

**Identifizierung von pathogenetisch relevanten Genen
bei lymphatischen Neoplasien unter besonderer Berücksichtigung
des langen Arms von Chromosom 14**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Inga Nagel

Kiel 2009

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Arnold

Koreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2009

Zum Druck genehmigt: 23.09.2009

gez. Prof. Dr. rer. nat. Lutz Kipp, Dekan

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der Tumorentstehung	1
1.2	Hämatologische Neoplasien	3
1.2.1	Lymphozytenentwicklung und -reifung	4
1.2.2	Physiologische Rearrangements des Immunglobulinschwerketten-Locus bei der Lymphozytenentwicklung	5
1.2.3	Klassifikation lymphatischer Neoplasien	8
1.2.4	Wiederkehrende genetische Veränderungen bei B-Zell-Lymphomen	11
1.2.5	Veränderungen des Chromosoms 14 bei B-Zell-Lymphomen	14
1.2.5.1	Aberrante Rearrangements der Immunglobulingene	14
1.2.5.2	Deletionen des Chromosoms 14	18
1.3	Zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden zum Nachweis chromosomaler Aberrationen in hämatologischen Neoplasien	19
1.3.1	Konventionelle Zytogenetik	19
1.3.2	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	21
1.3.3	Array-CGH	23
1.4	Fragestellung	24
2	Material	26
2.1	Tumormaterial	26
2.1.1	Tumormaterial für das Screening zur Identifizierung der t(5;14)(p15;q32) und ihrer Varianten	26
2.1.2	Tumormaterial für das Screening zur Identifizierung von die <i>CCNE1</i> -Region betreffende Aberrationen	27
2.1.3	Tumormaterial für das Screening zur Identifizierung von die <i>SPIB</i> -Region betreffende Aberrationen	27

Inhaltsverzeichnis

2.1.4	Tumormaterial für das Screening zur Identifizierung von Aberrationen in 14q24 ...	27
2.1.5	Zelllinien	28
2.2	Material für Kontrolluntersuchungen	28
2.3	Geräte und Software	29
2.4	Reagenzien, Chemikalien und Enzyme	30
2.5	Puffer und Lösungen	33
2.6	Kits.....	37
2.7	Bacterial Artificial Chromosome (BAC)- und Fosmid-Klone für die Herstellung locusspezifischer FISH-Sonden.....	38
2.8	Kommerzielle FISH-Assays	40
2.9	Sonden-Kombinationen der verwendeten FISH-Assays	41
2.10	Kommerzielle Microarrays	41
2.11	Custom-Arrays.....	41
2.12	Antikörper	42
2.13	Primer.....	42
2.13.1	Primer für die DHPLC-Analyse.....	43
2.13.2	Primer für die Bruchpunktklonierungen	44
2.13.3	Primer für die Kolonie-PCR	45
2.13.4	Primer für die Überprüfung der cDNA	45
2.13.5	Primer für die Mutationsanalyse von <i>ZFP36L1</i>	46
2.13.6	Primer und Proben für die quantitative RT-PCR	46
3	Methoden	48
3.1	Vorbereitung des Probenmaterials.....	48
3.1.1	DNA-Extraktion.....	48
3.1.2	DNA-Quantifizierung.....	48
3.1.3	RNA-Extraktion.....	48
3.1.4	RNA-Quantifizierung	49

Inhaltsverzeichnis

3.1.5	Protein-Extraktion	50
3.1.6	Protein-Quantifizierung	51
3.2	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	51
3.2.1	Isolierung der BAC-/Fosmid-DNA aus einer Bakterienkultur.....	51
3.2.2	Fluoreszenzmarkierung der DNA mittels Random Priming	52
3.2.3	Aufreinigung der DNA-Sonden.....	52
3.2.4	Ethanol-Fällung mit Cot-1-DNA.....	53
3.2.5	Vorbereitung der Objektträger	53
3.2.6	Hybridisierung	54
3.2.7	Waschen und DAPI-Färbung	54
3.2.8	Auswertung	55
3.2.9	Überprüfung der FISH-Sonden.....	55
3.2.10	Bestimmung der Nachweisgrenzen der etablierten FISH-Assays.....	55
3.3	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung an Paraffinschnitten.....	56
3.3.1	Vorbereitung der Paraffinschnitte	56
3.3.2	Hybridisierung auf Paraffinschnitte	57
3.3.3	Waschen, DAPI-Färbung und Auswertung.....	57
3.4	Array-CGH.....	57
3.5	Molekulargenetische Methoden	60
3.5.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	60
3.5.2	Auftrennung und Dokumentation der PCR-Produkte.....	61
3.5.3	Aufreinigung der PCR-Produkte	62
3.5.4	Isolierung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel.....	62
3.5.5	Klonierung von PCR-Produkten.....	63
3.5.6	Long Distance PCR zur Bruchpunktklonierung.....	65
3.5.7	Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC).....	69

Inhaltsverzeichnis

3.5.8	Surveyor-Nukleaseverdau mit anschließender Größenbestimmung	72
3.5.9	DNA-Sequenzierung	73
3.5.10	VDJ-Mutationsanalyse	75
3.5.11	Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA.....	75
3.5.12	Quantitative Reverse Transkription PCR.....	76
3.5.13	RT-PCR zur Identifizierung von Fusionstranskripten.....	78
3.6	Westernblot-Analyse	79
3.7	Statistische Berechnungen.....	83
4	Ergebnisse	84
4.1	Charakterisierung der Translokation t(5;14)(p15;q32).....	84
4.1.1	Screening von Lymphomen und Leukämien auf Aberrationen in der Region 5p15.33 mittels FISH	85
4.1.2	Bruchpunkteingrenzung in der <i>TERT-CLPTM1L</i> -Region unter Verwendung von Fosmid-Klonen	90
4.1.3	Custom-Array-CGH an Fällen mit deletionsassoziiertes Translokation in 5p15.33 ...	93
4.1.4	Expressionsanalyse von <i>TERT</i> mittels quantitativer RT-PCR.....	94
4.1.5	Bestimmung der Telomerase-Aktivität in Fällen mit Translokation unter Beteiligung der <i>TERT-CLPTM1L</i> -Region mittels TRAP-Assay.....	96
4.2	Charakterisierung von Translokationen t(14;19).....	97
4.2.1	Bruchpunktklonierung der Translokation t(14;19)(q32;q12)	97
4.2.2	Expressionsanalyse von Cyclin E1 mittels Westernblot und Immunhistochemie	99
4.2.3	Screening von Diffus großzelligen B-Zell Lymphomen auf Aberrationen in der Region um <i>CCNE1</i> mittels FISH	100
4.2.4	Screening von Diffus großzelligen B-Zell Lymphomen vom aktivierten B-Zell-Typ auf Aberrationen in der <i>SPIB</i> -Region mittels FISH	101
4.3	Charakterisierung der Deletion del(14)(q24q32).....	103
4.3.1	Identifizierung der del(14)(q24q32) mittels Array-CGH	104

Inhaltsverzeichnis

4.3.2	Eingrenzung der Bruchpunktregion in 14q24 mittels FISH.....	106
4.3.3	Screening von Lymphomen und Leukämien auf Aberrationen in der Region 14q24 um <i>ZFP36L1</i> mittels FISH.....	108
4.3.3.1	Screening mit dem <i>ZFP36L1</i> -Assay 1	108
4.3.3.2	Screening mit dem <i>ZFP36L1</i> -Assay 2	111
4.3.4	Bruchpunktklonierung der Deletion del(14)(q24q32)	113
4.3.5	Custom-Array-CGH an Fällen mit Deletion del(14)(q24q32)	117
4.3.6	Identifizierung von <i>ZFP36L1-IGH</i> -Fusionstranskripten	119
4.3.7	Variantveränderungen in Lymphomen mit Bruch in der Region 14q24.....	122
4.3.8	Expressionsanalyse von <i>RAD51L1</i> und <i>ZFP36L1</i> mittels quantitativer RT-PCR	125
4.3.9	Mutationsanalyse von <i>ZFP36L1</i>	127
4.3.10	Zusätzliche genetische Veränderungen der del(14)(q24q32)-positiven Lymphome.....	128
4.3.11	Screening der del(14)(q24q32)-positiven Fälle auf homozygote Deletionen des <i>TRAF3</i> -Gens.....	131
4.3.12	Bestätigung der homozygoten Deletionen mittels Array-CGH.....	133
4.3.13	<i>TRAF3</i> -Mutationsanalyse mittels DHPLC und anschließender Sequenzierung aberranter Fragmente.....	134
4.3.14	<i>TRAF3</i> -Expressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR	138
4.3.15	Westernblot-Analyse des TRAF3-Proteins	140
5	Diskussion	143
5.1	Methodische Aspekte der Bruchpunktkartierung	144
5.1.1	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung zur Eingrenzung von Bruchpunkten.....	144
5.1.2	Array-CGH zur Eingrenzung von Bruchpunkten.....	145
5.1.3	Klonierung von Bruchpunkten mittels verschiedener PCR-Techniken und anschließender Sequenzierung.....	146

Inhaltsverzeichnis

5.2	Die neu identifizierten Kandidatenonkogene und ihre mögliche Bedeutung für die Lymphom-Pathogenese	149
5.2.1	<i>TERT</i> als Onkogen der Region 5p15.33	149
5.2.2	<i>CCNE1</i> als Onkogen, das durch die Translokation t(14;19)(q32;q12) dereguliert wird	154
5.2.3	Die Translokation t(14;19)(q32;q13.4) und Variantveränderungen in ABC-DLBCL.	156
5.2.4	Potentielle Onkogene in der Chromosomenregion 14q24.1.....	157
5.3	<i>TRAF3</i> als Tumorsuppressorgen in der Region 14q32	164
5.4	Fazit	169
5.5	Ausblick	170
6	Zusammenfassung	172
7	Summary	174
8	Referenzen	176
9	Anhang	197
10	Danksagung	221
11	Lebenslauf	223
12	Publikationsliste	224
13	Erklärung	227

Abkürzungen

Abkürzungen

A	Adenin
aa	amino acids (Aminosäuren)
ABC-DLBCL	activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma (Diffus großzelliges B-Zell Lymphom vom aktivierten B-Zell-Typ)
ACP	Annealing Control Primer (Spezifische Primer)
add	addition of unknown material (angefügtes Chromosomenmaterial unbekannter Herkunft)
ALCL	anaplastic large cell lymphoma (Anaplastisch großzelliges Lymphom)
ALL	acute lymphocytic leukemia (Akute lymphatische Leukämie)
AML	acute myeloid leukemia (Akute myeloische Leukämie)
amp	Amplifikation
API2	apoptosis inhibitor 2 (Apoptose Inhibitor 2)
ARE	AU-rich element (AU-reiche Sequenz)
Arg	Arginin
Array-CGH	microarray-based Comparative Genomic Hybridization (Microarray-basierte vergleichende Genomhybridisierung)
ATM	ataxia telangiectasia mutated (Gen, welches bei der Ataxia telangiectasia mutiert ist)
b	blau
BAC	Bacterial Artificial Chromosome (künstliches Bakterienchromosom)
B-CLL	B-cell chronic lymphocytic leukemia (Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ)
B-NHL	B-cell Non-Hodgkin lymphoma (B-Zell Non-Hodgkin Lymphom)
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Serumalbumin vom Rind)
C (Aminosäure)	Cystein
C (Genabschnitte)	Constant (<i>IG</i> -Genabschnitte)
C (Nukleotid)	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation (Differenzierungsmerkmal)
Cdk2	cyclin-dependent kinase 2 (Cyclin-abhängige Kinase)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)

Abkürzungen

CEP	Chromosome Enumeration Probe (Chromosomen-spezifische Probe)
CF RFU	Curve Fit Relative Fluorescence Units (Fluoreszenzeinheit)
CLPTM1L	cleft lip and palate transmembrane 1 like (Gen, welches für das Lippen-Kiefer-Gaumenspalte-Transmembran 1-ähnliche Protein codiert)
CGH	Comparative Genomic Hybridization (vergleichende Genomhybridisierung)
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, ®Oncovin, Prednisolon
CpG	Cytosin-(Phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CT	Cycle Treshold (Schwellenwert-Zyklus)
CTD	Caltech D
CTD	C-terminal domain (C-terminale Domäne)
Cy3	Cyanin-Farbstoff 3
Cy5	Cyanin-Farbstoff 5
D	Diversity (IG-Genabschnitte)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	Diamidinophenylindol
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotid-Triphosphat
DEAC	Diethylaminomethyl coumarin
del	Deletion
der	derivatives Chromosom
DGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
dH₂O	destilliertes Wasser
DHPLC	Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie)
dist	distal
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma (Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribokleinsäure-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol

Abkürzungen

dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
E	Enhancer
ECF	Enhanced Chemifluorescence (Erhöhte Chemifluorescence)
ECL	Enhanced Chemiluminescence (Erhöhte Chemiluminescence)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay (Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay)
FGF	Basic fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization (Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung)
FL	follicular lymphoma (Follikuläres Lymphom)
g	grün
G	Guanin
G-Bänderung	Chromosomenbänderungsverfahren mit Giemsa
GCB-DLBCL	germinal center diffuse large B-cell lymphoma (Diffus großzelliges B-Zell Lymphom vom Keimzentrums-Typ)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (Granulozyten und Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor)
G6PD	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
GUSB	β-Glucuronidase
HD	High definition (Spezifische Oligonukleotide der Array-CGH)
HG	Human Genome (Humanes Genom)
H	Histidin
HPRT1	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1
HSR	Homogeneously staining region (Gleichmäßige Anfärbbarkeit eines chromosomalen Abschnitts durch DNA-Amplifikation)
Ig	Immunglobulin (Protein)
IG	Immunglobulin (Gen)
IGH	Immunglobulin heavy chain (Immunglobulinschwerketten)

Abkürzungen

IGK	Immunglobulin kappa
IGL	Immunglobulin lambda
IL	Interleukin
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Internationale Nomenklatur für die Beschreibung zytogenetischer Befunde)
J	Joining (Genabschnitte)
kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
Ko	Kolokalisation
LB	Luria Broth (Bakterienmedium)
LD-PCR	Long Distance PCR (PCR über lange Distanzen)
LDI-PCR	Long Distance Inverse PCR (Inverse PCR über lange Distanzen)
LK	Lymphknoten
LLMPP	Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project
LM	Ligation mediated PCR (Ligations-vermittelte PCR)
LSI	Locus Specific Identifier (Locus-spezifische Sonde)
lym	Lymphom
m	männlich
MALT	Mucosa-associated Lymphoid Tissue (Schleimhaut-assoziiertes lymphoides Gewebe)
Mb	Megabasen
MCL	Mantelzell-Lymphom
miRNA	microRNA
MM	Multiple Myelom
mRNA	messenger RNA
MSP	methylation specific PCR (Methylierungs-spezifische PCR)
MZL	Marginalzonen-Lymphom
n.a.	nicht auswertbar
NCBI	National Center of Biotechnology Information (Nationales Zentrum Biotechnologischer Informationen)
n.d.	nicht durchgeführt

Abkürzungen

neg	negativ
NF-κB	nuclear factor-kappa B (Kernfaktor-kappa B)
NHL	Non-Hogkin-Lymphom
NIK	NF-κB-inducing kinase (NF-κB-induzierende Kinase)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLPHL	Nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma (Noduläres Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom)
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NOS	nicht weiter klassifiziert
NTD	N-terminale Domäne
PAC	P1 artificial chromosome (Künstliches Chromosom aus dem Bakteriophagen P1)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
p-Arm	kurzer Arm eines Chromosoms
pB	peripheres Blut
PBS	Phosphat buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Pri-miRNA	Primary-miRNA (primäre miRNA)
prox	proximal
q-Arm	langer Arm eines Chromosoms
Q-Bänderung	Chromosomenbänderungsverfahren mit Quinacrin
R	Restriktionsschnittstelle
r	rot
R-Bänderung	Zur Giemsa-Färbung gegensätzliches (reverses) Chromosomenbänderungsverfahren
rs	reference single nucleotide polymorphism (Referenz-Einzelnukleotid-Polymorphismus)
RAG	recombination activating gene (Rekombination-aktivierendes Gen)
RefSeq	NCBI Reference Sequences Collection (NCBI-Kollektiv von Referenz-Sequenzen)
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Roswell Park Cancer Institute

Abkürzungen

RT	Reverse Transkription
S	Switch (Region des <i>IGH</i> -Locus)
SDS	sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SG	Spectrum green
SMZL	Splenic marginal zone lymphoma (Splenisches Marginalzonen-Lymphom)
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SO	Spectrum orange
SSC	standard saline citrate (Standard-Salzlösung aus Natriumchlorid und Natriumcitrat)
SSPE	Sodium Chloride-Sodium Hydrogen Phosphate-EDTA (Natriumchlorid-Natriumhydrogenphosphat-Salzlösung)
T	Thymin
TBE	Trisborat-EDTA
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBS	TBS mit Tween 20
TCR	T-cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
tel	telomerisch
TERT	human telomerase reverse transcriptase (Reverse Transkriptase-Untereinheit der humanen Telomerase)
TMA	Tissue Microarray (Microarray mit verschiedenen Gewebeproben)
TNF	Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
TNFAIP2	tumor necrosis factor alpha induced protein 2 (Tumornekrosefaktor alpha-induziertes Protein 2)
T-PLL	T-Cell Prolymphocytic Leukemia (T-Zell Prolymphozytenleukämie)
TRAF3	TNF receptor associated factor 3 (TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 3)
trans	Translokation
TRAP	Telomerase Repeat Amplification Protocol (Protokoll zur Messung der Telomerase-Aktivität)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TTP	Tristetrapolin

Abkürzungen

U	Uracil
UCSC	University of California, Santa Cruz
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Variable (Genabschnitte)
V.a.	Verdacht auf
V(D)J	Variable, Diversity, Joining-Genabschnitte
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Wachstumsfaktor des vaskulären Endothels)
w	weiblich
WCP	whole chromosome painting (Färbung des gesamten Chromosoms)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WI	Whitehead Institute
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YAC	Yeast Artificial Chromosome (Künstliches Chromosom aus der Hefe)
zen	zentromerisch
ZFP36L1	Zinc finger protein like 1 (Zinkfinger-Protein ähnliches Protein 1)
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Tumorentstehung

Tumoren sind Neubildungen (Neoplasien) von Körpergeweben, die sich durch Fehlregulationen des Zellwachstums bilden. Sie entstehen auf der Basis genetischer Veränderungen, die dazu führen, dass Zellen ihr normales kooperatives Verhalten verlieren und unkontrolliert proliferieren [1]. Bösartige Tumoren zeichnen sich durch verschiedene grundlegende Eigenschaften aus: Sie sind unabhängig von Wachstumsfaktoren, resistent gegen Wachstumsinhibitoren, umgehen die Apoptose, besitzen unbegrenzt Wachstumspotential, können sich selbst mit Blutgefäßen versorgen und sind fähig, in andere Gewebe einzudringen und zu metastasieren (Abbildung 1) [2].

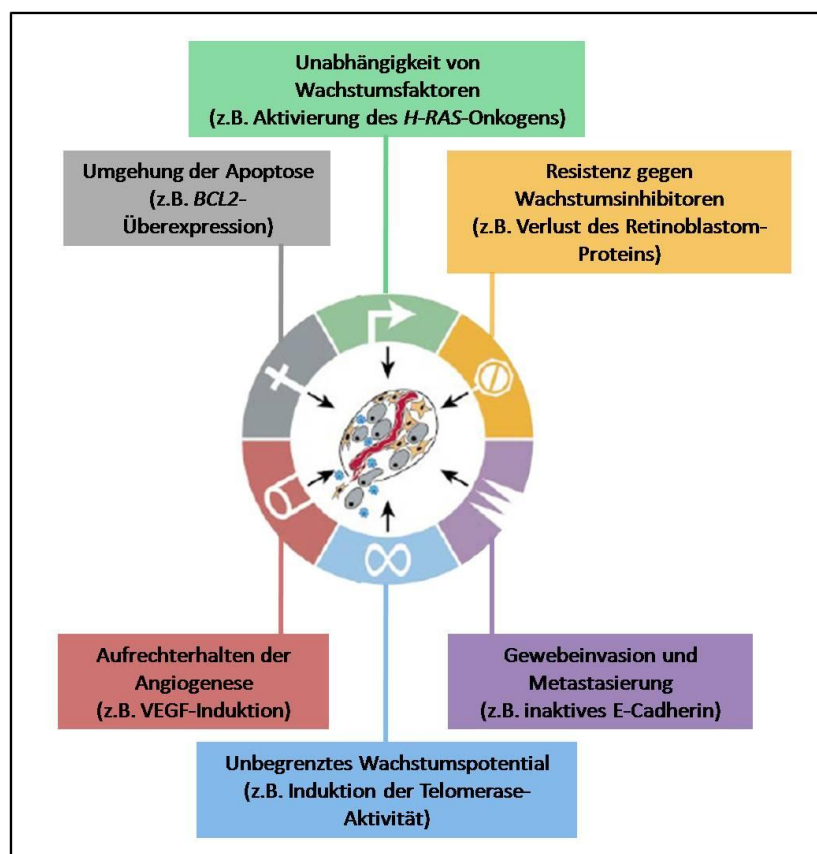


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kennzeichen von Tumoren (modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2000 [2]).

Dieses Modell der Eigenschaften von Tumoren wurde kürzlich um sechs weitere Charakteristika ergänzt [3]: Die Tumorzellen akkumulieren DNA-Schäden in Folge endogener

Einleitung

Ursachen, wie beispielsweise der Verkürzung der Telomere und anschließender Doppelstrangbrüche in subtelomeren Bereichen. Aufgrund der genannten tumorassoziierten Eigenschaften setzen die Zellen jedoch ihre Replikation fort. Viele bösartige Tumoren haben zudem Defekte der Mitose-Maschinerie, die in chromosomaler Instabilität resultieren. Die genetischen Veränderungen können zu einem Ungleichgewicht toxischer, ungefalteter Proteine führen, was sich in der Aktivierung des Hitzeschocksignalwegs zeigt. Ein weiteres Kennzeichen von vielen Tumoren ist, dass sie ihre Energie überwiegend mittels sauerstoffunabhängiger Glykolyse, anstelle der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, gewinnen. Dadurch erlangen sie die Fähigkeit in sauerstoffarmer Umgebung zu wachsen. Die Energiegewinnung durch Glykolyse hat eine hohe Konzentration von Laktat und somit ein Ansäuern der Mikroumgebung zur Folge. Die dadurch bedingte Unterdrückung der Immunabwehr wirkt ebenfalls tumorfördernd. Die Inaktivierung der mitochondrialen Funktionen zur Energiegewinnung wird als eine der Ursachen für die Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies in Tumorzellen angesehen, die ebenfalls DNA-Schäden verursacht. Das erweiterte Modell der Charakteristika von Tumoren ist in Abbildung 2 dargestellt [3].

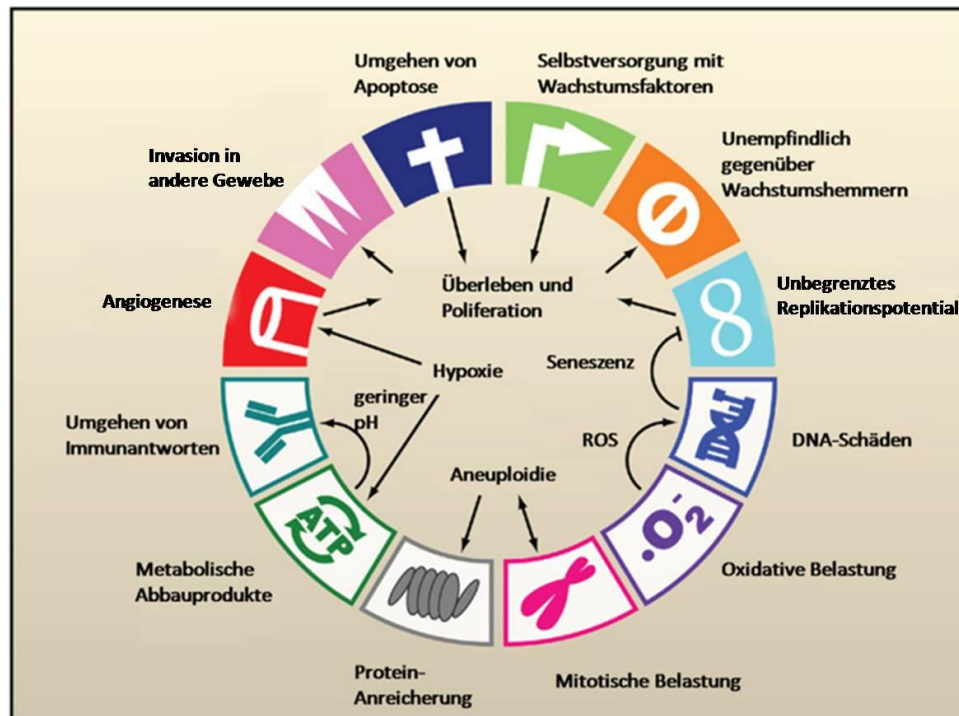


Abbildung 2: Aktualisierte Darstellung der Kennzeichen von Tumoren (modifiziert nach Luo et al., 2009 [3]).

Es wird davon ausgegangen, dass Tumorentwicklung in mehreren Schritten stattfindet und die Erkrankungen meistens auf eine einzige Zelle zurückgehen, die eine genetische

Veränderung erfuhr. Nachkommen dieser Zelle können weitere Mutationen ansammeln, die ebenfalls zur kanzerogenen Entwicklung beitragen, wobei auch mehrere Tumorsubklone entstehen können [4].

Bei den veränderten Genen handelt es sich um Onkogene und Tumorsuppressorgene [5-7]. Onkogene kodieren für Proteine, die durch erhöhte oder fehlerhafte Aktivierung die Tumorentwicklung vorantreiben können. In ihrer physiologischen Funktion werden sie auch als Protoonkogene bezeichnet. Häufig kodieren sie für Proteine, die die Zellproliferation und Apoptose kontrollieren (z.B. Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Apoptoseinhibitoren). Onkogene können durch Translokationen oder virale Insertionen in die Nähe von starken Enhancern verlagert und auf diese Weise oder auch durch Amplifikation des Gens überexprimiert werden. Mutationen oder Genfusionen können zu einer fehlerhaften Aktivität des entsprechenden Proteins führen [1, 8-11].

Tumorsuppressorgene führen im Allgemeinen durch Funktionsverlust zur Entstehung von Tumoren. Nach Knudsons „Two-Hit-Hypothese“ müssen beide Allele eines Gens inaktiviert werden, um einen tumorigenen Effekt zu erzielen. Heute sind jedoch auch Tumorsuppressorgene bekannt, die bereits durch die Inaktivierung eines Allels ihre volle Funktionsfähigkeit verlieren [12-15]. Tumorsuppressorgene können dabei durch Deletionen des Gens, durch Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen, oder durch epigenetische Mechanismen, welche die Expression des Gens unterdrücken, inaktiviert werden. Sie kodieren z.B. für den Zellzyklus regulierende oder Apoptose induzierende Proteine [16, 17].

Tumoren werden grundsätzlich in solide Tumoren (z.B. Mammakarzinom, Colonkarzinom und Retinoblastom) und hämatologische Neoplasien unterteilt. Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit hämatologischen Neoplasien beschäftigt, soll auf diese im Folgenden näher eingegangen werden.

1.2 Hämatologische Neoplasien

Hämatologische Neoplasien sind Tumore des blutbildenden Systems. Man unterscheidet zwischen myeloischen Erkrankungen, die sich aus Zellen der myeloischen Reihe entwickelt haben, und lymphatischen Erkrankungen, die aus Zellen der lymphatischen Reihe stammen (Abbildung 3) [1]. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Neoplasien handelte es sich

ausschließlich um Erkrankungen, die ihren Ursprung in Lymphozyten, insbesondere B-Lymphozyten, und ihren Vorläuferzellen haben.

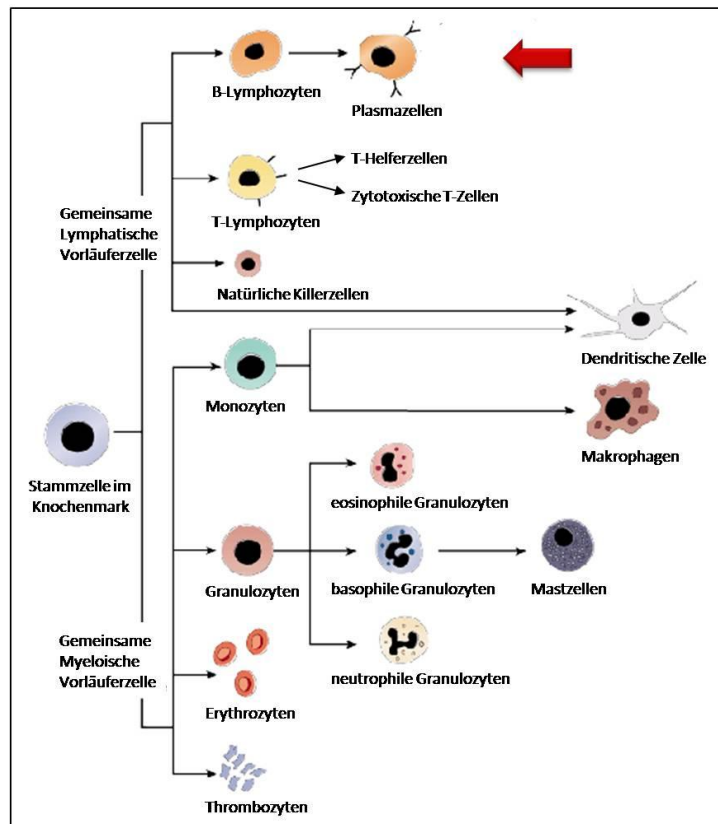


Abbildung 3: Zellen des hämatologischen Systems (modifiziert nach <http://www.dkfz.de>). Der Pfeil deutet auf die Entwicklungslinie der B-Lymphozyten, deren maligne Transformation in dieser Arbeit analysiert wurde.

1.2.1 Lymphozytenentwicklung und -reifung

Lymphozyten gehören zu den Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und unterteilen sich in B (bursa fabricius, beim Menschen bone marrow)-, T (Thymus)- und NK (natürliche Killer)-Zellen. Sie werden aus lymphatischen Vorläuferzellen gebildet, die sich wiederum aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks entwickeln. B-Zellen tragen am Ende ihrer Entwicklung im Knochenmark einen charakteristischen B-Zell-Rezeptor, d.h. einen membranverankerten Antikörper (Immunglobulin). Die naiven B-Zellen gelangen über die Blut- und Lymphgefäße zu den lymphatischen Organen (peripheres lymphatisches Gewebe). Wenn sie dort auf ein passendes Antigen treffen, können sie sich zu Gedächtniszellen und Plasmazellen entwickeln. Letztere sind darauf spezialisiert, Antikörper in großen Mengen zu sezernieren. T-Zellen entwickeln sich im Thymus aus Vorläuferzellen zu reifen T-Zellen. Sie

besitzen zur Erkennung von Antigenen T-Zell-Rezeptoren (TCR). T-Helferzellen können unter anderem B-Zellen zur Produktion von Antikörpern aktivieren. Zytotoxische T-Zellen töten infizierte Zellen, die an ihrer Oberfläche Fremdartige präsentieren. NK-Zellen entstehen ebenfalls aus lymphatischen Vorläuferzellen des Knochenmarks. Sie haben im Gegensatz zu B- und T-Zellen keine antigenspezifische Rezeptoren. NK-Zellen werden durch das Fehlen bestimmter körpereigener Zelloberflächenmoleküle sowie durch stressinduzierte zelluläre Moleküle von Tumorzellen oder infizierten Zellen aktiviert und eliminieren diese [18, 19].

Da in dieser Arbeit ausschließlich B-Zell-Neoplasien untersucht wurden, wird im Folgenden die B-Zell-Entwicklung genauer beschrieben.

1.2.2 Physiologische Rearrangements des Immunglobulinschwerketten-Locus bei der Lymphozytenentwicklung

Immunglobuline (Ig) bestehen jeweils aus zwei identischen schweren (Immunglobulin heavy chain, *IGH*) und zwei identischen leichten Polypeptidketten. Dabei gliedern sich die leichten Ketten in zwei funktionell nicht zu unterscheidende Klassen: Immunglobulin kappa (*IGK*) und Immunglobulin lambda (*IGL*).

Disulfidbrücken verknüpfen jeweils eine leichte mit einer schweren Kette und verbinden auch die beiden schweren Ketten kovalent miteinander. Die leichten Immunglobulinketten bestehen aus einer variablen und einer konstanten Domäne, die schweren Immunglobulinketten dagegen aus einer variablen und drei oder vier konstanten Domänen. Die Antigenerkennung findet an den variablen Domänen statt (Abbildung 4) [18].

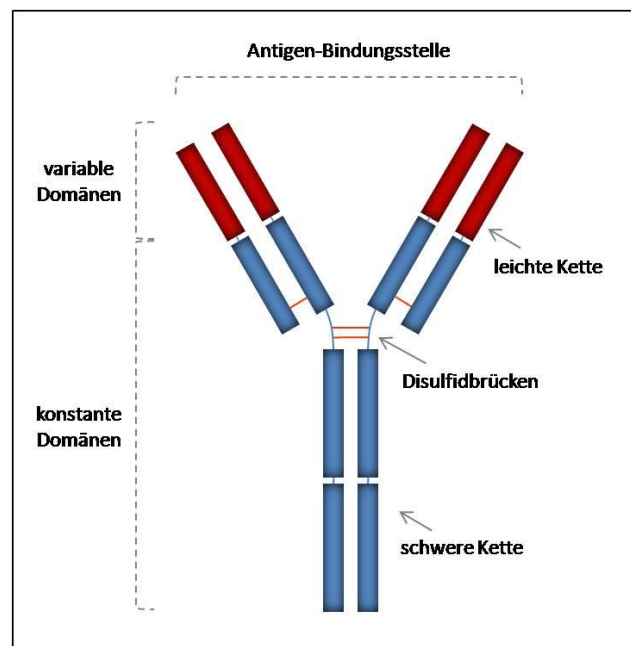


Abbildung 4 Struktur eines Antikörpers (basierend auf Schütt und Bröcker, 2009 [18]).

Immunglobuline erlangen ihre Vielfalt, die sie zur Erkennung von Antigenen benötigen, durch Umstrukturierungen von Gensegmenten der Loci, die für ihre Polypeptidketten kodieren. Diese somatischen Prozesse finden nur in den B-Zellen statt. Da Analysen des *IGH*-

Einleitung

Locus wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit waren, werden im Folgenden dessen physiologische Umlagerungen näher beschrieben. In Tabelle 1 sind die Stadien der B-Zell-Entwicklung im Zusammenhang mit den Rearrangements der *IG*-Gene aufgeführt.

Tabelle 1: Die Stadien der B-Zell-Entwicklung (modifiziert nach Harris et al., 2001 [19])

	B-Zelle	Immunglobulin-Gen	Somatische Mutationen	Ig-Protein	
Antigen-unabhängig	Stammzelle	Keimbahn	Keine	Keine	Knochenmark
	Pro-B-Zelle	Keimbahn	Keine	Keine	
	Prä-B-Zelle	<i>IGH</i> -Umlagerung	Keine	Ig μ (zytoplasmatisch)	
	Unreife B-Zelle	<i>IGL</i> -Umlagerung/ <i>IGH</i> umgelagert	Keine	IgM (Membran)	
Antigen-abhängig	Reife naive B-Zelle	<i>IGH/L</i> umgelagert	Keine	IgM/IgD	Peripheres lymphatisches Gewebe
	Keimzentrumszelle	<i>IGH/L</i> umgelagert - Klassenwechsel	Einbau somatischer Mutationen	Ig (gering oder abwesend)	
	Gedächtnis-B-Zelle	<i>IGH/L</i> umgelagert	Somatische Mutationen	IgM/IgG	
	Plasmazelle	<i>IGH/L</i> umgelagert	Somatische Mutationen	IgG>IgA>IgD	

Ig: Immunglobulin

Der *IGH*-Locus liegt in der Chromosomenregion 14q32. Er enthält für die Bildung einer variablen Region 46 funktionelle V_H (Variable)-Segmente, 23 funktionelle D_H (Diversity)-Segmente und 6 J_H (Joining)-Segmente [20, 21]. Ein funktionelles VDJ-Exon entsteht, indem im Knochenmark zunächst ein D_H -Segment mit einem J_H -Segment verknüpft und anschließend ein V_H -Segment mit dem D_HJ_H -Element verbunden wird. Lymphozyten-spezifische Endonukleasen (recombination activating gene (RAG) 1 und 2) schneiden die Gensegmente dabei an konservierten Signalsequenzen, wobei die dazwischen liegenden DNA-Abschnitte deletiert werden. Die Verbindung der Genelemente erfolgt nicht präzise. Einzelne Nukleotide können entfernt oder hinzugefügt werden (N-Sequenzen), wodurch die Antikörpervielfalt weiter erhöht wird. Der gesamte Prozess wird als VDJ-Rekombination bezeichnet und findet überwiegend nach dem Zufallsprinzip statt [22-25]. Bei den variablen Domänen der leichten Immunglobulinketten (*IGK* und *IGL*) wird direkt ein V-Segment mit einem J-Segment verknüpft [18].

Bei erfolgreicher Kombination der Gen-Segmente für eine schwere und eine leichte Kette ist die unreife B-Zelle in der Lage, IgM zu synthetisieren und auf der Oberfläche zu präsentieren. Dabei wird für die Bildung der konstanten Domänen auf RNA-Ebene das Segment C_{μ} (constant μ) des *IGH*-Locus an die VDJ-Einheit gespleißt. In reifen B-Zellen kann später auch IgD durch alternatives Spleißen des C_{δ} -Segment an die VDJ-Einheit gebildet werden [26]. War die Rekombination der Ketten nicht produktiv (z.B. durch Verschiebung des Leserasters) oder autoreaktiv, so hat die Zelle die Möglichkeit, jeweils das zweite Allel, beziehungsweise im Falle der leichten Ketten den zweiten Locus zu rekombinieren. Gelingt dies ebenfalls nicht, geht die Zelle in Apoptose [24, 27].

Die nun naiven reifen B-Zellen verlassen das Knochenmark und gelangen über das periphere Blut in die sekundären lymphatischen Gewebe wie Lymphknoten und Milz. Wenn sie dort auf ein passendes Antigen stoßen, können sie in Abhängigkeit von T-Zellen in als Keimzentren bezeichneten Strukturen weiteren Veränderungen unterliegen: Beim Klassenwechsel können die C_{μ} - und C_{δ} -Gene durch eines der C_{γ} - ($n = 4$), C_{α} - ($n = 2$) und C_{ϵ} -Gene ersetzt werden, wodurch IgG, IgA und IgE gebildet werden. Die intrachromosomale Rekombination findet an sogenannten Switch-Regionen statt, repetitiven Sequenzen, die stromaufwärts von jedem C_H -Segment liegen (Ausnahme C_{δ}). Die dazwischen liegende DNA wird wiederum deletiert [19, 22, 28-31]. Unabhängig vom Klassenwechsel häufen sich in den stark proliferierenden B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion Punktmutationen in den hypervariablen Bereichen der rekombinierten Immunglobulingene an. Bei diesem als „somatische Hypermutation“ bezeichneten Prozess finden ebenfalls eine Reihe von DNA-Doppelstrangbrüchen statt [32, 33]. B-Zellen, die durch die Mutationen eine erhöhte Affinität für ihr Antigen erhalten, werden positiv selektioniert. Diese Affinitätsreifung findet in mehreren Runden von somatischer Hypermutation und nachfolgender Selektion statt. Bei erfolgreicher Anpassung differenzieren sich die B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder zu langlebigen Gedächtniszellen [18, 22, 29]. In Abbildung 5 sind die beschriebenen Rekombinationsprozesse schematisch dargestellt.

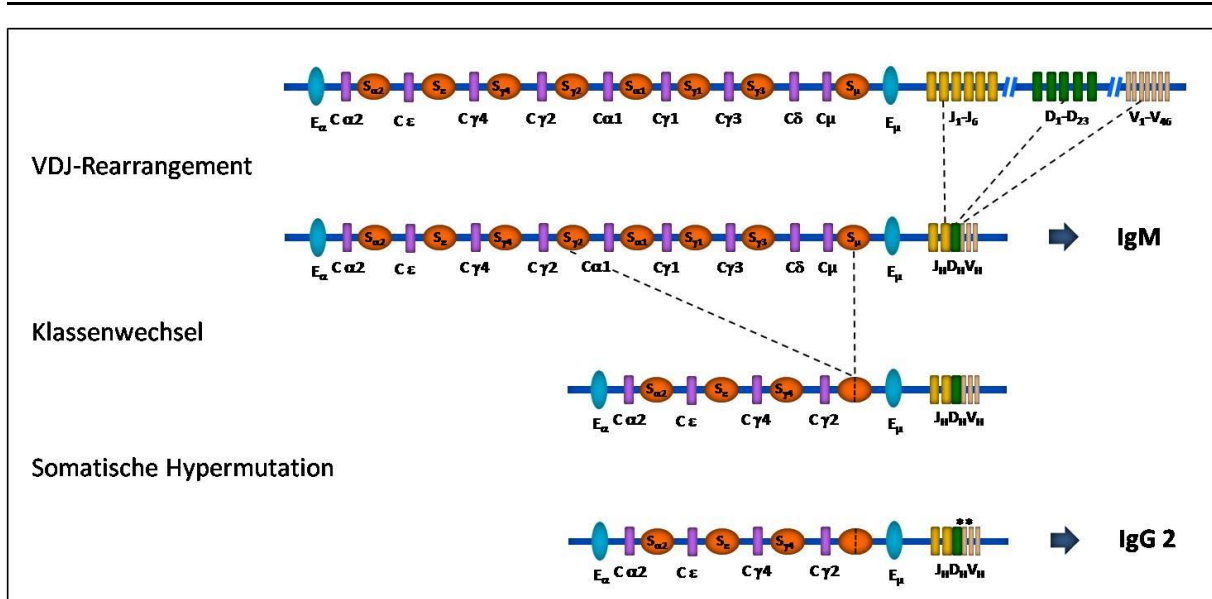


Abbildung 5: Physiologische *IGH*-Rearrangements und somatische Hypermutation. Die Sterne stellen somatische Mutationen dar (basierend auf Küppers, 2001 [22]).
 C: constant segment; E: Enhancer; J: Joining-Segment; S: Switch; tel: telomerisch; UTR: untranslatierte Region

1.2.3 Klassifikation lymphatischer Neoplasien

Die Klassifikation lymphatischer Neoplasien basiert unter anderem auf der Ermittlung der Reifungsstadien der entarteten Zellen. Der Status der *IG*-Loci, insbesondere des *IGH*-Locus, ist dabei von besonderer Bedeutung. Maligne Lymphome und Leukämien des lymphatischen Systems werden grundsätzlich anhand der Morphologie, des Immunphänotyps (Oberflächenmarker), genetischer Eigenschaften und klinischer Merkmale klassifiziert (Tabelle 2). Anhand der Einordnung in bestimmte Klassen können Aussagen über den Krankheitsverlauf und die Prognose getroffen werden, außerdem erfolgt mit Hilfe dieser Zuordnung die Wahl der Therapieform. Bei den Leukämien sind überwiegend Knochenmark und peripheres Blut befallen. Lymphome manifestieren sich primär in Lymphknoten, Milz und extranodalem lymphatischem Gewebe. Aus historischen Gründen unterscheidet man zwischen der Akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und den Hodgkin- und Non-Hodgkin Lymphomen. Das klassische Hodgkin-Lymphom zeichnet sich durch seine zum Teil mehrkernigen, großen Tumorzellen aus, die oft nur in geringer Anzahl (<1 %) im Tumorgewebe zu finden sind. Non-Hodgkin Lymphome stellen eine sehr heterogene Gruppe vieler Lymphomentitäten dar. Der überwiegende Teil der Non-Hodgkin Lymphome geht aus B-Zellen hervor (>90 %), nur weniger als 10 % stammen von T- oder NK-Zellen ab [34, 35].

Einleitung

Tabelle 2: Klassifikation der wesentlichen in dieser Arbeit untersuchten B-Zell-Neoplasien (nach Swerdlow et al., 2008 [36])

Neoplasie	Betroffenes Gewebe	Morphologie	Immunphänotypische Eigenschaften	Immunglobuline
ALL	Knochenmark, peripheres Blut	Kleine bis große Blasten	TdT, HLA-DR, CD19, CD10, CD24, CD22, CD20, CD79a, CD22	Ig μ (zytoplasmatisch)
MCL	Lymphknoten, Leber, Milz, z.T. peripheres Blut	Klein bis mittelgroße Zellen mit unregelmäßig geformtem Kern	CD5, CD23+/-, FMC7, CD43	IgM (Membran)
B-CLL	Peripheres Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Leber, Milz	Kleine Lymphozyten mit rundem Kern	CD5, CD19, CD20, CD22, CD79a; CD23, CD11c (schwach)	wenig IgM/D (Membran, zytoplasmatisch)
SMZL	Milz, Lymphknoten, Knochenmark, peripheres Blut, und andere Organe	Kleine Lymphozyten	CD20, CD79a	IgM/D (Membran)
DLBCL	Lymphknoten, Gastrointestinaltrakt, Knochenmark, Milz und weitere Gewebe	Diffuse Proliferation großer, lymphoider Zellen	CD19, CD20, CD22, CD79a, s/cIg+, CD10+/-, BCL2+/-, Ki67	IgM>IgG>IgA (in 50-75 %)

+/-: in einigen Fällen positiv

ALL: Akute lymphatische Leukämie; B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; CD: Cluster-Differenzierungsantigene; DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom; MCL: Mantelzell-Lymphom; SMZL: Splenisches Marginalzonen-Lymphom; TdT: terminale Desoxynukleotidyltransferase

Hämatologische Erkrankungen können in den meisten Fällen einem bestimmten Zell- bzw. Entwicklungsstadium zugeordnet werden. Es ist unklar, ob die Zelle durch die Entartung in einem bestimmten Entwicklungsstadium verharrt oder sich nach der Transformation noch weiter entwickelt hat und anschließend in einem Stadium der Entwicklung stehen geblieben ist [37]. Die ALL wird beispielsweise dem Stadium der Vorläufer-B-Zelle zugeordnet. Ihre Tumorzellen exprimieren in den meisten Fällen zytoplasmatisches Ig μ , wohingegen Oberflächenimmunglobuline in der Regel abwesend sind [19, 34]. Das Mantelzell-Lymphom (MCL) entwickelt sich vermutlich aus reifen naiven B-Zellen, die das Knochenmark verlassen haben. Sie präsentieren IgM, zum Teil auch IgD auf ihrer Oberfläche [38, 39]. Die Zellen des Follikulären Lymphoms zeigen den Entwicklungsstand von Keimzentrums-B-Zellen. Sie exprimieren in geringem Maß die Immunglobuline IgM und IgD, aber auch IgG und IgA, was den erfolgten Klassenwechsel anzeigt [34, 40]. Als schwieriger erweist sich die Frage nach dem zellulären Ursprung der Chronisch lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL). Die Tumorzellen zeigen eine schwache Expression von IgM und IgD. Die rekombinierten Immunglobulingene weisen in 59 % somatische Hypermutationen auf, was für Post-Keimzentrums-B-Zellen spricht. Die übrigen 41 % deuten mit ihrem unmutierten Status auf

einen Prä-Keimzentrumsursprung hin. Gen-Expressionsanalysen beider Untergruppen zeigen jedoch ein Profil, das dem der Gedächtnis-B-Zellen und damit Post-Keimzentrums-B-Zellen gleicht [41-44]. Bei den Diffus großzelligen B-Zell Lymphomen (DLBCL) konnten mittels Genexpressionsanalysen zwei Gruppen identifiziert werden, die sich morphologisch nicht unterscheiden lassen, jedoch eine deutlich unterschiedliche Prognose aufweisen: Das Diffus großzellige B-Zell Lymphom vom Keimzentrums-Typ (GCB-DLBCL), das aufgrund seines Expressionsmusters aus Keimzentrums-B-Zellen zu stammen scheint, und das Diffus großzellige B-Zell Lymphom vom aktivierten B-Zell-Typ (ABC-DLBCL), welches wahrscheinlich aus Postkeimzentrums-B-Zellen stammt. In Abbildung 6 ist die B-Zellentwicklung und die Zuordnung einiger B-Zell-Neoplasien zu bestimmten Stadien schematisch dargestellt.

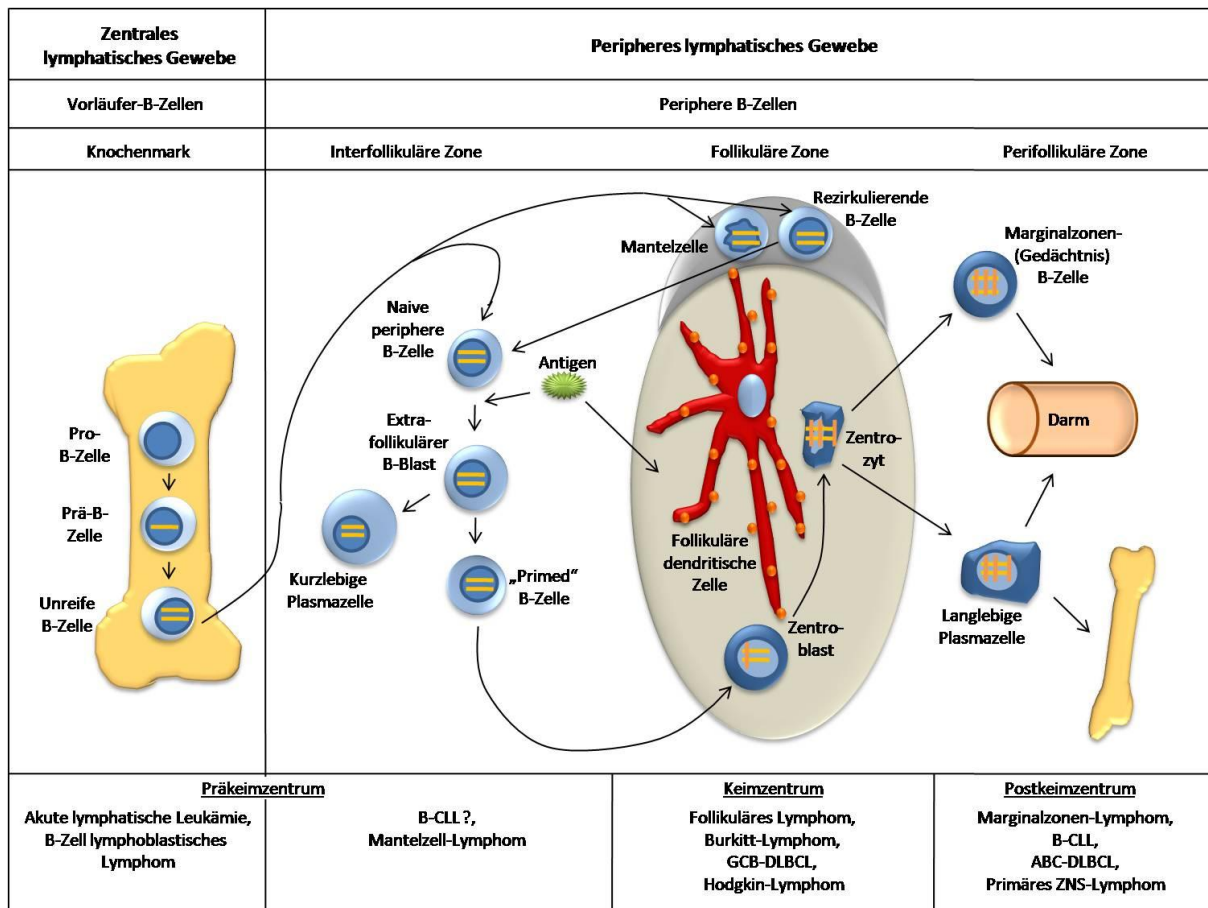


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Einordnung der häufigsten B-Zell-Neoplasien zu Stadien der B-Zell-Entwicklung. Die V(D)J-Rekombinationen der schweren und leichten Ketten der Immunglobulingene sind durch Querbalken dargestellt. Die somatische Hypermutation der Immunglobulingene wird durch senkrechte Balken symbolisiert (modifiziert nach Stein et al., 2007 [45]).

ABC-DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell Lymphom vom aktivierten B-Zell-Typ; B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; GCB-DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell Lymphom vom Keimzentrums-Typ; ZNS: Zentralnervensystem

1.2.4 Wiederkehrende genetische Veränderungen bei B-Zell-Lymphomen

Chromosomale Aberrationen sind in fast allen B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen nachweisbar und von großer Bedeutung für die Diagnosestellung sowie für die Prognose [30, 34]. Genetische Veränderungen in Lymphomen umfassen Translokationen, Insertionen, Deletionen, Duplikationen, Amplifikationen, Inversionen und Punktmutationen, die auf die wie in Abschnitt 1.1 beschriebene Weise tumorfördernd wirken können (Abbildung 7) [45, 46].

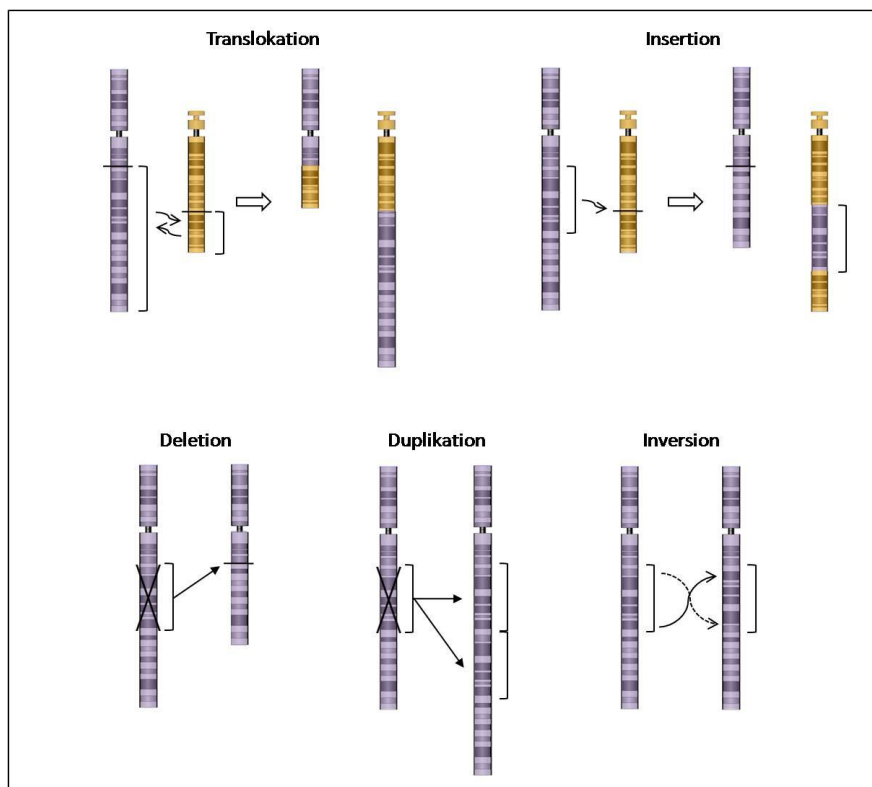


Abbildung 7: Schematische Darstellung wiederkehrender chromosomaler Strukturveränderungen bei B-Zell-Lymphomen.

Grundsätzlich wird bei Lymphomen zwischen primären und sekundären genetischen Veränderungen unterschieden. Primäre genetische Aberrationen treten sehr früh in der Lymphom-Pathogenese auf. Sie sind oftmals spezifisch für bestimmte Erkrankungen und folglich bedeutsam für die Diagnostik wie z.B. die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ bei Mantelzell-Lymphomen. Sekundäre genetische Veränderungen entstehen während der späteren Tumorentwicklung und sind zum Teil von prognostischer Relevanz. Viele dieser sekundären Aberrationen treten in unterschiedlichen Lymphomentitäten auf und sind teilweise nur in Subklonen der Tumorzellen zu finden (Abbildung 8) [47-49].

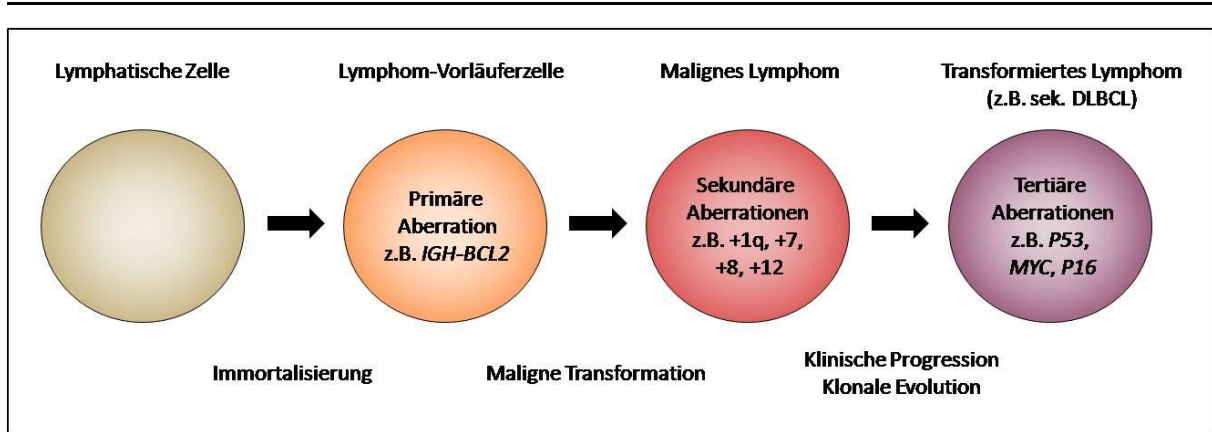


Abbildung 8: Mehrstufenmodell der Tumorentstehung am Beispiel der Entwicklung eines Lymphoms (Dyer und Siebert, 2009 [50]).

In B-Zell-Lymphomen stellen Translokationen, vor allem unter Einbeziehung der Immunglobulingene, häufig beobachtete und oftmals primäre genetische Veränderungen dar [46, 51]. Sie werden in Abschnitt 1.2.5.1 ausführlich beschrieben. Die primäre Veränderung reicht für die vollständige Entartung jedoch oft nicht aus. Dies wurde dadurch deutlich, dass typische primäre Aberrationen, beispielsweise die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ des Follikulären Lymphoms, die zur Überexpression von *BCL2* führt, ebenfalls in peripherem Blut gesunder Individuen beobachtet werden konnten [52-54]. Zudem haben Studien an transgenen Mäusen gezeigt, dass die deregulierte Expression der entsprechenden Onkogene für eine maligne Transformation nicht ausreichend ist [55-57]. Unter den sekundären Veränderungen bei malignen Lymphomen spielen Zugewinne und Verluste genomischen Materials eine bedeutende Rolle. Bei Mantelzell-Lymphomen treten z.B. häufig Zugewinne in den Chromosomenregionen 3q und 8q sowie Verluste in Chromosom 1p, 6q, 11q und 13q auf [58-61]. Beim Follikulären Lymphom gehören Zugewinne in den Chromosomen 1q, 7, 8 und 18q und die mit einer schlechteren Prognose einhergehenden Verluste in den Chromosomenregionen 1p21-22 und 6q23-26 zu häufig beobachteten Ereignissen [45, 62-65]. Stark prognoserelevant sind genetische Veränderungen in der B-CLL, die in den westlichen Ländern die häufigste lymphatische Erkrankung im Erwachsenenalter darstellt (Abbildung 9).

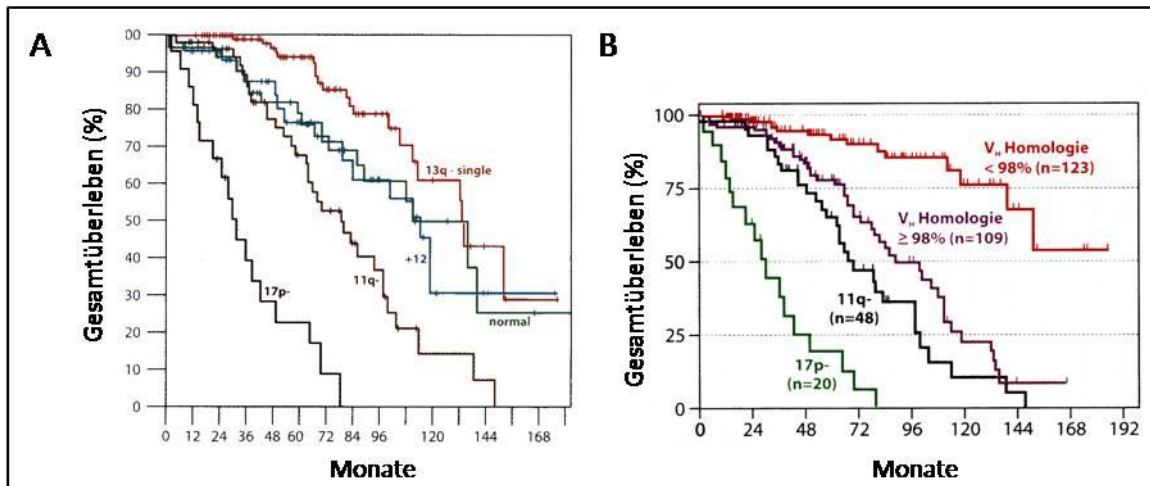


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Analysen der Überlebenszeiten auf der Grundlage von genetischen Risikofaktoren an einem Kollektiv von 325 Patienten **(A)** bzw. von 300 Patienten **(B)** mit B-CLL. Die Anzahl der Individuen ist in Klammern angegeben. Die V_H -Homologie gibt die Übereinstimmung der Hypervariablen V-Region des *IGH*-Locus mit der normalen Keimbahnsequenz an (modifiziert nach Hallek und Emmerich, 2008 und Döhner et al., 2000 [66, 67]).

Die häufigsten chromosomalen Veränderungen der B-CLL sind 13q-Deletionen (57 %), die Trisomie 12 (14 %), 11q-Deletionen (12 %) und 17p-Deletionen (7 %) [44]. In der minimal deletierten Region des Chromosoms 13 befinden sich die Gene der microRNAs miR15A und miR16-1 [68]. MiRNAs sind kurze RNA-Moleküle (19-25 Nukleotide), die spezifisch die Translation bestimmter mRNAs herunterregulieren [69]. Durch die 17p-Deletion wird das Tumorsuppressorgen *P53* deletiert, welches eine Rolle bei der Induktion des Zell-Zyklus-Arrests und der Apoptose nach DNA-Schädigung spielt [70, 71]. Zu einer indirekten Herunterregulation des *P53*-Gens führt auch die Deletion von *ATM* (ataxia telangiectasia mutated) in der Chromosomenregion 11q22 [72]. Patienten mit einer 17p- oder einer 11q-Deletion haben eine schlechtere Prognose als Patienten mit einem normalen Karyotyp oder einer 13q-Deletion (Abbildung 9) [67]. Auch Punktmutationen im *P53*-Gen sind mit einer niedrigeren Überlebensrate assoziiert. Aussagekräftig für die Prognose der B-CLL-Patienten ist zudem der Mutationsstatus der *IGV_H*-Gene: Ein unmutierter Status (weniger als 2 % somatische Mutationen verglichen mit der Keimbahnsequenz) weist auf eine ungünstigere, aggressivere Form der B-CLL im Vergleich zu einem mutierten Status [68, 73-75].

Generell scheint eine Ansammlung von Genomschäden zu einer progressiven Transformation von Lymphomen zu führen [45, 76, 77]. Wesentliche zytogenetische Veränderungen der für diese Arbeit relevanten B-Zell-Erkrankungen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Wesentliche zytogenetische Veränderungen der für diese Arbeit relevanten B-Zell-Erkrankungen (basierend auf Haferlach et al., 2007, Siebert, 2009 und Harrison et al., 2009 [44, 78, 79])

Neoplasie	Wesentliche zytogenetische Veränderungen	Häufigkeit
ALL	t(9;22)(q34;q11.2)	>25 % (Erwachsene); 2-4 % (Kinder)
	t(11)(q23)	22 %
	t(12;21)(p13;q22)	>5 % (Kinder)
	t(14)(q32)	1-15 %
MCL	t(11;14)(q13;q32)	>95 %
	del(11q), del(13q), der(3q), der(8q), +12, del(1p), del(6q), del(9p), del(17p)	10-50 % 5-15 %
B-CLL	del(13q)	~57 %
	+12	~14 %
	del(11q)	~12 %
	del(6q), del(17p)	~7 %
	t/der(14)(q32)	4-20 %
SMZL	del(7)(q31q32)	~40 %
	+3q	~20 %
DLBCL	t(3)(q27)	20-40 %
	t(14;18)(q32;q21)	20-30 % (GCB)
	t(8;14)(q24;32)/t(8)(q24)	5-10 %
	+3/3q, +18/18q, +19q, del(6q), del(9p)	10-40 % (ABC)
	+1q, +2p13~16, +7, +11q, +12/12q	10-40 % (GCB)

ABC: Aktivierter B-Zell-Typ; ALL: Akute lymphatische Leukämie; B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom; GCB: Keimzentrums-Typ; MCL: Mantelzell-Lymphom; SMZL: Splenisches Marginalzonen-Lymphom

1.2.5 Veränderungen des Chromosoms 14 bei B-Zell-Lymphomen

In B-Zell-Lymphomen gehören strukturelle Veränderungen des Chromosoms 14 zu den häufigsten chromosomalen Veränderungen. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Translokationen, die den *IGH*-Locus in der Chromosomenbande 14q32 betreffen. Wiederkehrende Ereignisse sind aber auch beispielweise Deletionen im langen Arm von Chromosom 14.

1.2.5.1 Aberrante Rearrangements der Immunglobulingene

Da während der Rekombination der Immunglobulingene mehrfach DNA-Doppelstrangbrüche stattfinden, sind diese Loci für Translokationen prädestiniert. Anstelle von intrachromosomalen Deletionen werden nicht-homologe Abschnitte anderer Chromosomen mit den Immunglobulin-Loci verbunden. Bei einer reziproken Translokation entstehen so zwei derivative Chromosomen. Wenn durch die Translokationen Onkogene in die Nähe der starken *IG*-Enhancer gelangen, können diese überexprimiert werden und zur Entstehung von Lymphomen beitragen. Die Promotorregion der Translokationspartner bleibt dabei üblicherweise erhalten [22, 80].

Bei den Translokationen der *IG*-Loci werden diejenigen, die sich auf fehlerhafte V(D)J-Rearrangements zurückführen lassen, von Translokationen unterschieden, die durch Fehler während des Klassenwechsels oder der somatischen Hypermuation des *IGH*-Locus bedingt sind [46, 80]. Der *IGH*-Locus enthält zwei starke Enhancer (E_{α} und E_{μ}), die beide zur Überexpression von benachbarten Translokationspartnern führen können. Der Enhancer E_{α} liegt zentromerisch der konstanten Region und der Enhancer E_{μ} zwischen der konstanten und der variablen Region des *IGH*-Locus (Abbildung 5). Bei einem Fehler während des VDJ-Rearrangements kommt es in der Regel zu einer Überexpression des Onkogens auf dem derivativen Chromosom 14 (der(14)), da beide *IG*-Enhancer auf diesem Chromosom verbleiben. Findet ein Fehler während des Klassenwechsels statt, kann grundsätzlich auf beiden derivativen Chromosomen eine Deregulation der Translokationspartner erfolgen: Der Translokationspartner auf dem der(14) gelangt unter den Einfluss des Enhancers E_{α} , der auf dem anderen derivativen Chromosom verbleibende Translokationspartner kann unter den Einfluss des Enhancers E_{μ} gelangen (Abbildung 10) [22].

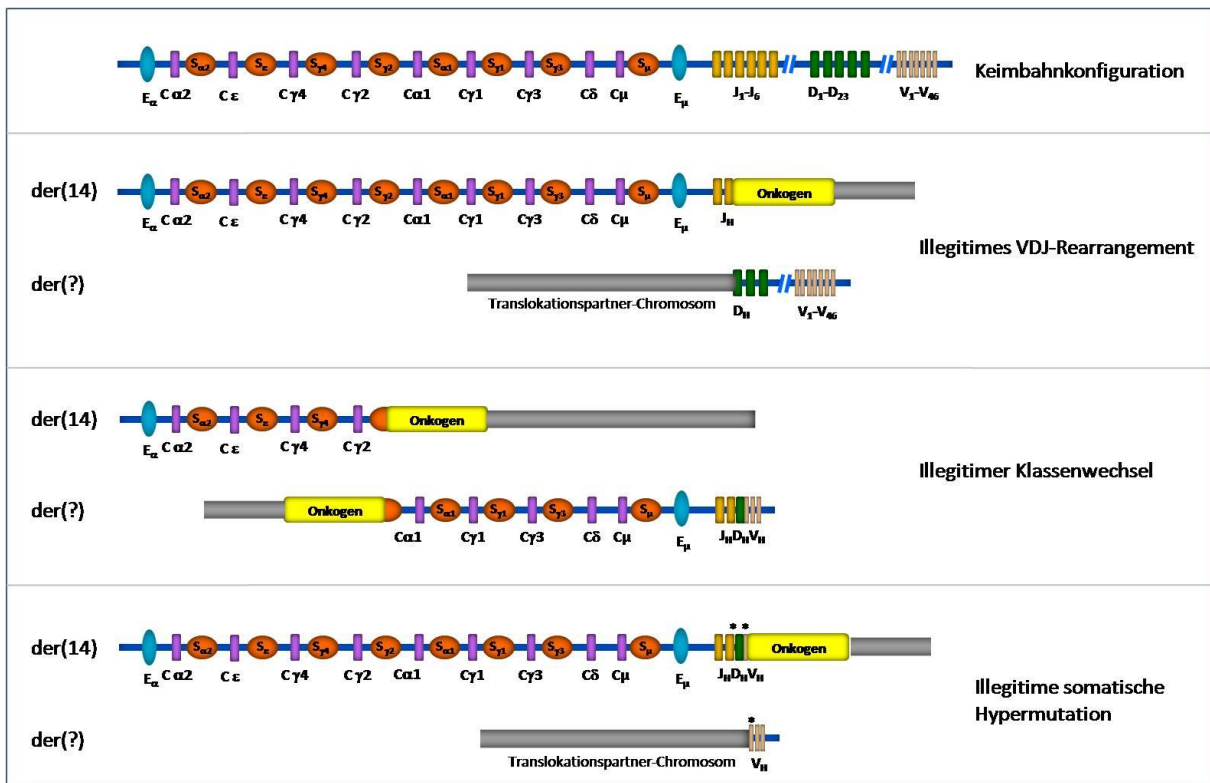


Abbildung 10: Illegitime Rearrangements des *IGH*-Locus. Die somatische Hypermuation ist durch Sterne dargestellt (basierend auf Küppers, 2005 [30]).

C: constant segment; der: derivatives Chromosom; E: Enhancer; J: Joining-Segment; S: Switch; tel: telomerisch

Translokationen, die durch ein fehlerhaftes VDJ-Rearrangement zustande gekommen sind, lassen sich, wie bei der Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ des Follikulären Lymphoms, daran erkennen, dass die Translokationsbruchpunkte nahe der RAG-Signalsequenzen von J_H -Gensegmenten oder von D_HJ_H -Verbindungen liegen. Zudem sind häufig kurze Nukleotidsequenzen in der Bruchpunktregion zu finden, die keiner der beiden Keimbahnsequenzen gleichen, was an die N-Sequenzen des VDJ-Rearrangements erinnert (siehe Abschnitt 1.2.2) [22, 81-84]. Auf einen fehlerhaften Klassenwechsel lässt sich schließen, wenn die Bruchpunkte in den Switch-Regionen liegen, wie es beispielsweise bei der $t(8;14)(q24;q32)$ des sporadischen Burkitt-Lymphoms oder der $t(3;14)(q27;q32)$ des DLBCLs der Fall ist [22, 85-88]. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass Translokationen ebenfalls durch Fehler während der somatischen Hypermutation stattfinden. In diesen Fällen liegen die Bruchpunkte innerhalb der V-Gene in Regionen, die Ziel der somatischen Hypermutation sind. Nahe gelegene Signalsequenzen der RAG-Endonukleasen sind nicht zu finden. Zudem zeigen somatische Hypermutationen der V-Gene in diesen Fällen, dass bereits eine Keimzentrumsreaktion stattgefunden hat [24, 89-93]. Durch den Mechanismus der somatischen Hypermutation können auch nicht *IG*-Gene mutiert werden. Dies kann zum einen durch eine Hypermutation von nicht *IG*-Genen im Anschluss an eine fehlerhafte DNA-Rekombination auftreten, zum anderen auch unabhängig von einer Translokation stattfinden, wie es oftmals beim DLBCL der Fall ist [22, 94, 95].

Die pathogenetische Auswirkung der *IGH*-Locus assoziierten Translokationen hängt von der Funktion des Onkogens ab, das in die Nähe der starken Enhancer gerät. Bei der Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, die in fast allen Mantelzell-Lymphomen vorkommt, gerät das *CCND1*-Gen unter die Kontrolle der *IGH*-Enhancer, wodurch das kodierte Protein Cyclin D1 überexprimiert wird. Cyclin D1 bewirkt den Fortgang des Zellzyklus in die S-Phase. Auf diese Weise kommt es zu einer Proliferation der normalerweise ruhenden Mantelzellen [45, 96-100]. Als Folge einer Translokation $t(8;14)(q24;q32)$, die typisch für das Burkitt-Lymphom ist, aber auch in anderen B-Zell-Erkrankungen (z.B. Follikuläres Lymphom und DLBCL) vorkommt, wird das *MYC*-Gen durch *IGH*-Enhancer überexprimiert, was zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen führt [101-103]. Durch die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ des Follikulären Lymphoms gelangt das *BCL2*-Gen in die Nähe der *IGH*-Enhancer, was die Überexpression des kodierten Proteins BCL2, eines Inhibitors der Apoptose, zur Folge hat [97].

Die Bruchpunkte der Translokation t(14;18)(q32;q21) des Follikulären Lymphoms liegen in der J_H-Region des *IGH*-Locus, was auf ein fehlerhaftes VDJ-Rearrangement im Knochenmark schließen lässt [51]. Die Erkrankung zeigt jedoch eindeutig Eigenschaften eines Keimzentrums-Lymphoms (siehe Abschnitt 1.2.3). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Translokation im Knochenmark stattfindet, aber das Ausbleiben der Apoptose erst im Keimzentrum seine Auswirkungen zeigt. Hier findet eine starke Proliferation der B-Zellen statt, wobei die funktionsuntüchtigen B-Zellen (> 95 %) normalerweise durch Apoptose beseitigt werden. Durch die starke Expression von BCL2 überleben die aberranten Zellen aber trotz ausbleibender Überlebenssignale. Es kommt zur Anhäufung von apoptoseresistenten B-Zellen, die weitere genetische Veränderungen ansammeln können [45, 51, 62, 104].

Bisher wurde eine Reihe von Translokationen mit Bruchpunkten im *IGH*-Locus beschrieben, von denen einige eher selten auftreten. Durch die Identifizierung der Translokationspartner konnten aber immer wieder neue Onkogene identifiziert werden, die nicht nur eine Rolle in der Pathogenese von Lymphomen spielen, sondern auch sonst in zellulären Prozessen wichtige Funktionen übernehmen. Zu diesen zählen beispielsweise *MYC*, *BCL10*, *IRF4*, *BCL6* und *MALT1* und weitere in Tabelle 4 aufgeführte *IGH*-Translokationspartner. Diese Onkogene werden teilweise auch in varianten Translokationen durch alternative Loci aktiviert, wie es beispielsweise beim *MYC*-Gen in 8q24 oder beim *BCL6*-Gen in 3q27 der Fall ist [105-107].

Eine Reihe von Translokationen mit Beteiligung des *IGH*-Locus in 14q32 sind noch nicht molekular charakterisiert worden, doch könnten durch ihre Charakterisierung potentiell neue wichtige Onkogene identifiziert werden [108].

Tabelle 4: Übersicht über einige wiederkehrende Translokationen in Non-Hodgkin Lymphomen vom B-Zell-Typ mit Bruchpunkt im *IGH*-Locus in 14q32 (modifiziert nach Siebert, 2009 [78])

Translokation	Neoplasie	Translokations-partner	Referenz
t(1;14)(p22;q32)	MALT-Lymphom	<i>BCL10</i>	[109, 110]
t(1;14)(q21;q32)	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom	<i>MUC1</i>	[111, 112]
t(2;14)(p13;q32)	B-CLL, Immunozytom	<i>BCL11A</i>	[113]
t(3;14)(p14;q32)	MALT-Lymphom, Diffus großzelliges B-Zell Lymphom	<i>FOXP1</i>	[114]
t(3;14)(q27;q32)	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom	<i>BCL6</i>	[115, 116]
t(6;14)(p21;q32)	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom, weitere B-Zell Lymphome	<i>CCND3</i>	[117]
t(7;14)(q21;q32)	Splenisches Lymphom mit villösen Lymphozyten	<i>CDK6</i>	[118]
t(8;14)(q24;q32)	Burkitt Lymphom/Leukämie, Diffus großzelliges B-Zell Lymphom, B-Zell-prolymphozytische Leukämie, Multiples Myelom	<i>MYC</i>	[119]
t(9;14)(p13;q32)	Lymphoplasmozytoides Immunozytom, weitere B-NHL	<i>PAX5</i>	[120, 121]
t(10;14)(q24;q32)	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom	<i>NFKB2 (LYT10)</i>	[122]
t(11;14)(q13;q32)	Mantelzell-Lymphom, Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ, B-Zell - prolymphozytische Leukämie, Splenisches Lymphom mit villösen Lymphozyten	<i>CCND1 (BCL1)</i>	[123, 124]
t(12;14)(p13;q32)	Mantelzell-Lymphom	<i>CCND2</i>	[125, 126]
t(12;14)(q24;q32)	Burkitt Lymphom/Leukämie	<i>BCL7A</i>	[127]
t(14;15)(q32;q11-13)	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom	<i>BCL8</i>	[128]
t(14;18)(q32;q21)	Follikuläres Lymphom, Diffus großzelliges B-Zell Lymphom	<i>BCL2</i>	[84]
t(14;18)(q32;q21)	Marginalzonenlymphom, MALT-Lymphom	<i>MALT1</i>	[129, 130]
t(14;19)(q32;q13)	Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ, weitere B-NHL	<i>BCL3</i>	[131]

Es sind nur Translokationen angegeben, bei denen das Partnergen mittels molekularer Klonierung identifiziert werden konnte.

B-NHL: B-Zell Non-Hodgkin Lymphom, MALT: Mucosa-associated Lymphoid Tissue

1.2.5.2 Deletionen des Chromosoms 14

Neben Translokationen, die den *IGH*-Locus in 14q32 betreffen, konnten weitere strukturelle Veränderungen des Chromosoms 14 in B-Zell-Lymphomen beobachtet werden (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). Im Jahre 1988 identifizierten Tilly et al. [132] unter 62 Patienten mit unterschiedlichen Subtypen von Non-Hodgkin Lymphomen drei Fälle mit einer Deletion des langen Arms von Chromosom 14 ausgehend von der Bande 14q22 (*del(14)(q22)*). In allen drei Fällen handelte es sich um B-CLLs, die mit einer Trisomie 12 assoziiert waren. In späteren Studien an Non-Hodgkin Lymphomen sind weitere Karyotypen mit Deletionen des langen Arms von Chromosom 14 ausgehend von der Bande 14q22-24 aufgetreten, die zum Teil ebenfalls mit einer Trisomie 12 assoziiert waren [133-

137]. Insgesamt konnte diese Aberration deutlich häufiger in B-CLLs als in anderen Non-Hodgkin Lymphomen festgestellt werden. Die pathogenetische Rolle dieser Deletion und die dadurch deregulierten Gene konnten bislang nicht ermittelt werden.

Um die Bedeutung von genetischen Aberrationen in der Tumorgenese verstehen zu können, müssen diese Veränderungen zunächst möglichst genau kartiert werden. Im Folgenden werden zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden zur Charakterisierung dieser chromosomalen Aberrationen beschrieben.

1.3 Zytogenetische und molekularzytogenetische Methoden zum Nachweis chromosomaler Aberrationen in hämatologischen Neoplasien

Der Nachweis genetischer Veränderungen in hämatologischen Neoplasien ist mit verschiedenen Techniken möglich, die je nach Art und Größe der genetischen Veränderung, Proliferationsgrad der Tumorzellen, Anteil der Tumorzellen im Untersuchungsmaterial und Tumorentität ausgewählt werden müssen. Die grundlegende Methode zur Identifizierung chromosomaler Aberrationen bei lymphatischen Neoplasien besteht in der konventionellen Zytogenetik, d.h. der Karyotypisierung mittels Chromosomen-Bänderung. Kleinere Veränderungen sind mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) nachweisbar. Bei der vergleichenden Genomhybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH) an Metaphasen können Änderungen der DNA-Kopienzahl detektiert werden. Die Einführung von Microarrays für die CGH ermöglichte eine deutlich höhere Auflösung als die zuvor genannten Techniken.

1.3.1 Konventionelle Zytogenetik

Bei der konventionellen Zytogenetik werden Metaphase-Chromosomen mit Hilfe von Bänderungstechniken analysiert. Es können Aneuploidien, Translokationen sowie größere (> 10 Mb) Deletionen oder Zugewinne erkannt werden. Um Metaphasen zu erhalten, müssen vitale Tumorzellen aus Frischmaterial gewonnen und kultiviert werden, wobei häufig die Zugabe mitogener Substanzen zur Anregung der Proliferation der Tumorzellen notwendig ist [138]. Die am häufigsten verwendeten Verfahren zur Differentialfärbung sind die G-Bänderung (Färbung mit Giemsa), die Q-Bänderung (Färbung mit Quinacrin) und die

der G-Bänderung gegensätzliche (reverse) Färbung (R-Bänderung), die beispielsweise mit Chromomycin A₃ erfolgt [139].

Die Chromosomen werden nach Größe, Lage des Zentromers und Bandenmuster geordnet und in Form eines Karyogramms dargestellt (Abbildung 11). Dabei definiert sich ein Chromosom nach der Herkunft des Zentromers. Der kurze Arm wird als p- und der lange Arm als q-Arm bezeichnet. Die Information des Karyogramms kann entsprechend der „Internationalen Nomenklatur der Zytogenetik“ von 2005 (ISCN) als Karyotypformel zusammengefasst werden.

Bei sehr komplexen Karyotypen, schlechter Metaphasequalität oder kryptischen (zytogenetisch nicht sichtbaren) Strukturveränderungen, wie beispielsweise Translokationen mit Beteiligung subtelomerischer Regionen, ist die vollständige Auflösung eines Karyotyps oftmals nicht möglich. Zudem können bei langsam proliferierenden Tumorentitäten oder geringer Tumordinfiltration teilweise keine Metaphasen dargestellt werden. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich, wenn verschiedene Subklone mit unterschiedlichen Proliferationszeiten auftreten, die teilweise nicht erfasst werden [140].

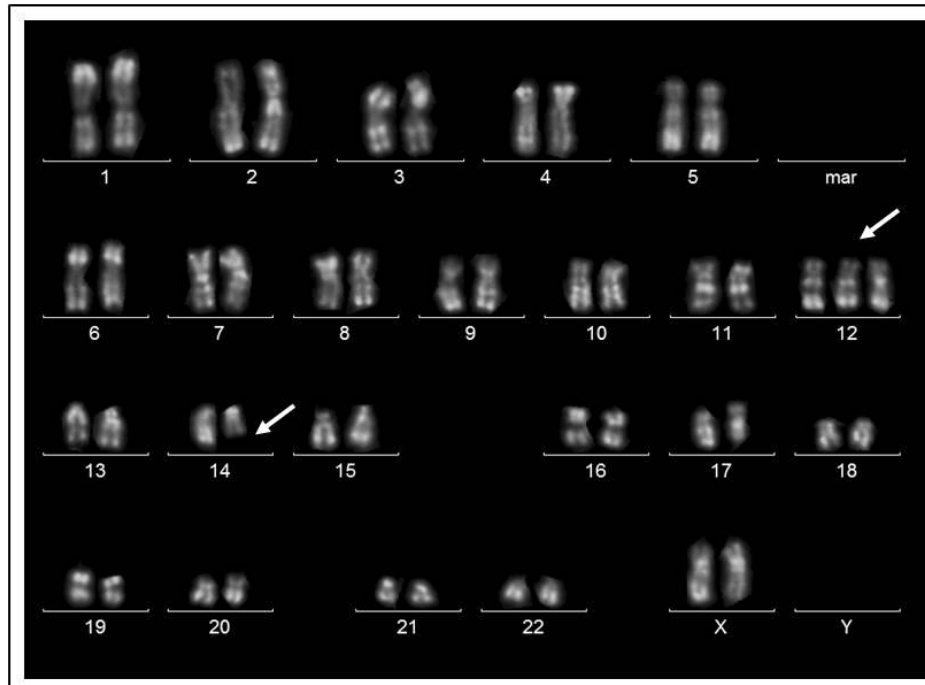


Abbildung 11: Beispiel eines Karyogramms mittels R-Bänderung einer CLL mit Deletion des langen Arms von Chromosom 14 und Trisomie 12 [Karyotyp: 46,XX,+12,del(14)(q24q32)]. Die Aberrationen sind durch Pfeile markiert [Das Karyogramm wurde freundlicherweise von Dr. Lana Harder (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt].

1.3.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) kann in verschiedenen Variationen angewandt werden. Das Prinzip beruht darauf, dass ein Fluoreszenz-markiertes einzelsträngiges DNA-Fragment (Sonde) an die komplementäre Sequenz der ebenfalls einzelsträngigen zu untersuchenden DNA bindet, wodurch die Ziel-DNA sichtbar gemacht wird. Letzteres erfolgt am Fluoreszenz-Mikroskop unter Verwendung von Filtersätzen, die nur den zur Anregung des Fluorochroms benötigten Wellenlängenbereich passieren lassen. Mit Hilfe von locus-spezifischen Sonden (locus specific identifiers, LSI) können spezifische Sequenzen des Genoms sichtbar gemacht und so strukturelle und numerische Aberrationen aufgedeckt werden. „Chromosome enumeration probes“ (CEPs) detektieren überwiegend die α -Satelliten der Zentromer-Region und werden zur Identifizierung von Aneuploidien oder als interner Standard verwendet. Whole chromosome painting (WCP)-Sonden hybridisieren hingegen mit ganzen Chromosomen und dienen beispielsweise der Ermittlung des Ursprungs von Markerchromosomen, d.h. zytogenetisch nicht identifizierbarer Chromosomen. Durch die Verwendung mehrerer differentiell markierter Sonden können komplexere Fragestellungen gelöst werden, wobei in den konventionellen FISH-Assays maximal drei Sonden Einsatz finden. Die gesamte DNA des Zellkerns wird meist zusätzlich mit Hilfe des in die DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) sichtbar gemacht, wodurch auch Aussagen über die Zellkernmorphologie getroffen werden können. FISH-Analysen können sowohl an Metaphasen als auch an Interphasen durchgeführt werden. FISH an Metaphasen ermöglicht die Zuordnung der Signale zu bestimmten Chromosomen. Interphasen liefern hingegen eine höhere Auflösung, da die DNA in diesem Zustand dekondensiert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden konventionelle FISH-Analysen mit locus-spezifischen Sonden durchgeführt. Das Design des FISH-Assays richtet sich nach Art der Fragestellung. Um Bruchereignisse innerhalb einer bestimmten Region erfassen zu können, bei denen die beteiligten Chromosomenregionen unbekannt sind, ist die Verwendung von zwei differentiell markierten Sonden, welche die Bruchpunktregion flankieren, am sinnvollsten. Assays dieser Art werden auch als „Break-Apart-Proben“ bezeichnet. In einem normalen Kern sind zwei kolokalisierte, d.h. zusammenliegende Signale zu sehen. Bei einem Bruchereignis findet ein sogenannter „Signalsplit“ statt, bei dem die unterschiedlich markierten Signale voneinander entfernt liegen. Numerische Aberrationen können mit

diesem Assay ebenfalls erfasst werden (Abbildung 12A). Bei der Suche nach einer ganz bestimmten Translokation ist eine höhere Sensitivität zu erreichen, indem zwei differentiell markierte, die jeweiligen Bruchpunkte überspannende Sonden verwendet werden. Die Translokation tragenden Zellen würden dann zwei Kollokationen und ein isoliertes Signal je Locus zeigen. Zur Detektion numerischer Aberrationen eines bestimmten Locus wird meist ein Zweifarb-FISH-Assay eingesetzt. Dabei hybridisiert eine Sonde innerhalb des zu untersuchenden Locus und eine weitere, als interne Kontrolle dienende Sonde, auf demselben Chromosom. So kann zwischen Aneuploidien und partiellen Deletionen oder Zugewinnen unterschieden werden (Abbildung 12B) [141-145].

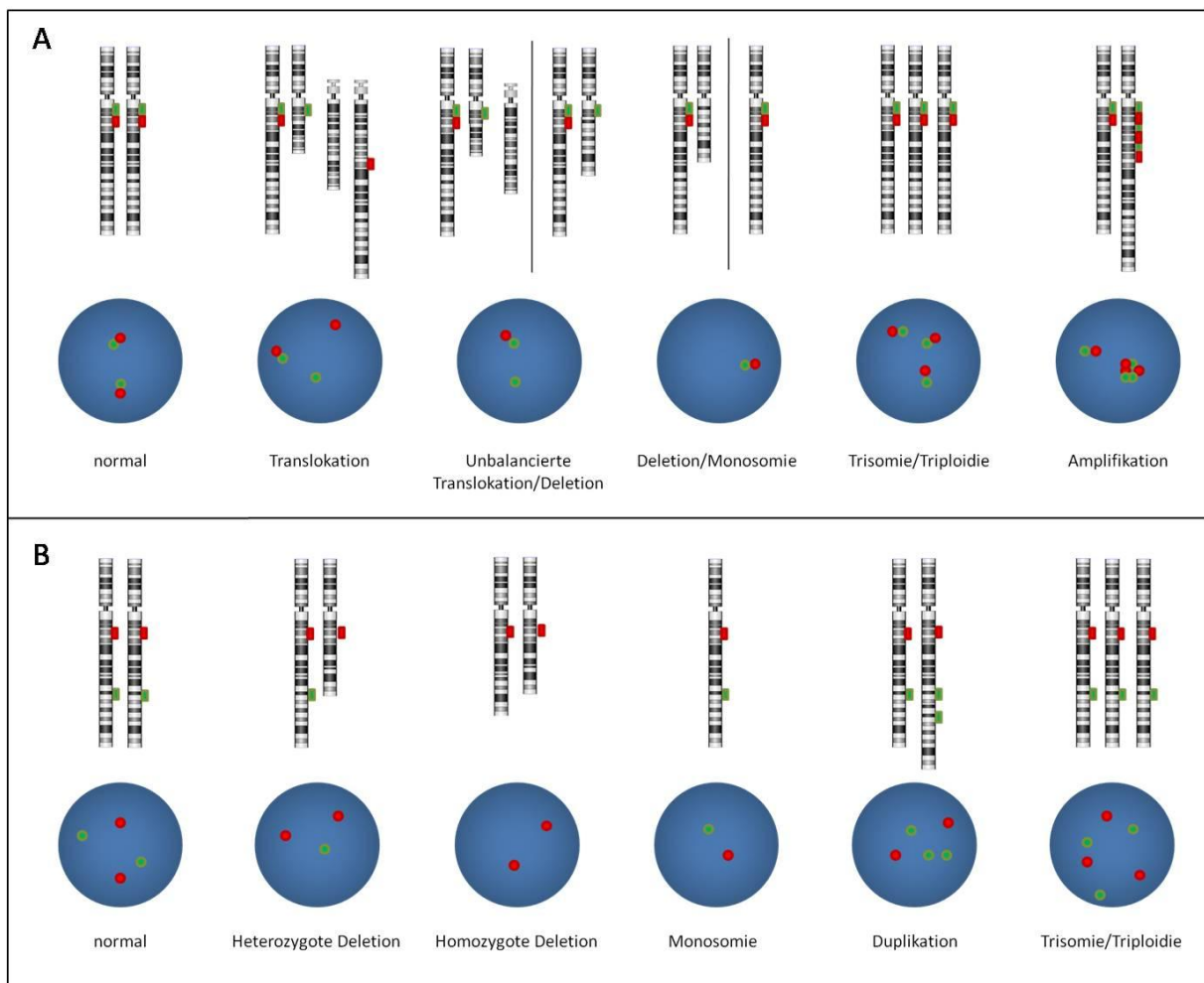


Abbildung 12: Schematische Darstellung einiger FISH-Signalmuster an Interphasekernen und deren mögliche Interpretation mit einer Break-Apart-Sonde (A) und einem Zweifarb-FISH-Assay zur Detektion genomischer Imbalancen (B).

1.3.3 Array-CGH

Die klassische CGH basiert auf der kompetitiven Hybridisierung verschieden farbiger markierter Tumor- und Normal-DNA auf normale Metaphase-Chromosomen. Über das Verhältnis der Signalintensitäten lassen sich numerische, jedoch keine balancierten Aberrationen des Tumorgenoms bestimmen.

Die Array-CGH-Analyse zur Detektion genomischer Imbalancen basiert auf demselben Prinzip wie die klassische CGH. Die Metaphase-Chromosomen werden jedoch durch Microarrays ersetzt. Ein Microarray ist in diesem Fall ein Objektträger, auf dessen Oberfläche definierte DNA-Fragmente rasterförmig angeordnet sind. Die unterschiedlich markierte Tumor- und Kontroll-DNA wird auf den Array kohybridisiert und die Fluoreszenzsignale mit einem Scanner detektiert. Mit entsprechender Software werden die Signale den entsprechenden Chromosomenregionen zugeordnet und die Imbalancen werden sichtbar (Abbildung 13). Für die ersten DNA-Microarrays wurden BAC (bacterial artificial chromosome)-, PAC (P1 artificial chromosome)-, YAC (yeast artificial chromosome), Cosmid- und Fosmid-Klone als Target-DNA verwendet. Die Anzahl der Klone hat dabei stetig zugenommen. Mit dem über 32.000 Klone enthaltenden Tiling-Path-Array wurde das gesamte menschliche Genom abgedeckt. Die Auflösung des Arrays war allerdings durch die Größe der eingesetzten Klone auf etwa 50-200 kb beschränkt. Deshalb wurden Oligonukleotid-Arrays entwickelt, die kleinere synthetisch hergestellte Oligonukleotide enthalten und die für jede beliebige Sequenz des Genoms hergestellt werden können. Verschiedene kommerzielle Array-Plattformen unterscheiden sich in der Oligonukleotidlänge, der Probenmarkierung und den Hybridisierungstechniken. Die maximale Auflösung von Oligonukleotid-Arrays liegt theoretisch bei wenigen Basen. Um jedoch eine ausreichende Spezifität zu erhalten, benötigen die verwendeten Oligonukleotide eine minimale Länge von etwa 25 bp. Da die Oligonukleotide aufgrund der repetitiven Sequenzen nicht gleichmäßig auf den Array verteilt werden können und zudem eine gewisse Varianz der Signalintensität (Streuung) zeigen, liegt die tatsächliche Auflösung der Arrays unterhalb der theoretisch berechneten [141, 143, 146-149].

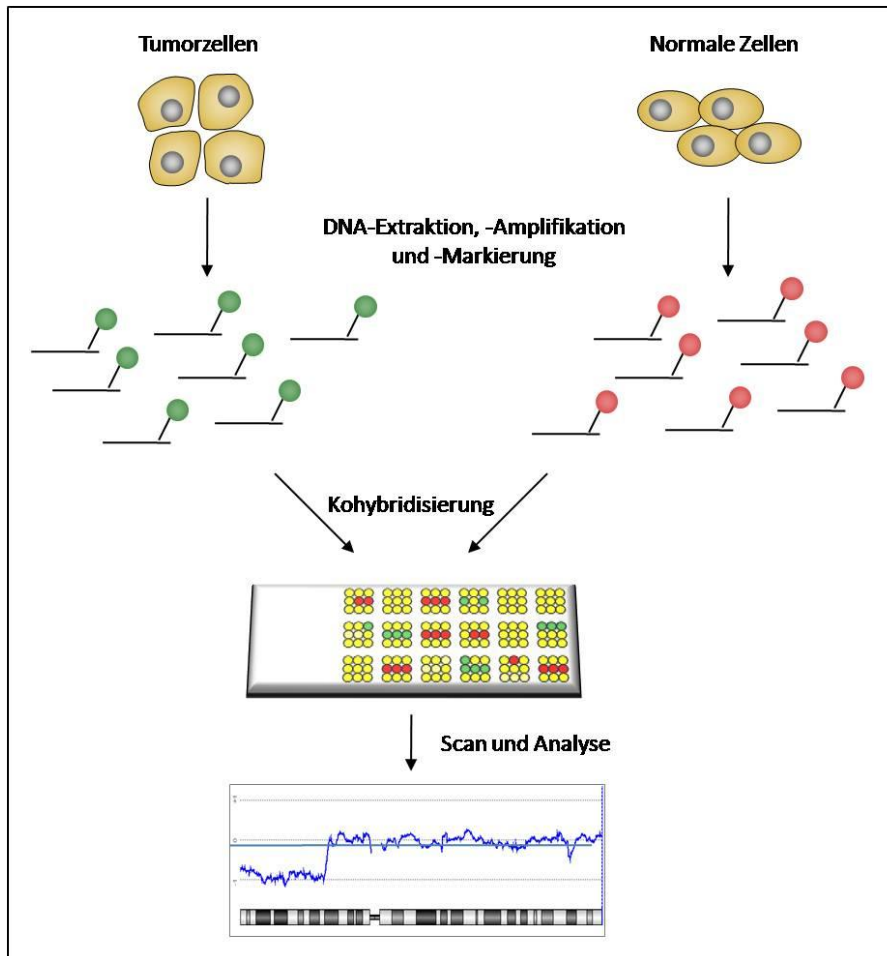


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Array-basierten CGH (modifiziert nach Trask, 2002 und Nieländer et al., 2007 [143, 146]).

1.4 Fragestellung

Durch die Identifizierung von Genen, die bei der Entstehung lymphatischer Neoplasien mitwirken, konnte in den vergangenen Jahrzehnten ein immer besseres Verständnis dieser Tumoren erreicht werden, was auch zu einer sich stetig verbessernden Klassifikation geführt hat. Viele wiederkehrende genetische Veränderungen sind diagnostisch und prognostisch relevant, einige definieren Subgruppen von Lymphomen. Das Chromosom 14 ist in malignen Lymphomen der B-Zell-Reihe besonders häufig betroffen. Die tumorrelevanten Gene einiger dieser Aberrationen sind jedoch bisher unbekannt. Dies ist beispielsweise der Fall bei Deletionen des langen Arms von Chromosom 14, die zytogenetisch häufig in der Chromosomenbande 14q22-24 beginnen, aber auch bei bisher nicht weiter charakterisierten Translokationen, die den *IGH*-Locus im subtelomeren Bereich des langen Arms von Chromosom 14 betreffen. Durch Charakterisierung solcher Translokationen wurden in der

Vergangenheit viele neue Onkogene aufgedeckt, die entscheidend bei der Lymphomentstehung mitwirken.

In dieser Arbeit sollten ausgehend von Veränderungen des langen Arms von Chromosom 14 Gene identifiziert werden, die eine pathogenetische Rolle bei lymphatischen Neoplasien spielen. Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie häufig treten Translokationen $t(5;14)(p15;q32)$ bzw. Varianten dieser Translokation in lymphatischen Neoplasien auf? Kommt die Veränderung in bestimmten Entitäten oder Subentitäten gehäuft vor? Welches Gen in der Region 5p15.33 wird durch den *IGH*-Locus in 14q32 dereguliert?
2. Wo genau liegen die Bruchpunkte der Translokation $t(14;19)(q32;q12)$? Welches Gen in der Region 19q12 wird durch den *IGH*-Locus in 14q32 dereguliert? Ist die Translokation $t(14;19)(q32;q12)$ bzw. sind Varianten dieser Translokation in DLBCL rekurrent?
3. Ist die Translokation $t(14;19)(q32;q13.4)$ bzw. sind Varianten der Translokation in ABC-DLBCL wiederkehrend?
4. Gibt es übereinstimmende Bruchpunktregionen in lymphatischen Neoplasien mit Deletion im langen Arm von Chromosom 14? Wie häufig tritt die Deletion bei diesen Erkrankungen auf? Ist die Aberration mit bestimmten Entitäten oder Subentitäten assoziiert? Mittels welcher molekularer Mechanismen könnte die Deletion des langen Arms von Chromosom 14 tumorfördernd wirken? Welche Gene liegen in den Bruchpunktregionen? Liegen Kandidatentumorsuppressorgene in der deletierten Region und werden diese durch die Aberration dereguliert bzw. inaktiviert?
5. Lässt sich eine veränderte Expression und Funktion von Genen nachweisen, die durch die Aberrationen betroffen sind?

Zusammenfassend sollten die Analysen zu einem besseren allgemeinen Verständnis über die Mechanismen der Lymphomentstehung führen.

2 Material

2.1 Tumormaterial

In dieser Arbeit wurden lymphatische Neoplasien unterschiedlicher Entitäten untersucht. Das verwendete Untersuchungsmaterial ist überwiegend zur tumorgenetischen Routine-Diagnostik im Institut für Humangenetik, in der II. Medizinischen Klinik, im Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) eingegangen. Zudem wurde freundlicherweise speziell für diese Analysen weiteres Tumormaterial aus externen Laboren zur Verfügung gestellt. Die Arbeit wurde im Rahmen und nach den Richtlinien des Netzwerkprojektes „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“ der deutschen Krebshilfe durchgeführt, für das positive Voten, u.a. der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, vorliegen (D425/03).

2.1.1 Tumormaterial für das Screening zur Identifizierung der t(5;14)(p15;q32) und ihrer Varianten

Im Screening zur Identifizierung der t(5;14) und ihrer Varianten wurden 164 Lymphome untersucht. Die Diagnosen und partiellen Karyotypen sind im Anhang 1 aufgeführt. Weiterführende Charakteristika der Fälle, die bei der Analyse Bruchereignisse oder Amplifikationen gezeigt haben, sind im Anhang 2 zusammengestellt. Von den in diesem Screening analysierten Lymphomen wurden 91 von Dr. Doug Horsman und Dr. Randy Gascoyne (Department of Pathology, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, Canada), drei von Prof. Jose Angel Martinez-Climent (Division of Oncology, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, Spanien), zwei von PD Dr. med. Claudia Haferlach (MLL Münchner Leukämielabor GmbH, München, Deutschland), acht von Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer (Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Ulm, Ulm, Deutschland) und zehn von Dr. Evelyne Callet-Bauchu (Laboratoire d'Hématologie et de cytogénétique, Centre Hospitalier Lyon Sud, Lyon, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Der im Anhang 2 angegebene Tumorzellgehalt der Proben wurde mit Hilfe der FISH-Analyse berechnet und ergab sich aus dem Anteil der aberranten Zellkerne, die mit dem 5p15.33-Dreifarb-FISH-Assay detektiert wurden.

2.1.2 Tumormaterial für das Screening zur Identifizierung von die *CCNE1*-Region betreffende Aberrationen

Der für die Cyclin E1/*CCNE1*-Analysen verwendete Tissue Microarray (TMA) mit 67 DLBCL des Projektes „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“ der deutschen Krebshilfe wurde freundlicherweise von PD Dr. Wolfram Klapper (Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt (Anhang 3).

2.1.3 Tumormaterial für das Screening zur Identifizierung von die *SPIB*-Region betreffende Aberrationen

Die TMAs 1 und 2 mit 40 bzw. 37 ABC-DLBCL stammen aus dem „Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project“ (LLMPP) und wurden freundlicherweise von Dr. Andreas Rosenwald (Institut für Pathologie, Universität Würzburg) und Dr. Randy Gascoyne (Department of Pathology, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, Canada) zur Verfügung gestellt (Anhang 4).

Charakteristika der Fälle mit identifizierten chromosomalen Veränderungen in 19q1 sind in Anhang 5 aufgeführt. Der angegebene Tumorzellgehalt der Proben wurde mit Hilfe der FISH-Analyse berechnet und ergab sich aus dem Anteil der aberranten Zellkerne, die mit dem *CCNE1*-FISH-Assay, beziehungsweise dem *SPIB*-Dreifarb-FISH-Assay detektiert wurden.

2.1.4 Tumormaterial für das Screening zur Identifizierung von Aberrationen in 14q24

Im Rahmen des Screenings zur Identifizierung von Veränderungen der Chromosomenregion 14q24 wurden 14 Lymphome untersucht. Die Diagnosen und partiellen Karyotypen sind im Anhang 6 zu finden. Weitere Charakteristika der Fälle, die bei der Analyse Bruchereignisse gezeigt haben, sind im Anhang 7 dargelegt. Von den untersuchten Fällen wurden drei Lymphomproben von Dr. Marta Salido und Dr. Francesc Solé (Servei de Patologia, Laboratori de Citogenètica Molecular, Hospital del Mar, GRETNHE, IMIM, Barcelona, Spanien), eine Lymphomprobe von Prof. Jose Angel Martinez-Climent (Division of Oncology, Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Pamplona, Spanien), 13 Lymphomproben von Dr. Evelyne Callet-Bauchu (Laboratoire d'Hématologie et de cytogénétique, Centre Hospitalier Lyon Sud, Lyon, Frankreich), 14 Lymphomproben von Dr. Maria Jose Calasanz

(Department of Genetics, University of Navarra, Pamplona, Spanien) und zwei Lymphomproben von Elizabeth Schroers (MVZ Dr. Eberhard & Partner, Dortmund, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der im Anhang 7 angegebene Tumorzellgehalt der Proben wurde mit Hilfe der FISH-Analyse berechnet und ergab sich aus dem Anteil der aberranten Zellkerne, die mit dem ZFP36L1-Assay 1 und der LSI IGH Dual Color Break Apart Rearrangement Probe detektiert wurden.

2.1.5 Zelllinien

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 26 Zelllinien verschiedener Entitäten, darunter acht MCL-, fünf Hodgkin-Lymphom-, drei Burkitt-Lymphom, zwei DLBCL-, eine ALL- und fünf weitere Zelllinien hämatologischer Neoplasien untersucht. Die Charakteristika dieser Zelllinien sind im Anhang 8 und Anhang 9 aufgeführt.

2.2 Material für Kontrolluntersuchungen

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen der in der vorliegenden Arbeit etablierten FISH-Assays wurden Zellen aus peripherem Blut von fünf freiwilligen gesunden Probanden verwendet. Für die molekulargenetischen Methoden sowie für die Array-CGH-Analysen wurde als Kontrollen genomische DNAs bzw. RNAs aus dem peripherem Blut freiwilliger gesunder Probanden isoliert. Zur Normalisierung der quantitativen Reverse Transkription (RT)-PCR-Analyse des *TRAF3*-Gens wurde „Normal Peripheral Blood B Cells cDNA (CD19+)“ der Firma Allcells (Emeryville, CA, USA) verwendet. Für die quantitativen RT-PCR-Analysen des *TERT*-Gens wurde zur Normalisierung cDNA aus dem peripherem Blut von freiwilligen gesunden Probanden hergestellt. Außerdem wurde hierfür die cDNAs von zwei Tonsillen und drei nicht-infiltrierten Knochenmarkproben von DLBCL verwendet. Als Kontrollmaterial für die Western-Blot-Analysen wurden aus frischer Tonsille isolierte Proteine verwendet. Als Positiv-Kontrolle dienten außerdem Proteine aus der Zelllinie SUDHL1 (Anhang 9). Die frischen Tonsillen wurden freundlicherweise von PD Dr. Wolfram Klapper (Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt.

Die für die quantitativen RT-PCR- und Westernblot-Analysen als Kontrollen verwendeten Lymphom- und Leukämieproben sind in Anhang 10 bis Anhang 12 beschrieben. Der angegebene Tumorzellgehalt der Proben wurde ermittelt aus dem Anteil der aberranten Zellkerne bei der FISH-Analyse innerhalb der Routinediagnostik mit verschiedenen Assays.

2.3 Geräte und Software

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Array-CGH-Scanner	GenePix4000B	Axon Instruments, Toronto, Canada
Brutschrank	Function Line	Heraeus, Hanau, Deutschland
DHPLC-Anlage	Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System 4500	Transgenomic, Omaha, NE, USA
Filtersätze	Multiband-Filter-Systeme	AHF, Tübingen, Deutschland
FISH-Waschautomat	VP2000 Processor	Abbott/Vysis, Downers Grove, IL, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.A1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Geldokumentation	BioDoc Analyzer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelkammer	Criterion® Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelkammer	Hoefer HE 33	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Gelkammer	Modell 41-2026	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Hybridisierungs-ofen	DNA Microarray Hybridization Oven	Agilent, Santa Clara, USA
Lichtmikroskop	476012	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Microfluidics-System	2100 Bioanalyzer	Agilent, Santa Clara, USA
Microfluidics-System	Experion® Elektrophorese System	Bio-Rad, München, Deutschland
Mikrowelle	M500	Philips, Hamburg, Deutschland
Netzgerät	El. Phor.-Powerpack P24	Biometra, Göttingen, Deutschland
Netzgerät	Electrophoresis Power supply ST606	GIBCO BRL life Technologies, Eggenstein, Deutschland
Netzgerät	Power Pack HC	AGFA, Köln, Deutschland
Plattenschüttler	MS 3 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Real-time PCR-Analyser	ABI Prism Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Real-time PCR-Analyser	iCycler®	Bio-Rad, München, Deutschland
Schnellkochtopf	Clipso	Tefal, Offenbach, Deutschland
Sequenzierer	ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Sequenzierer	Genetic Analyzer ABI PRISM 310	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Software	2100 Expert Software	Agilent, Santa Clara, USA
Software	310 Genetic Analyzer DATA collection Software Version 3.1	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Software	BioDoc Analyze Software Version 2.1	Biometra, Göttingen, Deutschland
Software	CGH Analytics 3.5.14	Agilent, Santa Clara, USA
Software	DNA Sequencing Analysis Software 5.2	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Software	eArray 6.2	Agilent, Santa Clara, USA
Software	Experion® Software 2.1	Bio-Rad, München, Deutschland

Material

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Software	Feature Extraction 9.5.3	Agilent, Santa Clara, USA
Software	GenePix Pro 6.1	Molecular Devices, Toronto, Canada
Software	iCycler® iQ optical System Software Version 3.0a	Bio-Rad, München, Deutschland
Software	ISIS Software Version 5.1.9	Metasystems, Altusheim, Deutschland
Software	ISIS Software Version 5.2.11	Metasystems, Altusheim, Deutschland
Software	NanoDrop® Software Version 3.2.1	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Software	Navigator™ Software Version 1.7.0	Transgenomic, Elancourt, Frankreich
Software	NimbleScan v2.3	Roche NimbleGen, Madison, WI, USA
Software	Run 3100-Avant Data Collection v2.0 Software	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Software	SignalMap v1.9	Roche NimbleGen, Madison, WI, USA
Spektrophotometer	NanoDrop® ND-1000 Spectrometer	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Spektrophotometer	Smart Spec™ Plus	Bio-Rad, München, Deutschland
Tank-Blot-Apparatur	Trans-Blot-Apparatur	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermocycler	T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Universalschüttler mit Inkubationshaube	SM-30 und TH30	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Vakuumpumpe	MultiScreen HTS Vacuum Manifold	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Vakuumzentrifuge	SpeedVac RC 1010	Thermo Scientific, Waltham, Ma, USA
Wasserbad	-	Labortechnik Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Wasserbad	WNE 14	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge 22R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Mikro 200	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 1 L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zytogenetische Trocknungskammer	CDS-5	Thermotron industries, Holland, MI, USA

2.4 Reagenzien, Chemikalien und Enzyme

100 bp-DNA-Längenstandard (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Acetyliertes BSA (Promega, Mannheim, Deutschland)

Agar-Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Agarose (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Alu I (Promega, Mannheim, Deutschland)

Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

β-Mercaptoethanol (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)

Borsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Carbenicillin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Material

Cyanine 3-dUTP (Perkin Elmer, Boston, MA, USA)
Cyanine 5-dUTP (Perkin Elmer, Boston, MA, USA)
DABCO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
DAPI (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Desoxynucleosid-Triphosphat Set (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
Dextransulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
DNASep® HAT Cartridge (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
dUTP-Diethylaminomethyl coumarin (DEAC) (NEN, Zaventem, Belgien)
dUTP spectrum green (1 mM) (Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)
dUTP spectrum orange (1mM) (Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)
EDTA (0,5 M) (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Fixogum-Kleber (Marabu, Tamm, Deutschland)
Formamid deionisiert (Amresco, Solon, Ohio, USA)
Glycerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Glycin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Gold Star® Taq-Polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgien)
HCl 2 N (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Human Cot-1 DNA (1 mg/ml) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Human Cot-1 DNA (1 mg/ml) (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde, Deutschland)
Igepal CA-630 Detergenz (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Lauril (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
LB Broth Base® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Microcon® YM-30 Säule (Millipore, Schwalbach, Deutschland)

NaAc (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Na₃Citrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
NaOH 5 N (Merck, Darmstadt, Deutschland)
One Shot TOP10 chemisch kompetente Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Paraformaldehyd (Serva, Heidelberg, Deutschland)
pCR 2.1-TOPO Vector (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Pepsin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Ponceau S (Serva, Heidelberg, Deutschland)
POP4 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Precision Plus WesternC Standard (Bio-Rad, München, Deutschland)
Protran BA85 Blotting Sandwiches (Whatman Ltd, Maidstone, UK)
Puffer C (Promega, Mannheim, Deutschland)
Roti® Histol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Rsa I (Promega, Mannheim, Deutschland)
SDS (Natriumdodecylsulfat) (Serva, Heidelberg, Deutschland)
SSPE (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Stabilization and Drying-Solution (Agilent, Santa Clara, USA)
Sterilfilter (Millipore, Schwalbach, Deutschland)
TE (1x, pH 8,0), Molecular grade (Promega, Mannheim, Deutschland)
Texas Red®-12-dUTP (Molecular Probes, Eugene, USA)
Tris-HCl Ready Gel Precast Gel (Bio-Rad, München, Deutschland)
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Tween-20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Urea (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
WAVE® DNA Sizing Standard (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
WAVE® High Range Mutation Standard (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
WAVE® Low Range Mutation Standard (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
WAVE® optimized Buffer A (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
WAVE® optimized Buffer B (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
WAVE® optimized Buffer D (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
WAVE® Syringe Wash Solution (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
X-Gal 99 % (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.5 Puffer und Lösungen

Antifade

230 mg DABCO

800 µl dH₂O

200 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0

wurden in 9 ml Glycerol gelöst.

Array-Waschpuffer 1

50 ml 20x SSPE

500 µl Lauril

wurden mit dH₂O auf 2 l aufgefüllt und mit Sterilfiltern über eine Wasserstrahlpumpe gereinigt.

Array-Waschpuffer 2

5 ml 20x SSPE

250 µl Lauril

wurden mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt und mit Sterilfiltern über eine Wasserstrahlpumpe gereinigt. Vor der Verwendung wurde der Puffer über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert.

Blocking-Reagenz

5 g Membrane blocking agent (ECF Western Blotting Reagent Packs, Amersham Biosciences)

wurden in 100 ml TBS-T gelöst.

Blot-Puffer

3,03 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

14,4 g Glycin

200 ml Methanol

wurden mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt.

Carnoy's-Fixativ

50 µl Eisessig

150 µl Methanol

DAPI-Lösung

6 µl DAPI-Konzentrat (0,2 mg/ml DAPI in dH₂O)

60 ml 2x SSC

EDTA-Puffer (0,5 M, pH 8,0)

186,1 g Na₂EDTA·2H₂O

wurden in 700 ml dH₂O gelöst und mit 10 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Anschließend wurde mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt.

EDTA-Puffer (1 mM, pH 8,0)

2 ml 0,5 M EDTA-Puffer pH 8,0

wurden mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt.

Gel-Ladepuffer

0,125 g Bromphenolblau

28,7 g Glycerol

wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt und gelöst.

LB-Medium

20 g LB BROTH BASE®

wurden in 1 l dH₂O gelöst und autoklaviert.

LB-Platten

10 g LB BROTH BASE®

15 g Agar-Agar

wurden mit dH₂O auf 500 ml aufgefüllt und autoklaviert. Es wurden 500 µl Carbenicillin (50 mg/ml) und 1,25 ml X-Gal (4 % in Dimethylformamid) zugegeben und das Gemisch in Platten (10 cm) ausgegossen.

Mastermix

2,5 ml deionisiertes Formamid

1,25 ml erwärmtes Dextransulfat (40 %)

0,5 ml 20x SSC

wurden mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit 1x SSC auf 4,5 ml aufgefüllt.

Paraformaldehydlösung 1 %

1 g Paraformaldehyd

1 ml 1 M MgCl₂

wurden mit 1x PBS auf 100 ml aufgefüllt, leicht erwärmt und auf pH 7,5 eingestellt.

PBS (phosphate buffered saline) (10x)

80 g NaCl

2 g KCl

6,1 g Na₂HPO₄

2 g KH₂HPO₄

wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt, gelöst und auf pH 7,3 eingestellt.

Pepsin-Lösung

5 mg Pepsin

0,5 ml 2N HCl

wurden in 99,5 ml dH₂O gelöst.

SDS-PAGE-Laufpuffer

30 g Urea

3 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

14,4 g Glycin

10 ml 10 % SDS

wurden mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt.

SDS-Probenpuffer

1,51 g Trishydroxymethyl)-aminomethan

wurden in 50 ml dH₂O gelöst und auf pH 6,8 eingestellt.

20 ml Glycerol

20 mg Bromphenolblau

6 g SDS

wurden dazugegeben, mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt und portioniert eingefroren. Vor Gebrauch wurde eine Spatelspitze Dithiothreitol (DTT) zugegeben.

SSC (Standard Saline Citrate) (20x)

175,3 g NaCl

88,2 g Na₃Citrat

wurden in dH₂O gelöst, mit HCl auf pH 7,0 eingestellt und mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt.

SSC (Standard Saline Citrate) (2x)

100 ml 20x SSC-Lösung

wurden mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt.

SSC-Lösung 1

2 ml 20x SSC

300 µl Igepal

wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

SSC-Lösung 2

10 ml 20x SSC

100 µl Igepal

wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Stripping-Buffer

30 g Glycin

40 ml 10 % SDS

2 ml Tween-20

wurden mit dH₂O auf 200 ml aufgefüllt.

TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) (10x)

108 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

wurden mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt.

TBS

29,24 g NaCl

2,4 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

wurden mit dH₂O auf 1 l aufgefüllt und auf pH 7,5 eingestellt.

TBS-T

TBS-Puffer mit 0,1 % Tween-20

Tris-HCl (1M, pH 8,0)

12,1 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

wurden in dH₂O gelöst, mit HCl auf pH 8,0 eingestellt und mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

2.6 Kits

Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit (Agilent, Santa Clara, USA)

Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

Bioprime[®] Array-CGH Genomic Labeling System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Bioprime[®] DNA-Labeling System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland)

ECF Western Blotting Reagent Packs (GE Healthcare, München, Deutschland)
ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, München, Deutschland)
Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
Experion® RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad, München, Deutschland)
Montage SEQ 96 Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore, Schwalbach, Deutschland)
Non-Interfering Protein Assay™ Kit (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
NuleoSpin Blood (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
Perfectprep® Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Perfectprep® Plasmid Maxi Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Precision Plus WesternC Standard (Bio-Rad, München, Deutschland)
Precision StrepTactin-HRP Conjugate (Bio-Rad, München, Deutschland)
ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
ProteoExtract® Complete Mammalian Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, USA)
Qiashreder (Qiagen, Hilden, Deutschland)
QuantiTect® Probe PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
QuantiTect® Reverse Transkription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
QuantiTect® SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
RNA 600 NANO Assay (Agilent, Santa Clara, USA)
RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
Surveyor Mutation Detection Kit (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
TOPO TA Cloning Kit mit pCR 2.1-TOPO Vector und One Shot TOP10 chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

2.7 Bacterial Artificial Chromosome (BAC)- und Fosmid-Klone für die Herstellung locuspezifischer FISH-Sonden

Im Rahmen des Humanen Genom Projektes wurde die menschliche DNA fragmentiert und in Klonierungsvektoren wie BACs, PACs, Cosmide und Fosmide inseriert. In dieser Arbeit wurde diese BAC- und Fosmid-DNA für die Herstellung locuspezifischer FISH-Sonden verwendet. Die Auswahl der Klone erfolgte mit Hilfe der Datenbank Human Genome Browser Gateway

(<http://genome.ucsc.edu/>). Die Klone der Caltech D (CTD) BAC Bibliothek wurden bei Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), die Klone der BAC Bibliothek des Roswell Park Cancer Institutes (RP11) beim Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (<http://www.rzpd.de>) und die Fosmid-Klone (WI2, Whitehead Institute) beim Sanger-Institut (<http://www.sanger.ac.uk>) bestellt. Die vektorenhaltenden *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien wurden zunächst in LB-Medium-Vorkulturen über Nacht an kultiviert. Anschließend wurden 500 µl der Bakterienkultur zu 500 µl Glycerin gegeben und dieser Glycerin-Stock bei -80 °C gelagert.

Tabelle 6: Verwendete Klone für die FISH-Analysen

Klon-Bezeichnung ¹	Locus	Position [bp] ²	RefSeq-Genes
RP11-323M9	5p15.33	205.276-392.087	<i>PLEKHG4B, SDHA, PDCD6, AHRR</i>
RP11-678B2	5p15.33	851.472-1.041.755	<i>ZDHHC11; BRD9; TRIP13</i>
RP11-117B23	5p15.33	1.260.045-1.422.139	<i>SLC6A18; TERT; CLPTM1L</i>
WI2-1943L8	5p15.33	1.327.987-1.368.909	<i>TERT</i>
WI2-841J3	5p15.33	1.349.298-1.386.902	<i>CLPTM1L</i>
WI2-1054L12	5p15.33	1.363.945-1.399.036	<i>CLPTM1L</i>
WI2-1945M12	5p15.33	1.373.051-1.408.036	<i>CLPTM1L</i>
RP11-94J21	5p15.33	1.377.471-1.540.913	<i>CLPTM1L; SLC6A3; LPCAT1</i>
WI2-2731B8	5p15.33	1.377.634-1.414.077	<i>CLPTM1L</i>
WI2-1224D6	5p15.33	1.386.147-1.426.553	<i>CLPTM1L</i>
RP11-1125A11	5p15.33	1.405.987-1.562.881	<i>SLC6A3; LPCAT1</i>
RP11-161F13	5p15.33	1.562.895-1.724.268	<i>LPCAT1; SDHAP3; LOC728613</i>
RP11-260M20	5p15.33	1.735.427-1.897.108	<i>MRPL36; NDUFS6</i>
RP11-259O2	5p15.33	1.916.850-2.071.732	<i>IRX4</i>
RP11-356C5	5p15.33	2.224.377-2.406.663	No gene
RP11-20B3	5p15.33	3.055.343-3.213.642	No gene
RP11-13H10	5p15.33-5p15.32	4.351.714-4.533.623	No gene
RP11-58A5	5p15.32	4.965.694-5.123.154	<i>LOC340094</i>
RP11-35K22	5p15.32	5.802.608-5.955.704	No gene
RP11-241D13	11q22.3	107.540.537-107.722.059	<i>NPAT; ATM</i>
RP11-420H22	11q22.3	109.734.799-109.919.070	<i>FDX1</i>
RP11-34F20	13q14.3	49.478.679-49.633.565	<i>TRIM13; KCNKG</i>
RP11-480P3	13q14.3	49.633.466-49.719.243	<i>FAM10A4</i>
RP11-369L4	13q14.3	49.719.144-49.850.074	No gene
RP11-175B12	13q14.3	49.973.084-50.099.510	No gene
RP11-233H19	13q14.3	50.187.167-50.328.618	<i>DLEU7</i>
RP11-58C16	13q14.3	50.191.198-50.191.416	<i>DLEU7</i>
RP11-447G18	14q11	[150]	<i>TCRAD</i>
RP11-977G1	14q23.3-14q24.1	66.956.961-67.134.585	<i>C14orf83; PLEKHH1</i>
RP11-1058L7	14q24.1	67.126.647-67.325.582	<i>PIGH; ARG2; VTI1B; RDH11; RDH12; ZFY26</i>
RP11-1081C22	14q24.1	67.735.531-67.929.703	<i>RAD51L1</i>
RP11-179B8	14q24.1	68.224.800-68.405.778	<i>ZFP36L1; C14orf181</i>
WI2-1549F1	14q24.1	68.261.016-68.303.440	No gene
WI2-1852O14	14q24.1	68.278.586-68.317.735	No gene
RP11-1031O11	14q24.1	68.290.160-68.480.671	<i>ZFP36L1; C14orf181; ACTN1</i>

Material

Klon-Bezeichnung ¹	Locus	Position [bp] ²	RefSeq-Genes
WI2-2822O2	14q24.1	68.310.417-68.346.699	<i>ZFP36L1</i> ; <i>C14orf181</i>
WI2-2202H16	14q24.1	68.330.387-68.370.894	<i>C14orf181</i>
WI2-2559E18	14q24.1	68.350.217-68.392.101	No gene
RP11-65A20 ³	14q24.1	68.370.241-68.544.848	<i>ACTN1</i>
WI2-697I16	14q24.1	68.424.347-68.461.676	<i>ACTN1</i>
RP11-45K7	14q24.1	68.458.614-68.637.391	<i>ACTN1</i> ; <i>WDR22</i>
RP11-960B20	14q24.1	68.520.068-68.734.551	<i>WDR22</i>
RP11-714M18	14q24.1	68.844.462-69.020.773	<i>ERH1</i> ; <i>SLC39A9</i>
CTD-2019G17	14q24.1	69.030.378-69.252.946	<i>FLJ44817</i> ; <i>C14orf162</i> ; <i>KIAA0247</i>
RP11-1113M10	14q24.1-14q24.2	69.233.335-69.413.045	<i>KIAA0247</i> ; <i>SFRS5</i> ; <i>SLC10A1</i>
RP11-300A24	14q24.2	69.390.393-69.581.154	<i>SMOC1</i>
RP11-195B2	14q24.2	69.492.306-69.662.799	<i>SMOC1</i> ; <i>SLC8A3</i>
RP11-747D3	14q31.3	88.433.474-88.628.699	No gene
RP11-960M10	14q31.3	88.627.379-88.818.714	<i>FOXN3</i>
RP11-786H7	14q31.3-14q32.11	88.798.639-88.973.921	<i>FOXN3</i>
CTD-3235K2	14q32.32	102.335.482-102.405.530	<i>TRAF3</i>
RP11-150I16	14q32.33	104,367,766-104,533,191	<i>KIAA0284</i> ; <i>PLD4</i> ; <i>AHNAK2</i>
RP11-817G24	14q32.33	104,533,194-104,759,742	<i>CDCA4</i> ; <i>GPR132</i> ; <i>JAG2</i>
RP11-937M13	14q32.33	104,759,745-104,947,992	<i>BRF1</i> ; <i>PACS2</i>
RP11-141I7	14q32.33	105,679,974-105,831,033	<i>IGH-Locus</i>
RP11-683L4	14q32.33	105,912,194-106,066,065	<i>IGH-Locus</i>
CTD-2011A5	14q32.33	106,118,006-106,302,057	<i>IGH-Locus</i>
RP11-199F11	17p13.1	7.478.108-7.599.152	<i>ATP1B2</i> ; <i>TP53</i> ; <i>WRAP53</i> ; <i>EFNB3</i> ; <i>DNAH2</i>
RP11-400F19	17q21.31	37.904.426-38.083.571	verschiedene
RP11-345J21	19q12	34.827.676-35.023.872	<i>PLEHF1</i> . <i>C19orf12</i> ; <i>CCNE1</i>
RP11-17N20	19q12	35.062.117-35.218.186	<i>C19orf2</i>
RP11-1051H12	19q13.33	55.756.597-55.954.297	<i>SYT3</i> ; <i>SHANK1</i> ; <i>CLEC11A</i>
RP11-45F3	19q13.33	55.605.506-55.778.832	<i>SPIB</i> ; <i>MYBPC2</i> ; <i>C19orf13</i> ; <i>ASPDH</i>
CTD-2126E3	19q13.33	55.186.918-55.354.717	<i>VRK3</i> ; <i>ZNF473</i>

¹RP11 und CTD bezeichnen BAC- und WI2 bezeichnen Fosmid-Klone. ²NCBI Build 36.1; ³NCBI Build 35 RefSeq; NCBI Reference Sequences Collection

2.8 Kommerzielle FISH-Assays

CEP 11 (D11Z1) SpectrumAqua Probe (Abbott/Vysis, Abbott Park, IL, USA)

CEP 17 (D17Z1) SpectrumAqua Probe (Abbott/Vysis, Abbott Park, IL, USA)

LSI 13/21 (Abbott/Vysis, Abbott Park, IL, USA)

LSI CHOP (12q13) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott/Vysis, Abbott Park, IL, USA)

LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott/Vysis, Abbott Park, IL, USA)

2.9 Sonden-Kombinationen der verwendeten FISH-Assays

11q-Deletion-Assay: RP11-241D13 (Spectrum orange), RP11-420H22 (Spectrum green) und CEP 11 (D11Z1) SpectrumAqua Probe (Abbott/Vysis)

13q-Deletion-Assay: RP11-175B12, RP11-58C16, RP11-233H19 (Spectrum orange) und RP11-34F20, RP11-480P3, RP11-369L4 (Spectrum green)

17p-Deletion-Assay: RP11-400F19 (Spectrum green), RP11-199F11 (Spectrum orange) und CEP 17 (D17Z1) SpectrumAqua Probe (Abbott/Vysis)

5p15.33-Dreifarb-FISH-Assay: RP11-678B2 (Spectrum green), RP11-117B23 (DEAC) und RP11-356C5 (Spectrum orange)

CCNE1-FISH-Assay: RP11-345J21 (Spectrum green) und RP11-17N20 (Spectrum orange)

IGH/TERT-CLPTM1L-Assay: LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott/Vysis), RP11-117B23 (DEAC)

IGH-ZFP36L1-Fusionssonde: RP11-179B8 (Spectrum green) und RP11-150I16, RP11-817G24, RP11-937M13, RP11-141I7, RP11-683L4, CTD-2011A5 (Spectrum orange)

SPIB-Dreifarb-FISH-Assay: RP11-1051H12 (Spectrum orange), RP11-45F3 (DEAC) und CTD-2126E3 (Spectrum green)

TRAF3-FISH-Assay: RP11-977G1 (Spectrum orange) und CTD-3235K2 (Spectrum green)

ZFP36L1-Assay 1: RP11-179B8 (Spectrum orange) und RP11-65A20 (Spectrum green)

ZFP36L1-Assay 2: RP11-977G1 (Spectrum green) und RP11-195B2 (Spectrum orange)

2.10 Kommerzielle Microarrays

Human Genome CGH Microarray Kit 44A (Agilent, Santa Clara, CA, USA)

Human Genome CGH Microarray Kit 44B (Agilent, Santa Clara, CA, USA)

Human Genome CGH Microarray Kit 244A (Agilent, Santa Clara, CA, USA)

HG18 CGH 385K WG Tiling v2.0 (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA)

2.11 Custom-Arrays

Für die hochauflösende Untersuchung bestimmter chromosomaler Regionen mittels Array-CGH wurden 44K-Custom-Arrays mit Hilfe der eArray Software 6.2 (Agilent) entworfen. Dabei wurde für die zu untersuchenden Regionen die maximale Anzahl von High definition

(HD)-Oligonukleotiden gewählt. Diese Oligonukleotide erfüllen bestimmte Voraussetzungen der Firma Agilent bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität. Zur Normalisierung wurde das Design mit von der eArray-Software zufällig gewählten Proben des kommerziellen Human Genome 44K-Arrays aufgefüllt. Die Arrays mit dem entsprechenden Design wurden bei der Firma Agilent bestellt.

Gewählte Regionen für die Kartierung der Bruchpunkte der Deletion del(14)(q24q32) (NCBI Build 36.1):

14q24: Chr14:68.224.800-68.405.850

14q32: Chr14:105.000.000-106.368.585

Gewählte Region für die Kartierung der Bruchpunkte der Translokationen t(5;14)(p15;q32) und t(5;7)(p15;p11) (NCBI Build 36.1):

5p15.33: Chr5:1.320.000-1.400.000

2.12 Antikörper

α -Tubulin: ab7291, Abcam, Cambridge, MA, USA

Cyclin E mouse monoclonal antibody, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK

Mouse Anti-Ku p70 antibody, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

TRAF3 (H-122): sc-1828, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

TRAF3 (H-20): sc-948, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

2.13 Primer

Die Auswahl geeigneter Primer erfolgte mit der Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) Software. Die Sequenz der genomischen DNA oder der RNA-Transkripte wurde der Datenbank Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) entnommen. Die Primer wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bestellt.

2.13.1 Primer für die DHPLC-Analyse

Für die Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC)-Analyse des *TRAF3*-Gens wurde versucht, die Primer etwa 75 bp vor bzw. nach den Exon-Grenzen zu positionieren, um das vollständige Exon und die entsprechenden Spleißstellen zu analysieren. Im Fall von Exon 6 (NM_145725) konnte aufgrund repetitiver Sequenzen allerdings nur ein Abstand von 13 bp zwischen Primer und Exon-Grenze eingehalten werden.

Tabelle 7: Primersequenzen und DHPLC-Bedingungen für die *TRAF3*-Mutationsanalyse

Exon ¹	Laborinterne Nummer	Orientierung	Sequenz	Fragment-Größe [bp]	DHPLC-Gradient [%] ²	DHPLC-Temperaturen [°C]
3	4611	v	5'-CTCAGGCACTTTTGCTTTCC-3'	475	58,2-67,2	58,1
	4612	r	5'-CGGAGGCTTTTATGGACTTC-3'			62,0
4	4613	v	5'-CTGTGAGCCACTGTGCAGAC-3'	263	53,3-62,3	57,7
	4614	r	5'-TGAGAGAATGTGTTGTGCCAG-3'			
5	5284	v	5'-TGCCTTGCCAAAGTAGCAGC-3'	278	55,9-64,9	55,0
	4616	r	5'-TGGTCTTAAAGTGCCACATCC-3'			58,0
6	5285	v	5'-TCCCAATTAAGAACATTGAATGGT-3'	248	57,9-66,9	55,3
	5286	r	5'-CATATAGGAATTGAGTGGGAAGGC-3'			60
7	4619	v	5'-GATGGTGAGCAGAGCCATTC-3'	296	54,6-63,6	60,5
	4620	r	5'-CATGACTCTCACGAACTGGG-3'			61,8
8	4621	v	5'-CACACCTGTAGCGATAAACACC-3'	340	55,8-64,8	57,0
	4622	r	5'-CTTTCGTACCCATGCAAC-3'			59,0
9	4623	v	5'-CCCCTCTTGTGTTTAGTGCTG-3'	307	54,9-63,9	55,8
	4624	r	5'-TTGATAGTTTCTTTTATCCAAAACCC-3'			62,0
10	4625	v	5'-AAGCTAACAGAAGGCCTATATTGTG-3'	347	57,2-66,2	51,9
	4626	r	5'-GCAAAGGTCAAGGACTCAGC-3'			54,9
						55,9
11	4627	v	5'-GCCTCTGACTGTTCTGCTCC-3'	430	57,2-66,2	59,1
	4628	r	5'-AGTCATCACACCTCTGCGTG-3'			
12	4629	v	5'-GTGCCAGGTCTACCTGAAC-3'	456	58,0-67,0	55,0
	4630	r	5'-TTCCTCCGTCTCACAAGGTC-3'			59,7

r: rückwärts; v: vorwärts

¹ Die Exons der bekannten *TRAF3*-Isoformen NM_145725, NM_003300 und NM_145726 wurden nach ihrer genomischen Position von 1-12 durchnummeriert, wobei die Exons 1 und 2 nicht-kodierend sind und aus dem Grund nicht analysiert wurden. Die *TRAF3*-Isoform NM_145725 enthält alle 12 Exons, der Isoform NM_003300 fehlt Exon 2 und der Isoform NM_145726 fehlt Exon 8.

² Bezieht sich auf den Anteil von Puffer B innerhalb von 4,5 min.

2.13.2 Primer für die Bruchpunktklonierungen

Die Primer für die Bruchpunktklonierungen in der Region 14q24 wurden in Abständen von maximal 400 bp ausgewählt. Für den *IGH*-Locus wurden Primer verwendet, die bereits im Institut für Humangenetik in Kiel erfolgreich für die Bruchpunktklonierung von *IGH*-Translokationen verwendet wurden.

Tabelle 8: Primer für die genomische Bruchpunktklonierung und Bestimmung von Fusionstranskripten der Deletion del(14)(q24q32)

Laborinterne Nummer	Lage	Orientierung ¹	Sequenz	Lokalisation ² [bp]
Primer zur Bruchpunktklonierung in der Region 14q24 im Gen <i>ZFP36L1</i>				
3934	3'UTR	+	5'-TCTGGCGCTGAAGAGGTAAT-3'	chr14:68325581-68325600
4304	3'UTR	+	5'-GGAGAAGAGGGTATGGGATG-3'	chr14:68325932-68325951
4305	Exon 2	+	5'-CCTCCCTACCCTGGCTTAGT-3'	chr14:68325988-68326007
4312	Exon 2	+	5'-CAAACATGTGAGGGGACTCG-3'	chr14:68326152-68326171
4306	Exon 2	+	5'-GGAAACCCAGCAAAGCTAAA-3'	chr14:68326397-68326416
4302	Exon 2	+	5'-ACGGTCAGCGGAGAGGTC-3'	chr14:68326435-68326452
4338	Exon 2	+	5'-TTGTAGCGCTGGAGTTGAC-3'	chr14:68326673-68326692
4265	Exon 2	+	5'-GGTTCTGGTGAACCTGGAG-3'	chr14:68326824-68326843
4266	Exon 2	+	5'-ACTGCCTTTCTGTCCAGCAG-3'	chr14:68326898-68326917
4307	Intron	+	5'-TCTGTCCCAAAGCTACCAC-3'	chr14:68327229-68327248
3935	Intron	+	5'-GCTACGTTAGGTCCCCTCC-3'	chr14:68327394-68327413
4308	Intron	+	5'-AGCTGCAGATGGAAAGGAAA-3'	chr14:68327774-68327793
4309	Intron	+	5'-AGTGGAGTTTGGGAATGTGC-3'	chr14:68328222-68328241
3936	Intron	+	5'-TTAAACCGCAGTCCTGGAAC-3'	chr14:68328515-68328534
4310	Intron	+	5'-TTGTCCCGAGACTCACTTCC-3'	chr14:68328900-68328919
4300	Intron	+	5'-AATCATCTCGCTGCACCAC-3'	chr14:68329236-68329254
3655	Exon 1	+	5'-AGTCGAAGATGGTGGCAGAC-3'	chr14:68329372-68329391
3654	Exon 1	+	5'-GTGGTCATCTGTGCGTTC-3'	chr14:68329400-68329419
Primer zur Bruchpunktklonierung in der Region 14q32 im <i>IGH</i>-Locus				
1117 ³	C _γ	-	5'-CCCAGCATGGAAATAAAGCACCC-3'	chr14:105161746-105161768 chr14:105180473-105180495 chr14:105205515-105205537 chr14:105278743-105278765
1113 ³	C _γ	-	5'-TCCCTGAGGTGGCACCGATG-3'	chr14:105163802-105163821 chr14:105182527-105182546 chr14:105280803-105280822 chr14:105309143-105309162
4268	I _γ	-	5'-CTCTCAGCCAGGACCAAGGA-3'	chr14:105166390-105166409 chr14:105185196-105185215 chr14:105284714-105284733 chr14:105312415-105312434
1116 ³	C _γ	-	5'-CACGCAGAAGAGCCTCCTCCCTGT-3'	chr14:105205642-105205664 chr14:105306633-105306655 chr14:105180599-105180621 chr14:105278869-105278891
1025 ³	C _μ /E _μ	-	5'-CTAGACTAAACAAGGCTGAACT-3'	chr14:105397637-105397658

Material

Laborinterne Nummer	Lage	Orientierung ¹	Sequenz	Lokalisation ² [bp]
1024 ³	C _μ /E _μ	-	5'-GGACTCAGATGGGCAAACACTGACCTAA-3'	chr14:105397665-105397691
1037 ³	C _μ /E _μ	-	5'-CCCATGCCTTCCAAAGCGATT-3'	chr14:105398221-105398241
1036 ³	C _μ /E _μ	-	5'-CACTGGCATCGCCCTTGTCTAA-3'	chr14:105398281-105398302
4267	C _μ /E _μ	-	5'-AGGCTCGCAGTGACCAGG-3'	chr14:105398575-105398592
1035 ³	C _μ /E _μ	-	5'-GCCCTTGTTAATGGACTTGGAGGA-3'	chr14:105398622-105398645
1034 ³	C _μ /E _μ	-	5'-TGGGATGCGTGGCTTCTGCT-3'	chr14:105398674-105398693
1033 ³	C _μ /E _μ	-	5'-CTTCTGGTTGTGAAGAGGTGGTTTTG-3'	chr14:105399399-105399424
1032 ³	C _μ /E _μ	-	5'-GAAGCAGGTCACCGCGAGAGT-3'	chr14:105399466-105399486
3855	J _H - Segments	-	5'-GGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG-3'	chr14:105400448-105400469

¹Die Orientierung der Primer bezieht sich auf die genomische DNA-Sequenz.

²Die genomische Lokalisation der Primer wurde mit Hilfe der Datenbank Human BLAT Search <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> (HG18) bestimmt.

³Diese Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

C: constant; E: Enhancer

2.13.3 Primer für die Kolonie-PCR

Die in der Kolonie-PCR verwendeten Primer binden innerhalb des pCR 2.1-TOPO-Vektors, dessen Sequenz unter (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_seq.txt) ersichtlich ist.

Tabelle 9: Primer für die Kolonie-PCR

Laborinterne Nummer	Lage	Orientierung ¹	Sequenz
461	TOPO TA-Vektor	vorwärts	5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAG-3'
462	TOPO TA-Vektor	rückwärts	5'-TTCACACAGGAAACAGCTATGACC-3'

2.13.4 Primer für die Überprüfung der cDNA

Die Intaktheit der cDNA wurde mit dem in der RT-PCR etablierten Primerpaar zur Quantifizierung von *PTEN*-Transkripten der Chromosomenregion 10q23 überprüft.

Tabelle 10: Primer für die Überprüfung der cDNA

Laborinterne Nummer	Lage	Orientierung ¹	Sequenz	Fragment-Größe [bp]
363	<i>PTEN</i> , Exon 1	+	5'-GCTTCTGCCATCTCTCCTCC-3'	397
364	<i>PTEN</i> , Exon 5	-	5'-GTCATCTTCACTTAGCCATTG-3'	

¹Die Orientierung der Primer bezieht sich auf die genomische DNA-Sequenz.

2.13.5 Primer für die Mutationsanalyse von *ZFP36L1*

Zur Mutationsanalyse von *ZFP36L1* wurden Primer für die Amplifikation und anschließende Sequenzierung der beiden Exons des Gens (NM_004926) ausgewählt.

Tabelle 11:Primer für die Mutationsanalyse von *ZFP36L1*

Laborinterne Nummer	Lage	Orientierung ¹	Sequenz	Fragment-Größe [bp]
4299	Exon 1	+	5'-GGGACTCCAGACAGGAGAGG-3'	273
4300	Exon1	-	5'-AATCATCTCGCTGCACCAC-3'	
4301	Exon 2	+	5'-GCGTTTGTGATTGTGTAGGG-3'	615
4302	Exon 2	-	5'-ACGGTCAGCGGAGAGGTC-3'	
4303	Exon2	+	5'-ATCGGCTTTTGCCCCTAC-3'	659
4304	Exon 2	-	5'-GGGGAAAGGGTTGAGC-3'	

¹Die Orientierung der Primer bezieht sich auf die genomische DNA-Sequenz.

2.13.6 Primer und Proben für die quantitative RT-PCR

Für die quantitative RT-PCR zur Bestimmung der *TERT*-Expression wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

TERT:

Vorwärtsprimer: 5'-TGTACTTTGTCAAGGTGGATGTGA-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CGGCTGGAGGTCTGTCAA-3'

Probe: 5'-FAM-TCAAACCCCAGAACACGTAAGTGG-TAMRA-3'

GUSB:

Vorwärtsprimer: 5'-CTCATTGGAATTTTGCCGATT-3'

Rückwärtsprimer: 5'- CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA -3'

Probe: 5'- JOE-TGAACAGTCACCGACGAGAGTGCTGG-3'

Für die quantitative RT-PCR zur Bestimmung der *ZFP36L1*- und *RAD51L1*-Expression wurden folgende kommerzielle Primer-Kits bzw. Oligonukleotide verwendet:

TaqMan® Gene Expression Kits (Applied Biosystems, Foster City CA):

ZFP36L1: Hs00245183_m1

RAD51L1: Hs00172522_m1

ZFP36L1 Exon 2:

Vorwärtsprimer: 5'-CAGACTTCCATCTCAGATGAC-3'

Rückwärtsprimer: 5'-GGCACATTCTGAGGTGCTGG-3'

GUSB:

Vorwärtsprimer: 5'-CTCATTTGGAATTTTGCCGATT-3'

Rückwärtsprimer: 5'- CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA -3'

Probe: 5'- JOE-TGAACAGTCACCGACGAGAGTGCTGG-3'

Für die quantitative RT-PCR zur Bestimmung der *TRAF3*-Expression wurden folgende spezifische Primerassays der Firma Qiagen verwendet:

Quantitect® Primer Assay Hs_TRAF3_1_SG

Quantitect® Primer Assay Hs_HPRT1_1_SG

Quantitect® Primer Assay Hs_G6PD_1_SG

Quantitect® Primer Assay Hs_GUSB_1_SG

3 Methoden

3.1 Vorbereitung des Probenmaterials

3.1.1 DNA-Extraktion

Für die genomischen PCR-Analysen und DNA-Microarray-Analysen wurde die DNA des peripheren Bluts, der lymphominfiltrierten Lymphknoten und des Knochenmarks aus bei -80 °C gelagerten DMSO-Stocks mit dem Kit NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel) nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Wenn kein asserviertes Material in Form von in DMSO tiefgefrorenen Zellen oder Kryoblöcken vorlag, wurde mit demselben Kit DNA aus bei -20 °C gelagerten Zellen in Fixativ isoliert (Fälle I-6, I-11, IV5, IV7, IV12, IV26-31, IV38 und IV46). In einem Fall (I-5) erfolgte die DNA-Extraktion aus tiefgefrorenen Gewebeschnitten mit dem PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra Systems).

3.1.2 DNA-Quantifizierung

Die Konzentration und Qualität der DNA wurde mit dem NanoDrop® ND-1000-Spektrophotometer und der NanoDrop® Software Version 3.2.1 nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Zur Ermittlung der Konzentration wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen dH₂O als Referenz bestimmt. Als Grundlage der Berechnung wurde davon ausgegangen, dass die optische Dichte doppelsträngiger DNA bei einer Konzentration von 50 µg/ml 1 beträgt. Das Gerät ermittelt außerdem das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm. Der Wert A₂₆₀/A₂₈₀ sollte dabei zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.1.3 RNA-Extraktion

Für die quantitative RT-PCR und die molekularbiologischen Untersuchungen zur Identifizierung von Fusionstranskripten wurde die RNA des peripheren Blutes, der lymphominfiltrierten Lymphknoten und des Knochenmarks aus bei -80 °C gelagerten DMSO-Stocks sowie aus tiefgefrorenen Gewebeschnitten extrahiert. Die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen) und die Homogenisierung des Lysats mittels Qiaschredder-Säulen durchgeführt:

1. Zunächst wurde 1 ml RLT-Puffer mit 10 μ l β -Mercaptoethanol versetzt.
2. Mindestens 1×10^6 /ml und höchstens 1×10^7 /ml Zellen in DMSO wurden bei 37 °C aufgetaut, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und sofort mit 1 x PBS auf 15 ml aufgefüllt.
3. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 400 g zentrifugiert (Multifuge 1 L-R, Heraeus) und das Zellpellet in 350 μ l (Zellzahl $< 5 \times 10^6$ /ml) bzw. 600 μ l (Zellzahl $> 5 \times 10^6$ /ml) RLT-Lysepuffer resuspendiert.
4. Das Lysat wurde zum Homogenisieren auf eine Qiashredder-Säule gegeben und 2 min bei 20.000 g zentrifugiert (Mikro 200, Hettich). Anschließend wurde die Säule verworfen.
5. Ein Volumenanteil 70 %-iges Ethanol wurde zum Durchlauf gegeben und gut mit der Pipette vermischt.
6. Höchstens 700 μ l des Gemisches wurden auf eine RNeasy-Säule gegeben und 15 s bei 12.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen.
7. Schritt 6 wurde mit dem Rest des Gemisches wiederholt.
8. Es wurden 700 μ l RW1-Waschpuffer auf die Säule gegeben und diese 15 s bei 12.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 2 ml-Gefäß gesetzt.
9. Es wurden 500 μ l RPE-Waschpuffer auf die Säule gegeben und 15 s bei 12.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen.
10. Schritt 9 wurde wiederholt.
11. Die Säule wurde 2 min bei 12.000 g trocken zentrifugiert und anschließend in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt.
12. Es wurden 50 μ l RNase-freies H₂O mittig auf die Säule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Säule bei 12.000 g zentrifugiert. Die Konzentration der RNA wurde gemäß Abschnitt 3.1.4 bestimmt und die RNA anschließend bei -80 °C gelagert.

3.1.4 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration und die Qualität der RNA wurden mit dem Experion® Elektrophorese System (Bio-Rad) oder alternativ mit dem 2100 Bioanalyzer (Agilent, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) bestimmt. Es handelt sich in beiden Fällen um Microfluidics-Systeme. Die Auftrennung der RNA erfolgt ähnlich einer

Kapillarelektrophorese im Miniaturmaßstab. Bei der RNA-Analyse mittels Experion® Elektrophorese Systems wurde das Experion® RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit der Experion® Software Version 2.1. Die RNA-Analyse mittels 2100 Bioanalyzer wurde mit dem RNA 600 Nano Kit (Agilent) durchgeführt und mit der Agilent 2100 Expert Software (Agilent) ausgewertet. Im Fall von nicht degradiertem RNA beträgt das Verhältnis von 18S zu 28S RNA 1:2. Da die RNA überwiegend aus Zellen in DMSO extrahiert wurde, musste in vielen Fällen eine Teildegradierung der RNA akzeptiert werden. Stark degradierte RNA wurde jedoch nicht weiter verwendet (Abbildung 14).

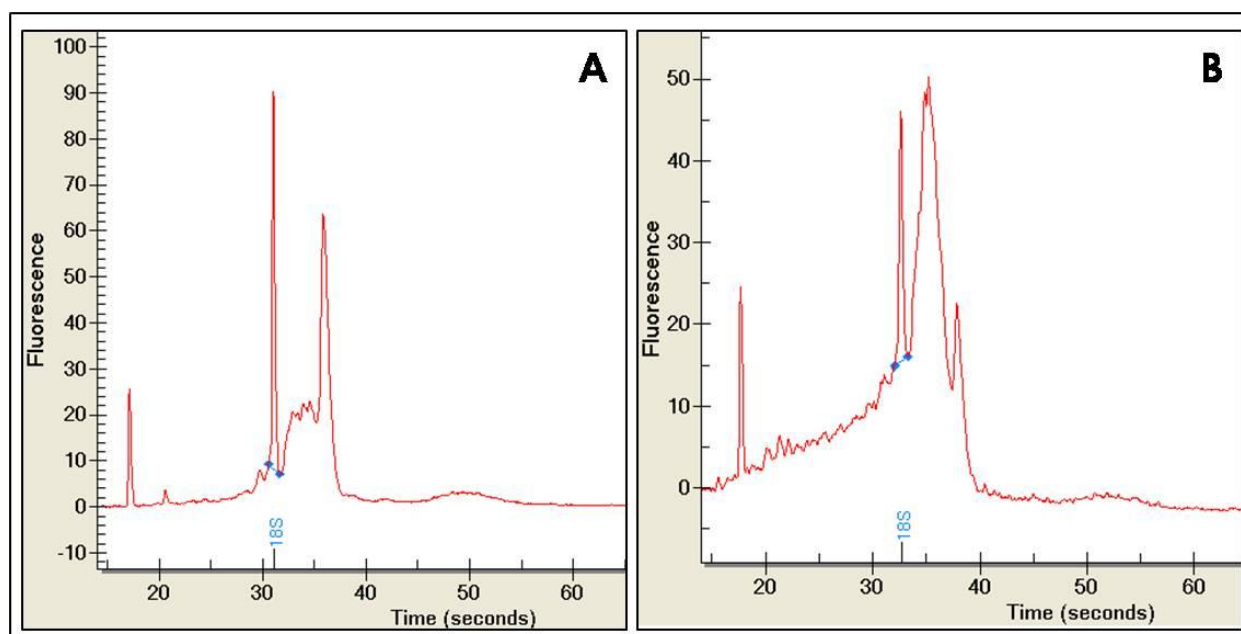


Abbildung 14: Beispiele für mittels Experion® Elektrophorese erhaltener Chromatogramme. **A)** Die Probe zeigt eine Teildegradierung der RNA, wurde aber für die Analyse verwendet. **B)** Die Probe zeigt eine starke Degradierung der RNA und wurde nicht weiter eingesetzt.

3.1.5 Protein-Extraktion

Die für die Western Blot-Analyse benötigten Proteine wurden aus peripherem Blut (pB), lymphominfiltierten Lymphknoten und Knochenmark aus bei -80 °C gelagerten DMSO-Stocks und frischer Tonsille extrahiert. Dies erfolgte zur Isolierung von Gesamtprotein mit dem ProteoExtract® Complete Mammalian Proteome Extraction Kit (Calbiochem) und für die fraktionierte Extraktion von Kern- und Zytoplasmprotein mit dem ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) nach Anleitung des Herstellers.

3.1.6 Protein-Quantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Non-Interfering Protein Assay Kit (Calbiochem) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde ein Aliquot des gereinigten Proteins entnommen und die störenden Reagenzien wurden als Durchlauf über die Säule des Kits entfernt. Die anschließende Konzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung von Kupferionen am Peptidrückrat. Die ungebundenen Kupferionen werden mit einem Farbreagenz gemessen. Je größer die Proteinkonzentration ist, desto geringer ist die Farbintensität. Die Messung erfolgte mit dem Spectrophotometer Smart SpecTM Plus (Bio-Rad) bei einer Wellenlänge von 480 nm gegen dH₂O als Referenz.

3.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Für die Herstellung von Sonden wurde die DNA der ausgewählten BACs- und Fosmide isoliert, fluoreszenzmarkiert und aufgereinigt. Um repetitive Sequenzen abzudecken, wurde die markierte DNA anschließend mit Cot-1 DNA gefällt und in der Hybridisierungslösung aufgenommen. Die fertige DNA-Sonde wurde dann auf Objektträger mit Pepsin verdauten Zellen hybridisiert. Die Denaturierung erfolgte unter Anwesenheit von Formamid, wodurch eine geringere Denaturierungstemperatur (75 °C anstatt 100 °C) ausreichend ist. Nach stringentem Waschen der Objektträger konnten die Signale unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

3.2.1 Isolierung der BAC-/Fosmid-DNA aus einer Bakterienkultur

Die in Form von Glycerin-Stocks bei -80 °C eingefrorenen BAC- und Fosmid-DNA enthaltenden Bakterien wurden aufgetaut. 100 µl dieser Bakterienkultur wurden in 200 ml LB-Medium mit 20 µg/ml Chloramphenicol überführt und über Nacht bei 37 °C im Inkubator für Zellkulturen (Edmund Bühler) kultiviert. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem Perfectprep[®] Plasmid Maxi Kit (Eppendorf) nach Anleitung des Herstellers. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrop[®] ND-1000 Spektrophotometers (NanoDrop[®] Technologies) bestimmt (Abschnitt 3.1.2).

3.2.2 Fluoreszenzmarkierung der DNA mittels Random Priming

Die Markierung der DNA erfolgte mit dem Bioprime® DNA-Labeling System (Invitrogen). „Random Oktamere“ lagern sich dabei an das denaturierte DNA-Template und werden mit dem Klenow-Fragment (DNA-Polymerase ohne 5' → 3' Exonuklease-Aktivität) verlängert, bis sie auf das nächste gebundene „Random Oktamer“ stoßen. Das im Kit zur Biotinylierung vorgesehene dNTP-Reagenz wurde durch einen dNTP-Mix mit direkt markierten Nukleotiden ersetzt. Dabei wurden die unmarkierten Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Roche) mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten dUTP-Nukleotiden gemischt. Es wurden die Farbstoffe Spectrum orange (SO), Spectrum green (SG) (Abbott/Vysis) und Diethylaminomethyl coumarin (DEAC) (NEN) verwendet.

Herstellung der 10x dNTP-Lösungen:

Komponente (Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
dATP (Roche)	10 nM	2,5 µl
dCTP (Roche)	10 nM	2,5 µl
dGTP (Roche)	10 mM	2,5 µl
dTTP (Roche)	10 mM	1,25 µl
X-dUTP (Abbott/Vysis bzw. NEN)	1 mM	12,5 µl
dH ₂ O		3,75 µl
Total		25 µl

X = SO, SG oder DEAC dATP, dCTP, dGTP und dTTP

- 1 µg DNA wurde mit dH₂O auf ein Volumen von 24 µl gebracht und anschließend mit 20 µl 2,5x Random Octamer gemischt.
- Die Denaturierung des Gemisches erfolgte durch 5-minütiges Kochen im Wasserbad. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt.
- Nach 2 min des Abkühlens erfolgte, weiterhin auf Eis, die Zugabe von 5 µl 10x-NTP-Mix und 1 µl Klenow-Fragment.
- Zur Renaturierung wurden die Proben über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Function Line, Heraeus) inkubiert und die Reaktion mit 5 µl Stopp-Puffer beendet.

3.2.3 Aufreinigung der DNA-Sonden

- Der Markierungsansatz aus 3.2.2 wurde mittig auf eine sich in einem 1,5 ml-Gefäß befindende Microcon® YM-30 Säule (Millipore) gegeben und 5 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen.

2. 300 µl dH₂O wurden zum Waschen auf die Säule gegeben, 10 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Durchlauf ebenfalls verworfen.
3. Schritt 6 wurde wiederholt.
4. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 50 µl dH₂O auf die Säule, wobei die Säule anschließend umgedreht in ein neues 1,5 ml Gefäß gestellt und 5 min bei 10.000 g zentrifugiert wurde.

3.2.4 Ethanol-Fällung mit Cot-1-DNA

1. 10 µl jeder aufgereinigten Sonde (Spectrum orange- und Spectrum green- bzw. Spectrum orange-, Spectrum green- und DEAC-markiert) wurden mit 5 µl Cot-1 DNA (1 mg/ml) (Invitrogen) versetzt.
2. Nach Zugabe von 1/10 des Volumens an 3 M NaAc (pH 5,2) und des 2,5-fachen Volumens an absolutem Ethanol wurde der Ansatz gemischt und 30 min bei 25.000 g zentrifugiert (Biofuge 22R, Heraeus).
3. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet im Dunkeln getrocknet und anschließend in 10 µl Mastermix aufgenommen. Zum Lösen der Sonde im Mastermix wurde der Ansatz 2 h bei 800 rpm geschüttelt (Thermomixer comfort, Eppendorf).

3.2.5 Vorbereitung der Objektträger

1. In einer Klimakammer (Thermotron industries) wurden mit einer Pasteurpipette wenige Tropfen Zellen in Carnoys-Fixativ auf einen Objektträger gegeben. Die Zellsuspensionen stammten aus der zytogenetischen Routinediagnostik.
2. Unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) wurden Areale mit ausreichend Zellen und gegebenenfalls Metaphasen ausgewählt und auf der Rückseite des Objektträgers mit einem Diamantschreiber markiert.
3. Der Objektträger wurde in einer frisch angesetzten Pepsin-Lösung 5 min bei 37 °C inkubiert (Function Line, Heraeus) und anschließend 1 min in dH₂O gewaschen.
4. Es erfolgte eine Fixierung der Zellen, indem der Objektträger 2 min in 1% Paraformaldehydlösung gestellt wurde. Danach wurde das Präparat nochmals 1 min in dH₂O gewaschen.

5. Die Dehydrierung der Zellen erfolgte jeweils 2 min in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 80 %, absolutes Ethanol).
6. Der Objektträger wurde an der Luft getrocknet.

Bei einigen Hybridisierungen wurde die Vorbereitung der Objektträger automatisiert im VP2000 Processor (Abbott/Vysis) nach gleichem Protokoll durchgeführt.

3.2.6 Hybridisierung

1. Auf den markierten Bereich des Objektträgers wurden 1,3 µl der DNA-Sonde in Mastermix pipettiert, die anschließend mit einem runden Deckglas abgedeckt und mit dem Photokleber Fixogum (Marabu) versiegelt wurden.
2. In einer feuchten Metallbox wurde die DNA 7 min bei 75 °C im Wasserbad denaturiert.
3. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Function Line, Heraeus).

3.2.7 Waschen und DAPI-Färbung

1. Eine Küvette mit SSC-Lösung 1 wurde im Wasserbad auf 71 °C erwärmt.
2. Das Deckglas und der Photokleber wurden vorsichtig entfernt.
3. Der Objektträger wurde in einer Küvette mit SSC-Lösung 1 bei 70 °C und anschließend 1 min bei Raumtemperatur in SSC-Lösung 2 gewaschen. Danach wurde er kurz in 2x SSC-Lösung gespült.
4. Zum Sichtbarmachen der Zellkerne erfolgte eine 5-minütige Gegenfärbung mit DAPI-Lösung und abschließendes Spülen in 2x SSC-Lösung.
5. Der Objektträger wurde mit 2 Tropfen Antifade eingedeckt.

Bei einigen Hybridisierungen erfolgte das Waschen der Objektträger automatisiert im VP2000 Processor (Abbott/Vysis) nach gleichem Protokoll.

3.2.8 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit den Fluoreszenzmikroskopen Axioskop, Axioskop 2 und Axio Imager.A1 (Zeiss). Als Lichtquelle dienten dabei 100W HBO-Lampen. Die Signale wurden mit Einzelbandfiltern (blau, grün, rot bzw. aqua) sowie mit doppelten (rot/grün) und dreifachen (blau/grün/rot) Breitbandfiltern angeregt (Multiband-Filter-Systeme, AHF). Die Dokumentation erfolgte mit der ISIS Software Version 5.1.9 und Version 5.2.11 (Metasystems).

3.2.9 Überprüfung der FISH-Sonden

Jede verwendete FISH-Sonde wurde in Kontrolluntersuchungen vor der ersten Hybridisierung auf

Tumormaterial auf die richtige Lokalisation und Spezifität überprüft. Dazu wurde die Sonde auf Metaphasen von Zellen aus dem peripheren Blut eines gesunden Probanden mit normalem Chromosomensatz überprüft.

3.2.10 Bestimmung der Nachweisgrenzen der etablierten FISH-Assays

Die Nachweisgrenze bezeichnet den geringsten prozentualen Anteil einer bestimmten, aberranten Signalkonstellation eines FISH-Assays, die als positiv gewertet wird. Bei Break-Apart-Assays zur Identifizierung von Translokationen wurde je nach Abstand der Sonden zueinander ein minimaler Signalabstand in Form von Signaldurchmessern definiert, bei dem von einem Bruchereignis ausgegangen wurde.

Der Assay wurde auf fixierte Zellen aus peripherem Blut von fünf gesunden Probanden mit normalem Karyotyp hybridisiert. In jeweils 100 Zellkernen wurde die Anzahl der Bruchereignisse per Definition, der Zugewinne und der Deletionen bestimmt. Die Nachweisgrenze für eine definierte Strukturveränderung errechnete sich aus dem Mittelwert des Anteils falsch positiver Signalkonstellationen in den Kontrollen in %, addiert zu der dreifachen Standardabweichung. Bei einer errechneten Nachweisgrenze unter 3 % wurde der Wert auf 3 % festgelegt.

3.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Paraffinschnitten

Die FISH-Analyse wurde zum Teil an Paraffinschnitten durchgeführt. Dies waren zum einen Ganzschnitte von Tumoren, zum anderen TMAs. Zur Herstellung von TMAs werden ausgestanzte Gewebezylinder von vielen Tumorproben in einen Paraffinblock integriert. Von diesem Paraffinblock wird ein Querschnitt auf einen Objektträger gebracht, so dass bis zu 200 Proben mit einer Hybridisierung untersucht werden können. Für die FISH-Analyse an Paraffinschnitten wurden die gleichen DNA-Sonden verwendet wie für die FISH-Analyse an Zellsuspensionen. Die Durchführung unterschied sich jedoch teilweise, da das Gewebe zunächst deparaffiniert werden musste und die Zellen durch das Vorliegen im Gewebeverband schwerer für die DNA-Sonden zugänglich waren.

3.3.1 Vorbereitung der Paraffinschnitte

1. Mit einem Diamantschreiber wurden auf der Rückseite des Objektträgers die Areale mit Gewebeschnitt eingekreist.
2. Zum Deparaffinisieren wurden die Objektträger mit den getrockneten Schnitten nacheinander jeweils 5 min in drei Küvetten mit Rotihistol inkubiert.
3. Die Schnitte wurden in einer absteigenden Ethanolreihe (absolutes, 80 %, 70 % Ethanol) jeweils 5 min hydriert und anschließend 1 min in dH₂O gewaschen, um das Rotihistol zu entfernen.
4. Ein Schnellkochtopf (Clipso, Tefal) wurde mit 1 l 1 mM EDTA-Puffer pH 8,0 gefüllt und dieser zum Kochen gebracht.
5. Die Objektträger wurden in einen Metallständer gestellt, dieser im Kochtopf platziert und auf höchster Druckaufbaustufe 2 min 40 s gekocht. Anschließend wurden sie 1 min in dH₂O gewaschen.
6. Die Schnitte wurden 25 min in frisch angesetzter Pepsin-Lösung inkubiert und danach 1 min in dH₂O gewaschen.
7. Die Zellen wurden 2 min in 1 % Paraformaldehyd fixiert und wiederum 1 min in dH₂O gewaschen.
8. Es erfolgte eine Dehydrierung der Zellen, indem jeweils 2 min in aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 80 %, absolutes Ethanol) inkubiert wurde. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet.

3.3.2 Hybridisierung auf Paraffinschnitte

1. Auf Paraffinschnitte mit Material von einer Tumorprobe wurden 1,3 µl der DNA-Sonde im Mastermix auf das eingekreiste Areal des Objektträgers gegeben und mit einem runden Deckglas abgedeckt. Auf die TMAs wurden 8 µl der DNA-Sonde auf das markierte Areal des Objektträgers gegeben und mit einem zurechtgeschnittenen Deckglas abgedeckt. Anschließend wurde mit dem Photokleber Fixogum (Marabu) abgedichtet.
2. Die DNA wurde 30 min bei 80 °C in einer feuchten Metallbox in einem Wasserbad denaturiert.
3. Die Hybridisierung erfolgte über zwei Nächte bei 37 °C.

3.3.3 Waschen, DAPI-Färbung und Auswertung

Diese Schritte erfolgten wie unter 3.2.7 und 3.2.8 beschrieben.

3.4 Array-CGH

Mittels Array-CGH können genomweit Veränderungen der DNA-Kopienzahl erkannt und damit Bruchpunkte, die zu Imbalancen geführt haben, genauer bestimmt werden. Für die Array-CGH-Analyse wurden etwa gleiche Mengen unterschiedlich Fluoreszenz-markierter Tumor- und Referenz-DNA auf einen Array kohybridisiert. Repetitive Sequenzen wurden wie bei der FISH-Analyse mit Cot-1 DNA geblockt. In dieser Arbeit wurden Microarrays mit synthetisch hergestellten Oligonukleotiden verwendet. Es wurden einerseits kommerzielle Arrays eingesetzt, bei denen die Proben über das gesamte humane Genom verteilt waren, und andererseits selbst entworfene Arrays (Custom Arrays), die von der Firma Agilent hergestellt wurden. Die Custom Arrays erlauben eine maximale Auflösung der interessierenden Region (Tiling Array). Der Tumorzellgehalt des zu untersuchenden Materials sollte mindestens 60 % betragen.

Verdau der Tumor-DNA und der gleichgeschlechtlichen Kontroll-DNA

Der folgende Restriktionsansatz wurde in 1,5 µl Schraubdeckelgefäße pipettiert.

Methoden

Tabelle 12: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau

Komponenten (Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
Puffer C (Promega)	10x	2,6 µl
Rsa I (Promega)	(10 U/µl)	0,5 µl
Alu I (Promega)	(10 U/µl)	0,5 µl
Acetyliertes BSA (Promega)	(10 µg/µl)	0,2 µl
DNA (Patient bzw. Kontrolle)	variiert	1 µg
dH ₂ O		ad 26 µl

Der Restriktionsverdau der genomischen DNA erfolgte durch zweistündiges Inkubieren bei 37 °C und 800 U/min (Thermomixer comfort, Eppendorf).

Markierung der DNA

Für die Markierung der DNA wurde das Kit Bioprime® Array-CGH Genomic Labeling System (Invitrogen) verwendet. Da die im Kit enthaltenen Farbstoffe Cy3 und Cy5 extrem lichtempfindlich sind, wurden die folgenden Schritte in einem abgedunkelten Raum durchgeführt.

Der verdauten DNA wurden 20 µl 2,5x Random Primer hinzugefügt, das Gemisch 5 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert und anschließend 1 min auf Eis abgekühlt.

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die Markierung der DNA

Komponenten (Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
Denaturiertes DNA-Gemisch		46 µl
dNTP-Mix (Invitrogen)	10x	5 µl
X-dUTP (Perkin Elmer)	1 mM	3 µl
Exo-Klenow-Fragment (Invitrogen)	40 U/µl	1 µl
Total		55 µl

X = Cy5 (Patient) oder Cy3 (Kontrolle)

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 2 h bei 37 °C inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf). Anschließend wurde die Reaktion mit 5 µl Stopp-Puffer beendet.

Das weitere Vorgehen richtete sich nach den verwendeten Arrays. Zur Hybridisierung des HG18 CGH 385K WG Tiling v2.0 Arrays von NimbleGen wurde nach Protokoll des Herstellers fortgefahren (NimbleChip™ Arrays User's Guide, S.11ff). Bei der Verwendung von Agilent Arrays wurde wie folgt vorgegangen:

Aufreinigung der markierten DNA über die Microcon® YM-30 Säule

1. 400 µl 1x TE-Puffer (pH 8,0) wurden zu der markierten DNA pipettiert und das Gemisch auf eine Microcon® YM-Säule gegeben, die sich in einem 1,5 µl-Gefäß befand. Anschließend wurde 8 min bei 8.000 g zentrifugiert.
2. Zur Elution wurde die Säule umgekehrt in ein neues 1,5 ml-Gefäß gestellt und 1 min bei 8.000 g zentrifugiert.

Messen der Markierungseffizienz

Die Markierungseffizienz wurde mit dem NanoDrop® ND-1000-Spektrophotometer und der NanoDrop® Software Version 3.2.1 nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Das Gerät gibt die Konzentration der Fluoreszenzfarbstoffe (Cy3 und Cy5) und die DNA-Konzentration der Probe an.

Vorbereitung der Proben für die Hybridisierung

1. Die Tumor-DNA und die gleichgeschlechtliche Kontroll-DNA wurden miteinander vermischt.
2. Das DNA-Gemisch wurde aufgereinigt wie oben beschrieben (Aufreinigung der markierten DNA über die Microcon® YM-30 Säule).
3. Entsprechend der genutzten Array-Plattform wurde die DNA vor der Hybridisierung mit dH₂O auf ein bestimmtes Endvolumen gebracht und ein Hybridisierungsansatz wie in Tabelle 14 beschrieben hergestellt. Für die Hybridisierung wurde das Agilent Oligo aCGH Hybridization Kit (Agilent) verwendet.

Tabelle 14: Pipettierschema für den Hybridisierungsansatz der Array-CGH

Komponenten (Hersteller)	Konzentration	Eingesetzte Menge	
		44K-Array	244K-Array
Gemischte, markierte DNA		39,5 µl	168 µl
Human Cot-1 DNA (Roche)	1 µg/µl	12,5 µl	50 µl
Blocking Agent (Agilent)	10x	13 µl	52 µl
Hybridization Buffer (Agilent)	2x	65 µl	260 µl
Total		130 µl	530 µl

Der Hybridisierungsansatz wurde erst 3 min bei 100 °C im Wasserbad und anschließend 30 min bei 37 °C im Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert.

Hybridisierung der Microarrays

Der Microarray wurde nach Anweisungen des Herstellers mit dem Hybridisierungsansatz beladen. Die Hybridisierung erfolgte 40 h bei 65 °C und 20 rpm im Hybridisierungssofen (DNA Microarray Hybridization Oven, Agilent).

Waschen der Microarrays

1. Der Microarray wurde aus der Hybridisierungskammer entfernt und in einem mit 1 l Waschpuffer 1 gefüllten Becherglas mit Hilfe einer Pinzette vom Dichtungsobjektträger gelöst.
2. Der Objektträger wurde in eine Objektträgerhalterung gestellt und in dieser 5 min unter Rühren in Waschpuffer 1 inkubiert.
3. Die Halterung wurde in ein Becherglas mit dem auf 37 °C vorgewärmten Waschpuffer 2 befördert und unter Rühren 2 min inkubiert.
4. Der Objektträger wurde 1 min in einer Küvette mit Acetonitril und anschließend 30 s in einer Küvette mit Stabilization & Drying-Solution inkubiert. Aus dieser Lösung wurde der Microarray langsam, ohne Bildung von Tropfen entfernt und in ein mit Alufolie umwickeltes 50 ml-Röhrchen gesteckt.

Scanning der Microarrays

Der Microarray wurde mit dem Array-CGH-Scanner GenePix4000B (Axon Instruments) und der Scannersoftware GenePix Pro (Molecular Devices) mit einer Auflösung von 5 µm gelesen. Die Auswertung des Arrays erfolgte im Falle eines Agilent Arrays mit der Feature Extraction 9.5.3 und CGH Analytics 3.5.14 Software (Agilent Technologies). NimbleGen Arrays wurden mit der NimbleScan v2.3 und der SignalMap v1.9 Software ausgewertet.

3.5 Molekulargenetische Methoden

3.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können definierte DNA-Abschnitte mit hoher Spezifität und Sensitivität enzymatisch vervielfältigt werden. Als Ausgangsmaterial diente in dieser Arbeit genomische DNA oder cDNA. Die PCR beginnt mit einer thermischen Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Anschließend binden synthetische

Oligonukleotide (Primer) an komplementäre Zielsequenzen, welche die interessierende DNA-Region einrahmen (Annealing). Die optimale Annealing-Temperatur ist dabei abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Eine hitzestabile DNA-Polymerase verwendet bei der Elongation die Primer als Startermoleküle und verlängert den Oligonukleotidstrang entlang des Templates nach dem Gesetz der komplementären Basenpaarung. Durch die zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte wird die zwischen den Primern liegende DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt.

Das Prinzip der PCR wurde in dieser Arbeit entsprechend der Fragestellung in verschiedenen methodischen Variationen angewandt, wie z.B. der Long Distance (LD)-PCR, der quantitativen RT-PCR und der Sequenz-PCR.

3.5.2 Auftrennung und Dokumentation der PCR-Produkte

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde je nach erwarteter Fragmentlänge ein 0,5-2 %-iges Agarosegel gegossen. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in einem Erlenmeyer-Kolben mit TBE-Puffer je nach Probenanzahl auf 50 bzw. 200 ml aufgefüllt und in einer Mikrowelle unter Kochen gelöst. Unter kaltem Wasser wurde die Lösung auf Handwärme abgekühlt und mit 2,5 bzw. 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Das Gel wurde in eine kleine (50 ml, Hoefer HE33, Amersham Biosciences) bzw. große (200 ml, Modell 41-2025, peqLab) Gelkammer gegossen, mit einem oder zwei Taschenkämmen versehen und zum Erstarren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Vor dem Auftragen der Proben wurden jeweils 10 µl des PCR-Produktes mit 3,5 µl Gel-Ladepuffer versetzt. Es wurde außerdem bei erwarteten Fragmentlängen kleiner 1.000 bp der 100 bp-DNA-Längenstandard (New England Biolabs) und bei erwarteten Fragmentlängen größer 1.000 bp der Hyperladder I-Längenstandard (Bioline) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei Fragmentlängen kleiner 1.000 bp für 1 h bei 180 V, bei Fragmentlängen größer 1.000 bp für 2 h bei 120 V. Dabei wurden die Netzgeräte El. Phor.-Powerpack P24 (Biometra) oder Electrophoresis Power supply ST606 (GIBCO BRL life Technologies) verwendet. Die PCR-Produkte wurden unter UV-Licht mit Hilfe des BioDoc Analyzers (Biometra) und der BioDoc Analyze Software Version 2.1 (Biometra) dokumentiert.

3.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte in Vorbereitung zur Sequenzreaktion wurde mit Hilfe des Clean & Concentrator-5 Kits (Zymo Research) durchgeführt.

1. Das 2-fache Volumen des PCR-Produktes an DNA-Binding-Buffer wurde zum PCR-Produkt gegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Die Mischung wurde auf die Säule, die sich in einem dazugehörigen Reaktionsgefäß befand, pipettiert.
2. Es wurde bei 12.000 g für 30 s zentrifugiert (Mikro 200, Hettich) und der Durchfluss verworfen.
3. Zum Waschen wurden 200 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und 30 s bei 12.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.
4. Es wurden 10 µl dH₂O auf die Säule gegeben und diese in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. Zur Elution wurde 30 s bei 12.000 g zentrifugiert.

3.5.4 Isolierung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel

Um einzelne Fragmente aus einem PCR-Produkt mit mehreren Fragmenten sequenzieren zu können, wurden die interessierenden Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Perfectprep® Gel Cleanup Kit (Eppendorf) aufgereinigt.

1. Die ausgeschnittenen Agarosestücke wurden zunächst ausgewogen und mit dem 3-fachen Volumen (1 mg entspricht 1 µl Volumen) Binding-Buffer versetzt.
2. Das Agarosestück wurde durch 5-minütiges Inkubieren bei 50 °C und 1.000 U/min (Thermomixer comfort, Eppendorf) im Binding-Buffer gelöst.
3. Es erfolgte die Zugabe des einfachen Volumens an Isopropanol.
4. Das Gemisch wurde auf eine Perfectprep® Gel Cleanup-Säule, die sich in einem 2 ml-Gefäß befand, gegeben. Es wurde 1 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen.
5. 750 µl Waschpuffer wurden auf die Säule gegeben und 1 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen.

6. Die Säule wurde 1 min bei 12.000 g trocken zentrifugiert und in ein neues 2 ml-Gefäß überführt.
7. 15 µl dH₂O wurden mittig auf die Säule gegeben und das PCR-Produkt durch 1-minütiges Zentrifugieren bei 12.000 g eluiert.

3.5.5 Klonierung von PCR-Produkten

Eine Klonierung von PCR-Produkten wurde in dieser Arbeit notwendig, wenn eine PCR mehrere Produkte lieferte, die sich nicht im Agarosegel auftrennen und isolieren ließen. Eine direkte Sequenzierung konnte demnach nicht angewandt werden. Zudem wurde eine Klonierung der PCR-Produkte durchgeführt, wenn eine unmittelbar auf den Primer folgende Sequenz zur Interpretation herangezogen werden musste, die bei der direkten Sequenzierung nicht sicher lesbar war.

Für die Klonierung wurde das TOPO TA Cloning Kit zusammen mit dem pCR 2.1-TOPO Vector und den One Shot TOP10 chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen verwendet (Invitrogen). Das Prinzip des TOPO TA Cloning Kits beruht darauf, dass die Taq-Polymerase eine terminale Transferase-Aktivität besitzt, die ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden des PCR-Produktes hängt. Der im Kit vorhandene, lineare Vektor enthält einzelne 3'-überhängende Desoxythymidine. Es erfolgt eine effiziente Ligation zwischen Vektor und PCR-Produkt mit Hilfe der am Vektor kovalent gebundenen Topoisomerase.

Klonierung und Transformation der PCR-Produkte

Wenn die Generierung der PCR-Produkte nicht mittels Taq-Polymerase erfolgt war, wurden die Desoxyadenosin-Überhänge nachträglich erzeugt. Dazu wurde 1 µl Gold Star® Taq-Polymerase (Eurogentec) zu 20 µl PCR-Produkt gegeben. Dieser Ansatz wurde im Thermocycler (T3000, Biometra) 2 min bei 95 °C denaturiert und 7 min bei 72 °C inkubiert.

1. Für den Klonierungsansatz wurden 4 µl des frischen PCR-Produktes, 1 µl des Vektors und 1 µl der Salzlösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und das Reaktionsgemisch 30 min bei Raumtemperatur und 30 min auf Eis inkubiert.
2. 4 µl des Reaktionsansatzes wurden anschließend in ein Röhrchen mit bei -80 °C gelagerten und auf Eis aufgetauten TOP10-*E. coli*-Zellen gegeben.

3. Die Zellen wurden dann 30 min auf Eis inkubiert, bevor sie einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 s ausgesetzt wurden.
4. Die Zellen wurden sofort mit 250 µl des auf 37 °C vorgewärmten SOC-Mediums versetzt und 1 h bei 37 °C im Inkubator (Edmund Bühler) geschüttelt.
5. Die kultivierten Bakterien wurden auf einer LB-Agar-Platte ausplattiert, die mit dem Antibiotikum Carbenicillin und X-Gal, einem Substrat der β-Galaktosidase, versetzt war. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert (Function Line, Heraeus). Die Auswahl der transformierten Klone erfolgte über die Blau-Weiß-Selektion. Der Vektor enthält das Enzym β-Galaktosidase, das den Indikator X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl umsetzt. Letzteres wird wiederum durch den Sauerstoff der Luft zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo oxidiert. Durch die Insertion des PCR-Produktes in die Klonierungsstelle wird das Enzym β-Galaktosidase zerstört und die Kolonien erscheinen weiß. Die Klone, die kein Insert enthalten, zeigen eine blaue Färbung.

Kolonie-PCR

Mittels Kolonie-PCR wurde die erfolgreiche Insertion des PCR-Amplifikats in den TOPO TA Cloning Vector anhand der Größe der Kolonie-PCR-Produkte im Agarosegel überprüft. Dazu wurden die vektorspezifischen Primer 461 und 462 (Tabelle 9) verwendet.

Tabelle 15: Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR

Komponenten (Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
Reaction Buffer (Eurogentec)	10x	2,5 µl
dNTPs (Roche)	10 mM	2 µl
MgCl ₂ (Eurogentec)	25 mM	4 µl
Gold Star Taq Polymerase (Eurogentec)	5 U/µl	0,2 µl
Primer (Biomers.net)	je 20 pmol/µl	je 1 µl
Weißer <i>E.coli</i> -Klon*		differiert
dH ₂ O		ad 25 µl

* Der Negativkontrolle wurde kein Klon hinzugefügt.

Es wurde eine neue LB-Agar-Platte mit Carbenicillin und X-Gal auf der Rückseite mit einem wasserfesten Stift in 30 Felder eingeteilt und durchnummeriert. Anschließend wurden bis zu 30 Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen gepickt, zunächst auf eines der Felder gestrichen und anschließend in einen PCR-Ansatz mit der gleichen Nummerierung gestellt. Nach kurzer

Inkubation wurden die Spitzen entfernt. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler T3000 (Biometra).

Tabelle 16: Programm der Kolonie-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	60 °C	30 s	35
Elongation	72 °C	1,5 min	
Extension	72 °C	5 min	1
Aufbewahrung	4 °C	∞	

Die PCR-Amplifikate wurden wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben aufgetrennt und dokumentiert. Bei bekannter Größe des gewünschten PCR-Produktes wurden mindestens zehn entsprechende Fragmente anschließend sequenziert. Im Fall der Bruchpunktklonierung wurde ein Produkt jeder auftretenden Fragmentgröße sequenziert.

3.5.6 Long Distance PCR zur Bruchpunktklonierung

Die direkte LD-PCR konnte bei der Bruchpunktklonierung angewendet werden, wenn die Bruchpunktregion von beiden chromosomalen Bereichen ungefähr bekannt war. Die eingesetzten, spezifischen Primer liegen in einem normalen Genom nicht in räumlicher Nähe zueinander. Nur in Fällen mit der zu klonierenden Translokation bzw. Deletion kann bei richtiger Wahl der Primer eine erfolgreiche Amplifikation der aberranten DNA-Sequenz stattfinden. Da die Bruchpunkte nicht genau bekannt waren, mussten verschiedene Primerkombinationen getestet werden. In Abbildung 15 ist beispielhaft die Lage der Primer für die Bruchpunktklonierung der Deletion del(14)(q24q32) dargestellt. Für die Amplifikation wurde die TaKaRa LA Taq-Polymerase (TaKaRa) gewählt, da diese sehr stabil ist und besonders lange PCR-Fragmente (> 15 kb) bilden kann. Lange Amplifikate erhöhen die Wahrscheinlichkeit, Bruchpunkt-überspannende Fragmente zu generieren.

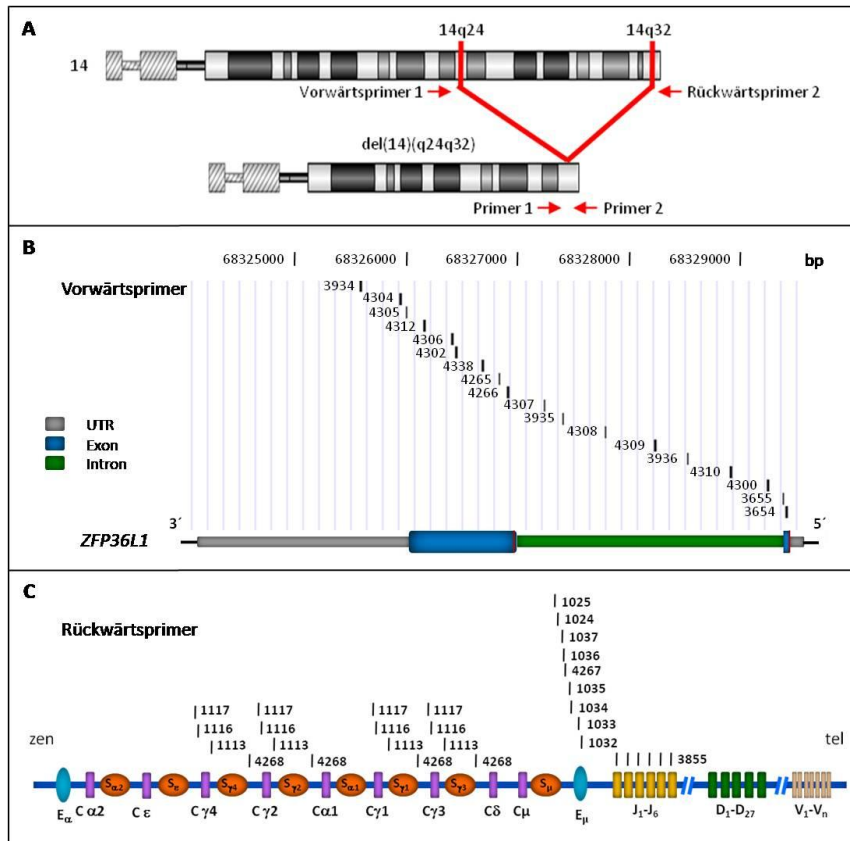


Abbildung 15: Lage der verwendeten Primer für die Bruchpunktklonierung der Deletion del(14)(q24q32) mittels LD-PCR. **A)** Schematische Darstellung der Lage der verwendeten Primer an einem normalen Chromosom (oben) und an einem Chromosom mit del(14)(q24q32). **B)** Lage der verwendeten Vorwärtsprimer in ZFP36L1. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Datenbank Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) erstellt. **C)** Lage der verwendeten Rückwärtsprimer im IGH-Locus. Die funktionellen Gensegmente sind farbig dargestellt. Diese Übersicht ist nicht maßstabsgetreu. C: constant segment; D: diversity segment; E: Enhancer; J: Joining-Segment; S: Switch region; tel: telomerisch; V: variable segment; zen: zentromerisch

Oftmals wurden nested PCRs durchgeführt, um die Spezifität zu erhöhen. Bei einer nested PCR werden zwei verschiedene Primerpaare in aufeinanderfolgenden PCRs eingesetzt. In der zweiten (inneren) PCR werden dabei zwei dichter zusammenliegende Primer und das Amplifikat der ersten PCR verwendet (Abbildung 16).

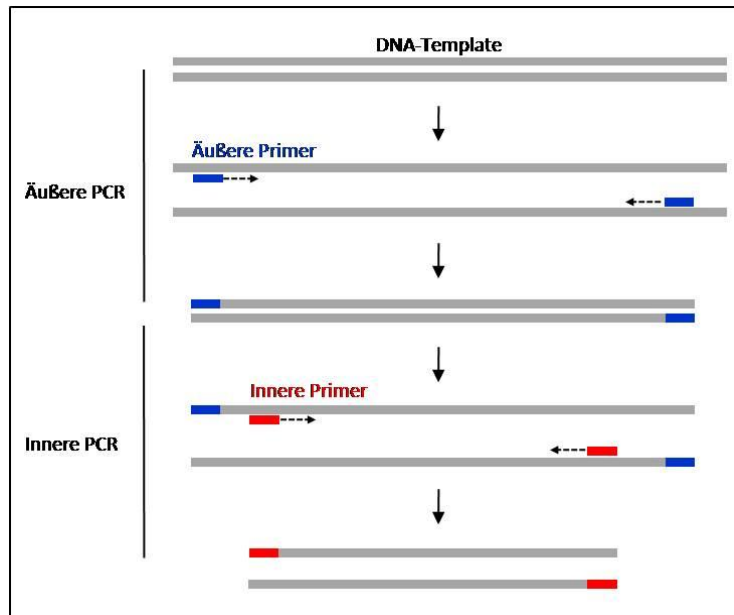


Abbildung 16: Schema einer Nested PCR

Äußere PCR

In der 1. PCR wurden außen liegende Primer der erwarteten Bruchpunktregionen verwendet. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert.

Tabelle 17: PCR-Reaktionsansatz für die LD-PCR zur Bruchpunktklonierung

Komponenten (Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
Puffer LA (TaKaRa)	10x	2,5 µl
dNTPs (TaKaRa)	2,5 mM	5 µl
MgCl ₂ (TaKaRa)	25 mM	2,5 µl
TaKaRa LA Taq (TaKaRa)	5 U/µl	0,3 µl
Primer (Biomers.net)	je 20 pmol/µl	je 1 µl
Genomische DNA	100 ng/µl	1 µl
dH ₂ O		ad 25 µl

Zur Erhöhung der Spezifität der PCR wurde in den ersten 16 Zyklen die Touchdown-PCR-Funktion genutzt. Die Annealing-Temperatur betrug anfänglich 68 °C und verringerte sich je Zyklus um 0,25 °C. In den folgenden 16 Zyklen verlängerte sich die Elongationszeit ausgehend von 5 min pro Zyklus um 15 s. Es wurde der Thermocycler T3000 (Biometra) verwendet.

Methoden

Tabelle 18: PCR-Program für die LD-PCR zur Bruchpunktklonierung

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94 °C	2 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	68°C (-0,25 °C/Zyklus)	30 s	16
Elongation	72 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	64 °C	30 s	16
Elongation	72 °C	5 min (+15 s/Zyklus)	
Extension	72 °C	10 min	1
Aufbewahrung	4 °C	∞	

Die Auftrennung und Dokumentation der PCR-Produkte erfolgte wie unter 3.5.2 beschrieben.

Innere PCR

Innere PCRs wurden durchgeführt, wenn bei der äußeren PCR Produkte auftraten, die nicht spezifisch waren oder eine sehr große Fragmentgröße zeigten. Dabei wurden zunächst geringfügig weiter innen liegende Vorwärtsprimer und gegebenenfalls in weiteren Reaktionsansätzen weiter innen liegende Rückwärtsprimer gewählt. Zudem unterschied sich die Durchführung der inneren PCR von der äußeren PCR dadurch, dass anstelle der genomischen DNA 1 µl 1:100-verdünntes Amplifikat aus der äußeren PCR verwendet wurde.

Wenn bei diesem Vorgehen kein spezifisches PCR-Produkt gewonnen werden konnte, wurden weitere Vorwärtsprimer ausgetestet, die mehrere Kilobasen (kb) weiter innen lagen. Diese wurden mit den äußeren und gegebenenfalls auch weiter innen lokalisierten Rückwärtsprimern kombiniert.

Bei sehr schwachen PCR-Produkten wurde die PCR wiederholt, wobei in den ersten 16 Zyklen des Touchdown-PCR-Programms die Temperatur um 0,5 °C pro Zyklus verringert wurde und so eine Annealing-Temperatur von 60 °C anstelle von 64 °C erreicht wurde.

Zeigte das PCR-Produkt des Tumormaterials im Agarosegel klare Banden, die im PCR-Produkt der Kontrolle nicht auftraten, wurde das Amplikon sequenziert. Die PCR-Produkte mussten vor der Sequenzierung in den meisten Fällen, wie unter 3.5.4 beschrieben, aus dem Agarosegel isoliert werden. In einigen Fällen wurde auch eine Klonierung der PCR-Produkte durchgeführt (Abschnitt 3.5.5). Die genomische Zuordnung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe

der Datenbank Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

3.5.7 Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Die DHPLC ist ein Verfahren zur Detektion von Punktmutationen, Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs), kleinen Deletionen und Insertionen. Es beruht im Wesentlichen auf der Unterscheidung zwischen Homo- und Heteroduplices in PCR-Amplifikaten mit Sequenzvariationen [151]. Durch Denaturierung und langsame Renaturierung lagern sich entstandene Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen zusammen. Liegen sowohl PCR-Amplifikate mit als auch ohne Mutation bzw. SNP vor, so lagern sich neben Homoduplices auch Fragmente unterschiedlicher Sequenz zusammen und es bilden sich Heteroduplices mit Mismatch-Basenpaarungen. Die Homo- und Heteroduplices können dann aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt werden. Die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle binden elektrostatisch an Ammonium-Kationen der Säulenoberfläche (Triethylammoniumacetat). Durch eine kontinuierlich steigende Acetonitrilkonzentration werden die DNA-Fragmente schließlich von der Säule gewaschen, wobei die weniger thermostabilen Heteroduplices vor den Homoduplices eluieren. Im Idealfall sollten bei heterozygoten Mutationsträgern im Chromatogramm vier Peaks zu erkennen sein, zwei Heteroduplex-Peaks und zwei Homoduplex-Peaks (Abbildung 17). Häufig sind die Unterschiede der Retentionszeiten zwischen den beiden Heteroduplices bzw. zwischen den beiden Homoduplices sehr gering, so dass im Chromatogramm nur zwei Peaks zu erkennen sind. Nicht selten ist auch die Auftrennung von Heteroduplices und Homoduplices nicht ausreichend und es zeigt sich nur eine zusätzliche Schulter im Chromatogramm. Demnach ist zur Beurteilung eines potentiell aberranten Fragmentes immer der Vergleich mit dem Chromatogramm einer Normalkontrolle notwendig [152].

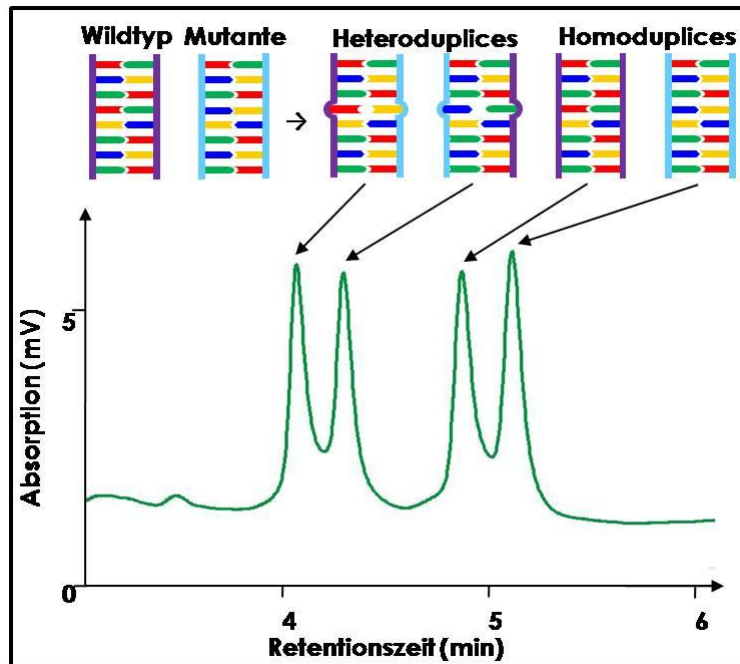


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Bildung von Hetero- und Homoduplices und Beispiel eines heterozygoten Chromatogramms (WAVE® Low Range Mutation Standard, Transgenomic).

PCR

Für jede Probe wurde eine PCR mit 50 µl Reaktionsvolumen angesetzt:

Tabelle 19: PCR-Reaktionsansatz für die DHPLC-Analyse

Komponenten (Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
PCR-Puffer 3 (Roche)	10x	5 µl
dNTPs (Roche)	10 mM	2 µl
MgCl ₂ (Roche)	25 mM	4 µl
Expand High Fidelity Enzyme Mix (Roche)	3,5 U/µl	0,4 µl
Primer (Biomers)	je 20 pmol/µl	je 2 µl
DNA*	100 ng/µl	2 µl
dH ₂ O		ad 50 µl

* Der Negativkontrolle wurde alternativ dH₂O hinzugefügt.

Die Amplifikation der Fragmente erfolgte zur Erhöhung der Spezifität mit einem Touchdown-PCR-Programm unter Verwendung des Thermocyclers T3000 (Biometra). Die Annealing-Temperatur verringerte sich dabei in den ersten 10 Zyklen um 0,5 °C pro Zyklus. Für die Amplifikation von Exon 5 wurde eine anfängliche Annealing-Temperatur von 63 °C gewählt. Bei allen anderen Fragmenten konnte die Primerhybridisierung bei 65 °C beginnen.

Methoden

Tabelle 20: PCR-Programm zur Fragment-Amplifikation für die DHPLC-Analyse

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	96 °C	2 min	1
Denaturierung	96 °C	30 s	
Annealing	63/65°C (-0,5 °C/Zyklus)	30 s	10
Elongation	72 °C	30 s	
Denaturierung	96 °C	30 s	
Annealing	58/60 °C	30 s	25
Elongation	72 °C	30 s	
Extension	72 °C	5 min	1
Aufbewahrung	4 °C	∞	

Die Auftrennung und Dokumentation der PCR-Produkte erfolgte wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben.

Heteroduplex-Formation

Zur Heteroduplex-Formation wurden die Proben 5 min bei 95 °C im Thermocycler T3000 (Biometra) denaturiert und anschließend langsam (0,1 °C/6 s) auf 65 °C abgekühlt. Um auch bei homozygoten Mutationen die Bildung einer detektierbaren Menge Heteroduplices zu ermöglichen, musste sichergestellt werden, dass sowohl ausreichend DNA-Amplifikat von Tumorzellen als auch von normalen Zellen vorhanden war. Bei Proben, deren Tumorzellgehalt mehr als 70 % betrug, wurden die PCR-Produkte deshalb zu gleichen Teilen mit den PCR-Produkten einer Kontroll-DNA eines gesunden Probanden gemischt.

Ermittlung der DHPLC-Analysetemperaturen

Die Unterscheidung zwischen Homo- und Heteroduplices gleicher Länge setzt partiell denaturierende Bedingungen voraus, da die Retentionszeit bei vollständig doppelsträngig vorliegender DNA rein längenabhängig ist. Zur Bestimmung der Analysetemperaturen wurde die Navigator Software Version 1.7.0 (Transgenomic) verwendet, die das theoretische Schmelzverhalten eines PCR-Produktes auf Grundlage seiner Sequenz berechnen kann. Mit Hilfe dieser Software wurden je Sequenz bis zu drei Analysetemperaturen bestimmt, so dass jede Schmelzdomäne unter partiell denaturierenden Bedingungen untersucht wurde.

DHPLC-Analyse

Die DHPLC-Analyse erfolgte im WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System 4500 (Transgenomic) unter Verwendung der Chromatographiesäule DNASep® HAT Cartridge (Transgenomic). Die mobile Phase bestand zu gleichen Teilen aus dem WAVE®-optimized

Buffer A (0,1 M TEAA) und dem WAVE[®]- optimized Buffer B (0,1 M TEAA, 25 % Acetonitril) (Transgenomic). Das Injektionsvolumen der PCR-Produkte betrug 8 µl. Die DNA wurde mit einer Flussrate von 0,9 ml/min und einem linear ansteigenden Acetonitril-Gradienten eluiert. Zwischen den Läufen wurde die Chromatographiesäule mit WAVE[®]-optimized Buffer D (75 % Acetonitril) (Transgenomic) und die Injektionsspritze mit der WAVE[®] Syringe-Wash-Solution (Transgenomic) gereinigt. Vor jedem Lauf wurde die Gerätekalibrierung mit einem der beiden Mutationsstandards WAVE[®] Low Range Mutation Standard und WAVE[®] High Range Mutation Standard (Transgenomic) überprüft. Sowohl die Steuerung der DHPLC-Anlage als auch die Auswertung und Dokumentation der DHPLC-Läufe in Form von Absorption-Zeit-Chromatogrammen erfolgte mit der Navigator-Software Version 1.7.0.

Das Chromatogramm des Tumormaterials wurde mit dem Chromatogramm des Kontrollmaterials verglichen. In der DHPLC auffällige Produkte wurden sequenziert. Für die Analyse von Exon 6 von TRAF3 musste aufgrund der geringen Distanz der Primer zur Exon/Intron-Grenze vor der Sequenzierung eine Klonierung der Amplifikate durchgeführt werden, ebenso bei unklaren, auffälligen Sequenzen (Abschnitt 3.5.5).

3.5.8 Surveyor-Nukleaseverdau mit anschließender Größenbestimmung

Die aus Pflanzen gewonnene Surveyor-Nuklease schneidet doppelsträngige DNA an Mismatch-Basenpaarungen. Sie wurde eingesetzt, wenn eine Sequenz bei der Mutationsanalyse auffällig, jedoch nicht eindeutig war. Voraussetzung für diese Methode der Mutationsbestätigung ist, dass die durch den Verdau entstehenden Fragmente eine Länge von mindestens 100 bp haben, da kürzere Fragmente bei der Größenbestimmung mittels DHPLC-Anlage nicht detektiert werden können. Entsprechen die ermittelten Größen des verdauten Tumor-PCR-Produktes den Größen, die anhand der auffälligen Sequenz erwartet wurden, und fehlen diese Fragmente in den verdauten Kontroll-PCR-Produkten, so gilt die Mutation als bestätigt [153].

Die PCR und die Heteroduplexformation erfolgten wie in Abschnitt 3.5.7 beschrieben. Die Auftrennung und Dokumentation der PCR-Produkte erfolgte gemäß Abschnitt 3.5.2. Um ausreichend Material für die Größenbestimmung zu behalten, wurden auf das Agarosegel jedoch nur 5 µl des PCR-Produktes mit 1,75 µl Gel-Lade-Puffer aufgetragen.

Surveyor-Nuklease-Verdau

Der Verdau erfolgte mit dem Surveyor Mutation Detection Kit von Transgenomic. Es wurden 45 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Surveyor-Nuklease und 1 µl Enhancer gemischt und 20 min bei 42 °C inkubiert (T3000, Biometra). Die Reaktion wurde mit 4,7 µl Stop-Solution beendet.

Größenbestimmung

Die Größenbestimmung mittels DHPLC-Anlage wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt wie im Abschnitt 3.5.7 „DHPLC-Analyse“ beschrieben. Es wurden jedoch 48 µl des verdauten Produktes auf die Säule injiziert. Die Analyse wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen bei einer Analysetemperatur von 50 °C durchgeführt. Durch den Vergleich der Retentionszeiten der Probenanalysen mit den Retentionszeiten des ebenfalls aufgetragenen Größenstandards (WAVE® DNA Sizing Standard) ließ sich die Größe der Fragmente der Probe feststellen.

3.5.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach dem Sanger-Verfahren, auch Kettenabbruchverfahren genannt. Hierbei werden in einem Sequenzierungsansatz enthaltene, markierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) zufällig in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Als DNA-Matrize dient dabei das zu untersuchende PCR-Fragment. Die ddNTPs führen zu einem Kettenabbruch, kommen aber im Verhältnis zu den dNTPs in so geringer Konzentration vor, dass auch relativ lange DNA-Einzelstränge entstehen können. Bei dem hier verwendeten Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) werden vier verschiedenfarbig Fluoreszenz-markierte ddNTPs eingesetzt. Die Reaktionsprodukte werden anschließend anhand ihrer Größe kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Das Chromatogramm gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

Sequenzreaktion

Der Vorwärts- und Rückwärtsstrang eines PCR-Fragments wurde in zwei Sequenzierungsansätzen getrennt voneinander analysiert.

Methoden

Tabelle 21: Reaktionsansatz zur Sequenzierung

Komponenten (Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
Big Dye Terminator Puffer (Applied Biosystems)	10x	2 µl
Big Dye Terminator (Applied Biosystems)		1 µl
Primer (Biomers)	je 20 pmol/µl	2 µl
Amplifikat (gereinigt)		1 µl
dH ₂ O		ad 20 µl

Tabelle 22: Sequenz-PCR-Programm (T3000, Biometra)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	96 °C	5 min	1
Denaturierung	96 °C	10 s	
Annealing	55 °C	5 s	25
Elongation	60 °C	4 min	
Aufbewahrung	4 °C	∞	

Aufreinigung der Sequenzreaktionsprodukte

Die Aufreinigung der Sequenzreaktionsprodukte erfolgte über eine 96-Well-Platte mit Hilfe des Montage SEQ 96 Sequencing Reaction Cleanup Kits (Millipore).

1. 20 µl Injektionspuffer wurden zu den Sequenzreaktionsprodukten gegeben, durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und das Gemisch in ein Well der Platte überführt.
2. Die Platte wurde auf dem Halter für die Vacuumpumpe (MultiScreen HTS Vacuum Manifold, Millipore) befestigt. Es wurde ein Druck von 23-25 mm Hg angelegt und gewartet, bis die Wells der Platte vollständig getrocknet waren.
3. Die Wells wurden mit 20 µl Injektionspuffer gefüllt und erneut durch das Anlegen eines Vacuums getrocknet.
4. Schritt 3 wurde wiederholt.
5. Zur Elution wurden 20 µl Injektionspuffer in jedes Well gegeben, die Platte mit Parafilm abgedeckt und 5 min bei 500 U/min geschüttelt (MS3 basic, IKA).
6. Bei anschließender Kapillarelektrophorese am ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer bzw. Genetic Analyzer ABI PRISM® 310 (Applied Biosystems) wurden die Proben 1/5 verdünnt.

Kapillarelektrophorese

Die aufgereinigten Sequenzreaktionsprodukte wurden luftblasenfrei in gerätespezifische Gefäße überführt, mit denen der Kapillarsequenzierer (Genetic Analyzer ABI PRISM® 310

bzw. ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)) anschließend beladen wurde. Das Gerät wurde mit Hilfe der ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer DATA collection Software Version 3.1 bzw. der Run 3100-Avant Data Collection v2.0 Software (Applied Biosystems) bedient. Die Injektionszeit variierte in Abhängigkeit von der Konzentration der Sequenzreaktionsprodukte zwischen 5 und 10 s. Die Laufzeit betrug je nach erwarteter Fragmentlänge 18 oder 30 min. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der ABI PRISM® AB DNA Sequencing Analysis Software Version 5.2 (Applied Biosystems). Bei unbekannter Sequenz (Bruchpunktklonierung) wurde die genomische Lokalisation der Sequenzen elektronisch mittels Blat-Funktion der Datenbank Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) identifiziert. Im Fall einer Mutationsanalyse wurden die Sequenzen manuell mit den entsprechenden Sequenzen der Datenbank (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) verglichen.

3.5.10VDJ-Mutationsanalyse

Für bestimmte Fragestellungen dieser Arbeit musste der VDJ-Mutationsstatus einiger B-Zell-Neoplasien festgestellt werden, d.h. es wurde bestimmt, ob somatische Hypermutation stattgefunden hatte. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. Matthias Ritgen (II. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt [154].

3.5.11 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Die Umschreibung von RNA in cDNA durch Reverse Transkription wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transkription Kit (Qiagen) durchgeführt.

1. Es wurde 1 µg RNA mit RNase-freiem dH₂O auf ein Volumen von 24 µl gebracht und mit dem im Kit enthaltenen gDNA Wipeout Puffer zum Verdau der genomischen DNA versetzt.
2. Der Ansatz wurde 2 min bei 42 °C im Thermocycler (T3000, Biometra) inkubiert.
3. Anschließend wurden 2 µl Reverse Transkriptase, 8 µl RT-Puffer und 2 µl Primer-Mix (Quiagen) hinzugegeben.

4. Die Reverse Transkription wurde im Thermocycler (T3000, Biometra) bei folgendem Programm durchgeführt:

42 °C → 15 min

95 °C → 3 min

4 °C → ∞

Die Qualität der cDNA, die der Identifizierung von Fusionstranskripten diene, wurde mit Hilfe von Kontroll-Primern (siehe Tabelle 10) überprüft.

3.5.12 Quantitative Reverse Transkription PCR

Durch die quantitative RT-PCR kann die Amplifikation der PCR-Produkte in Echtzeit gemessen und dargestellt werden. Die Quantifizierung wird mittels Fluoreszenzmessungen während der einzelnen PCR-Zyklen durchgeführt. Sie ist nur in der exponentiellen Phase der PCR möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen und eine direkte Abhängigkeit zur jeweiligen RNA- bzw. cDNA-Menge besteht. Der Ct-Wert (Cycle threshold) gibt den Zyklus an, in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, und beschreibt damit den Beginn der exponentiellen Phase [155, 156].

Als Template wurde cDNA verwendet, die gemäß Abschnitt 3.5.11 hergestellt wurde. Die Quantifizierung der Transkripte erfolgte relativ nach der sogenannten $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, bei der die Expression der Zielgene mit der Expression von konstitutionell transkribierten Housekeeping-Genen normalisiert wird. Dazu wird im ersten Schritt für jede analysierte Probe der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des untersuchten Gens subtrahiert. Anschließend wird der ΔCT -Wert der zu untersuchenden Proben vom ΔCT -Wert einer Kontrolle abgezogen ($\Delta\Delta\text{CT}$). Der relative Expressionsunterschied normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe (Ratio), ergibt sich aus der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ [157].

$\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Referenzgen}$

$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT untersuchter Fall} - \Delta\text{CT Kontrolle}$

$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$

Methoden

Für die Quantifizierung der *TRAF3* cDNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet. Er bindet an doppelsträngige DNA und emittiert in dieser Form grünes Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 521$ nm. Die Zunahme der Amplifikate korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz. Die Nutzung von SYBR-Green ermöglicht die anschließende Ermittlung einer Schmelzkurve, wodurch die Spezifität der PCR bestimmt werden kann.

Die quantitativen RT-PCRs zur relativen Messung der *TRAF3* mRNA wurden mit dem QuantiTect® SYBR Green PCR Kit und den QuantiTect® Primerassays angesetzt (Qiagen).

Tabelle 23: Reaktionsansatz für die quantitative RT-PCR

Komponenten (Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen)	2x	12,5 µl
QuantiTect® Primerassay (Qiagen)	10x	2,5 µl
dH ₂ O		8 µl
cDNA*		2 µl
Total		25 µl

* Der Negativkontrolle wurde alternativ H₂O hinzugefügt.

Die Analysen wurden im iCycler® (Bio-Rad) durchgeführt.

Tabelle 24: PCR-Programm für die quantitative RT-PCR mit anschließender Schmelzkurve

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	94 °C	15 s	45
Annealing	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	1 min	1
Renaturierung	55 °C	1 min	1
Schmelzen	55 °C (+0,5 °C)	10 s	80
Aufbewahrung	4 °C	∞	

Die Auswertung erfolgte mit der iCycler® iQ optical System Software Version 3.0a (Bio-Rad).

Die quantitativen RT-PCRs der Gene *ZFP36L1*, *RAD51L1* und *TERT* wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Monika Szczepanowski (Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt. Die Bestimmung der *TERT* mRNA Expression erfolgte nach Klapper et al., 2003 [158].

Die Messung der *RAD51L1*- und *ZFP36L1*-cDNAs erfolgte mit Hilfe von TaqMan Assays. Sie enthalten eine Sonde, die spezifisch zwischen den Primern bindet und am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorochrom und am 3'-Ende mit einem Quencher-Fluorochrom ligiert ist. Die Fluoreszenzintensität nimmt proportional zum PCR-Produkt zu, da die Polymerase mit ihrer 5'-Exonuklease-Aktivität während der Elongation die Sonde verdaut und damit das Reporter-Fluorochrom räumlich vom Quencher-Fluorochrom trennt.

Die quantitativen RT-PCRs zur Messung der relativen *ZFP36L1*- und *RAD51L1*-Expression wurden unter Verwendung des QuantiTect Probe PCR Kits (Qiagen) und der TaqMan® Gene Expression Kits (Applied Biosystems) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Analysen erfolgten am ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

3.5.13 RT-PCR zur Identifizierung von Fusionstranskripten

Der Nachweis von Fusionstranskripten erfolgte an cDNA. Durch das bereits vorhandene Wissen über die genomischen Bruchpunkte konnten die Primer so gewählt werden, dass Produkte unter 5 kb erwartet wurden, was die Verwendung der Gold Star Taq Polymerase (Eurogentec) zuließ. Alternativ wurde die PCR mit dem Expand High Fidelity PCR System durchgeführt.

Tabelle 25: Reaktionsansatz zur Identifizierung von Fusionstranskripten mit der Gold Star Polymerase

Komponenten (Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
Reaction Buffer (Eurogentec)	10x	2,5 µl
dNTPs (Roche)	10 mM	1 µl
MgCl ₂ (Eurogentec)	25 mM	4 µl
Gold Star Taq Polymerase (Eurogentec)	5 U/µl	0,2 µl
Primer (Biomers.net)	je 20 pmol/µl	je 1 µl
cDNA*		1 µl
dH ₂ O		ad 25 µl

* Der Negativkontrolle wurde alternativ H₂O hinzugefügt.

Methoden

Tabelle 26: Reaktionsansatz zur Identifizierung von Fusionstranskripten mit der Expand High Fidelity Polymerase

Komponenten (Hersteller)	Konzentration	eingesetzte Menge
PCR-Puffer 3 (Roche)	10x	2,5 µl
dNTPs (Roche)	10 mM	1 µl
MgCl ₂ (Roche)	25 mM	4 µl
Expand High Fidelity Enzyme Mix (Roche)	3,5 U/µl	0,5 µl
Primer (Biomers.net)	je 20 pmol/µl	je 1 µl
cDNA*	100 ng/µl	1 µl
dH ₂ O		ad 25 µl

* Der Negativkontrolle wurde alternativ H₂O hinzugefügt.

Die Menge der eingesetzten cDNA wurde in einigen Reaktionsansätzen auf 2 µl erhöht, wenn die PCR keine Produkte geliefert hatte.

Tabelle 27: PCR-Programm zur Identifizierung von Fusionstranskripten (T3000, Biometra)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	60 °C	30 s	35
Elongation	72 °C	1 min	
Extension	72 °C	5 min	1
Aufbewahrung	4 °C	∞	

Die Annealingtemperatur und die Elongationszeit wurden unter bestimmten Umständen verändert. Im Allgemeinen wurde die Annealingtemperatur zur Erhöhung der Spezifität auf 65 °C erhöht, die Elongationszeit wurde auf 30 s verkürzt oder es wurde in den ersten 16 Zyklen eine Touch-Down-PCR durchgeführt (68 °C → 64 °C bzw. 68 °C → 60 °C). Zur Erhöhung der Sensitivität wurde die Annealingtemperatur auf 55 °C herabgesetzt oder die Elongationszeit auf 2 min bzw. 3 min erhöht.

3.6 Westernblot-Analyse

Bei einem Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf eine Trägermembran übertragen und immobilisiert. Auf der Membran können zu untersuchende Proteine mit spezifischen Antikörpern qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. In dieser Arbeit erfolgte die Trennung der Proteine über SDS (sodium dodecylsulfate)-Polyacrylamidgelelektrophorese. Durch das negativ geladene SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und ihre Auftrennung erfolgt ausschließlich aufgrund ihrer Größe.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die wie in Abschnitt 3.1.5 isolierten und gemäß Abschnitt 3.1.6 quantifizierten Proteine wurden 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend 10 min bei 95 °C denaturiert. Es wurden diskontinuierliche Tris/HCl-Fertiggele der Firma Bio-Rad (Tris-HCl Ready Gel Precast Gel) mit 12 Taschen und einem 4 %-Sammelgel und einem 10 %-Trenngel verwendet. Die Auftrennung erfolgte in der Criterion Cell Gelkammer mit dem Netzgerät Power PAC HC (Bio-Rad). Die Taschen wurden mit 20 µg Protein in einem Volumen von 45 µl beladen. Außerdem wurden 4 µl des Precision Plus WesternC Standards aufgetragen. Zunächst wurde eine Spannung von 50 V angelegt, bis die Proteine nach ca. 20 min das Trenngel erreicht hatten. Anschließend wurden die Proteine ca. 2 h bei 100 V aufgetrennt.

Western Blot

Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran BA85 Blotting Sandwiches, Whatman) erfolgte mit einer Tank-Blot-Apparatur (Trans-Blot Cell, Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers 30 min bei 100 V.

Ponceau S-Färbung

Die Membran wurde kurz in dH₂O gewaschen und mit Ponceau S-Lösung gefärbt, bis deutliche Protein-Banden sichtbar wurden. Die Proteinfärbung wurde mit Hilfe des BioDoc Analyzers und der BioDoc Analyze Software Version 2.1 dokumentiert.

Immunreaktion

1. Die Membran wurde kurz gewaschen und 2 h in 20 ml Blocking-Reagenz bei 4 °C inkubiert, um die Bereiche, an denen keine Proteinbindung stattgefunden hat, abzudecken. Anschließend wurde einmal kurz und zweimal 15 min in TBS-T bei 4 °C gewaschen.
2. Die Verdünnung des Antikörpers variierte bei den unterschiedlichen Antikörpern. Die primären polyklonalen Kaninchenantikörper (TRAF3, H-122 bzw. H-20, Santa Cruz Biotechnology, INC) wurden 1:500 in 5 ml TBS-T mit 10 % Blocking Reagenz aufgenommen. Der monoklonale Cyclin E-Antikörper der Maus (Novocastra) wurde 1:200 und der monoklonale Anti-Ku p70 Antikörper der Maus (Sigma-Aldrich) wurde 1:5.000 in 5 ml TBS-T mit 10 % Blocking Reagenz verdünnt. Die Membran wurde über

Nacht bei 4 °C in der Antikörper-Lösung auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde einmal kurz und zweimal 15 min in TBS-T bei 4 °C gewaschen.

3. Der sekundäre, Horseradish Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper aus dem Esel (ECF Western Blotting Reagent Packs, GE Healthcare) wurde 1:5.000 in 5 ml TBS-T mit 10 % Blocking Reagenz verdünnt. Der sekundäre, Horseradish Peroxidase-gekoppelte Anti-Maus-Antikörper aus dem Schaf (ECF Western Blotting Reagent Packs, GE Healthcare) wurde 1:2.000 in 5 ml TBS-T mit 10 % Blocking Reagenz und 1,25 µl Precision Strep-Tactin-HRD conjugate (Bio-Rad) verdünnt. Weiterhin wurden 1,25 µl Precision Strep-Tactin-HRD conjugate (Bio-Rad) zugegeben, um den Strep-markierten Standard abschließend auf dem Röntgenfilm detektieren zu können. Die Membran wurde bei 4 °C für eine 1 h in diesem Gemisch inkubiert. Anschließend wurde sie einmal kurz und zweimal 15 min in TBS-T bei 4 °C und einmal 10 min in TBS bei Raumtemperatur gewaschen.

Detektion

Die Membran wurde auf einer Folie mit Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) nach Anleitung des Herstellers inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe der Antikörper-konjugierten Horseradish Peroxidase, die die Oxidation von Luminol unter Emission von Licht (Chemielumineszenz) katalysiert. Ein Amersham Hyperbond Röntgenfilm (GE Healthcare) wurde 2 min in einer Fotomappe mit der vorbereiteten Membran exponiert und in einem automatischen Röntgenfilmentwickler (CURIX 60, AGFA) entwickelt. Das Prinzip der Detektion ist in Abbildung 18 zusammengefasst.

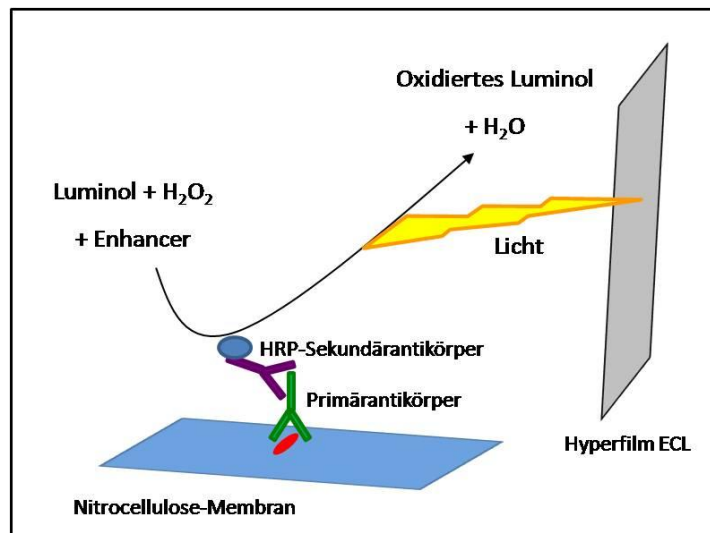


Abbildung 18: Prinzip des durchgeführten Westernblots [modifiziert nach Instructions for Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents (www1.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/western_blot)].
HRP: Horseradish Peroxidase

Strippen der Membran

Um die Proteine erneut mit einem als interne Kontrolle dienenden Antikörper rehybridisieren zu können, wurde die Membran von den gebundenen Antikörpern befreit. Dazu wurde die Membran 90 min in Stripping-Buffer inkubiert und anschließend über Nacht bei 4 °C in Blocking-Reagenz equilibriert.

Erneute Immunreaktion

1. Die Membran wurde einmal kurz und zweimal 15 min in TBS-T bei 4 °C gewaschen.
2. Der primäre, monoklonale Mausantikörper (α -Tubulin, Abcam), der als interne Kontrolle diente, wurde 1:500 in 2,5 ml TBS-T mit 10 % Blocking Reagenz verdünnt und die Membran 2 h auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde einmal kurz und zweimal 15 min in TBS-T gewaschen.
3. Der sekundäre, Horseradish Peroxidase-gekoppelte Anti-Maus-Antikörper aus dem Schaf (ECF Western Blotting Reagent Packs, GE Healthcare) wurde 1:2.000 in 5 ml TBS-T mit 10 % Blocking Reagenz und 1,25 μ l Precision Strep-Tactin-HRD conjugate (Bio-Rad) verdünnt. Die Membran wurde für eine 1 h in diesem Gemisch inkubiert. Zuletzt wurde sie einmal kurz und zweimal 15 min in TBS-T und einmal 10 min in TBS gewaschen.
4. Die Detektion erfolgte wie oben beschrieben.

3.7 Statistische Berechnungen

Die statistische Auswertung und die Berechnung der p-Werte erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4.00 für MS Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen wurde der Mann-Whitney-Test angewandt. Die Unabhängigkeit zweier Merkmale einer Stichprobe wurde mit dem exakten Fischer-Test überprüft.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die eine Rolle in der Pathogenese lymphatischer Neoplasien der B-Zell-Reihe spielen. Im Fokus der Arbeit standen dabei Gene, die durch Aberrationen des Chromosoms 14 aktiviert oder inaktiviert werden. Ein typischer Mechanismus bei B-Zellen sind Translokationen mit Bruchpunkten im *IGH*-Locus in der Chromosomenbande 14q32, durch die Onkogene aktiviert werden. Durch die Analyse bisher nicht näher charakterisierter Translokationen mit Beteiligung des *IGH*-Locus in 14q32 sollten in der vorliegenden Arbeit neue Kandidatenonkogene in B-Zell-Neoplasien entdeckt werden. Des Weiteren sollten Deletionen im langen Arm von Chromosom 14 untersucht und deren molekulare Mechanismen in der Lymphompathogenese charakterisiert werden. Um die Bedeutung der jeweiligen Aberrationen bei lymphatischen Neoplasien besser abschätzen zu können, sollte untersucht werden, ob diese wiederkehrend und mit bestimmten Entitäten von Lymphomen bzw. Leukämien assoziiert sind. Die Charakterisierung der verschiedenen Veränderungen des Chromosoms 14 und die weiterführende Analyse potentieller tumorassoziierter Kandidatengene werden im Folgenden für die einzelnen untersuchten Aberrationen beschrieben. Zur Identifizierung möglicher Kandidaten-Gene wurden die Veränderungen zunächst mittels FISH-, Array-CGH und PCR-basierte Techniken kartiert. Anschließend wurden die Veränderungen durch systematische FISH-Untersuchungen auf ihre Rekurrenz getestet. Eine spezifische molekulare Analyse ausgewählter Kandidatengene und deren Produkte erfolgte dann mit molekularzytogenetischen, molekulargenetischen und proteinanalytischen Verfahren.

4.1 Charakterisierung der Translokation t(5;14)(p15;q32)

In Vorarbeiten des Instituts für Humangenetik Kiel wurde eine bislang nicht charakterisierte zyto-genetisch nicht sichtbare Translokation t(5;14)(p15q32) mit Beteiligung des *IGH*-Locus in 14q32 in einer atypischen B-CLL (Fall I-1) beobachtet. FISH-Analysen zeigten zudem, dass die Translokation mit einer ca. 200 kb großen interstitiellen Deletion assoziiert war. Die beiden Bruchpunkte in 5p15.33 wurden auf jeweils ca. 40 kb eingegrenzt (Abbildung 19) und die Kandidatengene *TERT*, *CLPTM1L*, *SLC6A3*, *FLJ12443* sowie *PDCD6* diskutiert.

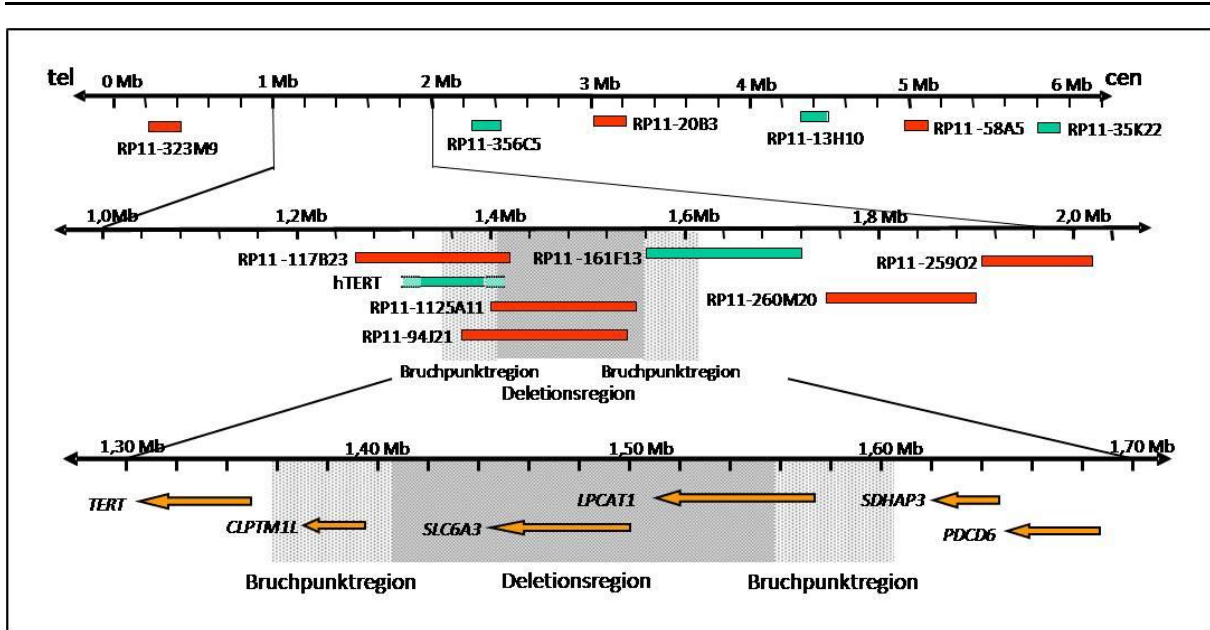


Abbildung 19: Bruchpunkt in der Region 5p15.33 bei einer B-CLL mit Translokation $t(5;14)(p15;q32)$ (Fall I-1). Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit aus [159]. Die Lage der zur Eingrenzung des Bruchpunktes mittels FISH verwendeten BAC-Klone ist schematisch angegeben. Die Bruchpunktregion ist vergrößert dargestellt. Rote Balken entsprechen mit Spectrum orange und grüne Balken mit Spectrum green-markierten Klonen. Die involvierten Gene sind in Form von gelben Pfeilen dargestellt, die die Transkriptionsrichtung angeben (Nagel et al., 2004 [159]).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, basierend auf den Vorbefunden der Arbeitsgruppe [159] die Häufigkeit der Translokation $t(5;14)(p15;q32)$ sowie Aberrationen der Chromosomenregion 5p15.33 zu ermitteln. Des Weiteren sollte das potentielle Onkogen in der Region 5p15.33, das möglicherweise durch den *IGH*-Locus in 14q32 aktiviert wird, identifiziert und funktionell analysiert werden.

4.1.1 Screening von Lymphomen und Leukämien auf Aberrationen in der Region 5p15.33 mittels FISH

Zunächst sollte in dieser Arbeit die Häufigkeit des Auftretens einer Translokation $t(5;14)(p15;q32)$ oder anderer Strukturveränderungen in der Chromosomenbande 5p15.33 ermittelt werden, indem ein Screening mittels Interphase-FISH an ausgewählten Lymphomen und Leukämien durchgeführt wurde. Dazu wurde ein Dreifarb-FISH-Assay mit den die beiden Bruchpunktregionen in 5p15.33 flankierenden BAC-Klonen RP11-678B2 und RP11-356C5 sowie dem *TERT* und *CLPTM1L* überspannenden BAC-Klon RP11-117B23 etabliert (Abbildung 20). Die Klone wurden bereits in den Vorarbeiten validiert [159]. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde der Assay auf Zellen aus peripherem Blut fünf gesunder Probanden mit normalem Karyotyp hybridisiert. In jeweils 100 Zellkernen wurde

die Signalkonstellation bestimmt. Da die Klone RP11-678B2 und RP11-356C5 etwa 1,2 Mb voneinander entfernt liegen, wurde ein Abstand zwischen dem grünen und dem roten Signal von bis zu drei Signaldurchmessern als Kolo-kalisation gewertet. Die Nachweisgrenze wurde definiert als Mittelwert falsch positiver Ergebnisse in den Kontrollen, plus drei Standardabweichungen. Für ein Bruchereignis zwischen dem roten und dem grünen Signal konnte so eine theoretische Nachweisgrenze von 2,1 % berechnet werden, die für die Praxis auf den Wert 3 % festgelegt wurde. Für einen Bruch innerhalb des Klons RP11-117B23 ergab die Nachweisgrenze 0 %, wurde aber ebenfalls auf 3 % festgelegt.

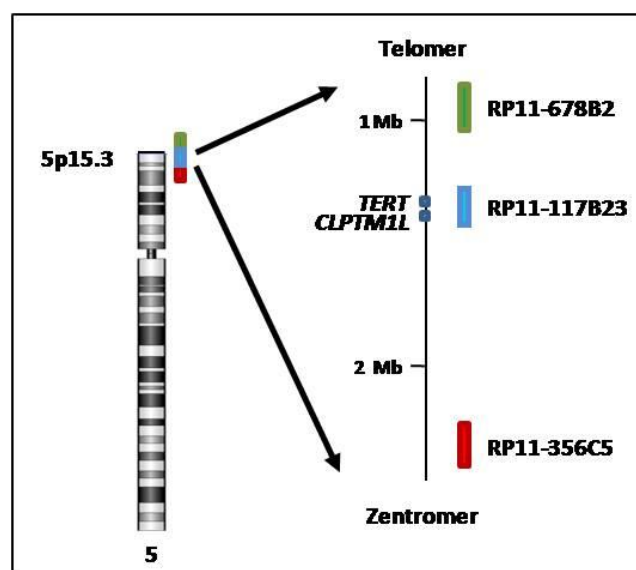


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Dreifarbf-FISH-Assays zur Detektion von Aberrationen in 5p15.33. Zur besseren Übersicht sind nur die Gene *TERT* und *CLPTM1L* dargestellt.

In den im Rahmen dieses Screenings untersuchten Fällen wurden je Fall, soweit möglich, 100 Zellkerne ausgewertet (Anhang 1). In 34 Lymphomen und Leukämien mit zytogenetischen Veränderungen in der Chromosomenregion 5p1 konnten sechs Fälle mit Bruchereignis (Abbildung 21A) und ein Fall mit einer Amplifikation (Abbildung 21B) in der untersuchten Region identifiziert werden. Bei vier dieser Fälle handelte es sich um MCL, weshalb anschließend weitere 123 primäre MCL mit diesem FISH-Assay analysiert wurden. Unter diesen konnte ein weiterer Fall mit Bruchereignis und ein weiterer Fall mit einer Amplifikation in dieser Region gefunden werden.

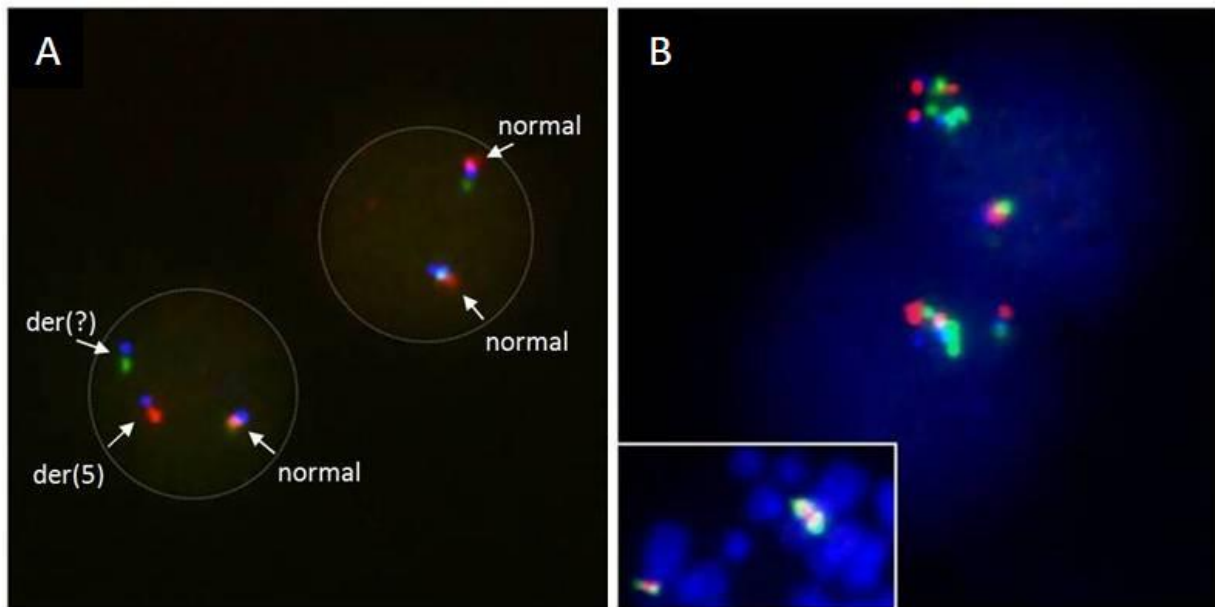


Abbildung 21: Aberrante Signalmuster mit dem Dreifarbf-FISH-Assay zur Detektion von Veränderungen in der Region 5p15.33. **A)** Zwei Interphase-Zellkerne des Falls I-6 mit Bruch in RP11-117B23. Die Umrandung des Kerns wurde mit einer gestrichelten Linie angedeutet, da zur besseren Sichtbarkeit der Signale auf eine DAPI-Darstellung verzichtet wurde. Rechts sind Aufnahmen der gleichen Interphasen mit den einzelnen Breitbandfiltern aqua, grün und rot gezeigt. **B)** Zwei Interphase-Zellkerne des Falls I-11 mit Homogeneously staining region (HSR)-Amplifikation in der untersuchten Region. In jedem Kern ist außerdem eine normale Kolokalisation zu sehen. Unten links ist ein Ausschnitt einer Metaphase des gleichen Falls gezeigt. Das Signal auf dem derivativen Chromosom mit HSR-Amplifikation (rechts) ist deutlich stärker als das auf dem normalen Chromosom 5 (links).

der: derivatives Chromosom

Darüber hinaus deckte die Anwendung dieses Dreifarbf-FISH-Assays in sieben Lymphomen und Leukämien mit unbekanntem *IGH*-Translokationspartner weitere zwei B-CLL und eine ALL mit Translokation in 5p15.33 auf. Um zu untersuchen, ob in diesen Fällen Fusionen zwischen der *TERT-CLPTM1L*-Region und dem *IGH*-Locus stattgefunden hatten, wurde ein FISH-Assay aus einer Kombination des DEAC-markierten, *TERT* und *CLPTM1L* überspannenden BAC-Klons RP11-117B23 und der kommerziellen LSI *IGH* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott/Vysis) hergestellt. Alle drei Fälle zeigten *TERT/CLPTM1L-IGH*-Fusionssignale (Abbildung 22). Alle Ergebnisse dieser FISH-Untersuchungen mit dem Dreifarbf-FISH-Assay zur Detektion von Veränderungen in der Region 5p15.33 an lymphatischen Neoplasien sind ausführlich im Anhang 1 aufgeführt. Eine Zusammenfassung der Befunde ist in Tabelle 28 zu finden.

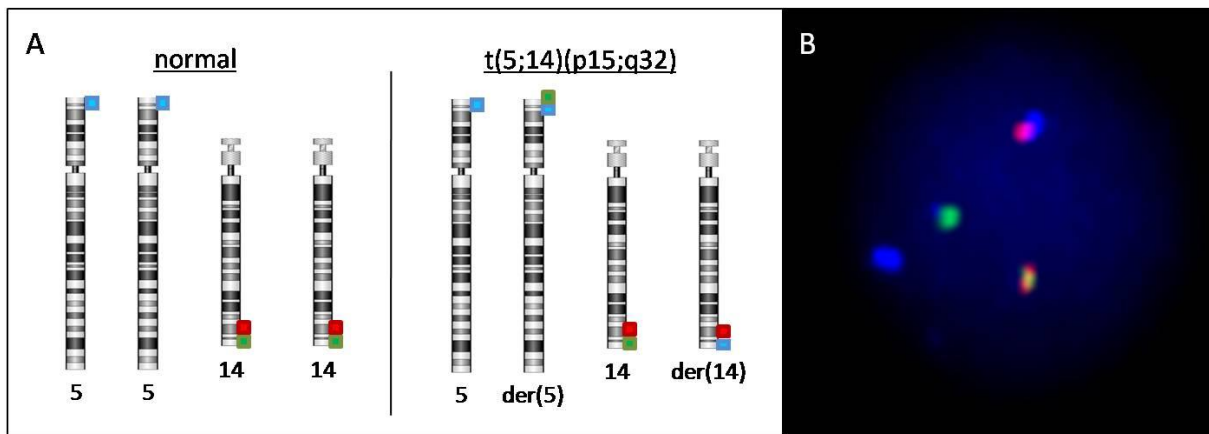


Abbildung 22: Bestätigung einer *IGH*-5p15.33-Fusion mittels *IGH/TERT-CLPTM1L*-Assay. **A)** Idiogramme der an der Translokation $t(5;14)(p15;q32)$ beteiligten Chromosomen 5 und 14. Links sind die in einer normalen Zelle vorkommenden Chromosomen 5 und 14 mit zwei kolokalisierten rot/grünen Signalen in den Regionen 14q32 und zwei blauen Signalen in den Regionen 5p15.33 dargestellt. Rechts sind die Idiogramme der Chromosomen in einer Zelle mit Translokation $t(5;14)(p15;q32)$ gezeigt. Durch die Translokation entsteht jeweils eine Kolokalisation zwischen dem grünen und dem blauen sowie dem roten und dem blauen Signal. **B)** Interphase-Zellkern des Falls I-7, der mit dem DEAC-markierten BAC-Klon RP11-117B23 (blau) und der LSI *IGH* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (*IGH* distal = Spectrum green; *IGH* proximal = Spectrum orange) hybridisiert wurde.

der: derivatives Chromosom

Bei der Untersuchung von acht MCL-Zelllinien mit dem Dreifarbf-FISH-Assay wiesen drei Zelllinien (NCEB1, Z-138 und REC-1) einen Bruch in der Region 5p15.33 auf. Inzwischen wurde jedoch eine Arbeit publiziert, in der stabil integrierte Mauschromosomen in der Zelllinie NCEB1 beschrieben wurden [160]. Bei der Zelllinie Z-138 bestehen Diskrepanzen zwischen mehreren Einsendungen der Zelllinie aus verschiedenen Laboren, was die Identität des untersuchten Materials in Frage stellt. Die Ergebnisse der Zelllinien NCEB1 und Z-138 wurden aus diesem Grund in dieser Arbeit nicht weiter dargestellt. In 16 Lymphom- und Leukämie-Zelllinien anderer Entitäten konnten mit dem Drei-Farb-FISH-Assay keine weiteren Fälle mit Bruch in 5p15.33 identifiziert werden. Die Ergebnisse des Screenings der Zelllinien mit dem 5p15.33-Dreifarb-FISH-Assay sind ausführlich im Anhang 8 aufgeführt.

Insgesamt konnten durch die Analyse von 164 primären Lymphomen und Leukämien sowie von 22 Lymphom- und Leukämie-Zelllinien mit dem 5p15.33-Dreifarb-FISH-Assay zehn weitere Fälle mit Bruch, zwei Fälle mit Amplifikation und eine Zelllinie mit Bruch innerhalb der Region 5p15.33 identifiziert werden.

Ergebnisse

Tabelle 28: Zusammenfassung des FISH-Screenings von primären Lymphomen und Leukämien mit dem 5p15.33-Dreifarb-FISH-Assay (bzgl. Zelllinien siehe Anhang 8)

Signalkonstellation ¹	Total	1 Ko	2 Ko	3-6 Ko	Komplex	HSR-Amp.	1 Ko+ 1 Split
Interpretation		Deletion	Normal	Zugewinn	Aberrant	Zugewinn	Bruch
Nachweisgrenze ²		3 %	-	3,1 %	3 %	3 %	3 %
Anzahl der Fälle mit zytogenetischer 5p1-Veränderung	34	4 (11,8 %)	19 (55,9 %)	2 (5,9 %)	2 (5,9 %)	1 (2,9 %)	6 (17,6 %)
Anzahl der Fälle mit unbekannter IGH-Translokation	7	-	4 (57,1 %)	-	-	-	3 (42,9 %)
Anzahl der Mantelzell-Lymphome	123	2 (1,6 %)	93 (75,6 %)	25 (20,3 %)	1 (0,8 %)	1 (0,8 %)	1 (0,8 %)
Gesamtanzahl	164	6	116	27	3	2	10

¹Der FISH-Assay besteht aus den Sonden RP11-678B2 (Spectrum green), RP11-117B23 (DEAC) und RP11-356C5 (Spectrum orange). Kolokalisation der Signale bedeutet eine Zusammenlagerung des grünen (RP11-678B2), blauen (RP11-117B23) und roten (RP11-356C5) Signals. Bei einer komplexen Signalkonstellation liegen verschiedene Tumorsubklone und z.T. auch Zugewinne oder Verluste vor. Eine HSR-Amplifikation liegt vor, wenn das amplifizierte Material in einer Region sichtbar ist und sich nicht über den Zellkern verteilt. Bei einem Signalsplit dissoziieren Signale des Assays, die auf einem normalen Chromosom kolokalisiert sind, auseinander. Der Bruch kann zwischen dem grünen und dem blauen, dem blauen und dem roten oder innerhalb des blauen Signals vorliegen. Im Anhang 1 sind die genauen Signalkonstellationen aufgeführt.

²Bei einer errechneten Nachweisgrenze unter 3 %, wurde der Wert auf 3 % festgelegt.

Amp.: Amplifikation; HSR: Homogeneously staining regio; Ko: Kolokalisation; MCL: Mantelzell-Lymphom

Um die neu identifizierten Fälle mit Bruch in der Chromosomenregion 5p15.33 näher zu charakterisieren, wurden die Bruchpunkte mit den bereits in den Vorarbeiten verwendeten BAC-Klonen (Abbildung 19) eingegrenzt. Dabei zeigte sich, dass ein Splenisches Marginalzonen-Lymphom (SMZL) mit Translokation t(5;7)(p15;p11) (Fall I-2) mit den verwendeten BAC-Klonen die gleichen Hybridisierungsmuster aufwiesen wie die initial beschriebene atypische B-CLL mit Translokation t(5;14)(p15;q32). Auch dieses Lymphom besaß eine ca. 200 kb-große interstitielle Deletion in 5p15.33, die mit einer Translokation assoziiert war. Acht Fälle (Fälle I-3-I-10; vier MCL, drei B-CLL und eine ALL) zeigten eine einfache Translokation mit Bruch in der Region der Gene *CLPTM1L* und *TERT*. Die MCL-Zelllinie REC-1 mit Translokation sowie ein T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom mit Deletion (Fall I-13) wiesen Bruchpunkte zwischen den Genen *FLJ12443* und *PDCD6* auf, ähnlich der zentromerischen Bruchpunktregion der Fälle mit deletionsassoziiierter Translokation (Abbildung 23).

Zusammenfassend konnten zwei Bruchpunktcluster in 5p15.33 identifiziert werden (Abbildung 23): Vier Bruchereignisse fanden zwischen den Genen *FLJ12443* und *PDCD6* und

zehn Bruchereignisse in der Region der Gene *TERT* und *CLPTM1L*, innerhalb des BAC-Klons RP11-117B23, statt.

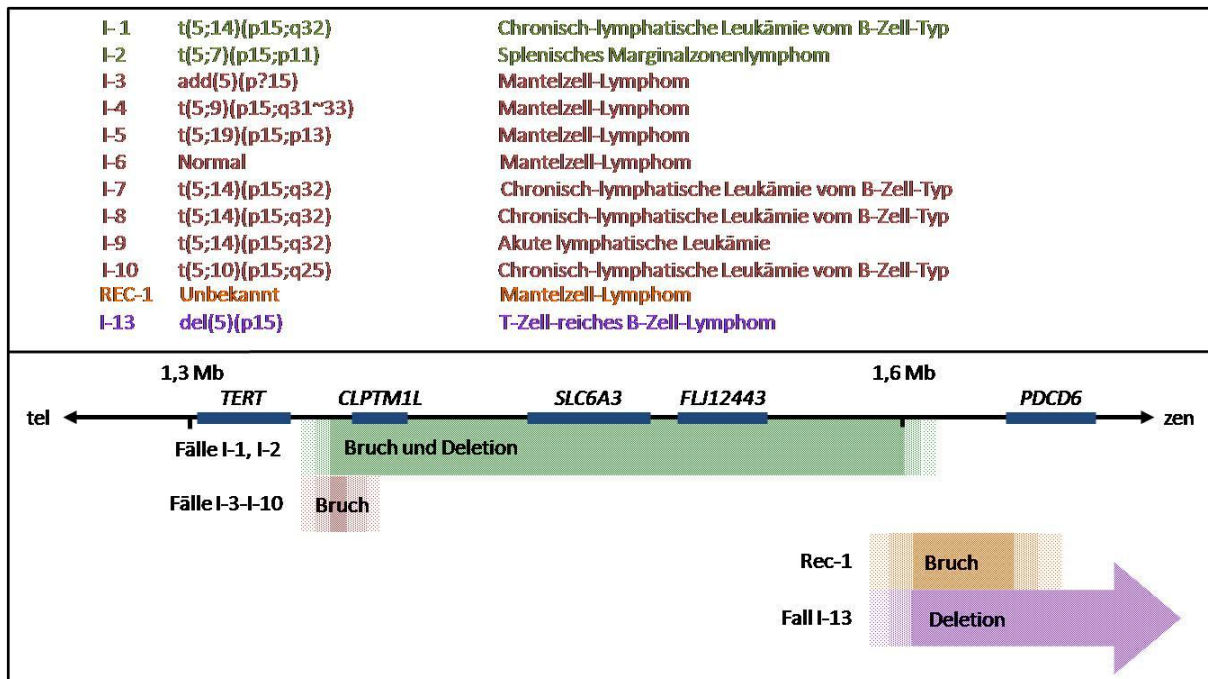


Abbildung 23: Lage der Bruchpunkte der Fälle mit Veränderungen in der Region 5p15.33. Die Gene sind durch blaue Balken angezeigt. Die transparenten Bereiche stellen die Bruchpunktregionen dar. Der violette Pfeil deutet an, dass die Deletion über den abgebildeten Bereich hinausgeht.
tel: telomerisch; zen: zentromerisch

4.1.2 Bruchpunkteingrenzung in der *TERT-CLPTM1L*-Region unter Verwendung von Fosmid-Klonen

Um die tumorrelevanten Mechanismen der Veränderungen in der *TERT-CLPTM1L*-Region besser verstehen zu können, sollten die Bruchpunkte der Translokationen in den zehn Fällen mit Bruch innerhalb des BAC-Klons RP11-117B23 mittels FISH noch weiter eingegrenzt werden. Dazu wurden zunächst sechs der kleineren, ca. 40 kb großen Fosmid-Klone verwendet. Die Analysen wurden an Interphasen durchgeführt, wobei der differentiell markierte BAC-Klon RP11-678B2, bei dem bereits bekannt war, dass er durch die Translokationen auf das Partnerchromosom verlagert wird, jeweils als Kontrollsonde verwendet wurde. Die Fosmid-Klone wurden vor der Anwendung am Tumormaterial an Metaphasen von Zellen aus dem peripheren Blut von Probanden mit normalem Chromosomensatz auf die richtige Lokalisation und Spezifität überprüft. Bei der Auswertung der FISH-Hybridisierungsmuster an den Fällen mit Translokation t(5)(p15.33) wurde bei

Ergebnisse

Brüchen innerhalb der Fosmid-Klone auch die Größe der einzelnen Signale genau analysiert. Die FISH-Ergebnisse sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Ergebnisse der Bruchpunkteingrenzungen der Translokationen unter Beteiligung der *TERT-CLPTM1L*-Region mittels Fosmid-Klonen¹

Fall-Nr.	WI2-1943L8	WI2-841J3	WI2-1054L12	WI2-1945M12	WI2-2731B8	WI2-1224D6
I-1	-	Reduziertes Signal auf der(14)	-	Deletiert	-	-
I-2	-	Reduziertes Signal auf der(14)	-	Deletiert	-	-
I-3	Signal auf der(?)	Signalsplit innerhalb des Klons	Signal auf der(5), Restsignal auf der(?)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)
I-4	Signal auf der(9)	Signalsplit innerhalb des Klons	Signal auf der(5), Restsignal auf der(9)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)
I-5	Signal auf der(19)	Signalsplit innerhalb des Klons	Signal auf der(5), Restsignal auf der(19)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)
I-6	Signal auf der(?)	Signalsplit innerhalb des Klons	Signal auf der(5), Restsignal auf der(?)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)
I-7	Signal auf der(14)	Signal auf der(14)	Signal auf der(14), Restsignal auf der(5)	Signalsplit innerhalb des Klons	Signalsplit innerhalb des Klons	Signal auf der(5), Restsignal auf der(14)
I-8	Signal auf der(14)	Signalsplit innerhalb des Klons	Signal auf der(5), Restsignal auf der(14)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)
I-9	Signal auf der(14)	Signalsplit innerhalb des Klons	Signal auf der(5), Restsignal auf der(14)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)
I-10	Signal auf der(10)	Signalsplit innerhalb des Klons	Signal auf der(5), Restsignal auf der(10)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)	Signal auf der(5)

¹Durch die Kohybridisierung mit dem BAC-Klon RP11-678B2 konnte bestimmt werden, auf welches der derivativen Chromosomen der jeweils eingesetzte Fosmid-Klon hybridisiert. der: derivatives Chromosom

Die beiden Fälle (I-1 und I-2) mit deletionsassoziiertes Translokation zeigten ein reduziertes Signal des Klons WI2-841J3 und eine Deletion des WI2-1945M12-Klons. Die Brüche liegen

demnach zwischen *TERT* und *CLPTM1L* oder im 3'-terminalen Bereich des *CLPTM1L*-Gens (Abbildung 24A). Sieben der Fälle mit einfacher Translokation zeigten einen Split innerhalb des Klon WI2-841J3. WI2-1054L12 hybridisierte größtenteils auf dem derivativen Chromosom 5, zeigte jedoch auch ein Restsignal auf dem Translokationspartner. Der Klon WI2-1943L8 zeigte hingegen ein starkes Signal auf dem Partnerchromosom und ein schwaches Restsignal auf dem derivativen Chromosom 5 (Abbildung 24B). Somit sollten die Bruchpunkte in diesen Fällen zwischen den Genen *TERT* und *CLPTM1L* liegen. Eine B-CLL mit Translokation t(5;14)(p15;q32) (Fall I-7) zeigte Signalsplits innerhalb der Klone WI2-2731B8, WI2-1224D6, WI2-1054L12 und WI2-1945M12 und damit einen Bruch innerhalb des *CLPTM1L*-Gens (Abbildung 24C).

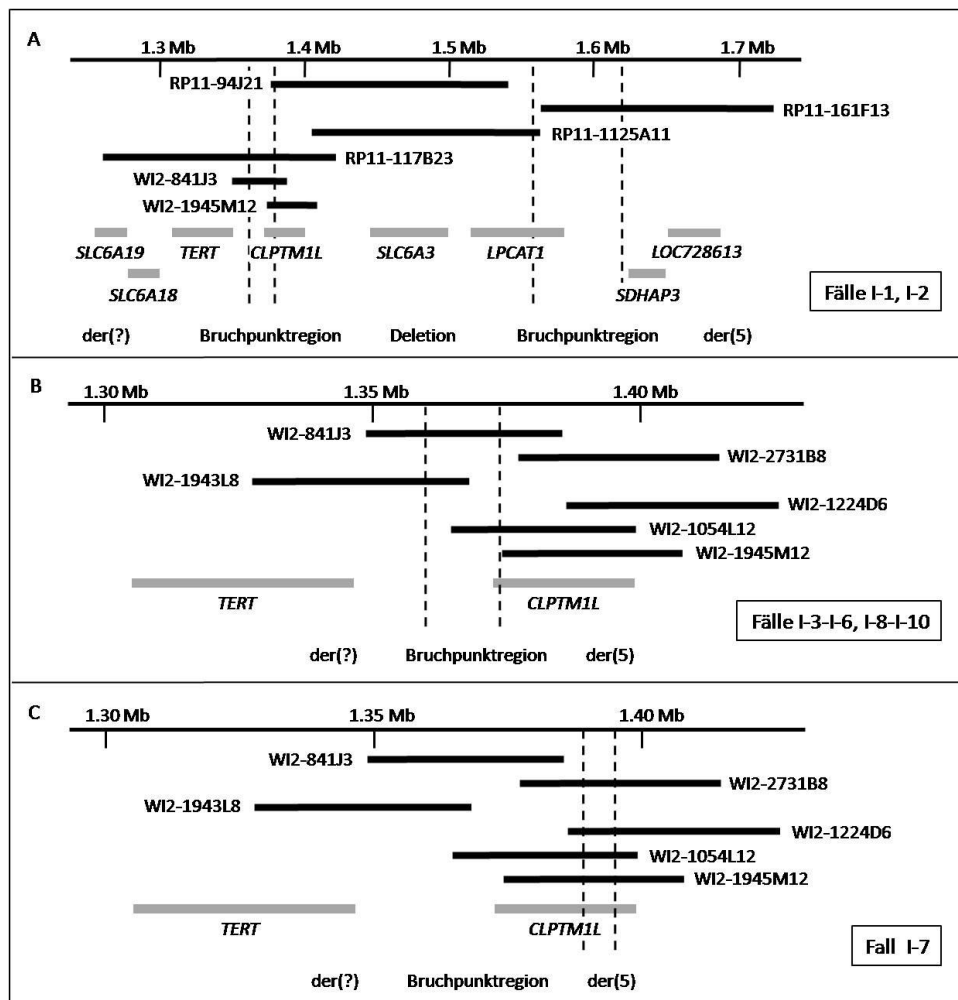


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Bruchpunktkartierung in Fällen mit Veränderungen in der *TERT-CLPTM1L*-Region mittels FISH. Die schwarzen Balken stellen die verwendeten BAC- und Fosmid-Klone dar. Die grauen Balken repräsentieren die Gene in der untersuchten Region. Die Bruchpunktregion wurde anhand der FISH-Hybridisierungsmuster bestimmt.

der: derivatives Chromosom

Die durchgeführten FISH-Analysen haben gezeigt, dass das *TERT*-Gen in allen zehn Fällen mit Translokation unter Beteiligung der *TERT-CLPTM1L*-Region auf das derivative Partnerchromosom verlagert wurde. *CLPTM1L* verbleibt in sieben der zehn Fälle auf dem derivativen Chromosom 5. In einem Fall liegt der Bruchpunkt innerhalb des *CLPTM1L*-Gens und in zwei Fällen ist das *CLPTM1L*-Gen durch die Deletion verloren gegangen.

4.1.3 Custom-Array-CGH an Fällen mit deletionsassoziiierter Translokation in 5p15.33

In den Fällen mit deletionsassoziiierter Translokation (Fälle I-1 und I-2) bestand die Möglichkeit einer Array-CGH-Analyse zur weiteren Eingrenzung und Bestätigung der Bruchpunktregion in 5p15.33, da es sich um unbalancierte Veränderungen handelt. Zu diesem Zweck wurde ein 44k-Custom-Array designt, der mit der maximalen Anzahl an HD-Oligonukleotiden in der Bruchpunktregion in 5p15.33 im Bereich der Gene *TERT* und *CLPTM1L* (chr5:1.320.000-1.400.000) besetzt wurde.

In beiden untersuchten Fällen zeigte sich, dass die Deletion innerhalb einer 12 kb großen, Repeat-reichen Region zwischen den Genen *TERT* und *CLPTM1L* beginnt (chr5:1.354-1.366 kb) (Abbildung 25).

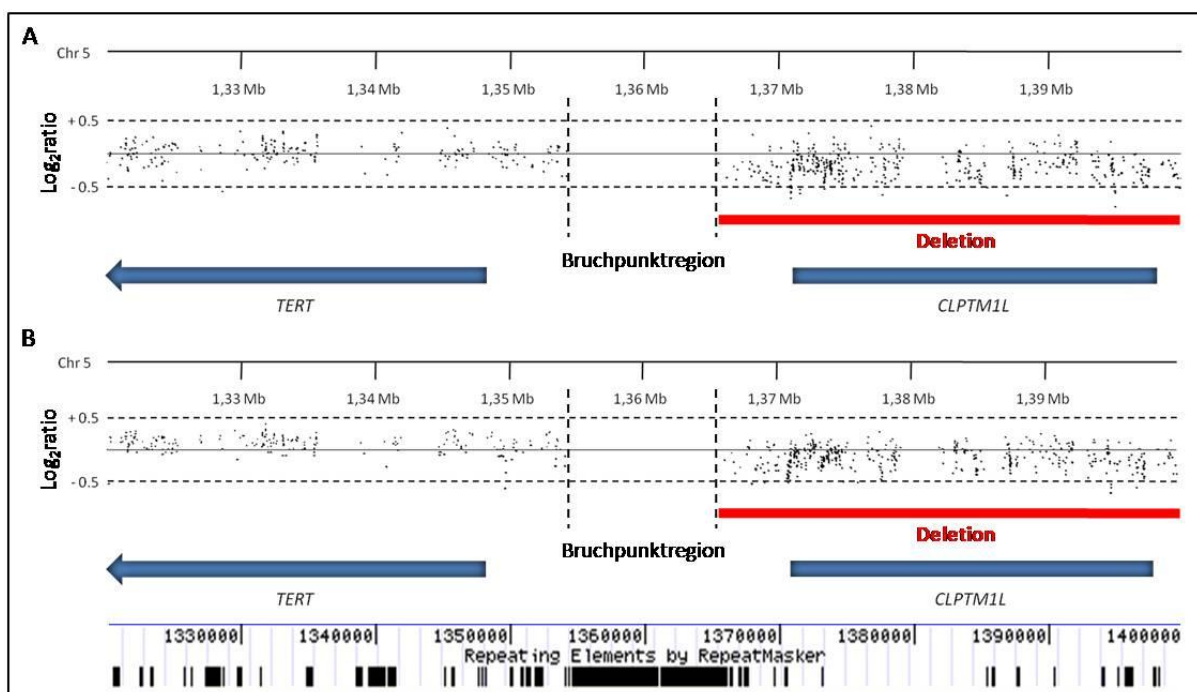


Abbildung 25: 44k-Custom-Array-CGH-Analyse der *TERT-CLPTM1L*-Region an den Fällen I-1 (A) und I-2 (B). Der Wert Null entspricht einem balancierten Chromosomenstatus, negative Werte zeigen einen Verlust von genomischem Material an. Unten ist der Repeat Masker der Human Genome Browser Datenbank (<http://genome.ucsc.edu/>; hg18) dieser Region angezeigt.

4.1.4 Expressionsanalyse von *TERT* mittels quantitativer RT-PCR

Die FISH- und Custom-Array-CGH-Analysen haben gezeigt, dass *CLPTM1L* in drei Lymphomen verloren gegangen ist beziehungsweise ein Bruchpunkt innerhalb des Gens liegt. Bei zwei dieser Fälle handelt es sich um *IGH*-Translokationen (Fälle I-1 und I-7). Da der *IGH*-Locus bekanntermaßen ein Onkogenaktivator ist, liegt die Vermutung nahe, dass nicht *CLPTM1L*, sondern *TERT* das Zielgen der Aberrationen in der *TERT-CLPTM1L*-Region ist.

Um feststellen zu können, ob die chromosomalen Veränderungen in der *TERT-CLPTM1L*-Region eine erhöhte *TERT*-Expression zur Folge haben, wurde eine *TERT*-Expressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt. Es wurden Primerassays für das *TERT*-Gen und das zur Normalisierung benötigte Housekeeping-Gen β -Glucuronidase (*GUSB*) verwendet.

Die Untersuchungen wurden an drei Fällen mit t(5;14)(p15;q32) (Abbildung 26A und C) und an fünf Fällen mit Varianttranslokationen (Abbildung 26A und B) in der Region 5p15.33 durchgeführt, von denen geeignetes Material zur Isolierung von RNA vorhanden war. Zum Vergleich wurde, soweit möglich, Tumormaterial von Fällen der entsprechenden Lymphom-Entitäten analysiert, die mit dem Dreifarb-FISH-Assay zur Detektion von Aberrationen in 5p15.33 ein normales Signalmuster gezeigt hatten. Außerdem wurden die *TERT*- und *GUSB*-Expressionen von Tonsillen, Knochenmark und peripherem Blut gemessen. Die Messungen wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt. Die relativen Standardabweichungen lagen je nach Messung zwischen 0,09-1,4 % (Mittelwert 0,5). Die Werte des peripheren Blutes wurden zur Berechnung der $\Delta\Delta$ CT-Werte verwendet.

In allen drei untersuchten B-CLL und dem SMZL mit Bruch innerhalb der *TERT-CLPTM1L*-Region war die *TERT* mRNA Expression im Vergleich zu elf B-CLL mit Trisomie 12 (n = 3), 13q-Deletion (n = 3), 11q-Deletion (n = 3) oder 17p-Deletion (n = 2) signifikant erhöht ($p = 0,0095$) (Abbildung 26A). Auch die drei untersuchten MCL mit Bruch in 5p15.33 zeigten eine signifikant erhöhte *TERT*-Expression im Vergleich zu fünf MCL ohne Bruch innerhalb der *TERT-CLPTM1L*-Region ($p = 0,01$) (Abbildung 26B). Die ALL mit Translokation t(5;14)(p15;q32) wies ebenfalls eine hohe *TERT*-Expression auf, die aber ebenfalls in einem Teil der ALL ohne Bruch in der *TERT-CLPTM1L*-Region zu messen war (Abbildung 26C). Das Knochenmark und das periphere Blut zeigten im Vergleich zum Tumormaterial eine sehr niedrige *TERT*-Expression. Bei der Analyse der Tonsillen wurde eine relativ starke, aber im Vergleich zu den Lymphomen und Leukämien mit 5p15.33-Bruch deutlich schwächere *TERT*-Expression gemessen.

Ergebnisse

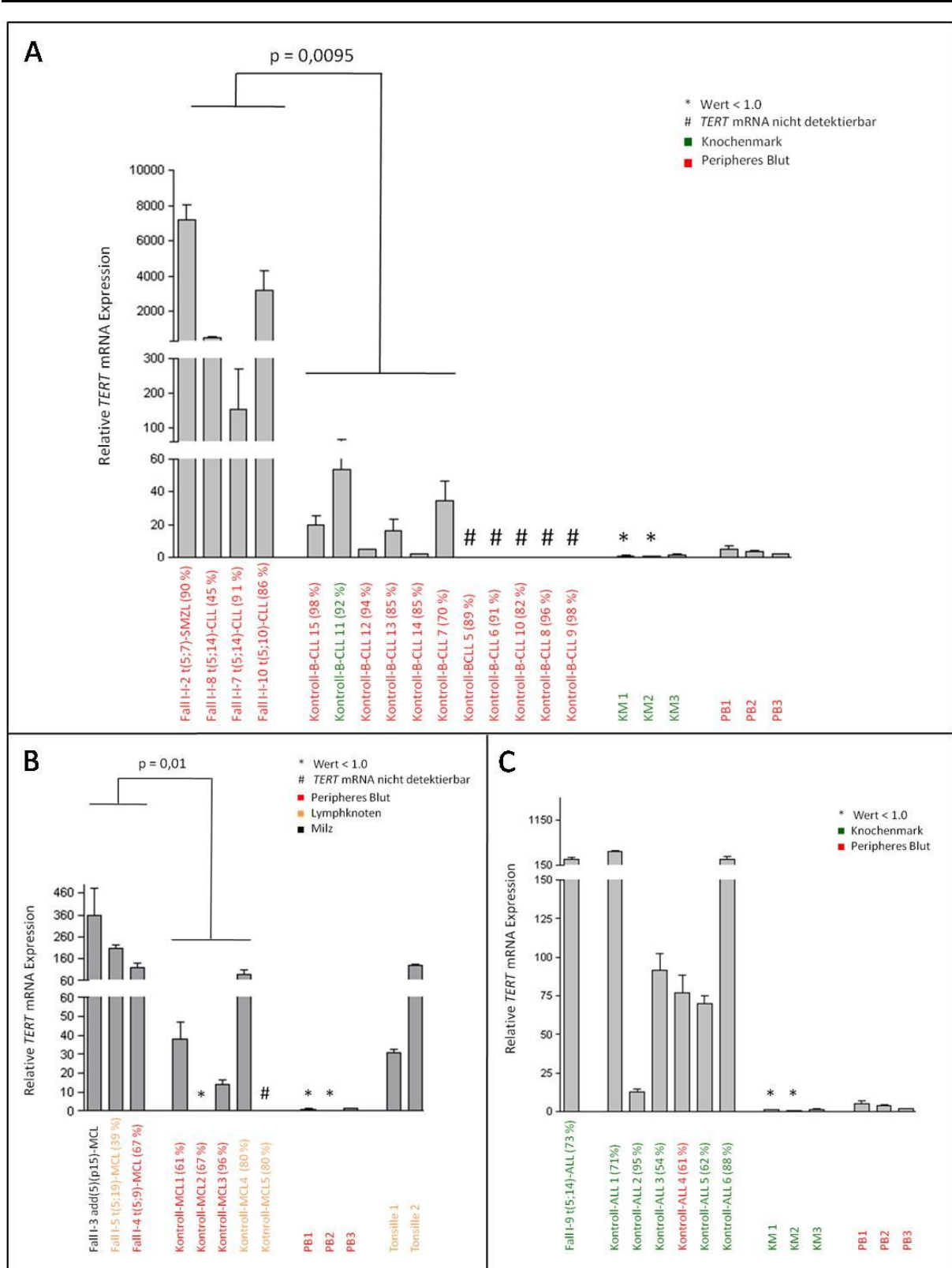


Abbildung 26: Quantitative RT-PCR zur Untersuchung der *TERT* mRNA Expression in Fällen mit und ohne (Kontrollen) Bruch innerhalb der *TERT-CLPTM1L*-Region. Angegeben ist die Ratio, ermittelt durch die $\Delta\Delta CT$ -Methode (siehe Abschnitt 3.5.12). Der Tumorzellgehalt ist in Klammern genannt. Die p-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests berechnet. **A)** Relative *TERT* mRNA Expression in B-CLL sowie einem SMZL. **B)** Relative *TERT* mRNA Expression in MCL. **C)** Relative *TERT* mRNA Expression in ALL.

ALL: Akute lymphatische Leukämie; B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; KM: Knochenmark; MCL: Mantelzell-Lymphom; pB: peripheres Blut

Aus den Ergebnissen der RT-PCR geht hervor, dass Translokationen, welche die *TERT-CLPTM1L*-Region betreffen, mit einer starken *TERT*-Expression assoziiert sind. Dies ist unabhängig vom Auftreten einer Deletion zentromerisch des *TERT*-Gens oder von dem jeweiligen Translokationspartner.

4.1.5 Bestimmung der Telomerase-Aktivität in Fällen mit Translokation unter Beteiligung der *TERT-CLPTM1L*-Region mittels TRAP-Assay

Mit Hilfe des Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP) Assays sollte untersucht werden, ob in Fällen mit Translokation unter Beteiligung der *TERT-CLPTM1L*-Region eine starke *TERT* mRNA Expression ebenfalls zu einer erhöhten Telomerase Aktivität führt. Der TRAP-Assay beruht darauf, dass die Telomerase *in vitro* in der Lage ist, de novo Telomerase-Repeats (TTAGGG) an einen Primer anzufügen [161]. Die resultierenden Produkte werden anschließend amplifiziert und quantifiziert. Die TRAP-Assays wurden von Dr. rer. nat. Monika Szczepanowski im Institut für Pathologie (Sektion Hämatopathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Es zeigte sich, dass sowohl die zwei untersuchten B-CLL als auch die zwei untersuchten MCL mit Bruchpunkt innerhalb der *TERT-CLPTM1L*-Region eine im Vergleich zu den B-CLL (n = 6) und MCL (n = 2) ohne diese Veränderungen erhöhte Telomerase-Aktivität aufwiesen (Abbildung 27).

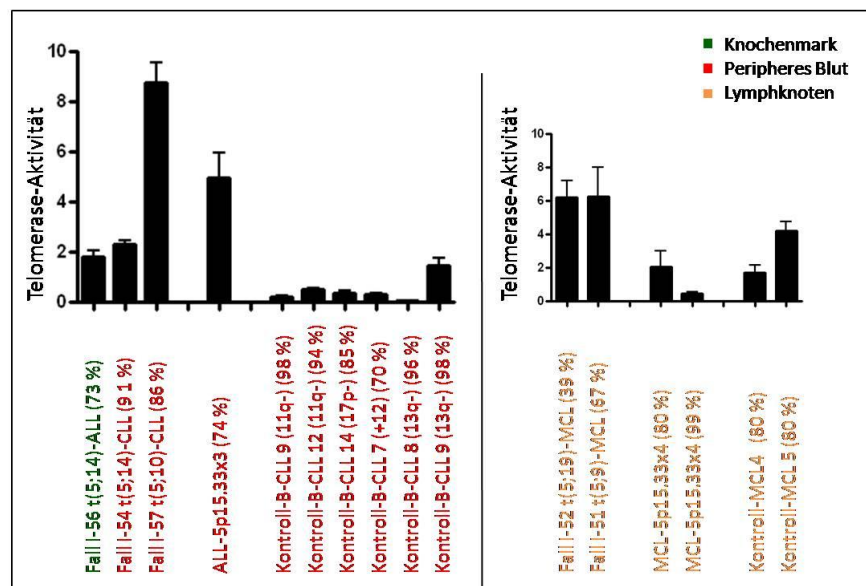


Abbildung 27: TRAP-Assay zum Vergleich der Telomerase-Aktivität von Fällen mit und ohne (Kontrollen) Veränderungen in der Region 5p15.33. Die Telomerase-Aktivität ist in einer freien Einheit angegeben. Der Tumorzellgehalt der Fälle ist in Klammern genannt.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass sowohl Translokationen $t(5;14)(p15;q32)$ unter Beteiligung des *IGH*-Locus in 14q32 als auch Variantveränderungen der Chromosomenbande 5p15.33 in malignen B-Zell-Erkrankungen wiederkehrend sind. Diese Aberrationen konnten besonders in MCL und B-CLL gefunden werden. Die Ergebnisse der Bruchpunkteingrenzung der Fälle mit Translokation unter Beteiligung der *TERT-CLPTM1L*-Region in 5p15.33 deuten daraufhin, dass *TERT* und nicht *CLPTM1L* der deregulierte Translokationspartner der Veränderungen sein müsste, da *CLPTM1L* in drei der Lymphome deletiert beziehungsweise durch einen Bruchpunkt unterbrochen worden ist. Quantitative RT-PCR-Analysen konnten eine erhöhte *TERT*-Expression und TRAP-Assays eine erhöhte Telomerase Aktivität in Fällen mit Veränderungen in 5p15.33 zeigen.

4.2 Charakterisierung von Translokationen $t(14;19)$

Translokationen, bei denen der *IGH*-Locus in der Chromosomenbande 14q32 in die Nähe eines Onkogens des langen Arms von Chromosom 19 gelangt, wurden bereits verschiedentlich beschrieben [162, 163]. In dieser Arbeit sollten zwei weitere, neu identifizierte Translokationen, bei denen der *IGH*-Locus in die Nähe eines Kandidatenonkogens in 19q1 gerät, charakterisiert werden:

- 1) Mittels Bruchpunktklonierung und Expressionsanalysen sollte untersucht werden, ob *CCNE1* das deregulierte Partnergen der in einem DLBCL auftretenden Translokation $t(14;19)(q32;q12)$ ist [159] und ob Veränderungen, die die Bruchpunktregion in 19q12 betreffen, in DLBCL wiederkehrend sind.
- 2) Es sollte die Häufigkeit der Translokation $t(14;19)(q32;q13.4)$, die in einer ABC-DLBCL-Zelllinie gefunden wurde, bestimmt werden. Das *SPIB*-Gen war bereits als Translokationspartner des *IGH*-Locus bekannt [164].

4.2.1 Bruchpunktklonierung der Translokation $t(14;19)(q32;q12)$

In einem DLBCL wurde zytogenetisch eine Translokation $t(14;19)(q32;q12)$ beobachtet (Fall II-107, Anhang 5). In Vorarbeiten des Instituts für Humangenetik in Kiel wurde die Bruchpunktregion in 19q12 auf 80 kb eingegrenzt [159]. Es wurden die Kandidatengene *PLEKHF1*, *C19orf12* und *CCNE1* diskutiert. *CCNE1* kodiert für Cyclin E1, eine regulatorische

Ergebnisse

Untereinheit des Cyclin E1/Cdk2 (cyclin-dependent kinase 2)-Komplexes, der eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielt.

Um die genaue Lokalisation des Bruchpunktes zu identifizieren, wurde gemeinsam mit Dr. Takashi Akasaka (MRC Toxicology Unit / Leicester University, UK), ausgehend vom *IGH*-Locus, eine Long Distance Inverse PCR (LDI-PCR) entwickelt, die in Leicester durchgeführt wurde [165]. Die Klonierung der Translokation t(14;19)(q32;q12) ergab, dass der Bruchpunkt in der Region 19q12 etwa 60 kb zentromerisch des *CCNE1*-Gens lag und in der Region 14q32 in der Switch alpha 1 ($S\alpha 1$)-Region des *IGH*-Locus. Des Weiteren konnte die bereits in der Zytogenetik beobachtete Translokation t(8;14)(q24;q32) kloniert werden. Hier lagen die Bruchpunkte auf dem Chromosom 8 etwa 500 kb zentromerisch von *MYC* und in der Switch gamma 2 ($S\gamma 2$)-Region des *IGH*-Locus (Abbildung 28).

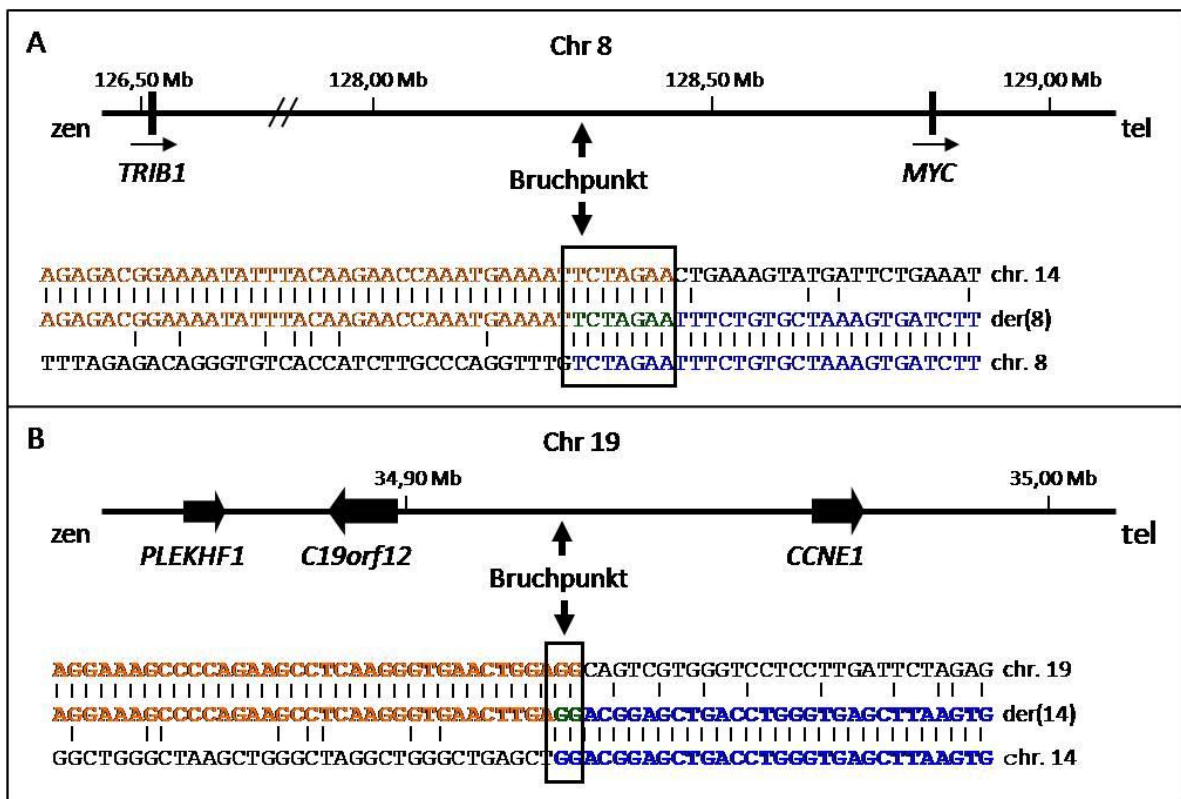


Abbildung 28: Klonierte Bruchpunkte im Fall II-107. **A)** Die Sequenz-Analyse des Bruchpunktes der Translokation t(8;14)(q24;q32) ergab, dass der Bruchpunkt in 8q24 etwa 500 kb zentromerisch des *MYC*-Gens liegt. **B)** Die Sequenz-Analyse des Bruchpunktes der Translokation t(14;19)(q32;q12) zeigt, dass der Bruchpunkt in 19q12 etwa 60 kb zentromerisch des *CCNE1*-Gens liegt.
der: derivatives Chromosom; tel: telomerisch; zen: zentromerisch

4.2.2 Expressionsanalyse von Cyclin E1 mittels Westernblot und Immunhistochemie

Um zu überprüfen, ob die Translokation t(14;19)(q32;q12), durch die *CCNE1* in die Nähe des *IGH*-Locus gerät, auch zu einer erhöhten Bildung des Cyclin E1-Proteins führt, wurde eine Westernblot-Analyse mit einem monoklonalen Cyclin E1-Antikörper der Maus durchgeführt. Verglichen wurde die Cyclin E1-Expression der Kern- und cytosolischen Lysate im t(14;19)(q32;q12)-positiven DLBCL mit vier Lymphknotenhyperplasien. Als interne Kontrolle wurde zudem ein monoklonaler Ku70-Antikörper der Maus eingesetzt. Die Westernblot-Analyse konnte eine erhöhte Cyclin E1-Expression in dem DLBCL mit Translokation t(14;19)(q32;q12) im Vergleich zu den Kontrollen zeigen (Abbildung 29A). Zur Bestätigung der erhöhten Expression von Cyclin E1 im DLBCL mit Translokation t(14;19)(q32;q12) wurde in Kooperation mit PD Dr. Wolfram Klapper (Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) eine immunhistochemische Analyse mit dem bereits im Westernblot verwendeten monoklonalen Cyclin E1-Antikörper der Maus (Novocastra) durchgeführt [166]. Die Mehrheit der Tumorzellen (50-75 %) zeigte eine starke Cyclin E1-Expression im Vergleich zu nicht-malignem lymphatischem Gewebe (Abbildung 29B).

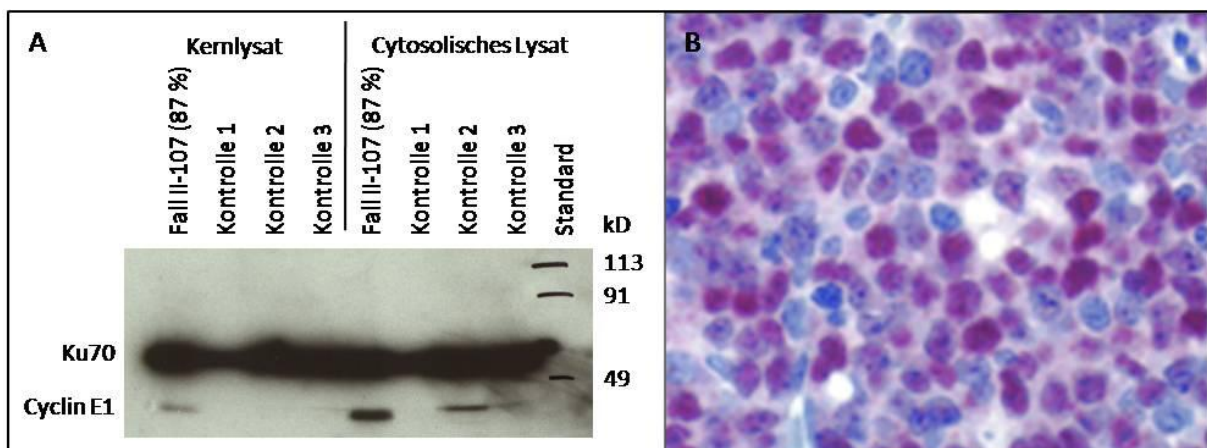


Abbildung 29: Cyclin E1-Expressionsanalyse am Fall II-107. **A)** Westernblot-Analyse mit dem Cyclin E1-Antikörper (Novocastra) und dem anti-Ku p70-Antikörper (Sigma-Aldrich) als interne Kontrolle. Cyclin E1 hat eine erwartete Größe von 47 kD, Ku70 eine von 70 kD (<http://www.uniprot.org>). **B)** Immunhistochemische Analyse mit dem Cyclin E1-Antikörper (Novocastra) an einem Knochenmark-Paraffingewebeschnitt des Falls II-107. Die violette Färbung bei der Mehrheit der Zellkerne weist die Expression von Cyclin E1 nach.

Anschließend wurde mit dem Cyclin E1-Antikörper eine immunhistochemische Färbung an einem TMA mit 67 DLBCL in Duplikaten durchgeführt. Es konnten 41 Fälle ausgewertet werden. Davon wurde in 24 Fällen (59 %) keine Cyclin E1-Expression detektiert, fünf Fälle

(12 %) zeigten eine Expression in 1-25 % der Tumorzellen, neun Fälle (22 %) in 26-50 % der Tumorzellen und drei Fälle (7 %) wiesen wie der Indexfall eine Cyclin E1-Expression in 51-75 % der Tumorzellen auf.

4.2.3 Screening von Diffus großzelligen B-Zell Lymphomen auf Aberrationen in der Region um *CCNE1* mittels FISH

Im Folgenden sollte mittels FISH-Analyse untersucht werden, ob Veränderungen in der *CCNE1*-Region in DLBCL wiederkehrend sind. Dazu wurde ein *CCNE1*-FISH-Assay mit den zur Bruchpunkteingrenzung verwendeten BAC-Klonen RP11-345J21 und RP11-17N20 etabliert (Abbildung 30). Die gemäß 3.2.10 berechnete Nachweisgrenze für einen Signalsplit zwischen den beiden Sonden war kleiner als 1 % und wurde auf einen Wert von 3 % festgelegt.

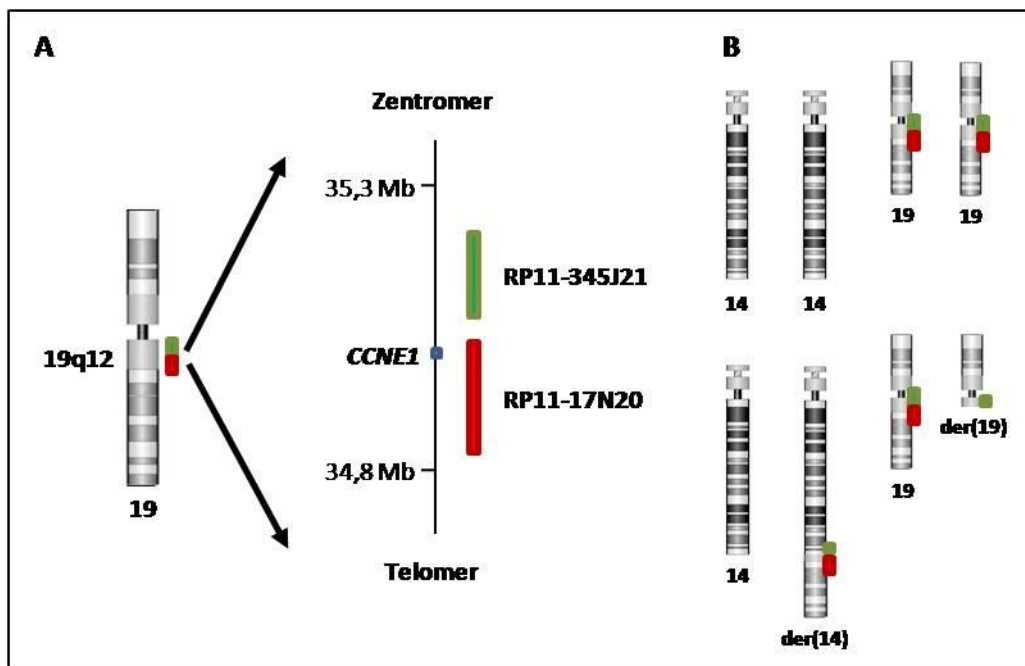


Abbildung 30: Zweifarb-FISH-Assay zur Detektion chromosomaler Aberrationen in der *CCNE1*-Region. **A)** Schematische Darstellung des *CCNE1*-FISH-Assays. Zur besseren Übersicht ist nur das *CCNE1*-Gen dargestellt. **B)** Idiogramme der an der Translokation $t(14;19)(q32;q12)$ beteiligten Chromosomen 14 und 19. Oben sind die in einer normalen Zelle vorkommenden Chromosomen 14 und 19 dargestellt, mit zwei kolokalisierten Signalen in den Regionen 19q12. Unten sind die Idiogramme der Chromosomen in einer Zelle mit Translokation $t(14;19)(q32;q12)$ gezeigt. Durch die Translokation befindet sich das rote Signal und ein Teil des grünen Signals auf dem derivativen Chromosom 14 und ein Teil des grünen Signals verbleibt auf dem derivativen Chromosom 19.
der: derivatives Chromosom

Der FISH-Assay wurde an den Fällen des TMAs angewandt, die bereits mit dem Cyclin E1-Antikörper immunhistochemisch analysiert werden konnten. Von den 41 DLBCL waren 35 mittels FISH auswertbar. Die Ergebnisse sind im Anhang 3 aufgelistet und in Tabelle 30

zusammengefasst. Keiner der Fälle wies einen Signalsplit mit dem CCNE1-FISH-Assay auf. Allerdings wurde in 10 Fällen (29 %) ein Zugewinn mit 3-6 Kopien gefunden. Fünf dieser DLBCL wiesen bei der Immunhistochemie auch eine Cyclin E1-Expression auf, darunter auch zwei der drei Fälle mit einer Cyclin E1-Expression, die mit dem Initialfall vergleichbar war.

Tabelle 30: Ergebnisse des Screenings von DLBCL mit dem CCNE1-FISH-Assay

Signalkonstellation ¹	Total	2Ko	3-4Ko	3-6Ko
Interpretation		Normal	Zugewinn	Zugewinn
Nachweisgrenze ²		-	3 %	3 %
Anzahl der DLBCL	35	25 (71,4 %)	8 (22,9 %)	2 (5,7 %)

¹Der Assay enthält die Klone RP11-17N20 (Spectrum orange) und RP11-345J21 (Spectrum green). Kolokalisation der Signale bedeutet eine Zusammenlagerung des roten und grünen Signals.

²Bei einer errechneten Nachweisgrenze unter 3 % wurde der Wert auf 3 % festgelegt.

DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell Lymphom; Ko: Kolokalisation

4.2.4 Screening von Diffus großzelligem B-Zell Lymphomen vom aktivierten B-Zell-Typ auf Aberrationen in der *SPIB*-Region mittels FISH

In der aus Tumorgewebe eines männlichen Patienten mit ABC-DLBCL etablierten Zelllinie Oci-Ly3 (Anhang 9) wurde anhand zytogenetischer Untersuchungen und „Chromosome Painting“ eine Translokation t(14;19)(q32;q13.4) festgestellt. Mittels direkter PCR wurden die Bruchpunkte dieser Translokation kloniert. Als Translokationspartner konnte das für den Transkriptionsfaktor *SPIB* kodierende Gen identifiziert werden. *SPIB* wird bekanntlich in ABC-DLBCL überexprimiert [167]. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe wurden 30 Lymphome mit Strukturveränderungen in den Chromosomenregionen 19q und 19p (die Arme dieses Chromosoms sind zytogenetisch oft schwer zu unterscheiden) sowie elf ABC-DLBCL auf Aberrationen der *SPIB*-Region untersucht. Es konnte kein weiteres Fall mit Bruchereignis in diesem Locus identifiziert werden.

Um eine bessere Aussage über die Häufigkeit der t(14;19) und anderer Veränderungen in 19q13.4 innerhalb der *SPIB*-Region treffen zu können, sollte das Screening von primären ABC-DLBCL ausgeweitet werden. Hierfür wurde der bereits etablierte *SPIB*-Dreifarb-FISH-Assay verwendet (Abbildung 31A). Von einem Bruchereignis wurde ausgegangen, wenn der Abstand zwischen der Spectrum orange- und Spectrum green-markierten Sonde mehr als einen Signaldurchmesser betrug. Die Nachweisgrenze für diese Signalkonstellation betrug 4,4 %.

Mit dem Assay wurden zwei TMAs mit ABC-DLBCL untersucht. TMA 1 enthielt 40 Fälle in Duplikaten. In 33 Fällen konnten mindestens 50 Kerne ausgewertet werden. TMA 2 enthielt 37 Fälle mit jeweils fünf Dots, wobei in 32 Fällen mindestens 50 Kerne ausgewertet werden konnten. Die Ergebnisse des Screenings sind im Anhang 4 aufgeführt und in Tabelle 31 zusammengefasst. In einem Fall (II-108, Anhang 5) konnte in 31 % der Kerne ein Bruch innerhalb der *SPIB*-Region identifiziert werden, wobei der DEAC-markierte Klon RP11-45F3 mit dem Spectrum orange-markierten Klon RP11-1051H12 kolokalisierte (Abbildung 31B). In 27 Fällen (41,5 %) wurden kleine Zugewinne von 3-6 Kolokalisationen des *SPIB*-Dreifarb-FISH-Assays gefunden.

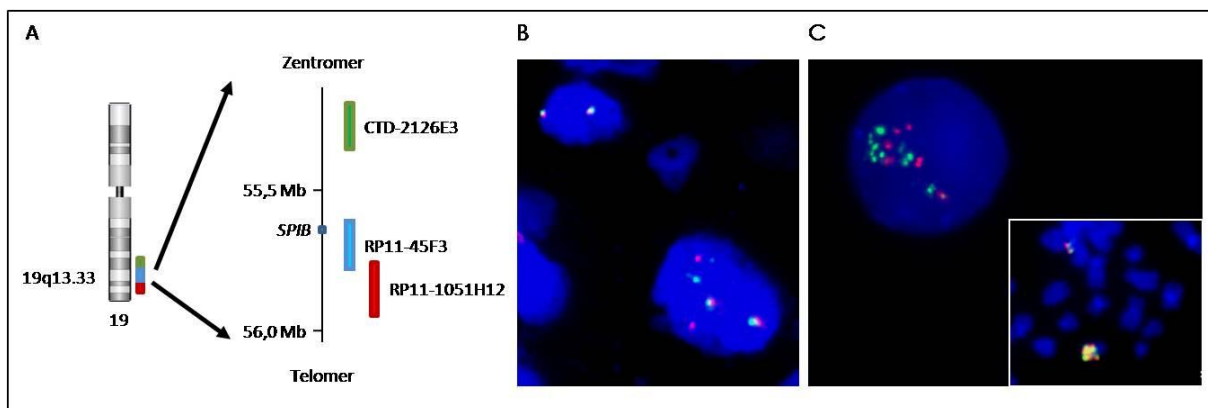


Abbildung 31: Dreifarb-FISH-Assay zur Detektion von Veränderungen in der *SPIB*-Region. **A)** Schematische Darstellung des Assays. Zur besseren Übersicht ist nur das *SPIB*-Gen dargestellt. **B)** Zwei Interphase-Zellkerne des Falls II-108. Der untere Zellkern zeigt zwei Kolokalisationen, zwei rote Signale und ein grünes Signal und damit einen Bruch in der *SPIB*-Region. Der obere Zellkern weist dagegen eine normale Signalkonstellation mit zwei Kolokalisationen auf. Auf eine Darstellung der blauen DEAC-Signale wurde verzichtet, um Kernmorphologie mit Hilfe der DAPI-Färbung zu zeigen. **C)** Ein Interphase-Zellkern des Falls II-109 mit HSR-Amplifikation in der *SPIB*-Region sowie einer normalen Kolokalisation. Unten rechts ist ein Ausschnitt einer Metaphase des Falls mit HSR-Chromosom zu sehen. Auch hier wurde für eine bessere Darstellung der Kernmorphologie auf eine Darstellung der DEAC-Signale verzichtet.
HSR: Homogenously staining region

Tabelle 31: Ergebnisse des Screenings von ABC-DLBCL mit dem *SPIB*-Dreifarb-FISH-Assay

Signalkonstellation ¹	Total	1 Ko	2 Ko	> 3-6 Ko	1Ko + 1 Split
Interpretation		Deletion ²	Normal	Zugewinn	Bruch
Nachweisgrenze [%]		15,3 %	-	5,6 %	4,4 %
Anzahl der ABC-DLBCL	65	16 (24,6 %)	21 (32,3 %)	27 (41,5 %)	1 (1,5 %)

¹Der Assay enthält die markierten BAC-Klone CTD-2126E3 (Spectrum green), RP11-45F3 (DEAC) und RP11-1051H12 (Spectrum orange). Kolokalisation der Signale bedeutet eine Zusammenlagerung des grünen (CTD-2126E3), blauen (RP11-45F3) und roten (RP11-1051H12) Signals. Bei einem Signalsplit dissoziieren Signale des Assays auseinander. Der Bruch kann zwischen dem grünen und dem blauen, dem blauen und dem roten oder innerhalb des blauen Signals vorliegen. In dem hier aufgeführten Fall mit Signalsplit hat der Bruch zwischen dem blauen und dem grünen Signal stattgefunden.

²Es handelt sich hier bei der Mehrheit der ABC-DLBCL wahrscheinlich um falsch-positive Deletionen, die durch angeschnittene Kerne zustande gekommen sind.

ABC-DLBCL: Diffus großzellige B-Zell Lymphome vom aktivierten B-Zell-Typ; Ko: Kolokalisation

In der Routinediagnostik ist ein weiteres, nicht näher klassifiziertes malignes Non-Hodgkin Lymphom mit einer zytogenetischen Triplikation im langen Arm von Chromosom 19 aufgefallen (Fall II-109, Anhang 5). Bei diesem Fall waren die Hybridisierungsmuster der Sonden der in der Chromosomenbande 19q1 liegenden Gene *BCL3* und *CCNE1* normal. Mit dem SPIB-Dreifarb-FISH-Assay wurden 100 Zellkerne ausgewertet. In 34 % der Nuclei konnte eine 4-5-fache HSR-Amplifikation identifiziert werden (Abbildung 31C). Alle drei Sonden, RP11-1051H12, RP11-45F3 und CTD-2126E3, waren vervielfältigt.

Zusammenfassend konnte mittels Westernblot-Analyse und Immunhistochemie gezeigt werden, dass *CCNE1* durch die Translokation t(14;19)(q32;q12) im DLBCL überexprimiert wird. *CCNE1* stellt somit ein neues Onkogen in lymphatischen Neoplasien dar. Der Translokationsbruchpunkt liegt in der Region 19q12 etwa 60 kb zentromerisch des *CCNE1*-Gens und in der Region 14q32 in der S α 1-Region des *IGH*-Locus. Ein weiteres DLBCL mit Bruchereignis in der Region 19q12 um *CCNE1* konnte nicht identifiziert werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass variante Aberrationen der t(14;19)(q32;q13.4) in Form eines Bruchereignisses oder einer Amplifikation in der Region 19q13.4 um das *SPIB*-Gen rekurrent auftretende Veränderungen in ABC-DLBCL sind. Insbesondere konnten in 41,5 % der untersuchten ABC-DLBCL Zugewinne der *SPIB*-Region identifiziert werden.

4.3 Charakterisierung der Deletion del(14)(q24q32)

Um die pathophysiologische Bedeutung von Deletionen im langen Arm von Chromosom 14 in lymphatischen Neoplasien besser verstehen zu können, sollte mit Hilfe von FISH- und Array-CGH-Analysen untersucht werden, ob wiederkehrende Bruchpunkte auf dem Chromosom 14 in Leukämien und Lymphomen mit Deletionen del(14)(q2) existieren und wie häufig diese vorkommen. Im Falle rekurrenter Bruchpunkte war es das Ziel diese genauer kartieren und so potentielle tumorassoziierte Gene dieser Aberrationen zu identifizieren. Eine mögliche Rolle der Kandidatengene in der Tumorgenese sollte mittels molekulargenetischer und proteinanalytischer Verfahren überprüft werden.

4.3.1 Identifizierung der del(14)(q24q32) mittels Array-CGH

Im Rahmen der zytogenetischen Diagnostik des Instituts für Humangenetik in Kiel konnten wiederkehrende Deletionen des langen Arms von Chromosom 14, ausgehend von der Bande 14q2 bis zum q-terminalen Ende des Chromosoms, beobachtet werden. Zudem werden viele B-Zell-Neoplasien routinemäßig mittels FISH-Analyse mit der LSI IGH Dual Color, Break Apart-Probe (Abbott/Vysis) auf Translokationen mit Beteiligung des *IGH*-Locus getestet (Abbildung 32A). Dabei wurden Verluste des zentromerischen Signals (LSI IGH flankierend) des *IGH*-FISH-Assays in fünf Fällen mit zytogenetisch sichtbarer Deletion del(14)(q2) identifiziert (Abbildung 32B+C).

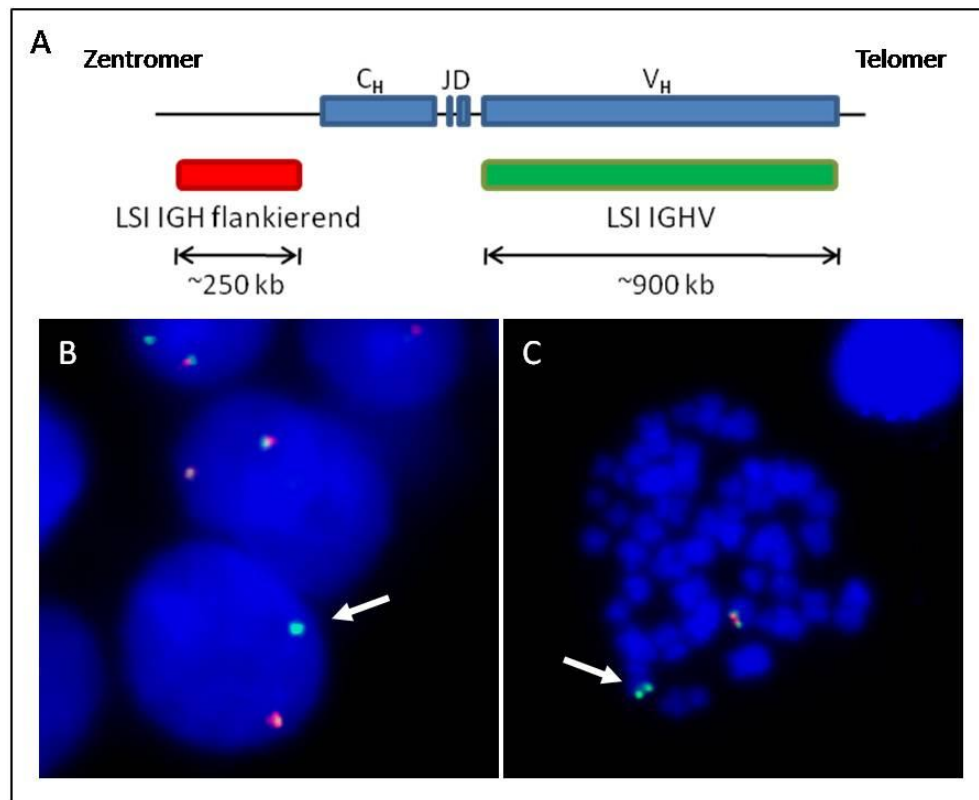


Abbildung 32: Zweifarb-FISH mit der LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe. A) Schematische Darstellung des Assays. Die grüne Sonde überspannt die variable Region, die rote Sonde flankiert den *IGH*-Locus zentromerisch. B) Interphase-Zellkerne des Falls III-3. Der obere vollständig dargestellte Kern zeigt die normale Signal-Konstellation. Der untere Kern weist einen Verlust des roten, proximalen Signals auf (Pfeil). C) Aberrante Metaphase des III-3, bei der ebenfalls das rote Signal deletiert ist (Pfeil).
C_H: constant segments heavy chain; D: Diversity; J: Joining-Segment; LSI: locus specific identifiers; V_H: variable region heavy chain

Um festzustellen, welche Regionen des Chromosoms 14 deletiert sind und ob die Bruchpunkte die gleiche Region betreffen (Bruchpunktcluster), sollten die Deletionen genauer kartiert werden. Dazu wurde an den Fällen mit Verlust des proximalen *IGH*-Signals und zytogenetischer Deletion del(14)(q21~24q32) (Fälle III-8, III-9, III-14, III-18 und III-20) sowie an einem Fall (Fall III-11) mit Verlust des proximalen *IGH*-Signals, aber unauffälligem Karyotyp, eine Array-CGH-Analyse mit dem Human Genome CGH Microarray 44A (Agilent) durchgeführt. Der durch die FISH-Diagnostik bekannte Tumorzellgehalt der fünf erstgenannten Fälle variierte zwischen 60 % und 90 %. Der Tumorzellgehalt des Falls III-11 betrug nur 40 %, was bei der Auswertung der Array-CGH-Ergebnisse berücksichtigt werden musste. Die Array-CGH ergab, dass in allen sechs Fällen die gleiche Bruchpunktregion betroffen war (Abbildung 33A+B). Die zentromerischen Bruchpunkte ließen sich in der Chromosomenbande 14q24 auf eine Region von 87 kb, zwischen 68,324 Mb und 68,411 Mb eingrenzen. Die telomerischen Bruchpunkte in 14q32 betrafen im Einklang mit den FISH-Befunden den *IGH*-Locus.

Zur Bestätigung der Array-CGH-Ergebnisse für die Region 14q24 wurde eine FISH-Analyse an den sechs Fällen mit zwei für diesen Zweck hergestellten FISH-Assays durchgeführt. Als Kontrollsonde wurde der BAC-Klon RP11-447G18 aus der Chromosomenregion 14q11 ausgewählt. Der zentromerische Beginn der Deletion sollte mit den BAC-Klonen RP11-1031O11 und RP11-45K7 bestätigt werden. Die BAC-Klone wurden an Metaphasen von Zellen aus peripherem Blut von Probanden mit normalem Karyotyp auf deren richtige Lokalisation und Spezifität getestet. In Übereinstimmung mit den Array-CGH-Ergebnissen zeigte der Klon RP11-1031O11 ein stark reduziertes, der Klon RP11-45K7 hingegen kein Signal auf dem derivativen Chromosom 14 (Abbildung 33C). Folglich konnten die Array-CGH-Ergebnisse und damit das Cluster der Deletionsbruchpunkte in den sechs Fällen bestätigt werden.

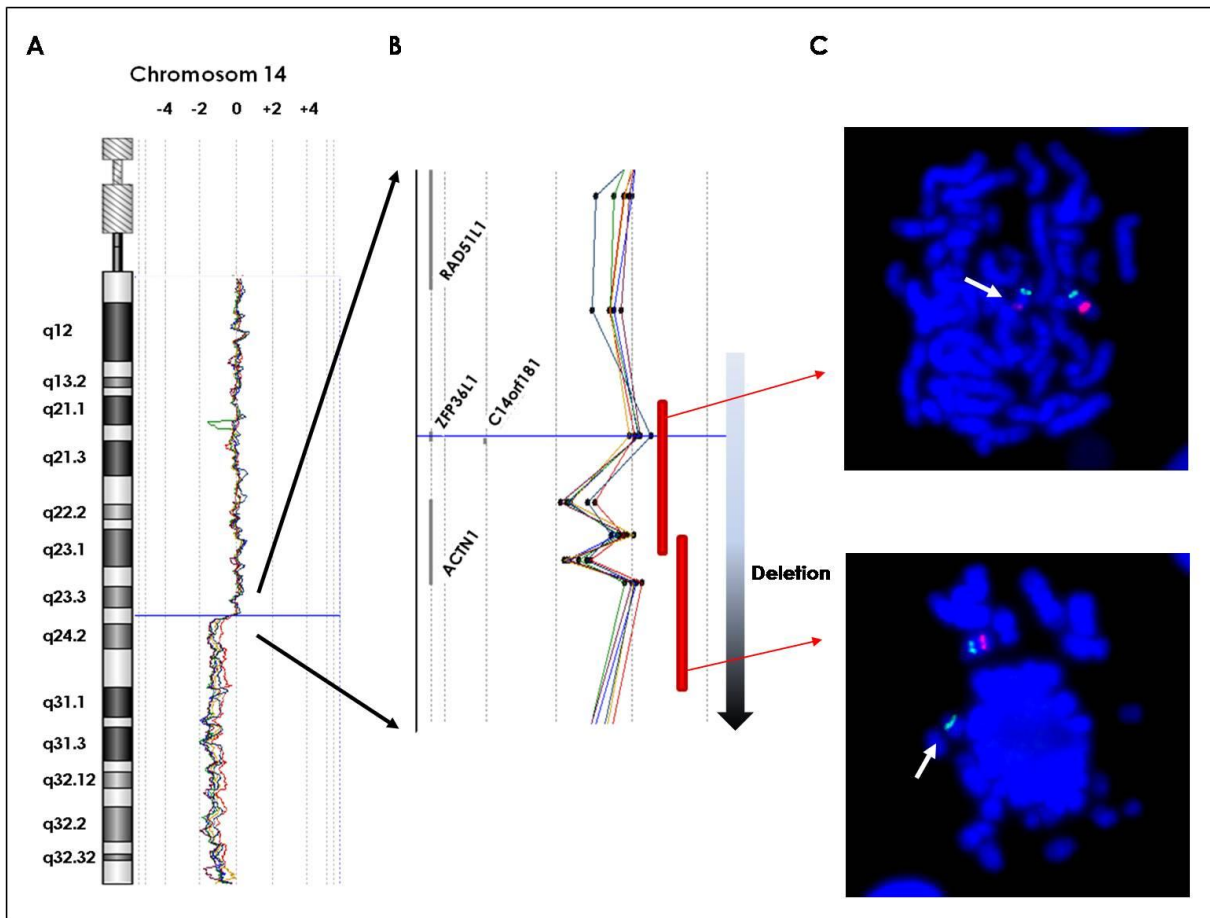


Abbildung 33: Array-CGH mit dem Human Genome CGH Microarray 44A (Agilent) an sechs Fällen (III-8, III-9, III-11, III-14, III-18 und III-20) mit Verlust des proximalen Signals der LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe der FISH. **A)** Dargestellt ist das Profil der genomischen Imbalancen der sechs Fälle auf Chromosom 14 von p-terminal (oben) nach q-terminal (unten), wobei jede der farbigen Linien einem Fall entspricht. Die blaue horizontale Linie entspricht dem Zentrum des vergrößerten Bereiches. Der Wert 0 entspricht einem balancierten Chromosomenstatus. Negative Werte bedeuten chromosomale Verluste, positive Werte bedeuten chromosomale Zugewinne. **B)** Vergrößerte Darstellung der Bruchpunktregion der Deletion in 14q24. Die in dieser Region annotierten Gene sind in Form von grauen Linien angezeigt. Jeder schwarze Punkt stellt ein Oligonukleotid dar. Die roten Balken entsprechen der Lokalisation der zur Bestätigung der Array-CGH verwendeten BAC-Klone für die FISH-Analyse. Die Pfeile zeigen auf die jeweilige FISH-Hybridisierung. **C)** FISH an Metaphasen des Falls III-20 zur Bestätigung der Array-CGH-Ergebnisse. Der Spectrum green-markierte BAC-Klon RP11-447G18 bindet in der Region 14q11 und dient als Kontrolle. Die obere Metaphase ist mit dem Spectrum orange-markierten BAC-Klon RP11-1031O11 hybridisiert. Das Signal ist auf einem Chromosom 14 reduziert (Pfeil). Die untere Metaphase ist mit dem Spectrum orange-markierten BAC-Klon RP11-45K7 hybridisiert. Das Signal ist auf einem Chromosom deletiert (Pfeil).

4.3.2 Eingrenzung der Bruchpunktregion in 14q24 mittels FISH

Da der *IGH*-Locus ein bekannter Onkogen-Aktivator ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein pathophysiologisch wirksames Gen durch die Deletion im langen Arm von Chromosom 14 in die Nähe der *IGH*-Enhancer gerät und dadurch aktiviert werden könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Bruchpunktregion in 14q24 mittels FISH in den sechs Fällen mit Deletion $\text{del}(14)(\text{q}24\text{q}32)$ weiter eingegrenzt. Neben vier weiteren BAC-

Klonen, deren Inserts gewöhnlich eine Größe von 150-350 kb besitzen, wurden auch sechs Fosmid-Klone mit einer Größe von ca. 40 kb verwendet, die eine bessere Kartierung ermöglichen. Anfangs wurde der Klon RP11-447G18 in der Region 14q11 als interne Kontrollsonde eingesetzt. Später wurden auch BAC-Klone aus der Nähe der Bruchpunktregion als Kontrolle verwendet, bei denen das Vorhandensein zweier Kopien in den sechs Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) bereits bekannt war. Alle eingesetzten Klone zeigten bei der Überprüfung an Metaphasen von Zellen aus peripherem Blut von Probanden mit normalem Karyotyp die richtige Lokalisation und Spezifität. Die Ergebnisse der Bruchpunkteingrenzung sind in Abbildung 34 dargestellt. In allen sechs Fällen detektierten die BAC-Klone RP11-960B20 und RP11-65A20 und die Fosmid-Klone WI2-2202H16, WI2-2559E18 und WI2-697I16 in der FISH heterozygote Deletionen, die Fosmid-Klone WI2-1549F1 und WI2-1852O14 zeigten zwei regelrechte Signale und der BAC-Klon RP11-179B8 und der Fosmid-Klon WI2-2822O2 wiesen jeweils neben einem normalen Signal ein reduziertes Signal nach. Der Fall III-14 zeigte subklonal in etwa 10 % der Tumorzellen eine Amplifikation des BAC-Klons RP11-179B8 und der Fosmid-Klone WI2-1549F1, WI2-1852O14 und WI2-2822O2.

Die zentromerische Bruchpunktregion der Deletion del(14)(q24q32) in den sechs Fällen konnte somit auf die Region zwischen 68,315 Mb und 68,340 Mb mit einer Größe von 25 kb eingegrenzt werden. In dieser Region liegt das Early Response Gen *ZFP36L1* (Zinc finger protein 36-like 1), das durch posttranskriptionellen mRNA-Abbau eine Rolle bei der Kontrolle der Genexpression spielt [168]. Das Gen *RAD51L1* liegt zentromerisch der Bruchpunktregion in 14q24. Das von ihm kodierte Protein ist beteiligt an der homologen Rekombination nach DNA-Doppelstrangbrüchen [169]. *ACTN1* liegt den FISH-Ergebnissen zufolge, wie etwa 450 weitere Gene, innerhalb der deletierten Region.

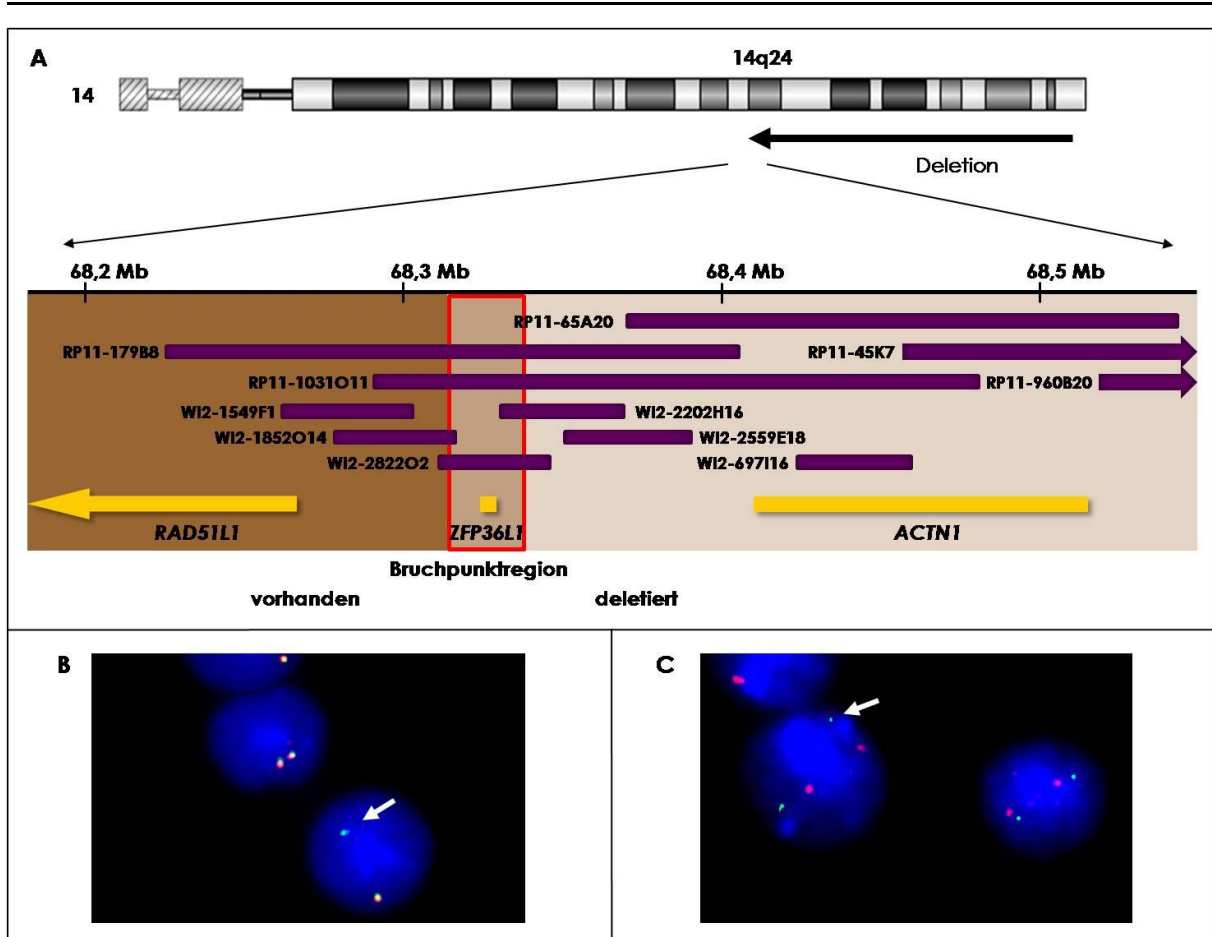


Abbildung 34: Bruchpunkteingrenzung in sechs Fällen (III-8, III-9, III-11, III-14, III-18 und III-20) mit Deletion $\text{del}(14)(\text{q}24\text{q}32)$ in der Region 14q24 mittels FISH. **A)** Schematische Darstellung der Lage der eingesetzten Klone. Die violetten Balken stellen die verwendeten BAC (RP11-*)- und Fosmid (WI2-*)-Klone dar. Die nicht deletierte Region ist dunkelbraun und die deletierte hellbraun unterlegt. Klone, die in beide Regionen reichen, zeigten reduzierte Signale. Die erwartete Bruchpunktregion ist rot umrandet. Gene sind in gelb dargestellt. Das Gen *RAD51L1* und die BAC-Klone RP11-45K7 und RP11-960B20 sind unvollständig abgebildet, was durch die Pfeile zum Ausdruck kommt. **B)** Zwei Interphasezellkerne des Falls III-18, die mit dem BAC-Klon RP11-179B8 in Spectrum green und mit dem Fosmid-Klon WI2-2202H16 in Spectrum orange hybridisiert worden sind. Der obere Zellkern zeigt eine normale Signalkonstellation mit zwei Kolokalisationen, die untere Interphase zeigt neben der Kolokalisation eine Deletion des roten Signals und ein reduziertes grünes Signal (Pfeil). **C)** Zwei mit dem BAC-Klon RP11-447G18 (Spectrum orange) und dem Fosmid-Klon WI2-282O2 (Spectrum green) markierte Interphasezellkerne des Falls III-9. RP11-447G18 hybridisiert in der Chromosomenregion 14q11. Der rechte Zellkern zeigt mit zwei roten und zwei grünen Signalen eine normale Signalkonstellation. Der linke Zellkern zeigt neben zwei roten und einem grünen Signal ein reduziertes grünes Signal (Pfeil).

4.3.3 Screening von Lymphomen und Leukämien auf Aberrationen in der Region 14q24 um *ZFP36L1* mittels FISH

4.3.3.1 Screening mit dem *ZFP36L1*-Assay 1

Um die Häufigkeit des Auftretens von Deletionen $\text{del}(14)(\text{q}24\text{q}32)$ abschätzen zu können, wurde ein Screening von Lymphomen und Leukämien mittels Interphase-FISH durchgeführt. Für dieses Screening wurden 73 Fälle mit einer zytogenetischen Veränderung (del (Deletion))

oder add (addition of unknown material)) in der Region 14q2 ausgewählt und 19 Fälle mit einem wie in Abbildung 32 beschriebenen Verlust des proximalen *IGH*-Signals sowie einem unbekanntem oder normalen Karyotyp. Jeder dieser Fälle wurde mit dem in Abbildung 35 beschriebenen, eigens etablierten ZFP36L1-Assay 1 untersucht. Der Assay besteht aus dem Spectrum orange-markierten BAC-Klon RP11-179B8, der das *ZFP36L1*-Gen überspannt und in Fällen mit der gesuchten Deletion reduziert ist sowie dem Spectrum green-markierten Klon RP11-65A20, der in diesen Fällen deletiert ist. Die wie in Abschnitt 3.2.10 berechnete Nachweisgrenze des Assays, bezogen auf eine geringere Kopienzahl von RP11-65A20 gegenüber RP11-179B8, betrug 0 % und wurde auf den Wert 3 % festgelegt.

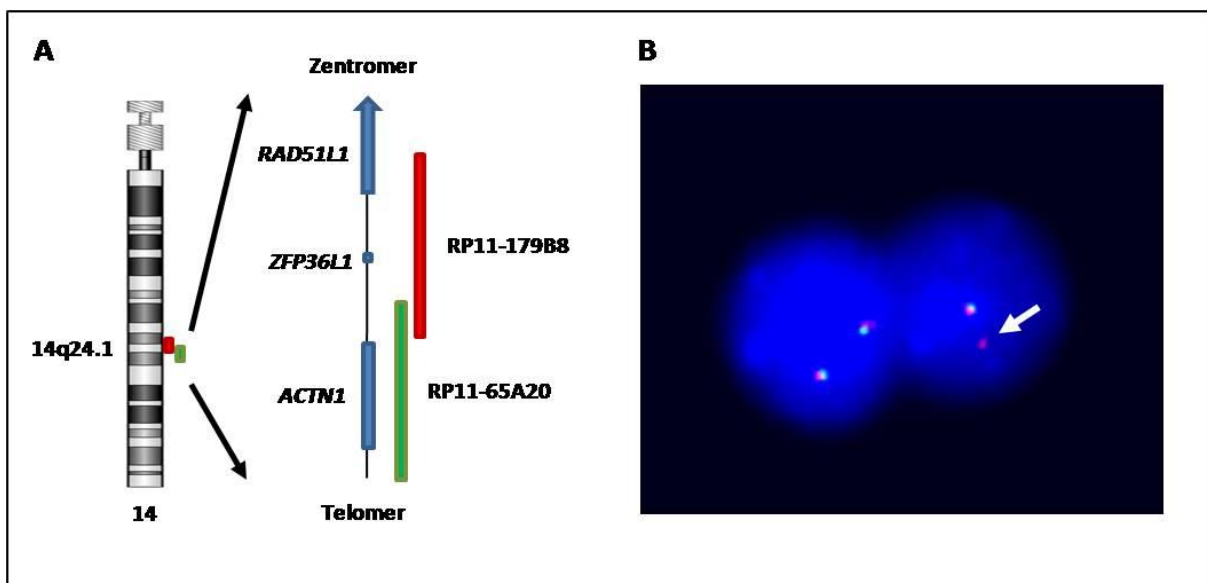


Abbildung 35: Zweifarb-FISH mit dem ZFP36L1-Assay 1. **A)** Schematische Darstellung des Assays. **B)** Zwei Interphasen des Falls III-6. Der linke Zellkern zeigt eine normale Signalkonstellation mit zwei Kolokalisationen. Der rechte Zellkern weist eine für dieses Screening positive Signalkonstellation auf: Der Spectrum orange-markierte BAC-Klon RP11-179B8 zeigt ein reduziertes Signal (Pfeil). Der Spectrum green-markierte BAC-Klon RP11-65A20 ist deletiert. Außerdem ist eine Kolokalisation der BAC-Klone des normalen Chromosoms 14 zu sehen.

Soweit nicht bereits in der Routinediagnostik geschehen, wurde das gleiche Patientenmaterial zusätzlich mit der LSI *IGH* Dual Color, Break Apart-Probe auf einen Verlust des proximalen *IGH*-Signals getestet. Mit beiden Assays wurden je Hybridisierung in der Regel 100 Zellkerne ausgewertet. Die Ergebnisse des Screenings sind im Anhang 6 aufgelistet und in Abbildung 36 und Tabelle 32 zusammengefasst.

Unter den 19 Fällen mit Verlust des proximalen *IGH*-Signals (*IGH* proximal < *IGH* distal) zeigten zwölf mit dem ZFP36L1-Assay 1 eine Deletion des BAC-Klons RP11-65A20 bei

Vorhandensein von RP11-179B8, was im Folgenden als „positives Signalmuster“ bezeichnet wird. Von den 73 Fällen mit zytogenetischer Veränderung in der Region 14q2 wiesen 28 Fälle einen Verlust des proximalen *IGH*-Signals auf, von denen 27 mit dem ZFP36L1-Assay 1 positiv waren und nur ein Fall für das Signalmuster negativ war. Die übrigen 45 Fälle mit zytogenetischen Veränderungen in der Region 14q zeigten keinen Verlust des proximalen *IGH*-Signals und nur einer dieser Fälle war mit dem ZFP36L1-Assay 1 positiv. Zusammenfassend konnten durch das Screening 40 weitere Fälle mit Deletionsbruchpunkt in der *ZFP36L1*-Region identifiziert werden, von denen 39 auch einen Verlust des proximalen *IGH*-Signals aufwiesen. Die Gesamtanzahl der Fälle mit Bruch in der Region 14q24 erhöhte sich somit auf 46. Bei 33 dieser Fälle handelt es sich um B-CLL.

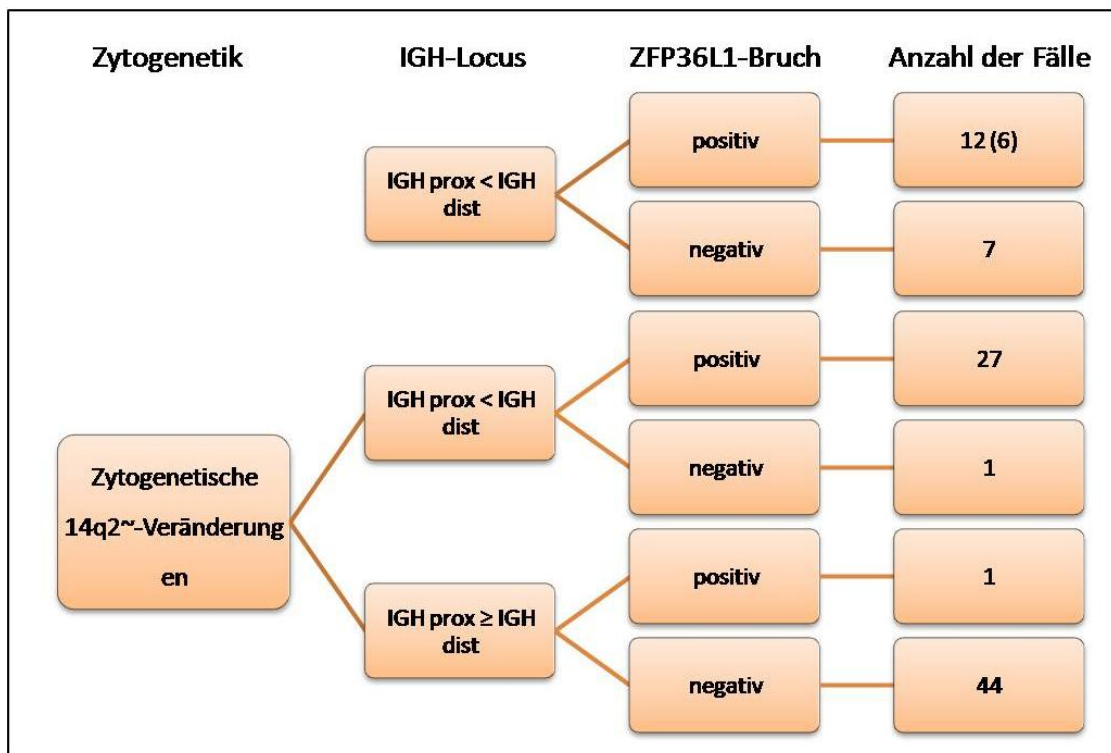


Abbildung 36: Zusammenfassung des Screenings von Lymphomen und Leukämien auf Aberrationen in der Region 14q24 um *ZFP36L1* mit dem ZFP36L1-Assay 1. Die sechs mittels Array-CGH untersuchten Fälle sind in Klammern eingeschlossen. Der obere Teil der Fälle wurde dem Screening unterzogen, da sie das in Abbildung 32 beschriebene Signalmuster mit der LSI *IGH* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Anzahl Signale *IGH* prox < *IGH* dist) zeigten. Der untere Teil der Fälle wies bei zytogenetischen Untersuchungen eine Veränderung in der Region 14q2 auf und wurde aus diesem Grund auf Aberrationen in der *ZFP36L1*-Region getestet. Fälle, die das in Abbildung 35B dargestellte Signalmuster mit Deletion des Klons RP11-65A20 bei Vorhandensein des Klons RP11-179B8 zeigten, wurden als ZFP36L1-Bruch positiv bezeichnet.

Da ein potentielles Kandidatenonkogen in der Region 14q24 auch durch andere Loci als den *IGH*-Locus aktiviert werden könnte, wurde ein Screening von 22 Lymphomen und Leukämien

Ergebnisse

mit zytogenetisch sichtbaren Translokationen unter Beteiligung der Region 14q2 auf Translokationen in der *ZFP36L1*-Region gescreent, ohne den *IGH*-Locus zu berücksichtigen. Dabei wurden ebenfalls je untersuchtem Fall 100 Zellkerne mit dem in Abbildung 35A beschriebenen ZFP36L1-Assay 1 ausgewertet. Es zeigte jedoch keiner der untersuchten Fälle einen Signalsplit. Die Ergebnisse des gesamten Screenings auf Aberrationen in ZFP36L1 mit dem ZFP36L1-Assay 1 sind im Anhang 6 aufgelistet und in Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32: Zusammenfassung des FISH-Screenings von Lymphomen und Leukämien mit dem ZFP36L1-Assay 1

Signalkonstellation ¹	Total	1 Ko + 1 rot	1 Ko	2 Ko	3-4 Ko	Komplex
Interpretation		Bruch	Deletion	Normal	Zugewinn	Komplex
Nachweisgrenze ²		3 %	3 %	-	3 %	3 %
Anzahl der Fälle - Zytogenetik: add14q2 + del14q2	73	28 (38,4 %)	18 (24,7 %)	20 (27,4 %)	5 (6,8 %)	2 (2,7 %)
Anzahl der Fälle – FISH: Anzahl der Signale IGH prox < IGH dist	19	12 (63,1 %)	2 (10,5 %)	4 (21,1 %)	0	1 (5,3 %)
Anzahl der Fälle – Zytogenetik: t(14)(q2)	22	0	1 (4,5 %)	14 (63,6 %)	7 (31,8 %)	0
Gesamtanzahl	114	40	21	38	12	3

¹Der Assay besteht aus den BAC-Klonen RP11-65A20 (Spectrum green) und RP11-179B8 (Spectrum orange). Kolokalisation der Signale bedeutet eine Zusammenlagerung des grünen und roten Signals. Bei einer komplexen Signalkonstellation liegen verschiedene Tumorsubklone und dabei z.T. sowohl Zugewinne als auch Verluste vor.

²Bei einer errechneten Nachweisgrenze unter 3 % wurde der Wert auf 3 % festgelegt.

add: addition of unknown material; del: Deletion; dist: distal; Ko: Kolokalisation; prox: proximal; trans: Translokation

4.3.3.2 Screening mit dem ZFP36L1-Assay 2

Mit dem ZFP36L1-Assay 1 können nur Deletionsbruchpunkte detektiert werden, die in der ca. 300 kb großen, ZFP36L1-überspannenden Region der BAC-Klone RP11-179B8 und RP11-65A20 liegen. Mit einem weiteren FISH-Assay sollte untersucht werden, ob Deletionsbruchpunkte in einer größeren Umgebung von *ZFP36L1* liegen, die mit dem ZFP36L1-Assay 1 nicht erfasst werden konnten. Das Screening wurde an Fällen durchgeführt, die mit der LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe einen Verlust des proximalen Signals zeigten, aber keine positive Signalkonstellation des ZFP36L1-Assays 1 aufwiesen (n = 4). Zudem wurden Fälle einbezogen, die mit dem ZFP36L1-Assays 1 nur eine Kolokalisation zeigten (n = 10). In diesen Fällen konnten demnach Deletionen im langen Arm von Chromosom 14 gezeigt werden, die Bruchpunkte liegen jedoch außerhalb der mittels ZFP36L1-Assay 1 detektierbaren Region. Der für das Screening neu etablierte, als ZFP36L1-Assay 2 bezeichnete FISH-Assay ist in Abbildung 37A dargestellt. Der Spectrum green-

markierte BAC-Klon RP11-977G1 liegt ca. 1,2 Mb zentromerisch und der Spectrum orange-markierte BAC-Klon RP11-195B2 ca. 1,2 Mb telomerisch des *ZFP36L1*-Gens. Beide Klone zeigten an Metaphasen von Zellen aus peripherem Blut von Probanden mit normalem Karyotyp die gewünschte Lokalisation und Spezifität. Der Abstand beider verwendeter BAC-Klone beträgt etwa 2,4 Mb, weshalb ein Signalabstand von bis zu drei Signaldurchmessern noch als Kolo-kalisation interpretiert wurde. Die gemäß Abschnitt 3.2.10 berechnete Nachweisgrenze für ein Bruchereignis betrug unter diesen Bedingungen 7,8 %. Je Hybridisierung wurden in der Regel 100 Zellkerne ausgewertet. Die Ergebnisse des Screenings sind im Anhang 6 aufgelistet und in Tabelle 33 zusammengefasst. Es konnten in zwei Fällen mit zwei Kolo-kalisationen und elf Fällen mit einer Kolo-kalisation keine Bruchereignisse in der untersuchten Region beobachtet werden. Der Fall III-47, der mit dem *ZFP36L1*-Assay 1 ebenfalls nur eine Kolo-kalisation aufwies, zeigte neben einer Kolo-kalisation einen Signalsplit, was auf ein Translokationsereignis mit einer daran gekoppelten Deletion hinwies (Abbildung 37B). Ein Deletions-/Translokationsbruchpunkt muss sich zwischen RP11-977G1 und RP11-179B8 befinden und ein weiterer zwischen RP11-65A20 und RP11-195B2. Dr. Lana Harder aus dem Institut für Humangenetik in Kiel konnte in diesem Fall zytogenetisch eine Translokation mit assoziierter Deletion [t(13;14)(q14;q24)del(14)(q24.1q24.2)] feststellen.

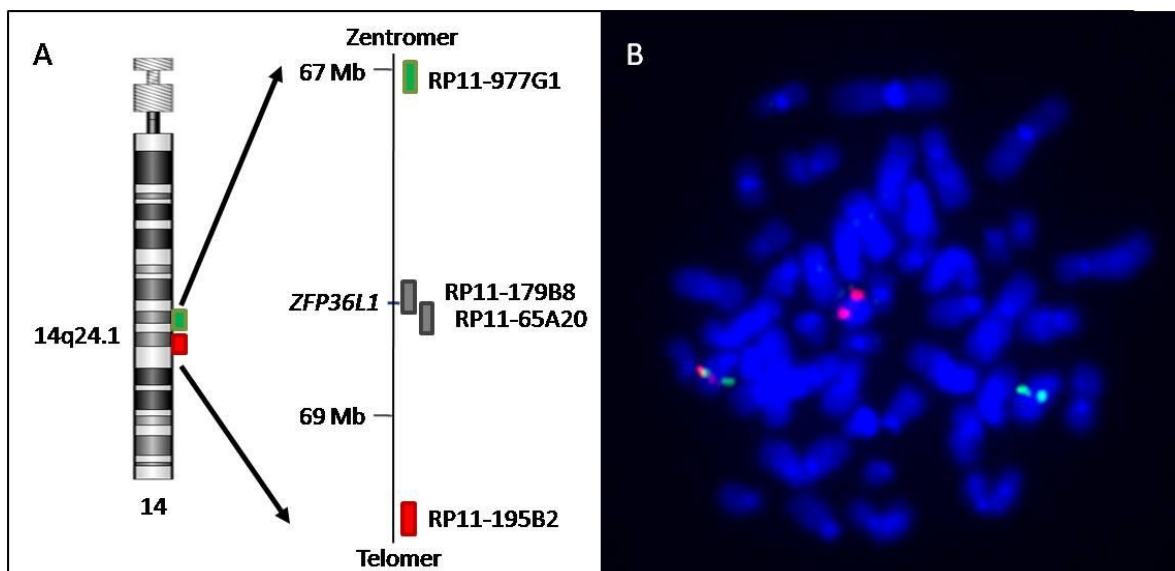


Abbildung 37: Zweifarb-FISH mit dem *ZFP36L1*-Assay 2. **A)** Schematische Darstellung des Assays. Die im *ZFP36L1*-Assay 1 verwendeten BAC-Klone RP11-179B8 und RP11-65A20 sind ebenfalls dargestellt, sind in diesem Assay jedoch nicht enthalten. Zur besseren Übersicht ist nur die Lage des *ZFP36L1*-Gens abgebildet. **B)** Metaphase des Falls III-47 mit Signalsplit zwischen den Klonen RP11-977G1 und RP11-195B2. Das isolierte grüne Signal hybridisiert auf dem derivativen Chromosom 14 und das isolierte rote Signal auf einem derivativen Chromosom 13.

Tabelle 33: Zusammenfassung des FISH-Screenings mit dem ZFP36L1-Assay 2

Signalkonstellation ¹	Total	1 Ko	2 Ko	1 Ko + 1 grün	1 Ko + 1 Split
Interpretation		Deletion	Normal	Bruch	Bruch
Nachweisgrenze ²		3,2 %	-	3 %	7,8 %
Anzahl der Fälle - ZFP36L1-Assay 1: 1Ko	10	7	0	2	1
Anzahl der Fälle – FISH:					
Anzahl der Signale IGH prox < IGH dist	4	3	1	0	0
Gesamtanzahl	14	10	1	2	1

¹Der Assay enthält die BAC-Klone RP11-195B2 (Spectrum orange) und RP11-977G1 (Spectrum green). Kolokalisation der Signale bedeutet eine Zusammenlagerung des roten und grünen Signals. Bei einem Signalsplit dissoziieren die Signale des Assays auseinander.

²Bei einer errechneten Nachweisgrenze unter 3 % wurde der Wert auf 3 % festgelegt.
dist: distal; Ko: Kolokalisation; prox: proximal

4.3.4 Bruchpunktklonierung der Deletion del(14)(q24q32)

Um eine mögliche Rolle der Deletion del(14)(q24q32) in der Tumorgenese und deren molekulare Mechanismen besser verstehen zu können, sollte eine Klonierung der Bruchpunkte dieser Deletionen mittels PCR durchgeführt werden. Ziel war es zu klären, ob die Bruchpunkte im *ZFP36L1*-Gen liegen oder proximal beziehungsweise distal des Gens. Auch die genaue Lage der telomerischen Bruchpunkte im *IGH*-Locus gibt Aufschluss darüber, ob zum Beispiel die *IGH*-Enhancer vorhanden sind und ob die Deletionen durch einen Fehler des VDJ-Rearrangements oder des Klassenwechsels entstanden sind. Die Bruchpunkte in der Region 14q24 waren in sechs Fällen durch die Bruchpunktkartierung mittels FISH bereits auf 25 kb eingegrenzt. Bei der methodischen Vorgehensweise wurde zunächst davon ausgegangen, dass das *ZFP36L1*-Gen vorhanden ist. In 45 Fällen war die Beteiligung des *IGH*-Locus durch FISH-Analysen mit der LSI *IGH* Dual Color, Break Apart-Probe bekannt. Aufgrund der guten Kartierung der Bruchpunkte in den Regionen 14q24 und 14q32 wurde die Strategie der direkten LD-PCR mit sequenzspezifischen Vorwärtsprimern im *ZFP36L1*-Gen und sequenzspezifischen Rückwärtsprimern im *IGH*-Locus gewählt. Die Lage der verwendeten Primer ist in Abbildung 15 dargestellt.

In 34 Fällen war genomische DNA verfügbar und konnte für die Bruchpunktklonierung verwendet werden. Es wurden 18 Primer für den *ZFP36L1*-Locus und 13 Primer für den *IGH*-Locus in verschiedenen Kombinationen eingesetzt (siehe Abschnitt 3.5.6) und die PCR unter Austestung unterschiedlicher Bedingungen optimiert. Mit dieser Strategie konnten 17 Bruchpunkte der Deletion del(14)(q24q32) kloniert werden. Als Beispiel ist die

Bruchpunktklonierung des Falls III-11 in Abbildung 38 dargestellt. Die Sequenzen der Bruchpunkte im FASTA-Format sind in Abbildung 39 zu finden.

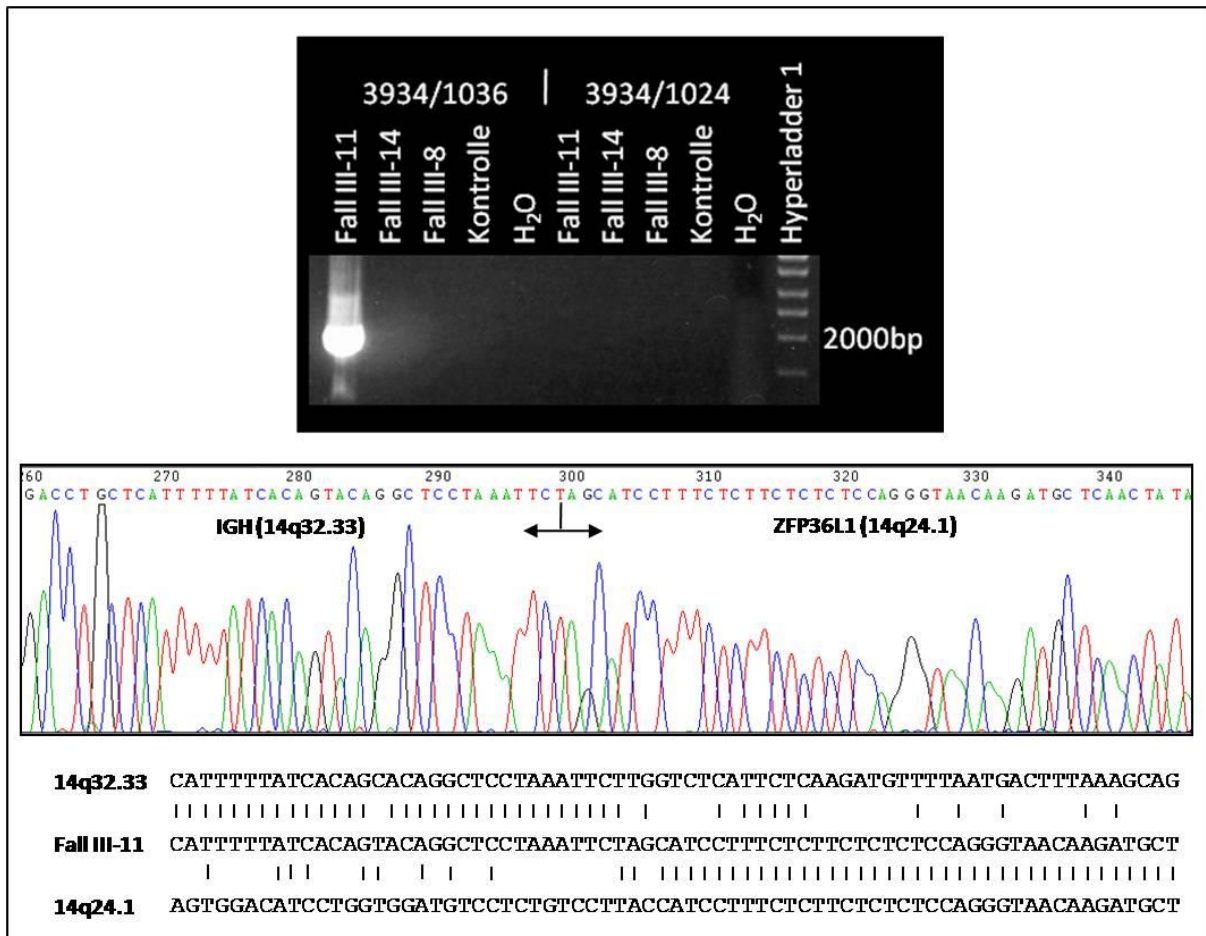


Abbildung 38: Genomische Bruchpunktklonierung der del(14)(q24q32) am Beispiel des Falls III-11. In diesem Fall wurde die Bruchpunktsequenz durch Ausschneiden der oben gezeigten Bande und anschließende Reinigung und Sequenzierung erhalten (ss sind die laufenden Nummern der verwendeten Primer angegeben). In der Mitte ist ein Ausschnitt der Rückwärtssequenz, erzielt mit dem Primer 1036, gezeigt. Der genaue Bruchpunkt in der Sequenz ist durch den senkrechten Strich dargestellt. Die Pfeile zeigen in die Richtung der *IGH*- bzw. der *ZFP36L1*-Sequenz. Unten ist ein Alignment der genomischen Sequenzen der Bruchpunktregionen in 14q24.1 und 14q32.33 (der Datenbank Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) entnommen) und der Bruchpunktsequenz des Falls III-11 gezeigt. Senkrechte Striche stellen die Übereinstimmung der Basen in der Sequenz dar.

bp: Basenpaare

Ergebnisse

```
14q24-Sequenz
14q32-Sequenz
14q24/14q32-Sequenz
nicht kartiert

>III-1
CTTCGCCCTCAAACCCCTGGCCTCCAGATTCACATGTAAAGGCTAGGCTGAGCTGAGCTGANCTGGGCTTGCCTGAACTGG
>III-2
CAGGACTGGGAACCCGATCANGACCAGCNAACCTGTGATCCACCTAGATCAGCTTAGCTCAGCCCAACTCAACCCAGCC
>III-3
GAGAGGGACCCCTCGAATGGGAACCCAGCCTGTCTCCCCCTCACCCGTGGGGTTGGGAGTGGGAGGTCCTCGGGAA
>III-4
TTNNTTTGTAGAAAAATTGTC CCGAGACTACTTC CCGAGCCAGGTTAGCTTCAGCCCAGTCCAGGTCAGCTCAACTC
>III-5
CCTGGGGCGTTGGCAGCTTGACCAACAGAAGCAGCAA GCTGTGACAAAAATGAGCAGGTCCCCTTGCTCTAGAAGTGGC
>III-6
ACAATGAGGTTCAATTA AAAAGTCGTGAGGGGGGAGGGGGCCAGTTCACCTTGTTA GTCTAGGTCAACTTAGGTCA GTT
>III-7
AGAAGTGTCCCTTCCTTTGCAACAGGTTTTCAGACTG CACAGCCCA GTTCAGCTCAGCTCAGCTTA ACTCAGTTCAGCTC
>III-8
CCGCCCGGACAAAAACAGGTAAACCTCAGAAAGGAGTCTA CAGCCCAGCCAGCTCAGCCCAGCCCA GCCTAGCTCAGC
>III-9
CCCGCCCGGACAAAAACAGGTAAACCTCAGAAAGGAGTCTCAGGCCAGCCAGCTCAGCCCAGCCAGCCTAGCTCAG
>III-10
CCTGGGTTTATTTTGGCCCCA TGC GTAAGAAACCACAAGATCAGCGCAGCCAGCCAGCTCAGCNGCAGCCCAGCTCAG
>III-11
ACCTGCTCATTTTTATCACAGTACAGGCTCCTAAATTCTAGCA TCCTTTCCTTCTCTCCAGGGTAACAAGATGCTCACTAT
>III-12
GTTGAGCATCTTGTACCTGGAGAGAGAAGAGAAAGGGATGATA TAGCTNAGCTCAGCCTAGCCTTGCTCAGCCCAGCTC
>III-13
TGGTGGAACCTGGAGCTGGCAGGGTGACNTGAGTG CCTCTCATTGCCA GGTTCCTGCACAGCCA GGCNTGGCTTCCAT
>III-14
CTGCCCCCGGCTGCTTCTGGGTGGGAGCA GCAGCCAGGCATCCCCCTGCTCAGCCCAGGGCCCCGCTACACCCCTTCCCC
>III-15
TCAGGCTGCGGAGCTCGTGATGCCGTGTGCGAACTGGCACTCTGCTGAGCTTGCCCCAGCTTGGCTTAGCCTGATACAA
>III-16
GCACAGCTCCGCTTGTACTTGGGGTGGCGGGTCAGGCTGCCTCCAGGAGCTGCCCCTTGCTCCTCTGCCCTGTTTAC
>III-17
CCCGGTGGCAGCGGCGGTGGCAGCGGCACTGGGAAACCA GCAGTCCA GGTTAATTCAGCCCAGCTCAGCCCTGCCAG
```

Abbildung 39: Klonierte Bruchpunktsequenzen im FASTA-Format.

In der Region 14q24 beginnt die Deletion in zwölf Fällen im Intron und in fünf Fällen zwischen der 94. und der 554. Base des zweiten Exons des *ZFP36L1*-Gens. Somit ist in allen 17 Fällen das erste Exon und damit auch das erste Startcodon des *ZFP36L1*-Gens verloren gegangen. In den fünf Fällen mit Bruchpunkt im zweiten Exon ist auch das alternative zweite Startcodon des *ZFP36L1*-Gens deletiert (Abbildung 40A). In der Chromosomenbande 14q32 liegen die Bruchpunkte in 14 Fällen in der Switch μ ($S\mu$)-Region und jeweils ein Bruchpunkt in der Switch gamma 1 ($S\gamma 1$)- und der Switch gamma 3 ($S\gamma 3$)-Region des *IGH*-Locus. Im Fall III-3 reicht die Deletion bis zwischen die Segmente J5 und J6 der Joining-Region, womit der Enhancer μ ($E\mu$) und damit beide Enhancer des *IGH*-Locus verloren gegangen sind (Abbildung 40B).

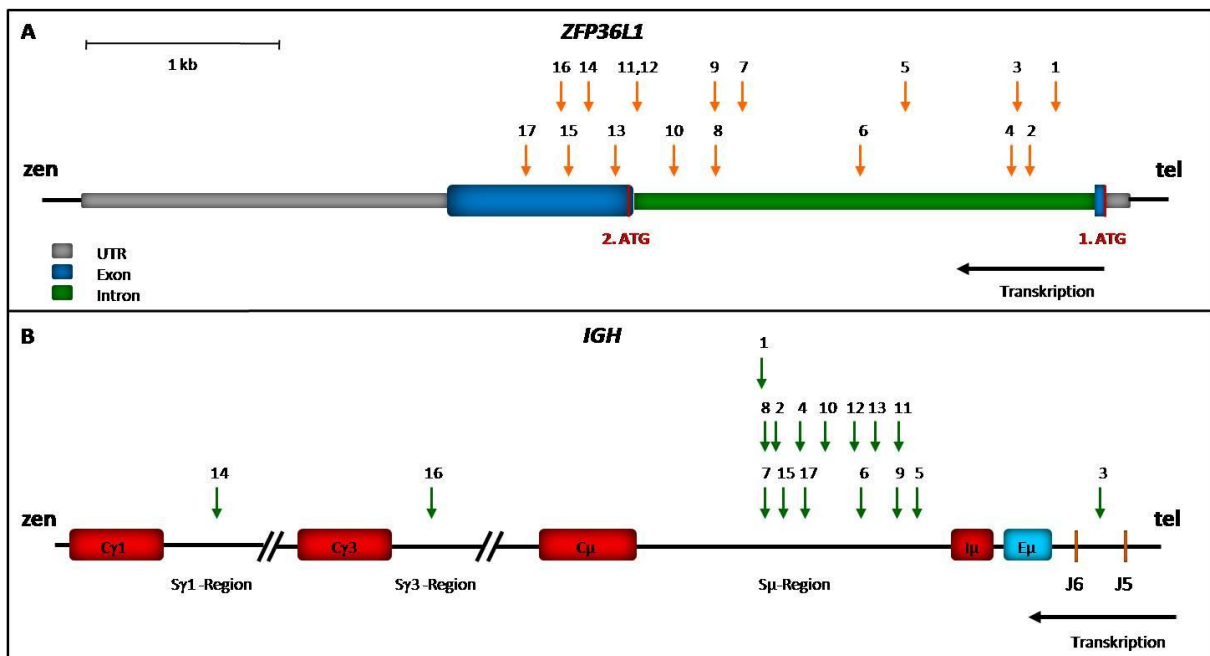


Abbildung 40: Lage der genomischen Bruchpunkte der Deletion del(14)(q24q32) in 17 mittels LD-PCR klonierten Fällen. Die als Fall-Nummern angegebenen Zahlen beziehen sich auf Kollektiv III-. **A)** Bruchpunkte in *ZFP36L1*. Das 1. Startcodon (1. ATG) und das alternative Startcodon (2. ATG) sind mit einem senkrechten roten Strich markiert. **B)** Bruchpunkte im *IGH*-Locus.

C: constant segment; E: Enhancer; J: Joining-Segment; S: Switch; tel: telomerisch; UTR: untranslatierte Region; zen: zentromerisch

In den 17 Fällen, bei denen die Bruchpunktklonierung nicht gelang, sowie in den 11 Fällen, von denen keine DNA verfügbar war, die aber die charakteristischen Hybridisierungsmuster des *ZFP36L1*-Assays 1 und der LSI *IGH* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe zeigten, sollte ausgeschlossen werden, dass der *IGH*-Locus und die *ZFP36L1*-Region durch komplexe chromosomale Aberrationen mit unterschiedlichen Partnern assoziieren. Um eine

Zusammenlagerung dieser Regionen durch die Deletion del(14)(q24q32) zu überprüfen, wurde ein FISH-Assay mit dem Spectrum green-markierten BAC-Klon RP11-179B8 der *ZFP36L1*-Region und sechs Spectrum orange-markierten BAC-Klonen des *IGH*-Locus (RP11-150I16, RP11-817G24, RP11-937M13, RP11-141I7, RP11-683L4 und CTD-2011A5) etabliert. Interphasen eines gesunden Probanden zeigten mit diesem Assay jeweils zwei isolierte rote und grüne Signale, da die Distanz zwischen der *ZFP36L1*-Region und dem *IGH*-Locus auf dem Chromosom 14 sehr groß ist (37 Mb). In allen 28 untersuchten Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) konnte jedoch in einem signifikanten Prozentsatz der Zellen ein Fusionssignal gefunden und damit eine Zusammenlagerung der *ZFP36L1*-Region mit dem *IGH*-Locus bestätigt werden (Abbildung 41).

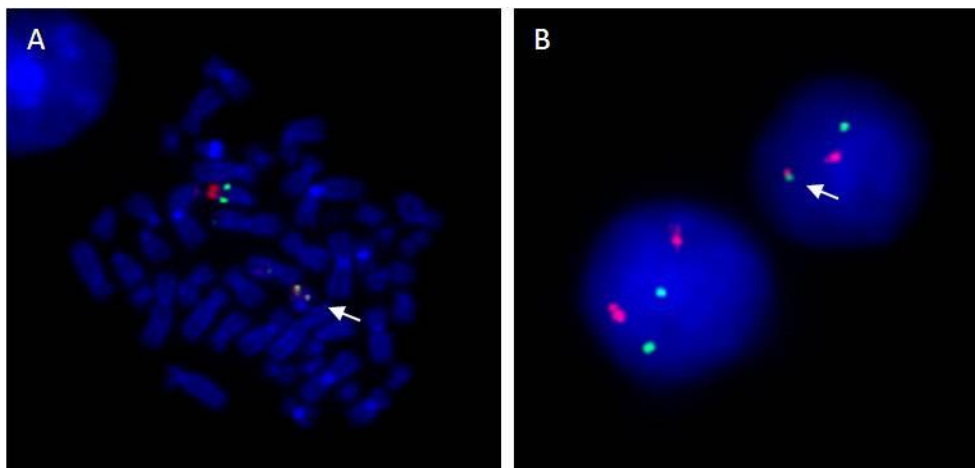


Abbildung 41: Bestätigung der *IGH-ZFP36L1*-Fusion mittels *IGH-ZFP36L1*-Fusionssonde (RP11-179B8 Spectrum green; RP11-150I16, RP11-817G24, RP11-937M13, RP11-141I7, RP11-683L4 und CTD-2011A5 Spectrum orange). **A)** Metaphase im Fall III-23 mit einem Fusionssignal auf dem derivativen Chromosom 14 (Pfeil). **B)** Interphase-Zellkern mit normaler Signalkonstellation (zwei isolierte rote und grüne Signale, links) und Interphase-Zellkern mit einem Fusionssignal (Pfeil) sowie jeweils einem isolierten roten und isolierten grünen Signal.

4.3.5 Custom-Array-CGH an Fällen mit Deletion del(14)(q24q32)

Da die Klonierung der genomischen Bruchpunkte der Deletion del(14)(q24q32) in 17 Fällen erfolglos blieb, wurde eine Custom-Array-CGH-Analyse an 16 dieser Fälle mit ausreichendem Tumorzellgehalt (>60 %) durchgeführt.

Die zentromerischen Bruchpunkte der Deletion konnten in allen 16 Fällen kartiert werden. In 14 Fällen lagen sie im Intron von *ZFP36L1* und in zwei Fällen im zweiten Exon von *ZFP36L1*, was vergleichbar mit den Ergebnissen der genomischen Bruchpunktklonierung ist. Die Bruchpunkte im *IGH*-Locus konnten mit Hilfe der Custom-Array-CGH-Analyse nicht eindeutig

bestimmt werden, was sich auf die vielen repetitiven Sequenzen und Umlagerungen im *IGH*-Locus zurückführen lässt. Abbildung 42 zeigt die Custom-Array-CGH-Analyse am Beispiel des Falls III-32 sowie eine Darstellung der Lage der Bruchpunkte im *ZFP36L1*-Gen. In Tabelle 34 ist die Position der Oligonukleotide aufgeführt, zwischen denen die Deletionsbrüche vermutlich stattgefunden haben.

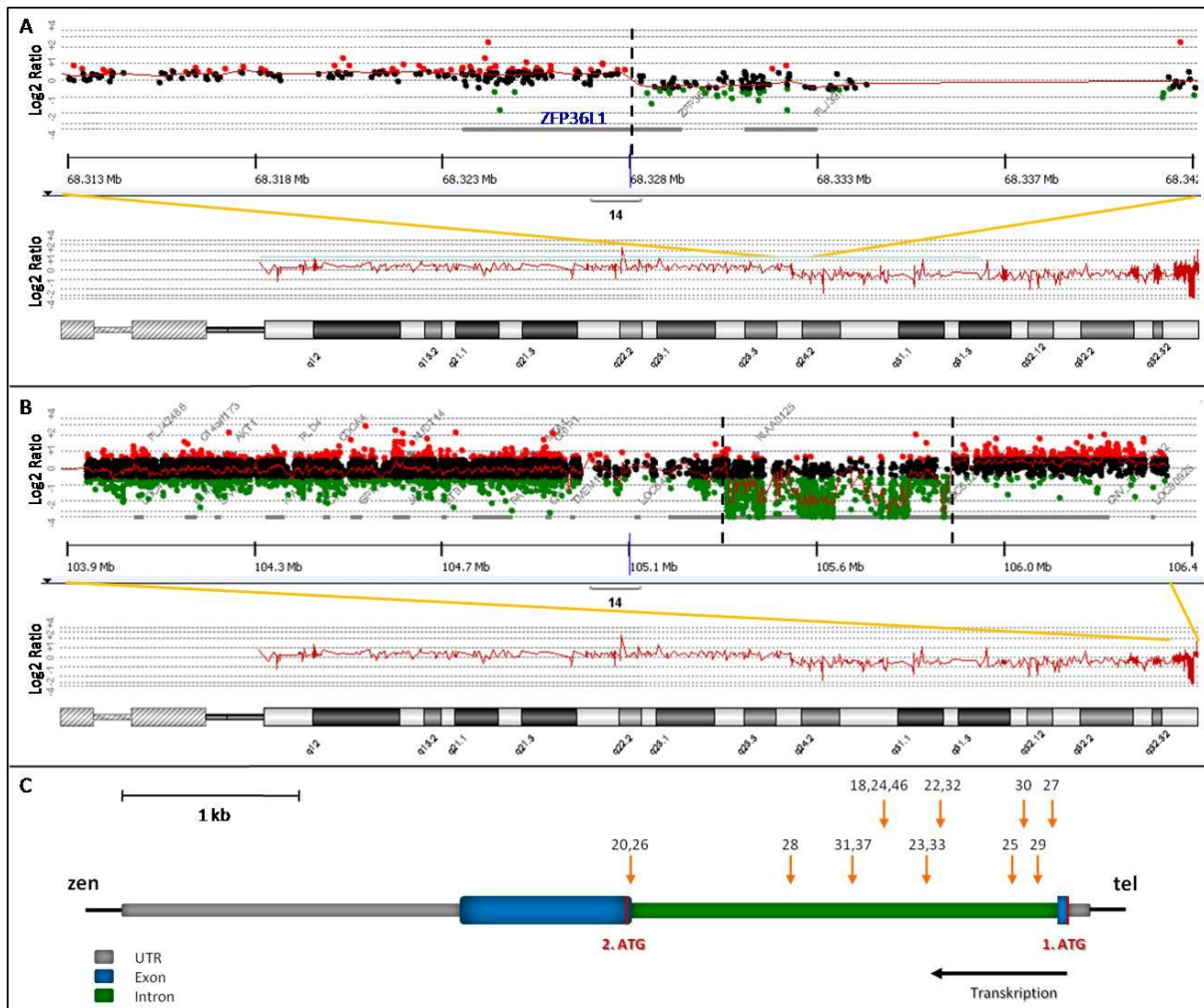


Abbildung 42: Bruchpunktkartierung mittels Custom-Array-CGH. Die als Fall-Nummern angegebenen Zahlen beziehen sich auf das Kollektiv III-. **A-B)** Beispiel einer Custom-Array-CGH-Analyse am Fall III-32. Die Kopienzahl ist durch Punkte von zentromerisch (links) nach telomerisch (rechts) dargestellt. Schwarze Punkte mit einer Log₂ Ratio von ~ 0 stellen einen balancierten Chromosomenstatus dar. Rote Punkte mit einer größeren Log₂ Ratio deuten auf chromosomale Zugewinne, grüne Punkte mit einer kleineren Log₂ Ratio auf chromosomale Verluste hin. Graue Balken zeigen die in der Region annotierten Gene an. Die roten Linien entsprechen den gemittelten Log₂ Ratios und die schwarzen, gestrichelten Linien den bestimmten Bruchpunktbereichen. **A)** Ausschnitt der Chromosomenregion 14q24. **B)** Ausschnitt der Chromosomenregion 14q32 (*IGH*-Locus). **C)** Lage der Bruchpunkte der 16 mittels Custom-Array-CGH untersuchten Fälle im *ZFP36L1*-Gen. Das 1. Startcodon (1. ATG) und das alternative Startcodon (2. ATG) sind mit einem senkrechten roten Strich markiert. tel: telomerisch; UTR: untranslatierte Region; zen: zentromerisch

Tabelle 34: Lage der anhand der Custom-Array-CGH-Analyse bestimmten Oligonukleotide, zwischen denen die Deletionsbrüche vermutlich stattgefunden haben.

Fall- Nummer	Letztes nicht deletiertes Oligonukleotid in 14q24 ^{1,2}	Erstes deletiertes Oligonukleotid in 14q24 ^{1,3}	Größe der eingegrenzten Bruchpunktregion [bp]
III-26	68326916-68326951	68326931-68326979	63
III-20	68326916-68326960	68326931-68326979	63
III-28	68327796-68327840	68327852-68327896	100
III-24	68328140-68328196	68328531-68328590	450
III-18	68328140-68328196	68328531-68328590	450
III-46	68328140-68328196	68328531-68328590	450
III-23	68328545-68328596	68328599-68328647	102
III-33	68328545-68328596	68328599-68328647	102
III-22	68328599-68328647	68328707-68328751	152
III-32	68328599-68328647	68328707-68328751	152
III-25	68328995-68329043	68329106-68329150	155
III-29	68329106-68329150	68329292-68329345	239
III-30	68329106-68329150	68329131-68329177	71
III-37	68329131-68328177	68328198-68328245	114
III-31	68329131-68328177	68328198-68328245	114
III-27	68329267-68329321	68329278-68329337	70

¹ NCBI Build 36.1

² Telomerischstes Oligonukleotid in der Chromosomenregion 14q24, das nicht deletiert zu sein scheint.

³ Zentromerischstes Oligonukleotid in der Chromosomenregion 14q24, das deletiert zu sein scheint.

Durch die Custom-Array-CGH-Analyse konnten die genomischen Bruchpunkte in der Region 14q24 in den 16 untersuchten Fällen auf eine Genauigkeit von 63-450 bp (Mittelwert 168 bp) eingegrenzt werden. Insgesamt zeigte sich, dass alle 33 mittels LD-PCR und Custom-Array-CGH kartierten Bruchpunkte in 14q24.1 in Fällen mit Verlust des BAC-Klons RP11-65A20 bei Vorhandensein des BAC-Klons RP11-179B8 in der FISH-Analyse, im *ZFP36L1*-Gen liegen.

4.3.6 Identifizierung von *ZFP36L1-IGH*-Fusionstranskripten

In der onkologischen Forschung wird in der Regel davon ausgegangen, dass chromosomale Deletionen auf Tumorsuppressorgene zielen und diese inaktivieren. Eine Clusterung der Bruchpunkte in der hier gezeigten Form ist dabei jedoch ungewöhnlich. In der Literatur wurden auch Onkogenaktivierungen durch chromosomale Deletionen, beispielsweise durch die Bildung von Fusionstranskripten, beschrieben [170, 171]. Die Bruchpunktklonierung der

17 Deletionen del(14)(q24q32) zeigte, dass in diesen Fällen auf genomischer Ebene eine Fusion des *ZFP36L1*-Gens und des *IGH*-Locus stattgefunden hat. Deshalb sollten Untersuchungen zeigen, ob ein *IGH-ZFP36L1*-Fusionstranskript gebildet wird. Beide Gene weisen die gleiche Transkriptionsrichtung auf. In die Untersuchungen wurden zehn Fälle (III-4, III-9, III-7, III-11, III-13, III-14, III-15, III-17, III-18 und III-22) mit ausreichend verfügbarem Material zur Extraktion von RNA eingeschlossen. Für die RT-PCRs wurden die in Abbildung 15 dargestellten Primer in verschiedenen Kombinationen verwendet. Begonnen wurde in den Fällen mit genomischem Bruchpunkt in der $S\mu$ -Region des *IGH*-Locus jeweils mit einem in der 3'-UTR des *ZFP36L1*-Gens und einem in der Exon $I\mu$ kodierenden Region [172] liegenden Primer. $I\mu$ ist bereits als beteiligtes Exon in *IGH*-Fusionstranskripten beschrieben worden [173]. Im Fall III-14 lag der genomische Bruchpunkt in der $S\gamma$ -Region des *IGH*-Locus, weshalb hier anstelle des $I\mu$ -Primers ein im Exon $I\gamma$ liegender Primer verwendet wurde. Anschließend wurden RT-PCRs und Sequenzreaktionen mit weiter innen liegenden Primern durchgeführt (siehe Abschnitt 3.5.13).

Insgesamt konnten in fünf der Fälle Fusionstranskripte nachgewiesen werden (Abbildung 43). Die Fälle III-4 und III-11 mit genomischem Bruchpunkt im Intron von *ZFP36L1* zeigten eine Fusion zwischen $I\mu$ und dem zweiten Exon von *ZFP36L1*. Dabei wurden die regulären Spleißstellen beider Gene verwendet. Sollte das zweite Startcodon des *ZFP36L1*-Gens genutzt werden, würden lediglich die 19 Aminosäuren des ersten Exons des *ZFP36L1*-Proteins fehlen. In drei Fällen mit genomischem Bruchpunkt im zweiten Exon wurden Transkripte identifiziert, bei denen das Exon $I\mu$ mit dem 3'-terminalen Bereich des zweiten Exons von *ZFP36L1* zusammengelagert ist (Fälle III-13, III-15 und III-17). Dabei wurde eine kryptische Spleißstelle im zweiten Exon genutzt. Der noch vorhandene Teil des zweiten Exons kodiert für 44 des 338 Aminosäuren großen *ZFP36L1*-Proteins.

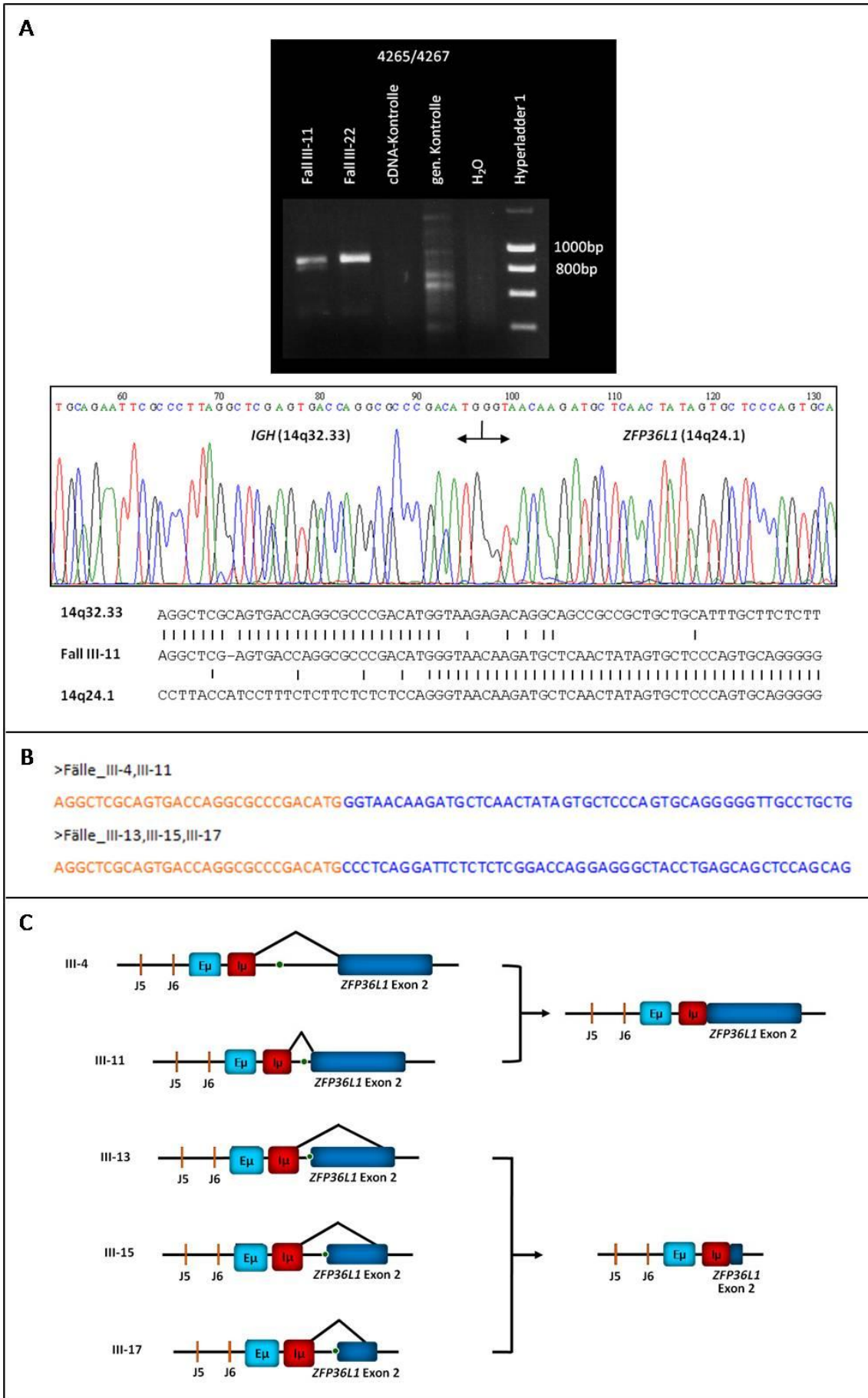


Abbildung 43: Identifizierung von *ZFP36L1-IGH*-Fusionstranskripten mittels RT-PCR. **A)** Nachweis eines *IGH-ZFP36L1*-Fusionstranskripts am Beispiel des Falls III-11. Das Elektropherogramm enthält den Bruchpunkt, der durch den senkrechten Strich angezeigt ist. Die Pfeile zeigen in die Richtung der *IGH*- bzw. der *ZFP36L1*-Sequenz. Unten ist das Alignment der Sequenzen der Bruchpunktregionen in 14q24.1 und 14q32.33 (der Datenbank Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) entnommen) und der Bruchpunktsequenz des Falls III-11 gezeigt. Senkrechte Striche stellen die Übereinstimmung der Basen in der Sequenz dar. **B)** Sequenzen der *ZFP36L1-IGH*-Fusionstranskripte im FASTA-Format. Die gelb markierten Basen konnten der 14q24-Region zugeordnet werden und die blau markierten Basen der 14q32-Region. **C)** Schematische Darstellung der nachgewiesenen Fusionstranskripte. Links sind die durch die Deletion del(14)(q24q32) entstandenen und mittels Bruchpunktklonierung nachgewiesenen genomischen Fusionen dargestellt. Die grünen Punkte stellen jeweils den Bruchpunkt dar. Die zusammenlaufenden Balken zeigen, welcher Teil der Sequenz durch Spleißen bei der Entstehung der Fusionstranskripte entfernt worden ist. Rechts sind die entstandenen Fusionstranskripte dargestellt. Die Segmente J5, J6, E μ und I μ gehören zum *IGH*-Locus. Links liegt jeweils das Telomer und rechts das Zentromer.
bp: Basenpaare; E: Enhancer; J: Joining-Segment; I: *IGH*-Keimbahntranskript

4.3.7 Variantveränderungen in Lymphomen mit Bruch in der Region 14q24

Beim Screening von Lymphomen und Leukämien mit dem *ZFP36L1*-Assay 1 wurde eine B-CLL mit typischem Signalmuster in 14q24 (Deletion des BAC-Klons RP11-65A20 und Reduktion des BAC-Klons RP11-179B8), aber normalem *IGH*-Hybridisierungsmuster beobachtet (Fall III-46). Der Bruchpunkt in 14q24 in der Region des *ZFP36L1*-Gens konnte mit dem 44k-Custom-Array bereits bestätigt werden (Abschnitt 4.3.5). Mittels Human Genome CGH Microarray 44B der Firma Agilent sollte untersucht werden, welche Gene in der telomerischen Bruchpunktregion der Deletion lokalisiert sind. Der Tumorzellgehalt des Falls betrug 49 %. Es zeigte sich, dass sich die Deletion im langen Arm von Chromosom 14 bis zur Bande 14q32.11 erstreckte, einer Region, in der die Gene *EML5*, *TTC8* und *FOXN3* lokalisiert sind (Abbildung 44). Zur Bestätigung und weiteren Eingrenzung der Bruchpunktregion wurden FISH-Sonden mit den BAC-Klonen RP11-747D3, RP11-960M10 und RP11-786H7 hergestellt und an Metaphasen von Zellen aus peripherem Blut von Probanden mit normalem Karyotyp auf die richtige Lokalisation und Spezifität überprüft. Die anschließenden FISH-Analysen am Fall III-46 zeigten, dass die BAC-Klone RP11-960M10 und RP11-786H7 vorhanden sind und der BAC-Klon RP11-747D3 deletiert ist. Damit befindet sich die Bruchpunktregion zwischen den Genen *TTC8* und *FOXN3*. *FOXN3* ist das nächst gelegene Gen, das durch die Deletion in die *ZFP36L1*-Region verlagert wird. *FOXN3* kodiert für CHES1 (checkpoint suppressor 1), einen Transkriptionsfaktor, der auf die Kontrollpunkte des Zellzyklus wirkt [174].

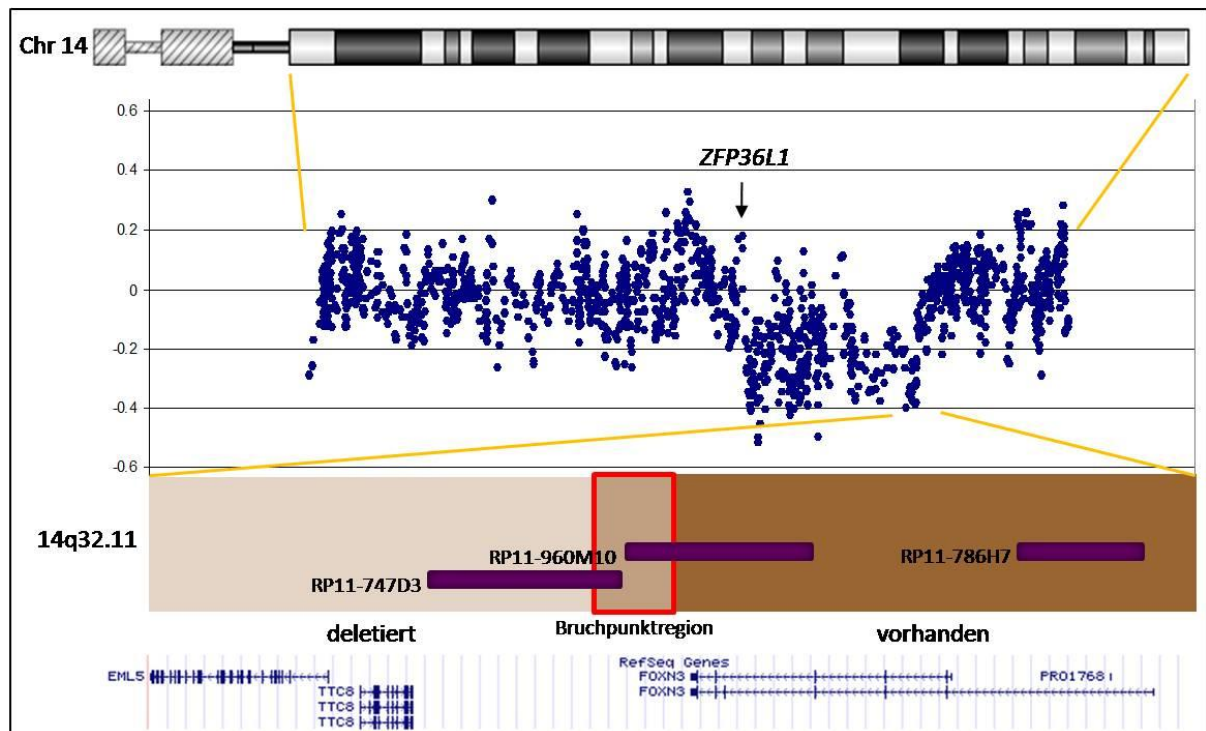


Abbildung 44: Array-CGH des langen Arms von Chromosom 14 am Fall III-46 mit dem Human Genome CGH Microarray 44B (Agilent). Jeder Punkt stellt ein Oligonukleotid dar. Das genomische Profil ist von zentromerisch (links) nach telomerisch (rechts) dargestellt. Eine Log₂ Ration von ~0 zeigt einen balancierten Chromosomenstatus an. Ausschläge nach unten deuten auf chromosomale Verluste und Ausschläge nach oben auf chromosomale Zugewinne hin. Die Bruchpunktregion in 14q32.11 mit den verwendeten BAC-Klonen (violette Balken) und den in dieser Region liegenden Genen (der Datenbank Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, NCBI Build 36.1) entnommen) ist vergrößert dargestellt. Die nicht deletierte Region ist dunkelbraun, die deletierte Region hellbraun unterlegt. Die Bruchpunktregion ist rot umrandet.

Eine B-CLL (Fall III-47) mit Translokation $t(13;14)(q14;q24)del(14)(q24.1q24.2)$ zeigte bei der Anwendung des ZFP36L1-Assays 1 eine Kolokalisation, mit dem ZFP361-Assay 2 jedoch neben einer Kolokalisation einen Signalsplit (Abbildung 37C). Diese komplexe Veränderung in der Region 14q23.3-14q24.2 sollte mittels FISH näher charakterisiert werden.

Für diesen Zweck wurden 12 weitere, aus BAC-Klonen hergestellte DNA-Sonden der zu untersuchenden Region verwendet. Bei der Überprüfung der Sonden auf die richtige Lokalisation und Spezifität an Metaphasen von Zellen aus peripherem Blut von Probanden mit normalem Karyotyp zeigte sich, dass drei BAC-Klone (CTD-3192A14, RP11-994F21 und CTD-2546H4) stark kreuzhybridisieren, weshalb sie nicht weiter verwendet wurden.

Die Lage der Sonden in der Region 14q23.3-14q24.2 und die Ergebnisse der Bruchpunktkartierung sind in Abbildung 45 und Tabelle 35 gezeigt. Die Klone RP11-1081C22 und RP11-714M18 sowie alle dazwischen liegenden Klone waren deletiert. Die Klone RP11-1058L7, RP11-1113M10 und RP11-300A24 waren in zwei Kopien vorhanden. Der Klon CTD-2019G17 zeigte einen Signalsplit. Der größte Signalanteil der Sonde hybridisierte auf das

derivative Chromosom 13, der kleinere Anteil auf das derivative Chromosom 14. Somit muss die Translokation und die Deletion in zwei aufeinander folgenden Ereignissen stattgefunden haben. Der Bruchpunkt der Translokation konnte somit auf eine Region von etwa 100 kb (69,05 Mb-69,15 Mb), innerhalb des Klons CTD-2019G17, eingegrenzt werden. In der Bruchpunktregion liegen die Gene *C14orf1621* und *KIAA0247*, deren Funktionen bisher nicht beschrieben sind. Der telomerische Bruchpunkt der Deletion liegt etwas weiter zentromerisch zwischen 69,0 Mb und 69,1 Mb, einer Region, in der neben den Genen *FLJ44817* und *C14orf1621* das Gen *SLC39A9* liegt, das für einen Zink-Transporter kodiert. Der zentromerische Bruchpunkt der Deletion konnte nur auf eine Region von etwa 450 kb (67,3 Mb-67,75 Mb), zwischen den Klonen RP11-1058L7 und RP11-1081C22, eingegrenzt werden, da alle zwischen diesen Sonden verwendeten Klone kreuzhybridisierten. In dieser Region liegt neben den Genen *RDH11*, *RDH12* und *ZFYVE26Z*, deren Funktionen nicht auf eine Rolle in der Tumorgenese hinweisen, das Gen *RAD51L1*. Das RAD51L1-Protein spielt eine Rolle bei der DNA-Reparatur durch homologe Rekombination und wurde in Assoziationsstudien mit Brustkrebs in Verbindung gebracht [175].

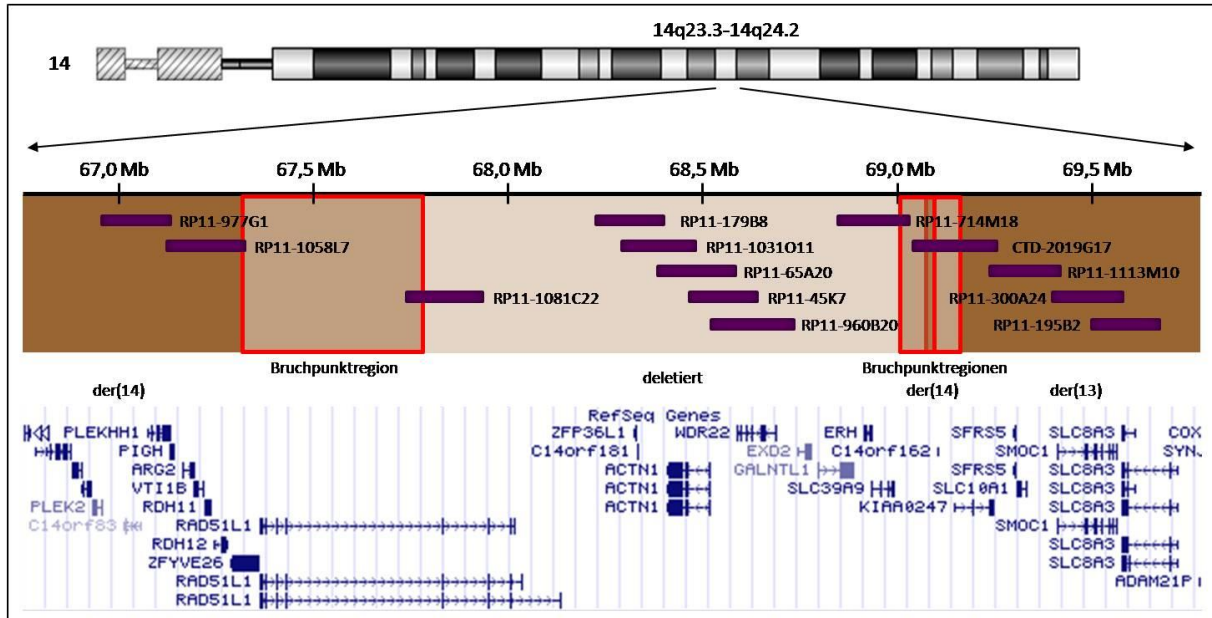


Abbildung 45: Eingrenzung der Bruchpunktregionen der Translokation und Deletion in 14q23.3-14q24.2 am Fall III-47. Die Lage der verwendeten BAC-Klone (violette Balken) ist schematisch dargestellt. Die nicht deletierte Region ist dunkelbraun und die deletierte hellbraun unterlegt. Die ermittelten Bruchpunktregionen sind rot umrandet. Unten sind die Gene in der untersuchten Region mit Hilfe der Datenbank Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, NCBI Build 36.1) dargestellt.

Tabelle 35: Ergebnisse der Bruchpunkteingrenzungen des Falls III-47 mit Translokation t(13;14)(q14;q24)del(14)(q24.1q24.2) mittels BAC-Klonen

BAC-Klon	Lokalisation ¹	Signalmuster ²
RP11-977G1	66.956.961-67.134.585	Signal auf der(14)
RP11-1058L7	67.126.647-67.325.582	Signal auf der(14)
RP11-1081C22	67.735.531-67.929.703	Deletiert
RP11-179B8	68.224.800-68.405.778	Deletiert
RP11-1031O11	68.290.160-68.480.671	Deletiert
RP11-65A20	68.370.241-68.544.848	Deletiert
RP11-45K7	68.458.614-68.637.391	Deletiert
RP11-960B20	68.520.068-68.734.551	Deletiert
RP11-714M18	68.844.462-69.020.773	Deletiert
CTD-2019G17	69.030.378-69.252.946	Signal auf der(13), Restsignal auf der(14)
RP11-1113M10	69.233.335-69.413.045	Signal auf der(13)
RP11-300A24	69.390.393-69.581.154	Signal auf der(13)
RP11-195B2	69.492.306-69.662.799	Signal auf der(13)

¹NCBI Build 36.1

²Durch die Auswertung an Metaphasen konnte bestimmt werden, auf welches der derivativen Chromosomen der jeweils eingesetzte BAC-Klon hybridisiert.

der: derivatives Chromosom

4.3.8 Expressionsanalyse von *RAD51L1* und *ZFP36L1* mittels quantitativer RT-PCR

Da bei 45 der 46 Fälle mit Deletion im langen Arm von Chromosom 14 und Beteiligung der *ZFP36L1*-Region der *IGH*-Locus beteiligt ist, bestand die Vermutung, dass durch die Deletion ein Onkogen in die Nähe des *IGH*-Locus gerät und aktiviert wird [176]. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte die Expression des *RAD51L1*- und des *ZFP36L1*-Gens in den Fällen mit typischer Deletion del(14)(q24q32) mittels quantitativer RT-PCR analysiert werden.

RAD51L1 ist das nächst gelegene Gen, das vollständig vorhanden ist, und liegt etwa 200 kb zentromerisch der genomischen Bruchpunkte. Der verwendete Assay für die *RAD51L1*-cDNA (Applied Biosystems) erkennt alle bekannten Transkripte des Gens. Zur Normalisierung wurde die Expression des Housekeeping-Gens *GUSB* gemessen. Die Expression der beiden Gene wurde in Triplikaten in zwölf Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) bestimmt. Als Kontrolle dienten vier B-CLL, die bei der FISH-Analyse keine Deletion del(14)(q24q32) gezeigt hatten. Die Entität B-CLL wurde als Kontrolle gewählt, da es sich bei der Mehrheit der Fälle mit Deletion del(14)(q24q32) um B-CLL handelte. Die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 0,04-0,9 % (Mittelwert 0,3). Mit Hilfe der vier Kontroll-B-CLL wurde der $\Delta\Delta$ CT-Wert berechnet. Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR sind in Abbildung 46 dargestellt. Drei Fälle (III-8, III-13 und III-32) zeigten eine deutlich höhere *RAD51L1*-Expression als die Kontrollen. Insgesamt konnte jedoch keine signifikante Überexpression von *RAD51L1* in

Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) im Vergleich zu B-CLL ohne Deletion del(14)(q24q32) festgestellt werden.

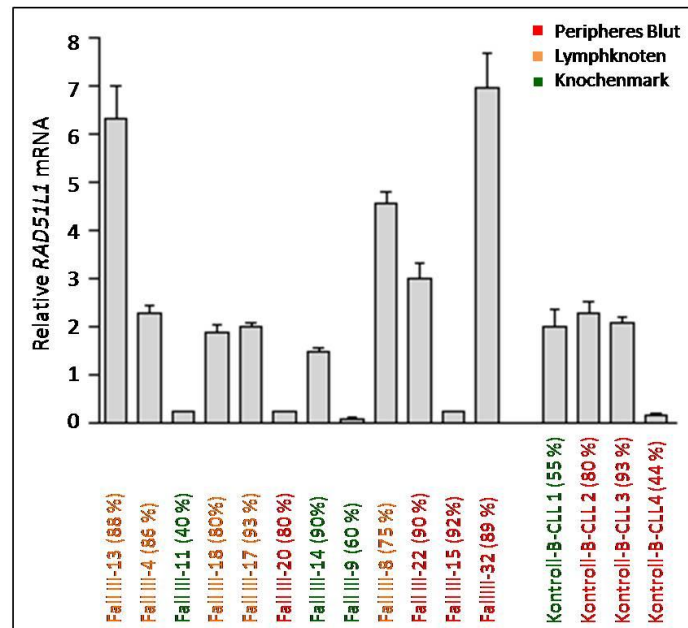


Abbildung 46 Quantitative RT-PCR zur Untersuchung der *RAD51L1*-mRNA-Expression in B-CLL mit und ohne (Kontroll-B-CLL) Deletion del(14)(q24q32). Angegeben ist die Ratio, ermittelt durch die $\Delta\Delta$ CT-Methode (siehe Abschnitt 3.5.12). Der Tumorzellgehalt ist in Klammern genannt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Deletion del(14)(q24q32) zu einer erhöhten Expression des *ZFP36L1*-Gens führt. Da das erste Exon in allen klonierten und mittels Array-CGH kartierten Fällen verloren gegangen ist, wurde ein quantitativer RT-PCR-Assay für das zweite Exon des Gens erstellt. Außerdem wurde an den gleichen Fällen eine quantitative RT-PCR mit einem Primerassay für das Vollängentranskript von *ZFP36L1* durchgeführt. Dieser Assay überspannt das Intron des Gens und misst dadurch nur die Expression des normalen Allels, was als Vergleich dienen sollte. Der Normalisierung diente wieder das Housekeeping-Gen *GUSB*.

Es wurden jeweils neun Fälle mit Deletion del(14)(q24q32) und vier Kontroll-B-CLL ohne diese Aberration in Triplikaten gemessen. Die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 0,04-1,4 % (Mittelwert 0,4). Auch hier wurde der $\Delta\Delta$ CT-Wert mit Hilfe der vier Kontroll-B-CLL berechnet. Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR sind in Abbildung 47 dargestellt. Zwei der untersuchten Fälle (Fälle III-13 und III-17) wiesen ein $l\mu$ -*ZFP36L1*-Fusionstranskript mit Bruch im 3'-terminalen Bereich des zweiten Exons auf. Wie erwartet

zeigten diese Fälle eine sehr geringe Expression mit dem *ZFP36L1*-Exon 2-Assay. Insgesamt ist jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression des zweiten Exons von *ZFP36L1* zwischen Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) und B-CLL ohne diese Deletion zu erkennen. Da der Assay zur Messung der Expression des Vollängentranskripts in Fällen mit Deletion nur ein Allel detektieren sollte, der Assay zur Messung der Expression des zweiten Exons von *ZFP36L1* mit Ausnahme der Fälle III-13 und III-17 jedoch beide Allele, wäre zu erwarten gewesen, dass der Vollängentranskript-*ZFP36L1*-Assay eine geringere Expression zeigen würde. Diese Tendenz ist in den hier untersuchten Fällen jedoch nicht zu beobachten. Da jedoch der quantitative PCR-Assay für das zweite Exon von *ZFP36L1* kein Intron überspannt, können hier trotz des DNA-Verdaus bei der Isolierung der RNA genomische Verunreinigungen und somit verfälschte Ergebnisse erzielt worden sein.

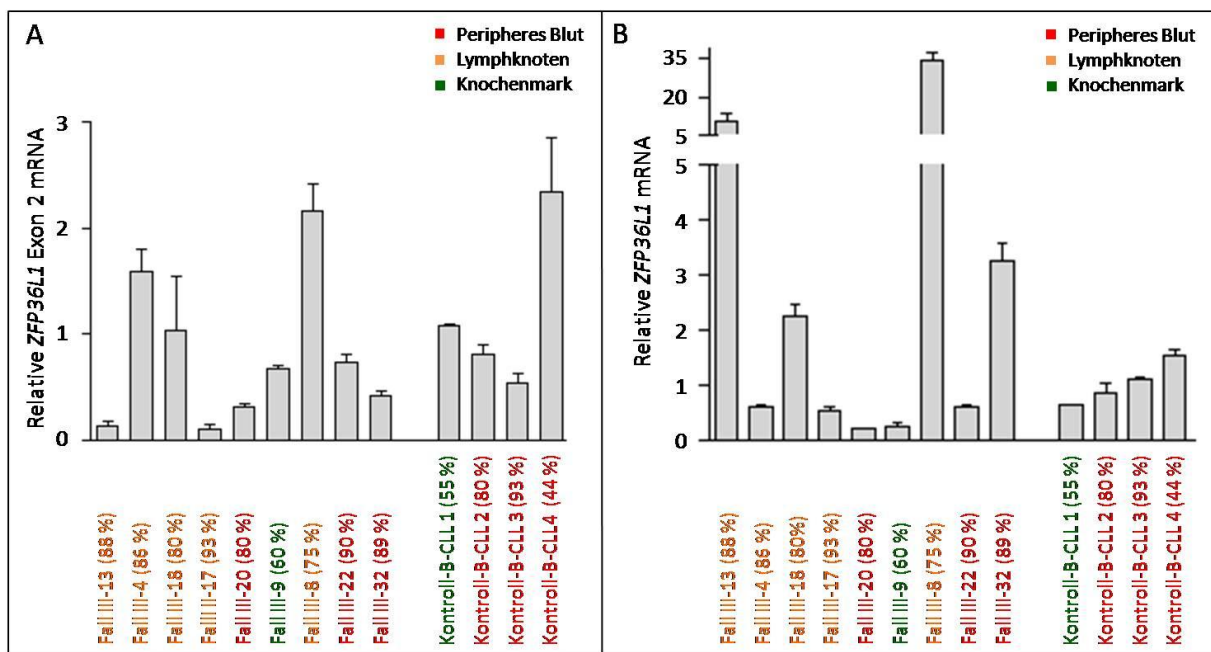


Abbildung 47: Quantitative RT-PCRs zur Untersuchung der *ZFP36L1*-mRNA-Expression in B-CLL mit und ohne (Kontroll-CLL) Deletion del(14)(q24q32). Die Expression ist als Ratio, ermittelt durch die $\Delta\Delta CT$ -Methode, angegeben (siehe Abschnitt 3.5.12). Der Tumorzellgehalt ist in Klammern genannt. **A)** Relative Expression des zweiten Exons von *ZFP36L1* **B)** Relative Expression des Vollängentranskripts von *ZFP36L1*.

4.3.9 Mutationsanalyse von *ZFP36L1*

Da in del(14)(q24q32)-positiven Lymphomen im Vergleich zu B-CLL ohne diese Deletion keine veränderte Expression von Genen zentromerisch der Bruchpunktregion in 14q24 festgestellt werden konnte, sollte aufgezeigt werden, ob Mutationen innerhalb des *ZFP36L1*-Gens auftreten. Dabei sollten beide, auch das in den meisten Fällen heterozygot deletierte erste Exon, analysiert werden. Als Hypothese wurde angenommen, dass das *ZFP36L1*-Allel

des Chromosoms mit Deletion zu einer veränderten Proteinfunktion führt und das zweite Allel durch Mutation inaktiviert oder das entsprechende Protein ebenfalls verändert wird. Insgesamt wurden 25 Fälle mit Deletion del(14)(q24q32) mittels Sequenzierung auf Mutationen in der kodierenden Sequenz einschließlich der Exon-/Intron-Genzen von *ZFP36L1* untersucht. Es wurden drei Primerpaare verwendet, eins für das erste Exon und zwei für das zweite Exon. Der Fall III-7 zeigte eine Deletion von zwölf Basenpaaren im zweiten Exon (chr14:68.326.368-68.326.379), die in 15 Kontrollen nicht gefunden wurde (Abbildung 48). Weitere Mutationen konnten nicht identifiziert werden.

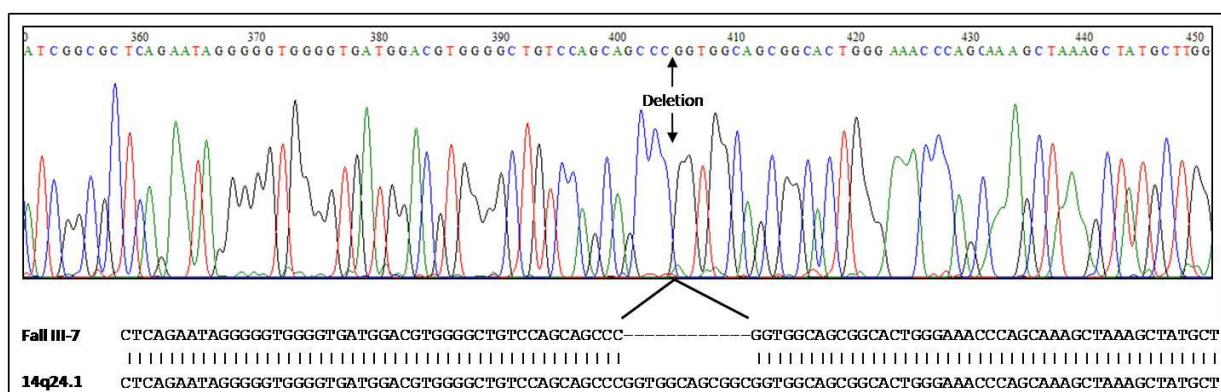


Abbildung 48: Deletion von zwölf Basenpaaren im zweiten Exon von *ZFP36L1* im Fall III-7. Das Elektropherogramm zeigt die anhand von Pfeilen markierte Deletion. Unten ist das Alignment der Sequenz mit Deletion des Falls III-7 und die entsprechende Wildtyp-Sequenz in 14q24.1, die der Datenbank Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) entnommene wurde, angezeigt. Senkrechte Striche stellen die Übereinstimmung der Basen in der Sequenz dar.

4.3.10 Zusätzliche genetische Veränderungen der del(14)(q24q32)-positiven Lymphome

Bei 33 von 45 (73 %) der del(14)(q24q32)-positiven Lymphome handelt es sich um B-CLL. Die B-CLL lässt sich, wie in Abschnitt 1.2.4 beschrieben, anhand verschiedener Parameter in Subklassen einordnen. Um zu untersuchen, ob die Deletion del(14)(q24q32) mit einer bestimmten Gruppe der B-CLL assoziiert ist, wurde in den 45 del(14)(q24q32)-positiven Lymphomen das Auftreten der häufigsten chromosomalen Aberrationen der B-CLL anhand von FISH-Analysen und der VDJ-Mutationsstatus mit Hilfe von PCR-Analysen bestimmt. Mittels FISH wurde auf eine 13q-Deletion, 11q-Deletion, Trisomie 12 und 17p-Deletion getestet. Die FISH Assays sind in den Abschnitten 2.8 und 2.9 beschrieben. Die Häufigkeit der genetischen Veränderungen in den del(14)(q24q32)-positiven Lymphomen wurde mit

Ergebnisse

der Häufigkeit dieser Aberrationen in B-CLL-Studien verglichen [44]. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 36 aufgelistet und in Tabelle 37 zusammengefasst.

Tabelle 36: Mittels FISH- und PCR-Analyse ermittelte zusätzliche genetische Veränderungen der del(14)(q24q32)-positiven Lymphome

Fall-Nummer	Diagnose	Signalkonstellationen 11q-Deletion FISH-Analyse ¹	Signalkonstellationen Trisomie 12 FISH-Analyse ²	Signalkonstellationen 13q-Deletion FISH-Analyse ³	Signalkonstellationen 13q-Deletion FISH-Analyse ⁴	Signalkonstellationen 17p-Deletion FISH-Analyse ⁵	IgV _H -Mutationsrate [%]
III-1	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (68 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-2	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (79 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	7,9
III-3	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	0
III-4	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	1Ko (12 %, subklonal)	2r+2g	2r+2g+2b	0
III-5	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (82 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-6	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (12 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-7	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (50 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	0
III-8	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	0
III-9	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	3,96
III-10	NOS Lymphom	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	0,5
III-11	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (41 %)	2Ko	2r+2g	1r+2g+2b (32 %)	0
III-12	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (72 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-13	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-14	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	1r+2g+2b (80 %)	0
III-15	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	3,1
III-16	NOS Lymphom	2Ko+2b	3Ko (25 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-17	B-CLL	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2r+2g+2b	0
III-18	hoch malignes B-NHL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	0,45
III-19	B-CLL	4Ko+4b (4 %, subklonal)	3Ko (83 %), 4Ko (5 %, subklonal)	4Ko (7 %, subklonal)	4r+4g (7 %, subklonal)	2r+2g+2b	n.d.
III-20	NHL/CLL/ L	2Ko+2b	3Ko (66 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	0
III-21	V.a. B-CLL	2Ko+2b	3Ko (15 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-22	B-NHL/ CyclinD1 neg. MCL?	2Ko+2b	2Ko	1Ko (60 %)	2r+1g	2r+2g+2b	0
III-23	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (41 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	3,6
III-24	niedrig malignes NHL	2Ko+2b	3Ko (10 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	2,2

Ergebnisse

Fall-Nummer	Diagnose	Signalkonstellationen 11q-Deletion FISH-Analyse ¹	Signalkonstellationen Trisomie 12 FISH-Analyse ²	Signalkonstellationen 13q-Deletion FISH-Analyse ³	Signalkonstellationen 13q-Deletion FISH-Analyse ⁴	Signalkonstellationen 17p-Deletion FISH-Analyse ⁵	IgV _H -Mutationsrate [%]
III-25	MCL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	1r+2g+2b (17 %)	n.d.
III-26	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (68 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	polyklonal
III-27	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	1Ko (25 %)	2r+2g	2r+2g+2b	6,93
III-28	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	0
III-29	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (90 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	5,98
III-30	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	4,72
III-31	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	0
III-32	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-33	NOS Lymphom	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	0
III-34	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	1r+2g+2b (61 %)	0
III-35	B-CLL	2Ko+2b	3Ko (96 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-36	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-37	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-38	SMZL	2Ko+2b	3Ko (60 %)	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	7,93
III-39	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-40	Verdacht auf MZL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-41	Verdacht auf MZL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-42	B-CLL	n.a.	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.
III-43	B-NHL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	2r+2g+2b	0
III-44	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	2Ko	2r+2g	1r+2g+2b (17 %, subklonal)	n.d.
III-45	B-CLL	2Ko+2b	2Ko	1Ko (85 %)	2r+2g	2r+2g+2b	n.d.

Der prozentuale Anteil der aberranten Kerne ist gegebenenfalls in Klammern angegeben. Die klonalen Aberrationen sind durch Fettschrift hervorgehoben. Kolokalisation bedeutet jeweils eine Zusammenlagerung des roten und grünen Signals.

¹Der verwendete Assay besteht aus den BAC-Klonen RP11-241D13 (ATM-Locus, Spectrum orange) und RP11-420H22 (FDX-Locus, Spectrum green) sowie der CEP11 (D11Z1) SpectrumAqua Probe (Abbott/Vysis).

²Die Analyse wurde mit der LSI CHOP (12q13) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott/Vysis) durchgeführt. Dabei liegt eine Spectrum orange-markierte Sonde zentromerisch des CHOP-Gens und eine Spectrum green-markierte Sonde telomerisch des CHOP-Gens.

³Der verwendete Assay besteht aus den BAC-Klonen RP11-175B12, RP11-58C16 und RP11-233H19 (Spectrum orange) sowie RP11-34F20, RP11-480P3 und RP11-369L4 (Spectrum green) der Chromosomenregion 13q14.3.

⁴Die Analyse wurde mit der LSI 13/21 Probe (Abbott/Vysis) durchgeführt. Dabei liegt eine Spectrum green-markierte Sonde innerhalb des RB1-Locus in der Chromosomenregion 13q14.2 und eine Spectrum orange-markierte Sonde in der Chromosomenregion 21q22.13-q22.2.

⁵Der verwendete Assay besteht aus den BAC-Klonen RP11-400F19 (17q21.31, Spectrum green) und RP11-199F11 (17p13.1, P53-Gen, Spectrum orange) sowie der CEP 17 (D17Z1) SpectrumAqua Probe (Abbott/Vysis).

Ko: Kolokalisation; n.a.: nicht auswertbar; n.d.: nicht durchgeführt

Ergebnisse

Tabelle 37: Zusätzliche genetische Veränderungen der del(14)(q24q32)-positiven Lymphome im Vergleich zu B-CLL allgemein

Genetische Veränderung	13q-Deletion	11q-Deletion	Trisomie 12	17p-Deletion	IgV _H -Mutation ¹
Häufigkeit der					
Aberration in B-CLL allgemein, gemäß Literatur [44]	57,4 % (287/500)	12,0 % (60/500)	13,6 % (68/500)	7,0 % (35/500)	59,3 % (261/440)
Häufigkeit der					
Aberration in B-CLL mit del(14)(q24q32) in dieser Arbeit (n = 33)	9,1 % (3/33)	0,0 % (0/33)	39,4 % (13/33)	15,2 % (5/33)	23,8 % (5/21)
Häufigkeit der					
Aberration in NHL mit del(14)(q24q32) in dieser Arbeit (n = 12)	8,3 % (1/12)	0,0 % (0/11)	33,3 % (4/12)	0,0 % (0/12)	80,0 % (4/5)

¹Der IgV_H-Status wurde als mutiert bezeichnet, wenn, verglichen mit der Keimbahnsequenz, mehr als 2 % somatische Mutationen aufgetreten sind [75].

B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; NHL: Non-Hodgkin Lymphom.

Die für B-CLL typischen genetischen Veränderungen konnten sowohl in der Gruppe der diagnostizierten B-CLL als auch in der Gruppe der Non-Hodgkin Lymphome (sieben nicht weiter charakterisierte NHL, sechs niedrig maligne Lymphome, Anhang 7) identifiziert werden. Es besteht aus dem Grund die Vermutung, dass es sich zumindest bei einem Teil der 13 Non-Hodgkin Lymphome ebenfalls um B-CLL handelt.

Die 13q-Deletion tritt in B-CLL mit Deletion del(14)(q24q32) wesentlich seltener auf als allgemein in B-CLL (p-Wert < 0,0001; exakter Fisher-Test). Die Trisomie 12 hingegen kommt in B-CLL mit Deletion del(14)(q24q32) signifikant häufiger vor als allgemein in B-CLL (p-Wert = 0,0001; exakter Fisher-Test).

4.3.11 Screening der del(14)(q24q32)-positiven Fälle auf homozygote Deletionen des *TRAF3*-Gens

Trotz der Rekurrenz der Bruchpunkte in der Region 14q24 in Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) könnte dem pathologischen Mechanismus der Deletion im langen Arm von Chromosom 14 auch eine Inaktivierung von einem oder mehreren Tumorsuppressorgenen zu Grunde liegen. Innerhalb der deletierten Region liegt das Tumorsuppressorgen TNF receptor associated factor 3 (*TRAF3*), dessen biallelische Inaktivierung im Multiplen Myelom und im Morbus Waldenström nachgewiesen wurde [73, 177, 178].

Um zu untersuchen, ob biallelische Inaktivierungen von *TRAF3* in Fällen mit Deletion $\text{del}(14)(\text{q}24\text{q}32)$ auftreten, wurde zunächst ein FISH-Assay zur Detektion von homozygoten Deletionen von *TRAF3* etabliert. Dieser bestand aus dem in Spectrum green-markierten BAC-Klon CTD-3235K2, der innerhalb des *TRAF3*-Gens hybridisiert, und dem in Spectrum orange-markierten BAC-Klon RP11-977G1, der außerhalb der Deletion $\text{del}(14)(\text{q}24\text{q}32)$ hybridisiert und als interne Kontrolle diente (Abbildung 49). Beide Klone zeigten an Metaphasen von Zellen aus peripherem Blut von Probanden mit normalem Karyotyp die richtige Lokalisation und Spezifität. Die gemäß Abschnitt 3.2.10 berechnete Nachweisgrenze für einen heterozygoten Verlust des Klons CTD-3235K2 bei Anwesenheit des Klons RP11-977G1 betrug 3,1 %. Die errechnete Nachweisgrenze für einen homozygoten Verlust betrug 0 % und wurde auf einen Wert von 3 % festgelegt.

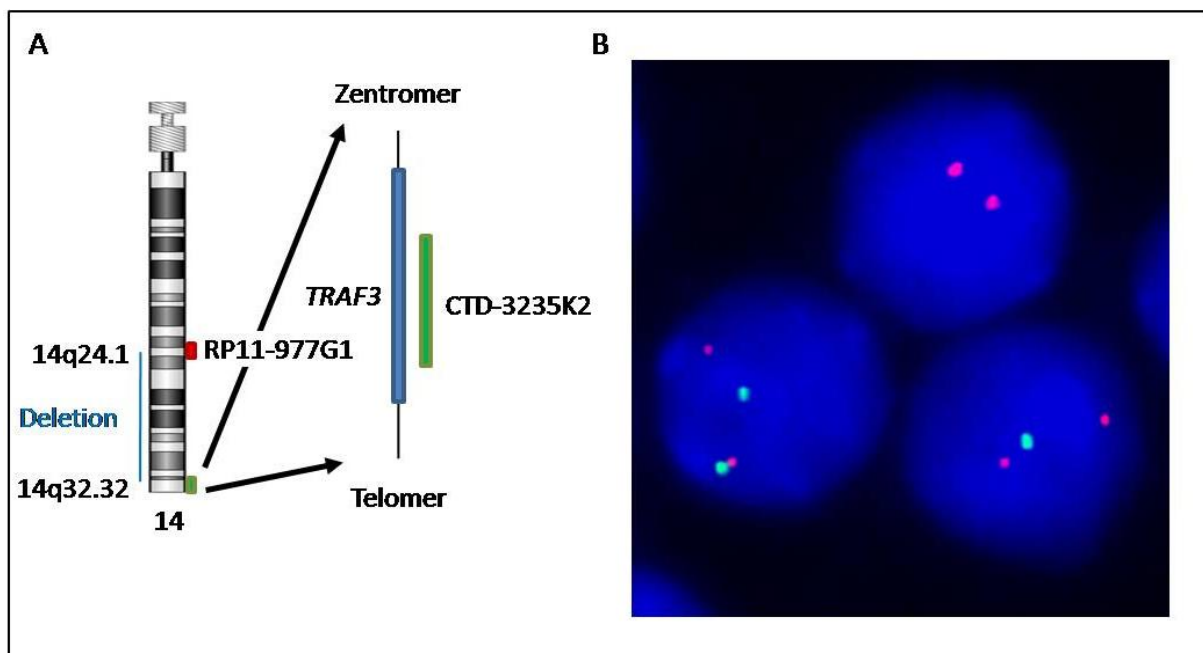


Abbildung 49: Zweifarb-FISH-Assay zur Detektion homozygoter *TRAF3*-Deletionen. **A)** Schematische Darstellung des Assays. Der Bereich der Deletion $\text{del}(14)(\text{q}24\text{q}32)$ ist durch eine senkrechte blaue Linie dargestellt. **B)** Zwei Interphase-Zellkerne des Falls III-13 mit subklonaler homozygoter Deletion des Klons CTD-3235K2. Der linke Zellkern weist eine normale Signalkonstellation mit zwei roten und zwei grünen Signalen auf. Der rechte Zellkern zeigt eine heterozygot deletierte Signalkonstellation des Klons CTD-3235K2 mit zwei roten Signalen und einem grünen Signal. In der oberen Zelle sind nur zwei rote Signale zu sehen, was auf eine homozygote Deletion des Klons CTD-3235K2 hinweist.

Mit dem *TRAF3*-FISH-Assay wurden 42 Fälle mit Deletion $\text{del}(14)(\text{q}24\text{q}32)$ und ausreichendem Material gescreent. Zwei der Fälle zeigten in 62 % (Fall III-13) bzw. 64 % (Fall III-37) der Zellkerne homozygote *TRAF3*-Deletionen, wobei im Fall III-13 zusätzlich 14 % der Kerne mit heterozygoter Deletion zu sehen waren. Außerdem konnten in vier Fällen

(III-12, III-24, III-32 und III-39) subklonal homozygote *TRAF3*-Deletionen in 7-14 % der aberranten Kerne identifiziert werden. Die Ergebnisse des Screenings sind ausführlich im Anhang 13 aufgeführt.

4.3.12 Bestätigung der homozygoten Deletionen mittels Array-CGH

Die mittels FISH identifizierten *TRAF3*-Deletionen sollten im Folgenden mit Hilfe der Array-CGH bestätigt werden. Dies konnte nur in den beiden Fällen durchgeführt werden, bei denen der Anteil von Zellen mit homozygoter *TRAF3*-Deletion über 60 % lag. Im Fall III-13 wurde der Array HG18 CGH 385K WG Tiling v2.0 von Roche NimbleGen verwendet. Die homozygote Deletion ließ sich bestätigen und erstreckte sich über etwa 690 kb von 101,99 Mb bis 102,68 Mb. Der Array zeigte insgesamt eine relativ starke Streuung der Signalstärke, weshalb für den zweiten Fall mit homozygoter *TRAF3*-Deletion die Array-CGH Plattform Human Genome CGH Microarray 244A (Agilent) verwendet wurde. Auch in diesem Fall ließ sich die homozygote Deletion bestätigen. Sie erstreckte sich über 670 kb von 102,00 Mb bis 102,67 Mb (Abbildung 50). Die zentromerischen und telomerischen Bruchpunkte der beiden homozygoten Deletionen liegen nur etwa 6 kb und 12 kb auseinander. In den Bruchpunktregionen liegen die Gene *KIAA0329* beziehungsweise *TNFAIP2*. Innerhalb der homozygot deletierten Region befinden sich neben *TRAF3* die Gene *ANKRD9*, *RCOR1*, *AMN*, *CDC42BPB* und *C14orf73*. *TNFAIP2* (tumor necrosis factor alpha induced protein 2) wird durch den Tumornekrosefaktor (TNF) induziert, ein Zytokin, das unter anderem eine Wirkung auf Apoptose und Zellproliferation hat [179]. Die Proteine, für die die anderen in der Region liegenden Gene kodieren, sind hypothetisch oder haben eine Funktion, die nicht auf eine Rolle in der Tumorgenese hinweist.

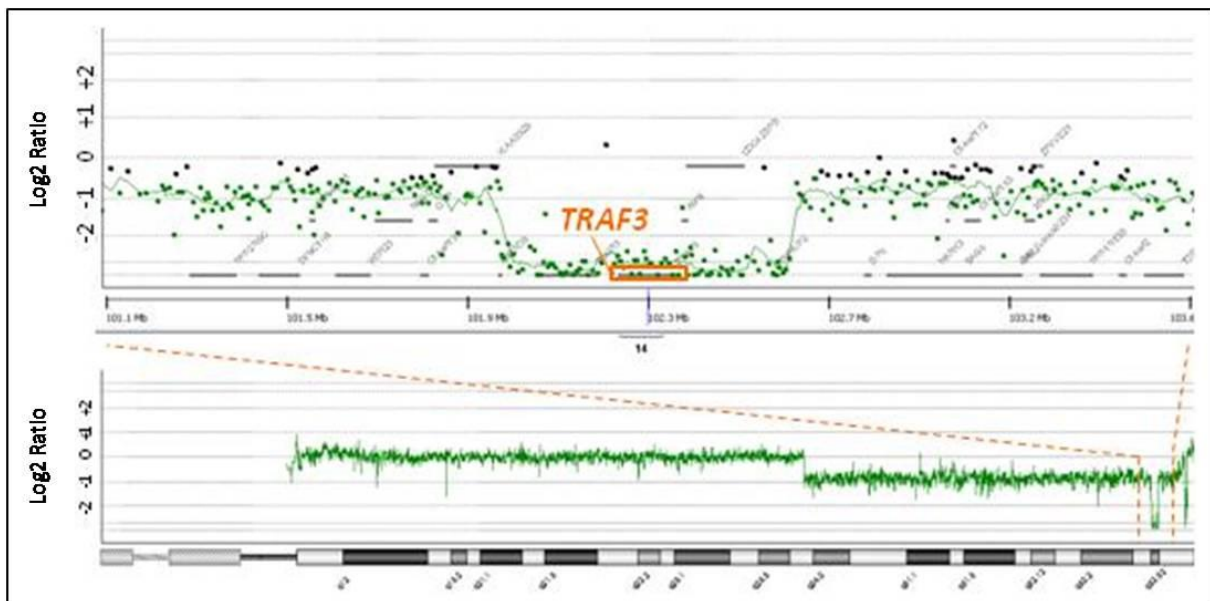


Abbildung 50: Bestätigung der homozygoten Deletionen des Falls III-37 mittels Array-CGH mit dem Human Genome CGH Microarray Kit 244A (Agilent). Unten ist das Profil der genomischen Imbalancen von Chromosom 14 in Form einer durchgehenden Linie angezeigt. Oben ist der Bereich der homozygoten Deletion vergrößert dargestellt. Jedes Oligonukleotid ist hier durch einen Punkt wiedergegeben, wobei die von der Software als normal gewerteten Oligonukleotide in Form von schwarzen Punkten und die als deletiert gewerteten Oligonukleotide in Form von grünen Punkten dargestellt sind. Graue Balken stellen die annotierten Gene dar. Eine Log2 Ratio von ~ 0 entspricht einem balancierten Chromosomenstatus. Negative Werte bedeuten chromosomale Verluste, positive Werte bedeuten chromosomale Zugewinne.

4.3.13 *TRAF3*-Mutationsanalyse mittels DHPLC und anschließender Sequenzierung aberranter Fragmente

Um zu untersuchen, ob das zweite *TRAF3*-Allel in Fällen mit heterozygoter Deletion $\text{del}(14)(\text{q}24\text{q}32)$ durch Punktmutationen inaktiviert worden sein könnte, wurde an 30 dieser Fälle mit ausreichend DNA und einem Tumorzellgehalt von mindestens 35 % eine Mutationsanalyse von *TRAF3* mittels DHPLC durchgeführt. Das *TRAF3*-Gen enthält zwölf Exons, von denen die ersten beiden Exons nicht kodierend sind. Die Mutationsanalyse wurde ausschließlich an den zehn kodierenden Exons 3-12 einschließlich der Exon-/Intron-Grenzen durchgeführt (NM_145725). Analyisierte Fragmente, deren DHPLC-Chromatogramme sich gegenüber einer parallel analysierten Kontrolle auffällig zeigten, wurden sequenziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 38 aufgelistet.

Zusammenfassend zeigten drei Fälle insgesamt fünf Mutationen, die voraussichtlich die Funktion des TRAF3-Proteins beeinträchtigen. Der Fall III-23 zeigte eine Ein-Basen-Deletion in Exon 8, die voraussichtlich zur Rasterverschiebung und zum vorzeitigen Kettenabbruch führt und somit einen Teil des Zinkfingermotifs, die Isoleucin-Zipper-Domäne und die MATH/TRAF3-Domäne zerstört (Abbildung 51A). Das Exon 4 des Falls III-5 zeigte eine

Überlagerung verschiedener Sequenzen im Elektropherogramm. Nach Klonierung des PCR-Produktes konnten die Sequenzen von sieben Klonen ausgewertet werden, die drei verschiedene Veränderungen aufwiesen: Drei Klone zeigten eine Ein-Basen-Deletion am Ende des vierten Exons, die ebenfalls voraussichtlich zur Rasterverschiebung und zum vorzeitigen Kettenabbruch führt, wodurch nur noch ein Teil der Ringfingerdomäne des TRAF3-Proteins intakt bleibt. In zwei weiteren Klonen konnte eine 15 Basenpaar-in-frame-Deletion identifiziert werden, die über die Spleißstelle des 3'-Endes von Exon 4 hinausging und somit eine veränderte Ringfingerdomäne zur Folge haben sollte. Die dritte Mutation in diesem Fall wurde in einem Klon identifiziert und betraf das Intron zwischen dem vierten und fünften Exon, woraus sich kein offensichtlicher Defekt im TRAF3-Protein ergibt (Abbildung 51B). Im Fall III-29 konnten insgesamt zwei Mutationen in den Exons 3 und 10 gefunden werden. Die Transition von A zu G im Exon 3 führt zu einem Aminosäureaustausch von Cystein zu Arginin innerhalb der Konsensussequenz des Ringfingermotifs, wodurch wahrscheinlich die Fähigkeit, Zink zu binden verloren geht [180]. Die Transition von G zu A im Exon 10 war in der Sequenz nicht eindeutig, wurde aber mittels Größenbestimmung nach Surveyor-Nuklease-Verdau bestätigt. Die Veränderung betrifft die Spleißstelle des 5'-Endes von Exon 10, was ebenfalls zu einem veränderten Protein führen muss (Abbildung 51C). In der Human Genome Browser Datenbank (<http://genome.ucsc.edu/>, dbSNP build 130) gibt es keine Hinweise für SNPs an diesen Sequenzpositionen. Auch DHPLC- und Sequenz-Analysen an jeweils mindestens 50 DNA-Proben aus peripherem Blut gesunder Probanden zeigten keine entsprechenden Veränderungen.

Tabelle 38: Ergebnisse der DHPLC-Analyse sowie anschließender Sequenzierung aberranter Fragmente des TRAF3-Gens

Fall-Nummer	Fragmente mit auffälligem DHPLC-Chromatogramm ¹	Sequenzanalyse der Fragmente ²
III-1	Exon 4 Exon 9	rs2295402 rs2273393
III-3	Exon 9	Wildtyp-Sequenz
III-4	-	-
III-5	Exon 4	<i>c.296delA</i> (3/7 Klone); <i>c.288_297+6del15</i> (2/7 Klone); <i>c.297+12T>G</i>
III-6	Exon 10	Wildtyp-Sequenz

Ergebnisse

Fall- Nummer	Fragmente mit auffälligem DHPLC- Chromatogramm ¹	Sequenzanalyse der Fragmente ²
III-7	Exon 3	rs28670970
	Exon 4	rs2295402
	Exon 5	rs1131877
	Exon 7	rs28410620
	Exon 9	rs2273393
	Exon 10	Wildtyp-Sequenz
III-8	Exon 4	rs2295402
	Exon 9	rs2273393
III-9	Exon 5	Wildtyp-Sequenz
III-10	-	-
III-11	Exon 4	rs2295402
	Exon 5	Wildtyp-Sequenz
III-12	Exon 3	Wildtyp-Sequenz
III-14	Exon 7	rs28410620
III-15	Exon 4	rs2295402
	Exon 9	rs2273393
III-16	Exon 4	rs2295402
	Exon 7	rs28410620
	Exon 9	rs2273393
	Exon 12	c.1707*13C>T (flankierende 3'-UTR)
III-18	-	-
III-20	Exon 5	Wildtyp-Sequenz
	Exon 10	Wildtyp-Sequenz
III-22	Exon 5	Wildtyp-Sequenz
	Exon 7	Wildtyp-Sequenz
	Exon 8	Wildtyp-Sequenz
	Exon 9	Wildtyp-Sequenz
	Exon 10	Wildtyp-Sequenz
	Exon 12	Wildtyp-Sequenz
III-23	Exon 8	c.669delA
	Exon 10	Wildtyp-Sequenz
III-24	Exon 4	Wildtyp-Sequenz
	Exon 10	Wildtyp-Sequenz
III-25	-	-
III-26	Exon 12	Wildtyp-Sequenz
III-27	Exon 4	Wildtyp-Sequenz
III-28	-	-
III-29	Exon 3	c.157T>C
	Exon 4	rs2295402
	?	Wildtyp-Sequenz
	Exon 10	c.820-1G>A
III-30	-	-
III-31	Exon 9	Wildtyp-Sequenz
III-32	-	-
III-33	Exon 11	Wildtyp-Sequenz
III-34	Exon 10	c.963+67T>G (flankierende Intronsequenz)
III-41	Exon 5	Wildtyp-Sequenz
III-42	Exon 4	rs2295402
	Exon 9	rs2273393

¹Die Primer für die DHPLC-Analyse wurden etwa 75 bp vor bzw. hinter die Exon-Grenzen positioniert, um auch die Exon-Intron-Grenzen zu analysieren.

²Die Mutationen wurden anhand der Referenzsequenz NM_145725 auf cDNA-Ebene angegeben.
-: keine auffälligen DHPLC-Chromatogramme; rs: reference SNP; UTR: untranslatierte Region

Ergebnisse

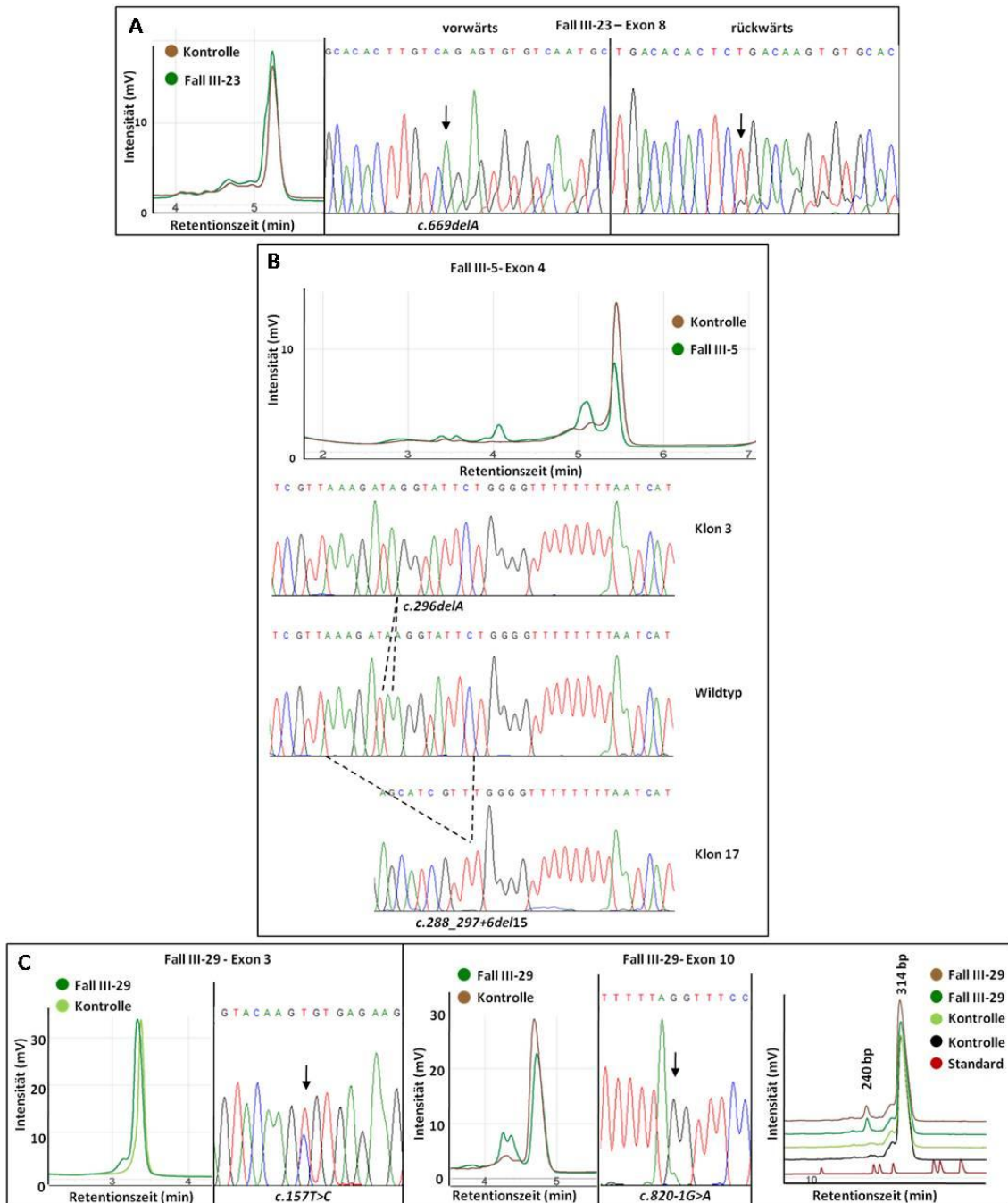


Abbildung 51: Mutationsdetection im *TRAF3*-Gen mittels DHPLC-Analyse, Sequenzierung und gegebenenfalls Größenbestimmung nach Surveyor-Nukleaseverdau. Als Kontrolle für die DHPLC bzw. den Nukleaseverdau wurde DNA aus peripherem Blut gesunder Probanden verwendet. **A)** DHPLC-Chromatogramm, Vorwärts- und Rückwärtssequenzausschnitt von Exon 8 des Falls III-23, welche die Deletion *c.669delA* anzeigen. **B)** DHPLC-Chromatogramm und Sequenzausschnitte von Exon 4 des Falls III-5. Die PCR-Produkte des Falls wurden vor der Sequenzierung kloniert. Die Sequenzen der Klone 3 und 17 mit den Mutationen *c.296delA* bzw. *c.288_297+6del15* sind beispielhaft dargestellt. Die gestrichelten Linien geben an, welche Sequenzausschnitte des Wildtyps in den Klonen deletiert sind. **C)** DHPLC-Chromatogramme, Sequenzausschnitte und Größenbestimmung nach Surveyor-Nukleaseverdau im Fall III-29, die Mutationen *c.157T>C* (Exon 3) und *c.820-1G>A* (Exon 10) nachweisen. Die Größenbestimmung nach Surveyor-Nuklease-Verdau zeigt im Fall III-29 im Vergleich zur Kontrolle einen zusätzlichen Peak bei 240 bp, was mit der erwarteten Fragmentgröße bei einer Fehlpaarung in Basenposition 240 durch die Mutation *c.820-1G>1* übereinstimmt. Die Mutationen wurden auf cDNA-Ebene anhand der Referenzsequenz NM_145725 (*TRAF3* Isoform 1) angegeben.

Ergebnisse

Insgesamt konnte in 9 von 42 Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) mittels FISH-, Array-CGH- und DHPLC-Analyse eine voraussichtlich biallelische Inaktivierung von *TRAF3* identifiziert werden. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 39 zusammengefasst.

Tabelle 39: Fälle mit voraussichtlich biallelischer Inaktivierung des *TRAF3*-Gens in del(14)(q24.1q32.33)-positiven Lymphomen

Fall- Nummer	Diagnose	Anteil der bei der FISH- Analyse aberranten Kerne (Anzahl der <i>TRAF3</i> - Kopien)	<i>TRAF3</i> -Aberrationen* - DNA Veränderung und prognostizierte Protein-Veränderung (Nachweismethode)
III-13	B-CLL	62 % (x 0); 14 % (x 1)	Subklonale homozygote Deletion (FISH, Array-CGH)
III-37	SMZL	64 % (x 0)	Homozygote Deletion (FISH, Array-CGH)
III-24	MCL	14 % (x 0); 68 % (x 1)	Subklonale homozygote Deletion (FISH)
III-32	Nicht weiter charakterisiertes Lymphom	7 % (x 0); 82 % (x 1)	Subklonale homozygote Deletion (FISH)
III-39	MZL	7 % (x 0); 37 % (x 1)	Subklonale homozygote Deletion (FISH)
III-12	B-CLL	11 % (x 0); 76 % (x 1)	Subklonale homozygote Deletion (FISH)
III-23	Niedrig malignes NHL	97 % (x 1)	<i>c.669delA</i> → <i>p.Ser223fs</i> (DHPLC, Sequenzierung)
III-5	B-CLL	90 % (x 1)	<i>c.296delA</i> (3/7 Klone) → <i>p.Lys99fs</i> <i>c.288_297+6del15</i> (2/7 Klone) → voraussichtliche Spleißstellen-Mutation (Exon 4/Intron) (DHPLC, Sequenzierung)
III-7	B-CLL	84 % (x 1)	<i>c.[157T>C; 820-1G>A]</i> → <i>p.Cys53Asp</i> + voraussichtliche Spleißstellen-Mutation (Intron/Exon 10) (DHPLC, Sequenzierung, Surveyor-Nuklease-Verdau)

* Die Mutationen wurden anhand der Referenzsequenz NM_145725 (*TRAF3* Isoform 1) angegeben.

B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; MCL: Mantelzell-Lymphom; MZL: Marginalzonen-Lymphom; NHL: Non-Hodgkin Lymphom; SMZL: Splenisches Marginalzonenlymphom.

4.3.14 *TRAF3*-Expressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR

Da eine verringerte Expression des zweiten *TRAF3*-Allels durch weitere Mechanismen wie epigenetisches Silencing oder Mutationen in regulatorischen Sequenzen hervorgerufen werden könnte und auch die heterozygote Deletion eines Gens entscheidenden Einfluss auf dessen Gesamtexpression haben kann, wurde eine *TRAF3*-Expressionsanalyse mittels

quantitativer RT-PCR durchgeführt. Es wurden kommerzielle Primerassays für das zu untersuchende *TRAF3*-Gen sowie für die zur Normalisierung benötigten Housekeeping-Gene Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), β -Glucuronidase (*GUSB*) und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (*G6PD*) verwendet. Die Untersuchungen wurden an 10 Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) durchgeführt, wobei der Fall III-13 eine homozygote Deletion aufwies. Da es sich bei diesen Fällen überwiegend um B-CLL handelt, wurden zum Vergleich auch elf B-CLL ohne mittels FISH detektierbarer Deletion del(14)(q24q32), aber mit den für diese Entität typischen Chromosomenveränderungen Trisomie 12 (n = 3), 13q-Deletion (n = 3), 11q-Deletion (n = 3) beziehungsweise 17p-Deletion (n = 2) untersucht. Bezogen wurde die Expression dieser Fälle und Kontrollen zur Ermittlung des $\Delta\Delta$ CT-Wertes auf den *TRAF3*-Gehalt von kommerzieller cDNA aus B-Zellen (CD19-positiv) des peripheren Blutes von gesunden Probanden (Allcells). Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt, aus denen der Mittelwert berechnet wurde. Die cDNA des Housekeeping-Gens *GUSB* konnte zum Teil nicht detektiert werden oder die CT-Werte lagen zu hoch, weshalb zur Normalisierung ausschließlich die Gene *HPRT1* und *G6PD* verwendet wurden. Die relativen Standardabweichung lagen zwischen 0,2-0,7 % (Mittelwert 0,4).

Alle Fälle mit Deletion del(14)(q24q32) zeigten eine erniedrigte Expression der *TRAF3*-Transkripte im Vergleich zu den B-Zellen des peripheren Blutes. Auch im Vergleich zu den B-CLL ohne Deletion del(14)(q24q32) zeigten diese Fälle eine signifikant erniedrigte Expression ($p = 0,0005$). Im Fall III-13 mit homozygoter *TRAF3*-Deletion konnte eine geringe *TRAF3*-Expression gemessen werden, die wahrscheinlich auf die kontaminierenden normalen Zellen des Tumormaterials zurückzuführen ist. Die normalen Zellen müssen auch in den übrigen Fällen für die Interpretation berücksichtigt werden. In Abbildung 52 sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse dargestellt, wobei auch der mittels FISH bestimmte Tumorzellgehalt angegeben ist.

Insgesamt konnte durch die quantitativen RT-PCR-Untersuchungen eine geringere *TRAF3*-Expression in Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen auf mRNA-Ebene gezeigt werden.

Ergebnisse

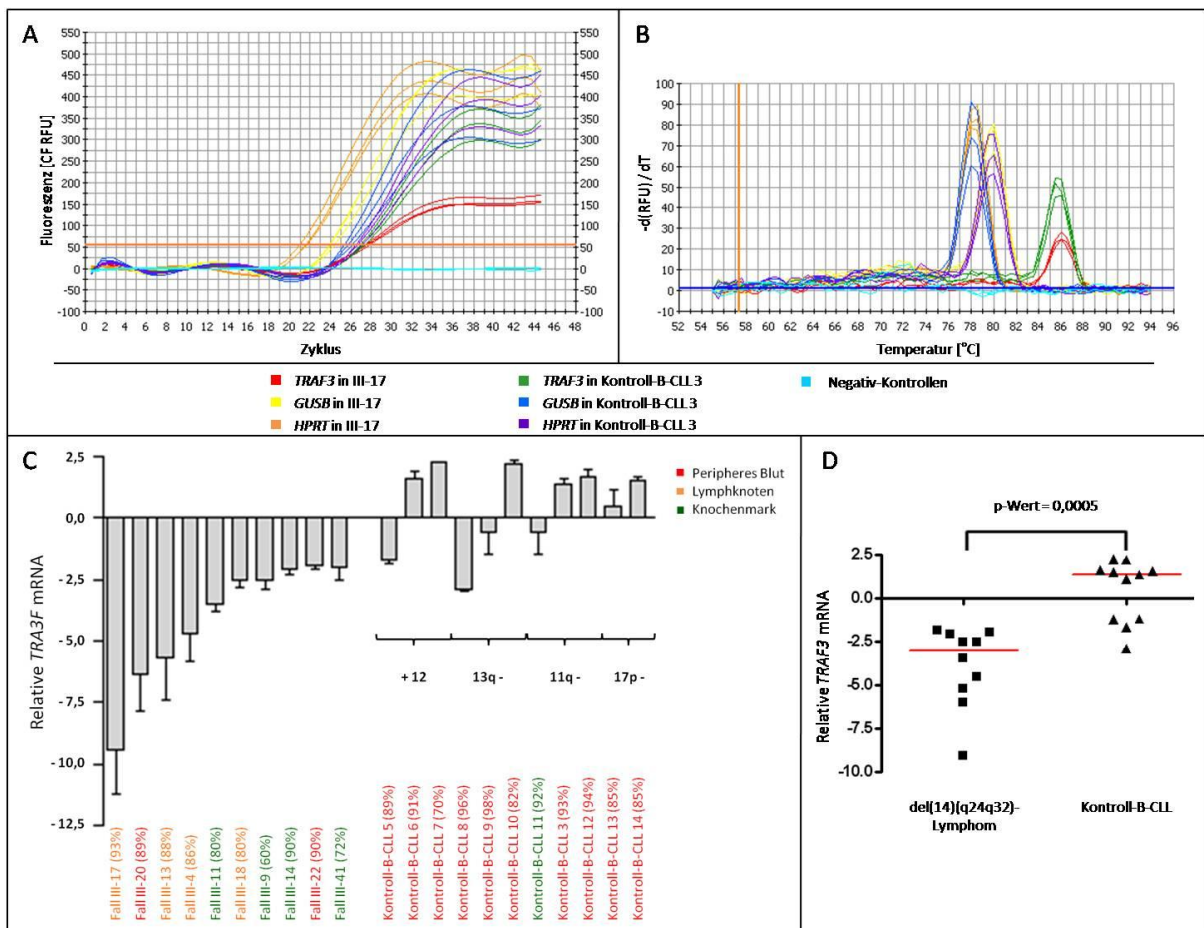


Abbildung 52: Quantitative RT-PCR zur Untersuchung der *TRAF3*-mRNA-Expression in Lymphomen mit und B-CLL ohne Deletion del(14)(q24q32). **A-B**) Beispiel für die Echtzeit-Quantifizierung der PCR-Produkte. Gezeigt sind die Messungen des Falls III-17 und der Kontroll-B-CLL 3 mit Primerassays für die Gene *TRAF3*, *GUSB* und *HPRT* in III-17. **A**) Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklen. Der Zyklus, bei dem die horizontale, orange Linie erreicht wird, gilt jeweils als CT-Wert. **B**) Schmelzkurve dargestellt als Veränderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit bei steigender Temperatur. **C-D**) Relative *TRAF3*-Expression in Lymphomen mit und B-CLL ohne (Kontroll-B-CLL) Deletion del(14)(q24q32), angegeben durch den Fold change der Ratio, ermittelt durch die $\Delta\Delta CT$ -Methode. **C**) Relative *TRAF3*-Expression dargestellt in Form eines Säulendiagramms. Der Tumorzellgehalt ist in Klammern genannt. Das *TRAF3*-Gen ist im Fall III-13 homozygot deletiert. **D**) Vergleich der relativen *TRAF3*-Expression in Fällen mit (links) und ohne (rechts) Deletion del(14)(q24q32) in Form eines Scatter plots. Die roten horizontalen Linien geben das arithmetische Mittel an. Der p -Wert wurde mit dem Mann-Whitney-Test ermittelt.

B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; CF RFU: Curve Fit Relative Fluorescence Units

4.3.15 Westernblot-Analyse des TRAF3-Proteins

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Expression des TRAF3-Proteins in Lymphomen mit Deletion del(14)(q24q32) im Vergleich zu B-CLL ohne diese Aberration ebenfalls erniedrigt ist. Als Positivkontrollen mit bekannter hoher *TRAF3*-Expression diente die Anaplastisch großzellige Lymphom (ALCL)-Zelllinie SUDHL1 sowie eine Tonsille (Anhang 9) [181, 182]. Es wurden die kommerziell erhältlichen polyklonalen TRAF3-Antikörper H-122 und H-20 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) getestet, die beide aus dem Kaninchen gewonnen wurden. Die Antikörper erkennen die Aminosäuren 322-444 (H-122) beziehungsweise den N-

Terminus (H-20) des TRAF3-Proteins. Um die Proteinbeladung des Elektrophoresegels und das erfolgreiche Blotten und Färben überprüfen zu können, wurde der Westernblot anschließend mit einem als interne Kontrolle dienenden monoklonalen α -Tubulin-Antikörper (Abcam) aus der Maus entwickelt.

Mit dem H-20-Antikörper wurden viele unspezifische Banden detektiert, weshalb dieser Westernblot nicht zu interpretieren war (Daten nicht gezeigt). Der H-122-Antikörper zeigte deutliche Banden in der zu erwartenden Größe von 67 kD. Zusätzlich waren wenige, meist schwächere Banden zu erkennen. Eine Korrelation der auf Tubulin normalisierten TRAF3-Expression zur mRNA-Expression oder zur Deletion fand sich aber nicht.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen zeigen können, dass die Deletion del(14)(q24q32) wiederkehrend auftritt und mit der B-CLL assoziiert ist. Die zentromerischen Bruchpunkte liegen im *ZFP36L1*-Gen überwiegend im Intron, zu einem geringeren Teil aber auch im zweiten Exon des Gens. Die telomerischen Bruchpunkte sind überwiegend in der S μ -Region des *IGH*-Locus zu finden, konnten jedoch auch in den Switch gamma-Regionen und in der Joining-Region des *IGH*-Locus identifiziert werden. Des Weiteren konnte die Existenz von Fusionstranskripten zwischen dem Exon I μ des *IGH*-Locus und dem zweiten Exon des *ZFP36L1*-Gens gezeigt werden. Dabei ist in den Fällen mit Deletionsbruchpunkt im zweiten Exon von *ZFP36L1* der größte Teil des zweiten Exons verloren gegangen.

In einer Variantdeletion des langen Arms von Chromosom 14 liegt der zentromerische Bruchpunkt im *ZFP36L1*-Gen, der telomerische Bruchpunkt liegt jedoch in der Region 14q32.11 um die Gene *EML5*, *TTC8* und *FOXN3*. In einem weiteren Fall konnte ein Translokationsbruchpunkt etwa 800 kb zentromerisch des *ZFP36L1*-Gens identifiziert werden. Dabei hat unmittelbar zentromerisch des Bruchpunktes eine ca. 1,5 Mb große Deletion stattgefunden, die sich bis zum *RAD51L1*-Gen erstreckte.

Eine Deregulation der Gene *ZFP36L1* und *RAD51L1* in Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) im Vergleich zu B-CLL ohne diese Aberration konnte nicht gezeigt werden. In einem dieser Fälle konnte jedoch eine Deletion von zwölf Basenpaaren im zweiten Exon des *ZFP36L1*-Gens identifiziert werden.

Molekularzytogenetische Analysen haben ergeben, dass die lymphatischen Neoplasien mit Deletion del(14)(q24q32) signifikant häufiger mit einer Trisomie 12 assoziiert sind als B-CLL im Allgemeinen, dafür aber wesentlich seltener eine 13q-Deletion zeigen.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass biallelische Inaktivierungen von TRAF3 in etwa 22 % der Fälle mit Deletion del(14)(q24q32) vorkommen. Darüber hinaus konnte in del(14)(q24q32)-positiven Fällen eine Herunterregulation der *TRAF3*-Expression auf mRNA-Ebene, jedoch nicht auf Protein-Ebene festgestellt werden.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Genen, die bei der Entstehung und Manifestation von lymphatischen Neoplasien der B-Zell-Reihe von Bedeutung sind. Dabei sollten Kandidatengene aufgedeckt werden, die durch Veränderungen des Chromosoms 14 dereguliert werden. Die Kartierung der Aberrationen wurde mittels FISH-, Array-CGH- und PCR-basierten Techniken durchgeführt. Durch die Charakterisierung von bisher unbekanntem Translokationspartnern, die in die Nähe des in B-Zellen transkriptionsaktiven *IGH*-Locus in der Chromosomenbande 14q32 gelangen, sollten neue Onkogene in B-Zell-Erkrankungen gefunden werden. Eine weitere Intention war, die pathophysiologische Bedeutung von Deletionen des langen Arms von Chromosom 14 zu analysieren. Das Screening von lymphatischen Neoplasien mittels FISH-Analysen ermöglichte Aussagen über die Häufigkeit der jeweiligen Aberrationen in diesen Erkrankungen und gegebenenfalls Assoziationen mit bestimmten Entitäten. Weiterführende molekularzytogenetische, molekulargenetische und proteinanalytische Verfahren sollten zeigen, inwieweit die identifizierten Kandidatengene tatsächlich eine Rolle in der Genese der malignen Erkrankungen spielen.

Zusammengefasst lieferten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien an lymphatischen Neoplasien die folgenden wesentlichen Ergebnisse:

1. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass chromosomale Translokationen einen Mechanismus zur Überexpression des *TERT*-Gens darstellen, was eine erhöhte Telomerase-Aktivität zur Folge hat. Diese Veränderungen sind in lymphatischen Neoplasien, insbesondere in MCL und B-CLL, wiederkehrend.
2. Das für Cyclin E1 kodierende Gen *CCNE1* konnte als neues Onkogen in B-Zell-Erkrankungen identifiziert werden.
3. Es konnte gezeigt werden, dass Translokationen und Amplifikationen der *SPIB*-Region in ABC-DLBCL rekurrent sind und Zugewinne des Locus in mehr als einem Drittel dieser Lymphome auftreten.
4. Durch die Deletion $\text{del}(14)(\text{q}24\text{q}32)$ wird der *IGH*-Locus mit dem *ZFP36L1*-Gen zusammengelagert. Es handelt sich dabei um ein rekurrentes Ereignis, das vor allem B-

CLL betrifft und häufig mit der Trisomie 12 assoziiert ist. Zudem konnten *I μ -ZFP36L1*-Fusionstranskripte nachgewiesen werden.

5. Del(14)(q24q32)-positive Lymphome zeigen eine erniedrigte Expression von *TRAF3*-mRNA. Biallelische Inaktivierungen von *TRAF3* konnten in 22 % der Fälle mit Deletion beobachtet werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zunächst im Hinblick auf die methodischen Aspekte der Bruchpunktkartierung und anschließend auf deren biologische Bedeutung diskutiert.

5.1 Methodische Aspekte der Bruchpunktkartierung

Um Kandidatengene zu identifizieren, die durch chromosomale Aberrationen des Chromosoms 14 dereguliert werden, wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche, sich ergänzende Strategien verwendet: FISH, Array-CGH und PCR-Analysen. Die methodischen Aspekte dieser Technologien hinsichtlich der Bruchpunktkartierung werden im Folgenden diskutiert.

5.1.1 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur Eingrenzung von Bruchpunkten

Die FISH-Technik konnte erfolgreich zur Eingrenzung der Bruchpunkte in 5p15.33 und 14q24 angewandt werden. Die Auflösung ist jedoch durch die Größe der Klone (BAC-Klone 150-350 kb; Fosmid-Klone etwa 40 kb) limitiert. Kleinere, beispielsweise mittels PCR generierte FISH-Sonden, waren mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgrund der geringen Signalgröße nicht mehr hinreichend auswertbar (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren kann bei einem Split innerhalb des Klons nicht direkt vom Anteil der Signalgrößen auf die Lage des Bruchpunktes geschlossen werden, da innerhalb eines Klons bei der Hybridisierung unterschiedliche Spezifitäten und Sensitivitäten vorliegen können. Höhere Auflösungen können durch Techniken wie die Fiber-FISH-Analyse erreicht werden. Dabei liegen Interphase-DNA-Moleküle in gestreckter Form auf Objektträgern fixiert vor und werden so mit Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden hybridisiert. Auf diese Art sollen Auflösungen von bis zu 1 kb erreicht werden. Der Nachteil der Methode liegt darin, dass die standardisierte Präparation der DNA-Fiber sehr aufwendig ist, weshalb sie in der vorliegenden Arbeit nicht angewandt wurde [183-185].

Einige BAC-Klone konnten in der vorliegenden Arbeit nicht zur Bruchpunktkartierung eingesetzt werden, da sie auch auf anderen Chromosomen unspezifische Signale zeigten. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Klone repetitive Sequenzen enthielten, die durch die Cot1-DNA nicht ausreichend abgedeckt wurden. Bei der FISH-Analyse an Paraffin-Geweben ist zu bedenken, dass die Kerne teilweise angeschnitten sind und dadurch Teile des Genoms in diesen Zellen nicht detektiert werden können [186]. Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass im Fall des Screenings mit dem SPIB-Dreifarb-FISH-Assay für die Region 19q13.4 relativ viele Kerne mit nur einer Kolo-kalisation detektiert wurden. Hinzu kommt, dass es sich bei der Chromosomenregion 19q13 um eine Nucleolus organisierende Region handelt [187] und die Signale beider Chromosomen dadurch häufig übereinander liegen. Das zeigte sich auch in der hohen Nachweisgrenze für nur eine Kolo-kalisation (15,3 %).

5.1.2 Array-CGH zur Eingrenzung von Bruchpunkten

Die genomweite Array-CGH-Analyse war in dieser Arbeit hilfreich, wenn zunächst die grobe Lage der Bruchpunkte in Erfahrung gebracht werden sollte. Auch in der Literatur ist diese Methode der Bruchpunkteingrenzung von chromosomalen Imbalancen vor einer hochauflösenden Kartierung oder Bruchpunktklonierung häufig beschrieben. Dabei werden maximale Auflösungen von etwa 10 kb erreicht [147, 188-191]. Die Custom-Array-CGH-Analyse einer bestimmten Region wird hingegen im Allgemeinen eingesetzt, um Bruchpunkte noch genauer zu kartieren [191-193]. In der vorliegenden Arbeit konnten die Regionen mit dieser Technik auf bis zu ca. 100 bp eingegrenzt werden. Lediglich die Bruchpunktregionen der Deletion del(14)(q24q32) im *IGH*-Locus konnten mit der Custom-Array-CGH-Analyse nicht eindeutig bestimmt werden, was sich auf die vielen repetitiven Sequenzen und Umlagerungen im *IGH*-Locus zurückführen lässt [51]. Auffällig war im Fall der Custom-Array-CGH an den Lymphomen mit Deletion del(14)(q24q32), dass der „Normalwert“, der einen balancierten Chromosomenstatus anzeigt, über dem erwarteten Wert von Null lag. Dies resultierte wahrscheinlich aus dem zu geringen Anteil von genomweiten Oligonukleotiden im Verhältnis zu den Oligonukleotiden der deletierten Region, schränkte jedoch die Kartierung des Bruchpunktes nicht ein. Die Custom-Array-CGH-Analysen in 5p15.33 konnten die Bruchpunktregionen nur auf eine Größe von etwa 12 kb eingrenzen, da aufgrund der vielen Sequenzwiederholungen in diesem Bereich keine

spezifischen Oligonukleotid-Tags vorhanden waren. Auch war die Signalstreuung hier sehr stark, was möglicherweise ebenfalls damit zusammenhängt, dass repetitive Sequenzen in subtelomeren Regionen, wie der Region 5p15.33, stark verbreitet sind [194, 195].

In der vorliegenden Arbeit wurden Array-CGH-Analysen nur bei Fällen mit unbalancierten Veränderungen durchgeführt. Die Bruchpunkte von balancierten Translokationen, wie der t(5;14)(p15;q32), könnten in Zukunft auch mittels Array-Painting weiter eingegrenzt werden. Dabei werden die beiden an der Translokation beteiligten derivativen Chromosomen durchflusszytometrisch oder mittels Mikrodissektion isoliert, amplifiziert, differentiell markiert und anschließend auf einen hochauflösenden Array hybridisiert [196-199].

Eine alternative Möglichkeit der Eingrenzung von Bruchpunkten genomischer Imbalancen ist die Anwendung der quantitativen PCR an genomischer DNA. Diese Methode ist jedoch sehr empfindlich und gerade in Bereichen mit repetitiven Sequenzen stark fehleranfällig [200-204]. Die Bruchpunktkartierung mittels Southern-Blot ist ebenfalls problematisch in Regionen mit vielen Sequenzwiederholungen. Die beispielweise mittels PCR generierten Sonden der Bruchpunktregion sind dann nicht spezifisch. Zudem ist diese Analyse aufwendiger als die hier angewandten Methoden und es werden im Vergleich zu den genannten Methoden der Bruchpunkteingrenzung relativ große Mengen an Tumormaterial benötigt [111, 205, 206].

5.1.3 Klonierung von Bruchpunkten mittels verschiedener PCR-Techniken und anschließender Sequenzierung

Die genaue Lokalisation der Bruchpunkte konnte in 17 Lymphomen mit Deletion del(14)(q24q32) mittels LD-PCR und anschließender Sequenzierung bestimmt werden. Dies war möglich, da die Lage der Bruchpunkte in beiden Loci mittels FISH- und Array-CGH-Analyse ausreichend bestimmt wurde. Die Translokationen unter Beteiligung der Region 5p15.33 konnten auf diesem Wege jedoch nicht kloniert werden. Auch die zur Bruchpunktklonierung häufig eingesetzte LDI-PCR, die angewendet wird, wenn ein Teil der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und deren Länge unbekannt sind [162, 165, 207, 208], führte in dieser Arbeit, sowohl ausgehend vom *IGH*-Locus als auch von der Region 5p15.33, nicht zum gewünschten Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die LDI-PCR konnte jedoch, ausgehend vom *IGH*-Locus in 14q32 im Fall der Translokation t(14;19)(q32;q12) des DLBCL,

Zur Klonierung des Bruchpunktes der Translokationen t(5)(p15.33) wurden zwei weitere Methoden ausgehend von der Region 5p15.33 angewandt, die die Bestimmung von unbekannt Sequenzen nahe bekannter Sequenzen ermöglichen (Daten nicht gezeigt). Die „Genome Walker PCR“ mit dem Kit der Firma Clontech basiert auf dem Anlegen einer Genom-Bibliothek mit ligierten Adaptern. In den PCRs zur Klonierung des Bruchpunktes werden Adapter-spezifische zusammen mit Zielsequenz-spezifischen Primern verwendet (Ligation mediated PCR, LM-PCR) [210]. Bei der Anwendung des „DNA Walking SpeedUp“-Kits (Stratagene) wurden verschachtelte PCRs mit Zielsequenz-spezifischen Primern in Kombination mit verschiedenen Primern (Annealing Control Primer, ACP), die wahrscheinlich spezifisch für häufig auftretende Sequenzwiederholungen sind, durchgeführt. Keine der beiden Strategien führte zum Erfolg (Daten nicht gezeigt). Mit allen Methoden, die zur Bruchpunktklonierung der Translokation t(5)(p15.33) eingesetzt wurden (Direkte PCR, LDI-PCR, Genome Walker PCR, DNA Walking SpeedUp-PCR), konnten PCR-Amplifikate gewonnen werden. Einige Produkte wiesen die Keimbahnsequenzen der Chromosomenregionen 5p15.33 oder 14q32 auf, ohne den Bruchpunkt zu überspannen. Andere Produkte ergaben nach Sequenzanalyse mit Hilfe von „Human BLAT Search“ (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) keinerlei Homologien zu Sequenzen des menschlichen Genoms oder eine Vielzahl von Treffern, nicht jedoch der Regionen 5p15.33 oder 14q32 (Daten nicht gezeigt). Trotz umfangreicher Versuche konnte keiner der Bruchpunkte der Translokationen t(5)(p15.33) kloniert werden. Das lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Bruchpunktregionen in 5p15.33 reich an repetitiven Sequenzen sind, was auch durch die Custom-Array-CGH-Analyse bestätigt wurde. Ein allgemeines Problem der Klonierung von Bruchpunkten besteht darin, dass unbekannt ist, wie groß die gewünschten, spezifischen Fragmente sind. Theoretisch müssten bei jeder eingesetzten Primerkombination eine Vielzahl von Temperatur-Bedingungen und PCR-Zusätzen, wie Magnesium-Ionen, Betain und DMSO, getestet werden, was aus ökonomischen Gründen nicht realisierbar ist. Bei den Klonierungsversuchen der Translokationen t(5;14)(p15;q32) und der Deletionen del(14)(q24q32) kam die besondere Problematik des *IGH*-Locus hinzu. Er kann durch kleine Mutationen, aber auch durch sehr komplexe Umlagerungen wie Inversionen, Insertionen und Deletionen verändert worden sein, was ein Anlagern der Primer unmöglich machen kann [22].

Eine neue Methode der Bruchpunktklonierung stellen die Parallelsequenzierungsmethoden (Next Generation Sequencing) dar. Durch diese Hochdurchsatzverfahren ist es möglich geworden, das vollständige Genom oder auch Transkriptom mit einem verhältnismäßig geringen Zeitaufwand parallel zu sequenzieren. So können neben der exakten Bruchpunktsequenz der interessierenden Aberration auch weitere genetische Veränderungen des Tumormaterials, wie Punktmutationen, erfasst werden [211-214]. Alternativ können nach speziellen Anreicherungsverfahren, beispielsweise mit Hilfe von Microarrays oder individuell designten Oligonukleotiden, auch nur bestimmte Chromosomenregionen von Interesse sequenziert werden [215-219]. Es können aber auch vor der Parallelsequenzierung die derivativen Chromosomen mittels Durchflusszytometrie isoliert werden, wobei sich die anschließende Sequenzierung dann auf die aberranten Chromosomen beschränkt [220].

5.2 Die neu identifizierten Kandidatenonkogene und ihre mögliche Bedeutung für die Lymphom-Pathogenese

Die Strategie der Identifizierung neuer Onkogene durch die Charakterisierung von fehlerhaften Rearrangements des *IGH*-Locus in 14q32 führte zum gewünschten Ergebnis. Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit identifizierten potentiellen Onkogene in den Regionen 5p15.33, 19q12, 19q13.4 und 14q24.1, die durch chromosomale Aberrationen in die Nähe des *IGH*-Locus geraten sind, diskutiert.

5.2.1 *TERT* als Onkogen der Region 5p15.33

Mittels FISH- und Array-CGH-Analysen konnten vier Translokationen t(5;14)(p15;q32) unter Beteiligung des *IGH*-Locus und sechs Varianttranslokationen t(5)(p15.33) identifiziert und deren Bruchpunkte in 5p15.33 eingegrenzt werden. Neun Bruchereignisse fanden zwischen den Genen *TERT* und *CLPTM1L* statt und eines innerhalb von *CLPTM1L*. In vier kürzlich veröffentlichten genomweiten Assoziationsstudien wurde beschrieben, dass bestimmte SNPs in genau dieser Region der Gene *TERT* und *CLPTM1L* mit einer Prädisposition für verschiedene Tumoren, beispielsweise Basalzellkarzinomen, Lungentumoren, Prostatakarzinomen und Zervixkarzinomen, assoziiert sind [221-224]. Welches der beiden Gene bei der Tumorentwicklung relevant ist, war bisher unbekannt.

TERT (human telomerase reverse transcriptase) kodiert für die katalytische Reverse Transkriptase-Untereinheit der Telomerase, deren bekannteste Aufgabe der Erhalt der Telomere ist [195, 225-227]. *CLPTM1L* kodiert für das CLPTM1L-Protein (cleft lip and palate transmembrane 1 like), das in Zellen, die sensitiv für das Zytostatikum Cisplatin sind, Apoptose induzieren kann [228].

Da vier der identifizierten Translokationen in 5p15.33 den *IGH*-Locus involvieren, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um einen Mechanismus der Onkogenaktivierung handelt. Das *TERT*-Gen ist jeweils auf das derivative Chromosom 14 verlagert worden. In einem dieser Fälle mit Translokation $t(5;14)(p15;q32)$ handelt es sich um eine ALL. Bei diesen Erkrankungen konnte eine Onkogenaktivierung durch den *IGH*-Locus bislang ausschließlich auf dem derivativen Chromosom 14 nachgewiesen werden, wie auch in der beschriebenen Translokation $t(6;14)(p22;q32)$ (Abbildung 53) [162, 209]. Dies ist darauf zurückzuführen,

dass in ALL, die aus Vorläufer B-Zellen entstehen, noch keine Klassenwechsel stattgefunden haben und *IGH*-Translokationen in dieser Entität durch fehlerhaftes VDJ-Rearrangement entstehen (siehe Abschnitte 1.2.3 und 1.2.5.1). Beide *IGH*-Enhancer bleiben bei VDJ-assoziierten *IGH*-Translokationen auf dem derivativen Chromosom 14 [19, 34]. Im Gegensatz dazu verbleibt das *CLPTM1L*-Gen auf dem derivativen Chromosom 5 (Abbildung 54). Dies unterstützt die Hypothese, dass *TERT* das Zielgen der Translokation $t(5)(p15.33)$ ist.

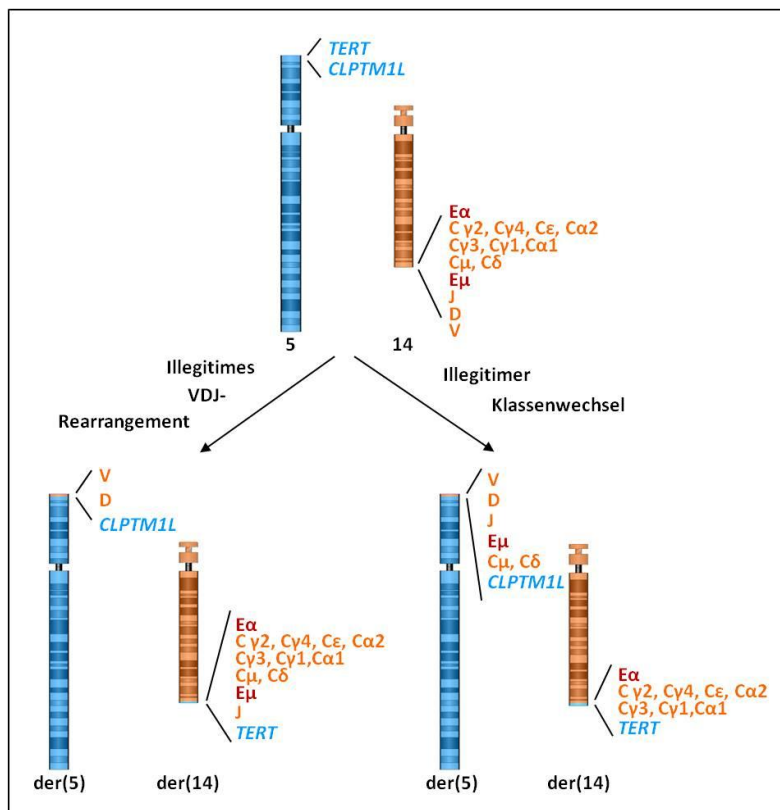


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Translokation $t(5;14)(p15;q32)$ hinsichtlich der Gene *TERT* und *CLPTM1L* sowie der *IGH*-Segmente. Im Falle eines illegitimen VDJ-Rearrangements, wie es bei der ALL vorkommt, verbleiben beide *IGH*-Enhancer auf dem derivativen Chromosom 14. Durch illegitimen Klassenwechsel, der häufig in anderen B-Zell-Neoplasien vorkommt, gelangt ein *IGH*-Enhancer auf das derivative Chromosom 5.

C: Constant; D: Diversity; der: derivatives Chromosom; E: Enhancer; J: Joining; V: Variable

Die FISH- und Array-CGH-Ergebnisse haben gezeigt, dass *CLPTM1L* in zwei der Fälle mit t(5)(p15.33) deletiert ist und in einem weiteren Fall durch die Translokation unterbrochen wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die postulierte Funktion von *CLPTM1L* deuten somit darauf hin, dass das *CLPTM1L*-Gen in den Fällen mit identifizierten Aberrationen der Chromosomenregion 5p15.33 allenfalls eine Rolle als Tumorsuppressorgen spielt, nicht jedoch als Onkogen.

Mittels quantitativer RT-PCR konnte eine Überexpression der *TERT* mRNA und mittels TRAP-Assay eine erhöhte Telomerase-Aktivität in den hämatologischen Neoplasien mit t(5)(p15.33) im Vergleich zu Tumoren derselben Entitäten ohne solche Aberrationen gezeigt werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die *TERT*-Expression tatsächlich durch diese 5p15.33-Aberrationen dereguliert wird. In den sechs Varianttranslokationen t(5)(p15.33) könnten alternative Onkogenaktivatoren zu einer Überexpression von *TERT* geführt haben. In der Literatur ist beschrieben worden, dass die gepackte Chromatinstruktur stromaufwärts und somit zentromerisch des *TERT*-Gens für eine Hemmung der *TERT*-Expression in den meisten somatischen Zellen zuständig ist [229-232]. Durch Translokationen unabhängig von einem speziellen Onkogenaktivator, könnte diese Struktur aufgelöst und *TERT* zur Expression freigegeben werden.

Die Telomerase schützt die Chromosomenenden, die normalerweise aufgrund des End-Replikationsproblems bei jeder Zellteilung kürzer würden, indem sie TTAGGG-Sequenzwiederholungen an das 3'-Ende der DNA fügt. Damit das Ende des Chromosoms nicht als DNA-Doppelstrangbruch erkannt wird, bildet sich am 3'-DNA-Überhang eine sogenannte T-Schleife (T-loop) aus [225, 226, 233, 234]. Die Telomerase benötigt für ihre Aktivität neben *TERT* ein kurzes RNA-Fragment (*TERC*), das komplementär zur Telomer-Wiederholungssequenz ist und als Matrize für die katalytische Reverse Transkriptase Untereinheit dient [235-238]. Die Telomerase-Aktivität wird größtenteils über die Regulation der *TERT*-Expression gesteuert, wohingegen *TERC* in humanen Zellen konstitutionell vorhanden ist [239, 240]. Die Notwendigkeit von *TERC* für die Telomerase-Aktivität könnte jedoch der Grund dafür sein, dass in dieser Arbeit der Effekt der Deregulation in Fällen mit t(5)(p15.33) bei der quantitativen RT-PCR von *TERT* stärker war als bei der Bestimmung der Telomerase-Aktivität mittels TRAP. Möglicherweise ist durch die hohe Expression von *TERT* die *TERC*-RNA zum limitierenden Faktor geworden. Interessanterweise zeigen MCL jedoch häufig Zugewinne im langen Arm von Chromosom 3, einer Region, in der auch das *TERC*-Gen

annotiert ist. Da die identifizierten Translokationen t(5)(p15.33) mit der Entität des MCL assoziiert zu sein scheint, könnte ein Zugewinn in der Region 3q in MCL ein Mechanismus sein, der die Telomerase-Aktivität noch stärker erhöht [58, 60, 241].

In den meisten normalen Geweben, mit Ausnahme von Keimzellen, Stammzellen und anderen dauerhaft proliferierenden Zellen, ist die Telomerase nicht aktiv. Die Telomerlänge verkürzt sich bei jeder Zellteilung, was bei Unterschreiten einer kritischen Telomerlänge dazu führt, dass die Zelle über den P53- oder Rb/p16-Signalweg der replikativen Zellseneszenz oder der Apoptose unterliegt [242-245]. In etwa 90 % der menschlichen Tumoren ist, im Gegensatz zu normalen, somatischen Zellen, Telomeraseaktivität nachzuweisen, was auch für hämatologische Neoplasien zutrifft [246-252]. In den übrigen Fällen ist wahrscheinlich ein alternativer Telomer-erhaltender Mechanismus (alternative maintenance, ALT) aktiv [247, 253-255]. Telomerase-Inhibitoren können das Wachstum humaner Tumorzellen einschränken [256, 257]. Der Erhalt der Telomere scheint für die Immortalisierung von Tumorzellen notwendig zu sein. Eine Hypothese für einen Mechanismus der Tumorentwicklung besteht darin, dass es durch die physiologische Verkürzung der Chromosomen bei Unterschreiten einer bestimmten Telomerlänge zu Chromosomenbrüchen und -fusionen kommt. Wenn in diesem Stadium, kurz vor Einsetzen der Apoptose, die Telomerase-Aktivität in einer Zelle wiederhergestellt wird, kann sie mit den notwendigen Signalen weiter proliferieren. In diesem Fall wären zwei charakteristische Eigenschaften von Tumorzellen gegeben, die genetische Instabilität und die Immortalisierung [255].

In einer in dieser Arbeit identifizierten B-CLL war die Translokation t(5;14)(p15;q32) die einzige zytogenetisch sichtbare Aberration, was darauf hindeutet, dass es sich bei der Veränderung um ein frühes und entscheidendes Ereignis während der Lymphomentstehung handelt. Der Erhalt der Telomere kann jedoch nicht allein zu einem malignen Phänotyp führen. Es gibt immer mehr Hinweise dafür, dass TERT unabhängig vom Erhalt der Telomere zur Tumorentstehung beitragen kann. Dies wurde an vielen Mausmodellen gezeigt, deren Telomere so lang sind, dass sie ohne Telomerase-Aktivität erst nach fünf Generationen eine kritische Telomerlänge erreichen. Somit stellt die Verkürzung der Telomere bei diesen Tieren kein Mechanismus der Tumorprävention dar [258-262]. Beispielsweise neigen Mäuse, die *TERT* in Thymozyten und peripheren T-Zellen konstitutiv exprimieren, dazu, T-Zell-Lymphome zu entwickeln [263]. Die genauen Mechanismen, mit denen TERT die

Tumorentstehung unabhängig von der Regulation der Telomerlänge fördert, sind bislang unbekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass TERT die Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie EGFR (Epidermal growth factor receptor) und FGF (Basic fibroblast growth factor) erhöht [264] und einen unabhängig von der Telomerase-Aktivität Apoptose-inhibierenden Einfluss aufweist [265-268]. Kürzlich wiesen Park et al. [269] nach, dass TERT ebenfalls unabhängig von der Telomerase-Aktivität den Wnt/ β -catenin-Signalweg aktiviert, welcher für die Selbsterneuerung und die Aktivierung von Stammzellen entscheidend ist. Ziele, des Signalwegs sind unter anderem *MYC* und das für Cyclin D1 kodierende *CCND1*-Gen. Eine aberrante Stimulation des Wnt/ β -catenin-Signalwegs wurde bereits mit verschiedenen Tumoren, wie dem Colon-Karzinom, Hauttumoren und sowohl myeloischen als auch lymphatischen Leukämien, in Verbindung gebracht [269-273].

Eine Aktivierung von *TERT* durch Translokationen in Tumoren wurde bislang nicht beschrieben, jedoch durch virale Integrationen vor *TERT*-Promotoren, die zu verschiedenen Tumoren, wie B-Zell-Lymphomen beim Huhn sowie Leberkarzinomen und Zervixkarzinomen beim Menschen führen können [274-276]. Auch Zugewinne und Amplifikationen des *TERT*-Locus konnten beispielsweise beim Lungenkarzinom, beim Neuroblastom und bei Tumoren des Zentralnervensystems detektiert werden [189, 277-279]. Chromosomale Veränderungen des *TERT*-Locus in hämatologischen Neoplasien sind in der Literatur jedoch bislang nicht beschrieben worden. In der Mammakarzinom-Zelllinie HCC1954 wurde kürzlich mittels Parallelsequenzierung eine Translokation $t(5;8)(p15.33;q24.21)$ identifiziert, deren Bruchpunkt in 5p15.33 innerhalb des *CLPTM1L*-Gens liegt, ähnlich wie in einer in dieser Arbeit analysierten B-CLL (Fall I-7) [214]. Es ist somit wahrscheinlich, dass Translokationen, die zu einer *TERT*-Überexpression führen, auch in soliden Tumoren auftreten.

Bei acht der zehn in dieser Arbeit beschriebenen Translokationen $t(5)(p15.33)$ handelt es sich um B-CLL oder MCL. Beide Entitäten haben gemeinsam, dass sie häufig Inaktivierungen des P53- und Rb/p16-Signalwegs aufweisen. In Mäusen, die *TERT* konstitutiv überexprimieren und als Folge dessen häufig Tumore entwickeln, assoziiert das Auftreten von Neoplasien mit heterozygoten Deletionen des *P53*-Gens [245, 255, 280]. Ein möglicher Mechanismus der Tumorentstehung von lymphatischen B-Zell-Neoplasien mit Translokation $t(5)(p15.33)$ könnte sein, dass in den B-Zellen zunächst eine Inaktivierung des P53- bzw. Rb/p16-Signalwegs stattfindet. Bei Unterschreiten der kritischen Telomerlänge entgehen die Zellen der normalerweise induzierten Apoptose und teilen sich weiter. Daraus resultierende

Chromosomenbrüche führen zu einer Translokation $t(5)(p15.33)$, die eine Expression von *TERT* und somit auch eine Wiederherstellung der Telomeraseaktivität bewirkt. Die Zelle kann sich nun unbegrenzt weiter teilen und erhält zudem durch die *TERT*-Expression weitere tumorcharakteristische Eigenschaften, die unabhängig vom Erhalt der Telomere ist.

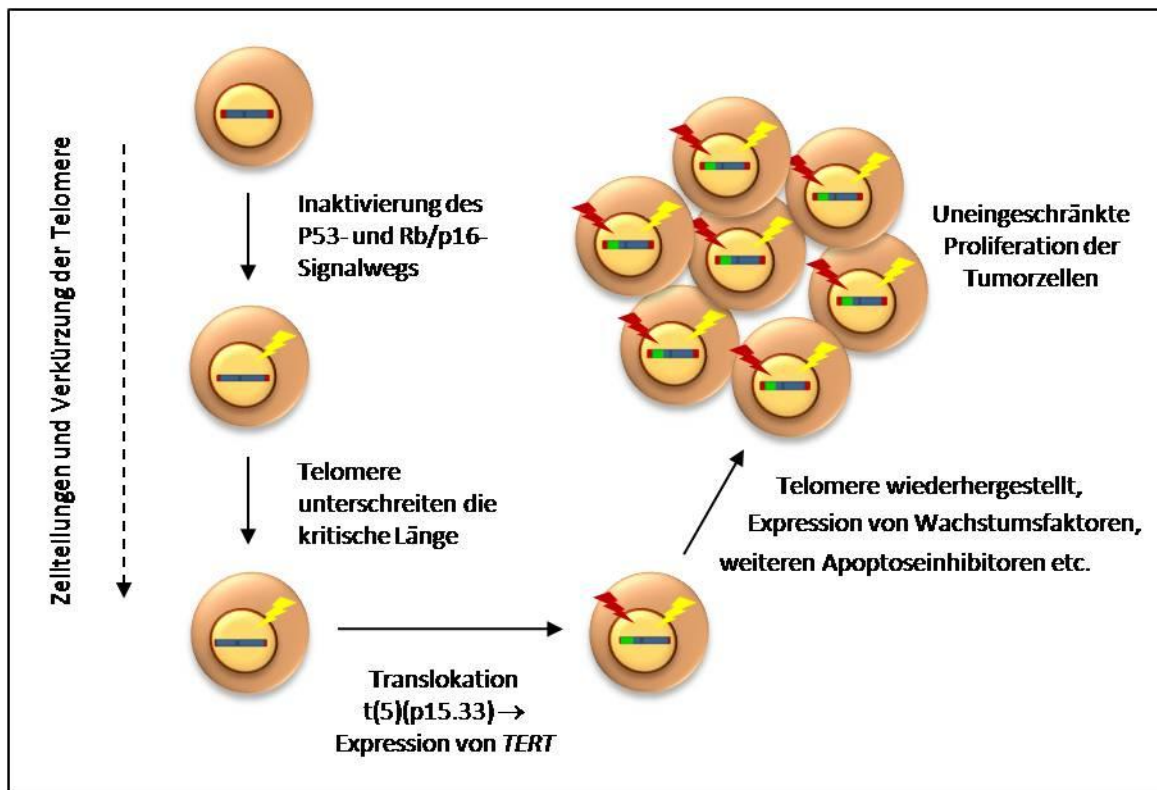


Abbildung 55: Modell des Mechanismus der Entstehung von Tumoren mit Translokation $t(5)(p15.33)$.

5.2.2 *CCNE1* als Onkogen, das durch die Translokation $t(14;19)(q32;q12)$ dereguliert wird

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das für Cyclin E1 kodierende Gen *CCNE1* in einem DLBCL durch die *IGH*-Translokation $t(14;19)(q32;q12)$ überexprimiert wird. Cyclin E1 stellt eines von zwei E-Typen-Cyclinen dar (Cyclin E1 und Cyclin E2). Zusammen mit Cdk2 bildet Cyclin E als regulatorische Untereinheit den Cyclin E/Cdk2 (cyclin-dependent kinase 2)-Komplex. Cdk2 besitzt nur innerhalb des Komplexes Kinaseaktivität. Unter physiologischen Bedingungen akkumuliert Cyclin E während des Übergangs von der G₁- zur S-Phase und wird anschließend degradiert. Der Cyclin E/Cdk2-Komplex phosphoryliert verschiedene Proteine, die den Übergang von der G₁- in die S-Phase sowie die Zentrosomenduplikation

unterstützen. Unter anderem wird die Rekrutierung von DNA-Helikasen, Primasen und Polymerasen an den Präreplikationskomplex bewirkt [281-284].

Viele menschliche Karzinome (Brust, Lunge, Zervix, Gastrointestinaltrakt), aber auch Lymphome und Leukämien zeigen eine Überexpression von *CCNE1* [285-289]. Tzankov et al. [290] wiesen mittels Immunhistochemie in 38 von 98 untersuchten DLBCL (38,8 %) eine Expression von Cyclin E in mehr als 20 % der Tumorzellen nach. In dieser Arbeit konnte mittels Immunhistochemie in 12 von 41 analysierten DLBCL (29,3 %) eine Expression von Cyclin E in mehr als 25 % der Tumorzellen nachgewiesen werden, was vergleichbar mit den Ergebnissen von Tzankov et al. ist [290].

Eine erhöhte Expression von Cyclin E konnte überwiegend auf Mutationen in Signalwegen, welche die Expression oder den Abbau von Cyclin E steuern, zurückgeführt werden [282]. Einige Tumoren, wie das Mammakarzinom, weisen häufig auch Amplifikationen des *CCNE1*-Gens auf [291]. In hämatologischen Neoplasien wurden chromosomale Veränderungen des *CCNE1*-Locus bislang nicht beschrieben. Studien an DLBCL haben jedoch, wie auch beim Mammakarzinom, ergeben, dass die Expression von Cyclin E in diesen Erkrankungen mit einer schlechten Prognose korreliert [290-292].

Die tumorigene Wirkung der Cyclin E-Überexpression lässt sich darüber begründen, dass das Protein den Eintritt in die S-Phase fördert. Dies ist ein Schritt, der entscheidend für das Fortsetzen des Zellzyklus und somit für die Proliferation ist [293, 294]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Überexpression von Cyclin E zu chromosomaler Instabilität führt, was durch den Einfluss auf die Zentrosomenduplikation erklärt werden kann [283, 295-298].

In dem hier beschriebenen DLBCL konnte neben der Translokation t(14;19)(q32;q12) eine Translokation t(8;14)(q24;q32) nachgewiesen werden, die das *MYC*-Gen in die Nähe der *IGH*-Enhancer bringt. Diese Veränderung ist typisch für das Burkitt-Lymphom, aber auch wiederkehrend im DLBCL [101, 208, 299]. Biallelische Translokationen des *IGH*-Locus, das heißt unabhängige Translokationen, die beide Chromosomen 14 betreffen, wurden bereits beschrieben. *MYC* ist dabei in der Mehrheit der Fälle einer der Translokationspartner. Meistens stellt die t(8;14)(q24;q32) das sekundäre Ereignis dar. Das primäre Translokationsereignis betrifft beispielsweise *BCL2*, *CCND1* oder *BCL6* [300]. Im hier beschriebenen DLBCL sind jedoch in allen untersuchten Metaphasen beide Translokationen vorhanden gewesen, weshalb nicht sicher beurteilt werden kann, welches der beiden Ereignisse primär aufgetreten ist.

Der Transkriptionsfaktor MYC beeinflusst die Expression einer Vielzahl von Genen, darunter auch diejenige, die den Zellzyklus regulieren [301, 302]. Beispielsweise wird die Expression des Cdk2-Inhibitors P21 durch MYC unterdrückt, was in einer gesteigerten Aktivität des Cyclin E/Cdk2-Komplexes resultiert [303]. Die durch die Translokation t(14;19)(q32;q12) erhöhte Expression von Cyclin E könnte, gemeinsam mit einer durch MYC gesteigerten Aktivität von Cdk2, zu einer besonders ausgeprägten Funktion des Cyclin E/Cdk2-Komplexes geführt haben. Möglicherweise war dies der Grund dafür, dass die Tumorzellen des DLBCL mit der biallelischen *IGH*-Translokation eine sehr starke Proliferation aufwiesen und der Patient einen schnell fortschreitenden Krankheitsverlauf zeigte.

Eine vereinfachte Darstellung der Regulation des Cyclin E/Cdk2-Komplexes unter Berücksichtigung des MYC-Proteins sind in Abbildung 56 dargestellt.

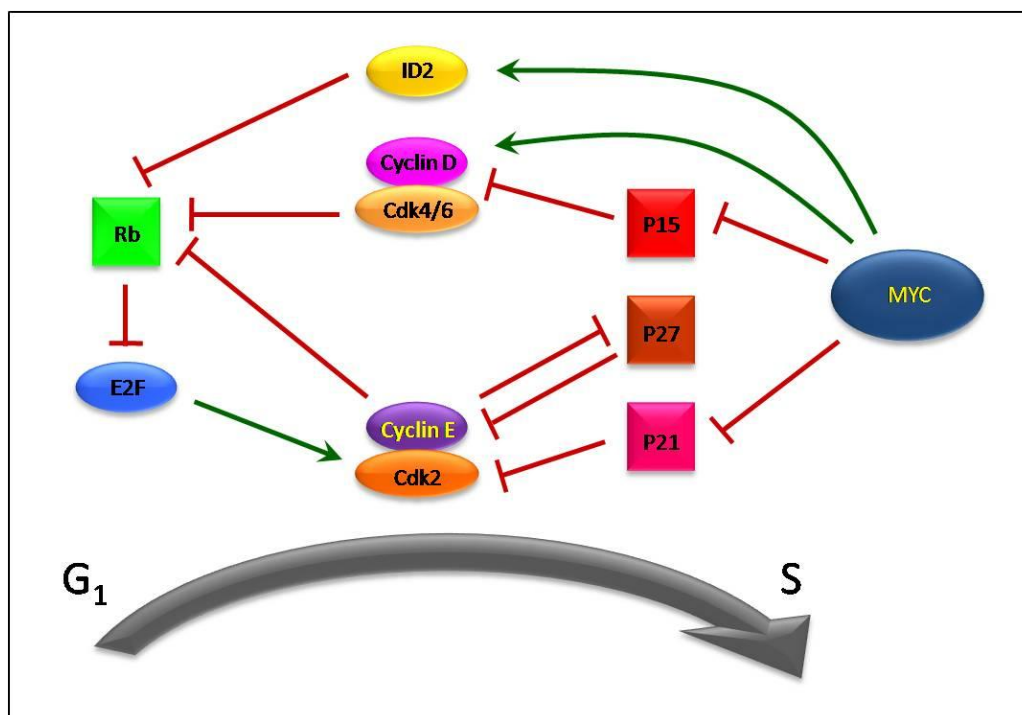


Abbildung 56: Vereinfachte schematische Darstellung der Kontrolle des Übergangs von der G1- zur S-Phase durch den Cyclin E/Cdk2-Komplex unter Berücksichtigung von MYC (basierend auf Massague, 2004 [293]; Matsumura et al., 2003 [304] und Moroy und Geisen et al., 2004 [281]).
 →: aktivierend; —|: inhibierend

5.2.3 Die Translokation t(14;19)(q32;q13.4) und Variantveränderungen in ABC-DLBCL

Das in dieser Arbeit durchgeführte Screening an ABC-DLBCL auf chromosomale Veränderungen um das *SPIB*-Gen in 19q13.4 hat gezeigt, dass Translokationen dieser Region wiederkehrend sind und Zugewinne häufig (41,5 %) in diesen Lymphomen auftreten. *SPIB* kodiert für den Ets-Transkriptionsfaktor SPIB, der spezifisch in hämatopoetischen Zellen

exprimiert wird [305-307]. Ets-Transkriptionsfaktoren binden an eine purinreiche Sequenz, die als PU-Box bezeichnet wird (5'-GAGGAA-3') [308]. SPIB spielt eine wichtige Rolle während der B-Zell-Entwicklung. Zielgene des SPIB-Proteins sind unter anderem Onkogene wie *FES* und *REL*, deren Promotoren durch SPIB aktiviert werden, was der Mechanismus einer onkogenen Wirkung von *SPIB* sein könnte [309-312]. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass *SPIB* in ABC-DLBCL überexprimiert wird [167]. Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass in 26 % der ABC-DLBCL, aber nur in 3 % der GCB-DLBCL Zugewinne im langen Arm von Chromosom 19 auftreten und dies in ABC-DLBCL mit einer hohen *SPIB*-Expression einher geht. Des Weiteren wirkte eine Herunterregulation von SPIB mittels RNA-Interferenz auf ABC-DLBCL- nicht aber auf GCB-DLBCL-Zelllinien toxisch [313]. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Translokationen, Amplifikationen oder Zugewinne der *SPIB*-Region sind wahrscheinlich ebenfalls alternative Mechanismen der Aktivierung von SPIB in ABC-DLBCL, die zur Pathogenese dieser Erkrankungen beitragen.

5.2.4 Potentielle Onkogene in der Chromosomenregion 14q24.1

In dieser Arbeit konnte anhand der FISH-Analyse in 45 Non-Hodgkin Lymphomen eine Deletion del(14)(q24q32) identifiziert werden, durch die der *IGH*-Locus in der Region 14q32 mit der *ZFP36L1*-Region in 14q24 fusioniert. Alle 32 Fälle mit Deletion del(14)(q24q32) und verfügbarer DNA zeigten mittels LD-PCR- und Custom-Array-CGH-Analysen, dass die zentromerischen Bruchpunkte innerhalb des *ZFP36L1*-Gens liegen. Aufgrund der FISH-Daten ist zu vermuten, dass auch die Fälle, von denen keine DNA zur Bruchpunktkartierung mittels Array-CGH oder LD-PCR zur Verfügung stand, einen Bruchpunkt innerhalb des *ZFP36L1*-Gens aufweisen. In 73 % der identifizierten del(14)(q24q32)-positiven Lymphome handelte es sich um B-CLL.

Während der Analysen an den Deletionen del(14)(q24q32) in der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Pospisilova et al. [204] ähnliche Ergebnisse über Deletionen des langen Arms von Chromosom 14 in B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen. Sie identifizierten mittels BAC-basierter Array-CGH und FISH-Analysen 21 B-Zell-Lymphome, ebenfalls überwiegend B-CLL, mit Deletionen del(14)(q24q32) mit zentromerischem Bruchpunkt in der Region des *ZFP36L1*-Locus und telomerischem Bruchpunkt im *IGH*-Locus. Eine Kartierung der Deletionen in elf Fällen mittels genomischer quantitativer PCR ergab, dass in der Region 14q24 drei Bruchpunkte zentromerisch, sechs innerhalb und drei telomerisch des *ZFP36L1*-Gens liegen.

Diese Befunde stimmen mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten überein. Pospisilova et al. führten jedoch weder eine Bruchpunktklonierung mittels PCR noch eine Bruchpunktkartierung mittels hochauflösender Oligonukleotid-basierter Array-CGH durch. Die Eingrenzung von Bruchpunkten mittels genomischer quantitativer PCR ist aus den oben genannten Gründen stark fehleranfällig (Abschnitt 5.1.2). Somit blieben aufgrund der Studie von Pospisilova et al. die Fragen offen, ob Deletionen del(14)(q24q32) existieren, bei denen der zentromerische Bruchpunkt in der Region des *ZFP36L1*-Gens liegt, jedoch knapp zentromerisch beziehungsweise telomerisch des Gens [204]. Des Weiteren waren weder genaue genomische Bruchpunkte angegeben noch wurde die Existenz von Fusionstranskripten gezeigt. Mögliche pathogenetische, molekulare Mechanismen der Deletion in Lymphomen wurden nicht diskutiert.

ZFP36L1 kodiert für ZFP36L1 (Zinc finger protein like 1), eines von drei humanen Mitgliedern der Tristetrapolin (TTP)-Familie (ZFP36, ZFP36L1, ZFP36L2), die bereits in der frühen Embryonalentwicklung eine bedeutende Rolle spielen [314, 315]. TTP-Familienmitglieder binden mit ihrer Zinkfingerdomäne an AU-reiche Sequenzen (AU-rich elements, ARE) in der 3'-UTR von mRNA-Transkripten. Sie vermitteln die Ansammlung der Ziel-mRNAs in P (Processing)-Bodies sowie den Abbau der mRNA [168, 316-320]. Bekannte Targets von ZFP36L1 sind Onkogene und Zytokine wie BCL2, API2 (Apoptose Inhibitor 2), IL (Interleukin)-3, IL-6, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) und TNF α (Tumor Necrosis Factor α) [320-325], die teilweise ebenfalls Ziele des umfangreicher analysierten ZFP36-Proteins darstellen [318].

Die Tatsache, dass die ARE-mRNAs, die von ZFP36L1 und den anderen Mitgliedern der TTP-Familie erkannt und abgebaut werden können, für Onkogene und Wachstumsfaktoren kodieren, spricht für eine Rolle der TTP-Mitglieder als Tumordinhibitoren [326]. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass ZFP36L1 in der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Ramos für den mitochondrialen Apoptose-Signalweg sowie in B-CLL-Zellen für die Rituximab-induzierte Apoptose notwendig ist [327, 328]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ZFP36L1* in B-Zell-Lymphom-Zelllinien nach Induktion der Anti-CD20- bzw. BCR-vermittelten Apoptose ansteigt. Durch diese Befunde wird auch deutlich, dass ZFP36L1 bei der Kontrolle der Zellproliferation in B-Zell-Lymphomen eine große Rolle zu spielen scheint, offensichtlich über die Induktion der Apoptose. Da jedoch an der Deletion del(14)(q24q32) der *IGH*-Locus beteiligt ist und ein Teil des *ZFP36L1*-Gens in allen

del(14)(q24q32)-positiven Fällen mit kartiertem Bruchpunkt vorhanden ist, besteht die Vermutung, dass ein durch die Deletion verändertes ZFP36L1-Protein eine onkogene Wirkung haben könnte.

Das *ZFP36L1*-Gen enthält zwei Exons, die für ein aus 338 Aminosäuren bestehendes Protein kodieren [329]. Mittels RT-PCR konnte in dieser Arbeit in fünf Lymphomen gezeigt werden, dass Fusionstranskripte zwischen dem nicht-translatierbaren Exon $I\mu$ des *IGH*-Locus und dem zweiten Exon von *ZFP36L1* gebildet werden. $I\mu$ stellt neben $I\gamma$, $I\alpha$, und $I\epsilon$ eines der nachgewiesenen *IG*-Keimbahntranskripte in B-Zellen dar, die wahrscheinlich mittels Bildung von chimären *IG*-Keimbahntranskripten beim Klassenwechsel mitwirken [172, 330, 331]. Der Bruchpunkt innerhalb von $I\mu$ war in allen fünf Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) identisch. Er stimmt ebenfalls mit dem $I\mu$ -Bruchpunkt der physiologischen chimären *IG*-Keimbahntranskripte und auch mit dem des bereits beschriebenen $I\mu$ -*BCL6*-Fusionstranskripts der Translokation t(3;14)(q27;q32) überein [173, 331]. In 14q24 wiesen zwei Fälle mit genomischem Bruchpunkt im Intron von *ZFP36L1* ein Fusionstranskript auf, bei dem die reguläre Spleißstelle des zweiten Exons von *ZFP36L1* verwendet wurde. Einem möglicherweise resultierenden ZFP36L1-Protein würden die ersten 19 Aminosäuren, die durch das erste Exon kodiert werden, fehlen. Drei Fälle mit genomischem Bruchpunkt innerhalb des zweiten Exons von *ZFP36L1* nutzten zur Bildung des Fusionstranskripts eine kryptische Spleißstelle im 3'-terminalen Bereich des zweiten Exons von *ZFP36L1*. Dabei kodiert der verbleibende Teil des zweiten Exons für 44 Aminosäuren.

Bei Einhalten des Leserasters des *ZFP36L1*-Gens und Zurückverfolgen der cDNA-Sequenz der zwei Formen von Fusionstranskripten (zweites Exon bleibt vollständig erhalten bzw. zweites Exon ist trunkiert) ergeben sich unterschiedliche Leseraster im Exon $I\mu$. Das Exon $I\mu$ enthält in allen Leserastern viele Stopcodons [331]. Diese Tatsachen lassen vermuten, dass kein wesentlicher Anteil eines putativen Fusionsproteins von der $I\mu$ -Sequenz abgelesen wird. Beide Fusionstranskripte enthalten innerhalb der $I\mu$ -Sequenz bei Einhalten des Leserasters von *ZFP36L1* jedoch AUG-Codons, auf die bis zum Erreichen der *ZFP36L1*-Sequenz kein Stop-Codon folgt. Es könnten demnach Proteine gebildet werden, die im Fall des langen Fusionstranskripts, mit Ausnahme der ersten 19 Aminosäuren des ersten Exons, alle übrigen 319 Aminosäuren des ZFP36L1-Proteins enthielten und im Fall des kurzen Transkripts die letzten 44 Aminosäuren.

Lai et al. [332] konnten über Transfektionsexperimente nachweisen, dass ZFP36-Proteine, die durch Mutationen innerhalb der Consensus-Sequenz in der Zinkfinger-Domäne nicht in der Lage sind, ARE-mRNAs zu binden, in den transfizierten Zellen zu einer Ansammlung der Ziel-mRNAs, TNF α und GM-CSF, führen [332]. Auch die simultane Expression von Wildtyp-ZFP36 konnte diesen Effekt nicht aufheben, was auf einen dominant-negativen Mechanismus hinweist. Es konnte gezeigt werden, dass dabei keine Heterodimerisierung der beiden ZFP36-Formen stattfindet [332]. Auch die exogene Überexpression der isolierten N-terminalen, C-terminalen oder mRNA-bindenden Domänen von ZFP36 führen in HELA-Zellen mit normal exprimiertem Wildtyp-ZFP36 zu einem stark verminderten Abbau von ARE-enthaltender mRNA [319]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass weitere transaktive Faktoren für diesen dominant-negativen Effekt verantwortlich sind. Diese Faktoren könnten beispielsweise auch das durch die Deletion del(14)(q24q32) trunkierte ZFP36L1 binden, das möglicherweise nicht mehr voll funktionsfähig ist. Die transaktiven Faktoren wären dann nicht mehr in der Lage, mit dem intakten ZFP36L1 zu interagieren.

Ein möglicher Kandidat, der am dominant-negativen Effekt trunkierter TTP-Proteine beteiligt sein könnte, ist die miRNA miR16. Sie enthält eine Sequenz der Basenabfolge UAAAUAUU, die komplementär zum ARE ist. Es konnte gezeigt werden, dass miR16 für die Degradierung von TNF α -mRNA notwendig ist. Allerdings ist miR16 kaum in der Lage, TNF α -mRNA zu destabilisieren, wenn alle drei TTP-Familienmitglieder mittels RNA-Interferenz inhibiert werden. MiR16 und ZFP36 binden nicht direkt aneinander, sondern interagieren wahrscheinlich über RISC (RNA-induced silencing complex) [333, 334].

Interessanterweise zeigen 57,4 % der B-CLL mittels FISH nachweisbare Deletionen innerhalb der Region 13q14.3, die für die miR16-1-miR15a Pri (Primary)-miRNA kodiert. Aus dieser Pri-miRNA werden die miRNAs miR15 und miR16 gebildet [135, 333]. In 68 % der B-CLL sind beide Gene deletiert oder herunterreguliert [335]. Diese B-CLL zeigen bei Microarray-basierter Expressionsanalyse eine signifikante Anreicherung ARE-enthaltender mRNAs [336]. In der vorliegenden Arbeit konnten mittels FISH aber nur in 9,1 % der del(14)(q24q32)-positiven B-CLL 13q14.3-Deletionen detektiert werden. Somit sind 13q14.3-Deletionen in B-CLL mit del(14)(q24q32) signifikant seltener als in denjenigen ohne del(14)(q24q32) (9,1 % gegenüber 57,4 %, $p = 0,0001$). Die Deletion 13q14.33 und die Deletion del(14)(q24q32) könnten alternative Mechanismen für die Hemmung des ARE-vermittelten mRNA-Abbaus über die Mitglieder der TTP-Familie sein. Die resultierende Anreicherung der ARE-mRNAs,

die für Gene wie *BCL2* und *API2* kodieren, könnte zu aberranten Dosen der entsprechenden Proteine führen und dadurch die Entstehung der B-CLL fördern (Abbildung 58). Die Tatsache, dass *BCL2* in etwa 60 % der B-CLL stark exprimiert wird, unterstützt diese Hypothese [337, 338].

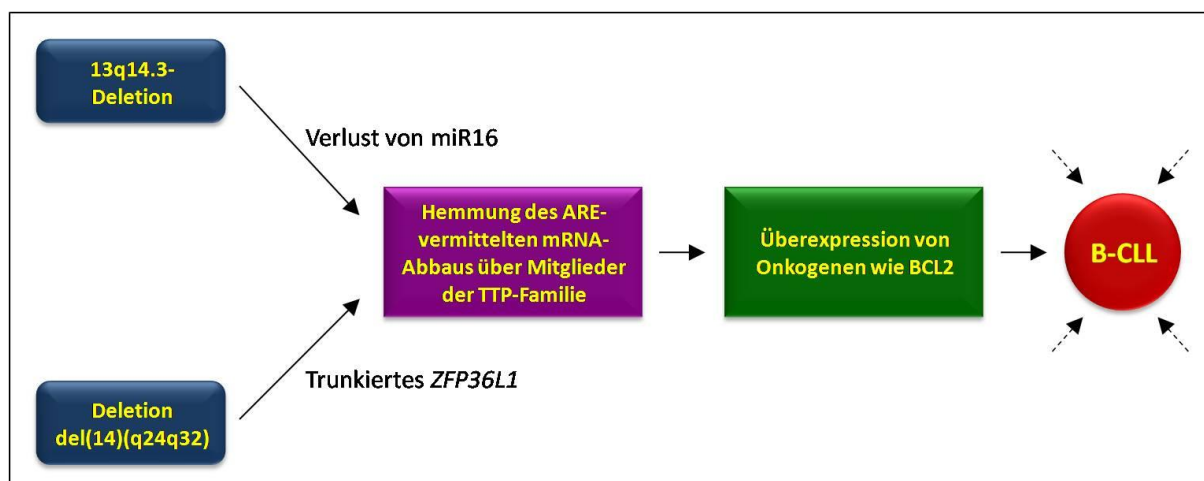


Abbildung 58: Modell des Beitrags der 13q14.3-Deletion und der Deletion del(14)(q24q32) zur Entstehung der B-CLL. Die gestrichelten Pfeile deuten an, dass mit großer Wahrscheinlichkeit auch weitere Faktoren bei der Entstehung der B-CLL eine Rolle spielen.

ARE: AU-rich element; B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; TTP: Tristetrapolin

Wenn das putative trunkierte ZFP36L1-Protein, das durch die Deletion del(14)(q24q32) entstehen könnte, einen dominant-negativen Effekt ausübt, sind keine großen Mengen des aberranten Proteins notwendig. Dies könnte der Grund dafür sein, dass mittels quantitativer RT-PCR weder in der vorliegenden Arbeit noch von Pospisilova et al. eine Überexpression von *ZFP36L1* festgestellt werden konnte [204]. Eine Unabhängigkeit von den starken *IGH*-Enhancern würde die Pathomechanismen in der identifizierten Variantendeletion erklären, bei der das *ZFP36L1*-Gen auf genomischer Ebene mit der *TTC8*- und *FOXN3*-Region fusioniert, aber auch solche Deletionen del(14)(q24q32) wie im Fall III-3, bei denen beide *IGH*-Enhancer verloren gegangen sind.

Etwa 200 kb zentromerisch von *ZFP36L1* liegt das *RAD51L1*-Gen. Dabei handelt es sich um das Gen, das am nächsten an den zentromerischen Bruchpunkten der Deletionen del(14)(q24q32) liegt und dabei vollständig vorhanden ist. Eine Überexpression von *RAD51L1* in den del(14)(q24q32)-positiven Lymphomen, im Vergleich zu B-CLL ohne diese Deletion, konnte mittels quantitativer RT-PCR in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Pospisilova et al. konnten jedoch mit dieser Methode in acht von zwölf untersuchten del(14)(q24q32)-

positiven Lymphomen eine 2-18-fache Überexpression von *RAD51L1* im Vergleich zu B-CLL ohne die Deletion zeigen. Es ist auch möglich, dass in B-CLL allgemein eine höhere *RAD51L1*-Expression auftritt und die Deletion del(14)(q24q32) ein möglicher Mechanismus für diese Überexpression darstellt. Zur Beantwortung dieser Frage müssten mittels quantitativer RT-PCR weitere Kontrollen wie normales peripheres Blut, Tonsillen und Knochenmark analysiert werden.

RAD51L1 kodiert für RAD51L1, ein Mitglied der RAD51-Familie (RAD51, XRCC2, XRCC3, RAD51L1, RAD51L2 und RAD51L3). Diese Proteine sind an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination beteiligt [169]. In Tumoren konnten sowohl Deletionen und eine erniedrigte Expression als auch Amplifikationen und eine Überexpression von Genen der RAD51-Familie beobachtet werden [60, 169, 339-342]. Im Fall des Mammakarzinoms weisen beispielsweise 30 % der Tumoren eine erniedrigte Expression von RAD51 auf [343]. Andere Studien zeigten hingegen eine Überexpression von RAD51 in Mammakarzinomen und pankreatischen Adenokarzinomen [339, 342]. *RAD51L1* konnte in einer Assoziationsstudie als Risikolocus für die Entstehung von Mammakarzinomen identifiziert werden [175]. Eine veränderte Expression des Gens in hämatologischen Tumoren wurde, mit Ausnahme der Ergebnisse von Pospisilova et al., in der Literatur bislang nicht beschrieben. Ebenso wenig konnten chromosomale Veränderungen der *RAD51L1*-Region in Tumoren beobachtet werden. Allerdings wurde beschrieben, dass RAD51L1 und RAD51L2 stabile Heterodimere bilden, die mit RAD51 interagieren und in der Form in der Lage sind, sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige DNA zu binden. Dies ist auf die Rolle dieser Proteine bei der homologen Rekombination zurückzuführen. Von Idoia Martín Guerrero im Institut für Humangenetik in Kiel durchgeführte Pyrosequenzierungsanalysen haben ergeben, dass CpG-Inseln der Promotorregion von *RAD51L2* in B-CLL und insbesondere in del(14)(q24q32)-positiven B-CLL hypomethyliert sind (unpublizierte Daten). Eine Hypomethylierung in CpG-Inseln in Promotorregionen führt im Allgemeinen zu einer erhöhten Expression des entsprechenden Gens [344, 345]. Es könnte somit sein, dass *RAD51L1* in del(14)(q24q32)-positiven Fällen durch die Nähe zum *IGH*-Locus und *RAD51L2* in diesen Lymphomen durch den Mechanismus der Hypomethylierung überexprimiert wird. Als RAD51L1/RAD51L2-Heterodimere könnten die Genprodukte bei der DNA-Reparatur mitwirken. Im Fall einer *RAD51*-Überexpression wird der tumorfördernde Effekt der Veränderung beispielsweise auf eine erhöhte Resistenz

gegen Chemotherapeutika aufgrund der verstärkten DNA-Reparatur zurückgeführt. Des Weiteren könnte eine zu große Menge des RAD51-Proteins zu aberranter DNA-Reparatur und damit zu chromosomaler Instabilität führen [169, 340, 346]. Ähnlich könnten sich auch überrepräsentierte von RAD51L1/RAD51L2-Heterodimere auswirken.

5.3 *TRAF3* als Tumorsuppressorgen in der Region 14q32

Die Deletion del(14)(q24q32) könnte alternativ oder zusätzlich zur Aktivierung eines Onkogens durch den *IGH*-Locus auch mittels Inaktivierung eines oder mehrerer Tumorsuppressorgene in der deletierten Region eine Rolle in der Tumorgenese spielen.

Innerhalb der deletierten Region in 14q32.32 liegt das Gen TNF receptor associated factor 3 (*TRAF3*). Das kodierte *TRAF3*-Protein ist ein Inhibitor des onkogen wirkenden NF- κ B (nuclear factor-kappa B)-Signalwegs [347]. Biallelische Inaktivierungen von *TRAF3* wurden bereits in 12 % der Multiplen Myelome und in 5 % der Patienten mit Morbus Waldenström nachgewiesen [73, 177, 178]. Es wurde gezeigt, dass B-Zellen in B-Zell-spezifischen *TRAF3*^{-/-} Mäusen deutlich länger leben und die B-Zell-Areale in diesen Mäusen stark vergrößert sind [348]. Somit ist das *TRAF3*-Gen bereits als Tumorsuppressorgen in hämatologischen Neoplasien bekannt. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit *TRAF3* als interessantes Kandidatentumorsuppressorgen in der deletierten Region untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 9 von 42 (21 %) Fällen mit Deletion del(14)(q24q32) eine biallelische Inaktivierung von *TRAF3* aufweisen. In sechs dieser Fälle wurden mittels FISH und Array-CGH homozygote Deletionen der *TRAF3*-Region identifiziert. Die übrigen drei Fälle zeigten bei der DHPLC- bzw. Sequenz-Analyse insgesamt fünf Mutationen, die eine Inaktivierung des *TRAF3*-Proteins zur Folge haben sollten. Die Veränderungen beinhalten zwei Spleißstellen-Mutationen, zwei Rasterverschiebungen, die zu trunkierten *TRAF3*-Proteinen führen müssten, und einen Aminosäureaustausch von Cystein zu Arginin innerhalb der Konsensussequenz der Ringfingerdomäne von *TRAF3*. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass ähnliche Mutationen innerhalb der Konsensussequenz der Ringfingerdomäne von *TRAF3* zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. Die entscheidende Fähigkeit der Domäne, Zink zu binden, geht verloren [180]. Eine schematische Darstellung der Ringfingerdomäne von *TRAF3* mit der Position des Aminosäureaustausches sowie der

Domänen des TRAF3-Proteins mit den fünf identifizierten Mutationen ist in Abbildung 59 dargestellt.

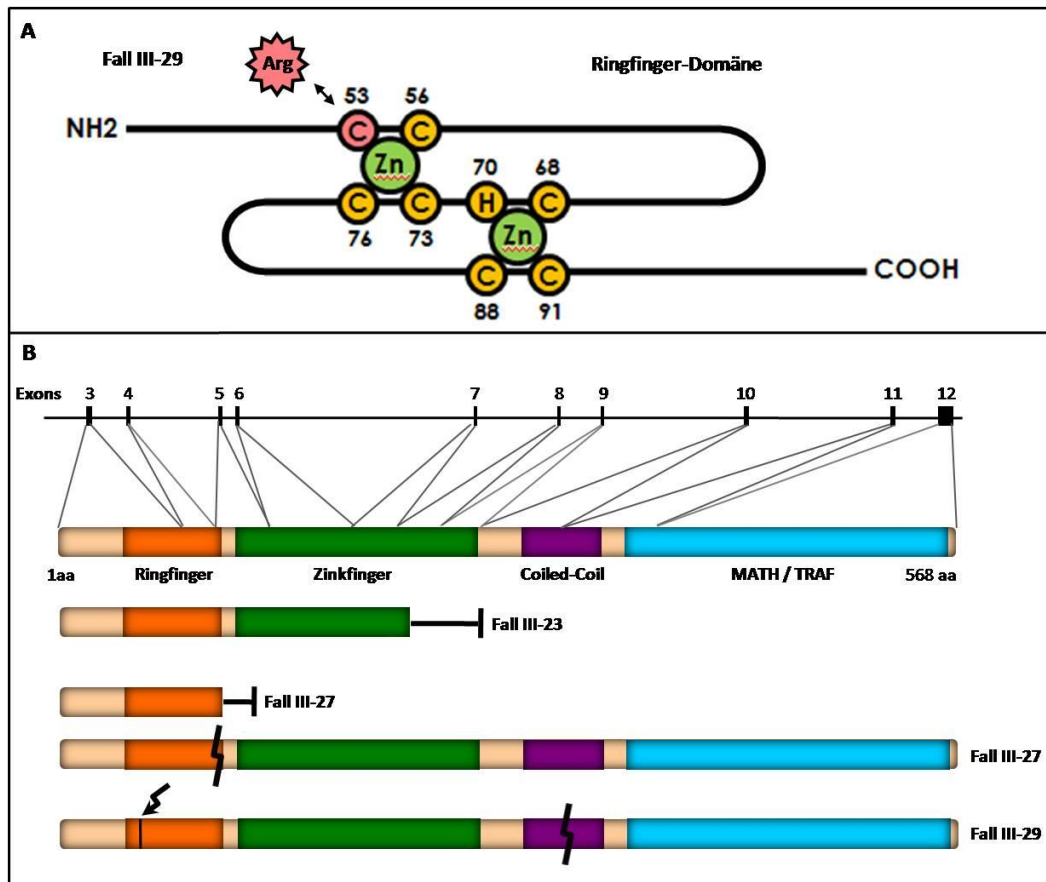


Abbildung 59: Identifizierte Mutationen von *TRAF3*. **A)** Stark vereinfachte Darstellung der Ringfinger-Domäne von *TRAF3*. Für die Komplexierung von zwei Zink-Ionen sind acht Aminosäuren essentiell und bilden die Konsensussequenz. Das Cystein an der Position 53 wird im Fall III-29 durch die Punktmutation in Exon 3 durch ein Arginin ersetzt, wodurch die Funktion der Ringfingerdomäne voraussichtlich zerstört wird. **B)** Darstellung der genomischen Organisation der kodierenden *TRAF3*-Exons (Exons 3-12) und der Protein-Domänen, für die diese Exons kodieren. Darunter sind die der vorausgesagten Proteine in den drei Fällen mit *TRAF3*-Mutationen angegeben (Struktur von *TRAF3* basierend auf He et al., 2007 [180]).

→ : Frameshift-Mutation und resultierendes Stopcodon; ⚡ : Spleißstellen-Mutation; ⚡ : Punktmutation

aa: Aminosäuren; Arg: Arginin; C: Cystein; H: Histidin

Auf mRNA-Ebene konnte in allen zehn mittels quantitativer RT-PCR analysierten Fällen, darunter ein Fall mit homozygoter *TRAF3*-Deletion, eine geringere Expression von *TRAF3* als in B-CLL ohne *TRAF3*-Aberration festgestellt werden. Eine hypothetische Ursache für diese niedrige Expression könnte sein, dass durch die Deletion im langen Arm von Chromosom 14 nur eine Kopie des *TRAF3*-Gens abgelesen werden kann. Das zweite Allel könnte aber zusätzlich durch weitere Mechanismen wie epigenetisches Silencing herunterreguliert

werden. Das *TRAF3*-Gen enthält keine klassischen CpG-Inseln (<http://genome.ucsc.edu/>). Dennoch führte Julia Richter (Institut für Humangenetik Kiel) eine Methylierungs-spezifische PCR (methylation specific PCR, MSP)-Analyse an zwei konservierten, CpG-reichen Loci der Promotor-Region durch. Alle 42 untersuchten *del(14)(q24q32)*-positiven Fälle wiesen wie die Kontrollen einen unmethylierten DNA-Methylierungsstatus auf. Eine verminderte Expression könnte aber auch durch andere epigenetische Mechanismen wie beispielsweise Histonmodifikationen hervorgerufen werden.

Veränderungen, die das TRAF3-Protein inaktivieren, führen zur konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs [73, 348]. Dies stellt in vielen Tumoren, wie beispielsweise dem Hodgkin-Lymphom, einen bekannten Mechanismus der Apoptose-Unterdrückung dar [347, 349, 350]. Die Mitglieder der NF- κ B-Familie kontrollieren unter anderem die Expression von Genen, welche die Differenzierung, das Überleben und die Proliferation von Zellen des Immunsystems regulieren. TRAF3 inhibiert den Nicht-kanonischen-NF- κ B-Signalweg, indem es den Abbau des NIK (NF- κ B-inducing kinase)-Proteins über dessen Ubiquitinierung bewirkt [351, 352]. NIK induziert bei Abwesenheit von TRAF3 über IKK-1 die Prozessierung des Proteins p100 und den anschließenden nukleären Transport des gebildeten p52-RelB-Komplexes, der nun die Transkription vieler Gene regulieren kann. TRAF3 kann durch die Stimulation eines TNF-Rezeptors, wie beispielweise BAFFR, CD40, LT β R, RANK, CD30 und FN40, degradiert werden, was zu einer Stabilisierung von NIK führt (Abbildung 60) [180, 351, 353-357].

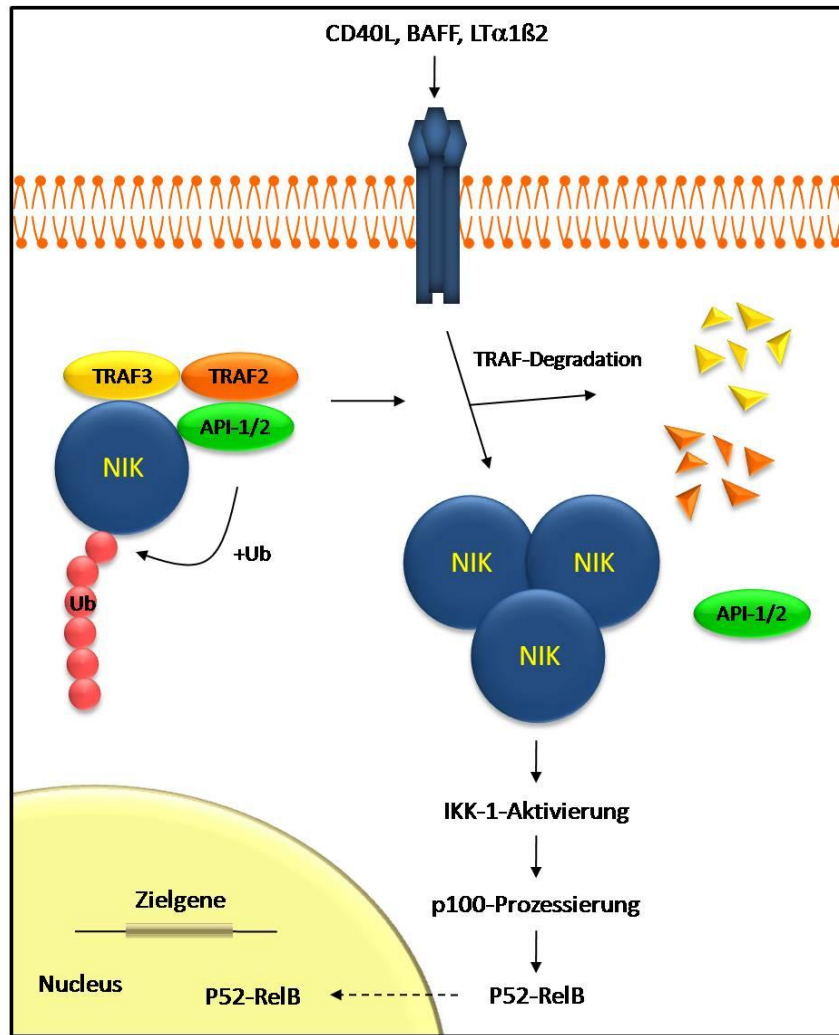


Abbildung 60: Schematische Darstellung des Nicht-kanonischen-NF-κB-Signalwegs (modifiziert nach Sun und Ley, 2008).
Ub: Ubiquitinierung

Sowohl die Ringfinger- als auch die TRAF-Domäne von TRAF3 sind essentiell für die Hemmung von NIK [180]. In den in dieser Arbeit identifizierten *TRAF3*-mutierten Allelen ist jeweils mindestens eine der beiden Domänen betroffen (Abbildung 59), was auf eine TRAF3-Protein-Inaktivierung in diesen Fällen deutet. Beim Multiplen Myelom konnte nachgewiesen werden, dass alle Fälle mit identifizierten biallelischen Mutationen des *TRAF3*-Gens eine erhöhte NF-κB-Expressionssignatur aufweisen [177].

Die Tatsache, dass fünf Fälle mit Deletion del(14)(q24q32) eine subklonale homozygote Deletion von *TRAF3* zeigten, weist darauf hin, dass der Verlust des zweiten Allels als sekundäres Ereignis während der Tumorentwicklung aufgetreten ist. Es ist immer noch möglich, dass eine Onkogenaktivierung in der Chromosomenregion 14q24 durch den *IGH*-Locus in 14q32 in del(14)(q24q32)-positiven Fällen der initiale Mechanismus in der Tumorgenese dieser Lymphome ist. Der vollständige Funktionsverlust von TRAF3 durch die

Inaktivierung des zweiten Allels könnte einen weiteren Selektionsvorteil für die Tumorzellen bedeuten. B-Zell-spezifische *TRAF3*-Knock-out-Mäuse zeigen eine erhöhte Bildung von Immunglobulinen [348]. Es könnte somit sein, dass ein Funktionsverlust von *TRAF3* in Fällen mit Deletion *del(14)(q24q32)* zu einer stärkeren Aktivierung der *IGH*-Enhancer führt und dadurch zur stärkeren Aktivierung eines putativen Onkogens in 14q24, das in die Nähe des *IGH*-Locus geraten ist. Der mittels quantitativer RT-PCR analysierte Fall III-13 mit homozygoter *TRAF3*-Deletion zeigt tatsächlich eine sehr starke Expression von *RAD51L1* (Abbildung 46). Da dieser Fall die kurze Form des trunkierten *ZFP36L1*-Transkripts aufweist, waren die verwendeten Primer für die Messung der *ZFP36L1*-Expression nicht in der Lage, die aberrante *ZFP36L1*-mRNA zu messen.

Möglicherweise existieren mehrere interagierende Mechanismen, durch welche die Deletion *del(14)(q24q32)* eine Rolle in der Tumorgenese spielt. Beispielsweise übt ein durch die Deletion trunkiertes *ZFP36L1*-Protein einen dominant-negativen Effekt auf den ARE-mRNA-Abbau aus, wodurch Onkogene wie *BCL2* überexprimiert werden. *RAD51L1* könnte durch die Nähe zu den *IGH*-Enhancern ebenfalls überexprimiert werden und das *RAD51L1*-Protein gemeinsam mit *RAD51L2*, welches beispielsweise durch Hypomethylierung angereichert wird, zu einer erhöhten Resistenz gegen Chemotherapeutika und zu chromosomaler Instabilität führen. Eine vollständige Inaktivierung des *TRAF3*-Proteins in *del(14)(q24q32)*-positiven Zellen könnte darüberhinaus eine konstitutive Aktivierung des Nicht-kanonischen NF- κ B-Signalwegs bewirken. Dies könnte dann zu einer noch stärkeren Aktivierung der *IGH*-Enhancer und einer damit verbundenen Überexpression putativer Onkogene wie beispielsweise trunkiertes *ZFP36L1* und *RAD51L1* in der Chromosomenregion 14q24 führen. Die beschriebenen potentiellen Mechanismen, mit denen die Deletion *del(14)(q24q32)* bei der Lymphomgenese mitwirken könnte, sind in Abbildung 61 zusammengefasst.

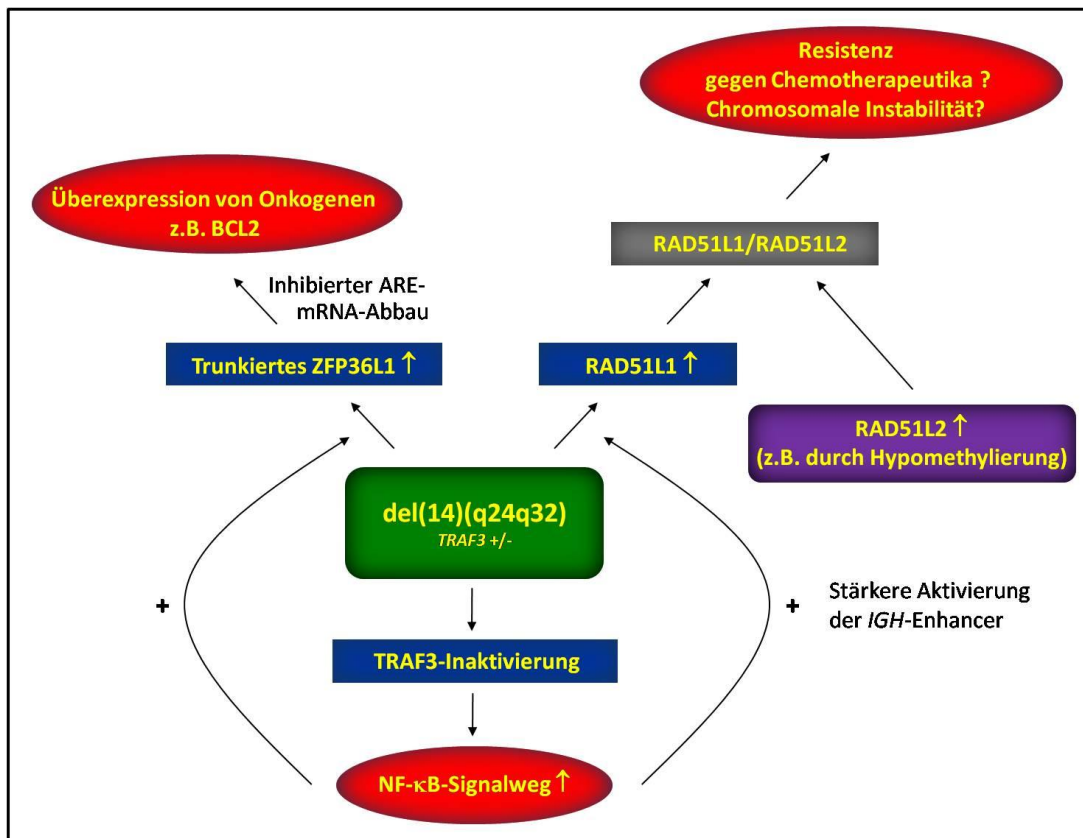


Abbildung 61: Modell möglicher Mechanismen, mit denen die Deletion *del(14)(q24q32)* bei der Entstehung von Lymphomen mitwirken könnte, und deren Interaktionen.

ARE: AU-rich element

5.4 Fazit

Ausgehend von der Charakterisierung verschiedener Aberrationen des langen Arms von Chromosom 14 bei lymphatischen Neoplasien konnten in der vorliegenden Arbeit mehrere Gene identifiziert werden, die in diesen Erkrankungen von pathogenetischer Bedeutung sein könnten.

Durch wiederkehrende Translokationen unter Beteiligung der Chromosomenregion 5p15.33, die vermehrt in MCL und B-CLL zu finden waren, wird das *TERT*-Gen überexprimiert, welches für die regulatorische katalytische Reverse Transkriptase-Untereinheit der Telomerase kodiert. Dies führt voraussichtlich zur Immortalisierung der Zellen und zur Expression von Wachstumsfaktoren und Apoptoseinhibitoren.

Die Translokation *t(14;19)(q32;q12)* eines DLBCL führt zur Überexpression des für Cyclin E1 kodierenden *CCNE1*-Gens. Cyclin E1 könnte in dem DLBCL gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor MYC, der durch eine in diesem Fall zusätzlich auftretende Translokation *t(8;14)(q24q32)* vermehrt gebildet werden sollte, eine starke Proliferation der Tumorzellen

hervorrufen. Die Translokation $t(14;19)(q32;q13.4)$, die das *SP1B*-Gen in die Nähe der *IGH*-Enhancer bringt, ist ein selten auftretendes Ereignis in ABC-DLBCL. Zugewinne des *SP1B*-Locus wurden jedoch in mehr als 40 % der untersuchten ABC-DLBCL detektiert.

Die Deletion $del(14)(q24q32)$, bei der das *ZFP36L1*-Gen mit dem *IGH*-Locus fusioniert wird, ist ein wiederkehrendes Ereignis, das insbesondere in B-CLL auftritt. Durch die Deletion werden μ -*ZFP36L1*-Fusionstranskripte gebildet, die möglicherweise die Generierung trunkierter ZFP36L1-Proteine bewirken. Diese Proteine könnten den Abbau von ARE-mRNAs, die überwiegend für Onkogene codieren, durch einen dominant-negativen Effekt inhibieren. Dies könnte die Begründung dafür sein, dass in den $del(14)(q24q32)$ -positiven B-CLL eine 13q-Deletion, die ebenfalls in einer Hemmung des ARE-vermittelten mRNA-Abbaus resultiert, signifikant seltener zu finden ist als allgemein in B-CLL. In 22 % der Lymphome mit Deletion $del(14)(q24q32)$ wurde eine biallelische Inaktivierung von TRAF3 identifiziert, die zu einer konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs führen müsste und möglicherweise auch zu einer verstärkten Aktivierung der *IGH*-Enhancer zur Folge hat. Letzteres könnte sich darüberhinaus in einer erhöhten Expression eines putativen Onkogens in der Chromosomenregion 14q24 auswirken.

Somit konnten alle eingangs formulierten Ziele der vorliegenden Arbeit erreicht werden.

5.5 Ausblick

Um die molekularen Mechanismen der neu identifizierten Kandidatengene in Lymphomen besser zu verstehen, sind ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit weiterführende funktionelle Analysen notwendig.

Beispielsweise könnte bei der Deletion $del(14)(q24q32)$ mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) untersucht werden, ob trunkierte ZFP36L1-Proteine an ARE-mRNA binden [332]. Yeast-Two-Hybrid- oder Ko-Immunpräzipitations-Analysen könnten die Wechselwirkung der trunkierten ZFP36L1-Proteine mit anderen, am ARE-mRNA-Abbau beteiligten Proteinen aufklären [358, 359]. Immunfluoreszenz-Analysen mit Antikörpern gegen mRNA-abbauende Enzyme, die in P-Bodies detektierbar sind und parallel durchgeführte *In-situ*-Hybridisierungen mit Sonden gegen transfizierte ZFP36L1-spezifische ARE-mRNA sollten anzeigen können, ob der ARE-mRNA-Abbau in P-Bodies über ZFP36L1 in Fällen mit Deletion $del(14)(q24q32)$ funktioniert [318]. Voraussetzung dabei ist jedoch die

Etablierung einer Zelllinie mit dieser Deletion. Um zu untersuchen, ob ARE-enhaltende mRNAs in del(14)(q24q32)-positiven Fällen angereichert sind, wie es bei B-CLL mit 13q-Deletionen der Fall ist, wären Microarray-basierte Expressionsanalysen in diesen Fällen weiterführend [336]. Mit dieser Methode könnte auch festgestellt werden, ob die Lymphome mit Deletion del(14)(q24q32) aufgrund der Herunterregulation von TRAF3, einem negativen Regulator des NF- κ B-Signalwegs, eine NF- κ B-Signatur aufweisen.

Im Rahmen von zukünftigen klinischen Studien sollte analysiert werden, ob die neu identifizierte Subgruppe der B-CLL mit Deletion del(14)(q24q32) einen anderen Krankheitsverlauf zeigt als B-CLL ohne diese Deletion. Das würde bedeuten, dass speziell für diese Gruppe die wirksamsten therapeutischen Maßnahmen ermittelt werden müssten. Da TRAF3 in del(14)(q24q32)-positiven Lymphomen herunterreguliert ist, wäre beispielsweise ein Ansatz sinnvoll, der den NF- κ B-Signalweg hemmt. Dies wird bereits beim Multiplen Myelom und beim Morbus Waldenström, die ebenfalls häufig Inaktivierungen von TRAF3 aufweisen, vorklinisch getestet [360, 361]. Die Entwicklung von Therapien, die den ARE-vermittelten mRNA-Abbau reaktivieren, könnte sowohl in del(14)(q24q32)-positiven B-CLL aber auch in B-CLL mit 13q14.33-Deletion hilfreich sein.

Tumoren mit besonders hoher Telomerase-Aktivität, wie die in der vorliegenden Arbeit identifizierten lymphatischen Neoplasien mit Translokation t(5)(p15.33), sprechen möglicherweise gut auf Telomerase-hemmende Therapeutika an. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Medikament Imatinib (Glivec®), ein Arzneistoff zur Behandlung der Chronisch myeloischen Leukämie, die Telomerase-Aktivität inhibiert [362, 363]. Somit könnte zunächst an Zelllinien mit Translokation t(5)(p15.33) getestet werden, ob Imatinib die Proliferation der Translokation-tragenden Zellen verringert.

In ABC-DLBCL könnte das SPIB-Protein durch Maßnahmen, wie beispielsweise spezifische Inhibition, herunterreguliert werden. Lenz et al. [313] konnten bereits zeigen, dass ABC-DLBCL-Zelllinien durch gegen SPIB gerichtete RNA-Interferenz eingehen.

Zusammenfassend können auf der Basis der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse durch weiterführende Studien Fortschritte in der Diagnostik und Therapie von lymphatischen Neoplasien erzielt werden.

6 Zusammenfassung

Wie alle malignen Tumoren entwickeln sich lymphatische Neoplasien auf der Basis genetischer Veränderungen. Durch die Identifizierung von Genen, die an der Initiation und Progression von Tumoren beteiligt sind, kann ein besseres Verständnis über die Pathogenese der Erkrankungen erworben werden, was wiederum zu Fortschritten in Diagnostik und Therapie führen kann.

Bei lymphatischen Neoplasien der B-Zell-Reihe ist der lange Arm des Chromosoms 14 besonders häufig von chromosomalen Aberrationen betroffen. Die meisten dieser Veränderungen betreffen den Immunglobulinschwerketten (*IGH*)-Locus in der Chromosomenregion 14q32. Durch Fehler während der physiologischen Umlagerungen der *IGH*-Gensegmente kann es zu Translokationen kommen, durch die Onkogene in die Nähe der *IGH*-Enhancer geraten und in der Folge überexprimiert werden. Es treten bei B-Zell-Lymphomen aber auch andere wiederkehrende Veränderungen des Chromosoms 14 auf, wie interstitielle Deletionen, deren pathogenetische Bedeutung bislang unbekannt ist.

Mit dem Ziel, Gene zu identifizieren, die eine Rolle in der Pathogenese lymphatischer Neoplasien spielen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene, bisher nicht näher charakterisierte Veränderungen des Chromosoms 14 bei B-Zell-Tumoren analysiert. Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) bei 164 lymphatischen Neoplasien konnten vier Fälle mit Translokation $t(5;14)(p15;q32)$ mit Beteiligung des *IGH*-Locus sowie sechs mit Varianttranslokationen $t(5)(p15.33)$ beschrieben werden. Durch Kartierung der Bruchpunkte konnte das in der Chromosomenregion 5p15.33 gelegene *TERT*-Gen, welches für die Reverse Transkriptase-Untereinheit der Telomerase kodiert, als Zielgen der Aberration identifiziert werden. Der Nachweis einer Überexpression des *TERT*-Gens und einer erhöhten Telomerase-Aktivität in $t(5)(p15.33)$ -positiven Fällen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen legt nahe, dass *TERT* ein Onkogen darstellt, welches durch Aberrationen des Chromosoms 14 in B-Zell-Neoplasien dereguliert wird.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Translokation $t(14;19)(q32;q12)$ eine Überexpression des für Cyclin E1 kodierenden Gens der Region 19q12 (*CCNE1*) bedingt und dass in 41 mittels Immunhistochemie analysierten Diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) 7 % eine Überexpression des Proteins aufweisen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Aberrationen in 19q13.4 im Bereich des *SPIB*-Gens, welches

ebenfalls ein *IGH*-Translokationspartner ist, in DLBCL rekurrent sind. Zugewinne in dieser Region konnten in 27 von 65 (41,5 %) analysierten DLBCL, insbesondere solchen vom aktivierten B-Zell (ABC)-Typ, detektiert werden.

Im dritten Teil der Arbeit konnten mittels FISH- und Microarray-basierter vergleichender Genomhybridisierung (Array-CGH)-Analysen in insgesamt 46 lymphatischen Neoplasien Deletionen del(14)(q24q32) identifiziert werden. Der zentromerische Bruchpunkt lag in allen Fällen innerhalb der Region des *ZFP36L1*-Gens in 14q24, der telomerische Bruchpunkt in 45 der Fälle innerhalb des *IGH*-Locus in 14q32. Bruchpunktkartierungen mittels hochauflösender Array-CGH und Long Distance PCR in 33 Lymphomen mit del(14)(q24q32) zeigten, dass alle proximalen Bruchpunkte innerhalb des kodierenden Bereichs des *ZFP36L1*-Gens liegen, welches für das am mRNA-Abbau beteiligte ZFP36L1-Protein kodiert. Darüber hinaus konnten mittels Reverser Transkriptase-PCR *IGH-ZFP36L1*-Fusionstranskripte nachgewiesen werden. Molekularzytogenetische Analysen wiesen auf, dass in Chronisch lymphatischen Leukämien vom B-Zell-Typ (B-CLL) mit del(14)(q24q32) eine 13q-Deletion signifikant seltener, eine Trisomie 12 hingegen signifikant häufiger auftritt als normalerweise bei der B-CLL. In 22 % der del(14)(q24q32)-positiven Lymphome konnte zudem durch Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC)-, FISH- und Sequenzanalysen eine biallelische Inaktivierung des TRAF3-Proteins festgestellt werden. TRAF3 ist innerhalb der deletierten Region in 14q kodiert und ein negativer Regulator des NF- κ B-Signalwegs. Insgesamt zeigten Lymphome mit Deletion del(14)(q24q32) auf mRNA-Ebene eine Herunterregulation der *TRAF3*-Expression. Basierend auf den erhobenen Daten und der Literatur wurde ein Modell zur Pathogenese von del(14)(q24q32)-positiven B-CLL entwickelt. Es wird eine Interaktion zwischen der erhöhten NF- κ B-Aktivierung und einem gehemmtem AU-rich element (ARE)-vermittelten mRNA-Abbau angenommen, welcher durch die ZFP36L1-Trunkierung bedingt ist. Diese Interaktion verstärkt den tumorigenen Effekt der einzelnen onkogenen Veränderungen.

Die Analysen in dieser Arbeit führten zu einem besseren Verständnis über die molekularen Mechanismen der Lymphomentstehung. Darauf aufbauende Studien könnten die Diagnostik und Therapie lymphatischer Neoplasien verbessern.

7 Summary

Like all malignant tumors, lymphatic neoplasms develop on the basis of genetic alterations. The identification of genes associated with tumor initiation and progression can give new insights into the pathogenesis of these malignancies and potentially result in advances in diagnosis and therapy.

Alterations of the long arm of chromosome 14 are a hallmark of lymphatic B-cell-malignancies. Most of these aberrations refer to the immunoglobulin heavy chain (*IGH*)-locus in the chromosomal region 14q32. Errors during physiological rearrangements of the *IGH*-gene segments can result in translocations whereby oncogenes are placed under the control of *IGH*-enhancers and are subsequently overexpressed. The long arm of chromosome 14 is also affected by further alterations in B-cell-lymphoma. These comprise for example interstitial deletions, as the pathogenetic relevance of which remained unknown until now.

To identify genes acting in the development of lymphatic neoplasms, in the present study uncharacterized alterations of the long arm of chromosome 14 in B-cell malignancies were analyzed. Using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in 164 lymphatic neoplasias, four cases with translocation t(5;14)(p15;q32) involving the *IGH*-locus and six variant translocations have been described. Mapping of the breakpoints in the chromosomal region 5p15.33 identified the gene *TERT*, encoding the reverse transcriptase subunit of the telomerase, as the target of these aberrations. The increased expression of *TERT* and telomerase activation in 5p15.33-positive cases compared to controls strongly suggests *TERT* to act as an oncogene deregulated by alterations of chromosome 14 in B-cell-neoplasms.

The second part of the study showed that the translocation t(14;19)(q32;q12) leads to overexpression of the *CCNE1*-gene in the chromosomal region 19q12 encoding Cyclin E1. Furthermore, 7% of 41 diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) analyzed by immunohistochemistry revealed overexpression of the Cyclin E1-protein. Moreover, it could be shown that aberrations affecting another region in 19q, i.e. 19q13.4 around the *IGH*-translocation partner gene *SPIB*, were recurrent in DLBCL. Chromosomal gains in this region have been identified in 27 of 65 (41,5%) analyzed DLBCL, especially those of the activated B-cell (ABC)-type.

In the third section of the study, FISH- and array-based comparative genomic hybridization (Array CGH)-analyses detected deletions del(14)(q24q32) in a total of 46 lymphatic neoplasms. In all cases the centromeric breakpoints have been mapped to a region around the *ZFP36L1*-gene in 14q24. Telomeric breakpoints were located in the *IGH*-locus in 14q32 in 45 of the cases. Breakpoint mapping by high resolution Array CGH and long distance PCR in 33 lymphomas with del(14)(q24q32) revealed the proximal breakpoints within the coding region of *ZFP36L1*. This gene encodes the ZFP36L1-protein, which is involved in mRNA-decay. By reverse transcription PCR, various fusion transcripts of *IGH* and *ZFP36L1* have been detected. Molecular cytogenetic analyses showed 13q-deletions to be significantly less frequent and trisomy 12 to be significantly more frequent in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) with del(14)(q24q32) as compared to B-CLL in general. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC)-, FISH- and sequence analyses detected biallelic inactivation of the *TRAF3* gene in 22 % of del(14)(q24q32)-positive lymphoma. *TRAF3* maps to the deleted region in 14q and its encoded protein negatively regulates the NF- κ B-pathway. Lymphoma with deletion del(14)(q24q32) showed low expression of *TRAF3*-mRNA. Based on the results of the present study and the literature, a model on the pathogenesis of del(14)(q24q32)-positive B-CLL has been established. This model presumes an interaction between enhanced NF- κ B-activation and a reduced AU-rich element (ARE)-mediated mRNA-decay, caused by the ZFP36L1-truncation. The interaction amplifies the tumorigenic effect of the particular oncogenic alterations.

The analyses performed in this thesis led to a better understanding of molecular mechanism of lymphoma development. Further studies may improve diagnostic and therapy of lymphatic malignancies.

8 Referenzen

1. Weinberg, R.A., *The biology of cancer*. Vol. 1. 2007, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 796.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Luo, J., N.L. Solimini, and S.J. Elledge, *Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction*. Cell, 2009. **136**(5): p. 823-37.
4. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
5. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
6. Beerenwinkel, N., et al., *Genetic progression and the waiting time to cancer*. PLoS Comput Biol, 2007. **3**(11): p. e225.
7. Balmain, A., J. Gray, and B. Ponder, *The genetics and genomics of cancer*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 238-44.
8. Croce, C.M., *Oncogenes and cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(5): p. 502-11.
9. Shtivelman, E., et al., *Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia*. Nature, 1985. **315**(6020): p. 550-4.
10. Tabin, C.J., et al., *Mechanism of activation of a human oncogene*. Nature, 1982. **300**(5888): p. 143-9.
11. Lockwood, W.W., et al., *DNA amplification is a ubiquitous mechanism of oncogene activation in lung and other cancers*. Oncogene, 2008. **27**(33): p. 4615-24.
12. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
13. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 157-62.
14. Nowak, M.A., et al., *Evolutionary dynamics of tumor suppressor gene inactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10635-8.
15. Payne, S.R. and C.J. Kemp, *Tumor suppressor genetics*. Carcinogenesis, 2005. **26**(12): p. 2031-45.
16. Weinberg, R.A., *Tumor suppressor genes*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1138-46.
17. Sherr, C.J., *Principles of tumor suppression*. Cell, 2004. **116**(2): p. 235-46.
18. Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. Vol. 2. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
19. Harris, N.L., et al., *New approaches to lymphoma diagnosis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2001: p. 194-220.
20. Lefranc, M.-P. and G. Lefranc, *The Immunoglobulin FactsBook*. 2001, London: Academic Press. 458.
21. Matsuda, F. and T. Honjo, *Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus*. Adv Immunol, 1996. **62**: p. 1-29.
22. Kuppers, R. and R. Dalla-Favera, *Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5580-94.
23. Tonegawa, S., *Somatic generation of antibody diversity*. Nature, 1983. **302**(5909): p. 575-81.
24. Kuppers, R., et al., *Cellular origin of human B-cell lymphomas*. N Engl J Med, 1999. **341**(20): p. 1520-9.

25. Krangel, M.S., *Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 624-30.
26. Coupland, S.E., M. Hummel, and H. Stein, *Lymphatisches System und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten*. Der Pathologe, 2000. **21**: p. 106-112.
27. Abken, H. and C. Butzler, *Re-organization of the immunoglobulin kappa gene on both alleles is not an obligatory prerequisite for Ig lambda gene expression in human cells*. Immunology, 1991. **74**(4): p. 709-13.
28. Stavnezer, J., J.E. Guikema, and C.E. Schrader, *Mechanism and regulation of class switch recombination*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 261-92.
29. Li, Z., et al., *The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination*. Genes Dev, 2004. **18**(1): p. 1-11.
30. Kuppers, R., *Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 251-62.
31. Chaudhuri, J. and F.W. Alt, *Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 541-52.
32. Bross, L., et al., *DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 589-97.
33. Papavasiliou, F.N. and D.G. Schatz, *Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 216-21.
34. Jaffe, E.S., et al., *Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms*, in *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition*. 2008, IARC Press: Lyon. p. 158-66.
35. Foss, H., S. Coupland, and H. Stein, *Klinisch-pathologische Formen peripherer T- und NK-Zell-Lymphome.*, in *Der Pathologe*. 2000, Springer-Verlag: Hamburg. p. 137-146.
36. Swerdlow, S.H., et al., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition*. 2008, Lyon: IARC Press.
37. Harris, N.L., et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues: Introduction*, in *World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2001, IARC Press: Lyon. p. 12-13.
38. Swerdlow, S., et al., *Mantle cell lymphoma*, in *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition*. 2008, IARC Press: Lyon. p. 229-32.
39. Lenz, G., M. Dreyling, and W. Hiddemann, *Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions*. Ann Hematol, 2004. **83**(2): p. 71-7.
40. Harris, A.W., et al., *Follicular Lymphoma*, in *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition*. 2008, IARC press: Lyon. p. 220-25.
41. Müller-Hermelink, H.K., et al., *Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma*, in *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition*. 2008, IARC Press: Lyon. p. 180-82.
42. Rosenwald, A., et al., *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1639-47.
43. Stevenson, F.K. and F. Caligaris-Cappio, *Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4389-95.

44. Haferlach, C., et al., *Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping*. *Leukemia*, 2007. **21**(12): p. 2442-51.
45. Stein, H., et al., [*Classification and pathogenesis of malignant lymphomas*]. *Internist (Berl)*, 2007. **48**(4): p. 351-61.
46. Chaganti, R.S., et al., *Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance*. *Semin Hematol*, 2000. **37**(4): p. 396-411.
47. Johansson, B., F. Mertens, and F. Mitelman, *Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances?* *Genes Chromosomes Cancer*, 1996. **16**(3): p. 155-63.
48. Zhang, Y., et al., *A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000. **27**(1): p. 52-8.
49. Kempski, H., et al., *Prenatal chromosomal diversification of leukemia in monozygotic twins*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003. **37**(4): p. 406-11.
50. Dyer, M.J. and R. Siebert, *Chromosomal and molecular alterations in lymphoid malignancies: basic principles and detection methods*, in *The Lymphoid Neoplasms, 3rd Edition*, I. Magrath, Editor. 2009, Oxford University Press.
51. Willis, T.G. and M.J. Dyer, *The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies*. *Blood*, 2000. **96**(3): p. 808-22.
52. Limpens, J., et al., *Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia*. *Oncogene*, 1991. **6**(12): p. 2271-6.
53. Summers, K.E., et al., *Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(2): p. 420-4.
54. Schmitt, C., et al., *The bcl-2/IgH rearrangement in a population of 204 healthy individuals: occurrence, age and gender distribution, breakpoints, and detection method validity*. *Leuk Res*, 2006. **30**(6): p. 745-50.
55. McDonnell, T.J. and S.J. Korsmeyer, *Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18)*. *Nature*, 1991. **349**(6306): p. 254-6.
56. Gladden, A.B., et al., *Expression of constitutively nuclear cyclin D1 in murine lymphocytes induces B-cell lymphoma*. *Oncogene*, 2006. **25**(7): p. 998-1007.
57. Bodrug, S.E., et al., *Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene*. *EMBO J*, 1994. **13**(9): p. 2124-30.
58. Schraders, M., et al., *Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization*. *Blood*, 2005. **105**(4): p. 1686-93.
59. Vater, I., et al., *GeneChip analyses point to novel pathogenetic mechanisms in mantle cell lymphoma*. *Br J Haematol*, 2009. **144**(3): p. 317-31.
60. Monni, O., et al., *Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998. **21**(4): p. 298-307.
61. Allen, J.E., et al., *Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization*. *Br J Haematol*, 2002. **116**(2): p. 291-8.
62. Bende, R.J., L.A. Smit, and C.J. van Noesel, *Molecular pathways in follicular lymphoma*. *Leukemia*, 2007. **21**(1): p. 18-29.

63. Ott, G. and A. Rosenwald, *Molecular pathogenesis of follicular lymphoma*. Haematologica, 2008. **93**(12): p. 1773-6.
64. Cheung, K.J., et al., *Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances*. Blood, 2009. **113**(1): p. 137-48.
65. Tilly, H., et al., *Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma*. Blood, 1994. **84**(4): p. 1043-9.
66. Hallek, M. and B. Emmerich, *Pathogenetische und prognostische Bedeutung genetischer Aberrationen, in Chronisch lymphatische Leukämie*. 2008, UNI-MED Verlag AG: Bremen.
67. Dohner, H., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2000. **343**(26): p. 1910-6.
68. Chen, J. and N.A. McMillan, *Molecular basis of pathogenesis, prognosis and therapy in chronic lymphocytic leukaemia*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(2): p. 174-9.
69. Jinek, M. and J.A. Doudna, *A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 405-12.
70. Stiewe, T., *The p53 family in differentiation and tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(3): p. 165-8.
71. Zenz, T., et al., *Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer: the role of the p53 pathway*. Cell Cycle, 2008. **7**(24): p. 3810-4.
72. Schaffner, C., et al., *Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(2): p. 748-53.
73. Keats, J.J., et al., *Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma*. Cancer Cell, 2007. **12**(2): p. 131-44.
74. Kay, N.E., et al., *The role of prognostic factors in assessing 'high-risk' subgroups of patients with chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2007. **21**(9): p. 1885-91.
75. Murray, F., et al., *Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1524-33.
76. Whang-Peng, J., et al., *Sequential analysis of 43 patients with non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations with cytogenetic, histologic, immunophenotyping, and molecular studies*. Blood, 1995. **85**(1): p. 203-16.
77. Offit, K., et al., *Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations*. Blood, 1991. **77**(7): p. 1508-15.
78. Siebert, R., *Mature B- and T-Cell Neoplasms and Hodgkin Lymphoma, in Cancer Cytogenetics, 3rd Edition*. 2009, Wiley-Blackwell.
79. Harrison, C.J., *Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol, 2009. **144**(2): p. 147-56.
80. Aplan, P.D., *Causes of oncogenic chromosomal translocation*. Trends Genet, 2006. **22**(1): p. 46-55.
81. Tsujimoto, Y., et al., *The reciprocal partners of both the t(14; 18) and the t(11; 14) translocations involved in B-cell neoplasms are rearranged by the same mechanism*. Oncogene, 1988. **2**(4): p. 347-51.
82. Jager, U., et al., *Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3520-9.
83. Cotter, F., et al., *Direct sequence analysis of the 14q+ and 18q- chromosome junctions in follicular lymphoma*. Blood, 1990. **76**(1): p. 131-5.

84. Tsujimoto, Y., et al., *The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining*. Science, 1985. **229**(4720): p. 1390-3.
85. Gelmann, E.P., et al., *Identification of reciprocal translocation sites within the c-myc oncogene and immunoglobulin mu locus in a Burkitt lymphoma*. Nature, 1983. **306**(5945): p. 799-803.
86. Showe, L.C., et al., *Cloning and sequencing of a c-myc oncogene in a Burkitt's lymphoma cell line that is translocated to a germ line alpha switch region*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(3): p. 501-9.
87. Baron, B.W., et al., *Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5262-6.
88. Ye, B.H., et al., *Cloning of bcl-6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma*. Cancer Res, 1993. **53**(12): p. 2732-5.
89. Goossens, T., U. Klein, and R. Kuppers, *Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2463-8.
90. Cario, G., et al., *Variant translocations in sporadic Burkitt's lymphoma detected in fresh tumour material: analysis of three cases*. Br J Haematol, 2000. **110**(3): p. 537-46.
91. Kato, S., et al., *Genetic recombination in a chromosomal translocation t(2;8)(p11;q24) of a Burkitt's lymphoma cell line, KOBK101*. Gene, 1991. **97**(2): p. 239-44.
92. Henglein, B., et al., *Three breakpoints of variant t(2;8) translocations in Burkitt's lymphoma cells fall within a region 140 kilobases distal from c-myc*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(5): p. 2105-13.
93. Akasaka, H., et al., *Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays*. Cancer Res, 2000. **60**(9): p. 2335-41.
94. Pasqualucci, L., et al., *Hypermethylation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 341-6.
95. Peng, H.Z., et al., *Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells*. Blood, 1999. **93**(7): p. 2167-72.
96. Callanan, M., et al., *Implication of cyclin D1 in malignant lymphoma*. Crit Rev Oncog, 1996. **7**(3-4): p. 191-203.
97. Barista, I., J.E. Romaguera, and F. Cabanillas, *Mantle-cell lymphoma*. Lancet Oncol, 2001. **2**(3): p. 141-8.
98. Ewen, M.E., et al., *Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins*. Cell, 1993. **73**(3): p. 487-97.
99. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**(3): p. 323-30.
100. Sanchez-Beato, M., A. Sanchez-Aguilera, and M.A. Piris, *Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1220-35.
101. Hummel, M., et al., *A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling*. N Engl J Med, 2006. **354**(23): p. 2419-30.
102. Hecht, J.L. and J.C. Aster, *Molecular biology of Burkitt's lymphoma*. J Clin Oncol, 2000. **18**(21): p. 3707-21.
103. Boxer, L.M. and C.V. Dang, *Translocations involving c-myc and c-myc function*. Oncogene, 2001. **20**(40): p. 5595-610.

104. Kondo, E. and T. Yoshino, *Expression of apoptosis regulators in germinal centers and germinal center-derived B-cell lymphomas: insight into B-cell lymphomagenesis*. *Pathol Int*, 2007. **57**(7): p. 391-7.
105. Ohno, H., *Pathogenetic and clinical implications of non-immunoglobulin ; BCL6 translocations in B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. *J Clin Exp Hematop*, 2006. **46**(2): p. 43-53.
106. Ohno, H., *Pathogenetic role of BCL6 translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. *Histol Histopathol*, 2004. **19**(2): p. 637-50.
107. Bertrand, P., et al., *Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas*. *Leukemia*, 2007. **21**(3): p. 515-23.
108. Siebert, R., et al., *Molecular features of B-cell lymphoma*. *Curr Opin Oncol*, 2001. **13**(5): p. 316-24.
109. Willis, T.G., et al., *Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types*. *Cell*, 1999. **96**(1): p. 35-45.
110. Zhang, Q., et al., *Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32)*. *Nat Genet*, 1999. **22**(1): p. 63-8.
111. Dyomin, V.G., et al., *MUC1 is activated in a B-cell lymphoma by the t(1;14)(q21;q32) translocation and is rearranged and amplified in B-cell lymphoma subsets*. *Blood*, 2000. **95**(8): p. 2666-71.
112. Gilles, F., et al., *MUC1 dysregulation as the consequence of a t(1;14)(q21;q32) translocation in an extranodal lymphoma*. *Blood*, 2000. **95**(9): p. 2930-6.
113. Satterwhite, E., et al., *The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies*. *Blood*, 2001. **98**(12): p. 3413-20.
114. Streubel, B., et al., *T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma*. *Leukemia*, 2005. **19**(4): p. 652-8.
115. Kerckaert, J.P., et al., *LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas*. *Nat Genet*, 1993. **5**(1): p. 66-70.
116. Ye, B.H., et al., *Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma*. *Science*, 1993. **262**(5134): p. 747-50.
117. Sonoki, T., et al., *Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies*. *Blood*, 2001. **98**(9): p. 2837-44.
118. Corcoran, M.M., et al., *Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations*. *Oncogene*, 1999. **18**(46): p. 6271-7.
119. Taub, R., et al., *Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(24): p. 7837-41.
120. Busslinger, M., et al., *Deregulation of PAX-5 by translocation of the Emu enhancer of the IgH locus adjacent to two alternative PAX-5 promoters in a diffuse large-cell lymphoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 6129-34.
121. Iida, S., et al., *The t(9;14)(p13;q32) chromosomal translocation associated with lymphoplasmacytoid lymphoma involves the PAX-5 gene*. *Blood*, 1996. **88**(11): p. 4110-7.
122. Neri, A., et al., *B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to *NF-kappa B p50**. *Cell*, 1991. **67**(6): p. 1075-87.

123. Motokura, T., et al., *A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene*. Nature, 1991. **350**(6318): p. 512-5.
124. Rosenberg, C.L., et al., *PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9638-42.
125. Gesk, S., et al., *A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus*. Blood, 2006. **108**(3): p. 1109-10.
126. Herens, C., et al., *Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma with cryptic t(12;14)(p13;q32) and cyclin D2 overexpression*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1745-6.
127. Zani, V.J., et al., *Molecular cloning of complex chromosomal translocation t(8;14;12)(q24.1;q32.3;q24.1) in a Burkitt lymphoma cell line defines a new gene (BCL7A) with homology to caldesmon*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3124-34.
128. Dyomin, V.G., et al., *BCL8, a novel gene involved in translocations affecting band 15q11-13 in diffuse large-cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5728-32.
129. Streubel, B., et al., *T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2335-9.
130. Sanchez-Izquierdo, D., et al., *MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4539-46.
131. Ohno, H., G. Takimoto, and T.W. McKeithan, *The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control*. Cell, 1990. **60**(6): p. 991-7.
132. Tilly, H., et al., *Del(14)(q22) in diffuse B-cell lymphocytic lymphoma*. Am J Clin Pathol, 1988. **89**(1): p. 109-13.
133. Jarosova, M., et al., *Contribution of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization to the detection of chromosomal abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Onkologie, 2001. **24**(1): p. 60-5.
134. Mayr, C., et al., *Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2006. **107**(2): p. 742-51.
135. Dicker, F., et al., *Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3152-60.
136. Kristoffersson, U., et al., *Deletion of 14q in non-Hodgkin's lymphoma*. Eur J Haematol, 1990. **44**(4): p. 261-4.
137. Hammond, D.W., et al., *Cytogenetic analysis of a United Kingdom series of non-Hodgkins lymphomas*. Cancer Genet Cytogenet, 1992. **61**(1): p. 31-8.
138. Fujiwara, A., et al., *Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation*. Genetica, 2001. **111**(1-3): p. 77-89.
139. Strachan, T. and A.P. Read, *Struktur und Funktion der Chromosomen.*, in *Molekulare Humangenetik*. 2005, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH. p. 207-34.
140. Schlegelberger, B., et al., *Classical and Molecular Cytogenetics of Tumor Cells*, in *Diagnostic Cytogenetics*. 1999, Springer: Berlin. p. 151-185.
141. Speicher, M.R. and N.P. Carter, *The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(10): p. 782-92.

142. Dewald, G.W., S.R. Brockman, and S.F. Paternoster, *Molecular Cytogenetic Studies for Hematological Malignancies in Hematopathology in Oncology*. 2006, Springer US. p. 69-112.
143. Trask, B.J., *Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(10): p. 769-78.
144. Kearney, L., *The impact of the new fish technologies on the cytogenetics of haematological malignancies*. Br J Haematol, 1999. **104**(4): p. 648-58.
145. Kearney, L. and S.W. Horsley, *Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects*. Chromosoma, 2005. **114**(4): p. 286-94.
146. Nielander, I., et al., *Combining array-based approaches for the identification of candidate tumor suppressor loci in mature lymphoid neoplasms*. APMIS, 2007. **115**(10): p. 1107-34.
147. Coe, B.P., et al., *Resolving the resolution of array CGH*. Genomics, 2007. **89**(5): p. 647-53.
148. Maciejewski, J.P. and G.J. Mufti, *Whole genome scanning as a cytogenetic tool in hematologic malignancies*. Blood, 2008. **112**(4): p. 965-74.
149. Maciejewski, J.P., R.V. Tiu, and C. O'Keefe, *Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies*. Br J Haematol, 2009.
150. Poppe, B., et al., *Novel cryptic chromosomal rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by multiple color fluorescent in situ hybridization*. Haematologica, 2005. **90**(9): p. 1179-85.
151. Yu, B., et al., *DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)*. Curr Protoc Hum Genet, 2006. **Chapter 7**: p. Unit7 10.
152. Xiao, W. and P.J. Oefner, *Denaturing high-performance liquid chromatography: A review*. Hum Mutat, 2001. **17**(6): p. 439-74.
153. Huber, C.G., P.J. Oefner, and G.K. Bonn, *Rapid and Accurate Sizing of DNA Fragments by Ion-Pair Chromatography on Alkylated Nonporous Poly(styrene-divinylbenzene) Particles*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(3): p. 578-585.
154. van Dongen, J.J., et al., *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. Leukemia, 2003. **17**(12): p. 2257-317.
155. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
156. Bustin, S.A., et al., *Quantitative real-time RT-PCR--a perspective*. J Mol Endocrinol, 2005. **34**(3): p. 597-601.
157. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
158. Klapper, W., et al., *DNA damage transiently increases TRF2 mRNA expression and telomerase activity*. Leukemia, 2003. **17**(10): p. 2007-15.
159. Nagel, I., *Positionelle Klonierung von Translokationspartnern des IGH-Locus bei lymphatischen Tumoren*, in *Diplomarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*. 2004: Kiel. p. 81.
160. Camps, J., et al., *Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines*. Leuk Res, 2006. **30**(8): p. 923-34.

161. Krupp, G., et al., *Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(4): p. 919-21.
162. Akasaka, T., et al., *Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3451-61.
163. Martin-Subero, J.I., et al., *A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation*. Leukemia, 2007. **21**(7): p. 1532-44.
164. Lenz, G., et al., *Aberrant Immunoglobulin Class Switch Recombination and Switch Translocations in Activated B Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. ASH Annual Meeting Abstracts, 2006. **108**(11): p. 356-.
165. Sonoki, T., et al., *Rapid amplification of immunoglobulin heavy chain switch (IGHs) translocation breakpoints using long-distance inverse PCR*. Leukemia, 2004. **18**(12): p. 2026-31.
166. Oschlies, I., et al., *Diffuse large B-cell lymphoma in pediatric patients belongs predominantly to the germinal-center type B-cell lymphomas: a clinicopathologic analysis of cases included in the German BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) Multicenter Trial*. Blood, 2006. **107**(10): p. 4047-52.
167. Rosenwald, A., et al., *The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma*. N Engl J Med, 2002. **346**(25): p. 1937-47.
168. Stoecklin, G., et al., *Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4709-18.
169. Thacker, J., *The RAD51 gene family, genetic instability and cancer*. Cancer Lett, 2005. **219**(2): p. 125-35.
170. Cools, J., et al., *A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(13): p. 1201-14.
171. Vandenberghe, P., et al., *Clinical and molecular features of FIP1L1-PDFGRA (+) chronic eosinophilic leukemias*. Leukemia, 2004. **18**(4): p. 734-42.
172. Neale, G.A. and G.R. Kitchingman, *mRNA transcripts initiating within the human immunoglobulin mu heavy chain enhancer region contain a non-translatable exon and are extremely heterogeneous at the 5' end*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(9): p. 2427-33.
173. Ruminy, P., et al., *Two patterns of chromosomal breakpoint locations on the immunoglobulin heavy-chain locus in B-cell lymphomas with t(3;14)(q27;q32): relevance to histology*. Oncogene, 2006. **25**(35): p. 4947-54.
174. Busygina, V., et al., *Multiple endocrine neoplasia type 1 interacts with forkhead transcription factor CHES1 in DNA damage response*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8397-403.
175. Thomas, G., et al., *A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1)*. Nat Genet, 2009. **41**(5): p. 579-84.
176. Van Vlierberghe, P., et al., *The cryptic chromosomal deletion del(11)(p12p13) as a new activation mechanism of LMO2 in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3520-9.

177. Annunziata, C.M., et al., *Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma*. *Cancer Cell*, 2007. **12**(2): p. 115-30.
178. Braggio, E., et al., *Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenstrom's macroglobulinemia*. *Cancer Res*, 2009. **69**(8): p. 3579-88.
179. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. *Immunology*, 2005. **115**(1): p. 1-20.
180. He, J.Q., et al., *Specificity of TRAF3 in its negative regulation of the noncanonical NF-kappa B pathway*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(6): p. 3688-94.
181. Zapata, J.M., et al., *TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies*. *J Immunol*, 2000. **165**(9): p. 5084-96.
182. Krajewski, S., et al., *Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of TRAF-3 expression, a member of the TNF receptor-associated factor family*. *J Immunol*, 1997. **159**(12): p. 5841-52.
183. Weier, H.U., *DNA fiber mapping techniques for the assembly of high-resolution physical maps*. *J Histochem Cytochem*, 2001. **49**(8): p. 939-48.
184. Buckle, V.J. and L. Kearney, *Untwirling dirvish*. *Nat Genet*, 1993. **5**(1): p. 4-5.
185. Heiskanen, M., L. Peltonen, and A. Palotif, *Visual mapping by high resolution FISH*. *Trends Genet*, 1996. **12**(10): p. 379-82.
186. Brown, L.A. and D. Huntsman, *Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions*. *J Mol Histol*, 2007. **38**(2): p. 151-7.
187. Whitehead, C.M., et al., *ASE-1: a novel protein of the fibrillar centres of the nucleolus and nucleolus organizer region of mitotic chromosomes*. *Chromosoma*, 1997. **106**(8): p. 493-502.
188. Stankiewicz, P., et al., *Genomic and genic deletions of the FOX gene cluster on 16q24.1 and inactivating mutations of FOXF1 cause alveolar capillary dysplasia and other malformations*. *Am J Hum Genet*, 2009. **84**(6): p. 780-91.
189. Coe, B.P., et al., *High-resolution chromosome arm 5p array CGH analysis of small cell lung carcinoma cell lines*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005. **42**(3): p. 308-13.
190. Kang, J.U., et al., *Identification of novel candidate target genes, including EPHB3, MASP1 and SST at 3q26.2-q29 in squamous cell carcinoma of the lung*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 237.
191. Heard, P.L., et al., *High resolution genomic analysis of 18q- using oligo-microarray comparative genomic hybridization (aCGH)*. *Am J Med Genet A*, 2009. **149A**(7): p. 1431-7.
192. Carvalho, C.M., et al., *Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by fork stalling and template switching*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(12): p. 2188-203.
193. Johnston, J.J., et al., *Zoom-in comparative genomic hybridisation arrays for the characterisation of variable breakpoint contiguous gene syndromes*. *J Med Genet*, 2007. **44**(1): p. e59.
194. Cheng, J.F., C.L. Smith, and C.R. Cantor, *Structural and transcriptional analysis of a human subtelomeric repeat*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(1): p. 149-54.
195. de Lange, T., et al., *Structure and variability of human chromosome ends*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(2): p. 518-27.

196. Gribble, S.M., et al., *Ultra-high resolution array painting facilitates breakpoint sequencing*. J Med Genet, 2007. **44**(1): p. 51-8.
197. Fiegler, H., et al., *Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays*. J Med Genet, 2003. **40**(9): p. 664-70.
198. Gribble, S.M., et al., *Applications of combined DNA microarray and chromosome sorting technologies*. Chromosome Res, 2004. **12**(1): p. 35-43.
199. Backx, L., et al., *Array painting using microdissected chromosomes to map chromosomal breakpoints*. Cytogenet Genome Res, 2007. **116**(3): p. 158-66.
200. Chabrol, B., et al., *Deletion of C2orf34, PREPL and SLC3A1 causes atypical hypotonia-cystinuria syndrome*. J Med Genet, 2008. **45**(5): p. 314-8.
201. Weksberg, R., et al., *Molecular characterization of deletion breakpoints in adults with 22q11 deletion syndrome*. Hum Genet, 2007. **120**(6): p. 837-45.
202. Buysse, K., et al., *Mapping of 5q35 chromosomal rearrangements within a genomically unstable region*. J Med Genet, 2008. **45**(10): p. 672-8.
203. Kolomietz, E., et al., *The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors*. Genes Chromosomes Cancer, 2002. **35**(2): p. 97-112.
204. Pospisilova, H., et al., *Interstitial del(14)(q) involving IGH: a novel recurrent aberration in B-NHL*. Leukemia, 2007. **21**(9): p. 2079-83.
205. Schule, B., et al., *Molecular breakpoint cloning and gene expression studies of a novel translocation t(4;15)(q27;q11.2) associated with Prader-Willi syndrome*. BMC Med Genet, 2005. **6**: p. 18.
206. Sood, R., et al., *Cloning and characterization of an inversion breakpoint at 6q23.3 suggests a role for Map7 in sacral dysgenesis*. Cytogenet Genome Res, 2004. **106**(1): p. 61-7.
207. Akasaka, T., H. Akasaka, and H. Ohno, *Polymerase chain reaction amplification of long DNA targets: application to analysis of chromosomal translocations in human B-cell tumors (review)*. Int J Oncol, 1998. **12**(1): p. 113-21.
208. Akasaka, T., et al., *Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC/immunoglobulin heavy-chain fusion gene*. J Clin Oncol, 2000. **18**(3): p. 510-18.
209. Russell, L.J., et al., *t(6;14)(p22;q32): a new recurrent IGH@ translocation involving ID4 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)*. Blood, 2008. **111**(1): p. 387-91.
210. Siebert, P.D., et al., *An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(6): p. 1087-8.
211. Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 387-402.
212. Campbell, P.J., et al., *Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing*. Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 722-9.
213. Bashir, A., et al., *Evaluation of paired-end sequencing strategies for detection of genome rearrangements in cancer*. PLoS Comput Biol, 2008. **4**(4): p. e1000051.
214. Zhao, Q., et al., *Transcriptome-guided characterization of genomic rearrangements in a breast cancer cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1886-91.
215. Turner, E.H., et al., *Methods for Genomic Partitioning*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009.
216. Bashiardes, S., et al., *Direct genomic selection*. Nat Methods, 2005. **2**(1): p. 63-9.

217. Noonan, J.P., et al., *Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA*. Science, 2006. **314**(5802): p. 1113-8.
218. Albert, T.J., et al., *Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization*. Nat Methods, 2007. **4**(11): p. 903-5.
219. Hodges, E., et al., *Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing*. Nat Genet, 2007. **39**(12): p. 1522-7.
220. Chen, W., et al., *Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing*. Genome Res, 2008. **18**(7): p. 1143-9.
221. Stacey, S.N., et al., *New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma*. Nat Genet, 2009. **41**(8): p. 909-14.
222. Rafnar, T., et al., *Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types*. Nat Genet, 2009. **41**(2): p. 221-7.
223. McKay, J.D., et al., *Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1404-6.
224. Wang, Y., et al., *Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1407-9.
225. Blackburn, E.H., *Switching and signaling at the telomere*. Cell, 2001. **106**(6): p. 661-73.
226. de Lange, T., *Protection of mammalian telomeres*. Oncogene, 2002. **21**(4): p. 532-40.
227. Collins, K. and J.R. Mitchell, *Telomerase in the human organism*. Oncogene, 2002. **21**(4): p. 564-79.
228. Yamamoto, K., et al., *A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(4): p. 1148-54.
229. Wang, S. and J. Zhu, *The hTERT gene is embedded in a nuclease-resistant chromatin domain*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55401-10.
230. Shin, K.H., et al., *Hypermethylation of the hTERT promoter inhibits the expression of telomerase activity in normal oral fibroblasts and senescent normal oral keratinocytes*. Br J Cancer, 2003. **89**(8): p. 1473-8.
231. Wang, S. and J. Zhu, *Evidence for a relief of repression mechanism for activation of the human telomerase reverse transcriptase promoter*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 18842-50.
232. Kyo, S., et al., *Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers*. Cancer Sci, 2008. **99**(8): p. 1528-38.
233. Karlseder, J., *Telomere repeat binding factors: keeping the ends in check*. Cancer Lett, 2003. **194**(2): p. 189-97.
234. Gonzalez-Suarez, I. and S. Gonzalo, *Crosstalk between chromatin structure, nuclear compartmentalization, and telomere biology*. Cytogenet Genome Res, 2008. **122**(3-4): p. 202-10.
235. Feng, J., et al., *The RNA component of human telomerase*. Science, 1995. **269**(5228): p. 1236-41.
236. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 4. 2002, New York: Garland Science.
237. Meyerson, M., et al., *hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization*. Cell, 1997. **90**(4): p. 785-95.
238. Cayuela, M.L., J.M. Flores, and M.A. Blasco, *The telomerase RNA component Terc is required for the tumour-promoting effects of Tert overexpression*. EMBO Rep, 2005. **6**(3): p. 268-74.

239. Ulaner, G.A., et al., *Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts*. *Cancer Res*, 1998. **58**(18): p. 4168-72.
240. Kyo, S. and M. Inoue, *Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy?* *Oncogene*, 2002. **21**(4): p. 688-97.
241. Ohyashiki, J.H., et al., *Quantitative relationship between functionally active telomerase and major telomerase components (hTERT and hTR) in acute leukaemia cells*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(10): p. 1942-7.
242. Oulton, R. and L. Harrington, *Telomeres, telomerase, and cancer: life on the edge of genomic stability*. *Curr Opin Oncol*, 2000. **12**(1): p. 74-81.
243. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(8): p. 611-22.
244. Smogorzewska, A. and T. de Lange, *Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells*. *EMBO J*, 2002. **21**(16): p. 4338-48.
245. Blasco, M.A., *Telomeres and cancer: a tale with many endings*. *Curr Opin Genet Dev*, 2003. **13**(1): p. 70-6.
246. Ely, S.A., et al., *Telomerase activity in B-cell non-Hodgkin lymphoma*. *Cancer*, 2000. **89**(2): p. 445-52.
247. Kim, N.W., et al., *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. *Science*, 1994. **266**(5193): p. 2011-5.
248. Hiyama, E., et al., *Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues*. *Neoplasia*, 2001. **3**(1): p. 17-26.
249. Klapper, W., et al., *Telomerase activity in B-cell non-Hodgkin lymphomas is regulated by hTERT transcription and correlated with telomere-binding protein expression but uncoupled from proliferation*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(4): p. 713-9.
250. Remes, K., et al., *Telomere length and telomerase activity in malignant lymphomas at diagnosis and relapse*. *Br J Cancer*, 2000. **82**(3): p. 601-7.
251. MacNamara, B., et al., *Telomerase activity in relation to pro- and anti-apoptotic protein expression in high grade non-Hodgkin's lymphomas*. *Haematologica*, 2001. **86**(4): p. 386-93.
252. Nakayama, J., et al., *Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas*. *Nat Genet*, 1998. **18**(1): p. 65-8.
253. Bryan, T.M., et al., *Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines*. *Nat Med*, 1997. **3**(11): p. 1271-4.
254. Chang, S., et al., *Telomere-based crisis: functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression*. *Genes Dev*, 2003. **17**(1): p. 88-100.
255. Blasco, M.A. and W.C. Hahn, *Evolving views of telomerase and cancer*. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(6): p. 289-94.
256. Damm, K., et al., *A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation*. *EMBO J*, 2001. **20**(24): p. 6958-68.
257. Hahn, W.C., et al., *Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells*. *Nat Med*, 1999. **5**(10): p. 1164-70.
258. Blasco, M.A., et al., *Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA*. *Cell*, 1997. **91**(1): p. 25-34.

-
259. Gonzalez-Suarez, E., et al., *Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis*. Nat Genet, 2000. **26**(1): p. 114-7.
260. Artandi, S.E., et al., *Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8191-6.
261. Gonzalez-Suarez, E., et al., *Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes*. EMBO J, 2001. **20**(11): p. 2619-30.
262. Stewart, S.A., et al., *Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12606-11.
263. Canela, A., et al., *Constitutive expression of tert in thymocytes leads to increased incidence and dissemination of T-cell lymphoma in Lck-Tert mice*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(10): p. 4275-93.
264. Smith, L.L., H.A. Collier, and J.M. Roberts, *Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 474-9.
265. Rahman, R., L. Latonen, and K.G. Wiman, *hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity*. Oncogene, 2005. **24**(8): p. 1320-7.
266. Dudognon, C., et al., *Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance*. Oncogene, 2004. **23**(45): p. 7469-74.
267. Massard, C., et al., *hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway*. Oncogene, 2006. **25**(33): p. 4505-14.
268. Del Bufalo, D., et al., *Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function*. Cell Death Differ, 2005. **12**(11): p. 1429-38.
269. Park, J.I., et al., *Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin*. Nature, 2009. **460**(7251): p. 66-72.
270. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.
271. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
272. Muller-Tidow, C., et al., *Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 2890-904.
273. Derksen, P.W., et al., *Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6122-7.
274. Ferber, M.J., et al., *Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers*. Oncogene, 2003. **22**(24): p. 3813-20.
275. Yang, F., et al., *Telomerase reverse transcriptase expression elevated by avian leukosis virus integration in B cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(48): p. 18952-7.
276. Janknecht, R., *On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells*. FEBS Lett, 2004. **564**(1-2): p. 9-13.
277. Mosse, Y.P., et al., *High-resolution detection and mapping of genomic DNA alterations in neuroblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **43**(4): p. 390-403.
278. Fan, X., et al., *hTERT gene amplification and increased mRNA expression in central nervous system embryonal tumors*. Am J Pathol, 2003. **162**(6): p. 1763-9.

279. Kang, J.U., et al., *Gain at chromosomal region 5p15.33, containing TERT, is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008. **182**(1): p. 1-11.
280. Gonzalez-Suarez, E., J.M. Flores, and M.A. Blasco, *Cooperation between p53 mutation and high telomerase transgenic expression in spontaneous cancer development*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(20): p. 7291-301.
281. Moroy, T. and C. Geisen, *Cyclin E*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(8): p. 1424-39.
282. Hwang, H.C. and B.E. Clurman, *Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles*. *Oncogene*, 2005. **24**(17): p. 2776-86.
283. Mussman, J.G., et al., *Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression*. *Oncogene*, 2000. **19**(13): p. 1635-46.
284. Okuda, M., et al., *Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication*. *Cell*, 2000. **103**(1): p. 127-40.
285. Schraml, P., et al., *Cyclin E overexpression and amplification in human tumours*. *J Pathol*, 2003. **200**(3): p. 375-82.
286. Wolowiec, D., et al., *Differential expression of cell proliferation regulatory proteins in B- and T-lineage acute lymphoblastic leukaemias*. *Br J Haematol*, 1996. **95**(3): p. 518-23.
287. Yasui, W., et al., *Expression of cyclin E in colorectal adenomas and adenocarcinomas: correlation with expression of Ki-67 antigen and p53 protein*. *Virchows Arch*, 1996. **429**(1): p. 13-9.
288. Iida, H., et al., *Overexpression of cyclin E in acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 1997. **90**(9): p. 3707-13.
289. Fukuse, T., et al., *Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(2): p. 242-4.
290. Tzankov, A., et al., *Diffuse large B-cell lymphoma with overexpression of cyclin e substantiates poor standard treatment response and inferior outcome*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(7 Pt 1): p. 2125-32.
291. Keyomarsi, K., et al., *Cyclin E and survival in patients with breast cancer*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(20): p. 1566-75.
292. Hunt, K.K. and K. Keyomarsi, *Cyclin E as a prognostic and predictive marker in breast cancer*. *Semin Cancer Biol*, 2005. **15**(4): p. 319-26.
293. Massague, J., *G1 cell-cycle control and cancer*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 298-306.
294. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 316-23.
295. Spruck, C.H., K.A. Won, and S.I. Reed, *Deregulated cyclin E induces chromosome instability*. *Nature*, 1999. **401**(6750): p. 297-300.
296. Loeb, K.R., et al., *A mouse model for cyclin E-dependent genetic instability and tumorigenesis*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(1): p. 35-47.
297. Hanashiro, K., et al., *Roles of cyclins A and E in induction of centrosome amplification in p53-compromised cells*. *Oncogene*, 2008. **27**(40): p. 5288-302.
298. Kawamura, K., et al., *Centrosome hyperamplification and chromosomal damage after exposure to radiation*. *Oncology*, 2004. **67**(5-6): p. 460-70.
299. Cigudosa, J.C., et al., *Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999. **25**(2): p. 123-33.
300. Kanda-Akano, Y., et al., *Molecular-cytogenetic characterization of non-Hodgkin's lymphoma with double and cryptic translocations of the immunoglobulin heavy chain gene*. *Leuk Lymphoma*, 2004. **45**(8): p. 1559-67.

-
301. Adhikary, S. and M. Eilers, *Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(8): p. 635-45.
 302. Hanson, K.D., et al., *Effects of c-myc expression on cell cycle progression*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 5748-55.
 303. Seoane, J., H.V. Le, and J. Massague, *Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage*. Nature, 2002. **419**(6908): p. 729-34.
 304. Matsumura, I., H. Tanaka, and Y. Kanakura, *E2F1 and c-Myc in cell growth and death*. Cell Cycle, 2003. **2**(4): p. 333-8.
 305. Su, G.H., et al., *The Ets protein Spi-B is expressed exclusively in B cells and T cells during development*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 203-14.
 306. Schotte, R., et al., *The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development*. J Exp Med, 2004. **200**(11): p. 1503-9.
 307. Anderson, M.K., et al., *Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage*. Development, 1999. **126**(14): p. 3131-48.
 308. Ray, D., et al., *Characterization of Spi-B, a transcription factor related to the putative oncoprotein Spi-1/PU.1*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(10): p. 4297-304.
 309. Su, G.H., et al., *Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 7118-29.
 310. Ray-Gallet, D., et al., *DNA binding specificities of Spi-1/PU.1 and Spi-B transcription factors and identification of a Spi-1/Spi-B binding site in the c-fes/c-fps promoter*. Oncogene, 1995. **11**(2): p. 303-13.
 311. Hu, C.J., et al., *PU.1/Spi-B regulation of c-rel is essential for mature B cell survival*. Immunity, 2001. **15**(4): p. 545-55.
 312. Martin-Subero, J.I., et al., *Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1474-7.
 313. Lenz, G., et al., *Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13520-5.
 314. Stumpo, D.J., et al., *Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of Zfp36L1, a gene encoding a CCCH tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(14): p. 6445-55.
 315. Brandenberger, R., et al., *Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(6): p. 707-16.
 316. Maclean, K.N., et al., *The human immediate early gene BRF1 maps to chromosome 14q22-q24*. Genomics, 1995. **30**(1): p. 89-90.
 317. Blackshear, P.J., et al., *Polymorphisms in the genes encoding members of the tristetraprolin family of human tandem CCCH zinc finger proteins*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2003. **75**: p. 43-68.
 318. Franks, T.M. and J. Lykke-Andersen, *TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements*. Genes Dev, 2007. **21**(6): p. 719-35.
 319. Lykke-Andersen, J. and E. Wagner, *Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1*. Genes Dev, 2005. **19**(3): p. 351-61.

-
320. Lai, W.S., et al., *Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to AU-rich elements and destabilization of mRNA*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17827-37.
321. Stoecklin, G., et al., *Cellular mutants define a common mRNA degradation pathway targeting cytokine AU-rich elements*. RNA, 2001. **7**(11): p. 1578-88.
322. Raineri, I., et al., *Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(4): p. 1279-88.
323. Schiavone, N., et al., *A conserved AU-rich element in the 3' untranslated region of bcl-2 mRNA is endowed with a destabilizing function that is involved in bcl-2 down-regulation during apoptosis*. FASEB J, 2000. **14**(1): p. 174-84.
324. Ciais, D., et al., *Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b*. Oncogene, 2004. **23**(53): p. 8673-80.
325. Lee, S.K., et al., *Butyrate response factor 1 enhances cisplatin sensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines*. Int J Cancer, 2005. **117**(1): p. 32-40.
326. Stoecklin, G., et al., *A novel mechanism of tumor suppression by destabilizing AU-rich growth factor mRNA*. Oncogene, 2003. **22**(23): p. 3554-61.
327. Ning, Z.Q., et al., *Distinct mechanisms for rescue from apoptosis in Ramos human B cells by signaling through CD40 and interleukin-4 receptor: role for inhibition of an early response gene, Berg36*. Eur J Immunol, 1996. **26**(10): p. 2356-63.
328. Baou, M., et al., *Involvement of Tis11b, an AU-rich binding protein, in induction of apoptosis by rituximab in B cell chronic lymphocytic leukemia cells*. Leukemia, 2009. **23**(5): p. 986-9.
329. Bustin, S.A., et al., *Cloning and characterization of ERF-1, a human member of the Tis11 family of early-response genes*. DNA Cell Biol, 1994. **13**(5): p. 449-59.
330. Stavnezer-Nordgren, J. and S. Sirlin, *Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching*. EMBO J, 1986. **5**(1): p. 95-102.
331. Fujieda, S., et al., *Multiple types of chimeric germ-line Ig heavy chain transcripts in human B cells: evidence for trans-splicing of human Ig RNA*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3450-9.
332. Lai, W.S., E.A. Kennington, and P.J. Blackshear, *Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9606-13.
333. Jing, Q., et al., *Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability*. Cell, 2005. **120**(5): p. 623-34.
334. Gupta, M. and G. Brewer, *MicroRNAs: new players in an old game*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 3951-2.
335. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
336. Calin, G.A., et al., *MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(13): p. 5166-71.
337. Kitada, S., et al., *Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3379-89.

-
338. Sargent, R.L., F.E. Craig, and S.H. Swerdlow, *Comparison of Bcl-2, CD38 and ZAP-70 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2009. **2**(6): p. 574-82.
339. Maacke, H., et al., *DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma*. *Oncogene*, 2000. **19**(23): p. 2791-5.
340. Klein, H.L., *The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells*. *DNA Repair (Amst)*, 2008. **7**(5): p. 686-93.
341. Wu, G.J., et al., *17q23 amplifications in breast cancer involve the PAT1, RAD51C, PS6K, and SIGma1B genes*. *Cancer Res*, 2000. **60**(19): p. 5371-5.
342. Maacke, H., et al., *Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer*. *Int J Cancer*, 2000. **88**(6): p. 907-13.
343. Yoshikawa, K., et al., *Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas*. *Int J Cancer*, 2000. **88**(1): p. 28-36.
344. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(6): p. 415-28.
345. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 683-92.
346. Richardson, C., et al., *Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability*. *Oncogene*, 2004. **23**(2): p. 546-53.
347. Basseres, D.S. and A.S. Baldwin, *Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression*. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6817-30.
348. Xie, P., et al., *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs*. *Immunity*, 2007. **27**(2): p. 253-67.
349. Schmitz, R., et al., *TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma*. *J Exp Med*, 2009. **206**(5): p. 981-9.
350. Annunziata, C.M., et al., *Hodgkin disease: pharmacologic intervention of the CD40-NF kappa B pathway by a protease inhibitor*. *Blood*, 2000. **96**(8): p. 2841-8.
351. Sun, S.C. and S.C. Ley, *New insights into NF-kappaB regulation and function*. *Trends Immunol*, 2008. **29**(10): p. 469-78.
352. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh, *NF-kappaB and the immune response*. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6758-80.
353. Hauer, J., et al., *TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(8): p. 2874-9.
354. Sasaki, Y., et al., *NIK overexpression amplifies, whereas ablation of its TRAF3-binding domain replaces BAFF:BAFF-R-mediated survival signals in B cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(31): p. 10883-8.
355. Gardam, S., et al., *TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor*. *Immunity*, 2008. **28**(3): p. 391-401.
356. Xie, P. and G.A. Bishop, *Roles of TNF receptor-associated factor 3 in signaling to B lymphocytes by carboxyl-terminal activating regions 1 and 2 of the EBV-encoded oncoprotein latent membrane protein 1*. *J Immunol*, 2004. **173**(9): p. 5546-55.
357. Liao, G., et al., *Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(25): p. 26243-50.

-
358. Koegl, M. and P. Uetz, *Improving yeast two-hybrid screening systems*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2007. **6**(4): p. 302-12.
359. Kaboord, B. and M. Perr, *Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation*. Methods Mol Biol, 2008. **424**: p. 349-64.
360. Kastiris, E., et al., *Targeted therapies in multiple myeloma*. Target Oncol, 2009. **4**(1): p. 23-36.
361. Ghobrial, I.M., et al., *Novel therapeutic agents in Waldenstrom's macroglobulinemia*. Clin Lymphoma Myeloma, 2009. **9**(1): p. 84-6.
362. Uziel, O., et al., *Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines*. Br J Cancer, 2005. **92**(10): p. 1881-91.
363. Yamada, O., et al., *Leukemic cells with increased telomerase activity exhibit resistance to imatinib*. Leuk Lymphoma, 2008. **49**(6): p. 1168-77.
364. Estrov, Z., et al., *Z-138: a new mature B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line from a patient with transformed chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Res, 1998. **22**(4): p. 341-53.
365. Medeiros, L.J., Z. Estrov, and G.Z. Rassidakis, *Z-138 cell line was derived from a patient with blastoid variant mantle cell lymphoma*. Leuk Res, 2006. **30**(4): p. 497-501.
366. Martinez-Climent, J.A., et al., *Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3479-82.
367. Drexler, H.G. and R.A. MacLeod, *Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of mantle cell lymphoma*. Leuk Res, 2002. **26**(9): p. 781-7.
368. Melo, J.V., et al., *Two new cell lines from B-prolymphocytic leukaemia: characterization by morphology, immunological markers, karyotype and Ig gene rearrangement*. Int J Cancer, 1986. **38**(4): p. 531-8.
369. Melo, J.V., et al., *The establishment of cell lines from chronic B cell leukaemias: evidence of leukaemic origin by karyotypic abnormalities and Ig gene rearrangement*. Clin Exp Immunol, 1988. **73**(1): p. 23-8.
370. Abe, M., et al., *Characterization and comparison of two newly established Epstein-Barr virus-negative lymphoma B-cell lines. Surface markers, growth characteristics, cytogenetics, and transplantability*. Cancer, 1988. **61**(3): p. 483-90.
371. Rudolph, C., et al., *Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519*. Cancer Genet Cytogenet, 2004. **153**(2): p. 144-50.
372. Amin, H.M., et al., *Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines*. Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(4): p. 424-31.
373. M'Kacher, R., et al., *Multiple molecular mechanisms contribute to radiation sensitivity in mantle cell lymphoma*. Oncogene, 2003. **22**(39): p. 7905-12.
374. M'Kacher, R., et al., *Blastoid mantle cell lymphoma: evidence for nonrandom cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) and generation of a mouse model*. Cancer Genet Cytogenet, 2003. **143**(1): p. 32-8.
375. Saltman, D.L., et al., *Characterization of a new non-Hodgkin's lymphoma cell line (NCEB-1) with a chromosomal (11:14) translocation [t(11:14)(q13;q32)]*. Blood, 1988. **72**(6): p. 2026-30.
376. Drexler, H.G., et al., *Hodgkin's disease derived cell lines HDLM-2 and L-428: comparison of morphology, immunological and isoenzyme profiles*. Leuk Res, 1986. **10**(5): p. 487-500.

377. Kapp, U., et al., *Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. J Exp Med, 1999. **189**(12): p. 1939-46.
378. Schaadt, M., et al., *Establishment of a malignant, Epstein-Barr-virus (EBV)-negative cell-line from the pleura effusion of a patient with Hodgkin's disease*. Blut, 1979. **38**(2): p. 185-90.
379. Wolf, J., et al., *Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3418-28.
380. Kanzler, H., et al., *Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3429-36.
381. Kubonishi, I., K. Niiya, and I. Miyoshi, *Establishment of a new human lymphoma line that secretes plasminogen activator*. Jpn J Cancer Res, 1985. **76**(1): p. 12-5.
382. Kobayashi, H., et al., *Variability of 11q23 rearrangements in hematopoietic cell lines identified with fluorescence in situ hybridization*. Blood, 1993. **81**(11): p. 3027-33.
383. Kamesaki, H., et al., *Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease*. Blood, 1986. **68**(1): p. 285-92.
384. Diehl, V., et al., *The cell of origin in Hodgkin's disease*. Semin Oncol, 1990. **17**(6): p. 660-72.
385. Hurwitz, R., et al., *Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype*. Int J Cancer, 1979. **23**(2): p. 174-80.
386. Matsuo, Y. and H.G. Drexler, *Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines*. Leuk Res, 1998. **22**(7): p. 567-79.
387. Naumovski, L., et al., *SUP-HD1: a new Hodgkin's disease-derived cell line with lymphoid features produces interferon-gamma*. Blood, 1989. **74**(8): p. 2733-42.
388. Epstein, A.L., et al., *Biology of the human malignant lymphomas. IV. Functional characterization of ten diffuse histiocytic lymphoma cell lines*. Cancer, 1978. **42**(5): p. 2379-91.
389. Li, C.C., et al., *Detection of p53 mutations in B cell non-Hodgkin's lymphoma cell lines*. Leukemia, 1995. **9**(4): p. 650-5.
390. Karpova, M.B., et al., *Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line*. Leukemia, 2005. **19**(1): p. 159-61.
391. Drexler, H.G. and J. Minowada, *History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines*. Leuk Lymphoma, 1998. **31**(3-4): p. 305-16.
392. Karpova, M.B., et al., *Combined spectral karyotyping, comparative genomic hybridization, and in vitro apoptotyping of a panel of Burkitt's lymphoma-derived B cell lines reveals an unexpected complexity of chromosomal aberrations and a recurrence of specific abnormalities in chemoresistant cell lines*. Int J Oncol, 2006. **28**(3): p. 605-17.
393. Klein, E., et al., *Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines*. Cancer Res, 1968. **28**(7): p. 1300-10.
394. Nadkarni, J.S., et al., *Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas*. Cancer, 1969. **23**(1): p. 64-79.
395. Amini, R.M., et al., *A novel B-cell line (U-2932) established from a patient with diffuse large B-cell lymphoma following Hodgkin lymphoma*. Leuk Lymphoma, 2002. **43**(11): p. 2179-89.

396. Eton, O., D.A. Scheinberg, and A.N. Houghton, *Establishment and characterization of two human myeloma cell lines secreting kappa light chains*. *Leukemia*, 1989. **3**(10): p. 729-35.
397. Drexler, H.G., *Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of myelodysplastic syndromes*. *Leuk Res*, 2000. **24**(2): p. 109-15.
398. Poppema, S., et al., *Morphologic, immunologic, enzyme histochemical and chromosomal analysis of a cell line derived from Hodgkin's disease. Evidence for a B-cell origin of Sternberg-Reed cells*. *Cancer*, 1985. **55**(4): p. 683-90.
399. Merz, H., et al., *Characterization of a novel human anaplastic large cell lymphoma cell line tumorigenic in SCID mice*. *Leuk Lymphoma*, 2002. **43**(1): p. 165-72.
400. Nacheva, E., et al., *B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 1106) with complex translocation involving 18q21.3 but lacking BCL2 rearrangement and expression*. *Blood*, 1994. **84**(10): p. 3422-8.
401. Tamura, A., et al., *Delineation of the breakpoint at 18q21.1 in a cell line (Karpas1106) derived from mediastinal B-cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones*. *Int J Cancer*, 1998. **78**(1): p. 100-5.
402. Epstein, A.L. and H.S. Kaplan, *Biology of the human malignant lymphomas. I. Establishment in continuous cell culture and heterotransplantation of diffuse histiocytic lymphomas*. *Cancer*, 1974. **34**(6): p. 1851-72.
403. Dirks, W.G., et al., *The (2;5)(p23;q35) translocation in cell lines derived from malignant lymphomas: absence of t(2;5) in Hodgkin-analogous cell lines*. *Leukemia*, 1996. **10**(1): p. 142-9.
404. Tweeddale, M., et al., *Production of growth factors by malignant lymphoma cell lines*. *Blood*, 1989. **74**(2): p. 572-8.
405. Mehra, S., et al., *Molecular cytogenetic characterization of non-Hodgkin lymphoma cell lines*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002. **33**(3): p. 225-34.

9 Anhang

Anhang 1: Ergebnisse des FISH-Screenings von lymphatischen Neoplasien mit dem Dreifarbf-FISH-Assays zur Detektion der t(5;14) und Varianten mit Aberrationen in 5p15.33 sowie Diagnosen und partielle Karyotypen der untersuchten Fälle

Fall-Nummer	Diagnose	Partieller Karyotyp nach ISCN 2005 (Zytopenetische Aberration in 5p1)	Detektierte FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	Anzahl ausgewerteter Zellkerne ²
I-1 ³	B-CLL	normal	2Ko 54; 1Ko+1g/b+1r 46	100
I-2 ⁴	SMZL	t(5;7)(p15;p11)	2Ko 10; 1Ko+1g/b+1r 90	100
I-3	MCL	add(5)(p?15)	2Ko 61; 1Ko+1r/b+1g/b+1r 39	100
I-4	MCL	t(5;9)(p15;q31~33)	2Ko 33; 1Ko+1g/b+1r/b 67	100
I-5	MCL	t(5;19)(p14;p13)	2Ko 61; 1Ko+1g/b+1r/b 39	100
I-6	MCL	normal	2Ko 52; 1Ko+1g/b +1r/b 48	100
I-7	B-CLL	t(5;14)(p15;q32)	2Ko 9; 1Ko+1g/b+1r/b 91	100
I-8	B-CLL	unbekannt	2Ko 55; 1Ko+1g/b+1r/b 45	100
I-9	ALL	normal	2Ko 27; 1Ko+1g/b+1r/b 73	100
I-10	B-CLL	t(5;10)(p15;q25)	2Ko 14; 1Ko+1g/b+1r/b 86	100
I-11	MCL	4n,der(2)t(2;5)(?;?)x2, -5, der(5)t(2;5)(?;?), der(9)t(5;9)(?;?)	2Ko 12; 5Ko+HSR-Amplifikation 88	100
I-12	MCL	del(5)(p14)	2Ko 29; 1Ko+HSR-Amplifikation 71	100
I-13	T-Zell reiches B-Zell-Lymphom	del(5)(p15)	2Ko 84; 1Ko 7; 1Ko+1g/b 9	100
I-14	B-CLL	normal	2Ko 100	100
I-15	B-CLL	normal	2Ko 98; 2Ko 2; 1Ko+1g +1b+1r 2	100
I-16	B-CLL	normal	2Ko 97; 1Ko+1g+1b+1r 3	100
I-17	DLBCL	add(5)(p12)	2Ko 100	100
I-18	Niedrig-malignes B-NHL	t(5;18)(p15.1;q21)	2Ko 100	100
I-19	FL	add(5)(p15)	2Ko 57; 1Ko 43	100
I-20	DLBCL	add(5)(p1?2)	2Ko 100	100
I-21	hochmalignes B-NHL	add(5)(p14)	2Ko 100	100
I-22	B-CLL,	der(5)t(5;?9)(p15;p22)	2Ko 100	100
I-23	FL	der(5)add(5)(p15)	2Ko 100	100
I-24	lymt(14;18) ⁵	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 100	100
I-25	lymt(14;18)t(8q24) ⁵	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 100	100
I-26	lymt(8;14) ⁵	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 100	100
I-27	lymt(3;14)v ⁵	add(5)(p14)	2Ko 67; 1Ko 25; 3-4Ko 8	107
I-28	lymt(3;14) ⁵	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 100	100
I-29	lymt(11;14) ⁵	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 100	100
I-30	lymt(14;18)t(3;14)r ⁵	add(5)(p14)	2Ko 40; 1Ko 60	100
I-31	lymt(14;18)rs ⁵	add(5)(p15)	2Ko 16; 1Ko 28; 3-6Ko 56	108
I-32	Lymphom ⁵	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 100	100
I-33	lymt(11;14) ⁵	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 100	100
I-34	lymt(3;14) ⁵	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 97; 1Ko+1g+1b+1r 3	100
I-35	lymt(11;14) ⁵	der(5)t(5;8)(p15;q13)	2Ko 100	100
I-36	Lymphom ⁵	t(5;6)(p?15q13)	2Ko 61; 1Ko 3; 3-6Ko 36	100
I-37	B-NHL NOS	+i(5)(p10)	2Ko 13; 3-4Ko 87	100

Anhang

Fall-Nummer	Diagnose	Partieller Karyotyp nach ISCN 2005 (Zytopenetische Aberration in 5p1)	Detektierte FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	Anzahl ausgewerteter Zellkerne ²
I-38	B-CLL	normal	2Ko 100	100
I-39	MCL	inv(5)(p14q21)	2Ko 84; 1Ko 14; 1Ko+1r 1; 1Ko+1g 1	100
I-40	B-NHL NOS	der(5)(t(2;5)(?p11;p14)	2Ko 100	100
I-41	CLL	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 100	100
I-42	CLL	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 100	36
I-43	Lympho-proliferatives Syndrom	5p1-Veränderung ⁶	2Ko 100	100
I-44	FL	add(5)(p15)	2Ko 22; 1Ko 78	100
I-45	MCL	normal	2Ko 40; 1Ko 2; 3-5Ko 58	100
I-46	MCL	normal	2Ko 10; 3-5Ko 90	103
I-47	MCL	normal	2Ko 96; 1Ko 4	100
I-48	MCL	4n	2Ko 33; 3-5Ko 67	100
I-49	MCL	4n	2Ko 22; 1Ko 2; 3-5Ko 76	117
I-50	MCL	normal	2Ko 99; 3Ko 1	100
I-51	MCL	normal	2Ko 100	117
I-52	MCL	normal	2Ko 97; 1Ko+1g+1b +1r 3	100
I-53	MCL	4n	2Ko 65; 3-4 Ko 35	100
I-54	MCL	normal	2Ko 98; 1Ko+1g +1b+1r 2	100
I-55	MCL	normal	2Ko 100	100
I-56	MCL	normal	2Ko 64; 3-4 Ko 36	50
I-57	MCL	normal	2Ko 97; 1Ko+1g +1b+1r 3	100
I-58	MCL	normal	2Ko 100	100
I-59	MCL	normal	2Ko 97; 1Ko+1g+1b+1r 3	29
I-60	MCL	normal	2Ko 98; 1Ko+1g+1b+1r 2	100
I-61	MCL	normal	2Ko 98; 4Ko 2	100
I-62	MCL	normal	2Ko 95; 3Ko 5	102
I-63	MCL	normal	2Ko 99; 3Ko 1	102
I-64	MCL	normal	2Ko 98; 3Ko 2	120
I-65	MCL	normal	2Ko 100	100
I-66	MCL	normal	2Ko: 99; 3 Ko: 1	100
I-67	MCL	normal	2Ko:100	101
I-68	MCL	normal	2Ko 73; 3-4 Ko 27	104
I-69	MCL	unbekannt	2Ko 98; 1Ko+1r+1b/g 2	100
I-70	MCL	normal	2Ko 100	100
I-71	MCL	normal	2Ko 95; 1Ko 2; 1Ko+1g 3	100
I-72	MCL	normal	2Ko 97; 1Ko+1g+1b+1r 2; 2g+2b+2r 1	100
I-73	MCL	normal	2Ko 97; 1Ko 1; 3Ko 1; 1Ko+1g+1b+1r 1	100
I-74	MCL	normal	2Ko 100	100
I-75	MCL	normal	2Ko 95; 1Ko+1r+1g/b 3; 1Ko+1g +1r/b 2	100
I-76	MCL	normal	2Ko 100	100
I-77	MCL	4n	2Ko 65; 3-4Ko 34; 1Ko+1g+1b+1r 1	100
I-78	MCL	normal	2Ko 97; 1Ko+1r+1g+1b 3	100
I-79	MCL	normal	2Ko 100	100
I-80	MCL	unbekannt	2Ko 88; 1Ko 2; 1Ko+1g+1b+1r 4; 3-4Ko 6	50
I-81	MCL	normal	2Ko 94; 1Ko 3; 1Ko+1g +1b+1r 3	100
I-82	MCL	normal	2Ko 97; 1Ko+1r+1g 3	110
I-83	MCL	der(5)t(5;?)(p12;?)	2Ko 100	100

Anhang

Fall-Nummer	Diagnose	Partieller Karyotyp nach ISCN 2005 (Zygenetische Aberration in 5p1)	Detektierte FISH-Signalkonstellationen [%] ¹	Anzahl ausgewerteter Zellkerne ²
I-84	MCL	normal	2Ko 100	100
I-85	MCL	normal	2Ko 100	100
I-86	MCL	normal	2Ko 30; 3Ko 68; 2Ko+1g+1b+1r 2	122
I-87	MCL	normal	2Ko 98; 3-4Ko 2	124
I-88	MCL	normal	2Ko 96; 1Ko+1r+1b+1g 2; 1Ko+1g 2	100
I-89	MCL	normal	2Ko 96; 3Ko 1; 1Ko+1r+1g 3	107
I-90	MCL	normal	2Ko 88; 3-4Ko 11; 2Ko+1g 1	103
I-91	MCL	normal	2Ko 98; 1Ko+1r+1g 1; 3Ko 1	100
I-92	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-93	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-94	MCL	TMA-unbekannt	1Ko	Paraffin
I-95	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-96	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-97	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-98	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-99	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-100	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-101	MCL	TMA-unbekannt	3Ko	Paraffin
I-102	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-103	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-104	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-105	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-106	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-107	MCL	TMA-unbekannt	3-5Ko	Paraffin
I-108	MCL	TMA-unbekannt	3-4Ko	Paraffin
I-109	MCL	TMA-unbekannt	3-4Ko	Paraffin
I-110	MCL	TMA-unbekannt	3-4Ko	Paraffin
I-111	MCL	TMA-unbekannt	1Ko	Paraffin
I-112	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-113	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-114	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-115	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-116	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-117	MCL	TMA-unbekannt	2Ko	Paraffin
I-118	MCL	TMA-unbekannt	3Ko	Paraffin
I-119	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-120	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-121	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-122	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-123	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-124	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-125	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-126	MC	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-127	MCL	unbekannt	3Ko	Paraffin
I-128	MCL	unbekannt	3-4Ko	Paraffin
I-129	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-130	MCL	unbekannt	4Ko	Paraffin
I-131	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin

Anhang

Fall-Nummer	Diagnose	Partieller Karyotyp nach ISCN 2005 (Zytopenetische Aberration in 5p1)	Detektierte FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	Anzahl ausgewerteter Zellkerne ²
I-132	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-133	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-134	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-135	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-136	MCL	unbekannt	4 Ko	Paraffin
I-137	MCL	unbekannt	1Ko; 1Ko+1g/b	Paraffin
I-138	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-139	MCL	unbekannt	3-4Ko	Paraffin
I-140	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-141	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-142	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-143	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-144	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-145	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-146	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-147	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-148	MCL	unbekannt	3-4Ko	Paraffin
I-149	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-150	MCL	unbekannt	2-3Ko	Paraffin
I-151	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-152	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-153	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-154	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-155	MCL	unbekannt	3-4 Ko	Paraffin
I-156	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-157	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-158	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-159	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-160	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-161	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-162	MCL	unbekannt	4Ko	Paraffin
I-163	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin
I-164	MCL	unbekannt	2Ko	Paraffin

¹Der FISH-Assay enthält die markierten BAC-Klone RP11-678B2 (Spectrum green), RP11-117B23 (DEAC) und RP11-356C5 (Spectrum orange). Kolokalisation der Signale bedeutet eine Zusammenlagerung des grünen, blauen und roten Signals. Eine HSR (Homogenously staining region)-Amplifikation liegt vor, wenn das amplifizierte Material in einer Region sichtbar ist und sich nicht über den Zellkern verteilt. Bei der FISH-Analyse an Paraffinmaterial sind, wenn vorhanden, die aberranten Klone angegeben.

²An Paraffinmaterial erfolgte keine Auszählung, sondern eine Beurteilung der FISH-Ergebnisse.

³Initiale B-CLL mit Translokation t(5;14)(p15;q32)

⁴Der Fall entspricht III-37 (Anhang 6 und Anhang 7).

⁵Diagnose wie von Dr. Evelyne Callet-Bauchu (Laboratoire d'Hématologie et de cytogénétique, Centre Hospitalier Lyon Sud, Lyon, Frankreich) mitgeteilt

⁶5p1-Veränderung wie von Dr. Evelyne Callet-Bauchu mitgeteilt.

ALL: Akute lymphatische Leukämie; b: blau; B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; B-NHL: B-Zell Non-Hodgkin Lymphom; DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell Lymphom; FL: Follikuläres Lymphom; g: grün; ISCN: International System for Human Cytogenetic Nomenclature; Ko: Kolokalisation; lym: Lymphom; MCL: Mantelzell-Lymphom; NHL: Non-Hodgkin Lymphom; NOS: nicht weiter klassifiziert; r: rot; SMZL: Splenisches Marginalzonen-Lymphom; TMA: Tissue Microarray

Anhang

Anhang 2: Charakteristika der Fälle mit Bruchereignis innerhalb der Chromosomenregion 5p15.33

Fall-Nummer	Diagnose	Alter bei Diagnose	Geschlecht	Material	Karyotyp nach ISCN 2005 ¹	Tumorzellgehalt [%] ²
I-1	B-CLL	77	m	pB	47,XY,der(2)t(2;14)(p11;q32), der(8)t(2;8)(p1?6;p21),+12, add(12)(p11)x2,add(14)(q32),i(17)(q10)	46
I-2	SMZL	82	m	pB	46,XY,t(5;7)(p15;p11),del(14)(q22q32)	90
I-3	MCL	62	m	Milz	46,XY,add(1)(q21),add(5)(p?15), add(7)(p?21),del(10)(p?11),t(11;14)(q13;q32),der(?)t(17;?)(q21;?)	39
I-4	MCL	78	m	pB	46,XY,del(2)(p12p22),t(5;9)(p15;q31~33), der(8)t(3;8)(q13;p21~22), t(11;14)(q13;q32), r(17)(?)	67
I-5	MCL	70	m	LK	46,XY,t(5;19)(p14;p13),t(11;14)(q13;q32), ?t(11;17)(q23;q11~12)	39
I-6	MCL	66	w	LK	46,XX,del(2)(p23),i(3)(q10),-9,del(10)(q24),t(11;14)(q13;q32), t(12;14)(q12;p12), +mar/46,XX	48
I-7	B-CLL	71	m	pB	46,XY	91
I-8	B-CLL	50	m	pB	unbekannt	45
I-9	ALL	8	w	KM	46,XX,t(12;21)(p12;q22)	73
I-10	B-CLL	35	w	pB	46,XX,t(5;10)(p15;q25)/46,idem, del(13)(q14q21)	86
I-11	MCL	85	w	LK	80-85,XXX,-X,-1,-2,der(2)t(2;5)(?;?)x2, +3,-4,-5,der(5)t(2;5)(?;?), der(6)t(6;22)(q13;?q11), -9,del(9)(?p11), der(9)t(5;9)(?;?), der(10)t(10;22)(?;?), der(11)t(11;14)(q13;q32)x2, del(13)(q21q22),der(13)t(13;16)(q22;?), +r(13)(p10q22),-14,der(14)t(11;14)(q13;q32)t(11;17)(q13.5;q23)x2,-15, -16,der(16)t(16;18)(?;?), der(16)t(16;22)(?;?),der(16)ins(16;18) (?q;?q),-17,der(17)t(11;17)(q13.5;q23)x2,-18,-21,-22,-22	88
I-12	MCL	73	m	LK	42,X,-Y,ins(1;?)(p22;?),del(5)(p14),-7,-9, ?del(11)(q23-24),t(11;14)(q13;q32),-13,-15,+1mar	71
I-13	T-Zell reiches B-Zell Lymphom	unbekannt			43,XX,der(1)(p?),del(4)(q21),del(5)(p15),del(6)(q21;?), add(14)(q32),del(16)(q23),der(17)(p),der(19)(q)/46;XX, del(16)(q23),del(17)(p13),add(14)(q32)	9

¹5p1-Veränderungen sind durch Fettschrift hervorgehoben.

²Der angegebene Tumorzellgehalt entspricht dem Anteil der aberranten Kerne unter Anwendung des Dreifarbf-FISH-Assays zur Detektion von Aberrationen in 5p15.33.

ALL: Akute lymphatische Leukämie; B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; KM: Knochenmark; LK: Lymphknoten; m: männlich; MCL: Mantelzell-Lymphom; pB: peripheres Blut; SMZL: Splenisches Marginalzonenlymphom; w: weiblich

Anhang

Anhang 3: Ergebnisse des Screenings von DLBCL mit dem CCNE1-FISH-Assay und der immunhistochemischen Färbung mit dem Cyclin E1-Antikörper am TMA

Fall-Nummer	TMA-Code	Detektierte , gegebenenfalls aberrante, FISH-Signalkonstellation ¹	Cyclin E1-Immunhistochemie ²
II-1	1-1	2Ko	negativ
II-2	1-2	2Ko	negativ
II-3	1-8	3-4Ko	negativ
II-4	1-10	3-6Ko	negativ
II-5	1-12	2Ko	negativ
II-6	1-15	2Ko	negativ
II-7	1-18	2Ko	negativ
II-8	1-19	2Ko	negativ
II-9	1-22	3-4Ko	negativ
II-10	1-25	2Ko	negativ
II-11	1-27	2Ko	negativ
II-12	1-28	2Ko	negativ
II-13	1-29	2Ko	negativ
II-14	1-30	3-4Ko	51-75 %
II-15	2-1	3-4Ko	26-50 %
II-16	2-2	2Ko	26-50 %
II-17	2-12	n.a.	26-50 %
II-18	2-15	2Ko	1-25 %
II-19	2-16	2Ko	26-50 %
II-20	2-24	n.a.	1-25 %
II-21	2-28	n.a.	26-50 %
II-22	2-30	n.a.	negativ
II-23	3-1	2Ko	negativ
II-24	3-2	2Ko	negativ
II-25	3-3	2Ko	negativ
II-26	3-5	3-4Ko	1-25 %
II-27	3-7	3-4Ko	26-50 %
II-28	3-8	2Ko	negativ
II-29	3-10	2Ko	negativ
II-30	3-13	n.a.	negativ
II-31	3-14	2Ko	negativ
II-32	3-15	n.a.	1-25 %
II-33	3-17	2Ko	26-50 %
II-34	3-18	2Ko	51-75 %
II-35	3-19	2Ko	1-25 %
II-36	3-23	3-4Ko	negativ
II-37	3-24	2Ko	negativ
II-38	3-26	2Ko	26-50 %
II-39	3-30	3-6Ko	negativ
II-40	3-32	2Ko	26-50 %
II-41	3-33	3-4Ko	51-75 %

¹Der FISH-Assay enthält die markierten BAC-Klone RP11-17N20 (Spectrum orange) und RP11-345J21 (Spectrum green). Kolokalisation der Signale bedeutet eine Zusammenlagerung des roten und grünen Signals. Da die FISH-Analysen an Paraffinmaterial durchgeführt wurden, erfolgte keine Auszählung, sondern eine Beurteilung der aberranten Signalkonstellationen, wenn vorhanden.

²Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem monoklonalen Cyclin E1-Antikörper der Maus. Angegeben ist der Anteil der Cyclin E1-positiven Zellkerne. Die Analyse wurde von Wolfram Klapper (Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt.

Ko: Kolokalisation; n.a.: nicht auswertbar; TMA: Tissue Microarray

Anhang

Anhang 4: Ergebnisse des Screenings von ABC-DLBCL mit dem SPIB-Dreifarb-FISH-Assay

Fall-Nummer	Tissue microarray	Koordinate	Detektierte FISH-Signalkonstellation ¹
II-42	Tissue Microarray 1	1A	3-4Ko
II-43	Tissue Microarray 1	3A	2Ko
II-44	Tissue Microarray 1	7A	2Ko
II-45	Tissue Microarray 1	1B	3-6Ko
II-46	Tissue Microarray 1	4B	1-3Ko+1-3g+1-3r/b
II-47	Tissue Microarray 1	5B	1Ko
II-48	Tissue Microarray 1	7B	3-4Ko
II-49	Tissue Microarray 1	9B	3Ko
II-50	Tissue Microarray 1	11B	3-4Ko
II-51	Tissue Microarray 1	3C	2Ko
II-52	Tissue Microarray 1	5C	3-4Ko
II-53	Tissue Microarray 1	7C	2Ko
II-54	Tissue Microarray 1	9C	2Ko
II-55	Tissue Microarray 1	12C	2Ko
II-56	Tissue Microarray 1	1D	2Ko
II-57	Tissue Microarray 1	3D	3-5Ko
II-58	Tissue Microarray 1	7D	3-4ko
II-59	Tissue Microarray 1	9D	3-4Ko
II-60	Tissue Microarray 1	11D	3-4Ko
II-61	Tissue Microarray 1	1E	3Ko
II-62	Tissue Microarray 1	3E	3-4Ko
II-63	Tissue Microarray 1	5E	3-4Ko
II-64	Tissue Microarray 1	9E	1Ko
II-65	Tissue Microarray 1	11E	3-4ko
II-66	Tissue Microarray 1	3F	1Ko
II-67	Tissue Microarray 1	5F	1Ko
II-68	Tissue Microarray 1	7F	1Ko
II-69	Tissue Microarray 1	9F	3-4Ko
II-70	Tissue Microarray 1	11F	1Ko
II-71	Tissue Microarray 1	1G	1Ko
II-72	Tissue Microarray 1	3G	3-4Ko
II-73	Tissue Microarray 1	5G	3Ko
II-74	Tissue Microarray 1	7G	1Ko
II-75	Tissue Microarray 2	Lym 179	1Ko
II-76	Tissue Microarray 2	Lym 19	2Ko
II-77	Tissue Microarray 2	Lym 199	3-4Ko
II-78	Tissue Microarray 2	Lym 178	3Ko
II-79	Tissue Microarray 2	Lym 79	1Ko
II-80	Tissue Microarray 2	Lym 139	3-4Ko
II-81	Tissue Microarray 2	Lym 160	3Ko
II-82	Tissue Microarray 2	Lym 198	3-4Ko
II-83	Tissue Microarray 2	Lym A	2Ko
II-84	Tissue Microarray 2	Lym 80	3-4Ko
II-85	Tissue Microarray 2	Lym 18	3Ko
II-86	Tissue Microarray 2	Lym 119	3-4Ko
II-87	Tissue Microarray 2	Lym 308	3-5Ko
II-88	Tissue Microarray 2	Lym 100	3Ko
II-89	Tissue Microarray 2	Lym 98	2Ko
II-90	Tissue Microarray 2	Lym 230	2Ko
II-91	Tissue Microarray 2	Lym 58	2Ko
II-92	Tissue Microarray 2	Lym 200	1Ko
II-93	Tissue Microarray 2	Lym 229	2Ko

Anhang

Fall-Nummer	Tissue microarray	Koordinate	Detektierte FISH-Signalkonstellation ¹
II-94	Tissue Microarray 2	Lym 138	2Ko
II-95	Tissue Microarray 2	Lym 219	1Ko
II-96	Tissue Microarray 2	Lym 59	1Ko
II-97	Tissue Microarray 2	Lym 159	1Ko
II-98	Tissue Microarray 2	Lym 304	2Ko
II-99	Tissue Microarray 2	Lym C	2Ko
II-100	Tissue Microarray 2	Lym 158	2Ko
II-101	Tissue Microarray 2	Lym 307	2Ko
II-102	Tissue Microarray 2	Lym 99	1Ko
II-103	Tissue Microarray 2	Lym 309	1Ko
II-104	Tissue Microarray 2	Lym 305	2Ko
II-105	Tissue Microarray 2	Lym 78	2Ko
II-106	Tissue Microarray 2	Lym D	2Ko

¹Der FISH-Assay enthält die markierten BAC-Klone CTD-2126E3 (Spectrum green), RP11-45F3 (DEAC) und RP11-1051H12 (Spectrum orange). Kolokalisation der Signale bedeutet eine Zusammenlagerung des grünen, blauen und roten Signals. Da die FISH-Analysen an Paraffinmaterial durchgeführt wurden, erfolgte keine Auszählung, sondern eine Beurteilung der aberranten Signalkonstellationen, wenn vorhanden.

Ko: Kolokalisation

Anhang

Anhang 5: Charakteristika der Fälle mit identifizierten chromosomalen Veränderungen in 19q1

Fall-Nummer	Diagnose	Alter bei Diagnose	Geschlecht	Material	Karyotyp (ISCN 2005) ¹	Chromosomale Veränderung	Tumorzellgehalt [%] ¹
II-107	DLBCL	64	m	KM	50,XY,dic(1;1)(q32;p11),+3, add(3)(q13)x2,t(8;14)(q24;q32),+12, add(12)(q23), t(14;19)(q32;q12) ,+18, +mar	Bruch in 19q12	87
II-108	ABC-DLBCL				unbekannt	Bruch in 19q13.4	31
II-109	Malignes NHL	72	m	KM	46,X,-Y,del(2)(p12), der(6)t(2;6)(p12;p21), del(7)(q11),inv(12)(p12q12~13),+18, del(18)(q22), trp(19)(q13.3q13.4) / 46,XY	Amplifikation in 19q13.4	34

¹19q-Veränderungen sind durch Fettschrift hervorgehoben.

ABC-DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell Lymphom vom aktivierten B-Zell-Typ; DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell Lymphom; KM: Knochenmark; m: männlich; NHL: Non-Hodgkin Lymphom

Anhang

Anhang 6: Ergebnisse des FISH-Screenings von hämatologischen Neoplasien mit dem ZFP36L1-Assay 1, der LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Vysis) und dem ZFP36L1-Assay 2 sowie Diagnosen und partielle Karyotypen der untersuchten Fälle

Fall-Nummer	Diagnose	Partieller Karyotyp nach ISCN 2005 (Zytoгенетische Aberration in 14q2)	ZFP36L1-Assay 1 FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	IGH-FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	ZFP36L1-Assay 2 FISH-Signal-konstellationen [%] ¹
III-1	B-CLL	del(14)(q?)	2Ko 16; 1Ko+1r 84	2Ko 13; 1Ko+1g 87	n.d.
III-2	B-CLL	del(14)(q21)	2Ko 94; 1Ko+1r 6	2Ko 97; 1Ko+1g 3	n.d.
III-3	B-CLL	del(14)(q12q24)	2Ko 23; 1Ko+1r 77	2Ko 17; 1Ko+1g 83	n.d.
III-4	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 15; 1Ko+1r 85	2Ko 13; 1Ko + 1g 87	n.d.
III-5	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 4; 1Ko+1r 96	2Ko 5; 1Ko+1g 95	n.d.
III-6	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 34; 1Ko+1r 66	2Ko 37; 1Ko+1g 63	n.d.
III-7	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 32; 1Ko+1r 68	2Ko 31; 1Ko+1g 69	n.d.
III-8 ²	B-CLL	del(14)(q23q32)	2Ko 28; 1Ko+1r 72	2Ko 19; 1Ko+1g 81	n.d.
III-9 ²	NOS Lymphom	del(14)(q24q32)	2Ko 41; 1Ko+1r 59	2Ko 40; 1Ko+1g 60	n.d.
III-10	B-CLL	del(14)(q22q24)	2Ko 35; 1Ko+1r 63; 2Ko+2r 2	2Ko 34; 1Ko+1g 66	n.d.
III-11 ²	B-CLL	normal	2Ko 60; 1Ko+1r 40	2Ko 45; 1Ko+1g 55	n.d.
III-12	B-CLL	del(14)(q22-q23)	2Ko 13; 1Ko+1r 87	2Ko 17; 1Ko+1g 83	n.d.
III-13	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 15; 1Ko+1g 85	2Ko 9; 1Ko+1g 91	n.d.
III-14 ²	B-CLL	del(14)(q21q32)	2Ko 7; 1Ko+1r 84; 1Ko+1r(amp) 9	2Ko 13; 1Ko+1g 87	n.d.
III-15	NOS Lymphom	normal	2Ko 8; 1Ko+1r 92	2Ko 9; 1Ko+1g 91	n.d.
III-16	B-CLL	normal	2Ko 70; 1Ko+1 30	2Ko 61; 1Ko+1g 39	n.d.
III-17	hoch malignes B-NHL	14q-Veränderung ³	2Ko 7; 1Ko+1r 93	2Ko 11; 2Ko+1r+1g 15; 2Ko+2r+2g 21; 3Ko+2r+1g 3; 4Ko 3; 3Ko+1r+1g 10; 4Ko+1r+1g 9; 1Ko+1r+1g 6; 3Ko+1r+2g 4; 2r+2g 9; 3Ko+1r 5; 2r+3g 6; 2Ko+1r+2g 7	n.d.
III-18 ²	B-CLL	del(14)(q23q32)	2Ko 20; 1Ko+1r 80	2Ko 16; 1Ko 41; 1Ko+1g 43	n.d.
III-19	NHL/B-CLL/FL	normal	2Ko 13; 1Ko+1r 87	2Ko 10; 1Ko+1g 90	n.d.
III-20 ²	V.a. B-CLL	del(14)(q22q32)	2Ko 20; 1Ko+1r 80	2Ko 8; 1Ko+1g 92	n.d.
III-21	B-NHL/ Cyclin D1 neg. MCL?	normal	2Ko 56; 1Ko+1r 43; 1Ko 1	2Ko 43; 1Ko+1g 57	n.d.
III-22	B-CLL	del(14)(q24q32)	2Ko 10; 1Ko+1r 90	2Ko 2; 1Ko+1g 98	n.d.
III-23	niedrig malignes NHL	del(14)(q22?)	2Ko 4; 1Ko+1r 96	2Ko 2; 1Ko+1g 98	n.d.
III-24	MCL	del(14)(q11?q24?)	2Ko 20; 1Ko+1r 79; 4Ko 1	2Ko 29; 1Ko+1g 71	n.d.

Anhang

Fall-Nummer	Diagnose	Partieller Karyotyp nach ISCN 2005 (Zytopenetische Aberration in 14q2)	ZFP36L1-Assay 1 FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	IGH-FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	ZFP36L1-Assay 2 FISH-Signal-konstellationen [%] ¹
III-25	B-CLL	unbekannt	2Ko 3; 1Ko 6; 1Ko+1g 91	2Ko 2; 1Ko+1g 98	n.d.
III-26	B-CLL	del(14)(q23)	2Ko 7; 1Ko+1r 93	2Ko 8; 1Ko+1g 92	n.d.
III-27	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 54; 1Ko+1r 46	2Ko 55; 1Ko+1g 45	n.d.
III-28	B-CLL	del(14)(q23)	2Ko 23; 1Ko+1r 77	2Ko 16; 1Ko +1g 84	n.d.
III-29	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 60; 1Ko+1r 40	2Ko 69; 1Ko+1g 31	n.d.
III-30	B-CLL	del(14)(q21)	2Ko 31; 1Ko+1r 69	2Ko 29; 1Ko+1r 71	n.d.
III-31	B-CLL	del(14)(q22-23)	2Ko 7; 1Ko+1r 93	2Ko 13; 1Ko+1g 87	n.d.
III-32	NOS Lymphom	del(14)(q21q32.33)	2Ko 14; 1Ko+1r 79; 1Ko 6; 1Ko+1r+1g 1	2Ko 7; 1Ko+1gr 93	n.d.
III-33	B-CLL	46,XX	2Ko 19; 1Ko+1r 81	2Ko 16; 1Ko+1gr 84	n.d.
III-34	B-CLL	del(14)(q24q32)	2Ko 7; 1Ko+1g 93	1Ko 8; 1Ko+1g 92	n.d.
III-35	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 97; 1Ko+1r 3	2Ko 96; 1Ko+1g 4	n.d.
III-36	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 86; 2Ko+1r 2; 1Ko+1r 12	2Ko 89; 1Ko+1g 9; 1Ko 2	n.d.
III-37 ⁴	SMZL	del(14)(q22q32)	2Ko 16; 1Ko+1r 84	2Ko 23; 1Ko+1g 77	n.d.
III-38	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 6; 1Ko+1r 94	2Ko 5; 1Ko+1g 95	n.d.
III-39	Verdacht auf MZL	del(14)(q22q32)	2Ko 84; 1Ko+1r 16	2Ko 63; 1Ko+1g 27;	n.d.
III-40	Verdacht auf MZL	del(14)(q22q32)	2Ko 8; 1Ko+1r 92	2Ko 11; 1Ko+1g 89	n.d.
III-41	B-CLL	del(14)(q24q32)	2Ko 10; 1Ko 18; 1Ko+1r 72	2Ko 1; 1Ko+1g 99	n.d.
III-42	B-NHL	unbekannt	2Ko 7; 1Ko+1r 93	2Ko 8; 1Ko+1g 92	n.d.
III-43	B-CLL	unbekannt	2Ko 14; 1Ko+1r 86	2Ko 13; 1Ko+1g 87	n.d.
III-44	B-CLL	del(14)(q24q31)	2Ko 41; 1Ko 6; 1Ko+1r 53	2Ko 59; 1Ko 34; 1Ko+1g 7	n.d.
III-45	MM	normal	2Ko 88; 1Ko+1r 12	2Ko 93; 1Ko+1g 7	n.d.
III-46	B-CLL	del(14)(q22q31)	2Ko 51; 1Ko+1r 49	2Ko 100	n.d.
III-47	B-CLL	del(13)(q14q21), t(13;14)(q14;q24) del(14)(q24.1q24.2)	2Ko 70; 1Ko 30	2Ko 100	2Ko 66; 1Ko+1r+1g 34
III-48	DLBCL	t(9;14)(p21;q22)	2Ko 75; 3Ko 8; 4Ko 17	n.d.	n.d.
III-49	B-CLL	der(14)t(12;14)(q24;q24)	2Ko 12; 1Ko 88	n.d.	2Ko 21; 1Ko 79
III-50	FL	der(6)t(6;14)(q21;q24)	2Ko 93; 4Ko 7	n.d.	n.d.
III-51	MCL	del(14)(q21q31)	2Ko 100	2Ko 5; 1Ko+1r+1g 95;	n.d.
III-52	B-CLL	del(14)(q23q32)	2Ko 52; 1Ko 48	2Ko 98; 1Ko 2	2Ko 51; 1Ko 47; 1Ko+1r+1g 2
III-53	MCL	der(14)t(14;?22)(q2?1;q12)	2Ko 99; 1Ko 1	2Ko 99; 3Ko 1	n.d.
III-54	DLBCL	?del(14)(q21)	2 Ko (Paraffin)	2 Ko (Paraffin)	n.d.
III-55	B-CLL im Progress	add(14)(q22)	2Ko 100	2Ko 9; 1Ko 91	n.d.
III-56	DLBCL	del(14)(q?)	2 Ko 100	2Ko 99; 3Ko 1	n.d.

Anhang

Fall-Nummer	Diagnose	Partieller Karyotyp nach ISCN 2005 (Zytopenetische Aberration in 14q2)	ZFP36L1-Assay 1 FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	IGH-FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	ZFP36L1-Assay 2 FISH-Signal-konstellationen [%] ¹
III-57	T-Zell-Lymphom NOS	der(15)t(14;15)(q?21;q2?4)	2Ko 99; 3Ko 1	n.d.	n.d.
III-58	ALL	+add(14)(q24)	2 Ko (Paraffin)	2Ko (Paraffin)	n.d.
III-59	B-CLL	?del(14)(q22)	2 Ko (Paraffin)	2Ko (Paraffin)	n.d.
III-60	B-CLL	del(14)(q23q31)	2 Ko (Paraffin)	1-2Ko (Paraffin)	n.d.
III-61	ALL	der(14)dup(14)(q32q21)	2Ko 14; 3Ko 86	2Ko14; 3Ko 86	n.d.
III-62	DLBCL	add(14)(q24)	2Ko 100	2Ko 52; 1Ko 48	n.d.
III-63	FL	t(14;18)(q22;q21)	2Ko 98; 3Ko 1; 4Ko 1	2Ko98; 3Ko 1; 4Ko 1	n.d.
III-64	MZL	?add(14)(q24-31)	2 Ko 100	2Ko	n.d.
III-65	DLBCL	t(14;18)(q23;q21), der(18)t(14;18)(q23;q21)	2Ko 100	n.d.	n.d.
III-66	DLBCL	normal	2Ko 92; 3Ko 2; 4Ko 2; 1Ko 2; 2Ko+1r 2	2Ko + 2g	n.d.
III-67	AML	t(1;14)(p35;q21)	2Ko 97; 1Ko 3	n.d.	n.d.
III-68	Hoch malignes Lymphom NOS	del?(14)(q23)x3	2Ko 47; 3Ko 51; 4Ko 2	3Ko	n.d.
III-69	B-CLL	del(14)(q23q24)	2Ko 100	1Ko 41; 2Ko 59	n.d.
III-70	T-PLL	der(14)(14pter->14q10::14q22->14q11::14q32->14qter)x2	2Ko 63; 1Ko 37	2Ko	n.d.
III-71	FL	der(6)t(6;14)(q24~25;q21)	2 Ko 100	n.d.	n.d.
III-72	DLBCL	t(3;14)(q26;q22)	2 Ko 99; 1Ko 1	n.d.	n.d.
III-73	FL	der(15)t(14;?,15)(q21;?;p13)	2 Ko 100	n.d.	n.d.
III-74	DLBCL	t(7;14)(q22;q21~24)	2 Ko 96; 1Ko 2; 3 Ko 2	n.d.	n.d.
III-75	T-Zell-Lymphom NOS	t(3;14)(p13;q21)	2 Ko 97; 3Ko 3	n.d.	n.d.
III-76	B-CLL	del(14)(q21q22)	2Ko 100	2Ko 100	n.d.
III-77	T-Zell-Lymphom NOS	del(14)(q13q21)	2Ko 100	2Ko 100	n.d.
III-78	B-CLL	t(14;18)(q23;q21)	2 Ko 83; 1Ko10; 3Ko 7	n.d.	n.d.
III-79	Richter-syndrom	add(14)(q21)	2Ko 87; 1Ko 13	2Ko 85; 1Ko+1g 15	2Ko 85; 1Ko 15
III-80	B-NHL NOS	der(19)t(14;19)(q22;q13)	2Ko 96; 1Ko 2; 3Ko 2	n.d.	n.d.

Anhang

Fall-Nummer	Diagnose	Partieller Karyotyp nach ISCN 2005 (Zytopenetische Aberration in 14q2)	ZFP36L1-Assay 1 FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	IGH-FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	ZFP36L1-Assay 2 FISH-Signal-konstellationen [%] ¹
III-81	ALL	der(7)t(7;14)(p22;q22), der(14)t(9;14)(q21;q22)	3-4 Ko (Paraffin)	n.d.	n.d.
III-82	AML	t(10;14)(p14~15;q21)	2 Ko 100	n.d.	n.d.
III-83	MM	del(14)(q21q23~24)	2Ko 47; 1Ko 52; 1Ko+1r 1	2Ko	2Ko 53; 1Ko 47
III-84	MM	t(10;14)(p14~15;q21)	2Ko 67; 1Ko+1r+1g 11; 1r+2g 1; 1Ko+1g 1; 1r 14; 1r+1g 4; 1Ko 2	2Ko 85; 1Ko+1g 15	2Ko 72; 1Ko 28
III-85	MCL	del(14)(q21)	2Ko 98; 3Ko 1; 4Ko 1	1Ko+1r 74; 1Ko+1r+1g 16; 2Ko 10	n.d.
III-86	DLBCL	14q2-Veränderung ³	2Ko 90; 1Ko 10	2Ko	n.d.
III-87	FL	t(13;19;14)(q31;q13;q21)	2Ko 94; 1Ko 3; 3Ko 3	n.d.	n.d.
III-88	DLBCL	14q2-Veränderung ³	2Ko 83; 1Ko 14; 1ko+1r 2; 1Ko+1g 1	1Ko	n.d.
III-89	MCL	del(14)(q21q31)	2 Ko (Paraffin)	2g+2r (Paraffin)	n.d.
III-90	B-CLL	del(14)(q21q31)	2Ko 98; 1Ko 2	2Ko 100	n.d.
III-91	DLBCL	14q2-Veränderung ³	2Ko 85; 1Ko 15	2Ko	n.d.
III-92	DLBCL	14q2-Veränderung ³	2Ko 77; 1Ko 6; 3Ko 11; 4Ko 2; 2Ko+1g 2; 2Ko+1r 2	1Ko+1r+1g	n.d.
III-93	B-CLL	der(14)del(14)(q21q31)	2Ko 52; 1Ko 48	2Ko 62; 1Ko+1r+1g 26; 2r+1g 8; 1r+1g 2; 2r+2g 2	2Ko 53; 1Ko 46; 4Ko 1
III-94	MM	der(14)del(14)(q14q21)	2Ko 98; 1Ko 2	1Ko+1r+1g	n.d.
III-95	DLBCL	14q2-Veränderung ³	2Ko 71; 1Ko 25; 3Ko 2; 1Ko+1r 1; 1Ko+1g 1	1Ko	n.d.
III-96	FL	14q2-Veränderung ³	2Ko 91; 1Ko+1g 3; 1Ko+1r 2; 2Ko+1g 2; 1Ko 2	1Ko+1g	n.d.
III-97	DLBCL	14q2-Veränderung ³	2Ko 17; 3Ko 41; 4Ko 39; 2Ko+1r 1; 2Ko 1g 2	3-4Ko	n.d.
III-98	DLBCL	14q2-Veränderung ³	2Ko 77; 1Ko 23	2Ko	n.d.
III-99	DLBCL	add(14)(q22)x2	2Ko 83; 1Ko 2; 4Ko 14; 1Ko+1r 1	2Ko	n.d.
III-100	NHL/B-CLL	normal	2Ko 89; 1Ko 10; 1Ko+1r 1	1Ko+1g 12; 2Ko 88	2Ko 99; 1Ko 1
III-101	MM	normal	2Ko 100	2Ko 98; 1Ko+1r+1g 1; 2r+2gr 1	n.d.

Anhang

Fall-Nummer	Diagnose	Partieller Karyotyp nach ISCN 2005 (Zytopenetische Aberration in 14q2)	ZFP36L1-Assay 1 FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	IGH-FISH-Signal-konstellationen [%] ¹	ZFP36L1-Assay 2 FISH-Signal-konstellationen [%] ¹
III-102	DLBCL	der(13)t(13;14)(q33;q23~24)	2Ko 98; 3Ko 2	n.d.	n.d.
III-103	unbekannt	unbekannt	2Ko 98; 1Ko 2	1Ko+1g 91; 2Ko 9	2Ko 99; 1Ko+1r+1g 1
III-104	B-CLL	t(7;14)(q31;q13~21)	2Ko 98; 1Ko 2	2Ko	n.d.
III-105	B-CLL	t(13;14)(q11~13;q24~32)	2Ko 100	n.d.	n.d.
III-106	T-PLL	der(22)t(14;?;22)(q21;?;p13)	2Ko 10; 3Ko 90	n.d.	n.d.
III-107	B-CLL	del(14)(q?)	2Ko 43; 1Ko 56; 4Ko 1	2Ko 100	2Ko 34; 1Ko 66
III-108	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 86; 1Ko 14	2Ko 100	2Ko 83; 1Ko 17
III-109	B-NHL NOS	del(14)(q22)	2Ko 100	2Ko 79; 1Ko+1r+1g 21	n.d.
III-110	B-NHL NOS	del(14)(q22q24)	2Ko 3; 1Ko 97	2Ko 100	2Ko 9; 1Ko 91
III-111	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 69; 1Ko 19; 3Ko 5; 4Ko 7	2Ko 96; 4Ko 4	n.d.
III-112	ALL	14q2-Veränderung ⁵	2-4 Ko (Paraffin)	2Ko (Paraffin)	n.d.
III-113	B-CLL	14q2-Veränderung ⁵	2 Ko (Paraffin)	2Ko (Paraffin)	n.d.
III-114	MCL/B-CLL	14q2-Veränderung ⁵	2Ko 100	2Ko 100	n.d.
III-115	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 66; 1Ko 34	2Ko 100	2Ko 65; 1Ko 35
III-116	B-CLL	del(14)(q22)	2Ko 53; 1Ko 47	2Ko 100	2Ko 55; 1Ko 43; 3Ko 2
III-117	B-CLL	del(14)(q21q24)	2Ko 10; 1Ko 90	2Ko 15; 1Ko 85	n.d.
III-118	B-CLL	del(14)(q21~22q24)	2Ko 100	2Ko	n.d.
III-119	MCL?	del(14)(q22)	2Ko 56; 1Ko 44	2Ko 98; 1Ko 2	n.d.
III-120	B-CLL	del(14)(q21q32)	2 Ko 4; 1Ko 96	1Ko+1g	n.d.

¹Der ZFP36L1-FISH-Assay 1 enthält die markierten BAC-Klone RP11-65A20 (Spectrum green) und RP11-179B8 (Spectrum orange) und der ZFP36L1-Assay 2 die Klone RP11-195B2 (Spectrum orange) und RP11-977G1 (Spectrum green). Für die IGH-FISH-Analyse wurde die kommerzielle LSI IGH Dual Color, Break Apart-Probe der Firma Vysis verwendet. Kolokalisation der Signale bedeutet eine Zusammenlagerung des grünen und roten Signals. Es wurden jeweils 100 Zellkerne ausgewertet. Bei Hybridisierungen, die innerhalb der Routinediagnostik durchgeführt wurden (Teil der IGH-FISH-Analysen), sowie bei FISH an Paraffinschnitten, ist nur eine Beurteilung der Signalmuster der gegebenenfalls aberranten Zellkerne angegeben.

²Bei diesen Fällen handelt es sich um die sechs anfangs identifizierten Fälle mit Deletion del(14q24q32).

³14q2-Veränderung wie mitgeteilt von Dr. Evelyne Callet-Bauchu (Laboratoire d'Hématologie et de cytogénétique, Centre Hospitalier Lyon Sud, Lyon Frankreich).

Anhang

⁴Dieser Fall ist identisch mit dem Fall I-2 (Anhang 1).

⁵14q-Veränderung wie mitgeteilt von Dr. Maria Jose Calasanz (Department of Genetics, University of Navarra, Pamplona, Spanien).

ALL: Akute lymphatische Leukämie; AML: Akute myeloische Leukämie; amp: Amplifikation; B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; B-NHL: B-Zell Non-Hodgkin Lymphom; DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell Lymphom; FL: Follikuläres Lymphom; ISCN: International System for Human Cytogenetic Nomenclature; Ko: Kolokalisation; MCL: Mantelzell-Lymphom; MM: Multiples Myelom; MZL: Marginalzonen-Lymphom; n.d.: nicht durchgeführt; neg.: negativ; NOS: nicht weiter klassifiziert; r: rot; SMZL: Splenisches Marginalzonen-Lymphom; V.a.: Verdacht auf; T-PLL: T-Zell Prolymphozytenleukämie

Anhang

Anhang 7: Charakteristika der Fälle mit Bruch innerhalb der Chromosomenregion 14q24

Fall-Nummer	Diagnose	Alter bei Diagnose	Geschlecht	Material	Karyotyp (ISCN 2005) ¹	Tumorzellgehalt [%]
III-1	B-CLL	75	w	KM	48,XX,+8,+12, del(14q?)	85
III-2	B-CLL	54	w	KM	46,X,-X,+12, del(14)(q21)	5
III-3	B-CLL	82	m	KM	46,XY, del(14q12q24)	77
III-4	B-CLL	49	m	LK	46,XY, del(14)(q22)	86
III-5	B-CLL	61	m	LK	47,XY,+12, del(14)(q22)	95
III-6	B-CLL	53	m	KM	46,XY, del(14q22)[32]/47,XY,+12,del(14)(q22)	66
III-7	B-CLL	77	w	PB	47,XX,+12, del(14)(q22)	69
III-8	B-CLL	67	w	LK	46,XX,t(4;14)(q13;q11), del(14)(q23q32)[9]/46,XX,del(6)(q16q24)	75
III-9	NOS Lymphom	55	m	KM	46,XY, del(14)(q24q32)	60
III-10	B-CLL	47	m	KM	46,XY, del(14q22q24)	63
III-11	B-CLL	80	w	KM	46,XX	40
III-12	B-CLL	70	m	PB	47,XY,+12, del(14)(q22-q23)	85
III-13	B-CLL	49	m	LK	45,XY,add(2)(p13),+der(?)t(?;2)(?;p13),del(7)(q11), der(?)t(?;8)(?;q21.1),add(12)(q24),-14, del(14)(q22),-20	88
III-14	B-CLL	54	m	KM und pB	46,XY,+8,-10, del(14)(q21q32) , der(17)t(17;18)(p12;q12),-18, +20,der(20)t(18;20)(q12;p12)x2,add(21)(q22)	90
III-15	NOS Lymphom	66	m	pB	46,XY	92
III-16	B-CLL	53	m	KM	46,XY	35
III-17	hoch malignes B-NHL	70	w	LK	unbekannt	93
III-18	B-CLL	62	w	LK	46,XX, del(14)(q23q32)	80
III-19	NHL/B-CLL/FL	58	m	pB	46,XY	87
III-20	V.a. B-CLL	51	m	pB	47,XY,+12, del(14)(q22q32)	80
III-21	B-NHL/ CyclinD1 neg. MCL?	74	m	pB	46,XY	43
III-22	B-CLL	50	m	pB	46,XY, del(14)(q24q32)[16]/46,idem, del(13)(q14q21)	90
III-23	niedrig malignes NHL	55	m	KM	47,XY,+der(12)t(12;12)(p11;p13), del(14)(q22?)	96
III-24	MCL	52	m	KM	46,XY, del(14)(q11?q24?)	79
III-25	B-CLL	63	m	KM	unbekannt	94
III-26	B-CLL	65	m	LK	47,XY,+12[1],47,idem, del(14)(q23)	92
III-27	B-CLL	76	m	LK	46,XY, del(14)(q22)[7]/45,X-Y,?del(6)(q26)	45
III-28	B-CLL	66	m	LK	46,XY, del(14)(q23)	80
III-29	B-CLL	54	w	LK	47,XX,+12, del(14)(q22)	36
III-30	B-CLL	47	w	PB	46,XX, del(14)(q21)	71
III-31	B-CLL	60	m	PB	46,XY, del(14)(q22-23)[5]/92,idemx2	87

Anhang

Fall-Nummer	Diagnose	Alter bei Diagnose	Geschlecht	Material	Karyotyp (ISCN 2005) ¹	Tumorzellgehalt [%]
III-32	NOS Lymphom	85	w	PB	46,XX, del(14)(q21q32.33)	89
III-33	B-CLL	81	w	PB	46,XX	82
III-34	B-CLL	78	w	PB	45,XX,der(13;17)(q10;q10), del(14)(q24q32)	92
III-35	B-CLL	69	w	pB	47,XX,+12, del(14)(q22) ,t(18;22)(q21;q11)	3
III-36	B-CLL	77	w	KM	46,XX, del(14)(q22) /46,idem,add(18)(p?11)	10
III-37	SMZL	82	m	pB	46,XY,t(5;7)(p15;p11), del(14)(q22q32)	80
III-38	B-CLL	71	w	KM	47,XX,+12, del(14)(q22)	95
III-39	Verdacht auf MZL	74	m	PB	46,XY, del(14)(q22q32)	21
III-40	Verdacht auf MZL	82	w	PB	46,XX, del(14)(q22q32)	90
III-41	B-CLL	82	w	KM	46,XY, del(14)(q24q32)	72
III-42	B-NHL		m	LK	unbekannt	93
III-43	B-CLL	66	w	LK	unbekannt	87
III-44	B-CLL	62	m	PB	45,XY, del(2)(q34q37) ,add(10)(q26), del(14)(q24q31) ,-17, dic(17;22)(q10;q10)[4];45,XY, del(6)(q21) ,-10, del(11)(p13) , del(14)(q24q31)	53 (Subklon mit <i>IGH</i> - Deletion)
III-45	MM	60	m	KM	46,XY	9
III-46	B-CLL		m	pB	47,XY,+12, del(14)(q22q31)	49
III-47	B-CLL	60	m	KM	46,XY, del(13)(q14q21) , t(13;14)(q14;q24) del(14)(q24.1q24.2)	30

¹14q-Veränderungen sind durch Fettschrift hervorgehoben.

B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; B-NHL: Non-Hodgkin Lymphom vom B-Zell-Typ; FL: Follikuläres Lymphom; KM: Knochenmark; LK: Lymphknoten; m: männlich; MCL: Mantelzell-Lymphom; MM: Multiples Myelom; MZL: Marginalzonenlymphom; NHL: Non-Hodgkin Lymphom; NOS: nicht weiter klassifiziert; pB: peripheres Blut; SMZL: Splenisches Marginalzonenlymphom w: weiblich

Anhang

Anhang 8: Ergebnisse des FISH-Screenings mit dem Dreifarb-FISH-Assay zur Detektion von Aberrationen in 5p15.3 von Zelllinien, die aus hämatologischen Neoplasien etabliert wurden sowie deren Diagnosen und partielle Karyotypen

Zelllinie	Diagnose	Partieller Karyotyp nach ISCN 2005 (Zytogenetische Aberration in 5p1)	Referenz	Detektierte FISH-Signalkonstellationen ¹
Z-138	MCL	normal	[364, 365]	1Ko+1g/b
REC-1	MCL	normal	[366, 367]	1Ko+1g/b+1r
JVM-2	MCL	normal	[368, 369]	2Ko
HBL-2	MCL	normal	[366, 370]	4Ko
Granta 519	MCL	normal	[366, 371]	3-4Ko
JEKO-1	MCL	der(5)t(5;12)(p15;p11-12)x2	[367, 372]	4Ko
UPN-1	MCL	normal	[373, 374]	2Ko
NCEB1	MCL	der(5)t(5;12)(p14;q12)	[366, 375]	1Ko+1g/b+1r
HDLM-2	Hodgkin-Lymphom	normal	[376, 377]	3-6Ko
L428	Hodgkin-Lymphom	add(5)(p11)	[377, 378]	4Ko
L1236	Hodgkin-Lymphom	normal	[379, 380]	2-3Ko
RC-K8	Histiozytisches Lymphom	normal	[381, 382]	3-5Ko
KM-H2	Hodgkin-Lymphom	add(5)(p11)	[383, 384]	3-4Ko
Nalm-6	ALL	normal	[385, 386]	4Ko
SUP-HD1	Hodgkin-Lymphom	del(5)(p15p15.3)	[384, 387]	2Ko
Su-DHL 4	DLBCL	add(5)(p15)	[388, 389]	2Ko
Raji	Burkitt-Lymphom	normal	[390, 391]	4Ko
Daudi	Burkitt-Lymphom	normal	[392, 393]	4Ko
Namalwa	Burkitt-Lymphom	normal	[392, 394]	2Ko
VB	DLBCL nach Hodgkin-Lymphom	normal	[395]	4Ko
SK-MM-2	Plasmazell-Leukämie	normal	[396, 397]	2Ko
DEV-1	NLPHL	normal	[384, 398]	2Ko
L-82	ALCL	unbekannt	[399]	6Ko
Karpas 1106	B-NHL	normal	[400, 401]	2Ko

¹Der FISH-Assay enthält die markierten BAC-Klone RP11-678B2 (Spectrum green), RP11-117B23 (DEAC) und RP11-356C5 (Spectrum orange). Kolokalisation der Signale bedeutet eine Zusammenlagerung des grünen, blauen und roten Signals.

ALCL: Anaplastisch großzelliges Lymphom; ALL: Akute lymphatische Leukämie; b: blau; Burkitt-Lymphom; B-NHL: B-Zell-Non-Hodgkin Lymphom; DLBCL: Diffus großzelliges B-Zell Lymphom; g: grün; ISCN: International System for Human Cytogenetic Nomenclature; Ko: Kolokalisation; MCL: Mantelzell-Lymphom; NLPHL: Noduläres Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom; r: rot

Anhang

Anhang 9: Charakteristika der Zelllinien SUDHL1 und Oci-Ly3

Zelllinie	Diagnose	Alter des Patienten bei Etablierung	Geschlecht	Karyotyp (ISCN 2005) ¹	Referenz
SUDHL 1	ALCL	10	m	74(67-75)<3n>XX, -Y, +1,+2, +3,+5,-7,+12,-16,-18,+19, -20, +21,+3mar,del(1)(p21),t(2;5)(p23;q35)x2, del(6)(q23)x1-2, add(8)(p12),add(9)(p21), del(1negativ)(p14),add(12)(q24), add(14)(p12),add(16)(q24), dup(19)(q13.1qter)	[402, 403]
Oci-Ly3	ABC-DLBCL	52	m	72-75,<3n+>,XY,+der(1)t(1;6)(p11;q11)x2, +3,add(4)(q28),-6,+13,t(14;18)(q32;q21), +add(19)(q13.3)x2 ,del(2negativ)(p11)+mar1, +mar2,+mar3	[404, 405]

¹19q-Veränderungen sind durch Fettschrift hervorgehoben.

ABC-DLBCL: Aktiviertes B-Zell diffus großzelliges B-Zell Lymphom; ALCL: Anaplastisch großzelliges Lymphom; m: männlich; MCL: Mantelzell-Lymphom

Anhang

Anhang 10: Charakteristika der als Kontrollen verwendeten B-CLL

Bezeichnung	Alter bei Diagnose	Geschlecht	Material	Karyotyp (ISCN 2005)	Tumorzellgehalt [%]
Kontroll-B-CLL 1	63	m	KM	47,XY,+12/46,XY. nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12q13 (CHOP prox x 3, CHOP dist x 3) , 13q14 (RB1 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q (LSI 21 x 2)(IGH prox sep IGH dist x 0)	55
Kontroll-B-CLL 2	49	m	pB	46,XY,del(13)(q14q21)/46,XY. nuc ish 11 (CEP11 x 2, FDX x 2, ATM x 2), 12q13 (CHOP prox x 2, CHOP dist x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q (LSI 21 x 2)(IGH prox sep IGH dist x 0)	80
Kontroll-B-CLL 3	68	m	pB	46,XY,del(11)(q14q25),del(13)(q13q14)/46,XY. nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 1, FDX x 1), 12q13 (CHOP x 2), 13q14 (RB1 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2), 21q (LSI 21 x 2)(IGH prox sep IGH dist x 0)	93
Kontroll-B-CLL 4	74	w	pB	47,XY,+12[11]/47,XY,+12,?del(13)(q21q21)/46,XX. nuc ish 11(CEP11 x 2, FDX x 2, ATM x 2), 12q13 (CHOP prox x 3, CHOP dist x 3), 13 (RB1 x 2, D13S25 /D13S319 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2) (IGH prox sep IGH dist x 0)	44
Kontroll-B-CLL 5	78	m	pB	nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12q13(CHOP prox x 3, CHOP dist x 3), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2)	89
Kontroll-B-CLL 6	60	m	pB	nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12q13(CHOP prox x 3, CHOP dist x 3), 13q14 (D13S319 x ?2, D13S25 x ?2), 14q32 (IGH prox x 2,IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2)	91
Kontroll-B-CLL 7	66	w	pB	nuc ish 12q13 (CHOP prox x 3, CHOP dist x 3), 17 (P53 x 2, MPO x 2)	70
Kontroll-B-CLL 8	71	w	pB	46,XX. nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12q13 (CHOP prox x 2, CHOP dist x 2), 13q14 (D13S319 x 1, D13S25 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2)	96
Kontroll-B-CLL 9	67	m	pB	46,XX. nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12q13 (CHOP prox x 2, CHOP dist x 2), 13q14 (D13S319 x 1, D13S25 x 1), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2)	98
Kontroll-B-CLL 10	68	w	pB	46,XX. nuc ish 11 (CEP11 x 2, CCND1 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12q13 (CHOP prox x 2, CHOP dist x 2), 13q14 (D13S319 x 1, D13S25 x 1), 14q32 (IGH x 2, IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 2, MPO x 2)	82
Kontroll-B-CLL 11	87	m	KM	46,XY,del(11)(q13q24)/46,XY. nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 1, FDX x 1), 13q14 (D13S319 x 1, D13S25 x 1), 17 (P53 x 2, MPO x 2)	92
Kontroll-B-CLL 12	64	m	pB	nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 1, FDX x 1), 17 (P53 x 2, MPO x 2)	94

Anhang

Kontroll-B-CLL 13	45	m	pB	46,XY. nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12q13 (CHOP prox x 2, CHOP dist x 2), 13q14 (D13S319 x 2, D13S25 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 1, CEP17 x 2)(IGH prox sep IGH dist x 0)	85
Kontroll-B-CLL 14	68	w	pB	44,XX,dic(9;16)(q34;q24)del(9)(q12q33), der(15;17)(q10;q10)del(17)(q21q23)/46,XX. nuc ish 11 (CEP11 x 2, ATM x 2, FDX x 2), 12q13 (CHOP prox x 2, CHOP dist x 2), 13q14 (D13S319 x 2, D13S25 x 2), 14q32 (IGH prox x 2, IGH dist x 2), 17 (P53 x 1, MPO x 2)	85
Kontroll-B-CLL 15	75	w	pB	nuc ish 11q22~23 (CEP11 x 2, ATM x 1), 17 (P53 x 2, CEP17 x 2)	98

B-CLL: Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; KM: Knochenmark; m: männlich; pB: peripheres Blut; w: weiblich

Anhang

Anhang 11: Charakteristika der als Kontrollen verwendeten MCL

Bezeichnung	Alter bei Diagnose	Geschlecht	Material	Karyotyp (ISCN 2005)	Tumorzelgehalt [%] ¹
Kontroll-MCL 1	69	w	pB	46,XX, nuc ish 11q13 (CCND1 x 3), 14q32 (IGH x 3)(CCND1 con IGH x 2)	61
Kontroll- MCL 2	66	w	pB	46,XX,t(11;14)(q13;q32). nuc ish 11q13 (CCND1 x 3), 14q32 (IGH x 3)(CCND1 con IGH x 2)	67
Kontroll- MCL 3	53	w	pB	46,XX,t(11;14)(q13;q32). nuc ish 11q13 (CCND1 x 3), 14q32 (IGH x 3)(CCND1 con IGH x 2)	96
Kontroll- MCL 4	67	m	LK	46,XY	80
Kontroll- MCL 5	69	w	LK	47,XX,+3,dup(8)(q24q21)	80

KM: Knochenmark; LK: Lymphknoten; m: männlich; MCL: Mantelzell-Lymphom; pB: peripheres Blut; w: weiblich

Anhang

Anhang 12: Charakteristika der als Kontrollen verwendeten ALL

Bezeichnung	Alter bei Diagnose	Geschlecht	Material	Karyotyp (ISCN 2005)	Tumorzellgehalt [%] ¹
Kontroll-ALL 1	15	w	KM	45,X,-X,t(1;12;21;1;12)(p36;p13;q22;q21;p13), del(12)(p13)	71
Kontroll- ALL 2	1	w	KM	unbekannt	95
Kontroll- ALL 3	45	w	KM	47,XX,t(9;22)(q34;q11),+21	54
Kontroll- ALL 4	31	w	pB	46,XX,add(8)(p22~23),del(9)(p12p21)/46,XX	61
Kontroll- ALL 5	3	w	KM	46,XX,t(2;16)(p13;p11),?add(5)(q32),add(6)(q22), del(12)(p12),inc/46,XX	62
Kontroll-ALL 6	12	w	KM	46,XX,del(9)(p22p23),del(9)(p12p22)	88

ALL: Akute lymphatische Leukämie; KM: Knochenmark; pB: peripheres Blut; w: weiblich

Anhang

Anhang 13: Ergebnisse des FISH-Screenings von lymphatischen Neoplasien mit Verlust des distalen Signals mit dem ZFP36L1-Assay 1 und Verlust des proximalen Signals mit der LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe unter Verwendung des TRAF3-FISH-Assays

Fall-Nummer	TRAF3-FISH-Assay Signalkonstellationen [%] ¹	Ausgewertete Zellkerne
III-1	2r+2g 20; 2r+1g 80	50
III-2	2r+2g 84; 2r+1g 16	100
III-3	2r+2g 14; 2r+1g 85; 2r+0g 1	100
III-4	2r+2g 39; 2r+1g 61	100
III-5	2r+2g 10; 2r+1g 90	100
III-6	2r+2g 43; 2r+1g 57	100
III-7	2r+2g 37; 2r+1g 63	100
III-8	2r+2g 22; 2r+1g 78	50
III-9	2r+2g 37; 2r+1g 63	100
III-10	2r+2g 5; 2r+1g 95	60
III-11	2r+2g 36; 2r+1g 62; 2r+0g 2	100
III-12	2r+2g 13; 2r+1g 76; 2r+0g 11	100
III-13	2r+2g 24; 2r+1g 14; 2r+0g 62	100
III-14	2r+2g 16; 2r+1g 80; 2r+0g 4	-
III-15	2r+2g 8; 2r+1g 92	100
III-16	2r+2g 60; 2r+1g 40	100
III-17	n.d.	-
III-18	2r+2g 24; 2r+1g 76	50
III-19	2r+2g 32; 2r+1g 68	50
III-20	2r+2g 14; 2r+1g 76	50
III-21	2r+2g 69; 2r+1g 31	70
III-22	2r+2g 1; 2r+1g 99	100
III-23	2r+2g 3; 2r+1g 97	100
III-24	2r+2g 18; 2r+1g 68; 2r+0g 14	100
III-25	2r+2g 4; 2r+1g 96	70
III-26	n.d.	-
III-27	2r+2g 34; 2r+1g 66	50
III-28	2r+2g 36; 2r+1g 64	50
III-29	2r+2g 16; 2r+1g 84	50
III-30	2r+2g 70; 2r+1g 30	50
III-31	2r+2g 8; 2r+1g 92	100
III-32	2r+2g 11; 2r+1g 82; 2r+0g 7	100
III-33	2r+2g 22; 2r+1g 78	50
III-34	2r+2g 2; 2r+1g 98	100
III-35	2r+2g 95; 2r+1g 5	100
III-36	2r+2g 82; 2r+1g 18	50
III-37	2r+2g 36; 2r+0g 64	100
III-38	n.d.	-
III-39	2r+2g 56; 2r+1g 37; 2r+0g 7	100
III-40	2r+2g 32; 2r+1g 68	50
III-41	2r+2g 6; 2r+1g 94	50
III-42	2r+2g 6; 2r+1g 94	50
III-43	2r+2g 12; 2r+1g 86; 2r+0g 2	50
III-44	2r+2g 52; 2r+1g 48	50
III-45	2r+2g 42; 2r+1g 8	50

¹Der TRAF3-FISH-Assay 1 enthält die markierten BAC-Klone CTD-3235K2 (Spectrum green) und RP11-977G1 (Spectrum orange).

b: blau; g: grün; n.d.: nicht durchgeführt; r: rot

10 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Arnold möchte ich mich herzlich für die Übernahme der Betreuung und des Hauptreferats meiner Doktorarbeit bedanken. Ich danke auch für das Interesse an der Arbeit sowie für das kritische Korrekturlesen der Niederschrift.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Reiner Siebert für das interessante Dissertationsthema, die hervorragende Betreuung und die fortwährende Unterstützung beim Anfertigen der Arbeit. Danke für die Motivation, für die Diskussionsbereitschaft und die hilfreiche Kritik, insbesondere aber auch für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Ich danke unseren Kooperationspartnern Dr. Evelyne Callet-Bauchu, Dr. Randy Gascoyne, Dr. Doug Horsman, Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer, Dr. Andreas Rosenwald, Prof. Jose Angel Martinez-Climent, Dr. Maria Jose Calasanz, Dr. Marta Salido, Dr. Francesc Solé, Elizabeth Schroers, Dr. Christian Bastard und besonders Dr. Martin JS Dyer für die Bereitstellung eines erheblichen Anteils des untersuchten Tumormaterials, für die Diskussionsbereitschaft und für die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Wolfram Klapper nicht nur für die immunhistochemischen Daten, sondern vor allem für die Hilfsbereitschaft bei verschiedenen Telomerase-spezifischen und pathologischen Fragen bedanken. Dr. Matthias Ritgen danke ich sehr für die Durchführung der IgVH-Mutationsanalyse und Dr. Takashi Akasaka für die Kooperation und die hilfreichen Tipps zur Durchführung der LDI-PCRs.

Aufrichtig bedanken möchte ich mich bei meiner „RNA-Lehrerin“ Dr. Monika Szczepanowski für die Unterstützung bei den quantitativen RT-PCRs und die Durchführung der TRAP-Assays.

Ich danke Dr. Svetlana Harder für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Fragen rund um die Tumorzytogenetik und für die Bereitstellung der für diese Arbeit erforderlichen zytogenetischen Daten.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Ole Ammerpohl, Dr. Stefan Gesk, PD Dr. Holger Tönnies und Dr. Simone Heidemann für ihre Geduld und weitreichende Unterstützung.

Danksagung

Für die große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten und die harmonische Zusammenarbeit im Labor danke ich Dorit Schuster, Claudia Becher, Magret Ratjen, Kerstin Runde, Reina Zühlke-Jenisch, Gabi Riesen, Elke Heiden, Ursula Schnaidt, Simone Hartmann, Astrid Schneider, Susanne Kuklinski, Christine Radbruch, Annekatrin Borowski, Antje Heidorn und Lamia Grimm sowie natürlich auch Stefanie Bug, Julia Richter und Andrea Haake.

Claus Peter Blohm danke ich sehr für seine Hilfe bei allen IT-Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. José Ignacio Martin-Subero und Dr. Inga Vater für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Anfertigung der Doktorarbeit, für ihre Ermutigungen und für vieles mehr.

Ich möchte mich bei denen bedanken, die mir Zeit für die Niederschrift der Doktorarbeit gegeben haben, indem sie sich liebevoll um meine Tochter gekümmert haben. Dazu zählen insbesondere die lieben Großeltern, aber auch Simone Hartmann, Jennifer Lorenzen-Peth und Katharina Gibas.

Der größte Dank gilt meiner Familie: Meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mich grenzenlos unterstützt haben. Meinen Schwestern Kaddy und Rebecca, die mir viel Verständnis entgegengebracht haben. Simon, der mir den Rücken freigehalten, mich immer wieder ermutigt und mir viel Kraft gegeben hat und meiner lieben Jonna, die mir auch in dieser Zeit jeden Tag aufs Neue viel Freude bereitet hat.

11 Lebenslauf

Name

Persönliche Daten

Inga Nagel

Akademischer Grad

Diplom-Biochemikerin

Anschrift

Rajensdorfer Weg 24, 24107 Quarnbek

Geburtsdatum/-ort

07.08.1979 / Eckernförde

Staatsangehörigkeit

deutsch

Familienstand:

ledig; eine Tochter, geb. 23.10.2006

Schulbildung und beruflicher Werdegang

1986-1990

Grundschule in Gettorf

1990-1999

Humboldt Schule in Kiel

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/1999-04/2004

Studium Molekularbiologie und Biochemie (Diplom) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2. Hauptfach: Humangenetik, Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Titel: „Positionelle Klonierung von Translokationspartnern des IGH-Locus bei lymphatischen Tumoren“

seit 06/2004

Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

09/2006-08/2007

Mutterschutz und Elternzeit zur Betreuung meiner Tochter Jonna Marie

Kiel, den

12 Publikationsliste

Originalarbeiten und gereviewte Letter

Nagel I, Szczepanowski M, Martín-Subero JI, Harder L, Akasaka T, Ammerpohl O, Callet-Bauchu E, Gascoyne RD, Gesk S, Horsman D, Klapper W, Majid A, Martinez-Climent JA, Stilgenbauer S, Tönnies H, Dyer MJS, Siebert R: Deregulation of the telomerase reverse transcriptase (*TERT*) gene by chromosomal translocations in B-cell malignancies. *Blood* (submitted).

Martin-Subero JI, Ammerpohl O, Bibikova M, Wickham-Garcia E, Agirre X, Alvarez S, Brüggemann M, Bug S, Calasanz MJ, Deckert M, Dreyling M, Du MQ, Dürig J, Dyer MJS, Fan JB, Gesk S, Hansmann ML, Harder L, Hartmann S, Klapper W, Küppers R, Montesinos-Rongen M, **Nagel I**, Pott C, Richter J, Román-Gómez J, Seifert M, Stein H, Suela J, Trümper L, Vater I, Prosper F, Haferlach C, Cruz Cigudosa J, Sieber R: A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS one* (in press, 09-PONE-RA-11823).

Nagel I, Bug S, Tönnies H, Ammerpohl O, Richter J, Vater I, Callet-Bauchu E, Calasanz MJ, Martinez-Climent JA, Bastard C, Salido M, Schroers E, Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Majid A, Dyer MJS, Siebert R: Biallelic inactivation of TRAF3 in a subset of B-cell lymphomas with interstitial del(14)(q24.1q32.33). *Leukemia* (Epub ahead of print, manuscript KF09-LEU-0626, August 2009).

Nagel I, Akasaka T, Klapper W, Gesk S, Böttcher S, Ritgen M, Harder L, Kneba M, Dyer MJS, Siebert R: Identification of the gene encoding cyclin E1 (*CCNE1*) as a novel IGH translocation partner in t(14;19)(q32;q12) in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 94:1020-3 (2009).

Hartmann S, Martin-Subero JI, Gesk S, Hüsken J, Giefing M, **Nagel I**, Riemke J, Chott A, Klapper W, Parrens M, Merlio JP, Küppers R, Bräuninger A, Siebert R, Hansmann ML: Detection of genomic imbalances in microdissected Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma by array-based comparative genomic hybridization. *Haematologica* 93:1318-26 (2008).

Russell LJ, Akasaka T, Majid A, Sugimoto KJ, Loraine Karran E, **Nagel I**, Harder L, Claviez A, Gesk S, Moorman AV, Ross F, Mazzullo H, Strefford JC, Siebert R, Dyer MJ, Harrison CJ: t(6;14)(p22;q32): a new recurrent IGH@ translocation involving ID4 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood* 111:387-91 (2008).

Lenz G, **Nagel I**, Siebert R, Roschke AV, Sanger W, Wright GW, Dave SS, Tan B, Zhao H, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Campo E, Jaffe ES, Smeland EB, Fisher RI, Kuehl WM, Chan WC, Staudt LM. (2007) Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 204:633-43.

Gesk S, Klapper W, Martín-Subero JI, **Nagel I**, Harder L, Fu K, Bernd HW, Weisenburger DD, Parwaresch R, Siebert R. (2006) A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the *CCND2* gene to the *IGK* locus. *Blood* 108:1109-10.

Veröffentlichte Tagungsbeiträge

Nagel I, Vater I, Klapper W, Sczepanowski M, Callet-Bauchu E, Calasanz MJ, Sole F, Ritgen M, Pott C, Richter J, Gesk S, Salido M, Martin-Subero JI, Schroers E, Harder L, Majid A, Kneba M, Dyer MJS, Moroni C, Siebert R (2009) 14q deletions with breakpoints in the *IGH* locus in CLL and related diseases. 20. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Humangenetik und der Schweizerischen Gesellschaft für medizinische Genetik, Aachen: P130

Nagel I, Martín-Subero JI, Harder L, Klapper W, Horsman D, Gascoyne RD, Dyer MJS, Martinez-Climent JA, Stilgenbauer S, Callet-Bauchu E, Siebert R (2006) Breakpoints in chromosomal region 5p15 centromeric of the hTERT locus are recurrent in hematological malignancies. 17. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Humangenetik und der Schweizerischen Gesellschaft für medizinische Genetik, Heidelberg: W9 05.

Gesk S, **Nagel I**, Klapper W, Martin-Subero JI, Fu K, Weisenburger DD, Harder L, Siebert R (2006) Activation of cyclin D2 by chromosomal translocations in cyclin D1-negative mantle cell lymphomas 17. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik gemeinsam

mit der Österreichischen Gesellschaft für Humangenetik und der Schweizerischen Gesellschaft für medizinische Genetik, Heidelberg: P031.

Lenz G, **Nagel I**, Siebert R, Sanger W, Wright GW, Zhao H, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Campo E, Jaffe ES, Smeland EB, Fisher RI, Kuehl WM, Chan WC, Staudt LM (2006) Aberrant Immunoglobulin Class Switch Recombination and Switch Translocations in Activated B Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. ASH Annual Meeting Abstracts, 108: 356.

Nagel I, Martin-Subero JI, Harder L, Ritgen M, Böttcher S, Pott C, Grote W, Kneba M, Siebert R (2005) A novel t(14;19)(q32;q12) juxtaposes the *CCNE1* candidate oncogene to the *IGH* locus in a leukemic B-cell lymphoma. 16. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Halle: P005.

Horsman D, Ludkovski O, de Leeuw R, Gascoyne R, Lam W, **Nagel I**, Bug S, Klapper W, Siebert R (2005) Identification of novel chromosomal changes in mantle cell lymphoma by multi-colour karyotyping, FISH, and tiling path array CGH. International Conference on Malignant Lymphoma, Lugano, Schweiz: No. 152.

Weitere Vorträge

Nagel I, Nieländer I, Martín-Subero JI, Dyer MJS, Gesk S, Harder L, Siebert R (2006) Charakterisierung der Deletion del(14)(q24q32) bei B-Zell-Neoplasien 19. Tumorzytogenetische Arbeitstagung, Wernigerode.

Nagel I, Martín-Subero JI, Harder L, Gesk S, Klapper W, Martínez-Climent JA, Calasanz MJ, Horsman D, Gascoyne RD, Siebert R (2005) Chromosomal aberrations in 5p15 in lymphoid neoplasias. 18. Tumorzytogenetische Arbeitstagung, Semmering, Österreich.

Nagel I, Martin-Subero JI, Martinez-Climent JA, Calasanz MJ, Horsman D, Gascoyne RD, Klapper W, Harder L, Siebert R (2004) Identifizierung von Kandidatenonkogenen aus IGH-Translokationen bei malignen Lymphomen. 23. Treffen Norddeutscher Humangenetiker, Hamburg.

13 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Abhandlung - abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Teilergebnisse der Arbeit wurden bereits publiziert (siehe Abschnitt 12). Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den.....

.....

Inga Nagel