

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Hierarchie proliferationsassoziierter sekundärer genomischer
Alterationen im Mantelzell-Lymphom – eine Analyse mittels
PCR-gestützter Genotypisierung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Miriam Scheubner

aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gunnar Schotta
Prof. Dr. Peter Lohse
Prof. Dr. Christoph Salat

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Grundlagen
- 1.2. Mantelzelllymphom
 - 1.2.1. Histologie
 - 1.2.2. Klinisches Bild
 - 1.2.3. Molekularbiologie

2. Material und Methoden

- 2.1. Patientenmaterial
 - 2.1.1. Patientencharakteristik
 - 2.1.2. Materialgewinnung
 - 2.1.2.1. Tumorgewebe
 - 2.1.2.2. Normalgewebe
- 2.2. Methodik
 - 2.2.1. Zellisolierung
 - 2.2.2. DNA-Extraktion
 - 2.2.3. Allelotypisierung
 - 2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese
 - 2.2.5. Fragmentanalyse
- 2.3. Materialien, Reagenzien, Medien
- 2.4. Methoden der Auswertung

3. Ergebnisse

- 3.1. Ergebnisse der genomischen Allelotypisierung
- 3.2. Ergebnisse der Allelotypisierung von Chromosom 17
- 3.3. Statistische Auswertung: Korrelationen zwischen Orten erhöhter genetischer Alterationen, Korrelationen mit dem Proliferationsindex und dem morphologischen Subtyp

4. Diskussion

- 4.1. Deletionen im Bereich 1p
- 4.2. Amplifikationen im Bereich 3q
- 4.3. Deletionen im Bereich 6q
- 4.4. Deletionen im Bereich 7q
- 4.5. Deletionen im Bereich 9p
- 4.6. Deletionen im Bereich 13q
- 4.7. Deletionen im Bereich 17p
- 4.8. Zusammenfassende Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Grundlagen

Das Wachstum bzw. die Teilung einer normalen Zelle wird durch eine Reihe von Faktoren so reguliert, dass die Zellteilung lediglich den Verlust von Zellen ausgleicht oder sich einem vermehrten Bedarf anpasst. Im Gegenteil dazu teilt sich eine maligne Zelle unkontrolliert. Bei der Transformation einer normalen zur malignen Zelle liegt eine Sequenz von Alterationen an Genen vor, die auch in der gesunden Zelle auf verschiedenen Ebenen an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind.

Die an der Transformation beteiligten Gene lassen sich in drei Gruppen einteilen: Onkogene, Tumorsuppressorgene und DNA-Reperatur-Gene .

Onkogene entstehen durch genetische Veränderung aus Protoonkogenen. Diese sorgen in der normalen Zelle abhängig von äußeren Faktoren für eine Regulation der Zelldifferenzierung und des Wachstums auf verschiedenen Ebenen (Bishop 1983) (Siehe Tabelle 1).

Das Onkogen ist in Gegensatz zum Protoonkogen unabhängig von äußeren Signalen ständig aktiviert. Wichtige regulatorische Elemente fehlen, so dass statt einer Wachstumsregulation ein ständiger Wachstumsreiz gesetzt wird. Dabei reicht die Veränderung eines der beiden Allele des Protoonkogenes zum Onkogen aus: Onkogene wirken dominant.

Regulationsebene	Beispiel	Protoonkogen	Mechanismus	Tumor
Wachstumsfaktor	Fibroblast growth factor	<i>hst-1</i>	Über-expression	Magenkrebs
Wachstumsfaktor-rezeptor	CSF-1-Rezeptor	<i>fms</i>	Punktmutation	Leukämie
Signaltransduktion	Nonreceptor-tyrosinkinase	<i>abl</i>	Translokation	CML, ALL
Nukleare Regulation	Transkriptions-aktivatoren	<i>myc</i>	Translokation	Burkitt-Lymphom
Zell-Zyklus-Regulation	Cycline	<i>cyclin D</i>	Translokation	Mantelzell-lymphom

Tabelle 1.1 Onkogene; nach Ramzi, Vinay, Tucker: Robbins Pathologic basis of disease, sixth edition, S.279

Die Überaktivierung des Onkogens kann dabei z.B. durch Punktmutationen oder durch Translokationen entstehen. Es kann so zu einer Fusion von Genen zu echten Neogenen kommen, so dass die Zelle physiologischerweise nicht vorkommende Proteine exprimiert, z.B. einen ständig aktivierten Wachstumsfaktor-Rezeptor. Diese qualitative Veränderung ist ein häufiges Ereignis bei der Entstehung myeloischer Neoplasien.

Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung eines Onkogens besteht in der Koppelung des Protoonkogens an den Promotor eines anderen Gens. Diesen Mechanismus findet man oft bei lymphatischen Neoplasien, bei denen das

Protoonkogen durch Translokation unter die Kontrolle des konstitutionell aktivierten Promotor der Immunglobuline oder der T-Zell-Rezeptoren gerät und dadurch überexprimiert wird.

Sowohl bei myeloischen wie auch bei lymphatischen Neoplasien stellt diese Onkogenentstehung ein relativ frühes und für die morphologisch definierten Subentitäten charakteristisches Ereignis dar. Die Entstehung *eines* Onkogens allein reicht aber für die maligne Transformation nicht aus. So fand Limpens 1995 in gesunden Personen die Translokation t(14; 18), die als bcl-Rearrangement an der Entstehung von follikulären B-Zelllymphomen beteiligt ist. Offensichtlich sind also weitere genetische Alterationen für die maligne Transformation notwendig.

Tumorsuppressorgene regulieren ebenfalls das Wachstum der Zelle, allerdings wirken sie im Gegensatz zu den (Proto-)Onkogenen hemmend auf den Prozess der Zellteilung. Auch Tumorsuppressorgene können prinzipiell auf allen Ebenen der Wachstumsregulation eingreifen (siehe Tab. 2). Damit die maligne Zelle unkontrolliert wächst, müssen beide Allele des TSG verloren gehen: TSG sind rezessive Gene.

Funktion	Gen	Tumor
Zelladhäsion	<i>E-cadherin</i>	Magenkrebs, Brustkrebs
Inhibition der ras-Signal-Transduktion	<i>NF-1</i>	Schwannom
Regulation des Zellzyklus	<i>Rb</i>	Retinoblastom Osteosarcom Brust-, Colon-, Lungenkarzinom
	<i>p16(INK4a)</i>	Pankreas-, Ösophaguskrebs
Regulation des Zellzyklus, Apoptose	<i>p53</i>	Viele humane Tumoren

Tabelle 1.2 Tumorsuppressorgene; nach Ramzi, Vinay, Tucker: Robbins Pathologic basis of disease, sixth edition, S.287

Tumorsuppressorgene können auf verschiedenen Wegen inaktiviert werden. Der Verlust des Gens durch genomische Deletion ist ebenso möglich wie Punkt-oder Rasterschubmutationen oder die Methylierung des Promotors (Murray et al. 2004, Weinberg et al. 1991).

In hämatologischen Neoplasien erfolgt im Rahmen der Multistep-Genese eines Tumors der Verlust von Tumorsuppressorgen relativ spät. Es ist bekannt, dass TSG-Verluste zum Progress dieser Tumoren beitragen, und sowohl die Prognose als auch das morphologische Bild des Tumors beeinflussen können.

Die dritte Gruppe der an der malignen Transformation beteiligten Gene sind die DNA-Reparaturgene. Sie beeinflussen die Tumorentstehung indirekt. In der normalen Zelle sind DNA-Reparaturgene während der Zellteilung in der Lage, entstandene Mutationen im Genom aufzuspüren und zu reparieren. Fallen sie aus, steigt die Zahl der fehlerhaft eingesetzten Basen während der Zellteilung

stark an. Auch Mutationen an den Onkogenen und Tumorsuppressorgenen werden wahrscheinlicher, und so wird indirekt die Entstehung einer Krebszelle gefördert.

1.2. Mantelzelllymphom

1.2.1. Histologie

Das Mantelzelllymphom ist ein niedrigmalignes Non –Hodgkin-Lymphom, das vor einigen Jahren als eigenständige Entität anerkannt wurde. Der Begriff Mantelzelllymphom fasst die vorher als zentrozytisches Lymphom (Kiel-Klassifikation) und die in der amerikanischen Literatur als lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation , intermediate lymphocytic lymphoma und mantelzone lymphoma bezeichneten Fälle auf Grund der in allen Fällen vorliegenden Translokation t(11;14) (q13;q32) (s.u.) zu einer neuen einheitlichen Gruppe zusammen.

Der Ursprung der Zellen des Mantelzelllymphoms liegt vermutlich in prägerminalen Zellen primärer Follikeln oder der Mantelregion sekundärer Follikel. Das Wachstumsmuster, der Nachweis von Positivität für alkalische Phosphatase sowie immunologische Analysen deuten auf diesen Ursprung in prägerminalen B-Zellen hin (Nanba et al., Hummel et al.). Auch die molekulare Struktur der chromosomalen Breakpoints der Translokation t(11; 14) (q13; q32) spricht für eine Abstammung von prägerminalen B-Zellen (Welzel et al., 2001). Andere Untersuchungen der Breakpoints haben jedoch auch gezeigt, dass nicht alle Fälle von MCL diese typische molekulare Struktur zeigen und implizieren damit, dass die Entität MCL genetisch heterogen sein könnte, wobei der größere Teil der Fälle von prägerminalen Zellen abstammt, ein kleinerer Teil aber auch von reiferen B-Zellen, die bereits der Umgebung im Keimzentrum des Lymphknoten exponiert waren (Thorselius et. Al., 2002).

In den Lymphknoten wächst das Mantelzelllymphom meist diffus oder leicht nodulär und zerstört die physiologische Architektur.

Die Bezeichnung Mantelzelllymphom umfasst zwei zytologische Varianten, die klassische und die blastoide. Die typische Variante zeigt kleine bis mittelgroße Lymphozyten, die irreguläre Kerne mit gleichmäßig verteiltem kondensiertem Chromatin, wenig Zytoplasma und unauffällige Nucleoli enthalten. Die proliferative Aktivität ist bei der klassischen Variante meist niedrig (Banks et al. 1992).

Die blastische Variante der MCL verläuft klinisch aggressiver als die klassische, was vermutlich mit ihrem durchschnittlich höheren mitotischen Index zusammenhängt. In der Gruppe der blastischen MCLs sind nach morphologischen Kriterien zwei Untergruppen zu unterscheiden: der lymphoblastoide und der pleomorphe Typ. Ersterer besteht aus mittelgroßen Lymphozyten mit wenig Zytoplasma, runden Kernen und prominenten Nucleoli. Die pleomorphe Untergruppe besteht aus großen Zellen mit ovalen oder unregelmäßig geformten Kernen mit lockerem Chromatin und kleinen Nucleoli (Ott et al. 1997, Lardelli et al. 1990, Bosch et al. 1998).

Dass all diese morphologisch so unterschiedlichen Gruppen einem einheitlichen Krankheitsbild angehören, zeigen Immunphänotyp und genetische Veränderungen, die in allen Untergruppen relativ einheitlich sind (Bosch et al. 1994, Rimokh 1993).

So exprimieren alle Untergruppen die B-Zell-Marker CD20 und CD22, ebenso das T-Zell-assoziierte CD5 und sind negativ für CD10 und CD23 (im Gegensatz zur CLL).

Auch die Translokation im Bereich 11q13, bcl-Rearrangements und eine Überexpression von Cyclin D1 sind in allen Untergruppen nachweisbar.

1.2.2. Klinisches Bild

Klinisch verläuft die Krankheit aggressiv und bisher unheilbar. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 3-4 Jahre, wobei die blastische Variante deutlich schneller voran schreitet (mittlere Überlebenszeit 18 Monate). Außer den Lymphknoten sind oft Knochenmark, peripheres Blut, Milz, Gastrointestinaltrakt und andere Organe betroffen. Splenomegalie und Lymphomzellen im peripheren Blut deuten auf eine schlechte Prognose hin, ebenso höheres Alter, Anämie, hohe Lactatdehydrogenase, niedrige Albuminserumwerte und eine hohe Mitoserate des Tumorgewebes (Argatoff et al. 1997, Bosch et al. 1998)

Die Therapie des Mantelzelllymphomes bleibt schwierig. Mit konventioneller Chemotherapie werden in einem Teil der Patienten komplette Remissionen erreicht, diese sind aber nicht von Dauer. In den letzten Jahren wurde versucht, die Chemotherapie des Mantelzelllymphomes zu intensivieren, um die Überlebenszeit der Patienten zu verbessern. Eine Studie, die Chemotherapie (CHOP) mit dem CD 20-Antikörper Rituximab kombiniert, erzielte signifikant höhere Ansprechensraten als alleinige Chemotherapie, bei gleicher Toxizität der Regime. Ob sich dieses gute Ansprechen auch auf die krankheitsfreie bzw. komplette Überlebenszeit der Patienten auswirkt, bleibt abzuwarten. (Lenz, Dreyling et al. 2005). Auch andere Chemotherapieschemata wie HyperCVAD werden zunehmend mit Rituximab kombiniert. Fludarabin in Kombination mit Cyclophosphamid und Mitoxantron (FCM) zeigten ebenfalls gute Ansprechraten. Auch hier zeigte sich ein besseres Ansprechen bei Kombination mit Rituximab (Forstpointner et al., 2006). Bendamustin in Kombination mit Rituximab zeigt ebenfalls gute Wirksamkeit, auch in der Rezidivtherapie (Rummel et al., 2005). Eine Erhaltungstherapie mit Rituximab verlängerte die krankheitsfreie Zeit bei Patienten mit indolenten Lymphomen (Cartron et al., 2007).

Auch autologe und allogene Stammzelltransplantationen werden durchgeführt, vorwiegend bei Patienten mit rezidivierter Erkrankung bzw. in der ersten Remission: Khouri et al. erreichten 2003 mittels allogener Stammzelltransplantation bei 17 von 18 Patienten mit rezidiviertem MCL eine komplette Remission. Auch hier ist jedoch die Nachbeobachtungszeit noch zu kurz, um das Gesamtüberleben zu bewerten. Eine primäre autologe Stammzelltransplantation wurde im Rahmen des „Nordic Mantle Cell Lymphoma Protocol“ von Andersen et al. 2003 durchgeführt. Patienten, die auf die Induktionstherapie mit einer kompletten oder partiellen Remission ansprachen wurden autolog transplantiert. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte krankheitsfreie bzw. auch Gesamtüberlebenszeit für Patienten, die in einer kompletten Remission transplantiert wurden, verglichen mit Patienten, die nur eine partielle Remission erreichten. Die Anzahl reinfundierter Tumorzellen in den autologen Stammzellen wirkte sich dabei nicht auf die Überlebenszeit aus. Eine

Studie von Kasamon et al. (2005) zeigt ebenfalls eine erhöhte krankheitsfreie Zeit bei Stammzelltransplantationen, wobei wiederum die Patienten, die in der ersten Remission transplantiert wurden, die besten Ergebnisse zeigten. Patienten, die nach dem Eintreten eines Rezidivs oder ohne Ansprechen der primären Chemotherapie transplantiert wurden, zeigten schlechtere Ergebnisse. In einer Studie des Europäischen Mantelzell Lymphom Netzwerkes wurde eine konsolidierende Hochdosistherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation im Vergleich zur konsolidierenden Therapie mit Interferon alpha (nach einer Induktionstherapie nach dem CHOP bzw. R-CHOP-Schema) durchgeführt. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte krankheitsfreie Überlebenszeit bei den Hochdosis-Patienten verglichen mit den Patienten, die Interferon alpha als Erhaltungstherapie erhielten (39 Monate vs. 17 Monate, $p=0,0108$) (Dreyling et al. 2005). In einer Studie der „Deutschen Studiengruppe Niedrigmaligne Lymphome“ fand sich jedoch in der Gruppe der Hochdosispatienten nach vier Jahren im Vergleich mit der Interferon alpha - Therapie ein etwas erhöhtes Risiko von 3,8% vs. 0% für sekundäre hämatologische Erkrankungen (myelodysplastisches Syndrom oder akute myeloische Leukämie) (Lenz, Dreyling et al 2004). Ob ein Vorteil in der Gesamtüberlebenszeit der hochdosistherapierten Patientengruppe besteht, kann erst nach längerer Beobachtungszeit entschieden werden.

Bei rezidierten bzw. therapierefraktären MCL zeigte auch eine Therapie mit Thalidomid plus Rituximab Wirkung (Kaufmann et al. 2004). Komplette Remissionen wurden bei 31% der 16 Patienten erreicht, ein Ansprechen bei 81%. Das mittlere progressionsfreie Intervall lag bei 20,4 Monaten.

Auch eine Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor Bortezomib, der auch für die Behandlung vom Multiplen Myelom zugelassen ist, zeigte in Studien ein Ansprechen bei rezidierten oder refraktären MCL (Goy et al. 2005, Kane et al. 2007).

Insgesamt muss bei den neuen Therapieansätzen der letzten Jahre die Nachbeobachtung entscheiden, ob und welche intensiverte Therapie einen Überlebensvorteil für die Patienten mit sich bringt.

1.2.3 Molekularbiologie

Die genetischen Veränderungen, die zur Entstehung der MCL führen, sind noch weitgehend ungeklärt. Typisch ist für die MCL die Translokation $t(11; 14)(q13; q32)$, die durch FISH-Technik in so gut wie allen MCL-Fällen nachgewiesen werden kann (Vaandrager et al. 1996). Durch diese Translokation erfolgt eine Anlagerung der Promotorregion für die schwere Kette der Immunglobuline zu *bcl-1* (B-cell lymphoma/leukemia1), ein Gen auf 11q13. Dieses Gen kodiert für Cyclin D1. Durch die Translokation gerät Cyclin D1 unter die Kontrolle des Immunglobulin-Promotors. Cyclin D1 wird in normalen Zellen nicht exprimiert, in MCL-Zellen dagegen ist eine Überexpression von Cyclin D1 nachweisbar (Bigoni et al. 1996).

Cyclin D1 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus, der den Übergang der Zelle von der G1 in die S-Phase kontrolliert. Die Funktion des Cyclin D1 hat somit Einfluss auf die Proliferationsaktivität der Zelle (Sherr 1996).

Während des gesamten Zellzyklus werden in der Zelle CDKs (Cyclin dependent kinase) exprimiert. Erhält die Zelle in der G1 Phase einen Wachstumsstimulus, bildet sie CyclinD1. Dieses bildet einen Komplex mit der CDK. Dieser Cyclin D1/CDK-Komplex phosphoryliert Rb (Retinoblastoma gene product). Wird Rb phosphoryliert, gibt es E2F-Faktoren frei, die die Transskription von für die S-Phase wichtigen Proteinen (wie DNA-Polymerasen, Thymidinkinasen etc.) veranlassen und die Zelle tritt in die Zellteilung ein. Somit führt die Überexpression von Cyclin D1 zur Zellproliferation der malignen Zelle. Interessanterweise stellt die Expression von zusätzlichen proliferationsassoziierten Genen einen wichtigen Prognosefaktor in MCL dar (Rosenwald et al. 2003).

Jedoch ist die alleinige Überexpression von Cyclin D1 nicht hinreichend für die Entstehung einer Krebszelle, wie an transgenen Mäusen gezeigt werden konnte (Bodrug et al. 1994, Lovec et al 1994). Dies könnte daran liegen, dass die Zelle bei hoher Cyclin D1 Konzentration kompensatorisch Cyclin D2 und 3 herunterreguliert. (Ott et al. 1997). Es sind also sekundäre genetische Veränderungen in MCL-Zellen notwendig, die zur Lymphomentstehung beitragen.

In Studien von Lovec et al. (1994) und Bodrug et al. (1994) wurde z.B. auf die Rolle des *c-myc* Gens hingewiesen, dessen Überexpression zusammen mit der Cyclin D1 Überexpression zur Ausbildung eines B-Zell-Lymphoms führen kann. Eine Studie von Hernandez et al. (1999) zeigte *c-myc*-mRNA Überexpression in 38% der analysierten MCL, die in blastischen Fällen etwas häufiger als in den typischen Fällen vorlag. Veränderungen am Genom waren dabei nur in einem Fall nachzuweisen, also wesentlich seltener als in anderen Lymphomen mit *c-myc*- Überexpression.

Eine Überexpression von *p53* führt zu einem klinisch aggressiven Verlauf und verkürzter Überlebenszeit (Louie et al. 1995, Greiner et al. 1996, Hernandez et al. 1996) Auch wurde von verschiedenen Gruppen nachgewiesen, dass eine Inaktivierung der CDK-Inhibitoren mit einem aggressiven Verlauf der Krankheit einhergeht. Meist waren die CDK-Inhibitoren in blastischen oder pleomorphen Fällen mutiert, jedoch auch in einigen klassischen Mantelzelllymphomen, die interessanterweise eine höhere Proliferationsaktivität und einen aggressiveren Verlauf zeigten (Dreyling et al. 1997, Pinyol et al.1997, Gronbaek et al.1998). *P53*- und CDK-Inhibitor-Mutationen scheinen also zu einer Transformation in die aggressive MCL-Variante zu führen.

Stilgenbauer et al. (1998) und Dreyling et al. (1997) identifizierten eine weitere Tumorsuppressorregion auf 13q14, die beim MCL in 70% deletiert war.

In einer anderen Studie fanden Stilgenbauer et al. (2000) mittels Fluoreszenz-in situ- Hybridisierung in 46% der MCL Deletionen auf 11q14-q24, die die Region des *atm*-Gens einschließen. Deletionen des *atm*-Genes treten beim MCL häufiger auf als bei anderen Lymphomen (Fang et al. 2003). Eine Mutation des *atm*-Genes bei NHL scheint signifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit

zusammenzuhängen. (Cuneo et al. 2000). Das *atm*-Gen ist also ein möglicher TSG-Kandidat in MCL, das bei der Entstehung bzw. dem Progress der Erkrankung eine wesentliche Rolle spielen könnte.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Kandidaten-Regionen für weitere sekundäre Alterationen identifiziert. Häufig wurden Amplifikationen von 3q, 7p, 8q, 12q, 18q und 9q gefunden. Deletionen wurden in den Regionen 6q, 1p, 11q, 10p, 17p, 9p, und 13 festgestellt. Die sekundären Veränderungen waren häufiger in blastoiden als in klassischen Fällen von MCL nachweisbar. (Bea S et al.1999, Monni et al. 1998)

Die vollständige Charakterisierung der Pathogenese im MCL steht allerdings noch aus. Nur wenig ist über sekundäre genetische Veränderungen bekannt, die zur klinischen Manifestation der Erkrankung beitragen könnten.

Unsere Gruppe hat genetisches Material von 52 MCL-Patienten mit 82 über das gesamte Genom verteilten Mikrosatelliten-Primern untersucht. Mittels PCR-gestützter Allelotypisierung wurde dabei sowohl Normal- wie auch Tumorgewebe auf Deletionen bzw. Amplifikationen genomischer Regionen untersucht.

2.Material und Methoden

2.1.Patientenmaterial

2.1.1.Patientencharakteristik

Von 52 Patienten mit Mantelzelllymphom wurden sowohl Tumor- als auch Normalgewebe untersucht. 42 Patienten waren männlichen und 10 Patienten weiblichen Geschlechts. Das Durchschnittsalter betrug 66.5 Jahre, wobei der jüngste Patient 42 und der älteste 85 Jahre alt war.

Die Untersuchungsergebnisse der 52 Patienten basieren auf den Ergebnissen der Arbeit „Charakterisierung von Tumorsuppressorregionen in Mantelzell-Lymphomen mittels PCR-gestützter Genotypisierung“ von Katja Hübler, 2002, in der die Genloci der vorliegenden Arbeit in 25 Patientenproben untersucht wurden. 27 Patientenproben wurden von uns auf identische Art und Weise gewonnen und mit derselben Methodik bearbeitet, so dass die Gesamtgruppe dieser Analyse 52 Patientenproben umfasst.

Tabelle 2.1 Patientencharakteristik und -material

Pat.- Nummer	MCL- Untergruppe	Geschlecht	Alter	Leukä- mische Generali- sation	Tumor- probe	Nor- mal- ge- webe
1	Klassisch	m	76	+	Buffy	Gran.
2	k.A.	m	k.A.	+	Buffy	Gran.
3	k.A.	f	68	+	Buffy	Gran.
4	k.A.	m	76	+	Buffy	Gran.
5	k.A.	f	43	+	Buffy	Gran.
6	Klassisch	m	67	-	Tumor	NPB
7	k.A.	m	k.A.	+	Buffy	Gran.
8	k.A.	m	63	+	Buffy	Gran.
9	Klassisch	m	71	+	Buffy	Gran.
10	Pleomorph	m	68	-	Tumor	NPB
11	k.A.	m	62	+	Buffy	Gran.
12	k.A.	m	61	-	Lymph	Gran.
13	k.A.	m	70	-	Tumor	NPB
14	Klassisch	f	62	+	Buffy	Gran.
15	k.A.	m	52	-	Tumor	Gran
16	Klassisch	f	64	-	Tumor	Buffy
17	k.A.	m	45	-	Tumor	Buffy
18	Klassisch	f	78	-	Tumor	Buffy
19	Klassisch	m	56	-	Tumor	Buffy
20	Klassisch	m	60	+	Buffy	Gran.
21	Klassisch	m	50	-	Tumor	Bucc. DNA
22	k.A.	m	63	-	Tumor	Gran
23	Klassisch	m	77	+	Buffy	Gran.
24	Klassisch	m	70	+	Buffy	Gran.
25	Klassisch	f	81	-	Tumor	NPB
26	k.A.	m	61	-	Tumor	NPB
27	Pleomorph	m	64	-	Tumor	NPB
28	Klassisch	m	68	-	Tumor	NPB

Pat.- Nummer	MCL- Untergruppe	Geschlecht	Alter	Leukä- mische Generali- sation	Tumor- probe	Nor- mal- ge- webe
29	Pleomorph	m	69	-	Tumor	Buffy
30	Klassisch	m	69	-	Tumor	Gran
31	Klassisch	m	72	-	Tumor	Buffy
32	Klassisch	f	k.A.	-	Tumor	Buffy
33	Pleomorph	m	k.A.	-	Tumor	Gran
34	Klassisch	m	63	-	Tumor	Buffy
35	Klassisch	m	58	-	Tumor	NPB
36	k.A.	m	80	-	Tumor	Buffy
37	Klassisch	f	76	+	Buffy	Gran.
38	k.A.	m	55	+	Buffy	Gran.
39	k.A.	m	60	+	Buffy	Gran.
40	k.A.	m	62	+	Buffy	Gran.
41	Klassisch	f	71	+	Buffy	Gran.
42	k.A.	m	70	+	Buffy	Gran.
43	Klassisch	m	55	+	Buffy	Gran.
44	Klassisch	f	81	+	Buffy	Gran.
45	Klassisch	m	76	-	Tumor	NPB
46	Klassisch	m	68	-	Tumor	NPB
47	Klassisch	m	62	-	Tumor	NPB
48	Klassisch	m	52	-	Tumor	NPB
49	Klassisch	m	64	-	Tumor	NPB
50	Pleomorph	m	58	-	Tumor	NPB
51	Klassisch	m	77	-	Tumor	NPB
52	Pleomorph	m	42	-	Tumor	NPB

m = männlich

f = weiblich

k.A. = keine Angabe

+ = leukämische Generalisation liegt vor

- = leukämische Generalisation liegt nicht vor

Buffy = aus Vollblut isolierte Lymphozyten

Tumor = Gewebe direkt aus dem Tumor, d.h. aus dem Lymphom

NPB = aus Vollblut isolierte Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten

Gran = aus Vollblut isolierte Granulozyten

Bucc. DNA = Wangenschleimhaut

2.1.2 Patientenmaterial

2.1.2.1 Tumorgewebe

Die histologische Diagnose des Mantelzelllymphomes wurde nach den ANNECY-Kriterien bzw. der aktuellen WHO-REAL-Klassifikation (Zucca et al. 1994) von einem Mitglied des europäischen MCL-Pathologenpanels (PD Dr. G. Ott, Universität Würzburg) morphologisch, zytogenetisch und mittels Immunphänotypisierung bestätigt. Aus dem Gewebe wurden Areale mit überwiegendem Tumoranteil ausgewählt.

In 31 Fällen wurde die Tumor-DNA aus formalinfixiertem Material (Tumor) extrahiert. Die übrigen 21 Tumor-DNA-Proben wurden aus dem Blut von Patienten mit immunphänotypisch nachgewiesener leukämischer Generalisation bzw. aus eingefrorenen vitalen Lymphozyten gewonnen, nachdem die leukämischen Mantelzelllymphom-Zellen mit Hilfe von Ficollseparationslösung aufgereinigt wurden.

2.1.2.2 Normalgewebe

Die Methode der Allelotypisierung basiert auf einem Vergleich von Tumor- und Normal-DNA. Das notwendige Normalgewebe stammt bei Patienten mit leukämischer Generalisation aus aufgereinigten Granulozyten (31 Fälle; Gran), bei Patienten ohne leukämische Generalisation aus Zellen des Vollblutes (20 Fälle; npb/Blut). Bei einem Patienten wurde die Normal-DNA aus Wangenschleimhaut gewonnen (buccal).

2.2. Methodik

2.2.1 Zellisolierung

Bei leukämischer Generalisation wurde das Vollblut in eine Lymphozyten-Monocyten-Fraktion (Buffy, Tumorzellen) und eine Granulozyten-Fraktion (Normalzellen) aufgeteilt.

Zunächst wurden die Erythrozyten abgetrennt, indem das Vollblut im Verhältnis 2:1 mit 6%igem Dextran-Sulphate Sodium Salt in 0,9%iger NaCl-Lösung gemischt wurde. Nach 30minütiger Sedimentation, in der sich die Erythrozyten abgesetzt hatten, wurde der Überstand aus Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten abgetrennt.

Um die Granulozyten von den Lymphozyten zu trennen, wurde der Überstand zu gleichen Anteilen mit PBS gemischt. Dieses Gemisch wurde langsam im Verhältnis 2:1 auf Ficoll-Separationslösung aufgeschichtet, anschließend wurde eine Dichtegradientenzentrifugation bei 1200g für 20 min. ohne Bremse durchgeführt. Während der Zentrifugation setzt sich das Erythrozyten-Granulozyten-Pellet von den mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) im Buffycoat ab. Der Buffy-coat wurde abpipettiert und anschließend

mit 30ml PBS gewaschen und 10 min. bei 400g zentrifugiert, um die Lymphozyten zu isolieren.

Das Erythrozyten-Granulozyten-Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit 30ml PBS und Zentrifugation (bei 400g für 10 min.) für 10 min. in eine Lösung aus 1ml PBS und 14ml 1xNH₄Cl-Solution gegeben, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Zuletzt erfolgte eine Zentrifugation für 10 min. bei 1000Upm .

Die Zellen wurden nach Tryptanblaufärbung in der Neubauer-Zählkammer gezählt und die Aufreinigung der Granulozyten zytomorphologisch bestätigt..

Das Vollblut von Patienten ohne leukämische Generalisation wurde im Verhältnis 1:3 mit 0,3% Triton X-100-Lösung gemischt und 6 min auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 1500g und 4°C wurde der Überstand verworfen, das Pellet wurde mit 10ml einer Lösung aus 50mM Tris pH 7.4, 25mM Saccharose, 5mM MgCl₂ und 25mM KCl gemischt und anschließend in 20ml 0,3%ige Triton X-100 gegeben. Das Gemisch wurde bei 1500g und 4°C für 10 min. erneut zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, und das Pellet aus Granulozyten und Lymphozyten als Normalgewebe für die DNA-Extraktion verwendet.

Die Zellen der Wangenschleimhaut, die bei einem Patienten verwendet wurden, wurden mit einem Cytobrush aus den Wangentaschen gewonnen. Die Zellen wurden 30 min. in 0,9%NaCl gelöst und sedimentiert. Das Pellet wurde zu gleichen Teilen mit PBS gemischt. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 1200g wurde das entstehende Pellet zur DNA-Extraktion weiterverwendet.

2.2.2 DNA-Extraktion

Aus den isolierten Zellen wurde die DNA extrahiert, indem die Zellen mit 400 µl 1xLysispuffer lysiert und 15 Stunden mit einigen µg Proteinase K bei 55°C inkubiert wurden. Anschließend wurde die Proteinase K (bei 70°C für 10 min.) inaktiviert und durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt, indem das Pellet mit 150 µl Chloroform und 150 µl Phenol vermischt und dann bei 13000g für 5min. zentrifugiert wurde. Die Proteine wurden in der Chloroform-Phenol Phase gebunden, während sich die DNA im wässrigen Überstand abpipettiert wurde. Die DNA wurde anschließend mit 40 µl 3M Natriumacetat und 880 µl absolutem Alkohol gefällt und für 20 min. bei 13000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde in 70% Alkohol gewaschen, für 5-10 min. unter Zentrifugation in einer Vakuumpumpe getrocknet und mit 50 bis 200 µl destilliertem Wasser gelöst.

2.2.3 Allelotypisierung

Auf dem gesamten menschlichen Genom finden sich hochpolymorphe Marker, die aus sich wiederholenden Di-, Tri- und Tetranukleotiden bestehen (Weber et May 1989, Mao et al. 1994). Diese Mikrosatelliten unterscheiden sich wegen ihres hochpolymorphen Charakters auf den beiden Allelen häufig in ihrer Länge. Zwei verschieden lange Sequenzen zeigen das Vorhandensein zweier verschiedener Allele für den jeweiligen Genomabschnitt an (heterozygote Allele). Findet man nur eine Sequenzgröße, dann ist das Genom in diesem Bereich homozygot, d.h. beide Allele weisen die gleiche Sequenzlänge auf.

Durch den Vergleich normaler DNA mit der DNA einer Tumorzelle kann man so Deletionen und Amplifikationen in der Tumorzelle identifizieren: Ist die normale Zelle eines Patienten heterozygot für einen Marker, die Tumorzelle aber homozygot, muss bei der Tumorzelle ein Allel in diesem Bereich verloren worden sein (loss of heterozygosity, loh). Somit ist nicht nur das Mikrosatellit-Allel deletiert, sondern auch die kodierende Gene dieser Region sind mit großer Wahrscheinlichkeit von der Deletion betroffen.

Um das gesamte Genom zu untersuchen wurden 85 Primer (siehe Tab. 3) ausgewählt, die gleichmäßig über das Genom verteilt sind. Verzichtet wurde lediglich auf Marker des Chromosoms 14, um Artefakte durch die bekannte Translokation t(11;14) zu vermeiden.

Die verwendeten Primer sind alle im Rahmen des Human Genom Project kartiert worden (Gyapay et al. 1994).

Tabelle 2.2 Mikrosatellitenprimer

Mikrosatellitenprimer	Lokalisation	Größe (bp)	Fluoreszenz-Marker	Heterozygotie
D1 S450	1p36	316-340	FAM	0,81
D1 S2797	1p	102-138	FAM	0,74
D1 S206	1p13	208-226	NED	0,82
D1 S2878	1q	152-178	NED	0,84
D1 S249	1q31	163-193	FAM	0,87
D1 S2785	1q42.2-43	173-187	HEX	0,76
D2 S 168	2p23	159-183	HEX	0,82
D2 S 2259	2p21	322-342	FAM	0,79
D2 S 2216	2p11.2	213-227	FAM	0,76
D2 S 2330	2q23-24	171-189	FAM	0,81
D2 S 2382	2q	299-337	HEX	0,81
D2 S 338	2q37.1	270-294	NED	0,81
D3 S 1304	3p25-pter	258-280	HEX	0,80

Mikrosatellitenprimer	Lokalisation	Größe (bp)	Fluoreszenz-Marker	Heterozygotie
D3 S 1300	3p14	235-267	FAM	0,82
D3 S 1292	3q22-23	115-149	NED	0,85
D3 S 1262	3q27	115-137	FAM	0,80
D3 S 1601	3q28-pter	299-331	HEX	0,85
D4 S 2935	4p16	90-110	HEX	0,62
D4 S 391	4p14	153-173	HEX	0,85
D4 S 1592	4q12	117-145	HEX	0,72
D4 S 1572	4q2	199-217	FAM	0,84
D4 S 413	4q31.1	286-338	FAM	0,85
D4 S 415	4q32	268-304	NED	0,80
D5 S 1981	5p15	121-131	NED	0,73
D5 S 426	5p	279-303	HEX	0,80
D5 S 641	5q	301-341	NED	0,77
D5 S 408	5q33	253-289	FAM	0,73
D6 S 1574	6p24	150-176	FAM	0,84
D6 S 276	6p23	205-237	FAM	0,83
D6 S 257	6p11-12	170-198	NED	0,87
D6 S 434	6q21	206-250	HEX	0,86
D6 S 292 (P39)	6q23	158-180	HEX	0,83
D6 S 308 (P37)	6q23-24	328-356	FAM	0,75
D6 S 264	6q26	113-135	FAM	0,70
D7 S 531	7p22	281-299	NED	0,83
D7 S 493	7p13-p21	207-239	HEX	0,88
D7 S 519	7p12-p13	260-288	FAM	0,81
D7 S 515	7q22	144-206	FAM	0,82
D7 S 684	7q35	344-366	HEX	0,81
D7 S 798	7q35-36	76-98	HEX	0,84
D8 S 550	8p22	191-221	NED	0,87
D8 S 285	8q12	317-333	NED	0,78
D8 S 270	8q22.1-22.2	107-123	NED	0,79
D8 S 284	8q24	275-309	HEX	0,83
D9 S 285	9p21	85-113	NED	0,78

Mikrosatellitenprimer	Lokalisation	Größe (bp)	Fluoreszenz-Marker	Heterozygotie
D9 S 171	9p21	164-188	NED	0,79
D9 S 273	9p13	206-226	NED	0,74
D9 S 1677	9q31-33	234-258	FAM	0,81
D10 S 249	10p15	122-144	NED	0,74
D10 S 547	10p13-14	238-260	HEX	0,74
D10 S 192	10 q25.1	242-268	NED	0,77
D11 S 902	11p14	152-172	HEX	0,80
D11 S 935	11p11.22	200-222	FAM	0,73
D11 S 987	11q12	100-138	FAM	0,82
D11 S 4175	11q14	290-342	NED	0,89
D12 S 352	12p13	156-176	HEX	0,73
D12 S 364	12p12-13	300-328	FAM	0,87
D12 S 326	12q13.12-23.3	210-236	HEX	0,80
D12 S 324	12q24	238-260	NED	0,69
D13 S 171	13q13	179-207	NED	0,73
D13 S 153	13q21	94-126	NED	0,81
D13 S 265	13q31-32	93-131	HEX	0,70
D13 S 173	13q33	237-257	FAM	0,82
D15 S 128	15q11-12	201-219	NED	0,78
D15 S 978	15q22	187-215	HEX	0,83
D15 S 205	15q25	130-170	FAM	0,88
D15 S 120	15q26	158-186	NED	0,73
D16 S 404	16p13.2	265-285	HEX	0,80
D16 S 3046	16p	87-113	FAM	0,74
D16 S 415	16q11.2	216-244	FAM	0,72
D16 S 516	16q23.3	248-270	NED	0,73
D17 S 831	17p13	112-134	HEX	0,82
D17 S 1852	17p13	283-311	FAM	0,87
D17 S 798	17q11	300-324	HEX	0,80
D17 S 949	17q 23-24	214-232	FAM	0,80
D18 S 1102	18q12	96-108	NED	0,79
D18 S 61	18q22	213-243	NED	0,87

Mikrosatellitenprimer	Lokalisation	Größe (bp)	Fluoreszenz-Marker	Heterozygotie
D18 S 70	18q23	115-135	FAM	0,83
D19 S 209	19p13.3	243-259	FAM	0,77
D19 S 226	19p13.1	241-273	NED	0,85
D19 S 571	19q13.4	290-322	NED	0,83
D20 S 195	20q12	133-159	FAM	0,81
D20 S 173	20q13	131-185	HEX	0,67
D21 S 1256	21p	101-121	NED	0,65
D21 S 263	21q21	198-232	HEX	0,75
D22 S 315	22q11.2	184-214	FAM	0,78
D22 S 283	22q12-13	132-160	NED	0,89

FAM, HEX, NED = verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe zur Markierung der Primer

Heterozygotie = die Häufigkeit zweier unterschiedlich langer Allele in der Normalbevölkerung

Bp = base pairs

2.2.4 Polymerase - Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese

Die Normal- und Tumor –DNA von 52 Patienten wurde mit Hilfe der Polymerase - Kettenreaktion amplifiziert.

Das Reaktionsvolumen von 15µl beinhaltete:

- 10µl destillierten Wasser
- 1,5µl 10x PCR-Puffer mit 25mM Magnesiumchlorid
- 0,3µl Magnesium [50mM]
- 1,5µl d-NTP [2,5mM]
- 1µl DNA
- 0,2µl Ampli Taq Gold [entspricht 1U]
- 1µl von dem jeweiligen fluoreszenzmarkierten Primer

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im PCR Thermo Cycler „Perkin Elmer System 9700“ durchgeführt:

1. Denaturierung für 12 min bei 95°C
2. 10 Zyklen je bei 94°C für 15 sec
bei 55°C für 30sec
bei 72°C für 30sec
30 Zyklen je bei 89°C für 15sec
bei 55°C für 30sec
bei 72°C für 30sec
3. Abschließende Synthese für 10 min bei 72°C

Um die Amplifikationsprodukte zu quantifizieren, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt: 3µl der Amplifikationsprodukte wurden mit 8µl 0,5xTBE und 1µl Gelfarbstoff gemischt und auf ein 2,0% Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief 35 min bei 100 V und 40mA. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und zur Dokumentation fotografiert. Als Standardmarker für das Molekulargewicht wurde ein 100bp DNA-Leiter (Promega Corporation) verwendet.

2.2.5 Fragmentanalyse

Jeweils 2,5µl FAM-markiertes (1:20)(blau), 5µl HEX-markiertes (1:10)(schwarz) und 5µl NED (1:10)(grün) -markiertes PCR-Produkt wurden in 37,5µl dH₂O (HPLC) gegeben. 1µl dieses Mix wurde mit 12,5µl Größenstandard (bestehend aus 0,5µl GS 400 HD-ROX) und 12µl Formamid, vermischt. Anschließend wurde das Gemisch bei 90°C für 2min denaturiert und 5 min auf Eis gestellt.

Die Amplifikationsprodukte der PCR wurden im Gene Scan mittels Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und die Menge analysiert.

Im Detektionsfenster des Gene Scans wurde ein Laser auf den fluoreszierenden Farbstoff der Primer gerichtet. Das entstehende Lichtsignal wird als digitales Signal in der Datenerfassungssoftware weiterverarbeitet.

Um die Größe der Amplifikationsprodukte festzustellen, wurde die Größe des jeweiligen Produktes mit dem Größenstandardfarbstoff (GS 400 HD-ROX) verglichen und bestimmt. Das Ergebnis der Analyse zeigte jeweils ein Kurvenprofil, in dem die Amplifikationsprodukte in ihrer Größe (X-Achse) und Menge (Y-Achse) dargestellt sind (siehe Abbildung 2.1.).

2.3. Materialien (Reagenzien, Medien, Geräte)

<u>Ampli Taq Gold:</u>	Perkin Elmer Biosystems Division Foster City , USA
<u>absoluter Alkohol</u>	
<u>Agarosepulver:</u> (2%iges Gel: 42ml 0,5x TBE, 0,8g Agarose)	Biozym bzw. GIBCO BRL Hessisch Oldendorf , Deutschland
<u>310 Capillaries für POP 4 (47cmx 50µm)</u>	Perkin Elmer Applied Biosystems Applied Biosystems GmbH Weiterstadt , Deutschland
<u>Chloroform:</u>	Sigma- Aldrich Chemie Deisenhohen , Deutschland
<u>Destilliertes Wasser:</u>	
<u>Dextran Sulfat Natrium Salz: 6 %ig</u>	Pharmacia Biotech Europe GmbH Freiburg , Deutschland
<u>100bp DANN Größenstandard Ladder:</u> (geliefert in 10mM Tris-HCl [pH 7,5], 1mM EDTA);	Promega Corporation Madison , USA
<u>Ethidiumbromid:</u> (20µl auf 200ml 0,5%ig TBE)	Merck KGaA Darmstadt , Deutschland
<u>Ficoll-Lösung:</u>	Biochrom seromed Berlin , Deutschland
<u>Gene Amp 10x PCR-Buffer II und 25mM MgCl₂-Lösung:</u> (100mM Tris-HCl [pH 8.3], 500mM KCl, 15mM MgCl ₂ , 0,01%[w/v] gelatin	Perkin Elmer Applied Biosystems Divisions Foster City , USA

<u>Genetic Analyzer Puffer mit EDTA:</u>	Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH Weiterstadt , Deutschland
<u>Genetic Analyzer-Reagenzröhrchen-0,5ml:</u>	Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH Weiterstadt , Deutschland
<u>Genetic Analyzer-Septen für 0,5ml Reagenzröhrchen:</u>	Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH Weiterstadt , Deutschland
<u>10x GS Puffer:</u>	Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH Weiterstadt, Deutschland
<u>Elektrophorese-Farbstoff:</u> (0,02g Bromphenol und 1,5g Ficoll zu/ auf 10ml dH2O)	
<u>Lysepuffer:</u>	Applied Biosystems GmbH Weiterstadt , Deutschland
<u>50mM Magnesium Chlorid:</u>	Gibco BRL Life Technologies GmbH Karlsruhe, Deutschland
<u>Natriumacetat:</u>	Merck KGaA Darmstadt , Deutschland
<u>d-NTP:</u> 2,5mM:Ansatz von jeweils 5 µl 100mM d-ATP, 100mM d-TTP, 100mM d-CTP, 100mM d- GTP auf 180µl dH2O 1.25mM:Ansatz von jeweils 2,5µl 100mM	Gibco BRL Life Technologies GmbH Karlsruhe , Deutschland

d-ATP, 100mM d-GTP, 100mM
d-TTP, 100mM d-CTP und
190µl dH₂O (Verdünnung 1:80)

1x NH₄Cl Lysing Solution: (1,68M NH₄Cl
[89,9g], 0,1M KHCO₃ [10,0g] und 0,1mM
Tetrasodium EDTA [370mg] in 1 Liter Aqua
bidest lösen, pH von 7,3 einstellen und
1:10 mit Aqua bidest verdünnen)

10x PCR Puffer ohne Mg:
(200mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl)

Gibco BRL
Life Technologies GmbH
Karlsruhe , Deutschland

PBS (Phosphat gepufferte Lösung):
(8g NaCl [58,44g/mol]; 0,2g KCl
[74,56g/mol]; 1,44g Na₂HPO₄
[wasserfrei, 141,96g/mol]; 0,24g KH₂PO₄
[136,09g/mol] auf 1 Liter bidestilliertes
Wasser, pH 7,4; autoklaviert

Phenol:

Carl Roth GmbH und Co
Karlsruhe , Deutschland

POP 4 Polymer4

Perkin Elmer
Applied Biosystems GmbH
Weiterstadt , Deutschland

PCR-Primer für beta-Aktin:
(5`-3` Sense:GCG GGA AAT CGT GCG
TGA CAT T
5`-3` Antisense:GAT GGA GTT GAA
GGT AGT TTC GTG
1:10 verdünnt)

NAPS Göttingen GmbH
Göttingen , Deutschland

Proteinase K:

Saccharose:

Gibco BRL

Life Technologies GmbH
Karlsruhe , Deutschland

Taq DNA Polymerase: Gibco BRL Gibco BRL
Life Technologies GmbH
Karlsruhe , Deutschland

0,5xTBE Medium: (270g TRIS; 137,5g
Borsäure; 100ml EDTA (pH8) ad 5l dH₂O -
>1:10 verdünnen [0,5mol])

Tris pH 7,4

Triton X-100 Lösung:0,3 %ig

Trypanblau: SERVA Feinbiochemica
Heidelberg , Deutschland

Fluoreszenzmarkierte Primer: siehe
Tabelle 3.2; Perkin Elmer Linkage
mapping Set 2 Perkin Elmer
Applied Biosystems GmbH
Weiterstadt , Deutschland

Größenstandard(Gene scan):0,5µl GS 400
HD ROX und 12µl Formamid Perkin Elmer
Applied Biosystems GmbH
Weiterstadt , Deutschland

PCR Thermo Cycler Perkin Elmer System
9700 Perkin Elmer
Applied Biosystems GmbH
Weiterstadt , Deutschland

Sequenzierer Gene Scan 310 Perkin Elmer
Applied Biosystems GmbH
Weiterstadt , Deutschland

2.4. Methoden der Auswertung

Die Kurvenprofile des Sequenzierers wurden in einem ersten Schritt nach allelischen Imbalancen ausgewertet. In einem zweiten Schritt wurden die gefundenen Imbalancen in Deletionen und Amplifikationen differenziert.

Die Allelotypisierung beruht auf einem Vergleich zwischen den Allelen von normaler und Tumor-DNA. Wird im Vergleich mit normaler DNA bei der Tumor-DNA der Verlust eines Allels nachgewiesen, spricht man von einem loss of heterozygosity (loh). Ebenso können durch den Vergleich zu normaler DNA Amplifikationen in Tumorzellen nachgewiesen werden.

Voraussetzung für diese Methode ist es jedoch, dass in der normalen DNA des Patienten zwei verschieden große Allele nachweisbar sind. Die Fälle, in denen dies nicht möglich ist, können nicht ausgewertet werden. Sie wurden als „nicht informativ“ bezeichnet.

Um einen Vergleich zwischen Normal und Tumor-DNA zu ermöglichen, wurde die PCR als „virtuelle“ Multiplex-PCR durchgeführt: Die Reaktionsbedingungen der PCR und der Fragmentanalyse waren für alle durchgeführten Reaktionen identisch. Ein gemeinsamer PCR-Mastermix (Patienten-DNA, Wasser, dNtp, Magnesium und Puffer) wurde erstellt und zuletzt lediglich der jeweilige Primer in die einzelnen Reaktionsgefäße hinzugegeben. Die Proben wurden in der gleichen Reaktionreihe im Thermocycler amplifiziert und im Sequenzierer visualisiert. Somit wurde die Amplifikation für alle Proben unter annähernd gleichen Bedingungen durchgeführt und die eventuell methodisch bedingten quantitativen Unterschiede der Allele zu vernachlässigen.

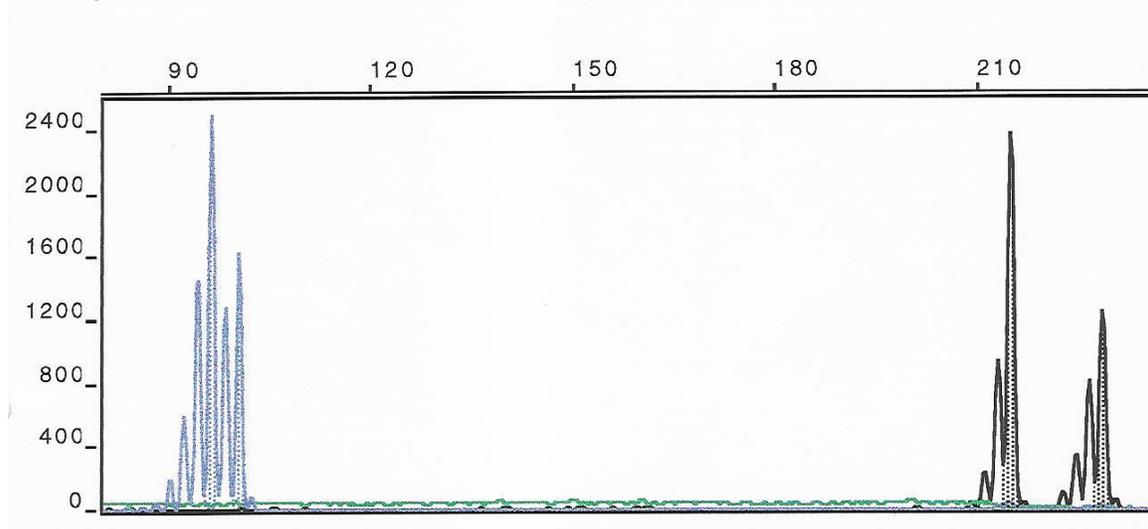
Die Amplifikationsprodukte wurden im Gene Scan nach Größe der Fragmente (X-Achse) und Menge (Y-Achse) dargestellt (siehe Abbildung 2.1., S.26).

Zum Nachweis einer allelischen Imbalanz wurde die Menge des Amplifikationsproduktes (Höhe des Allel-Peaks) mit dem zweiten Allel des Markers ins Verhältnis gesetzt (Quotientbildung: $\text{Allel 1} / \text{Allel 2}$). Dieser Quotient wurde für jeden Marker bestimmt und die Normal-Allele mit den Tumor-Allelen verglichen (Quotient Normal / Quotient Tumor). Dieser Gesamtquotient zeigt an, ob sich die Tumor-Allele im Vergleich zu den Normal-Allelen deutlich verändert haben und ein Verlust oder Zugewinn im Bereich des Mikrosatellitenmarkers in der Tumor-DNA vorliegt.

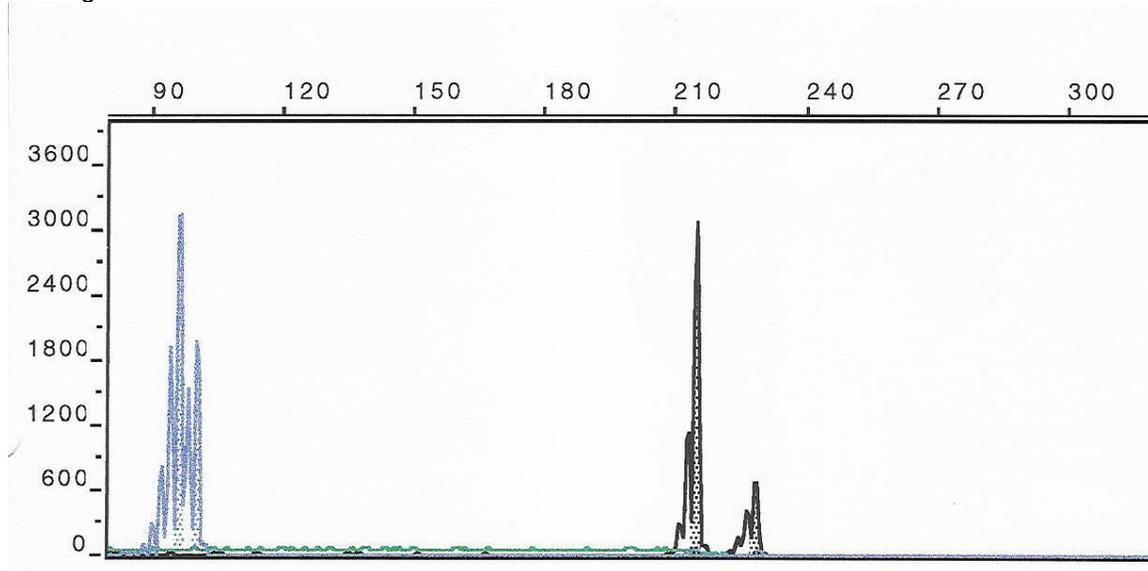
Im zweiten Schritt kann zusätzlich zwischen einer Amplifikation oder einer Deletion des Allels unterschieden werden. Da die Amplifikationsbedingungen im Rahmen der virtuellen Multiplex-PCR für alle Marker annähernd identisch sind, ist auch die Allelmenge verschiedener Marker vergleichbar. Ist ein Allelpeak deutlich höher als es im Vergleich mit den unveränderten benachbarten Mikrosatelliten zu erwarten wäre, liegt eine Amplifikation vor. Ist der Allelpeak deutlich niedriger, ist von einer Deletion auszugehen.

Abbildung 2.1. Beispiel für Kurvenprofile mit und ohne LOH

Normalgewebe



Tumorgewebe



In der oben stehenden Abbildung sind zwei Marker (blau und schwarz) zu sehen. Die x-Achse stellt die Größe, die y-Achse die Menge der Fragmente dar. Während bei dem blauen Marker das Verhältnis der Allelhöhen bei Normal- und Tumorgewebe annähernd gleich bleibt, ist bei dem schwarzen Marker eine deutliche Veränderung der Relation der Allelhöhen zu beobachten. Bei dem schwarzen Marker liegt ein loss of heterozygosity vor.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse genomische Allelotypisierung

Tumor- und Normalgewebe von 52 Patienten wurde mit jeweils 86 Primern untersucht. Ein Patient zeigte keine Alterationen. Alle anderen Patienten zeigten mindestens eine Deletion oder eine Amplifikation. Der Durchschnitt der Anzahl der Alterationen betrug 10,7.

In 12,48% der 4472 Experimente wurde eine allelische Imbalanz identifiziert. Diese Imbalanzen konnten in 371 Deletionen (66.5% der Imbalanzen) und 187 Amplifikationen (33,5% der Imbalanzen) differenziert werden.

Tabelle 3.1a Ergebnisse genomische Allelotypisierung für die Patienten 1-26

Primer/Pa.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
D1 S450	2	2	2	1	2A	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	-	2
D1 S2797	2	2A	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	1	2L	2	2	2	2	2
D1 S206	2L	2	1	2	2	2	2L	1	2	2	2	2	2L	1	2L	1	2	2L	2	1	2L	1	2	2L	2	2L
D1 S2878	2L	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2
D1 S249	2	2A	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D1 S2785	2	1	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D2 S 168	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2A	2L	2	2L	2	2	2	2L	1
D2 S 2259	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2A	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2A	1
D2 S 2216	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2A	1	2	2	1	-
D2 S 2330	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2A	2	2	1	2	2	2	2A	2	2	2	2	1	2
D2 S 2382	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2A	-
D2 S 338	1	2A	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	2L	2	2	2	2	2
D3 S 1304	2L	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2L	2	2L	2L	1	1	2	1	2	2A	2	2	
D3 S 1300	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2L	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1
D3 S 1292	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	1	2A	2	2	2	2	2	2	2L	2	2L
D3 S 1262	2A	2A	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	1	2	2	1	2	2A	2	2L	2	2	2	2	1	2	2
D3 S 1601	1	2	2A	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2L	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	1
D4 S 2935	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2A	2	1	2A	2	2	2	2	2	2	2	2
D4 S 391	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L
D4 S 1592	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2L	2	1	2	2	2	2	2

Primer/Pa.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
D4 S 1572	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D4 S 413	2	1	1	2	2L	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2L	2	1	2	2L	2	2	2	1	1	2	2
D4 S 415	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	1	2	2	2	2L	1	2	1	2	2
D5 S 1981	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2L	2	2	1	2	2	2	2
D5 S 426	1	2L	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2
D5 S 641	1	2	2A	1	2	2	2	2L	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	-	1
D5 S 408	2	1	1	1	2A	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2A	1	2	2	2	2
D6 S 1574	2	2	2	2	1	2A	2	2	2	2L	2	2	2A	1	2	2	1	2	2	2	2A	2	2	1	1	2L
D6 S 276	2	2	2A	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2	2A	2	2	2	1	2
D6 S 257	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D6 S 434	2	2L	2	1	2	2	1	2	2	2	2L	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2
D6S308	1	1	2	1	2	2	2	2	1	1	2L	2	1	2	2L	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2A	2
D6 S 264	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2L	2	2L	2	2	2	2	2	2L	2	2L	2	2	2	2L	-
D7 S 531	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2L	1	1	1	2	2	2	2
D7 S 493	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	1	2L	2	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2L	2	1	-	2
D7 S 519	2	2	1	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D7 S 515	2L	2	2	2	2	2	2L	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2L	2	2L	2	1	2	2	2	2	2
D7 S 684	1	2L	1	1	2	2	2L	2	2	1	1	1	2	2	2L	1	2	2	2	2	2L	2	2	1	2	2L
D7 S 798	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2L	2L	1	2	2	2	2	1	2
D8 S 285	1	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2L	2	2	2	2	2	1	2A	2	1	2L	2

Primer/Pa.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
D8 S 550	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2L	2	2L	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2L	2L
D8 S 270	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	
D8 S 284	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2L	2	2L	2	1	1	2	2	
D9 S 285	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2A	2A	2	2L	2A	2	1	2	2	
D9 S 171	1	1	1	2	2	2	1	1	2	1	2	1	2L	2	1	1	1	2L	2L	2L	2L	2L	1	2	2	2	
D9 S 273	2L	2	2L	2	2	2	2	2L	1	2A	2	2	2L	2	2L	1	2	2L	2L	2	2L	2L	1	2	1	-	
D9 S 1677	2A	1	2L	1	2	2	2	2L	2	2L	2	2	2	1	2L	2	1	2L	2	2	2L	2	2	1	2L	2A	
D10 S 249	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	1	
D10 S 547	2L	2	2	1	1	2	2L	2	2	2	1	2	2L	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	
D10 S 192	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	
D11 S 902	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	
D11 S 935	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	2	
D11 S 987	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	
D11S4175	1	2L	2	2	2L	2	1	2	2	2	2L	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	1	
D12 S 352	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	1	2	1	2	
D12 S 364	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2L	2A	2L	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	
D12 S 326	2	2L	2	2	2	2	2A	2	1	2	2L	2	2	2L	2	2A	2	2	2	1	2L	2	2	2	2	2L	
D12 S 324	2	2	2	1	2	1	2L	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	1	
D13 S 171	1	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2L	2	1	2	2	2	2	1	2L	1	2	2	1	2	
D13 S 153	2L	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2L	2	2	2	2	2L	2A	2	2	2L	2	2	2	2	

Primer/Pa.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
D13 S 265	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2L	2	2	2	2L	2L	2	1	2	2L	2L	2
D13 S 173	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	2L	2	2	2L	1	2	2	2	2	1	2	2L	1	2
D15 S 128	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2L	2L	2	2	2	2	1	2A	2
D15 S 978	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2A	1	2	2	2	1	1	2
D15 S 205	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2L	-
D15 S 120	2	2	2	2	2L	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2L	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
D16 S 404	1	2	2	2	2L	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2
D16S3046	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2	2	2L	2	2L	2	2	2
D16 S 415	2	2A	2	1	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D16 S 516	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2	1	2	2	2A	2	2L	1	2	1	2	2
D17 S 831	2L	2	2L	2L	2A	2	2	2L	2L	2L	2	2L	2	2	2L	2	2	2	2	2	2L	2	2A	2	2L	2L
D17S1852	1	2	1	2L	2L	2	2L	2L	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2L	2
D17 S 798	1	2	1	2L	2	2	2L	1	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2A	1	2	2	2	1
D17 S 949	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D18S1102	2	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	2
D18 S 61	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2L
D18 S 70	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-
D19 S 209	2A	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2A	2	2A	2	2	2	2	2	2A	2A	2	2	1	2L
D19 S 226	2	2A	1	2	1	2A	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	1
D19 S 571	1	2	2	1	2L	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2L	2	2L	2	2	2	2	2L

Primer/Pa.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
D20 S 195	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	-
D20 S 173	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2A	1
D21S1256	1	2	2	1	2	2	2L	2	2	2L	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2L	2	2	2	2	2
D21 S 263	2	2	2	1	1	1	2	2L	2	1	1	2	2	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	-
D22 S 315	2	2	1	2	2	2L	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1
D22 S 283	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L

Pa. = Patient Nr.

- = keine Amplifikationsprodukt

1 = im Normalgewebe homozygote Marker
(nicht informativ)

2 = im Normalgewebe heterozygote Marker

2A = Amplifikation im Tumorgewebe

2L = Deletion im Tumorgewebe

Tabelle 3.1b Ergebnisse genomische Allelotypisierung für die Patienten 27-52

Primer/Pa.	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	
D1 S450	2	2	-	2	2A	2	1	2	2	2L	1	2	2	-	22	-	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	-	
D1 S2797	2	2	2A	2	2	2	2	2A	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	-	2	2	1	2	1	1	1	
D1 S206	2L	2	2	2	2	2	2L	2A	1	2	2	1	2	2	1	-	1	2	2	1	2A	2	2	2L	1	2	
D1 S2878	2	2	2L	2	2	2	2	-	2	2	2	2	2	2	-	-	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	2L	
D1 S249	2	2	2	2	1	2	2	2A	2	2L	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	
D1 S2785	2	2	1	2	1	1	1	2A	2	2	2	2A	2	2	1	-	2	2	2	2	2	2	2	1	2L	2	
D2 S 168	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2L	2	2L	2L	2L	2L	2L	2	1	2	2L	2	2A
D2 S 2259	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2L	2A	2	2L	1	2	2	2	1	1	
D2 S 2216	2	2	2	1	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	-	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	
D2 S 2330	1	2	2	2	2A	2	2	2A	2	2	2L	2	2	2	1	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	
D2 S 2382	2A	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2L	
D2 S 338	2L	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	22	2	2L	1	1	2	2L	2	2	
D3 S 1304	2	-	2	2	-	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2L	2L	2	1	-	2	2	1	2	2	2	2L	
D3 S 1300	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	1	2A	2	2	2L	-	1	1	2	2	2	2	2	2L	2	2L	
D3 S 1292	2	2	1	2	2	2	2	2A	2L	2	2L	2	2A	2	2A	2L	2	2	2A	2	2L	2	2	2	2	2	
D3 S 1262	2A	-	2A	2	2	2L	2L	2	1	2	2A	2	2	2A	2	-	2	2	2A	2	2A	2	2	2	2	1	
D3 S 1601	2	2	2A	2	2	2A	2A	2	2	2L	2	2	2	1	1	-	1	2	-	2	2L	2	2	1	2	1	
D4 S 2935	2	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2L	1	1	2	2	2	1	1	2	2A	1	
D4 S 391	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2L	2	2	2	2	-	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2A	
D4 S 1592	1	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2A	2	1	1	2A	2	2A	2	2	2	

Primer/Pa.	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
D4 S 1572	2	1	2A	2	1	2	2	1	2	2L	2	1	1	2	2	2	2A	2	2	1	2	2	1	2	2	2
D4 S 413	1	2	2A	2	2	2	2	2A	2	2L	-	2L	2	2	2	1	2	2A	2	2	2	2	1	2L	2	2A
D4 S 415	1	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2L	2	2	2	1	2	2	1	2	1
D5 S 1981	2	2L	2	1	1	2	2	1	2A	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	1
D5 S 426	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2L	2	2	2	2L	2	2	2	2	-	2	1	2	2	2
D5 S 641	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	-	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L
D5 S 408	2	2	1	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	1	2	1	1	2L	2	1	2	-	2	2	2	2	2A
D6 S 1574	2A	2	2A	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	-	1	2	2	2	2	2	2	2L	1	2A
D6 S 276	1	1	2	2L	-	1	2	2	2	2L	2L	2	2	2L	2L	2L	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1
D6 S 257	2	2	2	2L	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	-	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2
D6 S 434	1	1	2	-	1	2L	2	1	1	2	2	2	-	2	2	-	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2L
D6S308	2	2	2L	1	2	2	-	2	1	1	1	2	1	1	2	-	1	1	2L	1	2	1	1	2A	1	1
D6 S 264	2	-	1	2A	2	2	2	2L	2	2	2	-	1	2	2	-	2	2	2	2L	2A	2	2L	2A	2L	2A
D7 S 531	2	1	-	2	1	1	1	2	2L	-	2	1	2	-	2	-	1	2	1	1	-	2	-	-	2	2
D7 S 493	2	2	2	2L	1	2L	2	1	2	2A	1	2	2	2	2	2L	2	1	2	2	1	2	1	2	2	2
D7 S 519	2	2	2	2L	2	2L	1	2	2	-	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2A	2	2	2	2	2L
D7 S 515	2A	-	2L	1	1	2	1	2A	2	2	1	2	2	2	2	2	2A	2	2	1	2	2	2	2	2	2A
D7 S 684	2	2	2	2A	2	2	2	-	1	-	2L	2	2	2L	1	2	2	2	2	2	-	-	-	1	1	1
D7 S 798	-	2	2	2L	-	2	1	2	-	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	2	2	1	-	2
D8 S 285	2	-	2L	2L	2	2	2L	2	1	2	1	2	1	2	2	-	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2

Primer/Pa.	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
D8 S 550	2	2A	2A	2	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	1	2	2A	2L	2	2
D8 S 270	2	1	2	1	-	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2L	2	1	2	2	1	2	2A	1	2	2
D8 S 284	2L	-	2	2	2	2	-	2A	2L	2	2	1	2	2A	2	2	1	2	2	2	2L	2	2	-	2	2
D9 S 285	1	2	2	2	-	1	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1
D9 S 171	2L	2	2L	2L	1	2	2	2A	2L	2	2	2	2	2	2	-	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2
D9 S 273	2	-	1	2L	1	1	2L	2L	1	1	2L	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2L	2L	2	2L
D9 S 1677	-	2	-	1	-	1	1	2	1	2L	2	2	2	1	2	-	2	2	1	2	-	2	2	1	1	1
D10 S 249	2A	-	2	2	2	1	2	2A	-	2L	2	1	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	2L	2	2	2
D10 S 547	2L	-	2	2	2	2	2	1	1	2	2L	1	2	2	2	-	2	2	1	2	2	1	1	2A	2	1
D10 S 192	2L	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2A	-	2	2
D11 S 902	2	2	2A	1	1	1	2A	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D11 S 935	1	2	2A	2	2	2	-	2	2	2L	2L	1	2	2	1	-	2A	2	2	2L	1	1	1	2	2	1
D11 S 987	2	2	2L	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2A
D11S4175	1	1	2	2	2	2	2	2	2A	2L	2	2A	2	2	1	-	2L	2	2L	2	2	2	2	1	2L	2
D12 S 352	2	1	2	-	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2A
D12 S 364	2L	2	2	-	2	2	1	2	2	2L	2	2	2	2	2L	-	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2L
D12 S 326	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2	2	-	2	2	2	2L	2L	2	2	2	2	2
D12 S 324	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2
D13 S 171	2	2	2	2	2	2	2	2	2L	2L	2	1	1	2	1	1	1	2L	2	2	2L	2	2	1	1	1
D13 S 153	2L	2	2	2L	2	2	2	2	2L	2L	2	2A	2	2	2	-	2	1	2L	2L	2	2	2L	2L	1	2A

Primer/Pa.	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
D13 S 265	1	2	1	2	2	2	2	2	2L	2L	2	1	2	1	1	2	2	2	2L	1	2L	2	2	2L	1	2A
D13 S 173	2L	1	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2L	-	2	1	2	2L	1	2	1	2A	2	2	-	2	2A
D15 S 128	2	1	2L	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2A
D15 S 978	2L	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2L	2L	2	2	2	2	2	2	2L	2	2L
D15 S 205	2	2	2A	2	-	2L	2	2A	2	2L	2	2	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2A
D15 S 120	1	1	2L	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	-	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
D16 S 404	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
D16S3046	2L	2	2L	2	2	2	2	2	1	2L	1	2	2	2A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A
D16 S 415	1	2	2	2	2	2	-	2	1	2	1	1	2	1	2	-	2	1	-	-	1	2	2	2	2A	2
D16 S 516	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2L	1	2	2	2	2	2L
D17 S 831	2	2	2	2	2	2L	2	2L	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2L	2	2
D17S1852	2	2L	2	1	2	2L	2	2L	2	2	2L	2	2	2	2L	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1
D17 S 798	2	2	1	2	1	2L	2A	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2L	2	2	2L	2	1	2	2A	2	1
D17 S 949	2	1	2	2	1	1	2A	2	2	2L	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	2
D18S1102	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	-	2	1	2L	2	1	2	1	2	1	2A
D18 S 61	-	2	-	2A	1	2	-	2	-	2	2	1	2	2	-	-	2L	2	2	2	2	1	2	2	2	2A
D18 S 70	2L	1	2	2L	2	2L	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2L	2	1	2	2	2	2	2A
D19 S 209	2L	1	2	2	2L	-	2L	2	2	2	2	1	1	2	-	-	-	1	-	2	2L	-	-	-	1	-
D19 S 226	2	2L	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2L	2	2	1	2	2	2	2	2L	2	2L
D19 S 571	2	1	1	2L	2	2	2	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2L	1	2	2

Primer/Pa.	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
D20 S 195	2	2	2A	1	2	2A	-	2	2	2	2	2	2	2A	2	1	1	2	2	1	2	1	2	-	2	2
D20 S 173	1	2	2	1	2	2	2L	2	2L	2	2L	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2L	1	1	2L	2	2
D21S1256	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	2
D21 S 263	2A	1	2	2A	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2L	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
D22 S 315	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2L	-	2	2	2	2	2	2	2	2	2
D22 S 283	2	2	2	2	2	2	2	2A	2	2	2	2	2	1	2	2L	-	2	2	2L	2	2	2	2	2	2L

Pa. = Patient Nr.

- = keine Amplifikationsprodukt

1 = im Normalgewebe homozygote Marker
(nicht informativ)

2 = im Normalgewebe heterozygote Marker

2A = Amplifikation im Tumorgewebe

2L = Deletion im Tumorgewebe

Tabelle 3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der genomischen Allelotypisierung

Primer	Auswertbare Fälle	Gesamt-LOH	Gesamt-LOH%	Deletionen	Deletionen%	Ampl.	Ampl%
D1S450	39	4	10,26%	2	5,13%	2	5,13%
D1S2797	42	5	11,9%	1	2,38%	4	9,52%
D1S206	39	13	33,33%	11	28,2%	2	5,13%
D1S2878	44	5	11,36%	3	6,82%	2	4,55%
D1S249	48	4	8,33%	2	4,17%	2	4,17%
D1S2785	41	3	7,32%	1	2,44%	2	4,88%
D2S168	44	11	25%	9	20,46%	2	4,17%
D2S2259	40	6	15%	3	7,5%	3	7,5%
D2S2216	42	2	4,76%	1	2,38%	1	2,38%
D2S2330	47	7	14,89%	3	6,38%	4	8,51%
D2S2382	44	4	9,09%	2	4,17%	2	4,17%
D2S338	42	6	14,29%	5	11,9%	1	2,38%
D3S1304	39	8	20,51%	7	17,95%	1	2,56%
D3S1300	45	6	13,33%	5	11,11%	1	2,22%
D3S1292	50	12	24%	5	10%	7	14%
D3S1262	46	13	28,26%	3	6,52%	10	21,74%
D3S1601	42	9	21,43%	4	9,52%	5	11,9%
D4S2935	34	3	8,82%	0	0%	3	8,82%
D4S391	48	4	8,33%	3	6,25%	1	2,08%
D4S1592	43	5	11,63%	2	4,65%	3	6,98%
D4S1572	43	3	6,98%	1	2,33%	2	4,65%
D4S413	43	11	25,58%	6	13,95%	5	11,63%
D4S415	42	4	9,52%	4	9,52%	0	0%
D5S1981	39	3	7,69%	2	5,13%	1	2,56%
D5S426	39	2	5,13%	2	5,13%	0	0%
D5S641	44	4	9,09%	2	4,17%	2	4,17%
D5S408	38	5	13,16%	2	5,26%	3	7,89%

Primer	Auswertbare Fälle	Gesamt-LOH	Gesamt-LOH%	Deletionen	Deletionen%	Ampl.	Ampl%
D6S1574	41	9	21,95%	3	7,32%	6	14,63%
D6S276	41	7	17,07%	5	12,2%	2	4,88%
D6S257	47	1	2,13%	1	2,13%	0	0%
D6S434	35	5	14,29%	5	14,29%	0	0%
D6S308	26	6	23,08%	4	15,38%	2	7,69%
D6S264	44	13	29,55%	9	20,45%	4	9,09%
D7S531	32	2	6,25%	2	6,25%	0	0%
D7S493	43	5	11,63%	2	4,65%	3	6,98%
D7S519	48	5	10,42%	5	10,42%	0	0%
D7S515	43	9	20,93%	5	11,63%	4	9,3%
D7S684	34	9	26,47%	8	23,53%	1	2,94%
D7S798	37	3	8,11%	3	8,11%	0	0%
D8S285	33	6	18,18%	5	15,15%	1	3,03%
D8S550	48	10	20,83%	6	12,5%	4	8,33%
D8S270	39	1	2,56%	0	0%	1	2,56%
D8S284	41	8	19,51%	6	14,63%	2	4,88%
D9S285	40	6	15%	3	7,5%	3	7,5%
D9S171	36	12	33,33%	11	30,56%	1	2,78%
D9S273	38	18	47,37%	17	44,74%	1	2,63%
D9S1677	34	11	32,35%	8	23,53%	3	8,82%
D10S249	42	5	11,9%	3	7,14%	2	4,76%
D10S547	38	6	15,79%	5	13,16%	1	2,63%
D10S192	45	3	6,67%	2	4,44%	1	2,22%
D11S902	48	4	8,33%	1	2,08%	3	6,25%
D11S935	38	5	13,16%	3	7,89%	2	5,26%
D11S987	45	4	8,89%	1	2,22%	3	6,67%
D11S4175	44	10	22,73%	8	18,18%	2	4,56%
D12S352	34	2	5,88%	0	0%	2	5,88%
D12S364	48	9	18,75%	8	16,67%	1	2,08%
D12S326	50	10	20%	8	16%	2	4%
D12S324	39	2	5,13%	2	5,13%	0	0%
D13S171	35	6	17,14%	6	17,14%	0	0%

Primer	Auswertbare Fälle	Gesamt-LOH	Gesamt-LOH%	Deletionen	Deletionen%	Ampl.	Ampl%
D13S153	50	18	36%	14	28%	4	8%
D13S265	40	12	30%	11	27,5%	1	2,5%
D13S173	38	11	28,95%	8	21,05%	3	7,89%
D15S128	45	5	11,11%	3	6,67%	2	4,44%
D15S978	44	5	11,36%	4	9,09%	1	2,27%
D15S205	48	8	16,67%	4	8,33%	4	8,33%
D15S120	35	3	8,57%	3	8,57%	0	0%
D16S404	43	3	6,98%	1	2,32%	2	4,65%
D16S3046	50	8	16%	5	10%	3	6%
D16S415	40	3	7,5%	1	2,5%	2	5%
D16S516	39	4	10,26%	3	7,69%	1	2,56%
D17S831	48	17	35,42%	15	31,25%	2	4,17%
D17S1852	43	12	27,91%	11	25,58%	1	2,33%
D17S798	42	9	21,43%	6	14,29%	3	7,14%
D17S949	49	3	6,12%	1	2,04%	2	4,08%
D18S1102	45	5	11,11%	1	2,22%	4	8,89%
D18S61	40	4	10%	2	5%	2	5%
D18S70	43	7	16,28%	5	11,63%	2	4,65%
D19S209	36	10	27,78%	5	13,89%	5	13,89%
D19S226	44	6	13,64%	4	9,09%	2	4,17%
D19S571	36	7	19,44%	5	13,89%	2	5,56%
D20S195	44	4	9,09%	0	0%	4	9,09%
D20S173	44	7	15,91%	5	11,36%	2	4,17%
D21S1256	32	3	9,38%	3	9,38%	0	0%
D21S263	39	4	10,26%	1	2,56%	3	7,69%
D22S315	45	1	2,22%	1	2,22%	0	0%
D22S283	50	5	10%	3	6%	2	4%

Auswertbare = Patientenzahl der Fälle informativen Fälle, d.h. mit heterozygoten Allelen im Normalgewebe

Deletionen = Patientenzahl der nachgewiesenen Deletionen

Deletionen% = Häufigkeit (in %) der auswertbaren Patienten mit nachgewiesenen Deletionen

Gesamt-LOH = Patientenzahl mit nachgewiesener LOH

Ampl. = Patientenzahl der nachgewiesenen Amplifikationen

Gesamt-LOH% = Häufigkeit (in %) der auswertbaren Patienten mit nachgewiesenen LOH

Ampl% = Häufigkeit (in %) der auswertbaren Patienten mit nachgewiesenen Amplifikationen

Abbildung 3.1 LOH von mindestens 2 benachbarten Markern pro Chromosomenarm

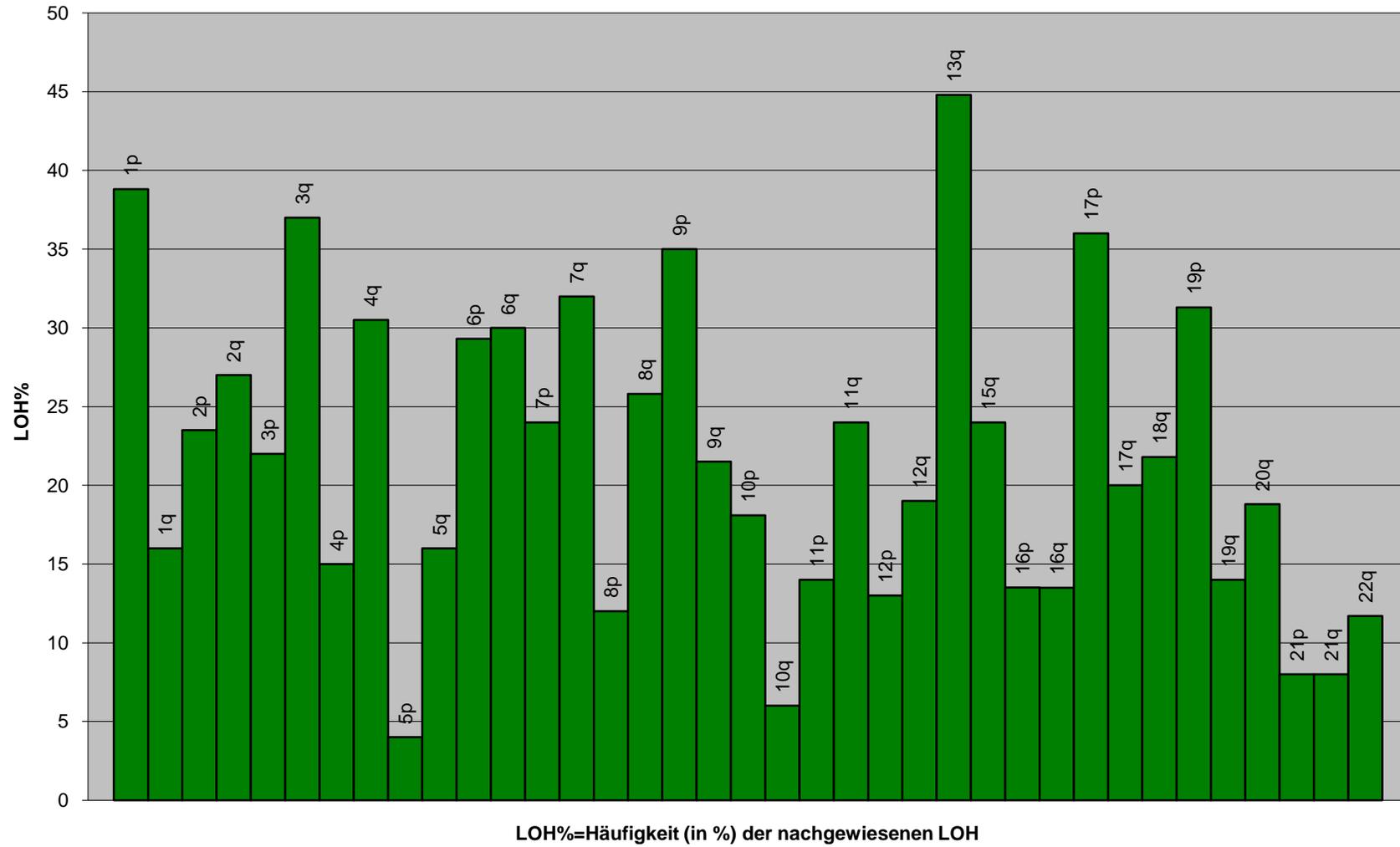


Abbildung 3.2 Deletion von mindestens 2 benachbarten Markern pro Chromosomenarm

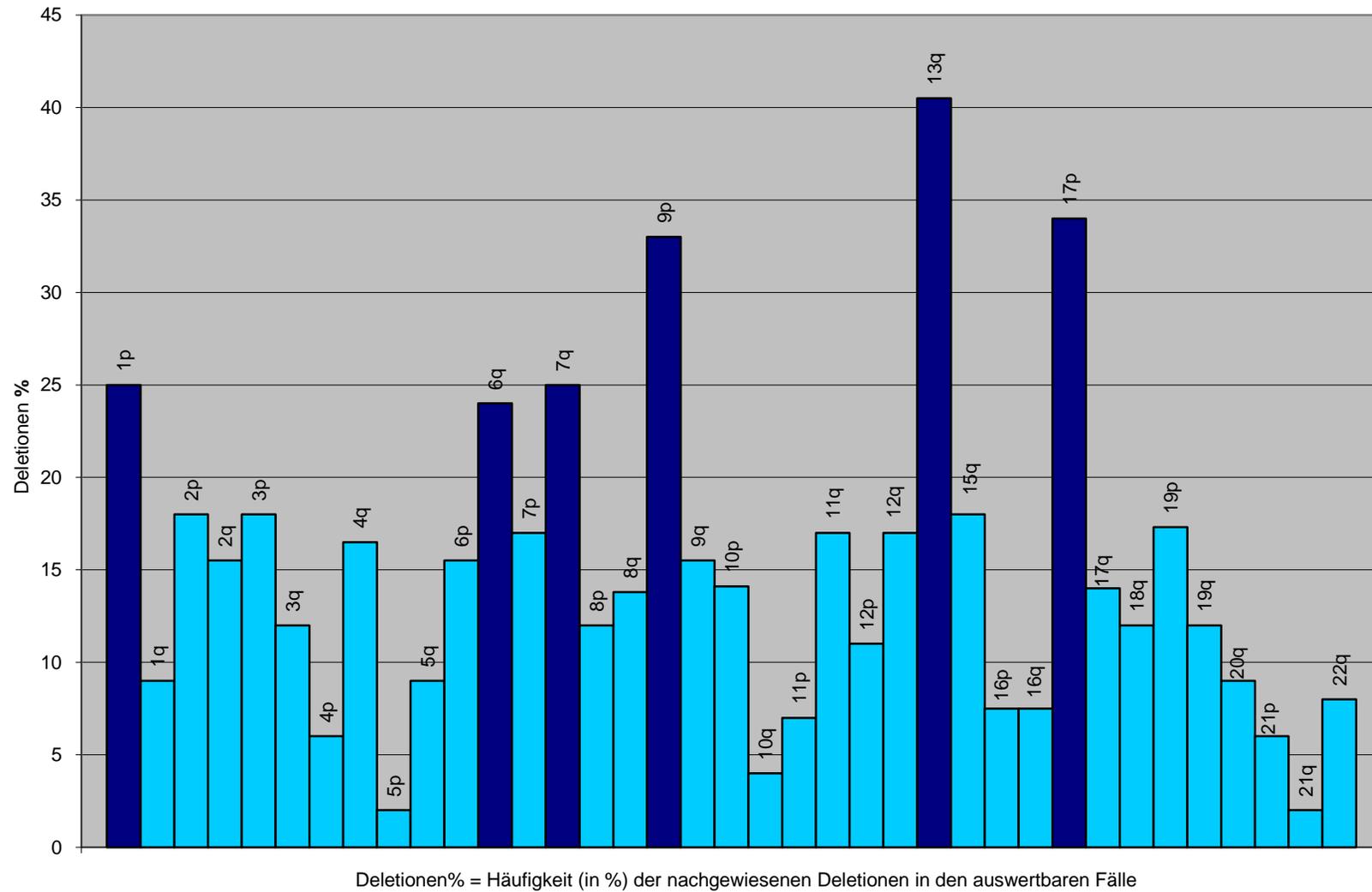
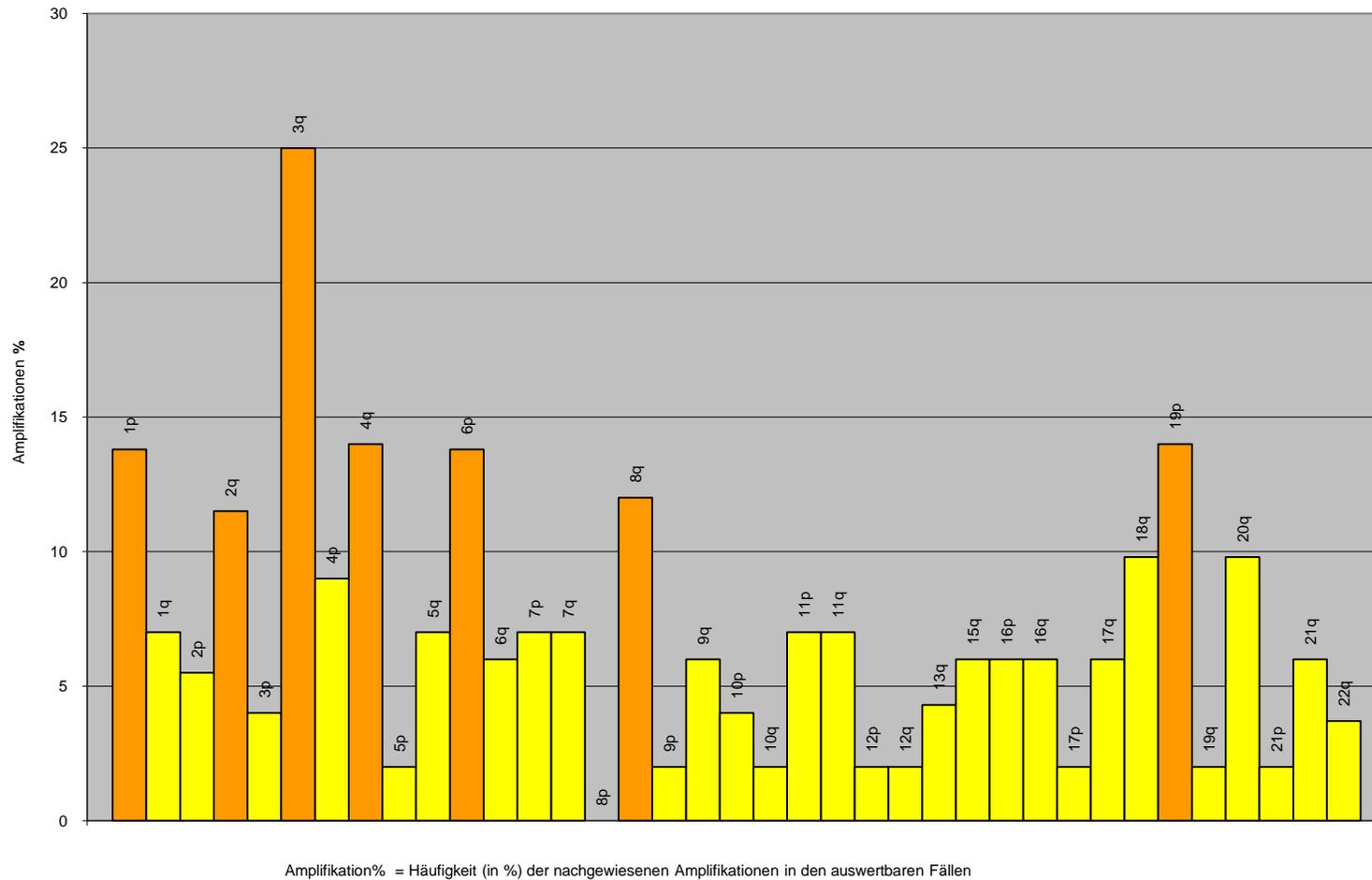


Abbildung 3.3 Amplifikation von mindesten 2 benachbarten Markern pro Chromosomenarm



Es fanden sich häufige Alterationen in den Bereichen 1p, 3q, 6q, 7q, 9p, 13q und 17p, die genetische Verluste bzw. Amplifikationen in über 20% der untersuchten Fälle zeigten.

Die von uns verwendeten Marker für den Bereich Chromosom 1p, D1S450 auf 1p36, D1S2797 auf 1p32 und D1S206 auf 1p21, zeigten insgesamt Deletionen in 25% der analysierten Proben, wobei der Marker D1S206 auf 1p21 am häufigsten (28.2%) deletiert war.

Die häufigste Amplifikation einer Region fand sich auf dem Chromosomenarm 3q (in 25% der untersuchten Fälle). Der Marker D3S1292 (3q22-23) war in 14% amplifiziert, D3S1262 auf 3q27 in 21,7%, D3S1601 im Bereich 3q28-pter in 11,9%.

Im Bereich von 6q (23,1%) fanden sich häufige Deletionen. Die von uns in diesem Bereich verwendeten Marker waren in (D6S434 auf 6q22) 14,3%, (D6S308 auf 6q25) 15,4% und (D6S264 auf 6q27) 20,5% deletiert.

Deletionen auf dem Chromosomenarm 7q fanden sich in 25% der Fälle. Die zur Charakterisierung dieser Region verwendeten Marker waren in (D7S515 auf 7q31) 11,6%, (D7S798 auf 7q36.2) 8,1% und (D7S684 auf 7q36.3) 23,5% deletiert.

Die Region 9p war in 21,2% deletiert. Sie wurde in unserer Studie mit 2 Markern untersucht: D9S285 auf 9p22 war in 7,5%, D9S171 auf 9p21 in 30,5% deletiert.

13q zeigte in dieser Studie Deletionen in 40,4 % der Fälle. Deletionen traten bei D13S171 auf 13q13 in 17,1%, D13S153 auf 13q14 in 28%, D13S265 auf 13q31 in 27,5%, D13S173 auf 13q33 in 21% auf.

Auch der Bereich 17p war häufig deletiert (34,6%). Der Marker D17S831 auf 17p13 war in 31,3%, der Marker D17S1852 auf 17p12 in 25,6% deletiert.

3.2. Allelotypisierung Chromosom 17

Eine genauere Untersuchung des Bereiches 17p13.1 bis 17p13.3 mit 18 Mikrosatellitenprimern dieser Region (siehe Tabelle 3.3 und 3.4) zeigte bei 48 von 51 Patienten (94,1%) mindestens für einen Primer einen loss of heterocycosity.

Tabelle 3.3 Ergebnisse Allelotypisierung des Bereiches 17p13.1 bis 17p13.3 (Patienten 1-52)

Primer/Pa.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
D17S849	2L	2	2L	2L	1	2	2	2L	2	2L	2	1	2	2	2	2	2	2L	1	2	2	1	1	2L	2L	2	
D17S1529	2L	1	2	2L	1	2	-	-	2	2L	2	2L	2	2	2L	2	-	2L	1	2	1	2	2	2	2	2L	
D17S1528	-	2	2L	1	2L	2L	2	1	2	1	2	2L	2	1	-	1	2L	-	2L	-	1	2	1	-	-	2	
D17S831	2L	2L	2L	2L	2L	2	2	2L	1	2L	2	2	2	2	2L	2L	2	2L	2	2	2	-	2	2L	2L	2	
D17S1845	2L	2	2L	2L	2L	2	2	-	2	1	2L	2	1	-	2L	1	2L	2L	2	2L	-	2	2L	2	2	2	
D17S1828	2L	2	1	2L	2L	2	2L	2L	2	2L	2	2	2	2	2L	1	2	1	2	2L	2	2	1	1	2	2	
D17S1298	2L	1	2	1	2L	1	1	2L	2	2L	2	2	1	2	1	2	2	2L	2	2L	-	2	2	1	1	1	
D17S1876	2L	2	2L	2L	2L	2	2	2L	2	2L	2	2	2	2	2L	2L	2	1	2L	-	1	2	-	-	2L	2	
D17S1810	2	2	1	2	-	2	2	-	2	2L	-	2	2	2	2L	2	2	1	2	1	2L	2	2	2L	2	2	
D17S938	2	2	2	2L	1	2	1	1	1	2L	2	2	2	1	2L	2	2	-	-	1	-	2	2	2L	2	2	
D17S516	2L	1	1	2L	1	-	1	2L	2	1	2L	2	2L	-	-	1	1	-	2	1	2L	-	2	2	2	2	
TP53	2L	2	2L	2L	2L	2	2	2L	2	2L	2	2	2	2	2L	2	2	2	2	2	-	2	1	2	2L	2	2L
D17S1844	2L	2	2L	1	1	2	2L	1	2	2	2	2L	2	2L	2L	2	2	2L	2	2							
D17S1791	2L	2	2L	1	1	2	2	2L	2	2L	2	2	2	2	-	2	2	2	2	2L	-	2	2	2	2	2	
D17S1852	1	2	1	2L	2L	2	1	2L	2	2L	2	2	2	2	-	2	2	2L	2	2L	2L	1	2	2L	2	2	
D17S799	1	2	2	2L	2L	2	2	2L	2	2L	2	1	2	1	1	2	2	2L	2	2L	2	1	2	2L	2L	2	
D17S921	2L	2	2L	2L	2L	2	2	1	2L	2	1	2	2	1	2L	2L	2	2L	2	2	1	2	1	1	2L	1	1
D17S1857	2L	1	1	2L	2L	2	2	1	1	2L	2	2	2L	2	2L	2	2	2	2	2L	2	2	2	2L	2	2	

Primer/Pa.	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
D17S849	2	1	1	2	1	2L	1	2L	2	1	2	2	2	2	2L	1	2	1	1	1	2	1	2	2L	1	1
D17S1529	1	2L	-	2	2L	2L	-	-	2	2L	2	2L	2	2	-	-	-	1	2	-	-	1	-	1	2L	2
D17S1528	2L	2L	-	-	2	2	2L	2	-	2L	-	2	-	-	-	1	-	1	2	-	-	-	-	-	2L	2L
D17S831	2	2	2	2	2	2L	2	2L	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	2L	2	2
D17S1845	2	2	1	1	2	2L	2	2	2	2	2L	2	2	2	2L	-	-	1	2	2L	2L	1	2L	1	2L	2
D17S1828	2	2	-	2	2	2L	1	2L	2	2	2	2	2	2	2L	2L	2	1	2	2	2L	2	1	-	2	2
D17S1298	2	1	2	2	2	2L	2	2L	2	2	2	2	2L	2	2L	-	2	1	2	2L	2	2L	2	2L	2	2L
D17S1876	1	-	2	2L	2	-	2	1	2	2L	-	2	2L	2L	1	-	2	1	2	2	2L	2	1	2L	-	2
D17S1810	2	2	2	2	2	2L	2	-	2	2	2	2	2	2	2L	2L	2	2	2	1	2	2	2	2L	2L	2
D17S938	2	2	2L	1	1	2L	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2	1	1	2L	2	2	2	1	2	2
D17S516	2L	2	-	2	2	1	1	2L	2	2	1	2	2	2	2L	1	2	1	1	1	1	1	1	2L	2	2
TP53	2	2	2	1	2	2L	2L	2L	2	2	1	2	2	2	2	-	2	1	2	2	2	2	2L	1	2	2
D17S1844	2L	2	2	2	2	1	2	-	2	1	2	2	2	2L	2L	-	2	1	2	2L	2L	2	-	1	2	2L
D17S1791	-	2	2L	2	2	2L	2L	2L	2	2	2L	2	-	2L	-	-	2L	2L	2	2	-	2	2	2L	2	2
D17S1852	2	2L	2	1	2	2L	2	2L	2	2	2L	2	2	2	2L	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1
D17S799	2	1	2	2	1	2L	2	2L	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2L	2	2L
D17S921	1	2	2L	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2L	2L	2	1	2	1	2	1	1	2L	2	1
D17S1857	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1	2L	2	2

Pa. = Patient Nr.
 - = keine Information

1 = im Normalgewebe homozygote Allele
 2 = im Normalgewebe heterozygote Allele

2L = Detektion eines LOH im Tumorgewebe

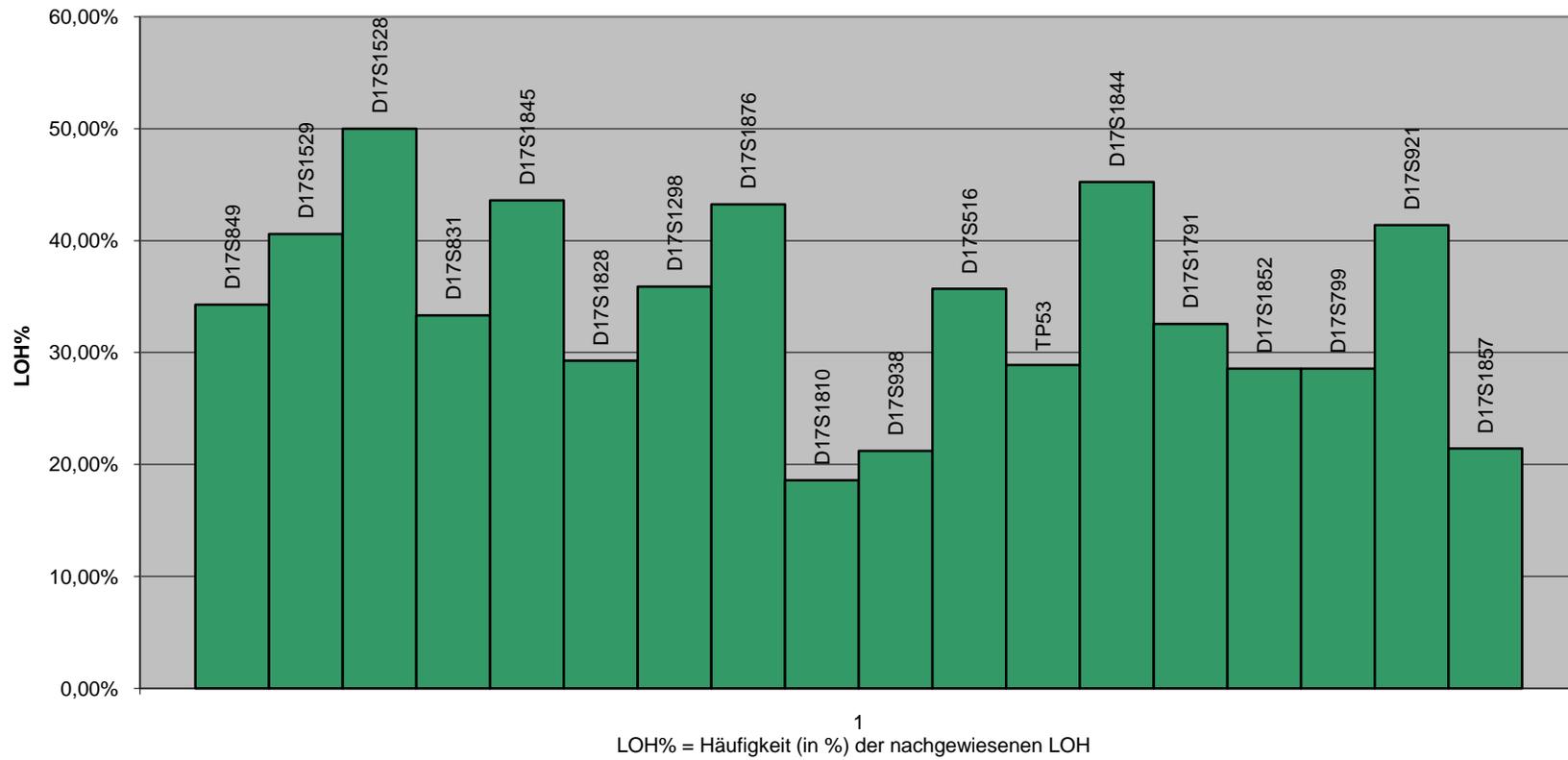
Tabelle 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Allelotypisierung der genomischen Region 17p13.1 bis 17p13.3

Primer	Auswertbare Fälle	LOH	LOH%
D17S849	35	12	34,29%
D17S1529	32	13	40,6%
D17S1528	24	12	50%
D17S831	45	15	33,33%
D17S1845	39	17	43,59%
D17S1828	41	12	29,27%
D17S1298	39	14	35,9%
D17S1876	37	16	43,24%
D17S1810	43	8	18,6%
D17S938	33	7	21,21%
D17S516	28	10	35,71%
TP53	45	13	28,89%
D17S1844	42	19	45,24%
D17S1791	43	14	32,56%
D17S1852	42	12	28,57%
D17S799	42	12	28,57%
D17S921	29	12	41,38%
D17S1857	42	9	21,43%

Auswertbare = Patientenzahl der Fälle
 Fälle informativen Fälle, d.h. Fälle mit heterozygoten Allelen im Normalgewebe

LOH = Patientenzahl mit nachgewiesenen LOH
 LOH% = Häufigkeit (in %) mit nachgewiesenen LOH

Abbildung 3.4 Deletionen im Bereich 17p13.1 bis 17p13.3



Bei der detaillierteren Analyse des Bereiches 17p13.1-p13.3 fanden sich zwei Regionen mit besonders häufigem Verlust von Allelen. Die eine Region befindet sich auf 17p13.1 in der Nähe der Primer TP53 und D17S1844. In 51% der Fälle zeigte mindestens einer der beiden Primer einen LOH. TP53 war in 25,5%, D17S1844 in 37,3% deletiert. Beide Marker liegen nahe dem Tumorsuppressorgen *p53*.

Die zweite Kandidatenregion befindet sich auf 17p13.3. Die Marker D17S831 und D17S1845 zeigten zusammen in 51% einen LOH, jeder Marker war einzeln betrachtet in 33,3% deletiert.

Um nachzuweisen, ob es sich bei den Deletionen um *eine* homogen betroffene Region handelt, oder ob sich im Bereich 17p 13.1-13.3 mehrere, voneinander unabhängig deletierte Regionen befinden, wurden die Häufigkeit der Deletionen des Primerpaares Primer TP53 und D17S1844 auf 17p13.1, der Region des *p53*-Tumorsuppressorgens, den Deletionen des Primerpaares D17S831 und D17S1845 auf 17p13.3 miteinander korreliert.

Deletionen auf beiden Regionen gleichzeitig fanden sich dabei in 30,8% der Fälle, Deletionen nur auf 17p13.1 in 19, 2% und Deletionen nur auf 17p13.3 in 17,3%. Keine Deletion auf einem der beiden Genloci wurde in 32,7% der Fälle festgestellt. Trotz der eng benachbarten Lokalisation der Marker ergab sich lediglich eine grenzwertige Korrelation ($p=0,052$).

3.3. Statistische Auswertung: Korrelationen zwischen häufigen genetischen Alterationen, Proliferationsindex und morphologischen Subtyp

Mittels Chi-Quadrat –Test und Odds ratio wurden die am häufigsten veränderten Loci (1p, 3q, 6q, 7q, 9p, 13q, 17p13.1, 17p13.3) daraufhin untersucht, ob die Amplifikation/Deletion bestimmter Loci überzufällig häufig gemeinsam mit Veränderungen anderer Loci vorkommen. Außerdem wurde untersucht, ob Veränderungen verschiedener Loci mit höherer Proliferation oder varianter Morphologie korrelieren. Signifikante ($p < 0,05$) Assoziationen sind hervorgehoben.

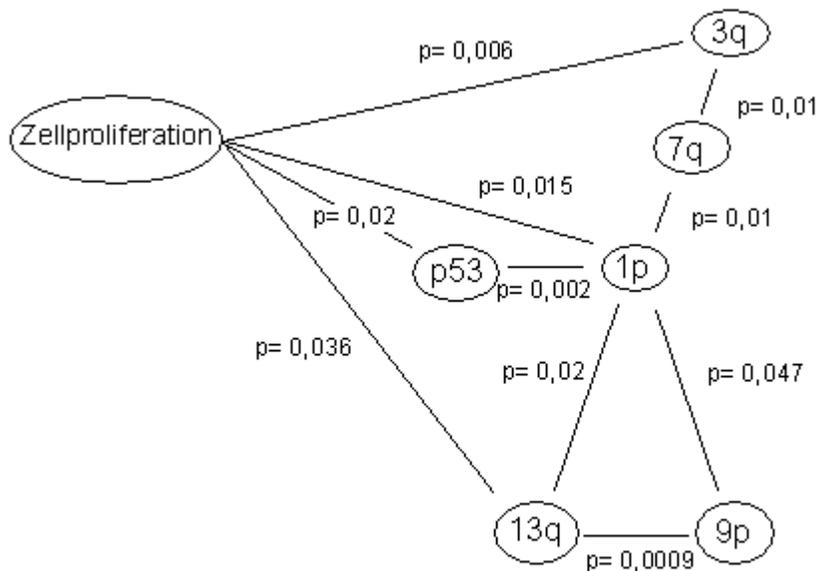
Tabelle 3.5 Korrelationen zwischen genomischen Alterationen, Proliferationsindex und morphologischem Subtyp

	Morpho	Proliferat	1p	3q	6q	7q	9p	13q	17p13.1
1p	OR=8,3 CHI=0,022	OR=11,9 Chi=0,015							
3q	OR=3 CHI=0,2	OR=10,5 Chi=0,006	OR=1,32 Chi=0,7						
6q	OR=0,57 CHI=0,6	OR=0,45 Chi=0,31	OR=1,15 Chi=0,86	OR=1,32 Chi=0,7					
7q	OR=1,2 CHI=0,8	OR=2,7 Chi=0,3	OR=5,67 Chi=0,01	OR=5,6 Chi=0,01	OR=2 Chi=0,34				
9p	OR=1,75 CHI=0,6	OR=5,63 Chi=0,051	OR=4,05 Chi=0,047	OR=0,59 Chi=0,5	OR=2,29 Chi=0,26	OR=2,36 Chi=0,24			
13q	OR=0,63 CHI=0,62	OR=4,8 Chi=0,036	OR=4,67 Chi=0,02	OR=1,1 Chi=0,88	OR=3,12 Chi=0,11	OR=0,75 Chi=0,68	OR=12,3 Chi=0,0009		
17p13.1	OR=0,46 CHI=0,41	OR=6,19 Chi=0,02	OR=15,6 Chi=0,002	OR=1,76 Chi=0,36	OR=1 Chi=1	OR=1,26 Chi=0,07	OR=1,48 Chi=0,57	OR=1,18 Chi=0,77	
17p13.3	OR=2,91 CHI=0,25	OR=1,17 Chi=0,83	OR=0,79 Chi=0,79	OR=1,76 Chi=0,36	OR=1,55 Chi=0,51	OR=0,79 Chi=0,73	OR=0,35 Chi=0,16	OR=1,65 Chi=0,39	OR=2,56 Chi=0,052

Morpho = morphologischer Subtyp
Proliferat. = Proliferationsindex

OR = Odds Ratio
Chi = Chi-Quadrat-Test

Abbildung 3.4. Graphische Darstellung der proliferationsassoziierten Alterationen in MCL



Wie in der oben stehenden Graphik dargestellt, fanden sich Assoziationen zwischen verschiedenen häufig alterierten genomischen Loci. Ein genetischer Verlust auf 1p war assoziiert mit Veränderungen von 7q, 9p, 13q und 17p13.1 (p53). Außerdem zeigte sich eine Assoziation zwischen Verlusten genetischen Materials auf 7q und Amplifikationen auf 3q.

Die stärksten Assoziationen fanden sich zwischen Veränderungen von 9p und 13q ($p= 0,0009$) sowie Veränderungen von 17p13.1 und 1p ($p=0,002$).

Im Gegensatz dazu zeigte 17p13.3 interessanterweise keine Assoziation zu anderen genetischen Veränderungen in dieser Studie.

Mit einem erhöhten Proliferationsindex waren Alterationen der Bereiche 1p, 3q, 13q und 17p13.1 (p53) assoziiert, aber nicht Deletionen des Bereiches 17p13.3. Eine Korrelation zwischen blastoidem Subtyp und genetischer Alteration fand sich nur für den Bereich 1p. Allerdings ist diese Analyse aufgrund der geringen Anzahl blastoider Fälle in dieser Studie nur eingeschränkt aussagekräftig.

4. Diskussion

Die sekundären Alterationen, die zur Entstehung des Mantelzellymphoms führen, sind noch nicht detailliert beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels PCR-gestützter Genotypisierung Alterationen des Tumorgewebes im Vergleich zum Normalgewebe identifiziert. Dabei wurden die Alterationen in Amplifikationen und Deletionen differenziert. Regionen mit nachgewiesenen Amplifikationen sind Bereiche, auf denen möglicherweise Onkogene liegen könnten. Bereiche mit nachgewiesenen Deletionen stellen Kandidatenregionen für Tumorsuppressorgene dar.

Tumorsuppressorgene verhalten sich rezessiv, das heißt, beide Allele müssen inaktiviert werden, damit die mutierte Zelle gegenüber den normalen Zellen einen Wachstumsvorteil erhält.

Die Inaktivierung der beiden Allele erfolgt durch ein „first hit“- und ein „second hit“-Ereignis. Der „first hit“ ist typischerweise eine Mutation innerhalb des Gens, z.B. eine Punktmutation, die das erste Allel funktionell inaktiviert.

Der „second hit“ entsteht häufig durch eine Deletion oder Rekombination, durch die das zweite Allel inaktiviert wird. Dieser „second hit“ wird bei Markern der Tumorsuppressorgen-Region als LOH sichtbar (Marshall 1991, Weinberg 1991): in der Fragmentanalyse wird lediglich ein Allel sichtbar.

In unseren Untersuchungen wurden folgende Kandidatenregionen für Tumorsuppressor- bzw. Onkogene identifiziert:

4.1. Deletionen im Bereich 1p

Die von uns verwendeten Marker für den Bereich Chromosom 1p befinden sich auf 1p21 (D1S206), 1p32 (D1S2797) und 1p36 (D1S450). Insgesamt fanden sich im Bereich 1p Deletionen in 25% der analysierten Proben, wobei der Marker D1S206 auf 1p21 am häufigsten (28.2%) deletiert war. Bea et al (1999) und Monni et al. (1998) detektierten im Bereich 1p häufige Deletionen (Deletionen in 24% bei Bea et al. bzw. in 33% bei Monni et al.). Auch Schraders et al. konnten häufige Deletionen auf 1p bei MCLs nachweisen (Schraders et al., 2006).

Eine Studie von Knutsen (1998) zeigt, dass sowohl in T-Zell-Lymphomen als auch in B-Zell-Lymphomen Veränderungen auf 1p häufig nachweisbar sind und z.B. an der Progression von low grade zu high grade T-NHL beteiligt sind. Die Veränderungen auf 1p bei MCL wirken sich dabei auf die Prognose der Krankheit aus.

Auf dem Bereich 1p wurden bereits einige Tumorsuppressorgene bzw. TSG-Kandidaten bei verschiedenen Tumoren gefunden. Auf 1p36 befindet sich zum Beispiel das Tumorsuppressorgen *p73*, ein Mitglied der *p53*-Familie (Jost et al. 1997). Eine Untersuchung von Dominguez et al. (2000) zeigt, daß ein loss of heterozygosity im Bereich des *p-73*-Gens deutlich mit einem schlechter differenzierten (Mamma-) Karzinom und einem fortgeschrittenen Stadium korrelieren. Beim Adenom der Nebenschilddrüsen wurden Deletionen im Bereich 1p36 gefunden, eine Beteiligung von *p73* ist jedoch bei dieser Entität unwahrscheinlich (Shan et al. 2001) Auch Patienten mit gastrointestinalen

Tumoren des Stroma bzw. des glatten Muskels weisen ein signifikant kürzeres Überleben auf, wenn ein LOH im Bereich 1p36 vorliegt (O'Leary et al. 1999).

Bei Non-Hodgkin-Lymphomen konnten Dave et al. in einer Studie von 850 NHL im Bereich 1p36 sowohl Translokationen als auch Deletionen nachweisen. Martinez-Delgado et al. zeigte, dass in verschiedenen NHLs *p73* häufig durch Methylierung inaktiviert ist. Dies deutet auf eine Beteiligung von *p73* bei der Lymphomentstehung dieser Entitäten hin.

Der im Bereich 1p36 lokalisierte Marker zeigte in unserer Studie nur eine niedrige Deletionsrate (unter 4%). Möglicherweise liegt der von uns verwendete Marker außerhalb der häufig alterierten Bereiche auf 1p36. Ob jedoch eine Methylierung in diesem Bereich vorliegt, die zu einer funktionellen Inaktivierung von *p73* führt, erfordert weitere Untersuchungen.

Im Bereich 1p32 liegt das Tumorsuppressorgen *p18INK4C*. Die Region 1p32 ist bei Menigeomen oft deletiert, *p18INK4C* ist jedoch nicht involviert (Leuraud et al. 2000).

Im Bereich 1p31.2 findet sich ebenfalls das Kandidatengen *gadd45a*. Mitglieder der *gadd45a* Familie sind mitverantwortlich für Differenzierung, Wachstumssuppression und Apoptose der Zelle. *Gadd45a* wurde für die Inhibition der *cdc2/cyclinB1*-Kinase verantwortlich gemacht (Vairapandi et al. 2002). Bei hämatologischen Erkrankungen wurden auch DNA – Amplifikationen im Bereich 1p32 festgestellt. Bei Natürlichen-Killer-Zellen-Lymphomen fand man Gewinne von DNA im Bereich 1p32-pter in der Hälfte der 10 analysierten Fälle (Siu et al. 1999). In unserer Studie war dieser Marker in nur 7.7% amplifiziert.

Am häufigsten zeigte der Marker D1S206 auf 1p21 genomische Alterationen: in dieser Studie war er in 21,2% der Fälle deletiert. Auch in anderen Studien wurde auf die Deletionen im Bereich 1p21 beim MCL hingewiesen (Rudolph et al., 2006, Camps et al., 2006). Rubio-Moscardo et al. fanden 2005 einen Zusammenhang zwischen verlängerter Überlebenszeit und Deletion des Bereiches 1p21 beim MCL.

In der unmittelbaren Nähe dieses Markers auf 1p22 befindet sich das Gen *bcl10*. Zhang et al. fanden 1999 heraus, dass eine Mutation dieses Gens beim MALT-Lymphom für einen Verlust der physiologisch vorhandenen pro-apoptotischen Wirkung verantwortlich ist und gleichzeitig zu einer Übermittlung proliferativer Signale durch die Aktivierung von *NF-kappaB* führt, wobei das mutierte *bcl10* überexprimiert wird. Das mutierte *bcl10* gibt der Zelle somit einen doppelten Überlebensvorteil. Auch Sagaert et al. wiesen 2006 auf die Rolle von *bcl10* in der Pathogenese der MALT Lymphome hin.

Bei einer Analyse von AML, ALL, CLL und CML wurde keine Beteiligung von *bcl10* an der Entstehung der Leukämien gefunden (Grimwade et al. 2000). Auch bei einer Analyse von 54 NHLs (durch Tadokoro et al. 2001) fand sich lediglich eine Mutationsrate von 3,6%. Bullinger et al. untersuchten 2000 die Rolle des *bcl10* beim MCL. Dabei wurden monoallelische *bcl10* Deletionen in 5 von 15 Fällen gefunden. Allerdings fand man keine Mutationen auf dem zweiten Allel des BCL10. Auch Steinemann et al. konnten bei einer Untersuchung von 43 Mantelzellymphomen monoallelische Deletionen auf 1p identifizieren. In 47% der Fälle wurde eine Deletion im Bereich 1p festgestellt. In 16 von 43 Fällen (37%)

war dabei der Bereich 1p22 betroffen. Ein Mechanismus zur Inaktivierung des zweiten Allels, z.B. durch Hypermethylierung, konnte nicht nachgewiesen werden. Ob das zweite Allel von *bcl10* durch noch nicht identifizierte Mechanismen inaktiviert wird oder ob eine Haploinsuffizienz alleine zur malignen Transformation beiträgt, ist noch nicht bekannt. Es ist auch möglich, dass *bcl10* bei den MCL nicht das auf 1p22 vermutete Tumorsuppressorgen ist, sondern in unmittelbarer genomischer Nähe des biologisch relevanten Tumorsuppressorgens liegt.

Im Bereich 1p21 ist ein weiterer Tumorsuppressorgenkandidat zu finden: *cdc14a* (Wong et al, 1999). Dieses Gen codiert für eine Phosphatase, die an der Regulation des Austrittes der Zelle aus der Mitose beteiligt ist. Das Produkt von *cdc14a* dephosphoryliert *p53* und bildet in verschiedenen Zellphasen einen Komplex mit Cdk1/cyclin B (Paulsen et al., 2006).

Mertens et al. wiesen 2000 darauf hin, dass sich im Bereich 1p22 –p31 ein Homolog (*bcmsun1*) des Genes *bcmsun* befindet. *Bcmsun* befindet sich auf 13q14.3, einer ebenfalls bei MCL häufig deletierten Region. Seine Funktion bei der Pathogenese maligner Erkrankungen ist noch nicht geklärt. In der genannten Studie wurde mittels FISH-Technik jedoch keine häufige Deletion von *bcmsun1* auf 1p22 bei MCL gefunden.

Alterationen der Region 1p waren mit Veränderungen der Bereiche 7q, 9p und 13q assoziiert. Inwieweit einer der potentiellen Kandidaten auf 1p mit Alterationen der Regionen 7q, 9p oder 13 q zusammenwirkt, ist ohne eine genauere Untersuchung und Eingrenzung der alterierten Regionen schwer zu sagen.

Interessanterweise ist die Deletion auf 1p in der vorliegenden Untersuchung die einzige Deletion, die mit dem blastoiden Subtyp assoziiert ist ($p=0,02$). Die Fälle mit Alterationen auf 1p waren außerdem mit einem erhöhten Proliferationsindex assoziiert ($p=0,015$).

4.2. Amplifikationen im Bereich 3q

Die häufigste Amplifikation einer Region fand sich auf dem Chromosomenarm 3q (Amplifikation von 3q insgesamt in 25% der Fälle). Der Marker D3S1292 auf 3q22-23 war in 14% amplifiziert, D3S1262 auf 3q27 in 21,7%, D3S1601 im Bereich 3q28-pter in 11,9%.

Beim MCL wurden auch von anderen Autoren häufige Amplifikationen auf dem Chromosomenarm 3q gefunden (Bea et al. 1999, Monni et al. 1998, Allen et al 2002, Tagawa et al., 2005, Rinalidi et al. 2006, Schraders et al. 2006), was auf ein möglicherweise an der Entstehung der MCL beteiligtes Onkogen in diesem Bereich hindeutet.

Auch in anderen aggressiven NHLs wurden Alterationen im Bereich 3q27 gefunden, insbesondere bei diffus-großzelligen Lymphomen (Chaganti et al. 1998, Bea et al., 2005). Bei diffus-großzelligen Lymphomen war eine Alteration des Locus 3p27 mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Barrans et al. 2002). *Bcl6*, ein Kandidaten-Onkogen im Bereich 3p27, codiert ein Zinkfinger-Protein. Es wird vermutet, dass *bcl6* durch Bindung an die DNA als Transkriptionsrepressor wirkt. (Übersicht in Albagli-Curiel 2003).

Baron et al. wiesen 2002 darauf hin, dass *bcl6* negativ regulatorisch auf das proapoptotisch wirkende Gen *pdc2* (auf 6q27) zu wirken scheint. In unserer Untersuchung fand sich dagegen keine Korrelation zwischen Deletionen von 6q27 und Amplifikationen von 3q27. Möglicherweise repräsentieren die beiden Ereignisse alternative Störungen desselben Signalpfades der Zellproliferations-Regulation sein.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese war die Amplifikation von 3q in unserer Studie mit einem erhöhten Proliferationsindex assoziiert ($p=0,006$).

4.3. Deletionen im Bereich 6q

Häufige Deletionen fanden sich auch im Bereich von 6q (23,1%). Die von uns in diesem Bereich verwendeten Marker lagen auf 6q22 (D6S434, deletiert in 14,3%), auf 6q25 (D6S308, deletiert in 15,4%) und auf 6q27 (D6S264, deletiert in 20,5%). Unsere Untersuchungen bestätigen die Häufigkeit von 6q-Deletionen in früheren Studien (Monni et al 1998, Wlodarska et al. 1999, Bea et al. 1999, Martinez-Climent et al. 2001, Allen et al. 2002).

Diese 6q-Deletionen kommen bei malignen Lymphomen als sekundäre Alterationen (zusätzlich zu den primären Translokationen) vor.

Auf 6q21/22 wurden Deletionen in verschiedenen malignen Lymphomen gefunden. Whang-Peng et al. fanden in einer Studie 1995 6q Deletionen sowohl in frühen wie in späten Stadien der malignen Lymphomen. Die 6q-Deletionen korrelieren mit einem kürzeren Überleben des Patienten. Beim follikulären Lymphom scheint die Deletion auf 6q mit einer morphologischen Progression der Krankheit zusammenzuhängen (Horsman et al. 2001). Zhang et al. identifizierten einen 3 cM (4-5Mb) großen Bereich bei 6q21, der bei aggressiven malignen Lymphomen häufig deletiert ist und eine Kandidatenregion für TSG darstellt. Auch beim Marginalzonen B-Zelllymphom fand man Deletionen auf 6q21 in 14% (Cuneo 2001).

Das Zinkfingerprotein PRDM1/BLIMP1 ist ein möglicher Tumorsuppressor-Kandidat auf 6q21-6q22.1. PRDM1/BLIMP1 wirkt als Transskriptionsrepressor und spielt eine Rolle bei der B-Zell-Differenzierung. Pasqualucci et al. untersuchten die Rolle von *prdm1/blimp1* bei der Pathogenese von diffus großzelligen Lymphomen und fanden eine häufige Inaktivierung dieses Genes. *Prdm1/blimp1* könnte somit z.B. durch eine gestörte B-Zell-Differenzierung zur Lymphomentstehung beitragen.

In der Region des in unserer Untersuchung am häufigsten deletierten Markers D6S264 auf 6q27 wurde bereits 1995 das menschliche Homolog (*pdc2*) eines proapoptotischen Rattengens (Rp8) lokalisiert (Kawakami et al 1995). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass *pdc2* durch *bcl6* (auf 3q27) negativ reguliert wird (Baron et al. 2002).

Steinemann et al. untersuchten *pdc2* bei malignen B-Zell-Lymphomen und fanden Hinweise auf eine Down-Regulation. Auch beim Mantelzelllymphom ist *pdc2* ein möglicher Tumorsuppressorgenkandidat der Region 6q27, wenngleich eine Beteiligung an der Entstehung dieser Entität noch genauer untersucht werden muss.

4.4. Deletionen im Bereich 7q

Die Region 7q zeigte Deletionen in 25% der Fälle. Die zur Charakterisierung dieser Region verwendeten Marker lagen auf 7q31 (D7S515, Deletion in 11,6%), auf 7q36.2 (D7S798, Deletion in 8,1%) und auf 7q36.3 (D7S684, Deletion in 23,5%).

Über Deletionen auf 7q beim MCL wurde schon in einer früheren Studie berichtet, sie sind bisher aber noch nicht genauer untersucht worden (Hernandez et al. 1997). Auch bei anderen malignen Lymphomen treten Veränderungen in diesem Bereich auf: Bei immunoblastischen Lymphomen wirken sich Veränderungen von 7q auf das Überleben der Patienten aus (Schlegelberger et al. 1999). Hernandez et al. untersuchten B-Zell Lymphome mit einer Deletion auf 7q (1997). Es konnten zwei verschiedene Typen von Deletionen abgegrenzt werden: eine proximale Region im Bereich 7q21-q31 und eine distale im Bereich 7q31-q34.

Beim Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (MZBL) wurde die Deletion auf 7q als charakteristische Alteration der splenischen MZBL (SMZL) identifiziert (Ott et al. 2000, Andersen et al. 2005). Patienten mit einer Deletionen von 7q weisen eine schlechtere Prognose in Bezug auf das Überleben als Patienten ohne die Deletionen auf (Hernandez et al. 2001).

Ebenfalls beim SZML wurden Translokationen von 7q mit dem Chromosom 2 gefunden. Die Bruchstellen auf 7q lagen dabei auf 7q21, interessanterweise in der Nähe des Genes für die cyclin dependent kinase 6, das bei einem Teil der Patienten überexprimiert war (Corcoran et al. 1999).

Welche Rolle die Deletion auf 7q beim MCL spielt, muss noch näher untersucht werden.

4.5. Deletionen im Bereich 9p

Die Region 9p war in 21,2% deletiert. Sie wurde in unserer Studie mit 2 Markern untersucht: D9S285 auf 9p22 war in 7,5%, D9S171 auf 9p21 in 30,5% deletiert.

Im Bereich 9p21 befindet sich das Gen *p16ink4a*, ein in den letzten Jahren identifiziertes Tumorsuppressorgen. Es codiert für den CDK-Inhibitor P16, der in der normalen Zelle die CDK hemmt und somit einen antiproliferativen Effekt hat. Wenn *p16* deletiert oder mutiert wird, hat die Zelle einen wichtigen Inhibitor der Zellproliferation verloren und die maligne Transformation wird gefördert.

Deletionen von 9p21-22 wurden sowohl bei soliden Tumoren (z.B. Adenokarzinomen des Pankreas oder bei Blasentumoren) (Caldas et al. 1994, Cairns et al. 1994) als auch in hämatologischen Neoplasien gefunden.

Bei diffusen großzelligen Lymphomen (DLCL) wurden Deletionen zwischen 15% und 38% gefunden (Koduru et al. 1995, Chaganti et al. 1995). Diese Deletionen scheinen bei hochmalignen Lymphomen häufiger vorzukommen als bei niedrigmalignen, und speziell bei sekundären diffusen großzelligen Lymphomen häufiger zu sein als bei de-novo-DLCLs. Dies deutet darauf hin, dass die Deletion von *p16* als Tumorsuppressorgen bei Lymphomen ein relativ spätes Ereignis der malignen Transformation ist (Dreyling et al. 1998). Auch Pinyol et al.

wiesen darauf hin, dass eine Deletion, Mutation oder Methylierung von *p16(ink4a)* eher bei aggressiven Subtypen der NHLs vorkommt und zu einer Progression indolenter Lymphome beitragen könnte.

Auch bei der ALL wurden Deletionen von *p16ink4a* gefunden (Stranks et al. 1995, Dreyling et al. 1995), wobei die Deletion bei T-ALL häufiger zu sein scheint als bei B-ALL (Schroder et al. 1995).

Bei der MCL wurden 9p-Deletionen in mehreren Studien als eine der häufigsten sekundäre Alterationen bestätigt (Monni et al. 1998, Bea et al. 1999, Tagawa et al., 2005, Camps et al. 2006), Marzec et al. fanden bei 4 MCL-Zelllinien und in acht Gewebeproben von MCL-Patienten eine verminderte bzw. vollständig fehlende Expression des auf 9p21-22 liegenden Cyclin D1 Inhibitors P16. Wie einige andere sekundären Alterationen bei MCL treten auch die 9p-Deletionen bei der blastoiden Untergruppe häufiger auf, als beim klassischen Typ. In einer Studie von Bea et al. (1999) waren 9% der klassischen MCL auf 9p deletiert, wogegen der blastoide Subtyp Deletionen in 31% der Fälle zeigte. Entsprechend sind 9p-Deletionen mit einem kürzeren Überleben der betroffenen Patienten assoziiert. Auch Rubio-Moscardo et al. (2005) und Hernandez et al. (2005) fanden einen Zusammenhang zwischen 9p-Deletionen und verkürzter Überlebenszeit. In einer anderen Arbeit von Bigoni et al. wurden dagegen nur sehr selten Veränderungen der Region 9p21 gefunden, was wahrscheinlich auf die niedrige Anzahl untersuchter blastoider Fälle in dieser Studie zurückgeführt wurde. In unserer Untersuchung wurden Alterationen des 9p21-Lokus in 21,2% nachgewiesen.

Die Deletion des CDK-Inhibitor-Gens stellt einen weiteren Eingriff in die Regulation des Zellzyklus im System der Cycline und CDKs zusätzlich zur charakteristischen Cyclin D1-Überexpression beim MCL dar. Dabei scheint sich die *p16*-Deletion direkt auf die Proliferationsaktivität auszuwirken. Dreyling et al. fanden 1997 eine Deletion von *p16ink4a* in 41% der analysierten Fälle, wobei die Deletion des Tumorsuppressorgens mit dem Proliferationsindex, aber nicht mit dem blastoiden Subtyp der MCL korrelierte. Auch Rosenwald et al. wiesen 2003 auf einen Zusammenhang zwischen der Deletion von *p16ink4a* und höherer Proliferationsaktivität hin. Die Deletion von 9p scheint also weniger mit dem histologischen Subtyp als mit der proliferativen Aktivität des Lymphoms zusammenzuhängen.

In unserer Arbeit fand sich entsprechend eine grenzwertige Korrelation zwischen der Deletion von 9p und dem Proliferationsindex ($p=0,051$). Auf Grund der geringen Fallzahl blastoider MCL in unserer Untersuchung können wir leider keine signifikanten Aussagen über die unterschiedliche Häufigkeit der 9p-Deletion bei blastoiden vs. klassischen Fällen treffen.

4.6. Deletionen im Bereich 13q

13q war in dieser Studie in 40,4 % der Fälle deletiert. Deletionen traten bei D13S171 auf 13q13 in 17,1%, D13S153 auf 13q14 in 28%, D13S265 auf 13q31 in 27,5%, D13S173 auf 13q33 in 21% auf.

Deletionen von 13q wurden in früheren Studien bei der B-CLL, ALL und verschiedenen malignen Lymphomen nachgewiesen (Liu et al. 1995).

Stilgenbauer et al. (1998) untersuchten den deletierten Bereich auf 13q14 bei MCL und B-CLL genauer. Die am häufigsten deletierte Region befindet sich zwischen dem RB1-Gen und dem Marker D13S25 und ist ca. 400kb groß. Bei anderen malignen Lymphomen finden sich ebenfalls Deletionen in diesem Bereich. Die 13q-Deletion tritt sowohl bei den aggressiven als auch bei den indolenten Arten der malignen Lymphome auf (Wada et al. 1999). Beim folliculären Lymphom ist die Inzidenz der 13q-Deletion bei Lymphomen mit histologisch aggressiverem Erscheinungsbild höher als bei den indolenten Fällen (Mohamed et al. 2001). Eine Untersuchung von 125 NHL-Fällen zeigte einen Zusammenhang zwischen 13q-Deletion und kürzerem Überleben der Patienten sowie geringerer Wahrscheinlichkeit einer kompletten Remission (Cuneo et al. 1999).

Auch beim MCL wurde in vorangegangenen Studien über Deletionen im Bereich 13q berichtet (Schraders et al., 2005, Jarosova et al., 2004). Monni et al. (1998) fanden 13q Deletionen in 41%, Bentz et al. (2000) sogar in fast 70%. Auch andere Studien zeigen eine vergleichbare Häufigkeit (Bea et al. 1999, Bigoni et al. 2001). Ein Zusammenhang zwischen 13q-Deletion und Überlebenszeit konnte in einer Studie von Cuneo et al. (1999) nicht festgestellt werden. Die Überlebenszeit war vielmehr von der Anzahl der sekundären Alterationen, bzw. Veränderungen von 17p oder Chromosom 12 abhängig. Im Gegensatz dazu fanden Kohlhammer et al. 2004 einen Zusammenhang zwischen 13q14-Deletion und verkürzter Überlebenszeit. Dreyling et al. untersuchten 1997 Deletionen der Rb-Region und von p16 beim MCL. Die Untersuchung weist darauf hin, dass nur selten beide Rb-Allele von der Deletion betroffen sind.

Im Gegensatz dazu stellten wir in unserer Studie einen Zusammenhang von 13q-Deletionen und Proliferationsindex fest ($p=0,036$).

Calin et al. wiesen auf die Bedeutung von microRNAs im Bereich 13q14 hin. Die in diesem Bereich gefundenen microRNAs hemmen *bcl2* und können zur Apoptose der normalen Zelle führen. Bei der chronischen lymphatischen Leukämie fanden Calin et al. Deletionen bzw. verminderte Expression der microRNAs. Die Leukämiezellen hatten dadurch einen Proliferationsvorteil gegenüber der normalen Zelle. Ob dieser Mechanismus auch beim MCL eine Rolle spielt, ist noch unklar.

Ein möglicher Tumorsuppressorgen-Kandidat der Region 13q14 ist RFP2, ein RING-Finger Protein, von dem angenommen wird, dass es an Tumorentstehung beteiligt ist (Baranova et al. 2003). Über die genaue Funktion des Genes und seine Beteiligung an der Entstehung von Lymphomen ist noch nicht viel bekannt. Ein weiterer Kandidat der Region 13q14 ist das *bcmsun* (früher *leu2*)-Gen. Bei der B-CLL wurde die Deletion der 13q14-Region genauer untersucht. Obwohl zunächst Hinweise bestanden, dass *bcmsun* als Tumorsuppressorgen bei der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielt (Wolf et al. 2001), konnte bisher keine eindeutige Beteiligung von *bcmsun* an der Entstehung der B-CLL nachgewiesen werden (Migliazza et al. 2001). Inwieweit dies auch für die Pathogenese des MCL zutrifft, bleibt zu untersuchen, allerdings fanden Kohlhammer et al. bei der MCL eine Assoziation zwischen Deletionen des Locus 13q14 und einer verkürzten Überlebenszeit der Patienten. Interessanterweise

fanden Mertens et al. 2000 ein Homolog des Genes, *bcmsun-like*, auf 1p22-p31, einer ebenfalls bei MCL häufig deletierten Region. In unserer Studie fand sich eine signifikante Korrelation zwischen Deletionen der beiden Regionen. Ob dies inhaltlich mit einer Deletion von *bcmsun* und seinem Homolog auf 1p zusammenhängt, muss genauer untersucht werden. Mertens et al. fanden 2000, wie bereits erwähnt, keine Beteiligung von *bcmsunl* an der Deletion auf 1p22 bei MCL. In unserer Serie weist die enge Korrelation von 1p und 13q Deletionen allerdings auch auf einen gewissen funktionellen Wirkungsmechanismus hin.

4.7. Deletionen im Bereich 17p

Auch der Bereich 17p war in dieser Studie häufig deletiert (34,6%). Der Marker D17S831 auf 17p13 war in 31,3%, der Marker D17S1852 auf 17p12 in 25,6% betroffen.

Bei einer genaueren Analyse des Bereiches 17p13.1-p13.3 fanden sich zwei Regionen mit besonders häufigem Verlust von Allelen. Die eine Region befindet sich auf 17p13.1 in der Nähe der Primer TP53 und D17S1844. In 51% der Fälle zeigte mindestens einer der beiden Primer einen LOH. TP53 war in 25,5%, D17S1844 in 37,3% deletiert. Beide Marker liegen innerhalb der Region, die für *p53* codiert.

Die zweite interessante Region befindet sich auf 17p13.3. Die Marker D17S831 und D17S1845 zeigten zusammen in 51% einen LOH, wobei jeder Marker einzeln betrachtet in 33,3% deletiert war.

Im Bereich 17p13.1 befindet sich das Tumorsuppressorgen *p53*, das in die Pathogenese vieler solider und hämatologischer Tumoren involviert ist. In der normalen Zelle hat *p53* eine zentrale Kontrollfunktion: *p53* detektiert einen Zellschaden und hindert die Zelle daran, in die S-Phase einzutreten oder verlangsamt diesen Prozess. *p53* reguliert z.B. nach Bestrahlung von Zellen das GADD45-Reparaturprotein hoch, so dass der Zellschaden behoben werden kann (Kastan et al. 1992). Ist die Reparatur nicht möglich, induziert *p53* die Apoptose der Zelle, so dass in keinem Fall veränderte oder beschädigte DNA weitergegeben wird (Übersicht in Hainaut 1995). Ein Verlust des *p53*-Gens oder seiner Funktion bedeutet also, dass die DNA leichter Mutationen erleidet, die dann auch weitergegeben werden und sich dadurch in der Zelle ansammeln, so dass eine maligne Transformation gefördert wird.

17p13 zeigt beim Brustkrebs (White et al. 1996), Cervixkarzinom (Kersemaekers et al. 1998) und vielen anderen Tumoren Deletionen. Auch bei vielen hämatologischen Neoplasien liegen Mutationen oder Deletionen dieses Bereichs vor.

Beim Marginalzonen B-Zell-Lymphom wurden Deletionen von 17p in 16% gefunden, wobei diese Deletionen bei progressiven oder rezidivierenden Lymphomen häufiger auftraten (Dierlamm et al. 1997) Auch in einer Studie von Cuneo et al. (2001) waren komplexe Chromosomendefekte dieser Entität einschließlich der Deletionen von 17p mit einer aggressiveren Histologie assoziiert. In einer Analyse von 98 Patienten mit B-Zell lymphoproliferativen Erkrankungen wiesen Patienten mit den Deletionen von 17p13 eine deutlich

schlechtere Prognose in Bezug auf die Überlebenszeit auf (Shaw et al. 2000, Greiner et al., 2006).

Veränderungen des Bereiches 17p13 wurden auch beim MCL gefunden (Cuneo et al.1999, Bigoni et al. 2001, Espinet et al.1999, Tagawa et al. 2005). Deletionen treten interessanterweise signifikant häufiger bei blastoiden als bei typischen Fällen auf (Bea et al.1999). In einer Studie von Greiner et al. 1996 fanden sich ebenfalls häufiger Alterationen des *p53*-Lokus bei blastoiden MCLs, wobei eine Veränderung (meist Überexpression) von *p53* mit einer deutlich schlechteren Prognose der Erkrankung einherging. Auch Louie et al. (1995) fanden bei MCL Punktmutationen und eine Überexpression von *p53*. Die Fälle mit dieser Überexpression zeigten auch hier ein wesentlich kürzeres Überleben in Übereinstimmung mit einer weiteren Studie (Hernandez et al, 1996).

Die Deletionen im Bereich 17p13.1, der Region, in der *p53* liegt, waren in unserer Studie nur mit Deletionen auf 1p assoziiert ($p=0,002$). Für diese Assoziation sind verschiedene Erklärungen denkbar, da in der Region auf 1p mehrere Gene liegen, die funktionell mit *p53* interagieren. *P73* gehört so zur selben Gruppe von Tumorsuppressorgenen wie *p53*, so dass eine gleichzeitige Deletion der beiden Loci einen starken Effekt auf die Proliferationsaktivität der Zelle haben könnte. *gadd45a*, ein Reparaturprotein, wird durch *p53* reguliert, und *bcl10* wirkt das wie *p53* in der normalen Zelle proapoptotisch.

Interessanterweise fanden wir eine Assoziation der Proliferationsaktivität mit dem untersuchten Locus auf 17p13.1 (*p53*) ($p=0,02$), aber nicht mit Alterationen der mehr telomerischen Region auf 17p13.3 ($p=0,83$).

Alterationen der Region 17p13.3 waren auch mit keiner anderen der gefundenen Alterationen assoziiert. Auch die Alterationen der Regionen 17p13.1 und 17p13.3 selbst waren trotz der eng benachbarten Lage nur grenzwertig miteinander assoziiert ($p=0,052$). Dieses unterschiedliche Deletionsmuster in der Region 17p13.3 unterstützt die Hypothese eines weiteren Tumorsuppressorgens in dieser Region, genauere Untersuchungen sind jedoch notwendig um diese Tumorsuppressorregion genauer zu kartieren. Auch Tagawa et al. beschrieben häufige Deletionen im Bereich 17p13.3 beim MCL. In dieser Region befinden sich mehrere bekannte Tumorsuppressorgene.

Ein Tumorsuppressorgen der Region ist *hic1*, das es bei verschiedenen hämatologischen Neoplasien durch Hypermethylierung inaktiviert wird. Issa et al. fanden 1997 eine Methylierung in 25% der untersuchten malignen Lymphome, in 53% der ALLs und in 50% der CMLs in chronischer Phase, sowie in allen Fällen von rezidierten ALL und CML in Blastenkrise. Dies unterstützt die Rolle von *hic1* in der Progression maligner Erkrankungen im Sinne einer sekundären Alteration. Eine Deletion könnte ebenso zur Inaktivierung der *hic1*-Funktion führen.

Interessanterweise gab es in letzter Zeit Hinweise auf ein funktionelles Zusammenspiel von *hic1* und *p53*: Der Verlust von *hic1* aktiviert das Protein SIRT1, das wiederum *p53* inaktiviert, eine Deletion von *hic1* würde also auch zu einer verminderten Aktivität von *p53* führen (Chen et al., 2005). Somit könnte *hic1* beim MCL einen alternativen Weg zu einer Verminderung der Aktivität von *p53* darstellen.

Auch das Gen für den Transkriptionsrepressor *mnt* liegt im Bereich 17p13.3. *Mnt* gilt als funktioneller Gegenspieler zu *myc*, beide Proteine dimerisieren mit dem *max*-Protein. *Myc-max* hat einen proliferationsfördernden Einfluss auf die Zelle, wohingegen *mnt-max* (ähnlich wie *mad-max*) zu einem Proliferationsstopp führt. Toya-oka et al. konnten nachweisen, dass in Brustdrüsengewebe eine Inaktivierung von *mnt* zu ähnlichen Auswirkungen wie eine Überaktivierung des Oncogenes *myc* führte. Auch bei der Entstehung von T-Zell-Lymphomen scheint die Deletion von *mnt* eine Rolle zu spielen: Mäuse mit *mnt*-Deletion entwickelten in hohem Prozentsatz T-Zelllymphome (Dezfouli et al., 2006).

Über Veränderungen des Tumorsuppressorgens *ovca1* auf 17p13.3 bei ovariellen Tumoren und beim Mammakarzinom wurde berichtet (Bruening et al., 1999). Ob dieses Tumorsuppressorgen allerdings bei der Lymphomentstehung ebenfalls eine Rolle spielt, ist nicht bekannt.

Deletionen der Region 17p13.3 wurden ebenfalls in 80% bei einer Untersuchung von 24 Leukämie- und Lymphomfällen gefunden (Sankar et al. 1998). Cuneo et al. fanden mittels FISH Deletionen von 17p13.3 in 4 von 14 Marginalzonenlymphomen. Tagawa et al. beschrieben 2005 die Deletion des Locus 17p13.3 als häufiges Ereignis beim Mantelzellymphom.

4.8. Zusammenfassende Diskussion

Mittels PCR-gestützter Genotypisierung konnten mehrere Kandidatenregionen für sekundäre Veränderungen identifiziert werden. Deletionen und damit Hinweise auf mögliche Tumorsuppressorgene fanden sich auf 1p, 6q, 7q, 9p, 13q, 17p13.1 und 17p13.3. Im Bereich 3q zeigte sich eine Amplifikation des genomischen Materials in Mantelzellymphomzellen verglichen mit dem Normalgewebe. Hier könnte ein Onkogen lokalisiert sein, das eine Rolle bei der malignen Transformation spielt.

In einer statistischen Auswertung der Ergebnisse fanden sich Assoziationen der alterierten Regionen sowohl untereinander als auch mit gesteigerter Zellproliferation. Alterationen der Bereiche 1p, 3q, 13q und 17p13.1 waren dabei mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert. Der Bereich 9p21, auf dem sich das für den CDK-Inhibitor p16 codierende Gen *p16ink4a* befindet, zeigte eine grenzwertige Korrelation mit erhöhter Zellproliferation.

Die Proliferationsrate scheint eine zentrale Rolle für den Verlauf einer Erkrankung wie dem Mantelzellymphom zu spielen. Tiemann et al. wiesen 2005 darauf hin, dass die Proliferationsaktivität (festgestellt über Ki-67 bzw. über den Mitoseindex) eine genauere prognostische Aussage in Bezug auf die Überlebenszeit bietet als die klassische histomorphologische Einteilung. Eine höhere Proliferationsrate des MCL hängt signifikant mit einer verkürzten Überlebenszeit des Patienten zusammen.

Rosenwald et al. untersuchten 2003 den Zusammenhang von Alterationen proliferationsassoziiierter Gene und der Überlebenszeit der Patienten. Deletionen von p53 waren dabei nicht signifikant mit erhöhter Proliferation assoziiert. Allerdings war die Anzahl der Fälle mit *p53*-Deletionen in dieser Untersuchung auch relativ klein und damit nicht voll aussagekräftig. Dagegen zeigte eine

Deletion von *p16ink4a* eine Assoziation mit sowohl der Proliferationsaktivität als auch mit der Überlebenszeit der Patienten.

Der Zusammenhang zwischen Alterationen bestimmter genomischer Regionen und erhöhter Proliferationsaktivität kann genauere Aussagen über die Prognose im Einzelfall treffen und somit auch die Wahl der Therapie beeinflussen, da eine schlechtere Prognose eine toxischere Therapieform rechtfertigt wohingegen Patienten mit einem voraussichtlich indolenten Verlauf von weniger toxischen Therapien profitieren. Die Assoziation einer genomischen Alteration mit der Zellproliferation ist somit nicht nur eine relevante Information zum Verständnis der Pathogenese sondern kann auch Prognose und Therapieentscheidung beim Mantelzelllymphom beeinflussen.

Korrelationen der alterierten Bereiche untereinander fanden sich zwischen 3q und 7q sowie zwischen 9p und 13q. Der Bereich 1p zeigte die meisten Assoziationen, nämlich mit 7q, 9p, 13q und 17p13.1 (*p53*). Die stärksten Assoziationen fanden sich dabei zwischen Veränderungen von 9p und 13q ($p=0,0009$) sowie Veränderungen von 17p13.1 und 1p ($p=0,002$). Der Bereich 17p13.3 zeigte keine Assoziationen zu erhöhter Proliferationsaktivität oder zu anderen alterierten Bereichen. Selbst zum eng benachbarten Locus 17p13.1 zeigte sich lediglich eine grenzwertige Korrelation. 17p13.3 könnte somit eine neue Kandidatenregion für ein Tumorsuppressorgen darstellen.

Von einigen der bekannten Gene, die auf den von uns identifizierten Regionen liegen, ist ein funktionelles Zusammenspiel bekannt, zum Beispiel von *bcmsun* auf 13q14 mit *bcmsunl* auf 1p22 oder von *p53* auf 17p13.1 mit *gadd45a* oder *cdc14a* auf 1p. Jedoch ist – vielleicht mit Ausnahme von *p53* – noch nicht bekannt, ob genau diese Gene eine Rolle bei der Entstehung von Mantelzelllymphomen spielen. Die Assoziationen der alterierten Regionen deuten auf ein funktionelles Zusammenwirken der Genprodukte hin. Eine Methode, um genauere Aussagen über die Beteiligung bekannter Gene treffen zu können, wäre die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), bei der gezielt Deletionen oder Amplifikationen einzelner Gene nachgewiesen werden können. Auch bisher unbekannte Gene in den alterierten Regionen könnten eine Rolle bei der malignen Transformation spielen.

Wir konnten in dieser Arbeit ein Netzwerk proliferationsassoziierter genomischer Alterationen sichtbar machen. Eine Identifikation der betroffenen Gene würde zum weiteren Verständnis der Pathogenese der Mantelzelllymphome beitragen.

5. Zusammenfassung

Das Mantelzelllymphom ist ein klinisch aggressives Non-Hodgkin-Lymphom, das durch das Vorliegen der Translokation t(11; 14) (q13; q32) charakterisiert ist. Die Translokation alleine ist jedoch nicht hinreichend um die Entstehung eines Mantelzelllymphomes auszulösen. Sekundäre genetische Veränderungen, die zur Entstehung der Erkrankung beitragen könnten, sind nur unzureichend charakterisiert. In der vorliegenden Studie wurde genetisches Material von 52 MCL-Patienten mit 82 über das gesamte Genom verteilten Mikrosatelliten-Primern untersucht. Mittels PCR-gestützter Allelotypisierung wurde dabei sowohl Normal- wie auch Tumorgewebe auf Deletionen bzw. Amplifikationen der Markerprodukte untersucht.

Häufige genomische Amplifikationen fanden sich im Bereich 3q (25%).

Häufige Deletionen fanden sich in den Bereichen 1p (25%), 6q(23,1%), 7q(25%), 9p(21,2%), 13q(40,4%) und 17p(34,6%). Eine detailliertere Untersuchung der Region 17p13.1 bis 17p13.3 mit 18 Mikrosatellitenprimern identifizierte zwei Regionen mit häufigen genomischen Alterationen. Die eine Region lag auf 17p13.1 in der Nähe des Tumorsuppressorgen *p53*, die andere auf 17p13.3. Die Loci waren jeweils in 51% der Fälle deletiert.

In einer statistischen Auswertung mittels Chi-Quadrat-Test wurde eine zellproliferationsassoziiertes Netzwerk von genomischen Alterationen identifiziert. Ein genetischer Verlust auf 1p war assoziiert mit Veränderungen von 7q, 9p, 13q und 17p13.1 (*p53*). Außerdem zeigte sich eine Assoziation zwischen Verlusten genetischen Materials auf 7q und Amplifikationen auf 3q. Die stärksten Assoziationen fanden sich zwischen Veränderungen von 9p und 13q ($p=0,0009$) sowie Veränderungen von 17p13.1 und 1p ($p=0,002$). 17p13.3 zeigte interessanterweise keine Assoziation zu den proliferationsassoziierten genetischen Veränderungen. Mit einem erhöhten Proliferationsindex waren Alterationen der Bereiche 1p, 3q, 13q und 17p13.1 (*p53*) assoziiert, aber nicht Deletionen des Bereiches 17p13.3.

Der Bereich 17p13.3, der im Gegensatz zu dem benachbarten Gen *p53* auf 17p13.1 nicht mit anderen sekundären Alterationen oder dem Proliferationsindex assoziiert war, repräsentiert somit eine neue Tumorsuppressorregion in MCL.

Die Assoziationen zwischen verschiedenen genomischen Bereichen deuten auf ein funktionelles Zusammenspiel der jeweils betroffenen Gene hin. Um welche Kandidatengene es sich im Einzelnen handelt, muss jedoch in künftigen Studien noch geklärt werden.

Zusammenfassend unterstreichen unsere Untersuchungen die Bedeutung sekundärer genomischer Alterationen als Netzwerk zellproliferationsassoziiierter Alterationen beim MCL.

6. Literaturverzeichnis

Albagli-Curiel O.: Ambivalent role of BCL6 in cell survival and transformation. *Oncogene*, Jan 30;22(4):507-16. 2003

Allen JE, Hough RE, Goepel JR, et al: Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DANN by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol*, Feb; 116(2):291-8. 2002

Andersen CL, Gruszaka-Westwood A, et al.: Recurrent genomic imbalances in B-cell splenic marginal-zone lymphoma revealed by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenetics*, Jan 15;156(2):122-8, 2005.

Andersen NS, Pedersen L, Elonen E, et al.: Primary treatment with autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: outcome related to remission pretransplant. *Eur J Haematol*, Aug;71(2):73-80, 2003

Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, et al.: Mantle cell lymphoma: A clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*, 89:2067-2078, 1997

Au AY, Gascoyne RD, Viswanatha DS, et al.: Cytogenetic analysis in mantle cell lymphoma : a review of 214 cases. *Leuk Lymphoma*, Apr;43(4):783-91, 2002

Banks PM, Chan J, Cleary ML, et al.: Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic and molecular data. *Am J Surg Pathol*, Jul;16(7):637-40, 1992

Baranova A, Hammarsund M, Ivanov D, et.al.: Distinct organisation of the candidate tumor suppressor gene RFP2 in human and mouse: multiple mRNA isoforms in both species- and human-specific antisense transscript RFP2OS. *Gene*, Dec 4;321:103-12, 2003

Baron BW, Anastasi, J, Thirman MJ, et.al.: The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene ist target of BCL-6 repression: implications for a role of bcl6 in the down-regulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, Mar 5;99(5):2860-5, 2002

Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, et al.: Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independant poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, May;117(2):322-32, 2002.

Beà S, Ribas M, Hernández JM, et al.: Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood*, 93; 4365-74, 1999

Bea S, Zettl A, Wright G, et al.: Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*, Nov 1;106(9):3183-90. 2005

Bentz M, Plesch A, Bullinger L, et al.: t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, mar;27(3):285-94, 2000

Bigoni R, Negrini M, Veronese ML, et al: Characterization of t(11;14) translocation in mantle cell lymphoma by fluorescent in situ hybridization. *Oncogene* 13:797-802,1996

Bigoni R, Cuneo A, Milani R, et al.: Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma: cytogenetic and fluorescence in situ hybridization studies. *Leuk Lymphoma* , Feb ; 40(5-6):581-90, 2001

Bishop JM.: Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu Rev Biochem.* 52:301-54, 1983

Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, et al.: Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with myc gene. *EMBO J* 13(9):2124-2130, 1994

Bosch F, Jares P, Campo E et al.: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, et al.: Mantle cell lymphoma: Presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 82:567-575,1998

Bruening W, Prowse AH, Schultz DC, et al: Expression of OVCA1, a candidate tumor suppressor, is reduced in tumors and inhibits growth of ovarian cancer cells. *Cancer Res*, Oct 1;59(19):4973-83, 1999

Cairns P, Tokino K, Eby Y, et al.: Homozygous deletions of 9p21 in primary human bladder tumors detected by comparative multiplex polymerase chain reaction. *Cancer Res*, Mar 15;54(6):1422-4, 1994

Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, et al.: Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16(MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet*, Sep;8(1):27-32, 1994

Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol*, Apr; 33(2): 167-173, 2006.

Camps J , Salaverria I, et al.: Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines. *Leuk Res*; Aug;30(8):923-34, 2006

Cartron G, Solal-Céligny P.: Maintenance therapy for low-grade lymphomas: has the time come? *Curr Opin Oncol*. Sep;19(5):425-32. 2007

Chaganti SR, Gaidano G, Louie DC, et al.: Diffuse large cell lymphomas exhibit frequent deletions in 9p21-22 and 9q31-34 regions. *Genes Chromosomes Cancer*, Jan;12(1):32-6, 1995

Chaganti SR, Chen W, Parsa N, et al.: Involvement of BCL6 in chromosomal aberrations affecting band 3q27 in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. Dec;23(4):323-7, 1998

Chen WY, Wang DH, Yen RC, et al.: Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell*, Nov 4;123(3):437-48., 2005

Corcoran MM, Mould SJ, Orchard JA, et al.: Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene* , Nov 4;18(46):6271-7, 1999

Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al.:13q14 deletion in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinicopathologic features. *Haematologica*, Jul;84(7):589-93, 1999

Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al.: Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: correlation with clinicobiologic features. *Blood*, Feb 15;93(4):1372-80, 1999

Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al.: Acquired chromosome 11q deletion involving the ataxia teleangiectasia locus in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinicobiologic features. *J Clin Oncol*. Jul;18(13):2607-14, 2000

Cuneo A, Bigoni R, Roberti MG, et al.: Molecular cytogenetic characterization of marginal zone B-cell lymphoma: correlation with clinicopathologic findings in 14 cases. *Haematologica*, Jan;86(1):64-70, 2001

Dave BJ, Hess MM, Pickering DL, et al.: Rearrangements of chromosome band 1p36 in non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*, Jun;5(6):1401-9, 1999

Dezfouli S, Bakke A, Huang J, et al: Inflammatory disease and lymphomagenesis caused by deletion of the Myc antagonist Mnt in T cells. *Mol Cell Biol*, Mar;26(6):2080-92, 2006

Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M, et al.: Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia*, May;11(5):747-58, 1997

Dierlamm J, Stefanova M, Wlodarska I, et al.: Chromosomal gains and losses are uncommon in hairy cell leukemia. A Study based on comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, Jul 15;128(2):164-7, 2001

Dreyling MH, Bohlander SK, LeBeau MM, et al.: Refined mapping of genomic rearrangements involving the short arm of chromosome 9 in acute lymphoblastic leukemias and other hematologic malignancies. *Blood*, Sep 1; 86(5): 1931-8, 1995

Dreyling MH, Bullinger L, Ott G, et al.: Alterations of the cyclin D1/p16-pRb pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 57:4608-4614, 1997

Dreyling MH, Roulston D, Bohlander SK, et al.: Codeletion of CDKN2 and MTAP genes in a subset of non-Hodgkin's lymphoma may be associated with histologic transformation from low-grade to diffuse large-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, May;22(1):72-8, 1998

Dreyling M, Lenz G, Hoster E, et al.: Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood*. Apr 1; 105(7):2677-84, 2005

Dominguez G, Silva J, Silva JM, et al.: Clinicopathological characteristics of breast carcinomas with allelic loss in the p73 region. *Breast Cancer Res Treat*, Sep;63(1):17-22, 2000

Espinete B, Sole F, Woenesser S, et al.: Translocation (11;14)(q13;q32) and preferential involvement of chromosomes 1,2,9,13 and 17 in mantle cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*, May; 111(1):92-8, 1999

Fang NY, Greiner TC, Weisenburger DD, et al.: Oligonucleotide microarrays demonstrate the highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. Apr 29;100(9):5372-7, 2003

Forstpointner R, Unterhalt M, Dreyling M, et al.: Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood*, Dec 15;108(13):4003-8, 2006

Goy A, Younes A, McLaughlin P, et al.: Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, Feb 1; 23 (4): 667-75, 2005

Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, et al.: p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood*, May 15;87(10):4302-10, 1996

Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, et al.: Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, Feb 14;103(7):2352-7. 2006

Grimwade D, Du MQ, Langabeer S, et al.: Screening for mutations of BCL 10 in leukemia. *Br J Haematol* , Jun;109(3):611-5, 2000

Gronbaek K, Nedergaad T Andersen MK, et al.: 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

Gyapay G, Morissette J, Vignal A, et al. : The 1993-1994 Genthon human genetic linkage map. *Nature Genetics* 7, 246-339, 1994

Hainaut P. The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr Opin Oncol*. Jan; 7(1):76-82, 1995

Hernandez JM, Mecucci C, Michaux L, et al.: del(7q) in chronic B-cell lymphoid malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* , Feb; 93(2):147-51, 1997

Hernandez JM, Garcia JL, Gutierrez NC, et al.: Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol*, May;158(5):1843-50, 2001

Hernandez L, Fest T, Cazorla M, et al.: p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*, Apr 15;87(8):3351-9, 1996

Hernandez L, Hernandez S, Bea S, et al.: c-myc mRNA expression and genomic alterations in mantle cell lymphomas and other nodal non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*, Dec;13(12):2087-93, 1999

Hernandez L, Bea S, Pinyol M, et al.: CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res*, Mar 15;65(6):2199-206, 2005

Hiddemann W, Dreyling M, Unterhalt M : Rituximab plus chemotherapy in follicular and mantle cell lymphomas. *Semin Oncol*. Feb;30(1 Suppl 2):16-20, 2003

Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, et al.: Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes Cancer*, Apr;30(4):375-82, 2001

Hummel M, Tamaru J, Kalvelage B, et al.: Mantle cell (previous 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

Issa JP, Zehnbauser BA, Kaufmann SH, et al.: HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* May1;57(9):1678-81, 1997

Jarsova M, Papajik T, et al.: High incidence of unbalanced chromosomal changes in mantle cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leuk Lymphoma*, Sep;45(9):1835-46, 2004

Jost CA, Marin MC, Kaelin WG JR.:p73 is a simian p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* Sep 11; 389(6647):191-4, 1997

Kane RC, Dagher R, Farrell A, et al.: Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. Sep 15;13(18):5291-4. 2007

Kasamon YL, Jones RJ, Diehl LF et al.: Outcomes of autologous and allogeneic blood or marrow transplantation for mantle cell lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. Jan;11(1):39-46, 2005

Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, et al.: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-teleangiectasia. *Cell*. Nov 13;71(4):587-97. 1992

Kaufmann H, Raderer M, Wohrer S, et al.: Antitumor activity of rituximab plus thalidomide in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Blood*, 2004 Oct 15; 104(8):2269-71, 2004

Kawakami T, Furukawa Y, Sudo K, et al.: Isolation and mapping of a human gene (PDCD2) that is highly homologous to Rp8, a rat gene associated with programmed cell death. *Cytogenet Cell Genet*. 71(1):41-3, 1995

Kersemaekers AM, Hermans J, Fleuren GJ, et al.: Loss of heterozygosity for defined regions on chromosomes 3,11 and 17 in carcinomas of the uterine cervix. *Br J Cancer*; 77(2):192-200, 1998

Khouri IF, Lee MS, Saliba, RM, et al.: Nonablative allogeneic stem-cell transplantation for advanced/recurrent mantle-cell-lymphoma. *J Clin Oncol*. Dec1;21(23):4407-12, 2003

Knutsen T.: Cytogenetic changes in the progression of lymphoma. *Leuk Lymphoma*, Sep;31(1-2):1-19, 1998

Koduru PR, Zariwala M, Soni M, et al.: Deletion of cyclin-dependent kinase 4 inhibitor genes p15 and p16 in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, Oct 15;86(8):2900-5, 1995

Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, et al.: Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas show a high frequency of aberrations and allowed a refined characterization of consensus regions. *Blood*, Aug 1;104(3):795-801, 2004

Lardelli P, Bookman MA, Sundeen J, et al.: Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation. Morphologic and immunophenotypic spectrum and clinical correlations. *Am J Surg Pathol*. Aug;14(8):752-63, 1990

Lenz G, Dreyling M, Schiegnitz E, et al.: Moderate increase of secondary hematologic malignancies after myeloablative radiochemotherapy and autologous stem-cell transplantation in patients with indolent lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*, Dec 15;22(24):4926-33, 2004

Lenz G, Dreyling M, Hoster E, et al.: Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamid, 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.* Mar 20;23(9):1984-92, 2005

Leuraud P, Marie Y, Robin E, et al.: Frequent loss of 1p32 region but no mutation of the p18 tumor suppressor gene in meningiomas. *J Neurooncol.* Dec;50(3):207-13, 2000

Liu Y, Hermanson M, Grander D, et al.: 13q deletions in lymphoid malignancies. *Blood*, Sep 1;86(5):1911-5, 1995

Louie DC, Offit K, Jaslow R, et al.: p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 86(8):2892-2899, 1995

Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, et al.: Cyclin D1 /bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J* Aug 1;13(15): 3487-95, 1994

Mao L, Lee DJ, Tockman MS, et al.: Mikrosatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 9871-9875, 1994

Martinez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M, et al.: Frequent inactivation of the p73 gene by abnormal methylation or LOH in non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer.* Nov 1;102(1):15-9, 2002

Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, et al. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood*, Dec1;98(12):3479-82. 2001

Marzec M, Kasprzyka M, et al: Mantle cell lymphoma cells express predominantly Cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity. *Blood*, Sep 1;108(5):1744-50, 2006

Mertens D, Wolf S, Bullinger L, et al.: BCMSUN, a candidate gene for B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle-cell lymphoma, has an independently expressed homolog on 1p22-p31, BCMSUN-like. *Int J Cancer*, Dec 1; 88(5):692-7, 2000

Migliazza A, Bosch F, Komatsu H, et al.: Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, apr1;97(7): 2098-104, 2001

Mohamed AN, Palutke M, Eisenberg L, et al.: Chromosomal analysis of 52 cases of follicular lymphoma with t(14;18), including blastic/blastoid variant. *Cancer Genet Cytogenet*, Apr 1;126(1):45-51, 2001

Monni O, Oinonen R, Elonen E, et al.: Gain of 3q and Deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chrom Cancer* 21; 298-307, 1998

Murray PG, Qiu GH, Fu L, et al.: Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. Feb 12;23(6):1326-31, 2004

Nanba K, Jaffe ES, Braylan RC, et al.: Alkaline phosphatase-positive malignant lymphomas. A subset of mantle cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* 68:535-542, 1977

Nervins JR: E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science (Washington DC)* 258:424-429, 1992

O'Leary T, Ernst S, Przygodzki R, et al.: Loss of heterozygosity at 1p36 predicts poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest*, Dec;79(12):1461-7, 1999

Onicu M, Schlette E, Medeiros LJ, et al.: 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*, Dec; 116(6):886-92. 2001

Ott G, Kalla J, Ott MM, et al.: Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood* Feb 15;89(4); 2114-9, 1997

Ott MM, Bartkova J, Bartek J, et al.: Cyclin D1 expression in mantle cell lymphoma is accompanied by downregulation of cyclin D3 and is not related to the proliferative activity. *Blood*, Oct 15;90(8):3154-9, 1997

Ott MM, Rosenwald A, Katzenberger T, et al.: Marginal zone B-cell lymphomas (MZBL) arising at different sites represent different biological entities. *Genes Chromosomes Cancer*, Aug;28(4):380-6, 2000

Pasqualucci L, Compagno M, et al.: Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*, Feb 20;203(2):311-7, 2006

Paulsen MT, Starks AM, Derheimer FA, et al.: The p53-targeting human phosphatase hCdc14A interacts with the Cdk1/cyclin B complex and is differentially expressed in human cancers. *Mol Cancer*, Jun 19;5:25. 2006

Pinyol M, Cobo F, Bea S, et al.: 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

Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, et al.: Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 89:272-280,1997

Raty R, Franssila K, Jansson SE, et al.: Predictive factors for blastoid transformation in the common variant of mantle cell lymphoma. *Eur J Cancer*, Feb;39(3):321-9, 2003.

Rimokh R, Berger F, Delsol G, et al.: Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13) bearing leukemias. *Blood*, Jun 1; 81(11):3063-7, 1993

Rinaldi A, Kwee I, Tadorelli M, et al: Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* Feb 132 (3) 303-16, 2006

Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al.: The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*, Feb;3(2):185-97,2003

Rubio-Moscardo F, Climent J, et al: Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood*; Jun 1;105(11):4445-54. 2005

Rudolph C, Liehr T, Steinemann D, et al.: Different breakage-prone regions on chromosome 1 detected in t(11;14)-positive mantle cell lymphoma cell lines and multiple myeloma cell lines are associated with different tumor progression-related mechanisms. *Cytogen Genome Reseach*; 112(3-4):213-21,2006

Rummel MJ, Al-Batran SE, Kim SZ, et al.: Bendamustine plus rituximab is effective and has a favorable toxicity profile in the treatment of mantle cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. May 20;23(15):3383-9, 2005

Sagaert X, Laurent M, et al: MALT1 and BCL10 aberrations in MALT lymphomas and their effect on the expression of BCL10 in the tumour cells. *Mod Pathol* Feb;19(2):225-32,2006

Sankar M, Tanaka K, Kumaravel TS, et al.: Identification of a commonly deleted region at 17p13.3 in leukemia and lymphoma associated with 17p abnormality. *Leukemia* Apr;12(4):510-6, 1998

Schlegelberger B, Zwingers T, Harder L, et al.: Clinicopathogenetic significance of chromosomal abnormalities in patients with blastic peripheral B-cell lymphoma. Kiel-Wien Lymphoma Study Group. *Blood*, Nov 1; 94(9):3114-20, 1999

Schraders M, Pfundt R, et al: Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood*, Feb 15;105(4):1686-93, 2005

Schroder M, Mathieu U, Dreyling MH, et al.: CDKN2 gene deletion is not found in chronic lymphoid leukemias of B- and T-cell origin but is frequent in acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol*, Dec;91(4):865-70, 1995

Shan L, Yang Q, Nakamura, et al.: Frequent loss of heterozygosity at 1p36 and p73 abnormality in parathyroid adenomas. *Mod Pathol*, Apr;14(4):273-8, 2001

Shaw GR, Kronberger DL: TP53 deletions but not trisomy 12 are adverse in B-cell lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet*, Jun;119(2):146-54, 2000

Sherr CJ, *Science*, Dec 6 274(5293):1672-7, 1996

Siu LL, Wong KF, Chan JK, et al.: Comparative genomic hybridization analysis of natural killer cell lymphoma/leukemia. Recognition of consistent patterns of genetic alterations. *Am J Pathol*, Nov;155(5):1419-25, 1999

Steinemann D, Gesk S, Zhang, et al.: Identification of candidate tumor-suppressor genes in 6q27 by combined deletion mapping and electronic expression profiling in lymphoid neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer*. Aug;37(4):421-6, 2003

Stilgenbauer S, Nickolenko J, Wilhelm J, et al: Expressed sequences as candidates for novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene* April 9;16 (14):1891-7, 1998

Stilgenbauer S, Schaffner C, Winkler D, et al.: The ATM gene in the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 11 Suppl1:127-130, 2000

Stranks G, Height SE, Mitchel P, et al.: Deletions and rearrangement of CDKN2 in lymphoid malignancies. *Blood*, Feb 15;85(4):893-901, 1995

Tadokoro J, Nakamura, Furusawa S, et.al.: Low frequency of BCL10 gene mutations in B-cell non Hodgekin's lymphoma. *Int J Hematol*. Feb;73(2):222-5, 2001

Tagawa H, Karnan S, Suzuki R et al.: Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*, Feb 17;24(8):1348-58, 2005

Thorselius M, Walsh S, Erikson I, et al.: Somatic hypermutation and V(H) gene usage in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol*. Apr;68(4):217-24, 2002

Tiemann M., Schrader C, Klapper W, et al.: Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from European MCL Network. *Br J of Haem*, 131, 29-38, 2005

Toyo-oka K, Bowen TJ, Hirotsune S et al.: Mnt-deficient mammary glands exhibit impaired involution and tumors with characteristics of myc overexpression. *Cancer Res*, Jun 1; 66(11):5565-73, 2006

Vaandrager JW, Schuurin E, Zwikstra E, et al.: Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DANN fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 84: 1177-1182, 1996

Vairapandi M, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA: GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* , Sep, 192(3):327-38, 2002

Vizcarra E, Martinez-Climent JA, Benet, et al.: Identification of two subgroups of mantle cell lymphoma with distinct clinical and biological features. *Hematol J*. 2(4):234-41, 2001

Wada M, Okamura T, Okada M, et al.: Frequent chromosome arm 13q deletion in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, May;13(5):792-8, 1999

Weber JL, May PE: Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *AM J Hum Genet* 44, 388-396, 1989

Weinberg, RA. Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146 , 1991

Welzel N, Le T, Marculescu R, et al.: Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions; implications for the mechanism of translocation and origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. Feb 15;61(4):1629-36, 2001

Whang-Peng J, Knutsen T, Jaffe ES, et al.: Sequential analysis of 43 patients with non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations with cytogenetic, histologic, immunophenotyping and molecular studies. *Blood*, Jan 1;85(1):203-16, 1995

White GR, Stack M, Santibanez-Koref M, et al.: High levels of loss at the 17p telomere suggest the close proximity of a tumor suppressor. *Br J Cancer*, Sep; 74(6):863-70, 1996

Winston JT, Coats SR, Wang YZ, et al.: Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene*, Jan 4; 12(1):127-34. 1996

Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeyer A, et al.: Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica*. Jul;84(7):594-9, 1999

Wolf S, Mertens D, Schaffner C, et al.: B-cell neoplasia associated gene with multiple splicing (BCMS): the candidate B-CLL gene on 13q14 comprises more than 560kb covering all critical regions. *Hum Mol Genet*. Jun1;10(12):1275-85, 2001

Wong AK, Chen Y, Lian L, et al.: Genomic structure, chromosomal location, and mutation analysis of the human CDC14A gene. *Genomics*, Jul 15;59(2):248-51, 1999

Zhang Q, Siebert R, Yan M, et al.: Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet*, May;22(1):63-8, 1999

Zhang Y, Matthiesen P, Harder S, et al.: A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, Jan;27(1):52-8, 2000

Zucca E, Stein H, Coiffier B: European Lymphoma Task Force (ELTF): Report of the workshop on Mantle Cell Lymphoma (MCL). *Ann Oncol*. Jul;5(6):507-11, 1994

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Seite

2.1. Beispiel für Kurvenprofile mit und ohne LOH	25
3.1 LOH von mindestens 2 benachbarten Markern pro Chromosomenarm	41
3.2 Deletion von mindestens 2 benachbarten Markern pro Chromosomenarm	42
3.3 Amplifikationen mindestens 2 benachbarten Markern pro Chromosomenarm	43
3.4 Deletionen im Bereich 17p13.1 bis 17p13.3	48
3.5 Graphische Darstellung der Korrelationen zwischen Alterationen verschiedener Chromosomenarme	51

Tabellen

Seite

1.1 Onkogene	3
1.2 Tumorsuppressorgene	4
2.1 Patientencharakteristik und - material	11
2.2 Mikrosatellitenprimer	15
3.1a Ergebnisse genomische Allelotypisierung für die Patienten 1-26	27
3.1b Ergebnisse genomische Allelotypisierung für die Patienten 27-52	32
3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der genomischen Allelotypisierung	37
3.3 Ergebnisse Allelotypisierung des Bereiches 17p13.1 bis 17p13.3 (Patienten 1-52)	45
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Allelotypisierung der genomischen Region 17p13.1 bis 17p13.3	47
3.5 Korrelationen zwischen genetischen Alterationen, Proliferationsindex und morphologischen Subtyp	50

Lebenslauf

Am 10. März 1977 wurde ich, Miriam Scheubner, als einziges Kind meiner Eltern, Gundel Hinderer-Scheubner und Harald Scheubner (beide Gymnasiallehrer in München), in München geboren.

Meine Schulausbildung schloss ich 1996 mit dem Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Ludwigsgymnasium München, humanistischer Zweig, ab. Im Herbst 1996 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich auch das Physikum (1998) sowie das erste (1999), zweite (2001) und dritte (2003) Staatsexamen ablegte.

Das praktische Jahr absolvierte ich in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Krankenhauses München-Schwabing und im Krankenhaus München-Neuperlach (Chirurgie und Gynäkologie).

Seit Juli 2003 arbeite ich im Krankenhaus München-Schwabing, Abteilung für Hämatologie und Onkologie. Nach Beendigung meiner Zeit als Ärztin im Praktikum bin ich dort seit Oktober 2004 als Assistenzärztin tätig.

Im Jahr 1999 begann ich auf Anregung meines Betreuers, Herrn Prof. Dr. med. M. Dreyling mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation „Hierarchie proliferationsassoziierter sekundärer genomischer Alterationen im Mantelzell-Lymphom – eine Analyse mittels PCR-gestützter Genotypisierung“.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Menschen bedanken, die mich in der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Dreyling, der mir jederzeit mit konstruktiven Ratschlägen und Anregungen zur Seite stand. Auf seine Initiative ist diese Arbeit entstanden, und ohne sein fortwährendes Engagement und seine Unterstützung wäre ihre Umsetzung nicht möglich gewesen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. W. Hiddemann für die Ermöglichung und Förderung dieser Dissertationsarbeit.

Ich danke außerdem Frau Monika Maier und Frau Dr. Gritt Hutter für ihre Mithilfe im praktisch-technischen Teil dieser Arbeit. Sie haben mich bei technischen Fragestellungen dieser Arbeit sehr unterstützt, sowohl durch meine Einarbeitung in die verwendeten Methoden als auch durch Übernahme eines Anteiles der praktischen Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, Gunde Hinderer-Scheubner und Harald Scheubner, sowie Frau Liane Klatt für ihre Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.