

Aus der Abteilung Innere Medizin III der Universität Ulm
Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie und Infektiologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Döhner

**Inzidenz sekundärer chromosomaler Aberrationen beim
Mantelzell Lymphom (MCL) mit Translokation t(11;14)(q13;q32)**

Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Universität Ulm

vorgelegt von
Marie-Sandrine Sander
geboren in Saarbrücken

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller
Tag der Promotion: 25.11.2005

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	8
1.1 Das Mantelzell Lymphom (MCL).....	8
1.2 Zytogenetik und Molekulargenetik.....	12
1.3 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH).....	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	17
2. Material und Methodik	18
2.1 Patienten.....	18
2.2 Kontrollen.....	18
2.3 Zellpräparation.....	19
2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Blut und Knochenmark.....	19
2.3.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus weiteren Gewebearten.....	20
2.3.3 Direkternte.....	20
2.3.4 Herstellung der Präparate.....	21
2.4 DNA-Sonden für die FISH-Experimente.....	21
2.4.1 YAC-Vektoren.....	21
2.4.2 BAC- und PAC-Vektoren.....	24
2.4.3 Cosmid-Vektoren.....	26
2.4.4 Nick-Translation.....	27
2.4.5 Kontroll-Sonden.....	28
2.5 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH).....	29
2.6 Mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation.....	31
2.7 Statistische Auswertung.....	32
2.8 Reagenzien und Chemikalien.....	32

3. Ergebnisse	35
3.1 Ergebnisse der Kontrollexperimente.....	35
3.1.1 Kontrolle der DNA-Sonden Lokalisation.....	35
3.1.2 Sensitivität der DNA-Sonden (Bestimmung der Schwellenwerte).....	35
3.1.3 Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32) mittels FISH Analyse	38
3.2 Sekundäre chromosomale Aberrationen beim MCL.....	40
4. Diskussion	48
4.1 Diskussion der Methodik.....	48
4.2 Inzidenz sekundärer chromosomaler Aberrationen beim MCL.....	49
4.2.1 Ergebnisse klassischer Bänderungsanalysen.....	49
4.2.2 Ergebnisse molekularzytogenetischer Analysen.....	50
4.3 Pathogenetische Bedeutung sekundärer Aberrationen beim MCL.....	56
4.4 Prognostische Bedeutung sekundärer Aberrationen beim MCL.....	60
4.5 Schlussfolgerung.....	60
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis	64
6.1 Zitierte Veröffentlichungen.....	64
6.2 Eigene Veröffentlichungen.....	80
6.2.1 Originalarbeiten.....	80
6.2.2 Kongressbeiträge.....	81
7. Danksagung	82
8. Lebenslauf	83

Abkürzungsverzeichnis

Alu	Arthrobacter luteus
AML	Akute Myeloische Leukämie
Ampl	Amplifikation
Aqua dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
ATM	Ataxia Teleangiectatica Mutated Gene
BAC	Künstliches Bakterienchromosom (Bacterial Artificial Chromosome)
BCL1	B-Cell CLL/Lymphoma 1 Gene
BCL2	B-Cell CLL/Lymphoma 2 Gene
BCL6	B-Cell CLL/Lymphoma 6 Gene
BCL10	B-Cell CLL/Lymphoma 10 Gene
bd	biallelische Deletion
BSA	Bovines Serumalbumin
B-Zelle	Bursa-abgeleiteter Lymphozyt (Bone marrow-derived lymphocyte)
CCND1	Cyclin D1 Gene
CDK	Cyclin abhängige Kinase (Cyclin Dependent Kinase)
CDKI	CDK Inhibitor
CGH	Vergleichende genomische Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization)
CHOP	Cyclophosphamide, Doxorubicin Hydrochloride, Oncovin (Vincristine), Prednisone
CISS	Chromosomale-In-Situ-Suppressions-Hybridisierung
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETV5	Ets variant Gene 5
F Factor	Fertility plasmid Faktor
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GLI	Glioma-associated Oncogene
HCl	Salzsäure (Hydrochloric acid)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue)
Mb	Megabasenpaare
MCL	Mantelzell Lymphom (Mantle Cell Lymphoma)
MDM2	Mouse double minute 2 homolog Gene
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger Ribonucleic Acid)
MTC	Haupttranslokationsbruchpunktregion (Major Translocation Cluster)
Myc	Myelocytomatosis viral Oncogene
n	Anzahl
NA	Nicht auswertbar
NaCl	Natriumchlorid
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PAC	Künstliches Bakterienchromosom (P1-derived Artificial Chromosome)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PFA	Paraformaldehyd
Ph ¹	Philadelphia-Chromosom
PRAD1	Parathyroid Adenomatosis 1 Gene
RB1	Retinoblastoma 1 Gene
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SINE	Short Interspersed Repetitive Element

SSC	Sodium chloride-Sodium citrate
t	Translokation
TAE	Tris-acetate EDTA
TE	Tris EDTA
T-PLL	T-Zell Prolymphozyten Leukämie
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand Gene
T-Zelle	Thymus-abgeleiteter Lymphozyt (Thymus-derived lymphocyte)
vs.	versus
YAC	Künstliches Hefechromosom (Yeast Artificial Chromosome)
YPD Medium	Yeast Extract-Peptide-Dextrose Medium

1. Einleitung

1.1 Das Mantelzell Lymphom (MCL)

Das Mantelzell Lymphom (MCL) bietet ein Beispiel für den Wissenszuwachs, der sich auf dem Gebiet der hämatologischen Onkologie innerhalb der letzten drei Jahrzehnte ereignet hat. Basierend auf spezifischen morphologischen Kriterien wurde das MCL in den 70iger Jahren erstmals als zentrozytisches Lymphom durch Lennert et al. von anderen Non-Hodgkin Lymphomen (NHL) abgegrenzt (Lennert et al. 1975). Seitdem haben Ergebnisse zahlreicher klinischer Studien, neue Technologien wie die Immunphänotypisierung, sowie Fortschritte auf dem Gebiet der Zytogenetik und Molekulargenetik dazu beigetragen, diese Entität genauer zu charakterisieren. Dieser multidisziplinäre Ansatz hat zu unserem heutigen Verständnis der Biologie und Pathogenese des MCL, der Identifikation prognostischer Parameter und der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien geführt. Viele Fragen sind heute jedoch weiterhin unbeantwortet und trotz unseres Einblicks in die molekularen Grundlagen dieses NHL ist das derzeitige Management leider immer noch unzureichend.

Definition

Mantelzell Lymphom ist die seit 1992 verwendete Bezeichnung für eine lymphoproliferative Erkrankung, die von einer Gruppe naiver B-Zellen ausgeht, die das Keimzentrum noch nicht durchlaufen haben (Banks et al. 1992). Diese sind sowohl in Primärfollikeln als auch in der Mantelzone von Sekundärfollikeln lokalisiert. Zunächst wurde diese Erkrankung in der Kiel Klassifikation als zentrozytisches Lymphom (Lennert et al. 1975) und in der amerikanischen Literatur unter anderem als lymphozytisches Lymphom mit intermediärer Differenzierung bezeichnet (Berard und Dorfmann 1974). Aufgrund der topologischen Verteilung alkalischer Phosphatase positiver Tumorzellen konnte einige Jahre später eine Beziehung zu „Mantelzellen“ vermutet werden (Nanba et al. 1977). Diese Annahme spiegelt sich auch in der Bezeichnung von Weisenburger et al. als Mantelzonen-Lymphom wieder (Weisenburger et al. 1982). Immunologische Analysen und der seltene Nachweis somatischer Immunglobulingenaberrationen beim MCL haben den Ursprung von Prä-Keimzentrumszellen bestätigt (Hummel et al. 1994, Du et al. 1997).

Morphologie

Zytologisch werden zwei Varianten des MCL unterschieden, das klassische und das blastoide MCL. Das klassische MCL ist charakterisiert durch eine monotone Proliferation kleiner bis mittelgroßer Lymphozyten mit spärlichem Zytoplasma, unregelmäßigem, oft gekerbtem Zellkern mit gleichmäßig verteiltem kondensiertem Chromatin und unauffälligen Nucleoli. Aufgrund ihrer Morphologie kann diese Variante differentialdiagnostisch schwierig von reaktiven Prozessen (z.B. Castleman Erkrankung), Marginalzonen Lymphomen, folliculären Lymphomen oder einer chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) abzugrenzen sein (Weisenburger und Armitage 1996). Ca. 20% aller MCL Fälle gehören zur blastoiden Variante. Deren neoplastische Zellen sind pleomorph, groß, mit fein verteiltem Chromatin und Nucleoli. Im Gegensatz zur klassischen Variante zeigt das blastoide MCL einen deutlich gesteigerten mitotischen Index, so dass differentialdiagnostisch auch an ein B-lymphoblastisches Lymphom gedacht werden muss (Cheng et al. 1994). Im Verlauf der Erkrankung bleibt das histologische Muster des MCL relativ stabil (Swerdlow et al. 1983, Argatoff et al. 1997).

Immunphänotypisierung

In der Immunhistologie zeigen MCL Zellen einen charakteristischen Phänotyp (Swerdlow et al. 1983, Harris et al. 1984). Neben der Expression der B-Zell Marker CD19, CD20, CD22 und CD79a tragen die Tumorzellen fast immer Oberflächen-IgM mit häufiger Koexpression von IgD. Im Gegensatz zu anderen B-Zell Lymphomen besteht beim MCL eine umgekehrte Ratio von κ zu λ mit Prädominanz der λ -Leichtketten. Ein weiteres Charakteristikum des MCL stellt die Koexpression des T-Zell assoziierten Antigens CD5 in nahezu allen Fällen, sowie die negative CD23 Expression dar, wodurch sich das MCL von der CLL unterscheiden lässt. CD10 und BCL6, zwei Antigene, die mit folliculären Lymphomen assoziiert sind, sind beim MCL ebenfalls negativ.

Die Expression von Cyclin D1 ist ein konstantes, für das MCL hochspezifisches Phänomen, das mit einem genetischen Rearrangement des *BCL1* Locus assoziiert (siehe unten) und von großer diagnostischer und prognostischer Relevanz ist (Levy et al. 1999, Yatabe et al. 2000).

Epidemiologie

Das MCL macht ca. 3-10% der Non-Hodgkin Lymphome aus. Es tritt vor allem bei älteren Menschen auf (medianes Alter je nach Studie zwischen 54 und 68 Jahren) und es besteht eine männliche Prädominanz mit einer Ratio von mindestens 2:1 (Swerdlow und Williams 2002).

Klinische Präsentation

60-70% der Patienten haben bei Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Stadium (Stadium III-IV gemäß Ann Arbor Einteilung) mit generalisierter Lymphadenopathie. Etwa 75% der Patienten weisen eine Infiltration des Knochenmarks auf, die jedoch im Vergleich zur Beteiligung des peripheren Blutes von keiner prognostischen Signifikanz ist. 25% der Fälle zeigen einen Befall des peripheren Blutes, der unabhängig von der absoluten Lymphozytenzahl mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert ist (Pittaluga et al. 1998, Wong et al. 1999). Des Weiteren sind häufig betroffen: Milz (55%), Leber (35%), Gastrointestinaltrakt (15%), Waldeyer'scher Rachenring (10%), seltener Zentralnervensystem, Pleura und andere extranodale Organe wie Haut, Lunge, Weichteile, Speicheldrüsen und Orbita (Campo et al. 1999). In 10-15% findet sich nur ein extranodaler Befall ohne Lymphknotenbeteiligung und in 30-50% sind mehr als zwei extranodale Organe befallen. Ca. 50% der Patienten weisen eine Anämie und erhöhte Serumspiegel von Laktatdehydrogenase und β 2-Mikroglobulin auf. Monoklonale Immunglobuline finden sich hingegen nur in 10-30% der Fälle (Bosch et al. 1998).

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist im Vergleich zu anderen niedrig malignen Non-Hodgkin Lymphomen aggressiv mit einer schlechten Ansprechrate auf konventionelle therapeutische Regime. Die mediane Überlebenszeit liegt zwischen 3 und 4 Jahren. Eine komplette Remission kann in 6-35%, in einigen Studien auch in 50% der Fälle erzielt werden, jedoch ist das krankheitsfreie Intervall kurz und nur wenige Patienten erreichen eine Langzeitremission (Norton et al. 1995, Teodorovic et al. 1995, Bosch et al. 1998, Coiffier et al. 1998). Das Rezidiv ist zunächst durch einen relativ indolenten Verlauf mit progressiver Lymphadenopathie von einigen Monaten Dauer gekennzeichnet. Eine zunehmende Resistenz gegenüber der Chemotherapie resultiert in einem rascheren Krankheitsprogress, der in einer akzelerierten Phase endet (Coiffier et al. 1998).

Therapie

Das MCL zeichnet sich durch eine infauste Prognose mit einem schlechten, allenfalls mittelmäßigen Ansprechen auf Chemotherapeutika aus. Trotz neuentwickelter Therapiemodalitäten blieb das Gesamt-Überleben der betroffenen Patienten im Median über die letzten 50 Jahre nahezu konstant. Konventionelle Protokolle, die alkylierende Substanzen, Anthrazykline und Purinanaloga enthielten, brachten ebenso wie intensive Therapieschemata, bestehend aus Hochdosis-Cytarabin kombiniert mit Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason, keinen Überlebensvorteil (Vandenberghe et al. 1997).

Der Einsatz monoklonaler Antikörper in Ergänzung zu konventionellen Schemata scheint in der Initialtherapie des MCL eine ernstzunehmende Alternative zu sein. Zwar zeigte sich keine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens für die Kombination von CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) plus Rituximab versus einem Therapieregime ohne den Anti-CD20-Antikörper, jedoch konnte eine signifikant verbesserte Ansprechrate beobachtet werden (Lenz et al. 2005). Hingegen konnten Forstpointner et al. einen Überlebensvorteil für Rituximab in einer kleinen Studie von 40 MCL Fällen belegen (Forstpointner et al. 2004). Da hier als konventionelles Regime ein fludarabin-haltiges Protokoll verwendet wurde, scheint sich der synergistische Effekt beider Substanzen, der bereits *in vitro* beschrieben wurde (Di Gaetano et al. 2001), zu bestätigen. Es gilt nun in weiteren prospektiven Studien diesen Sachverhalt zu klären.

Als Erhaltungstherapie bei Patienten bis 65 Jahre wird zur Zeit der Einsatz einer myeloablativen Radiochemotherapie gefolgt von autologer Stammzelltransplantation favorisiert. Hier konnte eine Studie des europäischen MCL Netzwerks einen Überlebensvorteil im Vergleich zum Einsatz von Interferon α belegen, jedoch muss mit einer hohen Rezidivrate gerechnet werden (Hiddemann et al. 2001). Die allogene Stammzelltransplantation stellt nur selten eine Therapiealternative dar, da das Alter der betroffenen Patienten meist über 60 Jahre liegt und somit das therapieassoziierte Risiko den Nutzen dieser Behandlungsoption oft überwiegt.

Neue therapeutische Ansätze, wie der Einsatz des Proteasomen-Inhibitor Bortezomib, scheinen vielversprechend zu sein, obwohl sie erst in einer frühen Phase der klinischen Erprobung stehen (O'Connor et al. 2005).

1.2 Zytogenetik und Molekulargenetik

Die Relevanz zytogenetischer Untersuchungen bei hämatologischen Malignomen wird besonders am Beispiel der chronisch myeloischen Leukämie (CML) deutlich. Bei dieser Erkrankung wurde erstmals in der Geschichte eine balancierte Chromosomen-Aberration, das Philadelphia-Chromosom, bei einer menschlichen Neoplasie beschrieben (Nowell und Hungerford 1960). Mit Hilfe verbesserter Chromosomen-Bänderungs-Techniken konnte ebenfalls erstmals gezeigt werden, dass es sich bei der mit dieser Erkrankung assoziierten chromosomalen Veränderung um eine reziproke Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ handelt (Rowley 1973). Das aus dieser Translokation resultierende Fusionsgen kodiert für ein Produkt mit gesteigerter Tyrosinkinase-Aktivität, welches verantwortlich für die Pathogenese der CML ist (Konopka et al. 1984, Shtivelman et al. 1985). Basierend auf diesen Grundlagen stellt die CML nun die erste maligne Erkrankung dar, für die ein Medikament entwickelt wurde, das auf molekularer Ebene selektiv in den Krankheitsprozess eingreift, nämlich durch Hemmung der gesteigerten Tyrosinkinase-Aktivität des Fusionsproteins (Buchdunger et al. 1996, Druker et al. 1996, Druker et al. 2001).

Das MCL weist ebenfalls eine charakteristische reziproke chromosomale Aberration, eine Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, auf. Diese wurde 1979 erstmals bei lymphoproliferativen Erkrankungen beschrieben (Van den Berghe et al. 1979), 1984 wurden die Translokationsbruchpunkte kloniert (Tsujimoto et al. 1984) und anschließend auch bald eine Assoziation mit dem MCL gezeigt (Weisenburger et al. 1987, Rimokh et al. 1990, Leroux et al. 1991, Vandenberghe et al. 1991). In klassischen zytogenetischen Studien weisen etwa 65% der MCL Patienten eine Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ auf. Mit modernen Interphase-Hybridisierungstechniken findet sich diese rekurrente Aberration in nahezu allen MCL Fällen (siehe unten), jedoch nur selten bei anderen lymphoproliferativen Erkrankungen.

Die reziproke Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ betrifft zum einen den Immunglobulinschwerkettenlocus auf Chromosom 14, sowie eine Region auf der Chromosomenbande 11q13, die *BCL1* (*B-cell CLL/lymphoma 1*) bezeichnet wurde, stellvertretend für ein in dieser Region postuliertes Onkogen. 1991 konnte dieses von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen beim MCL kloniert werden (Rosenberg et al. 1991, Withers et al. 1991). Initial *PRADI* (parathyroid adenomatosis 1) genannt, da erstmals bei

Nebenschilddrüsenadenomen beschrieben (Motokura et al. 1991), wurde dieses Gen dann offiziell als *CCND1* bezeichnet.

CCND1 kodiert für ein Protein namens Cyclin D1, welches in nahezu allen MCL Fällen auf RNA- und Protein-Ebene überexprimiert ist (Rimokh et al. 1993, Bosch et al. 1994, Swerdlow et al. 1995). Cyclin D1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. Hier bildet Cyclin D1 zusammen mit Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), v.a. CDK4 und CDK6, einen aktiven Komplex, der eine Promotion von der G1- in die S-Phase durch Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins und damit Freisetzung von Transkriptionsfaktoren wie E2F bewirkt (Hunter und Pines 1994, Sherr 1996). Die negative Regulation der Aktivität des Cyclin D1/CDK4 Komplexes erfolgt durch den Tumorsuppressor p53 (via p21), sowie durch Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (CDKI) wie p15 (INK4b, MTS2), p16 (INK4a, MTS1, CDKN2), p18 (INK4c) und p19 (INK4d). Mittels in vitro Studien konnte gezeigt werden, dass diese Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (CDKI) die Cyclin D1/CDK4 Aktivität hemmen und somit als Tumorsuppressor fungieren können (Hirama und Koeffler 1995, Hirai et al. 1995).

Die Überexpression von Cyclin D1 in nahezu allen MCL Fällen ließ vermuten, dass dies der auslösende Mechanismus für die maligne Transformation ist. In einigen Studien konnte auch demonstriert werden, dass Cyclin D1 als Onkogen fungieren kann (Hinds et al. 1994, Lovec et al. 1994a). Experimente mit transgenen Mäusen zeigten jedoch, dass eine alleinige Überexpression von Cyclin D1 nicht zur Entstehung einer lymphoproliferativen Erkrankung ausreicht. Im Mausmodell waren für die Induktion einer malignen lymphoproliferativen Transformation noch weitere gemeinsam auftretende Aberrationen, z.B. *c-MYC* Alterationen, notwendig (Bodrug et al. 1994, Lovec et al. 1994b). Folglich muss noch ein weiterer Faktor bzw. weitere Faktoren eine Rolle bei der Pathogenese des MCL spielen.

Der Mechanismus, der im Zusammenspiel mit einer erhöhten Cyclin D1 Expression zu einer malignen Transformation der B-Lymphozyten beim MCL führt, ist jedoch bislang noch nicht geklärt. In Frage hierfür kommen zum einen Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53* auf Chromosom 17p13, die zum Verlust der inhibitorischen Wirkung auf den Cyclin D1/CDK4 Komplex via p21 führen können (Hunter und Pines 1994, Sherr 1996). *p53* Aberrationen sind beim MCL bereits in mehreren Studien beschrieben worden. Diese Fälle sind mit einer aggressiven histologischen Variante, sowie mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert (Greiner et al. 1996, Hernandez et al. 1996). Einen weiteren wichtigen pathogenetischen Faktor könnten chromosomale CDKI Veränderungen darstellen. In aggressiven MCL Varianten fanden sich Deletionen, z.B. von *p16*, die mit einem Verlust der

mRNA- und Proteinexpression des entsprechenden Gens einhergingen (Dreyling et al. 1997, Pinyol et al. 1997, Gronbaek et al. 1998, Pinyol et al. 1998). Aberrationen des Tumorsuppressors *ATM* (ataxia teleangiectatica mutated), welcher in fast der Hälfte aller MCL Fälle deletiert ist, sind ebenfalls von pathogenetischer Bedeutung. Die Inaktivierung von *ATM* kann zu Defekten in der DNA-Reparatur und kumulativen Mutationen führen, die in einer Zelltransformation und Tumorprogression resultieren (Stilgenbauer et al. 1996, Cuneo et al. 2000, Schaffner et al. 2000, Stilgenbauer et al. 2000).

Weitere für die Pathogenese des MCL potentiell relevante rekurrente chromosomale Veränderungen wurden vor allem in zytogenetischen Analysen mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) beschrieben. In diesen Studien fanden sich am häufigsten Zugewinne in den Regionen 3q, 7p, 8q und 12q, sowie Verluste in den Banden 1p, 6q, 9p, 11q, 13q und 17p (Monni et al. 1998, Beà et al. 1999, Bentz et al. 2000 siehe Abbildung 1).

1.3 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die Entwicklung der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) stellt eine neue potente Methodik zur Identifizierung genetischer Aberrationen dar. Diese nicht-radioaktive In-Situ-Hybridisierungstechnik wird heute bereits in vielen Forschungsgebieten eingesetzt und bietet gegenüber radioaktiven Techniken und der klassischen Zytogenetik viele Vorteile (Lichter und Ward 1990, Lichter et al. 1991, Le Beau 1993). Mit Hilfe der FISH können neben Metaphasen auch Interphase-Kerne auf Einzelzellniveau analysiert werden und somit kann auf das Vorhandensein mitotischer Zellen verzichtet werden („Interphase-Zytogenetik“, Cremer et al. 1986). Chromosomale Veränderungen von nur wenigen Kilobasenpaaren (kb) Länge lassen sich mit spezifischen DNA-Sonden mit einer hohen Sensitivität und Spezifität erfassen, während bei konventionellen Bänderungsanalysen das Auflösungsvermögen im Megabasenpaaren (Mb)-Bereich liegt (Lichter et al. 1991, Jenkins et al. 1992). Die Weiterentwicklung der FISH zur „Chromosomalen-In-Situ-Suppressions-Hybridisierung“ Ende der 80iger Jahre machte es schließlich möglich, komplexe DNA-Sonden zu hybridisieren (Landegent et al. 1987, Cremer et al. 1988, Lichter et al. 1988, Pinkel et al. 1988). Durch Zugabe von Competitor-DNA (z.B. humane COT-1 DNA) ließen sich Kreuzhybridisierungen durch ubiquitär im menschlichen Genom vorkommende repetitive *Alu*- oder *KpnI*-DNA-Sequenzen (Short Interspersed Repetitive Sequences) verhindern.

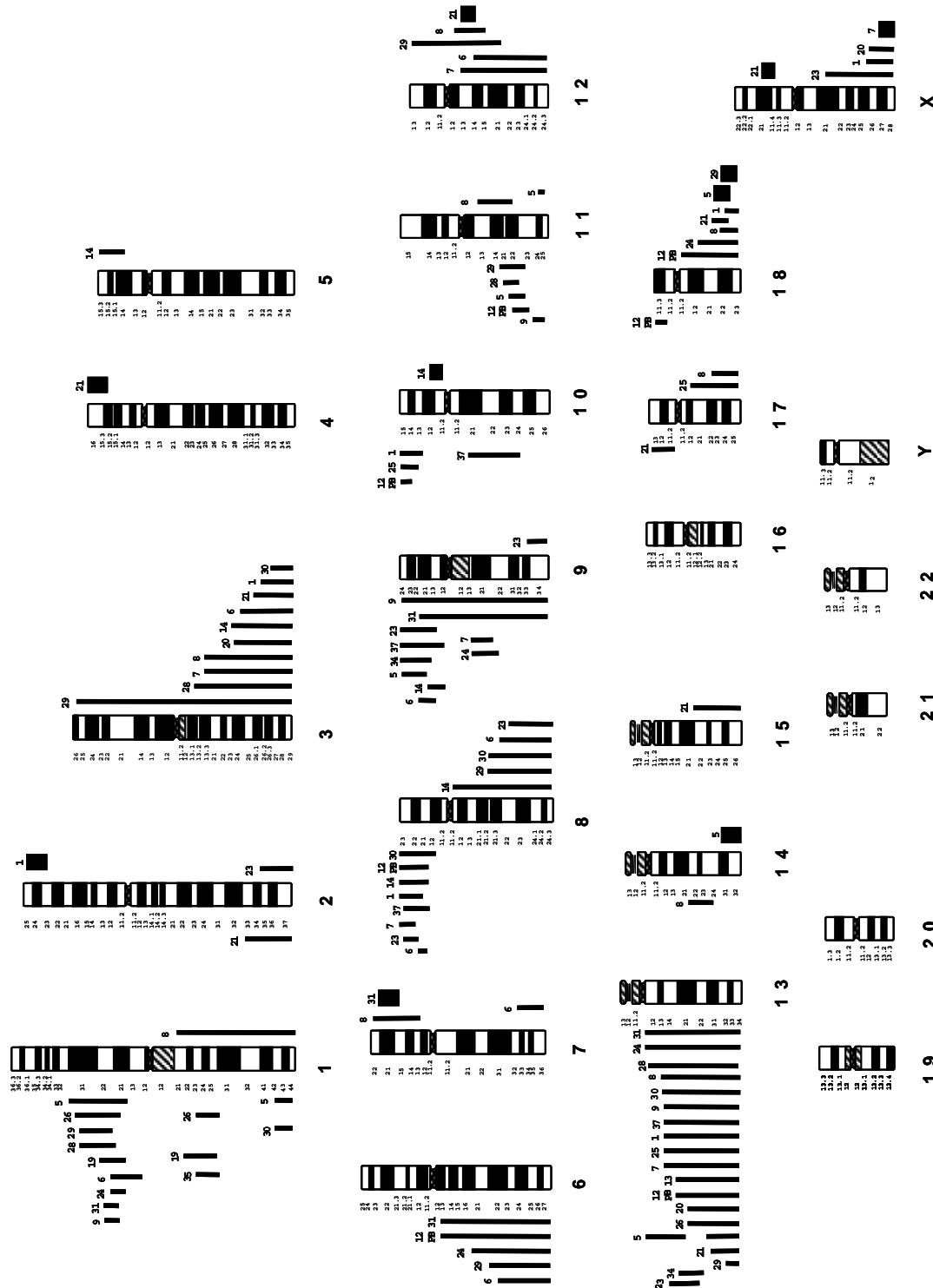


Abbildung 1: Sekundäre chromosomale Aberrationen beim MCL (n=27), Ergebnisse der CGH Analyse von Bentz et al. 2000

Deletionen sind als Balken links, Überrepräsentationen rechts neben den Chromosomen dargestellt.

Der Einsatz verschiedener Fluorochrome ermöglichte Mehrfarben-Experimente (Nederlof et al. 1989) mit der Möglichkeit zur Kombination von DNA-Sonden und folglich dem Nachweis mehrerer Chromosomen-Aberrationen in einem Experiment.

In der Tumorzytogenetik eröffnete die FISH durch den Nachweis sowohl numerischer (Monosomien, Trisomien) als auch struktureller chromosomaler Aberrationen (Translokationen, Deletionen) bei vielen hämatologischen Erkrankungen neue Perspektiven (Cremer et al. 1988). Rowley et al. konnten bei Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) einen Translokationsbruchpunkt auf 11q23 mittels eines den Bruchpunkt überspannenden YAC-Klons nachweisen (Rowley et al. 1990). Auch die Arbeitsgruppen von Arnoldus und Tkachuk konnten mit Hilfe der FISH das Philadelphia-Chromosom (Ph^1) bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) erstmals in Interphase-Kernen nachweisen, indem sie Cosmid-Klone verwendeten, die die Bruchpunkte auf Chromosom 9 und 22 flankierten (Arnoldus et al. 1990, Tkachuk et al. 1990).

In der zytogenetischen Charakterisierung lymphoproliferativer Erkrankungen, wie der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), konnten ebenfalls große Fortschritte durch diese Methode erzielt werden. Aufgrund der niedrigen mitotischen Aktivität neoplastischer CLL Zellen konnten in konventionellen Bänderungsanalysen nur in ca. 50% der Fälle genetische Veränderungen nachgewiesen werden. FISH Untersuchungen zeigten jedoch, dass über 80% der Patienten chromosomale Aberrationen aufweisen, von denen einige in multivariater Analyse von prognostischer Relevanz sind (Döhner et al. 2000).

Beim MCL bietet die FISH ebenfalls große Vorteile. Mit Hilfe konventioneller zytogenetischer Analysen konnte nur in 60-70% der Fälle eine Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ nachgewiesen werden, obwohl fast 100% der Patienten eine Cyclin D1 Überexpression aufweisen. Auch molekulargenetische Methoden, wie Southern Blot und Polymerase-Kettenreaktion (PCR), zeigen eine erhebliche Limitierung alle Translokationen zu erfassen, da die Translokationsbruchpunkte innerhalb einer 120 kb großen Region auftreten und nur in 30-40% der Fälle in der MTC (Major Translocation Cluster) Region liegen. Im Gegensatz dazu kann mittels FISH in nahezu allen MCL Fällen eine Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden (Monteil et al. 1996, Vaandrager et al. 1996). Dies konnte auch in nachfolgenden Studien belegt werden und somit kommt dem Nachweis einer Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ mit Hilfe der FISH ein hoher diagnostischer Stellenwert zu, besonders bei der Evaluation unklarer Fälle (Avet-Loiseau et al. 1998, Li et al. 1999, Matutes et al. 1999, Katz et al. 2000, Remstein et al. 2000).

Sekundäre chromosomale Aberrationen beim MCL sind komplex und bislang weitaus weniger gut charakterisiert, obwohl sie ebenfalls in nahezu allen Fällen nachgewiesen werden können. Mittels CGH Analysen wurden viele dieser Veränderungen beschrieben (siehe oben) und es konnte auch gezeigt werden, dass viele dieser Aberrationen rekurrent sind (Monni et al. 1998, Beà et al. 1999). Zur weiteren Charakterisierung und Ermittlung der Inzidenzen häufiger Sekundäraberration in einem größeren Patientenkollektiv bietet jedoch die wesentlich sensitivere FISH Vorteile gegenüber der CGH, besonders beim Nachweis spezifischer Deletionen, wie z.B. Verluste von 11q23 oder 17p13 (Bentz et al. 2000). In Studien mit kleineren Fallzahlen und einem auf wenige Aberrationen beschränkten Nachweis konnte dies bereits gezeigt werden (Cuneo et al. 1999, Bigoni et al. 2001). Eine umfassende FISH Analyse sekundärer chromosomaler Aberrationen eines großen MCL Kollektivs liegt aber bislang noch nicht vor.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das MCL ist charakterisiert durch eine reziproke Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ und die daraus resultierende Überexpression von Cyclin D1. In verschiedenen Modellen kann Cyclin D1 als Onkogen fungieren, transgene Mausexperimente haben jedoch gezeigt, dass zur malignen Transformation von B-Lymphozyten noch weitere Faktoren notwendig sind. In Frage hierfür kommen Aberrationen der Tumorsuppressorgene *p53*, *ATM* oder *p16*, sowie weitere rekurrente chromosomale Veränderungen. Diese sind bislang jedoch nur in Studien mit kleineren Fallzahlen charakterisiert worden, so dass die Inzidenz dieser Aberrationen heute noch nicht sicher bekannt ist.

Ziel der Arbeit ist es, mit Hilfe der FISH sekundäre chromosomale Aberrationen des MCL besser zu charakterisieren. Mit einem die häufigsten bekannten Sekundäraberrationen umfassenden DNA-Sonden Set soll ein großes MCL Kollektiv untersucht und die Inzidenz der einzelnen Veränderungen bestimmt werden. Die gewonnenen Ergebnisse sollen zu unserem Verständnis der Pathogenese des MCL beitragen, sowie eine Grundlage bilden für weitere diagnostische und prognostische Analysen.

2. Material und Methodik

2.1 Patienten

Es wurde Material von 103 Patienten mit einem Mantelzell Lymphom (MCL) untersucht. Die Diagnose beruhte auf morphologischen und immunphänotypischen Kriterien. Bei 31 Patienten wurden die zu untersuchenden Zellen aus peripherem Blut, bei 4 aus Lymphknotengewebe, bei 2 aus Knochenmark und bei jeweils einem Patienten aus Tonsillengewebe, Milzgewebe und Pleuraerguss gewonnen. Bei 63 Proben lagen keine Angaben zum Ursprung der Materialentnahme vor. Mittels Punktion erhielt man sowohl peripheres Blut und Knochenmark als auch Pleuraerguss. Zur Gewinnung von Lymphknotengewebe, Tonsillengewebe und Milzgewebe musste eine diagnostische Extirpation durchgeführt werden. Die Proben wurden zur zytogenetischen Analyse in das Zytogenetische Labor der Abteilung Innere Medizin III der Universität Ulm eingesandt.

Der Altersmedian der Patienten lag zum Zeitpunkt der Untersuchung bei 61 Jahren (Spannweite: 37-87 Jahre). 25/98 Patienten waren weiblich (26%), 73/98 Patienten männlich (74%) und von 5 Patienten lagen diesbezüglich keine Informationen vor. Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der zytogenetischen Untersuchung in folgenden Krankheitsstadien (Stadieneinteilung nach Ann Arbor): Stadium I = 3/89 (3%), Stadium II = 2/89 (2%), Stadium III = 10/89 (11%) und Stadium IV = 74/89 (83%). Bei 14 Patienten lagen keine Angaben zum Krankheitsstadium vor.

2.2 Kontrollen

Von 5 gesunden Probanden wurde peripheres Blut entnommen und als Kontrolle verwendet. Der Altersmedian der Kontrollpersonen lag bei 25 Jahren (Spannweite: 24-30 Jahre) mit einer Frauen/Männer-Ratio von 2:3.

2.3 Zellpräparation

2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Blut und Knochenmark

Mononukleäre Zellen wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation nach der modifizierten Methode von Böyum aus peripherem Blut oder Knochenmark isoliert (Böyum 1976). In Abhängigkeit von der Leukozytenzahl im heparinisierten Material (20 I.E. Natrium-Heparin/ml) wurde wie folgt vorgegangen:

Leukozytenzahl < 50.000/ μ l: Überschichtung von 20 ml Ficoll Separating Solution mit gleichem Volumen unverdünntem Heparin-Blut in einem 50 ml-Plastikröhrchen (Falcon-Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

Leukozytenzahl > 50.000/ μ l: Vorgehen wie oben, nur dass zuvor das Blut im Verhältnis 1:2 mit RPMI 1640 Waschmedium verdünnt wurde (bei Leukozytenzahlen >100.000/ μ l Verdünnung 1:3).

Die Dichtegradienten-Zentrifugation wurde bei Raumtemperatur für 20 min bei 2800 U/min (ohne Bremse) durchgeführt (Fa. Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland). Danach konnte die sogenannte Interphase (= Grenzschicht zwischen Ficoll Separating Solution und Plasma), in welcher sich die mononukleären Zellen befinden, mit einer Kunststoffpipette vorsichtig abgenommen werden. Diese wurde dann in ein neues 50 ml-Plastikröhrchen überführt, zweimal mit RPMI 1640 Waschmedium gewaschen und pelletiert (Zentrifugation für jeweils 10 min bei 1200 U/min). In Abhängigkeit von seiner Größe wurde das Pellet nach dem Dekantieren in 1 bis 10 ml RPMI 1640 Waschmedium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen anschließend entweder direkt geerntet oder archiviert.

2.3.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus weiteren Gewebearten

Nach Zugabe einer der Größe des Biopsats angepassten Menge 1xPBS-Puffer (Phosphate buffered saline) wurde das Lymphknoten-, Tonsillen- oder Milzgewebe in einer sterilen Petrischale mit Hilfe eines Skalpell's zerkleinert. Mit diesem wurde vorsichtig über die Schnittländer des Gewebes geschabt, so dass sich eine Zellsuspension bildete. Nach Aufnahme dieser Lösung in ein steriles 1,5 ml-Plastikröhrchen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) wurden die gewonnenen Zellen unter Zugabe des 2,3fachen Volumens an 100% Ethanol bei 4°C bis zur Herstellung der Präparate (siehe unten) gelagert.

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus einem malignen Pleuraerguss erfolgte durch Zentrifugation des Untersuchungsmaterials (10 min bei 1200 U/min, Fa. Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland) und anschließendem Dekantieren des Überstandes. Das verbliebene Zellpellet wurde dann, wie unter 2.3.3 beschrieben, weiterverarbeitet.

2.3.3 Direkternte

$1-2 \times 10^7$ resuspendierte mononukleäre Zellen wurden in ein 15 ml-Plastikröhrchen (Falcon-Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gegeben und mit 9 ml vorgewärmter hypotoner Kaliumchlorid-Lösung (0,075 M) bei 37°C für 16 min inkubiert. Anschließend wurden von den so lysierten Zellen die hydropisch geschwollenen Zellkerne durch Zentrifugation (10 min bei 1200 U/min, Fa. Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland) getrennt. Der Überstand wurde bis auf ca. 1 ml, in welchem das Pellet resuspendiert wurde, verworfen. Die Fixierung der Zellkerne erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 10 ml Fixativ-Lösung (Essigsäure-Methanol-Gemisch im Verhältnis 1:3) unter gleichzeitigem Mischen. Nach 30 min wurden die Zellkerne erneut zentrifugiert (10 min bei 1200 U/min), der Überstand abgenommen, 10 ml Fixativ-Lösung zugegeben und das Pellet bei 4°C gelagert.

2.3.4 Herstellung der Präparate

Vor dem Auftropfen auf Objektträger wurden die Zellkerne zunächst noch fünfmal in Fixativ-Lösung gewaschen, d.h. 10 min Zentrifugation bei 1200 U/min (Fa. Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland), Dekantieren des Überstandes und Resuspendierung in 10 ml frischer Fixativ-Lösung. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in einem seiner Größe entsprechenden Volumen resuspendiert.

Die zuvor mit 100% Ethanol und destilliertem Wasser gereinigten Objektträger wurden unmittelbar vor dem Auftropfen der Zellkern-Suspension mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm aus Wasserdampf überzogen. Dadurch wurde die gleichmäßige Ausbreitung der Zellkerne auf dem Objektträger gewährleistet. Aus ca. 30 cm Höhe wurden drei Tropfen der Zellkern-Suspension aus einer Pasteurpipette auf einen waagrecht gehaltenen Objektträger getropft. Nach kurzem Pusten über das Präparat zur gleichmäßigen Verteilung der Zellkerne wurden die Objektträger mit Fixativ-Lösung gespült und dann luftgetrocknet. Mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (Axioskop, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurden diese nun auf ihre Qualität hin überprüft, anschließend in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (70%, 90%, 100% Ethanol für jeweils 5 min) dehydriert, luftdicht in Plastikfolie verschweißt und bei -70°C gelagert.

2.4 DNA-Sonden für die FISH-Experimente

2.4.1 YAC-Vektoren

Mit Hilfe künstlicher Hefezellchromosomen als Vektoren, sogenannten YACs (Yeast Artificial Chromosomes), können große DNA-Fragmente von bis zu zwei Millionen Basenpaaren (2 Mb) kloniert werden (Burke et al. 1987).

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung sekundärer chromosomaler Aberrationen beim MCL folgende YAC-Klone eingesetzt: (i) YAC-Klon 968g8, kartiert auf der Bande 1p22, (ii) YAC-Klon 866e7 (Bande 3q26-q27), (iii) YAC-Klon 919h10 (Bande 6q27), (iv) YAC-Klon 961b12 (Bande 7p15), (v) YAC-Klon 948d5 (Bande 8p22), (vi) YAC-Klon 813d3 (Bande 10p15) und (vii) YAC-Klon 954e9 (Bande 15q23). Alle YAC-Klone wurden vom Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (Généthon, Fondation Jean Dausset, Paris, Frankreich) bezogen.

YAC-Präparation:

Unter YAC-Präparation versteht man die Extraktion der in *Saccharomyces cerevisiae* inkorporierten YAC-DNA, die dann mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden kann. Hierzu wurden die YAC enthaltenen Hefezellen zunächst auf Sabouraud-Agaroseplatten (2% Agarose in 3% Medium USP XVIII) 72 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde eine Hefezellkolonie, welche einem Hefezellklon entspricht, mittels einer sterilen Impföse in einen sterilen Erlenmeyerkolben mit 30 ml Sabouraud-Medium überführt. Nach einer Inkubation von mindestens 48 h unter Schütteln bei 30°C wurden zur Lagerung der YAC-Klone sog. Glycerolstocks hergestellt. 1 ml der 48h-Zellsuspension wurde 5 min bei 13000 U/min (Biofuge 13, Fa. Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) in einem sterilen 1,5 ml-Plastikröhrchen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, der Überstand verworfen und dann das Pellet in 1 ml YPD-Medium (2% Hefeextrakt [Yeast Extract], 2% Peptone, 2% Glukose) resuspendiert. 700 µl davon wurden mit 300 µl sterilem Glycerol in einem 2 ml-Plastikröhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gemischt und bei -70°C archiviert.

Aus der restlichen Hefezellsuspension wurde die DNA mit Hilfe eines DNA Isolations Kits (Gram positive bacteria & yeast DNA isolation kit, Puregene™) extrahiert. 1 ml der Suspension wurde in einem 1,5 ml-Plastikröhrchen bei 13000 U/min 5 s zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl „Cell Suspension Solution“ resuspendiert. Um die Zellwände zu verdauen, wurden 1,5 µl „Lytic Enzyme Solution“ zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 300 µl „Cell Lysis Solution“ resuspendiert und 100 µl „Protein Precipitation Solution“ hinzugegeben. Nach kräftigem Vortexen und 3 min Zentrifugation bei 13000 U/min bildeten die präzipitierten Proteine ein weißes Pellet. Der die DNA enthaltene Überstand wurde in einem neuen 1,5 ml-Plastikröhrchen mit 300 µl 100% Isopropanol vermischt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13000 U/min waren die Nukleinsäuren als kleines weißes Pellet sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300 µl Ethanol (70%) gewaschen und erneut 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und anschließend das Pellet 15 min luftgetrocknet. Nach Zugabe von 50 µl „DNA Hydration Solution“ und 1,5 µl „RNase A Solution“, kräftigem Vortexen und Inkubation bei 37°C für 15 min wurde die DNA über Nacht bei Raumtemperatur rehydriert. Die Lagerung der DNA fand bei 4°C statt.

Alu-PCR:

Die Vervielfältigung der menschlichen Sequenzen aus der isolierten YAC- und Hefe-DNA erfolgte mittels Alu-PCR (Lichter et al. 1990, Lengauer et al. 1992). Die Alu-PCR ist eine Polymerase-Kettenreaktion bei der Primer eingesetzt werden, die an die repetitiven Alu-Sequenzen im menschlichen Genom binden. Diese Alu-Sequenzen sind aus 300 Basenpaaren bestehende, in hunderttausendfacher Kopie vorliegende Nukleotidfolgen, die zur Familie der ubiquitär im menschlichen Genom vorkommenden kurzen repetitiven Sequenzen (SINEs = Short Interspersed Repetitive Elements) gehören (Singer 1982). Da sich in der Hefezell-DNA keine Alu-Sequenzen befinden, kann mittels dieser PCR spezifisch der Anteil an menschlicher DNA aus dem YAC/Hefe-DNA Gemisch amplifiziert werden. Eine vollständige Vervielfältigung der Sonden-DNA setzt natürlich eine relativ gleichmäßige Verteilung der Alu-Sequenzen in der Matrix voraus.

Für jede DNA-Sonde wurden drei 100 µl Ansätze unter sterilen Bedingungen auf Eis in PCR-Plastikröhrchen (Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA) pipettiert (siehe Tabelle 1). Ansatz 1 enthielt ein Nukleotidgemisch, PCR-Puffer, MgCl₂ (25 mM), Taq-Polymerase und den Primer *CL1*. Dementsprechend enthielt Ansatz 2 Primer *CL2* und Ansatz 3 beide Primer, *CL1* und *CL2*. Zu jedem dieser Ansätze wurden dann noch 2 µl Sonden-DNA aus der YAC-Präparation hinzugefügt.

Tabelle 1: Alu-PCR-Reaktionsansätze

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl/ pH 7,5, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂)	10 µl	10 µl	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl	2 µl	2 µl
dNTP (Nukleotidgemisch)	1 µl	1 µl	1 µl
Primer CL1 (50 µM)	1 µl	-	1 µl
Primer CL2 (50 µM)	-	1 µl	1 µl
Taq-Polymerase	1 µl	1 µl	1 µl
Sonden-DNA	2 µl	2 µl	2 µl
Aqua dest.	83 µl	83 µl	82 µl
Σ	100 µl	100 µl	100 µl

Die Reaktionsansätze wurden in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA) in 34 Zyklen amplifiziert. Ein Zyklus bestand aus 2 min Denaturierung bei 94°C, 1 min „Annealing“ (⇒ Anlagerung der Primer) bei 58°C und 5 min Kettenverlängerung (=Extension) bei 72°C. Zum Ende der Reaktion verblieb die DNA noch 10 min bei 72°C und wurde dann auf 4°C gekühlt.

Zum Ausschluss einer Kontamination der DNA-Fällung wurde von jedem Reaktionsansatz 7 µl mit 1,5 µl eines Bromphenol-Xylencyanol-Gemisches vermischt, auf einem Heizblock 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf einem Agarose-Gel (1,5% Agarose in 1xTAE-Puffer*) mit 15 V/cm Gellänge 25 min aufgetrennt. Nach einer Ethidiumbromid-Färbung (15 min) zeigten kontaminierte Reaktionsansätze unter UV-Licht einen „Schmier“ entlang der DNA-Laufbahn, während nicht-kontaminierte Ansätze ein für die jeweilige DNA-Sonde charakteristisches Bandenmuster aufwiesen. Nicht-kontaminierte Ansätze einer DNA-Sonde wurden vermischt und die DNA mit 5 M NaCl (1/25 des DNA-Volumens), 1 M MgCl₂ (1/100 des DNA-Volumens) und 100% eisgekühltem Ethanol (2,5faches des DNA-Volumens) 20 min bei -76°C gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min bei 13000 U/min und 4°C; Zentrifuge Typ Biofuge fresco, Fa. Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 4°C kaltem Ethanol (70%) gewaschen (10 min Zentrifugation, s.o.). Danach wurde der Überstand wieder verworfen und das DNA-Pellet 5 min in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator, Savant Instruments, Hicksville, USA) getrocknet. Über Nacht wurde die DNA dann in Aqua dest. (45/100 des DNA-Ausgangsvolumens) durch Schütteln bei Raumtemperatur resuspendiert und anschließend bei -20°C gelagert.

2.4.2 BAC- und PAC-Vektoren

Große DNA-Fragmente lassen sich mit Vektoren basierend auf Bakteriophagen P1 und F-Faktor Plasmiden (fertility plasmid) in bakteriellen Zellen klonieren. Vektorsysteme mit einer hohen Kopienzahl pro Zelle haben den Nachteil, dass diese Vektoren oft eine strukturelle Instabilität des klonierten DNA-Fragmentes aufweisen. Durch den Einsatz des *Escherichia coli* (*E.coli*) F-Faktors, eines Replikons, das nur eine kleine Kopienzahl von 1-2 pro Zelle aufrechterhält, kann jedoch auch eukaryote DNA mit repetitiven Sequenzen stabil in

* Stammlösung 50xTAE-Puffer (2 M Tris-Puffer, 5,7% Essigsäure, 0,5 M EDTA, pH 8,0)

Bakterien kloniert werden. Vektoren basierend auf dem F-Faktor System können große DNA-Fragmente (> 300 kb) aufnehmen. Diese lassen sich als künstliche bakterielle Chromosomen, sog. BACs (Bacterial Artificial Chromosomes), durch Elektroporation mit großer Effizienz in Bakterien transferieren (Shizuya et al. 1992). Eine Kombination des F-Faktors mit Bakteriophagen P1 System führt ebenfalls zu einem sehr effektiven Klonierungssystem, den sog. PACs (P1-derived artificial chromosomes), und ermöglicht die Klonierung von DNA-Fragmenten von bis zu 150 kb (Ioannou et al. 1994).

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung sekundärer chromosomaler Aberrationen beim MCL folgender BAC-Klon: (i) BAC-Klon 866e7 (Bande 3q26-q27) und folgende PAC-Klone eingesetzt: (ii) PAC-Klon 963d6 (Bande 6q21), (iii) PAC-Klon c-myc (Bande 8q24), (iv) PAC-Klone 55g7#1-4 (Bande 11q13), (v) PAC-Klon ATM#2 (Bande 11q22-q23), (vi) PAC-Klon 755b11 (Bande 11q22-q23), (vii) PAC-Klon Gli#3 (Bande 12q12-q13), (viii) PAC-Klon D13S272/3 (Bande 13q14), (ix) PAC-Klon 933e9#48 (Bande 13q14), (x) PAC-Klon #56 (Bande 13qter), (xi) PAC-Klone $\text{cos}\alpha_{1+2}\#1-4$ (Bande 14q32), (xii) PAC-Klone Y6#1-4 (Bande 14q32) und (xiii) PAC-Klon p53 (Bande 17p13). Alle BAC- und PAC-Klone wurden vom Deutschen Ressourcen Zentrum in Berlin bezogen.

BAC- bzw. PAC-Präparation:

Die BAC- bzw. PAC-Klone wurden zunächst auf Platten mit 1,5% Bacteriological Agar in LB-Medium (10g Peptone, 10 NaCl und 5g Yeast Extract ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,0) ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Entsprechend der Antibiotika-Resistenzgene der einzelnen Klone wurde dem Medium vor dem Gießen der Platten Kanamycin (in einer Endkonzentration von 25 µg/ml) oder Chloramphenicol (12,5 µg/ml) zugesetzt. Nach 24-48 h wurde eine Bakterienkolonie, welche einem Klon entspricht, in einen sterilen 2 l Erlenmeyerkolben mit 450 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotikumkonzentration (s.o.) mittels einer sterilen Impföse überführt. Zur Erhöhung der Plasmid-Kopienzahl pro Bakterienzelle wurden dem Medium zusätzlich 2,5 ml einer 0,1 M IPTG Lösung (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 24 h unter Schütteln bei 37°C wurden zur Lagerung der BAC- bzw. PAC-Klone Glycerolstocks hergestellt. Dazu wurden 700 µl der 24h-Zellsuspension mit 300 µl sterilem Glycerol in einem 2 ml-Plastikröhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gemischt und bei -70°C archiviert.

Für die Präparation der Plasmid-DNA mit Hilfe eines Plasmid-DNA Isolations Kits (Qiagen Plasmid Maxi Kit) wurde ca. 450 ml der Bakterienzell-Suspension in autoklavierten

450 ml-Beckmann-Plastikzentrifugationsgefäßen bei 6000 U/min in einer Zentrifuge mit einem Beckmann JA-10 Rotor 20 min zentrifugiert (Fa. Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und in ein 50 ml-Beckmann-Plastikzentrifugationsgefäß überführt. Um die Zellen zu lysieren, wurde 10 ml Puffer P2 zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml gekühltem Puffer P3 wurden die Proteine auf Eis 20 min präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 13000 U/min mit einem Beckmann JA-17 Rotor bei 4°C für 20 min wurde der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert, um sämtliche Proteinreste zu entfernen. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde an Qiagen-tip 500 Säulen gebunden, die zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert wurden. Nach zweimaligem Waschen der Säulen mit je 30 ml Puffer QC wurde die DNA mit 15 ml Puffer QF in ein 50 ml-Plastikröhrchen (Falcon-Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) eluiert. Zur Fällung wurden 10,5 ml Isopropanol zugegeben und mit 5000 g 60 min bei 4°C zentrifugiert (Fa. Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland). Nach Abnahme des Isopropanols wurde das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation mit 5000 g 60 min bei 4°C), um präzipitierte Salze und Isopropanol-Reste zu entfernen. Anschließend wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet, in 100-200 µl 1xTE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert, die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und das Pellet bei 4°C gelagert.

2.4.3 Cosmid-Vektoren

Cosmid-Vektoren enthalten sog. cos-Sequenzen (kohäsive Sequenzen aus Bakteriophagen lambda), die in ein Plasmid eingesetzt wurden. Im Gegensatz zu BACs, PACs oder YACs lassen sich mit diesen Vektoren nur kleine DNA-Stücke von 30-45 kb Größe klonieren. Die Präparation der Cosmid-DNA geschah analog der BAC- bzw. PAC-Präparation.

2.4.4 Nick-Translation

Die Nick-Translation ist eine Methode mit deren Hilfe die Sonden-DNA spezifisch markiert wird. Durch niedrig konzentriertes Enzym DNase I werden in Anwesenheit von Mg^{2+} an statistisch verteilten Stellen DNA-Einzelstrangbrüche (engl.= nicks) erzeugt, die sich durch die DNA-Polymerase I aus *E. coli* wieder verschließen lassen. Zur nicht-radioaktiven Markierung werden der DNA-Polymerase I neben dATP, dCTP, dGTP und dTTP auch chemisch modifizierte Desoxyribonukleosid-Triphosphate (biotiniertes-16-dUTP bzw. digoxigeniertes-11-dUTP) angeboten, die dann an den Bruchstellen eingebaut werden (Langer et al. 1981, Heiles et al. 1988).

Für eine gute Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH), d.h. eine hohe Signalintensität, ist neben einer effizienten Markierung der DNA-Sonden auch deren Länge entscheidend. Diese sollte 100 bis 500 Basenpaare betragen und wird durch einen DNase-Verdau (individuelle DNase I Konzentration und Reaktionszeit) erzielt. In dieser Fragmentlänge wird eine Penetration der Kernmembran erleichtert und gleichzeitig unspezifische Bindungen vermieden.

Tabelle 2: Nick-Translation-Reaktionsansatz für 2 µg Sonden-DNA

	Ansatz
Sonden-DNA in Aqua dest. (100 ng/µl)	20 µl (= 2 µg)
10x konzentrierter Puffer (0,5 M Tris-HCl/pH 8,0, 50 mM MgCl ₂ , 0,5 mg/ml Bovines Serum Albumin [BSA])	10 µl
β-Mercaptoethanol (0,1 M)	10 µl
Biotin-16-dUTP-Mix oder Digoxigenin-11-dUTP-Mix (0,5mM Bio-16-dUTP/dTTP od.Dig-11-dUTP/dTTP + dATP,dCTP,dGTP je 0,5mM)	10 µl
DNase I Stammlösung 1:2000 verdünnt (Stammlösung: 3 mg DNase I in 0,5 ml 0,3 M NaCl + 0,5 ml Glycerin)	2 µl
DNA-Polymerase I aus <i>E. coli</i> (10000 U/ml)	3 µl
Aqua dest.	45 µl
Σ	100 µl

In dieser Arbeit wurde der Nick-Translation-Reaktionsansatz gemäß dem obengenannten Schema (siehe Tabelle 2) in ein 1,5 ml-Plastikröhrchen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) pipettiert, 75 min bei 15°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Zur Überprüfung der DNA-Sonden-Länge wurde ein Aliquot von 7 µl mit 1,5 µl Bromphenol-Xylencyanol-Gemisch vermischt, 3 min bei 100°C denaturiert, sofort abgekühlt (4°C) und auf ein Agarose-Gel (1,5% Agarose in 1xTAE-Puffer) neben einem 1 kb Größenmarker (1 kb DNA-Ladder) aufgetragen. Die DNA wurde mit einer Spannung von 15 V/cm Gellänge 25 min aufgetrennt, mit Ethidiumbromid 15 min gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Unterschiedlich lange DNA-Fragmente waren nun als „Schmier“ sichtbar. Falls ein Teil des „Schmiers“ noch größer als 500 Basenpaare war, wurde nach erneuter Zugabe von Enzymen (frisches Aliquot DNase I und Polymerase I) ein individueller Nachverdau durchgeführt (je nach Sonden-Länge 10-60 min bei 15°C). Befanden sich alle DNA-Sonden im optimalen Längenbereich, wurden 3 µl 0,5 M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und 1 µl 10% SDS (Sodiumdodecylsulfat) zur Inaktivierung der DNase I hinzugegeben und die DNA anschließend bei 68°C 10 min auf einem Heizblock erhitzt. Um die markierten DNA-Sonden von den nicht eingebauten Nukleotiden zu trennen, wurde der Reaktionsansatz durch Zentrifugation (10 min mit 1600 U/min, Biofuge 13, Fa. Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) über 1 ml Sephadex G 50 Säulen (äquiliibriert mit 10 mM Tris-HCl/pH 8,0, 1 mM EDTA und 0,1% SDS) gereinigt. Die Konzentration der spezifisch-markierten DNA-Sonden betrug 20 ng/µl im Eluat. Die Lagerung der Sonden erfolgte bei -20°C.

2.4.5 Kontroll-Sonden

Um die Spezifität der einzelnen hergestellten DNA-Sonden zu überprüfen, wurden käufliche biotinierte oder digoxigenierte Zentromer-Sonden der Firma Oncor entsprechend der Sondenlokalisation verwendet (Fa. Oncor, Gaithersburg, MD, USA). Diese Zentromer-Sonden binden an menschliche Satelliten-DNA der *Alpha*-Familie, die spezifisch für die (Peri-) Zentromerregion von Chromosomen ist. Die alphoiden DNA-Sequenzen sind aus 171 Basenpaaren bestehende DNA-Fragmente, die hintereinander wiederholt werden und so bis zu einigen Millionen Basenpaaren lang sein können. Die Größe und Anzahl der Aneinanderreihungen sind chromosomenspezifisch (Willard und Waye 1987).

2.5 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die verwendeten DNA-Sonden enthalten ubiquitär im menschlichen Genom vorkommende repetitive Alu-Sequenzen (Short Interspersed Repetitive Sequences, s.o.). Um unspezifische Hybridisierungssignale verhindern zu können, die sonst durch die Alu-Sequenzen verursacht würden, wurde eine Chromosomale-In-Situ-Suppressions (CISS) Hybridisierung durchgeführt (Cremer et al. 1988, Lichter et al. 1988). Bei dieser Form der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung wird Humane COT-1 DNA aus Plazentagewebe, die ebenfalls hochrepetitive Sequenzen enthält, als Competitor-DNA zugegeben, um so unspezifische Bindungen zu supprimieren. Dazu wird die denaturierte Sonden-DNA und COT-1 DNA unmittelbar vor dem Zusammenbringen mit der chromosomalen DNA 5-20 min bei 37°C inkubiert. Bei diesem sog. Preannealing lagern sich die hochrepetitiven Sequenzen aufgrund ihrer geringen Komplexität und ihrer Häufigkeit rasch aneinander. Hingegen benötigt die Bindung der komplexen Sonden-DNA an die komplementären Zielsequenzen der chromosomalen DNA eine mehrstündige Inkubation bei 37°C.

Protokoll der FISH-Hybridisierung nach Lichter (Lichter et al. 1988):

- **Vorbehandlung der Patienten-DNA:**

Nach Auftauen der Objektträger wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop ein geeignetes Hybridisierungsareal ausgewählt und mit einem Diamantstift markiert. Die Zellkerne auf den Objektträgern (siehe 2.3.4) wurden nun 3 min mit Pepsin (1 mg Pepsin in 99 ml 0,01 N HCl bei 37°C) verdaut, um die Kernmembran für die Sonden-DNA durchlässiger zu machen. Anschließend wurden die Objektträger 2x 5 min in 1xPBS bei Raumtemperatur gewaschen, 5 min in 1% PFA (Paraformaldehyd) fixiert (Raumtemperatur) und dann nochmals in 1xPBS gewaschen (s.o.). Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 min 70%, 90%, 100% Ethanol bei Raumtemperatur) und Vorwärmen (10 min bei 70°C) wurden die Objektträger bei 72°C 2 min in deionisiertem Formamid (70% Formamid, 2xSSC*/pH 7,0) denaturiert. Nach erneuter Dehydrierung (je 3 min 70%, 90%, 100% Ethanol bei 4°C) wurden die Objektträger vor dem Auftragen der Sonden-DNA auf einem Heizblock bei 37°C getrocknet.

* Stammlösung 20xSSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat 2xH₂O, pH 7,0)

- **Behandlung der Sonden-DNA und Hybridisierung:**

Pro Objektträger wurden 200 ng biotin- und digoxigeninmarkierte Sonden-DNA, d.h. 10 µl des jeweiligen Nick-Translation-Produkts, zusammen mit 3 µg Lachs-DNA, 10 µg COT-1 DNA, 3 M Natriumacetat/pH 5,2 (1/20 des DNA-Volumens) und eisgekühltem 100% Ethanol (2,5faches DNA-Volumen) bei -76°C in 1,5 ml-Plastikröhrchen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) 20 min gefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 U/min und 4°C (Biofuge fresco, Fa. Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol (4°C) gewaschen (10 min Zentrifugation bei 13000 U/min und 4°C). Der Überstand wurde dekantiert und die DNA 5 min in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator, Savant Instruments, Hicksville, USA) getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 5 µl deionisiertem 100% Formamid 20 min resuspendiert und nach Zugabe von 5 µl Hybridisierungspuffer (4xSSC, 20% Dextransulfat) erneut 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 6 min Denaturierung bei 75°C auf einem Heizblock und nach 5-20 min Preannealing auf einem Heizblock bei 37°C wurde die Sonden-DNA auf das markierte Hybridisierungsareal eines vorgewärmten Objektträgers aufgetragen. Unter Vermeidung von Luftblasen wurde ein 18x18 mm Deckglas aufgelegt und dessen Ränder dann mit Fixogum Rubber Cement abgedichtet. Der so präparierte Objektträger wurde in einer feuchten Kammer bei 37°C für 12-18 h inkubiert.

Bei Verwendung einer alphoiden Zentromer-Sonde als Kontroll-Sonde erfolgte eine Modifikation des Protokolls. Es wurde nur DNA einer selbst hergestellten DNA-Sonde gefällt und diese anschließend in je 4 µl deionisiertem Formamid und Hybridisierungspuffer resuspendiert. Von der zentromerspezifischen Kontroll-Sonde wurden ohne vorangehende Fällung 4 µl bei 75°C auf einem Heizblock denaturiert und dann ohne Preannealing gemeinsam mit der Sonden-DNA auf das Hybridisierungsareal aufgetragen.

- **Detektion**

Nach Entfernen der Deckgläser wurden die Objektträger 3x 5 min in Formamid (50% Formamid, 2xSSC/pH 7,0 bei 42°C) und anschließend 3x 5 min in 0,5xSSC bei 60°C gewaschen. Um eine unspezifische Bindung der Fluorochrome zu verhindern, wurde das sog. Blocking durchgeführt. Auf die Objektträger wurde 200 µl 3% BSA-Lösung (3% Bovines Serumalbumin, 4xSSC) pipettiert und diese nach Abdecken mit einem 24x50 mm Deckglas 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Entfernen der

Deckgläser erfolgte die Detektion mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem Avidin (Avidin-FITC-DCS) und Cy3-konjugierten Digoxigenin-Antikörpern (Anti-Dig-Cy3). 200 µl der Detektionslösung (1% BSA, 4xSSC) wurden 1,5 µl Avidin-FITC-DCS und 1,0 µl Anti-Dig-Cy3 zugegeben, dieses Gemisch dann auf das Hybridisierungsareal aufgetragen, mit einem 24x50 mm Deckglas bedeckt und erneut 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die überschüssigen Fluorochrome durch 3x 5 min lichtgeschütztes Waschen mit 4xSSC/0,1% Tween bei 42°C entfernt. Um die Zellkerne unspezifisch gegenzufärben, wurden die Präparate 10 min lichtgeschützt in 80 ml 2xSSC mit 80 µl DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) inkubiert und dann kurz in 2xSSC/0,05 Tween 20 gewaschen. Um einem raschen Ausbleichen der Fluorochrome bei Anregung durch Licht entgegenzuwirken, wurden auf die Hybridisierungsareale 30 µl Vectashield™ mounting medium pipettiert, 24x40 mm Deckgläser aufgelegt und die Objektträger dann bei 4°C lichtgeschützt bis zur Auswertung gelagert.

2.6 Mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation

Bei der Auswertung der Präparate wurden die Signale der biotin- und digoxigenin-markierten DNA-Sonden in 200 Interphasekernen mit Hilfe eines Zeiss Mikroskops vom Typ Axioskop bestimmt (Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Das Axioskop war mit Filtersets für DAPI, FITC, Cy3/Rhodamin und gleichzeitige Betrachtung von FITC und Cy3/Rhodamin für Epifluoreszenz-Mikroskopie ausgerüstet.

Die fotografische Dokumentation fand mittels einer Charge Coupled Device Kamera (IMAC-CCD S30 Video camera module, Firma Compulog Computer Systeme GmbH, Böblingen, Deutschland) statt (Hiraoka et al. 1987). Durch digitale Bildverarbeitung wurden die mit verschiedenen Filtern aufgenommenen Bilder überlagert und das Verhältnis von Signal zu Hintergrund optimiert (Boyle et al. 1992). Dazu wurde auf einem PC mit Intel Pentium3 Processor das Software Programm „ISIS imaging system“ der Firma MetaSystems verwendet (MetaSystems, Altlusheim, Deutschland).

2.7 Statistische Auswertung

Die Daten zu den Patienten-Proben wurden in Form einer Microsoft Excel-Tabelle (Microsoft Office 2000 Professional, Microsoft Corporation, Redmond, USA) erfasst. Quantitative Parameter wurden durch den Mittelwert und/oder Median und ggf. die Standardabweichung, binäre Variablen durch Häufigkeiten beschrieben. Zur Überprüfung eines Unterschieds in der Verteilung binärer Variablen zwischen Gruppen verwendeten wir den χ^2 -Test (Chi-Quadrat-Test). Als Software zur Berechnung der Parameter dienten Microsoft Excel (Microsoft Office 2000 Professional, Microsoft Corporation, Redmond, USA).

2.8 Reagenzien und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten und hier aufgeführten Reagenzien und Chemikalien wurden über die angegebenen Firmen bezogen:

- Agarose Fa. Sigma, St. Louis, USA
- Anti-Digoxigenin-Cy3-Antikörper Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland
- Avidin-FITC-DCS Fa. Vector, Burlingame, USA
- Bovines Serumalbumin (BSA) Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
- Bromphenolblau Fa. Sigma, St. Louis, USA
- Chloramphenicol Fa. Sigma, St. Louis, USA
- Dextransulfat Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden
- 4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
- 1 kb DNA Größenmarker (1 kb DNA Ladder) Fa. Gibco-BRL life technologies, New York, USA
- DNase I Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
- DNA-Polymerase I (E. coli) Fa. New-England-Biolabs, Beverly, USA
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

- Essigsäure Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethanol Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethidiumbromid Fa. Sigma, St. Louis, USA
- Ficoll Separating Solution (Density 1,077) Fa. Seromed, Berlin, Deutschland
- Fixogum Rubber Cement Fa. Marabu, Tamm, Deutschland
- Formamid Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glucose Fa. Gibco-BRL life technologies, New York, USA

- Glycerol Fa. Sigma, St. Louis, USA
- Gram positive bacteria & yeast DNA isolation kit (Purogene™) GenraSystems Inc., Minneapolis, USA
- Hefeextrakt (Yeast Extract) Fa. Gibco-BRL life technologies, New York, USA

- Humane COT-1 DNA Fa. Gibco-BRL life technologies, New York, USA

- Isopropanol Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) Fa. Sigma, St. Louis, USA
- Kaliumchlorid (KCl) Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kanamycin Fa. Sigma, St. Louis, USA
- Lachs-DNA Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
- Magnesiumchlorid (MgCl₂) Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- β-Mercaptoethanol Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Methanol Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumacetat Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl) Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumcitrat Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumdodecylsulfat (SDS) Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
- Natrium-Heparin Fa. Braun, Melsungen, Deutschland

- Nukleotide:
 1. dATP, dCTP, dGTP, dTTP Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
 2. Biotin-16-dUTP Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
 3. Digoxigenin-11-dUTP Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
- Paraformaldehyd (PFA) Fa. Sigma, St. Louis, USA

-
- Phosphate buffered saline (PBS) Fa. Gibco-BRL life technologies, New York, USA
 - PCR-Oligonukleotid-Primer *CL1* und *CL2* Fa. MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
 - Pepsin Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
 - Peptone Fa. Gibco-BRL life technologies, New York, USA
 - Polyoxyethylenesorbitanmonolaureate (Tween 20) Fa. Sigma, St. Louis, USA
 - Qiagen Plasmid Maxi Kit Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland
 - RPMI 1640 Waschmedium Fa. Seromed, Berlin, Deutschland
 - Sabouraud-Medium (Medium USP XVIII) Fa. Gibco-BRL life technologies, New York, USA
 - Salzsäure (HCl) Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
 - Sephadex G 50 Fa. Sigma, St. Louis, USA
 - Taq-Polymerase Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
 - Tris-Puffer Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
 - Vectashield™ mounting medium Fa. Vector, Burlingame, USA
 - Xylencyanol Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Kontrollexperimente

3.1.1 Kontrolle der DNA-Sonden Lokalisation

Zur Überprüfung der richtigen Lokalisation der einzelnen DNA-Sonden wurden diese mit entsprechenden käuflichen Zentromer-Sonden auf Objektträger mit Metaphasen kohybridisiert. Bei allen Sonden konnte eine Fehllage auf einem anderen Chromosom ausgeschlossen werden.

3.1.2 Sensitivität der DNA-Sonden (Bestimmung der Schwellenwerte)

Bei der mikroskopischen Auswertung der FISH Experimente wurden von jeder Kontrollperson Signale von 200 Interphase-Zellkernen ausgezählt. In Analogie zu bereits publizierten Studien wurden die Schwellenwerte für Zugewinne (meist im Sinne einer Trisomie) bzw. Deletionen anhand der Hybridisierungs-Ergebnisse der Kontrollgruppe definiert (Kibbelaar et al. 1991, Stilgenbauer et al. 1993, Döhner et al. 1994):

Schwellenwert für die Diagnose eines Zugewinns (Trisomie)	=	Mittelwert der Zellkerne in der Kontrollgruppe mit drei Fluoreszenzsignalen	+	dreifache Standard- abweichung der Kontrollgruppe
--	---	---	---	---

Schwellenwert für die Diagnose einer Deletion	=	Mittelwert der Zellkerne in der Kontrollgruppe mit einem Fluoreszenzsignal	+	dreifache Standard- abweichung der Kontrollgruppe
---	---	--	---	---

Schwellenwert	=	$M_{xSignal}$	+	$3x \sigma_{xSignal}$
---------------	---	---------------	---	-----------------------

Zur Bestimmung der Schwellenwerte einzelner DNA-Sonden wurden Lymphozyten aus peripherem Blut von 5 gesunden Kontrollpersonen mit jeder verwendeten Sonde hybridisiert. Zellkerne, deren Signalzahl nicht eindeutig bestimmbar war, wurden als nicht auswertbar (NA) gewertet. Schwellenwerte wurden nur für peripheres Blut bestimmt. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass sich bei Experimenten mit optimal präparierten Zellen aus lymphatischen Geweben, wie Milz, Lymphknoten oder Tonsille, bzw. mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark die Hybridisierungseffizienz nicht signifikant von FISH Analysen an peripheren Blutzellen unterscheidet.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse und die Berechnung der Schwellenwerte zusammengefasst. Tabelle 3 zeigt beispielhaft die Bestimmung des Schwellenwertes für die auf Chromosomenbande 6q21 lokalisierte DNA-Sonde PAC 963d6 (incl. aller Daten). In den Tabellen 4, 5 und 6 sind die relevanten Daten für alle in dieser Studie verwendeten DNA-Sonden zusammengefasst.

Tabelle 3: Ergebnisse der FISH Experimente bei 5 Probanden mit der DNA-Sonde PAC 963d6 (Bande 6q21)

Probanden Nr.	Alter/ Geschlecht	Anzahl ausge- werteter Kerne	Anzahl von Signalen (Prozentwerte in Klammern)					
			0	1	2	3	4	NA
I	24 / w	200	0 (0,0)	6 (3,0)	183 (91,5)	2 (1,0)	1 (0,5)	8 (4,0)
II	24 / m	200	0 (0,0)	2 (1,0)	193 (96,5)	2 (1,0)	0 (0,0)	3 (1,5)
III	29 / m	200	0 (0,0)	2 (1,0)	195 (97,5)	1 (0,5)	0 (0,0)	2 (1,0)
IV	25 / w	200	1 (0,5)	3 (1,5)	191 (95,5)	2 (1,0)	0 (0,0)	3 (1,5)
V	30 / m	200	0 (0,0)	1 (0,5)	195 (97,5)	2 (1,0)	0 (0,0)	2 (1,0)
Mittelwert (M)			0,10%	1,40%	95,70%	0,90%	0,10%	1,80%
Standardabweichung (σ)			0,22%	0,96%	2,49%	0,22%	0,22%	1,26%
Schwellenwert ($M + 3x \sigma$)				4,29%				

Der Anteil der Zellkerne mit zwei Signalen variierte zwischen 91,5% und 97,5%. Die Hybridisierungseffizienz lag somit über 90% (Mittelwert 95,7%). Der Schwellenwert für das Vorliegen einer Deletion im Bereich der chromosomalen Bande 6q21 betrug 4,3% ($M_{1\text{Signal}} + 3x\sigma_{1\text{Signal}}$).

Tabelle 4: Schwellenwerte der DNA-Sonden (PAC-Klone) zum Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32)

Sonde	Lokalisation	Anzahl d. Zellkerne mit 3 Signalen*					Mittelwert (M)	Standardabweichung (σ)	Schwellenwert (M + 3x σ)
		Probanden Nr.							
		I	II	III	IV	V			
PAC 55g7#1-4**	11q13	1,0%	0,5%	2,0%	2,0%	1,5%	1,4%	0,65%	3,4%
PAC Y6#1-4	14q32	0,0%	2,5%	1,0%	2,0%	1,0%	1,3%	0,97%	4,2%
PAC cos α_{1+2} #1-4	14q32	1,0%	1,0%	1,5%	1,0%	2,0%	1,3%	0,44%	2,6%

Die Hybridisierungseffizienz war in allen Fällen > 90% (Mittelwert 96,4%).

* Gewertet wurden Zellen mit je 3 Signalen.

** Für die Translokationsbestimmung wurde von jeder Sonde jeweils ein Pool bestehend aus vier verschiedenen Klonen (#1-4) verwendet, um möglichst alle Translokationsbruchpunkte zu erfassen.

Tabelle 5: Schwellenwerte der DNA-Sonden (YAC-, BAC- oder PAC- Klone) zum Nachweis eines Zugewinns (Trisomie)

Sonde	Lokalisation	Anzahl d. Zellkerne mit 3 Signalen*					Mittelwert (M)	Standardabweichung (σ)	Schwellenwert (M + 3x σ)
		Probanden Nr.							
		I	II	III	IV	V			
BAC 866e7	3q26	1,0%	0,5%	1,5%	2,0%	1,5%	1,3%	0,57%	3,0%
YAC 961b12	7p15	1,5%	2,0%	2,0%	1,5%	1,0%	1,6%	0,42%	2,9%
PAC c-myc	8q24	1,0%	3,0%	2,0%	2,0%	1,0%	1,8%	0,83%	4,3%
PAC Gli#3	12q12-q13	3,0%	2,5%	1,0%	1,5%	2,0%	2,0%	0,79%	4,4%
YAC 954e9	15q23	0,5%	2,0%	1,5%	1,0%	3,0%	1,6%	0,96%	4,5%

Die Hybridisierungseffizienz war in allen Fällen > 90% (Mittelwert 95,8%).

* Gewertet wurden Zellen mit je 3 Signalen.

Tabelle 6: Schwellenwerte der DNA-Sonden (YAC-, PAC- oder Cosmid-Klone) zum Nachweis einer Deletion

Sonde	Lokalisation	Anzahl d. Zellkerne mit 1 Signal*					Mittelwert (M)	Standardabweichung (σ)	Schwellenwert (M + 3x σ)
		I	II	III	IV	V			
YAC 968g8	1p22	1,0%	0,0%	3,0%	2,0%	1,0%	1,4%	1,14%	4,8%
YAC 919h10	6q27	0,5%	2,0%	1,5%	1,5%	3,0%	1,7%	0,91%	4,4%
PAC 963d6	6q21	2,0%	1,0%	1,5%	2,0%	0,5%	1,4%	0,65%	3,4%
YAC 948d5	8p22	2,5%	2,0%	3,0%	2,0%	1,0%	2,1%	0,74%	4,3%
Cosmid p16	9p21	2,5%	1,0%	3,0%	0,5%	1,0%	1,6%	1,08%	4,9%
YAC 813d3	10p15	1,0%	1,5%	2,0%	2,0%	1,5%	1,6%	0,41%	2,9%
PAC ATM2	11q22-q23	1,5%	2,0%	2,5%	1,5%	1,0%	1,7%	0,57%	3,4%
PAC 755b11	11q22-q23	1,0%	1,5%	0,5%	3,0%	1,5%	1,5%	0,94%	4,3%
PAC 272/3	13q14	2,0%	2,0%	0,0%	2,5%	2,0%	1,7%	0,97%	4,6%
PAC 933e9#48	13q14	1,0%	2,0%	1,0%	2,0%	3,0%	1,8%	0,84%	4,3%
PAC #56	13qter	1,0%	1,5%	1,0%	0,5%	3,0%	1,4%	0,96%	4,3%
PAC p53	17p13	2,0%	2,5%	1,5%	3,0%	1,0%	2,0%	0,79%	4,4%

Die Hybridisierungseffizienz war in allen Fällen > 90% (Mittelwert 96,4%).

* Gewertet wurden Zellen mit je 1 Signal.

3.1.3 Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32) mittels FISH Analyse

Die PAC-Klone Y6#1-4 sind proximal, die PAC-Klone $\text{cos}\alpha_{1+2}\#1-4$ distal der Translokationsbruchpunkte auf der Bande 14q32 lokalisiert. In Interphase-Zellkernen liegen die Signale dieser Klone so eng beieinander, dass diese bei der mikroskopischen Auswertung als ein Signal wahrgenommen werden. Durch die Translokation t(11;14)(q13;q32) erfolgt jedoch eine Spaltung der Signale, so dass drei Signale sichtbar sind, von denen eines mit dem Signal des in der Gegenfarbe markierten 11q13-Sonden Pools PAC 55g7#1-4 kolokalisiert ist.

Für die Diagnosestellung einer Translokation t(11;14)(q13;q32) wird somit neben der Spaltung eines der 14q32-Signale auch eine Kolokalisation dieses Signals mit dem 11q13-Signal gefordert, welche in > 90% der Zellen mit drei 14q32-Signalen vorhanden sein muss. Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht der Sondenlokalisationen bei Vorliegen einer Translokation t(11;14)(q13;q32).

A



B

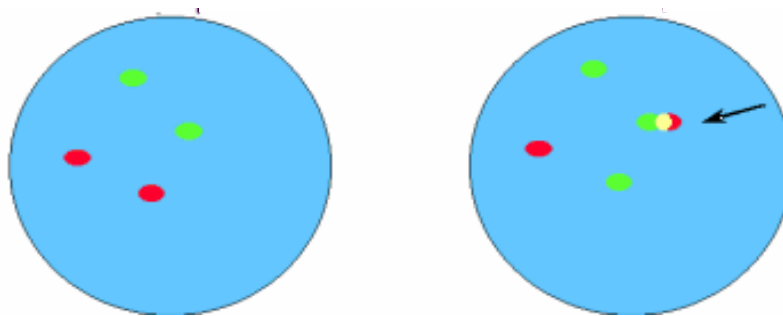


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ mittels FISH

A: Schematische Darstellung der Sondenlokalisierung. Die Sonden PAC 55g7#1-4 auf der Bande 11q13 sind als roter Balken, die Sonden PAC Y6#1-4 und PAC $\text{cos}\alpha_{1+2}$ #1-4 auf der Bande 14q32 als grüne Balken jeweils rechts neben den entsprechenden Chromosomen dargestellt. Durch die Translokation kommt es auf dem derivaten Chromosom 11 (der11) zu einer Kolokalisation zweier unterschiedlich markierter Signale.

B: Schematische Darstellung zweier Interphasekerne. Links ist ein Zellkern ohne, rechts ein Zellkern mit einer Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ dargestellt. Diese ist charakterisiert durch 3 grüne 14q32-Signale, von denen eines mit einem roten 11q13-Signal kolokalisiert (siehe Pfeil).

In allen untersuchten MCL Fällen (n=103) konnte mittels FISH Analyse eine Translokation t(11;14)(q13;q32) nachgewiesen werden. Der Prozentsatz positiver Zellen lag zwischen 17% und 96%. Abbildung 3 zeigt ein Beispiel für den Nachweis einer Translokation t(11;14)(q13;q32) bei einem Patienten mit MCL (Patient Nr. 67).

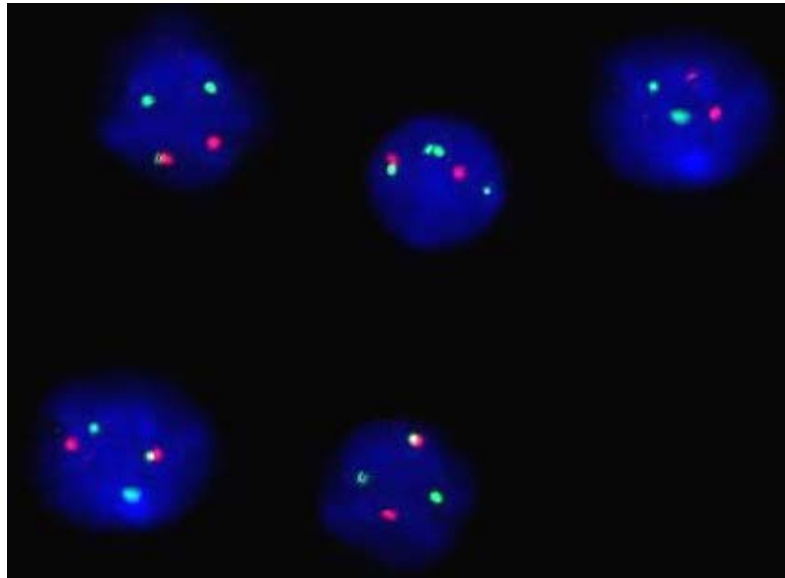


Abbildung 3: Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32) mittels FISH

In der oberen rechten Ecke findet sich ein normaler Interphase-Zellkern mit je zwei 14q32- (grün markiert) und 11q13-Signalen (rot markiert). In den anderen Zellkernen ist eines der 14q32-Signale gespalten und mit einem 11q13-Signal kolokalisiert (je 3 grüne und 2 rote Signale mit je einer Kolokalisation, zum Teil gelb leuchtend).

3.2 Sekundäre chromosomale Aberrationen beim MCL

Zur Charakterisierung sekundärer chromosomaler Aberrationen wurden alle MCL Fälle (n=103) mit dem vorbeschriebenen DNA-Sonden Set untersucht. Bei sämtlichen Experimenten wurden zwei unterschiedlich markierte DNA-Sonden miteinander hybridisiert, so dass jeweils eine Sonde als interne Kontroll-Sonde der anderen fungieren konnte. Es wurden nur solche Experimente ausgewertet, bei denen die Hybridisierungseffizienz der internen Kontroll-Sonde größer als 90% war und bei denen keine Deletion bzw. kein Zugewinn der Kontroll-Sonde vorlag (d.h. Anzahl der Zellkerne mit einem bzw. drei Signalen < Schwellenwert, s.o.). Bei gleichzeitiger Aberration in der Region der Kontroll-Sonde, d.h.

keine Sonde konnte als interne Kontrolle der anderen dienen, wurde das Experiment mit einer unterschiedlichen Sonden-Kombination wiederholt. Ein Teil der MCL Fälle wies eine Tetraploidie auf, d.h. hier wurden 4 Signale als diploid, weniger als 4 Signale als Deletion und mehr als 4 Signale als Zugewinn gewertet. Wenn beispielsweise ein Patient mit einem tetraploiden Klon von 50% (4 Signale in 50% der Zellen) in einer bestimmten Region in 100% der Zellen 2 Signale aufwies, wurde die Diagnose einer Deletion dieser Region in 50% der Zellen gestellt.

Bei 103 Translokation t(11;14)(q13;q32) positiven MCL Patienten wurde in 92% der Fälle (95/103) eine oder mehrere sekundäre Aberrationen nachgewiesen. Im Median finden sich zusätzlich zur Translokation t(11;14)(q13;q32) 4 weitere chromosomale Veränderungen (Variationsbreite 0-15 Aberrationen/Patient). In 10 Fällen hatten die malignen Zellen einen tetraploiden Chromosomensatz und in 6 weiteren Fällen konnte ein tetraploider Subklon (Anteil tetraploider Zellen < 20%) nachgewiesen werden. Jedoch konnten nicht in allen Fällen alle Sonden ausgewertet werden.

In den untersuchten Regionen fanden sich folgende Zugewinne: +(3q26) in 46/102 Fällen (45%), +(6q21) in 1/103 Fällen (1%), +(7p15) in 15/100 Fällen (15%), +(8p22) in 1/96 Fällen (1%), +(8q24) in 20/103 Fällen (19%), +(10p15) in 2/91 Fällen (2%), +(12q12-q13) in 17/101 Fällen (17%), +(13q14) in 2/99 Fällen (2%), +(13qter) in 4/87 Fällen (5%), +(15q23) in 17/92 Fällen (18%) und +(18q21) in 14/100 Fällen (14%). Bei 6 dieser Veränderungen handelte es sich um einen Zugewinn im Sinne einer Amplifikation der entsprechenden Region. Bei Patient Nr. 12 war die chromosomale Bande 7p15 amplifiziert, bei Patient Nr. 73 die Regionen 12q12-q13 und 13qter, bei Patient Nr. 5 die Bande 18q21 und bei Patient Nr. 43 die beiden Regionen 12q12-q13 und 18q21.

Deletionen fanden sich in folgenden Regionen: del(1p22) in 30/95 Fällen (32%), del(6q21) in 16/103 Fällen (16%), del(6q27) in 21/96 Fällen (22%), del(7p15) in 1/100 Fällen (1%), del(8p22) in 20/96 Fällen (21%), del(9p21) in 35/101 Fällen (35%), del(10p15) in 12/91 Fällen (13%), del(11q22-q23) in 41/94 Fällen (44%), del(13q14) in 44/99 Fällen (44%), del(13qter) in 29/87 Fällen (33%) und del(17p13) in 26/101 Fällen (26%). Von den 35 Patienten mit einer 9p21 Deletion zeigten 8 Fälle eine biallelische Deletion, d.h. einen Verlust beider 9p-Signale. Gleiches gilt für 3 der insgesamt 44 13q14 deletierten Fälle. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der FISH Analyse für die einzelnen Regionen zusammengefasst und in Tabelle 8 in Abhängigkeit von den einzelnen Patienten dargestellt.

* biallelisch deletierte Fälle mit eingeschlossen

Tabelle 7: Sekundäre Aberrationen bei Translokation t(11;14)(q13;q32) positiven MCL Fällen (Ergebnisse einer umfassenden FISH Analyse an 103 Patienten)

Chromosomen-Region	Aberrationen (del oder +)	Anzahl der Patienten*	Variationsbreite der betroffenen Zellen	Median	Inzidenz
1p22	del	30/95	25% - 98%	74,5%	32%
3q26	+	46/102	25% - 94%	64%	45%
6q21	del	16/103	35% - 98%	73,5%	16%
	+	1/103	36%	36%	1%
6q27	del	21/96	15% - 99%	79%	22%
7p15	del	1/100	89%	89%	1%
	+ &	15/100	13% - 84%	54%	15%
8p22	del	20/96	19% - 98%	69%	21%
	+	1/96	65%	65%	1%
8q24	+	20/103	10% - 92%	60%	19%
9p21	del [#]	35/101	19% - 97%	72%	35%
10p15	del	12/91	49% - 96%	80%	13%
	+	2/91	20% - 53%	36,5%	2%
11q22-q23	del	41/94	17% - 99%	79%	44%
12q12-q13	+ &	17/101	22% - 86%	74%	17%
13q14	del [#]	44/99	13% - 97%	78%	44%
	+	2/99	11% - 42%	26,5%	2%
13qter	del	29/87	19% - 97%	74%	33%
	+ &	4/87	8% - 77%	60%	5%
15q23	+	17/92	33% - 76%	57%	18%
17p13	del	26/101	13% - 99%	75%	26%
18q21	+ &	14/100	22% - 92%	65,5%	14%

* nicht bei allen 103 Patienten war jede Region auswertbar.

[#] incl. der Fälle mit biallelischer Deletion (bd).

& incl. der Fälle mit Amplifikation (Ampl).

(Fortsetzung) Tabelle 8: Ergebnisse einer FISH Analyse bei Translokation t(11;14) positiven MCL-Fällen

Pat. Nr.	% t(11;14)	Tetraploidienzahl der Aberration	1p22 YAC 95 bgl +47%	3q25 YAC 86 e67 +84%	6q21 PAC 93 b61 NA	6q27 YAC3 18 r10 NA	7p15 YAC261 b12 +80%	8p22 YAC 54 b55 del 4.4%	8q24 PAC cmyc del 8.7%	9p21 cos p16 del 8.7%	10p15 YAC 813 d3 NA	11q22-q23 PAC ATM2 del	12q12-q13 PAC G13 del	13q14 PAC 27 23 del 8.9%	13q14 PAC 93 b69 del 8.8%	15q23 YAC3 54 e9 del	17p13 PAC p33 del	18q21 YA153 a6 del
53	60%	n	7 del 82%	+47%	del	NA	+80%	del 4.4%	del 8.7%	del 8.7%	NA	del	del	del 8.9%	del 8.8%	del	del	del
54	78%	n	3 del 83%	+84%	del	del	+84%	del	del 8.7%	del 8.7%	del	del	del	del	del	+33%	del	del
55	53%	n	3 del 83%	del	del	del	del	del	del 8.7%	del 8.7%	del	del	del	del	del	del	del	del
56	53%	n	3 del 83%	del	del	del	del	del	del 8.7%	del 8.7%	del	del	del	del	del	del	del	del
57	94%	182n	6 del 82%	del	del 89%	del 89%	del	del	del 8.7%	del 8.7%	del	del 7.1%	del 7.1%	del 8.7%	del 8.4%	del	del 78%	del
58	71%	n	4 del 89%	del	del 89%	del 89%	+37%	del	del 7.9%	del 7.9%	del	del 6.6%	del 6.6%	del 8.2%	del 6.0%	del	del	NA
59	*	11.4n	8 del 68%	del	del 36%	del 51%	del	del	del 7.9%	del 7.9%	del	del 6.6%	del 6.6%	del 8.2%	del 6.0%	del	del	NA
60	*	n	2 del 84%	+64%	del	del 80%	del	del	del 7.9%	del 7.9%	del	del 6.6%	del 6.6%	del 8.2%	del 6.0%	del	del	del
61	95%	n	8 del 70%	+70%	del	del 80%	del	del	del 7.9%	del 7.9%	del	del 6.6%	del 6.6%	del 8.2%	del 6.0%	del	del	+82%
62	*	n	1 del 81%	del	del	del	del	del	del 7.9%	del 7.9%	del	del 6.6%	del 6.6%	del 8.2%	del 6.0%	del	del	del
63	*	n	4 del 81%	del	del	del	+13%	del 8.8%	del 7.0%	del 7.0%	del	del	del	del 7.5%	del 7.0%	del	del	del
64	62%	n	1 del 81%	del	del	del	del	del	del 7.0%	del 7.0%	del	del	del	del 7.5%	del 7.0%	del	del	del
65	23%	162n	7 del 89%	del	del 91%	del 91%	del	del	del	del	del	del	del	del 8.3%	del 8.3%	del	del	+83%
66	82%	n	3 del 79%	+79%	del	del	del	+60%	del 7.2%	del 7.2%	del	del	del	del 6.6%	del 5.4%	del	del	del
67	46%	n	2 del 89%	+69%	del	del 89%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del 21%	del
68	74%	n	5 del 89%	del	del 89%	del 89%	del	del	del	del	del	del	del	del	del 7.9%	+74%	del	del
69	70%	n	1 del 89%	+91%	del	del 79%	del	del	del	del	del	del 8.0%	del 8.0%	del 8.5%	del	del	del	del
70	85%	n	5 del 81%	+64%	del 81%	del 79%	del	del	del	del	del	del 8.0%	del 8.0%	del 8.5%	del	del	del	del
71	70%	n	0 del 82%	del	del	del	del	del	del 6.2%	del 6.2%	del	del	del	del	del	del	del	del
72	63%	n	5 del 82%	del	del	del	del	del	del 6.2%	del 6.2%	del	del	del	del	del 5.1%	+55%	del 79%	del
73	52%	161n	7 del 83%	del	del	del	del	del	del 7.3%	del 7.3%	del	del	del	del 7.5%	del 7.5%	del 56%	del 99%	del
74	30%	n	4 del 74%	del	del	del	+34%	del	del 7.3%	del 7.3%	del	del	del	del	del	del	del	del
75	81%	n	4 del 69%	+78%	del	del	del	del	del 7.5%	del 7.5%	del	del 7.5%	del 7.5%	del 7.9%	del	del	del	del
76	25%	n	3 del 30%	del	del	del	del	del	del 2.9%	del 2.9%	del	del	del	del	del	del	del	del
77	70%	n	3 del 30%	del	del	del	del	del	del 2.9%	del 2.9%	del	del	del	del	del	del	del	del
78	59%	114n	7 del 72%	+72%	del	del 79%	del	del	del 8.8%	del 8.8%	del	del	del	del 7.5%	del 6.0%	del	del 79%	del
79	48%	n	7 del 63%	+43%	del 79%	del 79%	del	del 3.7%	del 4.3%	del 4.3%	del	del	del	del 7.5%	del 6.0%	del	del 79%	del
80	59%	n	2 del 65%	del	del	del	del	del	del 8.9%	del 8.9%	del	del	del	del	del	del	del	+68%
81	17%	n	6 del 59%	+59%	del	del	del	del	del 8.9%	del 8.9%	del	del	del	del	del	del	del 13%	del
82	72%	n	2 del 78%	+78%	del	del	del	del	del 8.9%	del 8.9%	del	del	del	del	del	del	del	del
83	*	n	4 del 82%	del	del	del	del	del	del 5.4%	del 5.4%	del	del	del	del	del	del	del	del
84	87%	n	9 del 82%	+25%	del	del	del	del	del 5.4%	del 5.4%	del	del	del	del	del	del	del	del
85	71%	n	3 del 82%	del	del	del	del	del	del 5.4%	del 5.4%	del	del	del	del	del	del	del	del
86	72%	169n	8 del 35%	+26%	del 35%	del 36%	+39%	del 2.3%	del 3.7%	del 3.7%	del	del	del	del 5.5%	del 5.4%	del	del 85%	del
87	80%	n	2 del 84%	+84%	del	del	del	del	del 2.3%	del 2.3%	del	del	del	del	del 8.0%	del	del	del
88	50%	n	5 del 84%	+32%	del	del	del	del	del 2.9%	del 2.9%	del	del	del	del	del	del	del	del
89	51%	130n	3 del 26%	del	del	del	del	del	del 2.1%	del 2.1%	del	del	del	del	del	del	del	+22%
90	46%	n	0 del 46%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
91	21%	n	1 del 11%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
92	50%	n	3 del 82%	+55%	del	del 35%	del	del 2.7%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
93	91%	n	0 del 91%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
94	72%	n	1 del 72%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
95	76%	n	6 del 69%	+49%	del 41%	del 52%	del	del 3.6%	del 6.0%	del 6.0%	del	del	del	del 5.7%	del 2.9%	del	del	+33%
96	56%	n	9 del 75%	+56%	del 39%	del 39%	+49%	del 3.6%	del 2.3%	del 2.3%	del	del	del	del 4.2%	del 4.6%	del	del 27%	del
97	91%	165n	6 del 75%	+72%	del 89%	del 89%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del 85%	del
98	30%	n	2 del 82%	+28%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
99	93%	n	1 del 82%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
100	89%	n	5 del 82%	del	del	del	del	del 7.8%	del 8.6%	del 8.6%	del	del	del	del 8.3%	del 4.7%	del	del	del
101	73%	n	3 del 82%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del
102	73%	112n	8 del 82%	+72%	del 89%	del 15%	del	del 1.9%	del 1.0%	del 1.0%	del	del	del	del 8.0%	del 7.6%	del	del	del
103	91%	n	3 del 82%	del	del 76%	del 76%	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del	del

Zeichenerklärung: * t(11;14) + ohne Prozentangabe, n = keine Tetraploidie, j/(j) = tetraploid (Subklon), di = diploid, del = Deletion, bd = bialeleische Deletion, # = Zugewinn, Ampl = Amplifikation, NA = Experiment nicht auswertbar.

Insgesamt weisen somit 92% der Patienten mit einem Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ positiven MCL sekundäre chromosomale Veränderungen auf. Nur bei 8% der Patienten (8/103) finden sich mit unserem DNA-Sonden Set keine weiteren Aberrationen zusätzlich zur Translokation $t(11;14)(q13;q32)$. Am häufigsten sind Zugewinne der Regionen 3q26 (45%), 8q24 (19%), 15q23 (18%), 12q12-q13 (17%), 7p15 (15%) und 18q21 (14%). Als häufige Deletionen finden sich Aberrationen der Banden 13q14 (44%) und 11q22-q23 (44%), gefolgt von 9p21 (35%), 13qter (33%), 1p22 (32%), 17p13 (26%), 6q27 (22%), 8p22 (21%), 6q21 (16%) und 10p15 (13%).

In den Abbildungen 4 und 5 sind die Ergebnisse der Tabellen 7 und 8 nochmals graphisch dargestellt. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen einige Beispiele der FISH Experimente.

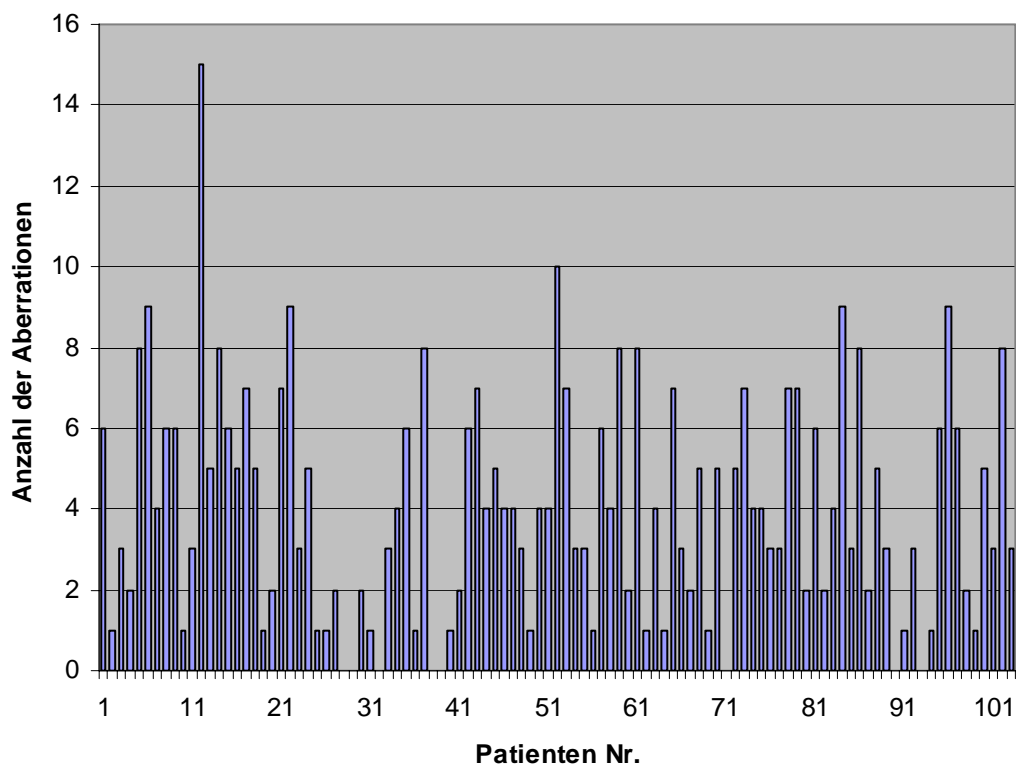


Abbildung 4: Anzahl sekundärer chromosomaler Aberrationen pro Patient
Median 4 Aberrationen/Patient.

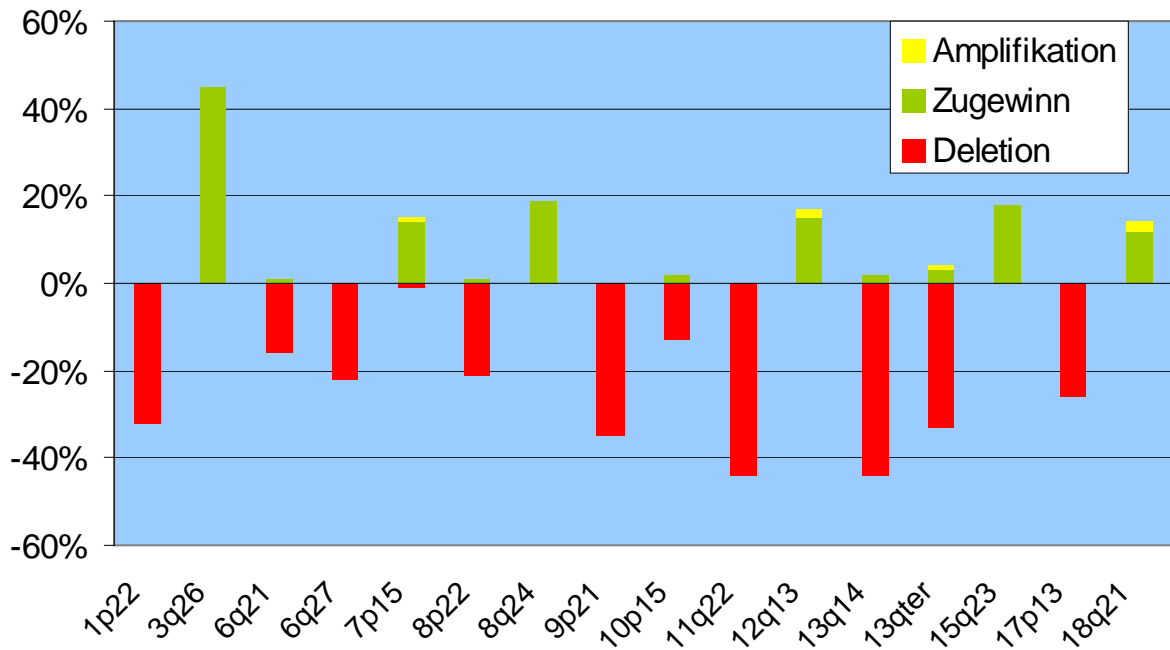


Abbildung 5: Sekundäre Aberrationen Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ positiver MCL Fälle

Aberrationsangaben in % der untersuchten Fälle.

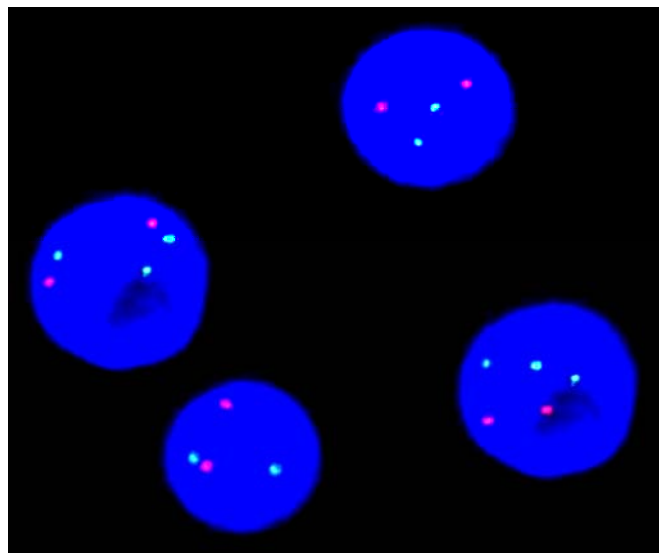


Abbildung 6: Zugewinn 3q26 in 55% der Zellen (Patient Nr. 92)

Unten links, sowie oben rechts Zellkerne ohne Aberrationen (2 grüne und rote Signale). Die beiden anderen Zellkerne zeigen einen 3q26 Zugewinn (3 grüne Signale), sowie zwei rote Signale (Sonde für die Region 6q21).

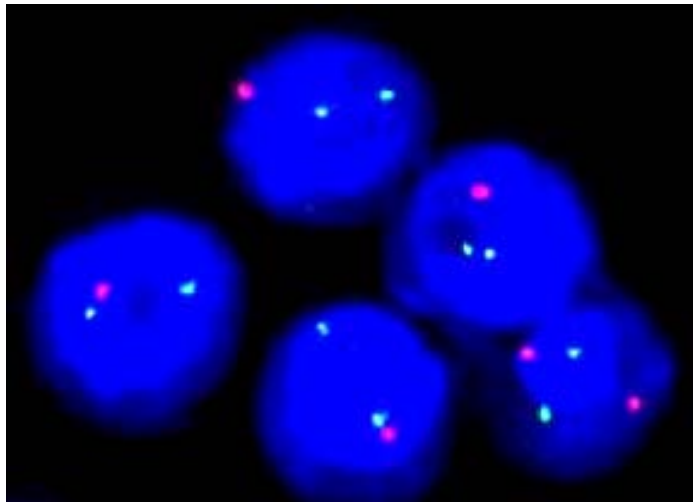


Abbildung 7: Deletion 9p21 in 88% der Zellen (Patient Nr. 77)

Unten rechts normaler Zellkern mit je 2 roten (9p21) und grünen (11q22-q23) Signalen. Alle anderen Zellkerne weisen eine monoallelische 9p21 Deletion auf (nur ein rotes Signal, aber beide grünen Kontrollsignale vorhanden).

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Die Zytogenetik zählt heute neben Morphologie, Zytochemie und Immunphänotypisierung zu den wichtigsten diagnostischen Methoden in der hämatologischen Onkologie, da viele chromosomale Aberrationen bei hämatologischen Neoplasien mit spezifischen morphologischen, immunologischen und klinischen Charakteristika assoziiert sind (Mitelman et al. 1990, Mitelman 1994).

Den Goldstandard in der zytogenetischen Diagnostik nimmt immer noch bei vielen Erkrankungen, wie z.B. der akuten myeloischen Leukämie (AML), die konventionelle zytogenetische Bänderungsanalyse ein. Mit ihrer Hilfe kann das komplette Genom ohne Vorkenntnisse über genetische Veränderungen beurteilt werden. Vorteile neuer Techniken wie der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) liegen hingegen (i) in einem höheren Auflösungsvermögen (im Kilobasenpaaren-Bereich im Gegensatz zum Megabasenpaaren-Bereich bei der Bänderungsanalyse) und (ii) im Nachweis chromosomaler Veränderungen auf Interphase-Zellkernniveau, d.h. es werden keine proliferierenden Zellen bzw. Mitosen benötigt; (iii) des Weiteren können genetische Subgruppen innerhalb einer Tumorentität detektiert werden, da die Auswertung auf Einzelzellkern-Niveau erfolgt.

Erste FISH Analysen beim MCL bestätigten Nachteile konventioneller Bänderungstechniken und zeigten ihre Überlegenheit in der Untersuchung spezifischer sekundärer Veränderungen (Coignet et al. 1996, Cuneo et al. 1999). Als Konsequenz hieraus ergeben sich deutliche Unterschiede in den Ergebnissen zytogenetischer Bänderungsanalysen: (i) Nachweis einer größeren Inzidenz normaler Karyotypen, da unter den Kulturbedingungen bevorzugt eine Proliferation normaler Lymphozyten stattfinden kann, (ii) Nachweis chromosomaler Aberrationen des Hauptklons mit fehlendem Nachweis von Veränderungen in Subklonen, sowie (iii) die Unmöglichkeit des Nachweises kleiner Aberrationen, v.a. Deletionen.

Entsprechend konventioneller Bänderungstechniken kann mittels CGH (Comparative Genomic Hybridization) Tumormaterial mit unbekanntem genetischen Aberrationen untersucht werden (Kallioniemi et al. 1992, du Manoir et al. 1993, Joos et al. 1993), jedoch mit dem Vorteil einer höheren Sensitivität (Bentz et al. 1995). Trotzdem liegt das

Auflösungsvermögen dieser sehr aufwendigen Technik deutlich unter dem der FISH, so dass diese für die Untersuchung bekannter Aberrationen besser geeignet ist. Diesbezüglich übertrifft die FISH auch weitere molekulargenetische Methoden, wie Southern-Blot oder RFLP-Techniken. Neben der Detektion selbst kleiner Aberrationen ist hier vor allem der Nachweis chromosomaler Veränderungen auf Einzelzell-Niveau entscheidend (Bentz et al. 1994, Joos et al. 1994, Lichter et al. 1996).

Bei der Untersuchung der für das MCL charakteristischen Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ konnte im direkten Vergleich mit quantitativer RT-PCR, PCR und Immunhistologie die Überlegenheit der FISH ebenso bestätigt werden (Belaud-Rotureau et al. 2002). Im Gegensatz zu den letztgenannten Methoden konnte eine Unabhängigkeit der FISH Ergebnisse von Materialart und Konservierungstechnik nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich eine Limitierung der PCR-Methodik im Nachweis der Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ aufgrund der weit verstreut liegenden 11q13 Bruchpunkte (Region größer als 120 kb).

4.2 Inzidenz sekundärer chromosomaler Aberrationen beim MCL

4.2.1 Ergebnisse klassischer Bänderungsanalysen

In nahezu allen MCL Fällen lässt sich eine Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ nachweisen, die heute als das für die Pathogenese entscheidende primäre Ereignis angesehen wird (Weisenburger et al. 1996). Jedoch reicht eine alleinige Überexpression von Cyclin D1 nicht zur malignen Transformation der betroffenen Zellen aus (Bodrug et al. 1994, Lovec et al. 1994a). Folglich müssen noch andere Faktoren zur Pathogenese des MCL beitragen. Mit Hilfe konventioneller Bänderungsanalysen konnten weitere rekurrente chromosomale Aberrationen identifiziert werden, die eine Beteiligung bestimmter Gene nahe legen. Jedoch ist die Datenlage hierzu bislang spärlich (Mitelman 2003).

In zwei großen Bänderungsanalysen konnte in ca. 48% bzw. 58% der untersuchten MCL Fälle sekundäre chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden (Cuneo et al. 1999, Wlodarska et al. 1999). Die alleinige Betrachtung Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ positiver Fälle zeigte jedoch eine deutlich höhere Inzidenz von 91% bzw. 94% (Wlodarska et al. 1999, Onciu et al. 2001). Etwa 16% hatten 1-2 zusätzliche Aberrationen, 33% der Fälle 3 oder 4 und 45% mehr als 4 Sekundärveränderungen (Onciu et al. 2001). Konventionelle

zytogenetische Studien konnten ferner belegen, dass zusätzliche Chromosomen-Veränderungen beim MCL hauptsächlich aus unbalancierten Rearrangements bestehen, die zu einem Verlust oder Zugewinn von DNA führen. Eine Übersicht der bis dato publizierten Fälle von Johansson et al. machte deutlich, dass diese sekundären Aberrationen bei Translokation t(11;14)(q13;q32) positiven Non-Hodgkin Lymphomen nicht zufällig über das Genom verteilt sind, sondern rekurrent auftreten (Johansson et al. 1995). Die häufigsten Veränderungen waren: -Y, del 6q, -13 und +3. In einer Zusammenfassung von in den 90iger Jahren publizierten 131 gut dokumentierten MCL Fällen aus insgesamt 6 Bänderungsanalysen (Vandenberghe et al. 1991, Leroux et al. 1991, Nowotny et al. 1996, Siebert et al. 1998, Cuneo et al. 1999, Wlodarska et al. 1999) fanden sich folgende sekundäre Aberrationen in mehr als 5 Fällen (der Häufigkeit nach geordnet): Deletion/Translokation (del/t) 6q15-q23 (n=15, 11%); -13 (n=14, 11%); del/t 1p21-31 (n=12, 9%); +3q (n=11, 8%); del/t 17p (n=9, 7%); 8p Translokationen (n=8, 6%); -Y (n=8, 6%); -20 (n=7, 5%); del/t 9q, del 10q22-q24, del/t 11q21-q23, del 13q14, -21, -22 und -X in je 6 Fällen (n=6, 5%). Obwohl keine dieser Sekundärveränderungen für das MCL spezifisch ist, zeigen diese Daten, dass bestimmte rekurrente sekundäre chromosomale Aberrationen für das MCL charakteristisch sind, deren weitere Abklärung von großem Interesse ist.

4.2.2 Ergebnisse molekularzytogenetischer Analysen

Gegen Ende der 90iger Jahre wurde mittels einer neuen Technik, der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH), die Charakterisierung sekundärer genomischer Aberrationen beim MCL verbessert. Vorteile der CGH gegenüber konventionellen Bänderungsanalysen liegen (i) in einer schnellen Analyse chromosomaler Imbalancen eines Tumorgenoms ohne die Notwendigkeit von Zellkulturen und Metaphasenpräparation der Tumorzellen, sowie (ii) in einem höheren Auflösungsvermögen. Während mittels konventioneller Zytogenetik nur einige Aberrationen, wie z.B. eine Deletion 6q oder 13q, in über 10% der Fälle nachgewiesen werden konnten, zeigten die Ergebnisse von 4 CGH Studien übereinstimmend deutlich höhere Inzidenzen für die einzelnen rekurrenten Aberrationen (Monni et al. 1998, Beà et al. 1999, Bentz et al. 2000, Allen et al. 2002).

In 85-100% der Fälle wurden in diesen Studien sekundäre Chromosomen-Aberrationen nachgewiesen. Die häufigsten Überrepräsentationen betrafen die chromosomalen Regionen 3q, 7p, 8q, 9q, 12q, 15q und 18q. Chromosomale Verluste fanden sich vor allem in den Regionen 1p, 6q, 8p, 9p, 10p, 11q, 13q und 17p. Die Ergebnisse der einzelnen Studien sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Zusammenfassung der CGH-Daten beim MCL
(Ergebnisse aus 4 Studien)**

	Monni et al. 1998 (n=27)	Beà et al. 1999 (n=45)	Bentz et al. 2000 (n=27)	Allen et al. 2002 (n=30)	Mittelwert
sekundäre Aberrationen*	100%	89%	85%	100%	94%
Überrepräsentationen					
3q	52%	49%	37%	70%	52%
7p	15%	27%	7%	23%	18%
8q	30%	22%	19%	13%	21%
12q	11%	20%	19%	30%	20%
15q	26%	11%	4%	23%	16%
18q	7%	18%	26%	7%	15%
Unterrepräsentationen					
1p	33%	24%	33%	33%	31%
6q	30%	27%	19%	37%	28%
8p	7%	7%	30%	23%	17%
9p	30%	16%	30%	17%	23%
10p	0%	18%	11%	13%	11%
11q	30%	22%	19%	27%	25%
13q	41%	44%	70%	60%	54%
17p	19%	16%	4%	23%	16%

* chromosomale Aberrationen zusätzlich zur Translokation t(11;14)(q13;q32).

Diese Daten zeigen eindrucksvoll, dass das MCL durch eine große Anzahl rekurrenter Sekundäraberrationen charakterisiert ist. Ein Vergleich der Inzidenzen der einzelnen Veränderungen in den verschiedenen Studien verdeutlicht jedoch auch, dass diese ersten Ergebnisse durch weitere Analysen bestätigt werden müssen. Während sich z.B. die Prozentsätze in Bezug auf Verluste von 1p22 nur geringfügig unterscheiden, bestehen für andere Regionen wie 3q doch erhebliche Diskrepanzen. Ursachen hierfür liegen zum einen in den relativ kleinen Fallzahlen der einzelnen Studien, sowie in der Heterogenität des Patientenmaterials und Patientenkollektivs. Während in drei Studien fast ausschließlich Frischmaterial für die Analyse verwendet wurde (Monni et al. 1998, Beà et al. 1999, Bentz et al. 2000), basierte die Studie von Allen et al. auf archiviertem Paraffin-Material (Allen et al. 2002). Auch in der Auswahl der eingeschlossenen Fälle zeigen sich Unterschiede. Im Patientenkollektiv von Beà und Monni lag der Anteil von blastoiden MCL Fällen bei 41% bzw. 44%, während Allen et al. ausschließlich die typische Variante dieses Lymphoms untersuchten. Beà und Monni fanden neben einem höheren Anteil an sekundären Aberrationen in der blastoiden Population (Median 4,5 Veränderungen/Fall vs. 3 Veränderungen/Fall beim typischen MCL) auch signifikante Inzidenzdifferenzen bestimmter Regionen beim blastoiden Subtyp (Überrepräsentationen von 3q, 7p, 12q und Verluste von 17p).

Um eine genauere Aussage über die „wahren“ Inzidenzen sekundärer Chromosomen-Aberrationen beim MCL treffen zu können, ist folglich die Analyse einer größeren Fallzahl mit einer sensitiveren Methode als der CGH notwendig. In der vorliegenden Studie wurde aus diesem Grund Frischmaterial von 103 Translokation t(11;14)(q13;q32) positiven MCL Fällen mit Hilfe der FISH untersucht.

Anhand der CGH Profile konnten für die häufigsten Über- und Unterrepräsentationen folgende Konsensusregionen auf den einzelnen Chromosomen abgegrenzt werden (Monni et al. 1998, Beà et al. 1999, Bentz et al. 2000): (i) Überrepräsentationen: 3q26-q27, 7p15-p22, 8q24, 12q13, 15q22-q23, 18q23; (ii) Unterrepräsentationen: 1p21-p22, 6q21-q22, 6q25-q27, 8p22, 9p21-ter, 10p14-p15, 11q21-q23, 13q14-q21, 13q32-ter, 17p13.

Diese Daten, sowie unsere Erfahrungen aus FISH Analysen bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) (Döhner et al. 2000, Stilgenbauer et al. 2002), lieferten die Grundlage für die Auswahl unseres FISH-Sonden Sets zur besseren Charakterisierung sekundärer Aberrationen beim MCL. Zum Nachweis chromosomaler Zugewinne wählten wir DNA-Sonden in den Regionen 3q26-q27, 7p15, 8q24, 12q12-q13, 15q23 und 18q21; für die

Detektion von Deletionen Sonden kartierend auf 1p22, 6q21, 6q27, 8p22, 9p21, 10p15, 11q22-q23, 13q14, 13qter und 17p13.

In unserer FISH Analyse bestehend aus 103 Translokation t(11;14)(q13;q32) positiven Mantelzell Lymphomen zeigten insgesamt 92% der Fälle sekundäre Chromosomen-Aberrationen. Zugewinne fanden sich am häufigsten in den Regionen 3q26 (45%), 8q24 (19%), 15q23 (18%), 12q12-q13 (17%), 7p15 (15%) und 18q21 (14%). Als häufige Deletionen fanden sich Aberrationen der Banden 13q14 (44%) und 11q22-q23 (44%), gefolgt von 9p21 (35%), 13qter (33%), 1p22 (32%), 17p13 (26%), 6q27 (22%), 8p22 (21%), 6q21 (16%) und 10p15 (13%).

Somit konnte die bereits in den CGH Studien beschriebene große Inzidenz sekundärer Veränderungen beim MCL bestätigt werden, jedoch fanden sich auch 8 Translokation t(11;14)(q13;q32) positive Fälle ohne weitere mit unseren Sonden nachweisbare genomische Aberrationen (8%). Im Gegensatz zu den Ergebnissen konventioneller Bänderungsanalysen lassen sich mittels FISH mehr Fälle mit 1-2 zusätzlichen genomischen Aberrationen nachweisen (26% versus 16%). In 26% der Fälle konnten wir 3-4 zusätzliche Veränderungen und in 40% mehr als 4 Veränderungen detektieren.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der CGH Studien (Monni et al. 1998, Bentz et al. 2000) fanden sich im Median 4 Sekundäraberrationen/Fall. Es zeigte sich jedoch in der FISH Analyse eine größere Spannweite der Veränderungen (0-15 Aberrationen/Fall vs. 0-9 Aberrationen/Fall bei Bentz et al. 2000).

Der Nachweis tetraploider Klone bei Non-Hodgkin Lymphomen vom B-Zell Typ ist eine Seltenheit (Mitelman 1994). 1995 wurde jedoch erstmals gezeigt, dass das MCL diesbezüglich eine Ausnahme darstellt (Daniel et al. 1995). Eine nachfolgende Studie konnte in 15 von 50 MCL Fällen (30%) mittels FISH tetraploide Chromosomenklone detektieren (Ott et al. 1997). Interessanterweise fand sich eine Korrelation zwischen der Morphologie der MCL Fälle und dem Vorliegen einer Tetraploidie. Während normale MCL Varianten in 8% der Fälle tetraploid waren, zeigten 54% der blastoiden MCL Fälle eine Verdopplung des Chromosomensatzes. Die Tatsache, dass in unserer Studie nur 16 Fälle (15%) tetraploid waren, dürfte auf einen geringeren Anteil blastoider Fälle in unserem Kollektiv zurückzuführen sein. Warum nur ein Teil dieser Erkrankung tetraploide Klone entwickelt, ist bislang ungeklärt. Diese Fälle zeichnen sich jedoch durch eine größere Anzahl sekundärer Chromosomen-Aberrationen aus (Median 6,5 Veränderungen/Fall mit einer Spannweite von 1-15 Aberrationen vs. Median 3 Veränderungen/Fall mit einer Spannweite von 0-10

Aberrationen beim diploiden Karyotyp) und spiegelt so die größere genetische Instabilität dieser Fälle wieder.

Bezüglich der einzelnen Sekundäraberrationen zeigen die Ergebnisse unserer umfassenden FISH Untersuchung eine weitgehende Übereinstimmung mit den entsprechenden Mittelwerten der 129 publizierten CGH Fälle (Monni et al. 1998, Beà et al. 1999, Bentz et al. 2000, Allen et al. 2002). Dies gilt insbesondere für die durch Zugewinne charakterisierten Loci 3q (45% in der FISH vs. 52% in den CGH Analysen), 7p (15% vs. 18%), 8q (19% vs. 21%), 15q (18% vs. 16%), 12q (17% vs. 20%), 18q (14% vs. 15%) und für die deletierten Regionen 1p (32% vs. 31%), 6q (26% vs. 28%), 8p (21% vs. 17%), 10p (13% vs. 11%). Die geringfügigen Abweichungen lassen sich zum einen durch die geringen Fallzahlen und die unterschiedliche Verteilung von typischen und blastoiden Varianten im Untersuchungskollektiv erklären, zum anderen durch die Tatsache, dass mittels FISH Analyse nur die minimal deletierte bzw. überrepräsentierte Konsensusregion untersucht wurde.

13q Deletionen wurden mit Hilfe der CGH im Mittel in 54% der Fälle beschrieben. Unsere Untersuchungen der Regionen 13q14 und 13qter zeigten Inzidenzen von 44% und 32%. In 24 Fällen waren beide Regionen von der Deletion betroffen, in 10 Fällen nur die proximale Bande 13q14 und in 4 Fällen allein die terminale Region. Zusammenfassend lassen sich somit in insgesamt 52% unserer Fälle 13q Deletionen detektieren und folglich besteht kein signifikanter Unterschied zu den CGH Ergebnissen ($p=0,691 \chi^2$ -Test). Ein direkter Vergleich unserer 13q14 Deletionsraten (44%) mit den entsprechenden Unterrepräsentationen in dieser spezifischen Region (33%) weist auf die Überlegenheit der FISH hin. Eine weitere FISH Analyse von 32 MCL Fällen zeigte eine weitgehende Konkordanz mit unseren 13q Ergebnissen (38%) (Rosenwald et al. 1999).

Im Vergleich zu den CGH Ergebnissen fanden wir mit Hilfe der FISH signifikant mehr 11q Aberrationen (44% vs. 25%, $p=0,003 \chi^2$ -Test), sowie deutlich mehr 9p Deletionen (35% vs. 23%, $p=0,057 \chi^2$ -Test) und 17p Deletionen (26% vs. 16%, $p=0,077 \chi^2$ -Test). Beim Nachweis dieser Deletionen zeigte sich die größere Sensitivität der FISH bei der Detektion von Deletionen relativ kleiner chromosomaler Konsensusregionen. Die von uns nachgewiesene hohe Inzidenz von 11q22-q23 Aberrationen bestätigt somit die hohen Inzidenzen zweier kleinerer FISH Studien von Monni (49%) und Camacho (45%) (Monni et al. 1999, Camacho et al. 2002) und weist darauf hin, dass die FISH Ergebnisse von Martinez-Climent et al. (21% 11q Aberrationen in 29 MCL Fällen) wahrscheinlich auf einer geringen Fallzahl beruhen (Martinez-Climent et al. 2001).

Ein Vergleich der 9p Ergebnisse spricht ebenfalls für eine höhere Empfindlichkeit der FISH. Für die Heterogenität der Inzidenzen in den einzelnen CGH Studien könnte die unterschiedliche Zusammensetzung des Patientenkollektivs mitverantwortlich sein. Pinyol et al. zeigten eine Assoziation von 9p Deletionen zur aggressiven Variante des MCL, daher kann die niedrige Inzidenz dieser Aberration bei Allen et al. auf die fehlende Vertretung dieser Entität in der Untersuchungsgruppe zurückzuführen sein (Pinyol et al. 1997). Eine Bestätigung unserer 9p Ergebnisse wurde in einer 53 MCL Fälle umfassenden Matrix-CGH Analyse erbracht (Inzidenz von 9p Verlusten in 36%) (Kohlhammer et al. 2004).

In unserer Studie konnten wir basierend auf der sensitiven FISH Analyse auch deutlich mehr 17p Deletionen nachweisen. Während mittels CGH 16% der Fälle eine 17p Unterrepräsentation aufwiesen, konnten wir mit einer 17p13 Sonde in 26% eine Deletion ausmachen. Der Unterschied zu den CGH Ergebnissen ist zwar nicht signifikant, jedoch zeigen die Ergebnisse einen starken Trend (26% vs. 16%, $p=0,077$ χ^2 -Test). Unsere Inzidenzen bestätigen somit die Resultate einer FISH Studie von Bigoni et al., der ebenfalls einen 17p13 Verlust in 26% der MCL Fälle nachweisen konnte (Bigoni et al. 2001).

Das MCL ist durch ein primäres zytogenetisches Ereignis, die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, charakterisiert. Wie wir gezeigt haben, finden sich zusätzlich zu dieser primären Aberration in fast allen Fällen weitere sekundäre Chromosomen-Aberrationen, sowie in einigen Fällen eine Tetraploidie. Dies spricht dafür, dass es im Rahmen der Pathogenese des MCL zu einer klonalen Evolution kommt. Für eine Bestätigung dieser Hypothese können die unterschiedlichen prozentualen Anteile Sekundäraberrationen tragender Zellen innerhalb eines MCL Falles herangezogen werden. Während z.B. bei Fall Nr. 21 die Aberrationen in den Regionen 7p15, 8p22, 9p21, 13q14, 13qter und 15q23 in jeweils über 75% der Zellen nachweisbar sind, findet sich ein Zugewinn von 3q26 nur in 41%. Dieser lässt sich ausschließlich in Zellen mit den oben beschriebenen Sekundäraberrationen nachweisen, jedoch zeigen etwa 40% der Zellen mit einer Deletion 13q14 keine Überrepräsentation von 3q26. Folglich muss sich der Zugewinn von genetischem Material des langen Armes von Chromosom 3 zu einem späteren Zeitpunkt als der Verlust auf Chromosom 13 ereignet haben. In weiteren Fällen finden sich ebenfalls Regionen mit genomischen Veränderungen in 80-90% der Zellen, die zusätzlich Subklone mit Aberrationen in einem deutlich niedrigeren Prozentsatz der Interphase-Zellkerne aufweisen. Jedoch lassen sich anhand dieser Fälle keine spezifischen sekundären chromosomalen Aberrationen ausmachen, die rekurrent früher in der Krankheitsevolution auftreten als andere.

Somit scheint die Akkumulation genetischer Aberrationen an sich von pathogenetischer Bedeutung zu sein (siehe unten).

Ein weiteres auf die genomische Instabilität des MCL hinweisendes Phänomen ist der Nachweis von DNA-Amplifikationen, die indikativ für Gen-Amplifikationen sind. Lymphome wurden früher aufgrund fehlender Nachweisverfahren nur in seltenen Fällen mit zytogenetischen Aberrationen im Sinne von Gen-Amplifikationen assoziiert (Ben-Yahuda et al. 1994). Mit Hilfe der CGH konnte jedoch eine größere Anzahl genomischer Amplifikationen bei Non-Hodgkin Lymphomen beschrieben werden, die eine erhöhte Inzidenz dieser Aberrationen bei lymphoproliferativen Erkrankungen vermuten ließ (Werner et al. 1997, Knuutila et al. 1998). In den verschiedenen MCL CGH Analysen wurden DNA-Amplifikationen in über 15 verschiedenen Regionen in 19%, 36% bzw. 26% der Fälle nachgewiesen (Monni et al. 1998, Beà et al. 1999, Bentz et al. 2000). Interessanterweise finden sich die meisten Amplifikationen in Regionen des Genoms, die für ihre erhöhte Fragilität bekannt sind (Beà et al. 1999) und weisen eine Assoziation mit der blastoiden Variante des MCL auf (Monni et al. 1998), welche durch eine erhöhte genetische Instabilität charakterisiert ist. Mittels unserer FISH Analyse konnten in 4 verschiedenen Regionen (7p15, 12q12-q13, 13qter, 18q21) 6 DNA-Amplifikationen in 4 MCL Fällen detektiert werden. Die mit einer Inzidenz von 4% deutlich niedrigere Nachweisrate im Vergleich zu den CGH Studien ist zurückzuführen auf: (i) eine geringere Anzahl blastoider MCL Varianten in unserem Kollektiv; (ii) die Tatsache, dass die FISH Analyse keine Genom-umfassende Nachweismethode für chromosomale Aberrationen ist; und (iii) somit viele der beschriebenen amplifizierten Loci von unserem DNA-Sonden Set nicht abgedeckt sind. Wie erwartet zeigen die amplifizierten Fälle Zeichen einer erhöhten genomischen Instabilität im Sinne von ≥ 7 Sekundäraberrationen, sowie einer Tetraploidie in 3 Fällen.

4.3 Pathogenetische Bedeutung sekundärer Aberrationen beim MCL

Der häufigste Zugewinn von chromosomalem Material findet sich beim MCL in der Bande 3q26. Basierend auf dieser Tatsache ist es sehr wahrscheinlich, dass sich ein pathogenetisch relevantes Onkogen (bzw. Onkogene) in dieser Region befindet. Ein offensichtliches Kandidaten-Onkogen stellte *BCL6* auf 3q27 dar, das jedoch in einer Serie von 14 MCL Fällen nicht an 3q Aberrationen beteiligt war (Otsuki et al. 1995). Auch in einer Studie von Beà et al. liegt *BCL6* außerhalb der kritischen Region und ist in den Fällen mit

einer 3q Amplifikation ebenfalls nicht betroffen (Beà et al. 1999). In einer quantitativen Expressionsanalyse konnten beim MCL zwei überexprimierte Gene in dieser Region identifiziert werden, *ETV5* und *TRAIL*, jedoch fand sich keine Korrelation der Expression mit dem Vorliegen genomischer Aberrationen (Korz et al. 2002). Letztendlich ist das involvierte Gen weiterhin unbekannt. Gleiches gilt für die mit 18% überrepräsentierte Region 15q23. Auch hier konnte bislang kein Kandidatengen identifiziert werden.

19% der MCL Fälle zeigen einen Zugewinn von 8q24, der Lokalisation des Proto-Onkogens *MYC*, das für einen die Zellproliferation und Apoptose regulierenden Transkriptionsfaktor kodiert. Genetische Aberrationen, die zu einer Überexpression von *MYC* führen, sind in vielen Neoplasien von pathogenetischer Relevanz, Non-Hodgkin Lymphomen miteingeschlossen. Beim MCL ließ sich in transgenen Mausmodellen durch eine gleichzeitige Überexpression von Cyclin D1 und *MYC* eine lymphoproliferative Transformation induzieren (Bodrug et al. 1994, Lovec et al. 1994b). Beim Menschen konnten Beà et al. in einem MCL Fall eine *MYC* Amplifikation nachweisen, in 4 weiteren Fällen mit einem Zugewinn von 8q24 fanden sich jedoch keine *MYC* Alterationen (Beà et al. 1999). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Studie von Hernandez et al., die in 38% der untersuchten MCL Fälle (n=29) eine Überexpression von *MYC* mRNA, aber nur in einem Fall (3%) eine genetische Veränderung von *MYC* im Sinne einer dreifachen Amplifikation nachweisen konnte (Hernandez et al. 1999). *MYC* Aberrationen scheinen demzufolge nicht für die Überexpression von *MYC* beim MCL verantwortlich zu sein. Möglicherweise spielt noch ein weiteres Kandidatengen bzw. -gene in der Region 8q24 eine pathogenetische Rolle.

In MCL Fällen mit 12q Zugewinnen sind Amplifikationen des *CDK4* Gens beschrieben (Beà et al. 1999, Allen et al. 2002). *CDK4* kartiert auf 12q13, einer chromosomalen Region, die in verschiedenen Tumoren häufig von Amplifikationen betroffen ist (Khatib et al. 1993, Reifenberger et al. 1996, Knuutila et al. 1998). Jedoch finden sich in dieser Bande noch weitere Kandidatengene, wie *GLI* und *MDM2*, die mit *CDK4* koamplifiziert und somit pathogenetisch relevant sein können. Eine Amplifikation dieser Gene ist bereits bei diffus großzelligen B-Zell Lymphomen beschrieben (Rao et al. 1998) und Hofmann et al. konnten eine Überexpression von *CDK4* und *MDM2* beim MCL mittels DNA Microarray Technologie demonstrieren (Hofmann et al. 2001).

Für die Region 18q21 kommt *BCL2* als betroffenes Onkogen in Frage. Während die Arbeitsgruppe von Beà weder bei 4 Fällen mit 18qter Amplifikation noch bei 4 Fällen mit 18q Überrepräsentation eine *BCL2* Aberration fand (Beà et al. 1999), konnten Bentz et al. in 2

Fällen mit einer 18q Amplifikation eine Überexpression von *BCL2* nachweisen (Bentz et al. 2000). Diese Beteiligung von *BCL2* bestätigen auch molekulargenetische Studien von Hofmann und Korz (Hofmann et al. 2001, Korz et al. 2002). In der weiteren häufig durch chromosomale Zugewinne charakterisierten Region 7p15 ist bis heute kein potentielles Kandidatengen bekannt.

Strukturelle Aberrationen der chromosomalen Bande 13q14 stellen bei der CLL die häufigste genetische Veränderung dar und lassen ein bislang nicht identifiziertes Tumorsuppressorgen zwischen *RBI* und dem Marker *D13S25* vermuten (Kalachikov et al. 1997, Liu et al. 1997, Stilgenbauer et al. 1998). Das MCL ist durch ein ähnliches Deletionsmuster gekennzeichnet, welches für eine genetische Verwandtschaft dieser Erkrankungen spricht und auf ein möglicherweise gemeinsames unbekanntes Kandidatengen in dieser Region hinweist (Stilgenbauer et al. 1998, Rosenwald et al. 1999). Die biologische Bedeutung von 13q14 Deletionen im MCL ist unklar. Auf 13qter, der zweiten kritischen Region auf dem langen Arm von Chromosom 13, sind bislang noch keine Kandidatengene detektiert worden.

In einem Versuch, ein Tumorsuppressorgen in der beim MCL häufig deletierten Region 11q22-q23 zu identifizieren, konnte eine minimal deletierte Region von weniger als 1 Mb Größe abgegrenzt werden, in der das *ATM* (ataxia teleangiectasia mutated) Gen kartiert (Stilgenbauer et al. 1999a). Dass *ATM* eine pathogenetische Rolle beim MCL spielen könnte, war sehr wahrscheinlich, da bereits bei anderen lymphoproliferativen Erkrankungen, wie der T-Zell Prolymphozyten Leukämie (T-PLL) und der CLL, Aberrationen des *ATM* Gens beschrieben waren (Stilgenbauer et al. 1997, Bullrich et al. 1999, Schaffner et al. 1999). Eine Mutationsanalyse von 7 11q22-q23 deletierten MCL Fällen demonstrierte in allen verbliebenen *ATM* Allelen Punktmutationen, die zu aberrantem Splicing, verkürztem Genprodukt oder veränderter Proteinstruktur führten (Schaffner et al. 2000). In einer weiteren Studie konnten *ATM* Mutationen mit verändertem Genprodukt in 7 von 9 MCL Fällen mit 11q22-q23 Deletion nachgewiesen werden (Camacho et al. 2002). Eine Mehrzahl der analysierten Fälle weist somit eine Inaktivierung beider *ATM* Allele durch Deletion bzw. Punktmutation auf. Dies spricht für eine pathogenetische Rolle von *ATM* bei der Entstehung und/oder Progression des MCL, weitere Kandidatengene in dieser genreichen Region können jedoch nicht ausgeschlossen werden (Monni und Knuutila 2001).

1p22 Deletionen stellen eine weitere in 32% der MCL Fälle auftretende Sekundäraberration dar. In dieser Region wurde *BCL10*, ein Gen mit potentieller Tumorsuppressorfunktion, aus dem Bruchpunkt der Translokation t(1;14)(p22;q32) bei

MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) Lymphomen kloniert (Willis et al. 1999, Zhang et al. 1999). In diesen Studien wies *BCL10* in einem Teil der Fälle Mutationen auf, die zu einem Verlust der proapoptotischen Funktion des Gens führten. Eine Mutationsanalyse von 1p22 deletierten Mantelzell Lymphomen (n=15) erbrachte jedoch keinen Nachweis für *BCL10* Mutationen (Bullinger et al. 2000). *BCL10* scheint somit beim MCL nicht das Kandidatengen in der kritischen Region 1p22 zu sein.

9p21 Aberrationen sind mit homozygoten oder hemizygoten Deletionen des *p16^{INK4a}* (*CDKN2A*) Gens assoziiert (Dreyling et al. 1997, Pinyol et al. 1997). Ein Verlust des CDK Inhibitors *p16^{INK4a}* korreliert mit einem gesteigerten Proliferationsindex im Sinne einer erhöhten Expression des Ki67 Antigens (Dreyling et al. 1997).

In der Region 17p13 kartiert mit *p53* ein weiteres Tumorsuppressorgen, welches bei der CLL (Döhner et al. 1995), atypischer CLL mit Translokation t(11;14)(q13;q32) (De Angeli et al. 2000), sowie beim MCL häufig von genomischen Aberrationen betroffen ist. Bereits 1995 wurde beim MCL eine Überexpression von *p53* mit strukturellen Veränderungen des *p53* Gens assoziiert (Louie et al. 1995). Das Vorliegen von *p53* Mutationen wurde dann im darauffolgenden Jahr durch zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen mittels Sequenzanalysen von Exon 5-9 bestätigt (Greiner et al. 1996, Hernandez et al. 1996). Bis heute sind somit beim MCL drei Tumorsuppressorgene, *ATM*, *p16^{INK4a}* sowie *p53*, bekannt, denen zusätzlich zur Überexpression von Cyclin D1 im Rahmen der Translokation t(11;14)(q13;q32) eine pathogenetische Rolle beigemessen werden kann.

In den weiteren häufig deletierten Regionen 6q27, 8p22, 6q21 und 10p15 sind bislang keine Kandidatengene identifiziert worden. Interessanterweise unterscheidet sich das Deletionsmuster der 6q Aberrationen beim MCL von dem der CLL. Während in einer großen Studie von 285 CLL Fällen Deletionen der proximalen Region 6q21 in insgesamt 7% gefunden wurden, konnte nur in einem Drittel dieser Fälle eine beide Regionen betreffende Aberration beobachtet werden (Stilgenbauer et al. 1999b). Alleinige Deletionen von 6q27 konnten nicht detektiert werden. Die Daten unserer MCL Studie zeigen proximale 6q Deletionen in 16% der Fälle, zu 87% unter Beteiligung von 6q27. Auch alleinige distale Chromosom 6 Veränderungen konnten in 9% aller Fälle diagnostiziert werden. Diese Erkenntnisse lassen auf ein weiteres Kandidatengen im Bereich der 6q27 Region schließen.

4.4 Prognostische Bedeutung sekundärer Aberrationen beim MCL

Bei der CLL, einer lymphoproliferativen Erkrankung, die in vielen Regionen die gleichen chromosomalen Aberrationen wie das MCL aufweist, lieferten 11q und 17p Deletionen in einer multivariaten Analyse signifikant prognostische Informationen (Döhner et al. 2000). Das Vorliegen einer *p53* Aberration stellte in dieser Studie sogar den stärksten prognostischen Faktor dar, der mit Therapieresistenz und verkürztem Überleben assoziiert ist.

Eine Vielzahl klinischer Parameter ist beim MCL mit einer gewissen prognostischen Bedeutung korreliert (Argatoff et al. 1997, Bosch et al. 1998, Campo et al. 1999, Weisenburger et al. 2000). Über den Stellenwert sekundärer genomischer Aberrationen ist jedoch bislang noch nicht allzu viel bekannt. *p53* Aberrationen scheinen auch beim MCL mit einer signifikant verkürzten Überlebenszeit assoziiert zu sein (Louie et al. 1995, Greiner et al. 1996, Hernandez et al. 1996). Genomische Veränderungen des *ATM* Gens sind aber im Gegensatz zu anderen malignen hämatologischen Erkrankungen (Cuneo et al. 2000, Monni et al. 2001) beim MCL nicht von prognostischer Relevanz (Monni et al. 1999, Camacho et al. 2002). Signifikant kürzere Überlebenszeiten zeigten sich bei mehr als 4 Zugewinne/Fall, Zugewinne von 3q, 12q und Verluste von 9p (Beà et al. 1999). Alle diese Daten beruhen jedoch auf Analysen mit kleinen Fallzahlen, Ergebnisse aus größeren prospektiven Studien liegen bislang nicht vor.

4.5 Schlussfolgerung

In den letzten Jahren hat die Tumorzytogenetik in der hämatologischen Onkologie durch die Entdeckung prognostischer und damit therapeutisch relevanter chromosomaler Aberrationen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der konventionellen zytogenetischen Analyse mit ihrem hohen Arbeitsaufwand und den methodischen Problemen steht heute die einfachere und weniger aufwendige Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) gegenüber. Mit dieser Technik lassen sich numerische und strukturelle Veränderungen unterschiedlicher Komplexität mit einer hohen Sensitivität identifizieren. Der weitere Einsatz der FISH in der Routinediagnostik wird wichtige Informationen zur Detektion neuer prognostischer Untergruppen liefern, die eventuell die Entwicklung Risiko-angepasster Therapieschemata ermöglichen.

Das MCL ist durch komplexe sekundäre chromosomale Aberrationen charakterisiert, die jedoch rekurrent in spezifischen Regionen auftreten und eine gewisse Ähnlichkeit mit genomischen Veränderungen bei der CLL aufweisen. Erste Untersuchungen bereits bekannter betroffener Gene und ihrer Proteine liefern wertvolle Einblicke in deren physiologische Bedeutung bei der Proliferation und Differenzierung normaler B-Zellen und deren Rolle in der Pathogenese von B-Zell Lymphomen. Der Einsatz neuer molekulargenetischer Methoden, wie quantitative RT-PCR (Korz et al. 2002) und DNA Microarray Technologie (Rosenwald et al. 2003, Kohlhammer et al. 2004), wird zusätzlich zur FISH entscheidend dazu beitragen, chromosomale Aberrationen besser charakterisieren und pathogenetisch relevante Gene identifizieren zu können.

Erste Ergebnisse weisen bereits darauf hin, dass beim MCL im Gegensatz zur CLL eine Beeinträchtigung der Apoptoseinduktion eine geringere Rolle spielt, eine Steigerung der Zellproliferation hingegen pathogenetisch ausschlaggebend zu sein scheint (Korz et al. 2002, Rosenwald et al. 2003). Weitere Analysen sind jedoch notwendig, um einen besseren Einblick in die molekularen Grundlagen dieser lymphoproliferativen Erkrankung zu gewinnen und zielgerichtete molekulare Therapiestrategien entwickeln zu können.

5. Zusammenfassung

Das Mantelzell Lymphom (MCL) ist charakterisiert durch eine reziproke Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ und die daraus resultierende Überexpression von Cyclin D1. Transgene Mausexperimente haben gezeigt, dass zur malignen Transformation von B-Lymphozyten noch weitere Faktoren notwendig sind. In Frage hierfür kommen sekundäre chromosomale Aberrationen, die mit Alterationen weiterer Onkogene und Tumorsuppressorgene assoziiert sein können. Sekundäre genomische Veränderungen sind bislang jedoch nur in Studien mit kleineren Fallzahlen detektiert worden, so dass die Inzidenz dieser Aberrationen heute noch nicht sicher festgelegt werden kann.

Mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) wurde eine einfache und sensitive Methode zur zytogenetischen Untersuchung von Interphase-Zellen (sog. Interphase-Zytogenetik) entwickelt. Durch den Einsatz genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sonden wurde es möglich, sowohl numerische als auch strukturelle Chromosomen-Aberrationen nachzuweisen. FISH-Studien bei der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) haben eindrucksvoll gezeigt, dass die Inzidenz spezifischer chromosomaler Veränderungen höher ist als man bisher aufgrund von Daten konventioneller chromosomaler Bänderungsanalysen und vergleichender genomischer Hybridisierungs-Analysen (CGH-Analysen) annahm.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Interphase-Zytogenetik die Inzidenz von sekundären chromosomalen Aberrationen bei Patienten mit Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ positivem MCL zu ermitteln. Es wurden 103 MCL Fälle mit insgesamt 18 verschiedenen Sonden, die in 16 aus CGH Analysen bekannten kritischen Regionen kartieren (1p22, 3q26, 6q21, 6q27, 7p15, 8p22, 8q24, 9p21, 10p15, 11q22-q23, 12q12-q13, 13q14, 13qter, 15q23, 17p13 und 18q21) untersucht. Bei 95 der 103 Patienten (92%) konnte zusätzlich zur Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ eine oder mehrere chromosomale Aberrationen (Median 4 Aberrationen/Fall, Spannweite 0-15 Aberrationen/Fall) diagnostiziert werden. 16 MCL Fälle mit einem tetraploiden Klon zeichneten sich durch eine größere Anzahl sekundärer genomischer Veränderungen aus (Median 6,5 Aberrationen/Fall). Zugewinne fanden sich am häufigsten in den Regionen 3q26 (45%), 8q24 (19%), 15q23 (18%), 12q12-q13 (17%), 7p15 (15%) und 18q21 (14%). Diese schlossen 6 DNA-Amplifikationen in 4 verschiedenen Regionen (7p15, 12q12-q13, 13qter, 18q21) mit ein, die in 4 MCL Fällen (4%) nachgewiesen wurden. Als häufige Deletionen fanden sich

Aberrationen der Banden 13q14 (44%) und 11q22-q23 (44%), gefolgt von 9p21 (35%), 13qter (33%), 1p22 (32%), 17p13 (26%), 6q27 (22%), 8p22 (21%), 6q21 (16%) und 10p15 (13%).

In dieser ersten großen FISH Untersuchung zur Detektion sekundärer chromosomaler Veränderungen beim MCL sind die Inzidenzen der einzelnen Aberrationen deutlich höher als in vergleichbaren konventionellen zytogenetischen Studien. In vielen untersuchten Regionen stimmen unsere FISH Daten gut mit den zusammengefassten Ergebnissen aus vier kleineren CGH Analysen überein. Beim Nachweis kleiner Deletionen der chromosomalen Banden 11q22-q23, 9p21 und 17p13 war die FISH Untersuchung jedoch deutlich sensitiver.

Ziel zukünftiger Untersuchungen wird es zum einen sein, krankheitsrelevante Gene in den kritischen Regionen zu identifizieren, sowie eine Korrelation des Genotyps mit dem klinischen Phänotyp des MCL zu ermitteln, um so weitere Einblicke in die Physiologie und Pathophysiologie der B-Lymphozyten und B-Zell Lymphome zu erhalten.

6. Literaturverzeichnis

6.1 Zitierte Veröffentlichungen

- Allen JE, Hough RE, Goepel JR, Bottomley S, Wilson GA, Alcock HE, Baird M, Lorigan PC, Vandenberghe EA, Hancock BW und Hammond DW. Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. Br J Haematol 116: 291-298 (2002).
- Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE und Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. Blood 89: 2067-2078 (1997).
- Arnoldus EP, Wiegant J, Noordermeer IA, Wessels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, van der Ploeg M und Raap AK. Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. Cytogenet Cell Genet 54: 108-111 (1990).
- Avet-Loiseau H, Garand R, Gaillard F, Daviet A, Mellerin MP, Robillard N, Bouyge I, Arcot S, Batzer M, Talmant P, Harousseau JL, Milpied N und Bataille R. Detection of t(11;14) using interphase molecular cytogenetics in mantle cell lymphoma and atypical chronic lymphocytic leukemia. Genes Chromosomes Cancer 23: 175-182 (1998).
- Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Gatter K, Grogan TM, Harris NL, Isaacson PG, Jaffe ES, Mason E, Pileri S, Ralfkiaer E, Stein H und Warnke RA. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. Am J Surg Pathol 16: 637-640 (1992).
- Beà S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, Garcia JL, Flores T, Gonzalez M, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Cardesa A, Montserrat E, Miro R und Campo E. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. Blood 93: 4365-4374 (1999).
- Belaud-Rotureau MA, Parrens M, Dubus P, Garroste JC, de Mascarel A und Merlio JP. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. Mod Pathol 15: 517-525 (2002).
- Bentz M, Döhner H, Cabot G und Lichter P. Fluorescence in situ hybridization in leukemias: 'the FISH are spawning!'. Leukemia 8: 1447-1452 (1994).

- Bentz M, Huck K, du Manoir S, Joos S, Werner CA, Fischer K, Döhner H und Lichter P. Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. Blood 85: 3610-3618 (1995).
- Bentz M, Plesch A, Bullinger L, Stilgenbauer S, Ott G, Muller-Hermelink HK, Baudis M, Barth TF, Moller P, Lichter P und Döhner H. t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Genes Chromosomes Cancer 27: 285-294 (2000).
- Ben-Yehuda D, Houldsworth J, Parsa NZ und Chaganti RS. Gene amplification in non-Hodgkin's lymphoma. Br J Haematol 86: 792-797 (1994).
- Berard CW und Dorfman RF. Histopathology of malignant lymphomas. Clin Haematol 3: 39-76 (1974).
- Bigoni R, Cuneo A, Milani R, Roberti MG, Bardi A, Rigolin GM, Cavazzini F, Agostini P und Castoldi G. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma: cytogenetic and fluorescence in situ hybridization studies. Leuk Lymphoma 40: 581-590 (2001).
- Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, Lindeman GJ, Harris AW und Adams JM. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. Embo J 13: 2124-2130 (1994).
- Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E, Rozman C and Cardesa A. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. Blood 84: 2726-2732 (1994).
- Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, Vallespi T, Woessner S und Montserrat E. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. Cancer 82: 567-575 (1998).
- Boyle AL, Feltquite DM, Dracopoli NC, Housman DE und Ward DC. Rapid physical mapping of cloned DNA on banded mouse chromosomes by fluorescence in situ hybridization. Genomics 12: 106-115 (1992).
- Böyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand J Immunol Suppl 5: 9-15 (1976).
- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ und Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. Cancer Res 56: 100-104 (1996).

- Bullinger L, Leupolt E, Schaffner C, Mertens D, Bentz M, Lichter P, Döhner H und Stilgenbauer S. BCL10 is not the gene inactivated by mutation in the 1p22 deletion region in mantle cell lymphoma. Leukemia 14: 1490-1492 (2000).
- Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostik P, Kipps T, Keating M, Albitar M, Reed JC und Croce CM. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Cancer Res 59: 24-27 (1999).
- Burke DT, Carle GF und Olson MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. Science 236: 806-812 (1987).
- Camacho E, Hernandez L, Hernandez S, Tort F, Bellosillo B, Beà S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernandez PL und Campo E. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. Blood 99: 238-244 (2002).
- Campo E, Raffeld M und Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. Semin Hematol 36: 115-127 (1999).
- Cheng AL, Su IJ, Tien HF, Wang CC, Chen YC und Wang CH. Characteristic clinicopathologic features of adult B-cell lymphoblastic lymphoma with special emphasis on differential diagnosis with an atypical form probably of blastic lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation origin. Cancer 73: 706-710 (1994).
- Coiffier B. Which treatment for mantle-cell lymphoma patients in 1998? J Clin Oncol 16: 3-5 (1998).
- Coignet LJ, Schuurin E, Kibbelaar RE, Raap TK, Kleiverda KK, Bertheas MF, Wiegant J, Beverstock G und Kluin PM. Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double- color fluorescence in situ hybridization. Blood 87: 1512-1519 (1996).
- Cremer T, Landegent J, Bruckner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P und van der Ploeg M. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non- radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. Hum Genet 74: 346-352 (1986).
- Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC und Manuelidis L. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. Hum Genet 80: 235-246 (1988).

- Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Piva N, Milani R, Bullrich F, Veronese ML, Croce C, Birg F, Döhner H, Hagemeijer A und Castoldi G. Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: correlation with clinicobiologic features. Blood 93: 1372-1380 (1999).
- Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, Roberti MG, Milani R, Bardi A, Minotto C, Agostini P, De Angeli C, Narducci MG, Sabbioni S, Russo G, Negrini M und Castoldi G. Acquired chromosome 11q deletion involving the ataxia teleangiectasia locus in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinicobiologic features. J Clin Oncol 18: 2607-2614 (2000).
- Daniel MT, Tigaud I, Flexor MA, Nogueira ME, Berger R und Jonveaux P. Leukaemic non-Hodgkin's lymphomas with hyperdiploid cells and t(11;14)(q13;q32): a subtype of mantle cell lymphoma? Br J Haematol 90: 77-84 (1995).
- De Angeli C, Gandini D, Cuneo A, Moretti S, Bigoni R, Roberti MG, Bardi A, Castoldi GL und del Senno L. BCL-1 rearrangements and p53 mutations in atypical chronic lymphocytic leukemia with t(11;14)(q13;q32). Haematologica 85: 913-921 (2000).
- Di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, Bassan R, Rambaldi A, Golay J, Introna M. Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. Br J Haematol 114: 800-809 (2001).
- Döhner H, Pilz T, Fischer K, Cabot G, Diehl D, Fink T, Stilgenbauer S, Bentz M und Lichter P. Molecular cytogenetic analysis of RB-1 deletions in chronic B-cell leukemias. Leuk Lymphoma 16: 97-103 (1994).
- Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, Volkmann M, Galle PR, Poustka A, Hunstein W und Lichter P. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. Blood 85: 1580-1589 (1995).
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M und Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 343: 1910-1916 (2000).
- Dreyling MH, Bullinger L, Ott G, Stilgenbauer S, Muller-Hermelink HK, Bentz M, Hiddemann W und Döhner H. Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. Cancer Res 57: 4608-4614 (1997).
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J und Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med 2: 561-566 (1996).

- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S und Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 344: 1031-1037 (2001).
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P und Cremer T. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. Hum Genet 90: 590-610 (1993).
- Du MQ, Diss TC, Xu CF, Wotherspoon AC, Isaacson PG und Pan LX. Ongoing immunoglobulin gene mutations in mantle cell lymphomas. Br J Haematol 96: 124-131 (1997).
- Forstpointner R, Dreyling M, Repp R, Hermann S, Hanel A, Metzner B, Pott C, Hartmann F, Rothmann F, Rohrberg R, Bock HP, Wandt H, Unterhalt M, Hiddemann W; German Low-Grade Lymphoma Study Group. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. Blood 104: 3064-3071 (2004).
- Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR und Weisenburger DD. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. Blood 87: 4302-4310 (1996).
- Gronbaek K, Nedergaard T, Andersen MK, thor Straten P, Guldborg P, Moller P, Zeuthen J, Ebbe Hansen N, Hou-Jensen K und Ralfkiaer E. Concurrent disruption of cell cycle associated genes in mantle cell lymphoma: a genotypic and phenotypic study of cyclin D1, p16, p15, p53 and pRb. Leukemia 12: 1266-1271 (1998).

- Harris NL, Nadler LM und Bhan AK. Immunohistologic characterization of two malignant lymphomas of germinal center type (centroblastic/centrocytic and centrocytic) with monoclonal antibodies. Follicular and diffuse lymphomas of small- cleaved-cell type are related but distinct entities. Am J Pathol 117: 262-272 (1984).
- Heiles HB, Genersch E, Kessler C, Neumann R und Eggers HJ. In situ hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papillomaviruses (HPV 16/18) in HeLa and SiHa cells. Biotechniques 6: 978-981 (1988).
- Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardesa A, Jaffe ES, Campo E und Raffold M. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. Blood 87: 3351-3359 (1996).
- Hernandez L, Hernandez S, Beà S, Pinyol M, Ferrer A, Bosch F, Nadal A, Fernandez PL, Palacin A, Montserrat E und Campo E. c-myc mRNA expression and genomic alterations in mantle cell lymphomas and other nodal non-Hodgkin's lymphomas. Leukemia 13: 2087-2093 (1999).
- Hiddemann W, Dreyling M, Pfreundschuh M, Gisselbrecht C, Diehl V, Boiron JM, Trümper L, Illiger HJ, Rudolph C, Boogaerts M, Kluin-Nelemans H, Parwaresch R, Unterhalt M. Myeloablative Radiochemotherapy Followed by Autologous Blood Stem Cell Transplantation Leads to a Significant Prolongation of the Event-Free Survival in Patients with Mantel Cell Lymphoma (MCL): Results of a Prospective Randomized European Intergroup Study. Blood 98:861a (2001) (abstr 3572).
- Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A und Weinberg RA. Function of a human cyclin gene as an oncogene. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 709-713 (1994).
- Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA und Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. Mol Cell Biol 15: 2672-2681 (1995).
- Hirama T und Koeffler HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. Blood 86: 841-854 (1995).
- Hiraoka Y, Sedat JW und Agard DA. The use of a charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structures. Science 238: 36-41 (1987).
- Hofmann WK, de Vos S, Tsukasaki K, Wachsman W, Pinkus GS, Said JW und Koeffler HP. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. Blood 98: 787-794 (2001).

- Hummel M, Tamaru J, Kalvelage B und Stein H. Mantle cell (previously centrocytic) lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. Blood 84: 403-407 (1994).
- Hunter T und Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell 79: 573-582 (1994).
- Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA und de Jong PJ. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. Nat Genet 6: 84-89 (1994).
- Jenkins RB, Le Beà u MM, Kraker WJ, Borell TJ, Stalboerger PG, Davis EM, Penland L, Fernald A, Espinosa R, 3rd, Schaid DJ, Noel P und Dewald GW. Fluorescence in situ hybridization: a sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. Blood 79: 3307-3315 (1992).
- Johansson B, Mertens F und Mitelman F. Cytogenetic evolution patterns in non-Hodgkin's lymphoma. Blood 86: 3905-3914 (1995).
- Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T und Lichter P. Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. Hum Genet 90: 584-589 (1993).
- Joos S, Fink TM, Ratsch A und Lichter P. Mapping and chromosome analysis: the potential of fluorescence in situ hybridization. J Biotechnol 35: 135-153 (1994).
- Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E, Fracchiolla NS, Bonaldo MF, Lawton L, Jelenc P, Ye X, Qu X, Chien M, Hauptschein R, Gaidano G, Vitolo U, Saglio G, Resegotti L, Brodjansky V, Yankovsky N, Zhang P, Soares MB, Russo J, Edelman IS, Efstratiadis A, Dalla-Favera R und Fischer SG. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. Genomics 42: 369-377 (1997).
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F und Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 258: 818-821 (1992).
- Katz RL, Caraway NP, Gu J, Jiang F, Pasco-Miller LA, Glassman AB, Luthra R, Hayes KJ, Romaguera JE, Cabanillas FF und Medeiros LJ. Detection of chromosome 11q13 breakpoints by interphase fluorescence in situ hybridization. A useful ancillary method for the diagnosis of mantle cell lymphoma. Am J Clin Pathol 114: 248-257 (2000).

- Khatib ZA, Matsushime H, Valentine M, Shapiro DN, Sherr CJ und Look AT. Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. Cancer Res 53: 5535-5541 (1993).
- Kibbelaar RE, van Kamp H, Dreef EJ, Wessels JW, Beverstock GC, Raap AK, Fibbe WE, den Ottolander GJ und Kluin PM. Detection of trisomy 8 in hematological disorders by in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 56: 132-136 (1991).
- Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V und Zhu Y. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. Am J Pathol 152: 1107-1123 (1998).
- Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Holzmann K, Kestler HA, Kienle D, Barth TF, Moller P, Ott G, Kalla J, Radlwimmer B, Pscherer A, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P und Bentz M. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. Blood 104: 795-801 (2004).
- Konopka JB, Watanabe SM und Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. Cell 37: 1035-1042 (1984).
- Korz C, Pscherer A, Benner A, Mertens D, Schaffner C, Leupolt E, Döhner H, Stilgenbauer S und Lichter P. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. Blood 99: 4554-4561 (2002).
- Landegent JE, Jansen in de Wal N, Dirks RW, Bao F und van der Ploeg M. Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. Hum Genet 77: 366-370 (1987).
- Langer PR, Waldrop AA und Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. Proc Natl Acad Sci U S A 78: 6633-6637 (1981).
- Le Beau MM. Detecting genetic changes in human tumor cells: have scientists "gone fishing?" Blood 81: 1979-1983 (1993).
- Lengauer C, Green ED und Cremer T. Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. Genomics 13: 826-828 (1992).
- Lennert K, Stein H und Kaiserling E. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. Br J Cancer 31 SUPPL 2: 29-43 (1975).

- Lenz G, Dreyling M, Hoster E, Wormann B, Duhrsen U, Metzner B, Eimermacher H, Neubauer A, Wandt H, Steinhauer H, Martin S, Heidemann E, Aldaoud A, Parwaresch R, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W. Immunochemotherapy With Rituximab and Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Significantly Improves Response and Time to Treatment Failure, But Not Long-Term Outcome in Patients With Previously Untreated Mantle Cell Lymphoma: Results of a Prospective Randomized Trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). J Clin Oncol Jan 24 (2005). [Epub ahead of print]
- Leroux D, Le Marc'Hadour F, Gressin R, Jacob MC, Keddari E, Monteil M, Caillot P, Jalbert P und Sotto JJ. Non-Hodgkin's lymphomas with t(11;14)(q13;q32): a subset of mantle zone/intermediate lymphocytic lymphoma? Br J Haematol 77: 346-353 (1991).
- Levy V, Ugo V, Delmer A, Tang R, Ramond S, Perrot JY, Vrhovac R, Marie JP, Zittoun R und Ajchenbaum-Cymbalista F. Cyclin D1 overexpression allows identification of an aggressive subset of leukemic lymphoproliferative disorder. Leukemia 13: 1343-1351 (1999).
- Li JY, Gaillard F, Moreau A, Harousseau JL, Laboisie C, Milpied N, Bataille R und Avet-Loiseau H. Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. Am J Pathol 154: 1449-1452 (1999).
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L und Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Hum Genet 80: 224-234 (1988).
- Lichter P, Ledbetter SA, Ledbetter DH und Ward DC. Fluorescence in situ hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6634-6638 (1990).
- Lichter P und Ward DC. Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? Nature 345: 93-94 (1990).
- Lichter P, Boyle AL, Cremer T und Ward DC. Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization. Genet Anal Tech Appl 8: 24-35 (1991).
- Lichter P, Fischer K, Joos S, Fink T, Baudis M, Potkul RK, Ohl S, Solinas-Toldo S, Weber R, Stilgenbauer S, Bentz M und Döhner H. Efficacy of current molecular cytogenetic protocols for the diagnosis of chromosome aberrations in tumor specimens. Cytokines Mol Ther 2: 163-169 (1996).

- Liu Y, Corcoran M, Rasool O, Ivanova G, Ibbotson R, Grander D, Iyengar A, Baranova A, Kashuba V, Merup M, Wu X, Gardiner A, Mullenbach R, Poltarau A, Hultstrom AL, Juliusson G, Chapman R, Tiller M, Cotter F, Gahrton G, Yankovsky N, Zabarovsky E, Einhorn S und Oscier D. Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. Oncogene 15: 2463-2473 (1997).
- Louie DC, Offit K, Jaslow R, Parsa NZ, Murty VV, Schluger A und Chaganti RS. p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). Blood 86: 2892-2899 (1995).
- Lovec H, Sewing A, Lucibello FC, Muller R und Moroy T. Oncogenic activity of cyclin D1 revealed through cooperation with Ha-ras: link between cell cycle control and malignant transformation. Oncogene 9: 323-326 (1994a).
- Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB und Moroy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. Embo J 13: 3487-3495 (1994b).
- Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Marugan I, Benet I, Sole F, Rubio-Moscardo F, Terol MJ, Climent J, Sarsotti E, Tormo M, Andreu E, Salido M, Ruiz MA, Prosper F, Siebert R, Dyer MJ und Garcia-Conde J. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. Blood 98: 3479-3482 (2001).
- Matutes E, Carrara P, Coignet L, Brito-Babapulle V, Villamor N, Wotherspoon A und Catovsky D. FISH analysis for BCL-1 rearrangements and trisomy 12 helps the diagnosis of atypical B cell leukaemias. Leukemia 13: 1721-1726 (1999).
- Mitelman F, Kaneko Y und Trent JM. Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. Cytogenet Cell Genet 55: 358-386 (1990).
- Mitelman F, Johansson B und Mertens F (Eds.). Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> (2003).
- Mitelman F. Catalog of chromosome aberrations in cancer. Wiley-Liss, New York Ed. 5 (1994).
- Monni O, Oinonen R, Elonen E, Franssila K, Teerenhovi L, Joensuu H und Knuutila S. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. Genes Chromosomes Cancer 21: 298-307 (1998).

- Monni O, Zhu Y, Franssila K, Oinonen R, Hoglund P, Elonen E, Joensuu H und Knuutila S. Molecular characterization of deletion at 11q22.1-23.3 in mantle cell lymphoma. Br J Haematol 104: 665-671 (1999).
- Monni O und Knuutila S. 11q deletions in hematological malignancies. Leuk Lymphoma 40: 259-266 (2001).
- Monteil M, Callanan M, Dascalescu C, Sotto JJ und Leroux D. Molecular diagnosis of t(11;14) in mantle cell lymphoma using two- colour interphase fluorescence in situ hybridization. Br J Haematol 93: 656-660 (1996).
- Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM und Arnold A. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. Nature 350: 512-515 (1991).
- Nanba K, Jaffe ES, Braylan RC, Soban EJ und Berard CW. Alkaline phosphatase-positive malignant lymphoma. Am J Clin Pathol 68: 535-542 (1977).
- Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ und Raap AK. Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. Cytometry 10: 20-27 (1989).
- Norton AJ, Matthews J, Pappa V, Shamash J, Love S, Rohatiner AZ und Lister TA. Mantle cell lymphoma: natural history defined in a serially biopsied population over a 20-year period. Ann Oncol 6: 249-256 (1995).
- Nowell PC und Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. Science 132: 1497 (1960) (Brief an den Herausgeber).
- Nowotny H, Karlic H, Gruner H, Hirsch J, Vesely M, Nader A und Heinz R. Cytogenetic findings in 175 patients indicate that items of the Kiel classification should not be disregarded in the REAL classification of lymphoid neoplasms. Ann Hematol 72: 291-301 (1996).
- O'Connor OA, Wright J, Moskowitz C, Muzzy J, Macgregor-Cortelli B, Stubblefield M, Straus D, Portlock C, Hamlin P, Choi E, Dumetrescu O, Esseltine D, Trehu E, Adams J, Schenkein D, Zelenetz AD. Phase II Clinical Experience With the Novel Proteasome Inhibitor Bortezomib in Patients With Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma and Mantle Cell Lymphoma. J Clin Oncol 23: 676-684 (2005).
- Onciu M, Schlette E, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Keating M und Lai R. Cytogenetic findings in mantle cell lymphoma cases with a high level of peripheral blood involvement have a distinct pattern of abnormalities. Am J Clin Pathol 116: 886-892 (2001).

- Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert JP, Jaffe ES und Raffeld M. Analysis of LAZ3 (BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. Blood 85: 2877-2884 (1995).
- Ott G, Kalla J, Ott MM, Schryen B, Katzenberger T, Muller JG und Muller-Hermelink HK. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. Blood 89: 1421-1429 (1997).
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J und Gray J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 9138-9142 (1988).
- Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, Balbin M, Jares P, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Lopez-Otin C und Campo E. Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. Blood 89: 272-280 (1997).
- Pinyol M, Cobo F, Beà S, Jares P, Nayach I, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A und Campo E. p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. Blood 91: 2977-2984 (1998).
- Pittaluga S, Tierens A, Pinyol M, Campo E, Delabie J und De Wolf-Peeters C. Blastic variant of mantle cell lymphoma shows a heterogenous pattern of somatic mutations of the rearranged immunoglobulin heavy chain variable genes. Br J Haematol 102: 1301-1306 (1998).
- Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, Parsa NZ, Cigudosa JC, Louie DC, Popplewell L, Offit K, Jhanwar SC und Chaganti RS. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. Blood 92: 234-240 (1998).
- Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahloun AG, Meltzer PS und Collins VP. Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. Cancer Res 56: 5141-5145 (1996).
- Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I, Bailey RJ, Proffitt J, Wyatt WA, Hanson CA und Dewald GW. Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. Br J Haematol 110: 856-862 (2000).

- Rimokh R, Berger F, Cornillet P, Wahbi K, Rouault JP, French M, Bryon PA, Gadoux M, Gentilhomme O, Germain D und Magaud JP. Break in the BCL1 locus is closely associated with intermediate lymphocytic lymphoma subtype. Genes Chromosomes Cancer 2: 223-226 (1990).
- Rimokh R, Berger F, Delsol G, Charrin C, Bertheas MF, French M, Garoscio M, Felman P, Coiffier B, Bryon PA, Rochet M, Gentilhomme O, Germain D und Magaud JP. Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)-Beà ring leukemias. Blood 81: 3063-3067 (1993).
- Rosenberg CL, Wong E, Petty EM, Bale AE, Tsujimoto Y, Harris NL und Arnold A. PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 9638-9642 (1991).
- Rosenwald A, Ott G, Krumdiek AK, Dreyling MH, Katzenberger T, Kalla J, Roth S, Ott MM und Muller-Hermelink HK. A biological role for deletions in chromosomal band 13q14 in mantle cell and peripheral t-cell lymphomas? Genes Chromosomes Cancer 26: 210-214 (1999).
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, Gascoyne RD, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Chiorazzi M, Giltane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Henrickson S, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Montserrat E, Bosch F, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Holte H, Delabie J und Staudt LM. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. Cancer Cell 3: 185-197 (2003).
- Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 243: 290-293 (1973).
- Rowley JD, Diaz MO, Espinosa R, 3rd, Patel YD, van Melle E, Ziemin S, Taillon-Miller P, Lichter P, Evans GA, Kersey JH, Ward DC, Domer PH und Le Beà u MM. Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 9358-9362 (1990).

- Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Döhner H und Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 94: 748-753 (1999).
- Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Döhner H und Lichter P. Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 2773-2778 (2000).
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science 274: 1672-1677 (1996).
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y und Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 8794-8797 (1992).
- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP und Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. Nature 315: 550-554 (1985).
- Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zuhlke-Jenisch R, Plendl H, Metzke S, Joos S, Zucca E, Weber-Matthiesen K, Roggero E, Grote W und Schlegelberger B. Application of interphase cytogenetics for the detection of t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphomas. Ann Oncol 9: 519-526 (1998).
- Singer MF. SINEs and LINEs: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. Cell 28: 433-434 (1982).
- Stilgenbauer S, Döhner H, Bulgay-Morschel M, Weitz S, Bentz M und Lichter P. High frequency of monoallelic retinoblastoma gene deletion in B-cell chronic lymphoid leukemia shown by interphase cytogenetics. Blood 81: 2118-2124 (1993).
- Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, Schroder M, Schlegelberger B, Fischer K, Bentz M, Lichter P und Döhner H. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 11837-11841 (1996).
- Stilgenbauer S, Schaffner C, Litterst A, Liebisch P, Gilad S, Bar-Shira A, James MR, Lichter P und Döhner H. Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia. Nat Med 3: 1155-1159 (1997).
- Stilgenbauer S, Nickolenko J, Wilhelm J, Wolf S, Weitz S, Döhner K, Boehm T, Döhner H und Lichter P. Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. Oncogene 16: 1891-1897 (1998).

- Stilgenbauer S, Winkler D, Ott G, Schaffner C, Leupolt E, Bentz M, Moller P, Muller-Hermelink HK, James MR, Lichter P und Döhner H. Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. Blood 94: 3262-3264 (1999a).
- Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Döhner K, Ho AD, Lichter P und Döhner H. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 13: 1331-1334 (1999b).
- Stilgenbauer S, Schaffner C, Winkler D, Ott G, Leupolt E, Bentz M, Moller P, Muller-Hermelink HK, James MR, Lichter P und Döhner H. The ATM gene in the pathogenesis of mantle-cell lymphoma. Ann Oncol 11(Suppl 1): 127-130 (2000).
- Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P und Döhner H. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. Leukemia 16: 993-1007 (2002).
- Swerdlow SH, Habeshaw JA, Murray LJ, Dhaliwal HS, Lister TA und Stansfeld AG. Centrocytic lymphoma: a distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse. Am J Pathol 113: 181-197 (1983).
- Swerdlow SH, Yang WI, Zukerberg LR, Harris NL, Arnold A und Williams ME. Expression of cyclin D1 protein in centrocytic/mantle cell lymphomas with and without rearrangement of the BCL1/cyclin D1 gene. Hum Pathol 26: 999-1004 (1995).
- Swerdlow SH und Williams ME. From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. Hum Pathol 33: 7-20 (2002).
- Teodorovic I, Pittaluga S, Kluin-Nelemans JC, Meerwaldt JH, Hagenbeek A, van Glabbeke M, Somers R, Bijmens L, Noordijk EM und Peeters CD. Efficacy of four different regimens in 64 mantle-cell lymphoma cases: clinicopathologic comparison with 498 other non-Hodgkin's lymphoma subtypes. European Organization for the Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. J Clin Oncol 13: 2819-2826 (1995).
- Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, Donlon TA, Cleary ML, Suryanarayan K, Homge M, Redner A, Gray J und Pinkel D. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogeneous leukemia by in situ hybridization. Science 250: 559-562 (1990).
- Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC und Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. Science 224: 1403-1406 (1984).

- Vaandrager JW, Schuurung E, Zwikstra E, de Boer CJ, Kleiverda KK, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, van Ommen GJ, Raap AK und Kluin PM. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. Blood 88: 1177-1182 (1996).
- Van Den Berghe H, Parloir C, David G, Michaux JL und Sokal G. A new characteristic karyotypic anomaly in lymphoproliferative disorders. Cancer 44: 188-195 (1979).
- Vandenberghe E, De Wolf-Peeters C, van den Oord J, Wlodarska I, Delabie J, Stul M, Thomas J, Michaux JL, Mecucci C, Cassiman JJ und Van Den Berghe H. Translocation (11;14): a cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle centre cell lineage. J Pathol 163: 13-18 (1991).
- Vandenberghe E, De Wolf-Peeters C, Vaughan Hudson G, Vaughan Hudson B, Pittaluga S, Anderson L, Linch DC. The clinical outcome of 65 cases of mantle cell lymphoma initially treated with non-intensive therapy by the British National Lymphoma Investigation Group. Br J Haematol 99: 842-847 (1997).
- Weisenburger DD, Kim H und Rappaport H. Mantle-zone lymphoma: a follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma. Cancer 49: 1429-1438 (1982).
- Weisenburger DD, Sanger WG, Armitage JO und Purtilo DT. Intermediate lymphocytic lymphoma: immunophenotypic and cytogenetic findings. Blood 69: 1617-1621 (1987).
- Weisenburger DD und Armitage JO. Mantle cell lymphoma - an entity comes of age. Blood 87: 4483-4494 (1996).
- Weisenburger DD, Vose JM, Greiner TC, Lynch JC, Chan WC, Bierman PJ, Dave BJ, Sanger WG und Armitage JO. Mantle cell lymphoma. A clinicopathologic study of 68 cases from the Nebraska Lymphoma Study Group. Am J Hematol 64: 190-196 (2000).
- Werner CA, Döhner H, Joos S, Trumper LH, Baudis M, Barth TF, Ott G, Moller P, Lichter P und Bentz M. High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-cell neoplasms. Am J Pathol 151: 335-342 (1997).
- Willard HF und Waye JS. Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. J Mol Evol 25: 207-214 (1987).
- Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG und Dyer MJ. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. Cell 96: 35-45 (1999).

- Withers DA, Harvey RC, Faust JB, Melnyk O, Carey K und Meeker TC. Characterization of a candidate bcl-1 gene. Mol Cell Biol 11: 4846-4853 (1991).
- Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeijer A, De Wolf-Peeters C und Van Den Berghe H. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. Haematologica 84: 594-599 (1999).
- Wong KF, Chan JK, So JC und Yu PH. Mantle cell lymphoma in leukemic phase: characterization of its broad cytologic spectrum with emphasis on the importance of distinction from other chronic lymphoproliferative disorders. Cancer 86: 850-857 (1999).
- Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, Matsuno Y, Ichinohasama R, Okamoto M, Yamaguchi M, Tamaru J, Uike N, Hashimoto Y, Morishima Y, Suchi T, Seto M und Nakamura S. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. Blood 95: 2253-2261 (2000).
- Zhang Q, Siebert R, Yan M, Hinzmann B, Cui X, Xue L, Rakestraw KM, Naeve CW, Beckmann G, Weisenburger DD, Sanger WG, Nowotny H, Vesely M, Callet-Bauchu E, Salles G, Dixit VM, Rosenthal A, Schlegelberger B und Morris SW. 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 (1999).

6.2 Eigene Veröffentlichungen

6.2.1 Originalarbeiten

Sander S, Bullinger L, Karlsson A, Giuriato S, Hernandez-Boussard T, Felsher D und Pollack J. Comparative genomic hybridization on mouse cDNA microarrays and its application to a murine lymphoma model. Oncogene, zur Publikation angenommen.

Manuskript zur vorliegenden Arbeit in Vorbereitung. Arbeitstitel: Comprehensive molecular cytogenetic analysis of mantle cell lymphoma.

6.2.2 Kongressbeiträge

Leupolt E, Sander S, Bullinger L, Bentz M, Ott G, Müller-Hermelink HK, Barth T, Möller P, Lichter P, Döhner H und Stilgenbauer S. Molecular characterization of mantle cell lymphoma. Onkologie 23: 15 (2000).

Leupolt E, Sander S, Bullinger L, Bentz M, Ott G, Müller-Hermelink HK, Barth T, Möller P, Lichter P, Döhner H und Stilgenbauer S. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of mantle cell lymphoma. Blood 96: 468a (2000).

Bullinger L, Sander S, Karlsson A, Giuriato S, Hernandez-Boussard T, Felsher D und Pollack J. Comparative genomic hybridization using mouse cDNA microarrays and its application to a murine lymphoma model. Proc Am Assoc Cancer Res 43: abstract 1635 (2004).

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner, Direktor der Abteilung Innere Medizin III der Universität Ulm, danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. med. Stephan Stilgenbauer danke ich für die Überlassung des Themas, die Hilfe bei der Einarbeitung in die umfangreiche Problematik und sein Engagement bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern im Labor von Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft danken, insbesondere Frau Dr. med. Elke Leupolt und Herrn Dr. med. Lars Bullinger.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, deren Unterstützung und Rückhalt ich mir immer sicher sein durfte und die mir dadurch ein erfolgreiches Studium ermöglicht haben.

8. Lebenslauf

Personalien

Name: Sander
Vorname: Marie-Sandrine
Geburtsdatum: 21.09.1977
Geburtsort: Saarbrücken
Familienstand: ledig
Vater: Reinfried Rüdiger Sander
Mutter: Anna-Theresia Heinemann-Sander, geb. Heinemann

Schulischer Werdegang

September 1984 - Juli 1988 Besuch der Grundschule Lauterbach
September 1988 - Juni 1997 Besuch der Marienschule Saarbrücken, Gymnasium in Trägerschaft des Bistums Trier
18.06.1997 Allgemeine Hochschulreife

Pflegepraktikum

August 1997 - September 1997 Pflegepraktikum im Kreiskrankenhaus Völklingen, Abteilung Herz-Thorax Chirurgie

Universitärer Werdegang

Oktober 1997 - September 1999 Vorklinisches Studium an der Universität Ulm
15.09.1999 Ärztliche Vorprüfung
Oktober 1999 – November 2004 Klinisches Studium an der Universität Ulm
22.03.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.04.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.11.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

November 1999 – Dezember 2001 Doktorarbeit im Zytogenetischen Labor der Abteilung Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm