnik AG Tübingen, Deutschland)
  - GraphPad Prism package V.5.00 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA)
  - IBM-SPSS Statistics V.21 (Chigago, IL, USA)
  - Isis-Workstation (Metasystems, Altlussheim, Deutschland)
  - Ikaros Computerprogramm V.5.2.11. (Metasystems, Altlussheim, Deutschland)
  - Klimakammer (Thermotron, Sittingbourne, Großbritannien)
  - NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometers (peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland)
  - Sicherheitswerkbank (Plymouth, USA)
  - Universalschüttler mit Inkubationshaube: SM-30 und TH30 (Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland)
  - Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
  - Twist Top Vials (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
  - Vortexer REAX2000 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
  - Wasserbad (Köttermann, jetzt ROWA, Heimsheim, Deutschland)
  - Zentrifuge: Biofuge 22R (Heraeus, Hanau, Deutschland)
  - Zentrifuge: Cytospin-2-Shandon (Shandon, Frankfurt, Deutschland)
  - Zentrifuge: Mikro 200 (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
  - Zentrifuge: Multifuge 1 L-R (Heraeus, Hanau, Deutschland)

---

### 3. Methoden

#### 3.1. Zytogenetische Untersuchungen reifer B-Zell Neoplasien mittels Chromosomen-Bänderungstechniken

Die Zytogenetik ist eine Methode, die einen Überblick über chromosomale Veränderungen schafft. Es existieren verschiedene Verfahren, um genetische Veränderungen bei reifen B-Zell Neoplasien nachzuweisen, die in Abhängigkeit der genetischen Veränderung zum Einsatz kommen. Die grundlegende Methode zur Identifizierung von chromosomalen Aberrationen ist die klassische Chromosomenanalyse bzw. Chromosomen-Bänderungsanalyse. Bei der klassischen Chromosomenanalyse müssen die Chromosomen im Metaphase-Stadium der Zellteilung arretiert und die Banden der Chromosomen durch verschiedene Färbungen sichtbar gemacht werden. Es können die G-Bänderung (Färbung mit Giemsa), die Q-Bänderung (Färbung mit Quinacrin) oder die R-Bänderung (reverse Färbung), die der G-Bänderung gegensätzliche Färbung darstellt, verwendet werden. Die Chromosomen werden nach Größe, Lage des Zentromers und der Bandenmuster geordnet und in Form eines Karyogramms dargestellt. Das Karyogramm wird entsprechend der Richtlinien des „*International System for Human Cytogenetic Nomenclature ISCN 2013*“ als Karyotypformel zusammengefasst (Shaffer et al. 2013) und die Richtigkeit der erstellten Karyotypen wurde mit dem *Cydas software package* geprüft (Hiller et al. 2005). Mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse können numerische Veränderungen (Aneuploidien) und strukturelle Veränderungen (Deletionen, intrachromosomale Zugewinne, Duplikationen, Inversionen und interchromosomale Translokationen) sowie größere Verluste oder Zugewinne von chromosomalen Anteilen nachgewiesen werden. Bei sehr komplexen Karyotypen oder schlechter Chromosomen-Morphologie ist eine vollständige Auflösung des Karyotyps nicht immer möglich. Um Veränderungen, die unterhalb der Nachweisgrenze von 10 Megabasenpaare (Mbp) der Chromosomen-Bänderungsanalyse liegen, zu identifizieren, werden molekularzytogenetische Untersuchungen mittels der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) angewandt (siehe Kapitel 3.2).

##### 3.1.1. Zellisolation aus peripherem Blut (pB), Knochenmark (KM), Pleura, Aszites, und Lymphknoten (LK)

Wie in Kapitel 3.1 erwähnt wurde, ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Chromosomen-Bänderungsanalyse, dass die Zellen im Zellteilungsstadium der Metaphase arretiert werden.

---

Dafür sind vitale, teilungsfähige Zellen aus unterschiedlichen Geweben, u. a. pB, KM oder LK unabdingbar. Um die Zellen für die Chromosomen-Bänderungsmethode vorzubereiten, wurden diese zuerst kultiviert. Zu diesem Zweck wurden pB, KM, Pleura und Aszites von hämatologischen Patienten in 15 ml Röhren gegeben und diese bis 14 ml mit RPMI 1640 aufgefüllt und gemischt. Aus der Mischung wurden 50 µl für die Zellzählung entnommen.

Bei Lymphknoten ist es erforderlich die Zellen aus dem Gewebe zu trennen, um sie isolieren zu können. Bei der Einsendung eines Lymphknotens wurde dieser zuerst geteilt. Die Hälften wurden drei Mal auf Objektträger aufgetupft, um Tupfpräparate herzustellen. Die Tupfpräparate wurden bei -20°C für ihre spätere Untersuchung mittels des FISH-Verfahrens asserviert. Die Anteile des Lymphknotens wurden in eine Petri-Schale mit RPMI 1640 gelegt und in kleine Teile geschnitten. Die zerkleinerten Teile wurden durch ein Drahtgewebe gepresst und das Netz zwischendurch mit RPMI 1640 gespült. Die ausgewaschenen Zellen wurden in einem Becherglas aufgefangen und in 15 ml Röhren umgefüllt. Das Röhren wurde bis 14 ml mit RPMI 1640 aufgefüllt. Daraufhin wurden 50 µl von der Lymphknotensuspension abgenommen und zur Zellzählung verwendet (Siehe Kapitel 3.2.2).

Die zur Zellzählung abgenommenen Zellen wurden mit 500 µl 2%iger Essigsäure gemischt. Davon wurden 10 µl in die Bürker Zählkammer gegeben und zwei Großquadrate ausgezählt. Aus dem Mittelwert wurde die Gesamtzellzahl berechnet. Zur Berechnung wurde die folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnung}}{\text{Essigsäure} \times \text{Probenvolumen}} = \text{Zellzahl} \times 10^4 \text{ Zellen in der eingesandten Probe}$$

Die restliche Lösung in den 15 ml Röhren, die nicht für die Zellzählung benötigt wurde, wurde weiter verarbeitet. Die Zelllösung wurde für 10 Minuten bei 1300 UpM zentrifugiert. Bei Pleura und Aszites wurde auf die Zentrifugation verzichtet. Folglich wurden die isolierten Zellen in weiteren Schritten für ihre Verwendung ggf. Kultivierung prozessiert (siehe Kapitel 3.1.2 und 3.1.3).

### **3.1.2. Herstellung von Cytospinpräparaten und Ausstrichen aus pB und KM**

Um Cytospinpräparate herstellen zu können wurden  $5 \times 10^6$  Zellen mit 10 ml PBS-Puffer gemischt. In den Objektträger-Clip der Cytospin 2-Zentrifuge wurden in dieser Reihenfolge: ein Objektträger, eine Filterkarte und eine TPX Probenklammer montiert. Daraufhin wurden 200 µL der Zellsuspension pipettiert. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 800 UpM zentrifugiert. Die Zentrifugation führt dazu, dass die Zellen sich an einer kleinen Stelle

---

konzentrieren. Wenn die Präparate nicht sofort verwendet werden, sollten sie bei mindestens  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden.

Ausstriche werden hergestellt, indem ein Tropfen des Blutes oder Knochenmarkes der Patienten auf einen Objektträger gegeben wird. Mit einem anderen Objektträger wird der Tropfen gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt. Der Objektträger wird luftgetrocknet.

### **3.1.3. Kultivierung isolierter Zellen und Aufarbeitung der Zellkulturen aus pB, KM, Pleura, Aszites und LK**

Aus den in Kapitel 3.1.1 hergestellten Lösungen wurden grundsätzlich je eine unstimulierte Über-Nacht-Kultur (ÜN-Kultur) mit dem ÜN-Medium und eine 2-Tage-Kultur (2d-Kultur) mit dem 2d-Medium angesetzt. Pro 5 ml Kultur wurden in der Regel  $10 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Kulturen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank (Kendro) 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Bei ausreichend vorhandenem Material bzw. Zellen wurden zusätzlich zu den Zellkulturen Cytospinpräparate hergestellt.

Nach den Inkubationszeiten der ÜN-Kultur und 2d-Kultur wurden zu je 5 ml Zellkultur 75  $\mu\text{l}$  Colcemid (10  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) pipettiert und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Colcemid ist ein Spindelapparatgift, wodurch die Zellen in der Metaphase arretiert werden. Die Zellsuspension wurde im nächsten Schritt bei 1300 UpM für 10 Minuten zentrifugiert (Multifuge 1 L-R Heraeus). Der Überstand wurde bis auf 2 ml abgenommen und das Sediment aufgeschüttelt. Das Sediment wurde mit 0,075 M KCl bis auf 14 ml aufgefüllt, damit die Zellen durch den leichten osmotischen Gradienten aufquellen, um die Zellnuklei zu isolieren. Die Zellsuspension wurde 30 Minuten im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  in Schräglage des Röhrchens inkubiert. Es wurden einige Tropfen  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltes Carnoy's Fixativ (Fixativ) hinzugegeben. Das Röhrchen wurde 10 Minuten bei 1300 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 2 ml abgenommen. Das Sediment wurde kurz im Vortexer aufgerüttelt und das Röhrchen bis auf 14 ml mit Fixativ aufgefüllt. Es wurde wieder 10 Minuten bei 1300 UpM zentrifugiert und der Überstand wieder bis 2 ml abgenommen. Diese Schritte wurden wiederholt, bis das Sediment mit den isolierten Zellnuklei weiß war. Durch dieses Verfahren werden Erythrozyten und Zytoplasma entfernt. Die Zellnuklei (fixierte Zellen) wurden in 2 ml Fixativ resuspendiert und in ein TwistTop Vial umgefüllt. Die fixierten Zellkerne werden nach Gebrauch zur Aufbewahrung im Kühlschrank gelagert.

---

#### **3.1.4. Herstellung des konditionierten Medium (CM) für die Zellkulturen**

Das CM ist erforderlich um die Proliferation der Zellen zu fördern. Dazu wird menschliches Blut genommen, um ein Milieu zu erzeugen, das dem des Körpers ähnelt. Das CM wurde angesetzt, indem von freiwilligen Blutspendern in Heparinmonovetten Blut abgenommen wurde. Diese wurden zum Absedimentieren 2–4 Stunden in den Brutschrank gestellt bis sich nach 2–4 Stunden ein Leukozytenring gebildet hatte. Je 9 ml des CM–Ansatzmediums wurden in eine Zellkulturflasche mit Belüftungsklappe gegeben. Vom Heparinblut wurde der Überstand mit Leukozytenring und einigen Erythrozyten abgenommen, gemischt und jeweils 1 ml pro Zellkulturflasche hinzugefügt. Die Kulturen wurden 3 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die im Medium kultivierten Lymphozyten in Röhrchen umgefüllt und 10 Minuten bei 1300 UpM herunterzentrifugiert (Multifuge 1 L–R, Heraeus). Der Überstand wurde in einen großen Erlenmeyerkolben gesammelt. Das Sediment wurde entsprechend der Sicherheitsverfahren entsorgt.

Als nächstes wurde die Lösung aus dem Erlenmeyerkolben in 50 ml Röhrchen mit je 40 ml abgefüllt. Die Steriflip–Filter wurden auf die Röhrchen aufgeschraubt und die Lösung sollte durch eine Vacuumpumpe gesaugt werden. Der Steriflip wurde unter der Klimakammer (Thermotron) abgeschraubt und das Röhrchen mit einem sterilen Deckel verschlossen. Die Kulturen wurden bis zum Gebrauch bei –20°C eingefroren.

#### **3.1.5. Chromosomenpräparation, Chromosomen–Färbung und digitale Aufnahme der gebänderten Chromosomen**

Für eine optimale Chromosomenanalyse wird eine große Aufspreitung der Chromosomen benötigt. Für diesen Zweck wurden die in Fixativ fixierten Zellen aus größerer Höhe in der Klimakammer auf eisgekühlte Objektträger aufgetropft. Daraufhin wurden die Objektträger bei Raumtemperatur 10 Minuten mit der Giemsa–Gebrauchslösung gefärbt und anschließend mit Leitungswasser gut abgespült. Dadurch werden die in der Metaphase arretierten Chromosomen gefärbt aber nicht gebändert, sodass das Auswerten der Mitosen noch nicht möglich ist.

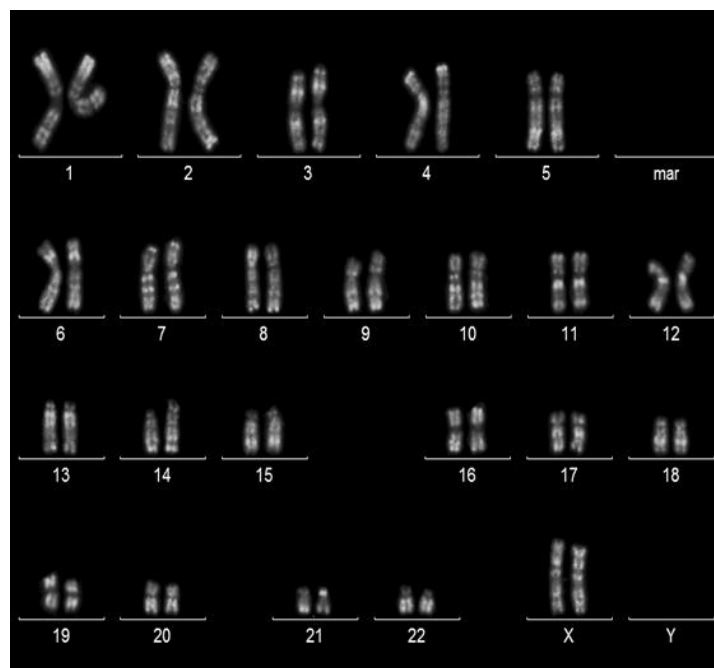
Die gefärbten Objektträger wurden in das Metaphasensuchgerät gelegt und das Gerät gestartet. Das Gerät sucht alle Metaphase–Chromosomen und fotografiert diese, aber trotz hoher Sensitivität des Gerätes nimmt dies auch Zellhaufen und andere Artefakte auf. Die Aufnahmen müssen daher manuell geprüft werden, um möglichst 40 Metaphasen geeigneter

---

Qualität speichern zu können. Das Gerät speichert auch die Koordinaten der Lokalisation der Metaphasen, um sie nach der Farbbänderung wieder zu finden.

Danach wurden die Objektträger für jeweils wenige Sekunden in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70%, 50%) und mindestens 45 Minuten in Fixativ von der Giemsa-Färbung entfärbt. Die nächste Färbung fand mit ChromomycinA3- und Methylgrün-Gebrauchslösung als Gegenfärbung statt. Durch diese Färbung erkennt man die R-Bänderung der Chromosomen. Dazu wurden zwei Tropfen ChromomycinA3-Gebrauchslösung auf den Objektträger gegeben und eingedeckelt. Luftblasen und überschüssiges Medium wurden vorsichtig unter dem Rand des Deckglases herausgepresst und mit einem Zellstoff entfernt. Die Färbung wirkte eine Stunde lang unter Lichtabschluss in einer Metallbox ein, gefolgt von einer 5 Minuten langen Inkubation in der Methylgrün-Gebrauchslösung.

Die auf den Objektträgern überschüssige Farbe wurde mit Glycerin abgespült und die Objektträger luftblasenfrei eingedeckelt. Vor dem Fotografieren wurde das überschüssige Glycerin sorgfältig aus den Objektträgern herausgedrückt. Zum Fotografieren wurden die Objektträger in das Metaphasensuchgerät gelegt, das nach manuellem Scharfstellen die vorher aufgesuchten Metaphasen fotografierte. Das Metaphasensuchgerät arbeitet mit Fluoreszenzlicht, wodurch die mit ChromomycinA3 gefärbten Objektträger leuchteten. Die fotografierten Metaphasen wurden mit dem Computerprogramm Ikaros unter dem jeweiligen Fall abgespeichert und ausgewertet. Die Abbildung 4 zeigt ein Karyogramm eines regelrechten weiblichen Chromosomensatzes.



**Abbildung 4:** Karyogramm mit einem regelrechten weiblichen Karyotyp: 46,XX



---

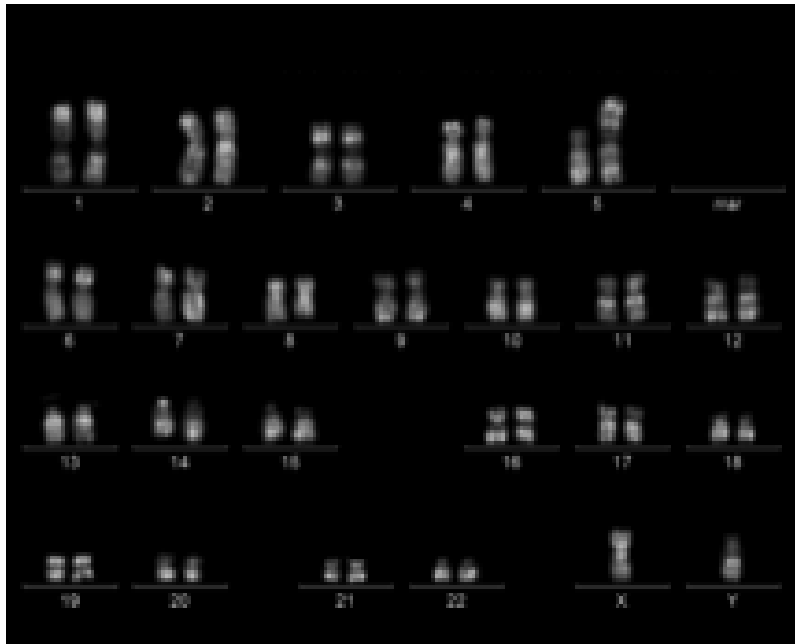
### 3.1.6. Auswertung der Chromosomen und Erstellung eines Karyotyps

Die Auswertung der Chromosomen erfolgte unter Anwendung des Computerprogramm Ikaros. Alle aufgenommen Metaphasen wurden angesehen und möglichst 20 Metaphasen, je zehn Metaphasen aus der ÜN-Kultur und der 2d-Kultur, hinsichtlich numerischer und struktureller Veränderungen ausgewertet. Bei mehr als zwei Kulturen wurden aus jeder Kultur möglichst gleich viele Metaphasen ausgewertet. Die Beschreibung der Karyotypen fand nach den Regeln der „*International System of Human Cytogenetic Nomenclature*“ (Shaffer et al. 2013) statt.

Strukturelle Veränderungen und Zugewinne von Chromosomen werden als klonal bewertet, wenn die Veränderungen in mindestens zwei Metaphasen auftreten. Bei Verlusten von ganzen Chromosomen müssen diese Verluste in mindestens drei Metaphasen nachzuweisen sein, um als klonal zu gelten. Wenn klonale Veränderungen nachgewiesen werden, sind sie als aberrante Veränderungen anzusehen und werden dokumentiert.

### 3.1.7. Komplex aberranter chromosomaler Karyotyp und Karyotypkomplexität

Für die Ermittlung der Karyotypkomplexität im Fall eines chromosomal aberranten Klons wurden strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen zusammengezählt. Karyotypen mit mehr oder gleich drei Aberrationen wurden als komplex bezeichnet. Ein Beispiel eines komplexen Karyotyps ist in Abbildung 5 gezeigt.



**Abbildung 5:** Komplex aberrantes Karyogramm eines BL mit dem Karyotyp: 46,X,der(Y)t(Y;7)(q12;q21),der(5)t(1;5)(q11;p14),t(8;14)(q24;q32). Die Komplexitätsanzahl beträgt in diesem Fall  $n=3$ .

---

Wird die Präsenz eines Markerchromosoms erfasst, wird dieses Markerchromosom ebenso als eine Veränderung gezählt. Die Anwesenheit von zusätzlichen aberranten Chromosomen wie z.B. eine zusätzliche  $t(8;14)(q24;q32)$  [ $+t(8;14)(q24;q32)$ ] wurden als zusätzliche Veränderung gezählt. Wenn gleichzeitig Tumormaterial von verschiedenen Geweben oder Organen (pB, KM, Pleura und Aszites) für die Untersuchung zur Verfügung standen, wurden diese als ein Zeitpunkt gewählt und nur eine Komplexitätsanzahl angegeben. Die Richtigkeit der erstellten Karyotypen wurde mit dem *Cydas software package* geprüft (Hiller et al. 2005).

### **3.2. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)–Analysen bei reifen B–Zell Neoplasien**

Die FISH–Analyse basiert auf der Verwendung von Fluoreszenz–markierten DNA–Sonden, um die komplementären DNA–Sequenzen darstellen zu können. Somit können spezifische genomische Sequenzen gezielt nachgewiesen werden. Die Darstellung erfolgt unter einem Fluoreszenz–Mikroskop mit Filtersätzen, die nur den benötigten Wellenlängenbereich durchlassen. Für die vorliegende Arbeit wurde FISH mit DNA–Sonden angewandt, die ermöglichen, strukturelle Veränderungen (z. B. Bruchpunkte, Deletionen, Translokationen, Duplikationen oder Amplifikationen) zu erfassen. Mittels FISH können auch numerische Veränderungen (Aneuploidien) sichergestellt werden. Ein Unterschied zu der klassischen Chromosomenanalyse ist, dass die FISH–Technik nicht nur an fixierten Zellen im Zellstadium der Metaphase, sondern auch an Interphase–Zellen angewandt werden kann. Somit besteht die Möglichkeit FISH an archiviertem Material wie z. B. Cytospinpräparaten und tiefgefrorenen und in Paraffin–eingebetteten Gewebeschnitten zu nutzen.

Die molekularzytogenetische Untersuchung mittels FISH erfordert zunächst die Sondenherstellung durch Isolierung von DNA der ausgewählten BACs, die fluoreszenzmarkiert und aufgereinigt werden. Um repetitive Sequenzen abzudecken, erfolgte eine Fällung mit Cot–1 DNA. Die Hybridisierung der DNA–Sonde fand auf mit Protease verdauten Objektträgern statt. Nach Waschen der Objektträger konnten die Signale unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Für die Detektion der häufigsten rekurrenten und klinisch relevanten chromosomalen Veränderungen hämatologischer Neoplasien stehen eine Vielfalt kommerzieller Sonden zur Verfügung. Hierzu gehören z.B. die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sonden zur Detektion von  $-17/del(17p)$  [TP53 (17p13)/SE 17 FISH Probe (Kreatech, Amsterdam, Niederlande)] und zur Detektion der  $t(8;14)/MYC-IGH$  [Vysis LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri–color Dual Fusion Probe Kit (Abbott, Wiesbaden, Deutschland)]. Für seltene Genorte stehen

---

keine industriell hergestellten Sonden zur Verfügung und diese müssen aus kommerziell erhältlichen bakteriellen Plasmiden in einem Verfahren, das in den nächsten Kapiteln erläutert wird (siehe Kapitel 3.2.1), selbst hergestellt werden, wie z.B. die Sonde für *IGλ*.

### **3.2.1. Bacterial Artificial Chromosome (BAC) für die Herstellung locuspezifischer DNA-Sonden**

Zur Herstellung lokusspezifischer DNA-Sonden für FISH-Analysen wurde die entsprechende BAC-DNA benötigt. Im Rahmen des Humanen Genom Projektes wurde die menschliche DNA fragmentiert und in Klonierungsvektoren wie BACs, PACs, Cosmide und Fosmide inseriert. BAC und PAC sind bakterielle Plasmide (doppelsträngige zirkuläre DNA) mit einer Größe von 100–300 Kbp, die die kodierende Sequenz der Gene von Interesse enthalten. Replikation und Vererbung erfolgen unabhängig vom bakteriellen Chromosom. Die Auswahl der DNA-Klone erfolgte mit Hilfe der UCSC Genome Bioinformatics-Datenbank (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Die BAC-Klone wurden bei der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bestellt. Die BAC-Klone wurden in ca. 3 ml LB-Medium mit 1,5 µl Chloramphenicol im Schüttelinkubator bei 37°C über Nacht inkubiert. Es wurden zwei Glycerinstöcke aus je 500 µl Glycerin und 500 µl Bakterienkultur hergestellt. Diese wurden in ein Schraubröhrchen gegeben und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

### **3.2.2. Isolierung der BAC –DNA aus einer Bakterienkultur**

Die bei –80°C eingefrorenen Glycerin-Stöcke mit den BACs wurden aufgetaut. 100 µl Bakterienkultur eines Glycerinstockes wurden in 200 ml LB-Medium mit 20 µg/ml Chloramphenicol über Nacht bei 37°C im Universalschüttler (Edmund Bühler) kultiviert. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem Perfectprep® Plasmid Maxi Kit (Eppendorf) nach Anleitung des Herstellers. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometers (NanoDrop® Technologies) bestimmt. Zur Ermittlung der Konzentration wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Wasser als Referenz bestimmt. Als Grundlage der Berechnung wurde davon ausgegangen, dass die optische Dichte doppelsträngiger DNA eine Konzentration von 50 µg/ml beträgt. Um die Reinheit der DNA zu überprüfen, wurde das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Wert A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> sollte dabei zwischen 1,8 und 2 liegen.

---

### 3.2.3. Fluoreszenzmarkierung der DNA mittels Random Priming

Die Markierung der DNA erfolgte mit dem Bioprime® DNA-Labeling System (Invitrogen). „Random Oktamere“ lagern sich dabei an das denaturierte DNA-Template und werden mit dem Klenow-Fragment (DNA-Polymerase ohne 5' → 3' Exonuklease-Aktivität) verlängert, bis sie auf das nächste gebundene „Random Oktamer“ stoßen. Das im Kit vorgesehene dNTP-Reagenz zur Biotinylierung wurde durch einen dNTP-Mix mit Spectrum Green bzw. Spectrum Orange markierten Nukleotiden ersetzt. Zur direkten Markierung dienten dabei die dUTP-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe Spectrum Green oder Spectrum Orange (Vysis/Abbott). Diese wurden wie folgt mit unmarkierten dNTPs (Roche Diagnostics) gemischt:

10x dNTP-Mix :	2,5 µl dATP (10 mM)
	2,5 µl dCTP (10 mM)
	2,5 µl dGTP (10 mM)
	1,25 µl dTTP (10 mM)
	12,5 µl dUTP-Spectrum Orange bzw. dUTP-Spectrum Green (1 mM)
	3,75 µl dH <sub>2</sub> O
	<hr/>
	25 µl gesamt

Es wurde 1 µg DNA mit Wasser auf ein Volumen von 24 µl verdünnt und mit 20 µl 2,5 x Random Primer gemischt. Das Gemisch wurde 5 Minuten in einem kochenden Wasserbad denaturiert und danach sofort ca. 5 Minuten in Eis abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 5 µl der 10 x dNTP-Mixtur und 1 µl Exo-Klenow Fragment (DNA-Polymerase ohne 5' → 3' Exonuklease-Aktivität). Über-Nacht wurde die Reaktion bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag mit 5 µl Stopp Puffer beendet.

### 3.2.4. Aufreinigung der DNA-Sonden

Zur Aufreinigung wurde die markierte DNA auf die Microcon® YM-30 Säule (Millipore) pipettiert, die in einem 1,5 ml-Gefäß stand und diese bei 14000 UpM 10 Minuten zentrifugiert (Mikro 200, Hettich). Der Durchlauf wurde verworfen. Es wurden 2 x 300 µl Wasser auf die Säule gegeben und jeweils 10 Minuten mit 14000 UpM erneut zentrifugiert. Der Durchlauf wurde wiederum verworfen. Es wurden 50 µl Wasser auf die Säule pipettiert und diese umgedreht in ein sauberes Röhrchen gestellt. Das Röhrchen wurde 5 Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert und der Durchlauf mit den markierten DNA-Sonden wurde bei – 20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

---

### 3.2.5. Ethanol-Fällung mit Cot-1-DNA

Fast alle Sonden weisen ubiquitär vorkommende repetitive Elemente auf, die zu unspezifischen FISH-Signalen führen würden. Zur Blockierung dieser unspezifischen Bindungsstellen wurde zu den Sonden hochrepetitive unmarkierte menschliche DNA sog. Cot-1 DNA gegeben. Dazu wurden 10 µl jeder aufgereinigten DNA-Sonde (Spectrum Green- und Spectrum Orange-markiert) mit 5 µl Cot-1-DNA versetzt. Nach Zugabe von 1/10 des Volumens an 3 M NaAc und des 2,5 fachen Volumens von 100%igem Ethanol wurde der Ansatz gemischt und bei 17.000 UpM für ca. 30 Minuten zentrifugiert (Biofuge 22R, Heraeus).

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet abgedunkelt für ca. 15 Minuten bei ca. 50 °C getrocknet. Folglich wurden die präzipitierten DNA-Sonden in 10 µl Mastermix 50% aufgenommen. Zum Lösen der Sonde im Mastermix 50% wurde der Ansatz zwei Stunden bei 800 UpM geschüttelt (Thermomixer comfort, Eppendorf).

### 3.2.6. Vorbehandlung der Objektträger

Für die Anwendung der FISH-Technik wurden vorhandene fixierte Zellen für die Chromosomenpräparationen auf die Objektträger aufgetropft. Im Falle, dass keine fixierten Zellen zur Verfügung standen, wurden Cytospinpräparate bzw. Ausstriche verwendet. Unter dem Mikroskop wurde auf dem Objektträger nach einem geeigneten Ort für das Pipettieren der Sonden gesucht. Dort sollten ausreichend, aber nicht überlagerte Zellen zur Verfügung stehen. Die ausgesuchten Bereiche/Felder wurden mit einem Diamantschreiber markiert, um später die Sonden an diesen geeigneten Stellen zu hybridisieren.

Die Zellen auf dem Objektträger wurden automatisiert in dem VP2000 Prozessor (Abbott) weiter behandelt. Dabei durchliefen die Objektträger verschiedene Bassins. Dabei fand eine enzymatische Verdauung mit Protease statt, um den Transfer der DNA in den Zellkern zu ermöglichen:

- 5 Minuten Protease bei 37°C
- 1 Minute Wasser bei RT
- 2 Minuten 1% Paraformaldehyd bei RT
- 1 Minute Wasser bei RT
- 2 Minuten 70% Ethanol bei RT
- 2 Minuten 80% Ethanol bei RT
- 2 Minuten 100% Ethanol bei RT

- 
- 5 Minuten Trocknung

### **3.2.7. Hybridisierung der DNA–Sonden zur Ziel–DNA**

Auf die behandelten Objektträger mit den Zellen wurden 1,3 µl der ausgewählten DNA–Sonden auf den ausgesuchten Feldern pipettiert. Auf die pipettierten Sonden wurden Deckgläschen von einem 10 mm Durchmesser gelegt, die mit Fixogum Flüssigkleber verschlossen wurden. Die Objektträger wurden in einer Feuchtkammer für sieben Min in einem auf 75°C aufgewärmtem Wasserbad inkubiert. Die Hybridisierung der markierten Sonden mit der DNA der Patienten erfolgte in Dunkelheit bei 37°C für 12–72 h in einem Brutschrank.

### **3.2.8. Waschen**

Nach der Inkubationszeit wurden die Objektträger mit dem VP2000 Waschprogramm gewaschen und anschließend mit einem DNA–bindenden Fluoreszenzfarbstoff (DAPI) gegengefärbt, um die Zellkerne und Metaphasen erkennen zu können. Dabei durchliefen die Objektträger verschiedene Bassins:

- 2 Minuten Waschpuffer 1 bei 72°C
- 1 Minute Waschpuffer 2 bei RT
- 1 Minute 2x SSC bei RT
- 5 Minuten DAPI bei RT
- Abschließendes Spülen in 2x SSC bei RT

Zum Schluss wurden auf ein Deckglas zwei Tropfen Antifade gegeben und die Objektträger mit dem Hybridisierungsfeld nach unten auf das Antifade gelegt. Luftblasen und überschüssiges Medium wurden vorsichtig unter dem Rand des Deckglases herausgedrückt und mit einem Zellstoff entfernt. Antifade ist nötig um die Fluoreszenzkraft der Sonden zu verstärken.

### **3.2.9. Auswertung FISH**

Die Analyse der Interphase–Zellkerne erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop. Es wurden immer 100 Interphase–Zellkerne ausgewertet und ein bis drei Bilder aufgenommen. Diese Bilder wurden mit dem ISIS Programm Software Version 5.1.9 und Version 5.2.11 (Metasystems) dokumentiert.

---

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene DNA-Sonden zur Detektion von numerischen Aberrationen, wie Deletionen des *TP53*-Gens (Abbildung 6), und strukturelle Aberrationen, wie die Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  (Abbildung 7) angewandt.



**Abbildung 6:** FISH mit lokusspezifischen DNA-Sonden für das *TP53*-Gen (grün) und den *MPO*-Locus (rot, Kontrollsonde). Die abgebildete Zelle zeigt 2 rote Signale für die Kontrollsonde. Für die grüne Sonde ist ein einziges Hybridisierungssignal nachweisbar, was auf eine *TP53*-Deletion hindeutet.

Abbildung 7 ist das Ergebnis einer Hybridisierung mit der in dieser Arbeit angewandten kommerziell erhältlichen Sonde zur Detektion der Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$ . Eine typische Fusion des *MYC*-Gens oder des *CCND1*-Gens mit dem *IGH* Locus besteht, wenn zwei kolokalisierte grüne und rote Signale zu sehen sind und zusätzlich noch ein grünes und ein rotes Signal vorhanden sind. Die gleiche Konstellation ist bei der Translokationssonde für das *MYC*-Gen mit dem *IGλ*- oder dem *IGH*-Locus zu sehen. Die untere Nachweisgrenze bei den Analysen liegt bei 5%.



**Abbildung 7:** FISH mit DNA-Sonden für das *MYC*-Gen (rot) und den *IGH*-Locus (grün). Normale Zellen weisen 2 getrennte Hybridisierungssignale für das *MYC*- und *IGH*-Gen auf. Findet eine Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  statt, werden jeweils ein rotes und ein grünes Signal durch 2 Fusionssignalen (gelb) ersetzt.

### 3.3. Statistische Auswertung

Folgende Daten wurden bei den Patienten für diese Arbeit erhoben:

- Alter bei Diagnosestellung
- Geschlecht
- Untersuchtes Organ
- Progressionsfreies Intervall

---

- Karyotyp und Komplexität des Karyotyps

Um das progressionsfreie Intervall zu berechnen, wurde die Zeit in Wochen berechnet. Diese wurden zu ganzen Wochen abgerundet. Zusätzlich zum Mittelwert wurden außerdem Maximum und Minimum berechnet.

Statistische Analysen inklusive der Abbildungen wurden mit dem GraphPad Prism package V.5.00 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA) und IBM-SPSS Statistics V.21 (Chigago, IL, USA) durchgeführt. Als statistisch signifikant zählte ein p-Wert von  $<0,05$ .



---

## 4. Ergebnisse

Bei der Diagnostik und der Prognoseabschätzung von malignen reifzelligen B-Zell Lymphomen spielt die genetische Untersuchung eine wesentliche Rolle. Ziel dieser Arbeit war, die klonale Entwicklung von MCL und BL und soweit möglich der CLL und GZL mit einer typischen BL-Translokation zu untersuchen sowie rekurrente sekundäre chromosomale Veränderungen aufzudecken und diese zu vergleichen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden insgesamt 13 reifzellige B-Zell Lymphome eingeschlossen; fünf MCL und fünf BL, sowie ein CLL und zwei GZL mit Nachweis einer  $t(8;14)/MYC-IGH$  oder Varianten, die mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse und der FISH-Technik untersucht wurden. Die gesamte Darstellung der demographischen Daten, klinischen Daten sowie der erhobenen zytogenetischen und molekularzytogenetischen Daten ist in den Tabellen 8, 12, 13, 16 und 17 zusammengefasst.

### 4.1. Zytogenetische und FISH-Analyse bei MCL

#### 4.1.1. Demographische Daten und Berechnung des progressionsfreien Intervalls von Diagnose bis zum Rezidiv bei MCL

Es wurden fünf Fälle mit der Diagnose eines MCL in diese Arbeit eingeschlossen, die alle Einschlusskriterien nach Kapitel 2.1 erfüllt hatten. Bei drei der fünf MCL-Fälle konnten aberrante Karyotypen von zwei Zeitpunkten untersucht werden. Bei den anderen zwei MCL-Fällen konnten aberrante Karyotypen von drei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden.

Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 64,2 Jahren. Vier der Patienten mit MCL waren männlichen Geschlechts und eine Person weiblichen Geschlechts.

Die durchschnittliche progressionsfreie Zeit von der Diagnose bis zum ersten Rezidiv lag bei 60 Wochen (Minimum 31 Wochen, Maximum 101 Wochen). Die Intervalle von Diagnose zum zweiten Progress/Rezidiv betragen 87 und 128 Wochen.

#### 4.1.2. Identifikation sekundärer genetischer Veränderungen bei der Diagnose von MCL

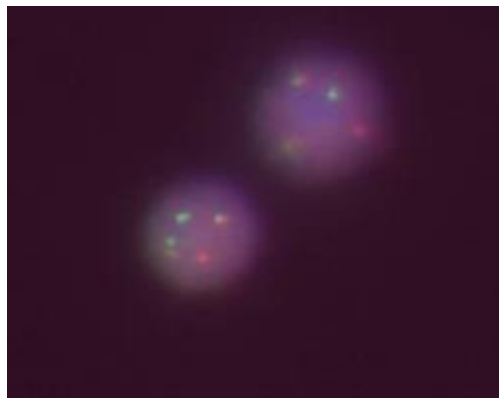
Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten MCL Fälle wiesen die für die MCL pathognomonische Translokation  $t(11;14)/CCND1-IGH$  auf. Die  $t(11;14)/CCND1-IGH$  wurde mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse detektiert. Außerdem wurden

spezifische Sonden für die *CCND1*- und *IGH*-Gene zum Nachweis der Translokation  $t(11;14)/CCND1-IGH$  mittels FISH angewendet (siehe Abbildung 8). Die  $t(11;14)/CCND1-IGH$  konnte erwartungsgemäß bei allen untersuchten MCL-Fällen bestätigt werden (Tabelle 4). Alle verwendeten Sonden sind in Kapitel 2.2.2 zu finden. Die Konsensus-Karyotypen der Chromosomen-Bänderungsanalysen und der FISH-Untersuchungen aller Fälle sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Darstellung der FISH Ergebnisse zum Nachweis der  $t(11;14)/CCND1-IGH$  bei den untersuchten MCL zum Zeitpunkt der Diagnose

Fall	$t(11;14)/CCND1-IGH$
MCL1a	+
MCL2a	+
MCL3a	+
MCL4a	+
MCL5a	+

Die Translokation war bei „+“, nachweisbar; „-“, nicht nachweisbar

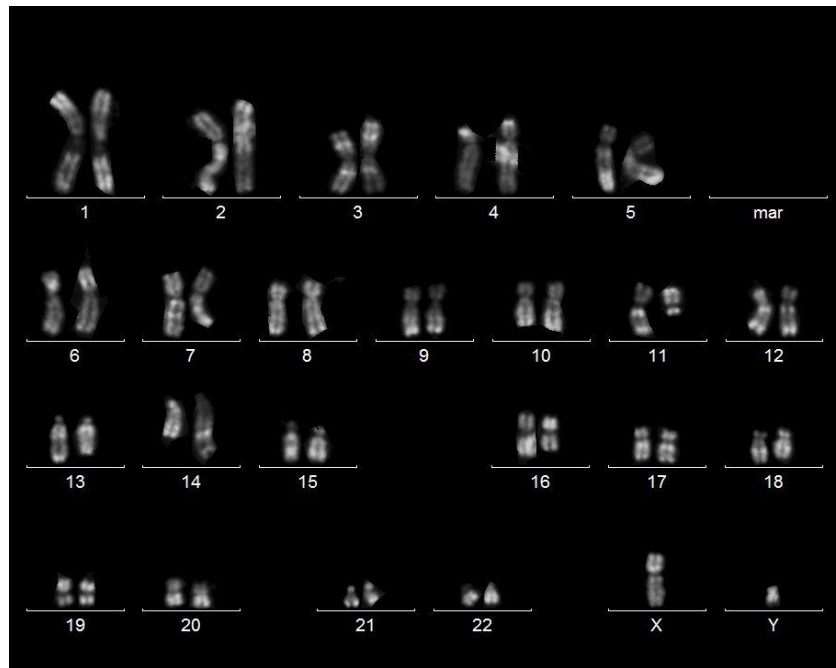


**Abbildung 8:** Repräsentatives Bild einer FISH-Analyse mit DNA-Sonden für das *CCND1*-Gen (rot) und den *IGH*-Locus (grün) zum Nachweis der  $t(11;14)/CCND1-IGH$  beim Fall MCL2. Normale Zellen würden 2 getrennte Hybridisierungssignale für das *CCND1*- und *IGH*-Gen aufweisen. Die auf dem Bild dargestellten Zellen zeigen 2 Fusionssignale, die den derivativen Chromosomen 11 und 14 aus der  $t(11;14)/CCND1-IGH$  zuzuordnen sind. Außerdem sind ein grünes Signal (*IGH*-Locus) und ein rotes Signal (*CCND1*-Gen), der nicht in der  $t(11;14)/CCND1-IGH$  beteiligten Chromosomen 11 und 14 zu sehen.

Bereits zum Zeitpunkt der Initialdiagnose konnten zusätzlich zu der  $t(11;14)/CCND1-IGH$  Translokation sekundäre Aberrationen in vier der fünf analysierten Fälle nachgewiesen werden. Bei MCL3 traten keine anderen Veränderungen außer der *CCND1-IGH* Translokation auf (Abbildung 9).

Ein komplex aberranter Karyotyp wurde in drei der fünf Fälle bei der Diagnose der Erkrankung identifiziert (siehe Tabelle 5). Bei MCL1a, MCL2a und MCL5a konnten 1–4 numerische Aberrationen und 7–11 strukturelle sekundäre Veränderungen nachgewiesen werden. Es konnten insgesamt drei unbalancierte Translokationen gefunden werden.

Unbalancierte Translokationen führen zu numerischen Abweichungen, die zu Zugewinnen oder Verlusten von chromosomalen Abschnitten führen können.



**Abbildung 9:** Karyogramm MCL3a mit dem Karyotyp nach ISCN-2013: 46,XY,t(11;14)(q13;q32). Die t(11;14)/*CCND1-IGH* ist die einzige nachweisbare chromosomale Veränderung bei der Initialdiagnose.

Die häufigste strukturelle Aberration bei MCL war im kurzen Arm von Chromosom 2 [del(2p)] lokalisiert, die bei den Fällen MCL1a, MCL2a und MCL5a auftrat

Es konnte in zwei der fünf Fälle ein balanciertes derivatives Chromosom 1 [der(1)] mit dem Bruchpunkt in der Region 1q31–q32 und einer Deletion in 1p [del(1p)], jedoch mit verschiedenen Translokationspartnern, festgestellt werden (Chromosom 17 bei MCL1a, Chromosom 12 bei MCL5a).

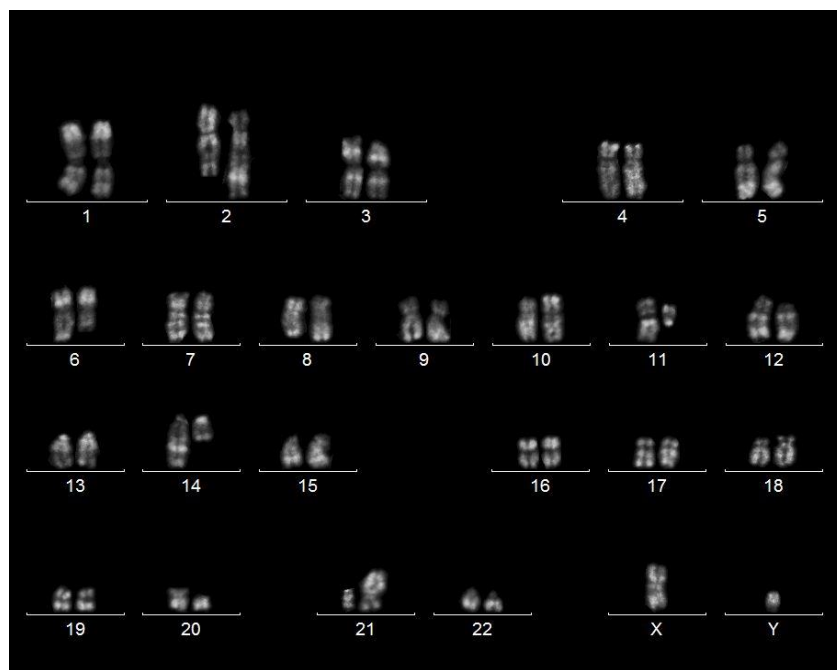
Es wurden in zwei der fünf Fälle Deletionen in 6q [del(6q)] (MCL2a und MCL1a als add(6q)) und eine Monosomie 17 (–17) (MCL1a und MCL5a) identifiziert. Die rekurrenten sekundären Aberrationen bei Diagnose bei den MCL sind in Tabelle 5 übersichtlich aufgeführt.

**Tabelle 5:** Tabelle der rekurrenten sekundären chromosomalen Veränderungen bei MCL bei Diagnose

Fall	der(1)(q31–q32)	del(1p)	del(2p)	del(6q)	–17/del(17p)	komplex
MCL1a	+	+	+	+	+	+
MCL2a	–	–	+	+	–	+
MCL3a	–	–	–	–	–	–
MCL4a	–	–	–	–	–	–
MCL5a	+	+	+	–	+	+

Das „der(1)“ bedeutet derivatives Chromosom 1; „del(2p)“ bedeutet partieller Verlust von 2p; „del(6q)“ 6q–Deletion; „–17“ bedeutet Monosomie 17; die jeweilige Veränderung war bei „+“ nachweisbar; „–“ nicht nachweisbar.

Im Folgenden sind in aufsteigender Reihenfolge die nicht rekurrenten sekundären Veränderungen der einzelnen MCL aufgeführt. Bei MCL4a wurde zusätzlich zu der Translokation  $t(11;14)/CCND1-IGH$  ein Verlust des Y-Chromosoms  $[(-Y)]$  nachgewiesen. Die Aberrationen sind in MCL1a:  $+4$ ,  $-7$ ,  $-13$  und vier derivative Chromosomen aufgrund einer unbalancierten Translokation zwischen den Chromosomen 5 und 7 [ $der(5)t(5;7)$ ], und balancierten Translokationen zwischen den Chromosomen 1 und 17 [ $der(17)t(1;17)$ ] und den Chromosomen 11 und 19 [ $der(19)t(11;19)$ ] und [ $der(14)t(11;19)$ ]. Bei MCL2a:  $-18$ , eine balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 8q und 9q [ $t(8;9)$ ] sowie Deletionen in 10p [ $del(10p)$ ], 12p [ $del(12p)$ ], 15p [ $del(15p)$ ], 21p [ $del(21p)$ ] und 14p [ $del(14p)$ ]. Ein Karyogramm von MCL2a ist folgend zu sehen (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Karyogramm MCL2a mit dem Karyotyp nach ISCN-2013:  $46,XY,der(2)del(2)(p14p16)t(2;3)(q36;q13),del(6)(q23),t(8;9)(q22;q21),add(10)(p14),t(11;14)(q13;q32),del(11)(q14;q23),del(12)(p12),?del(14)(q22q31),add(15)(p13),add(21)(p13)$ .

Bei MCL5a fanden sich zwei balancierten Translokationen zwischen den Chromosomen 6q und 10p [ $t(6;10)$ ] und den Chromosomen 1q und 12p [ $t(1;12)$ ] sowie zwei unbalancierte Translokationen, die in zwei derivativen Chromosomen  $der(8)t(1;8)$  und  $der(8;17)$  resultierten. Zudem waren Deletionen in 9p [ $del(9p)$ ], 4q [ $del(4q)$ ] und 7q [ $del(7q)$ ] zu sehen. Zusätzlich konnten eine perizentrische Inversion in Chromosom 2 [ $inv(2)(p22;q37)$ ], ein Zugewinn eines Isochromosoms 8 und ein Ringchromosom identifiziert werden.

### 4.1.3. Identifikation sekundärer genetischer Veränderungen beim Rezidiv von MCL

Die  $t(11;14)/CCND1-IGH$  konnte erwartungsgemäß auch bei allen untersuchten MCL Rezidiven mittels der Chromosomen-Bänderungs- und der FISH-Analyse bestätigt werden (Tabelle 6). Bei Fall MCL1d konnte aufgrund fehlenden Materials keine FISH-Untersuchung durchgeführt werden, allerdings war die  $t(11;14)/CCND1-IGH$  mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse nachweisbar.

**Tabelle 6:** Darstellung der FISH Ergebnisse zum Nachweis der  $t(11;14)/CCND1-IGH$  bei den untersuchten MCL zum Zeitpunkt der Rezidive

Fall	$t(11;14)/CCND1-IGH$
MCL1d	/
MCL2b	+
MCL3b	+
MCL3c	+
MCL4b	+
MCL5c	+
MCL5f	+

Die Translokation war bei „+“, nachweisbar; „-“, nicht nachweisbar; „/“, kein Material vorhanden

Anders als bei den Initialdiagnosen konnten bei den Rezidiven bei allen Fällen sekundäre genetische Veränderungen zu der  $t(11;14)/CCND1/IGH$  identifiziert werden. Ein komplex aberranter Karyotyp konnte in vier der fünf Fälle bei erstem Rezidiv, in allen Fällen beim zweiten Rezidiv der Erkrankung identifiziert werden (siehe Tabelle 7).

Bei den MCL Rezidiven konnten von 1–20 numerische Aberrationen und 2–11 strukturelle Aberrationen pro Fall nachgewiesen werden. Es traten insgesamt sechs unbalancierte Translokationen auf, die zu numerischen Abweichungen geführt haben, im Sinne von Zugewinnen oder Verlusten von chromosomalen Abschnitten. Außerdem wurden ebenfalls rekurrente sekundäre Veränderungen identifiziert. Die  $-17/del(17p)$  konnte in drei von fünf Fällen identifiziert werden, ( $-17$  bei MCL1d,  $i(17q)$  bei MCL3b–c,  $der(8;17)$  bei MCL5b–f). Die anderen rekurrenten sekundären Veränderungen kamen jeweils in zwei der fünf Fälle vor. Im Folgenden sind die rekurrenten sekundären Veränderungen bei den MCL-Rezidiven genannt:  $del(6q)$  (MCL1d aufgrund einer  $add(6q)$ , MCL2b), Zugewinne von 8q ( $+8$  bei MCL1d,  $+i(8q)$  bei MCL5b–f),  $del(11q)$  (MCL2b, MCL4b) und das aus der Initialdiagnose bekannte derivative Chromosom 1 [ $der(1)$ ] mit den Translokationspartnern Chromosom 17 bei MCL1a und Chromosom 12 bei MCL5a (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Tabelle der rekurrenten chromosomalen Veränderungen bei MCL zum Zeitpunkt der Rezidive

Fall	der(1) (q31–q32)	del(1p)	del(6q)	+8q	del(11q)	–17/del(17p)	komplex
MCL1b–d	+	+	+	+	–	+	+
MCL2b	–	–	+	–	+	–	+
MCL3b–c	–	–	–	–	–	+	+
MCL4b	–	–	–	–	+	–	+
MCL5b–f	+	+	–	+	–	+	+

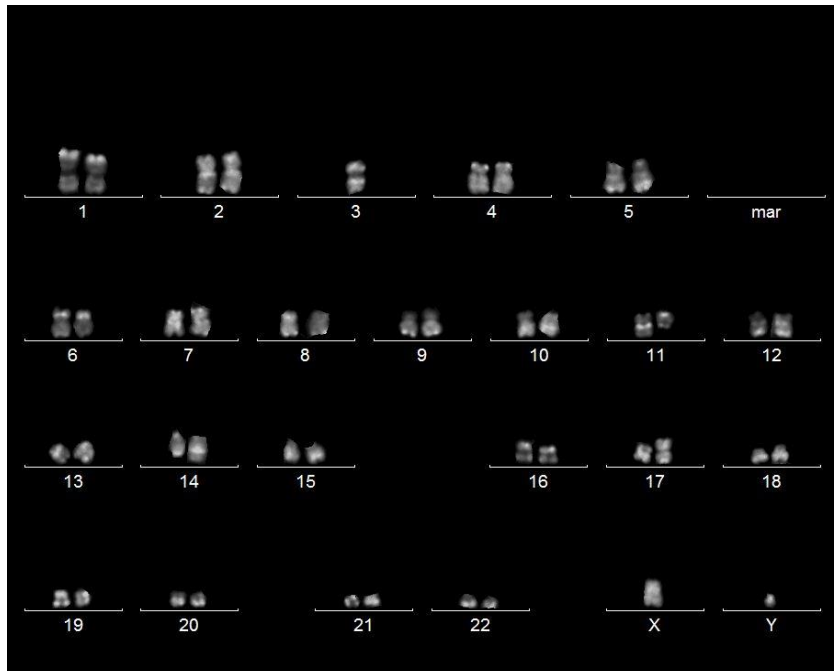
Das „der(1)“ bedeutet derivatives Chromosom 1; „del(1p)“ partieller Verlust von 1p; „del(6q)“ bedeutet Deletion in 6q; „+8q“ bedeutet Zugewinn von Chromosom 8 oder 8q; „–17/del(17p)“ partieller Verlust von 17p oder Monosomie 17; die jeweilige Veränderung war bei + nachweisbar; – nicht nachweisbar.

Nachfolgend sind die nicht rekurrenten genetischen Aberrationen bei den Rezidiven einzeln aufgeführt.

Bei MCL1 wurden zwei der nachfolgenden Einsendungen als normal gewertet im Sinne einer Remission (MCL1b–c). Bei MCL1d konnten die bekannten der(1) und der(5) sowie die del(6q) von der Diagnoseeinsendung wieder erkannt werden. Zusätzlich zeigte sich eine unvollständige Polyploidisierung des aberranten Klons mit Zugewinnen aller Chromosomen bis auf die Chromosomen 8, 9, 13 und 17, die in diesem Fall als Verlust der Chromosomen zu werten ist. Es konnte eine Deletion in beiden 3p Armen [del(3p)/add(3p)] und in 4q [del(4q)] nachgewiesen werden. Alle Veränderungen sind in Tabelle 8 dargestellt.

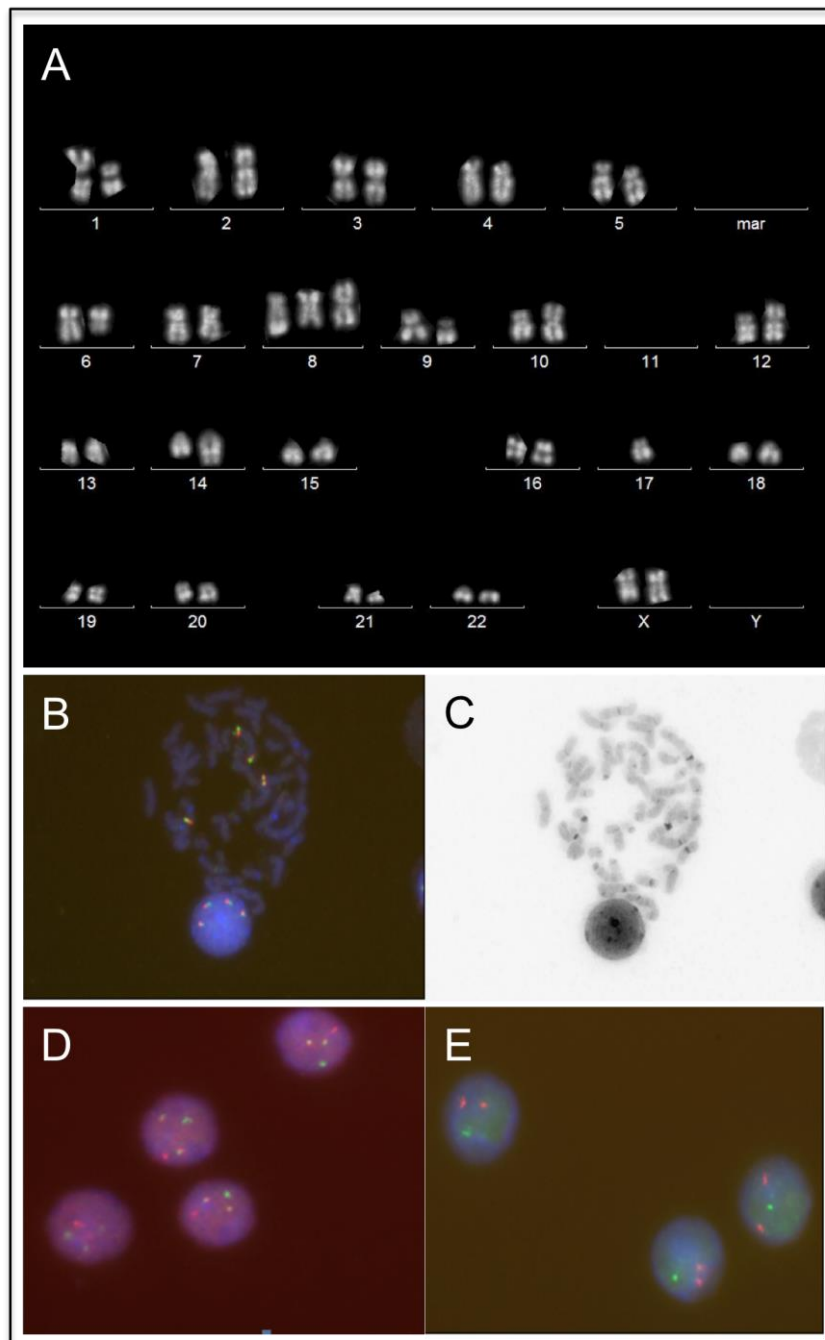
Bei MCL2b konnte zu den bei der Diagnose identifizierten Aberrationen ein Verlust in 1q [del(1q)] aufgrund einer strukturellen Veränderung mit Zugewinn von Material unbekannter Herkunft distal im langen Arm eines Chromosoms 1 detektiert werden (add(1)(q21)).

Es wurden bei MCL3b ein Isochromosom 17q und bei MCL3c eine unbalancierte Translokation zwischen Chromosom 8 und 17 [der(8;17)], die in beiden Fällen zum Verlust von 17p geführt hat, nachgewiesen. Das der(8;17) trat als zusätzliches Chromosom hinzu [+der(8;17)] und führt somit zu einem Zugewinn von 8q und 17q. Ein Karyogramm von MCL3b ist in Abbildung 11 zu sehen.



**Abbildung 11:** Karyogramm MCL3b mit dem Karyotyp nach ISCN-2013: 45,XY,-3, t(11;14)(q13;q32),i(17)(q10).

Bei MCL4b konnten zusätzlich zu den ursprünglichen Aberrationen folgende Aberrationen identifiziert werden: Eine balancierte Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 2 [t(1;2)(q;q)] und 5q und 10p [t(5;10)(q;p)], eine unbalancierte Translokation mit einem derivativen Chromosom 4, am ehesten aus einer Translokation zwischen den homologen Chromosomen 4 [der(4)t(4;4)], eine del(9q), del(13q) und ein -X sowie eine zusätzliche Kopie des der(14)t(11;14)del(11). Bei MCL5 gab es insgesamt sechs Einsendungen, dabei hatten die Einsendungen b, d und e einen normalen Karyotypen im Einklang mit einer Remission der Erkrankung. Bei der Einsendung MCL5c fand sich ein chromosomal aberranter Karyotyp, der im Vergleich zum Karyotyp der Initialdiagnose keine neuen Aberrationen, sondern weniger Veränderungen als bei der Diagnose aufwies. In der letzten Einsendung, MCL5f, waren die gleichen Aberrationen wie in dem Hauptklon bei Diagnose zu identifizieren. Hinzu kam eine Monosomie 11, Verlust des derivativen Chromosoms der(11)t(11;14), ein zusätzliches Markerchromosom, sowie ein i(8)(q10), das auch in einem Subklon bei Diagnose und beim ersten Rezidiv vorhanden war. Ein Karyogramm von MCL5f und FISH Analysen von MCL5c, auch an einer Metaphase, sind in Abbildung 12 gezeigt (Abbildung 12A-E, nächste Seite).



**Abbildung 12:** **A:** Karyogramm MCL5f mit dem Karyotyp nach ISCN–2013: 44,XX,der(1)del(1)(p13)t(1;12)(q21;p12),t(6;10)(q21;p12),der(8)t(1;8)(p31~32;q14),+i(8)(q10),der(8;17)(q10;q10),del(9)(p13),t(11;14)(q13;q32),-11,der(12)t(1;12),-der(11)t(11;14)(q13;q32),-mar1; **B:** FISH an Metaphase von MCL5c mit einer *MYC*-BAP-Sonde. Die Zellen zeigen Fusionssignalen für das *MYC*-Gen (es liegt kein Bruchereignis innerhalb des *MYC*-Gens vor). Die Region 8q24 liegt aufgrund der zwei Chromosomen 8 und des zusätzlichen i(8)(q10) vier Mal vor; **C:** DAPI-Färbung der Metaphase von Abbildung 12B, in der zwei Chromosomen 8 und das Isochromosom 8 zu sehen sind; **D:** FISH von MCL5c zum Nachweis der t(11;14)/*CCND1-IGH*. Normale Zellen würden 2 getrennte Hybridisierungssignale für das *CCND1*- (rot) und *IGH*-Gen (grün) aufweisen. Die auf dem Bild dargestellten Zellen weisen 2 Fusionssignale auf, die zu den der(11) und der(14) aus der t(11;14)/*CCND1-IGH* korrespondieren. Außerdem sind ein grünes Signal (*IGH*-Locus) und ein rotes Signal (*CCND1*-Gen) auf den nicht in der t(11;14)/*CCND1-IGH* beteiligten Chromosomen 11 und 14 zu sehen.; **E:** FISH von MCL5c mit einer lokusspezifischen DNA-Sonde für das *TP53*-Gen (grün) und einer Kontrollsonde für den *MPO*-Locus (rot). Die abgebildete Zelle zeigt zwei rote Signale für die Kontrollsonde, das *MPO*-Gen und ein einziges Hybridisierungssignal für die grüne Sonde (*TP53*-Gen), das auf eine Deletion des *TP53*-Gens hindeutet.



---

#### **4.1.4. Vergleich der rekurrenten sekundären Aberrationen bei Diagnose und Rezidiv**

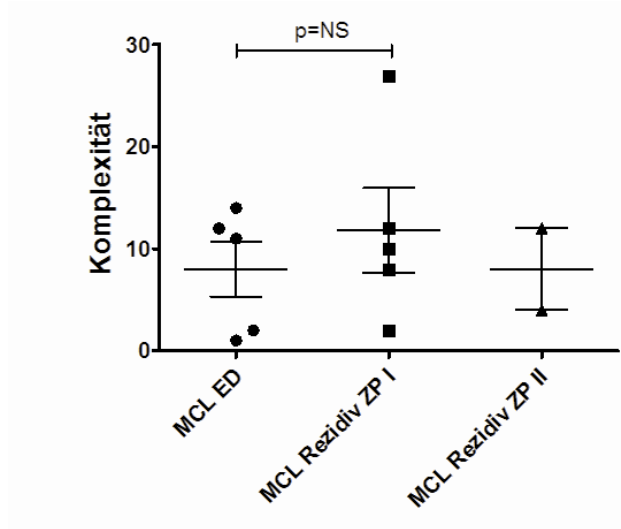
Zu den rekurrenten sekundären Veränderungen, die in allen Einsendungen bestätigt werden konnten, zählten das derivative Chromosom 1 [der(1)] mit dem Bruchpunkt in der Region 1q31–q32, die del(6q) und die –17/del(17p).

Bei Diagnose konnte eine rekurrente sekundäre Veränderung identifiziert werden, die bei den Rezidiven nicht mehr zu finden waren. Dies war die del(2q).

Bei den Rezidiven sind als rekurrente sekundäre Veränderungen ein Zugewinn von 8q und eine del(11q) hinzugekommen. Die –17/del(17p) konnte bei den Rezidiven bestätigt und in einem weiteren Fall identifiziert werden. In MCL1 konnten beim Rezidiv viele numerische Veränderungen im Sinne von zugewonnen Chromosomen gesehen werden. Bei MCL1 kommt zusätzlich eine del(3p), eine add(3p) und eine add(4q) hinzu. Bei MCL2 konnte beim Rezidiv zusätzlich eine add(1q) identifiziert werden. Bei MCL3 kommt beim 1. Rezidiv ein i(17) und beim 2. Rezidiv im Subklon eine unbalancierte Translokation der(8;17) mit einer zusätzlichen Kopie des der(8;17) hinzu. Bei MCL4 kommen viele verschiedene Veränderungen, wie die balancierten Translokationen t(1;2) und t(5;10) sowie die Deletionen del(13q) und del(9q), hinzu. Bei MCL5 ist von dem Subklon der Diagnose nur eine Aberration, die i(8q), zu finden. Es ist davon auszugehen, dass die i(8) bei Diagnose bereits in einem Subklon war, der nicht identifiziert werden konnte. Zudem kommt es zu einem Verlust der beiden Chromosomen 11.

#### **4.1.5. Komplexitätsvergleich zwischen Diagnose und Rezidiv**

Bei den analysierten MCL konnte bei Diagnose bei 3/5 (60%) der Fälle ein komplexer Karyotyp nachgewiesen werden, beim 1. Rezidiv in 4/5 (80%) der Fälle, beim 2. Rezidiv in 2/2 (100%) der Fälle. Die durchschnittliche Anzahl der chromosomalen Veränderungen beträgt 8 bei Diagnose, 11 beim 1. Rezidiv und 8 beim 2. Rezidiv. Es ist eine Komplexitätszunahme in vier von den fünf Fällen zu sehen. Eine statistische Signifikanz der Zunahme der chromosomalen Aberrationen bei den MCL konnte bei den vorhandenen fünf Fällen nicht nachgewiesen werden (p-Wert: 0,2785). Die Komplexität ist übersichtlich in der Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13:** MCL Komplexität bei Diagnose (ein Punkt steht für einen Fall), beim 1. Rezidiv (ein Kästchen steht für einen Fall) und beim 2. Rezidiv (ein Dreieck steht für einen Fall), ZP bedeutet Zeitpunkt, p=NS bedeutet p statistisch nicht signifikant.

**Tabelle 8:** (Molekulare) Zytogenetik MCL mit Konsensus–Karyotypen aus den Chromosomen–Bänderungs– und FISH–Analysen

Fall	A	G	Biopsie	Zeit*	O	Karyotyp und FISH <sup>†</sup>	K
MCL1a	41	M	Diagnose		pB, KM	44–45,XY,der(1)inv(1)(p13q32)del(1)(p21p31)t(1;17)(q31;q12),del(2)(p12),+4,der(5)t(5;7)(q31;q11),add(6)(q2?2),-7,t(11;14)(q13;q32),-13,der(17)?t(1;17)(q31;q12),-17[cp10]/44–45,idem,der(14)t(11;14)t(11;19)(q13;q13),der(19)t(11;19)[3],nuc ish 11q13 (CCND1 × 3), 14q32 (IGH × 3)(CCND1 con IGH × 2)	12
MCL1b				+ 4 W	KM	46,XY[18]	
MCL1c				+ 16 W	KM	46,XY[15]	
MCL1d			Rezidiv I	+31W	KM	76–82,XXY,+1,der(1)inv(1)(p13q32)del(1)(p21p31)t(1;17)(q31;q12)×2,+2,add(3)(p11),del(3)(p14),+4,add(4)(q34),+5×2,der(5)t(5;7)(q31;q11),+6,add(6)(q2?2),+7,-8,-9,+10,+11,t(11;14)(q13;q32)×2,+12,-13,+16,-17,+19×2,+20,+21,+22,+2mar[cp5]/46,XY[4]	27
MCL2a	57	M	Diagnose		LK	45,XY,der(2)del(2)(p14p16)t(2;3)(q36;q13),del(6)(q23),t(8;9)(q22;q21),add(10)(p14),t(11;14)(q13;q32),del(11)(q14;q23),del(12)(p12),?del(14)(q22q31,add(15)(p13),-18,add(21)(p13)[11]/46,XY[2],nuc ish 11q13 (CCND1 × 3), 14q32 (IGH × 3)(CCND1 con IGH × 2)	11
MCL2b			Rezidiv	+40W	KM	45,XY,der(2)del(2)(p14p16)t(2;3)(q36;q13),del(6)(q23),t(8;9)(q22;q21),add(10)(p14),t(11;14)(q13;q32),del(11)(q14;q23),del(12)(p12),?del(14)(q22q31,add(15)(p13),-18,add(21)(p13)[12]/45,XY,idem,add(1)(q21)[7],nuc ish 11q13 (CCND1 × 3), 14q32 (IGH × 3)(CCND1 con IGH × 2)	12
MCL3a	82	M	Diagnose		pB	46,XY,t(11;14)(q13;q32)[11]/46,XY[9],nuc ish 11q13 (CCND1 × 3), 14q32 (IGH × 3)(CCND1 con IGH × 2)	1
MCL3b			Rezidiv I	+43W	pB	46,XY,t(11;14)(q13;q32)[16]/46,XY,idem,i(17)(q10)[2]/46,XY[2],nuc ish 11q13 (CCND1 × 3), 12q13 (CHOP × 2), 13q14 (RB1 × 2), 14q32 (IGH × 3, IGH prox × 2, IGH dist × 2), 17 (TP53 × 2, CEP17 × 2), 18q21 (BCL2 × 2), CCND1 con IGH × 2)(IGH prox sep IGH dist × 1)	2
MCL3c			Rezidiv II	+87W	pB	46,XY,t(11;14)(q13;q32)[12]/46,XY,idem,i(17)(q10)[5]/46,XY,idem,der(8;17)(q10;q10),+der(8;17)[2],nuc ish 11q13 (CCND1 × 3), 14q32 (IGH × 3)(CCND1 con IGH × 2)	4
MCL4a	69	M	Diagnose		pB	45,X,-Y,t(11;14)(q13;q32)[2]/46,XY[18],nuc ish 11q13 (CCND1 × 3), 14q32 (IGH × 3) (CCND1 con IGH × 2)	2
MCL4b			Rezidiv	+101W	pB	46,X,-Y,t(1;2)(q21-22;q32),t(5;10)(q14;p13-14),del(9)(q12q32-33),der(11)t(11;14)(q13;q32),der(14)t(11;14)del(11)(q14q24),der(14)t(11;14)del(11)(q14q24),del(13)(q14q21)[5]/45,idem,-X[5]/45,-X,-Y,der(4)t(4;?4)(p16;q12),t(5;10)(q14;p13-14),del(9)(q12q32-33),der(11)t(11;14)(q13;q32),der(14)t(11;14)del(11)(q14q24),del(13)(q14q21)[3]/46,XY[2],nuc ish 11q13 (CCND1 × 3), 14q32 (IGH × 3), 17 (TP53 × 2, CEP17 × 2)(CCND1 con IGH × 2)	10
MCL5a	72	W	Diagnose		KM	45,XX,der(1)del(1)(p13)t(1;12)(q21;p12),t(6;10)(q21;p12),der(8)t(1;8)(p31-32;q24),der(8;17)(q10;q10),del(9)(p13),t(11;14)(q13;q32),der(12)t(1;12)[6]/46,XX,idem,inv(2)(p22;q37),del(2)(p13),del(4)(q25),add(7)(q11),+i(8)(q10),-17,+r[12]/46,XX[3],nuc ish 11 (CCND1 × 3, CEP11 × 2, ATM × 2), 12q13 (CHOP prox × 2, CHOP dist × 2), 13q14 (D13S319 × 2, D13S25 × 2), 14q32 (IGH x 3, IGH prox × 2, IGH dist × 2), 17 (TP53 × 1, MPO × 2), 18q21 (BCL2 × 2)(IGH con CCND1 × 2)(IGH prox sep IGH dist × 1)	14
MCL5b				+25 W		46,XX[15],nuc ish 11q13 (CCND1 × 2), 14q32(IGH × 2), 17 (TP53 × 2, MPO × 2)	
MCL5c			Rezidiv I	+88W	KM	45,XX,der(1)del(1)(p13)t(1;12)(q21;p12),t(6;10)(q21;p12),der(8)t(1;8)(p31-32;q14),der(8;17)(q10;q10),del(9)(p13),t(11;14)(q13;q32),der(12)t(1;12)[3]/46,idem,+i(8)(q10)[2]/46,XX[14],nuc ish 11q13 (CCND1 × 3), 14q32 (IGH × 3), 17 (TP53 × 1, MPO × 2)(CCND1 con IGH × 2)	8
MCL5d				+100 W	KM	46,XX[20],nuc ish 11q13 (CCND1 × 3), 14q32 (IGH × 3), 17 (TP53 × 1, MPO × 2)(CCND1 con IGH × 2)	
MCL5e				+115 W	KM	46,XX[3],nuc ish 11q13 (CCND1 × 2), 14q32 (IGH × 2), 17 (TP53 × 2, MPO × 2)	
MCL5f			Rezidiv II	+128W	KM	46,XX,der(1)del(1)(p13)t(1;12)(q21;p12),t(6;10)(q21;p12),der(8)t(1;8)(p31-32;q14),+i(8)(q10),der(8;17)(q10;q10),del(9)(p13),t(11;14)(q13;q32),-11,der(12)t(1;12),+mar1[6]/44,XX,idem,-der(11)t(11;14)(q13;q32),-mar1[3]/46,XX[9],nuc ish 11q13 (CCND1 × 4), 14q32 (IGH × 3), 17 (TP53 × 1, MPO × 2)(CCND1 con IGH × 1)	12

A, Alter bei Diagnose (in Jahren); G, Geschlecht; M, männlich; W, weiblich; „\*“ und „+“ entspricht Zeiten von der initialen klinischen/zytologischen Diagnose bis zu den einzelnen Einsendungen; W, Wochen; O, Organ; K, Karyotyp–Komplexität, entspricht der Anzahl der Aberrationen. Nummer in den eckigen Klammern entspricht der Nummer der analysierten Metaphasen. Für die Leserlichkeit sind Haupt– und Subklone hintereinander geschrieben.

---

## 4.2. Zytogenetische und FISH Analyse bei BL Patienten

### 4.2.1. Demographische Daten und Berechnung des progressionsfreien Intervalls von Diagnose bis zum Rezidiv bei BL

Es wurden fünf Fälle mit der Diagnose eines BL in dieser Arbeit eingeschlossen, die die Einschlusskriterien nach Kapitel 2.1 erfüllt hatten. Bei drei der fünf BL Fälle konnten aberrante Karyotypen von zwei Zeitpunkten analysiert werden. Bei zwei BL-Patienten konnten aberrante Karyotypen von drei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden.

Von den BL stammen vier Fälle von männlichen Kindern (Altersspanne: 4–12 Jahre, Durchschnittsalter 8,5 Jahre) und einer von einem 44 Jahre alten männlichen Erwachsenen. Die durchschnittliche progressionsfreie Zeit von der Diagnose bis zum ersten Rezidiv lag bei 30 Wochen (Minimum: 17 Wochen, Maximum 57 Wochen). Die Intervalle zum zweiten Progress von Diagnose betragen 21 Wochen und 63 Wochen. Alle Kinder hatten ein Rezidiv innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung und starben innerhalb von zwei Jahren nach Diagnosestellung (siehe Tabelle 12 und 13).

### 4.2.2. Identifikation sekundärer genetischer Veränderungen bei der Diagnose von BL

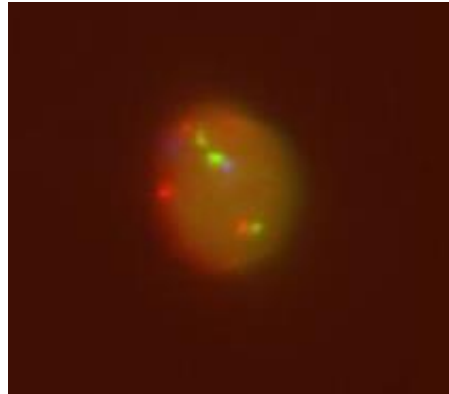
Die BL Fälle in der vorliegenden Arbeit wiesen die für die BL pathognomonische Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  oder die variante Translokation  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  auf. In drei der fünf BL Fälle (60%) konnte eine  $t(8;14)/MYC-IGH$  Translokation und in einem Fall (20%) die  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  nachgewiesen werden. Die Translokation  $t(2;8)(p11;q24)/MYC-IG\kappa$ , die ebenfalls für BL typisch ist, jedoch sehr selten ist, wurde in den hier untersuchten Fällen nicht festgestellt.

Die Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  bzw. die  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  wurden mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse detektiert. Außerdem wurden spezifische Sonden für *MYC*- und *IGH*- bzw. *IG\lambda*-Gene zum Nachweis der Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  bzw.  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  mittels FISH angewendet (siehe Abbildung 14). Die Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  konnte erwartungsgemäß bei den drei, mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse untersuchten BL-Fällen bestätigt werden. Die Translokation  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  beim Fall BL2 konnte mittels FISH aufgrund von keinem vorhandenen Material nicht bestätigt werden (Tabelle 9). Alle verwendeten Sonden sind in Kapitel 2.2.2 zu finden. Die Konsensus-Karyotypen der Chromosomen-Bänderungsanalysen und die FISH-Untersuchungen aller Fälle sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 9:** Darstellung der FISH Ergebnisse zum Nachweis der t(8;14)/*MYC-IGH* bzw. t(8;22)/*MYC-IGλ* bei den untersuchten BL zum Zeitpunkt der Diagnose

Fall	<i>MYC con IGH</i>	<i>MYC con IGλ</i>
BL1a	+	/
BL2a	/	/
BL3a	n.a.	/
BL4a	+	/
BL5a	Unauffälliger Karyotyp	

Die Translokation war bei „+“, nachweisbar; „-“, nicht nachweisbar; n.a., nicht auswertbar; „/“, nicht durchgeführt, da nicht notwendig oder kein Material mehr vorhanden



**Abbildung 14:** Repräsentatives Bild einer FISH-Analyse zum Nachweis der t(8;14)/*MYC-IGH* mit DNA-Sonden für das *MYC*-Gen (rot) und den *IGH*-Locus (grün) beim Fall BL4. Normale Zellen würden zwei getrennte Hybridisierungssignale für das *MYC*- und *IGH*-Gen aufweisen. Die auf dem Bild dargestellte Zelle zeigt zwei Fusionssignale, die den derivativen Chromosomen 8 und 14 aus der t(8;14)/*MYC-IGH* zuzuweisen sind. Außerdem sind ein grünes Signal (*IGH*-Locus) und ein rotes Signal (*MYC*-Gen), der nicht in t(8;14)/*MYC-IGH* beteiligten Chromosomen 8 und 14 zu sehen.

Bereits zum Zeitpunkt der Initialdiagnose konnten zusätzlich zu der Translokation t(8;14)/*MYC-IGH* bzw. t(8;22)/*MYC-IGλ* sekundäre Aberrationen in zwei der fünf analysierten Fälle nachgewiesen werden, aber keine dieser sekundären Veränderungen trat als rekurrente Veränderung auf (BL2 und BL3). Bei den Fällen BL1 und BL4 konnten keine sekundären Veränderungen gefunden werden, bei BL5a konnte ein unauffälliger Karyotyp festgestellt werden. Ein Karyogramm von BL2a ist in Abbildung 15 gezeigt.

Es konnte eine numerische Aberration und eine strukturelle Aberration (unbalancierte Translokation) in den Fällen identifiziert werden. Ein komplex aberranter Karyotyp mit drei oder mehr chromosomalen Aberrationen in einer Zelle konnte in keinem der fünf Fälle identifiziert werden. Es konnte eine unbalancierte Translokation im Fall BL2a, ein derivatives Chromosom 6 aus einer unbalancierten Translokation zwischen den Chromosomen 1q und 6q [der(6)t(1;6)], das zu einem Zugewinn von 1q und 6q führt und eine numerische Aberration im Fall BL3a, eine Trisomie 12, nachgewiesen werden.

### 4.2.3. Identifikation sekundärer genetischen Veränderungen beim Rezidiv von BL

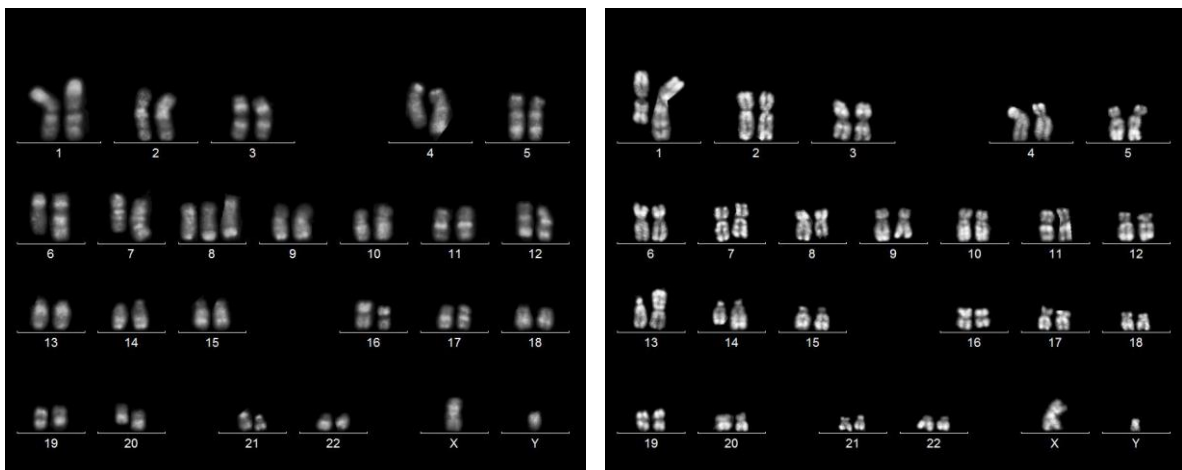
Die  $t(8;14)/MYC-IGH$  bzw.  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  konnte bei allen untersuchten BL Rezidiven bei vorhandenem Material mittels der Chromosomen-Bänderungs- und der FISH-Analyse nachgewiesen werden (Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Darstellung der FISH Ergebnisse zum Nachweis der  $t(8;14)/MYC-IGH$  bzw.  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  und *TP53* bei den untersuchten BL zum Zeitpunkt der Rezidive

Fall	<i>MYC con IGH</i>	<i>MYC con IG\lambda</i>	<i>TP53</i>
BL1b	+	-	+
BL1c	+	/	/
BL2b	-	+	/
BL3b	+	-	/
BL4c	/	/	/
BL5b	/	/	/
BL5c	+	/	/
BL5d	+	/	/

Die Translokation war bei „+“, nachweisbar; „-“, nicht nachweisbar; „/“, nicht durchgeführt, da nicht notwendig oder kein Material mehr vorhanden

Anders als bei den Initialdiagnosen konnten bei den Rezidiven bei allen Fällen sekundäre genetische Veränderungen zu der  $(8;14)/MYC-IGH$  bzw.  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  identifiziert werden. Ein komplex aberranter Karyotyp konnte in allen Fällen nachgewiesen werden. Es konnten insgesamt zwei unbalancierte Translokationen identifiziert werden. Bei den BL Rezidiven konnten von 0–3 numerische Aberrationen und 1–10 strukturelle Aberrationen nachgewiesen werden.



**Abbildung 15:** Auf der linken Seite das Karyogramm von BL2b mit Karyotyp nach ISCN–2013: 47,XY,der(6)t(1;6)(q21;q14),t(8;22)(q24;q11),+der(8)t(8;22)(q24;q11). Auf der rechten Seite das Karyogramm von BL4c mit Karyotyp nach ISCN–2013: 46,XY, dup(1)(q2?3q11),t(8,14)(q24;q32), add(13)(p10).

Die häufigsten rekurrenten sekundären Veränderung bei BL waren ein Zugewinn im langen Arm von Chromosom 1 in drei der analysierten fünf Fälle (BL2b, BL4c und BL5b–d) (Abbildung 15) und Deletionen in 11q [del(11q)] (BL1b–c, BL3b und BL5d) sowie eine del

(17p) (BL5d, add(17p) in BL1b–c und BL4c) die auch in jeweils drei der fünf Fälle identifiziert wurden (Tabelle 11). Eine Trisomie 21 (BL1b und BL3b), ein Verlust in 12 q aufgrund einer add(12q) (BL3b und BL5b–d), eine del(2p) (BL5d, add(2p) in BL3b) sowie eine del(13q)(BL5d, add(13q) in BL3b) konnten in jeweils zwei der fünf Fälle identifiziert werden. In zwei der fünf Fälle konnte ein Bruchpunkt in 6q erkannt werden (del(6q) in BL1c, unbalancierte Translokation der(6)t(1;6)(q;q) in BL2) (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Tabelle der rekurrenten chromosomalen Veränderungen bei BL zum Zeitpunkt der Rezidive

Fall	+1q	-6q	-11q	-12q	-13q	-17/del(17p)	+21	komplex
BL1b–c	+	+	+	-	-	+	+	+
BL2b	+	+	-	-	-	-	-	+
BL3b	-	-	+	+	+	-	+	+
BL4b–c	+	-	-	-	-	+	-	+
BL5b–d	+	-	+	+	+	+	-	+

Übersicht über die chromosomalen Veränderungen bei BL bei den 5 Fällen bei den nachfolgenden Einsendungen. „+1q“ beinhaltet Zugewinne in 1q; „-6q“, partieller Verlust von 6q; „-11q“, partieller Verlust von 11q; „-12q“, partieller Verlust von 12q; „-13q“, partieller Verlust von 13q; „-17p“, partieller Verlust von 17p; „+21“, Trisomie 21; die jeweilige Veränderung war bei „+“ nachweisbar; „-“ nicht nachweisbar.

Im Folgenden sind die genauen Veränderungen der einzelnen BL aufgeführt. Bei BL1b–c trat zusätzlich zu den oben beschriebenen sekundären rekurrenten Veränderungen als sekundäre Veränderungen eine Monosomie 6, eine Trisomie 7 sowie Deletionen in 15p, 20q und 22q auf. Bei BL2b ist zusätzlich zu den Veränderungen bei Diagnose ein Zugewinn des derivativen Chromosoms 8 aus der t(8;22)/MYC-IGλ identifiziert worden.

Bei BL3b konnten als einzelne sekundäre Veränderungen eine Monosomie 15, eine +12 sowie Deletionen in 3q, 9q und 18p identifiziert werden. Bei BL4c konnte als einzelne sekundäre Veränderung eine del(13p) durch ein add(13p) identifiziert werden. Zudem konnte eine sekundäre IG-Translokationen durch eine t(2;14)(p14;q32) nachgewiesen werden. Bei BL5b–d trat eine +1, eine Monosomie 12 und 16 sowie Deletionen in 13q, 15q, 16q und 18q auf. Zudem war ein derivatives Chromosom 12 [der(12)add(12p)add(12q24)] sowie eine unbalancierte Translokation durch ein unbekanntes derivatives Chromosom aus einer Translokation mit Chromosom 3 zu identifizieren.

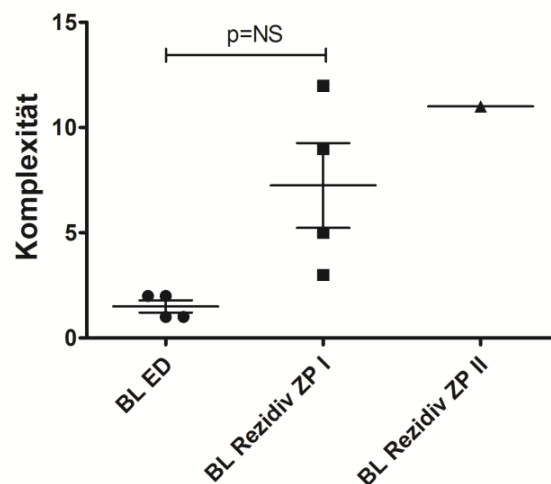
#### 4.2.4. Vergleich der rekurrenten sekundären Aberrationen bei Diagnose und Rezidiv

Bei den BL bei Diagnose konnten nur einzelne sekundäre Veränderungen gefunden werden und lediglich bei zwei Fällen, daher konnten rekurrente sekundären Veränderungen nur bei den Rezidiven identifiziert werden. Bei den Rezidiven konnten als häufigste rekurrente sekundäre Veränderungen ein Zugewinn im langen Arm von Chromosom 1, eine del(11q)

und eine  $-17/\text{del}(17\text{p})$  identifiziert werden. Die  $-17/\text{del}(17\text{p})$  und die  $\text{del}(11\text{q})$  waren bei Diagnose in keinem Fall identifiziert worden. Es traten zudem als rekurrente sekundäre Veränderungen eine Trisomie 21, eine  $\text{del}(12\text{q})$ , eine  $\text{del}(2\text{p})$  und eine  $\text{del}(13\text{q})$  auf. Es konnte ein Bruchpunkt in 6q als rekurrente sekundäre Aberration erkannt werden. Bei den Rezidiven waren die folgenden sekundären Veränderungen zu identifizieren: eine Monosomie 6, 12, 15 und 16, eine Trisomie 1, 7 und 12,  $\text{del}(3\text{q})$ ,  $\text{del}(9\text{q})$ ,  $\text{del}(13\text{p})$ ,  $\text{del}(13\text{q})$ ,  $\text{del}(15\text{p})$ ,  $\text{del}(15\text{q})$ ,  $\text{del}(16\text{q})$ ,  $\text{del}(18\text{p})$ ,  $\text{del}(18\text{q})$ ,  $\text{del}(20\text{q})$ ,  $\text{del}(22\text{p})$  und die  $\text{t}(8;22)/\text{MYC-IG}\lambda$  als zusätzliches Chromosom. Es wurde ein derivatives Chromosom 12 [ $\text{der}(12)\text{add}(12\text{p})\text{add}(12\text{q}24)$ ] sowie eine unbalancierte Translokation durch ein unbekanntes Derivat mit einer Translokation mit Chromosom 3 identifiziert werden. Zudem konnte eine sekundäre  $\text{IG}$ -Translokation durch eine  $\text{t}(2;14)(\text{p}14;\text{q}32)$  nachgewiesen werden.

#### 4.2.5. Komplexitätsvergleich zwischen Diagnose und Rezidiv

Bei den BL konnte bei Diagnose in keinem Fall (0/5, 0%) ein komplexer Karyotyp nachgewiesen werden. Beim Rezidiv zeigten alle fünf Fälle (5/5, 100%) einen komplexen aberranten Karyotypen. Die durchschnittliche Anzahl der Veränderungen beträgt 1 bei Diagnose, 6 beim 1. Rezidiv und 12 Aberrationen beim 2. Rezidiv (siehe Abbildung 16). Eine statistische Signifikanz der Zunahme der chromosomalen Aberrationen bei den BL konnte bei



den vorhandenen fünf Fällen nicht nachgewiesen werden (p-Wert: 0,1250).

**Abbildung 16:** BL Komplexität bei Diagnose (ein Punkt steht für einen Fall), 1. Rezidiv (ein Kästchen steht für einen Fall) und 2. Rezidiv (ein Dreieck steht für einen Fall). ZP, Zeitpunkt; p=NS, statistisch nicht signifikant.



**Tabelle 12:** Molekulare Zytogenetik der Burkitt Lymphome mit Konsensus-Karyotypen aus den Chromosomen-Bänderungs- und FISH-Analysen

Fall	A	G	Biopsie	Zeit*	Organ	Karyotyp und FISH <sup>†</sup>	K
BL1a	7	M	Diagnose		Pleura	46,XY,t(8;14)(q24;q32)[1].nuc ish 8q24 (MYC x 3),14q32 (IGH x 3)(MYC con IGH x 1~2)	1
BL1b			Rezidiv II <sup>‡</sup>	+57W	LK	47,XY,add(1)(q22),+7,t(8;14)(q24;q32),del(11)(q22q23),add(17)(p11),add(20)(q12),add(22)(p10)[9]/47,sl,add(15)(p11)[6]/48,sl,+21[2].nuc ish 8q24 (MYC x 3~5), 14q32 (IGH x 3~5), 17 (TP53 x 1, MPO x 2), 22q11 (IGL x 3)(MYC con IGH x 2~4)	9
BL1c			Rezidiv III	+63W	Tumor <sup>§</sup>	47,XY,add(1)(q22),+7,t(8;14)(q24;q32),del(11)(q22q23),add(17)(p11),add(20)(q12),add(22)(p10),add(15)(p11)[2]/46,sl,-6[5]/47,sl,del(6)(q11)[2]/47,sl,del(6)(q21~22)[5].nuc ish 8q24 (MYC x 3), 14q32 (IGH x 3), 18q21 (BCL2 x 2)(MYC con IGH x 2)	11
BL2a	12	M	Diagnose		KM	46,XY,der(6)t(1;6)(q21;q14),t(8;22)(q24;q11)[4]/46,XY[25]	2
BL2b			Rezidiv I	+30W	PB	47,XY,der(6)t(1;6)(q21;q14),t(8;22)(q24;q11),+der(8)t(8;22)(q24;q11)[8]/46,XY[4].nuc ish 8q24 (MYC x 3~4), 14q32 (IGH x 2), 22q11 (IGL x 3)(MYC con IGL x 2~3)	3
BL3a	11	M	Diagnose		KM	46,XY,t(8;14)(q24;q32)[3]/47,XY,t(8;14)(q24;q32),+12[7]/46,XY[6]	2
BL3b			Rezidiv I <sup>¶</sup>	+27W	KM	47,XY,add(3)(q13),t(8;22)(q22;q12),t(8;14)(q24;q32),+12,add(12)(q24)[11]/46,XY,add(2)(p11),t(8;22)(q22;q12),t(8;14)(q24;q32),add(9)(q34),der(11)del(11)(p12)del(11)(q23),add(13)(q11),-15,add(18)(p11),+21[10].nuc ish 8q24 (MYC x 2), 13q14 (D13S319 x 2, D13S25 x 2), 14q32 (IGH x 2), 22q12 (IGL x 2, IGL prox x 2, IGL dist x 2)(MYC con IGH x 1)(IGL prox sep IGL dist x 1)	12
BL4a	44	M	Diagnose		KM	46,XY,t(8;14)(q24;q32)[2]/46,XY[13].nuc ish 8q24 (MYC x 3),14q32 (IGH x 3)(MYC con IGH x 2)(IGH prox sep IGH dist x 1)	1
BL4b					KM	46,XY[20]	
BL4c			Progression	+24W	KM	46,XY,dup(1)(q23q11),t(8;14)(q24;q32)[9]/46,XY,idem,add(13)(p10)[5]/46,XY,idem,t(2;14)(p14;q32).add(17)(p13)[2].nuc ish 1q23.1 (IRTA1/2 prox x 3 IRTA1/2 dist x 3)	5
BL5a			Diagnose		KM	46,XY[17]	
BL5b	4	M	Rezidiv I	+18W <sup>**</sup>	KM	46,XY,inv(1)(p13q41),t(8;14)(q24;q32),add(12)(q24)[1]/46,XY[27].nuc ish 8q24 (MYC x 3), 14q32 (IGH x 3)(MYC con IGH x 2)	3
BL5c			Blastenkrise	+21W	KM	46,XY,inv(1)(p13q41),t(8;14)(q24;q32),add(12)(q24),add(15)(q22)[4]/46,XY[17].ish t(8;14)(IGH dist+;IGH prox+,IGH dist-).nuc ish 8q24 (MYC x 3), 14q32 (IGH x 3)(MYC con IGH x 2)	4
BL5d			Rezidiv II	+32W	Pleura [2]	46,XY,t(8;14)(q24;q32),add(2)(p22),der(12)add(12)(p13)add(12)(q24),add(16)(q24),del(17)(p12),add(18)(q12)[cp2]/46,XY[17]	15
					KM [12]	45,XY,+1,inv(1)(p13q41),del(2)(p12),t(8;14)(q24;q32),del(11)(q14),-12,-16,del(17)(p12),add(18)(q12)[cp2]/45,XY,t(8;14)(q24;q32),der(12)add(12)(p13)add(12)(q24),-16,del(17)(p12),add(18)(q12),der(?)t(?)3(?)q13[2]/42-47,sl,add(2)(p22)[cp3]/46-48,t(8;14)(q24;q32),der(12)add(12)(p13)add(12)(q24),add(16)(q24),del(17)(p12),add(18)(q12)[cp2]/45-46,sl2,add(2)(p22)[2]/42-45,sl2,add(2)(p22),del(13)(q14q21)[cp3]/46,XY[3].nuc ish 8q24 (MYC x 3, MYC prox x 2, MYC dist x 2), 14q32 (IGH x 3)(MYC prox sep MYC dist x 1)(MYC con IGH x 2)	

A, Alter bei Diagnose (in Jahren); G, Geschlecht; M, männlich; W, weiblich; \*,+„ entspricht Zeiten von der initialen klinischen/zytologischen Diagnose bis zu den einzelnen Einsendungen; W, Wochen; K, Karyotyp-Komplexität, entspricht der Anzahl der Aberrationen; Nummer in den eckigen Klammern entspricht der Nummer der analysierten Metaphasen. Für die Leserlichkeit sind Haupt- und Subklone hintereinander geschrieben; „<sup>‡</sup>“ vom ersten Rezidiv ist keine Zytogenetik vorhanden; „<sup>§</sup>“ Tumorlokalisation ist Lunge/Pleura; „<sup>¶</sup>“ vom 2. Rezidiv ist keine Zytogenetik vorhanden; „<sup>\*\*</sup>“ die initiale Knochenmarkseinsendung zur Zeit der klinischen und zytologische Diagnosestellung hatte einen nicht aberranten Karyotypen, vermutlich stellt dies einen Probenentnahmefehler dar.

**Tabelle 13:** Klinische Merkmale der pädiatrischen Patienten mit einem BL der BFM–NHL Studien

Fall	A	G	Studie	D	Path	KM <sup>1</sup>	ZNS <sup>1</sup>	LDH <sup>1</sup>	Manifestationen <sup>1</sup>	Risiko Gruppe	Rezidiv <sup>2</sup>	Allo–SCT	Status
<b>BL1</b>	7	M	NHL95	BL	BL <sup>3</sup>	0%	Nein	1199	PE, Aszites, Dünndarm, terminales Ileum, Colon	R4	Rezidiv +16W/57W/63W	Ja	9/T
<b>BL2</b>	12	M	NHL95	B–ALL	NV	73%	Nein	1368	KM, Aszites, mesenteriale LK, Colon, Pancreas, zervikale LK	R4	Rezidiv +30W	Nein	13/T
<b>BL3</b>	11	M	NHL95	B–ALL	NV	90%	Ja	5300	KM, Liquor, zervikale LK, submandibuläre LK, Milz	R4	Rezidiv +27W/ 37W	Ja	12/T
<b>BL5</b>	4	M	NHL95	B–ALL	NV	94%	Nein	801	KM	R3	Nein	Ja	5/T

Fall, Fall entspricht dem Fall in Text und Tabellen. A, Alter; Der erwachsene Patient ist nicht in der Tabelle zu sehen. Alter, Alter bei Diagnose; G, Geschlecht; M, männlich; W, weiblich; Studie, entspricht der Studie, in die der Patient eingeschlossen war; D, Diagnose; BL, Burkitt–Lymphom; B–ALL, akute lymphoblastische B–Zell–Leukämie; Path, Pathologische Neubegutachtung; NV, nicht vorhanden; KM, prozentuale Knochenmarksbeteiligung; ZNS, zentrales Nervensystem betroffen; LDH, Serum Lactat Dehydrogenase (U/l), die oberen normalen Grenzwerte der verschiedenen Labore waren nicht vorhanden; PE, Pleuraerguss; LK, Lymphknoten; Risikogruppe entsprechend der BFM–NHL Risikoklassifikation; Status L, lebend; T, tot; <sup>1</sup>Wertbestimmung erfolgte initial bei Diagnose; <sup>2</sup>W, Wochen nach Diagnose; <sup>3</sup>Neubegutachtung des Materials des 3. Rezidives; <sup>4</sup>Neubegutachtung des Materials bei Diagnose

---

### **4.3. Zytogenetische und FISH Analysen bei t(8;14)/MYC-IGH oder t(8;22)/MYC-IGλ positiven reifen B-Zell Lymphomen**

#### **4.3.1. Demographische Daten und Berechnung des progressionsfreien Intervalls von Diagnose bis zum Rezidiv bei GZL und CLL**

Es wurden zwei Fälle mit der Diagnose GZL und ein Fall mit der Diagnose einer CLL in diese Arbeit eingeschlossen, die alle Einschlusskriterien nach Kapitel 2.1 erfüllt hatten. Bei beiden GZL Fällen und dem CLL Fall konnten aberrante Karyotypen von zwei Zeitpunkten untersucht werden.

Das Alter der zwei GZL Patienten betrug zum Zeitpunkt der Initialdiagnose 68 und 34 Jahre, beide hatten weibliches Geschlecht (siehe Tabelle 16). Die progressionsfreie Zeit von der Diagnose bis zum Rezidiv lag bei vier und 42 Wochen. Zum Zeitpunkt der Initialdiagnose betrug das Alter des CLL Patienten 66 Jahre, männliches Geschlecht. Das Intervall zum ersten Rezidiv lag bei 182 Wochen.

#### **4.3.2. Identifikation chromosomaler genetischen Veränderungen bei der Diagnose von t(8;14)/MYC-IGH oder t(8;22)/MYC-IGλ positiven reifen B-Zell Lymphomen**

In der vorliegende Arbeit wurden drei Fälle eines reifen B-Zell Lymphoms mit einer t(8;14)/MYC-IGH bzw. t(8;22)/MYC-IGλ eingeschlossen und analysiert. Dabei handelte es sich um zwei GZL Fälle und einem CLL Fall. Die zwei GZL wiesen die Translokation t(14;18)/BCL2-IGH auf, die typisch für FL ist und die Translokation t(8;14)/MYC-IGH bzw. die Translokation t(8;22)/MYC-IGλ, die typisch für BL ist. Die gleichzeitige Präsenz der Translokationen t(14;18)/IGH-BCL2 und t(8;14)/MYC-IGH bzw. t(8;22)/MYC-IGλ deutet daraufhin, dass es sich bei diesen beiden GZL um zwei DH handelt (siehe Kapitel 1.7 der Einleitung). Der CLL Fall wies die t(8;14)/MYC-IGH auf.

Die t(14;18)/BCL2-IGH sowie die Translokationen t(8;14)/MYC-IGH bzw. t(8;22)/MYC-IGλ wurden mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse detektiert. Außerdem wurden spezifische Sonden für die MYC-, IGH-, IGλ- und BCL2-Gene zum Nachweis der Translokation t(14;18)/BCL2-IGH und t(8;14)/MYC-IGH bzw. t(8;22)/MYC-IGλ mittels FISH angewendet. Die Translokationen konnten erwartungsgemäß bei den beiden untersuchten GZL Fällen und die t(8;14)/MYC-IGH bei dem CLL Fall bestätigt werden (Tabelle 14). Alle verwendeten Sonden sind in Kapitel 2.2.2 zu finden. Die Karyotypen der

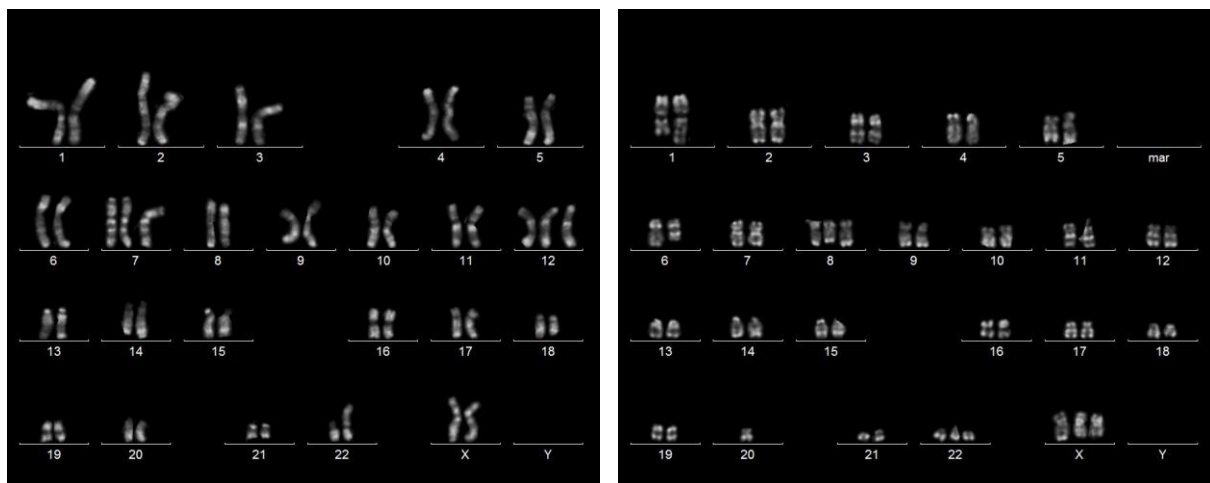
Chromosomen-Bänderungsanalysen und die FISH-Untersuchungen aller Fälle sind in Tabelle 16 und 17 dargestellt.

**Tabelle 14:** Darstellung der FISH Ergebnisse zum Nachweis der  $t(14;18)/BCL2-IGH$  und  $t(8;14)/MYC-IGH$  bzw.  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  bei den untersuchten GZL und CLL zum Zeitpunkt der Diagnose

Fall	<i>BCL2 con IGH</i>	<i>MYC con IGH</i>	<i>MYC con IG\lambda</i>
GZL1a	+	+	/
GZL2a	+	-	+
CLL1a	/	+	/

Die Translokation war bei „+“, nachweisbar; „-“, nicht nachweisbar; „/“, nicht durchgeführt, da nicht notwendig oder kein Material mehr vorhanden

Bereits zum Zeitpunkt der Initialdiagnose konnten bei den zwei GZL Fällen zusätzlich zu den Translokationen  $t(14;18)/BCL2-IGH$  und  $t(8;14)/MYC-IGH$  bzw.  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  andere chromosomalen Aberrationen nachgewiesen werden. Ein komplex aberranter Karyotyp wurde in beiden Fällen nachgewiesen, allerdings war keine der chromosomalen Veränderungen rekurrent. Es konnten in GZL1a zwei numerische Aberrationen (+7 und +12) und eine strukturelle Veränderung [del(22p)] identifiziert werden (Abbildung 17). In GZL2a konnten vier numerische Aberrationen (+X, +8, +22 und -20) und zwei strukturelle Veränderungen (Duplikation in 1q und Isochromosom 6) nachgewiesen werden (Abbildung 17). Die Frage, ob alle diese Veränderungen primär oder sekundär aufgetreten sind, kann Anhand der hier erhobenen Daten nicht sicher beantwortet werden. Anders als bei BL und MCL, die spezifische primäre genetische Veränderungen aufweisen, treten bei GZL und CLL verschiedene Aberrationen auf, die ursächlich für die Erkrankung sind (siehe Kapitel 1.7. und 1.8. der Einführung und 5.2.3. der Diskussion).



**Abbildung 17:** Karyogramme und Karyotypen nach ISCN-2013. Links, GZL1a: 48,XX,+7,t(8;14;18)(q24;q32;q21),+12,add(22)(p13); Rechts, GZL2a: 48,XX,+X,dup(1)(q12q32),i(6)(p10),+8,t(8;22)(q24;q11),t(14;18)(q32;q21),-20,+22

Zum Zeitpunkt der Initialdiagnose konnten ebenfalls zusätzlich zu der Translokation t(8;14)/MYC-IGH in dem CLL Fall weitere chromosomalen Aberrationen im Rahmen eines komplex aberranten Karyotyps nachgewiesen werden. In dem Fall CLL1a konnten zwei strukturelle Veränderungen (Deletionen del(11q) und del(13q)), aber keine numerische Aberration nachgewiesen werden. Bei diesem Fall ist die t(8;14)/MYC-IGH als sekundäre Veränderung aufgetreten, wie die Untersuchungen der Karyotypen zum Zeitpunkt des Rezidivs gezeigt haben (siehe Kapitel 4.3.3.).

### 4.3.3. Identifikation sekundärer genetischer Veränderungen beim Rezidiv von GZL und CLL

Die t(14;18)/BCL2-IGH und die t(8;14)/MYC-IGH bzw. t(8;22)/MYC-IGλ konnten auch bei allen untersuchten GZL Rezidiven mittels der Chromosomen-Bänderungs- und der FISH-Analyse bestätigt werden (Tabelle 15). Die t(8;14)/MYC-IGH konnte ebenfalls bei dem CLL-Rezidiv mittels der Chromosomen-Bänderungs- und der FISH-Analyse bestätigt werden (Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Darstellung der FISH Ergebnisse zum Nachweis der t(14;18)/BCL2-IGH und t(8;14)/MYC-IGH bzw. t(8;22)/MYC-IGλ bei den untersuchten GZL und CLL zum Zeitpunkt der Rezidive

Fall	BCL2 con IGH	MYC con IGH	MYC con IGλ	TP53
GZL1c	+	+	/	+
GZL2b	+	-	+	/
CLL1d	/	+	/	/

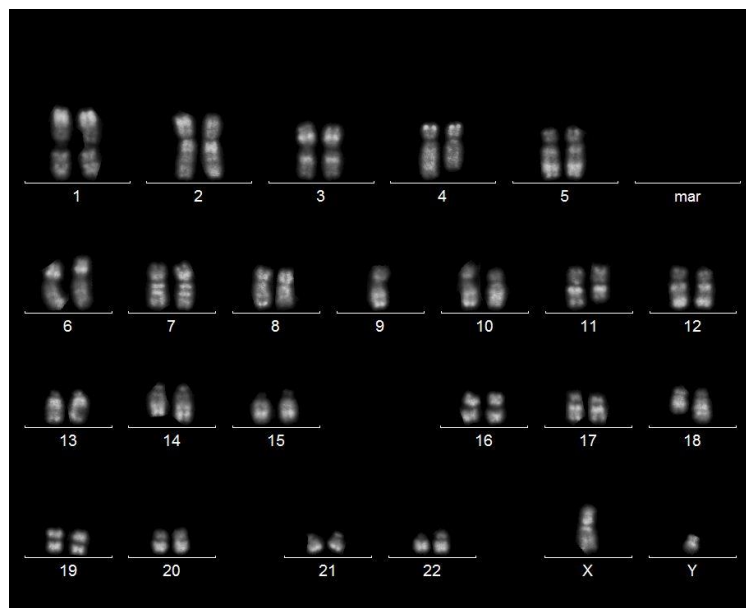
Die Translokation war bei „+“, nachweisbar; „-“, nicht nachweisbar; „/“, nicht durchgeführt, da nicht notwendig oder kein Material mehr vorhanden

Bei den Rezidiven konnten wie bei der Initialdiagnose keine rekurrenten chromosomalen Aberrationen zusätzlichen zu der t(14;18)/BCL2-IGH und t(8;14)/MYC-IGH gefunden werden. Einzelne chromosomale Aberrationen, inklusive zwei unbalancierter Translokationen, konnten identifiziert werden. Es konnten bei GZL1c vier numerische Aberrationen und vier strukturelle Aberrationen identifiziert werden. Bei GZL2b konnten drei numerische Aberrationen und eine strukturelle Aberration identifiziert werden.

In der nachfolgenden Einsendung GZL1b konnten keine Aberrationen gefunden werden im Sinne einer Remission. In der Einsendung GZL1c, die darauf folgte, konnten die Aberrationen von der Diagnosestellung wieder identifiziert werden. Zudem zeigten sich eine Trisomie 2 und 11, Deletionen in (3p) und (17p) sowie ein unbalanciertes derivatives Chromosom der(16)t(4;16)(q13;q24).

Bei GZL2b konnte in der nachfolgenden Einsendung der Karyotyp der ersten Einsendung identifiziert werde. Die dup(1), die -20 und die +22, die bei Diagnose vorhanden waren, konnten nicht wieder identifiziert werden. Es gab bei der nachfolgenden Einsendung jedoch einen Zugewinn des translozierten Chromosoms 8 [+der(8)t(8;22)]. Alle Aberrationen sind in Tabelle 16 zu sehen.

Bei CLL1d konnten eine numerische Aberration und vier strukturelle Aberrationen identifiziert werden, inklusive einer unbalancierten Translokation. Bei CLL1 waren in zwei nachfolgenden Einsendungen normale Karyotypen zu sehen (CLL1b und CLL1c). In der insgesamt 4. Einsendung (CLL1d) konnten die t(8;14)/MYC-IGH und die del(11q) wieder identifiziert werden. Ein aberranter Klon mit einer del(13q), zusätzlich zu t(8;14)/MYC-IGH und del(11q), wurde nicht identifiziert, jedoch wurde mittels FISH eine 13q-Deletion detektiert. Zudem wurden zwei aus diesem Klon mit der t(8;14)/MYC-IGH und del(11q) abgeleiteten Subklone mit jeweils einer Deletion in 4q [del(4q)] und einer Translokation von 4q mit 18q [t(4;18)(q;q)] detektiert. Interessanterweise wurde ein weiterer Klon mit der del(11q) sowie einem derivativen Chromosom der(4;21)del(4) und einem Markerchromosom, aber ohne die t(8;14)/MYC-IGH nachgewiesen (Abbildung 18). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die t(8;14)/MYC-IGH bereits zum Zeitpunkt der Initialdiagnose als sekundäre Veränderung auftrat. Aus einem unbekanntem Hauptklon mit einer del(11q) entwickelten sich zwei Subklone, die erst bei dem Rezidiv voneinander unterschieden werden konnten, ein Subklon mit der del(11q) und der t(8;14)/MYC-IGH und der andere Subklon mit der del(11q) aber keiner t(8;14)/MYC-IGH.



**Abbildung 18:** Karyogramm von CLL1d mit Karyotyp nach ISCN-2013: 46,XY,t(8;14)(q24;q32),-9,del(11)(q21q23),t(4;18)(q28;q22).

---

#### **4.3.4. Komplexitätsvergleich zwischen Diagnose und Rezidiv**

Bei den GZL beträgt die Anzahl der Veränderungen bei Diagnose bei GZL1 vier Aberrationen, bei GZL2 neun Aberrationen. Beide Fälle sind schon bei Diagnose als komplex zu werten. Beim Rezidiv beträgt die Anzahl der Aberrationen bei GZL1 acht und bei GZL2 sechs Aberrationen. In einem Fall ist eine Komplexitätszunahme zu sehen, bei dem anderen Fall nicht.

Bei dem CLL Fall beträgt die Anzahl der Aberrationen bei Diagnose drei und beim Rezidiv sechs. Der Fall zeigt eine Zunahme der Komplexität des Karyotyps und ist bei Diagnose schon als komplex zu werten.

**Tabelle 16:** (Molekulare) Zytogenetik von GZL mit Konsensus–Karyotypen aus den Chromosomen–Bänderungs– und FISH–Analysen

Fall	A	G	Biopsie	Zeit*	O	Karyotyp und FISH <sup>†</sup>	K
GZL1a	68	w	Diagnose		LK	47,XX,t(8;14;18)(q24;q32;q21),+12,add(22)(p13)[cp9]/48,XX,idem,+7[cp12].nuc ish 8 (CEP8 × 2, MYC × 3, MYC prox × 2, MYC dist × 2), 14q32 (IGH x 4), 18q21 (BCL2 x 3), 22q11 (IGλ prox × 2, IGλ dist × 2)(MYC prox sep MYC dist × 1)(MYC con IGH × 2)(IGH con BCL2 × 2)	4
GZL1b				+4 W	KM	46,XX[13].nuc ish 8q24 (MYC prox × 2, MYC dist × 2), 14q32 (IGH × 2), 18q21(BCL2 × 2)(IGH con BCL2 × 2)	
GZL1c			Rezidiv	+7W	Pleura	46–49,XX,+2,add(3)(p13),+7,t(8;14;18)(q24;q32;q21),+11,+12,der(16)t(4;16)(q13;q24),add(17)(p11),add(22)(p13),[cp20].nuc ish 8 (CEP8 × 2, MYC × 3, MYC prox × 2, MYC dist × 2), 14q32 (IGH × 4), 18q21 (BCL2 × 3)(MYC prox sep MYC dist × 1)(MYC con IGH × 2) (IGH con BCL2 × 2), 17 (TP53×1,MPO × 2)	9
GZL2a	34	w	Diagnose		pB	48,XX,+X,dup(1)(q12q32),i(6)(p10),+8,t(8;22)(q24;q11),t(14;18)(q32;q21), -20,+22[2]/46,XX[17].nuc ish 8q24 (MYC prox × 2–3, MYC dist × 2–3), 14q32 (IGH x 3), 22q11 (IGλ prox × 2–3, IGλ dist × 2–3) (MYC prox sep MYC dist × 1)(BCL2 × 3)(IGH con BCL2 × 2) (IGλ prox sep IGλ dist × 1), 8 (CEP8 × 3, MYC × 3), 14q32 (IGH × 3)(MYC con IGλ × 2)	8
GZL2b			Rezidiv	+ 42 W	pB	pB:48,XX,+X,i(6)(p10),+8,t(8;22)(q24;q11),t(14;18)(q32;q21)[4]/46,XX[3]	5
					KM	48,XX,+X,i(6)(p10),+8,t(8;22)(q24;q11),t(14;18)(q32;q21)[9]/49,XX,idem,+der(8)t(8;22)[2]/46,XX[2].nuc ish 8 (CEP8 × 3, MYC x 3, MYC prox × 3–4, MYC dist × 3–4), 14q32 (IGH × 3), 18q21 (BCL2 × 3)(MYC prox sep MYC dist × 1–2)(IGH con BCL2 × 2) (MYC con IGλ × 2)	6

A, Alter bei Diagnose (in Jahren); G, Geschlecht; M, männlich; W, weiblich; „\*“ und „+“ entspricht Zeiten von der initialen klinischen/zytologischen Diagnose bis zu den einzelnen Einsendungen, W, Wochen; O, Organ; K, Karyotyp–Komplexität, entspricht der Anzahl der Aberrationen; Nummer in den eckigen Klammern entspricht der Nummer der analysierten Metaphasen. Für die Leserlichkeit sind Haupt– und Subklone hintereinander geschrieben.

**Tabelle 17:** (Molekulare) Zytogenetik CLL mit Konsensus–Karyotypen aus den Chromosomen–Bänderungs– und FISH–Analysen

Fall	A	G	Biopsie	Zeit*	O	Karyotyp und FISH <sup>†</sup>	K
CLL1a	66	m	Diagnose		KM	46,XY,t(8;14)(q24;q32),del(11)(q21q23),del(13)(q14q21)[1].ish t(8;14)(MYC prox –,MYC dist +,IGH dist +; MYC prox +, MYC dist +, IGH prox +)[1]. nuc ish 8q24 (MYC × 2, MYC prox × 2, MYC dist × 2), 11 (CEP11 × 2, CCND1 × 2, ATM × 1, FDX x 1), 12q13 (CHOP prox × 2, CHOP dist × 2), 13q14 (D13S319 × 1, D13S25 × 1), 14q32 (IGH × 3, IGH prox × 2, IGH dist × 2), 17 (TP53 × 2, CEP17 × 2),18q21 (BCL2 × 2),21(21q × 2)(MYC con IGH × 1)(IGH prox sep IGH dist × 1)	3
CLL1b				+20W	KM	46,XY[9].nuc ish 8q24 (MYC prox × 2, MYC dist x 2), 11 (CEP11 × 2, ATM × 2, FDX × 2), 14q32(IGH prox × 2,IGH dist × 2)	
CLL1c				+94 W	KM	46,XY[14].nuc ish 8q24 (MYC × 2), 11(CEP11 × 2, ATM × 2, FDX × 2), 14q32 (IGH × 2), 13q14 (D13S319 × 2, D13S25 × 2)	
CLL1d			Rezidiv	+182 W	KM	46,XY,t(8;14)(q24;q32),del(11)(q21q23)[3]/46,XY,idem,del(4)(q28)[5]/46,XY,idem,t(4;18)(q28;q22)[8]/47,XY,del(11)(q21q23), der(4;21)(q10;q10) del(4)(q25q28),+mar1[2]/46,XY[1].nuc ish 11 (CEP11 × 2, ATM × 1, FDX × 1), 13q14 (D13S319 × 1, D13S25 × 1), 8q24 (MYC prox × 2, MYC dist × 2), 14q32 (IGH prox × 2, IGH dist × 2),17 (TP53 × 2, CEP17 × 2)(MYC prox sep MYC dist × 1)(IGH prox sep IGH dist × 1)(MYC con IGH × 1)	6

A, Alter bei Diagnose (in Jahren); G, Geschlecht; M, männlich; W, weiblich; „\*“ und „+“ entspricht Zeiten von der initialen klinischen/zytologischen Diagnose bis zu den einzelnen Einsendungen, W, Wochen; O, Organ; K, Karyotyp–Komplexität, entspricht der Anzahl der Aberrationen, Nummer in den eckigen Klammern entspricht der Nummer der analysierten Metaphasen. Für die Leserlichkeit sind Haupt– und Subklone hintereinander geschrieben.



#### 4.4. Vergleich der Demographie und der zytogenetischen Veränderungen von BL, MCL, CLL und GZL

Bei dem Vergleich der Geschlechtsverteilung fällt auf, dass bei BL und bei CLL nur Männer betroffen sind, bei den GZL nur Frauen. Das Geschlechterverhältnis liegt bei MCL stark auf der Seite der Männer (MCL 80%). Wenn die Altersverteilung verglichen wird, ist das Durchschnittsalter bei den BL mit 15,6 Jahren am niedrigsten, bei den CLL mit 72,5 Jahren am höchsten. Beim MCL sind vor allem ältere Erwachsene (Durchschnittsalter 64,2) betroffen, bei den GZL war ein jüngerer Erwachsener (34 Jahre) und ein älterer Erwachsener (68 Jahre) erkrankt (Tabelle 18).

**Tabelle 18:** Tabelle des Durchschnittsalters und der Aufteilung nach Geschlecht

Lymphomentität	Anzahl	Männlich	weiblich	Durschnittsalter in Jahren
MCL	5	4 (80%)	1 (20%)	64,2
BL	5	5 (100%)	0 (0%)	15,6
CLL	1	1 (100%)	0 (0%)	66
GZL	2	0 (0%)	2 (100%)	51
Gesamt	13	10	3	

Die progressionsfreie Zeit ist bei den GZL mit 24 Wochen am niedrigsten, bei den CLL Fällen mit 182 Wochen am höchsten. Das progressionsfreie Intervall ist bei den MCL bis zum 1. Rezidiv mit 60 Wochen doppelt so lang wie beim BL mit 30 Wochen. Bis zum 2. Rezidiv ist die Zeit beim MCL mit 107 Wochen ebenfalls viel länger als beim BL mit 42 Wochen (Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Tabelle des durchschnittlichen progressionsfreien Intervalls

Lymphom	Anzahl	Progressionsfreies Intervall in Wochen zum 1. Rezidiv*	Progressionsfreies Intervall in Wochen zum 2. Rezidiv
MCL	5	60	107
BL	5	30	42
CLL	1	182	/
GZL	2	24	/
Gesamt	13		

\*Das progressionsfreie Intervall wurde auf ganze Wochen abgerundet; / kein 2. Rezidiv vorhanden

Bei allen untersuchten reifen B-Zell Neoplasien wurden zum Zeitpunkt der Initialdiagnose und Rezidiv chromosomale genetischen Veränderungen festgestellt. Allerdings wurden nur bei den BL und MCL rekurrente sekundäre Chromosomenaberrationen gefunden. Bei den rekurrenten sekundären Veränderungen in MCL und BL gab es übereinstimmende Aberrationen. Die sekundären Veränderungen von 1q, die als sekundäre rekurrente Veränderungen identifiziert werden konnte, sind in jeweils einem Fall der MCL und GZL zu

sehen. Es zeigen sich übereinstimmend Deletionen in 11q [del(11q)] und eine Deletion in 6q [del(6q)], wobei die del(6q) bei MCL bereits bei Diagnose zu sehen und bei den BL nur bei den nachfolgenden Einsendungen identifiziert werden konnte. Außerdem wurden bei den MCL und BL 17p-Deletionen bzw. Verluste von Chromosom 17 [-17/del(17p)] als rekurrente Veränderung identifiziert. Die -17/del(17p) bzw. die Deletion des *TP53*-Gens konnte in der vorliegenden Arbeit bei den BL, MCL und bei einem GZL fast nur bei den Rezidiven identifiziert werden. Die Veränderungen in 1q, die bei den BL als sekundäre rekurrente Veränderungen identifiziert werden konnten und bei einem Fall bei Diagnose und in 3 Fällen beim Rezidiv identifiziert werden konnte, wurden in jeweils einem Fall der MCL und GZL gesehen. Die rekurrente Veränderung der BL del(13q) und +21, traten auch in einer MCL auf. Wiederum trat +8 als rekurrente sekundäre Veränderung bei den MCL nur in einem Fall der BL auf.

Die Komplexität bei Diagnose ist bei den BL mit einer durchschnittlichen Anzahl mit 1 am niedrigsten, bei MCL mit der Anzahl von 8 am höchsten. Die CLL zeigte 3 Aberrationen, die GZL 6 Aberrationen. Die BL zeigten keinen komplex aberranten Karyotyp, bei den MCL zeigten jedoch drei der fünf Fälle und bei den GZL und CLL alle Fälle einen komplex aberranten Karyotyp.

Beim 1. Rezidiv war die Komplexität bei den BL und bei dem CLL Fall mit der Zahl von 6 am niedrigsten, die MCL Aberrationen mit der Zahl von 11 am höchsten. Die GZL zeigten durchschnittlich 7 Aberrationen. Beim 1. Rezidiv sind bei BL, GZL und CLL alle Fälle komplex aberrant, beim MCL 80% (4/5). Nur bei den MCL und BL traten 2. Rezidive auf. Da keine klinischen Daten vorhanden sind, konnte nicht erfahren werden, ob die anderen Patienten kein 2. Rezidiv hatten oder eventuell verstorben sind. Beim 2. Rezidiv ist die Anzahl der Aberrationen bei den MCL ebenfalls mit 11 bzw. 8 höher als bei den BL mit 6 bzw. 12 (siehe Tabelle 20). Trotz der Tatsache, dass die karyotypische Komplexität bei den Rezidiven gestiegen ist, konnte eine statistisch signifikante Komplexitätszunahme bei den MCL, BL, GZL und CLL nicht nachgewiesen werden.

**Tabelle 20:** Tabelle der Komplexität der verschiedenen reifen B-Zell Neoplasien

	Durchschnitt Anzahl Aberrationen Diagnose*	Komplexe Fälle bei Diagnose	Durchschnitt Anzahl Aberrationen 1. Rezidiv*	Komplexe Fälle bei 1. Rezidiv	Durchschnitt Anzahl Aberrationen 2. Rezidiv
<b>BL</b>	1	0 %	6	100 %	13
<b>CLL</b>	3	100 %	6	100 %	/
<b>GZL</b>	6	100 %	7	100 %	/
<b>MCL</b>	8	60 %	11	80 %	8

\* Der Durchschnitt Anzahl der Aberrationen wurde auf ganze Zahlen abgerundet

#### 4.5. Klonale Entwicklung bei reifen B-Zell Neoplasien

Die Aufklärung der evolutionären Entwicklung ist für das Verständnis der B-Zell Neoplasien essentiell. Hinsichtlich der Evolution der Karyotypen, ob sich die verschiedenen Subklone aus einer Vorläuferzelle mit einem linearen oder aus einer Progenitorzelle mit parallelem Weg entwickelt haben soll hier für die untersuchten reifen B-Zell Neoplasien geklärt werden.

Bei der MCL konnten bei Diagnose in 2 Fällen Subklone festgestellt werden, die sich aus dem Hauptklon abgeleitet haben, da sie alle Veränderungen des Hauptklons mit zusätzlichen Veränderungen enthalten. Bei MCL1 konnten die Aberrationen des Hauptklons bei dem Rezidiv bis auf die del(2p), die Monosomie 7 und das der(17) wieder identifiziert werden. Da alle anderen Veränderungen noch vorhanden sind und noch weitere Veränderungen wie die Triploidie hinzugekommen sind, ist hier von einer linearen Entwicklung auszugehen. Bei MCL2, MCL3 und MCL4 konnten die Aberrationen von Diagnose und weitere Aberrationen bei dem Rezidiv identifiziert werden, sodass hier auch von einer karyotypischen linearen Entwicklung ausgegangen werden kann. Bei MCL5 konnte der Hauptklon von Diagnose bei dem Rezidiv wieder identifiziert werden. Zusätzlich wurde ein Subklon mit einem i(8q), die bei der Initialdiagnose nicht erfasst wurden, identifiziert. Da auch eine i(8q) in einem anderen Subklon bei Diagnose identifiziert werden konnte, ist davon auszugehen, dass bereits bei Diagnose ein Subklon des Hauptklons mit der i(8q) vorhanden war. Da zu diesem mutmaßlichen Subklon weitere Veränderungen hinzugekommen sind, ist trotz der insgesamt niedrigeren Anzahl an Aberrationen beim Rezidiv von einer linearen Entwicklung auszugehen (Abbildung 19). Somit konnte für alle MCL Fälle eine lineare Entwicklung während des Progresses und die Zunahme von Aberrationen verglichen mit der Diagnose gezeigt werden.

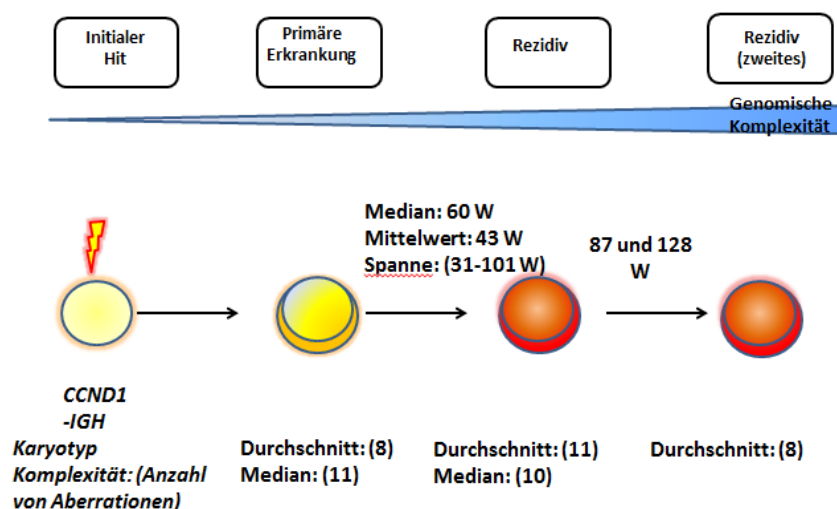
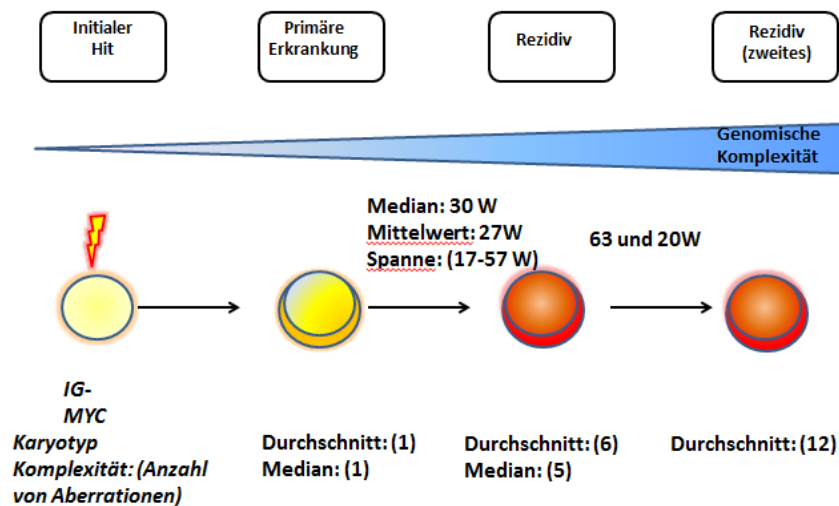


Abbildung 19: Zytogenetische Evolution von MCL

Bei den BL konnte bei Diagnose in lediglich einem Fall ein Subklon identifiziert werden. Bei BL1, BL2, BL3 und BL4 konnten bei dem Rezidiv alle bei der Diagnose identifizierten Aberrationen und zusätzliche Aberrationen festgestellt werden, sodass von einer linearen Evolution ausgegangen werden kann. Bei BL5 war bei Diagnose ein unauffälliger Karyotyp zu identifizieren, dies ist, am ehesten, auf ein Wachstum der Tumorzellen zurückzuführen. Jedoch zeigt dieser Fall bei den nachfolgenden Einsendungen bis zum 2. Rezidiv die gleichen Veränderungen wie bei dem ersten Rezidiv und eine Zunahme an sekundären Veränderungen, sodass auch hier von einer linearen Entwicklung ausgegangen werden kann. Somit konnte bei allen BL Fällen der lineare Weg der evolutionären Entwicklung gezeigt werden (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Zytogenetische Evolution von BL

Bei den GZL und CLL konnten aufgrund der wenigen Fälle nur wegweisende Befunde erstellt werden. Bei GZL1 konnten alle Aberrationen in dem Rezidiv wieder erkannt werden und es konnten zusätzliche Aberrationen identifiziert werden, sodass von einem linearen Weg auszugehen ist. Bei GZL2 zeigte der Hauptklon im peripheren Blut beim Rezidiv weniger Alterationen als bei der Diagnose (keine dup(1), keine -20 und keine +22). Aus zytogenetischer Sicht scheint der Klon beim Rezidiv im peripheren Blut, den ursprünglichen Klon aus dem sich die anderen Subklone entwickeln haben, zu repräsentieren. Dieser Klon wurde bei der Initialdiagnose, in der nur zwei aberranten Metaphasen gefunden wurden, nicht erfasst, am ehesten aufgrund des schlechten Wachstums der Tumorzellen. Dieses Ergebnis deutet auf eine klonale Heterogenität, bereits zum Zeitpunkt der Initialdiagnose hin. Allerdings, da alle Aberrationen des mutmaßlichen Hauptklons wieder nachgewiesen werden

---

konnten und neue Aberrationen in der Knochenmarksprobe festgestellt wurden, ist hier von einer linearen Entwicklung auszugehen.

Bei der CLL konnte wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben die  $t(8;14)/MYC-IGH$  als sekundäre Veränderung identifiziert werden. Bei der Einsendung sind drei Aberrationen zu identifizieren. Zwei der Aberrationen konnten mit der Zytogenetik [ $t(8;14)/MYC-IGH$  und  $del(11q)$ ], eine mit der Molekularzytogenetik [ $del(13q)$ ] bei dem Rezidiv nachgewiesen werden. Bei der Diagnose konnte nur eine Zelle ausgewertet werden, daher ist es möglich, dass bei Diagnose ein Subklon ohne die  $del(13q)$  vorhanden war. Da beim Rezidiv, die  $del(13q)$  mittels FISH, aber nicht mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse detektiert wurde, ist es am ehesten davon auszugehen, dass dieser Subklon aufgrund von keinem Wachstum nicht erfasst wurde. Da beim Rezidiv mehrere neue Veränderungen hinzugekommen sind, ist auch hier von einer linearen Entwicklung wahrscheinlich, jedoch kann dies aufgrund von wahrscheinlichen Subklonen bei Diagnose nicht sicher gesagt werden.

#### **4.6. Zusammenfassung der Ergebnisse**

Im Vergleich bei MCL, GZL, CLL und BL ist zu sehen, dass das Durchschnittsalter der Patienten bei den BL kleiner ist als bei den anderen Lymphomentitäten und dass der CLL Patient am ältesten ist (BL 15,6 Jahre, GZL 51 Jahre, MCL 64,2 Jahre und CLL 66 Jahre).

Im Vergleich von BL, GZL, MCL und CLL haben GZL eine kurze progressionsfreie Zeit, CLL eine lange (GZL 24 Wochen, BL 30 Wochen, MCL 60 Wochen und CLL 182 Wochen). Zum 2. Rezidiv haben die MCL ein längeres progressionsfreies Intervall als BL (MCL 107 Wochen, BL 42 Wochen). Bei den GZL und CLL gab es keine 2. Rezidive.

Die Anzahl an Aberrationen ist bei GZL, MCL und CLL schon bei Diagnose höher als bei BL (BL 1, CLL 3, GZL 6, MCL 8). Die BL zeigen bei Diagnose keinen komplexen Karyotypen (BL 0/5). CLL und GZL haben bei Diagnose zu 100% einen komplexen Karyotypen, MCL zu 60% (MCL 3/5). Beim 1. Rezidiv sind bei BL, GZL und CLL alle Fälle komplex und beim MCL 80% (4/5). 2. Rezidive traten nur bei BL und MCL auf und waren alle als komplex zu werten. Allerdings, konnte bei den BL, MCL, GZL und CLL keine statistische Signifikanz der Zunahme der Aberrationen bestätigt werden. Die sekundären rekurrenten Veränderungen, die ich in dieser Arbeit bei den BL nachweisen konnte, waren eine  $+21$ ,  $1q$ -Zugewinne sowie Deletionen in  $6q$ ,  $11q$ ,  $12q$ ,  $13q$  und  $17p$ . Unter den rekurrenten sekundären Veränderungen, die in dieser Arbeit bei MCL nachgewiesen werden konnten, waren ein derivatives

---

Chromosom 1 [der(1)] mit dem Bruchpunkt in der Region 1q31–q32 mit Deletionen in 1p, 8q–Zugewinne sowie Deletionen in 11q und 17p. Eine del(2p) trat rekurrent nur bei Diagnose auf.

Es fanden sich bei den BL und MCL folgende gleiche rekurrente Veränderungen: del(6q), del(11q) und -17/del(17p). Die -17/del(17p) konnte auch in einem GZL identifiziert werden. Die del(13q) und die del(11q) konnte in dem CLL Fall identifiziert werden. Allerdings konnten bei den GZL und CLL keine rekurrenten sekundären Aberrationen identifiziert werden. Bei BL und MCL und konnte eine lineare evolutionäre Entwicklung nachgewiesen werden, bei CLL und GZL aufgrund des kleinen analysierten Kollektivs sind Hinweise auf eine lineare Entwicklung zu finden.

---

## 5. Diskussion

In den letzten Jahren wird zunehmend angestrebt, die klonale Evolution der einzelnen Lymphomarten aufzuklären. Es wird zudem versucht, die sekundären chromosomalen Aberrationen der einzelnen Lymphome zu identifizieren. Das Endziel dieser Recherchen ist das genetische Verhalten reifzelliger B-Zell Neoplasien zu verstehen und durch diese Erkenntnisse Therapien spezifischer durchführen zu können. Bei FL ist man diesem Ziel bereits sehr nahe, bei anderen B-Zell Neoplasien wie z.B. bei MCL und BL ist man von diesem Ziel noch weit entfernt. Um die evolutionäre Entwicklung darzustellen, ist es nötig große Kohorten von Patienten der jeweiligen Lymphomart zu untersuchen.

### 5.1. Wertstellung der Zytogenetik zur Analyse klonaler Evolution reifer B-Zell Neoplasien

In der vorliegenden Arbeit wurden die zytogenetischen und molekularzytogenetischen Daten von 13 Fällen reifer B-Zell Neoplasien (BL, MCL, GZL und CLL) zu den Zeitpunkten der Initialdiagnose und eines oder mehrerer Rezidive eingeschlossen, um die klonale Evolution dieser seltenen Lymphomen zu untersuchen. Es konnten aufgrund der Seltenheit der hier untersuchten Lymphome und den seltenen Einsendungen bei Rezidiven wenige Fälle untersucht werden. Trotz der Seltenheit konnten in der vorliegenden Arbeit je fünf Fälle von BL und MCL untersucht werden.

Die klassische Chromosomen-Bänderungsanalyse ist eine ungerichtete Methode, die ermöglicht chromosomale Veränderungen bei menschlichen Neoplasien zu erfassen. Jede analysierte Metaphase repräsentiert eine Zelle und somit eignet sich die Chromosomen-Bänderungsanalyse sehr gut, um die Vielfalt der chromosomalen Veränderungen zu erfassen und um klonale Evolutionsstudien durchzuführen. Bei den molekularzytogenetischen Analysen mittels FISH, werden in jedem Experiment zwei oder drei Genorte gleichzeitig analysiert, daher ist die Unterscheidung der verschiedenen Gene bzw. der Klone, wenn mehrere Genorte gleichzeitig verändert sind, nicht immer möglich.

Für eine optimale Chromosomen-Bänderungsanalyse spielt die Auflösung oder Bandenqualität der Chromosomen eine wesentliche Rolle. Bei sehr niedrigem Bandenniveau der Chromosomen erschwert dies die Auswertung der chromosomalen Veränderungen, vor allem bei hoher karyotypischer Komplexität. Außerdem ist die Karyotypisierung eine

---

subjektive Auswertung, und somit ist keine Garantie für die Richtigkeit der Ergebnisse zu geben.

In der vorliegenden Arbeit war es nicht immer möglich bei der Chromosomen-Bänderungsanalyse die geforderten 20 Metaphasen auszuwerten, da die Qualität der Metaphasen zu schlecht war oder nicht genug Metaphasen gefunden werden konnten. Dadurch konnte die zytogenetische Vielfalt der Klone eventuell nicht immer vollständig abgebildet werden. Einige Fälle mussten als *composite* Fälle beschrieben werden. Dies war notwendig, da sich die einzelnen Metaphasen hinsichtlich der chromosomalen Veränderungen zu sehr unterschieden, sodass kein regulärer Karyotyp geschrieben werden konnte. Dadurch war es nicht möglich Subklone zu erfassen.

Trotz allem, ist die Chromosomen-Bänderungsanalyse die einzige Methode, die uns ermöglicht die Vielfalt der Veränderungen jeder einzelnen Tumorzelle zu erfassen und somit eignet sich die Chromosomen-Bänderungsanalyse vortrefflich für Studien über die klonale Evolution von Tumorzellen.

Es wurde bei den Fällen dieser Arbeit die Chromosomen-Bänderungsanalyse genutzt. Dadurch war es möglich einen guten Überblick über die chromosomalen Veränderungen zu erhalten. Kleine Aberrationen können damit nicht erkannt werden und zur Identifikation kleinerer Veränderungen wurde in dieser Arbeit die FISH zusätzlich zu der Chromosomen-Bänderungsanalyse angewandt.

## **5.2. Zytogenetische Veränderungen bei reifen B-Zell Neoplasien**

Hier sollen die zytogenetischen Veränderungen der einzelnen reifen B-Zell Neoplasien verglichen und diskutiert werden. Die Aufklärung der primären und sekundären Aberrationen und der klonalen Entwicklung ist wichtig zur Einschätzung der Prognose. In Zukunft sollte die Bedeutung der neu aufgetretenen Aberrationen in Verbindung mit anderen Prognosefaktoren gebracht werden, um risikoadaptierte Therapien zu ermöglichen.

### **5.2.1. MCL zeigen bei Diagnose eine hohe karyotypische Komplexität und eine lineare klonale Entwicklung**

Das MCL ist eine aggressive maligne Erkrankung, die sich durch die Präsenz der Translokation  $t(11;14)/CCND1-IGH$  charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden fünf MCL mit sequenziellen Proben und einer  $t(11;14)/CCND1-IGH$  untersucht, um die klonale Evolution dieser Lymphome zu analysieren. Die  $t(11;14)/CCND1-IGH$  konnte bei allen fünf



---

Fällen mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse und/oder FISH mit spezifischen Sonden für die *CCND1*- und *IGH*-Gene nachgewiesen werden.

Drei der fünf Fälle zeigten bei Diagnose bereits einen chromosomal komplex aberranten Karyotyp und diese komplexen Fälle wiesen schon eine große Anzahl von Aberrationen (zwischen 11 und 14 Aberrationen) auf. Die MCL haben schon bei Diagnose eine schlechte Prognose und eine hohe Komplexität schon bei Diagnose wurde mit einer schlechten Prognose assoziiert (Cortelazzo et al. 2012; Sarkozy et al., 2014). Im Einklang mit diesen Daten aus der Literatur zeigten alle fünf Patienten einen aggressiven Verlauf der Erkrankung und innerhalb des ersten Jahres erlitten alle ein Rezidiv. Leider waren klinische Daten der MCL Patienten nicht verfügbar, sodass darüber keine Aussagen gemacht werden konnten.

Es konnten durch die zytogenetischen Analysen der sequenziellen Proben in vier der fünf Fälle eine Zunahme der Aberrationen nachgewiesen werden. Allerdings erreichte die Zunahme der Aberrationen keine statistische Signifikanz, was auf die geringe Anzahl der untersuchten Fälle zurückzuführen sein kann.

In dieser Arbeit konnten die del(1p), del(6q), del(11q), -17/del(17p) sowie ein Zugewinn in 8q als rekurrente sekundäre Aberrationen nachgewiesen werden. Weiterhin konnten in dieser Arbeit eine del(9p) und eine del(13q) bei jeweils einem Fall identifiziert werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit publizierten Studien, die Deletionen in 1p, 6q, 9p, 11q, 13q und 17p sowie Zugewinne in 8q als rekurrente sekundäre chromosomale Veränderungen in MCL berichtet haben (Parry-Jones et al. 2007, Salaverria et al. 2008, Katzenberger et al. 2008, Sander et al. 2008, Espinet et al. 2010). Weitere Aberrationen, wie Deletionen in 8p, Zugewinne in 3q, 7p und 15q konnten nicht nachgewiesen werden. Dies könnte zum Einen an der geringen Größe der hier analysierten Kohorte liegen. Zum Anderen wurden die hier beschriebenen Proben mithilfe der Chromosomen-Bänderungsanalyse untersucht, während in den publizierten Studien Hochdurchsatzsequenzierung und Array-basierte Genomhybridisierung zur Anwendung kamen. Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit sequenzielle Proben der Diagnose und des Rezidivs von denselben Patienten untersucht und nicht heterogene Kollektive von MCL bei Diagnose und Rezidiv. In den in dieser Arbeit eingeschlossenen Fällen konnten zusätzlich als sekundäre rekurrente Veränderung ein derivatives Chromosom 1 mit Bruchpunkten in 1q und Deletionen in 2p identifiziert werden. Da die del(2p) bei den Rezidiven nicht mehr rekurrent vorhanden war, ist davon auszugehen, dass die del(2p) in der evolutionären Entwicklung keine Rolle spielt. Die rekurrenten sekundären Aberrationen werden ausführlich in Kapitel 5.2.5 besprochen.

---

Hinsichtlich der klonalen Evolution konnte bei allen Fällen eine lineare evolutionäre Entwicklung dargestellt werden. Bisher wurden nur wenige Patienten mit einer MCL untersucht, bei denen sowohl Proben bei Diagnose als auch bei Rezidiv von demselben Patienten zur Analyse vorlagen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten stehen im Einklang mit den wenigen publizierten Daten klonaler Evolution bei MCL, die sequenzielle Proben untersucht haben, die ebenfalls einen komplexeren Karyotypen und eine klonale Evolution während der Erkrankung beobachtet hatten (Beà et al. 2013).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die MCL zum Zeitpunkt der Initialdiagnose eine hohe Komplexität zeigen, dass die karyotypische Komplexität mit dem Krankheitsverlauf steigt, was mit der bekannten schlechten Prognose diese Lymphome einhergeht und dass bei MCL die klonale Entwicklung linear verläuft.

### **5.2.2. BL zeigen bei Diagnose eine niedrige karyotypische Komplexität und eine lineare klonale Entwicklung**

Die BL haben bei Diagnose eine gute Prognose, aber die wenigen Patienten mit einem BL Rezidiv haben eine sehr ungünstige Prognose (Atra et al. 2001). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es konnten fünf sequenzielle Proben von seltenen BL mit Rezidiven mittels zytogenetischer und molekulargenetischer Analysen untersucht werden. In allen BL Fällen konnte die Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  oder die Translokation  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  nachgewiesen werden. Die Translokation  $t(2;8)(p11;q24)/MYC-IG\kappa$ , die ebenfalls für BL typisch, jedoch sehr selten ist, wurde in den hier untersuchten Fällen nicht festgestellt.

Alle Fälle in dieser Arbeit hatten ein Rezidiv im ersten Jahr nach Diagnose und vier der fünf Patienten, alle Kinder, starben, die meisten innerhalb des ersten Jahres. Bei der initialen Diagnose von BL konnte bei allen Fällen ein simpler Karyotyp mit durchschnittlich einer Aberration (1–2 Aberrationen bei Diagnose) nachgewiesen werden. Zwei der fünf Fälle hatten die  $t(8;14)/MYC-IGH$  Translokation als einzige Veränderung. Die geringe genetische Komplexität von BL konnte bereits in anderen Studien nachgewiesen werden (Hummel et al. 2006, Boerma et al. 2009). Gerade bei den BL wäre es aufgrund der guten Prognose und der seltenen Rezidive und aufgrund der Assoziation zwischen komplexem Karyotyp bei Diagnose und schlechter Prognose (Hummel et al 2006) entscheidend, schon bei Diagnose eine Aussage über den weiteren Verlauf der Erkrankung treffen zu können. Dafür ist die Identifikation sekundärer Aberrationen und die Aufklärung der evolutionären Entwicklung entscheidend, um in Zukunft risikoadaptierte Therapien durchführen zu können.

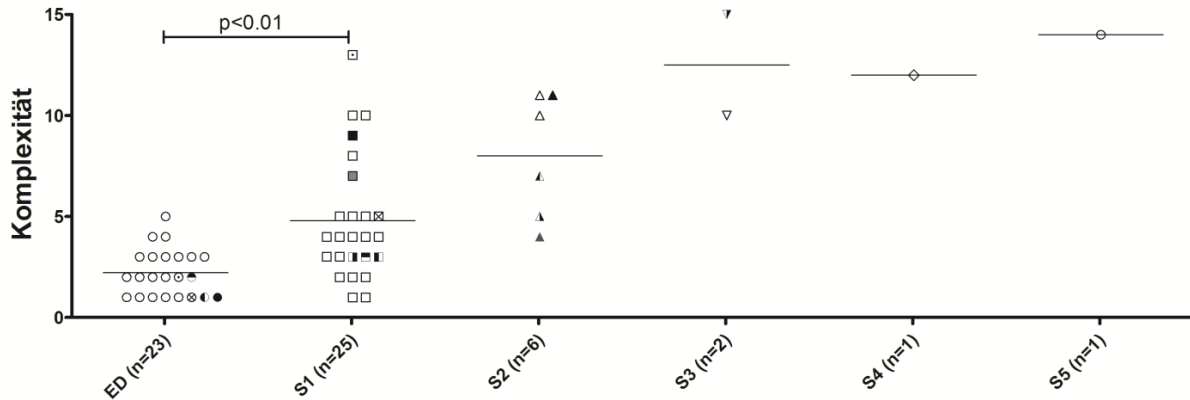
---

Es konnte bei jedem Fall eine Zunahme der Aberrationen nachgewiesen werden, eine statistisch signifikante Zunahme der Komplexität konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bewiesen werden.

Bei BL sind verschiedene rekurrente sekundäre Veränderungen bekannt, darunter zählt die dup(1q) als die häufigste Veränderung gefolgt von Zugewinnen in 7q und eine Trisomie 12 sowie Deletionen del(6q), del(11q), del(13q) und -17/del(17p) (Lones et al. 2004, Onciu et al. 2006, Boerma et al. 2009, Nelson et al. 2010, Murga Penas et al. 2014, Bödör und Reiniger 2016). Die veröffentlichten Daten korrelieren mit den in dieser Arbeit identifizierten Aberrationen. Bei Diagnose konnte in einem Fall eine Trisomie 12 nachgewiesen werden. Bei den Rezidiven dieser Studie konnten Zugewinne in (1q), del(6q), del(11q), del(13q) und -17/del(17p) als rekurrente sekundäre Veränderungen bestätigt werden. Darüber hinaus zeigten die untersuchten Fällen weitere rekurrente sekundäre Veränderungen: eine add(12)(q24) bei zwei Rezidiven und eine Trisomie 21 ebenfalls bei zwei Rezidiven. Die Trisomie 21 konnte auch schon in anderen Studien nachgewiesen werden und soll spät in dem Krankheitsverlauf auftreten (Bödör und Reiniger 2016). Veränderungen in 7q, wie in der Literatur beschrieben, konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die Veränderung in 7q soll früh in der Entwicklung auftreten (Bödör und Reiniger 2016). Die rekurrenten sekundären Aberrationen der untersuchten B-Zell Neoplasien werden ausführlich in Kapitel 5.2.5 besprochen.

Die fünf untersuchten BL Fälle wurden in der Publikation von Aukema und Theil et al. (2015) veröffentlicht. In dieser publizierten Studie wurden zusätzlich zwei externe Fälle aus dem NHL Studiencenter Berlin Frankfurt Münster (BFM) eingeschlossen, bei denen Einsendungen bei Diagnose und Rezidiv vorlagen. Zusätzlich wurden 18 Fälle mit Daten von sequenziellen Proben aus dem Mitelman Datenkatalog [*Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer* (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>)] in die Arbeit eingeschlossen. Es konnte eine statistisch signifikante Zunahme der Aberrationen nachgewiesen werden, mit einer durchschnittlichen Anzahl von zwei Aberrationen bei Diagnose, fünf beim ersten und acht beim zweiten Rezidiv (siehe Abbildung 21).

Bei den in der vorliegenden Arbeit analysierten Fällen konnte eine lineare evolutionäre Entwicklung nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.5.). Die untersuchte BL Kohorte mit lediglich fünf Fällen mag etwas zu klein sein, um eine sichere Aussage hinsichtlich der klonalen Evolution zu machen. Allerdings wurden diese seltenen Fälle in einer größeren Studie zusammen mit 20 weiteren Fällen aus eigenen und publizierten Studien analysiert; dabei wurde bestätigt, dass es sich bei BL um eine lineare evolutionäre Entwicklung handelt (Aukema und Theil et al. 2015).



**Abbildung 21:** Komplexitätszunahme von BL. Die Graphik zeigt die Dynamik der klonalen Evolution und der Karyotyp-Komplexität (Aukema und Theil et al. 2015). ED: Erstdiagnose, S1: Rezidiv, S2: zweites Rezidiv. Die zum Teil gefüllten Kästchen entsprechen den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fällen und den zwei untersuchten Fällen aus dem BFM-NHL

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass BL initial mit einer guten Prognose und einer geringen genomischen Komplexität assoziiert sind. Bei Rezidiven ist die Prognose schlecht und geht mit einer Zunahme der genomischen Komplexität einher. Der Anstieg der Komplexität zeigt bei der Analyse einer erweiterten Kohorte eine statistische Signifikanz. Zudem konnte bei BL in allen Fällen eine lineare evolutionäre Entwicklung nachgewiesen werden.

### 5.2.3. Die $t(8;14)/MYC-IGH$ oder $t(8;22)/MYC-IG\lambda$ positive reife B-Zell Neoplasien zeigen eine hohe karyotypische Heterogenität bei Diagnose

Zu den GZL gehören die DH-Lymphome, bei denen die Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  oder die Translokation  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  sowie die Translokation  $t(14;18)/BCL2-IGH$  nachzuweisen ist. Bei den GZL kann die  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  und die  $t(2;8)(p11;q24)/MYC-IG\kappa$  im Gegensatz zu den BL häufiger festgestellt werden (Snuderl et al. 2010). Des Weiteren kann auch eine  $t(8;14)/MYC-IGH$  bei andere Lymphomentitäten, wie CLL, auftreten. In dieser Arbeit konnten zwei der oben beschriebenen GZL und ein Fall einer CLL mit  $t(8;14)/MYC-IGH$  mit sequenziellen Proben untersucht werden. Bereits bei Diagnose der GZL konnten die beiden Translokationen  $t(8;14)/MYC-IGH$  bzw.  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  in jeweils einem Fall und die  $t(14;18)/BCL2-IGH$  in beiden Fällen nachgewiesen werden. Bei der CLL ist die  $t(8;14)/MYC-IGH$  Translokation sehr selten (Nelson et al. 2007).

Das GZL hat eine schlechte Prognose (Aukema et al. 2011), was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Die GZL Patienten zeigten Rezidive im ersten Jahr nach Diagnose. Die Prognose der Patienten mit CLL ist sehr variabel, chromosomale Aberrationen haben

---

dabei eine entscheidende Rolle (Puiggros et al. 2014). Die progressionsfreie Zeit von der Diagnose bis zum Rezidiv der hier untersuchten CLL war mit 182 Wochen lang. Klinische Daten der GZL und CLL Patienten waren nicht vorhanden, sodass darüber keine Aussagen gemacht werden konnten.

Beide Fälle der GZL waren bei Diagnose als komplex zu werten. In nur einem Fall konnte eine Zunahme der Aberrationen nachgewiesen werden. Die CLL war bei Diagnose mit drei Aberrationen ebenfalls als komplex zu werten. Die Anzahl der Aberrationen nahm zum Rezidiv zu. Ein komplexer Karyotyp wird mit einer schlechten Prognose assoziiert, dennoch zeigte der CLL Fall ein langes progressionsfreies Intervall (Puiggros et al. 2014).

Die erwähnten Translokationen bei den GZL wurden bei Diagnose nachgewiesen, somit kann keine Aussage darüber gemacht werden, welche Translokation zuerst aufgetreten ist. Es könnte auch sein, dass beide Translokationen gleichzeitig aufgetreten sind. Da bei einigen Fällen von FL ein DH oder sogar ein Tripple-Hit nachgewiesen wurde, wird diskutiert, ob sich GZL aus FL mit einer  $t(14;18)/IGH-BCL2$  zu der zusätzlich eine  $MYC$ -Translokation hinzugekommen ist, entwickeln (Dürkop et al. 2011).

Bei der CLL deuten die erhobenen Daten daraufhin, dass die  $t(8;14)/MYC-IGH$  als sekundäre Aberration hinzugekommen ist (siehe Kapitel 4.3.3). Es wird angenommen, dass die  $t(8;14)/MYC-IGH$  bei den CLL mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Cavazzini 2008, De Braekeleer et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit hatte der CLL-Patient ein langes progressionsfreies Intervall von 182 Wochen, sodass die schlechte Prognose nicht bestätigt werden konnte. Es sind weitere Studien dieser seltenen CLL Fälle nötig, um die Prognose der  $t(8;14)/MYC-IGH$  zu untersuchen. Es standen keine klinischen Daten des Patienten zur Verfügung, sodass darüber keine Aussagen gemacht werden können.

Aufgrund der Heterogenität der GZL ist eine Aussage über rekurrente sekundäre Translokationen schwierig. In einem Fall konnte eine  $-17/del(17p)$ , die bei vielen unterschiedlichen reifen B-Zell Neoplasien auftritt, identifiziert werden. In dem untersuchten CLL Fall konnte eine Deletion von 13q und 11q nachgewiesen werden. Diese Aberrationen wurden schon in anderen Studien als rekurrente Veränderungen beschrieben. Die  $del(13q)$  soll zusammen mit der rekurrenten Veränderung  $+12$  früh in der Entwicklung auftreten und eine gute Prognose haben (Döhner et al. 2000, Puiggros et al. 2014). Die häufigsten chromosomalen Veränderungen bei CLL sind zudem Deletionen in 6q, und 17p (Döhner et al. 2000, Puiggros et al. 2014). Bei der CLL werden bei der Identifikation der  $-17/del(17p)$  schon heute aggressivere Therapien eingesetzt (Puiggros et al. 2014). Die Deletion in 17p ( $TP53$ )

---

konnte in dem untersuchten Fall nicht identifiziert werden, was eventuell den besseren Verlauf der Erkrankung bei dem analysierten CLL Fall erklären könnte. Die rekurrenten sekundären Aberrationen der B-Zell-Neoplasien werden ausführlich in Kapitel 5.2.5 besprochen.

Obwohl wenige Fälle in diese Studie eingeschlossen werden konnten, zeigten die erhobenen Daten der beiden GZL und der CLL Hinweise auf eine lineare Entwicklung von Diagnose zum Rezidiv (siehe Kapitel 4.5).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass GZL und CLL mit einer  $t(8;14)/MYC-IGH$  eine große genetische Heterogenität bei Diagnose aufweisen. In dem vorliegenden Fall trat die Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$  als sekundäre Veränderung bei der CLL auf und es konnte keine wesentliche Verschlechterung der Prognose festgestellt werden. Bei den GZL Fällen konnte der Zeitpunkt des Auftretens der  $t(8;14)/MYC-IGH$  nicht festgestellt werden, wobei die Translokation bei beiden Patienten bei Diagnose bereits vorhanden war. Zudem konnten bei CLL und GZL Hinweise auf eine lineare Entwicklung von Diagnose zum Rezidiv gesehen werden.

#### **5.2.4. Zytogenetischer Vergleich reifer B-Zell Neoplasien und Identifikation der Kandidatengene**

Bei allen untersuchten reifen B-Zell Neoplasien konnten die Translokationen  $t(8;14)/MYC-IGH$ ,  $t(8;22)/MYC-IG\lambda$  oder  $t(11;14)/CCND1-IGH$  bestätigt werden. Es konnten in jedem Fall, spätestens im Rezidiv, sekundäre Aberrationen identifiziert werden. Im Folgenden werden die sekundären rekurrenten Veränderungen der B-Zell Neoplasien besprochen.

Die Entwicklung einer B-Zell Neoplasie ist ein mehrstufiger Prozess. Es kommt zu Ansammlungen von chromosomalen Aberrationen und Mutationen in Kandidatengenen, die den betroffenen Zellen einen Proliferationsvorteil verschaffen. Ausgehend von einer Ursprungszelle bis hin zum Rezidiv tragen genetische Veränderungen zur Entwicklung der Erkrankung bei. Es ist entscheidend die Kandidatengene und die Prognose der Aberrationen zu kennen, um risikoadaptierte Therapieregime einzusetzen.

Typisch für BL sind Duplikationen oder Zugewinne in 1q, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Lones et al. 2004). Die Kandidatengene auf Chromosom 1 konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Ein mögliches Gen ist das *MCLI*-Gen, das bei der Regulation der Apoptose beteiligt ist und durch die Duplikation überexprimiert wird (Lones et al. 2004, Onciu et al. 2006, Salaverria et al. 2008, Kim et al. 2013, Murga Penas et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte in einem GZL und einem BL Fall eine  $dup(1q)$  identifiziert

---

werden. Zudem konnte in jeweils einem Fall der BL eine Trisomie 1 und ein Zugewinn von 1q nachgewiesen werden

Als sekundäre rekurrente Veränderung bei MCL konnte eine Deletion in 1p identifiziert werden. Diese soll eine schlechte Prognose haben (Espinete et al. 2010). Bisher gibt es nur Vermutungen über die Kandidatengene, die deletiert sind. Es wird darüber diskutiert, dass die Gene *FAF1* und *CDKN2C* eine Rolle spielen (Bödör und Reiniger 2016). *FAF1* ist bei der Regulation der Apoptose beteiligt, *CDKN2C* spielt eine Rolle im Zellzyklus. In der hier vorliegenden Arbeit konnte die del(1p) in den MCL nachgewiesen werden.

In MCL, CLL und BL konnten Deletionen in 6q als rekurrente sekundäre Aberrationen identifiziert werden (Döhner et al. 2000, Lones et al. 2004, Onciu et al. 2006, Pérez-Galán et al. 2011, Cortelazzo et al. 2012, Murga Penas et al. 2014, Bödör und Reiniger 2016). Die Regionen variieren, sodass davon auszugehen ist, dass verschiedene Gene involviert sind. Es konnten noch keine Kandidatengene in der deletierten Region identifiziert werden, die bei allen Patienten vorkommen. Ein mögliches Gen in der Region (6)(q21–q22) ist das *PRDM1*-Gen, das ein Tumorsuppressorgen darstellt. Ein Gen in der Region (6)(q23) ist *TNFAIP3*, das für einen Tumornekrosefaktor kodiert (Onciu et al. 2006, Puiggros et al. 2014, Bödör und Reiniger 2016). Die del(6q) konnte in der vorliegenden Arbeit bei MCL und BL bestätigt werden. Bei der CLL war keine del(6q) zu identifizieren.

Als sekundäre rekurrente Veränderung ist bei MCL, CLL und BL eine del(11q) bekannt. Die Deletion soll eine schlechte Prognose haben (Döhner et al. 2000, Cortelazzo et al. 2012, Puiggros et al. 2014, Murga Penas et al. 2014, Bödör und Reiniger 2016). Die Deletion ist in der Region (11)(q22q23) lokalisiert. Dort befindet sich das *ATM*-Gen, ein Tumorsuppressorgen, bei MCL konnten häufige Deletionen des Gens festgestellt werden (Cortelazzo et al. 2012). In CLL Studien konnte die *ATM*-Deletion seltener nachgewiesen werden, sodass davon ausgegangen wird, dass auch andere Gene wie das *BIRC3*-Gen, das in dem Signalweg des NF- $\kappa$ B beteiligt ist, eine Rolle spielt (Puiggros et al. 2014, Bödör und Reiniger 2016). Das NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor und hat Bedeutung in der Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes (Li und Verma 2002, Sagaert et al. 2006). Die del(11)(q22) konnte in dieser Arbeit in MCL, CLL und BL nachgewiesen werden. Eine del(13)(q14) konnte bei BL, MCL und CLL als rekurrente sekundäre Aberration nachgewiesen werden und hat bei BL und MCL eine schlechte Prognose (Döhner et al. 2000, Lones et al. 2004, Onciu et al. 2006, Nelson et al. 2010, Cortelazzo et al. 2012, Murga Penas et al. 2014, Puiggros et al. 2014). Man vermutet, dass die Deletion des *RBI*-Gens, ein Tumorsuppressorgen, das in dieser Region lokalisiert ist, entscheidend ist (Bödör und Reiniger

---

2016). In der vorliegenden Arbeit konnte die del(13)(q14) bei jeweils einem Fall der MCL, BL und CLL identifizieren. Die Deletion von 13q tritt bei den CLL früh in der Entwicklung auf und hat eine günstige Prognose. Bei CLL ist oft nur das Gen *DLEU2* betroffen, das ein Tumorsuppressorgen ist. Bei einem Verlust von *RBI* ist die Prognose schlechter (Nelson et al. 2010, Puiggros et al. 2014).

Die Deletion des *TP53*-Gens (17p13), ein Tumorsuppressorgen, ist in mehreren B-Zell Neoplasien identifiziert worden und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Hernandez et al. 1996, Onciu et al. 2006, Salido et al. 2010, Cortelazzo et al. 2012, Amare et al. 2013, Bouska et al. 2014, Puiggros et al. 2014, Bödör und Reiniger 2016). Die Deletion des *TP53*-Gens konnte in der vorliegenden Arbeit bei den MCL, GZL und BL überwiegend in den Rezidiven nachgewiesen werden, übereinstimmend mit der schlechten Prognose.

### **5.2.5. Nachweis einer linearen evolutionären Entwicklung bei reifen B-Zell Neoplasien**

Bisher gibt es wenige Arbeiten, die sich mit der evolutionären Entwicklung reifer B-Zell Neoplasien an sequenziellen Proben beschäftigt haben. In den seltenen Publikationen konnten nur wenige Fälle, dieser an sich seltenen Lymphome, untersucht werden, bei denen chromosomales Material bei Diagnose und Rezidiv vorlag. (Schmitz et al. 2012, Beà 2013). In der vorliegenden Arbeit konnten jeweils 5 BL, 5 MCL, zwei GZL und eine CLL mittels zytologischer Methoden hinsichtlich der klonalen Evolution untersucht werden. Durch die Zytogenetik ist es möglich jede einzelne Zelle darzustellen und so ist die Untersuchung für Evolutionsstudien gut geeignet. Für die BL konnte der lineare Weg der Entwicklung zusammen mit der größeren Kohorte aus der Publikation Aukema, Theil et al. (2015) sicher festgestellt werden. Für die MCL deuten die Daten daraufhin, dass diese auch einem linearen Weg der Entwicklung folgen. Bei CLL und GZL gibt es Hinweise darauf, dass auch dort die Entwicklung linear verläuft. Somit unterscheiden sich die in dieser Arbeit untersuchten B-Zell Neoplasien von den FL, bei denen es zwei Wege der klonalen Entwicklung gibt, einen linearen Weg und einen parallelen Weg von einer Progenitorzelle (Berglund et al. 2006, Green et al. 2013, Pasqualucci et al. 2014). Allerdings sollten diese Daten, insbesondere bei MCL, GZL und CLL bestätigt werden.

### **5.3. Fazit**

In der vorliegenden Arbeit konnten jeweils fünf BL, fünf MCL, zwei GZL und eine CLL untersucht werden. Bei den untersuchten reifen B-Zell Neoplasien, BL, MCL, GZL und CLL, konnten sekundäre chromosomale Aberrationen identifiziert werden sowie der Weg der



---

evolutionären Entwicklung aufgeklärt werden. Dies gelang im Wesentlichen durch Anwendung zytogenetischer und molekularzytogenetischer Techniken an sequenziellen Proben von Patienten mit reifen B-Zell Neoplasien. Die Identifikation der sekundären Veränderungen und die Aufklärung der evolutionären Entwicklung soll zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen bei reifen B-Zell Neoplasien beitragen. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen bei Patienten eine risikoadaptierte Therapie einleiten zu können.

Die analysierten reifen B-Zell Neoplasien konnten in Hinblick auf die rekurrenten sekundären Veränderungen verglichen werden. Es konnten bei den untersuchten reifen B-Zell Neoplasien dieselben rekurrenten sekundär auftretenden Aberrationen gefunden werden. Dies waren die del(6q), del(11q), del(13q), und die -17/del(17p).

Bei der Komplexität konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen reifen B-Zell Neoplasien festgestellt werden. Bei den fünf eingeschlossenen BL Fällen konnte bei Diagnose eine geringe genomische Komplexität und in keinem Fall ein komplexer Karyotyp festgestellt werden, bei den Rezidiven waren alle Fälle komplex und die Aberrationen nahmen in jedem Fall zu. Bei den MCL konnten bei Diagnose schon in drei der fünf Fälle ein komplexer Karyotyp und eine große Anzahl von Aberrationen nachgewiesen werden. Beim 2. Rezidiv waren alle Fälle als komplex zu werten. In vier der fünf MCL Fälle konnte eine Zunahme der Aberrationen nachgewiesen werden. Die reifen B-Zell Neoplasien GZL und CLL mit Nachweis der t(8;14)MYC-IGH oder deren Varianten sind selten, es konnten trotzdem eine CLL und zwei GZL untersucht werden. Bei Diagnose waren die CLL und die GZL schon als komplex zu werten und hatten eine große genomische Heterogenität. In dem CLL Fall und einem GZL Fall konnte eine Zunahme der Aberrationen nachgewiesen werden.

Es konnte bei BL eine lineare evolutionäre Entwicklung sicher festgestellt werden. Bei MCL konnte ebenfalls ein linearer Weg der Entwicklung von Diagnose zu Rezidiv nachgewiesen werden. Bei CLL und GZL gibt es Hinweise darauf, dass die genetische Entwicklung ebenfalls linear verläuft.

Damit wurden alle eingangs formulierten Ziele der Arbeit erreicht.

#### **5.4. Ausblick**

Insgesamt wurden hier 13 reife B-Zell Neoplasien auf primäre und sekundäre genetische Veränderungen mittels zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden untersucht. Es konnten mehrere sekundäre Veränderungen, die rekurrent aufgetreten sind und der Weg der evolutionären Entwicklung bei den untersuchten reifen B-Zell Neoplasien dargestellt

---

werden. Allerdings werden weitere Studien an größeren Kohorten dieser seltenen Lymphome nötig sein, um die evolutionäre Entwicklung genauer verstehen zu können. Es ist davon auszugehen, dass die evolutionäre Entwicklung der reifen B-Zell Neoplasien weiterhin Gegenstand intensiver Forschung sein wird. Dabei wird die Kombination von etablierten Methoden (Zytogenetik/Molekularzytogenetik) und neueren Methoden (Hochdurchsatzsequenzierung) zum Nachweis chromosomaler Aberrationen sowie zur Identifikation von Kandidatengenen unser Wissen über die pathogenetischen Grundlagen und die Tumorgenese von Neoplasien deutlich erweitern können.

Die deutschlandweite Erfassung von Patientendaten wird derzeit ausschließlich für Kinder vorgenommen, für Erwachsene bestehen nur einzelne regionale Register. Die Zusammenführung und Erweiterung der Daten in einer gemeinsamen Datenbank könnte wesentlich zu einer genaueren Aufklärung der reifen B-Zell Neoplasien beitragen und schließlich gezielte Therapien und deren Optimierung ermöglichen. In Zukunft sollte es dadurch möglich sein risikoadaptierte Therapien für die Patienten durchzuführen.

Zusammenfassend können auf der Basis der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse durch weitere Studien Fortschritte in der Diagnostik und Therapie von reifen B-Zell Neoplasien erzielt werden.

---

## 6. Zusammenfassung

Burkitt-Lymphome, Mantelzell-Lymphome, chronisch lymphatische Leukämien und Grauzonen-Lymphome gehören zu den reifen B-Zell Neoplasien. Wie alle malignen Erkrankungen entwickeln sich lymphatische Neoplasien auf der Basis genetischer Veränderungen. Zytogenetische Studien zur klonalen Evolution reifer B-Zell Neoplasien, in denen Material desselben Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden konnte, sind selten. Das liegt zum Teil an der niedrigen Inzidenz dieser Lymphomentitäten und an der Seltenheit von sequenziellen Proben von Diagnose und Rezidiv bzw. Progress. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation sekundärer genetischer Veränderungen, um den Weg der evolutionären Entwicklung identifizieren zu können. Es wurden jeweils fünf Patienten mit einem Burkitt-Lymphom und einem Mantelzell-Lymphom, ein Patient mit einer chronisch lymphatischen Leukämie und zwei Patienten mit einem Grauzonen-Lymphom, von denen wir mindestens zwei Einsendungen erhielten, eingeschlossen. Es wurden bei den Fällen zytogenetische und molekularzytogenetische Untersuchungen mittels der Chromosomen-Bänderungsanalyse und der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung durchgeführt.

Bei den aggressiven Mantelzell-Lymphomen konnte die typische  $t(11;14)(q13;q32)/CCND1-IGH$  Translokation nachgewiesen werden. Drei der fünf Mantelzell-Lymphome waren schon bei Diagnose als komplex zu werten und hatten eine hohe Anzahl an Aberrationen. In dieser Arbeit konnten die Deletionen  $del(1p)$ ,  $del(6q)$ ,  $del(11q)$  und  $-17/del(17p)$  sowie ein 8q-Zugewinn als rekurrente sekundäre Aberrationen nachgewiesen werden. Die erhobenen Daten ermöglichten für die Mantelzell-Lymphome einen linearen Weg der evolutionären Entwicklung nachzuweisen.

Bei den sequenziellen Proben der Burkitt-Lymphome, die in dieser Arbeit untersucht werden konnten, wurde die typische  $t(8;14)(q24;q32)/MYC-IGH$  Translokation oder ihre Variante die  $t(8;22)(q24;q11)/MYC-IG\lambda$  bei allen eingeschlossenen Fällen nachgewiesen. Burkitt-Lymphome sind gut behandelbar, haben eine geringe genetische Komplexität und zeigen selten Rezidive. Die geringe genetische Komplexität bei Diagnose konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die aus der Literatur für die Burkitt-Lymphome bekannten sekundären Veränderungen, Deletionen  $del(6q)$ ,  $del(11q)$ ,  $del(13q)$  und  $-17/del(17p)$  sowie 1q-Zugewinne, konnten bei den Rezidiven der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Weiterhin deuten die erhobenen Daten auf einen linearen Weg der evolutionären Entwicklung hin. Darüber hinaus konnte die Analyse der erhobenen Daten mit den zytogenetischen Daten weiterer 20 Burkitt-Lymphome, zum Teil aus öffentlichen zytogenetischen Datenbanken

---

erweitert werden. Die Untersuchungen bestätigten die lineare klonale Evolution als Weg der zytogenetischen Entwicklung bei den Burkitt-Lymphomen.

Die für die Burkitt-Lymphome charakteristische  $t(8;14)/MYC-IGH$  kann auch bei anderen Lymphomentitäten auftreten. Grauzonen-Lymphome sind hoch-aggressive Lymphome mit intermediären Merkmalen zwischen einem diffus großzelligem Lymphom und einem Burkitt-Lymphom und können die Translokationen  $t(8;14)/MYC-IGH$  und die  $t(14;18)(q32;q21)/IGH-BCL2$  gleichzeitig aufweisen. In beiden Grauzonen-Lymphomen wurden beide genannten Translokationen nachgewiesen. Beide Fälle zeigten eine hohe zytogenetische Heterogenität bereits bei der Diagnose und daher war eine Aussage über rekurrente sekundäre Translokationen nicht möglich. Zudem konnte ein Fall einer chronisch lymphatische Leukämie mit den für diese Erkrankung typischen Deletionen  $del(13q)$  und  $del(11q)$  und einer Translokation  $t(8;14)/MYC-IGH$ , trotz ihrer Seltenheit, untersucht werden. Die kleine Anzahl der hier untersuchten  $t(8;14)/MYC-IGH$ -positiven Lymphome erlaubt keine definitiven Aussagen zur evolutionären Entwicklung, trotzdem gibt es ebenfalls Hinweise auf eine lineare klonale Evolution.

Zusammenfassend konnten in der hier verfassten Arbeit neue Einblicke in die evolutionäre Entwicklung von reifen B-Zell Neoplasien gewonnen werden. Die erhobenen Daten führten zur Identifikation von sekundären genetischen Veränderungen und zur Identifikation der evolutionären Entwicklung reifer B-Zell Neoplasien. Es konnten auch gemeinsame rekurrent auftretende Aberrationen bei allen untersuchten reifen B-Zell Neoplasien, die Deletionen  $del(6q)$ ,  $del(11q)$ ,  $del(13q)$ , und  $-17/del(17p)$ , gefunden werden. Somit bietet die vorliegende Arbeit Ansatzpunkte für weitere Studien, um die Diagnostik zu verbessern und um in Zukunft gezielte Risiko-adaptierte Therapien entwickeln zu können.

---

## 7. Literaturverzeichnis

Albright, F., Teerlink, C., Werner, T.L. & Cannon-Albright, L.A. (2012): Significant evidence for a heritable contribution to cancer predisposition: a review of cancer familiarity by site. *BMC cancer* 12, 138.

Amare, P.S., Gadage, V., Jain, H., Nikalje, S., Manju, S., Mittal, N., Gujral, S., Nair, R. (2013): Clinico-pathological impact of cytogenetic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia: experience from India. *Indian J Cancer* 50, 261–267.

Atra, A., Gerrard, M., Hobson, R., Imeson, J.D., Hann, I.M. & Pinkerton, C.R. (2001): Outcome of relapsed or refractory childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma treated with the UKCCSG 9003/9002 protocols. *British journal of haematology* 112, 965–968.

Aukema, S.M., Siebert, R., Schuurin, E., van Imhoff, G.W, Kluin-Nelemans, H.C., Boerma, E. & Kluin, P.M. (2011): Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 117, 2319–2331.

Aukema, S.M., Kreuz, M., Kohler, C.W., Rosolowski, M., Hasenclever, D., Hummel, M., Küppers, R., Lenze, D., Ott, G., Pott, C., Richter, J., Rosenwald, A., Szczepanowski, M., Schwaenen, C., Stein, H., Trautmann, H., Wessendorf, S., Trümper, L., Loeffler, M., Spang, R., Kluin, P.M., Klapper, W. & Siebert, R. (2014): Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica* 99, 726–735.

Aukema, S.M., Theil, L., Rohde, M., Bauer, B., Bradtke, J., Burkhardt, B., Bonn, B.R., Claviez, A., Gattenlöhner, S., Makarova, O., Nagel, I., Oschlies, I., Pott, C., Szczepanowski, M., Traulsen, A., Kluin, P.M., Klapper, W., Siebert, R. & Murga Penas, E.M. (2015): Sequential karyotyping in Burkitt lymphoma reveals a linear clonal evolution with increase in karyotype complexity and a high frequency of recurrent secondary aberrations. *British journal of haematology* 170, 814–825.

Bastard C, Tilly H, Lenormand B, Bigorgne C, Boulet D, et al. (1992): Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 79, 2527–2531.

Beà, S., Valdés-Mas, R., Navarro, A., Salaverria, I., Martín-Garcia, D., Jares, P., Ginéa, E., Pinyola, M., Royoa, C., Nadeua, F., Condea, L., Juana, M., Clota, G., Vizánc, P., Di Croce, L., Puente, D.A., López-Guerra, M., Morosa, A., Rouea, G., Aymericha, M., Villamora, N., Colomo, L., Martínez, A., Valera, A., Martín-Subero, J.I., Amadora, V., Hernández, L., Rozmana, M., Enjuanes, A., Forcadad, P., Muntañolad, A., Hartmanne, E.M., Calasanz, M.J., Rosenwalde, A., Ott, G., Hernández-Rivash, J.M., Klapper, W., Siebert, R., Wiestner, A., Wilson, W.H., Colomo, D., López-Guillermo, A., López-Otin, C., Puente, X.S., & Campo, E. (2013): Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 18250–18255.

Berglund, M., Enblad, G., Thunberg, U., Amini, R., Sundström, C., Roos, G., Erlanson, M., Rosenquist, R., Larsson, C. & Lagercrantz, S. (2006): Genomic imbalances during transformation from follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc* 20, 63–75.

Binet, J.L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Pigué, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M.T., Monconduit, M., Belabbes, S. & Gremy F. (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48, 198–206.

- 
- Blum, K. A., Lozanski, G., Byrd, J.C. (2004): Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104, 3009–3020.
- Bödör, C., Reiniger, L. (2016): Catalog of genetic progression of human cancers: non Hodgkin lymphoma. *Cancer Metastasis Rev* 35, 109–127.
- Bodrug, S. E., Warner, B. J., Bath, M.L., Lindeman, G.J., Harris, A.W. & Adams, J.M. (1994): Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *The EMBO journal* 13, 2124–2130.
- Boerma, E.G., Siebert, R., Kluin, P.M. & Baudis, M. (2009): Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge. *Leukemia* 23, 225–234.
- Bosch, F., López-Guillermo, A., Campo, E., Ribera, J. M., Conde, E., Piris, M. A., Vallespi, T., Woessner, S. & Montserrat, E. (1998): Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 82, 567–575.
- Bouska, A., McKeithan, T.W., Deffenbacher, K.E., Lachel, C., Wright, G.W., Iqbal, J., Smith, L.M., Zhang, W., Kucuk, C., Rinaldi, A., Bertoni, F., Fitzgibbon, J., Fu, K., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Dave, B.J., Gascoyne, R.D., Rosenwald, A., Ott, G., Campo, E., Rimsza, L.M., Delabie, J., Jaffe, E.S., Braziel, R.M., Connors, J.M., Staudt, L.M., Chan, W.C. (2014): Genome-wide copy-number analyses reveal genomic abnormalities involved in transformation of follicular lymphoma. *Blood* 123, 1681–1690.
- Brady, G., MacArthur, G.J., Farrell, P.J. (2008): Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Postgrad Med J* 84, 372–377.
- Burkhardt, B., Oschlies, I., Klapper, W., Zimmermann, M., Woessmann, W., Meinhardt, A., Landmann, E., Attarbaschi, A., Niggli, F., Schrappe, M. & Reiter, A. (2011): Non-Hodgkin's lymphoma in adolescents: experiences in 378 adolescent NHL patients treated according to pediatric NHL-BFM protocols. *Leukemia* 25, 153–160.
- Burkitt, D. (1958): A sarcoma involving the jaws in African children. *The British journal of surgery* 46, 218–223.
- Campo, E.; Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H. & Jaffe, E.S. (2011): The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117, 5019–5032.
- Carbone, A. (2002): AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: from pathology and molecular pathogenesis to treatment. *Human pathology* 33, 392–404.
- Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C., Modest, E.J. (1970): Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 30, 215–227.
- Cavazzini, F., Hernandez, J.A., Gozzetti, A., Russo Rossi, A., De Angeli, C., Tiseo, R., Bardi, A., Tammiso, E., Crupi, R., Lenoci, M.P., Forconi, F., Lauria, F., Marasca, R., Maffei, R., Torelli, G., Gonzalez, M., Martin-Jimenez, P., Maria Hernandez, J., Rigolin, G.M., Cuneo, A. (2008): Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol* 142, 529–537
- Cortelazzo, S., Ponzoni, M., Ferreri, A.J.M., Dreyling, M. (2012): Mantle cell lymphoma. *Critical reviews in oncology/hematology* 82, 78–101.

---

Croce, C.M. (2008): Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358, 502–511.

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

Dave, S.S., Fu, K., Wright, G.W., Lam, L.T., Klun, P., Boerma, E.J., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Rosenwald, A., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Rimsza, L.M., Braziel, R.M., Grogan, T.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Dave, B.J., Sanger, W., Bast, M., Vose, J.M., Armitage, J.O., Connors, J.M., Smeland, E.B., Kvaloy, S., Holte, H., Fisher, R.I., Miller, T.P., Montserrat, E., Wilson, W.H., Bahl, M., Zhao, H., Yang, L., Powell, J., Simon, R., Chan, W.C., Staudt, L.M.; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project (2006): Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 354, 2431–2442.

De Braekeleer, M.D., Corine, T., Guéganic, N., Le Bris, M., Basinko, A., Morel, F., Douet-Guilbert, N. (2016): Immunoglobulin gene translocations in chronic lymphocytic leukemia: A report of 35 patients and review of the literature. *Molecular and clinical oncology* 4, 682–694

De Jong, D, Balagué Ponz, O. (2011): The molecular background of aggressive B cell lymphomas as a basis for targeted therapy. *J Pathol.* 223, 274–282.

Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M. & Lichter, P. (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 343, 1910–1916.

Dores, G.M., Anderson, W.F., Curtis, R.E., Landgren, O., Ostroumova, E., Bluhm, E.C., Rabkin, C.S., Devesa, S.S. & Linet, M.S. (2007): Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *British journal of haematology* 139, 809–819.

Dreyling, M. & Hiddemann, W. (2009): Current treatment standards and emerging strategies in mantle cell lymphoma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 542–551.

Dürkop, H., Foss, H.–D. & Stein, H. (2011): 2008–WHO–Klassifikation der malignen Lymphome im Jahr 2011. *Der Onkologe*, 9 769–788.

Dyer, M.J. & Siebert, R (2009): Chromosomal and molecular alterations in lymphoid malignancies: basic principles and detection methods. *The Lymphoid Neoplasms 3rd Edition*, I. Margrath, Editor. 2009 Oxford University Press.

Espinete, B., Salaverria, I., Beà, S., Ruiz-Xivillé, N., Balagué, O., Salido, M., Costa, D., Carreras, J., Rodríguez-Vicente, A.E., Luís García, J., Hernández-Rivas, J.M., Calasanz, M.J., Siebert, R., Ferrer, A., Salar, A., Carrió, A., Polo, N., García-Marco, J.A., Domingo, A., González-Barca, E., Romagosa, V., Marugán, I., López-Guillermo, A., Millá, F., Luís Mate, J., Luño, E., Sanzo, C., Collado, R., Oliver, I., Monzó, S., Palacín, A., González, T., Sant, F., Salinas, R., Ardanaz, M.T., Font, L., Escoda, L., Florensa, L., Serrano, S., Campo, E. & Solé F. (2010): Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer* 49, 439–451.

Fisher, R. I. (1996) Mantle-cell lymphoma: classification and therapeutic implications. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 7, Suppl 6, 35–39.  
Fu, K., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C, Dave, S., Wright, G., Rosenwald, A., Chiorazzi, M., Iqbal, J., Gesk, S., Siebert, R., De Jong, D., Jaffe, E.S., Wilson, W.H., Delabie, J., Ott, G., Dave, B.J., Sanger, W.G., Smith, L.M., Rimsza, L., Braziel, R.M., Müller-Hermelink, H.K., Campo, E., Gascoyne, R.D., Staudt, L.M., and Chan, W.C., for the Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling

---

Project (2005): Cyclin D1–negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 106, 4315–4321.

Green, M.R., Gentles, A.J., Nair, R.V., Irish, J.M., Kihira, S., Liu, C.L., Kela, I., Hopmans, E.S., Myklebust, J.H., Ji, H., Plevritis, S.K., Levy, R. & Alizadeh, A.A. (2013): Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood* 121, 1604–1611.

Haferlach, T., Bacher, U., Kern, W., Schnittger, S., Haferlach, C. (2007): Neue Erkenntnisse in der Diagnostik chronischer myeloproliferativer Syndrome: Die therapeutische Relevanz steigt. *Medizinische Klinik* 102, 770–777.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf–Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C., Grogan, T.M., Isaacson, P.G., Knowles, D.M., Mason, D.Y., Muller–Hermelink, H.K., Pileri, S.A., Piris, M.A., Ralfkiaer, E., Warnke, R.A. (1994): A revised European–American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1, 1361–1392.

Hernandez, L., Fest, T., Cazorla, M., Teruya–Feldstein, J., Bosch, F., Peinado, M.A., Piris, M.A., Montserrat, E., Cardesa, A., Jaffe, E.S., Campo, E., Raffeld, M. (1996): p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 87, 3351–3359.

Hiller, B., Bradtke, J., Balz, H., Rieder, H. (2005): CyDAS: A cytogenetic data analysis system. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, 1282–1283.

Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., van Hoof, A., Kluijn–Nelemans, H.C., Reiser, M., Metzner, B., Einsele, H., Peter, N., Jung, W., Wörmann, B., Ludwig, W.D., Dührsen, U., Eimermacher, H., Wandt, H., Hasford, J., Hiddemann, W., Unterhalt, M.; German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG); European Mantle Cell Lymphoma Network (2008): A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced–stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111, 558–565.

Hummel, M., Bentink, S., Berger, H., Klapper, W., Wessendorf, S., Barth, T.F., Bernd, H.W., Cogliatti, S.B., Dierlamm, J., Feller, A.C., Hansmann, M.L., Haralambieva, E., Harder, L., Hasenclever, D., Kuhn, M., Lenze, D., Lichter, P., Martin–Subero, J.I., Moller, P., Muller–Hermelink, H.K., Ott, G., Parwaresch, R.M., Pott, C., Rosenwald, A., Rosolowski, M., Schwaenen, C., Sturzenhovecker, B., Szczepanowski, M., Trautmann, H., Wacker, H.H., Spang, R., Loeffler, M., Trumper, L., Stein, H. & Siebert, R. (2006): A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *The New England journal of medicine* 354, 2419–2430.

Jaffe, E.S. (2001): Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, Oxford: IARC Press; Oxford University Press (Hrsg.) (World Health Organisation classification of tumors).

Jaffe E.S. (2009): The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009, 523–531.

Jäger, U., Böcskő, S., Le, T., Mitterbauer, G., Bolz, I., Chott, A., Kneba, M., Mannhalter, C., Nadel, B. (2000): Follicular lymphomas BCL–2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood* 95, 3520–3529.

Jares, P. & Campo, E. (2008): Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *British journal of haematology* 142, 149–165.



- 
- Jares, P., Colomer, D., Campo, E. (2012): Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *The Journal of clinical investigation* 122, 3416–3423.
- Jiang, Y., Redmond, D., Nie, K., Eng, K.W., Clozel, T., Martin, P., Tan, L., Melnick, A.M., Tam, W. & Elemento, O. (2014): Deep sequencing reveals clonal evolution patterns and mutation events associated with relapse in B–cell lymphomas. *Genome biology* 15, 432.
- Johansson, B., Mertens, F., Mitelman, F. (1995): Cytogenetic evolution patterns in non–Hodgkin's lymphoma. *Blood* 86, 3905–3914.
- Johansson, B., F. Mertens, & Mitelman, F. (1996): Primary vs. secondary neoplasia–associated chromosomal abnormalities—balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 16, 155–163.
- Jung D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., Alt, F.W. (2006): Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 24, 541–570.
- Katzenberger, T., Kienle, D., Stilgenbauer, S., Höller, S., Schilling, C., Mäder, U., Puppe, B., Petzoldt, C., Sander, S., Bullinger, L., Stöcklein, H., Kalla, J., Hartmann, E., Adam, P., Ott, M.M., Müller–Hermelink, H.K., Rosenwald, A., Ott, G. (2008): Delineation of distinct tumour profiles in mantle cell lymphoma by detailed cytogenetic, interphase genetic and morphological analysis. *British journal of haematology* 142, 538–550.
- Kim, S., Kim, H., Kang, H., Kim, J., Eom, H., Kim, T., Yoon, S.S., Suh, C., Lee, D., Korean Society of Hematology Lymphoma Working Party (2013): Clinical significance of cytogenetic aberrations in bone marrow of patients with diffuse large B–cell lymphoma: prognostic significance and relevance to histologic involvement. *J Hematol Oncol.* 6, 76.
- Klapproth, K., Wirth, T. (2010): Advances in the understanding of MYC–induced lymphomagenesis. *British journal of haematology* 149, 484–497.
- Klein, U., Dalla–Favera, R. (2008): Germinal centres: role in B–cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8, 22–33.
- Küppers R (2005): Mechanisms of B–cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 251–262.
- Landau, D.A., Carter, S.L., Getz, G., Wu, C.J. (2014): Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia* 28, 34–43.
- Li, Q., Verma, I.M. (2002): NF– $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nature Rev Immunol* 2, 725–734.
- Lones, M.A., Sanger, W.G., Le Beau, M.M., Heerema, N.A., Spoto, R., Perkins, S.L., Buckley, J., Kadin, M.E., Kjeldsberg, C.R., Meadows, A., Siegel, S., Finlay, J., Bergeron, S., Cairo, M.S. & Children's Cancer Group Study CCG–E08 (2004): Chromosome abnormalities may correlate with prognosis in Burkitt/Burkitt–like lymphomas of children and adolescents: a report from Children's Cancer Group Study CCG–E08. *Journal of pediatric hematology/oncology* 26, 169–178.
- Lovec, H., Sewing, A., Lucibello, F.C., Müller, R. & Möröy, T. (1994): Oncogenic activity of cyclin D1 revealed through cooperation with Ha–ras: link between cell cycle control and malignant transformation. *Oncogene* 9, 323–326.
- Manolov, G. & Manolova, Y. (1972): Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. *Nature* 237, 33–34.

---

Maurer, C. & Hallek, M. (2013): Chronische lymphatische Leukämie. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 138, 2153–2166.

Miles, Rodney R., Arnold, S. & Cairo, M.S. (2012): Risk factors and treatment of childhood and adolescent Burkitt lymphoma/leukaemia. *British journal of haematology* 156, 730–743.

Mitelman, F., Johansson, B. & Mertens, F. (2013) Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> (Zugegriffen 18.April 2013).

Moormann, A.M., Snider, C.J., Chelimo, K. (2011): The company malaria keeps: how co infection with Epstein–Barr virus leads to endemic Burkitt lymphoma. *Curr Opin Infect Dis.* 24, 435–441.

Moreno, C. & Montserrat, E. (2008): New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood reviews* 22, 211–219.

Murga Penas, E.M., Hinz, K., Röser, K., Copie–Bergman, C., Wlodarska, I., Marynen, P., Hagemeyer, A., Gaulard, P., Löning, T., Hossfeld, D.K., Dierlamm, J. (2003): Translocations t(11;18)(q21;q21) and t(14;18)(q32;q21) are the main chromosomal abnormalities involving MLT/MALT1 in MALT lymphomas. *Leukemia* 17, 2225–2229.

Murga Penas, E.M., Schilling, G., Behrmann, P., Klokow, M., Vettorazzi, E., Bokemeyer, C. & Dierlamm, J. (2014): Comprehensive cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of 44 Burkitt lymphoma cell lines: secondary chromosomal changes characterization, karyotypic evolution, and comparison with primary samples. *Genes, chromosomes & cancer* 53, 497–515.

Nelson, B.P., Gupta, R., Dewald, G.W., Paternoster, S.F., Rosen, S.T. & Peterson, L.C. (2007): Chronic lymphocytic leukemia FISH panel: impact on diagnosis. *American journal of clinical pathology* 128, 323–332.

Nelson, M., Perkins, S.L., Dave, B.J., Coccia, P.F., Bridge, J.A., Lyden, E.R., Heerema, N.A., Lones, M.A., Harrison, L., Cairo, M.S. & Sanger, W.G. (2010): An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence in situ hybridization and its impact on survival in children and adolescents with Burkitt lymphoma: results from the Children's Oncology Group study CCG–5961. *British journal of haematology* 148, 600–610.

Nguyen–Khac, F., Chapiro, E., Lesty, C., Grelier, A., Luquet, I., Radford–Weiss, I., Lefebvre, C., Fert–Ferrer, S., Callet–Bauchu, E., Lippert, E., Ragueneau, V., Michaux, L., Barin, C., Collonge–Rame, M.A., Mugneret, F., Eclache, V., Taviaux, S., Dastugue, N., Richebourg, S., Struski, S., Talmant, P., Baranger, L., Gachard, N., Gervais, C., Quilichini, B., Settegrana, C., Maloum, K., Davi, F., Merle–Béral, H. (2011): Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res.* 1, 13–21.

Nickenig, C., Dreyling, M., Hoster, E., Pfreundschuh, M., Trumper, L., Reiser, Wandt, H., Lengfelder, E., Unterhalt, M., Hiddemann, W. & German Low–Grade Lymphoma Study Group (2006): Combined cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and prednisone (CHOP) improves response rates but not survival and has lower hematologic toxicity compared with combined mitoxantrone, chlorambucil, and prednisone (MCP) in follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized trial of the German Low–Grade Lymphoma Study Group. *Cancer* 107, 1014–1022.

Nowell, P.C., Hungerford, D.A. (1962): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132,1497.

Onciu, M., Schlette, E., Zhou, Y., Raimondi, S.C., Giles, F.J., Kantarjian, H.M., Medeiros, L.J., Ribeiro, R.C., Pui, C. & Sandlund, J.T. (2006): Secondary chromosomal abnormalities predict outcome in pediatric and adult high–stage Burkitt lymphoma. *Cancer* 107, 1084–1092.

- 
- Oschlies, I., Salaverria, I., Mahn, F., Meinhardt, A., Zimmermann, M., Woessmann, Burkhardt, B., Gesk, S., Krams, M., Reiter, A., Siebert, R. & Klapper, W. (2010): Pediatric follicular lymphoma—a clinico–pathological study of a population–based series of patients treated within the Non–Hodgkin's Lymphoma–Berlin–Frankfurt–Munster (NHL–BFM) multicenter trials. *Haematologica* 95, 253–259.
- Parry–Jones, N., Matutes, E., Morilla, R., Brito–Babapulle, V., Wotherspoon, A., Swansbury, G.J. & Catovsky, D. (2007): Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH. *British journal of haematology* 137, 117–124.
- Pasqualucci, L., Khiabani, H., Fangazio, M., Vasishtha, M., Messina, M., Holmes, Ouillette, P., Trifonov, V., Rossi, D., Tabbò, F., Ponzoni, M., Chadburn, A., Murty, V., Bhagat, G., Gaidano, G., Inghirami, G., Malek, S., Rabadan, R. & Dalla–Favera, R. (2014): Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell reports* 6, 130–140.
- Pérez–Galán, P., Dreyling, M. & Wiestner, A. (2011): Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*, 117, 26–38.
- Perkins, A.S. & Friedberg, J.W. (2008): Burkitt lymphoma in adults. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program 2008*, 341–348.
- Perkins, A.S., Friedberg, J.W. (2008): Burkitt lymphoma in adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2008*, 341–348.
- Poirel, H.A., Cairo, M.S., Heerema, N.A., Swansbury, J., Auperin, A., Launay, E., Sanger, W.G., Talley, P., Perkins, S.L., Raphael, M., McCarthy, K., Sposto, R., Gerrard, M., Bernheim, A., Patte, C. & FAB/LMB 96 International Study Committee (2009): Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B–cell non–Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Leukemia* 23, 323–331.
- Puiggros, A., Blanco, G. & Espinet, B. (2014): Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed research international*, doi 10.1155/2014/435983.
- Raffeld, M. & Jaffe, E.S. (1991): bcl–1, t(11;14), and mantle cell–derived lymphomas. *Blood* 78, 259–263.
- Rimokh, R., Berger, F., Delsol, G., Charrin, C., Berthéas, M.F., Ffrench, M., Garoscio, M., Felman, P., Coiffier, B. & Bryon, P.A. (1993): Rearrangement and overexpression of the BCL–1/PRAD–1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)–bearing leukemias. *Blood* 81, 3063–3067.
- Robert Koch–Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V (Hrsg.) (2013): *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe. Berlin, Deutschland: Robert Koch–Institut.
- Rochford, R., Moormann, A.M. (2015): Burkitt's Lymphoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 390, 267–285.
- Rosenwald, A. & Ott, G. (2008): Burkitt lymphoma versus diffuse large B–cell lymphoma. *Annals of oncology. Official journal of the European Society for Medical Oncology* 19, 67–69.
- Rossi, D., Khiabani, H., Spina, V., Ciardullo, C., Brusca, A., Famà, R., Rasi, S., Monti, S., Deambrogi, C., De Paoli, L., Wang, J., Gattei, V., Guarini, A., Fo\_a, R., Rabadan, R. & Gaidano, G (2014): Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 123, 2139–2147.

- 
- Rowley, J.D. (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243,290–293.
- Sagaert, X., Laurent, M., Baens, M., Wlodarska, I., De Wolf–Peeters, C. (2006): MALT1 and BCL10 aberrations in MALT lymphomas and their effect on the expression of BCL10 in the tumour cells. *Modern Pathology* 19, 225–232.
- Salaverria, I., Espinet, B., Carrió, A., Costa, D., Astier, L., Slotta–Huspenina, J., Quintanilla–Martinez, L., Fend, F., Solé, F., Colomer, D., Serrano, S., Miró, R., Beà, S., Campo, E. (2008): Multiple recurrent chromosomal breakpoints in mantle cell lymphoma revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques. *Genes, chromosomes & cancer* 47, 1086–1097.
- Salido, M., Baró, C., Oscier, D., Stamatopoulos, K., Dierlamm, J., Matutes, E., Traverse–Glehen, A., Berger, F., Felman, P., Thieblemont, C., Gesk, S., Athanasiadou, A., Davis, Z., Gardiner, A., Milla, F., Ferrer, A., Mollejo, M., Calasanz, M.J., Florensa, L., Espinet, B., Luño, E., Wlodarska, I., Verhoef, G., García–Granero, M., Salar, A., Papadaki, T., Serrano, S., Piris, M.A., Solé, F. (2010) Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B–cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B–Cell Lymphoma Group. *Blood* 116, 1479–1478.
- Samaha, H., Dumontet, C., Ketterer, N., Moullet, I., Thieblemont, C., Bouafia, F., Callet–Bauchu, E., Felman, P., Berger, F., Salles, G. & Coiffier, B. (1998): Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia* 12, 1281–1287.
- Sander, S., Bullinger, L., Leupolt, E., Benner, A., Kienle, D., Katzenberger, T., Kalla, J., Ott, G., Müller–Hermelink, H.K., Barth, T.F., Möller, P., Lichter, P., Döhner, H. & Stilgenbauer, S. (2008): Genomic aberrations in mantle cell lymphoma detected by interphase fluorescence in situ hybridization. Incidence and clinicopathological correlations. *Haematologica* 93, 680–687.
- Sarkozy, C., Terré, C., Jardin, F., Radford, I., Roche–Lestienne, C., Penther, D., Bastard, C., Rigau, S., Pilorge, S., Morschhauser, F., Bouscary, D., Delarue, R., Farhat, H., Rousselot, P., Hermine, O., Tilly, H., Chevret, S. & Castaigne, S. (2014): Complex karyotype in mantle cell lymphoma is a strong prognostic factor for the time to treatment and overall survival, independent of the MCL international prognostic index. *Genes, chromosomes & cancer* 53, 106–116.
- Schliemann, I., Oschlies, I., Nagel, I., Murga Penas, E.M., Siebert, R., Sander, B. (2016): The t(11;14)(q13;q32)/CCND1–IGH translocation is a recurrent secondary genetic aberration in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 25, 1–5.
- Schmitz, R., Young, R M., Ceribelli, M., Jhavar, S., Xiao, W., Zhang, M., Wright, G., Shaffer, A.L., Hodson, D.J., Buras, E., Liu, X., Powell, J., Yang, Y., Xu, W., Zhao, H., Kohlhammer, H., Rosenwald, A., Kluin, P., Muller–Hermelink, H.K., Ott, G., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Delabie, J., Smeland, E.B., Olgwang, M.D., Reynolds, S.J., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Tubbs, R.R., Cook, J.R., Weisenburger, D.D., Chan, W.C., Pittaluga, S., Wilson, W., Waldmann, T.A., Rowe, M., Mbulaiteye, S.M., Rickinson, A.B. & Staudt, L.M. (2012): Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490, 116–120.
- Seigmiller, A.C., Garcia, R., Huang, R., Maleki, A., Karandikar, N.J. & Chen, W. (2010): Simple karyotype and bcl–6 expression predict a diagnosis of Burkitt lymphoma and better survival in IG–MYC rearranged high–grade B–cell lymphomas. *Modern Pathology*, 23, 909–920.
- Seto, M. (2013) Malignant lymphoma as a consequence of clonal evolution. *Hematological oncology* 31, 84–88.
- Shaffer, L.G., McGowan–Jordan, J. & Schmid, M. (2013): ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel, Switzerland.

---

Sherr, C.J. (2004): Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235–246.

Shiramizu, B., Barriga, F., Neequaye, J., Jafri, A., Dalla-Favera, R., Neri, A., Gutierrez, M., Levine, P. & Magrath I. (1991) Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein–Barr virus association. *Blood* 77, 1516–1526.

Slager, S.L., Caporaso, N.E., Sanjose, S. & Goldin, L.R. (2013): Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in hematology* 50, 296–302.

Snuderl, M., Kolman, O.K., Chen, Y.B., Hsu, J.J., Ackerman, A.M., Dal Cin, P., Ferry, J.A., Harris, N.L., Hasserrjian, R.P., Zukerberg, L.R., Abramson, J.S., Hochberg, E.P., Lee, H., Lee, A.I., Toomey, C.E., Sohani, A.R. (2010): B–cell lymphomas with concurrent IGH–BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B–cell lymphoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 34, 327–340.

Streubel, B., Lamprecht, A., Dierlamm, J., Cerroni, L., Stolte, M., Ott, G., Raderer, M., Chott, A. (2003): T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 101, 2335–2339.

Sun, T., Nordberg, M.L., Cotelingam, J.D., Veillon, D.M. & Ryder, J. (2003): Fluorescence in situ hybridization: method of choice for a definitive diagnosis of mantle cell lymphoma. *American journal of hematology* 74, 78–84.

Swerdlow, A.J. (2003): Epidemiology of Hodgkin's disease and non–Hodgkin's lymphoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 30, 3–12.

Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. (2008): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed 4th). Lyon, France: IARC Press.

Tam, C.S., Bassett, R.; Ledesma, C., Korbling, M., Alousi, A., Hosing, C., Kebraei, P., Harrell, R., Rondon, G., Giralt, S.A., Anderlini, P., Popat, U., Pro, B., Samuels, B., Hagemester, F., Medeiros, L.J., Champlin, R.E. & Khouri, I.F. (2009): Mature results of the M. D. Anderson Cancer Center risk–adapted transplantation strategy in mantle cell lymphoma. *Blood* 113, 4144–4152.

Tam, C.S. & Seymour, J.F. (2014): A new prognostic score for CLL. *Blood* 124, 1–2.

Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., Leder, P. (1982): Translocation of the c–myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 783–7841.

Tiemann, M., Schrader, C., Klapper, W., Dreyling, M.H., Campo, E., Norton, A., Berger, F., Kluin, P., Ott, G., Pileri, S., Pedrinis, E., Feller, A.C., Merz, H., Janssen, D., Hansmann, M.L., Krieken, H., Möller, P., Stein, H., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Parwaresch, R. & European MCL Network (2005): Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *British journal of haematology* 131, 29–38.

Vaandrager, J.W.; Schuurin, E., Zwikstra, E., de Boer, C.J., Kleiverda, K.K., van Krieken, J.H., Kluin–Nelemans, H.C., van Ommen, G.J., Raap, A.K. & Kluin PM. (1996): Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 88, 1177–1182.

---

Van Den Berghe, H., Parloir, C., David, G., Michaux, J.L., Sokal, G. (1979): A new characteristic karyotypic anomaly in lymphoproliferative disorders. *Cancer* 44, 188–195.

Ward, E., DeSantis, C., Robbins, A., Kohler, B., Jemal, A. (2014): Childhood and adolescent cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 64, 83–103.

Willis, T.G., Jadayel, D.M., Du, M.Q., Peng, H., Perry, A.R., Abdul–Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarska, I., Pan, L., Crook, T., Hamoudi, R., Isaacson, P.G., Dyer, M.J. (1999): Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96, 35–45.

Willis, T.G., Dyer, M.J. (2000): The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B–cell malignancies. *Blood* 96, 808–822.

Woessmann, W. (2013): XI. How to treat children and adolescents with relapsed non–Hodgkin lymphoma? *Hematological oncology* 31, 64–68.

Wright DH (1967): The epidemiology of Burkitt’s tumor. *Cancer Res* 27, 2424–2438.

Young L.S., Murray P.G. (2003): Epstein–Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22, 5108–5121.

Zech, L., Haglund, U., Nilsson, K. & Klein, G. (1976): Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid–cell lines from patients with Burkitt and non–Burkitt lymphomas. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 17, 47–56.

Zhang, Q., Siebert, R., Yan, M., Hinzmann, B., Cui, X., Xue, L., Rakestraw, K.M., Naeve, C.W., Beckmann, G., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Nowotny, H., Vesely, M., Callet–Bauch, E., Salles, G., Dixit, V.M., Rosenthal, A., Schlegelberger, B., Morris, S.W. (1999): Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain–containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* 22, 63–68.

---

## 8. Danksagung

Bei PD Dr. rer. nat. Eva Maria Murga Penas möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Ich danke an dem Interesse an meiner Arbeit und für das kritische Korrekturlesen meiner Niederschrift. Zudem bedanke ich mich für die große Hilfe bei der Auswertung der Chromosomen sowie beim Schreiben der Karyotypen und dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Zudem bedanke ich bei der Unterstützung bei unserer Veröffentlichung.

Ich bedanke mich bei dem Koreferenten

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med Reiner Siebert für das interessante Dissertationsthema und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Sietse Aukema, der mich bei meiner Arbeit sehr gut unterstützte und motivierte, mir bei Fragen zur Seite stand und mir bei der statistischen Auswertung half. Zudem bedanke ich mich für die Verfassung unserer Veröffentlichung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. W. Klapper für die erneute Durchsicht der pathologischen Präparate bedanken.

Für die große Hilfsbereitschaft im Labor, beim experimentellen Arbeiten, bei der Auswertung der FISH-Befunde und bei der Auswertung der Chromosomen möchte ich mich bei Dorit Schuster, Reina Zühlke-Jenisch, Simone Hartmann, Annekatriin Borowski und dem ganzen Laborteam ganz herzlich bedanken.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, meinen Freunden und meinen Geschwistern, die mich immer wieder motiviert und aufgebaut haben. Zudem gilt mein Dank meinem Freund Christian und meiner Schwester Kathrin, die mich oft genug aufmuntern mussten und auch an schlechten Tagen motivierend zur Seite standen.

---

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Laura Theil  
Adresse: Kiefernweg 3, 21789 Wingst  
Telefon: 0176/97620049  
E-mail-Adresse: Laura.Theil@gmx.de  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Geburtsdaten: 10.01.1988 in Stade

### Schulische Ausbildung/Studium

1994 – 1998 Grundschule Cadenberge  
1998 – 2000 Orientierungsstufe Cadenberge  
2000 – 2007 Gymnasium Otterndorf mit Abschluss Abitur mit der Endnote 1,6  
2007 – 2014 Studium der Humanmedizin an der CAU Kiel  
06/14 Abschluss des Studiums

### Arbeit

10/14–03/15 Assistenzärztin in der Inneren Medizin im Elbe Klinikum Stade  
Seit 04/15 Assistenzärztin in der Aneos Klinik am Bürgerpark Bremerhaven/ Kinderklinik

### Nebentätigkeiten

2009–2010 Studienassistentin bei pro scientia med in Kiel  
2011–2013 Empfangsdame an der Uniklinik Kiel

### Veröffentlichungen

Aukema, S.M., Theil, L., Rohde, M., Bauer, B., Bradtke, J., Burkhardt, B., Bonn, B.R., Claviez, A., Gattenlöhner, S., Makarova, O., Nagel, I., Oschlies, I., Pott, C., Szczepanowski, M., Traulsen, A., Kluin, P.M., Klapper, W., Siebert, R. & Murga Penas, E.M. (2015): Sequential karyotyping in Burkitt lymphoma reveals a linear clonal evolution with increase in karyotype complexity and a high frequency of recurrent secondary aberrations. British journal of haematology 170, 814–825.



---

## 10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegt. Teilergebnisse der Arbeit wurden bereits publiziert (siehe Kapitel 9).

Kiel, den.....

.....

Laura Theil