

Stand 14. September 2004

**An die
Klinischen Teilnehmer und kooperierenden Pathologen
der klinischen Therapiestudien zur Behandlung maligner Lymphome der**

***GLSG (German Low Grade Lymphoma Study Group) und
DSHNHL (Deutsche Studiengruppe Hochmaligne Lymphome)***

Betrifft:

**Erweiterte Ziele der von der Deutschen Krebshilfe geförderten
Therapieoptimierungsstudien**

Sehr geehrte, liebe Kolleginnen und Kollegen,

hiermit möchten wir Sie darüber informieren, dass dank umfangreicher Förderung durch die Deutsche Krebshilfe die von ihr geförderten klinischen Lymphomstudien zukünftig auf molekularbiologischer Basis auch einen Beitrag

- Zur *Verbesserung der Diagnostik* am Biopsatgewebe,
- Zur *Aufklärung der Pathogenese* und
- zur Identifikation *Prognose- und Rezidiv-assoziiertes Gene*

leisten sollen. Diese neuen Untersuchungen, die für alle Studienpatienten unentgeltlich angeboten werden, stellen eine wichtige Ergänzung der bisherigen klinischen und wissenschaftlichen Studien dar.

Die rein morphologische (= konventionell histologische) Diagnostik ist in den Jahren 1973 bis 2001 durch Einbeziehung von

- immunhistologischen Untersuchungen,
- zytogenetischen Bestimmungen und
- Klonalitätsanalysen (PCR für Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgene)

erweitert und entscheidend verbessert worden. Mit Hilfe der aufgeführten Methoden wurde es möglich, biologische und damit auch klinisch relevante Lymphomkrankheiten zu unterscheiden. Ein Ergebnis dieser Studien ist die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome, die 2001 veröffentlicht wurde und an deren Entstehung die Referenzpathologen der deutschen Studien maßgeblich beteiligt waren und in die Daten der deutschen Zytogenetik-Referenzlabore eingeflossen sind.

Allerdings reichen die oben genannten Methoden nicht aus, um alle Lymphomkrankheiten exakt zu definieren und die Gene zu identifizieren, die bei der Pathogenese eine relevante Rolle spielen. Kürzlich erschienene Studien weisen darauf

hin, dass diese Gene möglicherweise die Prognose und die therapeutische Ansprechbarkeit einer individuellen Lymphomkrankheit bestimmen können. Deshalb sollen ab sofort **bei möglichst allen Patienten der klinischen Lymphomstudien** die zur Diagnostik entnommenen Gewebeproben nicht mehr nur mit den oben genannten konventionellen Methoden untersucht werden, sondern es soll zusätzlich das **genomweite Gen-Expressionsprofil (Transkriptom) erstellt werden**. Darüber hinaus sollen genomische Aberrationen an denselben Fällen umfassend mit Hilfe der Chromosomenbänderungsanalyse an Metaphasen, der hochauflösenden Matrix-CGH, verschiedener FISH-Analysen sowie der PCR bestimmt werden.

Für die Genexpressionsanalysen sind optimal eingefrorene Gefriergewebeproben und für die Chromosomenbänderungsanalysen unfixiertes Frischmaterial eine unabdingbare Voraussetzung!

Für diese erweiterte Zielsetzung finanziert die Deutsche Krebshilfe (DKH) im Rahmen eines überregionalen wissenschaftlichen Verbundprojektes mit dem Titel „*Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen*“ die Genexpressions- und molekularzytogenetische Analyse von Studienpatienten. Mit der Durchführung von genomweiten Expressionsuntersuchungen wurden die Referenzzentren für Lymphknotenpathologie mit den molekularzytogenetischen Analysen verschiedene genetische Referenzlabore beauftragt.

Für die erfolgreiche Durchführung des erweiterten Untersuchungsspektrums, insbesondere aber für die Durchführung der Genexpressionsanalyse am Frischgewebe und die zytogenetische Analyse wurde nachfolgendes Informationsblatt mit Anleitung verfasst (siehe folgende Seite).

Anleitung zur Asservierung und Versendung von Biopsatgewebe für eine histologische/immunhistologische Diagnostik, eine genomweite Genexpressionsanalyse und eine zytogenetische Analyse

Für die histologische/immunhistologische, genexpressionsanalytische und zytogenetische Diagnostik zur Abschätzung der Prognose und des therapeutischen Ansprechens einer **individuellen** Lymphomkrankheit ist sowohl Formalin-fixiertes Gewebe als auch adäquat tiefgefrorenes Frischgewebe sowie in physiologischer Kochsalz-Lösung versandtes „Lebend“-Gewebe erforderlich. Im folgenden ist beschrieben, was bei der Asservierung und Versendung des Biopsatgewebes beachtet werden muss, um optimale Untersuchungsergebnisse zu erzielen:

- Die zu asservierenden Biopsatstücke (möglichst mehrere) sollten einen vollständigen Lymphknoten bzw. mindestens eine Gewebeprobe nicht kleiner als 10 x 10 x 10 mm umfassen. Dies ist dem Chirurgen vor Beginn der Gewebentnahme ausdrücklich mitzuteilen, ein entsprechendes Schreiben für die chirurgischen Kollegen finden Sie in der Anlage. Je mehr Gewebe gewonnen werden kann, umso verlässlicher sind die diagnostische Aussagen.
- Die RNA ist nach der Gewebentnahme schnellen Abbauprozessen unterworfen. Deshalb muss das Einfrieren des Biopsats so schnell wie möglich (innerhalb von 30 Minuten) erfolgen. Auch das Lebendgewebe für die Zytogenetik muss so schnell wie möglich versandt werden. Hierfür ist es erforderlich, die nachfolgend beschriebenen Schritte möglichst zeitnah durchzuführen:
 1. **Teilung der frisch entnommenen Gewebeprobe(n):** In **Formalin-freier Umgebung** wird das frisch gewonnene bzw. die frisch gewonnenen Biopsat(e) in repräsentative Gewebescheiben von mindestens 5 mm Dicke geteilt. Eine der repräsentativen Gewebescheiben wird in ein in deutlicher Entfernung befindliches Gefäß mit gepuffertem Formalin (pH 7,2) verbracht. Dieses Gewebstück ist zur Paraffineinbettung für die histologische und immunhistologische Diagnostik am Paraffinschnitt im Institut/Praxis des Primärpathologen bestimmt. Der Paraffinblock soll bei Diagnose einer lymphoproliferativen Läsion an eines der unten aufgeführten Referenzzentren für Lymphknotenpathologie zur Referenzbeurteilung im Rahmen der klinischen Studien weitergeleitet werden.
 2. **Tiefriervorgang (siehe auch beiliegende Graphik):** Die zweite Gewebescheibe wird/ in etwa 10 x 10 x 5 mm große Gewebestücke – möglichst unter sterilen zumindest aber unter sehr sauberen Bedingungen - geteilt. Jedes dieser Gewebestücke wird in ein **spezielles Weichplastikröhrchen mit flachem Boden** verbracht (**Wichtig:** Es dürfen nur diese Röhrchen verwendet werden; diese können entweder einzeln oder mit einem Trockeneisversandpaket (s.u.) von der Verbundzentrale angefordert werden). Dabei ist darauf zu achten, dass das einzufrierende Gewebstück flach auf dem Boden des Weichplastikröhrchens zu liegen kommt. Das am Boden des Gefäßes liegende Gewebestück wird dann mit steriler physiologischer

Kochsalzlösung überschichtet, so dass das Gewebestück mit einer dünnen Flüssigkeitsschicht bedeckt ist (max. 2-3 mm Flüssigkeitsschicht; **auf keinen Fall das Röhrchen mit Flüssigkeit voll füllen!**). Anschließend die Röhrchen mit dem anhängenden Deckel verschließen und **aufrecht(!!!)** in flüssigem Stickstoff mit einer geeigneten Zange oder Halterung für 2-3 Minuten zum Schockgefrieren tauchen. Anschließend kann das tiefgefrorene Gewebe in einer -80°C Tiefkühltruhe oder in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Bitte beachten: Vor Verwendung des Weichplastikgefäßes dieses sorgfältig beschriften. Bei der Verwendung von Filzschreibern ist unbedingt darauf zu achten, dass die Schrift auch bei sehr tiefen Temperaturen nicht verwischt werden kann (vorher prüfen; oder im Versandkit enthaltene Filzschreiber verwenden!).

3. **Asservierung von Material für die zytogenetische Diagnostik:** Sollten mehr als **zwei Gewebescheiben nach der Teilung der Gewebeprobe(n)** zur Verfügung stehen, wird **eine der Gewebescheiben in einem Gefäß (50ml Falcon) mit 0.9% NaCl-Lösung (nach Möglichkeit steril) ungefroren** an eines der unten genannten zytogenetischen Labors versandt. Falls unzureichend Tumorgewebe verfügbar ist, kann die zytogenetische Analyse ggf. auch an **malignem Pleuraerguss oder Aszites** (in einem Beutel oder in gut verschlossener Spritze) oder **bei leukämischer Ausschwemmung (>20%) an heparinisiertem Blut oder Knochenmark** (in gut verschlossener Spritze oder Monovette) durchgeführt werden.

Falls mehr als 3 Gewebescheiben zur Verfügung stehen, frieren Sie bitte möglichst viele Gewebestücke wie unter Punkt 2 beschrieben ein

Hilfe: Falls Schwierigkeiten in der Bereithaltung von flüssigem Stickstoff oder in der Verfügbarkeit einer -80°C Tiefkühltruhe oder Versandgefäßen für die Zytogenetik bestehen, wenden Sie sich an eines der Referenzzentren für Lymphknotenpathologie oder an die Zentrale in Göttingen. Bei elektiver Gewebeentnahme kann vor dem Eingriff ein Kit mit den benötigten Versandröhrchen, Kochsalzlösung und Kryotiketten für die Beschriftung sowie Versandscheinen aus Göttingen angefordert werden.

Verbundzentrale Göttingen,

Tel. 0700-Lymphome / 0700 – 596 74663

Fax 0551 – 39 8587

e-mail lymphomverbund@medizin.uni-goettingen.de

4. **Meldung: Die materialgewinnende Einrichtung** (Kliniker oder Primärpathologe) meldet der Zentrale des Krebshilfeverbundprojektes in Göttingen (Formblatt "Materialmeldebogen für Frischmaterial-

versendung") die Asservierung einer oder mehrerer Gewebeproben unter Angabe einer kliniksinternen Referenznummer, z.B. der Eingangsnummer der Primärpathologie zum Zwecke der Materialverfolgung. Die Meldung kann auch telefonisch oder per Fax erfolgen. Dies dient der Verfolgung von in den Kliniken schon asservierten und abholbereiten Materialien.

5. **Diagnostik und Versandprozedere:** Der lokale Pathologe untersucht das in Paraffin eingebettete Gewebe. Bei Vorliegen eines Lymphoms oder einer reaktiven Lymphknotenveränderung (außer Tuberkulose) fordert der Pathologe oder der Kliniker für den Versand des Gefriermaterials ein Trockeneispaket von der Verbundzentrale in Göttingen (Tel. 0700-Lymphome / 0700 – 596 74663) an. Dieses Trockeneispaket enthält sämtliche für den Versand erforderlichen Utensilien einschließlich der Versandscheine und einer übersichtlichen Kurzanleitung. Der Primärpathologe oder Kliniker verpackt die Weichplastikgefäße mit den tiefgefrorenen Frischgewebeproben in Trockeneis und sendet es zusammen mit dem "Einsendeschein für gefrorenes Frischmaterial" mit einem Kurierdienst an eines der unten genannten **Zentren für Lymphknotenpathologie (Referenzzentren)**. Dabei sollte das selbe Referenzzentrum gewählt werden, an das auch das Paraffinmaterial gesandt wird. Außerdem sendet der Primärpathologe den Paraffinblock (und etwaiges Formolnassmaterial) in getrennter Post an das Referenzzentren für Lymphknotenpathologie seiner Wahl.

Frischmaterial zur zytogenetischen Diagnostik wird möglichst umgehend nach Entnahme per Kurier- in einem getrennten Paket **bei Raumtemperatur** an eines der **zytogenetischen Referenzlabore** versandt. Hierfür ist der "Einsendeschein für zytogenetische Analysen" zu verwenden.

DIE KURIER-VERSENDUNG DES GEFRIERMATERIALS FÜR DIE GENEXPRESSIONSANALYSE UND DES NATIVEN FRISCHMATERIALS FÜR DIE ZYTOGENETISCHE ANALYSE PER KURIER SIND FÜR DIE MATERIALGEWINNENDEN EINRICHTUNGEN SELBSTVERSTÄNDLICHE KOSTENFREI. DER TRANSPORT PER KURIER KANN DURCH DIE VERBUNDZENTRALE IN GÖTTINGEN ORGANISIERT WERDEN.

Bitte beachten: Die getrennte Versendung des Materials ist deshalb wichtig, weil der Paraffinblock und die Gewebescheibe für die Zytogenetik im Trockeneispaket Schaden nehmen und das Formolnassmaterial durch Gefrierartefakte zerstört wird.

Die Material-empfangende Einrichtung (Referenzpathologie und das Zytogenetische Labor) meldet den Empfang des Untersuchungsmaterials an die Verbundzentrale in Göttingen und an die Material-versendende Einrichtung. Die Material-empfangende Referenzpathologie leitet nach Identifikation der Studienpatienten diese

gefrorene(n) Gewebescheibe(n) an die Genexpressionszentrale in Berlin oder Würzburg weiter.

Kosten und Ergebnisse der genomweiten Genexpressionsanalyse und der zytogenetischen Untersuchung: Diese werden im Rahmen des oben genannten von der Deutschen Krebshilfe geförderten Forschungsverbundprojektes durchgeführt und sind damit kostenfrei. Allerdings werden die genomweite Genexpressionsanalysen und zytogenetischen Untersuchungen nur dann durchgeführt, wenn sich die eingefrorene(n) Gewebeprobe(n) bzw. die in Kochsalzlösung versandte Gewebescheibe dafür als geeignet erweisen.

6. **Versandkosten:** Die Versandkosten (Porto und Trockeneis) übernimmt die **Deutsche Krebshilfe**. Bitte die Rechnung für den Versand und das Trockeneis an die **Verbundzentrale** (Prof. Trümper, Göttingen) zur direkten Bezahlung schicken, falls der Kurier nicht direkt über die Verbundzentrale bestellt wurde.
7. **Aufwandsentschädigung:** Für die oben beschriebene Asservierung und Verschickung des Gefriermaterials gewährt die Deutsche Krebshilfe dem Kliniker oder dem Pathologen, der die Versendung des Gefriermaterials vorgenommen hat, eine Aufwandsentschädigung von 100,00 € pro Fall. Falls es nicht zur Versendung des Frischmaterials kommt, weil z.B. eine Metastase oder eine Tuberkulose vorliegt, wird der Aufwand mit € 20,00 entschädigt. Die Aufwandsentschädigung wird von der Verbundzentrale nach Registrierung in der Verbunddatenbank an die angegebene Bankverbindung überwiesen.
8. **Kosten der referenzpathologischen Diagnostik am Paraffinschnitt:** Sofern es sich um einen Studienpatienten handelt, ist diese Leistung dank der Finanzierung durch die Deutsche Krebshilfe ebenfalls kostenfrei. Die Genexpressionsanalyse und die molekularzytogenetische Analyse sind – wie bereits oben erwähnt - in jedem Fall kostenfrei. Selbstverständlich wird die Referenzpathologie in allen Fällen, bei denen kein Frischmaterial versendet werden konnte, weiterhin durch die Ihnen bekannten Referenzzentren erstellt und durch die Deutsche Krebshilfe finanziert. Leider lässt sich bei Nichtstudienpatienten die Berechnung der konsiliarischen Untersuchung nicht vermeiden.
9. **Befundübermittlung:** Der einsendenden Klinik und dem Primärpathologen wird wie bisher im Rahmen der Referenzbegutachtung der referenzpathologische Befund übermittelt. Ebenso werden die Ergebnisse der konventionellen Chromosomenanalyse (Bänderungsanalyse) an die einsendende Klinik übermittelt. Den Einsendern wird ebenso mitgeteilt, dass die Genexpressionsanalyse am eingesandten Material erfolgreich durchgeführt werden konnte!
10. Auf den **Studientreffen der klinischen Studiengruppen** werden regelmässig **die Ergebnisse** des Krebshilfe-Verbundprojektes vorgestellt!

Anlage A zum Studienprotokoll de Verbundprojektes "Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen"

Bei Rückfragen bezüglich der Gewebeaufarbeitung für den Versand wenden Sie sich bitte an die Verbundzentrale in Göttingen (Prof. Trümper, Sprecher des Forschungsverbundes der Deutschen Krebshilfe „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“) oder an einen der beteiligten Referenzpathologen. Weitere Informationen finden Sie unter www.lymphome.de/Projekte/MMML.

Bitte teilen Sie uns mit, ob Ihre Klinik technisch und personell in der Lage sowie bereit ist, an der Gewebesammlung teilzunehmen. Bitte nutzen Sie dafür das beigelegte Antwortformular.

Herzlichen Dank für Ihre Unterstützung!

Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann
Leiter der GLSG

Prof. Dr. Lorenz Trümper
Sprecher des Verbundprojektes

Prof. Dr. Michael Pfreundschuh
Studienleiter der DSNHL

Prof. Dr. Norbert Schmitz
Chairman der DSHNHL

**Zentrale des Verbundprojektes
Prof. Dr. Lorenz Trümper
Zentrum Innere Medizin
Klinikum der Georg-August-Universität
Göttingen
37099 Göttingen**

Antwort

Klinikname: _____

Ort: _____

Unsere Klinik ist in der Lage und bereit, an der geplanten Gewebesammlung für das Verbundprojekt "Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen" teilzunehmen.

ja

nein

Falls ja:

Ansprechpartner: _____

Telefon: _____

Unterschrift:

Bitte dieses Antwortformular per Fax (Fax-Nr.: 0551 / 398 587) oder per Post an die Verbundzentrale senden. Vielen Dank !

Adressen:

Verbundzentrale

Prof. Dr. med. L. Trümper
Verbundsekretariat Frau M. Wehner
37099 Göttingen
Tel: 0700-Lymphome / 0700 – 596 74663
Fax: 0551-398535
E-mail: lymphomverbund@medizin.uni-goettingen.de

Liste der Deutschen Referenzzentren für Lymphknotenpathologie und Zytogenetischen Referenzlabore, die von der Deutschen Krebshilfe gefördert werden und für das oben beschriebene Verbundprojekt der Deutschen Krebshilfe zur Verfügung stehen:

Prof. Dr. med. H. Stein
Genexpressionslabor des Verbundprojektes
Institut für Pathologie
Campus Benjamin Franklin
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin
Tel: 030/8445 2295
Fax: 030/8445 4473
Email: Harald.Stein@charite.de

Prof. Dr. med. R. Parwaresch
Institut für Hämatopathologie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,
Campus Kiel
Niemannweg 11
24105 Kiel
Tel: 0431/597 3390
Fax: 0431/597 34 26
Email: sbothe.lkr@path.uni-kiel.de

Prof. Dr. med. P. Möller
Pathologisches Institut, Universität Ulm
Albert-Einstein-Allee 11
89081 Ulm
Tel: 0731/502 33 21
Fax: 0731/502 38 84
Email: peter.moeller@medizin.uni-ulm.de

Prof. Dr. med. M.-L. Hansmann
Senckenbergisches Institut für Pathologie,
Universität Frankfurt
Theodor-Stern-Kai 7
60596 Frankfurt
Tel: 069/6301 53 64
Fax: 069/6301 5241
Email: m.l.hansmann@em.uni-frankfurt.de

Prof. Dr. med. A. C. Feller
Institut für Pathologie, Universitätsklinikum
Schleswig-Holstein,
Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck
Tel: 0451/500 2705
Fax: 0451/500 3328
Email: feller@patho.uni-luebeck.de

Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink
Genexpressionslabor des Verbundprojektes
Pathologisches Institut, Universität Würzburg
Josef-Schneider-Str. 2
97080 Würzburg
Tel: 0931/201 47777
Fax: 0931201 47440
Email: path062@mail.uni-wuerzburg.de

Koordination der zytogenetischen Referenzdiagnostik:

PD Dr. Reiner Siebert
Institut für Humangenetik
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel
Schwanenweg 24
24105 Kiel
Tel.: 0431-597 1779/1775
Fax.: 0431-597-1880
email: rsiebert@medgen.uni-kiel.de

Liste der Zytogenetischen Labore

Institut für Humangenetik des
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Frau Dr. Lana Harder
Campus Kiel
Schwanenweg 24
24105 Kiel
Tel. 0431/597-1787 oder -1784;
Fax 0431/597-1880
email: sharder@medgen.uni-kiel.de

Universität Würzburg
Institut für Pathologie
Ansprechpartner: Herr PD Dr. German Ott
Josef-Schneider-Str. 2
97080 Würzburg
Tel: +49 (0) 931 / 201 - 47777
Fax: +49 (0) 931 / 201 - 47440
path042@mail.uni-wuerzburg.de

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Abteilung Onkologie - Hämatologie
Ansprechpartner Frau PD Dr Judith Dierlamm
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Tel.: 040 / 42803 - 2993
Fax: 040 / 42803 - 2186
email: judith_dierlamm@yahoo.de

Pathologisches Institut, Universität Ulm
Ansprechpartner: Frau Silke Brüderlein
Albert-Einstein-Allee 11
89081 Ulm
Tel: 0731/502 33 21
Fax: 0731/502 38 84
Email: peter.moeller@medizin.uni-ulm.de