

**Aus dem Institut für Pathologie**

**der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Müller-Hermelink**

**„Analyse struktureller und numerischer chromosomaler Aberrationen peripherer  
T-Zell-Lymphome (PTCL NOS) und Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphome  
(EATCL) mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung“**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

Thorsten Eichler

aus Vechta

**Würzburg, Februar 2007**

# Referenten

**Referent:** Prof. Dr. German Ott

**Koreferent:** Prof. Dr. Hans Konrad Müller-Hermelink

**Dekan:** Prof. Dr. Georg Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung :** 29.6.2007

**Der Promovend ist Arzt**

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Material und Methoden .....	5
2.1	Herkunft des Untersuchungsguts .....	5
2.2	Materialpräparation .....	7
2.2.1	Frischmaterial .....	7
2.2.2	Tissue Tek .....	8
2.2.3	Austropfen der Zellen auf dem Objektträger .....	9
2.3	FISH .....	9
2.3.1	Grundlage der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH).....	9
2.3.2	Locusspezifische Sonden der Firma Vysis/Abott .....	13
2.3.3	Nicht-kommerzielle Sonden .....	15
2.3.3.1	YAC-, PAC- und BAC-Sonden .....	15
2.3.3.2	Markierung der Sonden (YAC, PAC, BAC) .....	17
2.3.3.3	Sondenpräparation (YAC, PAC, BAC) .....	17
2.3.3.4	Materialvorbereitung .....	18
2.3.3.5	Hybridisierung .....	18
2.3.3.6	Detektion .....	18
2.4	Notwendige Chemikalien und Lösungen .....	19
2.5	Ansätze für verwendete Medien, Puffer und Lösungen .....	20
2.6	Auswertung .....	22
3	Ergebnisse.....	23
3.1	PTCL NOS .....	23

3.1.1	Deletionen .....	23
3.1.2	Zugewinne .....	24
3.1.3.	Diploide PTCL NOS .....	28
3.1.4	Tetraploide PTCL NOS .....	29
3.1.5	Vergleich der diploiden und tetraploiden PTCL NOS .....	30
3.1.5.1	<i>TP53</i> .....	31
3.1.5.2	5q .....	31
3.1.5.3	7q35/36 .....	32
3.2	EATCL .....	33
3.2.1	Verluste .....	33
3.2.2	Zugewinne .....	33
3.2.3.	Diploide EATCL .....	36
3.2.4	Tetraploide EATCL .....	36
3.2.5	Vergleich der diploiden und tetraploiden EATCL .....	36
3.3.	Vergleich der PTCL NOS und EATCL .....	37
4	Diskussion .....	40
4.1	Übersicht über die genetischen Daten von PTCL NOS in der Literatur .....	40
4.2	Übersicht über die genetischen Daten von EATCL in der Literatur .....	42
4.3	9q34 .....	42
4.4	Chromosom 5 .....	44
4.5	<i>TP53</i> .....	45
4.6	<i>D13S25</i> .....	48
4.7	6q21 .....	49
4.8	1ptel .....	50

4.9	7q35/36 .....	50
4.10	12q21 .....	51
4.11	<i>ATM</i> .....	51
4.12	22q11 .....	52
5	Zusammenfassung .....	54
6	Literaturverzeichnis .....	56

## 1.) Einleitung

T-Zell-Lymphome sind maligne lymphoproliferative Neoplasien überwiegend reifer oder postthymischer T-Zellen. Die Inzidenz von T-Zell-Lymphomen beträgt in Europa etwa 1/100.000 pro Jahr. In Europa und Nordamerika machen sie 10-15% der Non-Hodgkin-Lymphome aus <sup>1</sup>. Interessanterweise liegt der Anteil der T-Zell-Lymphome in Asien und in der Karibik deutlich höher <sup>1,2</sup>. In einer Studie von Rüdiger et al. (2002) wurden Daten aus acht Zentren weltweit ausgewertet, wobei die Prozentsätze von 1,5 in Vancouver bis 18,3 in Hongkong variierten <sup>2</sup>. Dieses wird einerseits durch eine geringere Anzahl von B-Zell-Lymphomen in diesen Ländern erklärt. Andererseits scheint in der Pathogenese der T-Zell-Lymphome das Retrovirus HTVL-1, das in Teilen Japans endemisch ist und auch in der Karibik gehäuft auftritt, eine Rolle zu spielen <sup>3</sup>. Es gibt Hinweise, dass auch die Rassenzugehörigkeit ein Risikofaktor sein könnte <sup>1</sup>. Die Inzidenz der T-Zell-Lymphome hat sich nach WHO-Statistiken in den letzten Jahren nicht wesentlich verändert.

Die T-Zell Neoplasien werden nach der aktuellen WHO Klassifikation in Vorläufer T-Zell Neoplasien und reife T-Zell und NK-Zell Neoplasien unterteilt (Tabelle 1).

**Tabelle 1: WHO Klassifikation der T-Zell und NK-Zell Neoplasien <sup>4</sup>**

T-ZELL und NK-ZELL NEOPLASIEN	
Vorläufer T-Zell Neoplasien	Reife T-Zell und NK-Zell Neoplasien
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Vorläufer T-Zell-lymphoblastische Leukämie/Lymphome</li> <li>-Blastisches NK-Zell-Lymphom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Peripheres T-Zell-Lymphom, unspezifiziert</li> <li>-Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom</li> <li>-T-Zell-prolymphozytische Leukämie</li> <li>-T-Zell-großzellige granuläre lymphatische Leukämie</li> <li>-Aggressive NK-Zell-Leukämie</li> <li>-Adulte T-Zell Leukämie/Lymphom</li> <li>-Extranodales NK/T-Zell-Lymphom vom nasalen Typ</li> <li>-Hepatosplenisches T-Zell-Lymphom</li> <li>-Subkutanes Pannikulitis-ähnliches T-Zell-Lymphom</li> <li>-Mucosis fungoides</li> <li>-Sézary-Syndrom</li> <li>-Primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom</li> <li>-Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom</li> <li>-Anaplastisches großzelliges Lymphom</li> <li>-Lymphomatoide Papulose</li> </ul>

Die größte Untergruppe der T-Zell-Neoplasien bilden die peripheren T-Zell-Lymphome, nicht weiter spezifiziert (PTCL NOS). Ihr Anteil an allen peripheren T-Zell-Lymphomen wird mit 31%-50% angegeben <sup>1,2,5</sup>. Sie sind eine heterogene Gruppe vorwiegend nodaler peripherer T-Zell Neoplasien, die in fortgeschrittenen Stadien oft Knochenmark, Leber, Milz und Haut infiltrieren und zu den aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen mit einer 5 Jahres-Überlebensrate von 20-41% gehören <sup>5,6</sup>.

Im Vergleich zu den PTCL NOS sind die Enteropathie-assoziierten T-Zell-Lymphome (EATCL) deutlich seltener. Wie die PTCL NOS gehören sie zu den aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen. Sie machen weniger als 1% der peripheren T-Zell-Lymphome aus. Isaacson und Wright beschrieben sie erstmals 1978 <sup>7</sup>. Enteropathie-assoziierte T-Zell-Lymphome sind extranodale T-Zell-Lymphome, die gewöhnlich im Jejunum oder Ileum vorkommen <sup>8</sup>. Allerdings ist auch ein Auftreten im Duodenum, Magen, Kolon und außerhalb des Gastrointestinaltraktes beschrieben worden. Pathogenetisch wird eine Assoziation mit der Zöliakie beschrieben <sup>9</sup>. Die Prognose ist schlecht. Die meisten Patienten versterben innerhalb weniger Monate nach Diagnose. Die 1-Jahres-Überlebensrate beträgt lediglich 30-40%, die 5 Jahres-Überlebensrate 20% und das krankheitsfreie Überleben nur 3% <sup>10,11</sup>. Dies liegt zum einen daran, daß die Diagnose oft erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium beziehungsweise im Zusammenhang mit einer Perforation des Darms gestellt wird, die durch die resultierende Peritonitis selbst bereits häufig schon zum Tod führt <sup>12</sup>. Zudem befinden sich die Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose oft bereits in deutlich reduziertem Allgemeinzustand <sup>12</sup>. Auch kann die Diagnose durch die Histologie alleine schwierig sein, da die Tumoren ein großes Spektrum von zytomorphologischen Erscheinungsformen aufweisen <sup>8,12</sup>.

Während man bei den häufiger vorkommenden B-Zell-Lymphomen sehr umfangreiche genetische Untersuchungen durchgeführt hat, stehen bislang Daten für die selteneren T-Zell-Lymphome nur in geringem Umfang zur Verfügung. Bei den B-Zell-Lymphomen konnten dabei verschiedene für einzelne Entitäten charakteristische primäre und sekundäre Aberrationen beschrieben werden. Für die T-Zell-Lymphome sind solche Befunde derzeit noch sehr rar.

Primäre Aberrationen sind für eine Entität charakteristische genetische Veränderungen. Sie spielen für die Entstehung des Tumors eine notwendige Rolle als *conditio sine qua*

non<sup>13</sup>. Bei B-Zell-Lymphomen konnten beispielsweise folgende primäre Aberrationen gezeigt werden:

So findet sich die Translokation  $t(14;18)(q32;q21)$  in 70-95% bei follikulären B-Zell-Lymphomen sowie in 20-30% bei diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBL)<sup>14</sup>. Durch diese Translokation gelangt das *BCL2*-Gen auf Chromosom 18 in Bande 18q21 unter den Einfluß des J-Segment des IGH (Immunglobulinschwerkettenlokus), eines Locus in Bande q32 des langen Arms von Chromosom 14<sup>14</sup>. Dadurch gerät die Regulation der Expression des *BCL2*-Gen unter die Kontrolle der Enhancer der IGH-Region. Diese sorgen für eine konstante und permanente Expression. Das entstandene Fusionsgen wird somit unphysiologischerweise transkribiert und überexprimiert. In der Folge bindet das im Überschuß in den Zellen vorhandene BCL2-Protein an die innere Mitochondrienmembran und blockiert dort die Apoptose, wobei der exakte Mechanismus bislang unklar ist<sup>14</sup>.

Eine weitere für B-Zell-Lymphome beschriebene charakteristische Aberration ist die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$  in niedrig malignen MALT-Lymphomen<sup>15</sup>. Dabei kommt das *MALT1*-Gen auf Chromosom 18 Bande 18q21 unter den Einfluß des *API2*-Gens auf 11q21<sup>16-18</sup>. Das Fusionsgen *API2/MALT1* wird überexprimiert und inhibiert durch eine Aktivierung von NFκB die Apoptose<sup>16,18,19</sup>.

Sekundäre Aberrationen kommen in Zellen vor, die bereits eine primäre Aberration aufweisen. Man spricht ihnen eine Assoziation mit der Tumorprogression zu. In fortgeschrittenen Stadien können sie sehr zahlreich sein und den Karyotyp dominieren<sup>13</sup>. Im Gegensatz zu den primären Veränderungen sind sie zumeist nicht spezifisch für ein Malignom, kommen jedoch in Abhängigkeit von der primären Aberration und dem Tumortyp auch gehäuft vor. Sie führen oft zu biologischen Vorteilen gegenüber unveränderten Zellen, wie Chemotherapieresistenz oder Metastasierung bei Mutationen von Tumorsuppressorgen *TP53*<sup>20-25</sup>. In diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBL) finden sich Deletionen von *TP53* in 17-22%<sup>14</sup>. *TP53* ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen beeinflusst, die am Arrest des Zellzyklus oder der Apoptose nach Einwirkung von Noxen beteiligt sind. Aberrationen, die *TP53* betreffen, sind oft mit einer Tumorprogression assoziiert. Zudem sind die

Tumoren klinisch aggressiver und sprechen schlechter auf gängige Chemotherapeutika an<sup>20,21,26-30</sup>.

Bei T-Zell-Lymphomen sind bislang nur wenige charakteristische klonale Aberrationen bekannt. Brido-Babapulle et al. beschrieben bei den T-Zell-prolymphozytischen Leukämien (T-PLL) eine Inversion auf dem Chromosom 14<sup>31</sup>. In einer CGH-Studie Enteropathie-assoziiierter T-Zell-Lymphome fanden Zettl et al. „high level“ Amplifikationen der Bande 9q34<sup>32</sup>. Für die Gruppe der hepatosplenischen T-Zell-Lymphome wurde ein Isochromosom 7q nachgewiesen<sup>33</sup>. Kumaravel et al. zeigten für Angioimmunoblastische Lymphome Trisomien der Chromosomen 3 und 5<sup>34</sup>. Bei den anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphomen wurde die Translokation t(2;5)(p23;q35) von Rimokh et al. als spezifisch beschrieben<sup>35</sup>.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, ein Screening möglicher numerischer und struktureller Aberrationen maligner T-Zell-Lymphome in der FISH-Technik durchzuführen. Neben in B-Zell-Lymphomen bekannten Regionen, wie 6q21 und 11q22/23 (*ATM*), und bereits für T-Zell-Lymphome beschriebenen Loci wie *DI3S25*, *TP53*, 1ptel, 7q35/36, 12q21, wurden weitere in CGH-Profilen auffällige Chromosomenregionen (5q21, 5q31, 9q34, 22q11) berücksichtigt<sup>32,36-41</sup>. Insbesondere wurden die daraus resultierenden genetischen Profile von PTCL NOS und EATCL gegenübergestellt. Die resultierenden Charakteristika ermöglichen neue Einblicke in die Entstehung und Entwicklung dieser lymphatischen Neoplasien und könnten so neue Therapieansätze aufzeigen.

## 2.) Material und Methoden

### 2.1. Herkunft des Untersuchungsguts

Die untersuchten Fälle stammen aus dem Routineeingangsmaterial des Instituts für Pathologie/Referenzzentrums für Lymphknotendiagnostik der Universität Würzburg aus den Jahren 1986-2002. Die histopathologischen Diagnosen wurden anhand von gefärbten Paraffinschnitten (Hämatoxylin-Eosin, Giemsa, PAS und der Silberfärbung nach Gomori) gestellt. Die immunhistochemische Analyse erfolgte nach Standardprotokollen<sup>42</sup>. Dabei wurden die Marker CD2 (Verdünnung 1:20, Novocastra, Newcastle, UK), CD3 (1:400; DAKO, Kopenhagen, Dänemark), CD4 (1:10, Novocastra), CD5 (1:20, Novocastra), CD7 (1:40, Novocastra), CD8 (1:30, DAKO), CD20 (1:200, DAKO), CD30 (1:80, DAKO), CD56 (1:200, Sanbio, Uden, Niederlande),  $\beta$ F1 (1:10, T-Cell Sciences, Woburn, MA), EMA (1:100, DAKO) und TIA 1 (1:800, Coulter, Hialeah, FL) gefärbt.

Die Klassifikation der untersuchten Lymphome erfolgte nach den Kriterien der aktuellen WHO-Klassifikation (Tabelle 1). Aus der Gruppe der nodalen T-Zell-Lymphome wurden 30 Periphere T-Zell-Lymphome nicht weiter spezifiziert (PTCL NOS = Peripheral T-cell Lymphoma not otherwise specified, ICD-O code 9702/3) und von den extranodalen 9 Intestinale T-Zell-Lymphome (ETL = enteropathy-type T-cell Lymphoma, auch EATCL = enteropathie-assoziierte T-Zell-Lymphome, ICD-O code 9717/3) untersucht. Alter, Geschlecht der Patienten und Lokalisation sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Das untersuchte Material stammt aus unterschiedlichen Lokalisationen. Bei den PTCL NOS waren dies: Lymphknoten inguinal in sieben Fällen, axillär in vier, zervikal in drei und paraaortal in einem Fall. In sechs Fällen war es nicht möglich, die Lokalisation des Lymphknotens nachzuvollziehen, da diese in den Akten nicht vermerkt war. Extranodale Lokalisationen waren in drei Fällen die Tonsillen, in je zwei die Haut, Thoraxwand und Milz.

Von den 30 Patienten mit PTCL NOS waren 20 Männer und 10 Frauen. Das Alter bei Entnahme des Untersuchungsmaterials betrug im Durchschnitt 58 Jahre (11-80). Bei den EATCL stammten vier Fälle aus dem Dünndarm, drei aus dem Magen und zwei aus

**Tabelle 2: Diagnose, Alter der Patienten bei Diagnose, Materialart und Lokalisation der 39 untersuchten PTCL NOS und EATCL**

Fall-Nummer	Diagnose	Geschlecht	Alter	Untersuchtes Gewebe	Haupttumormasse
1	PTCL NOS	männlich	45	Lymphknoten	Kieferwinkel
2	PTCL NOS	männlich	71	Lymphknoten	Leiste, Axilla
3	PTCL NOS	weiblich	74	Blut	Milz
4	PTCL NOS	männlich	64	Lymphknoten	Axilla
5	PTCL NOS	männlich	60	Lymphknoten	Leiste
6	PTCL NOS	weiblich	61	Thoraxwand	Thoraxwand
7	PTCL NOS	weiblich	54	Lymphknoten	?
8	PTCL NOS	männlich	63	Lymphknoten	Leiste, Hals
9	PTCL NOS	männlich	74	Blut	Tonsille
10	PTCL NOS	weiblich	59	Lymphknoten	Hals
11	PTCL NOS	männlich	39	Lymphknoten	?
12	PTCL NOS	männlich	65	Lymphknoten	?
13	PTCL NOS	weiblich	79	Lymphknoten	Axilla
14	PTCL NOS	männlich	60	Lymphknoten	?
15	PTCL NOS	männlich	68	Lymphknoten	Leiste
16	PTCL NOS	männlich	11	Lymphknoten	Leiste
17	PTCL NOS	männlich	42	Lymphknoten	Axilla
18	PTCL NOS	weiblich	62	Tonsille	Tonsille
19	PTCL NOS	männlich	53	Lymphknoten	Leiste
20	PTCL NOS	weiblich	61	Lymphknoten	paraaortal
21	PTCL NOS	weiblich	73	Blut	Haut
22	PTCL NOS	weiblich	51	Blut	Axilla
23	PTCL NOS	männlich	55	Lymphknoten	?
24	PTCL NOS	männlich	63	Lymphknoten	Leiste
25	PTCL NOS	männlich	59	Lymphknoten	?
26	PTCL NOS	männlich	80	Thoraxwand	Thoraxwand
27	PTCL NOS	männlich	66	Lymphknoten	Hals
28	PTCL NOS	männlich	59	Milz	Milz
29	PTCL NOS	weiblich	44	Tonsille	Tonsille
30	PTCL NOS	männlich	66	Haut	Haut
31	EATCL line	weiblich	73	Lymphknoten der Magenwand	Magen
32	EATCL	männlich	75	Lymphknoten	Omentum majus
33	EATCL	männlich	66	Aszites	Duodenum
34	EATCL	männlich	73	Blut	Dünndarm, Dickdarm
35	EATCL	weiblich	53	Dünndarm	Dünndarm
36	EATCL line	weiblich	40	Lymphknoten der Magenwand	Magen, Dickdarm, Netz
37	EATCL (Rezidiv)	männlich	34	Lymphknoten	Dünndarm
38	EATCL	männlich	61	Magen	Magen
39	EATCL	weiblich	66	Lymphknoten	Netz

dem Omentum majus. Es waren vier Frauen und fünf Männer betroffen mit einem durchschnittlichen Alter von 54 Jahren (34-75).

## 2.2. Materialpräparation

### 2.2.1. Frischmaterial

In 21 von 39 Fällen (54%) lag Frischmaterial vor, z.B. in Form eines inguinalen Lymphknotens. Dieser wurde in RPMI-1640-Medium, dem fetales Kälberserum und Gentamycin zugegeben wurden, zerteilt und steril durch ein Polyestergazernetz mit 100 µm Porengröße in eine Petrischale disaggregiert. Das Exprimat wurde anschliessend 10 min bei 1500 Umdrehungen pro Minute (Upm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit RPMI/Gentamycin resuspendiert. Nach Bestimmung der Zelldichte in einer Zählkammer wurde entsprechend abzentrifugiert oder RMPI 1640 Medium, Kälberserum und Gentamycin hinzugefügt, bis die Zellzahl etwa  $2 \times 10^7 / \mu\text{l}$  betrug. In einer Kulturflasche wurden 10 ml der Zellkultur bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 7,5% im Brutschrank inkubiert. In einem Teil der Fälle wurde noch ein Stimulanz hinzugefügt (Tabelle 3). Die Stimulation erfolgte mit folgenden Substanzen:

- PHA: Phytohämagglutinin (200 µl/10 ml Zellsuspension)
- IL-2: Interleukin2 (10 µl/10 ml Zellsuspension)

**Tabelle 3: Präparation und verwendete Stimulantien des Frischmaterials (n=21)**

Präparation, Stimulanz	Anzahl der Fälle
Direkt	5
Direkt und 24 Stunden-Abbruch	8
PHA	5
PHA und direkt	1
PHA und IL-2	2

Die stimulierten Kulturen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die unstimulierten inkubiert, jedoch für mindestens 3-5 Tage.

Von jedem Fall wurde je eine Kulturflasche zur Direktpräparation verwandt. Bei den unstimulierten Zellsuspensionen wurde zudem noch ein 24h-Abbruch durchgeführt. Der Abbruch erfolgte bei den stimulierten Zellkulturen mit 100 µl Colcemid bei 37 °C im Brutschrank über 30 min. Den unstimulierten wurden 200 µl Colcemid hinzugefügt und 20 min im Brutschrank inkubiert. Colcemid enthält das Colchizin. Es arretiert durch Zerstörung des Spindelapparates die Zellen in der Metaphase.

Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 1000 Upm wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 37 °C warmer 0,075 molarer KCl-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. In der hypotonen Lösung strömt Wasser entsprechend des osmotischen Gradienten in die Zellen und führt zum Platzen der Zellmembranen. Lediglich die Kerne blieben intakt. Diese wurden durch 10 min Zentrifugation bei 1000 Upm von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Mit -20 °C kalter Carnoylösung (Methanol-Eisessig 3:1) wurde mehrfach gewaschen. Nach dem zweiten Waschgang wurde ein Standardaustropf hergestellt, um die Morphologie, Dichte und den Gehalt an Metaphasen mit dem Mikroskop zu beurteilen. Nun wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2. Tissue Tek

In 18 Fällen war in Tissue Tek eingebettetes und in Stickstoff tiefgefrorenes Nativgewebe vorhanden. Von diesen Gewebelöcken wurden mit dem Cryostat (Frigocut 2800N, Fa. Reichert-Jung) 10-20 Schnitte à 15 µm angefertigt. Diese wurden mit einem Zellzerkleinerer (Darko Medimachine CE/95) mit einem 50 µm Sieb (Fa. Dako 79400) weiter disaggregiert und mit 5 ml C100T-Lösung suspendiert. Die Zellsuspension wurde unter kontinuierlichem Schütteln (Frequenz 1000-1200/min) 10 min im Schüttler (IKA-Vibrax-UXR) bei Raumtemperatur inkubiert, um so die Zellen aus dem Zellverband herauszulösen. Anschließend wurde die Suspension mit 1x PBS auf 10 ml aufgefüllt und 10 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit -20 °C kalter Carnoylösung resuspendiert und bei -20 °C über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurde ein Standard erstellt, ggf. die Dichte verändert und bei -80 °C archiviert.

### 2.2.3. Austropfen der Zellen auf dem Objektträger

Auf einem Objektträger wurden mit einem diamantbeschichteten Glasmarker ein bis vier Hybridisierungsfelder mit einem Durchmesser von 10 mm markiert. Mit einem Fettstift (Darko Cytomation Pen S2002) wurden diese auf der Rückseite umrandet. In jedes der Hybridisierungsfelder wurde je nach Dichte der Suspension zwischen einem und sechs Tropfen Lösungen ausgetropft und bei Raumtemperatur 15 bis 30 Minuten getrocknet. Anschließend wurde die Dichte unter einem Lichtmikroskop kontrolliert und gegebenenfalls weitere Tropfen hinzugefügt.

## 2.3. FISH

### 2.3.1. Grundlage der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Bei der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung wird eine DNS – Probe, die die homologe Sequenz des Genlocus (komplett oder partiell) enthält, der mittels FISH überprüft werden soll, mit einem Reportermolekül verknüpft <sup>43</sup>. Dabei kann es sich bei der indirekten Fluoreszenz-Insitu-Hybridisierung um Biotin, Digoxigenin oder Dinitrophenol handeln, die über Fluorochrom-markierte Antikörper detektiert werden. Bei der direkten FISH sind die Sonden direkt mit einem Fluorochrom (beispielsweise Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) oder Cy3) markiert, das ohne zusätzliche Detektion durch primäre und sekundäre Antikörper visuelle Signale abgibt.

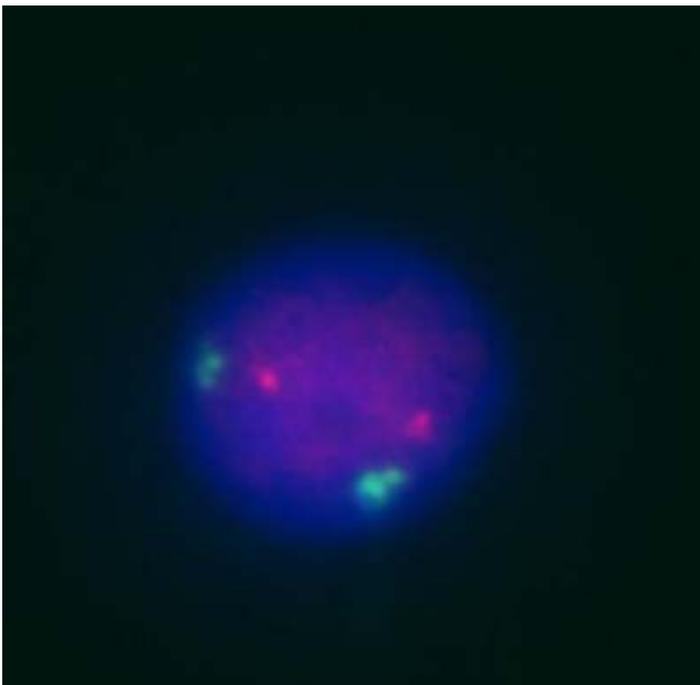
Die in Carnoy-Lösung fixierten Zellen, die sich überwiegend in der Interphase, zum Teil aber auch in der Metaphase befinden, werden auf einen Objektträger ausgetropft. Die DNS wird unter Verwendung einer Salzlösung durch Energiezufuhr in DNS-Einzelstränge aufgespalten (Denaturierung). Zu diesen Einzelsträngen gibt man nun die mit einem Reportermolekül markierte DNS-Sonde (Hybridisierung), die ebenfalls zuvor denaturiert wurde und somit in Einzelsträngen vorliegt. Diese DNS-Sonde lagert sich während der Inkubation an den entsprechenden DNS-Einzelstrang des Interphasen- bzw. Metaphasenkerns an. Sie wird dort über Wasserstoffbrückenbindungen spezifisch gebunden, so dass wieder ein stabiler DNS-Doppelstrang mit der homologen, markierten Sonde als komplementären Partner vorliegt (Renaturierung). Zuvor werden im Genom verteilt vorkommende repetitive DNS-Sequenzen, die zu unspezifischen Bindungen führen können, mittels eines Puffers (Cot-DNA) abgesättigt. Nach der

Inkubation wird bei der indirekten FISH die Sonde mittels eines primären Antikörpers (Avidin) gegen das Reportermolekül detektiert, an den ein Fluorochrom gekoppelt ist. Die Chromosome/Zellkerne werden unspezifisch mit Diamidinophenylindoldihydrochlorid (DAPI) gefärbt.

Die Signale der Fluorochrome werden dann mittels eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht. Dabei wird durch einen Exzitationsfilter, den man in den Lichtstrahl einer Quecksilberdampfampe einbringt, Licht einer bestimmten Wellenlänge auf den Objekträger mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern geschickt. Die Fluorochrome senden bei einer für sie charakteristischen Wellenlänge (Anregungswellenlänge) ein für das Fluorochrom spezifisches Licht einer bestimmten Wellenlänge aus (Emissionsspektrum). Die Signale können nun bezogen auf die Zellkerne/Metaphase gezählt werden, wobei normalerweise mit Ausnahme der Geschlechtschromosomen beim Mann jeweils zwei Signale pro Zelle und Chromosom zu erwarten sind (Abbildung 1).

Üblicherweise werden in einer Untersuchung zwei verschiedene Sonden mit unterschiedlichem Reportermolekül verwendet. Die zweite Sonde dient zur Kontrolle des Hybridisierungserfolgs.

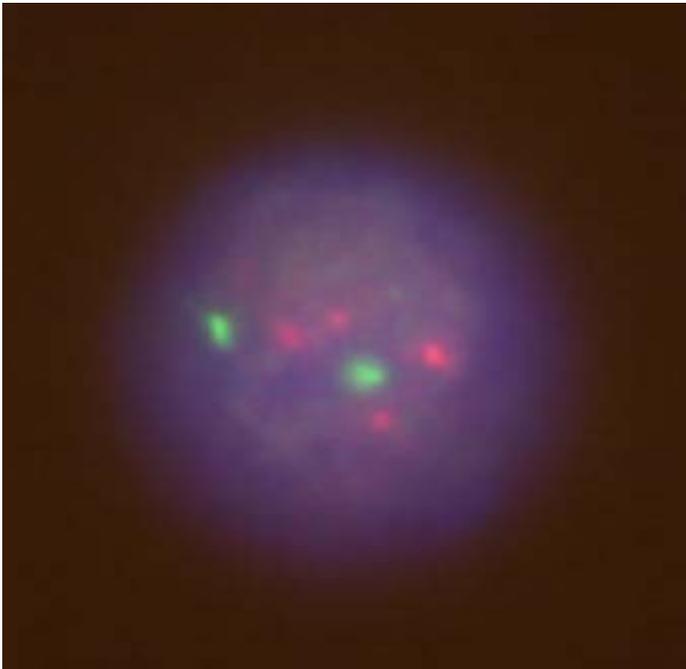
**Abbildung 1: Fallnummer 17, PTCL NOS, diploide Zelle, keine Aberration von 17cen bzw. 17p13, grüne Signale 17cen, rote Signale 17p13**



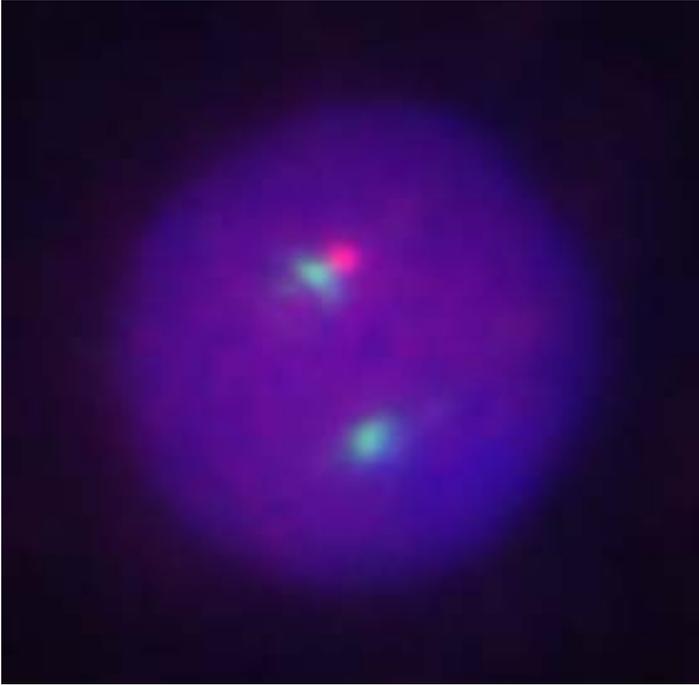
Zusätzliche oder fehlende Signale werden in Zusammenschau mit den Ergebnissen der zweiten Sonde und von Voruntersuchungen als Amplifikationen, Tri- oder Tetrasomien beziehungsweise Deletionen oder Monosomien gewertet (Abbildungen 2-4).

Die FISH ist eine sehr sensitive Methode zur Erfassung von Deletionen, Amplifikationen und Rearrangements genetischen Materials. Sie weist gegenüber klassischen zytogenetischen Methoden Vorteile auf. So ist die Untersuchung von Interphasekernen möglich. Durch die Unabhängigkeit von Metaphasen ist daher die Untersuchung größerer Zahlen von Kernen pro Fall möglich <sup>44</sup>. Auch ist bei der FISH die Auflösung besser als beispielsweise in der Comperativen Genomischen Hybridisierung (CGH). Deren Auflösung liegt bei >10 Mbp, wohingegen die FISH im Bereich von 100-400 bp liegt <sup>45-47</sup>. Allerdings kann die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung nur zur Untersuchung bekannter Regionen genutzt werden. Es werden daher Vorinformationen über mögliche Aberrationen benötigt. Das umfassende Screening des gesamten Karyotyps ist nicht möglich <sup>44</sup>.

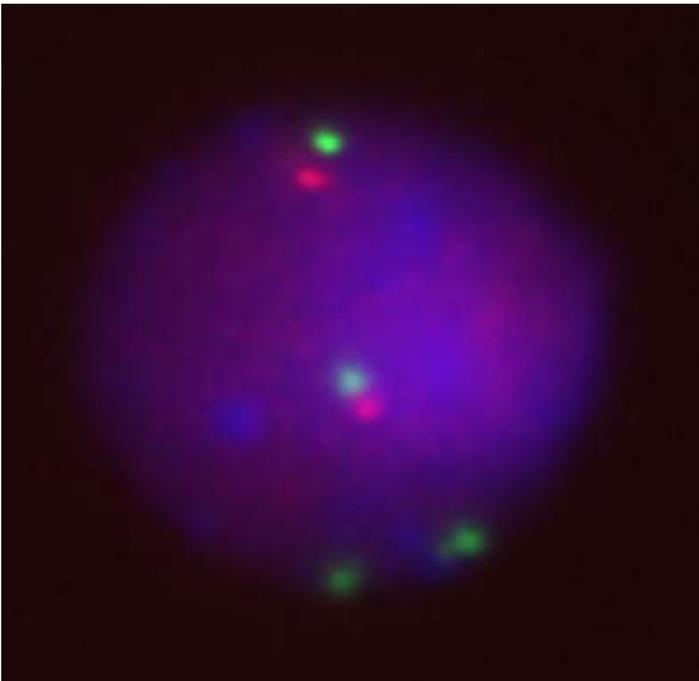
**Abbildung 2: Fallnummer 34, EATCL, diploide Zelle, Tetrasomie 9q34, grün 22q11, rot 9q34**



**Abbildung 3: Fallnummer 34, EATCL, diploide Zelle, Monosomie *TP53*, grün 17cen, rot *TP53***



**Abbildung 4: Fallnummer 14, PTCL NOS, tetraploide Zelle, Deletion *TP53*, grün 17cen, rot *TP53***



Die Untersuchungen wurden nach zwei Protokollen mit Sonden aus eigener Herstellung und mit Sonden der Firma Vysis (Stuttgart, Deutschland) durchgeführt. Die eigenen Sonden waren mit Biotin/Digoxigenin markiert und wurden mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper (FITC/Cy3) detektiert. Die Vysissonden waren mit SpektrumGreen/SpektrumOrange markiert.

### 2.3.2. Locusspezifische Sonden der Firma Vysis/Abott

Für die Genloci *TP53* (Tumorsuppressorgen p53 auf Bande 13.1 im kurzen Arm von Chromosom 17), *D13S25* (in Bande q14 des langen Arms von Chromosom 13), 17cen, 9q34, 22q11, 5q31 und 5p15 wurden Sonden der Firma Vysis (Stuttgart, Deutschland) verwendet (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Locusspezifische Sonden der Firma Vysis**

Locus/Region	Sonde (Produktnummer)	Cut-Off-Level
<i>TP53</i>	LSI- p53 (30190008)	5%
<i>D13S25</i>	LSI-D13S25 (30190029)	5%
17cen	CEP-17 $\alpha$ (im Set mit TP53 bzw. D13S25) (32112017)	5%
9q34, 22q11	LSI-bcr/abl ES Dual Color Translocation Probe (32191022)	8%
5q31, 5p15	LSI-EGR-1, LSI-D5S23/S721 (als feste Sondenkombination) (32191021)	6%

Die Objektträger mit den ausgetropften Kernen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) in 100 ml fassenden Glasküvetten bei Raumtemperatur für je 8 Minuten dehydriert. Zum Andau der Kernmembran wurden sie nun für 1-3 Minuten in 2 mg Pepsin und 100 ml 0,01n HCl in einer Glasküvette bei 38 °C im Wasserbad inkubiert. Der Stopp des Andaus erfolgte in circa 100 ml 1x PBS (siehe 2.5.) in einer Glasküvette bei Raumtemperatur über 5 Minuten. Zur Fixierung der

DNS wurden die Objektträger in 100 ml Paraformidllösung (siehe 2.5.) in einer Glasküvette für 5 min in Eis gestellt. Anschließend wurde mit circa 100 ml 1x PBS in einer Glasküvette für 5min gewaschen und erneut in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) über je 8 min dehydriert. Daraufhin erfolgte die Denaturierung der DNS durch 70 ml Formamidllösung (siehe 2.5.) in einer Glasküvette über 5 min bei 72 °C im Wasserbad. Dabei dissoziieren die Nukleinsäuredoppelstränge, was Voraussetzung für die Hybridisierung ist. Um die DNS in der dissoziierten Form zu fixieren, erfolgte eine weitere Dehydrierung durch die Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) im Eis über je 5 min. Nun wurden die Objektträger 15 min bei Raumluft getrocknet.

Die Hybridisierungslösung für sieben Fälle (ein Ansatz) bestand aus 7 µl LSI Puffer, 1,5 µl Aqua destillata, 1 µl der locuspezifischen Probe und bei den *TP53/D13S25*-Proben noch 0,5 µl 17cen. Bei den Kombinationssonden (5q31 und 5p15 sowie 9q34 und 22q11) enthielt der Ansatz 1 µl Sonde und 2 µl Aqua destillata. Die Hybridisierungslösung wurde im Eppendorfcap im Wasserbad bei 37 °C denaturiert. Anschließend wurden 1,35 µl der Hybridisierungslösung je Hybridisierungsfeld auf den vorgewärmten Objektträger (auf dem Wärmeblock bei 45-50 °C für 1 bis maximal 2 Minuten) pipettiert. Die Felder wurden mit einem Deckglas mit 10 mm Durchmesser bedeckt und mit Fixogum (Marabu, Tamm, Deutschland) abgedichtet. In einer feuchten Kammer wurden die Objektträger bei 37 °C für minimal 12 und maximal 16 Stunden inkubiert.

Am zweiten Tag wurden das Fixogum und die Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. In der Waschlösung (siehe 2.5.) wurden die Objektträger für 2 Minuten bei 73 °C im Wasserbad gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden zu lösen und nicht gebundene Sonden zu entfernen. Anschliessend wurden in der Kernfärbungslösung (siehe 2.5.) die Kerne über 5 Minuten bei Raumtemperatur mit DAPI (siehe 2.5.) gefärbt. Hiernach wurden die Objektträger für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit DAPI-Wash (siehe 2.5.) gewaschen. Die Untersuchungsfelder wurden mit einem Tropfen Vecta-Shield pro Hybridisierungsfeld eingedeckt und mit einem 24x15 mm großen Deckglas bedeckt. Die Lagerung erfolgte bei +4 °C im Kühlschrank.

### 2.3.3.: Nicht-kommerzielle Sonden

#### 2.3.3.1. YAC-, PAC- und BAC-Sonden

Die YAC-, PAC- und BAC-Klone stammen vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung Berlin. YAC ist die Abkürzung für Yeast Artificial Chromosome, PAC steht für P1-derived Artificial Chromosome und BAC für Bacterial Artificial Chromosome.

YAC: Die verwandten Klone finden sich in Tabelle 5. Die Hefen wurden auf Sabourand-Platten drei Tage angezüchtet, rote Kolonien (ein roter Marker zeigt das Vorhandensein des zu amplifizierenden Inserts an) über zwei Tage in Hefesuspension weitergezüchtet. Die Präparation der DNS erfolgte mit dem GenraSystems Kit (Pure Gene DNA-Isolierungskit Art. Nr. 203040) nach Herstellerangaben. Die gewünschte Sequenz wurde durch ALU-PCR amplifiziert. Der Ansatz bestand aus: 10x PCR Puffer (MBI Fermentas) 10 µl, 10 µl MgCl<sub>2</sub> 25mm, 100x dNTP 1 µl (MBI), Primer CL1 50 µm 1 µl (MWG-Biotec), Primer CL2 50 µm 1 µl, Taq Polymerase 5 Units/µl 1 µl (MBI), Aqua bidest 75 µl. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt, wobei sich jeder Zyklus aus drei Schritten zusammensetzt: Denaturierung 1 min bei 90 °C, Hybridisierung 30 sec bei 54 °C, Synthese 4 min 30 sec bei 72 °C.

**Tabelle 5: YACs mit Lokalisation der untersuchten Bande, Klon und Cut-Off-Level**

Locus	Klon	Cut-Off-Level
5q31	773d3	8%
6q21	956b10	8%
6q21	726d6	8%
7q35/36	940a12	7%
7q35/36	761h5	8%
7q35/35	932d12	8%
12q21	790f8	6%
12q21	959d5	6%

PAC: Die benutzten Klone sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Bakterien wurden auf Luria Bertami-(LB)-Platten (mit Kanamycin) ausgestrichen und bei 30 °C über Nacht bebrütet. Die entstandenen Kolonien wurden in 400 ml LB-Flüssigmedium mit Kanamycin bei 30 °C im Schüttelinkubator bebrütet. Kanamycin ist ein Antibiotikum, das das Wachstum anderer Pilze und Bakterien hemmt.

**Tabelle 6: PACs mit Lokalisation der untersuchten Gene bzw. Bande, Klon und Cut-Off-Level**

Locus	Klon	Cut-Off-Level
1ptel	A111092, O08967, K04892 als Kombinationssonde für 1ptel	6%
11q22/23	LLNLP704G18220Q19 ( <i>ATM1</i> )	6%
11q22/23	LLNLP704O01298Q19 ( <i>ATM2</i> )	6%

So können die resistenten Bakterien mit den Inserts ungestört Kolonien bilden. Die DNS-Präparation erfolgte mit dem NucleoBond PC 500-Kit (Art. 740574.50 Fa. Macherey Nagel Düren) nach Herstellerangaben. Das *ATM*-Gen liegt auf Bande q22/23 auf dem langen Arm von Chromosom 11. Es wurden zwei Abschnitte (*ATM1* und *ATM2*) untersucht.

BAC: Für die Untersuchung von 5q21 wurden die Klone 81c5 und 56P2 eingesetzt (Tabelle 7). 56P2 dient zur Untersuchung des *APC*-Gens. Die Präparation der DNS wurde analog zu den PAC durchgeführt. Lediglich das Kanamycin wurde durch Chloramphenicol ersetzt, da die Bakterien der BAC kanamycinsensibel und chloramphenicolresistent sind.

**Tabelle 7: BACs mit Lokalisation der untersuchten Gene, Klon und Cut-Off-Level**

Locus	Klon	Cut-Off-Level
5q21	81c5	6%
5q21	56P2 ( <i>APC</i> -Gen)	6%

### 2.3.3.2. Markierung der Sonden (YAC, PAC, BAC)

Die DNS wurde mittels Nick-Translation mit biotin-16-UTP oder digoxigenin-11-UTP gekennzeichnet.

Der Ansatz für die Markierung bestand aus 1µg DNS, 40µl 10x NT-Puffer und 2µl Polymerase 1, 20µl Biotin-Mix oder Dig-Mix (s. 2.5.), 20 µl Mercaptoethanol, 2 µl DNase (1:1000 verdünnt), 111 µl Aqua bidest in einem Eppendorfcap. Dieser Ansatz wurde in einem Wasserbad bei 15 °C über 45-60 Minuten inkubiert. Hierbei wird ein Strang der DNS durch die DNase abgebaut und durch die Polymerase 1 aus den zugesetzten Nukleotiden neu synthetisiert. Dabei werden anstelle des TTP teilweise auch mit Biotin oder Digoxenin markierte UTP-Nukleotide in die DNS eingebaut.

Durch eine Gelelektrophorese wird nach 45-60 Minuten die Länge der synthetisierten Fragmente untersucht. Diese sollte maximal 500 Basenpaare betragen. Wird diese Länge überschritten, wird der Ansatz für jeweils weitere 5 Minuten inkubiert, bis die gewünschte Maximallänge erreicht ist. Im Anschluss wird 6 µl 0,5 molares EDTA und 2 µl 10% SDS hinzugegeben und die DNS bei 68°C über 10 Minuten im Wasserbad denaturiert. Schliesslich wird der Ansatz in einer Sephadex-Säule gereinigt.

### 2.3.3.3. Sondenpräparation (YAC, PAC, BAC)

Von jeder Sonde wurden 4 µl mit 5 µl Human-Cot-1-DNA (zum Abdecken repetetiver DNS-Sequenzen), 0,35 µl ss-DNA, 0,67 µl 3M NaAcetat und 35,04 µl 100% Ethanol in ein Eppendorfcap pipettiert und 30 Minuten bei -70 °C gefällt. Anschließend wurde mit 13000 Upm bei 4 °C 20 Minuten und nach Verwerfen des Überstandes und Auffüllen mit 400 µl 70% Ethanol weitere 15 Minuten ebenfalls mit 13000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand verworfen und die Probe bei 37 °C auf dem Heizblock 20 Minuten getrocknet. Nach Zugabe von zunächst 2 µl deionisiertem Formamid sowie anschließend 2 µl Hybridisierungs-Mix wurde die Probe für jeweils 15 Minuten mit dem Schüttler durchmischt. Die Denaturierung der DNS erfolgte bei 75 °C im Wasserbad über 6 Minuten. Zur Vorbereitung des Annealings wurden die Proben 7 Minuten auf dem Heizblock bei 37 °C gewärmt.

#### 2.3.3.4. Materialvorbereitung

Die getrockneten Objektträger wurden in der aufsteigenden Alkoholreihe (70, 90, 100%) in Glasküvetten bei Raumtemperatur für je 8 Minuten dehydriert. Zum Andau der Kernmembran wurden sie nun für 1-3 Minuten in 2 mg Pepsin und 100 ml 0,01n HCl in einer Glasküvette bei 38 °C inkubiert. Nach 5 Minuten in etwa 100 ml 1x PBS in einer Glasküvette bei Raumtemperatur zum Stopp des Andaus wurden die Objektträger in 100 ml Paraformamidlösung (siehe 2.5.) in einer Glasküvette für 5 min in Eis gestellt. Dies diente der Fixierung der DNS. Nach erneuter Waschung in etwa 100 ml 1x PBS in einer Glasküvette bei Raumtemperatur für 10 Minuten erfolgte wiederum eine Dehydrierung mittels der Alkoholreihe (70, 90, 100%) bei Raumtemperatur für je 8 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für einige Minuten und im Trockenschrank bei 63 °C für weitere 20 Minuten getrocknet. Bei 73 °C erfolgte nun über 2 min 10 sec in 70 ml Formamidlösung in einer Glasküvette die Denaturierung des DNS-Doppelstrangs. Danach wurde wieder durch die Alkoholreihe dehydriert, diesmal 5 Minuten bei 4 °C, um die Einzelstränge zu fixieren. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Objektträger bei Raumtemperatur. Vor Zugabe der Sonden wurden sie für mindestens 1, maximal 2 Minuten auf dem Heizblock auf 37 °C erwärmt.

#### 2.3.3.5. Hybridisierung

Auf jedes Hybridisierungsfeld wurden 4 µl der Probe gegeben, mit Deckgläsern bedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 12 Stunden und maximal 16 Stunden bei 37 °C in einer feuchten Kammer.

#### 2.3.3.6. Detektion

Am nächsten Tag wurde das Fixogum mit einer Pinzette entfernt und die Deckgläschen behutsam abgehoben. Nicht oder unspezifisch gebundene Sonden wurden durch zwei Waschschriffe entfernt. Der erste Waschschriff erfolgte für einmal 10 Minuten sowie dreimal 5 Minuten in Wash A in einer Glasküvette bei 42 °C, der zweite in einer Glasküvette bei 60 °C für dreimal 5 Minuten in Wash B. Im Anschluss wurde pro Objektträger 200 µl Blocking aufgetragen, um unspezifische Bindungsstellen zu

sättigen, mit Parafilm (American National Can, USA) abgedeckt und für 30 Minuten bei 37 °C in der feuchten Kammer im Brutschrank inkubiert.

Daran schloß sich die Detektion der Sonden durch die fluoreszenzmarkierten Antikörper (mit FITC gegen Biotin und mit cy3 gegen Digoxigenin) an, beide von der Firma Dianova, Hamburg, Deutschland. Hierzu wurden pro Objektträger 2 µl FITC- und 2 µl cy3-markierte Antikörper in 200 µl Detektionlösung aufgetragen, mit Parafilm abgedeckt und bei 37 °C in der feuchten Kammer 20 Minuten inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde dreimal 5 Minuten mit Wash C gewaschen. Die Kerne wurden in 80 ml Kernfärbungslösung in einer Glasküvette bei Raumtemperatur für 5 Minuten angefärbt. Einer letzten Waschung in etwa 100 ml DAPI-Wash in einer Glasküvette bei Raumtemperatur für 3 Minuten schloß sich das Eindecken mit je einem Tropfen Vectashield pro Hybridisierungsfeld an. Die Objektträger wurden mit einem 24x15 mm großen Deckglas eingedeckt und bei +4 °C gelagert.

#### 2.4. Notwendige Chemikalien und Lösungen

Aqua bidestillata

Aqua destillata

bio 16-UTP (Firma Roche)

Chromosomenmedium RPMI 1640 (Firma Gibco)

Colcemid (Firma Invitrogen Art. Nr. 15210-016)

Cot-1 (Firma Roche)

DAPI-Stammlösung (Firma Roche)

Dextransulfat 50% (Firma Merck)

dig 11-UTP (Firma Roche)

DNase (Firma Roche)

EDTA (Firma Merck)

Essigsäure 100% (Firma Merck)

Ethanol 70%, 90% und 100% (Firma Merck)

Fetales Kälberserum (Firma PAA)

Formamid 70% (Firma AppliChem)

Gentamycin 10 mg/ml (Firma PAA Laboratories, Schweiz)

Giemsa (Firma Merck)

Kaliumchlorid (Firma Merck)  
 Kaliumdihydrogenphosphat (Firma Merck)  
 Magnesiumchlorid (Firma Merck)  
 Mercaptoethanol (Firma Sigma)  
 Methanol (Firma Merck)  
 Natriumacetat (Firma Merck)  
 Natriumchlorid (Firma AppliChem)  
 Natriumcitrat (Firma AppliChem)  
 Natriumhydrogencarbonat 0,9% (Firma Merck)  
 Natriumhydrogenphosphat (Firma Merck)  
 Nonidet P40 (Firma Sigma)  
 Nukleotide (ATP, CTP, GTP, TTP; Firma MBI Fermentas)  
 Paraformaldehyd (Firma Merck)  
 Pepsin 4500U/mg (Firma Sigma)  
 Polymerase 1 (Aktivität 10.000 U/ml, mit 10x NT-Puffer) (Firma Promega)  
 Salzsäure 0,01n (Firma Merck)  
 Sephadex (Firma Sigma)  
 ss-DNA (Firma Eppendorf)  
 Stimulantien (PHA (Firma Gibco), IL2 (Firma Sigma))  
 Tissue tech (Firma Sakura, Zoterwoude Niederlande)  
 Tween 20 (Firma Merck)  
 Vecta-Shield (Firma Alexis)  
 Zitronensäuremonohydrat (Firma AppliChem)

## 2.5. Ansätze für verwendete Medien, Puffer und Lösungen

- Biotin-Mix: 100µl Bio 16-UTP, 24µl TTP Stock (1:100 verdünnt), 1 µl ATP, 1µl CTP, 1µl GTP, 73 µl Aqua bidest.
- Blocking: 3% Rinderserumalbumin (BSA) in 4x SSC und 0,1% Tween20, pH 7,3
- Carnoy-Lösung: Essigsäure 100% und Methanol 100% im Verhältnis 1 zu 3
- C100T: 0,1 mol/l Zitronensäuremonohydrat und 0,5% Tween 20
- DAPI-Wash: 100 ml 2x SSC und 0,5 ml Tween 20 bei pH 7,0
- Detektionlösung: 1% BSA in 4x SSC und 0,1% Tween 20, pH 7,3

- Dig-Mix: 34  $\mu$ l Dig 11-UTP, 66  $\mu$ l TTP Stock (1:100 verdünnt), 1  $\mu$ l ATP, 1  $\mu$ l CTP, 1  $\mu$ l GTP, 97  $\mu$ l Aqua bidest.
- Formamid-Lösung: 49 ml Formamid, 7 ml 20x SSC und 14 ml Aqua dest. bei pH 7,0
- Giemsa-Lösung: 5 ml Giemsa mit Sörensenpuffer (3,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 4,14 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  auf 2000 ml Aqua destillata) auffüllen
- Hybridisierungs-Mix: 2 ml 20x SSC pH 7,0, 4 ml 50% Dextransulfat, 4 ml Aqua bidest
- KCl-Lösung 0,075M: 5,592 g KCl in 1000ml Aqua bidestillata
- Kernfärbung: 30  $\mu$ l DAPI-Stammlösung (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) in 80 ml 2x SSC
- Kulturmedium RPMI 1640: RPMI 1640 Trockensubstanz, 900 ml zweifach destilliertes Wasser, 2 g/l Natriumhydrogencarbonat. Nach Zugabe von 100 ml fetalem Kälberserum (inaktiviert) erfolgt eine Filtration mit einem Sterifilter. Kurz vor dem Gebrauch wird Gentamycin zugegeben.
- PBS-Puffer (1x): 8 g NaCl, 0,2 g KCL, 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 1000 ml Aqua dest.
- Pepsin-Verdau: 2 mg Pepsin in 100 ml 0,01 N HCl
- Paraformamid-Lösung: 10 ml 10% p-Formamid (100 g Paraformaldehyd mit 900 ml 1x PBS bei pH 7,0), 85 ml 1x PBS und 5 ml 1m  $\text{MgCl}_2$
- SSC (20x): 175,3 g NaCl und 88,2 g NaCitrat auf 1000 ml Aqua bidestillata bei pH 7,0
- Waschlösung Vysisprotokoll: 95 ml Aqua dest., 2 ml 20x SSC, 300  $\mu$ l nonidet P-40
- Wash A: 150 ml Formamid, 30 ml 20x SSC und 120 ml Aqua dest. (pH 7,0)
- Wash B: 250 ml 0,5x SSC (pH 7,0)
- Wash C: 100 ml 4x SSC und 100 $\mu$ l Tween 20 0,1% (pH 7,3)

## 2.6. Auswertung

In normalen Interphasekernen führt die Hybridisierung mit den verschiedenen markierten Sonden zu je zwei roten und grünen Signalen in jedem Kern. In Tumorkernen mit Aberrationen werden weniger (Deletionen, Monosomien) oder mehr (Amplifikationen, Tri-, Tetrasomien) Signale beobachtet. Dabei wurden nur Kerne gewertet, die einzeln lagen und eine ausreichende Morphologie (homogene DAPI-Färbung, glatte Kerngrenzen) aufwiesen. Weiterhin gefordert wurden eine geringe Hintergrundanfärbung und ein Anteil von hybridisierten Zellen von mindestens 90%.

Für jede Sonde wurde der Cut-Off-Level bestimmt (Tabellen 4 bis 7). Es wurden Zellpräparationen von fünf reaktiven Lymphknoten als Negativkontrolle untersucht. Der Cut-Off-Level wurde ermittelt aus dem Mittelwert des Prozentsatzes der Aberration für die untersuchte Sonde plus zwei Standardabweichungen. Der Cut-Off-Level ist der Prozentsatz von Zellen, die eine Aberration aufweisen, ab der diese Aberration als klonal gewertet wurde.

Wurden in einem Fall in mindestens der Hälfte der untersuchten Regionen in vergleichbaren Prozentsätzen Tetrasomien festgestellt, so wurde von einer Tetraploidie dieses Anteils der Zellen ausgegangen. Wies bei einer Hybridisierung mit zwei Sonden die eine vier Signale in einem entsprechenden Prozentsatz auf und die andere in einem geringeren Prozentsatz (unter Berücksichtigung des Cut-Off-Level), so wurde die zweite Region als deletiert gewertet. Entsprechend wurde bei mehr als vier Signalen für die zweite Region dies als Zugewinn der betreffenden Region gewertet.

Es wurden pro Fall minimal 100 intakte Kerne ausgezählt, in kritischen Fällen 200. In Fällen mit schlechter Morphologie wurde die Hybridisierung wiederholt und dann in Ausnahmen auch 50 Kerne gewertet. Ausgewertet wurde an einem Zeiss Axiophot Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Aufnahmen wurden erstellt mit dem ISIS Bildverarbeitungsprogramm (MetaSystems, Altlußheim, Deutschland).

### 3.) Ergebnisse

#### 3.1. PTCL-NOS

Es wurden 30 PTCL NOS untersucht. Davon wiesen 25 mindestens eine Aberration auf. Es wurden insgesamt 75 Deletionen und Zugewinne gefunden (siehe Tabellen 8-10, Ideogramm 1). Die meisten Fälle wiesen mehrere Aberrationen gleichzeitig auf. Als isoliert auftretende Aberrationen wurden Zugewinne von 17cen und 5p15 sowie Verluste von 5q21 (81c5), 5q31 und 22q11 nachgewiesen.

Die Deletionen (n=66) hatten ein deutliches Übergewicht gegenüber den Zugewinnen (n=9). Die Zahl der Aberrationen pro Fall betrug 2,4 (1 bis 8). Deletionen kamen in einer Häufigkeit von 2,2 pro Fall (1 bis 8), Zugewinne in 0,3 pro Fall (1 bis 3) vor.

##### 3.1.1. Deletionen

Die Deletionen betrafen in diploiden Zellen stets nur ein Allel. Biallele Deletionen wurden nicht beobachtet. In tetraploiden Zellen zeigten sich mono- oder biallelische Deletionen durch Tri- oder Disomien des untersuchten Locus in Kernen mit Tetrasomie für die zweite untersuchte Region. Monosomien oder Deletionen aller vier Allele wurden bei den tetraploiden Fällen nicht beobachtet. Bei den Fällen mit einem Anteil von tetraploiden Kernen wiesen fast ausschließlich diese Kerne Aberrationen auf.

Die häufigsten Deletionen betrafen *TP53*, 5q21 (81c5), *D13S25* und 6q21 und 1ptel (Tabelle 8, 10).

**Tabelle 8: Häufigkeit der Verluste bei den PTCL NOS (n=30) nach Locus, Prozentsatz der Fälle mit Deletionen und Prozentsatz der Kerne mit Deletionen pro Fall**

Locus	Prozentsatz der Fälle mit Deletionen	Prozentsatz der Kerne mit Deletionen pro Fall
<i>TP53</i>	47% (14 von 30)	0 - 82%
5q21 (81c5)	31% (9 von 29)	0 - 44%
<i>D13S25</i>	23% (7 von 30)	0 - 52%
6q21	20% (6 von 30)	0 - 80%

1ptel	20% (6 von 30)	0 – 30%
12q21	17% (5 von 30)	0 - 80%
7q35/36	13% (4 von 30)	0 – 45%
<i>APC</i>	10% (3 von 29)	0 – 45%
5q31	10% (3 von 30)	0 – 45%
22q11	10% (3 von 29)	0 – 72%
<i>ATM1</i>	10% (3 von 30)	0 – 54%
<i>ATM2</i>	7% (2 von 30)	0 – 59%

### 3.1.2. Zugewinne

Die Zugewinne zeigten sich als Tri- und Tetrasomien bei diploidem Chromosomensatz. Bei tetraploidem Chromosomensatz wurden mehr als vier Signale pro Kern als Gewinn gewertet. Zugewinne traten auf bei 7q35/36, *ATM1*, *ATM2*, 9q34, 5p15 und Chromosom 17 (Tabellen 9, 10).

**Tabelle 9: Häufigkeit der Zugewinne bei den PTCL NOS (n=30) nach Locus, Prozentsatz der Fälle mit Zugewinnen und Prozentsatz der Kerne mit Zugewinnen pro Fall**

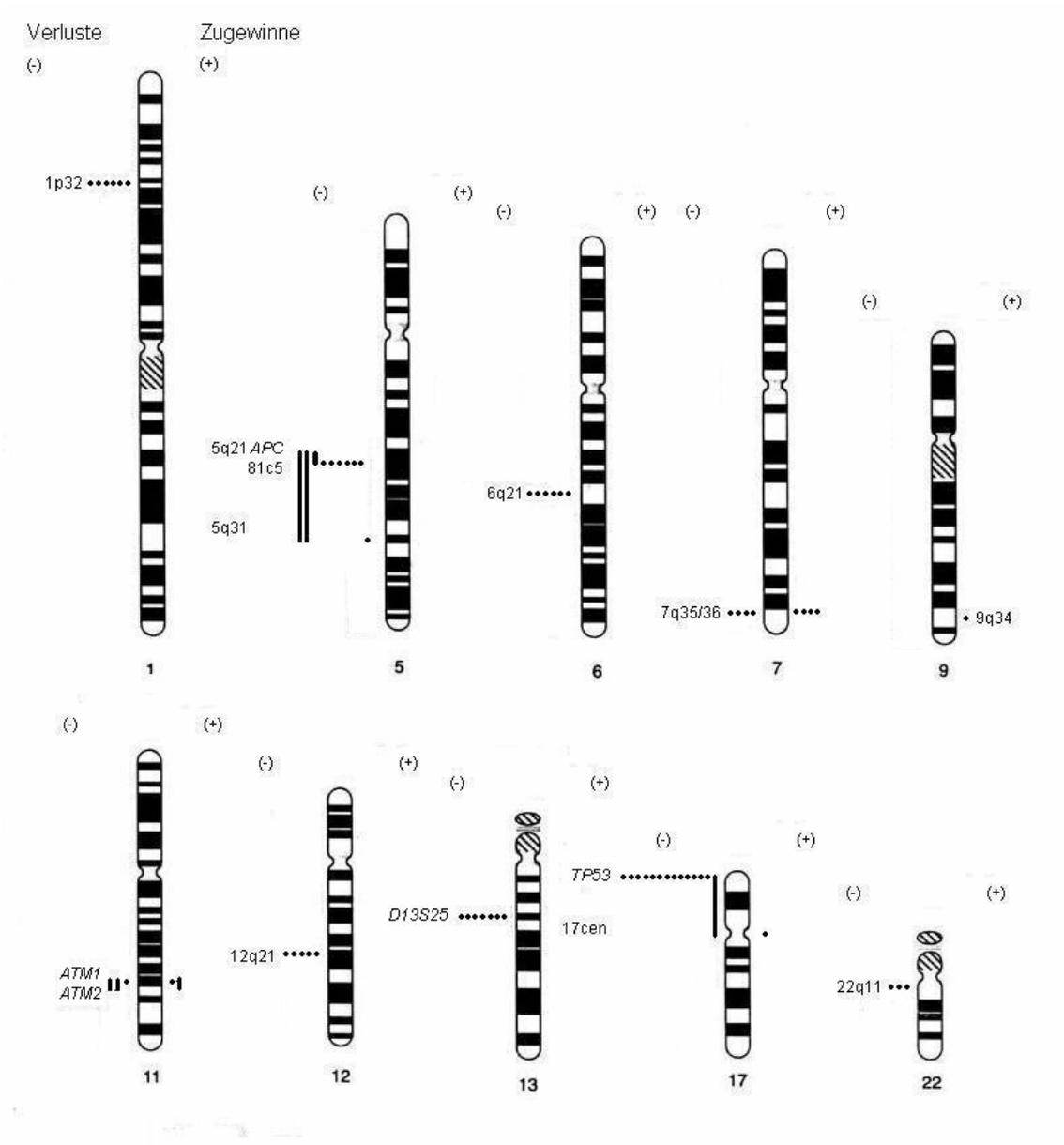
Locus	Prozentsatz der Fälle mit Zugewinnen	Prozentsatz der Kerne mit Zugewinnen pro Fall
7q35/36	13% (4 von 30)	0 - 51%
<i>ATM1</i>	7% (2 von 30)	0 – 25%
<i>ATM2</i>	3% (1 von 30)	0 – 25%
9q34	3% (1 von 30)	0 - 53%
17cen	3% (1 von 30)	0 – 51%
5p15	13% (1 von 8)	0 – 23%

**Tabelle 10: Gewinne (n=9) und Verluste (n=66) bei den PTCL NOS (n=30) nach Fällen mit Ploidie (2n = Diploidie, 4n = Fälle mit einem Anteil von tetraploiden Kernen)**

Fallnummer	Ploidie	Gewinne	Verluste
1	2n	17cen	-
2	2n	-	-
3	2n	-	-
4	2n	-	<i>D13S25</i> , 5q21 (81c5), 17
5	2n	7q35/36(Trisomie), <i>ATM1</i> , <i>ATM2</i>	-
6	2n	-	5q21 (81c5)
7	2n	-	5q21 (81c5)
8	2n	7q35/36 (Trisomie), <i>ATM1</i>	
9	2n	-	5q21 (81c5)
10	2n	7q35/36 (Trisomie)	12q21, <i>D13S25</i> , <i>TP53</i>
11	2n	-	5q31
12	2n	-	6q21, <i>TP53</i>
13	2n	5p15	-
14	2n	-	5q21 (81c5), <i>TP53</i>
15	2n	-	<i>D13S25</i> , <i>TP53</i>
16	2n	-	-
17	2n	-	1ptel, 7q35/36
18	2n	-	-
19	2n	-	22q11
20	2n	-	-
21	2n	-	<i>ATM1</i> , <i>ATM2</i> , 22q11
22	2n	-	5q21 (81c5), <i>TP53</i>
23	4n	-	diploide Kerne: -

			tetraploide Kerne: 1ptel, 6q21, 7q35/36 (monoallelisch), <i>ATM1</i> (überwiegend monoallelisch), 12q21, 22q11, <i>D13S25</i> , <i>TP53</i>
24	4n	-	diploide Kerne: - tetraploide Kerne: 1ptel, 6q21, <i>D13S25</i> , <i>TP53</i> (überwiegend monoallelisch)
25	4n	tetraploide Kerne: 7q35/36	diploide Kerne: <i>D13S25</i> , tetraploide Kerne: 1ptel, 12q21, <i>D13S25</i> , <i>TP53</i>
26	4n	-	diploide Kerne: - tetraploide Kerne: 1ptel, 5q31, <i>APC</i> , 5q21 (81c5), 6q21, 7q35/36, <i>TP53</i>
27	4n	-	diploide Kerne: - tetraploide Kerne: 6q21, 7q35/36 (monoallelisch), 12q21, <i>APC</i> , 5q21 (81c5), <i>TP53</i>
28	4n	-	diploide Kerne: - tetraploide Kerne: 1ptel (überwiegend monoallelisch), 5q31, <i>APC</i> , 5q21 (81c5), <i>ATM1</i> , <i>ATM2</i> , 12q21 (monoallelisch), <i>TP53</i>
29	4n	diploide Kerne: 9q34 tetraploide Kerne: 9q34	diploide Kerne: - tetraploide Kerne: 6q21, <i>TP53</i> (monoallelisch)
30	4n	-	diploide Kerne: - tetraploide Kerne: <i>D13S25</i> , <i>TP53</i>

**Ideogramm 1: Zugewinne (n=9) und Verluste (n=66) der PTCL NOS (n=30) nach Chromosomen (• = einzelne Aberration, | = gleichzeitige Aberrationen in einem Fall)**



### 3.1.3. Diploide PTCL NOS

Die 22 diploiden PTCL NOS (dPTCL NOS) zeigten 32 Aberrationen, mit einem Durchschnitt von 1,4 pro Fall (0 bis 4). In fünf Fällen konnte keine Veränderung nachgewiesen werden. Es kamen 24 Verluste (Mittelwert 1,1 pro Fall, 0 bis 3) sowie 8 Gewinne (Mittelwert 0,4 pro Fall, 0 bis 3) vor.

Die häufigsten Verluste betrafen 5q21 (81c5), *TP53* und *D13S25* (Tabelle 11). Gewinne waren in drei Fällen bei 7q35/36 nachzuweisen (14%). Dabei zeigte sich jeweils eine Trisomie in 23-33% der Zellen bei zusätzlicher Tetrasomie in 0-18%. Zwei Fälle zeigten Zugewinne bei *ATM1* (9%). In einem dieser Fälle war auch bei *ATM2* ein Gewinn zu verzeichnen. In je einem Fall gab es Zugewinne von 5p15 und Chromosom 17. Bei dem zweiten waren jedoch nur zwei Kopien von *TP53* nachweisbar, so dass angenommen werden kann, dass entweder in den veränderten Zellen *TP53* deletiert ist oder eine Trisomie des langen Arms vorliegt.

**Tabelle 11: Verluste bei den diploiden PTCL NOS (n=22) nach Locus, Prozentsatz der Fälle mit Verlusten und Prozentsatz der Kerne mit Verlusten pro Fall**

Locus	Prozentsatz der Fälle mit Verlusten	Prozentsatz der Kerne mit Verlusten pro Fall
5q21 (81c5)	29% (6 von 21)	0 – 28%
<i>TP53</i>	27% (6 von 22)	0 – 68%
<i>D13S25</i>	14% (3 von 22)	0 – 52%
22q11	9% (2 von 22)	0 – 72%
1ptel	5% (1 von 22)	0 – 54%
5q31	5% (1 von 22)	0 – 14%
6q21	5% (1 von 22)	0 – 15%
7q35/36	5% (1 von 22)	0 – 16%
12q21	5% (1 von 22)	0 – 45%
<i>ATM1</i>	5% (1 von 22)	0 - 54%
<i>ATM2</i>	5% (1 von 22)	0 - 59%

In allen sechs Fällen, die eine Deletion von 5q21 (81c5) zeigten, waren weder *APC* (ebenfalls 5q21/22) proximal noch 5q31 deletiert (Ideogramm 2). Dabei war der Verlust von 5q21 (81c5) in drei Fällen die einzige Alteration, die nachgewiesen werden konnte. Bei den drei anderen Fällen war die Deletion von 5q21 (81c5) mit einem Verlust von *TP53* assoziiert, einmal dabei mit einer zusätzlichen Deletion von *D13S25*.

Deletionen von 5q21 (81c5) waren mit 6 von 21 untersuchten Fällen signifikant häufiger als Deletionen von 5q31, die lediglich in einem Fall vorkamen ( $p < 0,05$ ). Für *APC*, das in keinem Fall deletiert war, ist dieser Unterschied sogar hochsignifikant ( $p < 0,01$ ).

#### 3.1.4. Tetraploide PTCL NOS

Bei acht PTCL NOS war der Chromosomensatz in 23-77% der Zellen tetraploid. Sie wiesen 43 Aberrationen auf mit einem Mittelwert von 5,3 pro Fall (2 bis 8). Alle untersuchten Fälle zeigten Aberrationen. Ein Großteil waren Verluste mit 41 (Mittelwert 5,1, 2 bis 8). Sämtliche acht Fälle waren deletiert für *TP53*. Bei sechs Fällen wurden überwiegend oder ausschließlich biallelische Deletionen gesehen. Weiterhin traten Verluste von 1ptel, 5q21 (81c5), *APC*, 5q31, 6q21, 7q35/36, *ATM1*, *ATM2*, 12q21, *D13S25* und 22q11 auf (Tabelle 12). Zugewinne zeigten nur zwei Fälle und dort jeweils nur in einem Locus. In dem Fall war dies 7q35/36, in dem anderen 9q34.

Deletionen von 5q21 traten in 3 Fällen auf. Betroffen waren jeweils sowohl 81c5 als auch *APC*. In zwei dieser Fälle war 5q31 ebenfalls deletiert (Ideogramm 2).

Bei den drei Fällen mit Deletionen von 7q35/36 wurden in zwei Fällen überwiegend monoallelische Deletionen beobachtet, die zu Zellen mit nun drei Signalen in 23 bzw. 56% der Zellen führten.

**Tabelle 12: Verluste bei den tetraploiden PTCL NOS (n=8) nach Locus, Prozentsatz der Fälle mit Verlusten und Prozentsatz der Kerne mit Verlusten pro Fall**

Locus	Prozentsatz der Fälle mit Verlusten	Prozentsatz der Kerne mit Verlusten pro Fall
<i>TP53</i>	100 % (8 von 8)	0 – 82%
1ptel	63 % (5 von 8)	0 – 30%
6q21	63 % (5 von 8)	0 – 80%
<i>D13S25</i>	50 % (4 von 8)	0 – 48%
12q21	50 % (4 von 8)	0 – 83%
7q35/36	38 % (3 von 8)	0 – 56%
5q21 (81c5)	38 % (3 von 8)	0 - 44%
<i>APC</i>	38 % (3 von 8)	0 – 45%
5q31	25 % (2 von 8)	0 – 15%
<i>ATM1</i>	25 % (2 von 8)	0 – 45%
<i>ATM2</i>	13 % (1 von 8)	0 – 81%
22q11	13 % (1 von 8)	0 – 67%

### 3.1.5. Vergleich der diploiden und tetraploiden PTCL NOS

Die tetraploiden PTCL NOS (tPTCL NOS) wiesen mit im Mittelwert 5,4 Aberrationen pro Fall deutlich mehr Aberrationen auf als die diploiden PTCL NOS (dPTCL NOS) mit einem Mittelwert von 1,5 pro Fall. Dieser Unterschied ist jedoch aufgrund der niedrigen Fallzahl statistisch nicht signifikant.

Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand bei Verlusten von *D13S25*. Hochsignifikant war der Unterschied für 1ptel, 6q21, 7q35/36, 12q21, *TP53* und *APC* (Tabelle 13).

Das Durchschnittsalter bei den tPTCL NOS lag mit 62 Jahren (von 44 bis 80 Jahren) geringfügig über dem der dPTCL NOS mit 59 Jahren (11-79). Aufgrund der niedrigen Fallzahlen ist dieser Unterschied allerdings nicht statistisch signifikant.

**Tabelle 13: Häufigkeiten der Deletionen bei den dPTCL NOS (n=22) und tPTCL NOS (n=8) nach Locus**

Locus	Anteil der Fälle mit Deletionen		
	dPTCL NOS	tPTCL NOS	
1ptel	5% (1 von 22)	63 % (5 von 8)	p < 0,001
5q21(81c5)	29 % (6 von 21)	38 % (3 von 8)	p > 0,05
<i>APC</i>	0 % (0 von 21)	38 % (3 von 8)	p < 0,001
5q31	5 % (1 von 22)	25 % (2 von 8)	p > 0,05
6q21	5% (1 von 22)	63 % (5 von 8)	p < 0,001
7q35/36	5 % (1 von 22)	50 % (4 von 8)	p < 0,001
9q34	0 % (0 von 22)	0 % (0 von 8)	-
<i>ATM1</i>	5% (1 von 22)	25 % (2 von 8)	p > 0,05
<i>ATM2</i>	5% (1 von 22)	13 % (1 von 8)	p > 0,05
12q21	5 % (1 von 22)	50 % (4 von 8)	p < 0,001
<i>D13S25</i>	14 % (3 von 22)	50 % (4 von 8)	p < 0,05
<i>TP53</i>	27% (6 von 22)	100% (8 von 8)	p < 0,001
22q11	9 % (2 von 22)	13 % (1 von 8)	p > 0,05

### 3.1.5.1. *TP53*

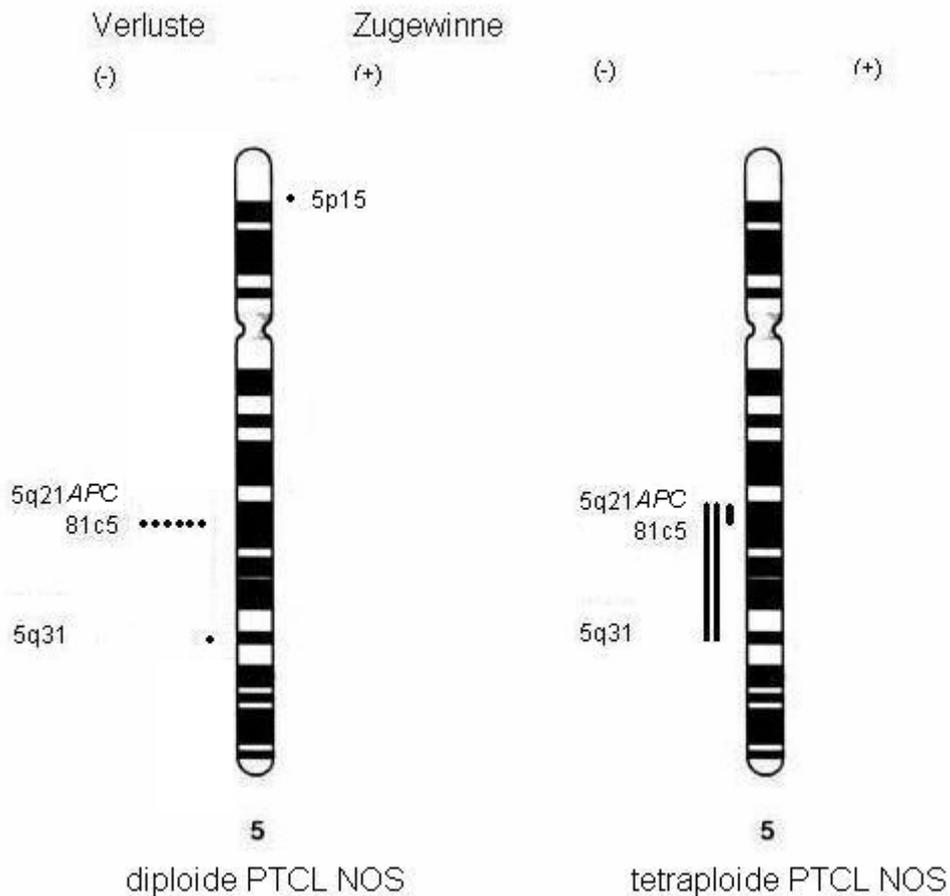
Deletionen von *TP53* kommen in beiden Gruppen vor. Sie sind jedoch unterschiedlich häufig. Bei den diploiden Fällen waren 6 von 22 betroffen, bei den tetraploiden alle 8 untersuchten Fälle. Dieser Unterschied ist hochsignifikant (p<0,001).

### 3.1.5.2. 5q

In beiden Gruppen wurden Verluste des langen Arms von Chromosom 5 festgestellt. Allerdings betrafen diese Verluste bei den dPTCL NOS stets nur einen Locus pro Fall, wohingegen die tPTCL NOS gleichzeitige Verluste von mehreren Loci in 5q aufwiesen. Bei den dPTCL NOS war 5q21 (81c5) in sechs Fällen deletiert. Das proximal gelegene *APC*-Gen jedoch war in keinem Fall und das distal gelegene 5q31 lediglich in einem

betroffen (Tabelle 11 und Ideogramm 2). Dieser Unterschied ist für beide Loci signifikant ( $p < 0,05$ ).

**Ideogramm 2: Gewinne und Verluste auf dem Chromosom 5 bei den diploiden (n=22) und tetraploiden (n=8) PTCL NOS (• = einzelne Aberration, | = gleichzeitige Aberrationen in einem Fall)**



### 3.1.5.3. 7q35/36

Aberrationen von 7q35/36 kommen in beiden Gruppen vor. Bei den dPTCL NOS traten sie in 4 von 22 Fällen (18%) auf, bei den tPTCL NOS in 4 von 8 (50%). Interessanterweise kam es sowohl bei den dPTCL NOS, als auch bei den tPTCL NOS zu Trisomien von 7q35/36 in 3 bzw. 2 Fällen. Die Frequenz lag zwischen 23 und 35 bei

den dPTCL NOS bzw. bei 21 und 56% bei den tPTCL NOS. Trisomien wurden in den anderen Loci nur vereinzelt und in geringen Prozentsätzen beobachtet.

### 3.2. EATCL

Es wurden neun EATCL untersucht. Alle neun wiesen Aberrationen auf. Es zeigten sich 28 Aberrationen (Mittelwert 3,1, 1 bis 8). Im Mittel traten 1,7 Gewinne (1 bis 3) und 1,4 Verluste (0 bis 4) auf. Gewinne und Verluste waren mit 15 zu 13 annähernd gleich häufig vorhanden (siehe Tabelle 15, Ideogramm 3).

#### 3.2.1. Verluste

Es konnten Verluste von 6q21, 12q21, *D13S25* und *TP53* gezeigt werden (Tabelle 14). Ein Fall wies zudem Verluste von 5q31, 5q21 (81c5) und *APC* auf, so dass hier eine Monosomie 5 oder eine Deletion des langen Arms vermutet werden kann.

**Tabelle 14: Verluste bei den EATCL (n=9) nach Locus, Prozentsatz der Fälle mit Verlusten und Prozentsatz der Kerne mit Verlusten pro Fall**

Locus	Prozentsatz der Fälle mit Deletionen	Prozentsatz der Kerne mit Verlusten pro Fall
<i>TP53</i>	33 % (3 von 9)	0 – 70%
6q21	22 % (2 von 9)	0 – 19%
12q21	22 % (2 von 9)	0 – 43%
5q21 (81c5)	11 % (1 von 9)	0 – 11%
<i>APC</i>	11 % (1 von 9)	0 – 8%
5q31	11 % (1 von 9)	0 – 6%
<i>D13S25</i>	11 % (1 von 9)	0 – 33%

#### 3.2.2. Zugewinne

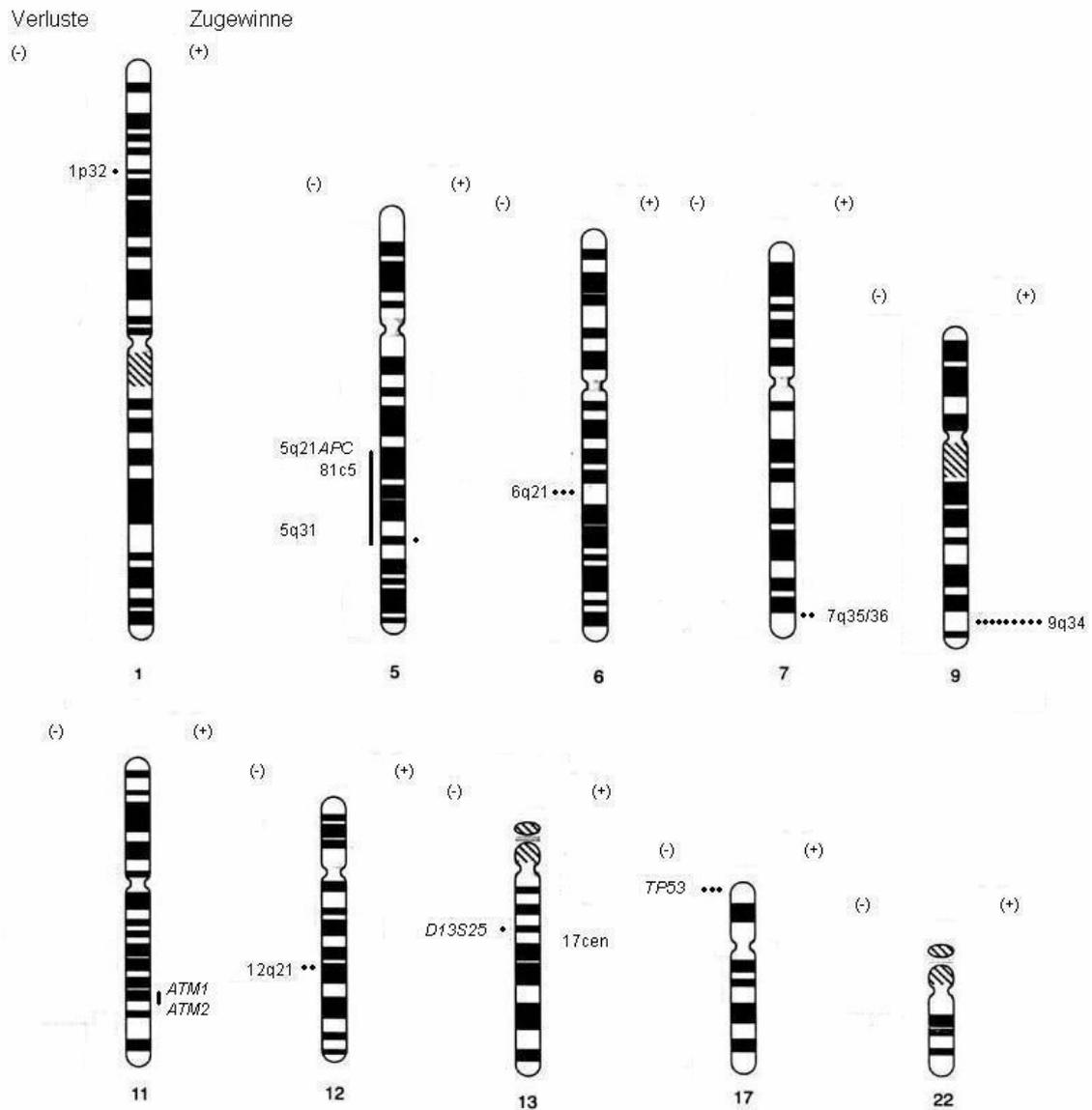
Bei allen neun untersuchten Fällen konnte ein Zugewinn von 9q34 in 10-84% der Kerne beobachtet werden. Es zeigten sich dabei bis zu 9 Kopien pro Kern. In 2 von 9 Fällen (22%) fand sich ein Zugewinn von 7q35/36. In einem Fall wurde ein Zugewinn von

*ATM1* und *ATM2* festgestellt. Ein anderer wies Zugewinne von 5q31 und 5p15 auf. Interessanterweise zeigten sich bei 5q21 (81c5) und *APC*, die auf dem Chromosom 5 zwischen beiden Loci gelegen sind, keine Zugewinne (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Gewinne (n=15) und Verluste (n=13) der EATCL (n=9), nach Fälle und Ploidie (2n = Diploidie, 4n = Fälle mit einem Anteil von tetraploiden Kernen)**

Fallnummer	Ploidie	Gewinne	Verluste
31	2n	9q34	<i>APC</i> , 5q21 (81c5), 5q31
32	2n	9q34, <i>ATM1</i> , <i>ATM2</i>	12q21
33	2n	9q34	6q21
34	2n	9q34	<i>TP53</i>
35	4n	diploide: - tetraploide: 9q34	-
36	4n	diploide: 9q34, 7q35/36 tetraploide: 9q34, 7q35/36	-
37	4n	diploide: - tetraploide: 9q34	diploide: - tetraploide: 6q21, <i>TP53</i> (überwiegend monoallelisch)
38	4n	diploide: 9q34 tetraploide: 9q34, 5q31, 5p15	diploide: - tetraploide: 1ptel (monoallelisch), 6q21, 12q21, <i>TP53</i>
39	4n	diploide: 9q34 tetraploide: 9q34, 7q35/36	diploide: <i>D13S25</i> tetraploide: <i>D13S25</i>

**Ideogramm 3: Gewinne (n=15) und Verluste (n=13) der EATCL (n=9), (• = einzelne Aberration, | = gleichzeitige Aberrationen in einem Fall)**



### 3.2.3. Diploide EATCL

Die vier diploiden Fälle zeigten 12 Aberrationen (Mittelwert 3, 2 bis 4). Dabei waren Gewinne und Verluste mit je sechs (Mittelwert 1,5, 1 bis 3) gleich häufig vertreten (Tabelle 15). Alle diploiden Fälle wiesen Amplifikationen von 9q34 auf. Dabei wurden bis zu 6 Kopien pro Kern beobachtet.

### 3.2.4. Tetraploide EATCL

Bei den fünf tetraploiden EATCL fand sich eine Frequenz von 8 bis 56% tetraploider Kerne. Sie wiesen insgesamt 16 Aberrationen auf (Mittelwert 3,2, 1 bis 7). Die Gewinne (Mittelwert 1,8, 1 bis 3) überwogen mit 9 zu 7 Verlusten (Mittelwert 1,4, 0 bis 4) leicht (Tabelle 15). Alle Fälle waren für 9q34 amplifiziert. Es konnten dabei bis zu 9 Kopien pro Kern nachgewiesen werden.

### 3.2.5. Vergleich der diploiden und tetraploiden EATCL

In beiden Gruppen war eine Amplifikation von 9q34 in allen Fällen zu beobachten. Bei den diploiden Fällen wurden dabei bis zu sechs Kopien, bei den tetraploiden Fällen wurden bis zu neun pro Kern gesehen.

Im Gegensatz zu den PTCL NOS zeigte sich bei den EATCL kein Unterschied in der Gesamtzahl der Aberrationen zwischen den diploiden und den tetraploiden Fällen. Ebenfalls fand sich kein Unterschied in der Häufigkeit von Einzelaberrationen.

Die Altersverteilung war bei den diploiden und tetraploiden Fällen stark unterschiedlich. Bei den diploiden EATCL betrug das Entnahmealter im Durchschnitt 71,8 Jahre (66-75 Jahre). Die Patienten mit tetraploiden EATCL waren mit durchschnittlich 50,8 Jahre (34-66 Jahre) deutlich jünger. Alle Patienten mit tetraploiden EATCL waren jünger als der jüngste Patient mit einem EATCL mit ausschließlich diploiden Karyotyp. Dieser Trend ist bei niedrigen Fallzahlen allerdings nicht statistisch signifikant.

### 3.3. Vergleich der PTCL NOS und EATCL

Die PTCL NOS und die EATCL unterscheiden sich signifikant in der Häufigkeit von Amplifikationen von 9q34 (Tabelle 16). Bei den PTCL NOS war lediglich in einem von 29 Fällen ein Zugewinn von 9q34 in Form einer Trisomie nachzuweisen. Hingegen zeigten bei den EATCL alle neun untersuchten Fälle Zugewinne von 9q34. Dabei fanden sich Amplifikationen mit bis zu neun Kopien pro Zellkern.

In beiden Gruppen waren, abgesehen von der Amplifikation von 9q34, Deletionen von *TP53* die häufigsten Aberrationen. Bei den PTCL NOS waren 47% der Fälle betroffen, bei den EATCL 33%. Während bei den PTCL NOS alle tetraploiden Fälle Deletionen von *TP53* aufwiesen, waren es bei den EATCL lediglich zwei von fünf.

Deletionen von 5q kamen sowohl bei den PTCL NOS als auch bei den EATCL vor. Verluste von 5q21 (81c5) waren bei den PTCL NOS mit 31% gegenüber 11% bei den EATCL deutlich häufiger. Dieser Trend ist jedoch statistisch nicht signifikant. Bei den dPTCL NOS wurden isolierte Verluste von 5q21 (81c5) nachgewiesen. Diese fanden sich weder bei den tPTCL NOS noch bei den EATCL. Der betroffene EATCL-Fall war ebenfalls für *APC* und 5q31 deletiert. Eine gemeinsame Deletion mehrerer Loci in 5q trat auch bei zwei der tPTCL NOS auf.

Deletionen von 1ptel zeigten beide Gruppen (20% der PTCL NOS und 11% der EATCL). Bei den PTCL NOS waren dabei 5 von 8 tetraploiden, aber lediglich einer von 22 diploiden Fällen betroffen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Auch bei den EATCL war der einzige betroffene Fall tetraploid.

Deletionen von 6q21 und 12q21 wurden sowohl bei den PTCL NOS als auch den EATCL gefunden. Mit 20 und 33% bzw. 17 und 22% war ihre Häufigkeit nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Bei den PTCL NOS waren Deletionen bei den tetraploiden Fällen signifikant häufiger als bei den diploiden Fällen. Bei den EATCL fand sich kein Unterschied zwischen diploiden und tetraploiden Fällen.

Bei 7q35/36 zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von Deletionen oder Amplifikationen zwischen den PTCL NOS und den EATCL. Bei den PTCL NOS waren Deletionen häufiger bei den tetraploiden Fällen. Bei 5 der 8 PTCL NOS mit Aberrationen von 7q35/36 resultierten diese in Trisomien. Sie wurden sowohl in den diploiden Fällen als auch bei den Fällen mit einem Anteil von tetraploiden

Kernen beobachtet. Bei den EATCL wurden sie nicht gefunden. Trisomien wurden bei den anderen untersuchten Regionen nicht oder nur in Einzelfällen beobachtet.

Zugewinne von *ATM1* und *ATM2* fanden sich sowohl bei den PTCL NOS als auch den EATCL in Einzelfällen. Dabei zeigten in je einem Fall bei den PTCL NOS und den EATCL beide Loci Gewinne, in einem weiteren bei den PTCL NOS nur *ATM1*. Zudem zeigten sich bei den PTCL NOS noch Verluste, die in zwei Fällen beide Loci, in einem weiteren lediglich *ATM1* betrafen.

Annähernd ein Viertel (7 von 30, 23%) der PTCL NOS waren deletiert für *D13S25*. Bei den EATCL zeigte ein Fall Verluste dieses Locus. Bei den PTCL NOS war *D13S25* signifikant häufiger bei den tetraploiden Fällen deletiert. Auch der betroffene EATCL-Fall war tetraploid.

Verluste von 22q11 zeigten 3 der 29 untersuchten PTCL NOS (10%). Bei den EATCL wurden keine Deletionen von 22q11 festgestellt.

Bei den EATCL wurde ein höherer Anteil von Fällen mit tetraploiden Zellen beobachtet (55% gegenüber 27% bei PTCL NOS). Dieser Trend ist mit  $p > 0,05$  allerdings statistisch nicht signifikant. Auch die Frequenz der tetraploiden Kerne war bei den PTCL NOS (23-77%) und den EATCL (8 bis 56%) nicht signifikant unterschiedlich.

**Tabelle 16: Vergleich der Aberrationen bei den PTCL NOS (n=30) und EATCL (n=9), nicht signifikant (-, p>0,05), signifikant (+, p<0.001)**

	PTCL NOS	EATCL	Signifikanz
diploide Fälle	73 % (22 von 30)	44 % (4 von 9)	-
Fälle mit tetraploiden Kernen	27 % (8 von 30, Frequenz 23-77%)	56 % (5 von 9, Frequenz 8-56%)	-
- 1ptel	20 % (6 von 30)	11 % (1 von 9)	-
- 5q31	10 % (3 von 30)	11 % (1 von 9)	-
- 5q21 $\Sigma$ 81c5 APC	31 % (9 von 29)	11 % (1 von 9)	-
	31 % (9 von 29)	11 % (1 von 9)	-
	10 % (3 von 29)	11 % (1 von 9)	-
- 6q21	20 % (6 von 30)	33 % (3 von 9)	-
- 7q35/36	13 % (4 von 30)	0 % (0 von 9)	-
+ 7q35/36	13 % (4 von 30)	22 % (2 von 9)	-
+ 9q34	3 % (1 von 29)	100 % (9 von 9)	+
- <i>ATM 1</i>	10 % (3 von 30)	0 % (0 von 9)	-
+ <i>ATM1</i>	7 % (2 von 30)	11 % (1 von 9)	-
- <i>ATM 2</i>	7 % (2 von 30)	0 % (0 von 9)	-
+ <i>ATM2</i>	3 % (1 von 30)	11 % (1 von 9)	-
- 12q21	17 % (5 von 30)	22 % (2 von 9)	-
- <i>DI3S25</i>	23 % (7 von 30)	11 % (1 von 9)	-
- <i>TP53</i>	47 % (14 von 30)	33 % (3 von 9)	-
- 22q11	10 % (3 von 29)	0 % (0 von 9)	-

## 4.) Diskussion

In der Klassifikation hämatologischer Neoplasien und der Therapiewahl spielen in zunehmendem Maße genetische Aberrationen, die für Untergruppen spezifisch sind, eine wichtige Rolle. Das Vorhandensein einiger dieser Aberrationen korreliert mit der Prognose der Erkrankung. Bei Lymphomen und Leukämien gilt dies insbesondere für Mutationen oder Deletionen von *TP53*, die beispielsweise bei folliculären B-Zell-Lymphomen oder aggressiven B-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden konnten und mit Progression oder einem aggressiveren klinischen Verlauf assoziiert sind<sup>21,23-27,48-50</sup>. Diese Unterscheidung in indolente und aggressive Subgruppen könnte zukünftig Eingang finden in unterschiedliche Therapieprotokolle für diese Subgruppen.

Für die häufigeren B-Zell-Lymphome sind spezifische Aberrationen für mehrere Untergruppen bekannt, wie die Translokation t(11;18)(q21;q21) bei den MALT-Lymphomen<sup>15</sup>.

Für die T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome liegen bislang wenige genetische Daten vor<sup>2,32,36-40,51-53</sup>. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen konnten zudem bislang nur wenige spezifische Veränderungen für Untergruppen definiert werden<sup>54</sup>. Ausnahmen sind anaplastische großzellige ALK-kinase-positive T-Zell-Lymphome (ALK+-ALCL), die in 60-80% eine Translokation t(2;5)(p23;q35) aufweisen, die T-Zell-prolymphozytische Leukämie, bei der eine Inversion im Chromosom 14 gezeigt werden konnte, die hepatosplenischen T-Zell-Lymphome, bei denen ein Isochromosom 7q gefunden wurde und die Angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphome mit Trisomien der Chromosomen 3 und 5<sup>33,34,55</sup>. Ein Nachweis der diagnostischen oder klinischen Relevanz von Aberrationen bei anderen Subgruppen peripherer T-Zell-Lymphome fehlt bislang.

In dieser Arbeit wurden 30 PTCL NOS und 9 EATCL untersucht und für beide Gruppen charakteristische Aberrationen nachgewiesen.

### 4.1. Übersicht über die genetischen Daten von PTCL NOS in der Literatur

Schlegelberger et al. (1994, 1996) untersuchten mit Bänderungstechnik 104 Periphere T-Zell Lymphome und wiesen Deletionen von 1p32 (in 11%), des kurzen Armes von

Chromosom 6 zwischen q15 und q25 (16%), Trisomien von 7q (4%) und 8q (10%), Monosomien von Chromosom 13 und Deletionen von 13q14 (11%), Zugewinne der Chromosome 3 (24%), 5 (14%), 7 (4%) und X (11%) sowie Verluste von Chromosom X (10%) nach <sup>36-38</sup>. Allerdings wurden die Fälle dabei nach der Kiel-Klassifikation eingeteilt, deren Untergruppen nicht mit denen der hier verwandten WHO-Klassifikation übereinstimmen. Ein Vergleich der Daten ist somit schwierig. In einer der Arbeiten wurden die peripheren T-Zell-Lymphome in eine hochmaligne und eine niedrigmaligne Gruppe unterschieden <sup>36</sup>. Dabei fanden sich bei den hochmalignen Fällen signifikant mehr aberrante Klone, Tetra- oder Polyploidien, komplexe Klone, Deletionen von 6q, partielle oder totale Deletionen von 7q und Monosomien oder Veränderungen von 13q14.

Lepetere et al. (2000) untersuchten mit Bänderungstechnik Material von 71 Patienten mit peripheren T-Zell-Lymphomen, wobei 51 als PTCL unspezifiziert nach der REAL-Klassifikation klassifiziert wurden (Tabelle 17) <sup>40</sup>. Es wurden bei den PTCL unspezifiziert Trisomien der Chromosomen 5 (7 Fälle) und 7 (4), sowie Verluste von 13 (7) und 17 (4) gezeigt. Es fanden sich Deletionen von 6q (8) und auch strukturelle Veränderungen mit Beteiligung von 1p, 6/-6q, 7q, 9q.

Renedo et al. (2001) untersuchten 29 T-Zell Non-Hodgkin-Lymphome, darunter 17 PTCL NOS mit der CGH <sup>52</sup> (Tabelle 17). Die Einteilung erfolgte nach der WHO-Klassifikation, die Ergebnisse wurden allerdings nicht nach den Untergruppen aufgeschlüsselt angegeben. Sie fanden Zugewinne des X-Chromosoms in 19% aller Fälle, der Chromosomen 17 (10%), 19 (10%) und 20 (10%) sowie in 9q34 (10%). Verluste traten in Chromosom 13 (10%) auf. Diese betrafen teilweise das ganze Chromosom, teilweise nur Abschnitte. Dabei war die Region 13q14-q21 am häufigsten deletiert. Weitere Aberrationen waren Zugewinne von 5p15, 7q32-ter und 11q13 in je 8%.

Die größte vorliegende Untersuchung von PTCL NOS nach der WHO-Klassifikation mit 42 Fällen stammt von Zettl et al. (2004) (Tabelle 17)<sup>53</sup>. Mit der CGH fanden sie Verluste in 13q in 36%, mit der minimalen überlappenden Region (MOR, minimal overlapping region) 13q21, in 5q (25%) mit MOR 5q21, in 6q/6q21 (31%), in 9p/9p21 (31%), in 10q/10q23-24 (28%) und in 12q/12q21-22 (28%). Weitere Verluste traten in 8p, 10p und 17p/17p13 (17%) auf. Gewinne wurden für 1q, 3p, 7q/7q22-qter (31%), 8q,

9q/9q33-qter (19%), 11q (17%) und 17q (25%) berichtet. Sie fanden zudem, daß in einer Untergruppe mit Verlusten von 5q, 10q oder 12q das Überleben signifikant besser war, als in den Fällen, die bei keinem dieser Loci Verluste zeigten.

#### 4.2. Übersicht über die genetischen Daten von EATCL in der Literatur

Die Gruppe der EATCL findet sich nicht in der Kiel- und REAL-Klassifikation. Daher gibt es bislang kaum Daten über Aberrationen. Die einzigen bislang vorliegenden Arbeiten mit Serien von EATCL sind die Untersuchungen von Zettl et al. sowie die von Baumgärtner et al.<sup>32,51</sup> (Tabelle 17). Zettl et al. (2002) zeigten bei 38 EATCL mit der CGH Zugewinne in 9q in 58%, 7q (24%), 5q (18%), sowie weitere Zugewinne in 1q, 6p, 8q, 11q und 12p<sup>32</sup>. Verluste fanden sie in 8p (24%), 13q (24%), 9p (18%) sowie in 3p, 4q, 6q, 7p, 10p, 11q, 16p, 18q und Xq. Die minimale überlappende Region in 9q war 9q34. Mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung konnten in allen vier untersuchten EATCL die Zugewinne in 9q34 bestätigt werden<sup>32</sup>. Diese Fälle sind auch Teil dieser Untersuchung. Baumgärtner et al. (2003) fanden in ihrer Untersuchung an 26 EATCL mit Mikrosatellitenmarkern Amplifikationen von 9q34 in 35%, 5q21 (12%), 5q33.34 (30%) und 7q31 (30%) sowie Deletionen von 6p24, 7p21, 8p, 9p, 13q (14%), 17q23-25 und 17p13.1 (27%)<sup>51</sup>. Sie beschrieben zwei Untergruppen mit spezifischen Aberrationen. Eine Gruppe mit 11 Fällen zeigte Amplifikationen von 9q34, die andere mit 5 Fällen Aberrationen von 3q27.

In beiden Untersuchungen ist die Amplifikation von 9q34 die mit Abstand am häufigsten beschriebene Aberration. Bis auf die oben genannte Bestätigung der Zugewinne in 9q34 liegt bislang keine FISH-Untersuchung intestinaler T-Zell-Lymphome vor. Daten zu intestinalen T-Zell-Lymphomen sind aufgrund der niedrigen Fallzahlen nicht leicht zu erheben. Zudem ist die Qualität des Materials oft für eine FISH-Untersuchung nicht ausreichend.

#### 4.3. 9q34

Alle neun untersuchten EATCL zeigten zum Teil hochgradige Amplifikationen von 9q34 mit bis zu neun Kopien pro Kern. Bei PTCL NOS wurde lediglich in einem von 29 Fällen (3%) ein Zugewinn gefunden. Das Material stammte bei diesem Fall aus den Tonsillen. Dieser Unterschied ist hochsignifikant ( $p < 0,001$ ).

In CGH-Untersuchungen beschrieben Zettl et al. (2002) erstmals Amplifikationen von 9q34 <sup>32</sup>. Auch Baumgärtner et al. (2003) fanden Aberrationen von 9q34 bei EATCL <sup>51</sup>. Sie beschrieben zwei Untergruppen von EATCL <sup>51</sup>. Die eine zeigte Amplifikationen von 9q34, eine kleinere Aberrationen von 3q27. In beiden Gruppen wurde die jeweils andere Aberration nicht nachgewiesen. In dieser Untersuchung konnten Amplifikationen von 9q34 in jedem EATCL-Fall nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen sind nötig, um zu klären, ob tatsächlich zwei Untergruppen von EATCL existieren, die sich bezüglich Amplifikationen von 9q34 unterscheiden.

Bei ALCL und T-PLL wurden Amplifikationen von 9q34 nicht beschrieben <sup>53,56</sup>. Bei ATCL hingegen konnten Tsukasaki et al. (2001) sie sowohl in der aggressiven Untergruppe (13%), als auch in der indolenten (6%) in niedrigen Prozentsätzen nachweisen <sup>57</sup>. Die Analyse der Studien an anderen T-Zell Neoplasien zeigt, dass sich EATCL sowohl in der FISH, als auch in Untersuchungen mit anderen Techniken deutlich von PTCL NOS und T-PLL, ALCL und ATCL unterscheiden in Bezug auf die Häufigkeit von Zugewinnen von 9q34. Kein Unterschied bestand zwischen PTCL NOS und T-PLL, ALCL und ATCL.

Die Region 9q34 beinhaltet mehrere Gene, für die eine Bedeutung für die Lymphomentstehung denkbar ist <sup>32</sup>. *TANI* kodiert für einen Transmembranrezeptor, der eine Rolle spielt bei der T-Zelldifferenzierung. In T-Zell-lymphoblastischen-Lymphomen konnte eine Beteiligung von *TANI* an Translokationen gezeigt werden <sup>58</sup>. *TANI* ist homolog zu dem Drosophila-Gen Notch, das in embryonalen Zellen einen Einfluss auf die Differenzierung hat <sup>58</sup>.

Weitere Kandidatengene sind *CDK9*, die Onkogene *ABL1* und *VAV2*, sowie das Homeoboxgen *LHX2*. *CDK9* kodiert für eine cyclin-abhängige Kinase und ist ein Regulator des Zellzyklus <sup>59</sup>. *ABL1* führt zur Bildung einer Tyrosinkinase, die an der Pathogenese der chronischen und akuten myeloischen Leukämie beteiligt ist <sup>60</sup>. Die konstitutive Aktivierung durch die Translokation t(9;22)(q34;q11) führt hierbei zur Dysregulation der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose. *LHX2* gehört zur Familie der Homeoboxgene. Es wird in neuronalen Zellen und lymphatischen Geweben exprimiert und hat dort eine Funktion als Regulatorprotein bei der Zelldifferenzierung <sup>61,62</sup>. Es wird auch in lymphoiden Malignomen exprimiert. Die gestörte Expression von

Genen der Homeoboxfamilie ist beispielsweise für *HOX11* bei den T-lymphoblastischen-Lymphomen bekannt<sup>61</sup>.

In einer kürzlich erschienen Arbeit zeigten Cejkova et al. (2005) mit quantitativer PCR von *NOTCH1* und *ABL1* als häufige Aberrationen bei EATCL<sup>63</sup>. Sie konnten zudem nachweisen, dass *NOTCH1* durchgehend stärker amplifiziert war als *ABL1* und schlossen daraus, dass *NOTCH1* das primäre Ziel der Amplifikation der DNA bei EATCL sein könnte. Welche Rolle diese Gene bei EATCL spielen, bleibt unbekannt. Weitere Untersuchungen sind nötig, um zu klären, welche Aberration für die Entstehung von EATCL entscheidend ist.

#### 4.4. Chromosom 5

PTCL NOS zeigten in 30% der Fälle Deletionen von 5q21/22. Dabei war stets der Klon 81c5 deletiert, während das *APC*-Gen nur in drei tetraploiden Fällen ebenfalls Verluste aufwies. Alleinige Verluste von *APC* traten nicht auf. In zwei der drei Fälle war ebenfalls 5q31 deletiert. Die diploiden PTCL NOS zeigten ausschließlich Deletionen von 5q21/81c5 in 27% (6 von 22). Dieser Unterschied bei den diploiden Fällen bezüglich Deletionen von 5q21/22 in 81c5 und *APC* sowie 5q31 ist signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei den EATCL fand sich lediglich in einem Fall ein Verlust von 5q21/22 und 5q31. Es zeigt sich somit ein Trend zu weniger Deletionen von 5q21/22 bei EATCL, der in dieser Arbeit allerdings statistisch nicht signifikant ist.

Unsere Ergebnisse spiegeln sich in den CGH-Untersuchungen von Zettl et al. (2002,2004) wider<sup>32,53</sup>. Sie beschrieben Verluste von 5q in einer CGH-Untersuchung bei 9 von 36 (25%) PTCL NOS mit der minimalen überlappenden Region (MOR) 5q21/22. Sie fanden sich nicht bei Anaplastischen Kinase-negativen T-Zell-Lymphomen (ALK-ALCL) und nur in einem von 38 Fällen (3%) bei EATCL. Dieser Unterschied ist in beiden Fällen signifikant und bestätigt die Ergebnisse unserer Untersuchung. Im Gegensatz dazu beschrieben Baumgärtner et al. (2003) mit Mikrosatellitentechnik Verluste des *APC*-Gens in 27% der von ihr untersuchten EATCL<sup>51</sup>. Sie benutzten lediglich eine Sonde für die Untersuchung von 5q21/22. Ob 81c5 ebenfalls häufiger betroffen ist oder die Deletionen längere Abschnitte betrafen, bleibt daher unklar, ist nach unseren Daten aber sehr wahrscheinlich.

Deletionen in 5q sind bei PTCL NOS bislang nicht beschrieben worden<sup>36-38,40,52</sup>. In den anderen T-Zell-Lymphomentitäten sind sie lediglich von Tsukasaki et al. (2001) bei aggressiven ATCL nachgewiesen worden<sup>56,57</sup>. Somit ist diese Aberration bei T-Zell-Lymphomen zum gegenwärtigen Zeitpunkt als spezifisch für PTCL NOS gegenüber ALCL, ATCL und T-PLL anzusehen. Die Ergebnisse dieser sowie der Untersuchung von Zettl et al. lassen zudem vermuten, daß Verluste von 5q21/22 (81c5) auch PTCL NOS von EATCL unterscheiden. Allerdings sind Untersuchungen größerer Kollektive notwendig, um diese Frage zu klären.

5q21/22 enthält das *APC*-Gen (Adenomatous-Polyposis-Coli-Gen), für das eine Rolle bei der Entstehung der Familiären Adenomatösen Polyposis Coli gezeigt wurde<sup>22</sup>. Dies ist eine hereditäre Erkrankung des Kolon, die obligat zur Entstehung von Kolonkarzinomen führt. Eine Assoziation mit Lymphomen ist nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten zudem daraufhin, daß der Verlust von *APC* bei PTCL NOS lediglich eine Kodeletion ist. Das Kandidatengen ist distal von *APC* und proximal von 5q31 in der Region von 81c5 zu suchen. Ebenfalls in 5q21/22 liegen *FER* (fer tyrosine kinase), dessen Genprodukt Wachstumsfaktorsignale vermittelt, und *U2AF1L1 /U2(RNU2)* (small nuclear RNA auxillary factor 1-like 1), das in Lungentumoren deletiert ist<sup>64</sup>. Ein weiteres möglicherweise betroffenes Gen ist *MCC* (mutated in colorectal cancer), das in kolorektalen Tumoren mutiert ist. In 5q23 liegt *SEMA 6A*, das für einen Transmembranrezeptor kodiert, der eine Rolle bei der Apoptose spielt.

#### 4.5. *TP53*

Unter den PTCL NOS waren 14 von 30 Fällen (47%) für *TP53* deletiert, bei EATCL drei von neun (33%). Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Interessanterweise waren bei den untersuchten PTCL NOS alle acht tetraploiden Fälle deletiert für *TP53*. Diese Deletionen waren überwiegend biallelisch. Deletionen waren bei tetraploiden EATCL in einem geringeren Prozentsatz zu beobachten. Hier waren lediglich zwei von fünf Fällen betroffen. Dies deutet darauf hin, dass eine Deletion von *TP53* bei den beiden Entitäten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Ploidie haben könnte oder in Zusammenhang mit ihr steht.

Verluste von *TP53* wurden auch in anderen Untersuchungen an PTCL NOS gefunden, wie von Lepetre et al. (2000) und Renedo et al. (2001)<sup>40,52</sup>. Zetl et al. (2002, 2004) wiesen bei PTCL NOS ebenfalls Deletionen von 17p nach, bei EATCL und ALCL beobachteten sie sie nicht<sup>32,53</sup>. Auch Tsukasaki et al. (2001) fanden sie weder bei indolenten, noch bei aggressiven ATCL<sup>57</sup>. Lepetre et al. (2000) berichteten in einer Untersuchung an T-PLL von Verlusten von 17p<sup>40</sup>. Alle diese Untersuchungen wurden mit der CGH durchgeführt. Insofern ist hier ein Vergleich erschwert, da Deletionen von *TP53* aufgrund der niedrigeren Auflösung zum Teil von der CGH nicht erfasst werden können. Baumgärtner et al. (2003) fanden sie in einer Untersuchung mit Mikrosatelliten in 27% der EATCL, was sich mit den Ergebnissen aus dieser Untersuchung deckt und eine Rolle von Verlusten von *TP53* bei EATCL nahe legt<sup>51</sup>.

Deletionen von *TP53* scheinen also sowohl bei PTCL NOS, als auch bei EATCL eine Bedeutung zu haben, wobei sie bei den PTCL NOS tendenziell häufiger sind. Ob sie bei anderen T-Zell-Lymphomentitäten tatsächlich weniger häufig auftreten und somit die Gruppen unterscheiden, lässt sich aus der momentanen Datenlage nicht beantworten. Es sind weitere Untersuchungen mit sensitiveren Methoden, wie z.B. der FISH, notwendig, um diese Frage zu klären.

*TP53* liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 in Bande 13.1. Es ist ein Tumorsuppressorgen, das bei vielen Tumorentitäten Aberrationen aufweist. Diese Aberrationen sind häufig sekundär. Die Aufgabe dieses Gens ist es, den Zellzyklus im Falle eines Schadens der DNS anzuhalten und somit eine Teilung der veränderten Zelle zu verhindern<sup>23,65</sup>. Es wurden Mutationen oder Deletionen von *TP53* in Malignomen von Kolon, Lunge, Brustdrüse, Oesophagus, Leber, Gehirn und des hämatopoetischen Systems nachgewiesen<sup>50</sup>. Bei B- und T-Zell-Lymphomen ist eine Deletion oder die gestörte Funktion von *TP53* mit einer Progression und einer schlechteren Prognose assoziiert<sup>21,24,26-30</sup>. Der schlechtere klinische Verlauf ist zum Teil durch ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapeutika bedingt<sup>30,66</sup>.

Bei peripheren T-Zell-Lymphomen zeigten Kanavaros et al. (2001) eine Überexpression von *TP53* in 12 von 57 Fällen (21%)<sup>67</sup>. In der Gruppe der PTCL NOS trat sie in 3 von 17 Fällen (17%) auf. Pescarmona et al. (1999) konnten bei PTCL immunhistochemisch eine Überexpression *TP53* in 9 von 45 Fällen (20%) nachweisen<sup>66</sup>. Dies ist ein Hinweis auf eine gestörte Funktion, da *TP53* normalerweise eine Halbwertszeit von 20 Minuten

hat und daher in nicht mutierten Zellen nicht nachweisbar ist<sup>68</sup>. Es wurden allerdings keine Mutationen im Gen gefunden. Der immunhistochemische Nachweis von TP53 war mit einem signifikant schlechteren Ansprechen auf Chemotherapeutika assoziiert. Sechs von sieben TP53-positiven Patienten starben, ohne ein Ansprechen auf intensive Chemotherapie zu zeigen. Im Gegensatz dazu waren alle sieben Überlebenden in kompletter Remission TP53-negativ. In einer anderen Arbeit mit 45 nodalen PTCL zeigten 13 (29%) eine Überexpression von *TP53*<sup>27</sup>. Diese Fälle hatten einen signifikant schlechteren klinischen Verlauf, sowohl was die Überlebenszeit, als auch die Zeit in Remission betraf. Murray et al. (1995) konnten immunhistochemisch TP53 in 22 von 23 EATCL nachweisen, was einen weiteren Hinweis auf eine Relevanz von TP53 bei dieser Entität liefert<sup>69</sup>.

Die gestörte Funktion von TP53, die zu der längeren Halbwertszeit und damit dem immunhistochemischen Nachweis führt, kann durch eine Mutation im Gen oder Alterationen im Abbauweg des Proteins bedingt sein<sup>68</sup>. Diese Veränderungen werden mit der FISH nicht erfasst. Sie weist lediglich Deletionen des Gens nach. Andererseits werden Deletionen durch die Immunhistochemie nicht entdeckt, da sie dazu führen, dass kein Protein nachweisbar ist, was in der Immunhistochemie für TP53 der Normalbefund ist. Beide Verfahren zeigen somit unterschiedliche Störungen des TP53-Weges. Es ist auch im Sinne des Two-Hit-Modells von Knudsen denkbar, daß im gleichen Fall ein Allel deletiert ist und das andere eine Mutation aufweist, die zu einer Inaktivierung führt<sup>22</sup>.

Die tatsächliche Häufigkeit von Inaktivierungen des TP53-Weges ließe sich durch eine Untersuchung der gleichen Fälle mit beiden Methoden, d.h. sowohl mit der FISH, als auch mit immunhistochemischen Methoden klären. In jedem Fall sprechen die bisherigen Daten der unterschiedlichen Methoden für eine wichtige Rolle von TP53 sowohl bei PTCL NOS als auch EATCL.

Sowohl Tetraploidien als auch Deletionen von *TP53* sind mit der Progression von Tumoren assoziiert<sup>20,25-27</sup>. In dieser Untersuchung waren bei PTCL NOS alle acht tetraploiden Fälle zugleich für *TP53* deletiert. Verluste wurden dabei ausschliesslich in den tetraploiden Kernen beobachtet. In sechs Fällen waren diese Deletionen in der überwiegenden Zahl der Kerne biallelisch. Es kann daher vermutet werden, dass *TP53* auch bei den PTCL NOS eine Rolle in der Progression spielt. Sollte eine Deletion von

*TP53* ein Marker für die Progression sein, so könnte die Untersuchung auf Deletionen von *TP53* für die Prognoseabschätzung und damit die Therapiewahl eine Rolle spielen. Dabei ist auch die Erkenntnis zu berücksichtigen, daß einige Chemotherapeutika und Bestrahlungen Apoptose über einen TP53-abhängigen Weg auslösen<sup>26</sup>. Sie können daher in *TP53*-deletierten Fällen unter Umständen von geringem oder keinem Nutzen sein.

Es wurden Versuche unternommen, TP53-Aktivatoren in der Therapie von Tumoren einzusetzen<sup>70,71</sup>. Snyder et al. (2004) injizierten Mäusen mit peritonealen Karzinomen einen Aktivator von TP53 intraperitoneal. Dies verlängerte das Überleben vor allem in disseminierten Fällen dramatisch. Allerdings ist dieser Ansatz noch im tierexperimentellen Stadium und vom Einsatz in der praktischen Medizin weit entfernt. Bei der hohen Anzahl von Deletionen von *TP53* bei PTCL NOS und EATCL könnte er jedoch besonders für die Behandlung fortgeschrittener Erkrankungen hier langfristig eine Bedeutung bekommen.

#### 4.6. *D13S25*

Bei PTCL NOS zeigten sich Verluste von *D13S25* in 7 von 30 Fällen (23%), bei EATCL in einem von neun Fällen (11%). Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Unsere Ergebnisse bestätigen eine Untersuchung von Rosenwald et al. (1999), die Deletionen von *D13S25* in 3 von 13 (23%) PTCL NOS fanden<sup>39</sup>. Schlegelberger et al. (1994) wiesen Monosomien von Chromosom 13 oder Aberrationen in 13q14 vor allem in den höhergradigen Fällen nach<sup>36</sup>. Weitere Untersuchungen an T-Zell-Lymphomen zeigten ebenfalls Verluste von Chromosom 13 oder seines langen Arms bei ALK-ALCL, T-PLL und ATCL (Tabelle 17)<sup>32,36-38,40,52,53,56,57</sup>.

Verluste in 13q spielen somit zwar bei PTCL NOS und EATCL wohl eine Rolle, allerdings hat *D13S25* vermutlich nicht die Bedeutung wie bei B-Zell-Lymphomen. Die relevante Region scheint eher in 13q21 zu liegen, die bei Zetl et al. (2004) die minimale überlappende Region darstellte und sich auch bei Renedo et al. (2001) andeutet<sup>52,53</sup>. In 13q21 liegen einige mögliche Kandidatengene. So sind Aberrationen von BRCA3 (breast cancer associated gene 3) mit Mammakarzinomen assoziiert. POU4F1 (pou domain, class 4 transcription factor 1) und LOC 390407 (ähnlich dem eukariotischen Transkriptionsfaktor 4a, Isoform 1) kodieren für Transkriptionsfaktoren.

KLF5 (kruppel-like factor 5) kodiert für ein Zink-Finger Protein und ist ein Tumorsuppressorgen.

#### 4.7. 6q21

Deletionen in 6q21 kommen bei PTCL NOS und EATCL vor. In dieser Untersuchung waren 6 von 30 PTCL NOS (20%) für 6q21 deletiert und 3 von 9 EATCL (33%). Die Häufigkeit ist in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Bemerkenswerterweise waren bei tetraploiden PTCL NOS fünf von acht Fällen für 6q21 deletiert gegenüber einem von 22 diploiden Fällen. Dieser Unterschied ist hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Bei EATCL fand sich ein derartiger Zusammenhang zwischen der Ploidie und der Häufigkeit von Deletionen nicht.

6q21 wurde bereits von einigen Autoren bei T-Zell-Lymphomen als deletierter Locus beschrieben<sup>36-38,53,72-74</sup>. Deletionen in 6q21 spielen anscheinend bei verschiedenen Gruppen der T-Zell-Lymphome eine Rolle.

Deletionen in 6q21 werden als sekundäre Aberrationen betrachtet, die mit der Progression assoziiert sind<sup>53</sup>. Schlegelberger et al. (1994) fanden sie signifikant häufiger bei den höhergradigen Fällen<sup>36</sup>. Auch in dieser Untersuchung wurden sie signifikant häufiger bei tetraploiden PTCL NOS beobachtet. Die Daten aus der vorliegenden Untersuchung unterstützen somit diese These.

Offit et al. (1991) fanden in einer Studie an Non-Hodgkin-Lymphomen einen schlechteren klinischen Verlauf mit einer kürzeren Überlebenszeit bei den Fällen mit einem Bruchpunkt im Bereich von 6q21-q25<sup>75</sup>. Da jedoch keine Einteilung in B- und T-Zell-Lymphome vorgenommen wurde, sind aus diesen Daten keine unmittelbaren Schlüsse für die T-Zell-Lymphome zu ziehen.

Das pathogenetisch relevante Gen ist bislang nicht bekannt<sup>73,74</sup>. Zhang et al. (2000) beschrieben eine 4-5Mb große Region, die in allen untersuchten T- und B-NHL deletiert war<sup>72</sup>. Die hier verwandten YACs 726d6 und 959b10 liegen in dieser Region. Mögliche Kandidatengene sind *TCBA1* (T-cell lymphoma breakpoint associated target 1), *CCNC* (cyclin C, ein Regulator des Zellzyklus), *AIM1* (absent in melanoma, Funktion bislang unbekannt) und *TLX* (auch NR2E1, ein Kernrezeptorprotein)<sup>72,73</sup>.

#### 4.8. 1ptel

Deletionen in 1ptel zeigten sich in 6 von 30 untersuchten PTCL NOS (20%). Bei EATCL zeigte nur einer von 9 Fällen (11%) Verluste in dieser Region. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand somit nicht.

Schlegelberger et al. (1994, 1994, 1996) und Lepetre et al. (2000) wiesen ebenfalls Deletionen in 1p32 nach <sup>36-38,40</sup>. Zettl et al. (2002, 2004) beschrieben sie weder bei PTCL NOS noch bei EATCL oder ALCL <sup>32,53</sup>. Auch bei T-PLL und ATCL wurden sie von Soulier et al. (2001) und Tsukasaki et al. (2001) nicht beobachtet <sup>56,57</sup>. Möglicherweise entgehen die Deletionen aufgrund ihrer Länge oder ihrer distalen Lage der CGH. Andernfalls wäre diese Aberration bei T-Zell-Lymphomen als spezifisch für PTCL NOS und EATCL anzusehen.

Offit et al. (1991) fanden in einer größeren zytogenetischen Arbeit Aberrationen in 1p32-36 in 14% der Non-Hodgkin-Lymphome <sup>75</sup>. Diese wurden allerdings nicht in B- und T-Zell-Lymphome unterschieden. Sie zeigten eine kürzere komplette Remissionszeit und eine kürzere Überlebenszeit in der Gruppe der Patienten mit Aberrationen in 1p32-36.

Als betroffenes Gen wird *p18<sup>INK4c</sup>*, das zu *p16<sup>INK4a</sup>* homolog ist, als mögliches Tumorsuppressorgen diskutiert <sup>76</sup>. Weitere Kandidaten könnten sein: *TALI* (T-cell acute lymphocytic leukemia) und *CDKN2C* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2C). *TALI* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten reguliert. *CDKN2C* dient als Regulator des Zellwachstums und kontrolliert die Progression in die G1 Phase des Zellzyklus.

#### 4.9. 7q35/36

Zugewinne in 7q35/36 fanden sich sowohl bei PTCL NOS als auch bei EATCL. Bei PTCL NOS wurden auch Verluste gefunden. Beide Entitäten unterschieden sich nicht signifikant bezüglich Gewinnen und Verlusten. Interessanterweise konnten in fünf Fällen bei PTCL NOS Trisomien gezeigt werden. Trisomien fanden sich bei allen anderen Loci nur in einzelnen Kernen und nicht klonal.

Zugewinne in 7q35/36 wurden auch in anderen Entitäten der T-NHL gezeigt <sup>32,36-38,40,51-53,56</sup>. Sie scheinen somit bei all diesen Malignomen eine gewisse Rolle zu spielen. Verluste wurden allerdings bislang nicht beschrieben. Die bereits erwähnten Trisomien

von 7/7q wurden auch von Schlegelberger et al. (1994) und Lepetre et al. (2000) gefunden<sup>36,40</sup>. In der Untersuchung von Schlegelberger et al. war die Bande 7q21 in allen Fällen mit einer Trisomie von 7q betroffen<sup>36</sup>. Sie waren signifikant häufiger bei den höhermalignen Fällen. Dies deutet auf eine Rolle von Aberrationen in 7q vor allem in der Progression hin.

Mögliche Kandidatengene sind *KIAA1862*, das bei der Transkriptionsregulation mitwirkt, *ABCF2*, das bei der DNS-Reparatur und Rekombination Einfluß nimmt, und *HLXB9*, ein Mitglied der Homeoboxgenfamilie.

#### 4.10. 12q21

Deletionen in 12q21 fanden sich sowohl bei PTCL NOS als auch bei EATCL in vergleichbaren Prozentsätzen (16 bzw. 22%). Es konnte somit in dieser Untersuchung kein Unterschied zwischen beiden Entitäten festgestellt werden.

Zettl et al. (2004) beschrieben Deletionen in 12q21 bei PTCL NOS und EATCL<sup>53</sup>. Sie fanden sie allerdings signifikant seltener bei EATCL, was sich in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigte<sup>32,53</sup>. Unter den T-Zell-Lymphomen sind Deletionen in 12q21 ansonsten bislang nicht oder nur in Einzelfällen beschrieben<sup>36-38,40,56,57</sup>. Somit unterscheiden sich PTCL NOS von ALCL, T-PLL und ATCL in Bezug auf Deletionen in 12q21. Ob dies auch für EATCL gilt, bleibt unklar.

Mögliche Kandidatengene in 12q21 sind die Apoptosegene *TDAG51* (T-cell death associated Gen 51) und *RAIDD/CRAD* (Casp1 and Ripk1 domain-containing adaptor with death domain) sowie *BTG1* (B-cell translocation gene), das die Proliferation von Lymphozyten reguliert<sup>53</sup>.

#### 4.11. *ATM*

Es zeigten sich bei PTCL NOS in einem geringen Prozentsatz (bis 10%) sowohl Gewinne als auch Verluste von *ATM1* und *ATM2*. Bei EATCL fand sich in einem Fall ein Verlust beider Loci. Untersucht wurde der *ATM*-Locus mit den Sonden *ATM1* und *ATM2*, die verschiedene Abschnitte des Gens repräsentieren. Ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von Aberrationen von *ATM* konnte somit nicht festgestellt werden. Aberrationen des *ATM*-Gens scheinen für beide Entitäten keine wesentliche Rolle zu spielen. Dieses Ergebnis wird bestätigt durch Zettl et al.

(2002,2004). Stilgenbauer et al. (1997) wiesen Deletionen des *ATM*-Gens mit Bänderungstechnik bei T-Prolymphozytischen Leukämien in 7 von 10 Fällen nach <sup>77</sup>. Mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung fanden sie monoallele Deletionen in 13 von 24 Fällen. Soulier et al. (2001) bestätigten diese Beobachtung <sup>56</sup>.

PTCL NOS und EATCL unterscheiden sich somit von T-PLL in Bezug auf Verluste von *ATM*. Ein Unterschied zu anderen Entitäten konnte nicht festgestellt werden.

Das Gen *ATM* (ataxia teleangiectasia mutated) liegt auf Chromosom 11 in q22.3-23.1. Es umfasst 150 kb, besteht aus 66 Exons und kodiert für ein Phosphoprotein des Zellkerns von etwa 660 Kilodalton <sup>77</sup>. Es hat eine Schlüsselbedeutung bei der Reparatur von durch physiologische Prozesse oder mutagene Stoffe verursachten DNA-Strangbrüchen <sup>65</sup>. Bei der Ataxia Teleangiectasia ist das *ATM*-Gen deletiert. Dies ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, die durch zerebelläre Ataxie, okulokutane Teleangiectasien, Immundefizite, genomische Instabilität und einer Prädisposition für die Entstehung von Malignomen, insbesondere B- und T-Zell Neoplasien gekennzeichnet ist <sup>77</sup>.

#### 4.2.12. 22q11

Verluste von 22q11 scheinen weder bei PTCL NOS noch EATCL eine wichtige Rolle zu spielen. Sie fanden sich in einem geringen Prozentsatz der PTCL NOS (10%, drei von 30). Die EATCL zeigten keine Deletionen. Deletionen von 22q11 wurden in keiner der anderen Studien an Untergruppen von T-Zell-Lymphomen beschrieben <sup>32,36-38,40,51-53,56,57</sup>. Sie wurden hier durch die Translokationssonde t(9;22)(q34;q11) zusammen mit 9q34 untersucht. Ob Veränderungen von 22q11 eine Rolle in der Pathogenese der PTCL NOS spielen, bleibt ungeklärt.

Tabelle 17: Zusammenstellung genetischer Daten von T-Zell-Lymphomen in der Literatur (MOR = minimale überlappende Region)

Chromosom	MOR bei CGH	PTCL (Zettl <sup>53</sup> ) (n=36)	ALK-ALCL (Zettl <sup>53</sup> ) (n=13)	EATCL (Zettl <sup>32</sup> ) (n=38)	T-PLL (Soulier <sup>56</sup> ) (n=22)	aggressive ATCL (Tsukasaki <sup>57</sup> ) (n=46)	indolente ATCL (Tsukasaki <sup>57</sup> ) (n=18)	PTCL REAL (Lepetrec <sup>40</sup> ) (n=71)	T-NHL NOS (Renedo <sup>52</sup> ) (n=37)
Trisomie 5								14%	
+5q	5q34-35			7 18%					
-5q	5q21-22	9 25%	0 0%	1 3%	1 4%	4 9%			
-6q	6q21-q22	11 31%	4 31%	3 8%	8 36%	9 20%	2 11%	19%	
Trisomie 7								14%	
7q	7q22-qter	11 31%	1 8%	9 24%	2 9%	15 33%	6 33%		8%
+9q	9q33-qter	7 19%	0 0%	22 58%	0 0%	6 13%	1 6%		10%
-9q						4 9%	2 11%		
+11q				3 8%		7 15%			8%
-11q	11q22-qter	3 8%	2 15%	4 11%	15 68%				
+12q						3 7%			
-12q	12q21-q22	10 28%	1 8%	1 3%	0 0%	(1 2%)			
-13								14%	10%
-13q	13q21	13 36%	3 23%	9 24%	9 41%	8 17%			
+17									10%
-17p		6 17%			5 23%				
+22q12-qter					9 41%				
-22q11									

## 5.) Zusammenfassung

Bei T-Zell-Lymphomen sind im Gegensatz zu B-Zell-Lymphomen wenige spezifische genetische Aberrationen bekannt. In dieser Arbeit wurden 39 periphere T-Zell-Lymphome (30 PTCL NOS und 9 EATCL) mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung untersucht. Es wurde ein Screening auf Aberrationen vorgenommen, die zu einem Teil bei B-Zell-Lymphomen eine Rolle spielen, zum anderen bereits für T-Zell-Lymphome beschrieben wurden.

Alle untersuchten EATCL wiesen Zugewinne in 9q34 auf. Diese waren signifikant häufiger bei EATCL als bei PTCL NOS. Diese Ergebnisse decken sich mit den CGH-Untersuchungen von Zetl et al.(2002,2004). Ein Vergleich mit Daten aus der Literatur zeigt, daß diese Zugewinne unter peripheren T-Zell-Lymphomen gegenwärtig als spezifisch für EATCL anzusehen sind. Dies ist die erste beschriebene spezifische Aberration bei EATCL. Das Philadelphiachromosom mit der Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$ , das bei der chronisch myeloischen Leukämie gefunden wird, wurde bei EATCL nicht nachgewiesen. Welches das relevante Gen in der Region 9q34 ist, ist noch nicht geklärt. Inwiefern Amplifikationen des *NOTCH1*-Gen für die Pathogenese der EATCL eine Rolle spielen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Bei PTCL NOS fand sich in 30% der Fälle eine Deletion im langen Arm von Chromosom 5. Dabei war in jedem Fall die Bande 5q21/22 betroffen. Es zeigte sich eine Tendenz zu häufigeren Deletionen von 81c5 als vom proximal gelegenen *APC*-Gen und in 5q31. Bei den diploiden Fällen war dieser Unterschied statistisch signifikant. Es ist somit anzunehmen, daß der Genlocus distal des *APC*-Gens und proximal von 5q31 in der Nähe von 81c5 liegt. Verluste in 5q21/22 sind bislang bei T-Zell-Lymphomen nur im Rahmen einer CGH-Studie für PTCL NOS beschrieben worden. Nach unseren Daten scheinen sie bei EATCL keine Rolle zu spielen.

Deletionen in 6q21 und von *TP53* spielen als sekundäre Aberrationen sowohl bei PTCL NOS als auch bei EATCL eine Rolle. Bei PTCL NOS waren sie signifikant häufiger bei den tetraploiden Fällen zu finden. So waren Deletionen von *TP53* bei allen tetraploiden Fällen nachzuweisen. Ein Zusammenhang mit der Progression der Tumoren kann vermuten werden. Dieser Unterschied zwischen diploiden und tetraploiden Fällen fand sich bei EATCL nicht.

Aberrationen von *ATM*, die bei B-Zell-Lymphomen beschrieben wurden, haben bei PTCL NOS und EATCL nach den vorliegenden Daten keine Bedeutung. Bezüglich Deletionen von *ATM* unterscheiden sich PTCL NOS und EATCL signifikant von T-PLL, bei denen Deletionen von *ATM* beschrieben wurden.

Deletionen von *D13S25* wurden zwar sowohl bei PTCL NOS als auch bei EATCL gefunden. Allerdings zeigt ein Vergleich mit der Literatur, dass die minimale überlappende Region der Deletionen eher distal in Bande 13q21 zu suchen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung spezifische Aberrationen bei PTCL NOS und EATCL beschrieben werden. Zudem konnten weitere Aberrationen nachgewiesen werden, die bei diesen Entitäten eine Rolle in der Pathogenese zu spielen scheinen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um ihre Bedeutung in der Diagnostik und Therapie der Malignome zu klären.

## 6.) Literaturverzeichnis

1. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House Virginia, November 1997. *Journal Clinical Oncology*. 1999;17:3835-3849
2. Rüdiger T, Weisenburger DD, Anderson JR, Armitage JO, Diebold J, MacLennan KA, Nathawani BN, Ullrich F, Muller-Hermelink HK. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol*. 2002;13:140-149
3. Su I-J, Wang C-H, Cheng A-L, Chen Y-C, Hsieh H-C, Chen C-J, Tien H-F, Woei-Tsay, Huang S-S, Hu C-Y, Chen P-J, Chen J-Y, Hsu H-C, Chuang S-M, Shen M-C, Kadin ME. Characterization of the spectrum of postthymic T-cell malignancies in Taiwan. *Cancer*. 1988;61:2060-2070
4. Rüdiger T, Müller-Hermelink HK. Die WHO-Klassifikation maligner Lymphome. *Radiologe*. 2002;12:936-942
5. Ralfkider E, Müller-Hermelink H K., Jaffe E S. Peripheral T-cell lymphoma, unspecified, World Health Organization Classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press. 2001:227-229
6. Gisselbrecht C, Gaulard P, Lepage E, Coiffier B, Briere J, Haioun C, Cazals-Hatem D, Bosly A, Xerri L, Tilly H, Berger F, Bouhabdallah R, Diebold J. Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1998;92:76-82
7. Isaacson PG, Wright DH. Intestinal lymphoma associated with malabsorption. *Lancet*. 1978;1:67-70
8. Isaacson PG, Wright D, Ralfkiaer E, Jaffe ES. Enteropathy-type T-cell lymphoma. World Health Organization Classification of Tumours. Tumours of the hematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press. 2001:208-209
9. Wright DH. Enteropathy associated T cell lymphoma. *Cancer Surv*. 1997;30:249-261
10. Gale J, Simmonds PD, Mead GM, Swetenham JW, Wright DH. Enteropathy-type T-cell lymphoma: clinical features and treatment of 31 patients in a single institution. *Journal Clinical Oncology*. 2000;18:795-703
11. Project The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification. A clinical evaluation of the international lymphoma study group classification of Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;89:3909-3918
12. Evens AM, Gartenhaus RB. Molecular etiology of mature T-cell Non-Hodgkins-Lymphomas. *Frontiers in Bioscience*. 2003;8:156-175
13. Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*. Edition Wiley-Liss;2nd Edition
14. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*. 2003;111:1220-1235
15. Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, Ott MM, Müller-Hermelink HK. The t(11;18)(q21;q21) Chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not in high-grade malignant Non-Hodgkin's lymphomas of the Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type. *Cancer Research*. 1997;57:3944-3948

16. Dierlamm J, Baens M, Stefano-Ouzounova M, Hinz K, Wlodarska I, Maes B, Steyls A, Driessen A, Verhoef G, Gaulard P, Hagemeijer A, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Marynen P. Detection of the t(11;18)(q21;q21) by interphase fluorescence in situ hybridization using API2 and MLT specific probes. *Blood*. 2000;96:2215-2218
17. Kalla J, Stilgenbauer S, Schaffner C, Wolf S, Ott G, Greiner A, Rosenwald A, Dohner H, Müller-Hermelink HK, Lichter P. Heterogeneity of the API2-MALT1 gene rearrangement in MALT-type lymphoma. *Leukemia*. 2000;14:1967-1974
18. Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefano-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A, van den Berghe H, Marynen P. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood*. 1999;93:3601-3609
19. Isaacson P G, Du M-Q. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nature*. 2004;4:633-653
20. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *New England Journal of Medicine*. 1993;329:1318-1327
21. Du MQ, Peng H, Singh N, Isaacson PG, Pan L. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood*. 1995;86:4587-4593
22. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993;90:10914-10921
23. Marshall C. Tumor suppressor genes. *Cell*. 1991;64:313-326
24. Møller MB, Gerdes A-M, Skjødt K, Mortensen LS, Pederson NT. Disrupted p53 function as predictor of treatment failure and poor prognosis in B- and T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 1999;5:1085-1091
25. Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, Raffeld M. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood*. 1993;82:1994-2004
26. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, Kato H, Nagai H, Tsushita K, Saito H, Hotta T. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 1997;337:529-534
27. Pescarmona E, Pignoloni P, Puopolo M, Martelli M, Adesso M, Guglielmi C, Baroni CD. p53 over-expression identifies a subset of nodal peripheral T-cell lymphomas with a distinctive biological profile and poor clinical outcome. *Journal of Pathology*. 2001;195:361-366
28. Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, Weisenburger DD. p53 Mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood*. 1996;87:4302-4310
29. Hernandez L, Fest T, Carzola M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardesa A, Jaffe ES, Campo E, Raffeld M. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*. 1996;87:3351-3359
30. el Roubi S, Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, Newcomb EW. p53 gene mutation in B-cell lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood*. 1993;82:3452-3459
31. Brido-Babapulle V, Pomfret M, Matutes E, Catovsky D. Cytogenetic studies on prolymphocytic leukemia II T cell prolymphocytic leukemia. *Blood*. 1987;4:926-931

32. Zettl A, Ott G, Makulik A, Katzenberger T, Starosik P, Eichler T, Puppe B, Bentz M, Mueller-Hermelink HK, Chott A. Chromosomal gains at 9q characterize enteropathy-type T-cell lymphoma. *American Journal of Pathology*. 2002;161:1635-1645
33. Salhany KE, Feldman M, Peritt D, Nowell PC. Cytotoxic T-lymphocyte differentiation and cytogenetic alterations in gammadelta hepatosplenic T-cell lymphoma and posttransplant lymphomoproliferative disorders. *Blood*. 1997;89:3490-3491
34. Kumaravel TS, Tanaka K, Arif M, Ohshima K, Ohgami A, Takeshita M, Kikuchi M, Kamada N. Clonal identification of trisomie 3, 5 and X in angioimmunoblastic lymphandepathy with dysproteinemia by fluorescence in situ hybridization. *Leukemia Lymphoma*. 1997;24:523-532
35. Rimokh R, Magaud JP, Berger F, Samarut J, Coiffier B, Germain D, Mason DY. A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ('Ki-1 lymphoma'). *Br J Haematology*. 1989;71:31-36
36. Schlegelberger B, Himmler A, GÖdde E, Grote W, Feller AC, Lennert K. Cytogenetic findings in peripheral T-cell lymphomas as a basis for distinguishing low-grade and high-grade lymphomas. *Blood*. 1994;83:505-511
37. Schlegelberger B, Himmler A, Bartels H, Kuse R, Sterry W, Grote W. Recurrent chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphomas. *Cancer Genetic Cytogenetic*. 1994;78:15-22
38. Schlegelberger B, Feller AC. Classification of peripheral T-cell lymphomas: cytogenetic findings support the updated Kiel classification. *Leukemia Lymphoma*. 1996;20:411-416
39. Rosenwald A, Ott G, Krumdiek AK, Dreyling MH, Katzenberger T, Kalla J, Roth S, Ott MM, Mueller-Hermelink HK. A biological role for deletions in chromosomal band 13q14 in mantle cell and peripheral T-cell lymphomas? *Genes, Chromosomes & Cancer*. 1999;26:210-214
40. Lepetre S, Buchonnet G, Stamatoullas A, Lenain P, Duval C, d'Anjou J, Callat MP, Tilly H, Bastard C. Chromosomal abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Genetic Cytogenetic*. 2000;117:71-79
41. Stilgenbauer S, Winkler D, Ott G, Schaffner C, Leupolt E, Bentz M, Möller P, Müller-Hermelink HK, James MR, Lichter P, Döhner H. Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenetic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood*. 1999;94:3262-3264
42. Chott A, Haedicke W, Mosberger I, Födinger M, Winkler K, Mannhalter C, Müller-Hermelink HK. Most CD 56+ intestinal lymphomas are CD 8+ CD5-T-cell lymphomas of morphologic small to medium size histology. *American Journal of Pathology*. 1998;153:1483-1490
43. Katzenberger T. Anwendung und Interpretation verschiedener FISH-Techniken in der Lymphom- und Leukämiediagnostik. Skript Internationale Akademie für Pathologie. 2005
44. Kearney L. Review: The impact of the new FISH technologies on the cytogenetics of the haematological malignancies. *Br. J of Haematology*. 1999;104:648-658
45. Lengauer C, Green ED, Cremer T. Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after Alu PCR amplifikation. *Genomics*. 1992;13:826-828

46. Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P. Minimal size deletion detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosome Cancer*. 1998;21:172
47. Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldmann FM, Gray JW, Pinkel D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosome Cancer*. 1994;10:231-243
48. Ott G. Molekulare Diagnostik in der Hämatopathologie. *Pathologe*. 2002;23:174-176
49. Müller-Hermelink HK, Zettl A, Pfeifer W, Ott G. Pathology of lymphoma progression. *Histopathology*. 2001;38:285-306
50. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253:49-53
51. Baumgärtner AK, Zettl A, Ott G, Müller-Hermelink HK, Starostik P. High frequency of genetic aberrations in enteropathy-type T-lymphoma. *Lab Invest*. 2003;83:1509-1516
52. Renedo M, Martinez-Delgado B, Arranz E, Garcia MJ, Urioste M, Martinez-Ramirez A, Rivas C, Cigudosa JC, Benitez J. Chromosomal changes pattern and gene amplification in T cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2001;15:1627-1632
53. Zettl A, Rüdiger T, Konrad M-A, Chott A, Simonitsch-Klupp I, Sonnen R, Müller-Hermelink HK, Ott G. Genomic profiling of Peripheral T-cell lymphoma, unspecified, and anaplastic large T-cell lymphoma delineates novel recurrent chromosomal alterations. *American Journal of Pathology*. 2004;164:1837-1848
54. Weidmann E, Gramatzki M, Wilhelm M, Mitrou PS. Diagnosis and actual therapy strategies in peripheral T-cell lymphomas: summary of an international meeting. *Annals of Oncology*. 2004;15:369-374
55. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of the haematopoietic lymphoid tissue. IARC Press. 2001
56. Soulier J, Pierron G, Vecchione D, Garand R, Brizard F, Sigaux F, Stern MH, Aurias A. A complex pattern of recurrent chromosomal losses and gains in T-cell prolymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2001;31:248-254
57. Tsukasaki K, Krebs J, Nagai K, Tomonaga M, Koeffler P, Bartam CR, Jauch A. Comparative genomic hybridization analysis in adult T-cell leukemia/lymphoma: correlation with clinical course. *Blood*. 2001;97:3875-3881
58. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. Tan1, the homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by the chromosomal translocations in T lymphoblastic lymphoma. *Cell*. 1991;66:649-661
59. Napolitano G, Majello B, Lania L. Role of cyclinT/Cdk9 complex in basal and regulated transcription. *Int J Oncol*. 2002;21:171-177
60. Pane F, Intrieri M, Quantarelli C, Izzo B, Muccioli GC, Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*. 2002;21:8652-8667
61. Xu HK, Baldassare M, Fisher P, Rathbun G, Oltz EM, Yancopoulos GD, Jessell TM, Alt FW. LH-2: a LIM/homeodomain gene expressed in developing lymphocytes and neural cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1993;90:227-231
62. Hobert O, Westphal H. Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet*. 2000;16:75-83

63. Cejkova P, Zettl A, Baumgärtner AK, Chott A, Ott G, Müller-Hermelink HK, Starostik P. Amplification of NOTCH1 and ABL1 gene loci is a frequent aberration in enteropathy-type T-cell lymphoma. *Virchows Archiv*. 2005;446:416-420
64. Ueno K, Kumagai T, Kijima T, Kishimoto T, Hosoe S. Cloning and tissue expression of cDNAs from chromosome 5q21-22 which is frequently deleted in advanced lung cancer. *Human Genetics*. 1998;102:63-68
65. Dasika GK, Lin S-CJ, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY-HP. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand repair in development and tumorigenesis. *Oncogene*. 1999;18:7883-7899
66. Pescarmona E, Pignoloni P, Santangelo C, Naso G, Realacci M, Cela O, Lavinia AM, Martelli M, Russo MA, Baroni CD. Expression of p53 and retinoblastoma gene in high-grade nodal peripheral T-cell lymphomas: immunohistochemical and molecular findings suggesting different pathogenetic pathways and possible clinical implications. *Journal of Pathology*. 1999;188:400-406
67. Kanavaros P, Bai M, Stefanaki K, Poussias G, Rontogianni D, Zioga E, Gorgoulis V, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of the p53, mdm2, p21/Waf-1, Rb, Ki67, cyclin D1, cyclin A and cyclin B1 proteins and apoptotic index in T-cell lymphomas. *Histol Histopathol*. 2001;16:377-386
68. Matsushima A, Cesarman E, Chadburn A, Knowles DM. Post-Thymic T cell lymphomas frequently overexpress p53 protein but infrequently exhibit p53 gene mutations. *American Journal of Pathology*. 1994;144:573-584
69. Murray A, Cuevas EC, Jones DB, Wright DH. Study of the immunohistochemistry and T cell clonality of enteropathy-associated T cell lymphoma. *American Journal of Pathology*. 1995;146:509-519
70. Lane D. Curing cancer with p53. *New England Journal of Medicine*. 2004;350:2711-2712
71. Snyder EL, Meade BR, Saenz CC, Dowdy SF. Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide. *PLoS Biol*. 2004;2:186-193
72. Zhang Y, Matthiesen P, Harder S, Siebert R, Castoldi G, Calasanz MJ, Wong KF, Rosenwald A, Ott G, Atkin NB, Schlegelberger B. A 3cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2000;27:52-58
73. Tagawa H, Miura I, Suzuki R, Suzuki H, Hosokawa Y, Seto M. Molecular cytogenetic analysis of the breakpoint at 6q21-22 in T-cell lymphoma/leukemia cell lines. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2002;34:175-185
74. Hatta Y, Yamada Y, Tomonaga M, Miyoshi I, Said JW, Koeffler HP. Detailed mapping of the long arm of chromosome 6 in adult T-cell leukemia. *Blood*. 1999;93:613-616
75. Offit K, Wong G, Filippa DA, Tao Y, Chaganti RSK. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of Non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood*. 1991;77:1508-1515
76. Mori N, Morosette R, Spira S, Lee S, Ben-Yehuda D, Schiller G, Landolfi R, Mizoguchi H, Koeffler HP. Chromosome Band 1p36 Contains a Putative Tumor Suppressor Gene Important in the Evolution of Chronic Myelocytic Leukemia. *Blood*. 1998;92:3405-3409

77. Stilgenbauer S, Schaffner C, Litterst A, Liebisch P, Gilad S, Bar-Shira A, James MR, Lichter P, Döhner H. Biallelic mutations in the ATM gene in T-prolymphocytic leukemia. *Nature Medicine*. 1997;3:1155-1159

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name, Vorname: Eichler, Thorsten  
Geburtsdatum: 08.02.1977  
Geburtsort: Münster  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Adresse: Bühlstr. 20, Hinterhaus  
37073 Göttingen  
Telefon: 0551-2500945  
E-Mail: teichler77@yahoo.de

## Beruflicher Werdegang

Seit 1. Dezember 2004: wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Georg-August-Universität Göttingen

## Hochschulausbildung

August 2005: Clinical skills exam (praktischer Abschnitt USMLE)  
November 2004: Approbation  
November 2004: Drittes Staatsexamen  
September 2004: Zweiter Abschnitt USMLE  
September 2003: Zweites Staatsexamen  
Januar 2002: Erster Abschnitt USMLE  
März 2001: Erstes Staatsexamen  
März 2000: Physikum  
April 1998-November 2004: Studium der Humanmedizin  
Oktober 1997- Februar 1998: Studium der Chemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

## Schulbildung

1989-1996: Gymnasium Antonianum Vechta  
1988-1989: Orientierungsstufe Vechta  
1987-1988: Orientierungsstufe Oesede  
1983-1987: Grundschule Dröper

## Wissenschaftliche Arbeit

Seit April 2001: Doktorarbeit am Institut für Pathologie Würzburg, Arbeitsgruppe Prof Dr.German Ott  
Thema: Analyse struktureller und numerischer chromosomaler Aberrationen peripherer T-Zell-Lymphome (PTCL NOS) und Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphome (EATCL) mittels Fluoreszenz-In-Situ  
Veröffentlichung: „Chromosomal gains at 9q characterize enteropathy-type T-cell lymphoma“ Zettl et al., American Journal of Pathology, 161: 1635-1645 (2002)

## Sprachenkenntnisse

Deutsch: Muttersprache  
Englisch: fließend  
Latein: grosses Latinum

# Danksagung

Ich danke meinen Eltern für liebevolle Begleitung und Nachsicht,  
Irina Eichelbrönnner für unermüdliche Unterstützung,  
Tiemo Katzenberger,  
meinem Doktorvater German Ott  
und der Frau, die mir alles bedeutet.