

Aus dem
Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink

**Genetische Charakterisierung von Mantelzell-Lymphomen
mittels komparativer genomischer Hybridisierung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dr. med. Philipp Jehn
aus Würzburg

Würzburg, im Juli 2008

Referent: Prof. Dr. med. A. Zettl

Korreferent: Prof. Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23. September 2008

Der Promovend ist Arzt und Zahnarzt.

Meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Tumorentstehung	1
1.2 Stadien der B-Zellreifung	2
1.3 Mantelzell-Lymphome – Definition.....	3
1.4 Mantelzell-Lymphome – Klassifikation.....	4
1.5 Mantelzell-Lymphome - Klinik.....	6
1.6 Immunphänotypisierung der Mantelzell-Lymphome.....	7
1.7 Zytogenetik und Genexpressionsanalysen der Mantelzell-Lymphome.....	8
1.8 Mantelzell-Lymphome – CGH-Arbeiten	10
1.9 Grundprinzipien der CGH	13
1.10 Fragestellungen.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Herkunft des untersuchten Materials	15
2.2 Bestimmung der Menge an Tumor-DNA.....	16
2.3 RNase-Verdau	16
2.4 Nick-Translation.....	16
2.5 Komparative Genomische Hybridisierung (CGH).....	17
2.6 Bildaufnahme und Bildauswertung	18
2.7 Statistische Analysen.....	19
3. Ergebnisse	20
3.1 Genetische Alterationen des Gesamtkollektivs der untersuchten Mantelzell- Lymphome.....	20
3.2 Genetische Alterationen Cyclin D1-positiver Mantelzell-Lymphome.....	20
3.3 Genetische Alterationen Cyclin D1-negativer Mantelzell-Lymphome.....	23
3.4 Cyclin D1-positive und Cyclin D1-negative Mantelzell-Lymphome im Vergleich.	25

4. Diskussion.....	27
4.1 Cyclin D1-positive und Cyclin D1-negative Mantelzell-Lymphome zeigen ein nahezu identisches Profil charakteristischer chromosomaler Aberrationen.....	27
4.2 Chromosomale Imbalanzen und mögliche Zielgene bei Cyclin D1-positiven und Cyclin D1-negativen Mantelzell-Lymphomen	29
5. Zusammenfassung	33
6. Literaturangaben.....	35
7. Abkürzungen.....	49
8. Anhang.....	50

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Tumorentstehung

Tumoren entstehen im Wesentlichen als Folge einer Fehlregulation des Zellwachstums. Diese führt zu einer Unabhängigkeit der betroffenen Zellen von externen Einflüssen und resultiert in autonomer Zellproliferation. Als ursächlich werden derzeit sechs Arten von Störungen diskutiert, die eine maligne Transformation von Zellen zur Folge haben können: Unabhängigkeit von wachstumsfördernden Signalen, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Apoptoseresistenz, unbegrenzte Replikationsfähigkeit, Tumorneoangiogenese sowie die Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung [1].

Die wesentliche Grundlage für klonale Dysregulationen der Zellproliferation stellen Veränderungen am Genom einer Zelle dar, die nach derzeitigem Verständnis in einem Mehrstufenprozess durch genetische Instabilität entstehen. Bei derartigen Alterationen handelt es sich sowohl um numerische chromosomale Aberrationen, die entweder durch Zugewinn oder durch Verlust von genetischem Material gekennzeichnet sind, als auch um strukturelle Veränderungen, wie beispielsweise Inversionen oder Translokationen. Zusätzlich kann die Integrität des Genoms jedoch auch durch Mutationen oder Genamplifikationen gestört werden.

Folgen derartiger Alterationen können ein Funktionsverlust wachstumshemmender Gene (sog. Tumorsuppressorgene) oder eine Aktivierung wachstumsfördernder Gene (sog. Onkogene) sein. Auch können Gene in ihrer Funktion gestört werden, die die DNA-Reparatur oder den Zelltod beeinflussen. Resultat dieser Veränderungen ist autonomes, neoplastisches Wachstum.

Die Analyse des genetischen Materials von Tumorzellen ermöglicht daher Einblicke in Genomabschnitte, die bei der Entstehung von Tumoren eine wesentliche Rolle spielen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Detektion chromosomaler Imbalancen von Mantelzell-Lymphomen.

1.2 Stadien der B-Zellreifung

Lymphatische Tumoren der B-Zellreihe, wie beispielsweise die in dieser Arbeit untersuchten Mantelzell-Lymphome, sind durch eine klonale Proliferation von B-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien gekennzeichnet [2]. Erstes Stadium der normalen B-Zellreifung ist dabei die Differenzierung von sog. Vorläufer-B-Zellen (Lymphoblasten) zu naiven B-Zellen (Lymphozyten). Diese beginnen, in die Blutbahn einzutreten und sich in den lymphatischen Geweben des Körpers, wie beispielsweise den Lymphknoten, anzusiedeln [3; 4]. Nach Kontakt der Zellen mit zirkulierendem Antigen (Aktivierung) erfolgt deren blastäre Transformation, Proliferation und Reifung zu Plasmazellen [5]. Innerhalb eines Lymphknotens können dabei im Wesentlichen zwei Wege der Zelldifferenzierung unterschieden werden. Entweder verbleibt die B-Zelle in der Parakortex und reift dort im Rahmen der sog. primären Immunantwort direkt zur Plasmazelle, oder aber sie wandert ins Zentrum eines primären Lymphfollikels. Dort formt sie mit ortsständigen Makrophagen und dendritischen Zellen das sog. Keimzentrum, in welchem die für die Erkennung und Beseitigung des Antigens essentielle genetische Rekombination und somatische Hypermutation stattfinden [6; 7]. Die Zellen eines solchen Keimzentrums werden dabei als Zentroblasten bezeichnet. Im Rahmen der sog. sekundären Immunantwort reifen diese dann als Zentrozyten ebenfalls weiter zu Plasmazellen. Während der follikulären Reaktion wird das Keimzentrum fortwährend kappenartig von einer Zone rezirkulierender, noch nicht durch dendritische Zellen aktivierter B-Lymphozyten umgeben (sog. Mantelzone). Zellen dieser Zone sind die Mantelzellen.

1.3 Mantelzell-Lymphome - Definition

Mantelzell-Lymphome („mantle cell lymphoma“; MCL) gehören zu den lymphatischen Tumoren vom Typ der Non-Hodgkin Lymphome. Als reife B-Zellneoplasien zerstören sie dabei die umgebende Lymphknotenarchitektur oder das extranodale Gewebe. Die Hauptprädispositionsstellen außerhalb der Lymphknoten (ca. 30 % der Fälle) sind diesbezüglich der Gastrointestinaltrakt sowie der Waldeyerschen Rachenring [2]. Unabhängig davon zeigt sich in den meisten Fällen ein diffuses, selten auch ein noduläres Wachstumsmuster. Ein echtes follikuläres Wachstum lässt sich hingegen kaum beobachten [2].

Die Tumoren sind durch eine Proliferation kleiner bis mittelgroßer, monomorpher, lymphoider Zellen der B-Zellreihe gekennzeichnet. Als vermutete Ausgangszellen klonaler Dysregulation werden nach derzeitigem Kenntnisstand periphere B-Zellen mit Ursprung aus der inneren Mantelzone des Keimzentrums angesehen [2]. Die Tumorzellen erinnern histologisch hauptsächlich an Zentrozyten. Andere neoplastisch transformierte Zellen, ähnlich Zentroblasten, Immunoblasten oder Paraimmunoblasten, fehlen. Auch Pseudofollikel finden sich nicht. Bei unregelmäßiger Kerngröße finden sich meist ein blasses Zytoplasma, mäßig verteiltes Chromatin sowie unauffällige Nukleoli. [2]. Histiocyten und nicht neoplastische Plasmazellen können begleitend im Tumorstroma vorkommen. Im Falle eingestreuter Histiocyten kann sich dabei ein Sternenhimmel-ähnliches Bild („Starry-sky“) zeigen [2]. Im Gegensatz zu anderen lymphatischen Tumorentitäten findet sich somit ein relativ homogenes morphologisches Bild.

1.4 Mantelzell-Lymphome - Klassifikation

Maligne Lymphome werden auch heutzutage vorwiegend nach histologisch-morphologischen Gesichtspunkten klassifiziert. Die Einordnung der MCL innerhalb der gebräuchlichen Lymphomklassifikationen soll daher im Folgenden kurz dargestellt werden.

Die von Karl Lennert im Jahr 1974 eingeführte und 1988 aktualisierte Kiel-Klassifikation, welche hauptsächlich auf zytologischen Kriterien beruht, ist auf dem Weg zu einer einheitlichen und reproduzierbaren Klassifikation lymphatischer Tumoren sicherlich als einer der Meilensteine anzusehen [8; 9; 10]. Im Kern wurde zwischen niedrig- und hochmalignen Lymphomen unterschieden, die entweder im Falle niedriger Malignität weitgehend aus „Zyten“, im Falle hoher Malignität aus „Blasten“ bestanden [8; 9; 10]. Die heutige Bezeichnung MCL fand sich in dieser Klassifikation noch nicht. Tumoren dieser Kategorie wurden von Lennert unter den „Lymphomen von niedrigem Malignitätsgrad des B-Zelltyps“ eingeordnet und mit dem Begriff „centrocytic (mantle cell) lymphoma“ beschrieben. Histologisch handelte es sich um Tumoren mit vorwiegend Zentrozyten-ähnlichen Bestandteilen sowie eingestreuten Plasmazellen [8; 9; 10].

Im Gegensatz dazu stand die „Working Formulation of Non-Hodgkin´s Lymphomas for Clinical Usage“, welche auf Ergebnissen ehemaliger Behandlungsprotokolle aus den 70er Jahren begründet war [11]. Sie beruhte dabei im Wesentlichen auf Parametern wie klinischem Verlauf, Prognose und therapeutischer Beeinflussbarkeit [11]. So wurden in Abhängigkeit vom zu erwartenden Krankheitsverlauf „maligne Lymphome niedrigen, mittleren und hohen Malignitätsgrades“ unterschieden. Nach heutigem Verständnis lassen sich diesbezüglich wohl am zutreffendsten die Begriffe einiger „maligner Lymphome von niedrigem und mittlerem Malignitätsgrad“, mit ihren Varianten „diffuse, small cleaved cell type“, „rarely follicular, small cleaved“ und „diffuse, mixed small and large cell or large cell type“, der Gruppe der MCL zuordnen [11].

Ein Zusammenschluss amerikanischer und europäischer Hämatopathologen, die sog. International Lymphoma Study Group (ILSG), veröffentlichte im Jahr 1994 die REAL-Klassifikation. Dabei wurden neben einigen neuen Tumorentitäten auch erstmals

immunohistochemische und genetische Kriterien berücksichtigt [12]. Grundsätzlich wurde zudem versucht, der Definition von Tumoren nach ihrer Differenzierung (z.B. B-Zellen vs. T-Zellen) und ihrem Entstehungsort Rechnung zu tragen. So sollte jedem Tumor eine ursprüngliche zelluläre Differenzierungsform (sog. normale Ausgangszelle) gegenübergestellt werden. Postulierte normale Ausgangszellen für das MCL waren periphere B-Zellen der inneren folliculären Mantelzone [12]. Histologisch wurde neben der zentrozytischen außerdem eine blastoide Variante, ähnlich dem „diffuse, mixed small and large cell or large cell type“ der Working Formulation, unterschieden [12].

Die bis heute allgemeingültige Klassifikation der Lymphome und lymphoproliferativen Erkrankungen durch die WHO wurde schließlich im Jahr 2001 veröffentlicht. In ihr wurden fachübergreifend neben zytologisch-morphologischen Kriterien auch klinische Daten sowie neueste Erkenntnisse der Immunphänotypisierung, der Molekularbiologie und der Zytogenetik berücksichtigt [2; 13]. Ebenso findet die Zuschreibung von Ursprungszellen („cells of origin“) zur jeweiligen Lymphomentität in dieser Klassifikation besondere Berücksichtigung. Zusätzlich erfolgt innerhalb der B- und T-Zellneoplasien die weitere Differenzierung in Neoplasien aus sog. Vorläuferzellen („precursor cells“) und solchen aus reifen Zellen („mature cells“). Tumoren vom Typ der MCL gehören dabei, wie bereits erwähnt, in die letztgenannte Gruppe. Postulierte Ursprungszellen sind, ähnlich der REAL-Klassifikation, auch hier periphere B-Zellen der inneren Mantelzone [2; 13]. Neben den klassischen MCL werden zwei blastoide Varianten (klassisch und pleomorph) sowie einige weitere Unterformen unterschieden, welche histologisch oft dem kleinzelligen lymphozytären Lymphom oder dem Marginalzonen-Lymphom ähneln. Nach derzeitigem Kenntnisstand stellen diese jedoch lediglich seltene Formen des MCL dar [2; 13].

1.5 Mantelzell-Lymphome - Klinik

MCL gelten bezüglich ihres klinischen Verhaltens als aggressive Non-Hodgkin Lymphome der B-Zellreihe, wobei sich epidemiologisch ca. 5-10 % der Tumoren dieser Gruppe zuordnen lassen [2; 14]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei ungefähr 60-70 Jahren, teils finden sich jedoch auch Verläufe bei Patienten mittleren Alters. Männer scheinen insgesamt etwas häufiger betroffen zu sein als Frauen [2; 14]. Die Tumoren sind dabei sowohl in der klinischen Präsentation als auch in dem zu erwartenden Verlauf durch ihre Heterogenität gekennzeichnet.

MCL entstehen in der Regel primär de novo mit bevorzugter Lokalisation in den Lymphknoten. Auch das Knochenmark und die Milz sind wichtige Prädilektionsstellen. Extranodal sind, wie bereits erwähnt, vor allem der Gastrointestinaltrakt (v.a. im Rahmen der multiplen lymphomatösen gastrointestinalen Polyposis) sowie der Waldeyersche Rachenring betroffen [2; 14]. Klinisch finden sich meist eine ausgeprägte Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie und Knochenmarkinfiltration. In 25 % zeigt sich außerdem eine hämatogene Aussaat mit Leukozytose, die bei einigen Patienten das Bild einer lymphozytischen Leukämie imitieren kann [2; 14]. Die Stadieneinteilung der Erkrankung erfolgt derzeit noch immer nach dem Ann Arbor-Klassifikationsschema (Stadium I und II: lokalisiertes Wachstum; Stadium III und IV: fortgeschrittenes, disseminiertes Wachstum), welches ursprünglich für das Staging des Morbus Hodgkin entwickelt wurde [15; 16]. Die meisten Patienten weisen dabei zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein Stadium III oder IV der Erkrankung auf.

Die therapeutische Beeinflussbarkeit der MCL ist insgesamt als schlecht einzuschätzen. So sprechen zwar einige Patienten auf eine initiale Polychemotherapie an, gelangen jedoch in der Mehrzahl der Fälle nicht in eine dauerhafte Remission oder erliegen der Erkrankung im weiteren Verlauf [17]. Für die Wahl der Therapie sowie die Abschätzung der Prognose kann dabei u.a. der Leistungszustand des Patienten einen Anhaltspunkt bieten. Dieser kann grob prozentual mittels des sog. Karnofsky-Index (100-10 %: symptomlos bis moribund) oder aber über die ECOG-Skala (0-4: normal bis ständig bettlägerig) beurteilt werden [18; 19]. Je nach Klinik kommen dabei Anthracyclin- oder Nicht-Anthracyclin-basierte Therapieregimes sowie Radio- oder

Stammzelltherapien zur Anwendung [17]. Dabei zeigt sich für Tumoren vom Typ der MCL eine mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von 3-5 Jahren. In einer Vielzahl der Fälle erliegen die Patienten der Erkrankung jedoch innerhalb weniger Monate. Auf der anderen Seite wurden bereits indolente Verläufe mit einer Überlebenszeit von bis zu 10 Jahren beschrieben [17].

Die Einschätzung des individuellen Risikos bzw. der Prognose gemäß dem internationalen prognostischen Index (IPI-Score), basierend auf verschiedenen klinischen Parametern (Alter, Lactatdehydrogenase-Spiegel, (Mobilitäts-)Status des Patienten, Tumorstaging, extranodaler Lymphombefall), kann hierbei für aggressive Lymphome einen Anhalt liefern [20; 21]. Im klinischen Alltag zeigen jedoch Patienten der vermeintlich selben Erkrankung bei gleichem IPI-Score dennoch oftmals unterschiedliche Krankheitsverläufe [20; 21]. Auch scheinen andere Parameter einen Einfluss auf die Progression der Erkrankung zu nehmen. Insbesondere für eine histologisch nachgewiesene hohe proliferative Aktivität oder das Vorliegen einer blastoiden Variante sowie für eine hämatogene Beteiligung wurde diesbezüglich eine Verschlechterung der Prognose beschrieben [22; 23].

Die hier beschriebene Heterogenität im klinischen Verlauf der MCL sowie das variable Ansprechen auf eingeleitete Therapiemaßnahmen machen deutlich, dass eine prognostische Abschätzung im individuellen Fall überaus schwierig ist. Neben der histologisch-morphologischen Differenzierung sind daher v.a. die immunphänotypische und die molekulargenetische Charakterisierung eventueller Subtypen Gegenstand derzeitiger Studien.

1.6 Immunphänotypisierung der Mantelzell-Lymphome

MCL zeigen sich immunphänotypisch als Gruppe mit Expression verschiedenster Oberflächenmarker („cluster of differentiation“; CD). So können in der Regel die Antigene CD19, CD20 und CD79a als Marker der B-Zell-Linie nachgewiesen werden [2; 24]. Sowohl CD20 als auch CD79a werden dabei während der zellulären

Differenzierungsschritte (Prä-B-Zelle bis Plasmazelle) über einen langen Zeitraum exprimiert [25; 26]. Zusätzlich zeigt die überwiegende Mehrzahl der MCL jedoch auch eine Expression B-Zell-unabhängiger Oberflächenmarker wie CD5 und CD43. Dabei ist insbesondere der Nachweis von CD5 als typisch für die MCL anzusehen [27; 28; 29; 30]. Weiterhin finden sich neben den erwähnten Oberflächenmarkern in großer Anzahl diverse Surface-Immunglobuline (Ig) vom Typ IgM und/oder IgD [27; 28].

Interessanterweise exprimieren nahezu alle Tumoren die Proteine Bcl-2, ein antiapoptotisches Protein, und Cyclin D1, ein Regulator-Protein des Zellzyklus [31; 32; 33; 34]. Cyclin D1 ist hierbei von besonderem Interesse, da dessen vermehrte Expression das Resultat der für MCL charakteristischen Translokation t(11;14)(q13;q32) ist [35; 36], auf die im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen wird. Keimzentrum-assoziierte Antigene bzw. Marker germinaler B-Zellen wie CD10, CD23 oder Bcl-6 lassen sich bei MCL in der Regel nicht nachweisen [37; 38].

1.7 Zytogenetik und Genexpressionsanalysen der Mantelzell-Lymphome

Wie bereits erwähnt sind MCL genetisch in der Mehrzahl der Fälle durch die chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32) charakterisiert, welche sich bei nahezu allen Tumoren nachweisen lässt und zur diagnostischen Abgrenzung der MCL gegenüber anderen lymphatischen Tumoren, wie beispielsweise der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL), herangezogen wird [35; 36]. Durch die Translokation gelangt das Gen Bcl-1 auf Chromosom 11 (Region 11q13), welches für Cyclin D1, ein Regulatorprotein des Zellzyklus, kodiert, unter Kontrolle der kodierenden Region für die Immunglobulin-Schwerketten auf Chromosom 14 (Region 14q32). Folge ist eine konsekutive Überexpression von Cyclin D1 mit Dysregulation der Zellzykluskontrolle [35; 36]. Obwohl diese Translokation auch heute noch als charakteristisch für die MCL gilt und deren Nachweis ein wichtiges differentialdiagnostisches Hilfsmittel ist, zeigen nicht alle Tumoren eine Überexpression von Cyclin D1 (sog. Cyclin D1-negative

MCL). Es bestand somit in der Vergangenheit oftmals Unklarheit über die genaue Zuordnung dieser Tumoren innerhalb der Gruppe lymphatischer Erkrankungen [39].

Andererseits zeigt das Vorhandensein derartiger Tumoren, dass neben einer Überexpression von Cyclin D1 auch andere genetische Veränderungen eine Rolle für die Tumorgenese der MCL zu spielen scheinen, welche beispielsweise in Störungen der DNA-Reparatur- oder der Apoptosemechanismen resultieren [40]. Mögliche Alterationen sowie deren Zielgene wurden in einigen Studien bereits nachgewiesen. So zeigten sich u.a. veränderte Expressionsmuster für die Gene p16 (INK4alpha), BMI-1, ATM, CDK4 und p53 [41; 42; 43; 44; 45].

Kürzlich durchgeführte Genexpressionsanalysen lieferten bezüglich der molekulargenetischen Charakterisierung bzw. Zuordnung der Cyclin D1-negativen Tumoren Klarheit. So konnten in den Studien von Rosenwald et al. sowie Fu et al. Tumoren dieser Gruppe erstmals über ihr sog. genetisches Expressionsprofil zweifelsfrei den MCL zugeordnet werden [46; 47]. Grundlage der Genexpressionsanalyse ist die cDNA-microarray-Technologie, die über die Analyse exprimierter Gene maligner Tumoren die genetische Charakterisierung der Zellen erlaubt. Als Genexpressionssignatur gilt dabei eine Gruppe von Genen, welche charakteristischerweise entweder von einem bestimmten Zelltyp (z.B. einer B-Zelle) oder aber während einer biologischen zellulären Reaktion (z.B. der zellulären Proliferation) vermehrt exprimiert wird [48; 49; 50]. Speziell Rosenwald et al. konnten diesbezüglich in ihrer Studie erstmals eine für alle MCL charakteristische Genexpressionssignatur nachweisen, mit der es möglich war, auch die Cyclin D1-negativen Tumoren eindeutig den MCL zuzuordnen [46]. Auch konnten sie zeigen, dass v.a. Gene der Proliferationssignatur (wie beispielsweise Ki-67) einen hohen prognostischen Vorhersagewert für den Krankheitsverlauf der MCL liefern. Eine erhöhte Expression dieser Gene wies dabei auf einen prognostisch ungünstigen Verlauf der Erkrankung hin [46]. Fu et al. konnten bei Cyclin D1-negativen Tumoren eine im Vergleich zu Cyclin D1-positiven MCL vermehrte, möglicherweise kompensatorische Expression der Zellzyklusproteine Cyclin D2 und D3 nachweisen [47]. Somit scheinen in dieser Gruppe andere genetische Dysregulationen eine wichtige Rolle zu spielen. Interessanterweise unterschieden sich in beiden Studien die klinischen Verläufe Cyclin

D1-negativer Tumoren nicht von denen klassischer MCL, weshalb sie von beiden Autoren übereinstimmend lediglich als bona fide MCL angesehen wurden [46; 47].

Die Ergebnisse der Zytogenetik sowie der Genexpressionsanalysen lassen somit vermuten, dass Cyclin D1 nicht als alleiniger Schlüssel in der Pathogenese der MCL angesehen werden kann. Eine Translokation t(11;14)(q13;q32) mit entsprechender Cyclin D1-Überexpression findet sich zwar bei der Mehrzahl der Tumoren, muss jedoch nicht zwingend vorliegen. Die weitere genetische Charakterisierung sowie insbesondere die Detektion chromosomaler Imbalancen sind daher von besonderem Interesse.

1.8 Mantelzell-Lymphome - CGH-Arbeiten

Der Nachweis rekurrenter genetischer Aberrationen bei Tumoren der Gruppe der MCL war seit Einführung der CGH bereits mehrfach Gegenstand wissenschaftlicher Studien. Erste genetische Analysen von Monni et al. zeigten hierbei Zugewinne auf den Chromosomen 3q, 8q und 15q sowie Verluste auf den Chromosomen 1p, 6q, 9p, 11q und 13q [51]. Insbesondere die Zugewinne auf Chromosom 3q (minimale Überlappungsregion 3q26-q27) sowie die Verluste auf Chromosom 11q (minimale Überlappungsregion 11q22) fanden sich bei einer Vielzahl der Fälle. So ließen sich erstere bei über der Hälfte, letztere bei rund einem Drittel der Fälle detektieren. Insgesamt war die Mehrzahl der nachgewiesenen Aberrationen bei MCL mit blastoiden Anteilen zu finden [51].

Bea et al. untersuchten im Jahr 1999 ebenfalls Tumoren vom Typ der MCL. Hierbei fanden sich innerhalb des Kollektivs chromosomale Aberrationen als Zugewinne auf den Chromosomen 3q, 7p, 8q, 9q, 12q und 18q. Verluste wurden auf den Chromosomen 1p, 6q, 9p, 10p, 11q, 13 und 17p nachgewiesen. Auch zeigten sich Amplifikationen der Regionen 3q27-q29, 18q23 sowie Xq28 [52]. Analog zur Studie von Monni et al. fand sich der Hauptteil der genetischen Aberrationen dabei bei blastoiden Varianten der MCL, insbesondere die Zugewinne auf den Chromosomen 3q, 7p und 12q sowie die Verluste

auf Chromosom 17p. Darüber hinaus waren Zugewinne auf den Chromosomen 3q und 12q auch mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten assoziiert [52].

Ein Jahr darauf analysierten Bentz et al. 39 Fälle t(11;14)-positiver MCL, wobei sich in 37 Fällen chromosomale Veränderungen nachweisen ließen. Die häufigsten Zugewinne fanden sich auf den Chromosomen 3q, 8q und 18q, die häufigsten Verluste auf den Chromosomen 9p, 11q und 13q. Auch DNA-Amplifikationen wurden in 26 % der Fälle detektiert [53]. Dabei zeigte sich, dass MCL einige gemeinsame, wenn auch insgesamt komplexere Aberrationsmuster mit Tumoren vom Typ der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) aufweisen, wie beispielsweise die Verluste auf den Chromosomen 11q und 13q. Dies könnte auf mögliche Gemeinsamkeiten in der Pathogenese dieser Lymphomentitäten hindeuten [53].

Eine Studie von Martinez-Climent et al. aus dem Jahr 2001 zeigte, dass MCL mit einer leukämischen Zellaussaat gegenüber der rein nodulären Krankheitsmanifestation vermehrt chromosomale Verluste auf Chromosom 8p (minimale Überlappungsregion 8p21-p23) zeigten [54]. Da Amplifikationen des Onkogens MYC an einen derartigen Verlust gekoppelt zu sein schienen, vermuteten die Autoren den Verlust eines bislang unbekanntes Tumorsuppressorgens in dieser Region mit konkomitanter Überexpression von MYC als mögliche Ursache einer leukämischen Manifestation der Erkrankung. Rekurrente Aberrationen fanden sich bei beiden MCL-Gruppen (nodulär und leukämisch) vorwiegend als Zugewinne auf den Chromosomen 3q und 8q sowie Verluste auf den Chromosomen 6q, 11q, 13q und 17p [54].

Allen et al. wiesen innerhalb eines Kollektivs von 30 Tumoren ebenfalls eine Reihe genetischer Alterationen nach. Die häufigsten Zugewinne waren auf den Chromosomen 3q, 6p, 7q, 12p, 12q und 17q, die häufigsten Verluste auf den Chromosomen 1p, 5p, 6q, 8p, 11q und 13q zu finden. Amplifikationen wurden auf Chromosom 3 (minimale Überlappungsregion 3q28-q29) detektiert [55]. Erstmals zeigten sich in dieser Studie auch Verluste der Region 6q25-q26. Insgesamt waren das Vorhandensein mehrerer gleichzeitiger Aberrationen (sog. komplexer Karyotyp) sowie Zugewinne auf Chromosom Xq und Verluste auf Chromosom 17p mit einem schlechten Krankheitsverlauf assoziiert [55].

Mittels Matrix-CGH, einer Weiterentwicklung der konventionellen CGH, konnten Kohlhammer et al. innerhalb eines Kollektivs von 53 Tumoren ebenfalls eine Reihe genetischer Aberrationen für die Gruppe der MCL nachweisen [56]. So fanden sie mit Hilfe dieser weiterentwickelten Methode eine um 50 % höhere Anzahl an genetischen Alterationen im Vergleich zur konventionellen CGH. Insbesondere Zugewinne auf den Chromosomen 11q und 13q (minimale Überlappungsregion 13q34) wurden in dieser Studie erstmals als rekurrent beschrieben [56].

Auch Tagawa et al. wiesen im Jahr 2005 mittels Matrix-CGH chromosomale Aberrationen bei MCL nach. Es fanden sich Zugewinne auf den Chromosomen 3q, 6p, 7p, 8q, 10p und 17q sowie Verluste auf den Chromosomen 1p, 1q, 2p, 2q, 5q, 6q, 7p, 8p, 9p, 9q, 10p, 11q, 13q, 17p, 19p und 22q. Erstmals wurden hier auch Verluste in den Regionen 1p36, 1q42-q43, 2p11, 2q13, 17p13 und 19p13 detektiert [57]. Interessanterweise zeigten sich in den Regionen 2p11 (Ig kappa), 2q13 (BIM) und 9p21-p24 (INK4 alpha/ARF) zudem rekurrente homozygote Verluste. Hierbei wurde v.a. dem Tumorsuppressorgen BIM eine mögliche Rolle in der Tumorgenese der MCL zugeschrieben [57].

Des Weiteren konnten Schraders et al., neben den bereits erwähnten Zugewinnen auf den Chromosomen 3q und 8q sowie den Verlusten auf den Chromosomen 1p, 6q, 11q und 13q, Zugewinne auf Chromosom 4p sowie Verluste auf den Chromosomen 20p, 20q und 22q mittels Matrix-CGH nachweisen [58].

Die hier beschriebenen Arbeiten zeigen, dass sich innerhalb der Gruppe der MCL charakteristische rekurrente genetische Aberrationen mittels CGH nachweisen lassen. Neue Aspekte der Genexpressionsanalysen veranschaulichen, dass sowohl Cyclin D1-positive als auch Cyclin D1-negative Tumoren eindeutig den MCL zuordnen sind. Es scheinen somit auch andere, sekundäre chromosomale Veränderungen für die Pathogenese dieser Tumoren von Bedeutung zu sein. Es liegen jedoch bislang keine Arbeiten vor, die sich gezielt mit genetischen Veränderungen der beiden Subgruppen Cyclin D1-positiver und Cyclin D1-negativer MCL sowie deren Vergleich beschäftigt haben. Insbesondere Cyclin D1-negative Tumoren sind dabei nur in äußerst geringen Fallzahlen analysiert worden. Die Untersuchung eines großen Kollektivs von MCL

mittels CGH unter Berücksichtigung der jeweiligen Cyclin D1-Expression ist daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.9 Grundprinzipien der CGH

Die komparative genomische Hybridisierung („comparative genomic hybridization“; CGH) wurde erstmals 1992 von Kallioniemi beschrieben [59]. Es handelt sich hierbei um eine molekulargenetische Methode, mit der Zugewinne und Verluste von genetischem Material, entsprechend numerischen chromosomalen Aberrationen eines Tumors, durch Vergleich der Tumor-DNA mit DNA aus nicht neoplastischem Gewebe ermittelt werden können. Nach unterschiedlicher Markierung der Normal- und TumordNA und Kohybridisierung auf normale humane Metaphasen können anhand der jeweiligen Signalverhältnisse Gewinne und Verluste von genetischem Material nachgewiesen werden. Nach Untersuchung mehrerer Fälle ergibt sich ein Aberrationsmuster der Tumorentität [60]. Chromosomenabschnitte, die Verluste von genetischem Material aufweisen, können hierbei Hinweise auf die Lokalisation eines in der Pathogenese des jeweiligen Tumors bedeutenden Tumorsuppressorgens geben. Amplifikationen sowie chromosomale Regionen, die einen Zugewinn von genetischem Material aufweisen, können Onkogene beinhalten, die in der Tumorgenese von Bedeutung sind.

Die CGH hat sich als rasche und umfassende genetische Screening-Methode erwiesen, die sowohl an Frisch- als auch an Paraffinmaterial angewendet werden kann. Balancierte chromosomale Veränderungen, wie Inversionen oder auch Translokationen, sind mit der Methode der CGH nicht darstellbar. Limitiert ist die Methode weiterhin durch die Auflösung, die je nach Autor mit 2 bis 10 Mb bei Amplifikationen sowie größer als 10 Mb bei Deletionen angegeben wird. Ausnahme hierbei sind sog. High-level-Amplifikationen, die je nach Amplifikationsgrad auch schon im Bereich von weniger als 1 Mb darstellbar sind [61; 62; 63].

1.10 Fragestellungen

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation bestand in der Charakterisierung chromosomaler Aberrationen von Mantelzell-Lymphomen (MCL) durch komparative genomische Hybridisierung. Zum einen sollte nachgewiesen werden, ob Tumoren vom Typ der MCL, wie andere Neoplasien, rekurrente Zugewinne und Verluste an genetischem Material aufweisen, die Rückschlüsse auf die Pathogenese der Tumoren ermöglichen, zum anderen sollte überprüft werden, ob den beiden Subgruppen (Cyclin D1-positive Tumoren vs. Cyclin D1-negative Tumoren) charakteristische und diese möglicherweise definierende chromosomale Veränderungen zugrunde liegen.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft des untersuchten Materials

Im Rahmen der Dissertation wurde Gewebe von 77 Patienten untersucht. Analysiert wurde die aus Frischmaterial nach dem Standardextraktionsverfahren extrahierte und aufgereinigte Tumor-DNA. Es handelte sich dabei um DNA, die zeitgleich mit mRNA des identischen Gewebematerials isoliert wurde. Die Tumoren wurden in einer von uns unabhängigen Untersuchung der Proben mittels cDNA-microarray- sowie PCR-Technologie bereits ihrem jeweiligen Subtyp (Cyclin D1- positiv vs. Cyclin D1-negativ) zugeordnet [46]. Alle untersuchten Tumoren wurden im Vorfeld der Subtypisierung gemäß der allgemein gültigen WHO-Klassifikation histologisch eingeordnet. Somit lagen uns sowohl der jeweilige Subtyp, die jeweilige histologische Diagnose als auch die klinischen Daten vor.

71 Fälle eines Cyclin D1-positiven MCL sowie 6 Fälle eines Cyclin D1-negativen MCL wurden mittels CGH untersucht. Histologisch handelte es sich im Gesamtkollektiv um 64 Fälle eines klassischen MCL und 13 Fälle einer blastoiden Variante. Alle blastoiden Tumoren fanden sich hierbei in der Gruppe der Cyclin D1-positiven MCL. Insgesamt handelte sich bei allen untersuchten Fällen um unbehandelte Primärtumoren. Das Durchschnittsalter der Patienten belief sich in der Gruppe der Cyclin D1-positiven Tumoren auf 63 Jahre (38-92 Jahre), in der Gruppe der Cyclin D1-negativen Tumoren auf 61 Jahre (54-77 Jahre). Männer stellten einen deutlich höheren Anteil am Untersuchungsgut als Frauen (58 ♂ vs. 19 ♀).

2.2 Bestimmung der Menge an Tumor-DNA

Die Menge Tumor-DNA in der zugesandten Probe wurde semiquantitativ mittels elektrophoretischer Auftrennung im Ethidiumbromid gefärbten 0,8 % Agarosegel durch Vergleich der Tumor-DNA mit einer Probe bekannten DNA-Gehaltes bestimmt.

2.3 RNase-Verdau

Zur Reduktion des Anteils an RNA in den zu untersuchenden Fällen wurde ein RNase-Verdau durchgeführt. Hierbei erfolgte nach elektrophoretischer Feststellung des RNA-Gehaltes der Proben im Ethidiumbromid gefärbten 0,8 % Agarosegel die Zugabe von RNase mit Inkubation der Proben über 2-3 Stunden bei 37 °C im Heizblock. Die zugegebene Menge an RNase sowie die Inkubationszeit wurden jeweils abhängig vom festgestellten RNA-Gehalt gewählt. Nach erneuter elektrophoretischer Kontrolle des Restgehaltes an RNA im Ethidiumbromid gefärbten 0,8 % Agarosegel erfolgte ggf. die Fortsetzung des Verdauens oder jedoch das Wegfrieren der Proben bei -20 °C bis zum Beginn der Nick-Translation.

2.4 Nick-Translation

Um die extrahierte Tumor- und Normal-DNA zu markieren, erfolgte eine sog. Nick-Translation nach dem CGH Protokoll des Lymphoma/ Leukemia Molecular Profiling Project (LLMPP). Hierbei wurde der Nick-Translation-Kit der Firma Vysis (Vysis, Inc., Downers Grove, IL) verwendet.

Die Tumor-DNA wurde mit dUTP SpectrumGreen, die Normal-DNA, gewonnen aus Plazentafrischgewebe, mit SpectrumRed markiert. Für einen Nick-Ansatz von 50 µl (ausreichend für eine Hybridisierung) waren 5 µl Tumor- sowie 5 µl Normal-DNA, 15,5

μl Aqua dest., 10 μl 0,1 mM dNTP mix (Ansatz für 600 μl dNTP mix-Stocklösung: je 200 μl 0,3 mM dATP, dCTP, dGTP), 5 μl 0,1 mM dTTP (Ansatz für 600 μl dTTP-Stocklösung: 200 μl 0,3 mM zu 400 μl Aqua dest.), je 2,5 μl 0,2 mM dUTP SpectrumGreen (Ansatz für 50 μl SpectrumGreen-Stocklösung: 5 μl 1 mM dUTP SpectrumGreen zu 45 μl Aqua dest.) und SpectrumRed (Ansatz für 50 μl SpectrumRed-Stocklösung: 5 μl 1 mM dUTP SpectrumRed zu 45 μl Aqua dest.), 5 μl 10x Nick-Translationspuffer sowie 7 μl Nick-Translationsenzym (DNAse und DNA Polymerase) notwendig. Die Nick-Translation wurde über 30 min im Kühlwasserbad bei 16 °C durchgeführt. Hierbei wurde die Menge des verwendeten Nick-Translationsenzym so gewählt, dass am Ende der Nick-Translation DNA-Fragmente einer Länge zwischen 500 und 1000 Basenpaaren vorlagen. Die Fragmentlänge wurde durch Elektrophorese auf einem Ethidiumbromid gefärbten 0,8 % Agarosegel kontrolliert. Betrug die Länge der Nick-Produkte mehr als 1000 Basenpaare, erfolgte ein von der Fragmentlänge des Nick-Produkts abhängiger Nachverdau. Der Abbruch der Nick-Translation erfolgte durch Erhitzen des Reagenz über 10 min bei 70 °C auf dem Heizblock sowie anschließendes Abkühlen über 5 min bei 0 °C im Eisbehälter. Bei Bedarf erfolgte an dieser Stelle die Unterbrechung des CGH-Protokolls durch Wegfrieren des Nick-Produkts bei -20 °C bis zur Fortführung der Hybridisierung.

2.5 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Pro Hybridisierungsansatz wurden 45 μl mit SpectrumGreen markierte Tumor-DNA sowie 45 μl mit SpectrumRed markierte Normal-DNA benötigt. Ferner wurden pro Hybridisierungsansatz 10 μl Cot-1 DNA (Roche Diagnostics Mannheim) eingesetzt, um ubiquitär vorkommende hochrepetitive DNA-Sequenzen abzudecken. Tumor-DNA, Normal-DNA und Cot-1 DNA wurden gemischt und durch Zugabe von 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 250 μl eisgekühltem 100 % Ethanol über 30 min bei -70 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation über 15 Minuten bei 12000 U/ min und 4 °C wurde der Alkohol abpipettiert und das DNA-Pellet über 15 min bei 37 °C auf dem Heizblock

getrocknet. Anschließend erfolgte die Resuspension der DNA in 7 µl deionisiertem Formamid über 30 min sowie in 7 µl Master Mix über weitere 30 min auf dem Rüttler. Die Hybridisierungsansätze wurden dann für 8 min bei 73 °C auf dem Heizblock denaturiert.

Parallel zur Probenvorbereitung wurden die bei -20 °C aufbewahrten Objektträger mit normalen humanen Metaphasen als Hybridisierungsmatrix (Vysis, Downers Grove, IL, USA) über 2 Stunden schrittweise auf 60 °C erwärmt und dann über 4 min bei 74 °C denaturiert. Die Denaturierungslösung bestand hierbei aus 49 ml deionisiertem Formamid, 7 ml 20x SSC sowie 7 ml Aqua dest. (pH 7,0). Anschließend wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 % und 100 % Ethanol) entwässert und luftgetrocknet. Nach Beschriftung der Objektträger konnten jeweils zwei Proben auf die zuvor mit einem Diamantstift markierten Hybridisierungsfelder aufgetragen werden. Nach Abdeckung mit Deckgläsern und Fixogum wurden die Objektträger über 3 Tage bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Objektträger nach Entfernung des Fixogums und der Deckgläser über je 2 min bei 70 °C im Wasserbad in Waschlösung A (20 ml 20x SSC, 950 ml Aqua dest., 3ml NP-40, pH 7,0) und Waschlösung B (100 ml 20x SSC, 850 ml Aqua dest., 1 ml NP-40, pH 7,0) gewaschen. Zur Färbung der Chromosomenbänderung wurden den Waschlösungen zusätzlich vor Beginn des Waschvorganges je 50 µl 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) zugegeben. Abschließend wurden die Objektträger mit Antifadelösung (Vectashields, Vector Laboratories) eingedeckelt.

2.6 Bildaufnahme und Bildauswertung

Die digitale Bildauswertung wurde mit dem Programm ISIS (MetaSystems, Altlußheim) über ein angeschlossenes Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss Aalen) durchgeführt. Kriterien bei der Beurteilung der Qualität der Hybridisierung waren ein minimaler unspezifisch gefärbter Hintergrund, eine minimale Granularität der

Chromosomen, helle und möglichst homogene Hybridisierungssignale über die gesamten Chromosomen sowie eine adäquate DAPI-Färbung zur Identifikation der Chromosomen [61; 63; 64; 65; 66]. Um DNA-Zugewinne und -Verluste zu bestimmen, wurden, entsprechend dem internationalen Standard, Schwellenwerte des Fluoreszenzverhältnisses festgelegt (obere Schwelle 1,25; untere Schwelle 0,75). High-level-Amplifikationen wurden als solche gewertet, wenn der Wert mehr als 1,5 betrug oder umschriebene chromosomale Banden ein sehr starkes Fluoreszenzsignal aufwiesen. Die Chromosomen 19, 20, 21, 22 und Y wurden nicht mit in die Untersuchung einbezogen, da diese zahlreiche repetitive Sequenzen und somit sehr kleine codierende Regionen aufweisen, welche für die CGH-Analyse als problematisch angesehen werden [67]. Pro Fall wurden zwischen 15 und 30 Metaphasen eingesehen. Die Gesamtheit der in dieser Arbeit mittels CGH detektierten Daten ist im Internet unter www.ncbi.nlm.nih.gov/sky einzusehen.

2.7 Statistische Analysen

Aufgrund der hohen Fallzahl untersuchter Tumoren in dieser Arbeit wurde eine sehr große Anzahl individueller chromosomaler Aberrationen detektiert. Es bestand daher die Gefahr, dass einige dieser Abnormitäten rein zufällig in der einen Gruppe signifikant häufiger erscheinen als in einer anderen. Um diese falsch positiven Ergebnisse auszuschließen, verwendeten wir einen schrittweisen Vertauschungstest [68; 69], welcher nominale p-Werte erzeugt, die zur Klärung und Validierung aufgestellter Hypothesen dienen. Dieser Test zieht die Korrelation der unterschiedlichen chromosomalen Aberrationen mit in Betracht. Signifikante Unterschiede in der Häufigkeit ihres Auftretens wurden mittels eines Chi-Square-Tests aufgedeckt. Ein p-Wert $< 0,05$ galt als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Genetische Alterationen des Gesamtkollektivs der Mantelzell-Lymphome

77 im Vorfeld durch Genexpressionsanalysen und quantitative PCR subtypisierte MCL wurden von uns mittels CGH untersucht. Es handelte sich dabei um 71 Cyclin D1-positive (92 %) sowie 6 Cyclin D1-negative MCL (8 %). Chromosomale Alterationen fanden sich in 70 der untersuchten Fälle (91 %). Es handelte sich dabei um 64 Fälle eines Cyclin D1-positiven sowie 6 Fälle eines Cyclin D1-negativen MCL. 7 Fälle der Cyclin D1-positiven Tumoren zeigten weder chromosomale Zugewinne noch Verluste. Chromosomale Amplifikationen ließen sich im Gesamtkollektiv nicht nachweisen.

3.2 Genetische Alterationen Cyclin D1-positiver Mantelzell-Lymphome

Insgesamt wurden 71 Cyclin D1-positive MCL mittels CGH untersucht. Histologisch handelte es sich um 58 MCL vom klassischen Typ sowie 13 MCL mit blastoiden Anteilen. 64 der untersuchten 71 Fälle (90 %) wiesen chromosomale Zugewinne oder Verluste auf. Bei 7 Fällen ließen sich keine genetischen Veränderungen nachweisen.

Zugewinne fanden sich auf Chromosom 3 (in 23 von 71 Fällen, 32 %; minimale Überlappungsregion 3q21-qter), Chromosom 8 (in 8 von 71 Fällen, 11 %; minimale Überlappungsregion 8q21-qter), Chromosom 15 (in 8 von 71 Fällen, 11 %; minimale Überlappungsregion 15q21-qter) sowie Chromosom 18 (in 8 von 71 Fällen, 11 %; minimale Überlappungsregion 8q11-q23).

Verluste fanden sich auf Chromosom 1 (in 37 von 71 Fällen, 52 %; minimale Überlappungsregion 1p21-p31), Chromosom 6 (in 13 von 71 Fällen, 18 %; minimale Überlappungsregion 6q15-q21; in 16 von 71 Fällen, 22 %; minimale Überlappungsregion 6q22-qter), Chromosom 8 (in 9 von 71 Fällen, 13 %; minimale

Überlappungsregion 8p21-pter), Chromosom 9 (in 13 von 71 Fällen, 18 %; minimale Überlappungsregion 9p21-pter; in 15 von 71 Fällen, 21 %; minimale Überlappungsregion 9q21-qter), Chromosom 13 (in 12 von 71 Fällen, 17 %; minimale Überlappungsregion 13q11-q13; in 29 von 71 Fällen, 41 %; minimale Überlappungsregion 13q14-q34) sowie Chromosom 17 (in 9 von 71 Fällen, 13 %; minimale Überlappungsregion 17p13-pter).

Die folgende Abbildung 1 zeigt die detektierten chromosomalen Imbalanzen der untersuchten Cyclin D1-positiven MCL als Chromosomenideogramm. Eine detaillierte Auflistung der Fälle im Einzelnen sowie der bei ihnen nachgewiesenen Zugewinne und Verluste findet sich im Anhang (s. Tabelle I).

Abbildung 1: Chromosomale Imbalanzen Cyclin D1-positiver MCL (n = 71)

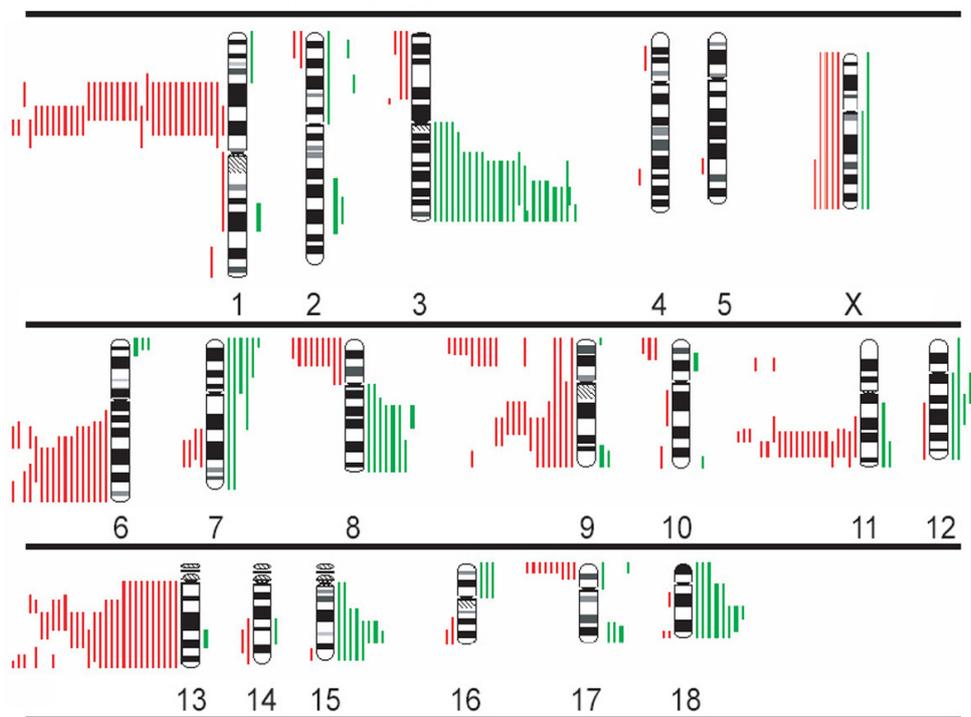


Abbildung 1:

Grüne Linien auf der rechten Seite: Zugewinne von chromosomalem Material

Rote Linien auf der linken Seite: Verluste von chromosomalem Material

3.3 Genetische Alterationen Cyclin D1-negativer Mantelzell-Lymphome

Insgesamt wurden 6 Cyclin D1-negative MCL mittels CGH untersucht. Histologisch handelte es bei allen Fällen um ein MCL vom klassischen Typ. Alle untersuchten Fälle (100 %) wiesen chromosomale Zugewinne oder Verluste auf.

Zugewinne fanden sich auf Chromosom 3 (in 3 von 6 Fällen, 50 %; minimale Überlappungsregion 3q21-qter), Chromosom 8 (in 2 von 6 Fällen, 33 %; minimale Überlappungsregion 8q21-qter) sowie Chromosom 15 (in 2 von 6 Fällen, 33 %; minimale Überlappungsregion 15q21-qter).

Verluste fanden sich auf Chromosom 1 (in 2 von 6 Fällen, 33 %; minimale Überlappungsregion 1p21-p31), Chromosom 8 (in 2 von 6 Fällen, 33 %; minimale Überlappungsregion 8p21-pter), Chromosom 9 (in 2 von 6 Fällen, 33 %; minimale Überlappungsregion 9p21-pter; in 1 von 6 Fällen, 17 %; minimale Überlappungsregion 9q21-qter) sowie Chromosom 13 (in 2 von 6 Fällen, 33 %; minimale Überlappungsregion 13q11-q13; in 4 von 6 Fällen, 67 %; minimale Überlappungsregion 13q14-q34).

Die folgende Abbildung 2 zeigt die detektierten chromosomalen Imbalanzen der untersuchten Cyclin D1-negativen MCL als Chromosomenideogramm. Eine detaillierte Auflistung der Fälle im Einzelnen sowie der bei ihnen nachgewiesenen Zugewinne und Verluste findet sich im Anhang (s. Tabelle II).

Abbildung 2: Chromosomale Imbalanzen Cyclin D1-negativer MCL (n = 6)

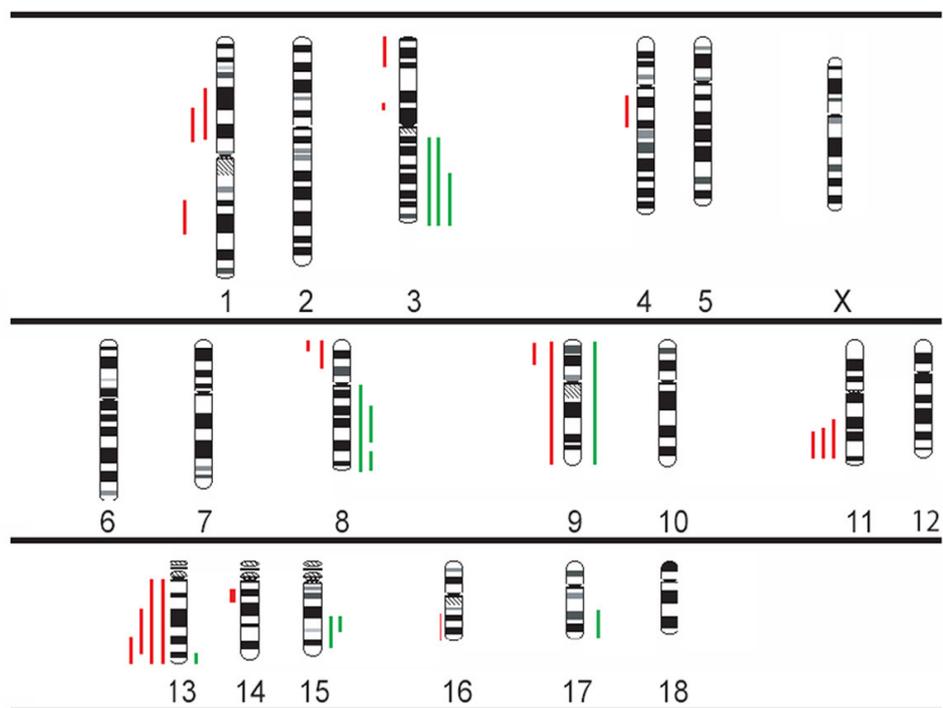


Abbildung 2:

Grüne Linien auf der rechten Seite: Zugewinne von chromosomalem Material

Rote Linien auf der linken Seite: Verluste von chromosomalem Material

3.4 Cyclin D1-positive und Cyclin D1-negative Mantelzell-Lymphome im Vergleich

Vergleicht man die Gruppen der Cyclin D1-positiven und Cyclin D1-negativen MCL bezüglich der bei ihnen detektierten chromosomalen Aberrationen, so zeigt sich, dass beide Gruppen Veränderungen auf den Chromosomen 3q, 11q und 13q in besonderer Häufung aufweisen. Dabei zeigten sich Zugewinne in der Region 3q21-qter in 32 % der Cyclin D1-positiven bzw. 50 % der Cyclin D1-negativen Tumoren. Ein Verlust der Region 11q21-q23 ließ sich in 28 % der Cyclin D1-positiven bzw. 50 % der Cyclin D1-negativen, ein Verlust der Region 13q13-q34 in 41 % der Cyclin D1-positiven bzw. 67 % der Cyclin D1-negativen Tumoren nachweisen. Innerhalb der Gruppe der Cyclin D1-positiven MCL fand sich außerdem ein Verlust auf Chromosom 1p (Region 1p21-p31) in 52 % der Fälle. Aberrationen in dieser Region wurden bei Cyclin D1-negativen Tumoren, wie auch Zugewinne der Regionen 8q21-qter und 15q21-qter sowie Verluste der Regionen 8p21-pter, 9p21-pter und 13q11-q13 bei jeweils einem Drittel der Fälle gefunden. Zugewinne auf Chromosom 8 (Region 8q11-q23) sowie Verluste auf Chromosom 6 (Regionen 6p15-q21 und 6q22-qter) und Chromosom 17 (Region 17p13-pter) zeigten sich ausschließlich innerhalb der Gruppe der Cyclin D1-positiven MCL. Obwohl die Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Cyclin D1-negativen Tumoren gering ist, legen die Ergebnisse die Vermutung nahe, dass beide Varianten in weiten Teilen ein ähnliches, wenn nicht gar dasselbe Profil genetischer Aberrationen aufweisen. Insbesondere die in beiden Gruppen gehäuft detektierten Alterationen auf den Chromosomen 3q, 11q und 13q scheinen dabei diese These zu stützen. Interessant scheint außerdem, dass sich bei blastoiden Formen der MCL, welche lediglich in der Gruppe Cyclin D1-positiver Tumoren vorhanden waren, eine besondere Häufung von Verlusten auf Chromosom 9p (Region 9p21-pter) fand.

Eine zusammenfassende Gegenüberstellung der detektierten Aberrationen von Tumoren der Gruppen Cyclin D1-positiver und Cyclin D1-negativer MCL findet sich in der nachfolgenden Tabelle:

	Cyclin D1-positiv		Cyclin D1-negativ	
	(n = 71)		(n = 6)	
ROI	n		n	
+ 3q21-qter	23	32 %	3	50 %
+ 8q21-qter	8	11 %	2	33 %
+ 15q21-qter	8	11 %	2	33 %
+ 18q11-q23	8	11 %	-	-
- 1p21-p31	37	52 %	2	33 %
- 6p15-q21	13	18 %	-	-
- 6q22-qter	16	22 %	-	-
- 8p21-pter	9	13 %	2	33 %
- 9p21-pter	13	18 %	2	33 %
- 9q21-qter	15	21 %	1	17 %
- 11q21-q23	20	28 %	3	50 %
- 13q11-q13	12	17 %	2	33 %
- 13q14-q34	29	41 %	4	67 %
- 17p13-pter	9	13 %	-	-

Tabelle: Abkürzungen: n = Fallzahl, ROI = Region (region of interest), + = Zugewinn, - = Verlust

4. Diskussion

4.1 Cyclin D1-positive und Cyclin D1-negative Mantelzell-Lymphome zeigen ein nahezu identisches Profil charakteristischer chromosomaler Aberrationen

Seit Einführung der Lymphomklassifikationen im Jahr 1981 durch Karl Lennert hat die morphologische Ähnlichkeit der MCL zu anderen lymphatischen Neoplasien, wie beispielsweise der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL), immer wieder zu Schwierigkeiten in der rein histologischen Diagnostik dieser Tumorentität geführt [2]. Daher spielen mittlerweile neben rein morphologischen auch klinische, immunhistochemische und molekulargenetische Parameter eine wichtige Rolle. MCL sind dabei insbesondere durch die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ gekennzeichnet, welche in der Mehrzahl der Fälle zu einer Überexpression des Zellzyklusproteins Cyclin D1 führt [35; 36]. Auf der anderen Seite zeigten durchgeführte zytogenetische Untersuchungen sowie Genexpressionsanalysen in der Vergangenheit für eine kleine Gruppe von MCL auch ein Fehlen einer derartigen Überexpression (sog. Cyclin D1-negative Tumoren). Diese ließen sich nur über ihr charakteristisches Genexpressionsprofil eindeutig den MCL zuordnen [46; 47]. Interessanterweise fand sich bei diesen Tumoren eine Überexpression der Proteine Cyclin D2 und D3, was möglicherweise auf alternative Pathomechanismen in der Entstehung der MCL hindeuten könnte [47]. Die Analyse sekundärer chromosomaler Aberrationen, insbesondere bei Cyclin D1-negativen MCL, sollte diesbezüglich weitere Erkenntnisse bringen. Auch sollte untersucht werden, ob Cyclin D1-positive und Cyclin D1-negative Tumoren gemeinsame genetische Alterationen aufweisen, die die Zugehörigkeit dieser beiden Gruppen zu ein und derselben Lymphomentität verdeutlichen.

Wie bereits erwähnt hat sich eine Vielzahl von Arbeiten bereits mit der Analyse rekurrenter chromosomaler Aberrationen bei MCL beschäftigt [51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58]. Hierbei erwiesen sich insbesondere Zugewinne auf den Chromosomen 3q, 6p, 7p, 8q, 10p, 12q und 18q sowie Verluste auf den Chromosomen 1p, 6q, 8p, 9p, 9q, 11q und 13q als charakteristisch. Eine gesonderte Untersuchung Cyclin D1-negativer

Tumoren fand sich bislang jedoch in keiner dieser Studien. Wir konnten zeigen, dass Cyclin D1-negative MCL dieselben genetischen Alterationen wie Tumoren mit Überexpression von Cyclin D1 aufweisen. Ähnlich diesen waren die häufigsten detektierten chromosomalen Aberrationen bei Cyclin D1-negativen MCL Zugewinne der chromosomalen Regionen 3q21-qter (50 % der Fälle), 8q21-qter (33 % der Fälle) und 15q21-qter (33 % der Fälle) sowie Verluste der minimalen Überlappingsregionen 1p21-q31 (33 % der Fälle), 8p21-pter (33 % der Fälle), 9p21-pter (33 % der Fälle), 9q21-qter (17 % der Fälle), 11q21-q23 (50 % der Fälle), 13q11-q13 (33 % der Fälle) und 13q14-q34 (67 % der Fälle). Ausschließlich bei Cyclin D1-positiven Tumoren konnten darüber hinaus Zugewinne der chromosomalen Region 18q11-q23 sowie Verluste der Regionen 6q15-q21, 6q22-qter und 17p13-pter detektiert werden. Ob sich diese Aberrationen und damit pathogenetische Unterschiede nur innerhalb dieser Gruppe von MCL finden, oder aber ob ein Fehlen derartiger genetischer Alterationen bei Cyclin D1-negativen Tumoren durch das relativ kleine Kollektiv begründet ist, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht eindeutig klären. Unabhängig davon scheint in unserer Analyse jedoch weiterhin interessant, dass sich bei blastoiden Formen der MCL eine Häufung von Deletionen der chromosomalen Region 9p21-pter fand. Ein derart gehäufte Verlust könnte dabei möglicherweise auf für diese aggressive Variante pathogenetisch bedeutsame Zielgene hinweisen.

Viele der malignen Lymphome sind genetisch durch eine primäre chromosomale Translokation, wie die t(11;14) in MCL [36], die t(14;18) in folliculären Lymphomen [70] oder die t(8;14) in Burkitt-Lymphomen [71], gekennzeichnet. Zusätzlich finden sich bei einer Vielzahl von lymphatischen Tumoren rezurrenente sekundäre Aberrationen, die für die jeweilige Entität charakteristisch sind. So zeigen beispielsweise MCL und B-CLL beide Verluste auf den Chromosomen 11q und 13q [72; 73]. Eine Trisomie 12, wie sie sich bei der B-CLL gehäuft findet, lässt sich hingegen bei den MCL nicht detektieren. Auf der anderen Seite finden sich bei diesen vermehrt Zugewinne auf Chromosom 3q und Verluste auf Chromosom 1p [72; 73]. Als weiteres Beispiel sei die bei Marginalzonen-Lymphomen oftmals nachweisbare Trisomie 3 genannt. Zwar sind Zugewinne auf Chromosom 3q sowohl bei Cyclin D1-positiven als auch Cyclin D1-negativen MCL sehr häufig, eine isolierte Trisomie findet sich jedoch nicht [74; 75].

Zusätzlich zeigen sich bei MCL hingegen Verluste auf den Chromosomen 1p, 11q und 13q, welche für Marginalzonen-Lymphome uncharakteristisch sind [74; 75]. Zugewinne auf Chromosom 3q wurden in Kombination mit Zugewinnen auf Chromosom 12 oder Chromosom 18 bei gastrointestinalen Lymphomen [76] bzw. bei diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen vom aktivierten B-Zelltyp [77] ebenfalls gehäuft detektiert. Dieses Aberrationsmuster erwies sich in unsere Analyse jedoch nicht als typisch für die MCL. Auch folliculäre Lymphome zeigen eine andere Kombination genetischer Veränderungen, wie insbesondere Zugewinne auf den Chromosomen 7, 12, 18 und X [78]. Somit weisen viele der lymphatischen Neoplasien Aberrationsmuster auf, die nur für sie charakteristisch sind und sie als eigenständige Entität gegenüber anderen Lymphomen abgrenzen.

Die nahezu identischen Profile sekundärer chromosomaler Aberrationen bei Cyclin D1-positiven und Cyclin D1-negativen MCL stützen daher die Auffassung, dass es sich bei beiden um Tumoren der gleichen biologischen Entität handelt und beide ähnliche molekularpathogenetische Mechanismen aufweisen.

4.2 Chromosomale Imbalanzen und mögliche Zielgene bei Cyclin D1-positiven und Cyclin D1-negativen Mantelzell-Lymphomen

Wie bereits erwähnt zeigten Cyclin D1-positive und Cyclin D1-negative MCL in unserer Analyse eine Reihe rekurrenter genetischer Aberrationen. So ließen sich Zugewinne der minimalen Überlappingsregionen 3q21-qter, 8q21-qter und 15q21-qter sowie Verluste der minimalen Überlappingsregionen 1p21-p31, 8p21-pter, 9p21-pter, 9q21-qter, 11q21-q23, 13q11-q13, 13q14-q34 und 17p13-pter bei beiden Gruppen nachweisen. Hierbei waren es v.a. die Verluste auf den Chromosomen 1p (52 % vs. 33 %), 11q (28 % vs. 50 %) und 13q (41 % vs. 67 %), die sich in besonderer Häufigkeit fanden. Verschiedene Untersuchungen an malignen Tumoren, wie beispielsweise diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen [77], Mamma-Karzinomen [79] oder

Tumoren der Prostata [80], haben dabei gezeigt, dass oftmals eine Beziehung zwischen numerischer chromosomaler Aberration und fehlerhafter Genexpression besteht.

Die chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32), welche sich bei der Mehrzahl der MCL detektieren lässt, führt, wie bereits erwähnt, zu einer Überexpression von Cyclin D1, einem Kontrollprotein des Zellzyklus (sog. Cyclin D1-positive Tumoren) [35; 36]. Cyclin D1 bildet dabei mit CDK4, einer Cyclin-abhängigen Kinase, einen Komplex, der zur Phosphorylierung und somit Inaktivierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) führt [81]. Resultat dieser Inaktivierung ist eine vermehrte Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F mit unkontrollierter Transkription regulatorischer Gensequenzen, Übertritt der Zelle von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus und folglich abnormer Proliferation [82]. Die Cyclin D1/ CDK4-Kinaseaktivität ist dabei u.a. direkt abhängig von p15 und p16, zwei Kinase-Inhibitoren [83]. In seiner komplexen Gesamtheit wird diese Kaskade daher als sog. Cyclin D1/p16-pRb-Signaltransduktionsweg bezeichnet. Sowohl eine Überexpression von Cyclin D1 oder CDK4 als auch Verluste von Rb oder p16 (INK4alpha) sind somit für ein unkontrolliertes Wachstum von zentraler Bedeutung [41].

Lokus des p16 (INK4alpha) ist die chromosomale Region 9p21, deren Verlust bei 21 % der Cyclin D1-positiven sowie 17 % der Cyclin D1-negativen MCL detektiert wurde. Für einen Verlust von p16 (INK4alpha) wurden in der Vergangenheit bereits mehrfach Assoziationen zu aggressiven bzw. blastoiden Varianten der MCL [84; 85] sowie zu einem schlechten klinischen Verlauf nachgewiesen [46; 52; 56]. Auch in unserer Analyse fanden sich Verluste von 9p21-pter gehäuft bei blastoiden Formen der MCL. Lokus des Rb ist hingegen die chromosomale Region 13q14. Verluste zeigten sich diesbezüglich in unserem Kollektiv sogar in bis zu 41 % bzw. 67 % der Fälle. Die Studienergebnisse bezüglich einer fehlerhaften Expression von Rb sowie deren pathogenetischer Bedeutung sind dabei insgesamt jedoch widersprüchlich. So sehen sie einige Autoren als mögliches Ergebnis chromosomaler Aberration, andere eher als Folge von Störungen des Cyclin D1/p16-pRb-Regelkreises [52; 86; 87]. Es scheint jedoch übereinstimmend kein Zweifel daran zu bestehen, dass neben Rb auch andere Gene, insbesondere distal der Region 13q14, die Tumorentwicklung beeinflussen. Beispielhaft seien hier die Gene DBM, ein ebenfalls auf dem langen Arm von

Chromosom 13 gelegenes Tumorsuppressorgen [88], sowie ING1, ein Regulatorgen der Zellproliferation (Wachstumsinhibitor), genannt [58]. Dabei konnte v.a. für eine Inaktivierung des ING1 (Lokus 13q34) gezeigt werden, dass es als potenter Stimulus für neoplastisches Wachstum wirken kann [89].

Darüber hinaus scheint das Protein p53, welches via Hemmung von p21 (WAF1), Inhibitor einer Cyclin-abhängigen Kinase, zu einem Arrest des Zellzyklus führt und somit DNA-Reparaturmechanismen ermöglicht, von besonderer Bedeutung zu sein [90; 91]. So könnten Verluste von p53 und p21(WAF1) u.a. in einer Persistenz genetischer Schäden und damit autonomem Zellwachstum resultieren. Während Verluste von p53 (Lokus 17p13) eine zentrale Rolle in der Genese einer Vielzahl von lymphatischen Tumoren zu spielen scheinen [92; 93; 94; 95], ließen sich genetische Alterationen von p21(WAF1) (Lokus 6p21) bislang nur in wenigen Studien nachweisen [96]. Im Falle eines vorhandenen Expressionsverlustes wurden jedoch sowohl für p21 (WAF1) als auch für p53 Assoziationen zu aggressiven Formen der MCL mit schlechtem klinischen Verlauf nachgewiesen [45; 91; 96]. Wie bereits erwähnt fanden sich chromosomale Verluste der Region 17p13 schon häufig bei Tumoren vom Typ der MCL. In unserer Analyse zeigten ausschließlich Cyclin D1-positive Tumoren (13 % der Fälle) eine derartige Aberration. Verluste der für p21 (WAF1) kodierenden Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 fanden sich in unserer Studie hingegen nicht.

Ein Verlust der Region 11q21-q23 wurde bei 28 % der Cyclin D1-positiven sowie 50 % der Cyclin D1-negativen MCL nachgewiesen. Diese Detektion ist von besonderem Interesse, da ein weiteres Gen, das sog. ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated Gene), ein für ein Regulatorprotein des p53 kodierendes Gen [97; 98], in dieser Region lokalisiert ist. So könnte bei einem ATM-Verlust beispielsweise die p53-abhängige Induktion der Apoptose gestört und autonomes Wachstum die Folge sein. Tatsächlich konnte diesbezüglich bei Ataxie-Patienten mit einem ATM-Gendefekt bereits ein vermehrtes Auftreten lymphatischer Tumoren der B- und T-Zellreihe beobachtet werden [99; 100]. Bei MCL konnte in der Vergangenheit ebenfalls ein derartiger Defekt nachgewiesen werden [101]. Auch wurde neben den Verlusten der Region 11q21-23 die vermehrte Assoziation eines ATM-Verlustes mit anderen chromosomalen Aberrationen, wie

beispielsweise Zugewinnen auf Chromosom 3q, für MCL gezeigt [98]. Eine Korrelation zum klinischen Verlauf der Erkrankung fand sich bislang jedoch nicht [97; 98].

Für die bereits oben erwähnte Cyclin-abhängige Kinase CDK 4, für MDM 2, ein Stabilisatorprotein des p53, sowie für BMI-1, einen Inhibitor des INK4alpha/ARF-Lokus, ließen sich in früheren Studien bereits Amplifikationen bei Tumoren vom Typ der MCL nachweisen [42; 44]. Chromosomale Aberrationen der zugehörigen Regionen auf Chromosom 12 bzw. Chromosom 10 ließen sich in unserer Arbeit jedoch nicht detektieren. Auch ein vermehrter Verlust der chromosomalen Region 2q13, Locus des Tumorsuppressorgens BIM, einem Mitglied der Bcl-2-Familie, zeigte sich im Gegensatz zu früheren Studien [57] nicht. Möglicherweise ist somit die Dysregulation von Genen nicht allein durch strukturelle, d.h. chromosomale Veränderungen erklärbar. Bcl-6 (LAZ3), ein für einen Transkriptionsfaktor kodierendes und vorwiegend während der Keimzentrumsreaktion exprimiertes Gen auf Chromosom 3 (Lokus 3q27), ist ebenfalls bereits bei einer Vielzahl lymphatischer Tumoren als mögliches Schlüsselgen in der Pathogenese beschrieben worden [102; 103]. So könnte eine fehlerhafte Expression von Bcl-6 beispielsweise eine unkontrollierte Aktivierung nachgeschalteter Gensequenzen mit neoplastischem Wachstum zur Folge haben [102; 103]. Zwar fanden sich in unserer Studie gehäuft Zugewinne dieser chromosomalen Region (32 % der Cyclin D1-positiven MCL, 50 % der Cyclin D1-negativen MCL), jedoch konnte erst kürzlich gezeigt werden, das Bcl-6 bei Tumoren vom Typ der MCL nicht vermehrt exprimiert wird. Es scheint daher nach derzeitigem Kenntnisstand für diese nur von untergeordneter pathogenetischer Bedeutung zu sein [52]. Die weitere Analyse dieser gehäuft detektierten Region bezüglich evtl. überexprimierter Zielgene ist daher, wie auch eine Untersuchung der Region 1p21-p31, für die ebenfalls noch kein eindeutiger Hinweis auf mögliche bedeutsame Zielstrukturen vorliegt und deren Verlust sich bei bis zu 52 % der Cyclin D1-positiven sowie 33 % der Cyclin D1-negativen MCL fand, zukünftig von besonderem Interesse.

5. Zusammenfassung

Mantelzell-Lymphome (MCL) gehören mit einem Anteil von ca. 5-10 % der B-Zellneoplasien zu den aggressiven lymphatischen Tumoren und sind, neben der histologisch-morphologischen und klinischen Präsentation, in der überwiegenden Anzahl der Fälle durch die Expression der Oberflächenmarker CD5 und Cyclin D1 sowie durch ein Fehlen Keimzentrums-assoziiierter Antigene, wie insbesondere CD23, gekennzeichnet. Zudem lässt sich meist eine chromosomale Translokation t(11;14) nachweisen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die genetische Charakterisierung dieser Gruppe von Tumoren sowie die Detektion vorhandener chromosomaler Imbalancen.

In unserer Analyse wurden dabei 77 MCL mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) untersucht. Die Tumoren waren im Vorfeld der Arbeit mittels cDNA-microarray-basierter Genexpressionsanalyse sowie zytogenetischen Methoden in sog. Cyclin D1-positive MCL (71 Fälle) sowie Cyclin D1-negative MCL (6 Fälle) eingeteilt worden. Weiterhin enthielt das untersuchte Kollektiv einige histologisch als blastoide Varianten des MCL klassifizierte Tumoren (13 Fälle).

Innerhalb der Gruppe der Cyclin D1-positiven MCL ließen sich bei 90 % der Tumoren genetische Aberrationen nachweisen. Insbesondere Zugewinne auf Chromosom 3 (minimale Überlappungsregion 3q21-qter) wurden in 32 % der Fälle, Verluste auf Chromosomen 11 (minimale Überlappungsregion 11q21-q23) in 28 % der Fälle und Verluste auf Chromosom 13 (minimale Überlappungsregion 13q14-q34) in 41 % der Fälle detektiert. Außerdem fand sich ein Verlust auf Chromosom 1 (minimale Überlappungsregion 1p21-p31) in bis zu 52 % der Fälle.

Demgegenüber zeigten Cyclin D1-negative MCL in 100 % der untersuchten Fälle genetische Veränderungen. Auch hier ließen sich die Zugewinne der bereits oben erwähnten Region auf Chromosom 3 sowie die Verluste der Regionen auf Chromosom 11 und Chromosom 13 analog den Cyclin D1-positiven Tumoren in besonderer Häufung nachweisen (50 % vs. 50 % vs. 67 %). Aberrationen der minimalen Überlappungsregionen 1p21-31 wurden in 33 % der Fälle detektiert.

Sowohl Cyclin D1-positive als auch Cyclin D1-negative MCL wiesen darüber hinaus, wengleich in geringerer Häufigkeit, eine Reihe zusätzlicher gemeinsamer

chromosomaler Veränderungen auf, wie beispielsweise Zugewinne der minimalen Überlappungsregionen 8q21-qter und 15q21-qter (jeweils 11 % vs. 33 %) oder Verluste der minimalen Überlappungsregionen 8p21-pter (13 % vs. 33 %), 9p21-pter (18 % vs. 33 %) und 13q11-q13 (17 % vs. 33 %). Zugewinne der minimalen Überlappungsregion 8q11-q23 sowie Verluste der minimalen Überlappungsregionen 6p15-q21, 6q22-qter und 17p13-pter fanden sich ausschließlich innerhalb der Gruppe der Cyclin D1-positiven MCL. Blastoide Varianten der MCL zeigten gegenüber der klassischen Form zudem gehäuft Verluste der minimalen Überlappungsregion 9p21-pter.

Die durchgeführten Untersuchungen machen somit deutlich, dass sowohl Cyclin D1-positive als auch Cyclin D1-negative MCL eine Vielzahl identischer rekurrenter chromosomaler Aberrationen aufweisen. Dies festigt die Auffassung, dass es sich bei den zwei MCL-Subgruppen um Tumoren der gleichen Entität handelt und beide, unabhängig von einer eventuellen Cyclin D1-Überexpression, eine Reihe pathogenetischer Gemeinsamkeiten aufweisen.

6. Literaturangaben

1. HANAHAN D, WEINBERG RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
2. JAFFE ES, HARRIS NL, STEIN H, VARDIMAN JW ET AL: World Health Organization classification of tumors: Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press 2001
3. KIPPS TJ: The CD5 B cell. *Adv Immunol* 1989, 47: 117-185
4. INGHIRAMI G, FOITL DR, SABICHI A, ZHU BY, KNOWLES DM: Autoantibody-associated cross-reactive idiotype-bearing human B lymphocytes: distribution and characterization, including VH gene and CD5 antigen expression. *Blood* 1991; 78: 1503-1515
5. MCHEYZER-WILLIAMS L, DRIVER D, MCHEYZER-WILLIAMS L M: Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 52-59
6. LIU YJ, ZHANG J, LANE PJ, CHAN EY, MACLENNAN IC: Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T-cell-dependent and T-cell-independent antigens. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2951-2962
7. MACLENNAN IC: Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 117-139
8. LENNERT K: Morphology and classification of malignant lymphomas and so-called reticuloses. *Acta Neuropathol Suppl (Berl)* 1975; Suppl 6: 1-16
9. LENNERT K: *Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome (nach der Kiel-Klassifikation)*. Springer-Verlag, Berlin, 1981

10. LENNERT K: Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome (nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation). Springer-Verlag, Berlin, 1990
11. PROJECT, T.N.-H.s.L.P.C.: National Cancer Institute sponsored study of classifications of Non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982; 49: 2112-2135
12. HARRIS NL, JAFFE ES, STEIN H, BANKS PM, CHAN JKC, CLEARY ML, DELSOL G, DE WOLF-PEETERS C, FALINI B, GATTER KC ET AL: A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994; 84: 1361
13. FELLER A, DIEBOLD J: Histopathology of nodal and extranodal Non-Hodgkin's lymphomas. Based on the WHO classification. Springer-Verlag Berlin 2004, PA 75-99
14. THE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA CLASSIFICATION PROJECT: A clinical evaluation of the international lymphoma study group classification of Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 89: 3909-3918
15. CARBONE P, KAPLAN H, MUSSHOF K, SMITHERS D, TUBIANA M: Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* 1971; 31: 1860-1861
16. LISTER TA, CROWTHER D, SUTCLIFFE SB, GLATSTEIN E, CANELLOS GP, YOUNG RC, ROSENBERG SA, COLTMAN CA, TURBIANA M: Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1630-1636

17. BOSCH F, LOPEZ-GUILLERMO A, CAMPO E, RIBERA J, CONDE E, PIRIS M, VALLESPI T ET AL: Mantle cell lymphoma: Presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 1998; 82: 567-575
18. WAITS TM, GRECO FA, GREER JP, JOHNSON DH, WOLFF SN ET AL: Effective therapy for poor-prognosis Non-Hodgkin's lymphoma with 8 weeks of high-dose-intensity combination chemotherapy. *J Clin Oncol* 1993; 11: 943-949
19. DENARDO GL, LAMBORN KR, DENARDO SJ, GOLDSTEIN DS, DOLBER-SMITH EG ET AL: Prognostic factors for radioimmunotherapy in patients with B-lymphocytic malignancies. *Cancer Res* 1995; 55: 5893-5898
20. THE INTERNATIONAL NON-HODGKIN'S LYMPHOMA PROGNOSTIC FACTORS PROJECT: A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329, 987-994
21. SHIPP M: Prognostic factors in aggressive Non-Hodgkin's lymphoma: Who has "high-risk" disease? *Blood* 1994; 83:1165-73
22. ARGATOFF L, CONNORS J, KLASA R, HORSMAN D, GASCOYNE R: Mantle cell lymphoma: A clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 1997; 89: 2067-2078
23. DUGGAN M, WEISENBURGER D, YE Y, BAST M, PIERSON J, LINDER J, ARMITAGE J: Mantle zone lymphoma: A clinicopathologic study of 22 cases. *Cancer* 1990; 66: 522-529
24. KNOWLES D: Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. In Knowles D Ed. *Neoplastic Hematopathology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; PA 93-226

25. CHANG K, ARBER D, WEISS L: CD20: A review. *Appl Immunohistochem* 1996; 4: 1-14
26. MASON D, CORDELL J, BROWN M ET AL: CD79a: A novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood* 1995; 86: 1453-1459
27. SWERDLOW S, HABESHAW J, MURRAY L, DHALIWAL H, LISTER T, STANSFELD A: Centrocytic lymphoma: A distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse. *Am J Pathol* 1983; 113: 181-197
28. ZUCCA E, STEIN H, COFFIER B: European Lymphoma Task Force (ELFT): Report of the workshop on mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 1994; 5: 507-511
29. ZUKERBERG L, MEDEIROS L, FERRY J, HARRIS: Diffuse low-grade B-cell lymphomas. Four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 373-385
30. KAPTAIN S, ZUKERBERG L, FERRY J, HARRIS N: Bcl-1 Cyclin D1+ CD5-mantle cell lymphoma. *Mod Pathol* 1998; 11: 133
31. CAMPO E, RAFFELD M, JAFFE E: Mantle cell lymphoma. *Semin Hematol* 1999; 36: 115-127
32. UTZ G, SWERDLOW S: Distinction of follicular hyperplasia from follicular lymphoma in B5-fixed tissues: Comparison of MT2 and Bcl-2 antibodies. *Hum Pathol* 1993; 24: 1155-1158

33. ZUKERBERG L, YANG W, ARNOLD A, HARRIS N: Cyclin D1 expression in Non-Hodgkin's Lymphomas. Detection by immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 756-760
34. DE BOER C, SCHUURING E, DREEF E, PETERS G, BARTEK J, KLUIN P, VAN KRIEKEN J: Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Blood* 1995; 86: 2715-2723
35. VANDENBERGHE E, WOLF-PETERS C, VAN DEN OORD J, WLODARSKA I ET AL: Translocation (11;14): A cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle centre cell lineage. *J Pathol* 1991; 163: 13-18
36. BOSCH F, JARES P, CAMPO E ET AL: PRAD1/ Cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: A highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994; 84: 2726-2732
37. DORFMAN D, PINKUS G: Distinction between small lymphocytic and mantle cell lymphoma by immunoreactivity for CD23. *Mod Pathol* 1994; 7: 326-331
38. KUMAR S, GREEN G, TERUYA-FELDSTEIN J, RAFFELD M, JAFFE E: Use of CD23 on paraffin sections in the diagnosis of small lymphocytic lymphoma and mantle cell lymphoma. *Mod Pathol* 1996; 9: 925-929
39. YATABE Y, SUZUKI R, TOBINAI K, MATSUNO Y ET AL: Significance of the cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: A clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* 2000; 95: 2253-2261

40. FERNANDEZ V, HARTMANN E, OTT G, CAMPO E ET AL: Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: All oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6364-6369
41. DREYLING M, BULLINGER L, OTT G, STILGENBAUER S, MUELLER-HERMELINK HK, BENTZ M ET AL: Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 1997; 57: 4608-4614
42. BEA S, TORT F, PINYOL M, PUIG X, HERNANDEZ L, HERNANDEZ S, FERNANDEZ P ET AL: BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 2001; 61: 2409-2412
43. SCHAFFNER C, IDIER I, STILGENBAUER S, DOEHNER H, LICHTER P: Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2773-2778
44. 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* 2005; 65: 2199-2206
45. HERNANDEZ L, FEST T, CAZORIA M, TERUYA-FELDSTEIN J, BOSCH F, PEINADO M ET AL: P53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1996; 87: 3351-3359
46. 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* 2003; 3: 185-197

47. FU K, WEISENBURGER D, GREINER T, DAVE S, WRIGHT G ET AL: Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: A clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 2005; 106: 4315-4321
48. SCHENA M, SHALON D, DAVIS RW, BROWN PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complimentary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470
49. DE RISI J, PENLAND L, BROWN P, BITTNER M, MELTZER P ET AL: Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet* 1996; 14: 457-460
50. GOLUB T, SLONIM D, TAMAYO P, HUARD C, GAASENBEEK M, MESIROV J ET AL: Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 229: 531-537
51. MONNI O, OINONEN R, ELONEN E, FRANSSILA K, TEERENHOVI L ET AL: Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 298-307
52. BEA S, RIBAS M, HERNANDEZ J, BOSCH F, PINYOL M, HERNANDEZ L ET AL: Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999; 93: 4365-4374
53. BENTZ M, PLESCH A, BULLINGER L, STILGENBAUER S, OTT G, ET AL: t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27: 285-294

54. MARTINEZ-CLIMENT J, VIZCARRA E, SANCHEZ D, BLESÁ D, MARUGAN I, BENET I ET AL: Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 2001; 98: 3479-3482
55. ALLEN J, HOUGH R, GOEPEL J, BOTTOMLEY S, WILSON G ET AL: Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol* 2002; 116: 291-298
56. KOHLHAMMER H, SCHWAENEN C, WESSENDORF S, HOLZMANN K, KESTLER H, KIENLE D ET AL: Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 2004; 104: 795-801
57. TAGAWA H, KARNAN S, SUZUKI R, MATSUO K ET AL: Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: Identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 2005; 24: 1348-1358
58. SCHRADERS M, PFUNDT R, STRAATMAN H, JANSSEN I ET AL: Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* 2005; 105: 1686-1693
59. KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN F, PINKEL D: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821
60. PETERSEN I, PETERSEN S, BOCKMÜHL U, SCHWENDEL A, WOLF G, DIETEL M: Comparative Genomische Hybridisierung an Bronchialkarzinomen und ihrer Metastasen. *Verh Dtsch Ges Path* 1997; 81: 297-305

61. KALLIONIEMI OP, KALLIONIEMI A, PIPER J, ISOLA J, WALDMAN FM, GRAY JW, PINKEL D: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1994; 10: 231-243
62. FOROZAN F, KARHU R, KONONEN J, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP: Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 1997; 13: 405-409
63. JAMES L: Comparative genomic hybridization as a tool in tumor cytogenetics. *J Pathol* 1999; 187: 385-395
64. LICHTER P, BENTZ M, DU MANOIR S, JOOS S: Comparative genomic hybridization. *Human chromosomes: Principles and techniques*, Ed. 2. Herausgegeben von RS Verma, A Baba. New York, McGraw-Hill 1995: 191-210
65. NACHEVA EP, GRACE CD, BITTNER M, LEDBETTER DH, JENKINS RB, GREEN AR: Comparative genomic hybridization: A comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 100: 93-105
66. WEISS MM, HERMSEN MAJA, MEIJER NCT, VAN GRIEKEN, BAAK JPA, KUIPERS EJ, VAN DIEST PJ: Comparative genomic hybridization. *J Clin Pathol: Molec Pathol* 1999; 52: 243-251
67. DU MANOIR S, SCHROCK E, BENTZ M, SPEICHER MR, JOOS S, RIED T, LICHTER P, CREMER T: Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; 19: 27-41
68. WESTPHAL PH, YOUNG SS: *Resampling-based multiple testing*. New York, Ny: Wiley; 1993

69. SIMON RM, KORN EL MCSHANE LM, RADMACHER MD, WRIGHT GW, ZHAO Y: Design and analysis of cDNA microarray investigations. New York, Ny; Springer-Verlag 2003
70. TSUJIMOTO Y, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE CM: Involvement of the Bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228: 1440-1443
71. DAVE S, FU K, WRIGHT G, LAM L, KLUIN P, BOERMA E, GREINER T, WEISENBURGER D ET AL: Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Eng J Med* 2006; 354: 2431-2442
72. BENTZ M, HUCK K, DU M ET AL: Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 1995; 85: 3610-3618
73. BEA S, LOPEZ-GUILLERMO A, RIBAS M ET AL: Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol* 2002; 161: 957-968
74. 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* 1997; 11: 747-758
75. HERNANDEZ J, GARCIA J, GUTIERREZ N ET AL: Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol* 2001; 158: 1843-1850
76. BARTH T, DOHNER H, WERNER C ET AL: Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. *Blood* 1998; 91: 4321-4330

77. 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* 2005; 106: 3183-3190
78. VIARDOT A, MOELLER P, HOGEL J, WERNER K, MECHTERSHEIMER G ET AL: Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4523-4530
79. HYMAN E, KAURANIEMI P, HAUTANIEMI S, WOLF M, MOUSSES S, ROZENBLUM E ET AL: Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 6240-6245
80. PHILIPPS J, HAYWARD S, WANG Y ET AL: The consequences of chromosomal aneuploidy on gene expression profiles in a cell line model for prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 8143-8149
81. DOWDY S, HINDS P, LOUIE K, REED S, ARNOLD A, WEINBERG R: Physical interaction of the retinoblastoma protein with human cyclins. *Cell* 1993; 73: 499-511
82. NEVINS J: E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992; 258: 424-429
83. KAMB A, GRUIS N, WEAVER F, LIU Q, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S, STOCKERT E ET AL: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440
84. PINYOL M, FRANCESC C, BEA S, JARES P, NAYACH I, FERNANDEZ P ET AL: P16 INK4a gene inactivation by deletions, mutations, and

hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of Non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998; 91: 2977-2984

85. PINYOL M, HERNANDEZ L, CAZORLA M, BALBIN M, JARES P, FERNANDEZ P ET AL: Deletions and loss of expression of p16 INK4a and p21 Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1997; 89: 272-280
86. STILGENBAUER S, NICKOLENKO J, WILHELM J, WOLF S, WEITZ S, DOEHNER K, BOEHM T ET AL: Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphatic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene* 1998; 16: 1891-1897
87. JARES P, CAMPO E, PINYOL M, BOSCH F, MIQUEL R, FERNANDEZ P ET AL: Expression of retinoblastoma gene product (pRb) in mantle cell lymphomas. Correlation with cyclin D1 (PRAD/ CCND1) mRNA levels and proliferative activity. *Am J Pathol* 1996; 148: 1591-1600
88. BROWN A, ROSS F, DUNNE E, STEEL C, WEIR-THOMPSON E: Evidence for a new tumor suppressor locus (DBM) in human B-cell neoplasia telomeric to the retinoblastoma gene. *Nat Genet* 1993; 3: 67-72
89. GARKAVTSEV I, KAZAROV A, GUDKOV A, RIABOWOL K: Suppression of the novel growth inhibitor p33 ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 1996; 14: 415-420
90. XIONG Y, HANNON G, ZHANG H, CASSO D, KOBAYASHI R, BEACH D: P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-704

91. EL-DEIRY W, TOKINO T, VELCULESCU V, LEVY D, PARSONS R, TRENT J ET AL: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-825
92. LO COCO F, GAIDANO G, LOUIE D, OFFIT K, CHAGANTI R, DALLA-FAVERA R: P53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993; 82: 2289-2295
93. SANDER C, YANO T, CLARK H, HARRIS C, LONGO D ET AL: P53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993; 82: 1994-2004
94. MARTINEZ-CLIMENT J, ALIZADEH A, SEGRAVES, BLES A D, RUBIO-MOSCARDO F, ALBERTSON D ET AL: Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 2003; 101: 3109-3117
95. STAROSTIK P, GREINER A, SCHULTZ A, ZETTL A, PETERS K, ROSENWALD A, KOLVE M, MUELLER-HERMELINK H: Genetic aberrations common in gastric high-grade large B-cell lymphoma. *Blood* 2000; 95: 1180-1187
96. SHIOHARA M, EL-DEIRY W, WADA M, NAKAMAKI T, TAKEUCHI S, YANG R, CHEN D ET AL: Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 1994; 84: 3781
97. GREINER T, DASGUPTA C, HO V, WEISENBURGER D, SMITH L, LYNCH J 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* 2006; 103: 2352-2357

98. CARMACHO L, HERNANDEZ L, HERNANDEZ S ET AL: ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 2002; 99: 238-244
99. STOPPA-LYONNET D, SOULIER J, LAUGE A, DASTOT H, GARAND R ET AL: Inactivation of the ATM gene in T-cell prolymphocytic leukemias. *Blood* 1998; 91: 3920-3926
100. BULLRICH F, RASIO D, KITADA S, STAROSTIK P, KIPPS T, KEATING M ET AL: ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1999; 59: 24-27
101. MONNI O, ZHU Y, FRANSSILA K, OINONEN R, HOEGLUND P, ELONEN E, JOENSUU H, KNUUTILA S: Molecular characterization of deletion at 11q22.1-q23.3 in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 1999; 104: 665-671
102. YE B, RAO P, CHAGANTI R, DALLA-FAVERA R ET AL: Cloning of bcl-6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2732-2735
103. KERCKAERT J, DEWEINDT C, TILLY H, QUIEF S, LEQOQ G, BASTARD C ETAL: LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nat Genet* 1993; 5: 66-70

7. Abkürzungen

ampl	Amplifikation (amplification)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
CGH	Komparative Genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization)
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
del	Deletion (deletion)
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleoid acid)
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP mix	Desoxynucleotidtriphosphat-Mix
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
Ig	Immunglobulin
Mb	Megabasen
MCL	Mantelzell-Lymphom (mantle cell lymphoma)
min	Minute
mM	Millimolar
mmol	Millimol
NP-40	Tergitol (Type NP-40)
REAL	Revised European American Lymphoma Classification
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleoid acid)
RNAse	Ribonuclease
SSC	Natriumzitat (sodiumchloride sodium citrate)
U	Umdrehungen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

8. Anhang

Tabelle I Analyierte Fälle der Cyclin D1-positiven MCL mit
Zugewinnen/ Verlusten

Tabelle II Analyierte Fälle der Cyclin D1-negativen MCL mit
Zugewinnen/ Verlusten

Abbildung I Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Cyclin D1-
positiven MCL

Abbildung II Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Cyclin D1-
negativen MCL

Tabelle I: Zugewinne und Verluste innerhalb der Gruppe Cyclin D1-positiver Mantelzell-Lymphome (n = 71)

Fall	Zugewinne	Verluste
781	2q31-q32, 18q21	9p22-pter, 13q14-q21, 13q33-qter, 16q21-qter
829	9p24-pter, 15q23-q24, 17p13-pter	1p22-p31, 8p21-pter, 13q21-q33
868	-	1p21-p22
881	Xq	1p21-p31, 6q22-qter, 9p22-pter, 11q22, 13q14-qter, 14q22-qter
885	1pter-p32	10pter-p13, 11q21-q23, 13q
916	3q22-qter, 7p, 11q13-qter, 18	1p13-p21, 5q31, 9p21-pter, 9q34
918	7, X	1p21, 9q21-q22, 13q14, 13q32-qter, 17p13-pter
920	3q22-q25, 3q26, 3q27-qter	-
921	2q23-q33	1p13-p31, 9, 13q14-q21
922	15q	1p21-p31, 7q22-q32
924	-	-
928	2p23-p24	1p22-p32
930	2p14-p16, 2p22	11q22-q23, 13q, 14q22-31, 17p12-pter
933	3q26-qter, 6p23-pter, 18	3p24-pter, 10p13-pter, 13q14-qter, 16q23-qter
936	-	-
937	-	-
938	-	1p21-p31, 11q22-q23
939	8q21, 17p	13q21-q22
940	7p22-pter, 15q22-qter	1p21-p31, 6q16-q21, 6q23-qter, 11q23, 13q22-qter
941	9q34-qter	1p21-p31
942	10q26-qter, 11q23-qter, 18q21-q22	8p21-pter, 9p21-pter, 9q22-q32, 18q23-qter
943	3q25-qter, 8q21-qter	1p21-p31, 6q15-qter, 8p21-pter, 11q21-q22, 17p13-pter
952	-	1p21-p22, 1cen-q31, 6q22-qter, 11q21-q23, 13q
953	-	-
954	3q22-qter	6q21-qter, 8p21-pter, 11q22-q23, 13q21-q31, X
956	2p	1p22-p31, 9p21-pter
957	-	1p22-p31, 6q22-qter
958	3q22-qter, 8q13-qter	6q21-qter, 13q13-q21, 15q26-qter
959	15q21-qter	1p13-p22, 17p13-pter
962	-	-
963	3q13-qter, 8q21-qter, 17q23-qter	1p21-p31, 8p, 9p23-pter, 10q25-qter, 11q22-q23, 17p12-pter
964	-	1p22-p31, 13q
965	-	1p21-p22, 6q21-q24, 9q21-q22
966	3q25-qter	-
968	6p24-pter	1p21-p31, 6q24-qter, 11q14-q23
970	15q	-
972	16p	1p22-p31, 4p14-p15, 8p21-pter, 9, 12q15-qter, 13q

Fall	Zugewinne	Verluste
974	2p15-p16, 3q, 18	1p22-p31, 2p22-pter, 3p14-pter, 6q15-qter
975	-	1p21-p31, 11q21-q22, 13q21-q22
977	15q21-qter, 17q24-qter	1p21-p22, 9p21-pter
979	16p	6q16-qter
980	-	1p21
981	-	6q16-qter, 9q22-q32, 13q
982	13q22-q31	17p12-pter, 13q34-qter
983	-	1p22-p31, 10p14-pter, 11q22-q23
987	7p, 7cen-q21, 18q	6q15-q21, 8p
988	3q21-qter	-
989	3q22-qter, 18q21-qter	9q, 13q33-qter, X
1012	-	1p21-p22, 13q, 14q24-q31
1028	-	1p31, 6q16-qter, 9p21-pter, 11q22-q23, 13q
1029	-	7q31-q32, 9, 13q13-q14, 17p12-pter
1072	8q21-qter	1p21-p22, 11q23
1091	3q21-qter	6q16-q21, 6q25-qter, 7q31-q32, 11q22-q23
1092	3q21-qter	-
1111	3q	1p22-p31, 3p14-pter, 17p13-pter
1114	3q23-q27, 3q28-qter, 7, 8q	1p21-p31, 8p21-pter
1115	-	1p21-p22, 9q22-qter
1117	3q	1p21-p22, Xq23-qter
1118	3q25-qter, 7p14-pter	11q21-q22, 17p13-pter
1121	3q27-qter	13q14-qter
1126	-	1p22-p31, 11p14
1133	8q23-qter, 14q22-q24	1p21-p22, 4q31, 11q22-q23, X
1166	3q26-qter, 6p24-pter	1p21-p22, 3p13, 6q13-qter, 9p21-pter, 9q21-q22
1169	-	-
1171	-	-
1172	3q21-qter	13q21-q31
1176	1q25-q31, 10p12-p13, 8q, 15q22-q24, 17q23-qter	1p21-p31, 1q14-qter, 2p23-pter, 8p22-pter, 9p22-pter, 10q21-q22, 13q33-qter, 17p13-pter, 18q12, 18q23-qter
1178	-	-
1179	15q22-q24, 16p, 18q	6q21-qter, 11q23-qter, 13q
1180	3q21-q26	11p14, 11q14-q22, 13q21-q31
1194	3q	11q22-q23, 13q21-qter

Tabelle II: Zugewinne und Verluste innerhalb der Gruppe Cyclin D1-negativer Mantelzell-Lymphome (n = 6)

Fall	Zugewinne	Verluste
950	3q13-qter, 8q	8p23-pter, 9, 13q
991	3q24-qter	11q22-q23
1265	8q21-q22, 8q24-qter, 13q33-qter, 15q22-q23	1p21-p31, 8p21-pter, 9p21-pter, 13q21-q32
2559	-	1p21-p22, 1q24-q31, 3p13, 3p21-pter, 11q21-q23
18330	3q13-qter, 15q22-q25, 17q22-qter	4q13-q22, 11q14-q23, 13q31-qter, 14q12-q13
18592	9cen-pter, 9cen-qter	13cen-qter

Abbildung I: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Cyclin D1-positiven Mantelzell-Lymphoms



Abbildung I:

Die Abbildung zeigt den Fall SLN 1118 eines Cyclin D1-positiven MCL. Man erkennt die beschriebenen chromosomalen Aberrationen (Pfeile) an der verstärkten Grünfärbung bei Zugewinn bzw. durch verstärkte Rotfärbung bei Verlust. Die in diesem Fall erkennbaren Zugewinne auf den Chromosomen 3 (minimale Überlappungsregion 3q25-qter) und 7 (minimale Überlappungsregion 7p14-pter) sowie die Verluste auf den Chromosomen 11 (minimale Überlappungsregion 11q21-q22) und 17 (minimale Überlappungsregion 17p13-pter) sind dabei für Tumoren vom Typ der MCL besonders charakteristisch.

Abbildung II: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Cyclin D1-negativen Mantelzell-Lymphoms

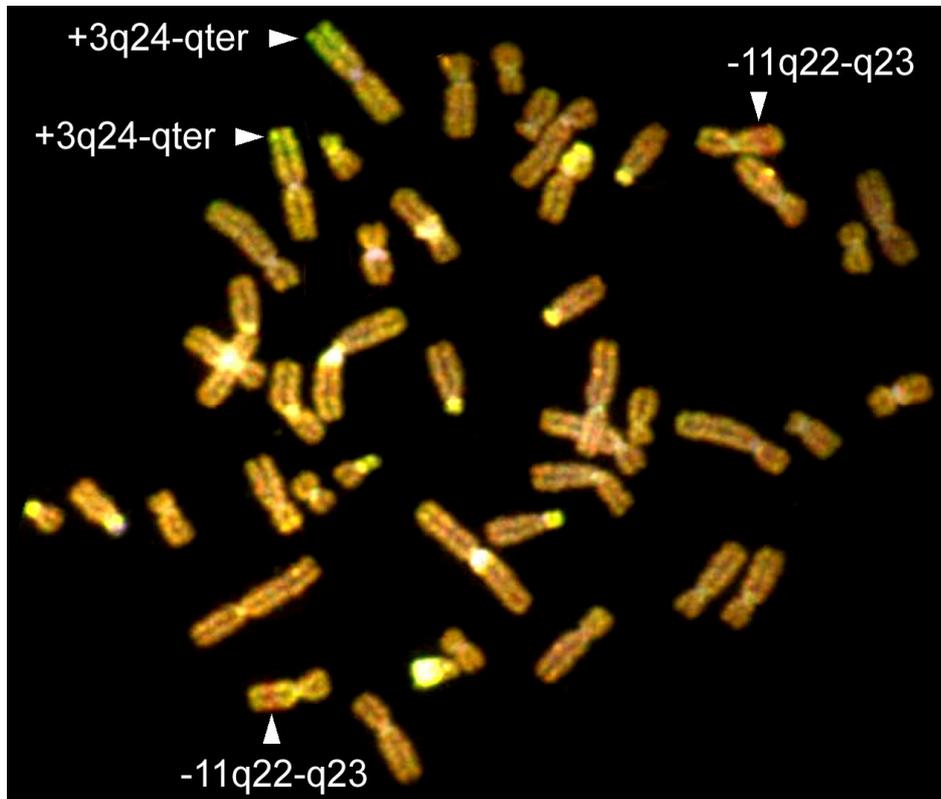


Abbildung II:

Die Abbildung zeigt den Fall SLN 991 eines Cyclin D1-negativen MCL. Man erkennt die beschriebenen chromosomalen Aberrationen (Pfeile) an der verstärkten Grünfärbung bei Zugewinn bzw. durch verstärkte Rotfärbung bei Verlust. Die in diesem Fall erkennbaren Zugewinne auf Chromosom 3 (minimale Überlappungsregion 3q24-qter) sowie die Verluste auf Chromosom 11 (minimale Überlappungsregion 11q22-q23) sind dabei für Tumoren vom Typ der MCL besonders charakteristisch.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Hans-Konrad Müller-Hermelink, Direktor des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg, für die Überlassung des Themas sowie seine tatkräftige Unterstützung während der Durchführung meiner Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Andreas Zettl, der mich anfangs sowohl in die Methodik des experimentellen Arbeitens im Labor einführte als auch später bei der Niederschrift der Dissertation tatkräftig unterstützte. Er war mir stets eine große Hilfe, die oftmals sicherlich weit über das übliche Maß hinausging.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich für ihren Rückhalt und die Möglichkeit, mein Studium in der schönen Stadt Würzburg absolvieren zu dürfen. Sie standen mir während meiner gesamten Studienzeit stets zur Seite und gaben mir Kraft, die vielfältigen Aufgaben zu bewältigen.

Außerdem danke ich allen Freunden und Studienkollegen, die mich auf meinem langen Weg begleitet und mit mir so manche unvergessliche Stunde verbracht haben.

Lebenslauf

Am 26. März 1977 wurde ich als viertes Kind der Eheleute Dr. med. Eckhard und Ingrid Jehn, geborene Haas, in Braunschweig geboren. Nach dem Besuch der Grundschule sowie der Orientierungsstufe in Bückeburg wechselte ich 1989 auf das Gymnasium Adolfinum, wo ich 1996 das Abitur ablegte.

In der Zeit von Juli 1996 bis Juni 1998 absolvierte ich anfangs im Rahmen der allgemeinen Wehrpflicht, später im Verhältnis eines Soldaten auf Zeit (SaZ) eine zweijährige Ausbildung im Sanitätsdienst der Bundeswehr.

Zum Wintersemester 1998/ 1999 nahm ich mein Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf. Nach der Ärztlichen Vorprüfung im August 2000 legte ich im August 2001 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, im August 2003 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Die Ausbildung im Praktischen Jahr absolvierte ich in der Abteilung für Chirurgie des Juliusspitals Würzburg, sowie der Medizinischen Poliklinik und dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg und legte im Oktober 2004 den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit Erhalt der Approbation in Würzburg ab.

Im Anschluss an das Studium der Humanmedizin begann ich zum Wintersemester 2004/ 2005 das Zweitstudium der Zahnmedizin, welches für die Ausbildung zum Facharzt für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie unabdingbare Voraussetzung ist. Nach erfolgreicher Absolvierung des vorklinischen und klinischen Studienabschnitts legte ich im Zeitraum Februar bis April 2008 die Zahnärztliche Prüfung mit Erhalt der Approbation ab.

Die medizinische Dissertation beendete ich im Juni 2007 am Pathologischen Institut der Universität Würzburg. Im Juli 2008 schloss ich, ebenfalls am Pathologischen Institut, die Arbeit an der zahnmedizinischen Dissertation ab.

Würzburg, im Juli 2008

Dr. med. Philipp Jehn