

**GENOMWEITE IDENTIFIZIERUNG
UND MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG
SEKUNDÄRER GENETISCHER VERÄNDERUNGEN
BEI MANTELZELL-LYMPHOMEN**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Inga Nieländer

Kiel 2008

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1.	Maligne Lymphome	1
1.2.	Lymphozyten	1
1.3.	B-Zell-Entwicklung	2
1.3.1.	Differenzierungsantigene	4
1.4.	Lymphomklassifikation	5
1.5.	Das Mantelzell-Lymphom	6
1.5.1.	Epidemiologie	6
1.5.2.	Morphologie und Immunphänotyp	7
1.5.3.	Klinik	8
1.5.4.	Zytogenetische Aberrationen bei Mantelzell-Lymphomen	9
1.6.	Tumorsuppressorgene	10
1.7.	Tumorsuppressorgen-Inaktivierung durch homozygote Deletionen und Mutationen	11
1.8.	Partielle uniparentale Disomie	12
1.9.	Klassische zytogenetische Methoden zum Nachweis chromosomaler Aberrationen	13
1.9.1.	Bänderungsverfahren zur Karyotypisierung	13
1.9.2.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	13
1.9.3.	Vergleichende Genom-Hybridisierung (CGH)	14
1.10.	Zytogenetische Analysen bei Mantelzell-Lymphomen	14
1.11.	DNA-Microarray-Technologien	16
1.11.1.	DNA-Microarray-Technologien zur Detektion genomischer Imbalancen und partieller uniparentaler Disomien	16
1.11.1.1.	Array-basierte vergleichende Genom-Hybridisierung	16
1.11.1.2.	BAC-/PAC-Microarrays	16
1.11.1.3.	Oligonukleotid-Arrays	17
1.11.1.3.1.	Affymetrix GeneChip® Mapping-Arrays	18
1.11.2.	Microarray-Analysen zur Detektion von Nonsense-Mutationen	19
1.11.2.1.	Nonsense-mediated mRNA Decay	19
1.11.2.2.	Gene Identification by Nonsense-mediated mRNA Decay Inhibition (GINI)	19
1.11.3.	Initiale Microarray-Studien zur Identifikation sekundärer chromosomaler Aberrationen bei Mantelzell-Lymphomen	20

1.11.4.	Fragestellung	22
2.	Material und Methoden	24
2.1.	Material	24
2.1.1.	Tumormaterial.....	24
2.1.1.1.	Mantelzell-Lymphome.....	24
2.1.1.2.	Mantelzell-Lymphom-Zelllinien.....	28
2.1.2.	Material für Kontrolluntersuchungen	29
2.1.3.	Material für die ArrayCGH-Analysen	30
2.1.4.	Reagenzien, Chemikalien und Enzyme.....	30
2.1.5.	Kits.....	33
2.1.6.	Microarrays	34
2.1.7.	Antikörper.....	34
2.1.8.	Kommerzielle FISH-Assays.....	34
2.1.9.	Bacterial Artificial Chromosome (BAC)- und P1 artificial chromosome (PAC)-Klone für die Herstellung lokusspezifischer FISH-Sonden.....	35
2.1.10.	Primer	36
2.1.10.1.	Primer für die Mutationsanalyse der mit der GINI-Methode detektierten Gene PIM2 und OAS1	36
2.1.10.2.	Primer zum Nachweis und zur Eingrenzung der mittels 100K GeneChip® Mapping identifizierten homozygoten Deletionen	37
2.1.10.3.	Primer für die DHPLC-Mutationsanalyse.....	38
2.1.10.4.	Primer für epigenetische Analysen	40
2.1.10.5.	Primer für die quantitative RT-PCR	41
2.1.11.	Geräte & Software.....	41
2.1.12.	Puffer und Lösungen	43
2.2.	Methoden.....	48
2.2.1.	Vorbereitung des Probenmaterials	48
2.2.1.1.	Kultivierung von Zelllinien	48
2.2.1.2.	DNA-Extraktion.....	48
2.2.1.3.	DNA-Quantifizierung mittels NanoDrop® ND-1000	49
2.2.1.4.	RNA-Extraktion	49
2.2.1.5.	RNA-Quantifizierung mittels Experion® Elektrophorese System	50
2.2.2.	Microarray-Analysen	51
2.2.2.1.	GINI-Microarray-Analysen.....	51

2.2.2.2.	ArrayCGH	55
2.2.2.3.	100K GeneChip® Human Mapping	56
2.2.3.	Molekularzytogenetische Methoden	60
2.2.3.1.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	60
2.2.3.1.1.	Isolierung der BAC-/PAC-/Fosmid-DNA aus einer Bakterienkultur	60
2.2.3.1.2.	Herstellung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden	60
2.2.3.1.3.	In-situ-Hybridisierung	61
2.2.4.	Molekulargenetische Methoden	62
2.2.4.1.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	62
2.2.4.2.	Multiplex-PCR	63
2.2.4.3.	Auswertung und Dokumentation von PCR-Produkten	63
2.2.4.4.	Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel	64
2.2.4.5.	Denaturing High-Performance Liquid Chromatographie (DHPLC)	64
2.2.4.6.	Aufreinigung von PCR-Produkten	67
2.2.4.7.	DNA-Sequenzierung	67
2.2.4.8.	Reverse Transkription	68
2.2.4.9.	Quantitative Reverse-Transkription (RT)-PCR	69
2.2.5.	Epigenetische Analysemethoden	70
2.2.5.1.	Natriumbisulfit-Behandlung der genomischen DNA	70
2.2.5.2.	Methylierungsspezifische PCR	72
2.2.5.3.	Bisulfitsequenzierung	73
2.2.6.	Proteinanalytische Methoden	75
2.2.6.1.	Western Blot	75
2.2.6.2.	Immunfluoreszenzmikroskopie	77
2.2.6.3.	Immunhistochemie	78
2.3.	Bioinformatische Analyse	79
2.3.1.	Auswertung der GINI-Daten	79
2.3.2.	Auswertung der ArrayCGH-Daten	79
2.3.3.	Auswertung der 100K GeneChip®-Daten	79
2.3.3.1.	Copy Number-Analyse	80
2.3.3.1.1.	Analyseverfahren zur Detektion homozygoter Deletionen	80
2.3.3.1.2.	Abgleich mit Copy Number-Variationen	80
2.3.3.2.	LOH-Analyse und Identifikation von pUPDs	81

3.	Ergebnisse	82
3.1.	Identifikation potentieller Tumorsuppressorgene mittels GINI	82
3.1.1.	Untersuchung von Kandidatengenomen	84
3.2.	Auswertung der ArrayCGH-Daten für das X-Chromosom	87
3.2.1.	Chromosomale Verluste des X-Chromosoms	87
3.2.2.	Chromosomale Zugewinne des X-Chromosoms	90
3.3.	100K GeneChip® Mapping	91
3.3.1.	Auswahl der zu analysierenden Mantelzell-Lymphome	91
3.3.2.	Qualitätskontrolle der 100K GeneChip®-Hybridisierung	93
3.3.3.	Genomweite Bestimmung von Imbalancen	94
3.3.3.1.	Chromosomale Zugewinne und Verluste und Bestimmung minimal aberranter Regionen	95
3.3.3.2.	High-Level-Amplifikationen	100
3.3.3.3.	Identifikation homozygoter Deletionen und ihre Verifikation mittels PCR-basierter Methoden oder FISH	102
3.3.3.3.1.	Eingrenzung homozygoter Deletionen zur Identifikation potentieller Tumorsuppressorgene	104
3.3.3.3.2.	FISH-Screening der Chromosomenregionen mit homozygoten Deletionen in Mantelzell- Lymphomen	106
3.3.3.3.3.	Mutationsanalysen von Kandidatengenomen	108
3.3.4.	Identifikation partieller uniparentaler Disomien	110
3.3.4.1.	Partielle uniparentale Disomien in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien	110
3.3.4.2.	Partielle uniparentale Disomien in primären Mantelzell-Lymphomen	112
3.3.4.3.	Tumorsuppressorgen-Inaktivierung durch partielle uniparentale Disomien (pUPD) in Mantelzell-Lymphomen	113
3.3.5.	Aberrationen Mikrotubuli-assoziiierter Gene bei Mantelzell-Lymphomen	114
3.3.5.1.	Genetische Aberrationen des MAP2-Gens	115
3.3.5.2.	Epigenetische Veränderungen des MAP2-Gens	116
3.3.5.3.	Expressionsanalyse des MAP2-Gens	119
3.3.5.3.1.	Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Konzentration des MAP2-Gens	119
3.3.5.3.2.	Western Blot-Analyse der MAP2-Proteinexpression	121
3.3.5.3.3.	Immunfluoreszenz-Analyse der MAP2-Proteinexpression	121
3.3.5.3.4.	Immunhistochemische Analyse der MAP2-Proteinexpression	122
3.3.5.4.	High-Level-Amplifikationen des MAP6-Gens	123

3.3.5.4.1.	Expressionsanalyse des MAP6-Gens	125
3.3.5.5.	Tumorsuppressor-Protein 53	127
3.3.5.6.	Häufigkeit von Aberrationen Mikrotubuli-assoziiierter Gene in Mantelzell-Lymphomen.....	129
3.3.6.	Genetische Veränderungen der Geschlechtschromosomen	130
3.3.6.1.	Verlust des Y-Chromosoms bei Mantelzell-Lymphomen	131
3.3.6.2.	Deletion der pseudoautosomalen Region 1 (PAR1)	133
4.	Diskussion	136
4.1.	GINI-Analysen der Mantelzell-Lymphome	137
4.2.	Array-CGH-Analyse des X-Chromosoms bei Mantelzell-Lymphomen.....	139
4.3.	100K GeneChip®-Mapping der Mantelzell-Lymphome	140
4.3.1.	Partielle uniparentale Disomien bei Mantelzell-Lymphomen.....	143
4.3.2.	Chromosomale Imbalancen bei Mantelzell-Lymphomen	144
4.3.3.	Mikrotubuli-assoziierte Gene	147
4.4.	Verlust des Y-Chromosoms und homozygote Deletion der PAR1-Region	151
4.5.	Fazit	152
4.6.	Ausblick.....	153
5.	Zusammenfassung	156
6.	Summary	158
7.	Referenzen	160
8.	Anhang	171
9.	Danksagung	174
10.	Lebenslauf	176
11.	Publikationen	177
12.	Erklärung	179

Abkürzungen

A	Adenin
ABC	activated B-cell
AKAP	A-Kinase-Ankerprotein
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
ArrayCGH	Microarray-basierte CGH
AZ	Aktenzeichen
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
BRLMM	Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAPK	cAMP-abhängige Proteinkinase
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CEP	Centromeric Enumeration Probe
CF RFU	Curve Fit Relative Fluorescence Units
CGH	Comparative Genomic Hybridization (vergleichende Genomhybridisierung)
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin®, Prednisolon
CL	Chemilumineszenz
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CNV	Copy Number Variation
CNAG	Copy Number Analyser for GeneChip® (Software)
CNAT	Copy Number Analysis Tool (Software)
CpG	Cytosin-(Phosphat)-Guanin-Dinukleotid
cRNA	complementary RNA
C-Segment	C: constant (Genabschnitt bei der somatischen Rekombination)
Ct	Cycle Treshold
Cy3	Cyanin-Farbstoff 3
Cy5	Cyanin-Farbstoff 5
D	Asparaginsäure
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	Diamidinophenylindol
dATP	Desoxyribonukleinsäure-Adenosin-Triphosphat
dChip	DNA-Chip Analyzer (Software)
dCTP	Desoxyribonukleinsäure-Cytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxyribonukleinsäure-Guanosin-Triphosphat
dH₂O	destilliertes Wasser
DHPLC	Denaturing High-Performance Liquid Chromatographie
DIG	Digoxigenin

Abkürzungen

Disk-PAGE	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DLBCL	Diffuse large B-cell Lymphoma (Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom)
D-MEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleinsäure-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxyribonukleinsäure-Thymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyribonukleinsäure-Uridin-Triphosphat
E	Glutaminsäure
EB	Elution Buffer
ECF	Enhanced Chemifluorescence
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FL	Follikuläres Lymphom
G (Nukleotid)	Guanin
G (Aminosäure)	Glycin
G-Bänderung	Chromosomenbänderungsverfahren mit Giemsa
GCB	germinal center B-cell-like
GCOS	GeneChip® Operating Software
GINI	Gene Identification by Nonsense-mediated mRNA Decay Inhibition
H	Histidin
HMM	Hidden Markov Model
iFISH	Interphase-FISH
Ig	Immunglobulin
IG	Immunglobulingene
IMISE	Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
IVT	<i>in-vitro</i> -Transkription
JMML	Juvenile Myelomonozytäre Leukämie
K	Lysin
KM	Knochenmark
LB	Luria Broth (Bakterienmedium)
LD	linkage disequilibrium
LK	Lymphknoten
LOH	Loss of Heterozygosity (Heterozygotieverlust)
LSI	Locus Specific Identifier
M	Milz
MALT	Mucosa-associated Lymphoid Tissue
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mFISH	FISH an Metaphasen

Abkürzungen

miRNA	microRNA
mRNA	messenger-RNA
MSP	methylierungsspezifische PCR
N/C	not calculable
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMD	Nonsense-mediated mRNA Decay
PAC	P1 Artificial Chromosome
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p-Arm	kurzer Arm eines Chromosoms
PAR1	pseudoautosomale Region 1
pB	peripheres Blut
PBS	Phosphat buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PKA	Proteinkinase A
PN	Phosphat-NaCl
PNM	Phosphat-NaCl-Milchpulver
PTLD	Post-transplant Lymphoproliferative Disorders
pUPD	partielle uniparentale Disomie
q-Arm	langer Arm eines Chromosoms
Q-Bänderung	Chromosomenbänderungsverfahren mit Quinacrin
R	Arginin
R-Bänderung	Zur Giemsa-Färbung gegensätzliches (<u>R</u> reverse) Chromosomenbänderungsverfahren
RCLB	Red Cell Lysis Buffer (Puffer für die Lyse von Erythrozyten)
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	short interfering RNAs
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Standard Saline Citrate (Standard-Salzlösung aus Natriumchlorid und Natriumcitrat)
SSPE	Sodium Chloride-Sodium Hydrogen Phosphate-EDTA
S-Region	Switch-Region (bei der somatischen Rekombination)
SYBR-Green	Cyanin-Farbstoff
T	Thymin
TBE	Trisborat-EDTA
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)

Abkürzungen

TBS-T	TBS-T mit Tween 20
TdT	Terminal Desoxynucleotidyl Transferase
TEAA	Triethylammoniumacetat
ter	terminal
TMACL	Tetramethylammoniumchlorid
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Uracil
UCSC	University of California, Santa Cruz
UCSF	University of California, San Francisco
UV	ultraviolet
V	Valin
V(D)J	V: Variable, D: Diversity, J: Joining (Genabschnitte bei der somatischen Rekombination)
W	Tryptophan
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YAC	Yeast Artificial Chromosome
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Maligne Lymphome

Als maligne Lymphome werden bösartige Tumore des lymphatischen Systems bezeichnet. In erster Linie sind die lymphatischen Organe wie Lymphknoten, Tonsillen, Milz und Knochenmark betroffen, eine Ausbreitung über das lymphatische System auf extralymphatische Organe ist aber bei allen malignen Lymphomen möglich. Man unterscheidet verschiedene Lymphomtypen, deren Tumorzellen sich von lymphatischen Zellen, den Lymphozyten, unterschiedlicher Zellreifungs- und Differenzierungsstufen ableiten (1, 2).

1.2. Lymphozyten

Lymphozyten entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks bzw. der fötalen Leber. Sie werden in B-, T- und NK (natürliche Killer)-Zellen unterteilt und haben eine zentrale Rolle in der Immunabwehr. B-Zellen können mit ihren spezifischen B-Zell-Rezeptoren körperfremde Strukturen, sogenannte Antigene, erkennen und daraufhin spezifische Antikörper produzieren, die bei der Antigenbekämpfung helfen. Bei den T-Zellen unterscheidet man verschiedene Subtypen. Die T-Helferzellen erkennen über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor Antigene, die ihnen von antigenpräsentierenden Zellen gezeigt werden, und reagieren mit der Produktion und Freisetzung von Zytokinen. Zytotoxische T-Zellen hingegen erkennen infizierte oder krankhaft veränderte körpereigene Zellen und lösen in diesen durch Ausschüttung bestimmter Substanzen Apoptose aus. NK-Zellen zeigen eine ähnliche Immunreaktion wie zytotoxische T-Zellen, allerdings besitzen sie im Gegensatz zu den anderen Lymphozyten keinen antigenspezifischen Rezeptor, sondern registrieren das Fehlen typischer körpereigener Zelloberflächenmoleküle infizierter oder entarteter Zellen (2, 3).

Da sich die vorliegende Arbeit mit einem Lymphom der B-Zell-Reihe beschäftigt, wird im Folgenden die B-Zell-Entwicklung genauer beschrieben.

1.3. B-Zell-Entwicklung

Die Reifung der B-Lymphozyten findet im Knochenmark, im peripheren Blut sowie in den lymphatischen Organen statt. Dass reife B-Lymphozyten in der Lage sind, eine riesige Anzahl unterschiedlicher Antigene zu erkennen, setzt eine große Vielfalt antigenspezifischer Rezeptoren voraus. Diese Variabilität wird durch den geregelten intrachromosomalen Umbau der Immunglobulin-Gene erreicht. Die

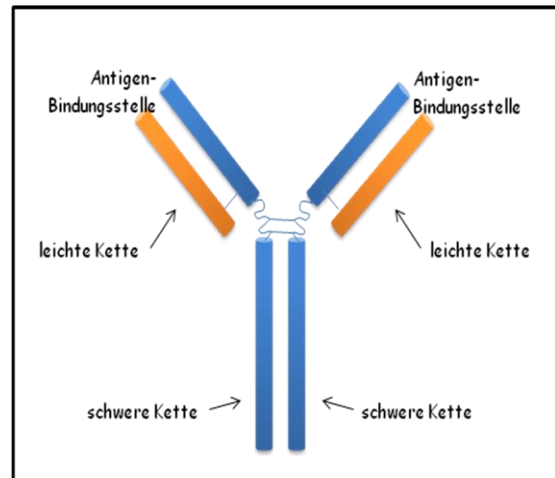


Abbildung 1: Schema eines Antikörpers (basierend auf Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 2002)

bestehen aus zwei identischen schweren Ketten (IgH) und zwei identischen leichten Ketten (entweder Igk oder Igλ) (Abbildung 1). Diese Proteine werden beim Menschen durch die Gene *IGH* in Chromosomenbande 14q32, *IGK* in 2p12 und *IGL* in 22q11 kodiert. Das humane *IGH*-Gen besteht aus 51V-, 27 D-, sechs J- und neun C-Segmenten, die unterschiedlich miteinander kombiniert werden können (3, 4). Ähnliches gilt auch für die *IG*-Leichtkettengene, denen allerdings die D-Segmente fehlen. Das V(D)J-Rearrangement des *IGH*-Gens und das VJ-Rearrangement von *IGK* und *IGL* finden noch im Knochenmark statt und führen zunächst zur Bildung funktioneller Immunglobuline des IgM- sowie des IgD-Isotypen in reifen B-Zellen. Die Bezeichnung dieser Subtypen bezieht sich auf die konstante Region der schweren Kette (C_{μ} bzw. C_{δ}). Die Antikörper werden auf der Zelloberfläche präsentiert. Zellen, bei denen die Rearrangements zu funktionsuntüchtigen Immunglobulinen geführt haben, gehen in Apoptose. Nach dem Verlassen des Knochenmarks wandert die naive periphere B-Zelle über das Blut zu den sekundären lymphatischen Organen wie z.B. Lymphknoten oder Milz. Wird sie auf ihrem Weg durch ein passendes Antigen aktiviert, führt das zur Proliferation der Zelle und zur Ausbildung eines Keimzentrums im Lymphfollikel. Hier erfahren die Immunglobuline der B-Zellen weitere Veränderungen wie Klassenwechsel und somatische Hypermutation. Beim Klassenwechsel wird durch Rekombination der konstanten Region (C-Segmente) des *IGH*-Lokus die Zusammensetzung der schweren Kette verändert, so dass einige B-Zellen nicht mehr die Isotypen IgM (C_{μ}) und IgD (C_{δ}) exprimieren, sondern IgG (C_{γ}), IgA (C_{α}) oder IgE (C_{ϵ}). Die Rekombination erfolgt hierbei über homologe „Switch“-Regionen (S_{μ} , S_{δ} , S_{γ} , S_{α} oder S_{ϵ}), die jeweils stromaufwärts der C-Segmente liegen. Bei der

somatischen Hypermutation werden in die Gene für die variable Sequenz der Antikörper Mutationen eingeführt, um die Antigen-Spezifität und -Affinität zu erhöhen (Abbildung 2). Ist diese Anpassung erfolgreich, differenzieren sich die B-Zellen entweder zu einer Antikörperproduzierenden Plasmazelle oder zu einer langlebigen Gedächtniszelle und verlassen das Keimzentrum (1-6) (Abbildung 3).

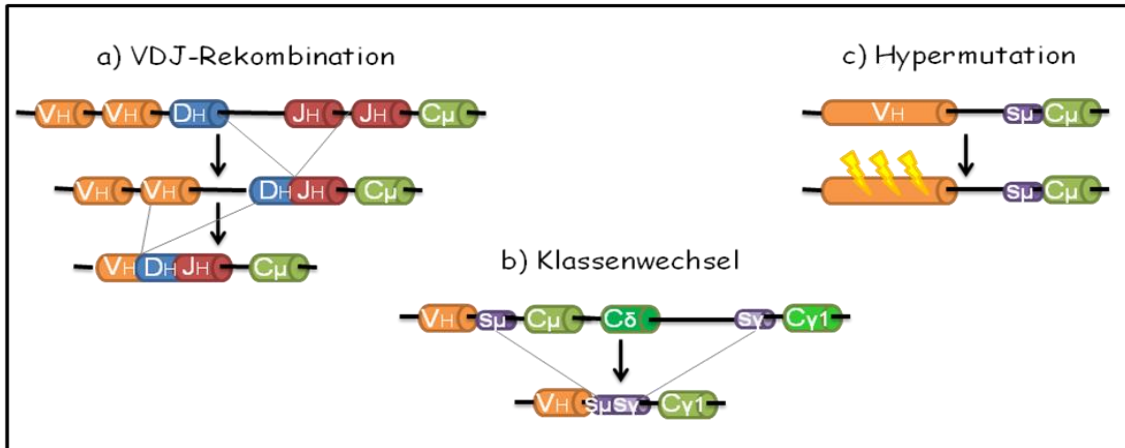


Abbildung 2: Molekulare Prozesse der Immunglobulin-Gene in der B-Zell-Entwicklung (modifiziert nach Küppers et al., 2005).

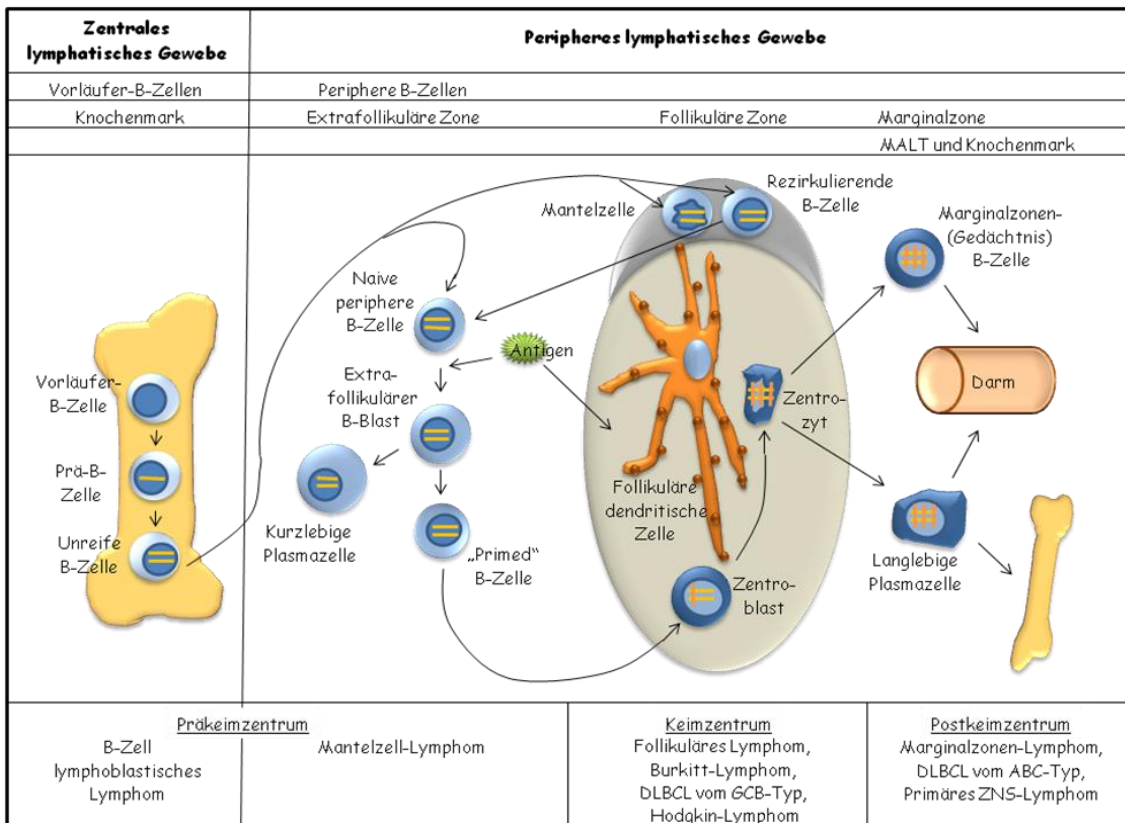


Abbildung 3: Schema zur Entwicklung und Differenzierung der Zellen des B-Zell-Systems. Die Umlagerungen der Schwer- und Leichtkettengene des Immunglobulinlokus sind durch Querbalken symbolisiert. Somatische Hypermutationen der Immunglobulingene sind durch senkrechte Striche in den Querbalken dargestellt. MALT: „mucosa-associated lymphoid tissue“, DLBCL-GCB: Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom vom Keimzentrumstyp, DLBCL vom ABC-Typ: diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom vom aktivierten B-Zell-Typ, ZNS: zentrales Nervensystem (modifiziert nach Stein et al., 2007)

1.3.1. Differenzierungsantigene

Die fortschreitende Reifung der B-Zellen lässt sich mit Hilfe der Cluster-Differenzierungsantigene (CD-Moleküle) auf der Zell-Oberfläche verfolgen. Die Zusammensetzung der auf der Zell-Oberfläche präsentierten CD-Moleküle verändert sich im Laufe der Zellreifung von der Stammzelle bis zum ausdifferenzierten Lymphozyten. Die Immunphänotypisierung mit Hilfe von Antikörpern erlaubt sowohl Rückschlüsse auf Zugehörigkeit zu einer bestimmten Zellreihe als auch auf den Differenzierungsgrad der Zellen (2, 7-11) (Abbildung 4).

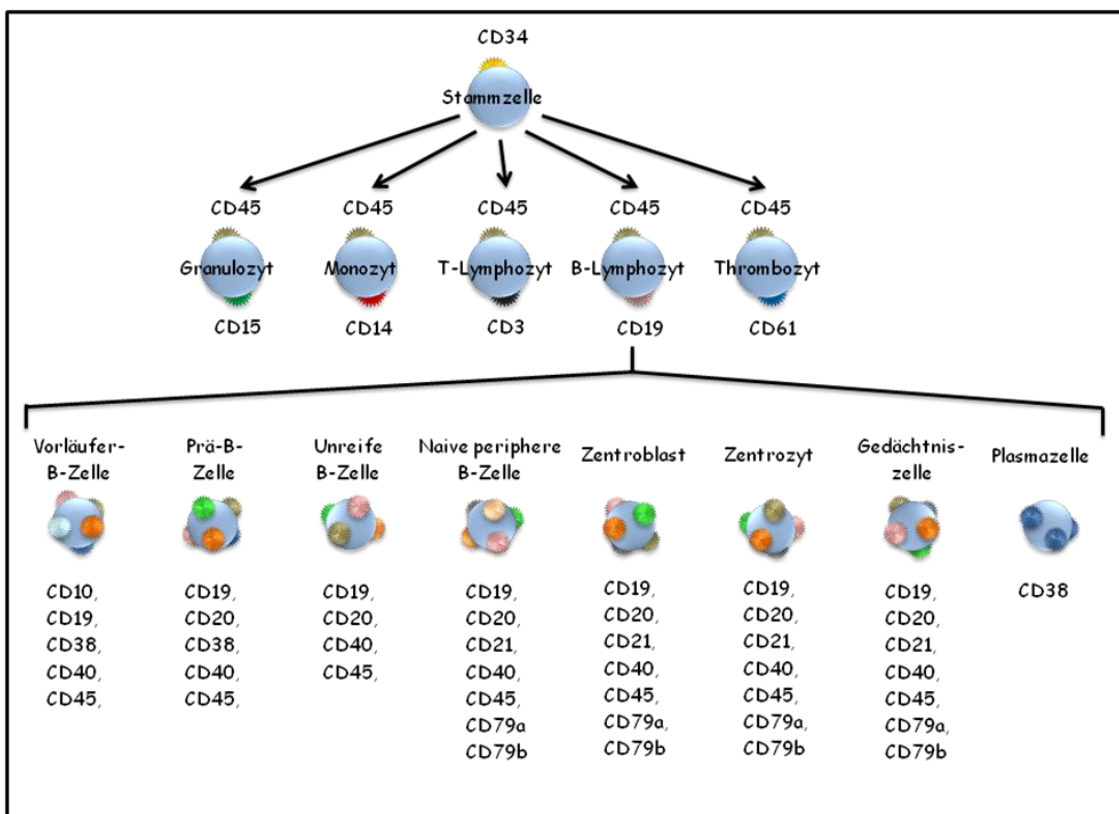


Abbildung 4: Veränderung der Muster der Differenzierungsantigene bei der Hämatoopoese mit Schwerpunkt in der B-Zell-Entwicklung (basierend auf Mitrou, *Non-Hodgkin-Lymphome*, 2001)

Der Immunphänotyp hat in der Therapie maligner Lymphome sowohl diagnostische als auch therapeutische Bedeutung. Das Muster der Differenzierungsantigene liefert dabei Hinweise auf den Differenzierungsgrad der Zelle. Zudem ist bei einigen Lymphomen auch eine aberrante Expression bestimmter CD-Antigene typisch. So exprimieren beispielweise die Tumorzellen des Mantelzell-Lymphoms das eher für T-Lymphozyten typische Antigen CD5, obwohl dieses Lymphom aus einer entarteten B-Zelle hervorgegangen ist. Auf diese Weise kann der Immunphänotyp zur Einteilung der verschiedenen Lymphomtypen genutzt werden (10-13). Darüberhinaus wird aufgrund der Zellspezifität der CD-Moleküle versucht, diese als

Zielstrukturen für eine pharmakologische Therapie zu nutzen. Ein Beispiel für einen therapeutischen monoklonalen Antikörper gegen ein CD-Antigen ist Rituximab. Dieser Antikörper bindet spezifisch an CD20 und kann damit eine Immunantwort gegen CD20-positive Zellen auslösen (1, 10, 14).

1.4. Lymphomklassifikation

Die verschiedenen Lymphomentitäten zeigen große Unterschiede in Manifestation, Verlauf, Prognose sowie empfohlener Therapie. Innerhalb der malignen Lymphome gibt es zwei große Gruppen, die Hodgkin-Lymphome (auch Morbus-Hodgkin genannt) und die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Das klassische Hodgkin-Lymphom zeichnet sich durch seine charakteristischen mehrkernigen Riesentumorzellen aus, die sogenannten Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen, deren natürliche Vorläuferzellen in der Regel B-Lymphozyten aus dem Keimzentrum der Lymphknoten sind. Unter der Bezeichnung Non-Hodgkin-Lymphom wird eine Vielzahl von Lymphomentitäten zusammengefasst, die in ihrer Morphologie und ihrem Krankheitsverlauf sehr heterogen sind (15). Über 90 % der Non-Hodgkin-Lymphome sind B-Zell-Lymphome, nur etwa 10 % gehen auf T- oder NK-Zellen zurück (16) (Abbildung 5).

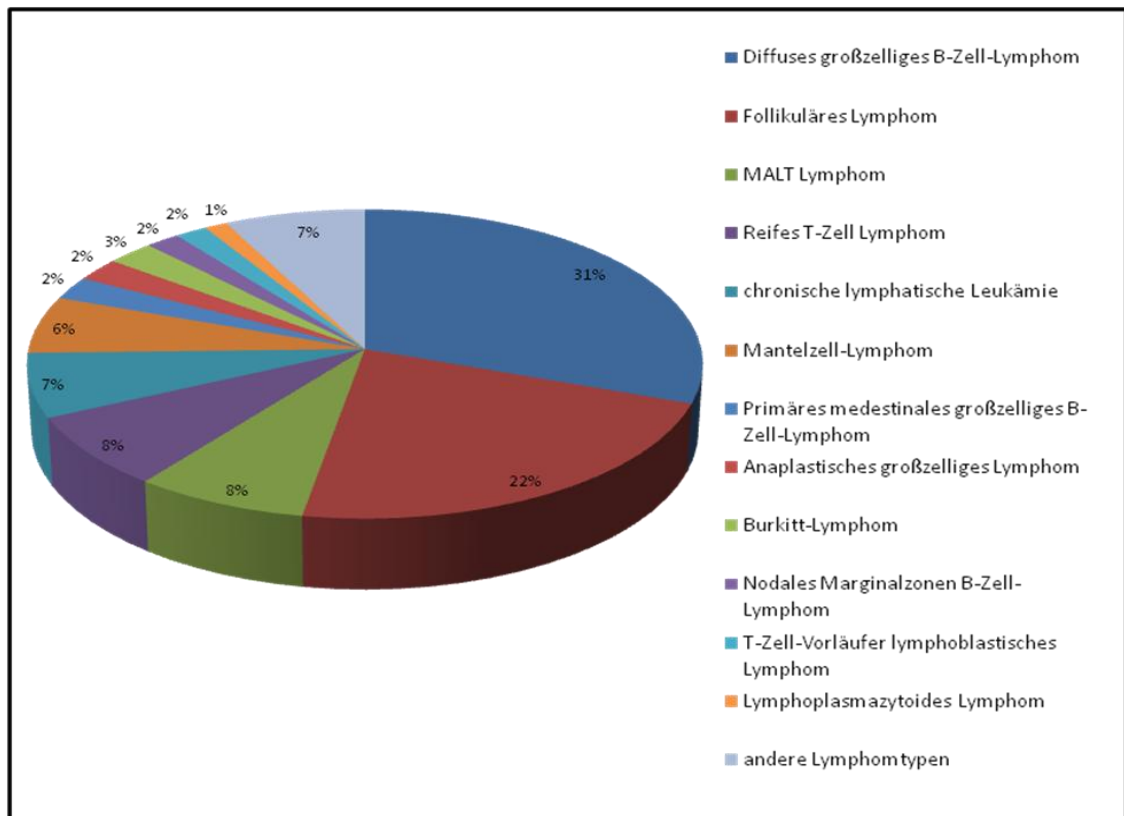


Abbildung 5: Häufigkeiten der B-Zell- und T-/NK-Zell-Lymphome (basierend auf Harris et al., *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue*, 2001)

Ein charakteristisches Merkmal reifer B-Zell-Lymphome ist das Auftreten balancierter Chromosomen-Translokationen, an denen die Immunglobulin-Gene (IG) beteiligt sind. In den meisten Fällen wird das translozierte Partnergen unter Kontrolle eines IG-Enhancers überexprimiert. Die deregulierte Expression dieser Proto-Onkogene führt in vielen Fällen zu einer gestörten Zellzykluskontrolle, einer Apoptose-Hemmung und/oder einer verstärkten Proliferation. Einige dieser Rearrangements sind charakteristisch für bestimmte Lymphomentitäten und dienen so auch der Diagnostik, wie beispielsweise die Translokation t(11;14)(q13;q32) in Mantelzell-Lymphomen (*CCND1/IGH*), die Translokation (14;18)(q32;q21) in Follikulären Lymphomen (*BCL2/IGH*) und die Translokation t(8;14)(q24;q32) in Burkitt-Lymphomen (*MYC/IGH*). Die häufige Beteiligung der *IG*-Loci an diesen Translokationen lässt sich auf den Umbau der *IG*-Gene während der B-Zell-Reifung zurückführen (1, 4, 6, 13, 17). Studien an transgenen Mausmodellen konnten allerdings zeigen, dass die deregulierte Expression dieser Onkogene für eine maligne Transformation der Zellen nicht ausreichend ist, sondern zusätzliche sekundäre Veränderungen notwendig sind (18-20).

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Untersuchungen bei Mantelzell-Lymphomen durchgeführt, weshalb diese Lymphomentität im weiteren Verlauf näher beschrieben wird.

1.5. Das Mantelzell-Lymphom

1.5.1. Epidemiologie

Das Mantelzell-Lymphom (WHO-Klassifikation), auch zentrozytisches Lymphom (Kiel-Klassifikation) genannt, macht etwa 5-10 % der NHL aus (21). Es tritt mit einer Häufigkeit von $3/1 \cdot 10^5$ Einwohner pro Jahr auf, wobei die Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt (22). Das Durchschnittsalter bei Diagnose liegt bei Mantelzell-Lymphom-Patienten bei 60 Jahren

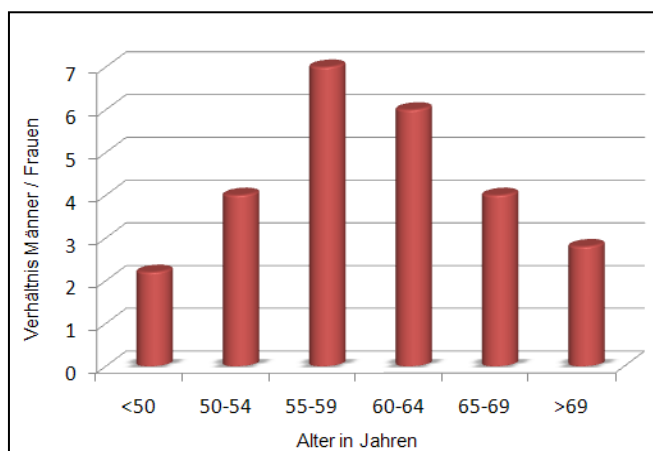


Abbildung 6: Verhältnis von männlichen und weiblichen Patienten mit der Diagnose eines Mantelzell-Lymphoms (modifiziert nach Decaudin et al., 2000)

und es zeigt sich eine deutliche Prädominanz des männlichen Geschlechts (21, 23). Das Verhältnis erkrankter Männer zu erkrankten Frauen variiert dabei in verschiedenen Studien und in Abhängigkeit vom Alter der untersuchten Patienten von 2:1 bis zu 7:1 (23) (Abbildung 6). Die Ursache für diese ungleiche Geschlechtsverteilung ist nicht bekannt. Möglicherweise spielen hormonelle Unterschiede der Geschlechter hier eine Rolle. Eine andere Hypothese ist, dass ein Geschlechtschromosomen-assoziiertes genetischer oder epigenetischer Defekt Ursache für die männliche Prädominanz sein könnte. Bislang konnten allerdings keine rekurrenten strukturellen Veränderungen der Geschlechtschromosomen in Mantelzell-Lymphomen identifiziert werden (23). In einigen Mantelzell-Lymphom-Studien wurden jedoch rekurrente Verluste des Y-Chromosoms beobachtet, wobei deren Bedeutung als sekundäre Aberration für die Tumorzellen bislang nicht weiter untersucht wurde (24-26).

1.5.2. Morphologie und Immunphänotyp

Das Mantelzell-Lymphom ist ein B-Zell-Lymphom. Die typischen malignen Zellen des Mantelzell-Lymphoms sind klein bis mittelgroß und zeigen einen schmalen Zytoplasmasaum sowie einen dichten, oft unregelmäßig geformten Kern. Sie liegen in der Regel diffus oder angedeutet nodulär im Lymphknotengewebe vor. Bei der blastoiden Variante des Mantelzell-Lymphoms sind die Tumorzellen größer und häufig pleomorph mit eher runden Zellkernen. Die Analyse des Immunphänotyps zeigt eine membranständige Expression von IgM und meistens IgD sowie eine Expression von B-Zell-assoziierten Antigenen wie z.B. CD19, CD20, CD22, CD79a und CD79b. Weiterhin wird CD5 und CD43 exprimiert, wohingegen die Expression von CD23 fehlt. Anhand der Zellmorphologie, des Immunphänotyps und histochemischer Daten werden naive B-Zellen der Mantelzone des Lymphfollikels als Ausgangszellen der malignen Mantelzell-Lymphom-Zellen vermutet (21, 27-29) (Abbildung 7).

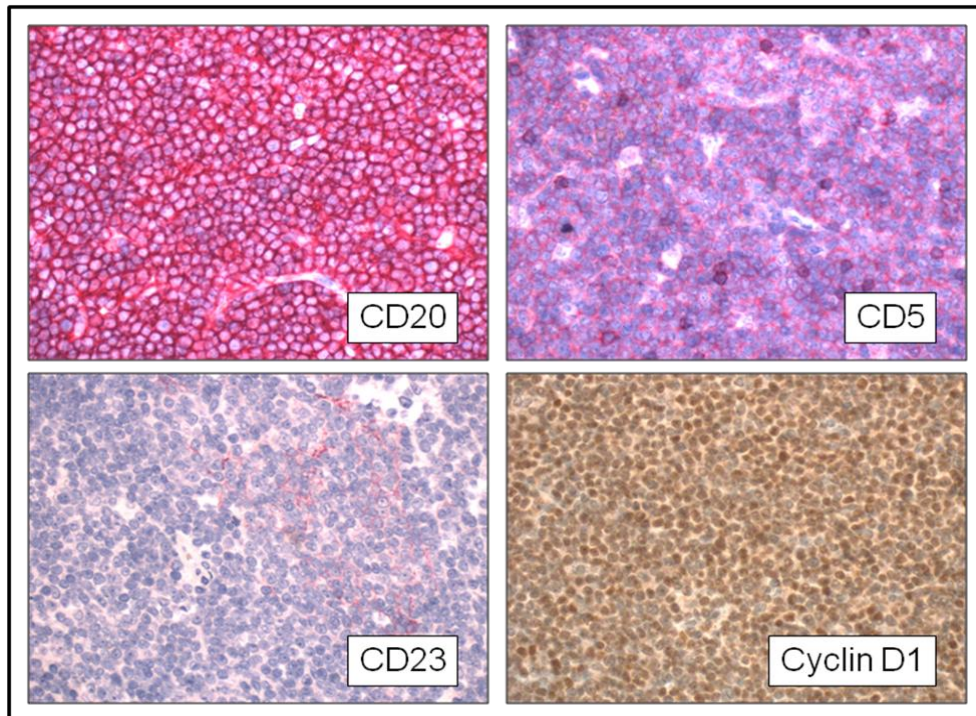


Abbildung 7: Immunphänotypisierung eines Mantelzell-Lymphoms mit monoklonalen Antikörpern, die verschiedene Differenzierungsantigene und Cyclin D1 erkennen. Im Gegensatz zu CD23 lassen sich CD20- und CD5-Antigene auf der Zelloberfläche nachweisen (rote Färbung). Das Cyclin D1-Protein (braun) zeigt hingegen eine starke nukleäre Expression [Die Abbildung wurde freundlicher Weise von PD Dr. Wolfram Klapper zur Verfügung gestellt (Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel)].

1.5.3. Klinik

Obwohl das Mantelzell-Lymphom zu den niedrigmalignen Lymphomen gerechnet wird, zeichnet es sich durch einen rasch progredienten und letztendlich meist therapierefraktären klinischen Verlauf aus. Es hat eine der schlechtesten Prognosen aller Lymphomentitäten mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 3 Jahren und nur wenig Langzeitüberlebenden (21). Eine Heilung durch alleinige konventionelle antracyclinhaltige Chemotherapie z.B. nach dem CHOP-Protokoll (Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin®, Prednisolon) ist nicht möglich, allerdings belegen aktuelle Studien den Vorteil einer kombinierten Immunochemotherapie mit dem CD20-Antikörper Rituximab. Eine nachfolgende Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation führt bei Patienten bis 65 Jahren zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und ist zurzeit die effektivste Konsolidierungstherapie. Leider rezidiert ein Großteil der Patienten auch nach einer solchen dosisintensivierten Behandlung (30, 31).

1.5.4. Zytogenetische Aberrationen bei Mantelzell-Lymphomen

Bei Betrachtung des Karyotyps findet sich in nahezu allen Mantelzell-Lymphomen eine Chromosomentranslokation $t(11;14)(q13;q32)$. Durch dieses Rearrangement gelangt das *CCND1*- (früher *BCL1*-) Gen in 11q13 unter die Kontrolle des IGH-Enhancers in 14q32, was zu einer starken Überexpression des kodierten Proteins Cyclin D1 führt (32-34) (Abbildung 8).

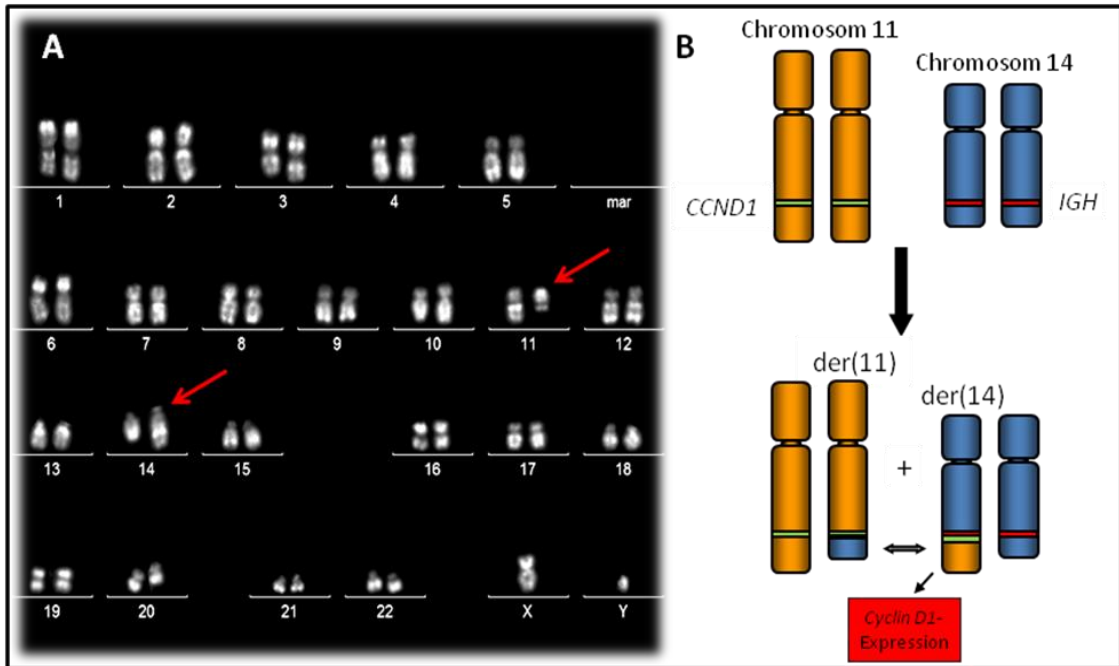


Abbildung 8: Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ beim Mantelzell-Lymphom. **A)** Karyotyp nach R-Bänderung. Die beiden derivativen Chromosomen sind durch rote Pfeile markiert. **B)** Schematische Darstellung des Rearrangements [Der Karyotyp wurde freundlicherweise von Dr. Lana Harder zur Verfügung gestellt (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel)].

Das Cyclin D1 ist beteiligt an der Regulation des Zellzyklus. Am Ende der G1-Phase phosphoryliert ein Cyclin D1-CDK4/6-Komplex das Rb1-Protein, welches dadurch die Bindung zum Transkriptionsfaktor E2F löst. Dieser initiiert dann die Transkription bestimmter Gene, welche den G1/S-Phase-Übergang steuern (Abbildung 9). Ektopische Expression des *CCND1*-Gens in der G1-Phase unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors bewirkt die frühe Phosphorylierung des Rb1-Proteins und in Folge dessen eine Verkürzung der G1-Phase (35-37). Obwohl die charakteristische Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ in fast allen Mantelzell-Lymphomen nachgewiesen werden kann, ist sie alleine nicht ausreichend für eine maligne Transformation (18, 19, 38). Vielmehr spielen sekundäre Veränderungen eine entscheidende Rolle, die in einem mehrstufigen Prozess zur Genese des Mantelzell-

Lymphoms beitragen. Häufige sekundäre zytogenetische Aberrationen in Mantelzell-Lymphomen sind Zugewinne in 3q26-q27 sowie Deletionen in 9p21, 13q14, 11q22-23 und 17p13. In den meisten dieser Regionen liegen bekannte Tumorsuppressorgene, wie beispielweise *CDKN2A/p16* in 9p21, *RB1* in 13q14, *ATM* in 11q22 und *TP53* in 17p13 (34, 39, 40).

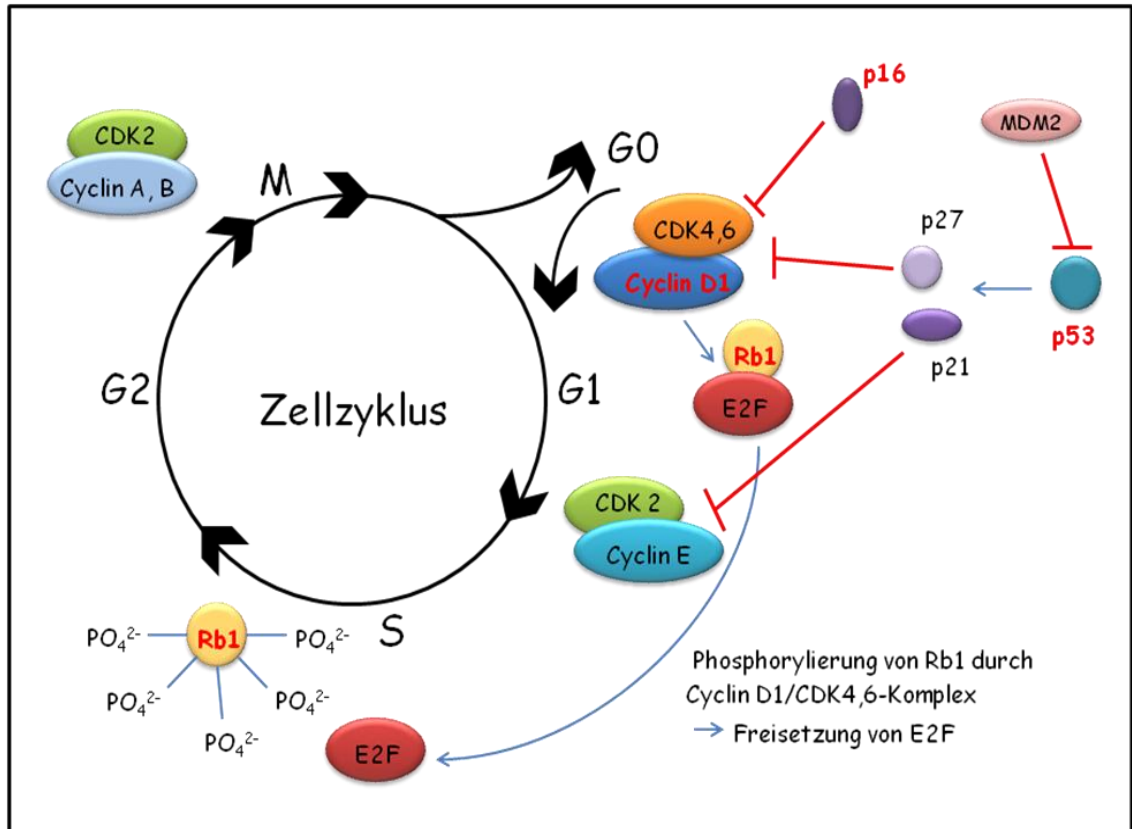


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung der Zellzyklusregulation mit Schwerpunkt auf G1/S-Phase-Übergang (basierend auf Ewen et al., 1993; Weinberg 1995; Sherr and Roberts 1999). In roter Schrift sind die Gene markiert, die häufig bei Mantelzell-Lymphomen dereguliert sind (34, 39, 40).

1.6. Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgen-Inaktivierung ist ein bekannter Mechanismus, der an der malignen Transformation von Lymphomen beteiligt ist. Proteine, die von Tumorsuppressorgen kodiert werden, schützen beispielsweise vor DNA-Schäden (*ATM*), regulieren den Zellzyklus (*CDKN2A/p16*, *RB1*) oder induzieren die Apoptose im Fall einer fehlenden Zellzykluskontrolle (*P53*) (41-46). Klassische Mechanismen der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung sind Deletionen, die den Verlust eines Tumorsuppressorgens zur Folge haben, oder Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. Außerdem können epigenetische Defekte zur Unterdrückung der Genexpression und damit zur Tumorsuppressorgen-Inaktivierung

führen. Nach Knudsons Zwei-Treffer-Hypothese müssen beide Allele eines Tumorsuppressorgens inaktiviert werden, damit der genetische Defekt Auswirkungen auf die Zelle hat (47, 48) (Abbildung 10). Dabei können neben Protein-kodierenden Genen auch regulatorische RNA-Transkripte wie z.B. nicht-kodierende microRNAs (miRNAs) als Tumorsuppressor wirken (49, 50).

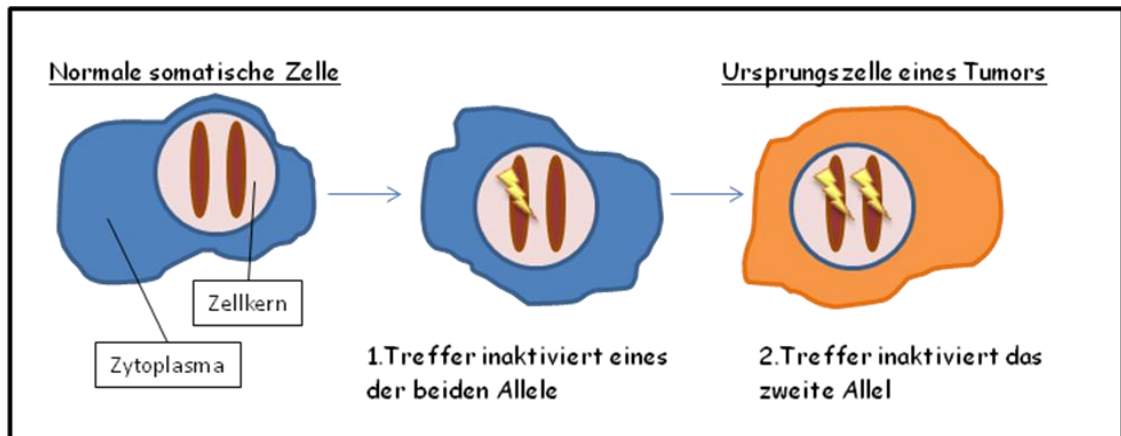


Abbildung 10: Tumorsuppressorgen-Inaktivierung nach Knudsons Zwei-Treffer-Hypothese (nach Knudson, 1971).

1.7. Tumorsuppressorgen-Inaktivierung durch homozygote Deletionen und Mutationen

Die Bezeichnung „homozygote Deletion“ beschreibt ein genetisches Ereignis, bei dem ein identischer Chromosomenabschnitt auf beiden Chromosomen eines Homologenpaares verlorenght. Dieses Ereignis führt zu dem Verlust beider Allele der betroffenen Gene. Viele der bekannten Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise *CDKN2A/p16*, *PTEN* und *RB1*, wurden über die Detektion homozygoter Deletionen identifiziert (51-53). Anschließende molekulargenetische Untersuchungen konnten dann weitere genetische Aberrationen identifizieren, die einen Funktionsverlust des Proteins zur Folge hatten, wie beispielsweise Punktmutationen oder kleine Insertionen und Deletionen. Durch das rekurrente Auftreten solcher Mutationen konnte die Bedeutung als Tumorsuppressor belegt werden. Die Suche nach homozygoten Deletionen und Gen-inaktivierenden Mutationen in Tumoren ist demnach eine geeignete Strategie, um neue Tumorsuppressorgene zu identifizieren.

1.8. Partielle uniparentale Disomie

Ein alternativer Mechanismus der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung ist die partielle uniparentale Disomie (pUPD). Bei diesem Mechanismus wird nach Verlust eines der beiden elterlichen Chromosomen (oder eines Chromosomenabschnittes) die noch verbliebene Kopie dupliziert, was zwar keine Deletion zur Folge hat, aber trotzdem zum Verlust der Heterozygotie (LOH: Loss-of-Heterozygosity) führt (54, 55) (Abbildung 11). In dem Fall, dass involvierte Gene rezessive Mutationen tragen oder durch epigenetische Veränderungen inaktiviert wurden, können sich diese durch die pUPD homozygot auswirken. Dieser Reparaturmechanismus der Zelle basiert wahrscheinlich auf homologer Rekombination, ist aber bislang nicht im Detail verstanden. Aktuelle Studien konnten zeigen, dass die Tumorsuppressorgen-Inaktivierung durch pUPD ein häufiges Ereignis in hämatologischen Neoplasien und soliden Tumoren ist (56-61). Da die genomweite Detektion von pUPDs mit den klassischen zytogenetischen Analyseverfahren nicht möglich ist, wurde die weitreichende Bedeutung dieses Mechanismus für die Tumorgenese erst in den letzten Jahren nach Einführung spezieller Microarray-Technologien erkannt, obwohl bereits früher Mikrosatelliten-basierte LOH-Analysen darauf hinwiesen (62, 63).

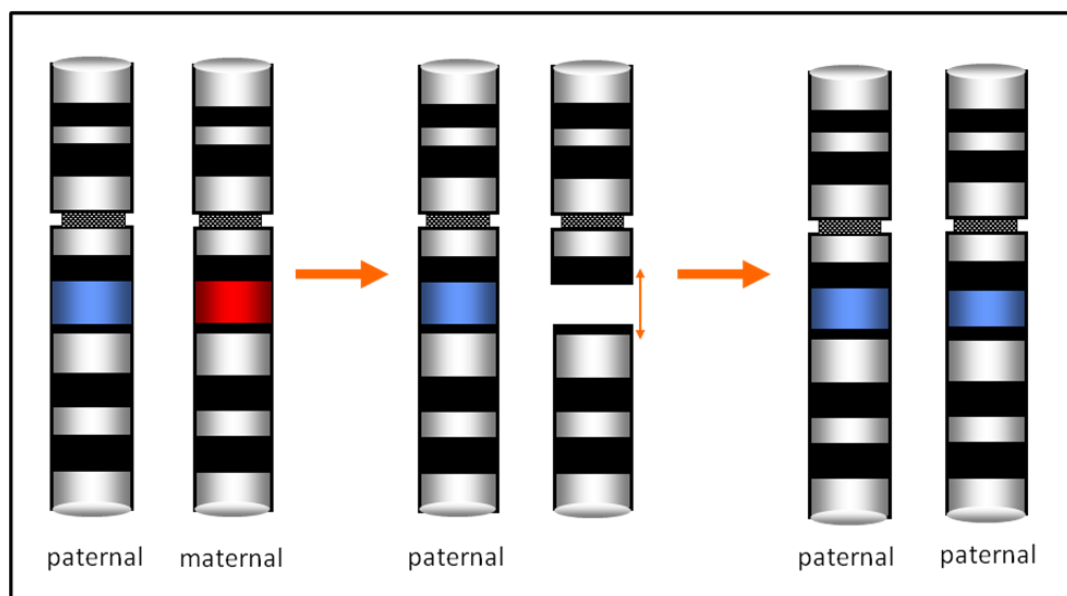


Abbildung 11: Entstehung einer partiellen uniparentalen Disomie

1.9. Klassische zytogenetische Methoden zum Nachweis chromosomaler Aberrationen

Die meisten Erkenntnisse über strukturelle Chromosomenaberrationen bei Lymphomen basieren auf den Ergebnissen klassischer zytogenetischer Analyseverfahren wie der Karyotypisierung mittels Chromosomen-Bänderung, der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) oder der Vergleichenden Genom-Hybridisierung (englisch: Comparative Genome Hybridization = CGH).

1.9.1. Bänderungsverfahren zur Karyotypisierung

Für die Karyotypisierung von Metaphase-Kernen gibt es unterschiedliche Verfahren der Chromosomenfärbung. Diese erzeugen spezifische Bandenmuster, die es ermöglichen, neben Aneuploidien auch Bruchstellen von Translokationen, größeren Deletionen oder Zugewinnen zu erkennen. Die Art der Chromosomenanomalien und die betroffenen Banden oder Subbanden werden in einem Karyotyp zusammengefasst. Die häufigsten Bänderungsverfahren sind die Färbung mit Giemsa (G-Bänderung), Quinacrin (Q-Bänderung) und die der G-Bänderung gegensätzliche Färbung (R-Bänderung) beispielsweise mit Chromomycin A₃ (64).

1.9.2. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren, um bestimmte DNA-Sequenzen in Interphase-Kernen (iFISH) oder Metaphase-Kernen (mFISH) nachzuweisen. Dazu wird eine komplementäre DNA-Sonde hergestellt, die heutzutage meistens aus fluoreszenzmarkierten BAC/PAC-, Fosmid oder Cosmid-Klonen besteht. Nach Hybridisierung mit dem Zellkern können die Fluoreszenzsignale unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Durch zusätzliche Signale lassen sich chromosomale Zugewinne identifizieren, wohingegen das Fehlen von Signalen auf Verluste hinweist. Durch die Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe können unterschiedlich markierte Sonden gleichzeitig verschiedene Chromosomenregionen sichtbar machen. Neben chromosomalen Imbalancen können so auch strukturelle Rearrangements wie z.B. Translokationen nachgewiesen werden (64).

1.9.3. Vergleichende Genom-Hybridisierung (CGH)

Die Technik der CGH ermöglicht die genomweite Detektion chromosomaler Imbalancen einer Zelle (65, 66). Bei der klassischen CGH werden die DNA der zu untersuchenden Probe und eine normal diploide Referenz-DNA mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend auf eine normale gespreitete Metaphase hybridisiert. Die Hybridisierung repetitiver Sequenzen wird durch Zugabe von Cot-1 DNA verhindert. Über das Verhältnis der Signalintensitäten für Test- und Referenz-DNA lässt sich die relative DNA-Kopienzahl des Test-Genoms bestimmen. Auf diese Weise können Zugewinne und Verluste genetischen Materials detektiert werden. Allerdings können mit der CGH-Technik keine balancierten chromosomalen Rearrangements erkannt werden, und der Tumorzellgehalt der Probe muss bei mindestens 30-50 % liegen.

1.10. Zytogenetische Analysen bei Mantelzell-Lymphomen

Sowohl mit den klassischen Bänderungstechniken als auch mit FISH und der klassischen CGH konnten eine Vielzahl sekundärer Aberrationen detektiert werden, die zur Mehrstufen-Genese des Mantelzell-Lymphoms beitragen. In der Mitelman-Datenbank wurden die zytogenetischen Daten diverser Studien zusammengetragen (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). Mit Hilfe der Software des Progenetix-Projects (www.progenetix.net) wurden in den Mitelman-Daten von mehr als 400 Mantelzell-Lymphomen vor allem Zugewinne in Chromosom 3 und 11q, Deletionen in Chromosom 1, 6q, 8, 9, 10, 11q, 13, 14, 15, 17p, 18, 21 und 22 sowie Verluste der Geschlechtschromosomen beobachtet (Abbildung 12).

Zwischen 1998 und 2002 wurden mehrere Studien mit Hilfe der klassischen CGH an Mantelzell-Lymphomen durchgeführt. Mit dieser Technik konnten weitere rekurrent zugewonnene und deletierte Regionen identifiziert und die Bruchstellen genauer kartiert werden. Häufige Zugewinne fanden sich in 3q, 6p, 7p, 8q, 9q, 15q und 18q. Die Regionen 1p, 6q, 8p, 9p, 11q, 13q, 17p und 22q waren rekurrent von Deletionen betroffen (39, 40, 67-70). In der Progenetix-Datenbank (www.progenetix.net) sind die Daten dieser Studien zusammengefasst worden (Abbildung 13). Der Vergleich dieser CGH-Daten mit denen der Mitelman-Datenbank, die mittels Chromosomenbänderungstechnik generiert wurden, zeigt offensichtlich eine verbesserte Auflösung und somit eine genauere Kartierung der Imbalancen. Allerdings ist auch bei der klassischen CGH die maximale Auflösung durch die Hybridisierung einer gespreiteten Metaphase auf 10-20 Mb beschränkt, so dass kleinere

Imbalancen, mit Ausnahme von High-Level-Amplifikationen, nicht detektiert werden können. Wie im Folgenden dargestellt, kann eine Verbesserung der Auflösung allerdings durch die Verwendung von Microarrays statt Metaphasen erreicht werden.

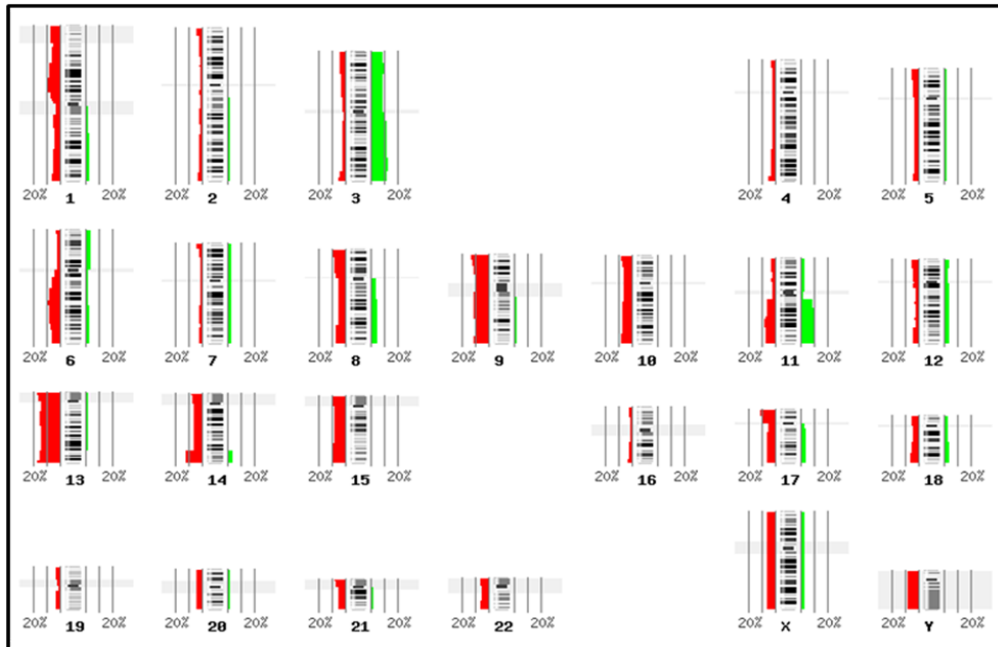


Abbildung 12: Übersicht über rekurrente Imbalancen bei Mantelzell-Lymphomen, die mit Hilfe der Chromosomenbänderungsanalyse identifiziert wurden. Dargestellt ist der Anteil der Mantelzell-Lymphome [%], der in den jeweiligen Chromosomenregionen rekurrente Zugewinne (grün) und Verluste (rot) gezeigt hat [Karyotyp-Analyse von 426 zytogenetisch untersuchten Mantelzell-Lymphomen der Mitelman-Datenbank (Oktober 2007 Edition) mit der Analyse-Software des Progenetix-Projekts (www.progenetix.de)].

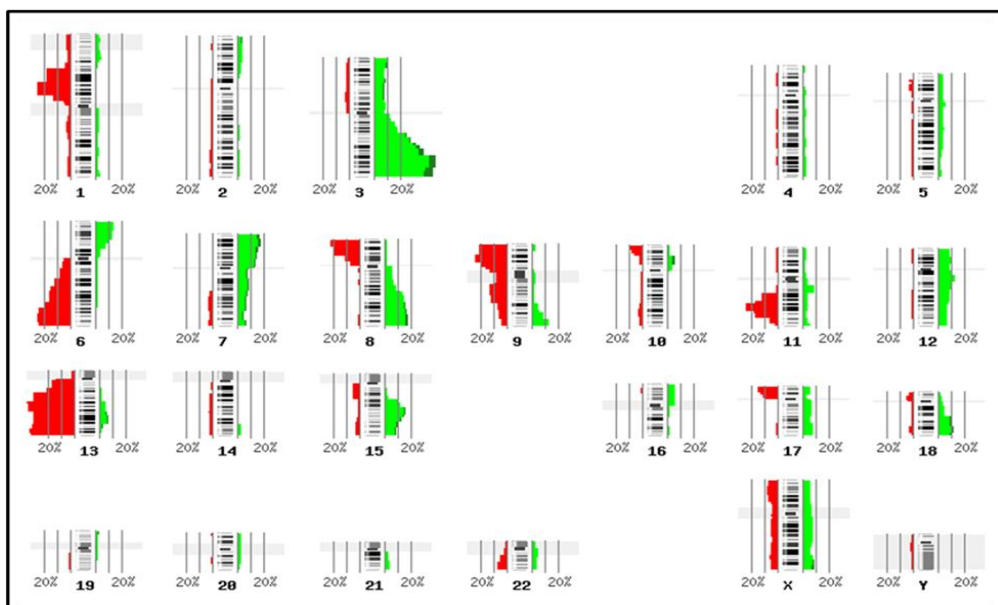


Abbildung 13: Übersicht über rekurrente Imbalancen bei Mantelzell-Lymphomen, die mittels klassischer CGH detektiert wurden. Dargestellt ist der Anteil der Mantelzell-Lymphome [%], der in den jeweiligen Chromosomenregionen rekurrente Zugewinne (grün) und Verluste (rot) gezeigt hat [Analyse von 182 mit klassischer CGH untersuchten Mantelzell-Lymphomen der Progenetix-Datenbank mit der Software des Progenetix-Projekts (www.progenetix.de, Nov. 2007)].

1.11. DNA-Microarray-Technologien

Microarrays sind miniaturisierte Proben­träger, auf denen tausende in ihrer Identität bekannte Biomoleküle untergebracht werden können. Die spätere Identifizierung erfolgt dabei aufgrund der Position auf dem Microarray. Auf diese Weise können in einem einzigen Experiment mehrere tausend Einzelnachweise durchgeführt werden. DNA-Microarrays bestehen aus DNA-Fragmenten, synthetischen Oligonukleotiden oder cDNA-Molekülen und finden ihre Anwendung in der Genomforschung sowie in der Untersuchung differentieller Genexpression (71). Im Folgenden sind die für diese Arbeit relevanten Microarray-Technologien ausführlicher beschrieben.

1.11.1. DNA-Microarray-Technologien zur Detektion genomischer Imbalancen und partieller uniparentaler Disomien

1.11.1.1. Array-basierte vergleichende Genom-Hybridisierung

Die Array-basierte CGH (ArrayCGH) ist eine Weiterentwicklung der klassischen CGH. Durch die Einführung der Microarray-Technologie konnte mit der sogenannten ArrayCGH eine wesentlich höhere Auflösung erreicht werden. Bei diesem Verfahren werden die gespreiteten Metaphasen durch Microarrays als Hybridisierungsobjekt ersetzt (72) (Abbildung 14). Diese können entweder aus Bacterial-Artificial-Chromosome (BAC)- und P1-Artificial-Chromosome (PAC)-Klonen oder aus synthetisch hergestellten Oligonukleotiden bestehen. In beiden Fällen entspricht die Nukleotidsequenz der Tags auf dem Array bestimmten Abschnitten der DNA-Sequenz der zu untersuchenden Spezies. Damit können die chromosomalen Bruchpunkte, die zu den Imbalancen führen, sehr viel genauer bestimmt werden.

1.11.1.2. BAC-/PAC-Microarrays

Die ersten ArrayCGH-Plattformen bestanden aus gespotteten DNA-Fragmenten, die in BAC-, PAC- und Yeast Artificial Chromosomes (YAC)-Vektoren kloniert wurden und allgemein als BAC-/PAC-Arrays bezeichnet werden. Alternativ wurden auch Cosmid- und Fosmid-Klone oder cDNAs verwendet (72-75). Bis heute sind eine ganze Reihe unterschiedlicher Arrays zur Untersuchung des humanen Genoms beschrieben. Die Anzahl der gespotteten Klone hat dabei stetig zugenommen, von 2.460 (73), 3.500 (76), 4.134 (77), über 6.000 (78) bis zu 32.000 Klonen (79, 80), wodurch eine zunehmende Auflösung erreicht wurde. Die 32.000 Klone des Tiling-Path-Array überlappen einander in ihrer DNA-Sequenz und decken so das gesamte menschliche Genom ab. Allerdings ist die maximale Auflösung, die mit einem

BAC/PAC-Array erreicht werden kann, durch die Größe der eingesetzten Klone auf etwa 50-200 kb beschränkt.

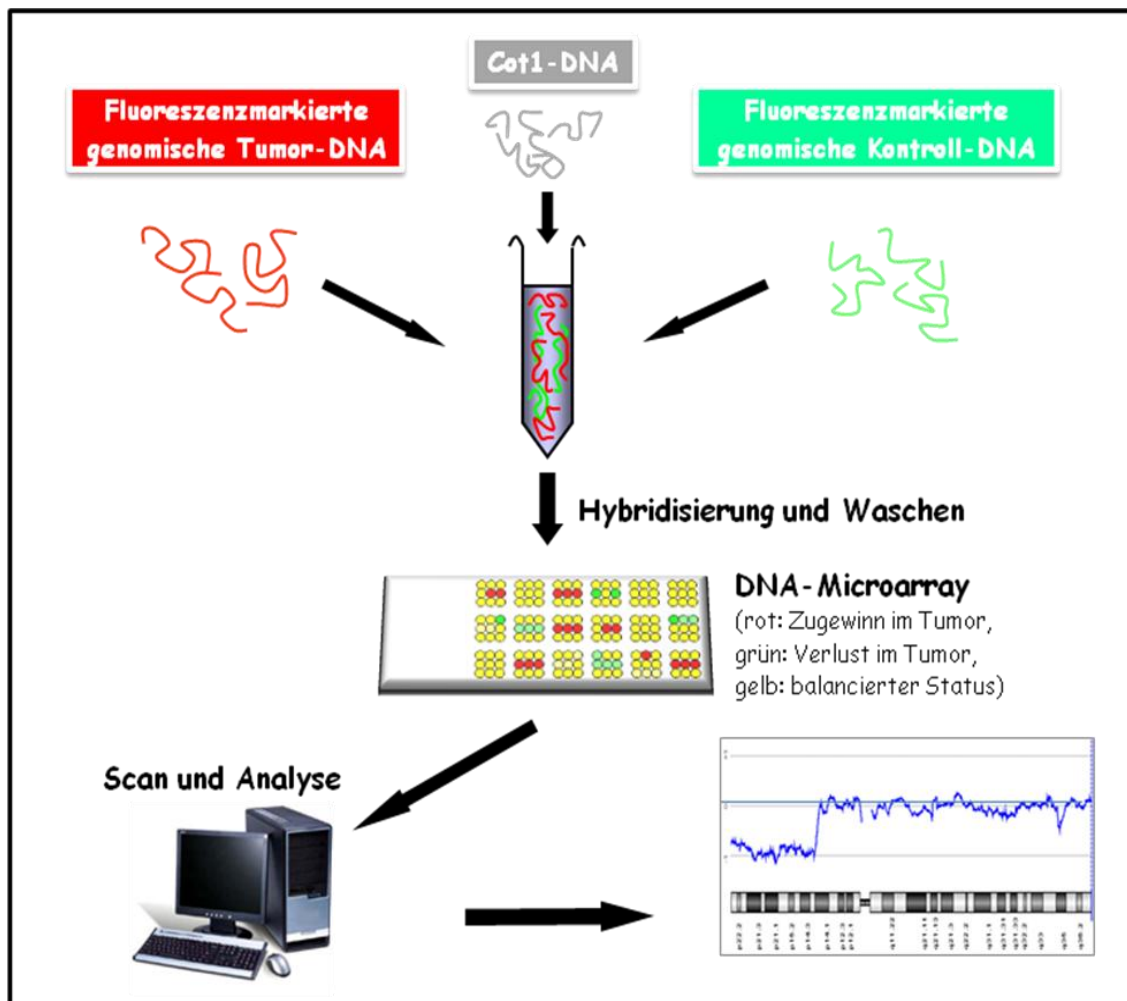


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Array-basierten Comparative-Genom-Hybridisierung

1.11.1.3. Oligonukleotid-Arrays

Die Oligonukleotid-Arrays bestehen aus synthetisch hergestellten Oligonukleotiden, die entweder ähnlich wie die BAC/PAC-Klone auf den Array gespottet oder aber direkt an der Oberfläche des Arrays synthetisiert werden. Oligonukleotide können für jede beliebige Sequenz des Genoms hergestellt werden. Aufgrund der variablen Größe ist die maximal erreichbare Auflösung von OligoArrays fast nicht limitiert. In den letzten Jahren wurden verschiedene kommerzielle Array-Plattformen entwickelt, die sich in der Oligonukleotidlänge, der Probenmarkierung und den Hybridisierungstechniken unterscheiden.

1.11.1.3.1. Affymetrix GeneChip® Mapping-Arrays

Eine dieser kommerziellen Microarray-Technologien ist das GeneChip®-Mapping von Affymetrix. Die GeneChip®-Microarrays bestehen aus 25mer Oligonukleotiden, die spezifisch für die Untersuchung von bestimmten Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) entwickelt wurden. Die Oligonukleotide werden in einem photolithographischen Verfahren direkt auf der Oberfläche der Arrays synthetisiert. Mit den in dieser Arbeit verwendeten 50K GeneChip® Human Mapping-Arrays können in einem einzigen Experiment mehr als 50.000 unterschiedliche SNPs analysiert werden. Für den 100K-Assay werden entsprechend zwei verschiedene 50K-Microarrays separat voneinander prozessiert und die generierten Daten der beiden Arrays anschließend digital vereint, um eine größere Auflösung zu erhalten. Die Probenvorbereitung und -markierung dieses Microarray-Verfahrens unterscheidet sich von der bereits beschriebenen ArrayCGH. Die zu untersuchende Probe wird zunächst mit Hilfe eines Restriktionsenzymys verdaut und die Fragmente mit entsprechenden Adapter-Nukleotiden ligiert. In der darauf folgenden Polymerase-Ketten-Reaktion werden die Reaktionsbedingungen so gewählt, dass selektiv nur Fragmente größer 2.000 bp amplifiziert werden. Auf diese Weise kann die Komplexität des Genoms vor der Markierung von etwa 3 Gb auf ca. 60 Mb reduziert werden, wodurch die Effizienz der späteren Hybridisierung erhöht wird. Nach einer weiteren Fragmentierung erfolgt dann eine indirekte Fluoreszenzmarkierung. Im Gegensatz zu der bereits beschriebenen ArrayCGH muss bei der Hybridisierung dieser Arrays nur die Proben-DNA analysiert werden. Es wird keine Referenz-DNA benötigt, da die Daten bereits analysierter Normalkontrollen von der Firma Affymetrix zur Verfügung gestellt und in die Analysesoftware implementiert wurden (Abbildung 15) (81, 82).

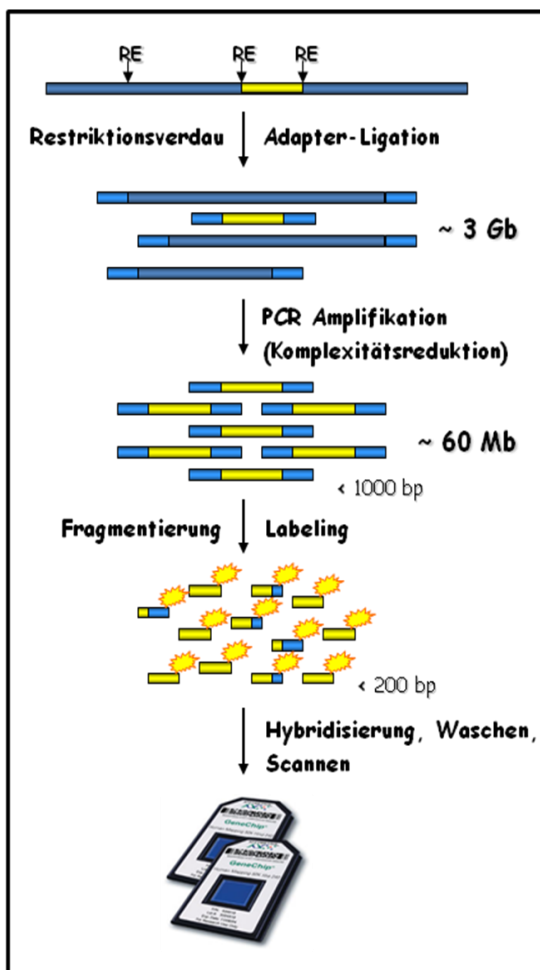


Abbildung 15: Durchführung des 100K-GeneChip®-Human-Mappings (RE: Restriktionsenzym)

1.11.2. Microarray-Analysen zur Detektion von Nonsense-Mutationen

Ein kürzlich vorgestelltes Microarray-basiertes Screening-Verfahren mit dem Namen Gene Identification by Nonsense-mediated mRNA Decay Inhibition (GINI) soll über die Detektion von Nonsense-Mutationen die Identifikation potentieller Tumorsuppressorgene ermöglichen (83-85).

1.11.2.1. Nonsense-mediated mRNA Decay

Stoppmutationen und auch die meisten Frameshift-Mutationen führen zu mRNA-Transkripten, die ein vorzeitiges Stoppcodon tragen. Diese sogenannten Nonsense-Transkripte würden für carboxy-terminal verkürzte Proteine kodieren, die der Zelle schaden könnten. Zudem würde die Synthese funktionsuntüchtiger Proteine der Zelle nutzlos Energie kosten. Der Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) ist ein biologischer Kontrollmechanismus der Zelle, um fehlerhafte mRNA-Transkripte zu erkennen und abzubauen. Eine große Rolle spielt der NMD auch bei der Qualitätskontrolle des alternativen Splicings. Hierbei entstehen große Mengen an Nonsense-Transkripten, die durch den NMD rasch abgebaut werden. Die Mechanismen des NMD-Pathway sind bis heute unklar. Es gibt Hinweise, dass es sich um einen spleiß- und translationsabhängigen Prozess handelt (86, 87).

1.11.2.2. Gene Identification by Nonsense-mediated mRNA Decay Inhibition (GINI)

GINI ist eine Microarray-basierte Analysemethode, die sich den NMD-Pathway der Zelle zu Nutze macht, um in einer zu untersuchenden Probe Gene zu identifizieren, die ein vorzeitiges Stoppcodon tragen. Bei Tumoren könnten mit diesem Verfahren potentielle Tumorsuppressorgene detektiert werden. Für die GINI-Analyse wird der NMD-Pathway in den kultivierten Tumorzellen (z.B. durch Zugabe von Emetin) pharmakologisch inhibiert, was zu einer Stabilisierung der Nonsense-Transkripte führt. Aus einer so behandelten und einer unbehandelten Tumorzell-Kultur wird jeweils die Gesamt-RNA isoliert. Über Reverse Transkription und darauf folgende *in vitro* Transkription mit Digoxigenin (DIG)-gekoppelten Nukleotiden wird die RNA amplifiziert und markiert. Anschließend werden die Proben separat auf Microarrays hybridisiert. In der bioinformatischen Analyse können dann anhand der Verhältnisse der Signalintensitäten überrepräsentierte Transkripte in der behandelten Probe identifiziert werden. Um stabilisierte Nonsense-Transkripte von Transkripten, deren Expression durch die pharmakologische Behandlung hochreguliert wurde, zu unterscheiden,

werden Kontroll-Zellkulturen parallel prozessiert und für die statistische Analyse als Referenz verwendet (83-85) (Abbildung 16).

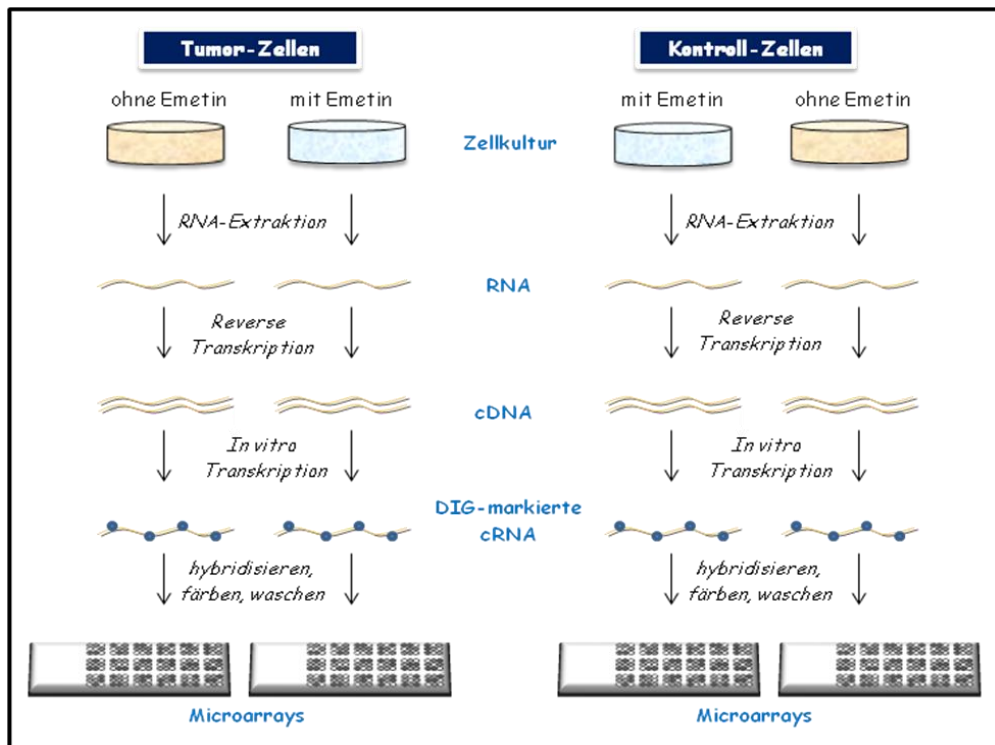


Abbildung 16: Schematische Darstellung der GINI-Analyse

1.11.3. Initiale Microarray-Studien zur Identifikation sekundärer chromosomaler Aberrationen bei Mantelzell-Lymphomen

Die Entwicklung der Microarray-Technologien hat die Charakterisierung sekundärer Aberrationen bei Mantelzell-Lymphomen stark vorangetrieben. Studien verschiedener Arbeitsgruppen konnten mit dieser Technik bereits eine Reihe chromosomaler Regionen identifizieren, die bei Mantelzell-Lymphomen rekurrent von Deletionen oder Zugewinnen betroffen sind (88-90). Die in diesen Studien verwendeten Microarrays bestanden aus 812, 2.348 bzw. 32.433 BAC- und PAC-Klonen. Durch die zunehmende Anzahl von Klonen bei den verwendeten Microarray-Plattformen konnte die Sensitivität erhöht und die Eingrenzung der minimal zugewonnenen oder deletierten Regionen verbessert werden. Die Bestimmung der minimal aberranten Regionen ermöglichte die Identifikation von potentiellen Tumorsuppressorgenen sowie Onkogenen, die in die Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms involviert sein könnten. Eine Übersicht der in den Mantelzell-Lymphom-Studien rekurrent betroffenen Chromosomenabschnitte sowie minimal aberrante Regionen und potentielle Tumorsuppressorgene und Onkogene sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Einleitung

Deletionen							Zugewinne						
Region	Subregion	Größe [Mb]	% *	Kandidatengene	Ref.	Region	Subregion	Größe [Mb]	% *	Kandidatengene	Ref.		
1p36	1p36.23-p36.32	4,5	31 (29/7)	k.A.	(89)	1pter-p36	1pter-p36.32	3,1	38 (0/8)	k.A.	(90)		
	1p36.11	1,2	38 (0/8)	SRC2	(90)	1q32	1q32.2-q32.3	4,7	38 (0/8)	k.A.	(90)		
1p21-p31	1p21	k.A.	38 (53/0)	k.A.	(88)	2p16-p15	2p16.1-p15	1,1	38 (0/8)	REL	(90)		
	1p21.1-p31.1	35,3	38 (0/8)	BCL10, CNN3, GBP1, TGFB3	(90)	2q37	2q37.1	1,7	38 (0/8)	k.A.	(90)		
	1p21.3-p22.1	5,8	52 (29/7)	GCLM	(89)		2q37.2	0,9	38 (0/8)	k.A.	(90)		
1q42-q43	1q42.2-q43	7,3	17 (29/7)	Q8WUH8	(89)		2q37.3	2,4	38 (0/8)	k.A.	(90)		
2p11	2p11.2	0,1	88 (0/8)	IGK	(90)	3q26-q29	3q26-q29	k.A.	55 (53/0)	k.A.	(88)		
	2p11.2	0,5	83 (29/7)		(89)		3q26.1	7,5	48 (29/7)	SERPIN12	(89)		
2q13	2q13	3,2	17 (29/7)	BIM	(89)	6p25-p22	6p25.3-p22.3	24,2	24 (29/7)	IRF4	(89)		
5q22	5q22.1-q22.3	9,7	21 (29/7)	k.A.	(89)	7p21-p11	7pter-p22.1	5,9	50 (0/8)	MAD1L1	(90)		
6q23-q24	6q23.2-q24.1	13,2	38 (29/7)	TNFAIP3	(89)		7p21.3-p21.1	11,1	34 (29/7)	HS7c218	(89)		
6q25-q26	6q25-q26	k.A.	25 (53/0)	k.A.	(88)		7p21.2-p11.2	40,4	38 (0/8)	NMB	(90)		
8p21	8p21	2,4	34 (53/0)	TNFRSF10B	(88)	7q11	7q11.23	4,3	38 (0/8)	k.A.	(90)		
	8p21.2-p21.3	0,7	38 (0/8)	k.A.	(90)	8q21-q24	8q22.1-q22.3	4,8	38 (0/8)	k.A.	(90)		
8p23	8p23.1-p23.3	k.A.	34 (29/7)	k.A.	(89)		8q24	k.A.	28 (53/0)	k.A.	(88)		
	8p23.3	0,4	38 (0/8)	k.A.	(90)		8q21.3-q24.21	39,8	24 (29/7)	MYC	(89)		
9p21-p22	9p21.3	1,2	75 (0/8)	P16/INK4A, P15/INK4B	(90)		8q24.13-q24.21	5,6	50 (0/8)		(90)		
	9p21-p22	12,2	36 (53/0)		(88)	9q34	9q34.2-q34.3	4,3	38 (0/8)	k.A.	(90)		
	9p21.3-p22.1	2,4	41 (29/7)		(89)	10p13	10p13	2,7	11 (53/0)	BMI1	(88)		
9p23-p24	9p23	0,6	50 (0/8)	k.A.	(90)	10p12	10p12.2-p12.1	2,9	21 (29/7)	BMI1	(89)		
	9p23-p24.1	3,3	50 (0/8)	k.A.	(90)	11pter-p16	11pter-p16.5	2,5	50 (0/8)	I-8D, H-RAS, IFI17	(90)		
9q13-q31	9p24.2-p24.3	5,2	41 (29/7)	k.A.	(89)	11q13	11q13	1,4	11 (53/0)	RELA, MAP4K2	(88)		
	9q13-q22	k.A.	25 (53/0)	k.A.	(88)		11q13	5,2	11 (53/0)	CCND1, FGF3, FGF4	(88)		
9q34	9q22.33-q31.1	3	45 (29/7)	C9orf3	(89)	11q23	11q23	7,1	8 (53/0)	MLL	(88)		
	9q34	k.A.	25 (53/0)	k.A.	(88)	12p12-p11	12p12.3-p11.21	12,3	38 (0/8)	k.A.	(90)		
10p14-p15	10p14-p15	12,4	21 (53/0)	k.A.	(88)	12q13-q15	12q13.13-q13.2	3	50 (0/8)	RARG	(90)		
	10p14-p15.3	16,5	31 (29/7)	C10orf47	(89)		12q13.2-q14.1	3,4	38 (0/8)	CD63, CDK4	(90)		
11q22-q23	11q22-q23	1,7	43 (53/0)	ATM	(88)		12q13-q15	k.A.	17 (53/0)	k.A.	(88)		
	11q22.3-q23.1	11,3	55 (29/7)		(89)		12q14.2	0,4	38 (0/8)	k.A.	(90)		
13q14-q21	13q14	0,4	55 (53/0)	RFP2, BCMSUN	(88)	12q15-qter	12q15-12q21.2	7,3	38 (0/8)	k.A.	(90)		
	13q14.2-q14.3	0,8	50 (0/8)	DLEU1, DLEU2, RFP2, C13orf1	(90)		12q24.21-qter	19,1	38 (0/8)	k.A.	(90)		
	13q14.3-q21.1	4,8	55 (29/7)	RFP2	(89)	13q31	13q31.3	1,2	38 (0/8)	k.A.	(90)		
13q33-q34	13q33-q34	6,9	49 (53/0)	k.A.	(88)	17q23-q24	17q23.2-q24	10,3	17 (29/7)	n.A.	(89)		
	13q34	13,5	52 (29/7)	bA65D24.2	(89)	18q21-q22	18q21	9,3	15 (53/0)	BCL2	(88)		
15q13	15q13.1	18,6	21 (29/7)	k.A.	(89)		18q21.33-q22.1	7,3	38 (0/8)	BCL2	(90)		
17p11-pter	17p11-p13	k.A.	21 (53/0)	TP53	(88)	18q11-q21	18q11.2-q21.2	17,1	38 (0/8)	k.A.	(90)		
	17p11.2-pter	15,6	38 (0/8)		(90)		19p13	19p13.2	1,5	28 (29/7)	CD202	(89)	
	17p13.1	12,2	31 (29/7)		(89)			22q11	22q11.22	0,4	63 (0/8)	Igl	(90)
	17p13.3	5,8	45 (29/7)		NXN		(89)		22q12	22q12.2	11,6	21 (29/7)	UCRX
17p13.3-pter	1,1	50 (0/8)	k.A.	(90)									

Tabelle 1: Minimal rekurrent deletierte und zugewonnene Chromosomen-Regionen bei Mantelzell-Lymphomen, die mit Hilfe der ArrayCGH ermittelt wurden.

* In Klammern ist die Anzahl der untersuchten primären Mantelzell-Lymphome/Mantelzell-Lymphom-Zelllinien dargestellt.
k.A.: keine Angaben

1.11.4. Fragestellung

Der Karyotyp von Mantelzell-Lymphomen ist meist komplex aberrant. Die charakteristische Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ findet sich in fast allen Mantelzell-Lymphomen, ist aber für eine maligne Transformation nicht ausreichend. Vielmehr tragen offensichtlich sekundäre genetische Veränderungen in einem mehrstufigen Prozess zur Pathogenese dieses Lymphoms bei. Bereits durch klassische zytogenetische Untersuchungen konnten eine Reihe sekundärer Aberrationen identifiziert und charakterisiert werden. Die Einführung erster Mikroarray-Verfahren hat gezeigt, dass es eine Vielzahl weiterer rekurrent aberranter Chromosomenregionen gibt, die bei der Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms eine Rolle spielen könnten. Deren genaue Bedeutung sowie potentiell involvierte Tumorsuppressor- und Onkogene sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Auch gibt es bislang keine Erkenntnisse, wodurch die Prädominanz des männlichen Geschlechts bei Mantelzell-Lymphomen verursacht sein könnte.

Die Verbesserung der Detektion und Kartierung sekundärer Aberrationen durch den Einsatz neuer Mikroarray-Techniken sowie die anschließende Identifikation und Charakterisierung potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene kann helfen, die Entwicklung und Progression dieser bösartigen Krankheit besser zu verstehen und auf dieser Grundlage neue Therapien zu entwickeln. In dieser Arbeit sollten drei verschiedene Microarray-Technologien angewendet werden mit dem Ziel, neue Kandidatengene zu identifizieren, die möglicherweise in die Tumorgenese des Mantelzell-Lymphoms involviert sind. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Suche nach neuen Tumorsuppressorgenen sowie geschlechtsassoziierten Genen, die zur Prädominanz des männlichen Geschlechts beitragen könnten. Dazu sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Lassen sich mit Hilfe der GINI-Technologie in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Gene identifizieren, die ein vorzeitiges Stoppcodon tragen und so nicht für ein funktionstüchtiges Protein kodieren? Handelt es sich bei diesen Genen um potentielle Tumorsuppressorgene und sind genetische Veränderungen dieser Gene auch in primären Mantelzell-Lymphomen nachweisbar?
2. Lässt sich durch die Auswertung verfügbarer ArrayCGH-Daten des X-Chromosoms von 68 primären Mantelzell-Lymphomen und 9 Mantelzell-Lymphom-Zelllinien ein Kandidatengen identifizieren, das mit der männlichen Prädominanz des Mantelzell-Lymphoms assoziiert sein könnte?

3. Ermöglicht das hochauflösende 100K GeneChip®-Mapping eine bessere Kartierung bekannter Imbalancen im Vergleich zu BAC/PAC-Arrays und lassen sich neue, bislang unbekannte, rekurrent deletierte oder zugewonnene Regionen identifizieren?
4. Lassen sich durch die kombinierte Copy-Number und LOH-Analyse mittels Genotypisierung beim GeneChip®-Mapping in Mantelzell-Lymphomen Regionen identifizieren, in denen pUPD vorliegt? Wenn ja, gibt es rekurrent betroffene Regionen und wie sind diese im Genom verteilt? Lässt sich zeigen, ob durch diesen Mechanismus Tumorsuppressorgene inaktiviert werden?
5. Lassen sich durch die höhere Sensitivität der GeneChip®-Mapping-Arrays im Vergleich zu den BAC/PAC-Arrays besonders kleine homozygote Deletionen besser detektieren? Enthalten die homozygot deletierten Regionen Kandidatengene, die typische Tumorsuppressor-Eigenschaften zeigen wie beispielsweise Einfluss auf die Zellzyklusregulation, Apoptose oder DNA-Reparatur?
6. Liefern die 100K GeneChip®-Mapping-Analysen Hinweise auf einen geschlechtsassoziierten genetischen Defekt, der zur Prädominanz des männlichen Geschlechts bei Mantelzell-Lymphomen beitragen könnte?
7. Lassen sich durch weiterführende zytogenetische, molekulargenetische und epigenetische Untersuchungen der identifizierten Kandidatengene neue molekulare Mechanismen identifizieren, die möglicherweise eine Bedeutung in der Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms haben?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Tumormaterial

2.1.1.1. Mantelzell-Lymphome

In dieser Arbeit wurde ausschließlich tumorzellhaltiges Gewebe verwendet, bei dem die pathologische Begutachtung die Diagnose eines Mantelzell-Lymphoms ergab. In allen Fällen war das Untersuchungsmaterial zur tumorgenetischen Routine-Diagnostik beim Institut für Humangenetik, bei der 2. Medizin oder beim Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie, des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, eingegangen. Die Arbeiten wurden im Rahmen des „Europäischen MCL-Netzwerks“ durchgeführt, für das zentrale und lokale Ethikvoten vorliegen (AZ: B300/04, B226/04, D403/05). Insgesamt wurden in die verschiedenen Untersuchungen dieser Arbeit 72 Mantelzell-Lymphome eingeschlossen, wobei 51 von männlichen und 21 von weiblichen Patienten stammten. Der Altersdurchschnitt bei Diagnosestellung lag bei 63 Jahren. Die Tumorzellen stammten aus Lymphknoten (LK), Milzgewebe (M), peripherem Blut (pB) oder Knochenmark (KM). Alle untersuchten Mantelzell-Lymphome trugen die charakteristische Translokation $t(11;14)(q13;q32)$. Für die FISH-Analysen lagen die zu untersuchenden Zellen bereits in Carnoys-Fixativ vor. Für die Extraktion von DNA oder RNA lagen die Tumorzellen in DMSO-Stocks oder als Gewebeschnitte bei -80 °C gelagert vor. In Tabelle 2 sind die Charakteristika der untersuchten Mantelzell-Lymphome sowie deren Verwendung für die verschiedenen Analyseverfahren zusammengefasst.

Tabelle 2: Charakteristika und Verwendung der untersuchten Mantelzell-Lymphome

Fall-Nummer	Geschlecht	Alter bei Diagnose [Jahre]	Material	Karyotyp des aberranten Klonns nach R-Bänderung (ISCN 1995)	Anwendung							
					GeneChip® Arrays	DHPLC			epigenetische Analyse	FISH (Untersuchung KAL und STS)	FISH (Untersuchung von Kandidatengenen)	FISH (Untersuchung des Y-Verlusts und der PAR1-Region)
						MAP2	MOBK12B/IFNK	TP53				
1	w	67	LK	unbekannt	x	x		x	x			
2	m	84	pB	45,XY,dic(1;1)(p10;q41),der(8)Pt(8;8)(p21;q23),-9,ins(9;?) (p13;?),add(10)(q24~25),t(11;14)(q13;q32),del(13)(q12q21), del(19)(p13)	x	x		x	x		x	
3	w	64	LK	unbekannt	x	x		x	x			
4	m	75	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)	x	x		x	x		x	
5	m	75	LK	84~88<4n>,XXYY,del(1)(p21p31)x2,-7,-7,-9,t(11;14) (q13;q32),-15,-19,-21[cp10]	x	x		x	x			
6	m	74	pB	46,XY,del(6)(q?),der(9)del(9)(p?)del(9)(q?),del(10)(q?), t(11;14)(q13;q32),add(19)(p13)	x	x		x	x		x	x
7	m	82	pB	46,XY,t(11;14)(q13;q32)	x	x		x	x		x	
8	m	71	LK	46,XY,del(1)(p21p31)t(11;14)(q13;q32),add(12)(q24.1)	x	x		x	x		x	
9	m	64	LK	unbekannt	x			x	x			x
10	m	43	LK	unbekannt	x			x	x			
11	w	47	KM	unbekannt	x			x	x		x	
12	m	73	KM	47,XY,+3,t(11;14)(q13;q32)	x	x		x	x	x		
13	m	83	M	46,XY,t(11;14)(q13;q32)	x	x		x	x		x	
14	w	70	LK	43~45,XX,add(9)(p11),t(11;14)(q13;q32),+der(11)t(11;14) (q13;q32),add(15)(p13),+1~2mar[cp2]	x	x		x	x			
15	m	79	LK	47~48,XY,+3,t(8;17)(p12;q12),add(9)(p22~23),t(11;14) (q13;q32),del(11)(q22~23),add(13)(q34),+15[cp7]	x	x		x	x	x		
16	m	57	LK	46,XY,der(2)del(2)(p?14?p16)t(2;3)(q36;q13),del(6)(q23),t(8;9) (q22;q21),add(10)(p14),t(11;14)(q13;q32),+der(11)t(11;14) (q13;q32),del(11)(q14q23),del(12)(p12),-14,add(15)(p13), -18,add(21)(p13)	x	x		x	x		x	
17	m	66	LK	41,X,-Y,del(1)(q31),-2,-6,add(6)(q23~24),add(8)(q21),dic(9;13) (q34;p10),t(11;14)(q13;q32),add(12)(q14),-13,add(15)(p13), -17,+mar	x	x		x	x			x
18	m	69	pB	45,X,-Y,add(6)(q22),del(9)(p11),t(11;14)(q13;q32)	x	x		x	x		x	x
19	m	75	pB	46,XY,+3,t(11;14)(q13;q32),-17,der(22)t(22;?) (p13;?)q11[6]/ 46,idem,t(1;13)(p21;q31)[10]	x	x		x	x		x	x
20	w	83	pB	unbekannt	x	x		x	x		x	
21	m	52	pB	unbekannt	x	x		x				
22	m	47	LK	46,XY,t(11;14)(q13;q32),add(13)(q32~34)	x	x		x				
23	m	52	LK	45,X,-Y,del(1)(p32~34),der(1)t(1;3)(q32;p14),add(2)(p22~23), add(3)(q13),t(6;15)(q13;q21),t(11;14)(q13;q32),del(15)(q24), add(22)(q13)	x			x		x	x	
24	m	57	KM	unbekannt	x			x				
25	m	38	LK	46,XY,add(2)(p14)[2]/45,X-Y,t(11;14)(q13;q32)[1]	x	x		x			x	x
26	w	69	LK	unbekannt	x			x				
27	m	60	pB	unbekannt							x	
28	w	79	pB	unbekannt							x	
29	m	61	pB	46,XY,t(11;14)(q13;q32)[1]/46,X,add(?) (q12),add(3)(p25), t(11;14)(q13;q32),der(13)t(3;13)(q13;q33),add(15)(q2?5), add(16) (q24),der(17)t(12;17)(q12;p11)[11]		x				x	x	
30	m	54	pB	44~46,der(X)t(X;?)1(q2?6;p34),Y,der(1)del(1)(p21p22)inv(1) (p31q21),add(1)(p11),der(7)del(7)(p21)add(7)(q31),+9,add(9) (p10)x2, t(11;14)(q13;q32),-13,+mar[cp5]						x	x	x
31	m	70	pB	45,XY,t(11;14)(q13;q32),del(13)(q13q21),-15, der(17)t(15;17)(q22;q23~24),-18,+mar						x	x	
32	w	72	pB	90~96<4n>,XXXX,del(1)(p21p31)x2,add(8)(p22)x2,t(11;14) (q13;q32)x2,add(13)(q33~34)x2,add(14)(p13)x2,add(17) (p12)x2,+19,+19[cp19]						x	x	
33	w	59	pB	46,XX,del(1)(p21p31),t(11;14)(q13;q32),add(17)(q23)x2							x	

Material

Fall-Nummer	Geschlecht	Alter bei Diagnose [Jahre]	Material	Karyotyp des aberranten Klonns nach R-Bänderung (ISCN 1995)	Anwendung								
					GeneChip® Arrays	DHPLC			epigenetische Analyse	FISH (Untersuchung KAL und 5T5)	FISH (Untersuchung von Kandidatengen)	FISH (Untersuchung des Y-Verlusts und der PAR1-Region)	
						MAP2	MOBKLB/IFNK	TP53					
34	w	59	LK	80~88<4n>,XXXX,+X,del(1)(q24),add(1)(q32),-4,-6,del(6)(q21q23),-9,-9,t(11;14)(q13;q32),add(12)(q24),-13,-3,add(14)t(11;14)(q13;q32),-15,-15,+16,-19,-22,+3mar[cp8]		x					x		
35	w	59	pB	47,XX,+X,+X,+X[1]/43,X,-X,der(1)t(1;18)(q31;q12),ins(2;?)(p16;?),add(8)(q24),-9,-10,t(11;14)(q13;q32),del(12)(p12),der(?)t(?;15)(?;q11),-17,+r,+mar[3]/43,idem,add(3)(q27),add(14)(q32)[4]/46,XX[15]						x	x		
36	m	51	LK	46,XY,t(11;14)(q13;q32)[2]/46,idem,del(1)(p21p31)[1]/46,XY,t(1;2)(q23;p13)[1]								x	
37	w	59	LK	42~43,XX,-1,t(3;10)(q13;p12~13),add(6)(q26),add(6)(q13),-8,t(11;14)(q13;q32),der(12)t(1;12)(q21;p12)del(1)(q4?2),der(13;14)(q10;q10)c,-15,der(17)t(?;17)(p34;p12),-20,-21,+1~2mar[cp25]/45,XX,der(13;14)(q10;q10)c[3]								x	
38	w	81	LK	92<4n>,XXXXdel(1)(p13p32-33)x2,der(11)t(11;14)(q13;q32)x2,der(12)(12pter->12q?15::12q24->12q?15::14q13->14q22::11q14->11q13::14q32->14q22::11q14->11qter),der(14)(14pter->14q22::11q14->11q13::14q32->14q22::11q14->11qter)x2								x	
39	m	67	pB	45,X,-Y,?t(4;7)(p16;q33),add(6)(q25),+8,i(8)(q10)x2,+9,del(9)(q21)x2,-10,t(11;14)(q13;q32),add(13)(q14),add(17)(p12),-18							x	x	
40	m	67	pB	46,XY,der(1)del(1)(p13p31)dup(1)(q31q21),add(2)(p12),+3,der(4)del(4)(p13p15)del(4)(q22q26),der(5;17)(q10;q10),t(6;15)(q21;q24),der(8)del(8)(p22)del(8)(q21q22~23),-9,t(11;14)(q13;q32),+mar		x						x	
41	m	40	LK	44,X,-Y,dup(3)(q13q26),t(11;14)(q13;q32),der(11)t(11;15)(q14;q15),der(10)t(10;14)(p15;q32),add(13)(p13),del(14)(q21),-15[1]/45,X,-Y,dup(3)(q13q26),der(11)t(11;15)(q14;q15)x2,der(10)t(10;14)(p15;q32),add(13)(p13),del(14)(q21),der(14)t(11;14)(q13;q32),-15,+mar[7]		x							x
42	w	74	LK	47,XX,+3,inv(5)(p14q21),del(9)(q13q21),t(11;14)(q13;q32),del(16)(p11)		x							
43	m	58	LK	45,i(X)(q10),Y,del(8)(p21),del(9)(p13),add(10)(p15),t(11;14)(q13;q32),dup(11)(q13q25),-17[12]/46,i(X)(q10),Y,del(8)(p21),del(9)(p13),add(10)(p15),der(14)t(11;14)(q13;q32)add(14)(p13),add(14)(q32)[4]/92<4n>,idem[10]		x							
44	m	67	pB	44,X-Y,der(8)t(8;15)(q24;q15),-9,del(10)(q2?3),t(11;14)(q13;q32),-13,-15,der(17)add(17)(p11)add(17)(q22),+?(8)(q10),+mar		x							x
45	m	69	LK	46,XX,t(11;14)(q13;q32)		x							
46	w	51	LK	90~92<4n>,XXX,t(X;1)(q2?1;p13),del(1)(q11q31),del(3)(p22p24),-5,-5,add(6)(q26)x2,-8,del(9)(q21q22),t(11;14)(q13;q32),der(12)t(1;12)(q21;q24),add(16)(p12),-22,+2mar[cp18]		x				x			
47	m	45	LK	46,XY,del(9)(q12q33),t(11;14)(q13;q32)[2]/45,idem,-4,add(9)(p21~22)[1]/45,idem,-del(9)(q12q33),-13[1]/46,XY,t(3;17)(p22;p12)[1]		x							
48	m	66	pB	45,XY,t(2;8)(p12;q24),-10,dic(10;15)(p10;p13),der(11)t(11;14)(q13;q32),der(14)t(11;14)(q13;q32),del(11)(q14q22),-15[20]/45,idem,del(6)(q?15~16q?24)[7]		x				x			
49	m	47	LK	45,XY,?del(1)(q42),add(1)(q21),dup(4)(q?2q?3),-9,t(11;14)(q13;q32),-13,+mar[15]/46,idem,+7,[3]/90<4n>,XXYY, idem,t(1;9)(p10;q10),add(2)(q31)x2,-5,+18,+18[9]		x							
50	w	56	LK	46,XX,del(1)(p35),del(1)(q21),del(6)(q21),del(9)(q32),t(11;14)(q13;q32)		x				x			
51	m	56	LK	45,XY,der(4)t(4;11)(q22-24;q24),-6,t(11;14)(q13;q32),t(4;11)(q22~24;q24),add(14)(q21),der(15)t(3;15)(q13;q23),der(?)t(?;1)(?;p2?1)t(?;10)(?;q21)/45,idem,del(11)(q?) [1]		x							

Material

Fall-Nummer	Geschlecht	Alter bei Diagnose [Jahre]	Material	Karyotyp des aberranten Klonns nach R-Bänderung (ISCN 1995)	Anwendung								
					GeneChip® Arrays	DHPLC			epigenetische Analyse	FISH (Untersuchung KAL und 5T5)	FISH (Untersuchung von Kandidatengen)	FISH (Untersuchung des Y-Verlusts und der PAR1-Region)	
						MAP2	MOBKLB/IFNK	TP53					
52	m	49	pB	45,X,-Y,?add(5)(p11),add(8)(q24),add(10)(q26),t(11;14)(q13;q32), del(16)(q11q22),add(19)(q13)x2,add(21)(p13)[cp9]		x							x
53	m	76	pB	43,add(X)(p?),Y,der(1)add(p36)del(p1?3p3?1),del(6)(q1?3),del(11)(q?),-12,-13,der(14)t(11;14)(q13;q32),-17,-21,+mar[cp4]		x							
54	m	47	LK	46,XY,del(1)(p?13p?31),add(3)(p22),dup(3)(q13q24),t(6;12)(q14;q15),t(11;14)(q13;q32),add(19)(q13)		x							
55	w	70	KM	47,XX,+3,t(11;14)(q13;q32)		x							
56	w	62	LK	44,XX,inv(1)(p13p36),der(6)add(6)(p21)add(6)(q26),add(9)(p23),del(11)(q21q22),t(11;14)(q13;q32),del(14)(q21q31)		x							
57	m	66	KM	78~90<4n>, der(X)t(X;8)(p21;q21),add(2)(q37),del(6)(q16)x2,t(11;14)(q13;q32)x2,del(11)(q22)x2,add(17)(p12)x2		x							
58	m	71	pB	45,X,-Y,t(1;2)(q21~22;q32),t(5;10)(q14;p13~14),del(9)(q12q32~33), der(11)t(11;14)(q13;q32),del(13)(q14q21),der(14)t(11;14)(q13;q32)del(11)(q14q24)									x
59	m	66	pB	44~45,der(X)t(X;3)(p21~22;q23),-Y,+X,-2,add(3)(p13),del(6)(q16),add(6)(q21),-8,der(8)t(8;17)(p12;q12),del(9)(p13),t(11;14)(q13;q32),add(12)(p12~13),del(13)(q13~14),add(14)(p13),-17,add(22)(p13),+mar[cp 12]									x
60	m	73	LN	42,X,-Y,ins(1;?)p(22;?),del(5)(p14),-7,-9,?del(11)(q23~q24),t(11;14)(q13;q32),-13,-15,+mar									x
61	m	73	pB	46,X,-Y,+3,t(11;14)(q13;q32)									x
62	m	75	KM	43,X,-Y,der(1)t(1;15)(p12~13;q21~22),-9,t(11;14)(q13;q32),-13,der(15)t(1;15)(p31;q21~22)									x
63	m	65	pB	46,X,-Y,der(3)add(3)(p1?3)add(q2?6),der(4)t(3;4)(q1?3;q34),+8,add(8)(p1?1),der(8)?t(3;8)(q26;p1?2),der(10)t(10;15)(p12;q1?2),t(11;14;22)(q13;q32;q13),der(17)?t(3;17)(q26;p10), add(21)(q?21)									x
64	m	65	LK	45~46,X,-Y,-1,der(2)t(2;5)(q36;q21),-3,der(5)t(3;5)(p13;q21),-10,t(11;14)(q13;q32),-15,+3mar[cp12]									x
65	m	67	LK	48,X,-Y,+3,+r(3)(p2?6q2?9),del(5)(q1?4q2?1),der(11)t(11;14)(q13;q32),+12,-13,der(14)ins(14;11)(q31;q22q13)t(11;14)(q13;q32),+mar[20]/48,idem,+7,der(9)t(9;9)(p21;q32)ins(9;?)q(21;?),del(19)(p13)[8]/48,idem,der(9)t(9;22)(p21;q11)[11]									x
66	m	62	pB	45,X,-Y,t(11;14)(q13;q32)									x
67	m	68	pB	43~44,X,-Y,der(1)t(1;7)(p13;q33),+3,del(6)(q12~13),der(7)t(1;7)(p32;q33),add(9)(p21),t(11;14)(q13;q32),add(15)(p13),der(15)t(3;?)15(q13;?;q24),-18,-22[cp 10]									x
68	m	65	pB	46,XY,der(3)t(3;10)(p21;q25),t(8;15)(p12;q12),add(9)(p21),der(10)t(3;10)(p21;q23),t(11;14)(q13;q32)							x		
69	w	56	pB	44~45,XX,del(1)(p21p31),der(1)t(1;3)(q31;p14),add(3)(p12),add(3)(q13),del(6)(q16q22),-11,add(12)(p13),del(13)(q12q22),der(14),t(11;14)(q13;q32),-21							x		
70	m	30	LK	46,XY,?t(5;19)(p14;p13),t(11;14)(q13;q32),t(11;17)(q23;q11~12)							x		
71	w	41	LK	47,XX,der(2;13)(q10;q10),+3,-5,+6,t(11;14)(q13;q32),+mar							x		
72	w	67	M	47,XX,der(1)add(1)(p13)del(1)(q11q31),t(1;?)p(21;?),der(2)add(2)(p24)t(2;?8)(q36~37;q23),del(5)(q11q23),add(7)(q22),der(8)t(2;8)(q36~37;q23),t(11;14)(q13;q32)							x		

m: männlich, w: weiblich, LK: Lymphknoten, pB: peripheres Blut, KM: Knochenmark, M: Milz, DHPLC: Denaturing High-Performance Liquid Chromatographie, FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, x: für die jeweilige Anwendung eingesetzt

2.1.1.2. Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Neben den primären Mantelzell-Lymphomen wurden außerdem insgesamt sieben t(11;14)-positive Mantelzell-Lymphom-Zelllinien in dieser Arbeit verwendet. Die Zelllinien GRANTA-519, HBL-2, UPN-1 und REC-1 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M. J. S. Dyer (Abteilung für Hämatologie, Universität Leicester, UK) und die Zelllinie MAVER-1 von Prof. Dr. A. Zamo (Abteilung für Pathologie, Universität Verona, Italien) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien JEKO-1 und NCEB-1 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Charakteristika dieser Zelllinien und deren Verwendung für die verschiedenen Untersuchungen dieser Arbeit sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Charakteristika und Verwendung der untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Mantelzell-Lymphom-Zelllinie	Geschlecht	Alter des Patienten bei Etablierung [Jahre]	Karyotyp des aberranten Klons nach ISCN 1995	Referenz	Anwendung			
					GINI	GeneChip® Arrays	DHPLC	FISH
HBL-2	m	84	46,X,-Y,der(?)t(3;?)p13;?,der(4)t(1;4)(q21;p15.2),t(11;6;9)(q11;p23q21;p22),+7,add(8)(p23),der(9)t(3;9)(q21;p22),del(9)(q23),add(11)(q23),der(11)t(?;11;14)(?;q13;q32),add(13)(q32),der(14)t(11;14)(q12.2;q32.3),t(11;14)(q32.3;q15),add(15)(p12),add(17)(p13),add(18)(q23),der(22)t(9;22)(q11;p12)	(70, 91)		x	x	x
GRANTA-519	w	58	43,XX,der(1)(14qter->14q11::1p34->1p21::1q10->1q12::12q12->12q23),der(9)(9q31->9q34::12q23->12q11::9p11->pqter,t(11;14)(q13;q32),-12,der(13)(13q32->14q24::13q14->13q10::13q10->13qter),-14,dic(17;18)(q10)(q10)trp(18)(q11q23),der(20)t(17;20)(q21;p11)	(70, 92-96)	x	x	x	x
REC-1	m	61	43,XY,del(2)(q14q35),der(7)dup(7)(p22)inv(7)(p12q21),t(3;8)(q24;p11),i(8)(p10),t(9;22)(p11;q11),t(9;?17)(q23;q?11),t(11;14)(q13;q32),der(12)t(8;12)(p13;q11),-15,-17,-22,add(22)(q13)	(70, 94, 95)		x	x	x
UPN-1	m	52	?46,add(X)(?),-Y,der(4)t(4;8)(q35;?),der(8)t(Y;8;22)(?,?,?),der(8)t(X;Y;8)(?,?,?),der(11)t(11;20)(q10;q10),i(13)(q10),der(14)t(11;14;19)(11pter->14q32::11q13->11q13::19q13?->19pter),der(16)t(16;18)(p10;q10),der(17)t(2;17)(q10;q10),der(19)t(11;14;19;18)(?,?,?),der(19)t(11;18;19)(?,?,?),der(21)t(2;8;21)(?,?,?),der(18)(?)	(97, 98)		x	x	x
MAVER-1	m	82	46,XY,der(1)t(1;3)(p36;q21or23),-3,der(4)t(4;8)(?q35;?q24),der(6)t(6;14;11)(6pter->6q13::14q11->14q32::11q13->11q25::11q23->11qter),der(7)del(7)(p15.1p15.2)del(7)(q32),-8,del(9)(?q10),der(9)t(22;9;22)(22qter->22q11::9q34->9?->9q34::22q11->22q12or13),der(10),t(8;10)(q13;p13),del(11)(q13),-12,der(12)t(12;12)(12?->12q?::12q21->12q13::12p13->12qter),-13,-14,ins(15)(q12q15q22),add(17)(p13),der(21)t(13;21)(q?;q22),-22,+mar(22;14;11),+2~11mar[5]	(99)		x	x	x

Mantelzell-Lymphom-Zelllinie	Geschlecht	Alter des Patienten bei Etablierung [Jahre]	Karyotyp des aberranten Klon nach ISCN 1995	Referenz	Anwendung			
					GINI	GeneChip® Arrays	DHPLC	FISH
JEKO-1	w	78	70-78<3n>XXXX,+X,+1,+2,+2,+4,+6,+7,-8,+10,+11,-12,-12,+13,+14,+15,-17,+18,-19,-19,-22,+2~4mar, del(X)(p21)/add(X)(p11.2)x2,der(X)t(X;11)(q26-28;q13)t(11;?10)(q24;?p12),der(1)t(1;2)(p21;q22)x2,add(2)(q2?),del(2)(q11),add(3)(q27),der(5)t(5;12)(p15;p11-12)x2,add(6)(p21)x2,der(6;13)(p10;q10)x1~2,der(7)t(4;7)(q2?6;q32.1)x2,add(9)(p2?),der(9)t(9;14)(q34-35;q32-33)x2,der(10)t(10;11)(p12;?)x2,der(11)t(11;14)(q13;q32)x1-2,add(13)(p11),der(13)t(13;?) (p11;?)t(13;?) (q11),add(14)(p11),der(14)t(14;17)(p12;q11)t(14;6)(q24;?p11),der(14)t(11;14)(?;p11)t(11;?8)(?;?),del(16)(p11),add(17)(p11),ins(19;12)(q13.1;q13.2q2?4)x2	(95, 96, 100)	x	x	x	
NCEB-1*	m	57	43,X,-Y,der(5)t(5;12)(p14;q12),der(8)t(8;?)(p11.2;?),t(9;?;13)(q32;?;q14)der(10)t(10;15)(q24;q15),t(11;14)(q13;q32),-12,-15,-17,+mar	(70, 94, 101)	x			

m: männlich, w: weiblich, DHPLC: Denaturing High-Performance Liquid Chromatographie, GINI: by Nonsense-mediated mRNA Decay Inhibition, FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, x: für die jeweilige Anwendung eingesetzt, *: während dieser Arbeit wurde publiziert, dass der Karyotyp dieser Zelllinie stabil integrierte Mautosomen enthält (102), weshalb sie als Mantelzell-Lymphom-Modell nicht geeignet scheint.

2.1.2. Material für Kontrolluntersuchungen

Als Kontrollen für die GINI-Analysen dienten die drei klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L1236, L428 und KM-H2, die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen wurden. Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen bei den FISH-Analysen wurden Zellen aus dem peripheren Blut von fünf freiwilligen Probanden verwendet. Die bei den molekularbiologischen Untersuchungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und die Denaturing High-Performance Liquid Chromatographie (DHPLC) benötigte Kontroll-DNA wurde aus dem peripheren Blut eines freiwilligen männlichen Probanden isoliert. Für die Untersuchung möglicher Polymorphismen wurden 50 DNA-Proben von freiwilligen Probandinnen analysiert, die älter als 60 waren und eine leere Familienanamnese bezüglich Krebs hatten. Als Kontrollen für die RT-PCR-Experimente wurden die vereinigten Lymphknoten-RNAs von 12 kaukasischen Spendern (Alter 20-59) verwendet, die in dem Human Immune System Multiple Tissue cDNA Panel (Clontech Laboratories) enthalten waren. Alternativ wurde die RNA aus Tonsillengewebe extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Für methylierungsspezifische PCRs und Bisulfidsequenzierungen wurde aus dem peripherem Blut von 3 freiwilligen Probanden sowie aus 3 Tonsillen DNA isoliert und bisulfidbehandelt. Die Proteine für die Western-Blot-Kontroll-

Analysen wurden entweder aus frisch entnommenem Heparin-Blut von freiwilligen Probanden oder aus frisch entnommenen Tonsillen gewonnen. Die oben genannten Tonsillenproben für RNA, DNA und Proteinextraktion wurden freundlicherweise von PD Dr. W. Klapper aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, zur Verfügung gestellt. Ebenfalls wurden von PD Dr. W. Klapper freundlicherweise Kryo- und Paraffinschnitte von Tonsillen als Kontrollen für die Immunfluoreszenzmikroskopie zur Verfügung gestellt (Ethikvotum: AZ D425/03 und D426/03).

2.1.3. Material für die ArrayCGH-Analysen

Die bereits generierten ArrayCGH-Daten von 68 primären Mantelzell-Lymphomen und 9 Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jose Angel Martinez-Climent (Abteilung für Hämatologie und medizinische Onkologie der Universität von Valencia, Valencia, Spanien) zur Verfügung gestellt. Die Herkunft der Zelllinien und des primären Untersuchungsmaterials sowie die klinischen Daten der untersuchten Patienten sind in der Publikation von Rubio-Moscardo et al., 2005 (103) beschrieben.

2.1.4. Reagenzien, Chemikalien und Enzyme

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

Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Agar-Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Agarose (Eurogentec, Seraing, Belgien)

Borsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, Deutschland)

Carbenicillin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Criterion® Tris/HCL-Fertiggele (Bio-Rad, München, Deutschland)

DABCO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

DAPI (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Denhardt's Solution (50x) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Desoxynucleosid-Triphosphat Set (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Dextransulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

D-MEM (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
DNASep® HAT Cartridge (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
dUTP spectrum green (1 mM) (Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)
dUTP spectrum orange (1 mM) (Abbott/Vysis, Wiesbaden, Deutschland)
EDTA (0,5 M) (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Elution Buffer (EB) (Qiagen, Hilden, Deutschland)
Emetin-Dihydrochlorid-Hydrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
FCS (fetal calf serum) (Invitrogen, Karlsruhe, 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 2N (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Heringssperma-DNA (10mg/ml) (Promega, Mannheim, Deutschland)
Human Cot-1 DNA (1mg/ml) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Human Immune System Multiple Tissue cDNA Panel (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA)
Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde, Deutschland)
Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Igepal CA-630 Detergenz (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Kanamycin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)
KH₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
LB Brose Base® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamin (200 mM) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Magermilchpulver (Nestlé, Frankfurt am Main Deutschland)
Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
MES Hydrate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
MES Sodium Salt (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Microcon® YM-30 Säule (Millipore, Schwalbach, Deutschland)
NaAc (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Na-Azid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Na₃Citrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
NaCl, nucleasefrei (5 M) (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
NaH₂PO₄ · 2H₂O (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
NaOH 5N (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Nitrocellulose-Membran Hybond® ECL (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland)
NucleoFast® 96 PCR Plates (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland)
Paraformaldehyd (Serva, Heidelberg, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin liquid (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Pepsin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Ponceau S (Serva, Heidelberg, Deutschland)
POP4 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Roti® Histol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
RPMI-1640-Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
SDS (Natriumdodecylsulfat) (Serva, Heidelberg, Deutschland)
Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Tetramethyl-Ammonium-Chlorid (TMACL) 5 M (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Tween-20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Urea (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Vectashield® (Vector Laboratories, Burlingame, Californien, USA)
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 Solution D (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
WAVE® Syringe Wash Solution (Transgenomic, Elancourt, Frankreich)
X-Gal 99 % (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.5. Kits

Accuprime® Taq DNA Polymerase System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

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

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

Chemiluminescence Detection Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

Chemiluminescent RT-IVT Labeling Kit V.2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

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

ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland)

ECF Western Blotting Reagent Packs (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland)

EpiTect® Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Experion® RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad, München, Deutschland)

GeneChip® Human Mapping 50K Hind Assay Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

GeneChip® Human Mapping 50K Xba Assay Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

Montage SEQ 96 Sequencing Reaction Cleanup Kits (Millipore, Schwalbach, Deutschland)

Perfectprep® Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Perfectprep® Plasmid Maxi Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

ProteoExtract® Complete Mammalian Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)

ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)

RNA 600 NANO Assay (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland)

RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Qiashreder (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QuantiTect® Reverse Transkription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

QuantiTect® SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

TOPO TA Cloning Kit mit pCR 2.1-TOPO Vector und One Shot TOP10 chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.6. Microarrays

GeneChip® Human Mapping 50K Xba Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

GeneChip® Human Mapping 50K Hind Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)

Human Genome Survey V2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

2.1.7. Antikörper

Monoklonaler CD20-Antikörper aus der Maus, Klon L26 (Dako, Glostrup, Dänemark)

Monoklonaler MAP2-Antikörper aus der Maus, Klon HM-2 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Monoklonaler MAP2-Antikörper aus der Maus, Klon HM-2 (Abcam, Cambridge, UK)

Polyklonaler MAP2-Antikörper aus dem Kaninchen (Cell Signaling/New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland)

Monoklonaler β -Tubulin-Antikörper aus der Maus (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Anti-Streptavidin Antikörper, biotinyliert aus der Ziege (Biozol, Eching, Deutschland)

Alexa Fluor® 594 Anti-Maus-Antikörper aus dem Kaninchen (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

Alexa Fluor® 594 Anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

2.1.8. Kommerzielle FISH-Assays

Zum Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32) wurde ein kommerzieller FISH-Assay (LSI IGH/CCND1 dual color, dual fusion translocation probe) der Firma Abbott/Vysis (Downers Grove, IL, USA) verwendet. Für die Dreifarb-FISH-Analysen zur Untersuchung des Y-Chromosom-Verlusts wurde dieser Assay mit einer kommerziellen Sonde zur Detektion der Chromosomenregion Yq12 (CEP Y Sat III, spectrum aqua, Abbott/Vysis) kombiniert.

Zur Analyse des *KAL*-Genlokus in Xp22.31 diente die LSI *KAL*/CEP X Control Probe (Abbott/Vysis), der *STS*-Lokus wurde mit der LSI *STS*/CEP X Control Probe (Abbott/Vysis) untersucht.

2.1.9. Bacterial Artificial Chromosome (BAC)- und P1 artificial chromosome (PAC)-Klone für die Herstellung lokusspezifischer FISH-Sonden

Zur Herstellung lokusspezifischer FISH-Sonden wurde die entsprechende BAC-/PAC- bzw. Fosmid-DNA benötigt. Die Auswahl der diese DNA enthaltenden Klone erfolgte mit Hilfe der UCSC Genome Bioinformatics-Datenbank (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Die BAC- und PAC-Klone wurden bei der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), die Fosmid-Klone beim Sanger-Institut (<http://www.sanger.ac.uk>) bestellt. Von den Klonen wurden zunächst mit LB-Medium Vorkulturen angesetzt und diese über Nacht kultiviert. Anschließend wurden 500 µl der Bakterienkultur zu 500 µl Glycerin gegeben und dieser Glycerin-Stock bei -80 °C gelagert. In Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten FISH-Assays mit den entsprechenden Klonen zusammengefasst.

Tabelle 4: In den FISH-Assays verwendete BAC-/PAC- und Fosmid-Klone

Lokus*	BAC-/PAC-/Fosmid-Klon ¹	Gen	Position [bp]*	Kontrollsonde ²
2q34	RP11-48D23	<i>MAP2</i>	210.110.254-210.271.579	CEP 2 (D2Z1) spectrum orange Probe (Abbott/Vysis, Wiesbaden)
2q34	RP11-232I14	<i>MAP2</i>	210.342.914-210.518.141	CEP 2 (D2Z1) spectrum orange Probe (Abbott/Vysis, Wiesbaden)
2q37.2	RP11-449H21	no gene	237.328.131-237.514.318	CEP 2 (D2Z1) spectrum orange Probe (Abbott/Vysis, Wiesbaden)
11q13.5	RP11-664N20	<i>MAP6</i>	74.913.316-75.081.191	RP11-241D13
12p13.1	WI2-3113L17	<i>GRIN2B</i>	13.603.451-13.647.071	RP11-756G20
13q33.1	RP11-230O10	<i>FGF14</i>	101.668.810-101.837.797	RP11-58C16
13q33.1	RP11-347N5	<i>FGF14</i>	101.620.113-101.812.763	RP11-58C16
17p13.1	RP11-199F11 ²	<i>TP53</i>	7.478.108-7.599.152	RP11-400F19 ¹
18q22.1	RP11-113G19	<i>c18orf4</i>	63.288.352-63.442.829	RP11-806L2
Xp22.33	RP4-674K6 /RP11-261P4	<i>CSF2RA, IL3RA, SLC25A6, ASMTL, P2RY8</i>	1.347.823-1.704.175	RP13-156P1, RP11-296N8
Xp22.33	RP11-800K15	<i>SHOX</i>	555.079-590.146	RP13-156P1, RP11-296N8
Xp22.33	RP4-674K6	<i>CSF2RA</i>	1.355.173-1.396.299	RP13-156P1, RP11-296N8
Xp22.33	RP11-475E20	<i>CRLF2</i>	1.672.024-1.687.565	RP13-156P1, RP11-296N8

Lokus*	BAC-/PAC-/Fosmid-Klon ¹	Gen	Position [bp]*	Kontrollsonde ²
Xq26.2- Xq28	RP11-155A5	verschiedene Gene	130.451.443-130.589.797	Die Klone wurden zur Bestimmung der minimal aberranten Region unterschiedlich miteinander kombiniert.
	RP11-111D18		131.351.666-131.510.686	
	RP11-513O11		132.706.430-132.900.109	
	RP11-671P4		133.236.541-133.431.430	
	RP11-352M22		133.654.338-133.808.247	
	RP11-80N13		132.706.181-132.852.570	
	RP4-809E13		133.726.094-133.872.483	
	RP11-1061A17		133.809.829-134.017.549	
	RP11-357N12		133.892.920-134.080.603	
	RP11-97N5		134.702.951-134.880.261	
	RP11-673D17		145.797.416-145.972.439	
	RP11-63P10		145.888.479-146.065.119	
	RP11-49B20		146.036.256-146.183.854	
	RP5-1014O16		148.556.223-148.560.146	
	RP13-156P1		153.307.962-153.377.926	
RP11-296N8	153.694.380-153.873.219			

*NCBI Build 35, ¹spectrum green-markiert, ²spectrum orange-markiert. Bei den WIZ-Klonen handelt es sich um Fosmide [WI: Whitehead Institute], RP11 und RP13 bezeichnen BAC-Klone, RP4 und RP5 bezeichnen PAC-Klone [RP(CI): Roswell Park Cancer Institute].

2.1.10. Primer

2.1.10.1. Primer für die Mutationsanalyse der mit der GINI-Methode detektierten Gene *PIM2* und *OAS1*

Die Primer für die Amplifikation und anschließende Sequenzierung wurden anhand der cDNA-Transkriptsequenzen der Gene *PIM2* (NM_00687) bzw. *OAS1* (NM_016816, NM_001032409 und NM_002534) (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) mit Hilfe der online verfügbaren Primer 3-Software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi) entworfen und von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bezogen. Die Primersequenzen und die in der PCR-Optimierung ermittelten Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 5 dargestellt (zur Primeroptimierung siehe Abschnitt 2.2.4.1).

Tabelle 5: Primer für die Mutationsanalyse von *PIM2* und *OAS1*

Lokus*	Gen	Transkript-Spezifität der Primerpaare	Vorwärts- primer	Rückwärts- primer	Annealing-Temperatur [°C]
Xp11.23	<i>PIM2</i>	NM_00687	5'-GCCACCAGTTTCTCTGCTTT-3'	5'-GGGGCTGTACACCCCTTGTC-3'	60
	<i>PIM2</i>	NM_00687	5'-AAGTAGTGGCAGCCATCCAG-3'	5'-TGGGAACAACCTTACCAAAA-3'	60
12q24.13	<i>OAS1</i>	NM_016816, NM_001032409 und NM_002534	5'-GGCAGTTCTGTTGCCACTCT-3'	5'-GATGAGGCTCTTGAGCTTGG-3'	65
	<i>OAS1</i>	NM_016816, NM_001032409 und NM_002534	5'-GGTGGAGTTCGATGTGCTG-3'	5'-GCCTGCTGGGTCTATGAGAG-3'	65
	<i>OAS1</i>	NM_016816 und NM_001032409	5'-CCCCATTATTGAAAGTACCTGA-3'	5'-TGAATGAAGTGAAGGCTGTG-3'	60
	<i>OAS1</i>	NM_002534	5'-CCCCATTATTGAAAGTACCTGA-3'	5'-GAAGCAGGAGGTCTACCAG-3'	65

*NCBI Build 35

2.1.10.2. Primer zum Nachweis und zur Eingrenzung der mittels 100K GeneChip® Mapping identifizierten homozygoten Deletionen

Die benötigten Primer zum Nachweis und zur Eingrenzung homozygoter Deletionen wurden anhand der genomischen DNA-Sequenz der Gene (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) mit Hilfe der online verfügbaren Primer 3-Software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi) ausgewählt und von der Firma Biomers bezogen. Die Sequenzen und Annealing-Temperaturen der Primer sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Primer zum Nachweis und zur Eingrenzung homozygoter Deletionen

Lokus*	Gen	Exon/ Intron	Vorwärts- primer	Rückwärts- primer	Annealing-Temperatur [°C]
1p32.3	<i>FAF1</i>	Exon 7	5'-ATGCCTGTGTGGAGGTTAGG-3'	5'-CCAGAACAGATAAGCCCTCTTT-3'	60
		Exon 19	5'-AAAATGAAGGCCATGTAGAGAA-3'	5'-TTGCAAGAGGCAGAAAGTGTG-3'	60
	<i>CDKN2C</i>	Exon 1	5'-GCCGAGCCTCCTTAAACTC-3'	5'-GCTCCCAGTGACAGTTTCTTTT-3'	60
	<i>AJ301580</i>	Exon 1	5'-GGCAGCCGAGAAAGTACCC-3'	5'-CACTGAACCGAAGACCTCGT-3'	60
1p32.2	<i>DAB1</i>	Intron 4/5	5'-TCATTGTGAGGGGACAAAAC-3'	5'-CACTGGGGACCACACTCTA-3'	60
2q34	<i>MAP2</i>	Exon 1	5'-AGCAGCAGCATCCTCTCTTC-3'	5'-ACTCAGAGACCGAGGCAAAA-3'	60
		Exon 18	5'-GAAAGAGGTAGGGGCCAGTT-3'	5'-TGACATCCTACGCCAAAGTG-3'	60
	<i>RPE</i>	Intron 1/2	5'-GGTCCCAAACCTCAGTTCT-3'	5'-TCCAAGGTAACCCAGCAAGT-3'	65
	<i>PTHR2</i>	Exon 13	5'-AGATGTGGAGTCGGTGGAAC-3'	5'-AAAGAGTGTGGCAGGCAGTC-3'	65
	<i>AK027583</i>	Exon 1	5'-GAGTTCTATAAGCACTGTGGGC-3'	5'-CAACCCAACACACACATTAG-3'	65
	<i>RNAz s59613</i>	-	5'-TTTCTCCAGCAGCTCAACTTT-3'	5'-GGGTGCAGGGACATACTAGG-3'	60
	<i>RNAz s59616</i>	-	5'-CTGAAACAGTCAGCGGTCAA-3'	5'-GGCAGGGGATAATCTTTGCT-3'	60
	<i>sorklu.gAug05</i>	Exon 2	5'-CCAGTTCTGCCCAAAGAGAG-3'	5'-TCAGTGCCTCAACTGGATCA-3'	65
2q37.3	-	Exon 1	5'-AAGGAGGGGATGAGAGTTGG-3'	5'-AGGGAGCTGCAGGCTGTG-3'	60
		-	5'-CTGCCAGGCTCAGATGAGTT-3'	5'-GCCCCCTGGATTTTCTTAAT-3'	60
		-	5'-TCAAGTCTGTGTTGGGTTG-3'	5'-GCCTGATACAAATTTAAGCCA-3'	60
		-	5'-CTGGCAGAATTCACCACTCA-3'	5'-TTGGGAACAGGAGTACACA-3'	60
	<i>CMKOR1</i>	Exon 2	5'-TCCCTTCTCCATTATCGCTG-3'	5'-AAAACATAGGGCCCATCAC-3'	65
	<i>IQCA</i>	Exon 1	5'-CCTTCAGAGCAACGGAAG-3'	5'-AGAGAAGCAGAAAGCAAGCC-3'	65
	<i>COPS8</i>	Exon 1	5'-AGGGACAGTCTGGGTTTG-3'	5'-CGTTACCCCTGGAACCTGGTG-3'	65
	<i>RNAz s60900</i>	-	5'-CACTGGATACCTTCGGGTGT-3'	5'-GCTTTTCTCGGGAATGGTT-3'	65
	<i>RNAz s60902</i>	-	5'-ATCCAGGAATGGCAAAACAT-3'	5'-ATGCGTCATGTGACCAGACT-3'	65
	<i>RNAz s60903</i>	-	5'-ATGACAGCACTGGGCTCTG-3'	5'-GCTAGGGTGGTCTCATCAC-3'	65
	<i>RNAz s60904</i>	-	5'-GCGAGCCTCACAAATAAGCTG-3'	5'-GCCGGGGTGAATTTGAATA-3'	60
	<i>RNAz s60905</i>	-	5'-CAAAGCACTGAATGGAAGCA-3'	5'-GAGAGGGGGCGTCTATTTTC-3'	60
	<i>RNAz s60907</i>	-	5'-GAGCAAGGCTGATGATGT-3'	5'-AGAGAGGCTGAGCTGTGAA-3'	60
	4q26	<i>SYNPO2</i>	Intron 1/2	5'-TAGGAAAGGGTCTGTGGAG-3'	5'-TGCACACACAACACAAAA-3'
4q32.1	-	-	5'-TCCTTGTGTCTGGGAAAGT-3'	5'-TGCCCAAGTAGTGGGAAAGT-3'	60

Material

Lokus*	Gen	Exon/ Intron	Vorwärts- primer	Rückwärts- primer	Annealing- Temperatur [°C]
4q32.1	-	-	5'-TTGAGCAGCATGATTAATGAAA-3'	5'-CAGGGCATCTGTGGTGACTT-3'	60
6p24.3	-	-	5'-TCCTAGGAGCTGTGGACAAA-3'	5'-TCCAGGATCAGCTGGCTTAG-3'	65
8p23.2	-	-	5'-TGCCTGAACCTCAAGGTGAT-3'	5'-GGCCCAAGTACGAGAAATTGA-3'	60
9p24.3	-	-	5'-GATGAAATGGACAAATGCTAGG-3'	5'-TTTGTTCAAAATAGATGACCTCAGA-3'	65
9p21.2	MOBK2B	Exon 2	5'-GAGTGCTGGCAGTGGAAAAC-3'	5'-ATCACAGGACAGGTCCGC-3'	60
		Exon 2	5'-AGGACCAGAATGACTGGGTG-3'	5'-AGTGATGGGATTAATGCATGG-3'	60
		Exon 3	5'-CTGTAGCATTGCCCTCAGAC-3'	5'-GCCATCAATGAGCATTITTC-3'	60
		Exon 4	5'-CAGGCTCTCGAGATCCAAAG-3'	5'-CTGCTGTTCCTGGGAGTAGG-3'	60
	IFNK	Exon 1	5'-TGAGAAAACCTCCTCGCTG-3'	5'-TTGCTGATCAAGTCTATTGG-3'	60
		Exon 1	5'-GGCCTTCTATGAAATGTCC-3'	5'-GGACAGGCTTACAGGACAGC-3'	60
		Exon 5	5'-TAACAGCAGAGGGCGATCTT-3'	5'-CTGCAATTGCTGAGAGCAGA-3'	60
	LRRN6C	Exon 7	5'-TAAGAGGGTCTGCCATCAGG-3'	5'-GATTAACACCACAGCCAGACC-3'	60
	c9orf11	Exon 1	5'-CAGAAAGGAGGCTCTGGGTA-3'	5'-CTCCTGTAGAAAACCTGCCACA-3'	60
		Exon 8	5'-AACACTTTGGGCAAAATTCG-3'	5'-ACCCAAAATGTGCTGCTCT-3'	60
TEK	Exon 23	5'-GGTGAATCAAAGCAGCCTA-3'	5'-AGGTCCCAGGTACAGCAC-3'	60	
9p21.1	-	-	5'-TTGCACAACGTGAAGCACTCC-3'	5'-GGGGCTAGAGAACGGATTTT-3'	55
10p12.1	GPR158	Intron 7/8	5'-TTGGCTGGAACATTTCATAGC-3'	5'-CATCCATCCAAAACCAAGG-3'	60
12p13.31	CLEC2B	Intron 3/4	5'-CCTTGCTTAACCCCTCGACT-3'	5'-AAAGCCAAAACCTTAGCCCAAC-3'	65
12p13.1	GRIN2B	Exon 9	5'-GGTTTTAGCGGAAGGGTTTC-3'	5'-AGGGAAACTGACTTCTACTCCC-3'	65
12p13.1	GRIN2B	Intron 9/10	5'-AGCTCCGCCACTTACCCT-3'	5'-CACCTACTGTGTGCCAGGTG-3'	65
12p13.1	GRIN2B	Exon 10	5'-GGGTCCCTTCCATTATAAATCC-3'	5'-GGAAATCCATAAAGAGCAAATG-3'	65
12q21.31	-	-	5'-GAATGTATCCTAAGCCGGATATG-3'	5'-GATTTGTTTTGTCAGGGGAAA-3'	55
13q33.1	FGF14	Intron 1/2	5'-GCTTCCAGGTGGCAAAATAA-3'	5'-CCCTCAGGGAGAAATGAATTG-3'	60
	-	-	5'-CACAAGTGGGAGATGAGGT-3'	5'-CGGCCAATCCTGAGTTTATG-3'	60
13q33.3	L10374	Intron 1/2	5'-CATTGGCTGGTTCATGTGAAT-3'	5'-TGCTGTATGCCATGGATTATTT-3'	60
18q22.1	c18orf4	Exon 1	5'-TCATTTGGCACCCTTAGA-3'	5'-TCCAAGCTGAGAGCACAAATG-3'	60
		Exon 1	5'-TGCTCCTTTAGCATTGTAAGT-3'	5'-CCAAAAGTGCATCTTTAACCCAG-3'	65
	RNAz s48696	-	5'-GCAACATATTGGTGGCTCT-3'	5'-TGCTGGATTGCAGGTGTAAG-3'	65
	CDH19	Exon 2	5'-TTTTGTAGTGACGCTCCTGTTTC-3'	5'-TGTTTGAAGCTTTTCAATGGC-3'	65
	TXNDC10	Exon 5	5'-AAGCCTCATTGTGTACCTAGTTTCTC-3'	5'-CCCAATCTTCAATCCTCCAG-3'	65
	-	-	5'-TCCAAGCTGAGAGCACAAATG-3'	5'-TGTTTCTTCCCTTGCGTCTT-3'	60
18q22.2	DOK6	Exon 3	5'-CAATTTCAGAATGAGTACAAATATCCC-3'	5'-GTGTACCTTAATCCGCCTGG-3'	60
Xp22.31	wavy.aAug05	Exon 1	5'-ACATGGTTTTTCAGCCCTCAG-3'	5'-CCCAAGTGAAGTGAAGGTGT-3'	60
		Exon 3	5'-TGTGATGCATTGGAGGAGAA-3'	5'-CATGAAGAAGTCAGGCTGGA-3'	65
Xq28	-	-	5'-CTCCCAAGTCACTCTGTG-3'	5'-TTTGAGCGCTAACTGTGACC-3'	65
		-	5'-CTTCCAGCTTCTTCCCCATA-3'	5'-AGTTCACTTTCATCCCAAGGA-3'	65
Kontrollokus für Multiplex-PCR (17p13.3)	-	-	5'-ATAATGATGCGGCGAAAGAT-3'	5'-GCCTGACAGAATAGCCTGGT-3'	55, 60, 65

* gemäß NCBI Build 35

2.1.10.3. Primer für die DHPLC-Mutationsanalyse

Die Primer für die DHPLC-Mutationsanalyse des *MAP2*-Gens wurden anhand der genomischen DNA-Sequenz der bekannten Transkripte NM_001039538, NM_031847, NM_031845, NM_002374 und NM_031846 (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) mit Hilfe der online verfügbaren Primer 3-Software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi) so ausgewählt, dass alle proteinkodierenden Exons inklusive der Exon/Intron-Übergänge amplifiziert wurden. Größere Exons mussten mit mehreren überlappenden Primerpaaren amplifiziert werden. Für die Mutationsanalyse des *TP53*-Gens wurden die Primer einer bereits publizierten Arbeit übernommen [Gross, Kiechle, Arnold, 2001]. Die Primer wurden bei der Firma Biomers bestellt. Die Primersequenzen sowie PCR- und DHPLC-Konditionen für die *MAP2*-Mutationsanalyse sind in Tabelle 7, die für die *MOBK2B*- und *IFNK*-Mutationsanalysen in Tabelle 8 und die für die *TP53*-Mutationsanalyse in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 7: Primersequenzen, PCR- und DHPLC-Konditionen für die MAP2-Mutationsanalyse

Transkript-Spezifität der Primerpaare	Exon ¹	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Fragmentgröße [bp]	Annealing-Temperatur [°C] ²	DHPLC-Gradient (% Puffer B innerhalb 4,5min)	DHPLC-Temperatur [°C]
MAP2 (NM_001039538, NM_031847, NM_031845, NM_002374, NM_031846)	5	5'-ATCAGATCAGAAGATTTCCCC-3'	5'-CACTAGTGAAAGAGGATCAGTGC-3'	445	65	57,8-66,8	57 60
MAP2 (NM_001039538, NM_031847, NM_031845, NM_002374, NM_031846)	6	5'-TTTGGTTACTTTCTCTTTGC-3'	5'-TTTTGAACATGAAGCATTTATCCTG-3'	262	65	53,5-62,5	55,9 58,5
MAP2 (NM_001039538, NM_031847, NM_031845, NM_002374, NM_031846)	7	5'-TGCGAGAACTTCTACACATCTAC-3'	5'-AACCAATACCAAGTCCAGAGC-3'	245	65	52,8-61,8	56,2 58,2
MAP2 (NM_002374, NM_031846)	8	5'-GCATGCTTGCATGTTCCATA-3'	5'-CAAGAGTGTGCCAAACAAA-3'	367	65	56,4-65,4	55,3 58,3
		5'-CAGCCTCGAAGATGGAGTTC-3'	5'-TCAGAGGGCCAGGAGATATG-3'	405	65	57,1-66,1	59
		5'-AGTACCTGGCATTGACCTCC-3'	5'-TGAATGTGAGCATCTTTGG-3'	454	65	57,9-66,9	58,2
		5'-AAACCAGTGGCCAGCTAC-3'	5'-TCTGTAAGTCTTGTCTCAAAC-3'	463	68	58,1-67,1	58,1
		5'-GCATAATTGACCTCCACAG-3'	5'-GGCTGGGATTCTTTCTCTG-3'	472	68	58,2-67,2	57
		5'-TGCCTTGAAAGAAGAAGCAAC-3'	5'-GGTTAGAATATCGGAAGCCAG-3'	472	65	58,2-67,2	57,6
		5'-TTGGTGGTAGGCTGCAATAG-3'	5'-CCAGTACGACTATCCTCAACCAC-3'	472	68	58,2-67,2	58,1
		5'-ACCTGACCTTCTGAAATGC-3'	5'-CCTATCATTAGCTTTCTCTTTGG-3'	469	65	58,2-67,2	59
		5'-AGCCGGAAGAGTCAAAGATG-3'	5'-CAAGTTTTAGCTCTGTTGCC-3'	455	68	58-67	57,5
		5'-AAAGGTGGAACAAGGTCTGG-3'	5'-TGTGGCTAAATCAGCCTCTG-3'	463	65	58,1-67,1	58,5
5'-AAGCTGATGAGGGCAAGAAG-3'	5'-TTCATCAGTTGTGGTTGCAC-3'	467	65	58,1-67,1	58,5		
5'-TGCTCTCCGCTCAGACAC-3'	5'-AACACAGTGAAAACATTAGTAACAAG-3'	599	65	59,6-68,6	51,3 59		
MAP2 (NM_002374, NM_031846)	9	5'-CATGATTTGCTTTGATCCACA-3'	5'-GGAGCAAAACCGAACGAAAT-3'	346	65	55,9-64,9	54,6 56,9
MAP2 (NM_002374, NM_031846)	10	5'-GCAGAACTGCCTAACAGTGG-3'	5'-GCAAAATTGTTTCATGACTGCTG-3'	372	65	56,5-65,5	55,4 56,4
MAP2 (NM_001039538, NM_031847, NM_031845, NM_002374, NM_031846)	11	5'-TGCTTGCATTAGTCTGTTGAC-3'	5'-ACGGAGAATCTTCTGGGTG-3'	314	65	55,1-64,1	55,1
MAP2 (NM_001039538)	12	5'-AGAAGTGTGAAATCTCTCTCATC-3'	5'-AAAAGGGCCTACTGTTTATGTG-3'	489	65	58,4-67,4	53,1 55,1
MAP2 (NM_001039538, NM_031847, NM_031845, NM_002374, NM_031846)	13	5'-GGAGGAAAATAGCAAAATCAATAT-3'	5'-TCTGATCCTTATGGCAAATATAAT-3'	368	65	56,4-65,4	50,8 52,8 54,8
MAP2 (NM_001039538, NM_031847, NM_031845, NM_002374, NM_031846)	14	5'-ATGGGAAGAGGGATGTTTTG-3'	5'-TTCCCTTTAAGAACTGTTAGTTTTTC-3'	500	65	58,6-67,6	57,7 59,7
MAP2 (NM_001039538, NM_031847, NM_031846)	15	5'-TGATGCTACCCATTCTGGTTC-3'	5'-GAAAGAGGTGGAAAGAAGG-3'	260	65	53,4-62,4	57,1 59,1
MAP2 (NM_001039538, NM_031847, NM_031845, NM_002374, NM_031846)	16	5'-GCATGTTGTGACTTTGGGTG-3'	5'-TCCTTCCAATTAGGTATTTTGC-3'	280	65	54,1-56,1	54,1 56,1
MAP2 (NM_001039538, NM_031847, NM_031845, NM_002374, NM_031846)	17	5'-AATTGTGGTTTCCGCTAGTC-3'	5'-CCCCTTCTATTTGTCCAGG-3'	322	65	55,8	55,8
MAP2 (NM_001039538, NM_031847, NM_031845, NM_002374, NM_031846)	18	5'-CCTGGACAATAAGAAGTGGG-3'	5'-CAATTACTACAGTTGGGGATGAG-3'	480	65	56,4-58,4	56,4 58,4

Die MgCl₂-Endkonzentration des PCR-Ansatzes betrug jeweils 4mM.

¹Die MAP2-Exons aller bekannten Transkripte wurden nach ihrer physikalischen Position von 1-18 durchnummeriert.

²Es sind nur die Annealing-Temperaturen für den ersten Zyklus der PCR angegeben. Da Touch-Down-PCRs durchgeführt wurden, nahm die Annealing-Temperatur in den ersten 10 Zyklen um 5°C ab (Abschnitt 2.2.4.5).

Tabelle 8: Primersequenzen, PCR- und DHPLC-Konditionen für die *MOBK2B*- und *IFNK*-Mutationsanalyse

Gen	Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Fragmentgröße [bp]	Annealing-Temperatur [°C]	DHPLC-Gradient (% Puffer B innerhalb 3min)	DHPLC-Temperatur [°C]
<i>MOBK2B</i>	2	5'-GAGTGCTGGCAGTGGAAAAC-3'	5'-ATCACAGGACAGGTCCGC-3'	371	65	55,9-64,9	60,1 61,1
	2	5'-AGGACCAGAATGACTGGGTG-3'	5'-AGTGATGGGATTAATGCATGG-3'	369	65	56,4-65,4	58 59,2
	3	5'-CTGTAGCATTGCCCTCAGAC-3'	5'-GCCATCAATGAGCATTTCC-3'	398	65	57-66	55,9 58,9
	4	5'-CAGGCTCTCGAGATTCCAAG-3'	5'-CTGCTGTTCTGGGAGTAGG-3'	240	65	52,6-61,6	59,3 60,3
<i>IFNK</i>	1	5'-TGAGAAAACCTCCTCTGCTG-3'	5'-TTGCTGATCAAGTCTATTGG-3'	474	65	58,2-67,2	55,5 57,8
	1	5'-GGCCTTCTATGAAATGTCCC-3'	5'-GGACAGGCTTACAGGACAGC-3'	475	65	58,2-67,2	55 56 57

Die $MgCl_2$ -Endkonzentration des PCR-Ansatzes betrug jeweils 4mM.

¹Es sind nur die Annealing-Temperaturen für den ersten Zyklus der PCR angegeben. Da Touch-Down-PCRs durchgeführt wurden, nahm die Annealing-Temperatur in den ersten 10 Zyklen um 5°C ab (Abschnitt 2.2.4.5).

Tabelle 9: Primersequenzen, PCR- und DHPLC-Konditionen für die *TP53*-Mutationsanalyse

Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Fragmentgröße [bp]	Annealing-Temperatur [°C]	MgCl ₂ [mM]	DHPLC-Gradient (% Puffer B innerhalb 3min)	DHPLC-Temperatur [°C]
2+3	5'-CCAGGTGACCCAGGGTTG-3'	5'-GCAAGGGGACTGTAGATGG-3'	402	62	2,5	60-66	63
4	5'-ACCTGGTCTCTGACTGCTC-3'	5'-GCCAGGCATTGAAGTCTCAT-3'	363	60	2,0	59-65	63
5+6	5'-CCGTGTTCCAGTTGCTTTAT-3'	5'-TTAACCCCTCCTCCCAGA-3'	488	58	2,0	62-68 60-66	61 63
7	5'-TGCTTGCCACAGGTCTCC-3'	5'-CCGGAATGTGATGAGAGGT-3'	301	60	2,5	58-64 56-62	62 64
8+9	5'-TTCCTTACTGCCTCTTGCTT-3'	5'-AGAAAACGGCATTTTGAGTG-3'	411	57	2,5	58-64 56-62	61 63
10	5'-CTCAGGTAAGTGTATATAC-3'	5'-CTATGGCTTTCCAACCTAGGA-3'	218	55	4,0	55-61 53-59	58 63
11	5'-TCATCTCTCCTCCCTGCTTC-3'	5'-CCACAACAAAACACAGTGC-3'	300	60	2,0	54-60	60

2.1.10.4. Primer für epigenetische Analysen

Die benötigten Primer für die methylierungsspezifische PCR und die Bisulfitequenzierung wurden anhand der DNA-Sequenz des CpG-Islands des *MAP2*-Gens (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) unter Verwendung der Methprimer-Software (<http://www.urogene.org/methprimer>) entworfen und ebenfalls von der Firma Biomers bezogen. Die pCR 2.1-TOPO-Vektor-spezifischen Primer wurden ausgehend von der

Sequenz des Vektors (http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_seq.txt.) erstellt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Primer für epigenetische Analysen des MAP2-Gens

Primer-Spezifität	Vorwärts- primer	Rückwärts- primer	Annealing- Temperatur [°C]
MSP, methylierte DNA	5'-GTTTTTCGAGGTTTTTATTTTCG-3'	5'-TACTACTACTACTACCCAAAACCCG-3'	55
MSP, unmethylierte DNA	5'-GGGGTTTTTGAGGTTTTTATTTT-3'	5'-ACTACTACTACTACTACCCAAAACCCA-3'	62
CpG Island Amplifikation nach Bisulfidkonversion	5'-GGGATTAGGGTTTTGGAGAAG-3'	5'-CCTACATAAAACCAAAAATAAAAC-3'	55
vektorspezifische Primer	5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAG-3'	5'-CTACTACTACTACTACCCAAAACCC-3'	60

MSP: methylierungsspezifische PCR

2.1.10.5. Primer für die quantitative RT-PCR

Für die quantitative RT-PCR wurden folgende spezifische Primerassays der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet:

QuantiTect® Primer Assay Hs_MAP2_1_SG

QuantiTect® Primer Assay Hs_MAP2_va.1_SG

QuantiTect® Primer Assay Hs_MAP6_1_SG

QuantiTect® Primer Assay Hs_HPRT1_1_SG

QuantiTect® Primer Assay Hs_GUSB_1_SG

QuantiTect® Primer Assay Hs_G6PD_1_SG

2.1.11. Geräte & Software

Tabelle 11: Typbezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Array-Waschautomat	GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Brutschrank	Function Line	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank	Galaxy B	RS Biotech, Irvine, UK
DHPLC-Anlage	Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System 4500	Transgenomic, Omaha, NE, USA
Filtersätze	Multiband-Filter-Systeme	AHF, Tübingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
FISH-Waschautomat	VP2000 Processor	Abbott/Vysis, Downers Grove, IL, USA
Geldokumentation	BioDoc Analyzer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelkammer	Criterion® Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelkammer	Modell 41-2026	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland

Material

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Hybridisierungsöfen	GeneChip® Hybridization Oven 640	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Hybridisierungsöfen	VWR Model 1575	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Inkubator für Zellkulturen	SM-30	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Microfluidics-System	2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Microfluidics-System	Experion® Elektrophorese System	Bio-Rad, München, Deutschland
Mikrowelle	M500	Philips, Hamburg, Deutschland
Plattenschüttler	MS 3 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Real-time PCR-Analyser	iCycler®	Bio-Rad, München, Deutschland
Scanner	1700-Chemiluminescent-Microarray-Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Scanner	GeneChip® Scanner 3000	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Schnellkochtopf	Clipso	Tefal, Offenbach, Deutschland
Sequenzierer	Genetic Analyzer ABI PRISM 310	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Software	2100 Expert Software	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Software	Applied Biosystems Expression Array System-Software	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Software	BioDoc Analyze Software Version 2.1	Biometra, Göttingen, Deutschland
Software	Copy Number Analyser for GeneChip® (CNAG) Version 2.0	Nannya et al., 2005 (104)
Software	Copy Number Analysis Tool (CNAT) Version 2.0	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Software	Excel 97	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Software	DNA-Chip Analyzer (dChip) Software	Lin et al., 2004 (105)
Software	Experion® Software 2.1	Bio-Rad, München, Deutschland
Software	GeneChip® Operating Software (GCOS) Version 1.4	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Software	iCycler® iQ optical System Software Version 3.0a	Bio-Rad, München, Deutschland
Software	ISIS Software Version 5.1.9	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	Sequencing Analysis Software Version 5.2	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Spektrophotometer	NanoDrop®ND-1000 Spectrometer	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Tank-Blot-Apparatur	Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Taumelschüttler	VWR Rocking Platform	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Thermocycler	DNA Engine Tetrad	MJ Research/Bio-Rad, München, Deutschland
Thermocycler	T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe	MultiScreen HTS Vacuum Manifold	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Vortexer	REAX2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waschbehältnis	Microarray Wash Tray	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	-	Labortechnik Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge 22R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	J-6B	Beckmann, München, Deutschland
Zentrifuge	Mikro 200	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 1L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.12. Puffer und Lösungen

100K GeneChip®-Färbelösung 1

495 µl 100K GeneChip®-Färbelösungspuffer

5 µl Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) (1 mg/ml)

100K GeneChip®-Färbelösung 2

495 µl 100K GeneChip® Färbelösungspuffer

5 µl 0,5 mg/ml Anti-Streptavidin-Antikörper (biotinyliert)

100K GeneChip®-Färbelösungspuffer

300 µl 20x SSPE

3,3 µl Tween-20 (3 %)

20 µl Denhardt's Solution (50x)

666,7 µl dH₂O

100K GeneChip®-Waschpuffer A

300 ml 20x SSPE

1 ml Tween-20 (10 %)

wurden auf 1.000 ml mit dH₂O aufgefüllt, auf pH 6,5 eingestellt und steril filtriert (0,2 µm-Filter).

100K GeneChip®-Waschpuffer B

30 ml 20x SSPE

1 ml Tween-20 (10 %)

wurden auf 1.000 ml mit dH₂O aufgefüllt, auf pH 6,5 eingestellt und steril filtriert (0,2 µm-Filter).

Antifade

230 mg DABCO

800 ml dH₂O

200 µl 1 M Tris-HCL pH 8,0

9 ml Glycerol

Blocking-Reagenz

5 g Membran 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 in dH₂O auf 1.000 ml aufgefüllt.

Carnoy's-Fixativ

Methanol/Eisessig 3:1

10x PBS

80 g NaCl
2 kg KCl
6,1 g Na₂HPO₄
2 g KH₂HPO₄
wurden auf 100ml mit dH₂O aufgefüllt und auf pH 7,3 eingestellt.

DAPI-Lösung

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

Gel-Loading-Puffer

0,125 g Bromphenolblau
28,7 g Glycerol
wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Holding-Puffer

8,3 ml 12x MES-Stammlösung
18,5 ml nukleasefreies NaCl (5 M)
0,1 ml Tween-20 (10 %)
wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt und lichtgeschützt gelagert.

LB-Medium

20 g LB Base® wurden in 1.000 ml dH₂O gelöst, autoklaviert und anschließend mit Chloramphenicol (für BACs und Fosmide) bzw. Kanamycin (für PACs) versetzt (die Endkonzentrationen entsprachen 20 µg/ml für Chloramphenicol und 25 µg/ml für Kanamycin).

LB-Platten

10 g LB Base®

15 g Agar-Agar

wurden auf 500 ml mit dH₂O 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 (20 mm) ausgegossen.

Mastermix

2,5 ml deionisiertes Formamid

1,25 ml Dextransulfat (40 %)

0,5 ml 20x SCC

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

MES-Stammlösung (12x)

70,4 g MES Hydrat

193,3 g MES Natriumsalz

wurden auf 1.000 ml mit dH₂O aufgefüllt, auf pH 6,5 eingestellt und steril filtriert (0,2 µm-Filter).

PAGE-Laufpuffer

30 g Urea

3 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

14,4 g Glycin

10 ml 10% SDS

wurden auf 1.000 ml mit dH₂O aufgefüllt.

PAGE-Probenpuffer

1,51 g Tris(hydroxymethyl)-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 100 ml aufgefüllt und portioniert eingefroren. Vor Gebrauch wurde eine Spatelspitze DTT zugegeben.

Paraformaldehydlösung (1 %)

1 g Paraformaldehyd

1 ml 1 M MgCl₂

99 ml 1x PBS

wurden leicht erwärmt und auf pH 7,5 eingestellt.

Pepsin-Lösung

5 mg Pepsin

0,5 ml 2N HCL

wurden in 99,5 ml dH₂O gelöst.

PN-Puffer

137,89 g NaH₂PO₄ · 2H₂O

142 g Na₂HPO₄

180 ml 5 N NaOH

wurden auf 10 L mit dH₂O aufgefüllt.

PNM-Puffer

5 % Magermilchpulver und 0,02 % Na-Azid wurden 15 min in PN-Puffer gelöst. Dieser Ansatz wurde 1-2 h bei 37 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Bei 1500 g wurde 15 min zentrifugiert, der Überstand portioniert und ggf. bei -20 °C eingefroren.

Ponceau S-Lösung

(1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure)

RCLB-Puffer (10x)

50 ml 1 M Tris-HCL pH 7,6

25 ml 1 M MgCl₂

8,3 ml 6 M NaCl

wurden auf 500 ml mit dH₂O aufgefüllt.

SSC (Standard Saline Citrate) (20x)

175,3 g NaCl

88,2 g Na₃Citrat

wurden in 1.000 ml dH₂O gelöst und mit HCL auf pH 7,0 eingestellt.

SSC-Lösung 1

2 ml 20x SSC

300 µl Igepal

wurden auf 100 ml mit dH₂O aufgefüllt.

SSC-Lösung 2

10 ml 20x SSC

100 µl Igepal

wurden auf 100 ml mit dH₂O 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 auf 1.000 ml mit dH₂O aufgefüllt.

TBS

29,24 g NaCl

2,4 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

wurden mit dH₂O auf 1.000 ml aufgefüllt und pH 7,5 eingestellt.

TBS-T

TBS-Puffer mit 0,1 % Tween-20

2.2. Methoden

2.2.1. Vorbereitung des Probenmaterials

2.2.1.1. Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung sämtlicher Zelllinien erfolgte im Brutschrank (Galaxy B, RS Biotech) bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂. Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium kultiviert, mit Ausnahme der Zelllinie GRANTA-519, bei der D-MEM-Medium eingesetzt wurde. Beiden Kulturmedien wurden 10 % FCS (v/v), L-Glutamin (2 mM) und 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) zugefügt.

2.2.1.2. DNA-Extraktion

Für die DNA-Microarray-Analysen und die anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen wurde die genomische DNA der lymphominfiltrierten Lymphknoten (LK), des Knochenmarks (KM), der Milz (M) und von peripherem Blut (pB) aus bei -80 °C gelagerten DMSO-Stocks extrahiert. In zwei Fällen erfolgte die DNA-Isolierung aus tiefgefrorenen Gewebeschnitten der betroffenen Lymphknoten. Die Zelllinien-DNA wurde ebenfalls aus eingefrorenen DMSO-Stocks oder direkt aus der Zellkultur extrahiert. Die DNA-Extraktion wurde mit dem QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen) durchgeführt:

1. a) Die DMSO-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte 10 min bei 400 g (Mikro 200, Hettich). Das Pellet wurde anschließend in 200 µl PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml-Gefäß überführt und mit 20 µl Protease versetzt.
b) Die tiefgefrorenen Gewebeschnitte wurden aufgetaut und in 200 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurde mit Hilfe einer Kanüle homogenisiert.
2. Nach der Zugabe von 200 µl Puffer AL wurde der Ansatz 15 s gevortext (REAX2000, Heidolph) und 10 min bei 56 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert.
3. Anschließend wurden 200 µl absolutes Ethanol zugegeben und der Ansatz erneut 15 s gevortext.
4. Nach der Überführung des gesamten Ansatzes auf eine QIAamp Mini Säule in einem 2 ml-Gefäß wurde 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues 2 ml-Gefäß gegeben und das Gefäß mit dem Durchlauf verworfen.

5. Als erster Waschschrift wurden zunächst 500 µl AW1-Puffer auf die Säule gegeben und diese 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule wieder in ein neues 2 ml-Gefäß gegeben und das Gefäß mit dem Durchlauf verworfen.
6. Für den zweiten Waschschrift wurden 500 µl AW2-Puffer auf die Säule gegeben und diese 3 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde mit dem Gefäß verworfen und die Säule in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt.
7. Zur Elution der DNA wurden 200 µl dH₂O auf die Säule gegeben, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Säule danach 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf enthielt die eluierte DNA.

2.2.1.3. DNA-Quantifizierung mittels NanoDrop® ND-1000

Die DNA-Konzentration und -Qualität wurde mit dem NanoDrop® ND-1000-Spektrophotometer und der NanoDrop® Software Version 3.2.1 nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die optische Dichte der Probe gegen dH₂O als Referenz bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die optische Dichte doppelsträngiger DNA bei einer Konzentration von 50 µg/ml 1 beträgt. Um die Reinheit der DNA zu überprüfen, wurden das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Wert A₂₆₀/A₂₈₀ sollte dabei zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.2.1.4. RNA-Extraktion

Für die GINI-Analysen sowie für molekularbiologische Untersuchungen von Kandidatengen wurde aus Mantelzell-Lymphom-Zelllinien in Kultur die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) und die Homogenisierung des Lysats mittels Qiashredder-Säulen (Qiagen) durchgeführt:

1. 10 ml Zellkultur wurden in ein 15 ml-Röhrchen überführt und dieses 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 350 µl RLT-Lysepuffer vorsichtig resuspendiert.
2. Nach Überführung des Lysats in ein 1,5 ml-Gefäß wurde 20 min bei 37 °C inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf).
3. Das gesamte Lysat wurde zum Homogenisieren auf eine Qiashredder-Säule gegeben und diese 2 min bei 20.000 g zentrifugiert (Mikro 200, Hettich). Die Säule wurde anschließend verworfen.

4. Zum Durchlauf wurden 350 µl 70 % Ethanol gegeben, mit der Pipette gut vermischt und die gesamte Menge auf eine RNeasy Mini-Säule überführt. Es wurde 15 s bei 12.000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.
5. Anschließend wurden 50 µl RW1-Waschpuffer auf die Säule gegeben und diese wieder 15 s bei 12.000 g zentrifugiert.
6. Danach wurden 10 µl DNase mit 70 µl RDD-Puffer vorsichtig vermischt und mittig auf die Säule gegeben. Es wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.
7. Es wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Nach 15 s Zentrifugation bei 12.000 g wurde der Durchlauf verworfen.
8. Die Säule wurde in ein neues 1,5ml-Gefäß gestellt. Danach wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben, diese 15 s bei 12.000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.
9. Es wurde noch einmal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und nach 2 min Zentrifugation der Durchlauf verworfen.
10. Anschließend wurde erneut 1 min bei 20.000 g zentrifugiert, um Flüssigkeitsreste zu entfernen, und die Säule danach in ein neues 1,5ml-Gefäß überführt.
11. 50 µl RNase-freies H₂O wurden mittig auf die Säule pipettiert und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1 min bei 12.000 g zentrifugiert.
12. Das Eluat wurde erneut auf die Säule gegeben, wieder 1 min inkubiert und die Säule anschließend bei 12.000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde nach der Konzentrationsbestimmung (Abschnitt 2.2.1.5) bei -80 °C gelagert.

2.2.1.5. RNA-Quantifizierung mittels Experion® Elektrophorese System

Die RNA-Qualität und -Konzentration wurde mit Hilfe des Experion® Elektrophorese Systems (Bio-Rad) bestimmt. Mit diesem Microfluidics-System können, ähnlich wie bei einer Kapillarelektrophorese, die Bestandteile einer Probe in Abhängigkeit von Ladung und Größe im Miniaturmaßstab elektrophoretisch aufgetrennt werden. Für die RNA-Analyse 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. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der RNA-Qualitätsprüfung für sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien dargestellt.

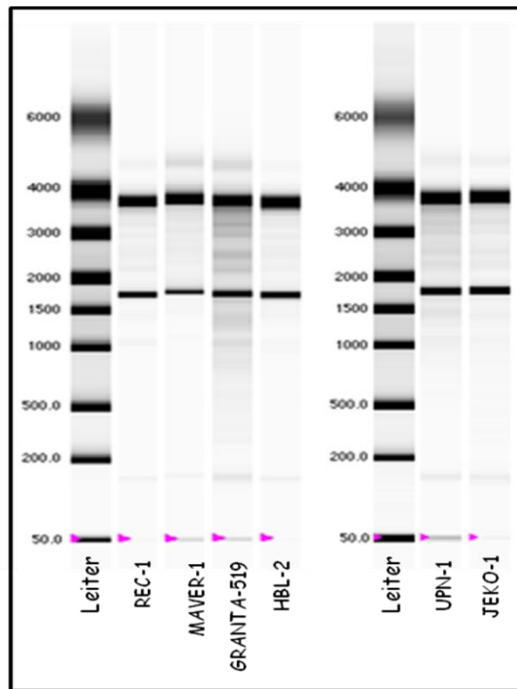


Abbildung 17: Qualitätsprüfung der extrahierten RNA aus den sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mit dem Experion® Elektrophorese System. Alle Proben zeigen typische Bandenmuster für die Auftrennung eukaryotischer RNA. Die beiden stärksten Banden entsprechen der 18S und 28S rRNA. Die unterste Bande bei 50bp (pinker Pfeil) zeigt den internen Marker.

2.2.2. Microarray-Analysen

2.2.2.1. GINI-Microarray-Analysen

Die GINI-Analysen wurden im Rahmen eines Gastaufenthaltes selbstständig am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt (Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Die Grundlagen dieses Analyseverfahrens wurden bereits in Abschnitt 1.11.2 beschrieben. Für die Analysen wurden von jeder untersuchten Zelllinie die RNA-Proben einer mit Emetin behandelten und einer unbehandelten Zellkultur benötigt. Dazu wurden die Zelllinien nach erfolgreicher Kultivierung (Abschnitt 2.2.1.1) geteilt und die eine Hälfte mit Emetin-Dihydrochlorid-Hydrat (Endkonzentration 100 µg/ml) versetzt. Nach weiteren 9h im Brutschrank wurde die RNA aus der mit Emetin behandelten und aus der unbehandelten Kultur isoliert (Abschnitt 2.2.1.4). Die Vorbereitung und Markierung der Proben wurden mit Hilfe des Chemiluminescent RT-IVT Labeling Kit V.2.0 (Applied Biosystems) durchgeführt. Für das Waschen und Färben der Microarrays wurde das Chemiluminescence Detection Kit (Applied Biosystems) verwendet. Es wurden jeweils zwei biologische Replikate analysiert.

Reverse Transkription

1. Die RNA-Proben und Reagenzien wurden langsam auf Eis aufgetaut und wie folgt in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert. Die Temperaturprotokolle wurden in einem Thermoblock (DNA Engine Tetrad, MJ Research/Bio-Rad) durchgeführt.

2 µl	T7-Oligo (dT) Primer
10 µl	RNA-Probe (2 µg) in nukleasefreiem H ₂ O
4 µl	Kontroll-RNA
<hr/>	
16 µl	gesamt

Thermocycler-Protokoll:

70 °C	5 min
4 °C	∞

Reverse Transkription:

16 µl	RNA-Primer-Mix
1 µl	RNase-Inhibitor
2 µl	10x 1st-Strand-Puffer-Mix
1 µl	RT-Enzyme
<hr/>	
20 µl	gesamt

Thermocycler-Protokoll:

25 °C	10 min
42 °C	2 h
70 °C	15 min
4 °C	∞

Zweitstrang-Synthese:

20 µl	Produkt aus der Reversen Transkription
55 µl	nukleasefreies H ₂ O
20 µl	5x 2nd-Strand-Puffer-Mix
5 µl	2nd-Strand-Enzym-Mix
<hr/>	
100 µl	gesamt

Thermocycler-Protokoll:

16 °C	2 h
70 °C	15 min
4 °C	∞

cDNA-Aufreinigung

2. 100 µl DNA-Binding-Puffer und die gesamte cDNA-Synthese-Reaktion wurden in einem 1,5 ml-Gefäß vermischt.
3. Das Gemisch wurde auf eine Nano-Purification-Säule gegeben, die Säule 1 min bei 12.000 g zentrifugiert (Centrifuge 5415D, Eppendorf) und der Durchlauf verworfen.

4. Die Säule wurde zweimal mit je 300 µl DNA-Waschpuffer gewaschen, jeweils bei 12.000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Um restliche Flüssigkeit zu entfernen, wurde noch einmal 1 min bei 12.000 g zentrifugiert.
5. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. 10 µl DNA-Elutionspuffer wurden mittig auf die Säule gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1 min bei 12.000 g zentrifugiert.
6. Weitere 10 µl DNA-Elutions-Puffer wurden auf die Säule gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 min Zentrifugation bei 12.000 g wurde die Säule verworfen.

In Vitro Transkription (IVT) Labeling

7. Die aufgereinigte cDNA wurde zunächst mit nukleasefreiem H₂O auf ein Volumen von 24 µl gebracht.

24 µl	cDNA
8 µl	5x IVT-Puffer-Mix
4 µl	DIG-UTP
<u>4 µl</u>	<u>IVT-Enzyme-Mix</u>
40 µl	gesamt

Thermocycler-Protokoll:
37 °C 9 h
4 °C ∞

cRNA-Aufreinigung

8. Die gesamte IVT-Reaktion wurde mit 20 µl nukleasefreiem H₂O vermischt und mit 200 µl RNA-Binding-Puffer sowie 140 µl absolutem Ethanol versetzt.
9. Das Gemisch wurde auf eine RNA-Purification-Säule überführt und diese 1 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen.
10. Die Säule wurde zweimal mit je 500 µl RNA-Waschpuffer gewaschen, jeweils 1 min bei 12.000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.
11. Um restliche Flüssigkeit zu entfernen, wurde noch einmal 1 min bei 12.000 g zentrifugiert.
12. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. 50 µl RNA-Elutionspuffer wurden mittig auf die Säule gegeben und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1 min bei 12.000 g zentrifugiert.
13. Es wurden weitere 50 µl RNA-Elutionspuffer auf die Säule gegeben und erneut 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 min Zentrifugation bei 12.000 g wurde die Säule verworfen.

Bestimmung der RNA-Konzentration und -Qualität

14. Mit Hilfe des 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies) wurde die RNA-Konzentration sowie -Qualität bestimmt. Das Gerät ist äquivalent zu dem bereits beschriebenen Experion Elektrophorese System (Abschnitt 2.2.1.5). Für die RNA-Analyse wurde der RNA 600 NANO® Assay (Agilent Technologies) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgten mit der 2100 Expert Software (Agilent Technologies).

Äquilibrierung der Microarrays

15. Die Microarrays (Human Genome Survey V2.0, Applied Biosystems) lagen in einer Hybridisierungskammer vor. Sie wurden zunächst mit 1.000 µl Prähybridisierungslösung äquilibriert.

150 µl	nucleasefreies H ₂ O
330 µl	Hybridisierungspuffer
100 µl	Hybridisierungsdenaturant
420 µl	Blocking-Reagenz
<hr/>	
1.000 µl	gesamt

16. Nach Befüllen der Hybridisierungskammer wurde diese auf einem Taumelschüttler (VWR Rocking Platform, VWR International) 5 min bei 10° Neigung geschwenkt.

17. Anschließend wurde die Hybridisierungskammer 1 h bei 55 °C und 100 U/min im Hybridisierungssofen (VWR Model 1575, VWR International) äquilibriert.

Fragmentierung der cRNA

18. 10 µl Fragmentierungspuffer wurden in einem 0,2 ml-Gefäß vorgelegt und mit 10 µg DIG-markierter cRNA in 90 µl nucleasefreiem H₂O versetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 60 °C im Thermocycler inkubiert.

19. Nach der Inkubation wurden 50 µl cRNA Fragmentierungs-Stoppuffer zugegeben.

Hybridisierung der Microarrays

20. Der Hybridisierungscocktail wurde in einem 1,5 ml-Gefäß angesetzt.

100 µl	nucleasefreies dH ₂ O
170 µl	Hybridisierungspuffer
30 µl	Hybridisierungskontroll-Reagenz
150 µl	fragmentierte cRNA
50 µl	Hybridisierungsdenaturant
<hr/>	
500 µl	gesamt

21. Der Hybridisierungscocktail wurde durch Vortexen gemischt.
22. Die Hybridisierungskammer wurde zügig mit dem Hybridisierungscocktail befüllt und 16 h bei 55 °C und 100 U/min im Hybridisierungssofen inkubiert.

Waschen und Färben

23. Die Microarrays (maximal 4 Stück gleichzeitig) wurden aus ihren Hybridisierungskammern genommen und in ein spezielles Waschbehältnis (Microarray Wash Tray, Applied Biosystems) mit 300 ml Waschpuffer 1 gegeben. Es wurde 5 min bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler bei 10° Neigung gewaschen. Anschließend wurde der Waschpuffer 1 verworfen.
24. Es wurde 5 min in 300 ml Waschpuffer 2 gewaschen.
25. Dann wurde 2x 5 min mit 300 ml CL (Chemilumineszenz)-Rinse-Puffer gewaschen.
26. Nachdem 4 ml Antikörper-Mix auf jeden Microarray gegeben wurden, musste 20 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Der Antikörper-Mix wurde verworfen und es wurde 3x 10 min mit 300 ml CL-Rinse-Puffer gewaschen.
27. Anschließend wurden die Microarrays 10 min in 300 ml CL-Enhancing-Rinse-Puffer geschwenkt und dieser anschließend verworfen.
28. Es wurden 4 ml CL-Enhancing-Lösung auf jeden Microarray gegeben und 20 min auf dem Taumelschüttler inkubiert. Danach wurde noch einmal 10 min mit 300 ml CL-Enhancing-Rinse-Puffer gewaschen.
29. Nachdem 3,5 ml CL-Substrat auf jeden Microarray gegeben wurden, konnten diese mit Hilfe des 1700-Chemiluminescent-Microarray-Analyzer (Applied Biosystems) gescannt werden. Die Steuerung des Geräts sowie die Analyse der Scans erfolgte mit der Applied Biosystems Expression Array System Software (Applied Biosystems).

2.2.2.2. ArrayCGH

Die ArrayCGH-Daten wurden bereits vor Beginn der Promotionsarbeit von der Abteilung für Hämatologie und medizinische Onkologie der Universität von Valencia (Valencia, Spanien) unter Leitung von Jose Angel Martinez-Climent in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik in Kiel generiert und analysiert. Dazu wurde ein Microarray verwendet, der aus 2.464 BAC- und PAC-Klonen bestand mit einer genomweiten Auflösung von ca. 1,4 Mb (UCSF Hum Array 2.0). Nach Berechnung der Copy Number wurden die X-chromosomalen Daten für weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt (69).

2.2.2.3. 100K GeneChip® Human Mapping

Die Grundlagen dieser Technik sowie das Microarray-Design wurden bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben (Abschnitt 1.11.1.3.1). Für Probenvorbereitung und die Hybridisierungen der GeneChip® Human Mapping-Arrays der Mantelzell-Lymphome wurden die Labore und Gerätschaften des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (RZPD) in Berlin genutzt. Später wurde die Technik basierend auf den Erfahrungen aus Berlin erfolgreich im eigenen Labor etabliert. Für die Analyse der Mantelzell-Lymphome wurden das GeneChip® Human Mapping 50K Xba Assay Kit und das GeneChip® Human Mapping 50K Hind Assay Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Entsprechend wurden zwei jeweils verschiedene Microarrays hybridisiert, der GeneChip® Human Mapping 50K Xba Array und der GeneChip® Human Mapping 50K Hind Array.

Restriktionsverdau

1. Der Restriktionsverdau der genomischen DNA wurde in zwei parallelen Ansätzen mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xba I angesetzt. Die Temperaturprotokolle wurden in einem Thermocycler (DNA Engine Tetrad, MJ Research/Bio-Rad) durchgeführt.

10,5 µl	nucleasefreies H ₂ O
5 µl	DNA (50 ng/µl)
2 µl	10x BSA-Puffer
2 µl	10x BSA
<u>0,5 µl</u>	<u>Restriktionsenzym (20 U/µl)</u>
20 µl	gesamt

Bei der Leerkontrolle wurden statt der DNA 5 µl nucleasefreies H₂O zugegeben.

Thermocycler-Protokoll:

37 °C	120 min
70 °C	20 min
4 °C	∞

Ligation

2. Die Ligation der Restriktionsfragmente mit den Adaptern wurde auf Eis angesetzt:

20 µl	Restriktionsverdau
1,25 µl	Adapternukleotide (5 µM)
2,5 µl	10x T4-Ligase-Puffer
0,625 µl	T4-Ligase (400 U/µl)
<u>0,625 µl</u>	<u>nucleasefreies H₂O</u>
25 µl	gesamt

Thermocycler-Protokoll:

16 °C 120 min
70 °C 20 min
4 °C ∞

Polymerase-Ketten-Reaktion

3. Zunächst wurde die Ligationsreaktion mit 75 µl nucleasefreiem H₂O verdünnt.
4. Pro Restriktionsenzym wurden drei PCR-Reaktionen angesetzt, um genug Produkt für die Microarray-Hybridisierung zu bekommen. Die Angaben gelten für einen PCR-Ansatz.

10 µl verdünntes Ligationsprodukt
44 µl nucleasefreies H₂O
10 µl 10x Pfx-Amplification-Puffer
10 µl 10x PCR-Enhancer
2 µl MgSO₄ (50 mM)
12 µl dNTPs (je 2,5 mM)
10 µl PCR-Primer (10 µM)
2 µl Pfx-Polymerase (2,5 U/µl)
100 µl gesamt

Thermocycler-Protokoll:

94 °C 3 min
94 °C 15 s
60 °C 30 s
68 °C 1 min
68 °C 7 min
4 °C ∞

} 30 Zyklen

Im Thermocycler waren die Funktionen „Heated Lid“ und „Calculated Temperatures“ aktiviert.

5. Die PCR-Produkte wurden über ein 2 %-Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 2.2.4.2). Als Längenstandard wurde der Hyperladder I-Längenstandard (Bioline) verwendet. Der Großteil der PCR-Produkte lag zwischen 250 bp und 2.000 bp.
6. Die restlichen PCR-Produkte aus den drei Ansätzen wurden dann vereinigt und in ein Well einer 96er PCR-Aufreinigungsplatte gegeben (NucleoFast 96 PCR Plates, Macherey & Nagel). Mit Hilfe einer Vakuumpumpe (MultiScreen HTS Vacuum Manifold, Millipore) wurde ein Vakuum (800 mbar) angelegt, bis die Wells getrocknet waren.
7. Es wurde dreimal mit nucleasefreiem H₂O gewaschen und die Wells durch Anlegen eines Vakuums (23-25 mmHg) getrocknet.

8. Anschließend wurden 40 µl Elutionspuffer (Qiagen) in jedes Well gegeben und die Platte mit einer Klebefolie abgedeckt. Die Platte wurde auf einen Plattenschüttler (MS3 basic, IKA) gestellt und 10 min bei Raumtemperatur und 500 U/min geschüttelt. Dann konnte das Eluat aus dem Well in ein 0,2 ml-Gefäß überführt werden.
9. 1 µl des Eluats wurde entnommen und mit 9 µl nucleasefreiem H₂O verdünnt. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte dann mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Abschnitt 2.2.1.3).

Fragmentierung der PCR-Produkte

10. Für den Fragmentierungsansatz musste das Fragmentierungsreagenz zunächst auf eine Endkonzentration von 0,04 U/µl verdünnt werden. Alle verwendeten Reagenzien wurden vorher auf Eis gestellt, und das Ansetzen der Fragmentierungsreaktion erfolgte ebenso auf Eis.

45 µl	PCR-Eluat (40 µg DNA)
5 µl	10x Fragmentierungspuffer
5 µl	<u>verdünntes Fragmentierungsreagenz</u>
55 µl	gesamt

Thermocycler-Protokoll:

(Der Thermocycler war bereits auf 37 °C vorgeheizt.)

37 °C 35 min

95 °C 15 min

4 °C ∞

11. 4,5 µl des Fragmentierungsansatzes wurden danach auf 10 µl mit nucleasefreiem H₂O verdünnt, mit 3,5 µl Auftragspuffer versetzt und über ein 4 %-Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 2.2.4.2). Als Längenstandard wurde die 100 bp-DNA-Leiter verwendet. Der Großteil der Fragmente befand sich zwischen 30 bp und 100 bp.

Labeling

12. Das Ansetzen der Labeling-Reaktion erfolgte auf Eis.

50,5 µl	Fragmentierungsreaktion
14 µl	5x TdT-Puffer
2 µl	Labeling-Reagenz (7,5 mM)
3,5 µl	<u>TdT (30 U/µl)</u>
70 µl	gesamt

Thermocycler-Protokoll:

37 °C 2 h
95 °C 15 min
4 °C ∞

Hybridisierung

13. Der Hybridisierungscocktail wurde in einem 0,5 ml-Gefäß angesetzt.

70 µl	Labeling-Reaktion
12 µl	12x MES
13 µl	DMSO
13 µl	50x Denhardt's Solution
3 µl	EDTA (0,5 M)
3 µl	Heringsperma-DNA (10 mg/ml)
2 µl	Oligonukleotid-Kontrollreagenz
3 µl	Human Cot-1 DNA (1 mg/ml)
1 µl	Tween-20 (3 %)
<u>140 µl</u>	<u>TMACL (5 M)</u>
260 µl	gesamt

14. Der Hybridisierungscocktail wurde 10 min bei 95 °C im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert und danach 10 s auf Eis gestellt. Der entstandene Niederschlag wurde dann durch Auf- und Abpipettieren wieder gelöst.

15. Anschließend wurde der Hybridisierungscocktail 2 min bei 48 °C inkubiert und 200 µl davon in einen 50K-Microarray injiziert.

16. Es wurde 16-18 h bei 48 °C und 60 U/min im Hybridisierungssofen (Hybridization Oven 640, Affymetrix) inkubiert.

Waschen, Färben und Scannen

17. Der Hybridisierungscocktail wurde abgezogen und der Microarray mit 250 µl Holding-Puffer gefüllt.

18. Anschließend wurden die Microarrays in der Fluidics Station 450 (Affymetrix) nach Anweisung des Herstellers automatisch gewaschen und gefärbt. Dafür mussten Färbelösung 1, Färbelösung 2, Waschpuffer A und Waschpuffer B angesetzt werden. Die Steuerung der Fluidics Station 450 erfolgte mit der GeneChip® Operating Software (GCOS) Version 1.4 (Affymetrix). Es wurde das Protokoll „Mapping 100Kv1_450“ durchgeführt.

19. Die Microarrays wurden mit Hilfe des GeneChip® Scanners 3000 (Affymetrix) und der GCOS-Software analysiert.

2.2.3. Molekularzytogenetische Methoden

2.2.3.1. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

2.2.3.1.1. Isolierung der BAC-/PAC-/Fosmid-DNA aus einer Bakterienkultur

100 µl Bakterienkultur eines Glycerin-Stocks wurden in 200 ml LB-Medium mit 20 µg/ml Chloramphenicol (BACs und Fosmide) bzw. 25 µg/ml Kanamycin (PACs) über Nacht bei 37 °C im Inkubator (Edmund Bühler) kultiviert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem Perfectprep® Plasmid Maxi Kit (Eppendorf) nach Anleitung des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometers (NanoDrop® Technologies) bestimmt (Abschnitt 2.2.1.3).

2.2.3.1.2. Herstellung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden

Random Priming

Die Markierung der DNA erfolgte mit dem Bioprime® DNA-Labeling System (Invitrogen). Das im Kit vorgesehene dNTP-Reagenz zur Biotinylierung wurde durch einen dNTP-Mix mit spectrum green bzw. spectrum orange markierten Nukleotiden ersetzt. Zur direkten Markierung dienten dabei die dUTP-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe spectrum orange oder spectrum green der Firma Vysis/Abbott. Diese wurden wie folgt mit unmarkierten dNTPs (Roche Diagnostics) gemischt:

10x dNTP-Mix :	2,5 µl	dATP (10 mM)
	2,5 µl	dCTP (10 mM)
	2,5 µl	dGTP (10 mM)
	1,25 µl	dTTP (10 mM)
	12,5 µl	dUTP-spectrum orange bzw. dUTP-spectrum green (1 mM)
	3,75 µl	dH ₂ O
	25 µl	gesamt

1. 1 µg DNA wurde mit dH₂O auf ein Volumen von 24 µl gebracht und 20 µl der 2,5x Random Octamers wurden hinzugefügt.
2. Der Ansatz wurde 5 min im Wasserbad gekocht und anschließend sofort auf Eis gestellt.
3. Es erfolgte die Zugabe von 5 µl des 10x dNTP-Mix sowie 1 µl Klenow-Fragment.
4. Nach Inkubation bei 37 °C im Brutschrank (FunctionLine, Heraeus) über Nacht wurden 5 µl Stopppuffer hinzugefügt.

Aufreinigung der Sonde über die Microcon YM-30 Säule

5. Der gesamte Markierungsansatz wurde auf eine Microcon® YM-30 Säule (Millipore) gegeben, die sich in einem 1,5 ml-Gefäß befand. Dann wurde 5 min bei 20.000 g zentrifugiert (Mikro 200, Hettich) und der Durchlauf verworfen.
6. Zum Waschen wurden 2x 300 µl dH₂O auf die Säule gegeben und diese jeweils 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen.
7. Es wurden 50 µl dH₂O auf die Säule pipettiert, die Säule kopfüber in ein neues 1,5 ml Gefäß gesteckt und so 5 min bei 10.000 g zentrifugiert.

Ethanol-Fällung mit Cot-1-DNA

8. Jeweils 10 µl der aufgereinigten Sonden (spectrum orange und spectrum green) wurden vermischt und mit 5 µl Cot-1 DNA (1 mg/ml) versetzt.
9. Es wurde 1/10 des Volumens an 3 M NaAc (pH 5,2) hinzugefügt.
10. Nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens an absolutem Ethanol wurde 30 min bei 25.000 g zentrifugiert (Biofuge 22R, Heraeus).
11. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet im Dunkeln getrocknet und anschließend in 10 µl Mastermix aufgenommen.

2.2.3.1.3. *In-situ*-Hybridisierung

Vorbereitung der Objektträger

1. In einer frisch angesetzten Pepsin-Lösung wurde der Objektträger 5 min bei 37 °C inkubiert (Function Line, Heraeus) und anschließend 1 min in dH₂O gewaschen.
2. Zur Fixierung der Zellen wurde der Objektträger 2 min in 1 % Paraformaldehydlösung gestellt und danach kurz in dH₂O gewaschen.
3. Es erfolgte eine Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80%, absolutes Ethanol) für jeweils 2 min.
4. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet.

Alternativ wurde bei einigen Hybridisierungen die Vorbereitung der Objektträger automatisch im VP2000 Processor der Firma Abbott/Vysis nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Hybridisierung

5. 1,3 µl der DNA-Sonde im Mastermix wurden auf den markierten Bereich des Objektträgers gegeben. Anschließend mussten sie mit einem kleinen runden Deckglas abgedeckt und mit Photokleber Fixogum versiegelt werden.

6. In einer feuchten Metallbox wurde die DNA unter Ausschluss von Licht 7 min bei 75 °C im Wasserbad denaturiert.
7. Die Hybridisierung erfolgte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank (Function Line, Heraeus).

Waschen unter stringenten Bedingungen

8. Deckglas und Photokleber wurden vorsichtig entfernt und der Objektträger 2 min in einer Küvette mit SSC-Lösung 1 bei 70 °C gewaschen.
9. Anschließend wurde 1 min bei Raumtemperatur in SSC-Lösung 2 und danach kurz in 2x SSC-Lösung gewaschen.
10. Darauf folgte eine 5-minütige Gegenfärbung mit DAPI-Lösung.
11. Der Objektträger wurde nochmals kurz in 2x SSC-Lösung gewaschen, um dann mit Antifade eingedeckt zu werden.

Alternativ wurden die Objektträger bei einigen Hybridisierungen automatisch im VP2000 Processor der Firma Abbott/Vysis nach Anleitung des Herstellers gewaschen.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axioskop 2, Zeiss). Als Lichtquelle diente eine 100W HBO-Lampe. Es wurden verschiedene Filtersysteme mit einzelnen Breitbandfiltern (blau/grün/rot) sowie doppelten (rot/grün) und dreifachen (blau/rot/grün) Breitbandfiltern als Anregungsfilter verwendet (Multiband-Filter-Systeme, AHF, Tübingen). Die Dokumentation erfolgte mit der ISIS Software Version 5.1.9 (MetaSystems).

2.2.4. Molekulargenetische Methoden

2.2.4.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte sequenzspezifisch amplifiziert, um sie anschließend molekularbiologisch weiter analysieren zu können. Der PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 95 °C. Bei dem anschließenden Annealingschritt hybridisieren kurze synthetisierte Oligonukleotide (Primer) an die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen DNA-Moleküle. Dort flankieren sie den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt und dienen als Startermoleküle für die enzymatische Nukleotidverlängerung (Elongation) durch hitzestabile DNA-Polymerasen. Der

Elongationsschritt wird beim Temperaturoptimum der Polymerase durchgeführt, im Fall der Taq-Polymerase bei 72 °C. Durch die zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte (in der Regel 25-40 Zyklen) wird die zwischen den Primern liegende DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt. Die folgenden Angaben gelten für einen Reaktionsansatz.

1 µl	DNA (100 ng/µl)
14,3 µl	dH ₂ O
2,5 µl	10x Reaktionspuffer
4 µl	25 mM MgCl ₂
1 µl	Desoxynucleotide
je 1 µl	Primer
0,2 µl	Gold Star Taq Polymerase
25 µl	gesamt

Alternativ wurden bei der Leerkontrolle statt der DNA 1 µl dH₂O zugefügt.

Thermocycler-Protokoll (T3000, Biometra):

95 °C	5 min	} 35 Zyklen
95 °C	30 s	
XX	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Zur Primeroptimierung wurden drei verschiedene Annealing-Temperaturen (XX = 55 °C, 60 °C oder 65 °C) getestet. Es wurde die Temperatur verwendet, die in der anschließenden Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.4.2) eine spezifische Bande der erwarteten Größe zeigte.

2.2.4.2. Multiplex-PCR

Zum Nachweis homozygoter Deletionen wurden sogenannte Multiplex-PCRs durchgeführt. Dabei wurde in einem Ansatz simultan zur Amplifikation der Zielsequenz im Kandidatengen auch ein Kontrolllokus amplifiziert. Eine fehlende Bande des zu untersuchenden DNA-Fragments im Agarosegel bei gleichzeitiger Anwesenheit einer Bande für den Kontrolllokus lieferte so den Beweis für eine homozygote Deletion.

2.2.4.3. Auswertung und Dokumentation von PCR-Produkten

Zur Auftrennung der PCR-Amplifikate wurde je nach Größe der Fragmente ein 2-4 %iges Agarosegel verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose (4-8 g) auf 200 ml mit TBE-Puffer aufgefüllt, in einer Mikrowelle aufgeköcht und anschließend auf Handwärme

abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel zum Erstarren in eine Gelkammer gegossen und mit einem Taschenkamm versehen. Zum Probenauftrag wurden 10 µl PCR-Produkt mit 3,5 µl Gel-Loading-Puffer versetzt. Bei Fragmenten < 1.000 bp wurde der 100 bp-DNA-Längenstandard (New England Biolabs), bei Fragmenten > 1.000 bp der Hyperladder I-Längenstandard (Bioline) verwendet. Die Auftrennung erfolgte für 1 h bei 150 V (Gelkammer Modell 41-2026, peqLab Biotechnologie). Anschließend wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht mit Hilfe des BioDoc Analyzers und der BioDoc Analyze Software Version 2.1 dokumentiert.

2.2.4.4. Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel

Um in einem Gel aufgetrennte Banden einzeln sequenzieren zu können, wurden die Banden zunächst mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem Perfectprep® Gel Cleanup Kit der Firma Eppendorf aufgereinigt.

1. Die ausgeschnittenen Agarosestücke wurden ausgewogen und mit dem 3fachen Volumen (1 mg entspricht 1 µl Volumen) Binding-Puffer versetzt.
2. Es wurde 5 min bei 50 °C und 1.000 U/min im Thermomixer (Thermomixer comfort Eppendorf) inkubiert.
3. Nach Zugabe des einfachen Volumens an Isopropanol wurde die Probe auf die Säule in einem 2 ml-Gefäß gegeben und 1 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen.
4. 750 µl Waschpuffer wurden auf die Säule gegeben und 1 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule erneut 1 min bei 12.000 g zentrifugiert.
5. Nach der Überführung der Säule in ein neues 2 ml-Gefäß wurden 15 µl dH₂O mittig auf die Säule gegeben und das PCR-Produkt durch 1 min Zentrifugation bei 12.000 g eluiert.

2.2.4.5. Denaturing High-Performance Liquid Chromatographie (DHPLC)

Die DHPLC ist ein chromatographisches Verfahren, das zur Mutationsdetektion eingesetzt wird. Es beruht im Wesentlichen auf der Detektion von Heteroduplices in PCR-Amplifikaten, die innerhalb ihrer Sequenz Variationen zeigen (106). Dazu gehören Punktmutationen, SNPs, aber auch kleine Deletionen oder Inversionen (107). Nach Denaturierung und langsamem Abkühlen der PCR-Amplifikate lagern sich die entstandenen Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen zusammen. Weichen die Sequenzen an einer Stelle voneinander ab, so

bilden sich Heteroduplices mit Mismatch-Basenpaarungen. In gleicher Menge entstehen Homoduplices, die vollständig komplementär sind (108) (Abbildung 18).

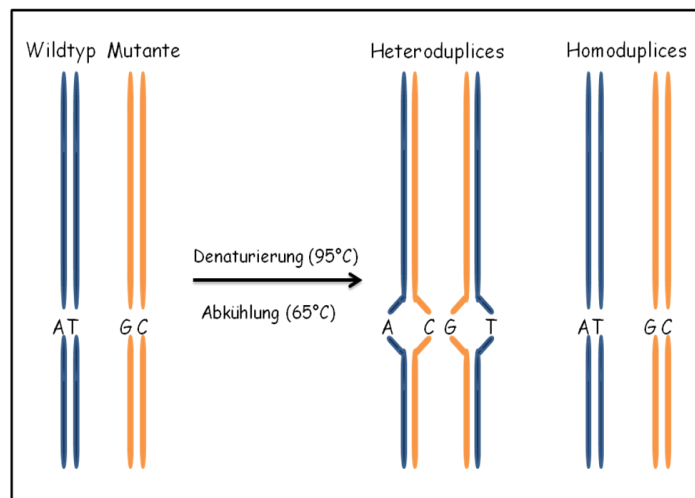


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Homo- und Heteroduplex-Formation (modifiziert nach Schwarzer, 2000)

Die entstandenen Heteroduplices können nun aufgrund der veränderten physikalischen Eigenschaften über eine spezielle Chromatographiesäule von den Homoduplices getrennt werden. Bei einer für das jeweilige Fragment optimalen Analysetemperatur und einer kontinuierlich ansteigenden Acetonitril-Konzentration der mobilen Phase eluieren die thermolabileren Heteroduplices vor den Homoduplices (109).

Polymerase-Ketten-Reaktion mit dem Expand High Fidelity PCR System

Die der DHPLC vorausgehende PCR wurde mit einem speziellen, besonders korrekt polymerisierenden Enzym durchgeführt (Expand High Fidelity PCR System, Roche). Die folgenden Angaben gelten für einen Reaktionsansatz.

2 µl	DNA
28,6 µl	dH ₂ O
5 µl	10x Puffer
8 µl	25 mM MgCl ₂ (Endkonzentration 4 mM)
2 µl	Desoxynucleosid-Triphosphate
Je 2 µl	Primer
<u>0,4 µl</u>	<u>Expand High Fidelity Enzyme Mix</u>
50 µl	gesamt

Bei der *TP53*-Mutationsanalyse wurden entsprechend für eine 2 mM Endkonzentration 4 µl bzw. für eine 2,5 mM Endkonzentration 5 µl 25 mM MgCl₂-Lösung eingesetzt und der Rest mit dH₂O aufgefüllt.

Touch down-Thermocycler-Protokoll (T3000, Biometra):

96 °C	2 min	
96 °C	30 s	} 10 Zyklen (-0,5 °C pro Zyklus)
60/63/65 °C	30 s	
72 °C	30 s	
96 °C	30 s	} 25 Zyklen
55/58/60 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5min	
4 °C	∞	

Die PCR-Produkte wurden, wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben, aufgetrennt und dokumentiert.

Duplex-Formation

Um die Duplex-Formation zu ermöglichen, wurden die PCR-Produkte in einem Thermocycler (*T3000, Biometra*) 5 min bei 95 °C denaturiert und dann langsam (0,1 °C/6 s) auf 65 °C abgekühlt. Bei Proben, deren Tumorzellgehalt >70 % betrug oder deren Tumorzellgehalt unbekannt war, wurden die PCR-Produkte der Mantelzell-Lymphome für einen zusätzlichen DHPLC-Lauf mit den PCR-Produkten einer Kontroll-DNA eines gesunden Probanden zu gleichen Teilen gemischt. Auf diese Weise konnte eine Heteroduplex-Formation auch bei Homozygotie einer Mutation in den zu untersuchenden Mantelzell-Lymphomen erreicht werden.

DHPLC-Analyse

Für die DHPLC-Analysen wurde das WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System 4500 (Transgenomic) eingesetzt. Als Chromatographiesäule wurde die DNASep® HAT Cartridge verwendet. Die Ermittlung der sequenzabhängigen Analysetemperatur erfolgte mit der Navigator-Software Version 1.7.0 (Transgenomic). Je nach Konzentration der PCR Produkte betrug das Injektionsvolumen 5-10 µl. Die DNA wurde mit einer Flussrate von 0,9 ml/min und einem linear ansteigenden Acetonitril-Gradient der mobilen Phase eluiert. Die mobile Phase war dabei aus dem WAVE®-Puffer A (0,1 M TEAA) und dem WAVE®-Puffer B (0,1 M TEAA, 25 % Acetonitril) zusammengesetzt. Die Syringe-Wash-Solution wurde zur Reinigung der Injektionsspritze zwischen den Läufen verwendet, und mit der Solution D (75 % Acetonitril) wurde die Säule zwischen den Läufen gewaschen. Zwei Mutationsstandards, der WAVE® Low

Range Mutation Standard und der WAVE® High Range Mutation Standard (Transgenomic), dienten zur Überprüfung der Gerätekalibrierung. Die Auswertung und Dokumentation der DHPLC-Läufe in Form von Absorptions-Zeit-Chromatogrammen erfolgte mit der Navigator-Software Version 1.7.0.

2.2.4.6. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Aufreinigung wurde mit Hilfe des Clean & Concentrator-5 Kits (Zymo Research) durchgeführt.

1. 30 µl des DNA-Binding-Puffers (2-faches Volumen) wurden zu 15 µl des PCR-Produktes gegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Der Mix wurde auf die Säulen des Kits geladen, die vorher auf den dazu gehörigen Reaktionsgefäßen platziert wurden. Nach Zentrifugation bei 12.000 g für 30 s wurde der Durchfluss verworfen.
2. Es wurde zweimal gewaschen. Dazu wurden 200 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und diese 30 s bei 12.000 g zentrifugiert.
3. Zur Elution wurden 10 µl dH₂O direkt auf die Säulenmatrix pipettiert und die Säule in ein neues 1,5 ml-Gefäß gestellt. Dann wurde 30 s bei 12.000 g zentrifugiert.

2.2.4.7. DNA-Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden nach dem Sanger-Verfahren sequenziert. Dieses Verfahren beruht auf dem Einbau markierter Didesoxynukleotide in den neu synthetisierten DNA-Strang, was zu einem Kettenabbruch führt (110). Die Sequenzierung wurde mit dem Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt, bei dem vier verschiedenfarbig fluoreszenz-markierte Didesoxynucleotide eingesetzt werden. Der Vorwärts- und der Rückwärtsstrang eines PCR-Fragments wurden in zwei Sequenzierungsansätzen getrennt voneinander analysiert.

Ansetzen einer Sequenzierungsreaktion:

1 µl	Big Dye Terminator
2 µl	10x Puffer
2 µl	Primer (20 pmol/µl)
1 µl	gereinigtes Amplifikat
14 µl	dH ₂ O
20 µl	total

Thermocycler-Protokoll (T3000, Biometra):

96 °C	5 min	} 25 Zyklen
96 °C	10 s	
50 °C	5 s	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

Aufreinigung der Sequenzierungs-Reaktion

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

1. Es wurden 20 µl Injektionspuffer zu der Sequenzierungsreaktion gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Danach wurde das gesamte Gemisch in ein Well der Platte überführt.
2. Die Platte wurde auf dem Halter für die Vakuumpumpe (MultiScreen HTS Vacuum Manifold, Millipore) platziert und ein Druck von 23-25 mmHg angelegt, bis die Wells der Platte vollständig getrocknet waren.
3. Jedes Well wurde zweimal mit 20 µl Injektionspuffer gewaschen. Dabei wurden die Wells wieder über das Anlegen eines Vakuums getrocknet.
4. Nachdem 30 µl dH₂O in jedes Well gegeben wurden, wurde die Platte mit einer Klebefolie abgedeckt und 10 min bei 500 U/min geschüttelt (MS3 basic, IKA).

Kapillarelektrophorese

Die aufgereinigten Sequenzierungsprodukte wurden luftblasenfrei in gerätespezifische Gefäße überführt und in einen Kapillar-Sequenzierer (Genetic Analyzer ABI PRISM 310, Applied Biosystems) zur Analyse gegeben. Die Injektionszeit variierte in Abhängigkeit von der Konzentration der Sequenzierungsprodukte zwischen 5 s und 10 s. Die Laufzeit betrug je nach Fragmentlänge 18 min oder 30 min.

Die Auswertung der Sequenzierungsreaktion erfolgte mit der Sequencing Analysis Software Version 5.2 (Applied Biosystems). Die Sequenzen wurden anschließend manuell mit den entsprechenden Gensequenzen der Datenbank (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) verglichen.

2.2.4.8. Reverse Transkription

Mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transkription Kit (Qiagen) wurde isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde 1 µg RNA in 24 µl dH₂O mit 4 µl gDNA Wipeout Puffer versetzt und 2 min bei 42°C im Thermocycler (T3000, Biometra) inkubiert.

28 µl	RNA-Ansatz
2 µl	Reverse Transkriptase
8 µl	RT-Puffer
<u>2 µl</u>	<u>Primer-Mix</u>
40 µl	gesamt

Thermocycler-Protokoll:

42 °C	15 min
95 °C	3 min
4 °C	∞

2.2.4.9. Quantitative Reverse-Transkription (RT)-PCR

Bei der quantitativen PCR kann die Bildung der Amplifikate während ihrer Synthese in Echtzeit erfasst werden. Ziel der quantitativen PCR ist es, aus der Menge der amplifizierten PCR-Produkte auf die Menge des eingesetzten Templates zu schließen. Im Falle der quantitativen RT-PCR lässt sich so die Menge an mRNA-Transkripten eines Gens zum Zeitpunkt der Zelllyse bestimmen. In dieser Arbeit wurde dazu der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet. Dieser interkaliert in doppelsträngige DNA, so dass die Bildung von PCR-Amplifikaten anhand der Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit gemessen werden kann. Der sogenannte Ct-Wert (Cycle threshold) gibt dabei den Zyklus an, in dem die Amplifikation die exponentielle Phase erreicht, und ist abhängig von der Ausgangskonzentration des Templates. Die gleichzeitige Analyse von Housekeeping-Genen, die konstitutionell exprimiert werden, ermöglicht eine relative Quantifizierung der mRNA Transkripte des zu untersuchenden Gens (111).

Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde mit dem QuantiTect® SYBR Green PCR Kit und den QuantiTect® Primerassays angesetzt (Qiagen). Die Analysen wurden im iCycler® (Bio-Rad) durchgeführt.

2 µl	cDNA
12,5 µl	2x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix
2,5 µl	Primerassay
<u>8 µl</u>	<u>nukleasefreies H₂O</u>
25 µl	gesamt

iCycler®-Protokoll:

15 min	95 °C	
15 s	94 °C	} 35-45 Zyklen
30 s	55 °C	
30 s	72 °C	
1 min	95 °C	
1 min	55 °C	
10 s	55 °C (+0,5 °C)	80 Zyklen
∞	4 °C	

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der iCycler® iQ optical System Software Version 3.0a (Bio-Rad). Zusätzlich zu der Bestimmung der Ct-Werte wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR-Produkte zu überprüfen.

2.2.5. Epigenetische Analysemethoden

Die methylierungsspezifische PCR (MSP) und die Bisulfitsequenzierung sind zwei Analyseverfahren, um in einer zu untersuchenden Probe den Methylierungsgrad bestimmter DNA-Sequenzen zu bestimmen. Von DNA-Methylierung spricht man, wenn bestimmte Cytosine in der DNA-Sequenz, die sich bei Säugetieren immer in CpG-Dinukleotiden befinden, an ihren C5-Kohlenstoffatomen eine zusätzliche Methylgruppe tragen. CpG-Dinukleotide treten vor allem in der 5'-untranslatierten Region oder im ersten Exon eines menschlichen Gens, in sogenannten CpG-Islands, auf (112). Die DNA-Methylierung dieser CpG-Islands hat meist reprimierenden Einfluss auf die Expression der dazugehörigen Gene (113). Aus diesem Grund ist die Methylierungsanalyse potentieller Tumorsuppressorgene von großem Interesse (114, 115).

2.2.5.1. Natriumbisulfit-Behandlung der genomischen DNA

Durch die Natriumbisulfit-Behandlung der DNA werden in der Sequenz alle nicht methylierten Cytosine desaminiert und so zu Uracilen konvertiert (Abbildung 19). Methylierte Cytosine hingegen werden durch die Natriumbisulfit-Behandlung nicht konvertiert und verbleiben als Cytosine in der DNA-Sequenz. Auf diese Weise lässt sich in der nachfolgenden PCR-Analyse der Methylierungsgrad der untersuchten DNA-Abschnitte rekonstruieren. Nach der PCR sind die Uracil-Basen dann allerdings durch Thymin-Basen ersetzt (116).

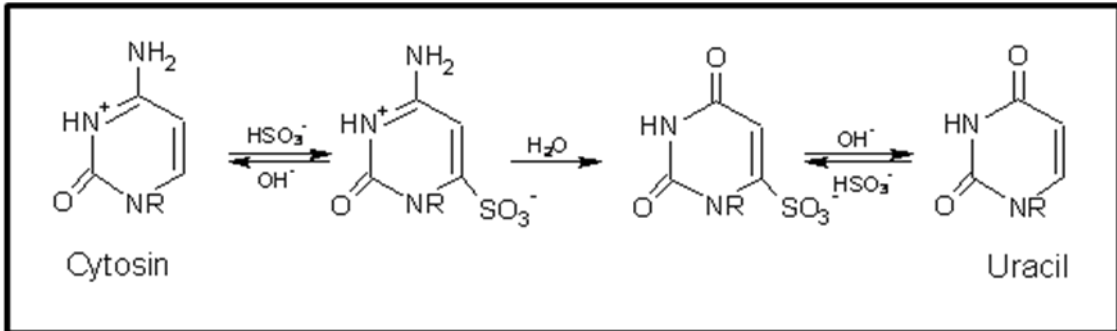


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Desaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil durch die Natriumbisulfit-Behandlung (Carew und Feinberg, 1985).

Die Bisulfitbehandlung der DNA wurde mit Hilfe des EpiTect®Bisulfite Kits (Qiagen) durchgeführt.

Bisulfitkonversion

1. 2 μg DNA wurden mit 85 μl gelöstem Natriumbisulfit-Mix und 35 μl DNA-Schutzpuffer versetzt und im Thermocycler inkubiert.

Thermocycler-Protokoll (T3000, Biometra):

5 min	99 °C
25 min	60 °C
5 min	99 °C
85 min	60 °C
5 min	99 °C
175 min	60 °C
∞	20 °C

Aufreinigung mittels EpiTect-Säulen

2. 560 μl BL-Puffer wurden zum Ansatz pipettiert, gemischt und der Mix auf die EpiTect-Säule gegeben. Bei 20.000 g wurde 1 min zentrifugiert (Mikro 200, Hettich) und der Durchfluss verworfen.
3. 500 μl Waschpuffer wurden auf die Säule pipettiert und diese 1 min bei 20.000 g zentrifugiert.
4. 500 μl Desulfonierungspuffer wurden auf die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.
5. Es wurde 2x mit 500 μl Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.
6. Es wurde nochmals 1 min bei 20.000 g zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
7. Mit 20 μl dH_2O erfolgte die Elution der DNA bei 15.000 g für 1 min.

8. Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer bestimmt (Abschnitt 2.2.1.3).

2.2.5.2. Methylierungsspezifische PCR

Bei der methylierungsspezifischen PCR (MSP) werden zwei verschiedene Primerpaare verwendet, die selektiv nur die methylierte oder unmethylierte DNA-Sequenz nach Natriumbisulfit-Behandlung amplifizieren. Dafür muss mindestens einer der beiden Primer so ausgewählt sein, dass die Primerbindungssequenz am 3'-Ende das zu analysierende CpG-Dinukleotid enthält. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel lassen sich so die methylierten oder unmethylierten Templates nach Bisulfitbehandlung nachweisen (117, 118). Als Kontrolle für die erfolgreiche Bisulfitkonvertierung kann zusätzlich ein Primerpaar verwendet werden, das spezifisch nur nicht konvertierte DNA amplifiziert, also Cytosine außerhalb von CpG-Dinukleotiden in seiner Sequenz enthält.

Für die MSP wurde das Accuprime® Taq DNA Polymerase System (Invitrogen) verwendet.

1 µl	bisulfitbehandelte DNA (100 ng/µl)
19 µl	dH ₂ O
2,5 µl	10x Puffer
je 1 µl	Primer
0,5 µl	Accuprime Taq Polymerase
25 µl	gesamt

Alternativ wurde bei der Leerkontrolle 1 µl dH₂O zugegeben. Als Positivkontrollen für die verschiedenen Primerpaare dienten bisulfitkonvertierte universell methylierte genomische DNA, bisulfitkonvertierte universell unmethylierte DNA sowie nicht bisulfitkonvertierte genomische DNA aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders.

Thermocycler-Protokoll (T3000, Biometra):

95 °C	2 min	} 35 Zyklen
95 °C	30 s	
XX	30 s	
68 °C	30 s	
4 °C	∞	

Die Annealing-Temperatur wurde so gewählt, dass die Elongation ein optimales Annealing der Primer voraussetzte. Es wurde die Temperatur verwendet (XX zwischen 55°C und 68 °C), die in der anschließenden Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.4.2) eine spezifische Bande der erwarteten Größe zeigte.

2.2.5.3. Bisulfitsequenzierung

Bei diesem Verfahren wird zunächst eine PCR an bisulfitbehandelter DNA durchgeführt, wobei die Primer so gewählt werden, dass sie unabhängig von der CpG-Methylierung binden. Um die einzelnen PCR-Produkte analysieren zu können, werden diese in Vektoren ligiert und in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Die Quantifizierung der DNA-Methylierung erfolgt anhand der Auswertung der sequenzierten Klone. Je zu analysierender Probe werden in der Regel 10 Klone sequenziert. Mit diesem Analyseverfahren können sämtliche im Template enthaltene CpG-Dinukleotide untersucht werden (119, 120).

PCR-Amplifikation

An der mit Natriumbisulfit behandelten DNA wurde zunächst mit dem Accuprime Taq DNA Polymerase System (Invitrogen) eine PCR durchgeführt.

1 µl	bisulfitbehandelte DNA (100 ng/µl)
19 µl	dH ₂ O
2,5 µl	10x Puffer
je 1 µl	Primer
0,5 µl	Accuprime Taq Polymerase
25 µl	gesamt

Alternativ wurde bei der Leerkontrolle 1 µl dH₂O zugegeben. Als Kontrollen für die anschließende Sequenzierung wurden bisulfitkonvertierte universell methylierte genomische DNA und bisulfitkonvertierte universell unmethylierte genomische DNA mitgeführt.

Thermocycler-Protokoll (T3000, Biometra):

95 °C	2 min	} 35 Zyklen
95 °C	30 s	
60 °C	30 s	
68 °C	30 s	
4 °C	∞	

Klonierung und Transformation

Zur Klonierung der PCR-Produkte wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zusammen mit dem pCR 2.1-TOPO Vektor und One Shot TOP10 chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen (Invitrogen) verwendet. Für die Klonierungsreaktion wurden 4 µl des PCR-Produktes mit 1 µl des Vektors und 1 µl der Salzlösung zunächst 30 min bei Raumtemperatur und dann 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde über Nacht bei -20 °C eingefroren.

Nachdem die bei -80 °C gelagerten TOP10-Zellen auf Eis aufgetaut waren, wurden sie mit 4 µl des Klonierungsansatzes vermischt. Die Zellen wurden dann 30 min auf Eis inkubiert, bevor sie einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 s ausgesetzt wurden. Anschließend wurden die transformierten Zellen kurz auf Eis abgekühlt und mit 250 µl des auf 37 °C vorgewärmten SOC-Mediums versetzt. Bei 37 °C wurden die Zellen 1 h im Schüttler inkubiert, um dann auf einer LB-Agar-Platte mit dem Antibiotikum Carbenicillin und X-Gal, einem Substrat der β -Galaktosidase, ausplattiert zu werden. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert (Function Line, Heraeus). Die Auswahl der erfolgreich transformierten Klone erfolgte durch die sogenannte Blau-Weiss-Selektion. Durch die Insertion des PCR-Amplifikats in die multiple Klonierungsstelle wird das Enzym β -Galaktosidase zerstört. Das Enzym β -Galaktosidase setzt den Indikator X-Gal zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl um (121). Das 5-Brom-4-Chlor-Indoxyl wird vom Sauerstoff der Luft zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlor-Indigo oxidiert. Wird die β -Galaktosidase nicht mehr gebildet, kann X-Gal nicht abgebaut werden. Diese Klone sind weiß.

Kolonie-PCR

Mit einer Kolonie-PCR sollte die Insertion des vollständigen PCR-Amplifikats überprüft werden. Der PCR-Ansatz wurde wie folgt pipettiert.

20 µl	H ₂ O
2,5 µl	10x Puffer
je 1 µl	Primer
<u>0,5 µl</u>	<u>Accuprime Taq Polymerase</u>
25 µl	gesamt

Thermocycler-Protokoll (T3000, Biometra):

95 °C	2 min	} 35 Zyklen
95 °C	30 s	
60 °C	30 s	
68 °C	30 s	
4 °C	∞	

Zum Picken der Kolonien wurden sterile Pipettenspitzen verwendet. Nachdem der Klon mit der Pipettenspitze zunächst auf eine Masterplatte (neue LB-Agar-Platte mit Carbenicillin und X-Gal) übertragen wurde, musste dieselbe Spitze im PCR-Ansatz durch Auf- und Abpipettieren gespült werden. Insgesamt wurden 30 weiße Klone von der Platte gepickt.

Die PCR-Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt (Abschnitt 2.2.4.2). Zehn von ihnen, die in der Gelelektrophorese ein Fragment der zu erwartenden Größe zeigten, wurden anschließend aufgereinigt (Abschnitt 2.2.4.6) und sequenziert (Abschnitt 2.2.4.7).

2.2.6. Proteinanalytische Methoden

2.2.6.1. Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots lassen sich Proteine identifizieren, die über ein Elektrophoresegel der Größe nach getrennt und anschließend auf eine Membran transferiert wurden. Der Nachweis erfolgt mit spezifischen Antikörpern, die das gewünschte Protein erkennen (122).

Probenvorbereitung aus frischem Heparin-Blut

1. Ungefähr 7 ml frisch entnommenes Blut wurde mit 1x RCLB-Puffer in einem 50 ml-Sarstedt-Röhrchen auf doppeltes Volumen aufgefüllt und bei 400 g 10 min zentrifugiert (J-6B, Beckmann).
2. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet weitere zweimal mit 50 ml 1x RCLB-Puffer gewaschen und jeweils 10 min bei 400 g zentrifugiert.

Probenvorbereitung aus einer Zellkultur

1. Einer Zellkultur wurden ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen entnommen, in einem 50 ml-Sarstedt-Röhrchen mit 1x PBS verdünnt und dann 10 min bei 400 g zentrifugiert.
2. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde weitere zweimal mit 50 ml 1xPBS gewaschen und wie oben zentrifugiert.

Zellysis:

Die Zellysis wurde mit dem Kit ECF Western Blotting Reagent Packs (Amersham Biosciences) durchgeführt.

1. Das gereinigte Pellet wurde mit 20 μ l Proteaseblocker versetzt, anschließend in 100 μ l Lysispuffer resuspendiert und sofort 5 min auf Eis gestellt.
2. Nach Überführung des Lysats in ein 1,5 ml-Gefäß wurde 5 min bei 20.000 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415C). Das Zytoplasmalysat wurde als Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt.
3. Das Pellet wurde erneut mit 20 μ l Proteaseblocker und 100 μ l 0,35 M NaCl-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt.

4. Es wurde wieder 5 min bei 20.000 g zentrifugiert, der Überstand mit dem Kernlysat vorsichtig entnommen und das Pellet verworfen.

Alternativ wurde die Isolierung der Gesamtproteine mit Hilfe des ProteoExtract® Complete Mammalian Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) oder für die Isolierung einzelner Proteinfractionen mit dem ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Disk-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine in einer Disk-PAGE wurden CriterionTris/HCL-Fertiggele sowie die Criterion Cell Gelkammer der Firma BIO-RAD (München, Deutschland) verwendet. Das Lysat wurde mit 100 µl PAGE-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend konnten jeweils 12 µl der Proben auf das Gel aufgetragen werden. Zunächst wurde eine Spannung von 50 V angelegt, bis die Proben die Grenze des Sammelgels erreicht hatten. Danach wurde die Spannung auf 100 V erhöht.

Western Blot

Nachdem die Proteine durch die PAGE aufgetrennt waren, wurden sie über Nacht bei 30 V in einer Tank-Blot-Apparatur (Trans-Blot Cell, BIO-RAD) auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond® ECL Nitrocellulose-Membran, Amersham Biosciences) übertragen.

Anschließend wurde die Membran kurz in dH₂O gewaschen und mit Ponceau S-Lösung gefärbt, bis die Protein-Banden deutlich sichtbar waren. Die Proteinfärbung wurde mit Hilfe des BioDoc Analyzers und der BioDoc Analyse Software Version 2.1 dokumentiert.

Immunodetektion

1. Nach kurzem Waschen mit dH₂O wurde die Membran 1 h in Blocking-Reagenz gelegt, um unspezifische Bindungen abzudecken. Anschließend wurde zweimal 15 min in TBS-T gewaschen.
2. Der primäre Antikörper sowie der β-Tubulin-Antikörper (interne Kontrolle) wurden 1:1000 in TBS-T mit 10 % Blocking-Reagenz verdünnt (alternativ wurde der Primärantikörper auch in einer 1:500 Verdünnung angesetzt). Die Membran wurde 2,5 h mit der Antikörper-Verdünnung inkubiert. Anschließend wurde zweimal 15 min mit TBS-T gewaschen.

3. Der entsprechende Sekundär-Antikörper (ECF Western Blotting Reagent Packs, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) wurde ebenfalls 1:1000 in TBS-T mit 10 % Blocking-Reagenz verdünnt und 1 h mit der Membran inkubiert.
4. Es wurde noch zweimal 15 min mit TBS-T und einmal 15 min mit TBS-Puffer gewaschen.
5. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe einer Peroxidase-Reaktion (Abbildung 20).

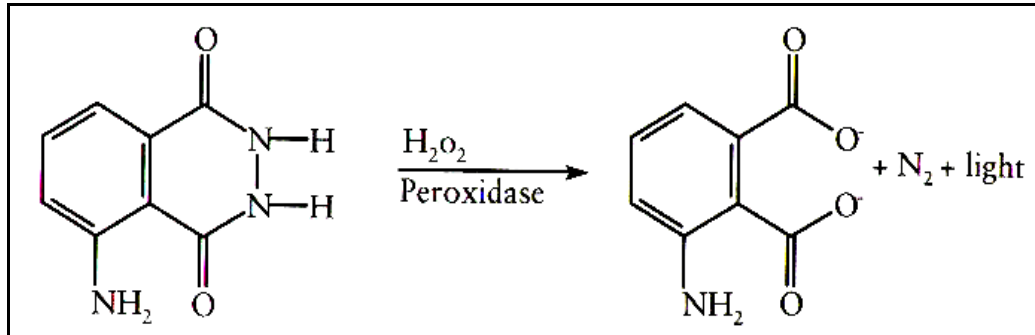


Abbildung 20: Nachweisreaktion für den Western Blot [Instructions for ECL Western Blotting Detection Reagent and Analysis System, Amersham Biosciences]

Es wurde das Kit ECL Western Blotting Detection Reagents and Analysis System (Amersham Biosciences) verwendet. Ein Röntgenfilm wurde anschließend 5 min in einer Fotomappe mit der vorbereiteten Membran exponiert und anschließend in einem automatischen Röntgenfilm-Entwickler der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, entwickelt.

2.2.6.2. Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit der Immunfluoreszenzmikroskopie kann ein Protein in der Zelle nachgewiesen und subzellulär lokalisiert werden. Voraussetzung für dieses Verfahren ist ein geeigneter Antikörper, der spezifisch das gewünschte Protein erkennt. Mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers, der an den Primärantikörper bindet, kann das Protein dann lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden (122). In dieser Arbeit wurde die Immunfluoreszenz sowohl an Paraffin- als auch an Kryoschnitten durchgeführt.

Vorbereitung der Paraffinschnitte

1. Zum Entparaffinisieren der Objektträger wurde dreimal 5 min bei Raumtemperatur in Roti®-Histol inkubiert. Die Hydrierung der Schnitte erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe (absolutes, 85 % und 70 % Ethanol). Anschließend wurde 5 min in dH_2O gewaschen.
2. Im Schnellkochtopf wurde 2 min 40 s in 1 mM EDTA-Puffer (pH 8,0) unter höchster Druckaufbaustufe gekocht. Danach wurde 2 min in dH_2O gewaschen.

Vorbereitung der Kryoschnitte

1. Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenen Objektträger wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und zunächst 30 min an der Luft getrocknet.
2. Danach wurden sie 15 min in Aceton inkubiert und anschließend erneut an der Luft getrocknet.

Immunfärbung

1. Die vorbereiteten Objektträger wurden zunächst kurz mit PN-Puffer gewaschen.
2. Der Primärantikörper wurde mit PNM-Puffer verdünnt und jedes Präparat für 30 min bei Raumtemperatur mit $100\text{ }\mu\text{l}$ inkubiert. Anschließend wurde kurz mit PN-Puffer gewaschen.
3. Der entsprechende fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 594 Anti-Maus-Antikörper aus dem Kaninchen bzw. Alexa Fluor® 594 Anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurde ebenfalls mit PNM-Puffer verdünnt und $100\text{ }\mu\text{l}$ dieser Verdünnung 30 min bei Raumtemperatur mit den Präparaten inkubiert. Danach wurde kurz mit PN-Puffer und daraufhin 2 min mit dH_2O gewaschen.
4. Nach einer 5 min DAPI-Färbung wurde kurz mit SSC-Puffer gewaschen und anschließend mit Vectashield® eingedeckt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des unter 2.2.3.1.3 beschriebenen Fluoreszenzmikroskops (Axioskop 2, Zeiss). Die Dokumentation wurde mit Hilfe der ISIS Software Version 5.1.9 (MetaSystems) durchgeführt.

2.2.6.3. Immunhistochemie

Wie bei der Immunfluoreszenzmikroskopie handelt es sich auch bei der Immunhistochemie um eine spezifische Antikörperfärbung, um bestimmte Proteine in einer Zelle nachweisen und subzellulär lokalisieren zu können. Dieses Verfahren eignet sich besonders zur Untersuchung des gesamten Expressionsmusters eines Gewebes oder anderer vielzelliger Strukturen (122). Bei der hier durchgeführten immunhistochemischen Färbung von Paraffingewebe war der sekundäre Antikörper mit einem Peroxidase-Detektionssystem konjugiert, welches das farblose Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu seinem braunen Endprodukt umsetzt. Die Immunhistochemie wurde freundlicherweise durch das Labor von PD Dr. Wolfram Klapper (Institut für Pathologie, Sektion Hämatopathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt.

2.3. Bioinformatische Analyse

2.3.1. Auswertung der GINI-Daten

Die statistische Auswertung der Daten wurde von der Dipl. Bioinformatikerin Claudia Döring am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt (Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Für die Normalisierung wurde dabei die Quantile-Normalisierung nach Bolstad angewendet (123). Die differentielle Expression wurde mittels t-Test berechnet und die Falsch-Positiven wurden über den „False Discovery Rate“-Algorithmus nach Benjamini & Hochberg (124) bestimmt. Die Bestimmung von Kandidatengenenen nach den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Auswahlkriterien erfolgte selbstständig mit Hilfe der Microsoft Software Excel 97 in Kiel.

2.3.2. Auswertung der ArrayCGH-Daten

Die bioinformatische Analyse der ArrayCGH-Daten wurde bereits vor Beginn dieser Promotionsarbeit von Mitarbeitern der Abteilung für Hämatologie und medizinische Onkologie der Universität von Valencia (Valencia, Spanien) durchgeführt, wo die Daten auch generiert wurden. Das Verfahren zur Berechnung der Copy Number sowie die angewandten Kriterien bei der Bestimmung chromosomaler Imbalancen sind in der Publikation von Rubio-Moscardo et al., 2005 (103) beschrieben.

2.3.3. Auswertung der 100K GeneChip®-Daten

Mit Unterstützung des Instituts für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) der Universität Leipzig wurde eine umfassende bioinformatische Analyse der 100K GeneChip®-Daten der Mantelzell-Lymphome durchgeführt. Referenz und Tumor Arrays wurden gemeinsam mit dem BRLMM Algorithmus (125) genotypisiert. Dabei wurden die Standard-Parameter (Score Threshold = 0,5, Prior Size = 10.000, DM Threshold = 0,17) verwendet. Als Referenz für Copy Number- und LOH-Analysen wurden die 100K GeneChip®-Daten von 90 HapMap-DNAs (30 CEPH Trios) verwendet. Diese wurden von Affymetrix zur Verfügung gestellt (http://www.affymetrix.com/support/technical/sample_data/hapmap_trio_data.affx). Eine vollständige Liste der verwendeten Affymetrix Referenz-Daten befindet sich im Anhang 1.

2.3.3.1. Copy Number-Analyse

Die Copy Number-Analyse wurde mit Hilfe der CNAG Software V2.0 durchgeführt (104). Xba I- und Hind III-Arrays wurden für die Analyse kombiniert. Die Segmentierung der Rohdaten wurde nach dem in der Software implementierten Hidden Markov Model (HMM) durchgeführt (104). Dabei wurden die HMM-Parameter individuell für jeden Array in Abhängigkeit von der Hybridisierungsqualität und dem Tumorzellgehalt adjustiert. Mit Rücksicht auf Ausreißer und technische Artefakte wurden für die weitere Analyse nur aberrante Segmente berücksichtigt, die mindestens 10 zusammenhängende SNP-Marker umfassten. Aberrationen mit Copy Number ≥ 5 wurden als High-Level-Amplifikationen klassifiziert. Für das X-Chromosom beim männlichen Geschlecht galt bereits eine Copy Number ≥ 4 als High-Level-Amplifikation.

2.3.3.1.1. Analyseverfahren zur Detektion homozygoter Deletionen

Für die Detektion homozygoter Deletionen wurden zwei verschiedene Analyseverfahren angewendet, ein liberales und ein sensitives Verfahren. In dem liberalen Verfahren wurden alle Regionen, die nach der im Abschnitt 2.3.3.1 beschriebenen Berechnung und Segmentierung eine Copy Number = 0 zeigten, als homozygote Deletion klassifiziert. In dem sensitiven Analyseverfahren zur Detektion homozygoter Deletionen wurde die Copy Number-Analyse mit Hilfe der Copy Number Analysis Tool (CNAT)-Software Version 2.0 (Affymetrix) bestimmt. Dazu wurden die Daten der Xba I- und Hind III-Arrays vereint und für die Analyse in der CNAT-Software ein 0,5 Mb-Segmentierungsfiler eingestellt. Anschließend wurden die Daten in die Excel 97 Software (Microsoft) exportiert und manuell nach Regionen durchsucht, in denen mindestens zwei benachbarte SNPs eine Copy Numer $\leq 0,6$ zeigten und von denen mindestens einer bei der Genotypisierung einen „NoCall“ ergeben hatte. Das sensitive Analyseverfahren zur Detektion homozygoter Deletionen wurde im Rahmen dieser Arbeit selbstständig am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein entwickelt und durchgeführt.

2.3.3.1.2. Abgleich mit Copy Number-Variationen

Die ermittelten Regionen, die rekurrente Imbalancen, High-Level-Amplifikationen oder homozygote Deletionen zeigten, wurden anschließend mit der „Database of Genomic Variants“ (<http://projects.tcag.ca/variation/>) abgeglichen. In dieser Datenbank sind aus einer Reihe verschiedener Studien polymorphe Regionen zusammengetragen, in denen auch

bei gesunden Individuen chromosomale Imbalancen nachgewiesen werden konnten. In den 100K GeneChip®-Daten detektierte Regionen, die von einer bekannten Copy Number-Variation zu $\geq 50\%$ überdeckt waren, wurden als CNV klassifiziert.

2.3.3.2. LOH-Analyse und Identifikation von pUPDs

LOH-Regionen wurden mit Hilfe einer auf Hidden-Markov-Modellen (HMM) basierenden Methode bestimmt (126). Sie ist in der dChip-Software (105, 127) implementiert. Es wurde die HMM considering haplotype (LD-HMM) (126) Methode verwendet, um die Abhängigkeit benachbarter SNP-Marker zu berücksichtigen. Die LOH Call Threshold (126) wurde auf den Standardwert 0,5 gesetzt. Zusätzlich wurde eine empirische Haplotypkorrektur (126) angewendet. Dadurch wurden putative LOH-Regionen in den Tumoren zurückgewiesen, wenn einige euploide Referenzfälle eine große Übereinstimmung mit dem Tumorfall bezüglich der Genotypen in der entsprechenden Region zeigten. LOH-Regionen wurden als pUPD bezeichnet, wenn keine Copy Number-Aberrationen in der entsprechenden Region auftraten. Wenn in einer LOH-Region Teilbereiche Copy Number-Veränderungen zeigten, so wurden diploide Teilbereiche der LOH-Region als pUPD bezeichnet, wenn sie mindestens 50 zusammenhängende SNP-Marker umfassten.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten mit GINI, BAC-/PAC-basierter ArrayCGH und dem 100K GeneChip® Mapping drei verschiedene Microarray-Technologien eingesetzt werden, um sekundäre genetische Veränderungen bei Mantelzell-Lymphomen zu detektieren und zu charakterisieren. Das Ziel war einerseits die genomweite Identifikation neuer Tumorsuppressor- und Onkogene, die für die Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms von Bedeutung sind, andererseits die Identifikation einer gonosomenassoziierten Aberration, die mit der Prädominanz des männlichen Geschlechts assoziiert sein könnte. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit in der Reihenfolge des methodischen Vorgehens unter Verwendung der verschiedenen Microarray-Plattformen dargestellt. Im Anschluss daran wird gezeigt, wie einzelne Aberrationen und Kandidatengene mittels molekularzytogenetischer, molekulargenetischer und proteinanalytischer Analyseverfahren genauer charakterisiert wurden, um so deren Bedeutung für die Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms aufzuklären.

3.1. Identifikation potentieller Tumorsuppressorgene mittels GINI

Mit der GINI-Microarray-Analyse sollten in den beiden Mantelzell-Lymphom-Zelllinien GRANTA-519 und NCEB-1 potentielle Tumorsuppressorgene identifiziert werden, die in diesen Zellen durch Mutationen inaktiviert wurden. Diese beiden Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurden ausgesucht, da sie zu den wenigen der 13 etablierten t(11;14)-positiven Zelllinien gehören, deren Entität eindeutig bestimmt werden konnte (128) und bei denen eine hohe Proliferationsrate die pharmakologische Behandlung mit Emetin vereinfachte. Zu den Mutationen, die mit der GINI-Analyse detektiert werden können, gehören Punkt- oder Frameshiftmutationen, die ein vorzeitiges Stoppcodon in die kodierende Sequenz eines Gens einführen und so Nonsense-Transkripte verursachen (Abschnitt 2.2.2.1). Der verwendete Microarray (Human Genome Survey Microarray V2.0, Applied Biosystems) bestand aus 32.878 Tags für die Untersuchung von 29.098 Genen. Von beiden Zelllinien wurde die mRNA einer mit Emetin behandelten und einer unbehandelten Zellkultur analysiert, um inaktivierte potentielle Tumorsuppressorgene zu identifizieren, die in den mit Emetin behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine Anreicherung bestimmter mRNA-Transkripte zeigten. Die Differenz der Signalintensitäten wurde durch die sogenannte „Fold-Change“ angegeben. Je größer dieser Wert, desto größer war die Transkriptanreicherung nach Emetin-Behandlung. In die Liste der Kandidatengene wurden

nur die Gene aufgenommen, deren Fold-Change einen Wert > 4 zeigten. Um stabilisierte Nonsense-Transkripte von Transkripten zu unterscheiden, deren Expression durch die pharmakologische Behandlung hochreguliert war, wurden drei Hodgkin-Lymphom-Zelllinien als Kontrollen parallel prozessiert. Bei der Suche nach Kandidatengen wurden dann alle Gene ausgeschlossen, die in mindestens einer der Kontrollzelllinien ebenfalls eine deutliche Transkriptanreicherung (Fold-Change > 2) zeigten. Bei der Zelllinie GRANTA-519 konnten 376 Gene mit einer Fold-Change > 4 identifiziert werden. 350 dieser Gene waren auch in mindestens einer der Kontrollzelllinien angereichert. Die übrigen 26 Gene sind in Tabelle 12 zusammengestellt. Einige dieser Gene wurden gleich durch mehrere Tags auf dem Microarray analysiert. Meistens zeigte allerdings nur jeweils einer dieser Tags eine Fold-Change > 4 . Nur bei dem Gen *OAS1* wurde von beiden Tags, die auf dem Array vorhanden waren, eine Transkriptanreicherung nach Emetin-Behandlung detektiert (Tabelle 12). Eine Auswertung für die Mantelzell-Lymphom-Zelllinie NCEB-1 erfolgte analog, ist hier aber nicht dargestellt, da inzwischen eine Arbeit publiziert wurde, die stabil integrierte Mauschromosomen in den NCEB-1-Zellen beschreibt (102). Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse scheint die NCEB1-Zelllinie als Mantelzell-Lymphom-Modell nicht geeignet und wurde von allen weiteren Analysen ausgeschlossen.

Tabelle 12: Gene, die nach Emetin-Behandlung in der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 eine Transkriptanreicherung (Fold Change > 4) im Gegensatz zu den drei Hodgkin-Zelllinien (Fold-Change < 2) zeigten, sortiert nach ihrer Chromosomenlokalisierung.

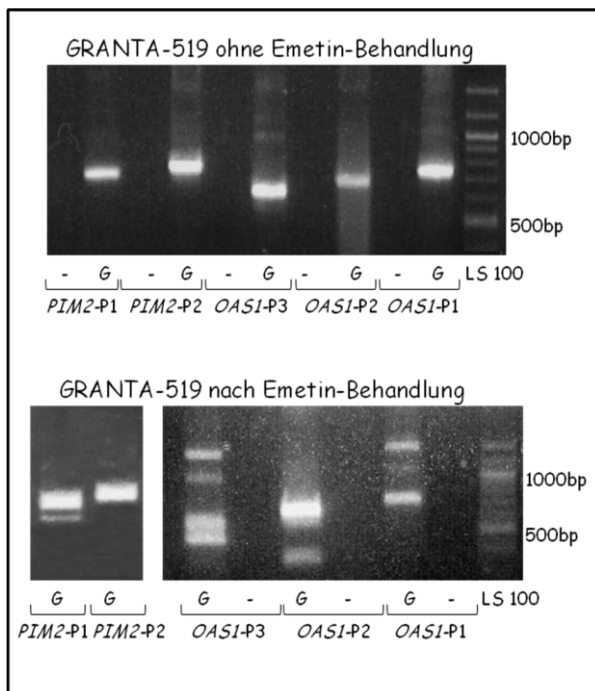
Gensymbol	Name des Gens	Lokus*	Position [bp]*	Anzahl der genspezifischen Tags auf dem Array	Anzahl der genspezifischen Tags mit einer Fold-Change > 4
<i>TNFRSF8</i>	Tumornecrosisfaktor Receptor Superfamily, member 8	1p36.22	12.057.700-12.138.528	1	1
<i>PDZK1</i>	PDZ Domain containing 1	1q21.1	143.216.770-143.253.117	2	1
<i>AK093200.1</i>	EST	1q42.2	229.169.735-229.185.196	1	1
<i>MRAS</i>	Muscle RAS Oncogene Homolog	3q22.3	139.574.405-139.607.073	1	1
<i>HTRA3</i>	Serine Protease HTRA3	4p16.1	8.389.563-8.426.901	1	1
<i>CPZ</i>	Carboxypeptidase Z	4p16.1	8.712.506-8.739.557	1	1
<i>KCNK5</i>	Potassium Channel, Subfamily K, member 5	6p21.2	39.264.727-39.305.229	1	1
<i>ACHE</i>	Acetylcholinesterase	7q22.1	100.132.269-100.138.147	1	1
<i>OCM</i>	Oncomodulin	7q21.3	97.258.663-97.264.067	2	1
<i>DKFZp547F072</i>	hypothetical Protein DKFZp547F072	8q24.3	145.525.263-145.526.328	2	1
<i>CEBPD</i>	CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP), delta	8q11.21	48.812.029-48.813.323	1	1
<i>LCN6</i>	Lipocalin 6	9q34.3	136.914.309-136.918.817	3	1
<i>MRPS16</i>	mitochondrial ribosomal Protein S16	10q22.2	74.678.608-74.682.457	3	1
<i>FLJ30213</i>	hypothetical protein FLJ30213	11q12.1	57.169.143-57.173.824	1	1
<i>DDX11</i>	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) Box Polypeptide 11	12p11.21	31.118.077-31.148.992	2	1
<i>OAS1</i>	2',5'-Oligoadenylate Synthetase 1	12q24.13	111.807.532-111.820.427	2	2
<i>KIAA1622</i>	KIAA1622	14q32.13	93.710.402-93.815.825	2	1

Gensymbol	Name des Gens	Lokus*	Position [bp]*	Anzahl der genspezifischen Tags auf dem Array	Anzahl der genspezifischen Tags mit einer Fold-Change > 4
<i>CALML4</i>	Calmodulin-like 4	15q23	66.270.480-66.285.502	1	1
<i>SCNN1G</i>	Sodium Channel, nonvoltage-gated 1, gamma	16p12.1	23.101.541-23.135.701	1	1
<i>MT1H</i>	Metallothionein 1H	16q12.2	55.261.275-55.262.541	2	1
<i>CCL2</i>	Chemokine (C-C motif) Ligand 2	17q12	29.606.409-29.608.331	1	1
<i>AOC3</i>	Amine Oxidase, Copper containing 3	17q21.31	38.256.727-38.263.664	1	1
<i>AK125941.1</i>	EST	17q25.3	77.704.787-77.708.118	1	1
<i>SLC16A3</i>	solute Carrier Family 16, member 3	17q25.3	77.780.236-77.790.640	1	1
<i>SECTM1</i>	secreted and transmembrane 1	17q25.3	77.872.189-77.884.930	1	1
<i>PIM2</i>	Serin/Threonin Proteinkinase PIM2	Xp11.23	48.526.709-48.532.532	1	1

* NCBI Build 35

3.1.1. Untersuchung von Kandidatengenen

Zunächst wurde anhand bereits publizierter ArrayCGH-Daten von Mantelzell-Lymphomen (Tabelle 1) überprüft, ob die in Tabelle 12 dargestellten Kandidatengene aus der GINI-Analyse in Regionen lokalisiert sind, die bei Mantelzell-Lymphomen als rekurrent deletiert beschrieben worden waren. Dies traf allerdings für keines der aufgeführten Gene zu. Das *PIM2*-Gen wurde aufgrund seiner X-chromosomalen Lokalisation für die Mutationsanalyse ausgewählt, da auf diesem Chromosom ein Tumorsuppressorgen vermutet wird, welches für die männliche Prädominanz des Mantelzell-Lymphoms eine Rolle spielen könnte. Als zweites Kandidatengen wurde das *OAS1* untersucht, da für dieses Gen von beiden Tags auf dem Microarray eine Transkript-Anreicherung in der Emetin-behandelten Probe detektiert wurde. Für die Mutationsanalyse wurden die proteinkodierenden



Sequenzen von *PIM2* und *OAS1* ausgehend von der cDNA der mit Emetin behandelten Zelllinie GRANTA-519 amplifiziert. Zum Vergleich wurde auch die cDNA der unbehandelten GRANTA-519-Zellen amplifiziert (Abbildung 21).

Abbildung 21: RT-PCR-Analyse des *PIM2*- und des *OAS1*-Gens der unbehandelten und der mit Emetin behandelten GRANTA-519-Zelllinie (G). Für die Negativ-Kontrolle (-) wurde dem PCR-Ansatz dH₂O statt cDNA zugefügt. Für das *PIM2*-Gen sind beide (P1, P2), im Falle des *OAS1* nur drei der insgesamt vier verschiedenen Primeransätze gezeigt (P1-P3). Das Auftreten zusätzlicher Banden nach Emetin-Behandlung der Zelllinie ist deutlich erkennbar.

Bereits die Auftrennung der RT-PCR-Amplifikate im Agarosegel zeigte, dass in der mit Emetin behandelten im Vergleich zur unbehandelten GRANTA-519-Zelllinie alternative Transkriptvarianten angereichert waren. Die RT-PCR-Produkte der unbehandelten GRANTA-519-Zelllinie zeigte für alle Primerpaare jeweils nur eine spezifische Bande im Agarosegel. Im Gegensatz dazu ergab die Auftrennung der Amplifikate der mit Emetin behandelten GRANTA-519-Zelllinie bis zu drei zusätzliche Banden (Abbildung 21). Die anschließende Sequenzierung der verschiedenen PCR-Fragmente zeigte, dass es sich dabei um unterschiedliche Spleißvarianten der beiden Gene handelte. In einigen dieser Spleißvarianten konnte ein durch Verschiebung des Leserasters entstandenes vorzeitiges Stoppcodon identifiziert werden. In Abbildung 22 ist am Beispiel zweier in der mit Emetin behandelten GRANTA-519-Zelllinie identifizierter Transkripte des *OAS1*-Gens gezeigt, wie durch alternatives Spleißen ein verkürztes Transkript entstanden ist, das ein vorzeitiges Stoppcodon trug. In der unbehandelten GRANTA-519-Zelllinie wurde dieses Nonsense-Transkript vermutlich durch den NMD-Pathway abgebaut.

In keinem der beiden Gene, *OAS1* und *PIM2*, konnte bei der Sequenzierung der Transkripte eine Mutation identifiziert werden. In den *OAS1*-Transkripten wurden zwar vier Sequenzveränderungen in Form eines Einzel-Basen-Austausches detektiert, diese waren aber bereits als SNPs in der Datenbank des Genome Browsers (NCBI Build 35) eingetragen. Einer dieser SNPs betraf die Spleißstelle an der Intron/Exon-Grenze des Exons 6, wodurch eine verlängerte Transkriptvariante mit zusätzlicher intronischer Sequenz entstand. Durch die Verschiebung des Leserasters entstand zudem ein vorzeitiges Stoppcodon. Die drei anderen SNPs verursachten kein vorzeitiges Stoppcodon in der kodierenden Sequenz. Die Sequenzierungsergebnisse mit allen identifizierten Transkripten, Spleißvarianten und SNPs sind in Anhang 2 zusammengefasst.

Zusammenfassend konnten mit Hilfe der GINI-Technologie in der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 insgesamt 26 Gene identifiziert werden, die durch die Emetin-Behandlung im Vergleich zu Kontrollen angereichert waren. Die Sequenzierung von zunächst zwei Kandidatengenen konnte nur eine Vielzahl angereicherter Spleißvarianten aber keine Stopp- oder Frameshift-Mutation identifizieren. Da eine vollständige Sequenzierung aller angereicherten Transkripte jedes Kandidatengens sehr aufwändig gewesen wäre und die Transkriptanreicherung der identifizierten Gene möglicherweise nur durch verschiedene Nonsense-Spleißvarianten bedingt war, wurde auf die Sequenzanalyse weiterer Gene zunächst verzichtet. Auch Vergleiche mit den später bei der ArrayCGH (Abschnitt 3.2) und dem 100K GeneChip® Mapping (Abschnitt 3.3) ermittelten aberranten Chromosomenregionen und den darin enthaltenen Kandidatengenen lieferten keine ergänzenden Hinweise auf ein Tumorsuppressorgen unter den mittels GINI identifizierten Kandidatengenen.

3.2. Auswertung der ArrayCGH-Daten für das X-Chromosom

Für die Untersuchung geschlechtschromosomaler Veränderungen wurden von der Abteilung für Hämatologie und medizinische Onkologie der Universität von Valencia (Valencia, Spanien) die bereits generierten ArrayCGH-Daten von 68 primären Mantelzell-Lymphomen und neun Mantelzell-Lymphom-Zelllinien zur Verfügung gestellt. Da der verwendete BAC-/PAC-Array keine Klone zur Analyse des Y-Chromosoms enthielt, wurden ausschließlich die Daten für das X-Chromosom ausgewertet. Ausnahme waren die Gene der pseudoautosomalen Region des Y-Chromosoms, die aufgrund ihrer Homologie zu den X-chromosomalen Genen durch den Microarray analysiert wurden. Insgesamt wurde das X-Chromosom von 61 der 2464 Klone des Microarrays abgedeckt, was einer Auflösung von etwa 2,5 Mb entspricht. Anhand dieser Daten konnten zwei aberrante X-chromosomale Regionen in den untersuchten Mantelzell-Lymphomen identifiziert werden, die im Folgenden ausführlicher beschrieben sind. Dabei handelte es sich einerseits um eine homozygote Deletion in Xp22.3 andererseits um rekurrente chromosomale Zugewinne im langen Arm des X-Chromosoms.

3.2.1. Chromosomale Verluste des X-Chromosoms

In einem der primären Mantelzell-Lymphome eines männlichen Patienten [MCL 114 (103)] konnte durch die ArrayCGH eine hemizygoten Deletion in der Chromosomenregion Xp22.3 identifiziert werden (Abbildung 23). Die deletierte Region erstreckte sich von Xpter bis etwa

9 Mb von pter und umfasste somit auch die pseudoautosomale Region in Xp22.33. Deshalb wird die Deletion im Folgenden als hemi-/homozygot bezeichnet. Die Gene, die sich innerhalb der deletierten Region befanden, sind in Tabelle 13 aufgeführt.

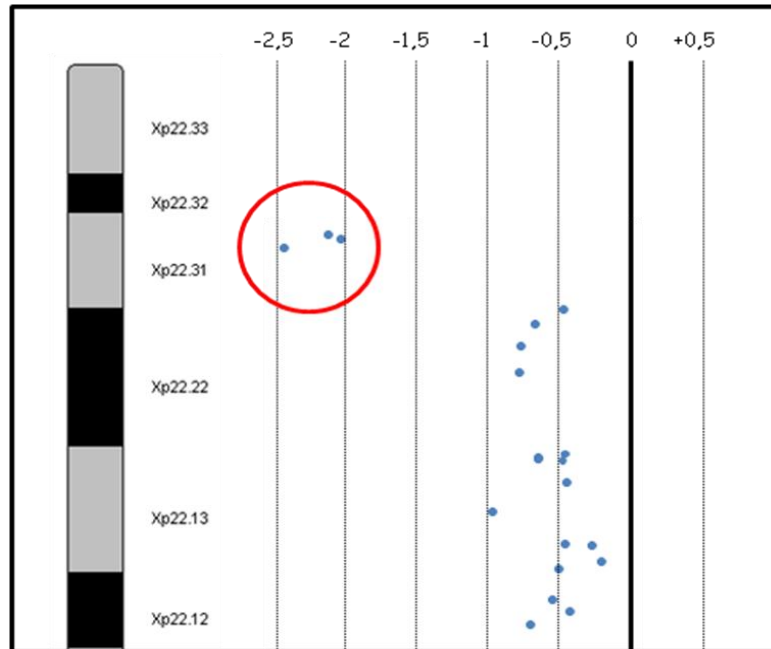


Abbildung 23: ArrayCGH-Befund der terminalen Region des kurzen Arms des X-Chromosoms von dem primären Mantelzell-Lymphom mit einer hemi-/homozygoten Deletion in Xp22.3. Die drei Klone, mit denen die Deletion detektiert wurde, sind rot eingekreist.

Tabelle 13: Gene innerhalb der hemi-/homozygoten Deletion in Xp22.3

Chromosomen- bande*	Position [bp]*	Gensymbol	Name des Gens
Xp22.33	132.992-160.020	<i>PLCXD1</i>	Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C
	161.426-170.887	<i>GTPBP6</i>	GTP Binding Protein like
	264.970-272.590	<i>PPP2R3B</i>	Protein Phosphatase 2, regulatory Subunit B
	555.079-590.146	<i>SHOX</i>	short stature Homeobox
	772.383-982.187	<i>ATRX</i>	α -Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked
	1.324.940-1.326.617	<i>PGAM4</i>	Phosphoglycerate Mutase Family 4
	1.355.173-1.396.262	<i>CSF2RA</i>	Colony stimulating Factor 2 Receptor, alpha
	1.383.007-1.393.032	<i>TAF9B</i>	Transcription associated Factor 9B
	1.499.188-1.545.408	<i>IL3RA</i>	Interleukin 3 Receptor, alpha Precursor
	1.548.872-1.554.821	<i>SLC25A6</i>	solute Carrier Family 25, member A6
	1.565.861-1.615.583	<i>ASMTL</i>	Acetylserotonin O-Methyltransferase-like
	1.625.295-1.699.827	<i>P2RY8</i>	G-Protein coupled purinergic Receptor P2Y8
	1.672.024-1.687.565	<i>CRLF2</i>	Cytokine Receptor-like Factor 2
	1.754.313-1.765.236	<i>SFRS17A</i>	Splicing Factor, Arginine/Serine-rich 17A
	1.758.175-1.805.801	<i>ASMT</i>	Acetylserotonin O-Methyltransferase
	2.397.816-2.412.369	<i>ZBED1</i>	Ac-like transposable Element
	2.602.589-2.652.709	<i>CD99</i>	CD 99 Antigen
	2.663.476-2.727.327	<i>XG</i>	XG Glycoprotein
2.741.507-2.793.944	<i>GYG2</i>	Glycogenin 2	
2.825.016-2.840.677	<i>ARSD</i>	Arylsulfatase D	

Ergebnisse

Chromosomen- bande*	Position [bp]*	Gen-sym-bol	Name des Gens
Xp22.33	2.846.213-2.875.672	<i>ARSE</i>	Arylsulfatase E
	2.918.015-2.944.786	<i>ARSH</i>	Arylsulfatase H
	2.978.214-3.024.108	<i>ARSF</i>	Arylsulfatase F
	3.219.970-3.258.042	<i>MXRA5</i>	Matrix-remodelling associated 5
	3.519.302-3.624.839	<i>PRKX</i>	Proteinkinase, X-linked
Xp22.32	5.669.981-5.929.235	<i>NLGN4X</i>	Neurologin 4, X-linked
Xp22.31	6.311.396-6.312.895	<i>VCX3A</i>	variable charge, X-linked 3A
	6.826.697-6.925.925	<i>HDHD1A</i>	Haloacid Dehalogenase-like Hydrolase Domain
	6.997.233-7.132.416	<i>STS</i>	Steroid-Sulfatase
	7.620.955-7.621.919	<i>VCX</i>	variable charge, X chromosome
	7.678.440-7.705.213	<i>PNPLA4</i>	Patatin-like Phospholipase Domain containing 4
	7.947.721-7.949.044	<i>VCX2</i>	variable charge, X-linked 2
	8.242.607-8.244.287	<i>VCX3B</i>	variable charge, X-linked 3B
	8.306.651-8.509.963	<i>KAL1</i>	Kallmann Syndrom Protein 1
	8.568.572-8.579.160	<i>FAM9A</i>	Family with Sequence Similarity 9, member A
8.802.772-8.811.904	<i>FAM9B</i>	Family with Sequence Similarity 9, member B	

Die anschließend mittels FISH untersuchten Genorte sind durch Fettschrift hervorgehoben.

* NCBI Build 35

Zu den 36 Genen, die in der deletierten Region lokalisiert waren, gehörten unter anderem die Gene *KAL1* (Kallmann Syndrom Protein 1) und *STS* (Steroid-Sulfatase). Zum spezifischen Nachweis dieser beiden Genloci in Xp22.31 waren kommerzielle FISH-Assays erhältlich (LSI KAL/CEP X Control Probe und LSI STS/CEP X Control Probe, Abbott/Vysis). Zunächst mussten für die beiden verwendeten FISH-Assays die Nachweisgrenzen für die Detektion chromosomaler Verluste an Interphasen bestimmt werden. Dazu wurden jeweils 200 Zellkerne aus dem peripheren Blut fünf gesunder Probanden mit normalem Karyotyp ausgewertet. Die Nachweisgrenze wurde dabei definiert als Mittelwert falsch positiver Ergebnisse in den Kontrollpersonen plus drei Standardabweichungen (129). Die ermittelten Nachweisgrenzen für chromosomale Verluste lagen bei 9,1 % für die *KAL1*-Sonde und 3,0 % für die *STS*-Sonde. Mit Hilfe dieser lokusspezifischen Sonden konnte die hemizygoten Deletion in jeweils 78 von 100 ausgewerteten Zellen des Mantelzell-Lymphoms bestätigt werden (Abbildung 24). Der mit einer kommerziellen FISH-Sonde zum spezifischen Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32) (Abbott/Vysis) bestimmte Tumorzellgehalt der Probe lag bei 80%. Aufgrund des Nachweises von mehr als 20 % Zellen mit normaler Signalkonstellation kann ausgeschlossen werden, dass es sich um eine CNV handelt, da diese als konstitutionelle Variante in allen Zellen nachweisbar sein sollte.

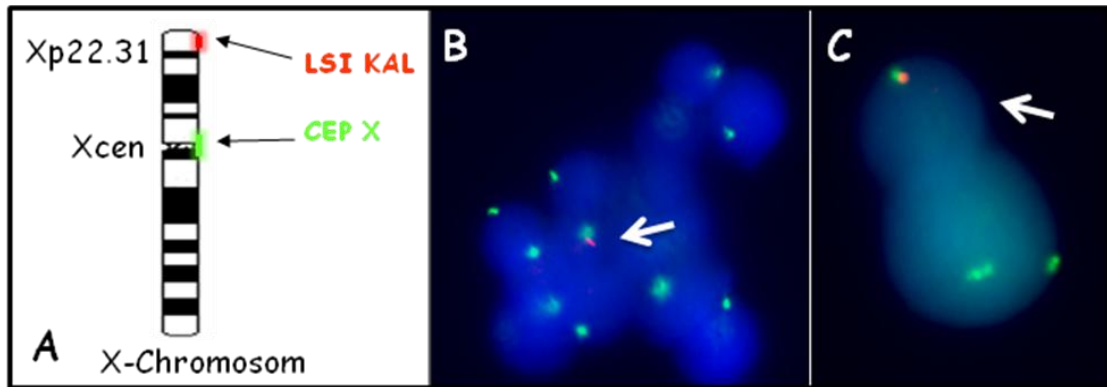


Abbildung 24: FISH-Analyse des *KAL1*-Lokus an dem Mantelzell-Lymphom mit der in den ArrayCGH-Daten detektierten hemi-/homozygoten Deletion in Xp22.3. **A)** Lokusspezifischer FISH-Assay mit einer rot markierten Sonde für den *KAL1*-Lokus in Xp22.31 und einer grün markierten Kontrollsonde für das Zentromer des X-Chromosoms. **B)** Bis auf einen (Pfeil) zeigen alle Interphasekerne des untersuchten Lymphoms kein rotes Signal für den *KAL1*-Lokus. **C)** Eine vermutlich tetraploide Mantelzell-Lymphom-Zelle mit zwei X-Chromosomen zeigt eine *KAL1*-Deletion neben einer Zelle mit normaler Signalkonstellation (Pfeil).

Um zu untersuchen, ob die *KAL1*- und *STS*-Loci in Mantelzell-Lymphomen rekurrent von Deletionen betroffen sind, wurden 16 weitere primäre Mantelzell-Lymphome mittels FISH analysiert. In keinem dieser Fälle konnte eine Deletion des *KAL1*- oder *STS*-Gens beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte die hemi-/homozygote Deletion in Xp22.3 zwar durch zwei verschiedene FISH-Assays bestätigt werden, allerdings ließ sich für keinen der beiden mit FISH untersuchten Genloci (*KAL1* und *STS*) ein rekurrenter Chromosomenverlust in Mantelzell-Lymphomen nachweisen. Auf eine Analyse weiterer Gene innerhalb der hemi-/homozygot deletierten Region wurde aufgrund der Vielzahl potentieller Kandidatengene zunächst verzichtet. Mit Hilfe der im späteren Verlauf dieser Arbeit generierten 100K GeneChip®-Daten der Mantelzell-Lymphome ließ sich die minimal deletierte Region jedoch weiter eingrenzen (Abschnitt 3.3.6.2).

3.2.2. Chromosomale Zugewinne des X-Chromosoms

In zwei der 68 mit ArrayCGH untersuchten primären Mantelzell-Lymphome [MCL 42 und MCL 107 (103)] und in einer der neun Mantelzell-Lymphom-Zelllinien (UPN-1) konnten Zugewinne der Chromosomenregion in Xq26.3-Xq28 detektiert werden. Alle drei Lymphome stammten von männlichen Patienten, folglich lag nur ein X-Chromosom vor. Um die Aberrationen zu bestätigen und die minimal zugewonnene Region genauer bestimmen zu können, wurden aus verschiedenen BAC- und PAC-Klonen dieser Region lokusspezifische FISH-Sonden hergestellt und für die Analyse zu unterschiedlichen Zweifarb-FISH-Assays (spectrum orange und spectrum green markiert) miteinander kombiniert. Auf diese Weise ließ sich die minimal aberrante Region auf etwa 8,5 Mb in der Chromosomenregion Xq27.3-

Xq28 eingrenzen. In Abbildung 25 sind die für die FISH-Analysen verwendeten BAC-/PAC-Klone, ihre chromosomale Lokalisation sowie die durch FISH ermittelte Kopienzahl der jeweiligen Region in den untersuchten Proben aufgeführt. Die weiter q-terminal liegende Region von 153.873.219 bp-154.824.264 bp wurde nicht mittels FISH untersucht, da aufgrund der ArrayCGH-Daten ein vollständiger Zugewinn dieser Region angenommen wurde. Aufgrund der Vielzahl an Genen (> 50) innerhalb der minimal aberranten Region wurden keine weiterführenden Untersuchungen einzelner Kandidatengene vorgenommen.

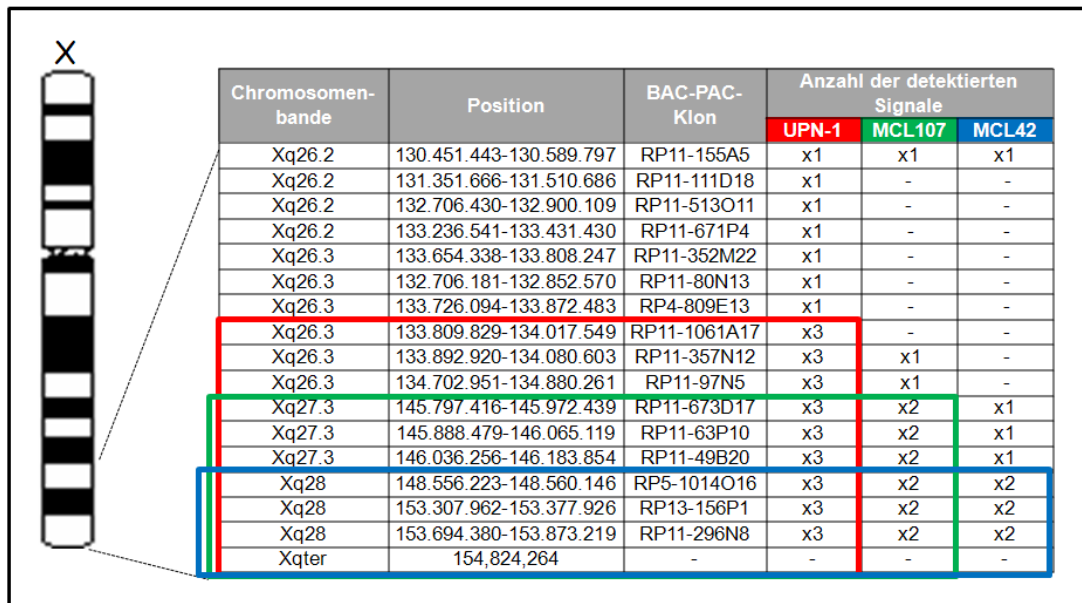


Abbildung 25: Kartierung der minimal zugewonnenen Region im langen Arm des X-Chromosoms

3.3. 100K GeneChip® Mapping

Mittels der neuen 100k GeneChip® Mapping-Technologie sollten in dieser Arbeit sowohl Mantelzell-Lymphom-Zelllinien als auch primäre Mantelzell-Lymphome untersucht werden. Die Vorteile gegenüber der bereits beschriebenen ArrayCGH waren einerseits eine verbesserte Auflösung aufgrund einer größeren Anzahl untersuchter Zielsequenzen auf dem Microarray und andererseits die Möglichkeit, neben den chromosomalen Imbalancen auch partielle uniparentale Disomien (pUPDs) identifizieren zu können.

3.3.1. Auswahl der zu analysierenden Mantelzell-Lymphome

Für die 100K GeneChip®-Arrays wurden aus 159 Mantelzell-Lymphomen nur die ausgewählt, die im Rahmen der Routinediagnostik bei der Karyotypisierung mittels R-Bänderung oder FISH die für dieses Lymphom charakteristische Translokation t(11;14)(q13;q32) gezeigt hatten und von denen geeignetes Material für die geplanten Analysen zur Verfügung stand. Da aufgrund theoretischer Erwägungen die Sensitivität für die Detektion chromosomaler

Imbalancen sowie LOH mit abnehmendem Tumorzellgehalt einer DNA-Probe abnimmt, wurden hauptsächlich Mantelzell-Lymphom-Proben ausgewählt, deren Tumorzellgehalt über 70 % lag. Demnach wurden zunächst alle Mantelzell-Lymphome ausgeschlossen, bei denen bereits ein Tumorzellgehalt von < 70 % bekannt war. Von 15 Mantelzell-Lymphom-Proben ohne Information über den Tumorzellgehalt wurde mit einer kommerziellen Sonde zum spezifischen Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32) (Abbott/Vysis) dieser Wert nachträglich mittels FISH bestimmt (Abbildung 26). Dafür wurden jeweils 100 Zellkerne ausgewertet. In acht der 15 Mantelzell-Lymphom-Proben zeigten mindestens 70 % der ausgezählten Zellen eine aberrante Signalkonstellation (70-85 %). In den übrigen sieben Proben variierte der Tumorzellgehalt zwischen 37 % und 68 %.

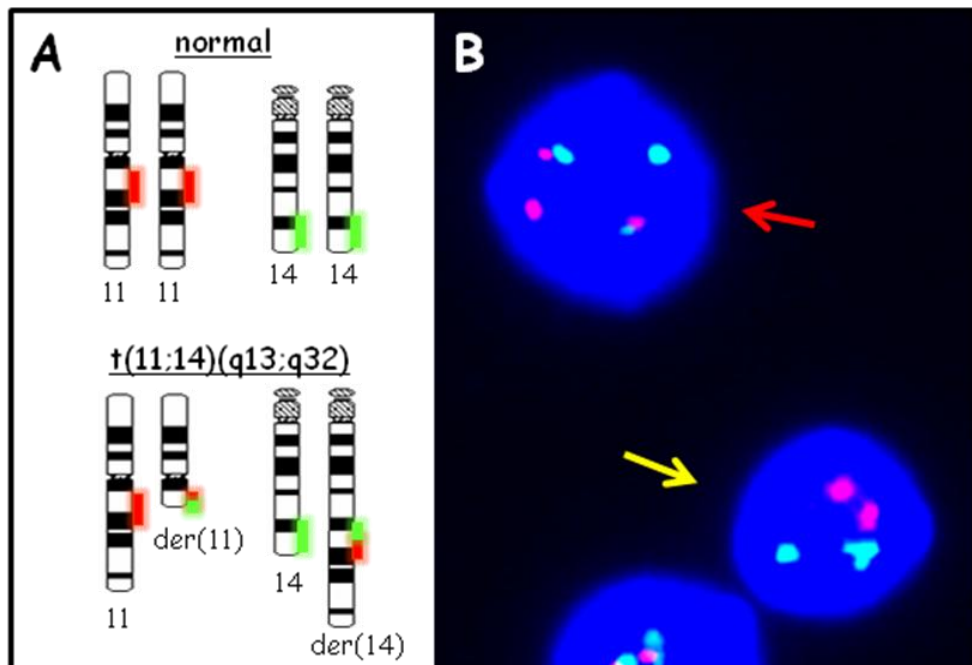


Abbildung 26: Interphase-FISH mit einer kommerziellen Sonde zum spezifischen Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32) (Abbott/Vysis) am Beispiel des Mantelzell-Lymphoms mit der Fall-Nr. 13. Während bei der normalen Signalkonstellation zwei rote und zwei grüne Signale einzeln zu beobachten sind (A oben, B gelber Pfeil), zeichnet sich die aberrante Signalkonstellation (A unten, B roter Pfeil) durch die Kolokalisation der beiden Signale auf den derivativen Chromosomen 11 und 14 aus.

Anschließend wurden 100K GeneChip®-Analysen bei insgesamt 26 primären Mantelzell-Lymphomen von 20 männlichen und sechs weiblichen Patienten durchgeführt. Um die Abhängigkeit der Sensitivität vom Tumorzellgehalt beurteilen zu können, wurden auch einige Proben mit Tumorzellgehalt unter 70 % in die Analysen eingeschlossen. In Abbildung 27 ist der Tumorzellgehalt der ausgewählten Proben dargestellt. Dieser Wert variierte zwischen 21 % und 95 % mit einem Mittelwert von 75 %.

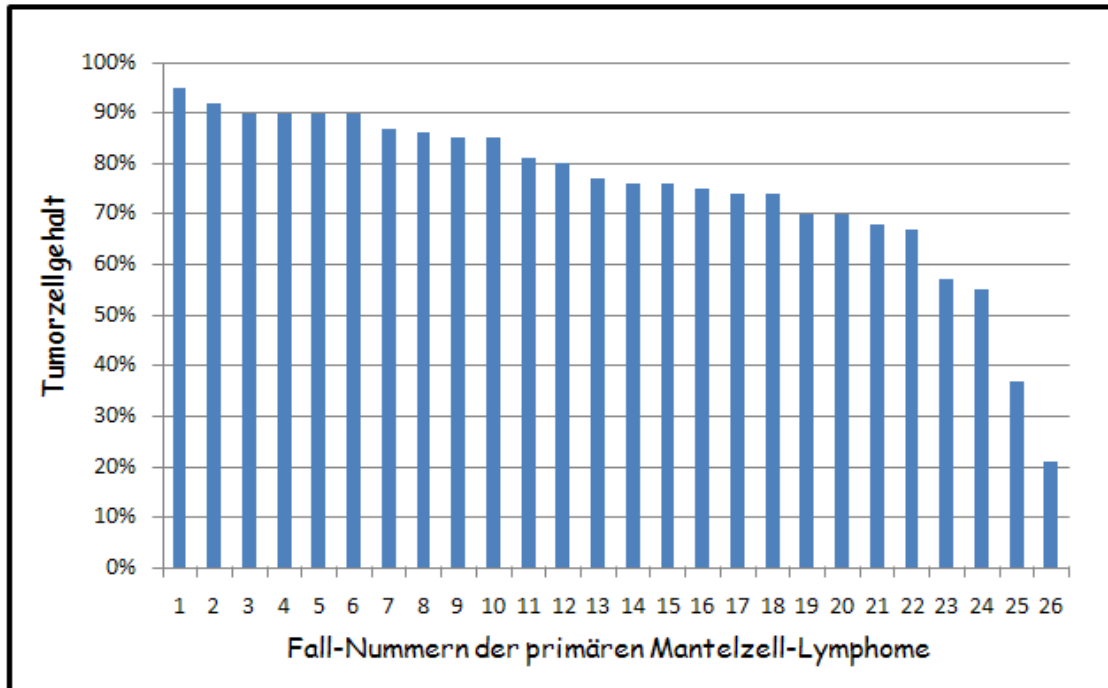


Abbildung 27: Mittels FISH zum Nachweis der $t(11;14)(q13;q32)$ ermittelter Tumorzellgehalt der mittels 100K GeneChip® Mapping untersuchten primären Mantelzell-Lymphome

3.3.2. Qualitätskontrolle der 100K GeneChip®-Hybridisierung

Insgesamt wurden 26 primäre Mantelzell-Lymphome und sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mittels 100K GeneChip® Mapping analysiert. Die Qualität der Hybridisierung wurde anhand der erreichten Call Rate überprüft. Die Call Rate entspricht der proportionalen Anzahl an SNPs, die durch die Hybridisierung eindeutig genotypisiert werden konnten. Bei der 100K GeneChip®-Analyse von Proben mit einem regelrechten Chromosomensatz sollte dieser Wert erfahrungsgemäß > 95 % betragen. Da in dieser Arbeit Tumorgewebe mit einer Vielzahl von chromosomalen Imbalancen das Ausgangsmaterial für die Analysen war, wurden auch geringfügig kleinere Werte akzeptiert. Dies ist dadurch begründet, dass in Regionen, die homozygote Deletionen zeigen, eine Genotypisierung völlig ausgeschlossen ist und dass auch chromosomale Zugewinne in den betroffenen Regionen eine zuverlässige Bestimmung erschweren. Die Call Rates der hier analysierten primären Mantelzell-Lymphome und Mantelzell-Lymphom-Zelllinien betragen zwischen 96,06 % und 99,88 % (Median = 98,59 %) bei den Xba I Arrays und zwischen 94,54 % und 99,77 % (Median = 98,92 %) bei den Hind III-Arrays (Tabelle 14).

Tabelle 14: Call Rates der 100K GeneChip® Xba I- und Hind III-Arrays von den untersuchten Mantelzell-Lymphomen

Primärfälle [Fall-Nr.] und Zelllinien	Call Rates [%]	
	100K GeneChip® Xba I	100K GeneChip® Hind III
1	96,06	98,51
2	96,86	97,96
3	98,86	99,19
4	97,27	96,99
5	98,53	98,79
6	98,09	96,57
7	98,11	99,18
8	98,23	98,04
9	99,48	99,42
10	99,40	99,16
11	97,79	98,94
12	99,10	98,91
13	97,07	99,13
14	97,64	97,45
15	98,47	98,83
16	98,44	98,85
17	97,56	97,26
18	98,79	98,93
19	97,39	97,40
20	98,42	99,33
21	99,12	99,50
22	99,80	99,77
23	99,64	99,69
24	99,31	99,09
25	99,77	99,76
26	99,88	99,72
HBL-2	99,05	98,65
GRANTA-519	99,24	99,00
REC-1	98,65	98,33
UPN-1	99,54	99,05
MAVER-1	97,04	94,54
JEKO-1	99,21	98,66

3.3.3. Genomweite Bestimmung von Imbalancen

Mit den erhobenen 100K GeneChip®-Daten der primären Mantelzell-Lymphome sowie der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurde eine Copy Number-Analyse durchgeführt, um genomweit chromosomale Imbalancen bestimmen zu können (Abbildung 28). Anhand der Überlappung aberranter Regionen wurden minimal zugewonnene bzw. deletierte Regionen ermittelt, die in den Mantelzell-Lymphomen rekurrent betroffen waren. Ein Schwerpunkt der Analysen war die Detektion von High-Level-Amplifikationen und homozygoten Deletionen zur Identifikation potentieller Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene.

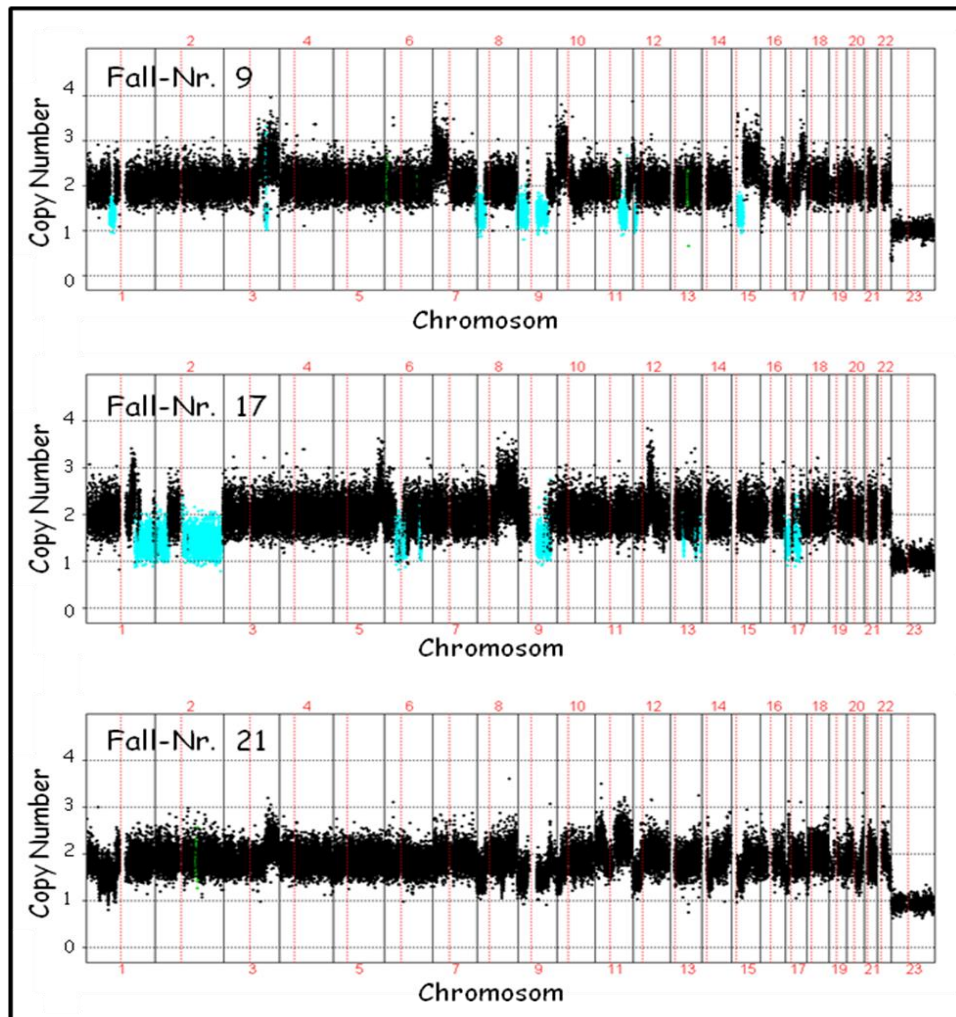


Abbildung 28: Beispiele genomischer Profile von drei primären Mantelzell-Lymphomen. Die Copy Number ist durch schwarze Punkte entlang der X-Achse dargestellt. Ein Wert von 2 entspricht dabei einem normalen diploiden Status (mit Ausnahme der Geschlechtschromosomen), Ausschläge nach oben signalisieren Zugewinne, Ausschläge nach unten entsprechen Verlusten genetischen Materials. LOH-Regionen sind türkis dargestellt. Die Chromosomen sind von 1pter (links) nach Xqter (rechts) aufgetragen. Das Chromosom 23 entspricht dem X-Chromosom. Der Tumorzellgehalt der Proben nimmt von oben nach unten ab (Fall-Nr. 9 = 85 %, Fall-Nr. 17 = 74 %, Fall-Nr. 21 = 67 %).

3.3.3.1. Chromosomale Zugewinne und Verluste und Bestimmung minimal aberranter Regionen

In den 26 primären Mantelzell-Lymphomen wurden insgesamt 206 Regionen detektiert, die in den 100K GeneChip®-Daten Zugewinne genetischen Materials zeigten. Das entspricht einem Mittelwert von etwa acht zugewonnenen Regionen je Mantelzell-Lymphom, wobei der absolute Wert zwischen 0 und 13 in den 25 betroffenen Primärfällen variierte. Außerdem zeigten 236 Regionen chromosomale Verluste, was einem Mittelwert von etwa neun Deletionen je Mantelzell-Lymphom entspricht. Der Absolutwert variierte in den Primärfällen von 1-25. Die sechs untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien zeigten insgesamt 181 Regionen mit chromosomalen Zugewinnen, so dass im Mittel in jeder Zelllinie

etwa 30 Regionen überrepräsentiert waren. Der Absolutwert variierte in den sechs Zelllinien zwischen 5 und 44. Chromosomale Verluste betrafen bei den Zelllinien 204 verschiedene Regionen, was im Mittel 34 Deletionen je Zelllinie entspricht, wobei der absolute Wert zwischen 19 und 68 variierte. Ein genomischer Überblick über die zugewonnenen und deletierten Regionen ist in Abbildung 29 für die untersuchten primären Mantelzell-Lymphome und in Abbildung 30 für die Mantelzell-Lymphom-Zelllinien dargestellt.

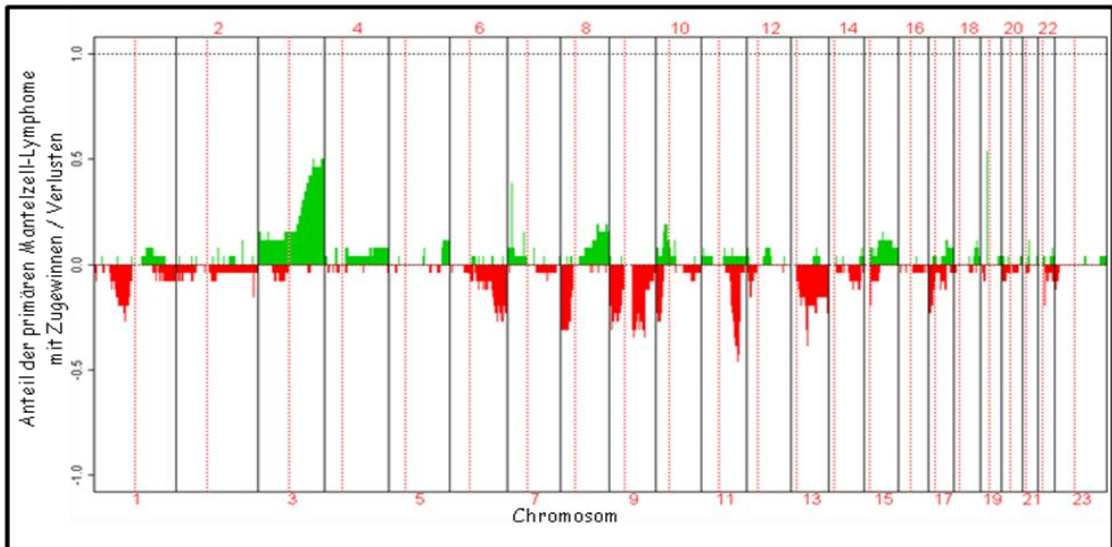


Abbildung 29: Chromosomale Zugewinne und Verluste der primären Mantelzell-Lymphome dargestellt in einem Summations-Plot. Der Anteil der 26 untersuchten Mantelzell-Lymphome, der chromosomale Zugewinne und Verluste zeigte, ist von 1pter (links) bis Xqter (rechts) dargestellt. Das Chromosom 23 entspricht dem X-Chromosom. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials.

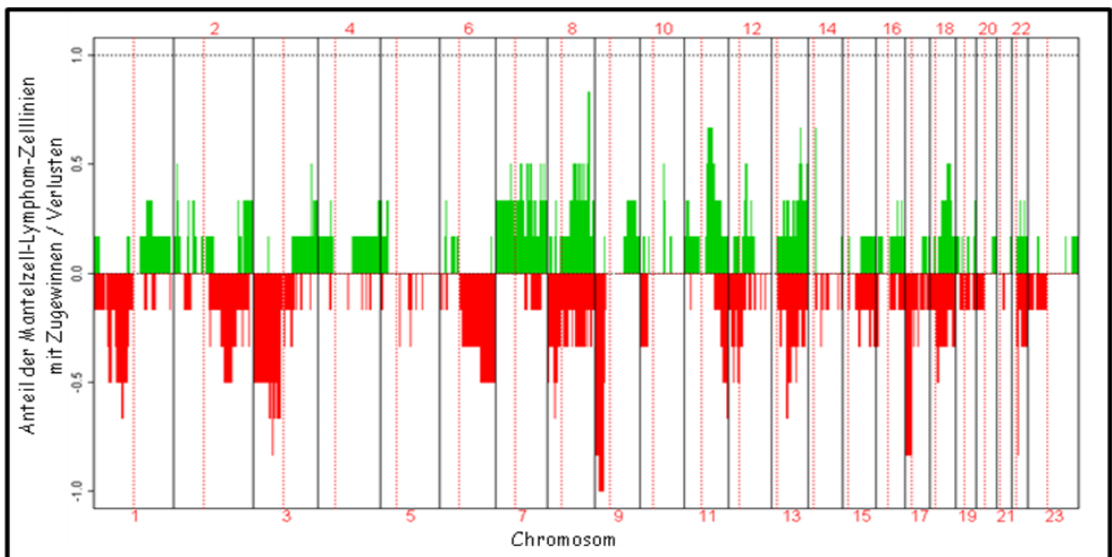


Abbildung 30: Chromosomale Zugewinne und Verluste der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien dargestellt in einem Summations-Plot. Der Anteil der sechs untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien, der chromosomale Zugewinne und Verluste zeigte, ist von 1pter (links) bis Xqter (rechts) dargestellt. Das Chromosom 23 entspricht dem X-Chromosom. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials.

Anhand der Überlappungen rekurrent zugewonnener bzw. deletierter Chromosomenabschnitte wurden minimal aberrante Regionen bestimmt. Für einige dieser minimal aberranten Regionen wurden zusätzlich noch minimale „Peak“-Regionen ermittelt, die durch sehr kleine Imbalancen einzelner Fälle bestimmt wurden. Aufgrund der geringen Fallzahl ließ sich allerdings nicht zuverlässig beurteilen, ob diese minimalen „Peak“-Regionen tatsächlich den minimalen Regionen der rekurrenten Aberrationen entsprechen.

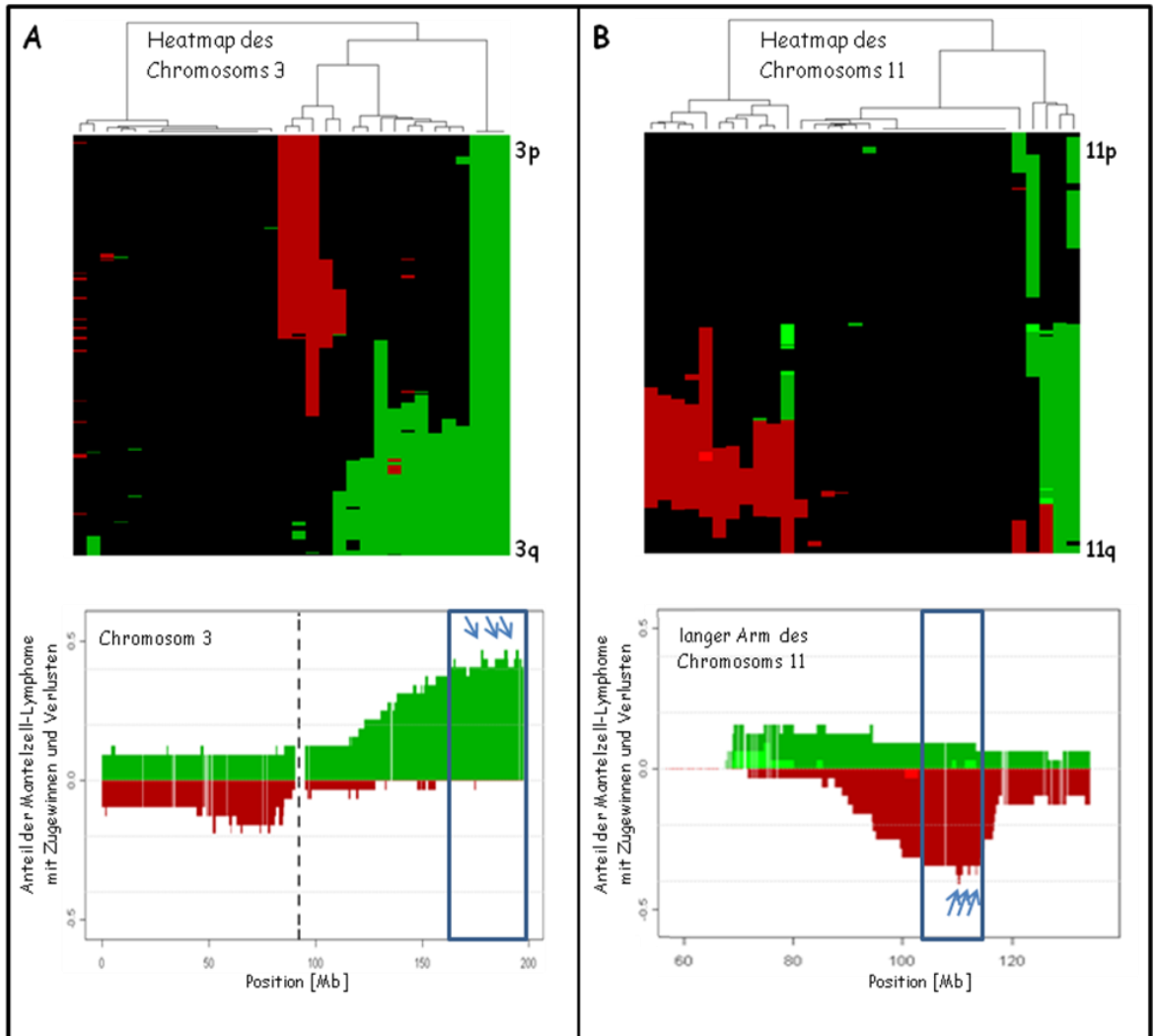


Abbildung 31: Heatmaps (oben) und genomische Verteilung (unten) chromosomaler Zugewinne und Verluste der untersuchten Mantelzell-Lymphome zur Bestimmung der minimal zugewonnenen Region in 3q27.3-3q28 (A) sowie der minimal deletierten Region in 11q22.3-q23.2 (B). Chromosomale Zugewinne sind grün, chromosomale Verluste rot und homozygote Verluste hellrot dargestellt. Jede Spalte der Heatmaps entspricht einem Primärfall bzw. einer Zelllinie. Die chromosomale Position ist von pter (oben) nach qter (unten) aufgetragen. Es wurde ein hierarchisches Clustering für die Copy Number-Werte durchgeführt. Die genomischen Profile zeigen den Anteil der Mantelzell-Lymphome mit chromosomalen Zugewinnen und Verlusten von pter nach qter (Chr. 3) bzw. von zentromerisch nach telomerisch (11q). Die minimal aberranten Regionen sind blau eingerahmt, die minimalen „Peak“-Regionen durch blaue Pfeile markiert. In einer der minimalen „Peak“-Regionen in 3q27.3 ist das bekannte Onkogen *BCL6* lokalisiert. In der minimal deletierten Region in 11q22.3-q23.2 liegt das Tumorsuppressorgen *ATM*, welches in Mantelzell-Lymphomen häufig deletiert und mutiert ist.

Ergebnisse

In Tabelle 15 und Tabelle 16 sind alle minimal aberranten Regionen zusammengefasst, die in mindestens vier der primären Mantelzell-Lymphome oder Mantelzell-Lymphom-Zelllinien betroffen waren. Häufig zugewonnene Regionen lagen in 1q23.3-q25.1, 2p25.1, 2q32.3, 3q27.3-3q28, 4q35.1-q35.2, 7p22.3-p15.3, 7p12.1, 7q21.11, 8p23.3, 8q22.1-q24.21, 10p15.3, 10p12.1-p11.22, 11q13.3-q21, 12q13.3-q14.1, 13q31.3, 14q11.2, 15q21.3, 17q23.2, 18q21.2-q22.3 und 19p12. Rekurrente Deletionen betrafen die Chromosomenregionen in 1p33-p32.3, 1p31.1-p21.1, 2q13, 2q24.1-q31.2, 2q37.1, 3p14.2-p12.2, 6q23.3-q27, 8p23.2-p21.2, 9p24.3-p21.2, 9q13-q31.2, 10p14-p13, 11q22.3-q23.2, 12p13.2-p13.1, 13q12.3-q13.1, 13q14.2-q14.3, 13q22.2-q31.1, 13q34, 14q32.12, 15q11.2, 17p13.3-p12, 22q11.22, 22q13.2-q13.33 und Xp22.33. Einige dieser Regionen sind als CNVs (Abschnitt 2.3.3.1.2) bekannt und als solche in Tabelle 15 und Tabelle 16 gekennzeichnet.

Tabelle 15: Minimal zugewonnene Regionen der mit 100K GeneChip® Mapping untersuchten primären Mantelzell-Lymphome und Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Chromosomen- bande ¹	minimal zugewonnene Region [bp] ¹	minimale Peak-Region [bp] ¹	Anzahl der betroffenen Primärfälle (n=26)	Anzahl der betroffenen Zelllinien (n=6)	Anzahl der betroffenen Primärfälle und Zelllinien (n=32)	CNV ²	Kandidatengene
1q23.3-q25.1	161.811.290-171.285.105	-	2 (7,7 %)	2 (33,3 %)	4 (12,5 %)	-	> 50 Gene
2p25.1*	8.437.257-8.658.000	-	1 (3,8 %)	3 (50 %)	4 (12,5 %)	-	keine Gene
2q32.3*	196.855.791-196.998.642	-	3 (11,5 %)	2 (33,3 %)	5 (15,6 %)	-	<i>STK17B, HECW2</i>
3q27.3-3q28	163.310.236-198.703.540	177.621.541-178.305.378 188.482.673-189.756.712 194.024.864-195.020.693	12 (46,2 %)	1 (16,7 %)	13 (40,6 %)	-	> 50 Gene (<i>TBL1XR1, BCL6, HRASLS</i>)
4q35.1-q35.2*	183.667.778-190.853.064	-	2 (7,7 %)	2 (33,3 %)	4 (12,5 %)	-	> 30 Gene (<i>CDKN2AIP, ING2/P33, MFL1IP</i>)
7p22.3-p15.3	1.307.029-22.122.136	15.290.294-15.406.781	2 (7,7 %)	2 (33,3 %)	4 (12,5 %)	-	> 50 Gene (<i>MAD1L1</i>)
7p12.1	51.343.627-51.599.041	-	4 (15,4 %)	2 (33,3 %)	6 (18,8 %)	CNV	keine Gene
7q21.11*	80.015.814-80.140.864	-	2 (7,7 %)	3 (50 %)	5 (15,6 %)	-	<i>SEMA3C</i>
8p23.3	180.568-604.843	-	8 (30,8 %)	0	8 (25 %)	CNV	<i>ZNF596, FBXO25</i>
8q22.1-q24.21	97.386.585-129.315.597	113.839.919-114.465.021 127.573.835-128.808.953	3 (11,5 %)	3 (50 %)	6 (18,8 %)	-	<i>CSMD3, NSE2, MYC</i>
10p15.3	259.695-609.170	-	6 (23,1 %)	1(16,7 %)	7 (21,9 %)	CNV	<i>ZMYND11, KIAA0934</i>
10p12.1-p11.22	22.539.396-33.299.723	-	4 (15,4 %)	0	4 (12,5 %)	-	> 50 Gene (<i>BMI1</i>)
11q13.3-q21	69.059.827-94.517.738	-	1 (3,8 %)	3 (50 %)	4 (12,5 %)	-	> 50 Gene (<i>CCND1, MAP6</i>)
12q13.3-q14.1	57.124.923-59.086.345	-	2 (7,7 %)	3 (50 %)	5 (15,6 %)	-	<i>LRIG3, SLC16A7</i>
13q31.3	89.815.135-90.996.633	-	0	4 (66,7 %)	4 (12,5 %)	-	<i>GPC5, miR-17-92</i>
14q11.2	21.138.908-21.395.736	-	1 (3,8 %)	4 (66,7 %)	5 (15,6 %)	CNV	<i>TCRA</i>
15q21.3*	54.986.374-80.106.823	-	3 (11,5 %)	1(16,7 %)	4 (12,5 %)	-	> 50 Gene
17q23.2	55.055.019-57.159.092	-	3 (11,5 %)	1(16,7 %)	4 (12,5 %)	-	<i>CLTC, BIT1, RPS6KB1, APPB2, PPM1D, BCAS3, TBX2, TBX4, BRIP1</i>
18q21.2-q22.3	50.456.856-68.715.474	58.695.331-59.544.814 62.293.147-62.874.398 68.117.861-68.574.532	0 (0 %)	3 (50 %)	3 (9,4 %)	-	> 50 Gene (<i>BCL2, CDH19, CBLN2</i>)
19p12	21.633.219-22.888.187	-	14 (53,8 %)	1(16,7 %)	15 (46,9 %)	CNV	<i>ZNF43, ZNF100, ZNF257</i>

¹ NCBI Build 35, ² Database of Genomic Variants, CNV: Copy Number Variation, * in dieser Arbeit erstmals identifiziert

Ergebnisse

Tabelle 16: Minimal deletierte Regionen der mit 100K GeneChip® Mapping untersuchten primären Mantelzell-Lymphome und Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Chromosomen- bande ¹	minimal deletierte Region [bp] ¹	minimale Peak-Region [bp] ¹	Anzahl der betroffenen Primärfälle (n=26)	Anzahl der betroffenen Zelllinien (n=6)	Anzahl der betroffenen Primärfälle und Zelllinien (n=32)	CNV ²	Kandidatengene
1p33-p32.3	48.753.114-52.103.613	-	2 (7,7 %)	3 (50 %)	5 (15,6 %)	-	<i>CDKN2C/P18</i>
1p31.1-p21.1	73.516.733-102.599.981	-	6 (23,1 %)	2 (33,3 %)	8 (25 %)	-	> 50 Gene (<i>BCL-10, CDC14A, miRNA-137</i>)
2q13	111.333.143-112.182.931	-	1 (3,8 %)	3 (50 %)	4 (12,5 %)	-	<i>BIM</i>
2q24.1-q31.2*	154.878.648-178.828.455	-	3 (11,5 %)	1(16,7 %)	4 (12,5 %)	-	> 50 Gene
2q37.1*	230.936.568-231.268.933	-	4 (15,4 %)	2 (33,3 %)	6 (18,8 %)	-	<i>SP100, SP140</i>
3p14.2-p12.2*	63.027.952-80.797.517	-	2 (7,7 %)	3 (50 %)	5 (15,6 %)	-	> 30 Gene (<i>FOXP1</i>)
6q23.3-q27	136.713.787-170.822.590	142.535.483-144.002.083 156.057.296-157.512.514	5 (19,2 %)	3 (50 %)	8 (25 %)	-	> 50 Gene
8p23.2-p21.2	5.433.070-27.132.044	794.885-1.589.804 24.048.944-24.698.294	8 (30,8 %)	2 (33 %)	10 (31,3 %)	-	> 50 Gene (<i>TRAILR1, TRAILR2</i>)
9p24.3-p21.2	239.391-26.049.028	239.391-999.833 6.348.849-7.106.020 12.177.104-12.296.011 24.645.242-25.112.214	5 (19,2 %)	5 (83,3 %)	10 (31,3 %)	-	> 50 Gene (<i>CDKN2A/P16, CDKN2B/P15</i>)
9q13-q31.2	68.229.855-105.506.617	72.272.862-73.907.292 104.629.148-104.660.862	6 (23,1 %)	0 (0 %)	6 (18,5%)	-	> 50 Gene (<i>CDC14B, FANCC, SYK</i>)
10p14-p13	7.695.671-13.025.331	-	7 (26,9 %)	2 (33,3 %)	9 (28,1 %)	-	> 20 Gene (<i>GATA3</i>)
11q22.3-q23.2	103.667.432-114.240.545	109.836.841-110.807.220 112.002.972-112.189.062 113.395.335-113.508.625	10 (38,5 %)	1(16,7 %)	11 (34,4 %)	-	> 50 Gene (<i>ATM</i>)
12p13.2-p13.1*	12.641.776-14.212.344	-	4 (15,4 %)	2 (33,3 %)	6 (18,8 %)	-	> 10 Gene (<i>CDKN1B/P27</i>)
13q12.3-q13.1	29.413.553-31.330.232	-	5 (19,2 %)	2 (33,3 %)	7 (21,9 %)	-	<i>KATNAL1, HSPH1</i>
13q14.2-q14.3	49.387.084-49.966.576	-	10 (38,5 %)	4 (66,7 %)	14 (43,8 %)	CNV	<i>RFP2, DLEU1, DLEU2, miRNA15/16</i>
13q22.2-q31.1*	74.736.427-78.699.864	-	6 (23,1 %)	2 (33 %)	8 (25 %)	-	> 10 Gene (<i>MYCBP2</i>)
13q34	110.816.774-114.051.465	-	6 (23,1 %)	1(16,7 %)	7 (21,9 %)	CNV	> 20 Gene (<i>SOX1, GAS6, RASA3</i>)
14q32.12*	90.494.774-91.041.872	-	3 (11,5 %)	1(16,7 %)	4 (12,5 %)	-	<i>RPS6KA5, c14orf159, GPR68</i>
15q11.2	19.208.413-19.989.036	-	5 (19,2 %)	1(16,7 %)	6 (18,8 %)	CNV	<i>POTE15</i>
17p13.3-p12	450.509-14.796.744	3.446.119-6.054.729 7.486.446-8.967.535	6 (23,1 %)	5 (83,3 %)	11 (34,4 %)	-	> 50 Gene (<i>TP53</i>)
22q11.22	21.051.522-21.479.136	-	5 (19,2 %)	4 (66,7 %)	9 (28,1 %)	CNV	<i>IGL</i>
22q13.2-q13.33	41.669.179-48.983.486	-	2 (7,7 %)	2 (33,3 %)	4 (12,5 %)	-	> 50 Gene
Xp22.33*	677,050-2,561,008	-	3 (11,5 %)	1(16,7 %)	4 (12,5 %)	-	<i>PAR1</i> -Gene

¹ NCBI Build 35, ² Database of Genomic Variants, CNV: Copy Number Variation, PAR1: pseudoautosomale Region 1,

* in dieser Arbeit erstmals identifiziert

Neben den bereits bekannten rekurrenten Aberrationen in Mantelzell-Lymphomen konnten mit Hilfe der 100K GeneChip®-Analysen fünf bislang unbekannte Regionen mit häufigen Zugewinnen und sieben bislang unbekannte Regionen mit rekurrenten Deletionen identifiziert werden. In einigen dieser Regionen liegen Kandidatengene mit typischen Eigenschaften von Tumorsuppressor- bzw. Onkogenen, wie beispielweise *FOXP1* in 3p13, *CDKN1B/P27* in 12p13.1, *MYCBP2* in 13q22.3 oder *CDKN2AIP* und *ING2/P33* in 4q35.1 (Tabelle 15 und Tabelle 16).

3.3.3.2. High-Level-Amplifikationen

Die Detektion und Charakterisierung sogenannter „High-Level-Amplifikationen“ ist eine Möglichkeit, neue Onkogene identifizieren zu können. Dabei ist der Begriff der „Amplifikation“ hinsichtlich der Kopienzahl nicht eindeutig definiert. Bei der Analyse der 100K GeneChip®-Daten der Mantelzell-Lymphome in dieser Arbeit wurden alle Regionen mit einer Copy Number ≥ 5 als High-Level-Amplifikationen klassifiziert. Für das X-Chromosom beim männlichen Geschlecht galt bereits eine Copy Number ≥ 4 als High-Level-Amplifikation. Insgesamt wurden 21 High-Level-Amplifikationen in 15 verschiedenen Chromosomenregionen detektiert. Rekurrent amplifizierte Regionen lagen in 11q13.4-q13.5, 13q31.3 und 18q21.3. Jede dieser drei Regionen war in drei verschiedenen Zelllinien amplifiziert. Weitere High-Level-Amplifikationen, die nur jeweils in einem der primären Mantelzell-Lymphome oder einer Mantelzell-Lymphom-Zelllinie detektiert wurden, lagen in den Chromosomenregionen 4p14, 6p21.2, 8p23.1, 8p23.1-p22, 8q24.21, 10p12.31-12.2, 11q22.3, 11q23.1-q32.2, 11q14.1, 17p11.2, 18q12.2 und 18q12.2-q12.3 (Tabelle 17).

Tabelle 17: High-Level Amplifikationen in den untersuchten Mantelzell-Lymphomen

Lokus ¹	Position [bp] ¹	betroffene primäre Mantelzell-Lymphome oder Mantelzell-Lymphom-Zelllinien	Kandidatengene	CNV ²
4p14	39.276.234-40.270.308	HBL-2	<i>N4BP2, RHOH</i>	-
6p21.2	36.882.990-38.489.334	JEKO-1	<i>PIM1</i>	-
8p23.1	8.131.816. 8.707.032	JEKO-1	<i>MFHAS1</i>	-
8p23.1-p22	12.637.991-13.371.441	JEKO-1	/	CNV
8q24.21	127.511.831-128.808.953	JEKO-1	<i>NSE2</i>	-
10p12.31-12.2	22.129.010-24.582.433	Fall-Nr. 1	<i>BMI1</i>	-
11q13.3-q13.5	69.275.669-75.585.898	HBL-2	<i>MAP6</i>	
11q13.4-q13.5	74.753.514-75.585.898	JEKO-1		-
11q13.3-q14.1	69.059.827-80.083.509	MAVER-1		
11q14.1	84.360.089-85.287.454	MAVER-1	/	-
11q22.3	109.100.854-109.679.318	JEKO-1	/	-
11q23.1-q23.2	111.394.279-113.282.972	JEKO-1	<i>IL18, ZW10</i>	-
13q31.1-q31.3	85.798.893-90.996.633	REC-1	<i>GPC5, miR-17-92</i>	
13q31.3	89.815.135-91.765.949	JEKO-1		-
13q31.3	90.032.734-90.996.633	HBL-2		
17p11.2	19.211.040-20.874.347	Fall-Nr. 4	<i>MAPK7, AKAP10</i>	-
18q12.2	33.888.498-34.735.189	MAVER-1	/	-
18q12.2-q12.3	34.770.753-36.241.073	GRANTA-519	/	-
18q21.2-q22.2	49.877.128-65.507.016	HBL-2	<i>BCL2</i>	
18q21.32-q22.3	54.738.782-69.307.794	GRANTA-519		-
18q21.33	58.695.331-59.544.814	MAVER-1		

¹ NCBI Build 35, ² Database of Genomic Variants, /: kein funktionelles Kandidaten-Onkogen identifiziert, CNV: Copy Number Variation

Von den 15 von High-Level-Amplifikationen betroffenen Chromosomenregionen beinhaltet die Region 8p23.1-p22 einen bekannten CNV. Ein Großteil der Aberrationen (> 90 %) wurde in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien detektiert. Nur zwei der primären Mantelzell-Lymphome, Fall-Nr. 1 und Fall-Nr. 4, zeigten Amplifikationen. Die betroffenen Chromosomenabschnitte dieser Primärfälle lagen in 10p12.31-12.2 und 17p11.2. Potentielle Onkogene, die in die detektierten High-Level-Amplifikationen der primären Mantelzell-Lymphome sowie der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien involviert waren, sind in Tabelle 17 aufgeführt. In zwei der von High-Level-Amplifikationen betroffenen Regionen waren Gene involviert, die bereits in früheren Mantelzell-Lymphom-Studien als amplifiziert oder überexprimiert beschrieben worden waren. So konnte beispielsweise ein rekurrenter Zugewinn der Chromosomenregion in 18q21.3, in der das Onkogen *BCL2* liegt (90), durch die 100K GeneChip®-Daten bestätigt werden. Auch die Region in 10p12.31-10p12.2, in der das *BMI1*-Gen als potentielles Onkogen beschrieben ist (130), zeigte in der 100K GeneChip®-Analyse eines Primärfalls eine High-Level-Amplifikation. Rekurrente High-Level-Amplifikationen in der Chromosomenregion 13q31.3 konnten bereits in den Mantelzell-Lymphom-ArrayCGH-Daten der Abteilung für Hämatologie und medizinische Onkologie der Universität von Valencia detektiert werden. Mit der Analyse der 100K GeneChip®-Daten konnte die minimal zugewonnene Region bestätigt werden. Weiterführende Untersuchungen der spanischen Arbeitsgruppe identifizierten das Gen *GPC5* und das miRNA-Cluster *miR-17-92* als potentielle Zielgene (103).

Neben der Validierung bereits beschriebener High-Level-Amplifikationen in Mantelzell-Lymphomen konnte anhand der 100K GeneChip®-Daten auch eine neue rekurrent amplifizierte Chromosomenregion identifiziert werden. Gleich drei der sechs untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien (MAVER-1, JEKO-1 und HBL-2) zeigten in der Region 11q13.4-q13.5 chromosomale Zugewinne mit einer Copy Number ≥ 5 . Anhand der Überlappung der betroffenen Regionen in den drei Zelllinien wurde eine minimal amplifizierte Region eingegrenzt, die neun verschiedene Gene einschloss. Diese von der Amplifikation betroffenen Gene waren *MAP6* (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 6), *SERPINH1* (Serine Proteinase Inhibitor 1), *GDPD5* (Glycerophosphodiester Phosphodiesterase Domain 5), *RPS3* (Ribosomal Protein S3), *UVRAG* (UV Radiation Resistance assoziiertes Gen), *WNT11* (Wingless-type MMTV Integration Site Family), *MOGAT2* und *DGAT2* (Mono- und Diacylglycerol O-Acyltransferasen) sowie das für ein hypothetisches Protein kodierende *LOC283212*. Außerdem kodierte die Region für zwei snoRNAs (*U15A* und *U15B*) (zu den weiterführenden Untersuchungen von Genen dieser Region siehe Abschnitt 3.3.5.4).

3.3.3.3. Identifikation homozygoter Deletionen und ihre Verifikation mittels PCR-basierter Methoden oder FISH

Für die Identifikation homozygot deletierter Regionen in den 100K GeneChip®-Daten wurden zwei unterschiedliche Analyseverfahren angewandt, ein liberales und ein sensitives Verfahren (Abschnitt 2.3.3.1.1). Mit dem liberalen Analyseverfahren wurden in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien elf homozygote Deletionen in acht verschiedenen Chromosomenabschnitten detektiert (Tabelle 18). In jeder dieser Regionen konnte die Aberration mittels Multiplex-PCR bestätigt werden oder sie war bereits bekannt. Mit Hilfe der sensitiven Analyse wurden 19 weitere potentiell homozygot deletierte Regionen identifiziert, von denen vier mit Multiplex-PCR validiert werden konnten und zwei mit bekannten CNVs übereinstimmten (Tabelle 18). Die anderen 13 potentiellen homozygoten Deletionen ließen sich mittels PCR nicht bestätigen. Demnach konnte das sensitive Analyseverfahren zwar mehr homozygote Deletionen identifizieren, lieferte aber mit 43 % eine bemerkenswert hohe Falsch-Positiv-Rate. Das liberale Analyseverfahren zeigte zwar aufgrund der stärkeren Glättung der Rohdaten eine deutlich geringere Sensitivität, war aber bei der Analyse der 100K GeneChip®-Daten ausnahmslos zuverlässig. In Tabelle 18 sind alle verifizierten homozygoten Deletionen der untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien zusammengefasst. Des Weiteren ist dort angegeben, mit welchem der beiden Screening-Verfahren eine Detektion möglich war.

Tabelle 18: Mittels PCR verifizierte homozygote Deletionen der untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Lokus ¹	Sensitives Screening [bp] ¹	Liberales Screening [bp] ¹	PCR-basierte Eingrenzung [bp] ¹	betroffene Zelllinien	Kandidatengene
1p32.3	50.837.181-57.453.350	nicht detektiert	nicht untersucht, da bereits bekannt (131)	UPN-1	<i>CDKN2C/P18</i>
2q13	111.616.112-112.155.057	111.616.112-112.182.931	nicht untersucht, da bereits bekannt (89)	JEKO-1	<i>BIM</i>
2q34	210.048.358-210.472.004	210.048.358-210.472.004	210.079.601-210.462.202	UPN-1	<i>MAP2</i>
2q37.3	237.396.643-237.486.004	nicht detektiert	237.272.264-237.637.712	UPN-1	keine Gene
9p21.3	21.948.524-22.090.176	21.948.524-22.102.599	nicht untersucht, da bereits bekannt (88-90)	GRANTA-519, REC-1, MAVER-1	<i>CDKN2A/P16, CDKN2B/P15</i>
9p21.2	27.248.185-27.716.731	27.316.780-27.716.911	27.287.093-27.940.630	MAVER-1	<i>MOBK2B, IFNK, c9orf72</i>
9p21.1	28.761.537-30.316.115	28.761.537-30.316.115	mit PCR bestätigt, aber nicht weiter eingegrenzt, da keine involvierten oder benachbarten Gene	MAVER-1	keine Gene
12p13.1	13.617.759-13.618.078	nicht detektiert	13.616.272-13.652.667	REC-1	<i>GRIN2B</i>
13q14.2	47.812.793-47.817.924	nicht detektiert	nicht untersucht, da bereits bekannt (45)	UPN-1	<i>RB1</i>
13q33.1	101.552.480-101.943.751	101.552.480-101.943.751	PCR-basierte Eingrenzung aufgrund von Sequenzhomologien nicht möglich	JEKO-1	<i>FGF14</i>
18q22.1	63.097.606-63.491.358	62.853.023-63.491.358	62.390.461-64.346.179	UPN-1	<i>c18orf4</i>
22q11.22	20.994.635-21.479.136	20.994.635-21.479.136	nicht untersucht, da CNV ² und bereits bekannt	GRANTA-519, HBL-2	<i>IGL</i>
Xp22.31	6.492.343-6.543.186	nicht detektiert	nicht untersucht, da CNV ²	JEKO-1	keine Gene
Xq28	153.981.072	nicht detektiert	nicht untersucht, da CNV ²	GRANTA-519	keine Gene

¹ NCBI Build 35, ² Database of Genomic Variants, CNV: Copy Number Variation

Insgesamt wurden in den untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien 14 verschiedene von homozygoten Deletionen betroffene Regionen identifiziert, von denen fünf (1 CNV) bereits in der Literatur beschrieben waren. Von den neun neuen homozygoten Deletionen entsprachen zwei den Regionen bekannter CNVs (Abschnitt 2.3.3.1.2) und wurden demnach nicht weiter untersucht. Die Region in 9p21.1 wurde nicht weiter untersucht, da keine Gene involviert oder benachbart waren. In der Region 13q33.1 war eine Eingrenzung der homozygoten Deletion mittels PCR aufgrund von Sequenzhomologien nicht möglich. In den übrigen fünf Regionen in 2q34, 2q37.3, 9p21.2, 12p13.1, und 18q22.1 (Tabelle 18) wurden hingegen durch PCR-basierte Eingrenzung der homozygoten Deletionen potentielle Kandidatengene bestimmt (Abschnitt 3.3.3.3.1).

In den 26 primären Mantelzell-Lymphomen wurden mit dem liberalen Analyseverfahren sechs Regionen und mit dem sensitiveren Verfahren 15 Regionen detektiert, die die Kriterien einer homozygoten Deletion erfüllten (Tabelle 19). Vier der in den Primärfällen detektierten Regionen, in 9p21.3, 9p21.2, 12p13.1 sowie 22q11.22, stimmten mit homozygot deletierten Regionen überein, die bereits in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien identifiziert worden waren. Aufgrund der Kontamination des analysierten Tumorgewebes durch umliegendes Normalgewebe wurden keine PCR-basierten Methoden zur Bestätigung dieser Aberrationen angewandt. Eine FISH-Analyse zum Nachweis der homozygot deletierten Regionen war nur möglich, wenn die geschätzte Größe der Aberration die Größe der einzusetzenden BAC-/PAC-Klone (etwa 100 kb) nicht unterschritt. Regionen, die als CNVs (Abschnitt 2.3.3.1.2) bekannt waren, wurden nicht weiter untersucht. Folglich blieben drei Regionen, für die lokusspezifische FISH-Assays zum Nachweis der homozygoten Deletion etabliert werden sollten. Dazu wurden BAC-/PAC- bzw. Fosmid-Klone ausgewählt, die den betroffenen Chromosomenabschnitt überspannten. Ein weiterer Klon, der mit einem entfernten Locus auf dem gleichen Chromosom hybridisierte, wurde als interne Kontrolle verwendet. Die richtige Lokalisation und Spezifität der jeweiligen Sonden wurde zunächst durch Hybridisierung von Metaphasen von Zellen aus dem peripheren Blut eines gesunden Probanden mit normalem Chromosomensatz überprüft. Für einen der drei Loci in der Region 11q22.1 scheiterte aufgrund repetitiver Sequenzen der Versuch, eine spezifische Sonde herzustellen. In den anderen beiden Regionen, in 9p21.3 und in Xp22.33, die jeweils in zwei Primärfällen homozygot deletiert waren, konnten die kompletten Verluste mittels FISH verifiziert werden. Rekurrente Deletionen in 9p21.3 waren bereits aus anderen Mantelzell-Lymphom-Studien bekannt (88-90). Deletionen in Xp22.33 waren in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien bislang nicht beschrieben. Diese Region hatte aber bereits bei der

Analyse der X-chromosomalen ArrayCGH-Daten eine homozygote Deletion gezeigt (Abschnitt 3.2.1). In Tabelle 19 sind die aus den 100K GeneChip®-Daten ermittelten potentiell homozygot deletierten Regionen in primären Mantelzell-Lymphomen bezüglich ihrer Größe, bekannter CNVs, potentieller Zielgene und Validierung mittels FISH zusammengefasst.

Tabelle 19: Potentielle homozygote Deletionen in den untersuchten primären Mantelzell-Lymphomen

Lokus ¹	Sensitives Screening [bp] ¹	Liberales Screening [bp] ¹	Betroffene Mantelzell-Lymphome [Fall-Nr.]	FISH	Kandidatengene
1p21.2	100.823.226-100.823.636	nicht detektiert	5	nicht untersucht, da < 100kb	keine Gene
3p26.3	1.510.440-1.511.278	nicht detektiert	22	nicht untersucht, da CNV ²	keine Gene
4q22.1	90.356.219-90.356.586	nicht detektiert	23	nicht untersucht, da CNV ²	keine Gene
5q22.2	111.710.742-111.711.216	nicht detektiert	9	nicht untersucht, da CNV ²	<i>EPB41L4A</i>
9p24.1	7.501.166-7.503.589	nicht detektiert	14	nicht untersucht, da CNV ²	keine Gene
9p23	12.742.340-12.750.718	8.916.956-12.974.756	2	nicht untersucht, da CNV ²	<i>PTPRD, TYRP1</i>
9p21.3	nicht detektiert	21.762.317-22.801.336	2 & 8	homozygote Deletion verifiziert	<i>CDKN2A/P16, CDKN2B/P15</i>
9p21.2	27.692.974-27.693.855	nicht detektiert	9	nicht untersucht, da < 100kb	keine Gene
9p21.1	nicht detektiert	30.425.441-31.302.460	2	nicht untersucht, da CNV ²	keine Gene
11q22.1	100.654.097-100.773.657	100.546.098-102.615.349	14	aufgrund repetitiver Sequenzen konnte kein Assay etabliert werden	<i>BIRC2, BIRC3</i>
11q22.3	109.749.455-109.749.570	nicht detektiert	1	nicht untersucht, da CNV ²	<i>TMED</i>
12p13.1	13.617.759-13.618.078	nicht detektiert	24	nicht untersucht, da < 100kb	<i>GRIN2B</i>
22q11.22	21.099.653-21.337.561	21.099.653-21.479.136	18	nicht untersucht, da CNV ²	<i>IGL</i>
Xp22.33	677.050-2.528.646	677.050-2.561.008	9 & 25	homozygote Deletion verifiziert	PAR1-Gen
Xp21.2	29.303.376-29.351.134	nicht detektiert	7	nicht untersucht, da CNV ²	<i>IL1RAPL1</i>
Xp21.1	33.396.094-33.415.950	nicht detektiert	19	nicht untersucht, da CNV ²	keine Gene
Xq21.33	98.159.771-98.164.282	nicht detektiert	4 & 7	nicht untersucht, da < 100kb	keine Gene

¹ NCBI Build 35, ² Database of Genomic Variants, CNV: Copy Number Variation, PAR1: pseudoautosomale Region 1

3.3.3.3.1. Eingrenzung homozygoter Deletionen zur Identifikation potentieller Tumorsuppressorgene

Die Chromosomenregionen, in denen eine homozygote Deletion mittels PCR oder FISH bestätigt werden konnte, wurden im Folgenden weiter eingegrenzt, um potentielle Tumorsuppressorgene zu identifizieren. Regionen, die bereits aus früheren Studien bekannt oder als CNVs klassifiziert waren, wurden nicht weiter untersucht. Im Falle der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien konnte die Eingrenzung mittels PCR durchgeführt werden. Die verwendeten Primerpaare wurden so ausgesucht, dass sie hauptsächlich kodierende Exons von Genen, in einigen Fällen aber auch intergenische DNA-Sequenzen der betroffenen Chromosomenregionen abdeckten. Konnte mit einem Primerpaar keine Amplifikation erreicht werden, d.h. ließ sich nach Auftrennung des PCR-Produktes keine Bande im Gel nachweisen, wurde zur Validierung eine Multiplex-PCR mit einem Kontroll-Primerpaar durchgeführt. Die minimal aberranten Regionen, die auf diese Weise bestimmt wurden, sind ebenfalls in Tabelle 18 aufgeführt. In Abbildung 32 ist exemplarisch für die homozygoten Deletionen in 12p13.1 und 18q22.1 dargestellt, wie die minimal aberranten Regionen

mittels PCR eingegrenzt wurden. Um mögliche unbekannte Polymorphismen ausschließen zu können, wurde mit jeweils einem Primerpaar innerhalb der homozygoten Deletionen eine Multiplex-PCR an 50 DNA-Proben freiwilliger Probanden durchgeführt. Allerdings konnte in keiner der untersuchten Regionen bei einer der Kontroll-DNAs eine homozygote Deletion nachgewiesen werden.

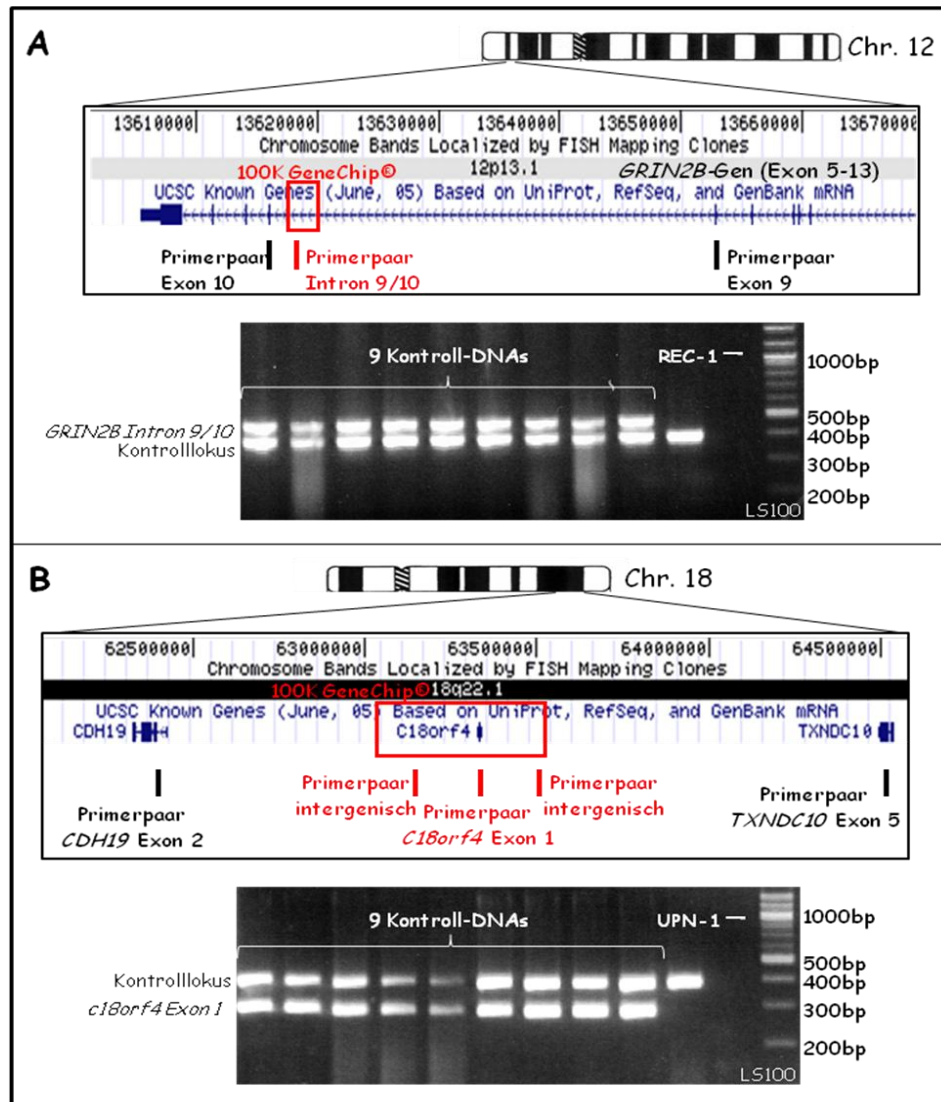


Abbildung 32: Bestimmung der minimal deletierten Regionen in 12p13.1 (A) und 18q22.1 (B). **A und B oben)** Zur Veranschaulichung wurden genomische Karten der betroffenen Regionen aus dem UCSC Genome Browser (Build 35) verwendet, in denen sowohl die mittels 100K GeneChip® ermittelte homozygot deletierte Region (roter Rahmen) als auch die zur Eingrenzung verwendeten Primerpaare dargestellt wurden. Mit den schwarz markierten Primern konnte in der jeweiligen Zelllinie (REC-1 bzw. UPN-1) das Fragment mittels PCR amplifiziert werden, mit den rot markierten Primern fand keine Amplifikation statt. **A und B unten)** Multiplex-PCRs der Gene *GRIN2B* und *c18orf4* mit einem Kontrollloкус. Dargestellt sind die im Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte von der jeweils betroffenen Mantelzell-Lymphom-Zelllinie und neun der insgesamt 50 analysierten Kontrollen. Für die Negativkontrolle (-) wurde dem PCR-Ansatz dH₂O statt DNA zugefügt. Im Gegensatz zu den betroffenen Zelllinien, in denen die homozygoten Deletionen durch das Fehlen der jeweiligen genspezifischen Bande bestätigt werden konnten, wurde in keiner der Kontrollen eine homozygote Deletion nachgewiesen. Folglich konnte ein häufiger Polymorphismus ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend konnte mit der PCR-basierten Eingrenzung der in den Zelllinien detektierten neuen homozygoten Deletionen die durch die Auflösung der 100K-Microarrays bedingte „Unschärfe“ bei der Kartierung chromosomaler Imbalancen verringert werden. Dabei lag der Schwerpunkt nicht auf der genauen Bestimmung des Bruchpunktes, sondern auf der Identifikation involvierter Kandidatengene. Die Größe der identifizierten und verifizierten homozygot deletierten Regionen variierte zwischen 36 kb und 1,96 Mb. In zwei dieser Regionen waren keine bekannten Gene lokalisiert. In der Region in 13q33.1 konnte die homozygote Deletion innerhalb des *FGF14*-Gens zwar mittels PCR bestätigt, aber aufgrund von Sequenzhomologien nicht weiter eingegrenzt werden. Die homozygote Deletion in 12p13.1 wurde auf eine intronische Sequenz innerhalb des *GRIN2B*-Gens eingegrenzt. Für die homozygote Deletion in 9p21.2 ließen sich die drei Kandidatengene *MOBK2B*, *IFNK* und *c9orf72* ermitteln, in den homozygot deletierten Regionen in 2q34 und 18q22.1 konnte jeweils ein Zielgen bestimmt werden, *MAP2* bzw. *c18orf4*.

Von den beiden verifizierten homozygoten Deletionen der Primärfälle wurde die Region in 9p21.3 nicht weiter charakterisiert, da die involvierten Tumorsuppressorgene *CDKN2A/P16* und *CDKN2B/P15* bereits häufig in Mantelzell-Lymphomen als Zielgene beschrieben worden waren (43, 44). Aufgrund der Kontamination durch Normalgewebe war eine Eingrenzung der homozygot deletierten Region in Xp22.33 mittels PCR nicht möglich. Allerdings konnte der Einsatz verschiedener FISH-Assays die minimal aberrante Region dieser homozygoten Deletion genauer charakterisieren (Abschnitt 3.3.6.2).

3.3.3.3.2. FISH-Screening der Chromosomenregionen mit homozygoten Deletionen in Mantelzell-Lymphomen

Um zu überprüfen, ob die identifizierten Chromosomenregionen in 2q34, 2q37.3, 12p13.1, 13q33.1, 18q22.1 und Xp22.33, die von bisher nicht beschriebenen homozygoten Deletionen betroffen waren, in Mantelzell-Lymphomen häufiger chromosomale Verluste zeigen, wurden jeweils 27 weitere primäre Mantelzell-Lymphome in diesen Regionen mittels FISH analysiert. Für die Region in 9p21.2 wurde kein FISH-Screening durchgeführt, da Verluste dieser Region in Mantelzell-Lymphomen häufig beschrieben sind und auch die 100K GenChip®-Daten von fünf primären Mantelzell-Lymphomen und 5 Zelllinien hier bereits rekurrente Verluste gezeigt hatten.

Für die FISH-Analysen wurden zunächst sechs lokusspezifische Assays etabliert, mit denen die Aberrationen nachgewiesen werden konnten. Dazu wurden BAC-/PAC- bzw. Fosmid-

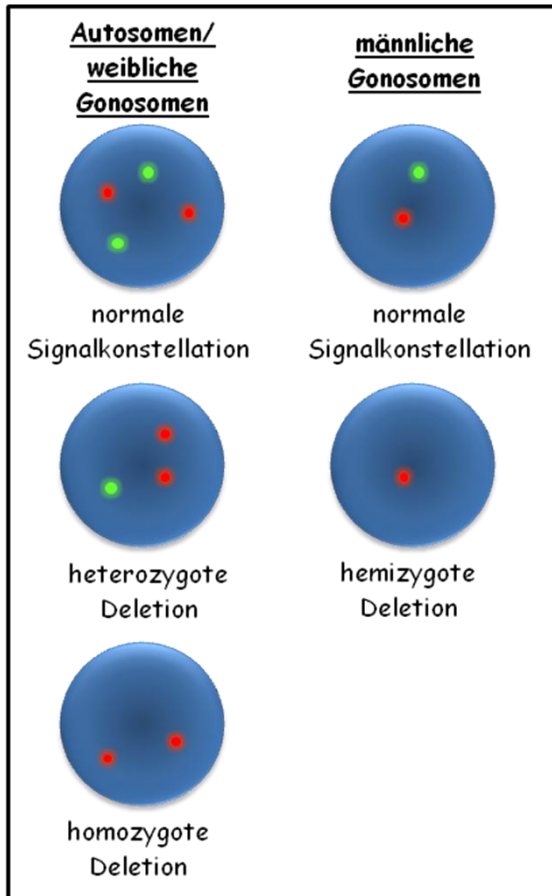


Abbildung 33: Mögliche Signalkonstellationen zum Nachweis chromosomaler Verluste durch lokusspezifische Zweifarb-FISH-Assays.

Klone verwendet, die die betroffenen Chromosomenabschnitte überspannten. Als interne Kontrolle wurde jeweils ein Klon gewählt, der mit einem entfernten Locus auf dem gleichen Chromosom hybridisierte. Die richtige Lokalisation und Spezifität der Sonde wurde durch die Hybridisierung von Kontrollmetaphasen von Zellen aus dem peripheren Blut von fünf Probanden mit normalem Karyotyp überprüft. Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen für Aberrationen in Interphasen wurden jeweils 200 Zellkerne derselben Probanden bezüglich der möglichen Signalkonstellationen bei chromosomalen Verlusten ausgewertet (Abbildung 33). Die Nachweisgrenze wurde

dabei definiert als Mittelwert falsch positiver Ergebnisse in den Kontrollpersonen plus drei Standard-

abweichungen (129). Die ermittelten Nachweisgrenzen für chromosomale Verluste sind für die verschiedenen FISH-Assays in Tabelle 20 zusammengefasst. Die Ergebnisse des FISH-Screenings der 27 primären Mantelzell-Lymphome sind ebenfalls in Tabelle 20 dargestellt. Die häufigsten identifizierten Aberrationen waren heterozygote Deletionen. In der pseudoautosomalen Region in Xp22.33/Yp11.3 konnten in sieben Mantelzell-Lymphomen rekurrente Verluste detektiert werden. Bei der in Tabelle 20 beschriebenen homozygoten Deletion handelt es sich um einen der beiden Fälle, die bereits in der GeneChip®-Analyse eine homozygote Deletion in Xp22.33/Yp11.3 gezeigt hatten. Alle Mantelzell-Lymphome, die in diesem Locus chromosomale Verluste zeigten, stammten von männlichen Patienten. Spätere Analysen konnten in allen Fällen einen Verlust des Y-Chromosoms nachweisen (Abschnitt 3.3.6.2). Bei der Region in Xp22.33/Yp11.3 handelte es sich um dieselbe Region, die bereits in der ArrayCGH-Analyse eines anderen primären Mantelzell-Lymphoms eine homo- bzw. hemizygoten Deletion gezeigt hatte (Abschnitt 3.2.1).

Tabelle 20: Ermittelte Nachweisgrenzen der eingesetzten FISH-Assays und Ergebnisse der FISH-Analysen von 27 primären Mantelzell-Lymphomen

Lokus*	lokusspezifischer BAC-/ Fosmid-Klon ¹	Kontrollsonde ²	Nachweisgrenze für chromosomale Verluste	Anzahl der Mantelzell-Lymphome mit aberranter Signalkonstellation (n=27)	
				heterozygoter Verlust	homozygoter Verlust
2q34	RP11-48D23	CEP 2 (D2Z1) spectrum orange Probe (Abbott/Vysis)	3,8 %	0/27	0/27
	RP11-232I14		3,5 %	1/27	0/27
2q37.3	RP11-449H1	CEP 2 (D2Z1) spectrum orange Probe (Abbott/Vysis)	4,7 %	1/27	0/27
12p13.1	WI2-3113L17	RP11-756G20	8,9 %	3/27	0/27
13q33.1	RP11-230O10	RP11-58C16	3,9 %	0/27	0/27
	RP11-375N5		6,1 %		0/27
18q22.1	RP11-113G19	RP11-806L2	4,0 %	1/27	0/27
Xp22.33*	RP4-674K6	RP13-156P1, RP11-296N8	4,3 %	6/27	1/27

*NCBI Build 35, ¹ spectrum green-markiert, ² spectrum orange-markiert

Zusammenfassend konnten durch das FISH-Screening nur in den Chromosomenregionen 12p13.1 und Xp22.33 rekurrente Verluste identifiziert werden. Eine homozygote Deletion wurde nur in einem Fall in der Chromosomenregion Xp22.33 beobachtet, der diese Aberration bereits in der 100K GeneChip®-Analyse gezeigt hatte. Aufgrund der hohen Anzahl rekurrenter Deletionen und der Gonosomen-Assoziation wurde die Region in Xp22.33 im Verlauf dieser Arbeit weiterführend untersucht (Abschnitt 3.3.6).

3.3.3.3. Mutationsanalysen von Kandidatengen

Nach Eingrenzung der minimal homozygot deletierten Regionen wurde an drei Kandidatengen mittels DHPLC eine Mutationsanalyse durchgeführt. Zu diesen Genen gehörten die beiden Gene *MOBKL2B* und *IFNK* in 9p21.2, die in der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie MAVER-1 homozygot deletiert waren. Diese Genloci lagen zudem innerhalb der minimal aberranten Region im kurzen Arm des Chromosoms 9, die bei der 100K GeneChip®-Analyse in fünf primären Mantelzell-Lymphomen und vier weiteren Mantelzell-Lymphom-Zelllinien rekurrente Deletionen gezeigt hatte (Tabelle 16 in Abschnitt 3.3.3.1). Funktionell war besonders das *MOBKL2B* aufgrund seiner Bedeutung für die Spindelpol-Verdopplung und die Zellzyklus-Regulation interessant (132). Als drittes Kandidatengen für die Mutationsanalyse wurde das *MAP2*-Gen ausgewählt, das als einziges Gen innerhalb der homozygot deletierten Region in 2q34 lag. Der Einfluss des MAP2-Proteins auf Mikrotubuli-Stabilität und -Dynamik machte dieses Gen zu einem geeigneten Kandidatengen, da Mantelzell-Lymphome häufig komplexe Karyotypen zeigen. Das DHPLC-Screening der drei genannten Gene umfasste zunächst 20 primäre Mantelzell-Lymphome und die sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien. Das *MAP2*-Gen wurde nur in fünf der sechs Mantelzell-

Lymphom-Zelllinien untersucht, da es in der Zelllinie UPN-1 homozygot deletiert war. Analyisierte Fragmente, deren DHPLC-Chromatogramme sich gegenüber einer parallel analysierten Kontrolle auffällig zeigten, wurden sequenziert. In den drei kodierenden Exons des *MOBK2B* und dem kodierenden Exon des *IFNK* konnten keine Mutationen identifiziert werden (Tabelle 21). Die DHPLC-Analyse des *MAP2*-Gens zeigte bei einem Mantelzell-Lymphom (Fall-Nr. 16) ein auffälliges Chromatogramm für das Exon 5 (Abbildung 34 A). Die anschließende Sequenzierung konnte eine G > A Transition identifizieren. In Abbildung 34 B ist die detektierte Mutation in der Rückwärtssequenz gezeigt (C > T). Diese Mutation betrifft die erste Position eines kodierenden Triplets und hat einen Aminosäureaustausch von Glutaminsäure (E) zu Lysin (K) zur Folge. In der NCBI Build Datenbank (Version 36.1) gibt es keine Hinweise, dass es sich bei diesem Basenaustausch um einen SNP handeln könnte, und auch die DHPLC-Analyse von 50 DNA-Kontrollen aus dem peripheren Blut gesunder Probanden zeigte keine entsprechende Sequenzveränderung. Aufgrund des positiven Befunds der *MAP2*-Mutationsanalyse wurden noch 20 weitere Mantelzell-Lymphome in diesem Gen mittels DHPLC analysiert. Es konnte allerdings keine weitere Mutation detektiert werden (Tabelle 21).

Tabelle 21: Mutationsanalysen der kodierenden Regionen der drei Kandidatengene *MOBK2B*, *IFNK*, *MAP2* in Mantelzell-Lymphomen

Gene	untersuchte Exons	Anzahl der untersuchten PCR-Fragmente	Anzahl der untersuchten Primärfälle	Anzahl der untersuchten Zelllinien	Anzahl detektierter Mutationen
<i>MOBK2B</i>	Exon 2-4	4	20	6	0
<i>IFNK</i>	Exon 1	2	20	6	0
<i>MAP2</i>	Exon 5-18	25	40	5	1

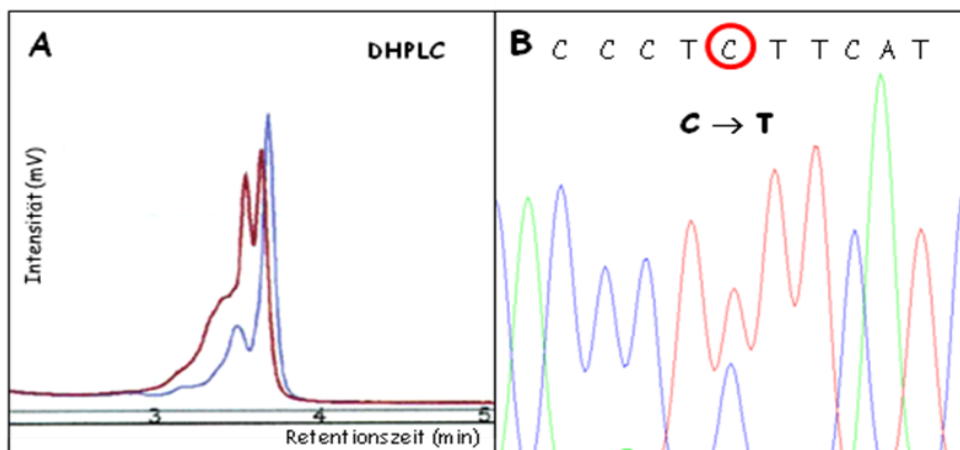


Abbildung 34: Punktmutation innerhalb der kodierenden Sequenz des *MAP2*-Gens. **A)** Das DHPLC-Chromatogramm des Exons 5 des primären Mantelzell-Lymphoms mit der Fall-Nr. 16 (rot) im Vergleich zu einer normalen Kontrolle (blau). **B)** Die Sequenz des aberranten Fragments zeigt eine heterozygote Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz führt (E163K). Hier dargestellt ist der Rückwärtsstrang mit einer C > T Transition.

3.3.4. Identifikation partieller uniparentaler Disomien

Ein großer Vorteil der GeneChip®-Array-Technologie gegenüber der klassischen ArrayCGH ist, dass über die Genotypisierung eine LOH-Berechnung ermöglicht wird. Auf diese Weise können neben chromosomalen Imbalancen auch pUPDs identifiziert werden, d.h. Regionen, die trotz einer regelrechten Kopienzahl von 2 über weite Strecken Homozygotie für die untersuchten SNPs zeigen.

3.3.4.1. Partielle uniparentale Disomien in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Mit Hilfe der 100K GeneChip®-Analysen konnten in jeder der sechs untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien Regionen mit pUPD identifiziert werden. Insgesamt wurden in den Zelllinien 99 Regionen mit pUPD detektiert. Das entspricht einem Mittelwert von 16,5 detektierter pUPDs je Zelllinie, wobei die Anzahl zwischen den einzelnen Zelllinien stark variierte. So wurde in der Zelllinie GRANTA-519 mit nur vier betroffenen Regionen die geringste Anzahl an pUPDs detektiert, wohingegen die Zelllinie HBL-2 mit 31 betroffenen Regionen die meisten pUPDs zeigte (Tabelle 22). Auffällig war, dass die rekurrent von pUPD betroffenen Chromosomenregionen häufig mit Regionen übereinstimmten, die sonst bei Mantelzell-Lymphomen rekurrent deletiert sind, wie beispielweise 8p, 9q oder 17p (Abbildung 35 und Abbildung 36).

Tabelle 22: Anzahl detektierter pUPDs in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Mantelzell-Lymphom-Zelllinie	Anzahl detektierter pUPDs
HBL-2	31
GRANTA-519	4
REC-1	18
UPN-1	12
MAVER-1	7
JEKO-1	27

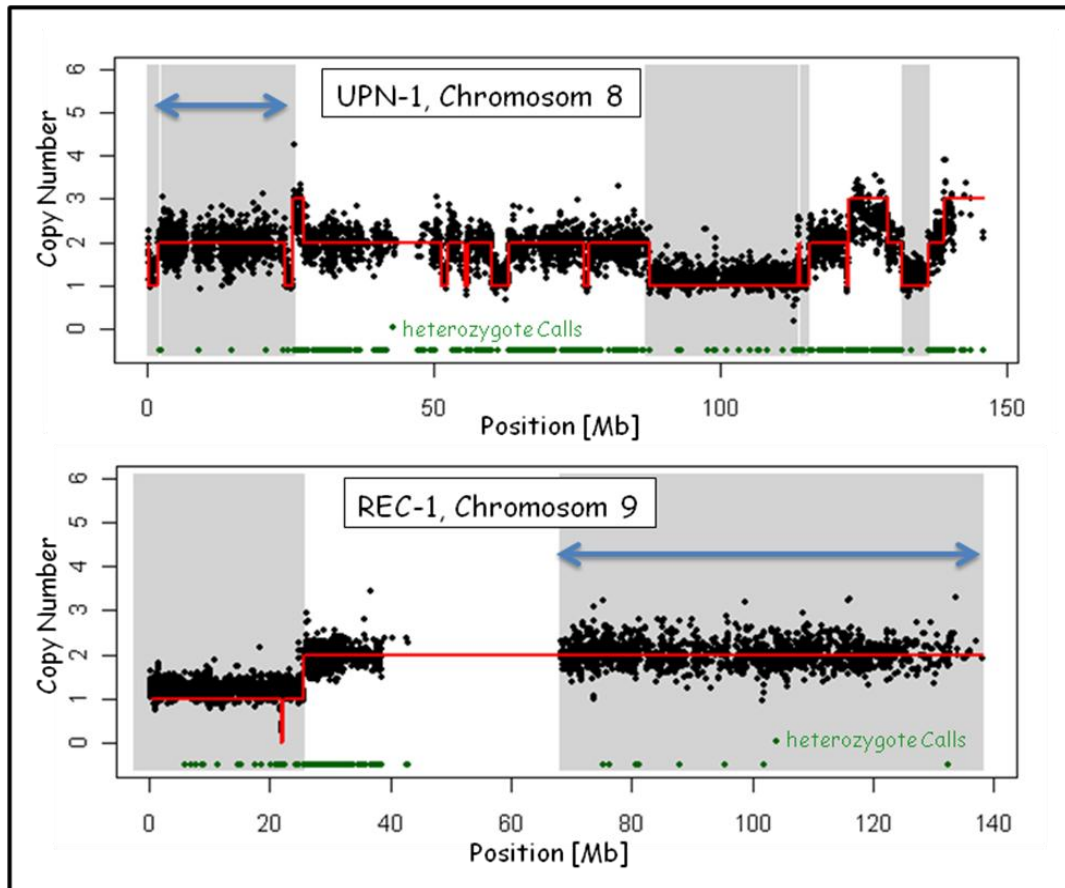


Abbildung 35: Beispiele für Regionen mit pUPD in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien. Das Profil genomischer Imbalancen ist durch schwarze Punkte entlang der X-Achse dargestellt. Die rote Linie entspricht der geschätzten Copy Number. Ein Wert von 2 entspricht dabei einem balancierten Chromosomenstatus. Die Chromosomen sind von pter (links) nach qter (rechts) gezeigt. Heterozygote Calls sind als grüne Punkte dargestellt, die identifizierten LOH-Regionen sind grau hinterlegt. Die blauen Pfeile markieren Regionen mit pUPD, in denen trotz eines Copy-Number-Werts von 2 LOH detektiert wurde.

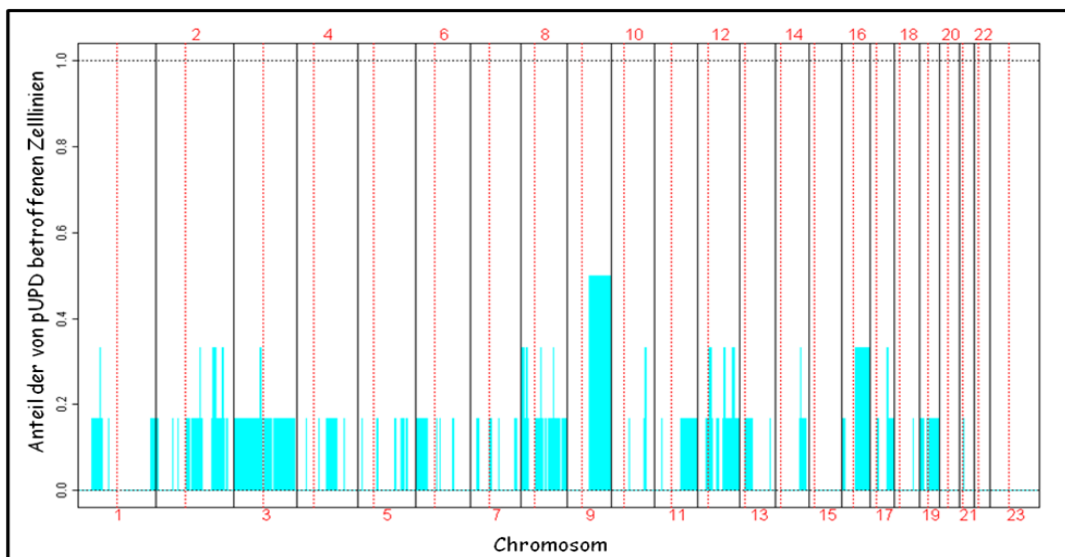


Abbildung 36: Chromosomale Verteilung der detektierten pUPDs in den untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien. Von 1pter (links) nach Xqter (rechts) ist ein genomweiter Summations-Plot gezeigt, in dem die Regionen mit pUPD türkis dargestellt sind. Das Chromosom 23 entspricht dem X-Chromosom.

3.3.4.2. Partielle uniparentale Disomien in primären Mantelzell-Lymphomen

Auch in den primären Mantelzell-Lymphomen ließen sich mittels 100K GeneChip®-Analyse in 18 der 26 untersuchten Mantelzell-Lymphome pUPDs nachweisen. Allerdings war die Anzahl der detektierten pUPDs mit durchschnittlich 1,6 je Primärfall deutlich geringer als bei den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien (etwa 1/10). Mit 5 betroffenen Regionen zeigte das Mantelzell-Lymphom mit der Fall-Nr. 15 die größte Anzahl pUPDs (Tabelle 23).

Tabelle 23: Anzahl der detektierten pUPDs in den untersuchten primären Mantelzell-Lymphomen

Fall-Nr.	Anzahl der detektierten pUPDs	Tumorzellgehalt der Probe [%]
1	1	95
2	1	92
3	1	90
4	3	90
5	3	90
6	0	90
7	1	87
8	4	86
9	4	85
10	0	85
11	3	81
12	0	80
13	0	77
14	3	76
15	5	76
16	1	75
17	0	74
18	0	74
19	0	70
20	4	70
21	2	68
22	0	67
23	1	57
24	2	55
25	2	37
26	1	21

Auch in den primären Mantelzell-Lymphomen stimmten 2 der 4 Regionen, die rekurrent von pUPDs betroffenen waren, mit Chromosomenregionen überein, die sonst bei Mantelzell-Lymphomen häufig deletiert sind. Diese Regionen lagen in 11q und 13q.

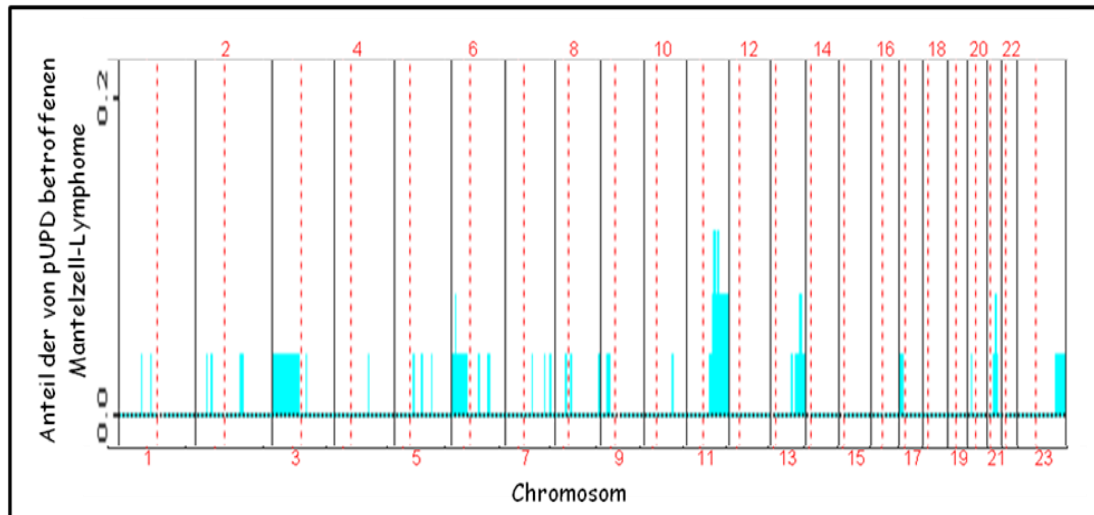


Abbildung 37: Chromosomale Verteilung detektierter pUPDs bei den untersuchten primären Mantelzell-Lymphomen. Gezeigt ist ein genomweiter Summations-Plot von 1pter (links) nach Xqter (rechts), in dem die Regionen mit pUPD türkis dargestellt sind. Das Chromosom 23 entspricht dem X-Chromosom.

3.3.4.3. Tumorsuppressorgen-Inaktivierung durch partielle uniparentale Disomien (pUPD) in Mantelzell-Lymphomen

Die Rolle der pUPDs in der Tumorgenese wurde am Beispiel der Chromosomenregion im kurzen Arm des Chromosoms 17 untersucht (Abbildung 38A). In dieser Region liegt das bekannte Tumorsuppressorgen *TP53*, das in Mantelzell-Lymphomen häufig durch Deletionen und/oder Mutationen inaktiviert ist. In einem der primären Mantelzell-Lymphome (Fall-Nr. 8) konnte eine pUPD festgestellt werden, in die das *TP53*-Gen involviert war. Eine Mutationsanalyse durch direkte Sequenzierung der kodierenden Exons 2-11, inklusive der Exon/Intron-Übergänge, konnte eine homozygote Missense-Mutation durch Basenaustausch eines einzelnen Nukleotids (g.14490 T > A) in Exon 8 detektieren (Abbildung 38B). Die Mutation befindet sich in einer DNA-Bindungsdomäne und führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Asparaginsäure, wodurch die p53-DNA-Interaktion beeinflusst wird (<http://www-p53.iarc.fr>). Eine FISH-Analyse mit einer lokusspezifischen Sonde für das *TP53*-Gen bestätigte den 100K GeneChip®-Daten entsprechend eine normale Gendosis von zwei Kopien (Abbildung 38C). Der Mechanismus der pUPD hat demnach zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens beigetragen, indem das normale zweite Allel verloren ging und durch das mutierte Allel ersetzt wurde. Auf diese Weise konnte sich die Missense-Mutation homozygot auswirken.

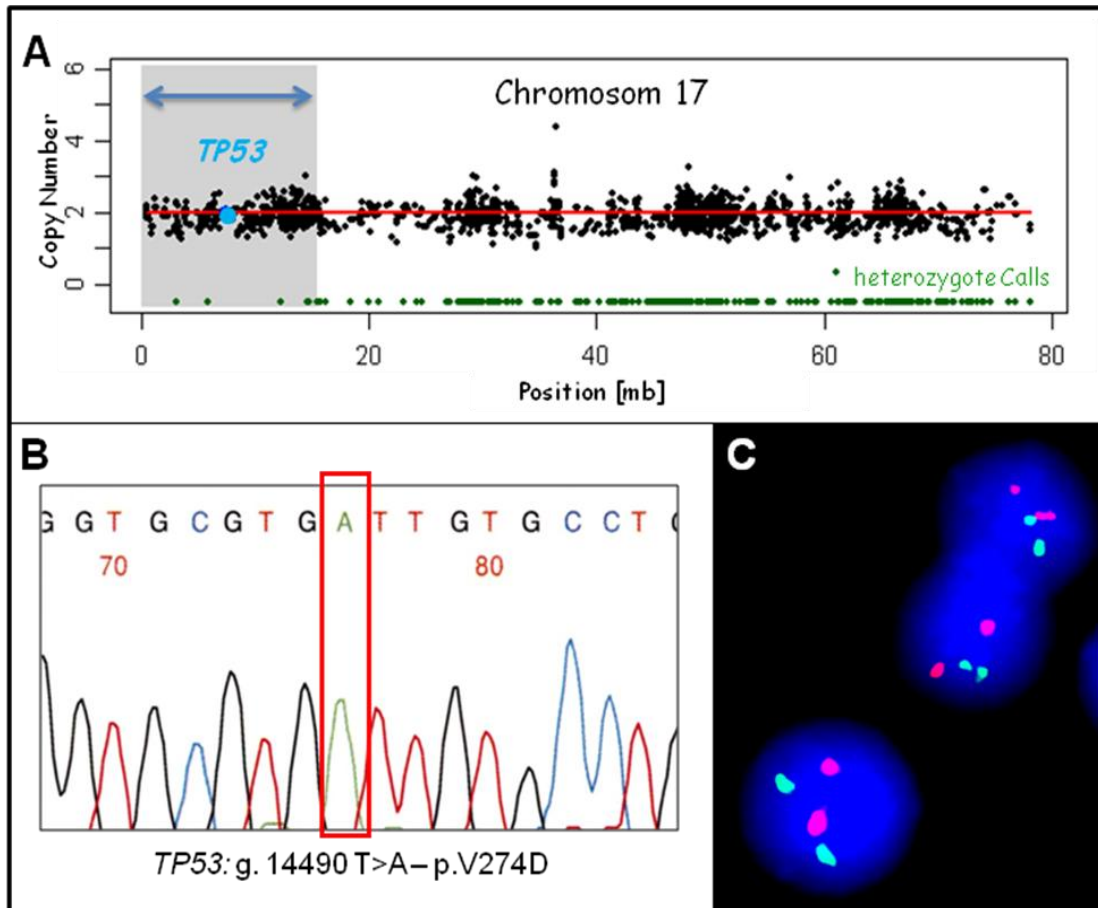


Abbildung 38: *TP53*-Inaktivierung durch pUPD in dem primären Mantelzell-Lymphom mit der Fall-Nr. 8. **A)** Detektion einer pUPD im kurzen Arm des Chromosoms 17. Das Profil genomischer Imbalancen ist durch schwarze Punkte entlang der X-Achse dargestellt. Die rote Linie entspricht der geschätzten Copy Number. Ein Copy Number-Wert von 2 entspricht dabei einem balancierten Chromosomenstatus. Das Chromosom 17 ist von pter (links) nach qter (rechts) aufgetragen. Heterozygote Calls sind als grüne Punkte dargestellt, die LOH-Region ist grau hinterlegt. Der blaue Doppelpfeil markiert die Region mit pUPD, in der trotz eines Copy-Number-Werts von 2 LOH detektiert wurde. Der hellblaue Punkt zeigt den *TP53*-Lokus. **B)** Die DNA-Sequenz des Mantelzell-Lymphoms zeigt eine homozygote Punktmutation des *TP53*-Gens. **C)** FISH an Interphasen dieses Mantelzell-Lymphoms mit lokusspezifischen Sonden für das *TP53*-Gen (spectrum orange markiert, rot) und einen Kontrollloкус in 17q21.2 (spectrum green markiert, grün) zeigt zwei Kopien für den *TP53*-Lokus.

3.3.5. Aberrationen Mikrotubuli-assoziiierter Gene bei Mantelzell-Lymphomen

Die Analyse der 100K GeneChip®-Daten der untersuchten primären Mantelzell-Lymphome und Mantelzell-Lymphom-Zelllinien zeigte, dass bei mehreren chromosomalen Aberrationen verschiedene Gene involviert waren, die für Mikrotubuli-assoziierte Proteine kodieren. Betroffen waren beispielweise die Gene für das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2), das mikrotubuli-assoziierte Protein 6 (MAP6) und den Tumorsuppressor p53, welches ebenfalls die Mikrotubuli-Dynamik beeinflusst. Daraufhin wurden diese Kandidatengene weitergehend untersucht.

3.3.5.1. Genetische Aberrationen des *MAP2*-Gens

Die Mantelzell-Lymphom-Zelllinie UPN-1 zeigte in den 100K GeneChip®-Daten eine Region in 2q34, die den Kriterien einer homozygoten Deletion entsprach (Abschnitt 3.3.3.3, Tabelle 18, Abbildung 39). Mit Hilfe der Multiplex-PCR konnte das vollständige Fehlen dieser Chromosomenregion bestätigt und die Grenzen dieses Bruchereignisses genauer lokalisiert werden (Abbildung 39). In der minimal deletierten Region befand sich nur das *MAP2*-Gen. Auch die Mantelzell-Lymphom-Zelllinie REC-1 zeigte eine heterozygote Deletion des *MAP2*-Gens, allerdings war hier ein längerer Abschnitt des langen Arms des Chromosoms 2 verlorengegangen.

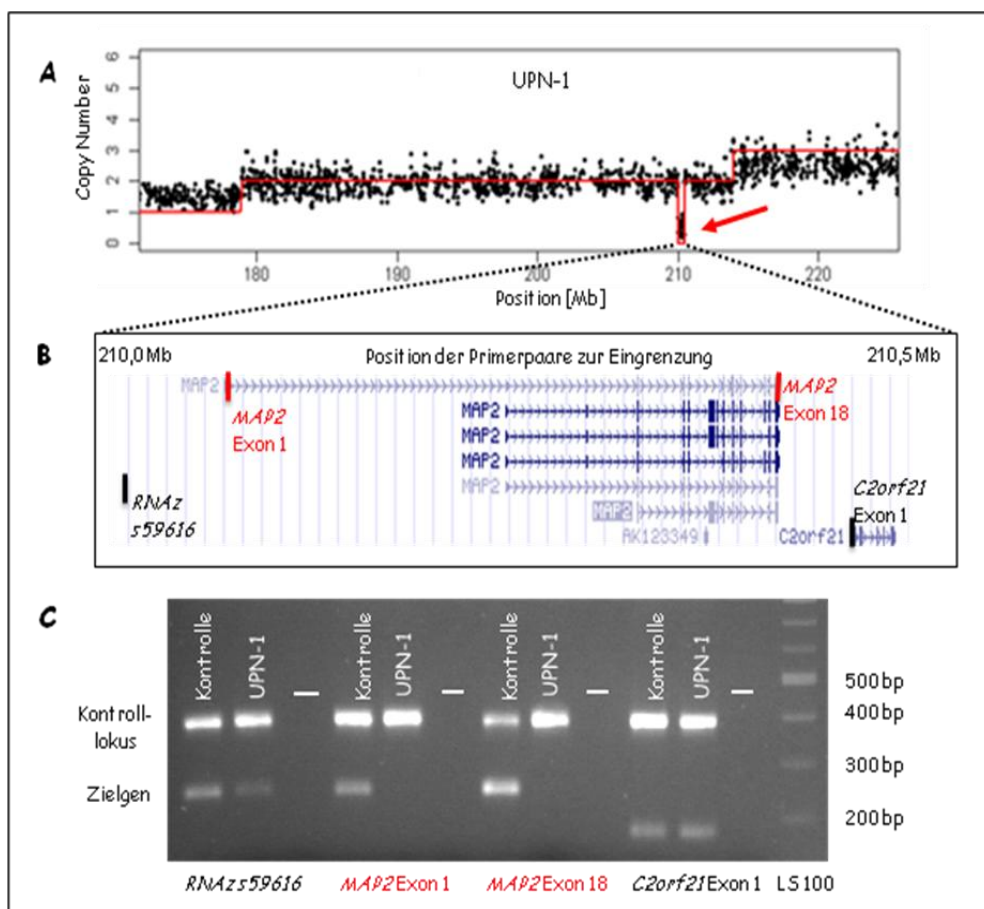


Abbildung 39: Homozygote Deletion in der Chromosomenregion 2q34. **A)** Genomisches Profil eines Teils des Chromosoms 2 der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie UPN-1. Die Copy Number ist in schwarzen Punkten entlang der X-Achse dargestellt mit einem Wert von 2 bei einem balancierten Chromosomenstatus. Die Region im langen Arm des Chromosoms 2 ist von zentromerisch (links) nach telomerisch (rechts) dargestellt. Die rote Linie entspricht der geschätzten Kopienzahl. Ein roter Pfeil markiert die homozygote Deletion. **B)** Ein Auszug des Genome Browsers (NCBI Build 35) zeigt die mit 100K GeneChip® Mapping ermittelte minimal aberrante Region mit den darin enthaltenen Genen. Die Primer, mit denen die homozygote Deletion mittels Multiplex-PCR bestätigt werden konnte, sind rot, die anderen Primer schwarz markiert. **C)** Multiplex-PCRs der Zielgene und eines Kontrolllokus bestätigten die homozygote Deletion des *MAP2*-Gens, nicht aber die der angrenzenden Gene *RNAs59616* und *C2orf21* in der Zelllinie UPN-1. Als Kontrolle wurde DNA aus dem peripheren Blut eines gesunden Probanden verwendet. Für die Negativkontrolle (-) wurde dem PCR-Ansatz dH₂O statt DNA zugefügt.

3.3.5.2. Epigenetische Veränderungen des *MAP2*-Gens

Um den DNA-Methylierungsstatus des CpG-Islands des *MAP2*-Gens zu untersuchen, wurde an der mit Natriumbisulfit behandelten DNA von 20 primären Mantelzell-Lymphomen und fünf Mantelzell-Lymphom-Zelllinien eine MSP durchgeführt. Für die MSP-Analysen wurden nur die Mantelzell-Lymphome mit einem Tumorzellgehalt > 70 % ausgewählt. In 18 der 20 analysierten Primärfälle zeigte das Muster der PCR-Produkte eine partielle DNA-Methylierung. Die Zelllinien JEKO-1 und HBL-2 zeigten ebenfalls eine partielle *MAP2*-Methylierung. Das MSP-Bandenmuster der Zelllinie REC-1 zeigte sogar eine vollständige DNA-Methylierung des *MAP2*-CpG-Islands. Bei dieser Zelllinie ist eine Kopie des *MAP2*-Gens vollständig deletiert. Das verbleibende *MAP2*-Allel liegt offensichtlich hypermethyliert vor. Die Zelllinie GRANTA-519 zeigte nur eine schwache Bande für methylierte DNA. MAVER-1 und die zwei weiteren Primärfälle schienen anhand des MSP-Bandenmusters vollständig unmethyliert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Mantelzell-Lymphome, zeigte die MSP von neun Kontrollen (vier Tonsillen und fünfmal peripheres Blut) einen vollständig unmethylierten Zustand des *MAP2*-CpG-Islands (Abbildung 40B).

Da eine Quantifizierung methylierter und unmethylierter DNA mit Hilfe der MSP nicht möglich ist, wurde der DNA-Methylierungsstatus bei einem Teil der Proben zusätzlich mit der wesentlich aufwändigeren Methode der Bisulfitsequenzierung ermittelt. Insgesamt wurden fünf Mantelzell-Lymphom-Zelllinien, sechs primäre Mantelzell-Lymphome sowie sechs Kontrollen (drei Tonsillen und dreimal peripheres Blut) untersucht. Nach PCR-Amplifikation der mit Natriumbisulfit behandelten DNA, wurden die PCR-Fragmente mit einem geeigneten Vektor ligiert und in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Die Quantifizierung erfolgte durch die Sequenzierung von jeweils 10 Klonen. Ohne Ausnahme korrelierten die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung mit denen der MSP (Abbildung 40). Darüberhinaus ließen die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung zumindest in dem primären Mantelzell-Lymphom mit der Fall-Nr. 2 unter Berücksichtigung des Tumorzellgehalts der Probe (92 %) eine vollständige Methylierung des *MAP2*-CpG-Islands vermuten. Die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung für jeden einzelnen Klon aller analysierten Proben sind in Anhang 3 gezeigt.

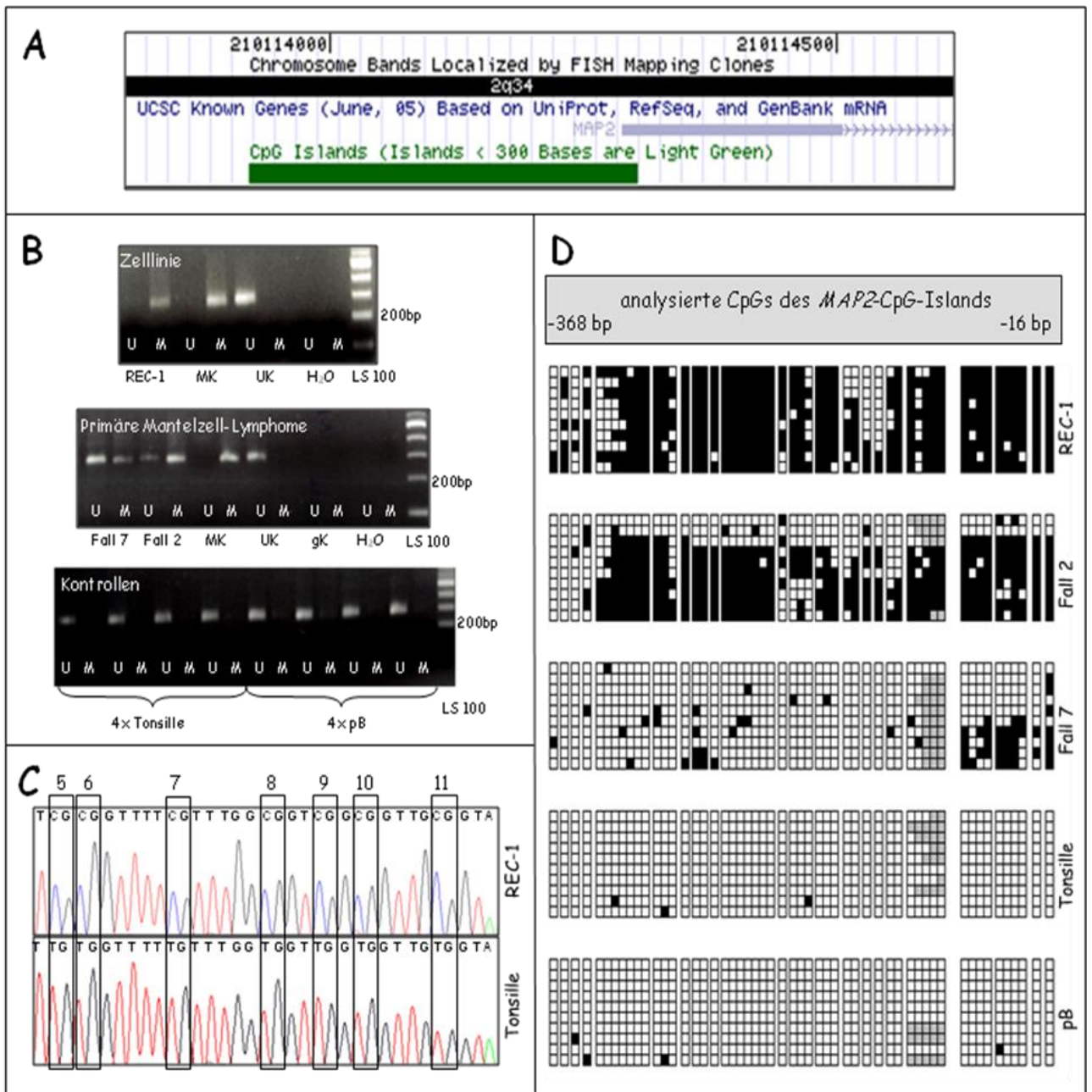


Abbildung 40: Epigenetische Analysen des *MAP2*-CpG-Islands. **A)** Auszug des Genom Browsers (NCBI Build 35), in dem die Lage des *MAP2*-CpG-Islands erkennbar ist. **B)** MSP des *MAP2*-CpG-Islands der Zelllinie REC-1, der zwei primären Mantelzell-Lymphome und der Kontrollen. Es wurden zwei spezifische Primerpaare zum Nachweis methylierter (M) und unmethylierter (U) DNA verwendet. Die methylierungsspezifische Amplifikation wurde anhand einer universell methylierten (MK) und einer universell unmethylierten (UK) Kontroll-DNA überprüft. Eine genomische Kontroll-DNA (gK) wurde verwendet, um unspezifische Amplifikation auszuschließen. **C)** Teil der analysierten Sequenz des *MAP2*-CpG-Islands der Zelllinie REC-1 und des Tonsillengewebes. Die in der dargestellten Sequenz enthaltenen CpG-Dinukleotide 5-11 sind durch schwarze Rahmen hervorgehoben. **D)** Ergebnisse der Bisulfidsequenzierung der Zelllinie REC-1, zwei primärer Mantelzell-Lymphome sowie einer Tonsille und peripheren Bluts eines gesunden Probanden als Kontrolle. Jede Spalte entspricht einem CpG-Dinukleotid, jede Zeile entspricht einem von 10 sequenzierten Klonen. Methylierte CpGs sind schwarz, unmethylierte CpGs weiß dargestellt. Die CpG-Dinukleotide, die nicht ausgewertet werden konnten, sind grau markiert.

Tabelle 24: Ergebnisse der epigenetischen Analysen des *MAP2*-Gens in Mantelzell-Lymphomen

Mantelzell-Lymphom (Primärfall oder Zelllinie)	methylierungs-spezifische PCR	Bisulfitsequenzierung
Fall-Nr. 1	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 2	partiell methyliert	partiell methyliert
Fall-Nr. 3	partiell methyliert	partiell methyliert
Fall-Nr. 4	unmethyliert	/
Fall-Nr. 5	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 6	partiell methyliert	partiell methyliert
Fall-Nr. 7	partiell methyliert	partiell methyliert
Fall-Nr. 8	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 9	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 10	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 11	unmethyliert	/
Fall-Nr. 12	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 13	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 14	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 15	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 16	partiell methyliert	partiell methyliert
Fall-Nr. 17	partiell methyliert	partiell methyliert
Fall-Nr. 18	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 19	partiell methyliert	/
Fall-Nr. 20	partiell methyliert	/
MAVER-1	unmethyliert	unmethyliert
JEKO-1	partiell methyliert	partiell methyliert
HBL-2	partiell methyliert	partiell methyliert
REC-1	methyliert	methyliert
GRANTA-519	unmethyliert	unmethyliert

*In den Primärfällen gilt die Beschreibung „partiell methyliert“ für das gesamte Untersuchungsmaterial, da eine Unterscheidung zwischen Tumorzellen und kontaminierendem Gewebe mit den angewandten Analysemethoden nicht möglich war.
/: nicht untersucht*

Mittels epigenetischer Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass DNA-Hypermethylierung des *MAP2*-Gens ein häufiges Ereignis sowohl in primären Mantelzell-Lymphomen als auch in Mantelzell-Lymphom-Zelllinien darstellt. Damit wurde neben Deletion und Mutation ein weiterer molekularer Mechanismus identifiziert, der zu einer Inaktivierung dieses potentiellen Tumorsuppressorgens in Mantelzell-Lymphomen führt.

3.3.5.3. Expressionsanalyse des *MAP2*-Gens

Der Einfluß der identifizierten genetischen und epigenetischen Aberrationen des *MAP2*-Gens auf dessen Expression sollte zunächst mit Hilfe quantitativer RT-PCR auf mRNA-Ebene untersucht werden. Um eine mögliche differentielle *MAP2*-Expression anschließend auch auf Protein-Ebene nachweisen zu können, wurden drei verschiedene Verfahren gewählt, der Western Blot, die Immunfluoreszenz-Mikroskopie und die Immunhistochemie.

3.3.5.3.1. Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Konzentration des *MAP2*-Gens

Für die quantitative RT-PCR wurden zwei verschiedene kommerzielle Primerassays verwendet, mit denen alle bekannten *MAP2*-Transkriptvarianten nachgewiesen werden konnten. Zur relativen Quantifizierung wurden parallel die drei Housekeeping-Gene Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), β -Glucuronidase (*GUSB*) und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (*G6PD*) amplifiziert. Die Untersuchungen wurden an den sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien durchgeführt, da hiervon genug Material zur RNA-Extraktion zur Verfügung stand. Als Kontrolle dienten die vereinigten Lymphknoten-RNAs von 12 kaukasischen Spendern. Alternativ wurde auch die extrahierte RNA aus Tonsillengewebe verwendet. Mit jedem der Primerassays wurde je Zelllinie eine Dreifachbestimmung durchgeführt, aus der ein Mittelwert berechnet wurde. Die relativen Standardabweichungen lagen je nach Messung zwischen 0,35-6 % (Mittelwert 1,5 %). In allen untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien konnte eine Expression der drei Housekeeping-Gene bestimmt und zur relativen Quantifizierung verwendet werden. In den Zelllinien UPN-1 und REC-1 konnten keine *MAP2*-Transkripte nachgewiesen werden. Die Ergebnisse für die Zelllinie HBL-2 zeigten eine erniedrigte Expression aller *MAP2*-Transkripte im Vergleich zum normalen Lymphknotengewebe. In GRANTA-519 und MAVER-1 war die *MAP2*-Expression vergleichbar oder minimal reduziert, wohingegen die Zelllinie JEKO-1 im Vergleich zum gesunden Lymphknotengewebe eine wesentlich stärkere Expression aller *MAP2*-Transkripte zeigte (Abbildung 41). Die Analyse mit Tonsillengewebe als Referenz lieferte vergleichbare Ergebnisse.

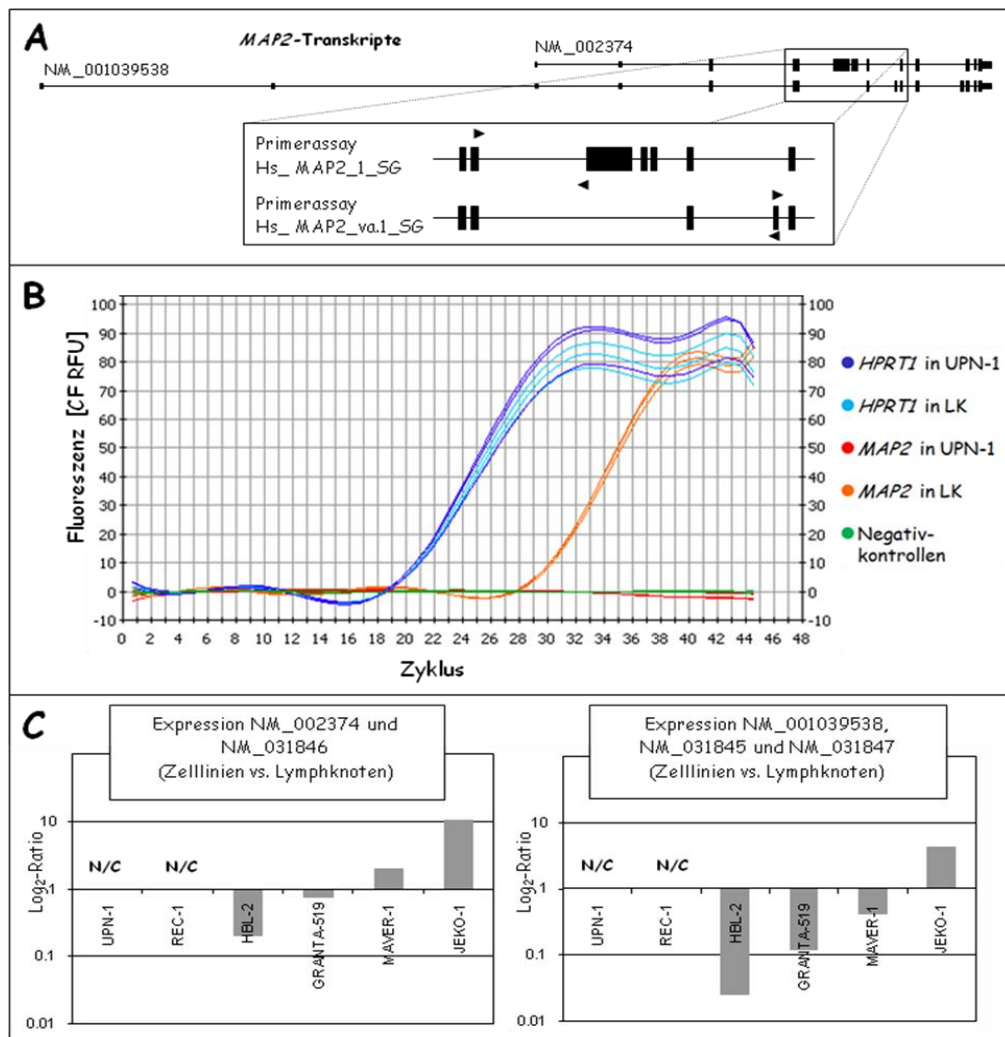


Abbildung 41: Quantitative RT-PCR zur Untersuchung der *MAP2*-Expression in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien. **A)** Zum Nachweis aller bekannten *MAP2*-Transkripte, von denen zwei dargestellt sind, wurden zwei verschiedene Primerassays verwendet. Die Position der Primer ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. **B)** Beispiel für die Echtzeit-Quantifizierung der PCR-Produkte. Dargestellt ist die Messung der Zelllinie UPN-1 sowie des gesunden Lymphknotengewebes (LK) mit einem der beiden Primerassays (Hs_MAP2_1_SG) zur *MAP2*-Analyse und dem Primerassay zur Analyse des Housekeeping-Gens *HPRT1* (CF RFU: Curve Fit Relative Fluorescence Units). Den Negativkontrollen wurde dH₂O statt cDNA zugefügt. **C)** Differenz der *MAP2*-Expression der sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien zu der *MAP2*-Expression von gesundem Lymphknotengewebe. Die relative *MAP2*-Expression jeder Probe wurde anhand der mittleren Expression dreier Housekeeping-Gene ermittelt. In den Zelllinien UPN-1 und REC-1 wurden keine *MAP2*-Transkripte detektiert, demnach konnte die log₂-Ratio nicht berechnet werden (N/C: not calculable).

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR konnte die genetisch bzw. epigenetisch bedingte vollständige Inaktivierung des *MAP2*-Gens in den Zelllinien UPN-1 und REC-1 bestätigt werden. Insgesamt zeigte die *MAP2*-Expression in allen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien bis auf JEKO-1 eine große Übereinstimmung mit den Ergebnissen der epigenetischen Analysen. So wurde in den Methylierungs-Analysen der Zelllinie HBL-2 eine partielle DNA-Methylierung beobachtet, wohingegen die Zelllinien GRANTA-519 und MAVER-1 kaum bzw. überhaupt keine Methylierung zeigten.

3.3.5.3.2. Western Blot-Analyse der MAP2-Proteinexpression

In dieser Arbeit sollte mit der Methode des Western Blots die Expression des MAP2-Proteins anhand der Kern-, Zytoplasma- und Gesamtlysate der sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien untersucht werden. Als Kontrollen dienten die entsprechenden Lysate von Zellen aus Tonsillengewebe oder dem peripheren Blut eines gesunden Probanden. Es wurden drei verschiedene kommerziell erhältliche MAP2-Antikörper eingesetzt. Zwei dieser Antikörper waren monoklonal und stammten aus der Maus (Abcam, Sigma-Aldrich). Bei dem dritten handelte es sich um einen polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen (Cell Signaling).

Um das erfolgreiche Blotten und Färben überprüfen zu können, wurde zusätzlich zu dem jeweiligen Primärantikörper ein β -Tubulin-Antikörper aus der Maus als interne Kontrolle eingesetzt. Weder in den Lysaten der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien noch in denen der Kontrollen ließen sich mit einem der drei Antikörper spezifische Banden der zu erwartenden Größe von 280kDa (MAP2A), 270kDa (MAP2B), 70kDa (MAP2C) und 75kDa (MAP2D) detektieren. Die Antikörper wurden sowohl bei der empfohlenen Verdünnung von 1/1000 als auch bei einer Verdünnung von 1/500 getestet. Der β -Tubulin-Antikörper detektierte in allen Lysaten eine spezifische Bande der zu erwartenden Größe (55 kDa), so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine methodischen Fehler aufgetreten sind.

3.3.5.3.3. Immunfluoreszenz-Analyse der MAP2-Proteinexpression

Mit der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sollte das MAP2-Protein direkt an Kryo- oder Paraffinschnitten nachgewiesen werden. Da das MAP2-Protein *in vivo* mit den Mikrotubuli assoziiert ist, wurde eine Lokalisation im Zytoplasma der Zellen erwartet. Als Positiv-Kontrolle diente ein CD20-Antikörper aus der Maus. Als Negativkontrolle wurden die entsprechenden Schnitte nur mit dem Sekundärantikörper behandelt. Auf diese Weise konnten unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden. Keiner der drei zur Verfügung stehenden MAP2-Antikörper (Abschnitt 3.3.5.3.2) zeigte in der Immunfluoreszenz an Kryo- oder Paraffinschnitten normaler Tonsillen eine spezifische Fluoreszenz-Färbung im Vergleich zur Negativkontrolle. Im Gegensatz dazu konnte in einer parallelen Färbung mit einem CD20-Antikörper als Primärantikörper sowohl an Kryo- als auch an Paraffinschnitten eine spezifische zytoplasmatische Fluoreszenzfärbung beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden keine weiterführenden Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Präparaten der Mantelzell-Lymphome durchgeführt.

3.3.5.3.4. Immunhistochemische Analyse der MAP2-Proteinexpression

Auch bei der Immunhistochemie sollte das MAP2-Protein direkt am Gewebeschnitt nachgewiesen werden. Für die Austestung der drei MAP2-Antikörper (Abschnitt 3.3.5.3.4) wurden Paraffinschnitte aus dem Gehirn (Cortex) sowie der Tonsille verwendet. Das Gehirnpräparat diente dabei als Positivkontrolle, da das MAP2-Protein in den Dendriten der Neuronen besonders stark exprimiert wird. Die besten Ergebnisse für den immunhistochemischen Nachweis des MAP2-Proteins lieferte der monoklonale MAP2-Antikörper der Firma Abcam. Abbildung 42 zeigt die mit diesem Antikörper immunhistochemisch behandelten Paraffinschnitte des Cortex und der Tonsille.

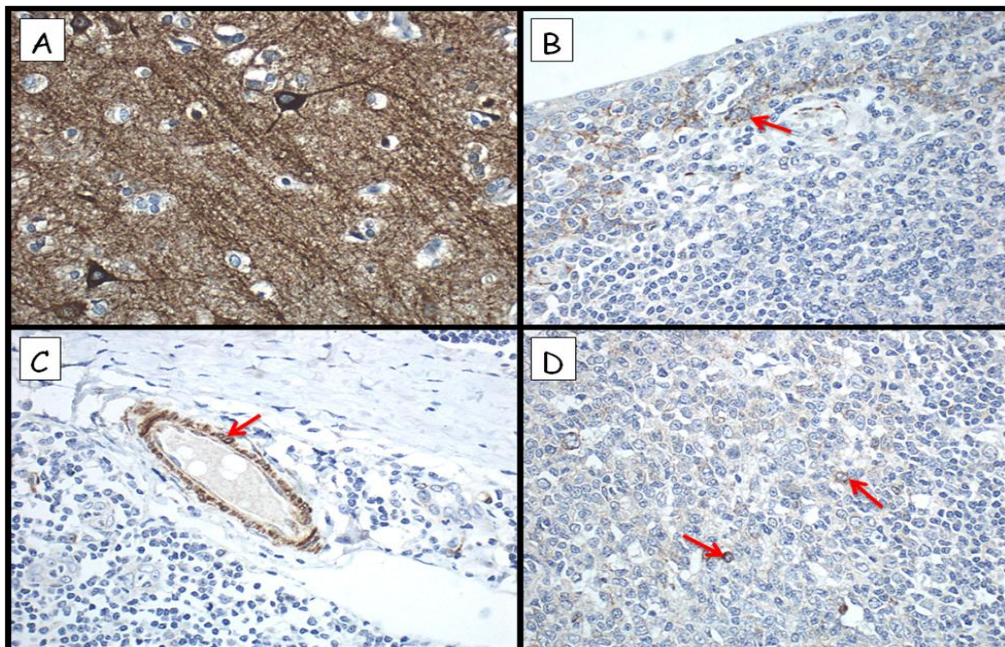


Abbildung 42: MAP2-immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten **(A)** des Gehirns (Cortex) und **(B-D)** einer Tonsille. Das Zytoplasma der Zellen aus dem Gehirn zeigte eine kräftige bräunliche Färbung. In der Tonsille konnte hauptsächlich in den Epithelzellen des Basal-Layers **(B)** und in den myofibroblastischen Zellen **(C)** der Gefäße MAP2-Protein nachgewiesen werden. Im Keimzentrum **(D)** zeigten hingegen nur vereinzelte Zellen eine eindeutige Reaktion.

Wie erwartet zeigte der Paraffinschnitt des Gehirns im Zytoplasma fast aller Zellen eine kräftige bräunliche Färbung, was auf eine starke MAP2-Expression rückschließen lässt. In der Tonsille hingegen konnte nur in sehr wenigen Zellen, vor allem des Epithels und der Gefäße, eine MAP2-Expression nachgewiesen werden. Von den Zellen des Keimzentrums zeigten nur wenige eine starke zytoplasmatische bräunliche Färbung. Zwar wurde innerhalb des Keimzentrums eine verbreitete sehr schwache Färbung beobachtet, allerdings konnte nicht eindeutig beurteilt werden, ob es sich hierbei um eine spezifische Reaktion handelte. Das

Signal wurde nicht, wie zu erwarten wäre, strikt zirkulär um die lymphatischen Zellen herum im Zytoplasma detektiert, sondern diffus in den interzellulären Räumen. Es könnte sich folglich um eine unspezifische Reaktion follikulärer dendritischer Zellen handeln, deren Ausläufer zwischen den lymphatischen Zellen liegen. Follikuläre dendritische Zellen reagieren bei einigen immunhistologischen Färbungen schwach mit. Da sich in den Zellen der Mantelzone des Keimzentrums mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung nicht eindeutig MAP2-Protein detektieren ließ, wurde auf die Untersuchung von Mantelzell-Lymphom-Präparaten verzichtet. Für einen Nachweis einer unterdrückten oder reduzierten MAP2-Expression der aberranten Mantelzell-Lymphom-Zellen im Vergleich zu normalen Lymphozyten des Keimzentrums erschien diese Methode nicht sensitiv genug.

3.3.5.4. High-Level-Amplifikationen des *MAP6*-Gens

Mit der 100K GeneChip®-Analyse wurden in den drei Mantelzell-Lymphom-Zelllinien MAVER-1, JEKO-1 und HBL-2 High-Level-Amplifikationen identifiziert, die das *MAP6*-Gen in der Chromosomenregion 11q13.5 enthielten (Abbildung 43).

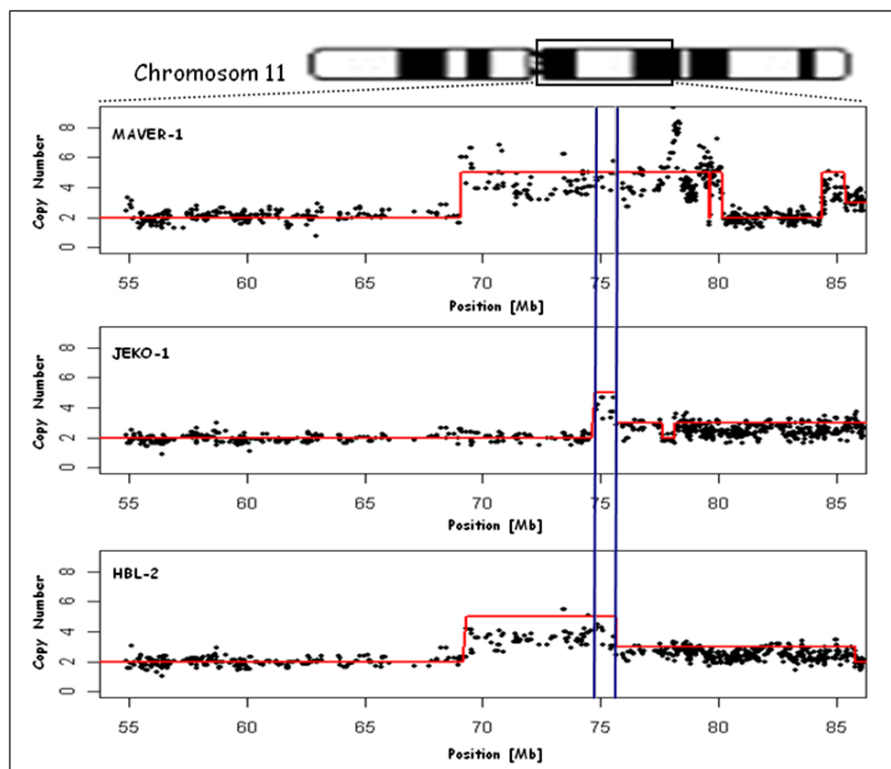


Abbildung 43: Genomische Profile eines Teils des Chromosoms 11 von drei Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mit High-Level-Amplifikationen des *MAP6*-Gens. Der Wert für die Copy Number jedes SNPs ist als schwarzer Punkt dargestellt. Die rote Linie entspricht der geschätzten Kopienzahl, wobei ein Wert von 2 einem normalen Status entspricht. Der Chromosomenabschnitt im langen Arm des Chromosoms 11 ist von zentromerisch nach telomerisch dargestellt. Die minimal aberrante Region ist durch zwei blaue Balken hervorgehoben.

Um die Ergebnisse der 100K GeneChip®-Analysen bestätigen zu können, wurde ein FISH-Assay mit einem den *MAP6*-Lokus überspannenden BAC-Klon in 11q13.5 und einer Kontrollsonde in 11q22.3 etabliert. Die wie in Abschnitt 3.3.3.2 beschrieben bestimmte Nachweisgrenze betrug 4,2 %. Mit Hilfe dieses FISH-Assays konnte der *MAP6*-Zugewinn in allen drei Zelllinien bestätigt werden. In der MAVER-1-Zelllinie konnte eine aus FISH und R-Bänderung kombinierte Analyse die Existenz zweier derivativer Chromosomen 6 nachweisen, die beide die amplifizierte Region in 11q13.5 enthielten (Abbildung 44). Nach ISCN-Nomenklatur wurden die beiden derivativen Chromosomen wie folgt beschrieben: $\text{der}(6)(6\text{pter}\rightarrow 6\text{q}22::11\text{q}13\text{?}::11\text{q}22\text{?}11\text{q}23::11\text{q}22 \rightarrow 11\text{q}23::?)$ für das in Abbildung 44E als „A“ bezeichnete derivative Chromosom 6 und $\text{der}(6)(\text{?}::6\text{p}21\text{?}6\text{q}22::11\text{q}13\text{?}11\text{q}14::11\text{q}23\text{?amp})$ für das in Abbildung 44E als „B“ bezeichnete Chromosom 6. Ein FISH-Screening an Interphasekernen von 27 primären Mantelzell-Lymphomen identifizierte außerdem in einem der Fälle (Fall-Nr. 38) fünf *MAP6*-Genkopien. Allerdings war von dieser Aberration auch der Kontrollloкус in 11q22.3 betroffen. In den übrigen 26 Mantelzell-Lymphomen konnten keine chromosomalen Zugewinne des *MAP6*-Gens beobachtet werden.

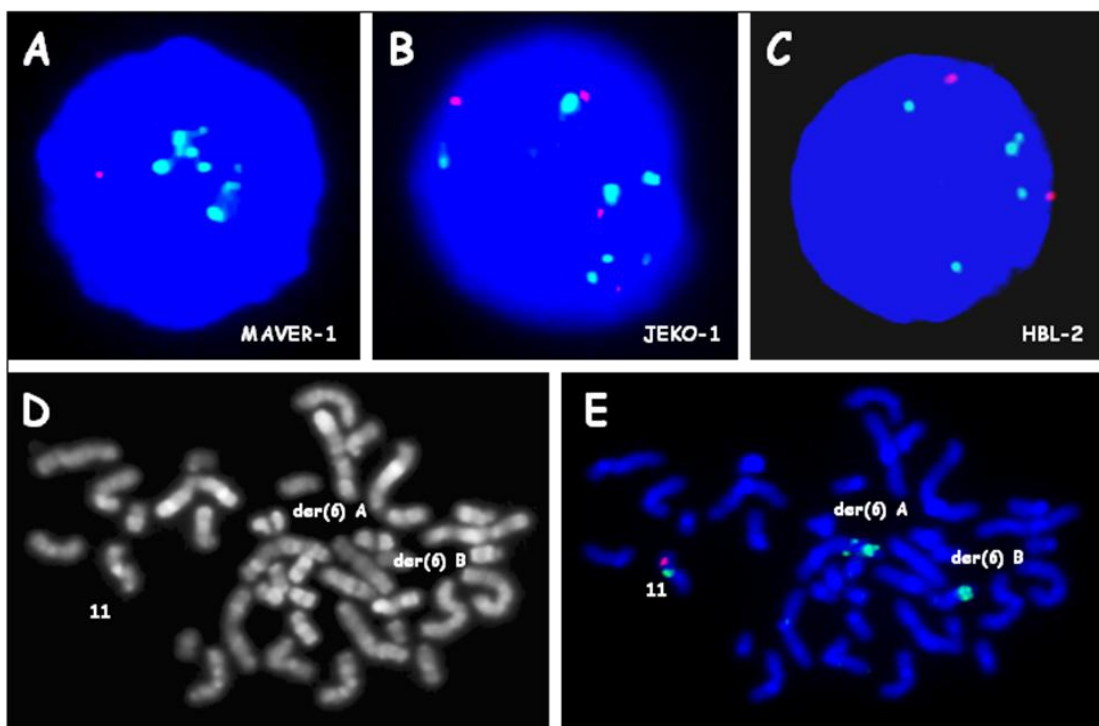


Abbildung 44: High-Level-Amplifikationen des *MAP6*-Gens. **A-C)** FISH an Interphasen dreier Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mit einer lokusspezifischen Sonde für das *MAP6*-Gen (spectrum green) und einer Sonde für einen Kontrollloкус in 11q22.3 (spectrum orange). **D-E)** R-Bänderung gefolgt von FISH an Metaphasen mit dem beschriebenen *MAP6*-Assay identifizierte in der Zelllinie MAVER-1 zwei derivative Chromosomen 6, welche die amplifizierte 11q13.5 Region enthielten.

3.3.5.4.1. Expressionsanalyse des *MAP6*-Gens

Um zu untersuchen, ob sich die erhöhte *MAP6*-Gendosis in den betroffenen Zelllinien auf die Genexpression auswirkt, wurde an allen sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mit einem *MAP6*-spezifischen Primerassay eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Zur relativen Quantifizierung wurden wie bei der Analyse der *MAP2*-Expression (Abschnitt 3.3.5.3) parallel die drei Housekeeping-Gene *HPRT1*, *GUSB* und *G6PD* amplifiziert. Als normale Kontrolle wurde RNA aus Tonsillengewebe verwendet. Mit jedem der Primerassays wurde je Zelllinie eine Dreifachbestimmung durchgeführt, aus der ein Mittelwert berechnet wurde. Die relativen Standardabweichungen lagen je nach Messung zwischen 0,4-11 % (Mittelwert 3,6 %). In allen untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien konnte eine Expression der drei Housekeeping-Gene detektiert und zur relativen Quantifizierung verwendet werden. In den Zelllinien UPN-1 und HBL-2 ließ sich keine *MAP6*-Expression nachweisen. In den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien JEKO-1, GRANTA-519 und REC-1 war die Expression des *MAP6*-Gens gegenüber dem Kontrollgewebe deutlich erhöht. Auch die Zelllinie MAVER-1 zeigte eine etwas stärkere *MAP6*-Expression als das Tonsillengewebe (Abbildung 45).

Demnach korrelierten die Ergebnisse der *MAP6*-RT-PCR nur zum Teil mit den durch die 100K GeneChip®-Analyse identifizierten High-Level-Amplifikationen. Zwar zeigten drei der sechs untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien eine deutlich gesteigerte *MAP6*-Expression in Vergleich zum normalen Tonsillengewebe, allerdings war von den dreien nur in der Zelllinie JEKO-1 eine High-Level-Amplifikation identifiziert worden. MAVER-1 zeigte nur eine geringfügig höhere *MAP6*-Expression als das verwendete Kontrollgewebe, obwohl mit der 100K GeneChip®-Analyse und der nachfolgenden FISH-Untersuchung eine High-Level-Amplifikation des *MAP6*-Lokus in dieser Zelllinie nachgewiesen wurde. Obwohl auch in HBL-2 mit dem 100K GeneChip®-Mapping und FISH ein Zugewinn > 5 des *MAP6*-Gens identifiziert werden konnte, wurde in dieser Zelllinie keine *MAP6*-Expression detektiert.

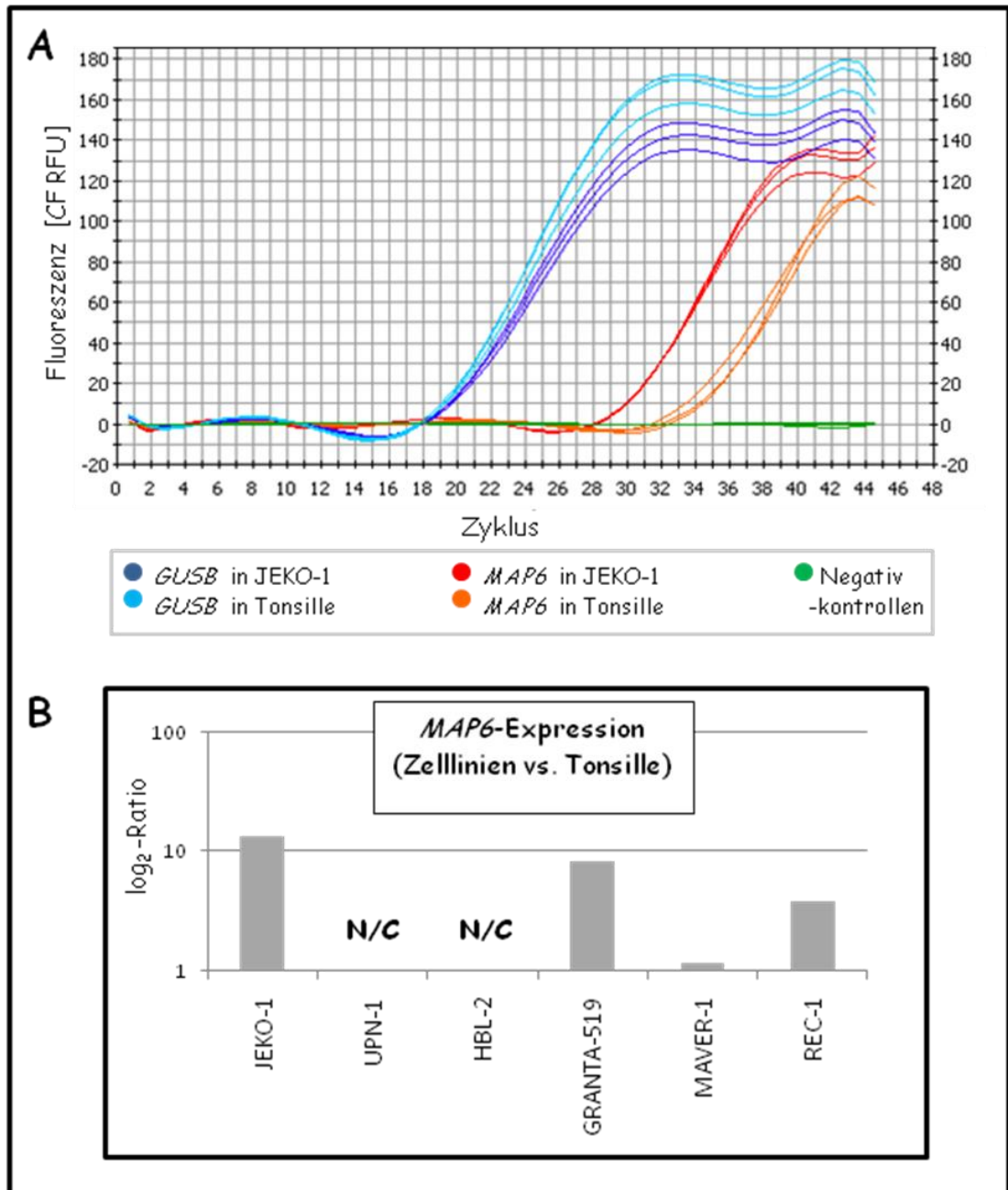


Abbildung 45: Quantitative RT-PCR des *MAP6*-Gens in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien. **A)** Beispiel für die Echtzeit-Quantifizierung der PCR-Produkte. Dargestellt sind die Messungen der Zelllinie JEKO-1 sowie des Tonsillengewebes mit dem Primerassay für die *MAP6*-Analyse und dem Primerassay zur Analyse des Housekeeping-Gens *GUSB* (CF RFU: Curve Fit Relative Fluorescence Units). **B)** Differenz der *MAP6*-Expression in den sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien zur *MAP6*-Expression im gesunden Tonsillengewebe. Dafür wurde die relative *MAP6*-Expression jeder Probe anhand der mittleren Expression dreier Housekeeping-Gene ermittelt. In den Zelllinien UPN-1 und HBL-2 ließ sich keine *MAP6*-Expression nachweisen, demnach konnte die \log_2 -Ratio nicht berechnet werden (N/C: not calculable).

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Expressionsanalyse und der ermittelten *MAP6*-Gendosis der Zelllinien könnte dadurch bedingt sein, dass der verwendete Primerassay zur Detektion des bekannten neuronalen Vollängentranskripts entworfen wurde und möglicherweise alternative Transkriptvarianten nicht detektiert. Im Gegensatz zum humanen *MAP6*, von dem bislang nur das neuronale Vollängentranskript nachgewiesen und charakterisiert werden konnte, sind in Nagetieren verschiedene kürzere Transkriptvarianten bekannt, die vor allem in Zellen nicht neuronaler Gewebe identifiziert wurden (133). Demnach wurden die funktionell relevanten nicht neuronalen Transkripte in den Lymphomzelllinien möglicherweise trotz Anreicherung durch den Primerassay nicht detektiert.

3.3.5.5. Tumorsuppressor-Protein 53

Da auch das p53-Protein die dynamische Instabilität der Mikrotubuli beeinflusst (134), wurden in allen 26 primären Mantelzell-Lymphomen und den sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien, die für die GeneChip®-Analysen verwendet wurden, eine *TP53*-Mutationsanalyse durchgeführt. Ein Fall wurde bereits bei der Untersuchung der pUPDs direkt sequenziert (Abschnitt 3.3.4.3). In den anderen Fällen wurde eine DHPLC-Analyse durchgeführt, wobei Fragmente, die ein auffälliges Chromatogramm zeigten, anschließend sequenziert wurden. Insgesamt zeigten sieben der 26 primären Mantelzell-Lymphome Mutationen innerhalb der kodierenden Sequenz des *TP53*-Gens. Bei den detektierten Mutationen handelte es sich um sechs verschiedene Punktmutationen, bei denen jeweils eine Base ausgetauscht war, sowie um eine Mikrodeletion eines einzelnen Basenpaares. In allen diesen Fällen hatte die 100K GeneChip®-Analyse einen Verlust des zweiten Allels durch Deletion oder pUPD gezeigt (Abbildung 46, Tabelle 25). In den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien UPN-1, HBL-2, MAVER-1 und JEKO-1 wurden drei Punktmutationen und eine Mikrodeletion im *TP53*-Gen identifiziert. In allen diesen Zelllinien war das zweite Allel deletiert (Tabelle 25). Die Zelllinien REC-1 und GRANTA-519 zeigten beide das *TP53*-Wildtypallel, wobei in der letzteren eine heterozygote Deletion des Gens vorlag. Ein Teil der Ergebnisse der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurde bereits in anderen Studien beschrieben (96, 97, 99, 102).

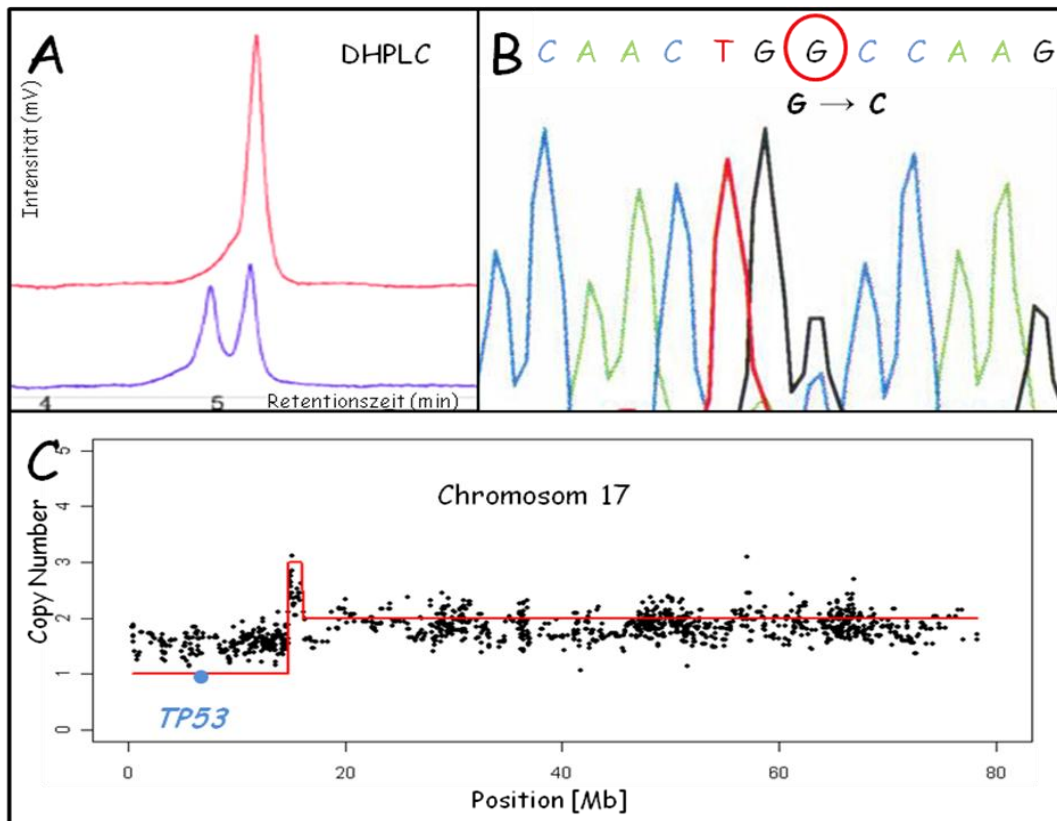


Abbildung 46: Detektion einer Mutation im TP53-Gen eines primären Mantelzell-Lymphoms. **A)** Auffälliges DHPLC-Chromatogramm des Exons 5 von dem Mantelzell-Lymphom Nr. 21 (lila) im Vergleich zu einer normalen Kontrolle (rot). **B)** Die DNA-Sequenz des aberranten Fragments zeigt eine Punktmutation (C > G), die zu einem Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz führt (A138P). **C)** 100K GeneChip®-basierte Copy Number-Analyse des Chromosoms 17 von dem Mantelzell-Lymphom Nr. 21. Die Copy Number ist in schwarzen Punkten entlang der X-Achse dargestellt mit einem Wert von 2 bei einem balancierten Chromosomenstatus. Das Chromosom 17 ist von pter (links) nach qter (rechts) dargestellt. Die rote Linie entspricht der geschätzten Kopienzahl. Die 100K GeneChip®-Daten zeigen, dass in den Tumorzellen ein TP53-Allel durch Deletion des kurzen Arms des Chromosoms 17 verloren gegangen ist. Folglich liegt die detektierte Mutation im TP53-Gen in den Tumorzellen homozygot vor. Der Tumorzellgehalt der Probe betrug nur 68 %, was dazu geführt hat, dass die homozygote Mutation in den Tumorzellen bei der Sequenzierung von der Wildtypsequenz des kontaminierenden Normalgewebes überlagert wurde (B).

Tabelle 25: TP53-Mutationsanalyse bei Mantelzell-Lymphomen

primäre Mantelzell-Lymphome [Fall-Nr.]	TP53-Mutation	2. Aberration in 17p13.1
4	g.12178 delC - p.122X	Deletion
6	g.14487 G > T - p.R273L	Deletion
8	g.14490 T > A - p.V274D	pUPD
15	g.13203 G > A - p.R175H	Deletion
17	g.14070 C > T - p.R248L	Deletion
19	g.12108 G > T - p.E62X	Deletion
21	g.13091 G > C - p.A138P	Deletion
Mantelzell-Lymphom-Zelllinien	TP53-Mutation	2. Aberration in 17p13.1
UPN-1	g.14525 G > A - p.E286K	Deletion
MAVER-1	g.14511 A > G - p.D281G	Deletion
JEKO-1	g.12096 delC - p.58X	Deletion
HBL-2	g.14511 A > G - p.D281G	Deletion

g.: Position der genomischen DNA-Sequenz, p.: Position der Proteinsequenz (<http://www-p53.iarc.fr>)

Mit der *TP53*-Mutationsanalyse konnte gezeigt werden, dass in 27 % der primären Mantelzell-Lymphome und in 67 % der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien kein funktionsfähiges Wildtypallel vorhanden war.

3.3.5.6. Häufigkeit von Aberrationen Mikrotubuli-assoziiierter Gene in Mantelzell-Lymphomen

Betrachtet man neben den Ergebnissen der *TP53*-Mutationsanalyse auch die Ergebnisse der verschiedenen *MAP2*- und *MAP6*-Untersuchungen, so gibt es von den 20 primären Mantelzell-Lymphomen, an denen eine *MAP2*-MSP durchgeführt werden konnte, nur einen Fall, bei dem in keinem der drei Gene eine genetische oder epigenetische Veränderung identifiziert werden konnte (Tabelle 26). Von den sechs untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien konnte nur in der GRANTA-519-Zelllinie keine Veränderung in einem der drei Gene nachgewiesen werden (Tabelle 26). Leider stand für die *MAP6*-FISH-Analyse nicht mehr von allen Fällen ausreichend Material zur Verfügung.

Tabelle 26: Übersicht (epi-)genetischer Aberrationen der untersuchten Mikrotubuli-assoziierten Gene in 20 primären Mantelzell-Lymphomen (Tumorzellgehalt > 70 %) und sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien

Mantelzell-Lymphom (Primärfall oder Zelllinie)	<i>TP53</i>	<i>MAP2</i>	<i>MAP6</i>
Fall-Nr. 1	keine Mutation	methyliert	/
Fall-Nr. 2	keine Mutation	methyliert	kein Zugewinn
Fall-Nr. 3	keine Mutation	methyliert	/
Fall-Nr. 4	Mutation/Deletion	unmethyliert	kein Zugewinn
Fall-Nr. 5	keine Mutation	methyliert	/
Fall-Nr. 6	Mutation/Deletion	methyliert	kein Zugewinn
Fall-Nr. 7	keine Mutation	methyliert	kein Zugewinn
Fall-Nr. 8	Mutation/pUPD	methyliert	kein Zugewinn
Fall-Nr. 9	keine Mutation	methyliert	/
Fall-Nr. 10	keine Mutation	methyliert	/
Fall-Nr. 11	keine Mutation	unmethyliert	kein Zugewinn
Fall-Nr. 12	keine Mutation	methyliert	/
Fall-Nr. 13	keine Mutation	methyliert	kein Zugewinn
Fall-Nr. 14	keine Mutation	methyliert	/
Fall-Nr. 15	Mutation/Deletion	methyliert	/
Fall-Nr. 16	keine Mutation	Mutation/methyliert	kein Zugewinn
Fall-Nr. 17	Mutation/Deletion	methyliert	/
Fall-Nr. 18	keine Mutation	methyliert	kein Zugewinn
Fall-Nr. 19	Mutation/Deletion	methyliert	kein Zugewinn
Fall-Nr. 20	keine Mutation	methyliert	kein Zugewinn
UPN-1	Mutation/Deletion	homozygote Deletion	kein Zugewinn
MAVER-1	Mutation/Deletion	unmethyliert	High-Level-Amplifikation
JEKO-1	Mutation/Deletion	methyliert	High-Level-Amplifikation
HBL-2	Mutation/Deletion	methyliert	High-Level-Amplifikation
REC-1	keine Mutation	methyliert/Deletion	kein Zugewinn
GRANTA 519	keine Mutation	unmethyliert	kein Zugewinn

/: kein *MAP6*-FISH, da für diese Analyse nicht mehr ausreichend Material zur Verfügung stand.

Die aberranten Befunde sind farbig hervorgehoben.

Zusammengefasst konnten die Analysen der Mikrotubuli-assoziierten Gene *MAP2*, *MAP6* und *TP53* zeigen, dass genetische und epigenetische Veränderungen dieser Gene rekurrent in Mantelzell-Lymphomen auftreten. Dabei war das *MAP2*-Gen besonders häufig betroffen. Auch die durchgeführten quantitativen RT-PCR-Analysen konnten in den untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien eine rekurrente Inaktivierung des *MAP2*-Gens bestätigen. Aberrationen im *MAP6*-Gen traten nur in den untersuchten Zelllinien, nicht aber in den primären Mantelzell-Lymphomen auf. Auch konnte hier nicht immer eine Korrelation mit der Genexpression festgestellt werden. Die *TP53*-Mutationsanalyse in Verbindung mit den 100K GeneChip®-Microarray-Daten zeigte in den primären Mantelzell-Lymphomen und in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien eine rekurrente Inaktivierung dieses Tumorsuppressorgens durch Mutation und LOH.

3.3.6. Genetische Veränderungen der Geschlechtschromosomen

Eine Hypothese zur Erklärung der Prädominanz des männlichen Geschlechts bei Mantelzell-Lymphomen beruht auf dem Vorliegen eines genetischen oder epigenetischen Defekts, der mit den Geschlechtschromosomen assoziiert ist. Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit war demzufolge die Identifikation chromosomaler Aberrationen des X- oder Y-Chromosoms. Bei der 100K GeneChip®-Analyse war aufgefallen, dass die pseudoautosomale Region 1 (PAR1) in Xp22.33/Yp11.3 in zwei primären Mantelzell-Lymphomen homozygot deletiert war. Ein FISH-Screening an 16 Mantelzell-Lymphomen hatte außerdem in sechs weiteren Fällen heterozygote Verluste dieser Chromosomenregion gezeigt, wobei keine Unterscheidung zwischen X- und Y-chromosomalen Verlusten möglich war. Ein rekurrenter Verlust des Y-Chromosoms wurde bereits in mehreren Mantelzell-Lymphom-Studien erwähnt (24-26), allerdings wurde diese Aberration in keiner dieser Studien genauer untersucht. Um die Rekurrenz einer Deletion des Y-Chromosoms zu überprüfen, wurde mit Hilfe der Karyotyp-Analyse-Software des Progenetix-Projektes (www.progenetix.de) anhand der Daten der Mitelman-Datenbank (Oktober 2007 Edition) aus 365 Einträgen t(11;14)-positiver B-NHL männlicher Patienten (ausgeschlossen Plasmazytome/Multiple Myelome, nicht weiter spezifizierte NHL und unreife NHL) die Häufigkeit eines Chromosom-Y-Verlusts berechnet. Dabei zeigten 42 der 365 t(11;14)-positiven Lymphome (11,5 %) diese numerische Aberration. Des Weiteren wurde anhand eigener zytogenetischer Daten des Instituts für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) die Häufigkeit eines Verlustes des Y-Chromosoms aus 80 Fällen t(11;14)-positiver Lymphome von männlichen Patienten ermittelt. Hier zeigten 22 der

80 in die Analyse eingeschlossenen Lymphome (27,5 %) eine Deletion des Y-Chromosoms. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Rolle des Chromosom-Y-Verlusts als sekundäre Aberration bei Mantelzell-Lymphomen im Folgenden genauer untersucht. Anschließend sollte die pseudoautosomale Region in Xp22.33/Yp11.3 weiter charakterisiert werden.

3.3.6.1. Verlust des Y-Chromosoms bei Mantelzell-Lymphomen

Um zwischen einem altersabhängigen zufälligen Verlust und einem klonalen tumorassoziierten Verlust des Y-Chromosoms unterscheiden zu können, sollte untersucht werden, ob diese numerische Aberration auf die t(11;14)-positiven Mantelzell-Lymphom-Zellen beschränkt ist, oder ob sie auch in den normalen Zellen der Biopsien zu finden ist. Dafür wurde ein Dreifarbf-FISH-Assay entwickelt, mit dem gleichzeitig die Translokation t(11;14)(q13;q32) und die Chromosomenregion Yq12 nachgewiesen werden konnten (Abbildung 47). Die wie in Abschnitt 3.3.3.3.2 bestimmte Nachweisgrenze für chromosomale Verluste des Y-Chromosoms lag bei 3%. Es wurden 21 Mantelzell-Lymphome männlicher Patienten hybridisiert, bei denen im Rahmen der Diagnostik oder vorangegangener Forschungsprojekte des Instituts für Humangenetik ein Chromosom-Y-Verlust beschrieben worden war. In 18 der 21 untersuchten Mantelzell-Lymphome konnte der Verlust des Y-Chromosoms durch FISH bestätigt werden. In den drei übrigen Fällen ließ sich hingegen Yq12-Chromosomenmaterial nachweisen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen waren im Karyotyp dieser drei Mantelzell-Lymphome Markerchromosomen beschrieben, die vermutlich das durch die FISH-Probe detektierte Chromosomenmaterial trugen. In den 18 Mantelzell-Lymphom-Proben, in denen ein Verlust des Y-Chromosoms nachgewiesen werden konnte, wurden jeweils 100 t(11;14)-positive und 100 t(11;14)-negative Zellen ausgewertet. In 12 dieser Mantelzell-Lymphome zeigten nur die t(11;14)-positiven Zellen einen Verlust des Y-Chromosoms (Abbildung 48). In drei weiteren Fällen war zwar in 9 % (Fall-Nr. 64), 12 % (Fall-Nr. 62) und 16 % (Fall-Nr. 39) der t(11;14)-negativen Zellen das Y-Chromosom verlorengegangen, allerdings war der Anteil der t(11;14)-positiven Zellen ohne Y-Chromosom deutlich größer (5,9-8,3 fach). Demnach schien der Verlust des Y-Chromosoms in 83 % der untersuchten Mantelzell-Lymphome ein klonales Ereignis zu sein. In 5 der 15 Mantelzell-Lymphome mit klonalem Chromosom-Y-Verlust wurde auch ein geringer Anteil (mindestens 3 %, variierte von 3-44 %) t(11;14)-positiver Zellen ohne Deletion des Y-Chromosoms beobachtet (Fall-Nr. 44, 58, 39, 18 und 64) (Abbildung 48). Das Vorhandensein des Y-Chromosoms in diesen Lymphom-Zellen deutet daraufhin, dass sich die Aberration sekundär zur Translokation t(11;14)(q13;q32) ereignete.

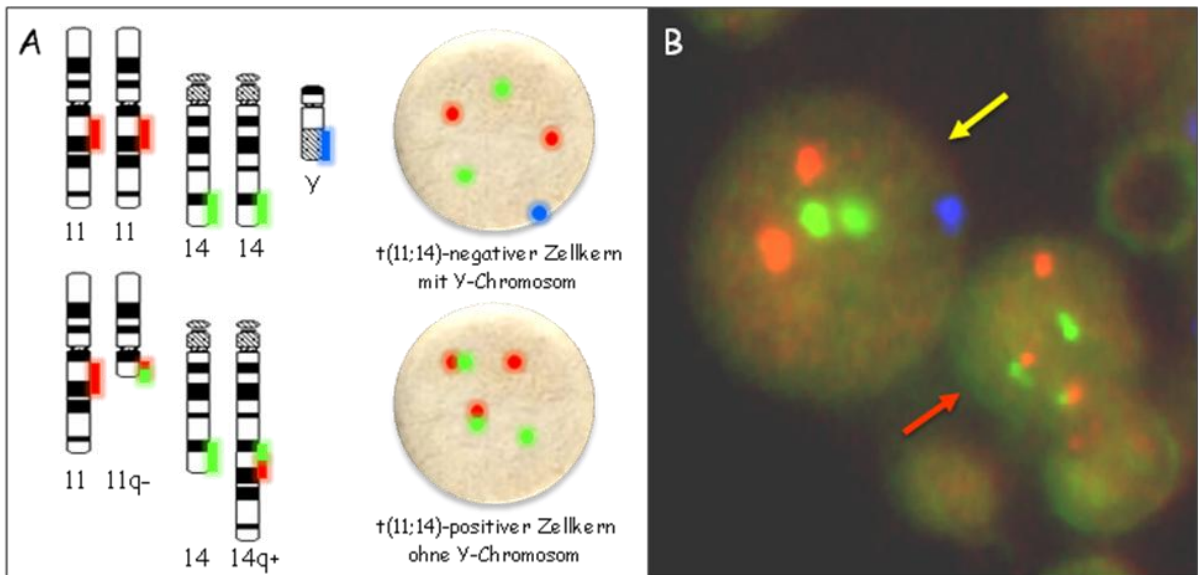


Abbildung 47: A) Dreifarbf-FISH mit der rot/grün markierten LSI IGH/CCND1 Dual Color Probe (Abbott/Vysis) in Kombination mit der blau markierten CEP Y SAT III-Probe für die Detektion des Y-Chromosoms (Abbott/Vysis). Durch die Kolokalisation von roten und grünen Signalen ließ sich die Translokation t(11;14)(q13;q32) nachweisen. Ein blaues Signal zeigte das Vorhandensein eines Y-Chromosoms. B) Bei diesem Mantelzell-Lymphom (Fall-Nr. 25) ließ sich das Y-Chromosom nur in den t(11;14)-negativen Zellkernen der normalen Zellen (gelber Pfeil), aber nicht in den t(11;14)-positiven Mantelzell-Lymphom-Zellkernen (roter Pfeil) nachweisen.

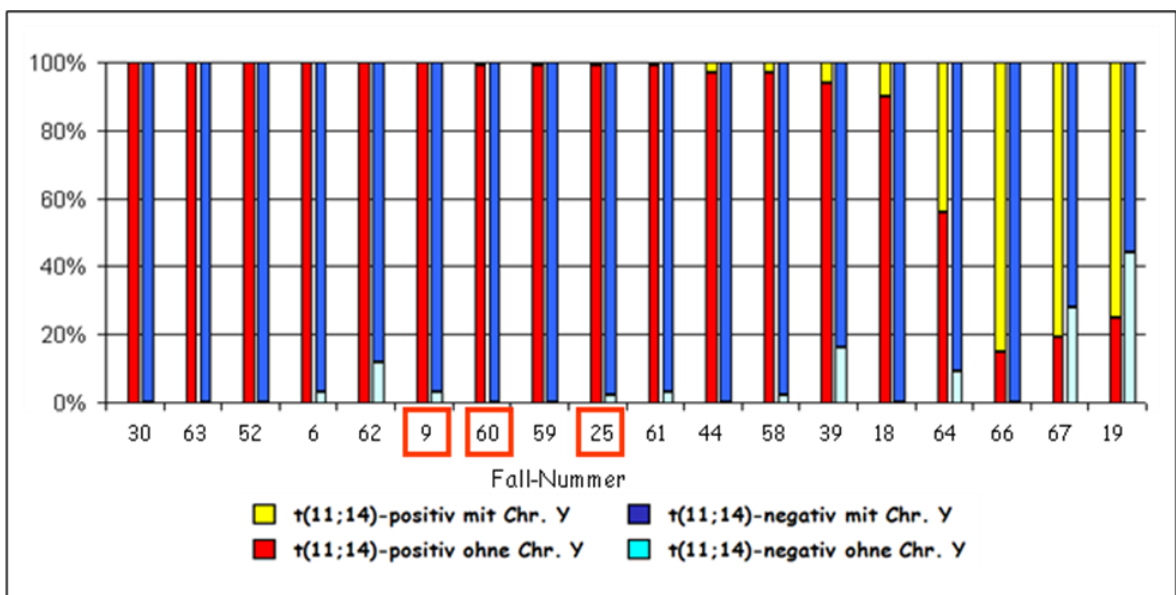


Abbildung 48: Anteil der Zellen mit Verlust des Y-Chromosoms in den t(11;14)(q13;q32)-positiven Tumorzellen (linke Säule) und den t(11;14)(q13;q32)-negativen normalen Zellen (rechte Säule) von 18 primären Mantelzell-Lymphomen. Von jedem Fall wurden die Interphasekerne von jeweils 100 Tumorzellen und 100 normalen Zellen mittels FISH ausgewertet. Die Mantelzell-Lymphome, die zudem eine Deletion der PAR1-Region in Xp22.33 zeigten, sind durch einen roten Rahmen gekennzeichnet.

3.3.6.2. Deletion der pseudoautosomalen Region 1 (PAR1)

Das Y-Chromosom besitzt nur wenige Gene. Die meisten dieser Gene befinden sich innerhalb der beiden pseudoautosomalen Regionen, die homolog zu Chromosomenabschnitten des X-Chromosoms sind und mit diesen rekombinieren können. Bereits in den unter Abschnitt 3.2.1 beschriebenen ArrayCGH-Daten konnte in einem der 68 untersuchten t(11;14)-positiven primären Mantelzell-Lymphome eine biallelische Deletion des terminalen Abschnittes des kurzen Arms von Chromosom X identifiziert werden. Die detektierte Region beinhaltete den *KAL1*-Genlocus in Xp22.31 sowie die pseudoautosomale Region 1 (PAR1). Auch in den 100K GeneChip®-Daten der Mantelzell-Lymphome konnte in zwei primären Mantelzell-Lymphomen (Fall-Nr. 9 und Fall-Nr. 25) eine homozygote Deletion der PAR1-Region in Xp22.33/Yp11.3 detektiert werden. Mit der Dreifarbf-FISH-Analyse (Abschnitt 3.3.6.1) konnte in beiden Fällen ein Verlust des Y-Chromosoms nachgewiesen werden. Anhand der 100K GeneChip®-Daten umfasste die minimal aberrante Region etwa 2,5 Mb vom Xp-Telomer bis zum SNP "rs5982788" (Abbildung 49). In dieser Region befinden sich 16 pseudoautosomale Gene (Tabelle 27).

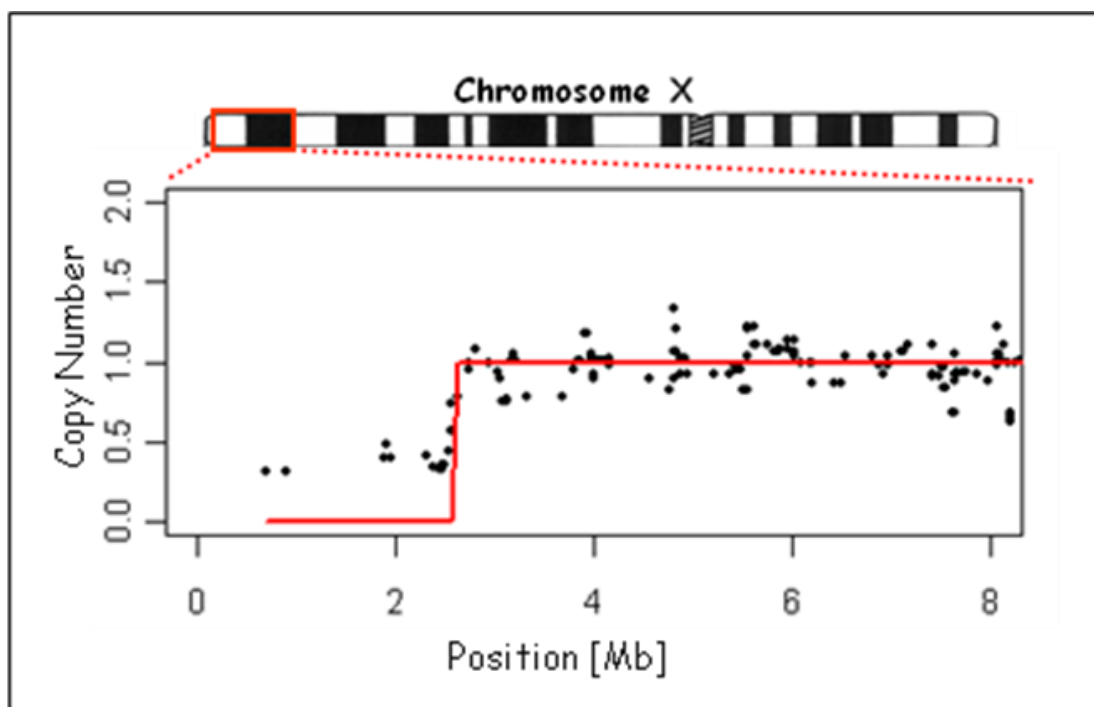


Abbildung 49: Homozygote PAR1-Deletion. Die 100K GeneChip®-Copy Number-Analyse des Mantelzell-Lymphoms mit der Fall-Nr. 9 zeigt eine homozygote Deletion der PAR1-Region in Xp22.33. Die Copy Number ist durch schwarze Punkte entlang der X-Achse dargestellt. Die rote Linie entspricht der geschätzten Kopienzahl nach Glättung der Daten. Das genomische Profil des X-Chromosoms ist vom p-Telomer (links) bis zur 8 Mb-Position (rechts) dargestellt. Der Copy Number-Wert von 1 entspricht dem normalen Status eines X-Chromosoms beim männlichen Geschlecht.

Tabelle 27: Gene innerhalb der PAR1-Deletion und Position der für die FISH-Assays verwendeten BAC-/PAC-Klone

Gensymbol	Name des Gens	Position [bp] * auf Chromosom X und Y	genüberspannende BAC/PAC-Klone
PLCXD1	Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C	132.992-160.020	-
GTPBP6	GTP Binding Protein like	161.426-170.887	-
PPP2R3B	Protein Phosphatase 2, regulatory Subunit B	264.970-272.590	-
SHOX	short stature Homeobox	555.079-590.146	RP11-800K15
ATRX	α-Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked	772.383-982.187	-
PGAM4	Phosphoglycerate Mutase Family4	1.324.940-1.326.617	-
CSF2RA	Colony stimulating Factor 2 Receptor, alpha	1.355.173-1.396.262	RP4-674K6
TAF9B	Transcription associated Factor 9B	1.383.007-1.393.032	-
IL3RA	Interleukin 3 Receptor, alpha Precursor	1.499.188-1.545.408	-
SLC25A6	solute carrier family 25, member A6	1.548.872-1.554.821	-
ASMTL	Acetylserotonin O-Methyltransferase-like	1.565.861-1.615.583	-
P2RY8	G-Protein coupled purinergic Receptor P2Y8	1.625.295-1.699.827	-
CRLF2	Cytokine Receptor-like Factor 2	1.672.024-1.687.565	RP11-475E20
SFRS17A	Splicing Factor, Arginine/Serine-rich 17A	1.754.313-1.765.236	-
ASMT	Acetylserotonin O-Methyltransferase	1.758.175-1.805.801	-
ZBED1	Ac-like transposable Element	2.397.816-2.412.369	-

* NCBI Build 35

Zu der bereits in Abschnitt 3.3.3.3.2 beschriebenen lokusspezifischen Sonde für die Region Xp22.33, die das *CSF2RA*-Gen detektierte, wurden zwei weitere lokusspezifische FISH-Assays mit überspannenden BAC-Klonen für das weiter telomerische *SHOX*- und das weiter centromerische *CRLF2*-Gen etabliert (Tabelle 27). Die wie in Abschnitt 3.3.3.3.2 beschrieben bestimmten Nachweisgrenzen betragen 5,4 % für die *SHOX*- und 4,9 % für die *CRLF2*-Sonde. Auch mit den zwei neuen lokusspezifischen FISH-Assays für die Region Xp22.33 konnte die biallelische Deletion der PAR1-Region in beiden Mantelzell-Lymphomen bestätigt werden. Darüberhinaus konnten FISH-Analysen mit allen drei Assays für die Region Xp22.33 in den übrigen 16 Mantelzell-Lymphomen mit Chromosom-Y-Verlust einen weiteren Fall identifizieren, in dem alle drei Genloci vollständig deletiert waren. Mit dem Fall aus der ArrayCGH-Studie konnten so insgesamt vier Fälle mit einer biallelischen PAR1-Deletion identifiziert werden. FISH-Untersuchungen mit den kommerziellen lokusspezifischen Sonden zum Nachweis des *KAL1*- bzw. *STS*-Lokus (Abbott/Vysis)(Abschnitt 3.2.1) zeigten in zwei dieser Fälle, dass diese Loci nicht in die Deletion involviert waren.

Eine Auswertung von jeweils 100 Zellkernen, die mit dem *CSF2RA*-FISH-Assay hybridisiert worden waren, ergab, dass der Anteil der Zellen, die in dem untersuchten Probenmaterial einen homozygoten Verlust der PAR1 zeigten, etwa dem Tumorzellgehalt entsprach, der mit Hilfe des t(11;14)-FISH-Assays ermittelt werden konnte (Abbildung 50). Die Signalkonstellation der übrigen vermutlich normalen Zellen zeigte, dass sowohl die X-chromosomale als auch die Y-chromosomale PAR1-Region vorhanden waren

(Abbildung 50). Der PAR1-Verlust beschränkte sich folglich auf die t(11;14)-positiven Lymphomzellen, so dass eine konstitutionelle CNV ausgeschlossen werden konnte.

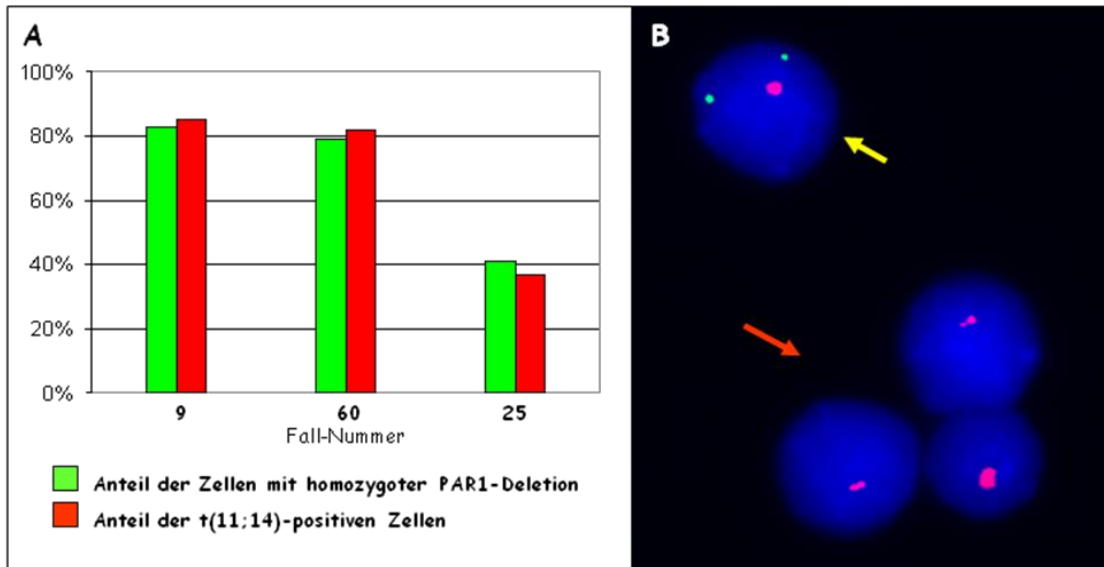


Abbildung 50: FISH zum Nachweis der PAR1-Deletion. **A)** Durch Auszählung von jeweils 100 Zellkernen bestimmter Anteil der Zellen mit einer homozygoten PAR1-Deletion (grün) im Vergleich zum Anteil der Zellen mit einer Translokation t(11;14)(q13;q32) in den Proben von drei Mantelzell-Lymphomen mit PAR1-Deletion. **B)** FISH mit einer lokusspezifischen Sonde für die PAR1-Region in Xp22.33. Der grün markierte PAC-Klon RP4-674K6 hybridisiert mit dem *CSF2RA*-Lokus, während die beiden rot markierten BAC-Klone RP13-156P1 und RP11-296N8 einen Kontrollloкус in Xq28 detektieren. In den Zellen mit einer PAR1-Deletion konnte kein grünes Signal detektiert werden (roter Pfeil). Zwei grüne Signale in der durch einen gelben Pfeil markierten Zelle konnten sowohl die X-chromosomale als auch die Y-chromosomale PAR1-Region nachweisen. Die Zellkerne wurden bei dieser Hybridisierung mit DAPI angefärbt.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass es sich bei dem Verlust des Y-Chromosoms in Mantelzell-Lymphomen um eine sekundäre Aberration der t(11;14)-positiven Tumorzellen handelt. Darüberhinaus konnte durch die Identifikation von vier Mantelzell-Lymphomen, die zusätzlich zum Verlust des Y-Chromosoms auch eine Deletion der PAR1-Region in Xp22.33 zeigten, eine minimal aberrante Region bestimmt werden, die eine Reihe potentieller Tumorsuppressorgene enthält, deren Inaktivierung möglicherweise zur männlichen Prädominanz bei Mantelzell-Lymphomen beiträgt.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung sekundärer genetischer Veränderungen bei Mantelzell-Lymphomen mit Hilfe dreier verschiedener Microarray-Technologien. Mit der GINI-Analyse sollten Nonsense-Mutationen detektiert werden, um potentielle Tumorsuppressorgene zu identifizieren. Mittels BAC-/PAC-basierter ArrayCGH und 100K GeneChip® Mapping-Analyse hingegen ließen sich genomische Profile erstellen, die die Detektion und Kartierung chromosomaler Imbalancen ermöglichten. Der Schwerpunkt lag dabei in der Detektion kleiner homozygoter Deletionen sowie von High-Level-Amplifikationen mit dem Ziel, potentielle Tumorsuppressorgene und Onkogene zu identifizieren. Darüberhinaus ermöglichte die 100K GeneChip®-Microarray-Plattform eine LOH-Berechnung, so dass neben chromosomalen Imbalancen auch pUPDs bestimmt werden konnten. Aufgrund der Hypothese, dass ein gonosomaler genetischer oder epigenetischer Defekt mit der Prädominanz des männlichen Geschlechts bei Mantelzell-Lymphomen assoziiert sein könnte, wurden die generierten Microarray-Daten besonders im Hinblick auf Aberrationen der Geschlechtschromosomen untersucht. Weiterführende molekulargenetische und epigenetische Untersuchungen im Anschluss an die Microarray-Analysen sollten zeigen, inwieweit die ermittelten Kandidatengene tatsächlich eine Bedeutung für Entstehung und Progression des Mantelzell-Lymphoms haben.

Zusammengefasst lieferten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien an primären Mantelzell-Lymphomen und Mantelzell-Lymphom-Zelllinien folgende Ergebnisse:

1. Es konnten eine Reihe neuer Kandidaten-Onkogene und Tumorsuppressorgene bei Mantelzell-Lymphomen identifiziert und initial charakterisiert werden.
2. Mit der pUPD wurde ein neuer molekularer Mechanismus der Mantelzell-Lymphom-Genese identifiziert.
3. Rekurrente Veränderungen Mikrotubuli-assoziiierter Gene deuten auf einen neuen Pathomechanismus bei Mantelzell-Lymphomen hin.
4. Es ließ sich ein Genort in der PAR1 identifizieren und eingrenzen, der möglicherweise mit der männlichen Prädominanz bei Mantelzell-Lymphomen assoziiert ist.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zunächst methodisch und anschließend im Hinblick auf ihre biologische Bedeutung diskutiert.

4.1. GINI-Analysen der Mantelzell-Lymphome

Mit Hilfe der GINI-Microarray-Technologie ließen sich in der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 insgesamt 26 Gene identifizieren, deren Transkripte nach Emetin-Behandlung angereichert waren und deren Anreicherung nicht auf eine pharmakologisch induzierte Expressionssteigerung zurückzuführen war. In den zwei Kandidatengen, deren proteinkodierende Exons anschließend anhand der cDNA vollständig sequenziert wurden, konnten allerdings keine tumorassoziierten Nonsense-Mutationen identifiziert werden. Vielmehr handelte es sich bei den angereicherten Transkripten um verschiedene Spleißvarianten, die ohne Emetin-Behandlung der Zellen vermutlich durch den NMD-Pathway abgebaut worden wären. In einigen der angereicherten Spleißvarianten konnten vorzeitige Stoppcodons identifiziert werden. Die Tatsache, dass diese Spleißvarianten nur in der GRANTA-519-Zelllinie, nicht aber in den Kontrollzelllinien angereichert waren, könnte zumindest beim *OAS1*-Gen eine Folge von SNPs sein, die bei der Sequenzierung des Gens identifiziert werden konnten. Da in jeder Zelle permanent fehlerhaft gespleißte Transkripte entstehen, welche normalerweise durch den NMD-Pathway umgehend abgebaut werden (86), und die GINI-Methode offensichtlich nicht in der Lage ist, zwischen mutationsbedingten Nonsense-Transkripten und Spleißvarianten zu unterscheiden, ist die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse bei der GINI-Analyse sehr hoch. Dass die Detektion von durch Nonsense-Mutationen inaktivierten Tumorsuppressorgenen durch GINI grundsätzlich möglich ist, konnte an verschiedenen Beispielen bereits bekannter Stoppmutationen gezeigt werden (83). Auch mit der in dieser Arbeit durchgeführten GINI-Analyse ließ sich eine bereits bekannte Stoppmutation des *CYLD*-Gens (Schmitz et al., bislang nicht publiziert) in der als Kontrolle verwendeten Hodgkin-Zelllinie KM-H2 detektieren. Weitere bekannte Nonsense-Transkripte der Gene *IκBa* und *TNFAIP3* in den Hodgkin-Zelllinien (135, 136) wurden allerdings durch die GINI-Analyse nicht erkannt, da diese Gene offensichtlich durch die pharmakologische Behandlung in allen Zelllinien eine Expressionssteigerung aufwiesen.

Anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Identifikation von bislang unbekanntem Nonsense-Mutationen mit Hilfe der GINI-Technologie aufgrund der hohen Falsch-Positiv-Rate meist schwierig und kostenintensiv ist. Zudem können Mutationen in Genen, die aufgrund der pharmakologischen Behandlung eine verstärkte Expression zeigen, wegen der Auswahlkriterien nicht als Kandidatengene identifiziert werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass für die GINI-Analysen ausschließlich Zelllinien verwendet werden können, da die

Emetin-Behandlung während der Kultivierung stattfindet, und die Ergebnisse reproduzierbar und mit einer unbehandelten Kultur vergleichbar sein müssen. Von vielen Tumorentitäten ist die Anzahl verfügbarer Zelllinien allerdings sehr begrenzt, des Weiteren zeigen viele der etablierten Zelllinien chromosomale Instabilität und Kulturartefakte (137). Die genannten Schwierigkeiten und Einschränkungen sind wahrscheinlich auch die Begründung dafür, dass seit der erstmaligen Vorstellung des GINI-Verfahrens im Jahre 2001 (83) trotz zunehmender Standardisierung der Microarray-Technologie bislang nur vier Arbeiten publiziert wurden, in denen mit Hilfe dieser Technik unbekannte Nonsense-Mutationen identifiziert werden konnten (45, 85, 138, 139). In einer dieser Studien, die im Juni 2007 erschien, wurden fünf Mantelzell-Lymphom-Zelllinien mittels GINI untersucht. Auch diese Studie bestätigte die Schwierigkeiten bei Detektion von Nonsense-Transkripten aufgrund der hohen Falsch-Positiv-Rate durch angereicherte Spleißvarianten. Nur die Anwendung eines sehr konservativen Algorithmus machte die Detektion von Nonsense-Transkripten zwischen der Vielzahl falsch-positiver Ergebnisse möglich. Dieser Algorithmus setzte für ein potentielles Tumorsuppressorgen ein fast vollständiges Fehlen der Expression ohne Emetin-Behandlung voraus. Gleichzeitig musste in jeder der anderen untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien eine Expression dieses Kandidatengens detektierbar sein, was bedeutet, dass Gene, die aufgrund eines Defekts in einer weiteren Mantelzell-Lymphom-Zelllinie fehlende Expression zeigten, nicht erkannt werden konnten. Mit diesen sehr stringenten Auswahlkriterien konnte bis auf eine als Positivkontrolle verwendete bekannte homozygote *TP53*-Stoppmutation nur eine Nonsense-Abberation in den untersuchten Zelllinien identifiziert werden. Dabei handelte es sich allerdings um eine mehrere Exons überspannende intragenische homozygote Deletion des *RB1*-Proteins in der Zelllinie UPN-1, welche in der vorliegenden Arbeit auch mittels 100K GeneChip®-Analyse detektiert wurde. Weitere Nonsense-Mutationen in einer der anderen Mantelzell-Lymphom-Zelllinien konnten nicht gezeigt werden.

Es ist hervorzuheben, dass auch in der im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels GINI untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 durch die Studie von Pinyol et al. (45) keine Nonsense-Mutationen identifiziert werden konnten. Auch die in dieser Studie angegebenen in GRANTA-519 selektiv angereicherten Gene stimmten mit keinem der Gene überein, die in der vorliegenden Arbeit mittels GINI bestimmt wurden (45). Diese fehlende Übereinstimmung beider Studien deutet darauf hin, dass es sich bei den jeweils identifizierten Genen um falsch-positive Ergebnisse handelt, die aufgrund der unterschiedlichen als Referenzen verwendeten Zelllinien voneinander abweichen.

Auch wenn die GINI-Analyse allein anhand dieser Ergebnisse für die Identifikation von Kandidatengenen nur bedingt geeignet scheint, so könnte die Kombination mit Microarray-basierten Copy Number- oder Expressions-Analysen für die Bestimmung von Kandidatengenen hilfreich sein. Der Vergleich mit rekurrent deletierten Chromosomenregionen sowie mit differentiell exprimierten Genen, könnte ergänzende Hinweise liefern, um eine gezieltere Untersuchung potentieller Tumorsuppressorgene zu ermöglichen. Im Fall der untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 befand sich allerdings keines der 26 mit GINI detektierten Gene in einer Region, die in diesem Lymphom als häufig deletiert beschrieben war. Auch war keines dieser Gene in rekurrente Deletionen oder pUPDs involviert, die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der BAC-/PAC-basierten ArrayCGH oder der 100K GeneChip®-Analyse bestimmt werden konnten. Vergleiche mit publizierten Expressionsdaten von Mantelzell-Lymphomen (140-143) lieferten außerdem keine Hinweise auf differentielle Expression eines der mit GINI identifizierten Gene. Unter den 24 bislang nicht weiter untersuchten Kandidatengenen der GINI-Analyse gab es drei Gene (*TNFRSF8*, *MRAS* und *DDX11*) mit Funktionen in der Zellzyklusregulation, Proliferation und Apoptose. Allerdings entsprechen diese Funktionen nur im Falle des *TNFRSF8*-Gens, als positivem Regulator der Apoptose, typischen Tumorsuppressorgen-Eigenschaften. Da es bislang keine Hinweise auf genetische Veränderungen dieses Genlokus in Mantelzell-Lymphomen gab, wurden vorerst keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

4.2. Array-CGH-Analyse des X-Chromosoms bei Mantelzell-Lymphomen

Die in der vorliegenden Arbeit analysierten ArrayCGH-Daten von 68 Mantelzell-Lymphomen und neun Mantelzell-Lymphom-Zelllinien wurden mit Hilfe eines Microarrays generiert, der aus 2464 BAC- und PAC-Klonen bestand. Damit konnte die Auflösung gegenüber zwei der drei bis dahin publizierten ArrayCGH-Studien an Mantelzell-Lymphomen verbessert werden (88, 89). Zwar gab es bereits eine Mantelzell-Lymphom-Studie, in der ein BAC-/PAC-Microarray mit 32.433 Klonen eingesetzt wurde, allerdings wurden dort nur acht Mantelzell-Lymphom-Zelllinien und keine Primärfälle untersucht (90). Aufgrund der verbesserten Auflösung von ca. 1,4 Mb bei einer großen Anzahl repräsentativer primärer Mantelzell-Lymphome konnte die Analyse der neu generierten ArrayCGH-Daten durch die Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universität von Valencia die meisten bislang beschriebenen chromosomalen Imbalancen in Mantelzell-Lymphomen weiter eingrenzen und neue Regionen mit rekurrenten Zugewinnen und Deletionen identifizieren (103). Im

Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die ArrayCGH-Daten im Hinblick auf gonosomale Aberrationen analysiert werden. Da der Microarray keine BAC- oder PAC-Klone zur Analyse des Y-Chromosoms enthielt, wurde mit Ausnahme der pseudoautosomalen Regionen ausschließlich das X-Chromosom untersucht. Dieses wurde von insgesamt 61 der 2464 Klone des Microarrays abgedeckt, was einer Auflösung von etwa 2,5 Mb entspricht.

Bis zu dieser Studie waren keine rekurrenten strukturellen Veränderungen des X-Chromosoms bei Mantelzell-Lymphomen bekannt (Tabelle 1). Mit Hilfe der ArrayCGH-Daten konnten zwei aberrante X-chromosomale Regionen identifiziert werden. In der Chromosomenregion Xq27.3-Xq28 ließ sich mittels FISH anhand zweier betroffener primärer Mantelzell-Lymphome und einer betroffenen Mantelzell-Lymphom-Zelllinie (UPN-1) eine minimal zugewonnene Region von etwa 8,5 Mb bestimmen. Aufgrund der Vielzahl an Genen innerhalb dieser Region (> 50) wurden allerdings keine weiterführenden Untersuchungen an einzelnen Kandidatengenen durchgeführt. Auch der Vergleich mit bereits publizierten Microarray-basierten Expressionsstudien von Mantelzell-Lymphomen (140-143) zeigte keine Gene innerhalb der minimal aberranten Region, deren Transkripte in Mantelzell-Lymphomen rekurrent überrepräsentiert waren.

Eine zweite X-chromosomale Aberration konnte in der Region Xp22.3 identifiziert werden. Hier zeigte ein primäres Mantelzell-Lymphom eine hemi- bzw. homozygote Deletion von etwa 9 Mb, welche mittels FISH bestätigt werden konnte. FISH-Analysen an 16 weiteren primären Mantelzell-Lymphomen in zwei der 36 involvierten Genloci (*KAL1* und *STS*) zeigten keine rekurrenten Verluste. Auch waren keine Gene involviert, die in bereits publizierten Expressionsstudien differentielle Expression gezeigt hätten. Mit Hilfe der im späteren Verlauf dieser Arbeit generierten 100K GeneChip®-Daten von Mantelzell-Lymphomen ließ sich die minimal aberrante Region jedoch weiter eingrenzen (Abschnitt 4.4).

4.3. 100K GeneChip®-Mapping der Mantelzell-Lymphome

Als dritte Microarray-Technologie zur Untersuchung sekundärer Aberrationen bei Mantelzell-Lymphomen wurde in dieser Arbeit das 100K GeneChip® Mapping eingesetzt, mit dem 26 primäre Mantelzell-Lymphome und sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien analysiert wurden. Mit den beiden verwendeten 50K GeneChip®-Microarrays (Xba I und Hind III) wurden insgesamt je Mantelzell-Lymphom 116.204 SNPs untersucht, was einer theoretischen Auflösung von etwa 24 kb entspricht (81, 82). Im Vergleich zu den in dieser

Arbeit vorgestellten ArrayCGH-Daten entspricht das theoretisch einer 47mal höheren Auflösung bei der Copy Number-Analyse. Die effektive Auflösungsverbesserung der 100K GeneChip®-Analysen gegenüber der ArrayCGH war allerdings deutlich geringer, da die generierten Daten eine wesentlich stärkere Streuung zeigten als die der BAC-/PAC-Arrays. Infolgedessen mussten die Rohdaten der GeneChip®-Arrays stärker segmentiert werden. Ein Grund für die stärkere Streuung der 100K GeneChip®-Analyse ist, dass bei diesem Analyseverfahren keine Referenz-DNA mitgeführt wird, wie das bei der ArrayCGH der Fall ist. Die Daten werden erst bei der computergestützten Analyse mit Referenz-Daten verglichen. In Abbildung 51 ist am Beispiel des seit kurzem zur Verfügung stehenden 250K GeneChip® Mappings (Sty I) gezeigt, wie die effektive Auflösungsverbesserung gegenüber einem BAC-/PAC-Array mit 2751 Klonen ermittelt wurde. Die Studie ergab, dass die praktisch ermittelte Auflösungsverbesserung in diesem Fall nur um das Zwölfwache und nicht wie theoretisch erwartet um das 86-fache verbessert wurde (Kreuz et al., persönliche Mitteilung).

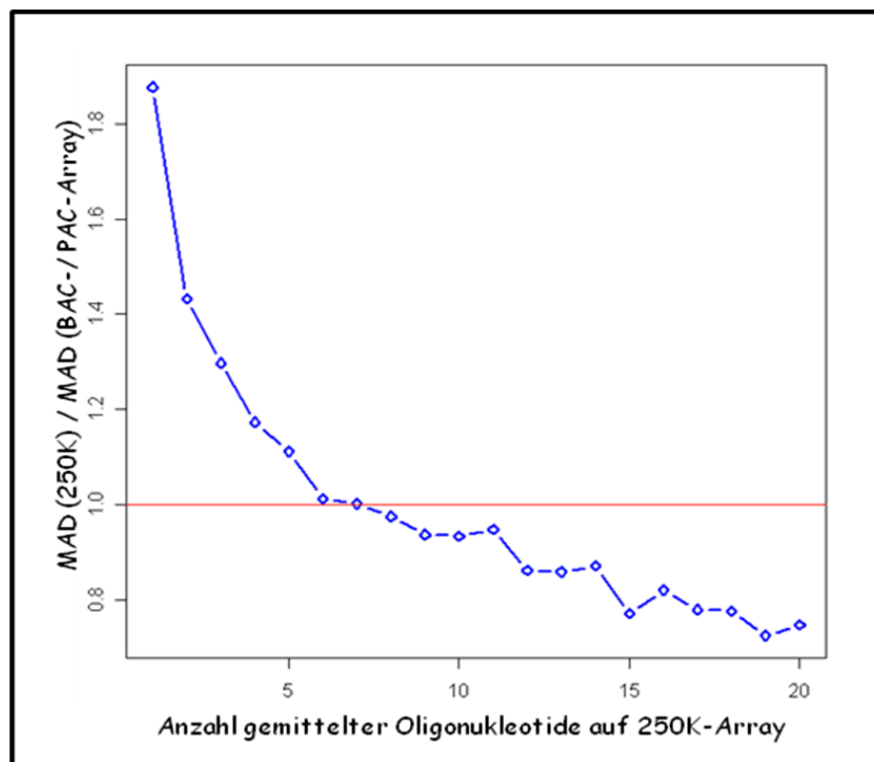


Abbildung 51: Durchschnittliche Streuungsreduktion der 250K GeneChip®-Daten (n = 95 Fälle) in Abhängigkeit von der Anzahl gemittelter Oligonukleotide. Bei Mittelung über sieben Oligonukleotide war die Streuung der 250K GeneChip®-Analyse mit der Streuung der ArrayCGH vergleichbar. Obwohl die theoretische Auflösung des 250K GeneChip®-Arrays 86mal so hoch war wie die des untersuchten BAC-/PAC- Arrays war die effektive Auflösung nur etwa zwölfwache so hoch ($86/7=12$) [Die Daten wurden freundlicherweise von Markus Kreuz, Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt].

Leider konnte eine vergleichbare Studie nicht anhand der 100K GeneChip®-Daten durchgeführt werden, da nicht von identischen primären Mantelzell-Lymphomen ArrayCGH-Daten und 100K GeneChip®-Daten existierten. Da aber dem 250K und 100K GeneChip® Mapping-Verfahren die gleiche Methode und Technologie zu Grunde liegt (Restriktionsverdau zur Komplexitätsreduktion des Genoms, 25mer Oligonukleotide als Zielsequenzen, keine Referenz-DNA für die Hybridisierung notwendig) (144), wären ähnliche Ergebnisse für die Streuungsreduktion zu erwarten. Damit läge die effektive Auflösung der 100K GeneChip®-Arrays immer noch etwa siebenmal höher als die der in dieser Arbeit verwendeten BAC-/PAC-Arrays, was vor allem bei der Detektion von kleinen Regionen mit High-Level-Amplifikationen sowie homozygoten Deletionen einen Vorteil darstellt.

Für die Identifikation von homozygot deletierten Chromosomenregionen wurden hier zwei verschiedene Analyseverfahren angewendet, ein liberales und ein sensitives (Abschnitt 2.3.3.1.1). Da bei dem sensitiven Verfahren keine Segmentierung, d.h. Glättung der Daten notwendig war, konnte die effektive Auflösung verbessert und die Sensitivität für die Detektion homozygoter Deletionen erhöht werden. In den Zelllinien konnten mit Hilfe des sensitiven Verfahrens 55 % mehr verifizierte homozygote Deletionen detektiert werden als mit dem liberalen Ansatz. Allerdings wurden dabei auch 43 % falsch-positive Ergebnisse toleriert. In den primären Mantelzell-Lymphomen konnten durch die sensitive Analysemethode sogar fast dreimal so viele potentielle homozygote Deletionen identifiziert werden wie mit dem liberalen Verfahren. Eine Verifikation mittels PCR oder FISH war aufgrund der Kontamination durch Normalgewebe und der geringen Größe der aberranten Regionen nur in Einzelfällen möglich. Die Häufigkeit falsch-positiver Ergebnisse bei der sensitiven Analyse der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien sollte demnach bei der Beurteilung der Ergebnisse der Primärfälle berücksichtigt werden, wobei die Anzahl der CNVs, die mit einem Großteil der ausschließlich durch das sensitive Verfahren detektierten homozygoten Deletionen übereinstimmte, durchaus für eine relativ zuverlässige Detektion des sensitiven Verfahrens in den Primärfällen spricht. Neben der Bestimmung chromosomaler Imbalancen war mittels 100K GeneChip® Mapping auch eine LOH-Berechnung zur Detektion partieller UPDs möglich. Damit konnte zusätzlich zur Deletion ein weiterer Mechanismus der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung in Mantelzell-Lymphomen untersucht werden.

4.3.1. Partielle uniparentale Disomien bei Mantelzell-Lymphomen

Mit Hilfe der 100K GeneChip®-Technologie konnten sowohl in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien als auch in den primären Mantelzell-Lymphomen pUPDs detektiert werden. Die durchschnittliche Anzahl (Mittelwert) detektierter pUPDs war bei den Zelllinien mit 16,5 pUPDs je Zelllinie etwa zehnmal so hoch wie bei den primären Mantelzell-Lymphomen mit 1,6 pUPDs je Primärfall. Da Zelllinien häufig chromosomale Instabilität zeigen und die Anzahl chromosomaler Aberrationen im Vergleich zu den primären Tumorzellen nicht selten zunimmt (137), erscheint dieses Verhältnis nicht ungewöhnlich. Ähnliches wurde auch bei der Detektion chromosomaler Imbalancen beobachtet. Sowohl in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien als auch in den primären Mantelzell-Lymphomen konnte beobachtet werden, dass die rekurrent von pUPDs betroffenen Chromosomenregionen häufig mit Regionen übereinstimmen, die sonst in Mantelzell-Lymphomen rekurrent deletiert sind (Tabelle 1), wie beispielsweise 8p, 9q, 11q, 13q sowie 17p. Ähnliches wurde bereits in Studien anderer hämatopoetischer Neoplasien beschrieben (Tabelle 28). Dabei lassen sich wie auch bei Deletionen entitätsspezifische Unterschiede bei den rekurrent betroffenen Regionen erkennen.

Tabelle 28: Regionen mit pUPD in hämatopoetischen Neoplasien

Entität	Microarray-Plattform	Regionen mit pUPD	Referenz
ALL	100K GeneChip® Human Mapping und 250K GeneChip® Human Mapping Sty I	1p, 3q, 6p, 9p, 12p, 17p, 19q, 20q	(145)
AML	10K GeneChip® Human Mapping	6p, 9p, 13q	(58)
AML	10K GeneChip® Human Mapping	6p, 9p, 11p, 13q, 19q, 21q	(57)
AML	10K GeneChip® Human Mapping	6p, 9p, 11p, 11q, 13, 19q, 21q	(60)
CLL	10K GeneChip® Human Mapping und 50K GeneChip® Human Mapping Xba I	13q	(146)
DLBCL	10K GeneChip® Human Mapping	12q	(147)
FL	50K GeneChip® Human Mapping Xba I	1p, 6p, 9p, 10q, 16p	(148)
FL	10K GeneChip® Human Mapping	6p, 9p, 12q, 17q	(149)
JMML	100K GeneChip® Human Mapping	17q	(150)
PTLD	10K GeneChip® Human Mapping	10, 9p	(147)

ALL: Akute Lymphatische Leukämie, AML: Akute Myeloische Leukämie, CLL: Chronisch Lymphatische Leukämie, DLBCL: Diffus großzelliges B-Cell Lymphom; FL: Follikuläres Lymphom, JMML: Juvenile Myelomonozytäre Leukämie, PTLD: Post-transplant Lymphoproliferative Disorders

In einer Arbeit aus dem Jahre 2005 konnten Fitzgibbon et al. (57) bereits zeigen, dass der Verlust der Heterozygotie durch pUPDs als nach Knudsons Hypothese „zweiter Treffer“ (47) zur Homozygotie pathogener Mutationen in AML führt. Gleichmaßen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand einer homozygoten Mutation des *TP53*-Gens in 17p13.1 an

einem konkreten Beispiel gezeigt werden, dass der Mechanismus der pUPD zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens bei Mantelzell-Lymphomen führt. Die detektierte homozygote Mutation befindet sich in einer DNA-Bindungsdomäne und hat negativen Einfluss auf die p53-DNA-Interaktion. Zudem tritt sie mit 28 % sehr häufig in Lymphomen auf (<http://www-p53.iarc.fr>). Demnach konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass pUPD einen zur Deletion alternativen Mechanismus der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung in Mantelzell-Lymphomen darstellt und so zur Pathogenese dieser bösartigen Erkrankung beiträgt.

Die ArrayCGH-Analysen der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universität von Valencia hatten anhand klinischer Daten der untersuchten Mantelzell-Lymphome für Deletionen in 17p13.1 zeigen können, dass diese mit einer schlechteren Prognose einhergehen (103). Mit der ArrayCGH-Technik können allerdings keine pUPDs detektiert werden. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist für eine zuverlässige Prognoseabschätzung bei Mantelzell-Lymphomen eine Technik, wie beispielsweise die GeneChip®-Technologie, mit der eine LOH-Bestimmung durchgeführt werden kann, wesentlich geeigneter. Gleiches gilt auch für andere Leukämie- und Lymphomentitäten. Beispielsweise führt der Nachweis einer 17p13-Deletion bei Patienten mit einer Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) aufgrund der deutlich schlechteren Prognose zur einer veränderten Behandlungsstrategie (151, 152). Da laut einer aktuellen Studie auch bei der CLL pUPDs auftreten (146), scheint der diagnostische Ausschluss einer 17p13-Deletion nicht ausreichend für eine zuverlässige Prognoseabschätzung. Zusammenfassend sind für ein besseres Verständnis und eine Optimierung der Therapien hämatopoetischer Neoplasien eine Berücksichtigung des Mechanismus der pUPD und der Einsatz von dafür geeigneten Analyse-Techniken zwingend notwendig.

4.3.2. Chromosomale Imbalancen bei Mantelzell-Lymphomen

Anhand rekurrenter Aberrationen in den untersuchten Mantelzell-Lymphomen wurden minimal zugewonnene und minimal deletierte Chromosomenregionen bestimmt. Neben der Detektion und weiteren Eingrenzung von bereits bekannten Aberrationen ließen sich mit Hilfe der 100K GeneChip®-Analysen auch fünf bislang unbekannte Regionen mit häufigen Zugewinnen und sieben unbekannte rekurrente Deletionen identifizieren. In einigen der in dieser Arbeit erstmals detektierten rekurrenten Aberrationen sind Kandidatengene mit typischen Tumorsuppressor- bzw. Onkogen-Eigenschaften involviert. So kodiert beispielsweise das in 3p13 lokalisierte und in den mit 100K GeneChip® Mapping untersuchten

Mantelzell-Lymphomen rekurrent deletierte *FOXP1*-Gen für einen Transkriptionsfaktor mit entscheidender Funktion bei der B-Zell-Entwicklung (153-155). Abberante *FOXP1*-Expression wurde bereits in verschiedenen B-Zell-Lymphomen beobachtet und geht häufig mit einer schlechten Prognose einher (156-159). Das MYC-Binding-Protein 2 (MYCBP2), auch PAM genannt, ist ein Inhibitor der Adenylat-Cyclase und kontrolliert so die Konzentration des Second-Messengers cAMP, der in eine Reihe zellulärer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose involviert ist (160-162). Das *MYCBP2*-Gen liegt in der Chromosomenregion 13q22.3, welche in den in dieser Arbeit untersuchten Mantelzell-Lymphomen rekurrente Deletionen zeigt. Desweiteren waren von den rekurrenten Aberrationen, die mittels 100K GeneChip®-Analyse erstmals in Mantelzell-Lymphomen detektiert wurden, verschiedene Gene betroffen, die für an der Zellzyklusregulation beteiligte Proteine kodieren, wie beispielsweise *CDKN2AIP/CARF* (163-165) und *ING2/P33* (166-168) in 4q35.1 sowie *CDKN1B/P27* in 12p13.1 (169-173) (Abbildung 52). Eine fehlerhafte Zellzykluskontrolle ist ein Schlüsselmechanismus der Tumorgenese (174-176) und wie die charakteristische Translokation t(11;14)(q13;q32), welche zur gesteigerten Cyclin D1-Expression führt, gehen die meisten bislang identifizierten Aberrationen in Mantelzell-Lymphomen mit einer Störung der Zellzyklusregulation einher (21, 44, 177).

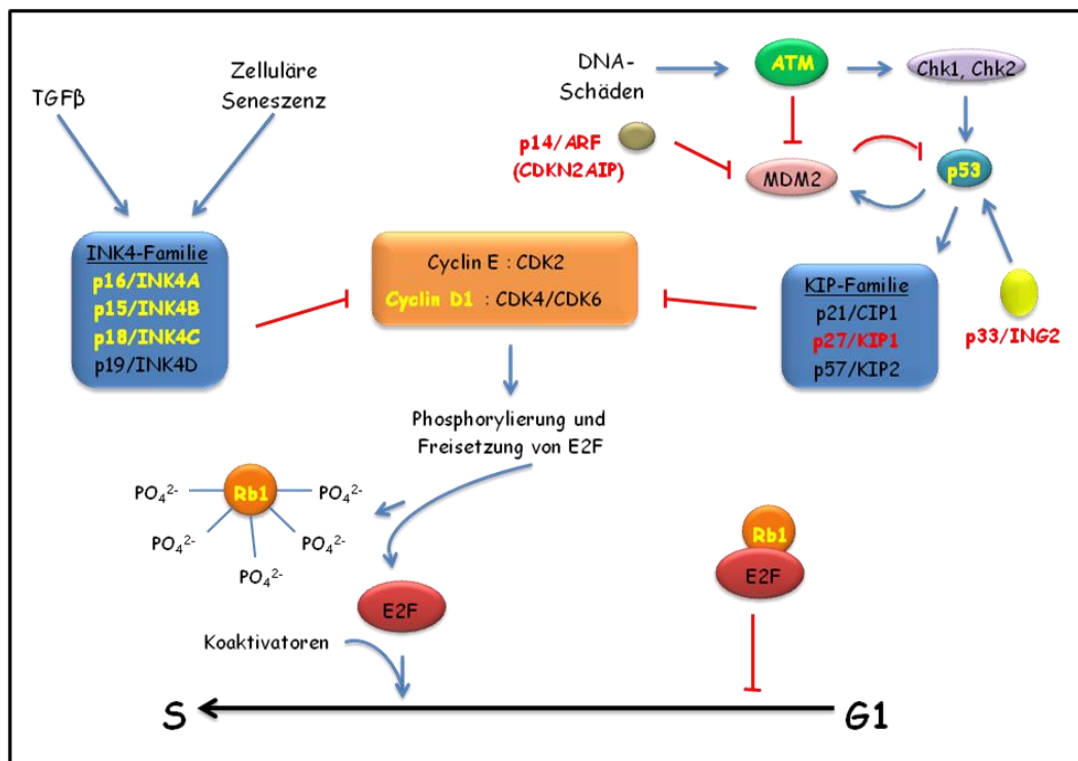


Abbildung 52: Schematische Darstellung der Regulation des G1/S-Phase-Übergangs im Zellzyklus. Gene innerhalb rekurrenter Aberrationen in Mantelzell-Lymphomen, die in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnten, sind durch gelbe Schrift gekennzeichnet. Gene innerhalb rekurrenter Aberrationen in Mantelzell-Lymphomen, die in dieser Arbeit erstmals detektiert wurden, sind in roter Schrift hervorgehoben.

Besonders die Suche nach kleinen High-Level-Amplifikationen und homozygoten Deletionen profitierte von der höheren Auflösung der 100K GeneChip®- gegenüber der ArrayCGH-Analyse der Mantelzell-Lymphome. Eine bislang in Mantelzell-Lymphomen nicht beschriebene Region in 11q34-11q35 war gleich in drei Mantelzell-Lymphom-Zelllinien von High-Level-Amplifikationen betroffen. In die minimal aberrante Region war unter anderem das für ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein kodierende *MAP6*-Gen involviert (133, 178, 179), dessen Amplifikation in Verbindung mit weiteren Ergebnissen dieser Arbeit sehr interessant schien (Abschnitt 4.3.3).

Außerdem konnten mittels 100K GeneChip®-Analyse der Mantelzell-Lymphom-Zelllinien sieben homozygote Deletionen in 2q34, 2q37.3, 9p21.1, 9p21.2, 12p13.1, 18q22.1 und Xp22.33 identifiziert werden, die bislang in Mantelzell-Lymphomen nicht beschrieben waren und mit keinen bekannten CNVs übereinstimmten (<http://projects.tcag.ca/variation>). Von den detektierten homozygoten Deletionen in den primären Mantelzell-Lymphomen war vor allem die durch FISH verifizierte homozygote Deletion in Xp22.33 im Hinblick auf die Prädisposition des männlichen Geschlechts bei Mantelzell-Lymphomen interessant. Zudem stimmte sie mit der Region überein, die bereits in der Analyse der X-chromosomalen ArrayCGH-Daten eine homozygote Deletion gezeigt hatte. Desweiteren wurden durch die PCR-basierte Eingrenzung der homozygot deletierten Regionen Kandidatengene bestimmt, wie beispielweise *MAP2*, *MOBK2B*, *IFNK*, *c9orf72*, *GRIN2B*, *FGF14* oder *c18orf4*.

Aufgrund der Vielzahl an Kandidatengenen, die sich durch die Copy Number-Analyse der 100K GeneChip®-Daten von primären Mantelzell-Lymphomen und Mantelzell-Lymphom-Zelllinien identifizieren ließ, kann an dieser Stelle nicht auf jedes einzelne eingegangen werden. Die Vielzahl genetischer Aberrationen, die scheinbar zur Tumorgenese des Mantelzell-Lymphoms beiträgt, stimmt überein mit jüngsten Erkenntnissen aus Studien an soliden Tumoren, wie dem Brust- oder Kolorektal-Krebs, in denen durch Sequenzierung durchschnittlich 80 Mutationen je Tumor identifiziert werden konnten (180-182). Demnach wurde die Anzahl genetischer Veränderungen, die zur malignen Transformation von Zellen beitragen, bislang bei weitem unterschätzt. Diesen Studien zur Folge sind es nicht rekurrente Aberrationen weniger Gene sondern eine Vielzahl verschiedener Genveränderungen innerhalb der gleichen Pathways, die zu entitätsspezifischen Entartungen von Zellen führen. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere potentielle Tumorsuppressor- und Onkogene in bei Mantelzell-Lymphomen häufig gestörten Pathways

identifiziert, deren Bedeutung für die Pathogenese in weiterführenden Studien untersucht werden sollte.

Im Folgenden wird neben geschlechtschromosomalen Veränderungen in Mantelzell-Lymphomen vor allem auf verschiedene für Mikrotubuli-assoziierte Proteine kodierende Gene eingegangen, da in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt wurde, dass diese in verschiedene rekurrente Aberrationen involviert waren.

4.3.3. Mikrotubuli-assoziierte Gene

Interessanterweise konnten durch die 100K GeneChip[®]-Analysen und weiterführende Untersuchungen von Kandidatengenen verschiedene Gene identifiziert werden, die für Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) kodieren und in den untersuchten primären Mantelzell-Lymphomen und Mantelzell-Lymphom-Zelllinien rekurrente Aberrationen zeigten. MAPs sind zelluläre Proteine, die mit den Mikrotubuli assoziiert sind und deren Dynamik beeinflussen. Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli ist entscheidend für den Aufbau des Spindelapparats und die Anheftung und Fortbewegung der Chromosomen entlang der Spindel während der Mitose (183, 184). Die Unterdrückung der Mikrotubuli-Dynamik ist ein weit verbreiteter chemotherapeutischer Ansatz bei der Behandlung von Tumoren (185). Neben ihrer unmittelbaren Rolle in der Mitose dienen Mikrotubuli auch als Gerüst (Scaffold) für Signalmoleküle (186). Die Familie der MAPs ist sehr heterogen. Zu den kodierenden Genen gehören sowohl Tumorsuppressor- als auch Onkogene, einige haben Einfluss auf die Regulation der Apoptose. Folglich könnten Störungen der dynamischen Instabilität und Veränderungen der Scaffold-Eigenschaften von Mikrotubuli ein kritisches Ereignis in der Tumorgenese und -progression darstellen (187).

In dieser Arbeit wurden in einem Großteil der untersuchten Mantelzell-Lymphome genetische und epigenetische Veränderungen des *MAP2*-Gens identifiziert. 90 % der untersuchten Primärfälle und 67 % der untersuchten Zelllinien zeigten Veränderungen dieses Gens. Auch auf Ebene der Expression konnte in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien eine Reduktion der Transkription in Korrelation zu den genetischen und epigenetischen Defekten beobachtet werden. Das MAP2-Protein trägt zur Stabilisierung der Mikrotubuli bei und wird besonders stark in Neuronen exprimiert, wo es essentiell an der Regulation des Organellentransports innerhalb der Axone und Dendriten beteiligt ist (188). Des Weiteren war es das erste Protein, dem eine direkte Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA), auch cAMP-abhängige Proteinkinase (cAPK) genannt, nachgewiesen werden konnte (189, 190). Neben anderen zellulären Effekten beeinflusst die

PKA-katalysierte Phosphorylierung die Zellproliferation, die Zellteilung sowie den Auf- und Umbau des Zytoskeletts. Das MAP2-Protein fungiert dabei als A-Kinase-Ankerprotein (AKAP) und bringt die PKA zu den Mikrotubuli. Die MAP2-Bindung an die Mikrotubuli wird dabei durch die Tubulin-Bindungsdomäne vermittelt (Abbildung 53) (191, 192). Das MAP2-Protein besitzt außerdem eine konservierte Bindedomäne für die Phosphatase PP2A, obwohl eine direkte Bindung bislang nicht nachgewiesen werden konnte. PP2A ist eine heterotrimere Serin/Threonin-Phosphatase und ist in eine Vielzahl regulatorischer Prozesse involviert, wie beispielweise in die Regulation von Apoptose, Transkription, Translation, DNA-Replikation, Signaltransduktion und Zellteilung (193).

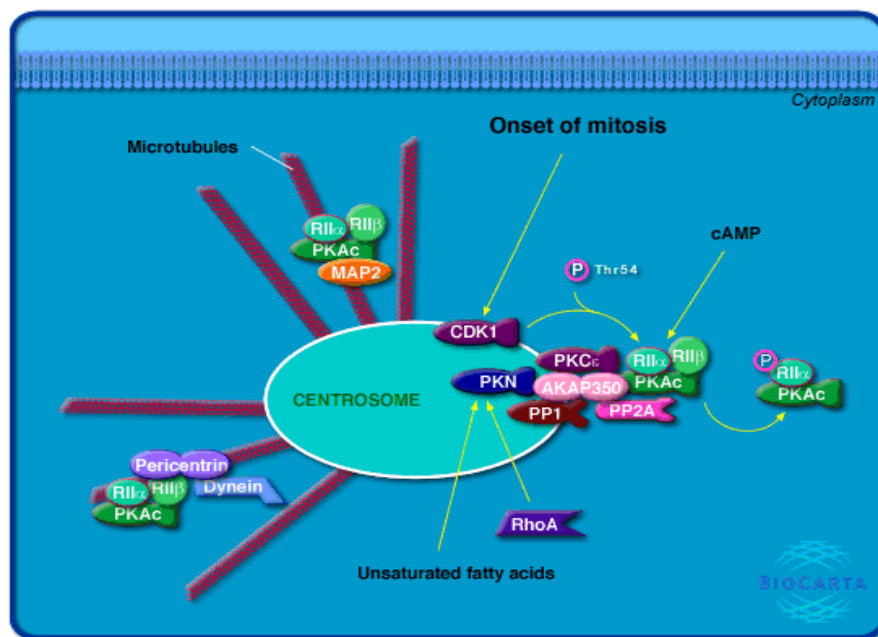


Abbildung 53: Organisation des Spindelapparates
(http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_akapCentrosomePathway)

Im Jahre 2005 berichteten Soltani et al. (194) von der Bedeutung der *MAP2*-Expression für die Prognose von Melanomen. In einer klinischen 5-Jahres-Follow-Up-Studie zeigten Patienten, in deren Tumoren eine deutliche *MAP2*-Expression nachgewiesen werden konnte, ein längeres krankheitsfreies Überleben als Patienten, deren Tumore wenig oder gar kein *MAP2* exprimierten. Darüberhinaus führte die exogene Expression durch ein Adenovirus zu Zellzyklus-Arrest, Wachstumshemmung und Apoptose in metastatischen Melanomzellen (194, 195). Demnach könnte die fehlende *MAP2*-Expression in Mantelzell-Lymphomen auch mit der Tumorgenese und -progression assoziiert sein.

Auch dem p53-Protein konnte *in vitro* und *in vivo* eine Assoziation mit den Mikrotubuli (134) nachgewiesen werden. Zudem scheint es andere MAPs zu regulieren (196-198). *TP53*-Inaktivierung durch chromosomale Deletionen oder Mutationen ist ein häufiges

genetisches Ereignis in Mantelzell-Lymphomen. Zwar ist das p53-Protein in eine Vielzahl anderer regulatorischer Prozesse des Zellzyklus und der Apoptose involviert (199), dennoch könnte seine Rolle bei der Organisation der Mikrotubuli gerade unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit für die Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms von Bedeutung sein. Im Jahre 2003 gelang es Galmarini et al. (200) an Brust-Adenokarzinom-Zelllinien zu zeigen, dass die Proteinkomposition der Mikrotubuli in *TP53*-Mutanten verändert und die dynamische Instabilität der Mikrotubuli dadurch signifikant erhöht waren. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte *TP53*-Mutationsanalyse konnte in 27 % der primären Mantelzell-Lymphome eine homozygote Mutation in der proteinkodierenden DNA-Sequenz des Gens identifizieren. In all diesen Fällen war das zweite Allel durch Deletion oder pUPD verlorengegangen. Auch in 2/3 der untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien konnte eine homozygote Mutation des *TP53*-Gens nachgewiesen werden (96, 97, 99, 102).

Galmarini et al. (200) konnten außerdem zeigen, dass das MAP6-Protein, auch STOP-Protein genannt, in *TP53*-Mutanten stärker exprimiert wurde als in *TP53*-Wildtypzellen, was für eine negative Regulation der *MAP6*-Transkription durch das p53-Protein spricht. Interessanterweise zeigten drei der untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien in den 100K GeneChip®-Daten High-Level-Amplifikationen, in die das *MAP6*-Gen involviert war. Die chromosomalen Zugewinne des *MAP6*-Lokus korrelierten teilweise mit einer gesteigerten *MAP6*-Expression. Die Tatsache, dass High-Level-Amplifikationen des *MAP6*-Gens häufig in den Mantelzell-Lymphom-Zelllinien, nicht aber in den analysierten Primärfällen detektiert wurden, könnte für einen Zusammenhang mit Tumorprogression sprechen. Für Zelllinien ist bekannt, dass die Anzahl chromosomaler Aberrationen im Vergleich zu den primären Tumorzellen deutlich zunimmt und dass einige dieser Veränderungen für die Zellen weitere Wachstumsvorteile bedeuten (137). Im Einklang mit dieser Hypothese konnte in einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) eine pathogene strukturelle Veränderung eines anderen MAP-Gens (*MAP4*), in dessen Folge es zur starken Expression eines MALT1-MAP4-Fusionproteins kam, nur bei der Untersuchung des Rezidivs, nicht aber bei der Initialdiagnose beobachtet werden (201).

Die 100K-GeneChip®-Analyse der Mantelzell-Lymphome lieferte Hinweise darauf, dass Veränderungen der Mikrotubuli-Dynamik bei der Entstehung und Progression dieser bösartigen Erkrankung eine Rolle spielen könnten. In 19 der 26 mittels 100K GeneChip® untersuchten primären Mantelzell-Lymphome und in fünf der sechs untersuchten Mantelzell-Lymphom-Zelllinien konnte eine genetische und/oder epigenetische Aberration in mindestens einem der drei untersuchten Mikrotubuli-assoziierten Gene *MAP2*, *MAP6* und

TP53 festgestellt werden. Sechs der 26 mittels 100K GeneChip® analysierten Primärfälle wurden nicht epigenetisch untersucht, da der Tumorzellgehalt für die angewandten Techniken (<70 %) nicht ausreichte. Insgesamt zeigten nur ein Primärfall und eine Zelllinie, die in allen drei Genloci analysiert wurden, keine der untersuchten Aberrationen.

Die Komplexität des mitotischen Spindelapparats setzt eine genaue dynamische Abstimmung der Mikrotubuli-Organisation für einwandfreie Zellteilung voraus. MAPs können Mikrotubuli sowohl stabilisieren als auch destabilisieren (202). Veränderungen der Expression von MAPs korrelieren scheinbar mit der Aggressivität von Tumorzellen sowie mit der Sensitivität für Mikrotubuli-beeinflussende Substanzen. Obwohl zahlreiche Studien an MAPs in Neuronen durchgeführt wurden, wo sie von großer Bedeutung für das Neuritenwachstum und die Dendritenentwicklung sind (188, 203, 204), bleiben die Mechanismen, die bei der Regulation und Organisation des mitotischen Spindelapparats eine Rolle spielen, weitgehend ungeklärt. Eine Begründung dafür ist vermutlich, dass viele der involvierten Gene eine geringe bzw. im Zellzyklus zeitlich determinierte Expression zeigen und daher schwer zu untersuchen sind. Im Gegensatz zur starken Expression im Gehirn ist die *MAP2*- und *MAP6*-Expression in vielen anderen Geweben, wie beispielweise den Lymphknoten, kaum detektierbar (<http://ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass genetische und epigenetische Veränderungen, wie beispielweise *MAP6*-Amplifikationen sowie *MAP2*- und *TP53*-Inaktivierung durch Mutation, Deletion oder Hypermethylierung, in Mantelzell-Lymphomen häufig vorkommen und möglicherweise in die Tumorgenese involviert sind. Veränderungen der Mikrotubuli-Dynamik und der Spindelapparat-Organisation könnten auch zu der für das Mantelzell-Lymphom charakteristischen Komplexität des Karyotyps und zur chromosomalen Instabilität beitragen. Diese Hypothese unterstützend wurde in einer kürzlich vorgestellten Studie die verstärkte Expression zentrosomenassoziierter Proteine in blastoiden Mantelzell-Lymphomen beschrieben (205).

Es gibt bislang keine Therapie, die zu einem langfristigen Überleben von Patienten mit einem Mantelzell-Lymphom führt (21). Eine Resistenz gegenüber mikrotubuli-beeinflussenden chemotherapeutischen Substanzen könnte eine Folge der beeinträchtigten Mikrotubuli-Dynamik sein. Durch die Untersuchung weiterer Gene, deren Produkte in die Organisation und Regulation von Mikrotubuli, Kinetochoren und Zentrosomen involviert sind, ließen sich möglicherweise weitere Erkenntnisse gewinnen, die über die Bedeutung dieser Prozesse für die Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms Aufschluss geben könnten.

4.4. Verlust des Y-Chromosoms und homozygote Deletion der PAR1-Region

Die Gründe für die Prädominanz des männlichen Geschlechts bei Mantelzell-Lymphomen sind noch immer unbekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in bis zu 27,5 % der zytogenetisch analysierten t(11;14)-positiven Mantelzell-Lymphome von männlichen Patienten ein Verlust des Y-Chromosoms beobachtet werden kann. Obwohl der Verlust des Y-Chromosoms in Zellen älterer Männer ein bekanntes Phänomen ist (206), wurde in jüngsten Studien auch ein Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren, speziell beim Prostatakrebs, beschrieben (207-209). Bei der FISH-Analyse von Mantelzell-Lymphomen mit Chromosom-Y-Verlust in der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass in 83 % der Verlust des Y-Chromosoms ein sekundäres klonales Ereignis der t(11;14)-positiven Tumorzellen war. Das Y-Chromosom enthält nur wenige Gene, von denen ein Großteil in den beiden pseudoautosomalen Regionen (PAR1 und PAR2) liegt. Die PAR-Regionen des Y-Chromosoms sind homolog zu zwei Abschnitten des X-Chromosoms, mit denen auch Rekombination stattfindet (210). Bereits bei der Analyse der ArrayCGH-Daten der Mantelzell-Lymphome war in einem primären Mantelzell-Lymphom in der Region Xp22.3 im kurzen Arm des Chromosoms X eine homozygote Deletion aufgefallen. Mit Hilfe des 100K GeneChip®-Mappings und anschließender FISH-Analysen konnten drei weitere primäre Mantelzell-Lymphome mit einer homozygoten Deletion in dieser Region detektiert werden. Die minimal aberrante Region umfasste mit etwa 2,5 Mb vom p-terminalen Ende genau die PAR1-Region. In weiterführenden FISH-Analysen konnte die PAR-1-Deletion den t(11;14)-positiven Tumorzellen zugeordnet und eine CNV ausgeschlossen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung geschlechtschromosomaler Aberrationen bei Mantelzell-Lymphomen konnten zeigen, dass es sich bei dem Verlust des Y-Chromosoms wahrscheinlich um eine sekundäre Aberration t(11;14)-positiver Tumorzellen handelt. Die zusätzliche Detektion einer rekurrenten PAR1-Deletion in diesen Zellen lässt ein Tumorsuppressorgen innerhalb der deletierten Region in Xp22.33 vermuten, das möglicherweise bei der Tumorgenese des Mantelzell-Lymphoms eine Rolle spielen könnte. Die Inaktivierung eines PAR1-gekoppelten Tumorsuppressorgens in Kombination mit dem Verlust des Y-Chromosoms durch einen altersabhängigen Effekt älterer Zellen könnte eine plausible Erklärung für die männliche Prädominanz des Mantelzell-Lymphoms sein (Abbildung 54).

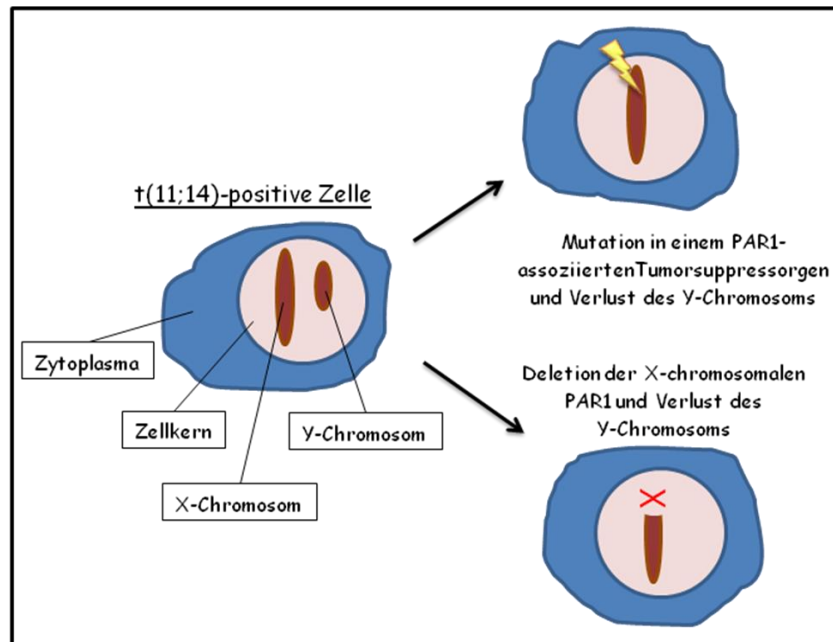


Abbildung 54: Modell zum möglichen Mechanismus der Inaktivierung eines potentiellen PAR1-assoziierten Tumorsuppressorgens

Bemerkenswerterweise wurde aufgrund einer Linkage-Analyse mehrerer Familien mit einer erblichen Prädisposition für die Entwicklung eines Hodgkin-Lymphoms bereits bei einer anderen Lymphomentität eine pseudoautosomale Kopplung postuliert (211, 212). Des Weiteren konnte eine kürzlich vorgestellte Studie am Kaposi-Sarkom zeigen, dass ein rekurrenter Y-Verlust möglicherweise ein initiales genetisches Ereignis bei der malignen Transformation der Tumorzellen darstellt, bevor in Folge chromosomaler Instabilität weitere Aberrationen, wie beispielweise *TP53*-Deletionen, akkumuliert werden (209). Wie das Mantelzell-Lymphom tritt auch das Kaposi-Sarkom häufiger bei Männern auf (213-215). Innerhalb der PAR1-Region befindet sich ein Zytokinrezeptor-Gencluster (216). Die aberrante Expression von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren spielt eine große Rolle in malignen hämatopoetischen Zellen (217, 218). Zukünftige Untersuchungen, wie Mutations- oder Expressionsanalysen der PAR1-Gene, könnten zur Identifikation eines mit der Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms assoziierten Tumorsuppressorgens beitragen.

4.5. Fazit

Mit den in dieser Arbeit eingesetzten neuen Microarray-Technologien konnten eine Vielzahl sekundärer Veränderungen in den untersuchten primären Mantelzell-Lymphomen und Mantelzell-Lymphom-Zelllinien detektiert werden. Zudem wurden die Vor- und Nachteile sowie Einschränkungen der einzelnen Microarray-Technologien kritisch betrachtet und anhand der generierten Mantelzell-Lymphom-Daten belegt. Bei der Bestimmung

chromosomaler Imbalancen ermöglichte die hohe Auflösung der verwendeten Microarrays eine verbesserte Detektion und Kartierung gegenüber bereits publizierten Mantelzell-Lymphom-Studien. Vor allem die Ergebnisse der 100K GeneChip® Mapping-Analysen sowie der weiterführenden zytogenetischen, molekulargenetischen und epigenetischen Untersuchungen ausgesuchter Aberrationen und Kandidatengene brachten neue Erkenntnisse, die möglicherweise zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms beitragen können. So konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass pUPDs bei Mantelzell-Lymphomen rekurrent auftreten und hier einen alternativen Mechanismus der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung darstellen. Durch die Detektion rekurrenter X-chromosomaler PAR-1-Deletionen in Verbindung mit häufigen Verlusten des Y-Chromosoms konnte außerdem eine geschlechtschromosomale Aberration identifiziert werden, die mit der charakteristischen Prädominanz des männlichen Geschlechts bei Mantelzell-Lymphomen assoziiert sein könnte. Die Detektion rekurrenter Aberrationen in Genen, die für Mikrotubuli-assoziierte Proteine kodieren, lieferte zudem Hinweise, dass Veränderungen der Mikrotubuli-Dynamik für die Entstehung und Progression des Mantelzell-Lymphoms von Bedeutung sein könnten. Damit wurden alle eingangs formulierten Ziele der vorliegenden Arbeit erreicht.

4.6. Ausblick

Von der Vielzahl sekundärer Aberrationen und Kandidatengene, die mittels der durchgeführten Microarray-Analysen identifiziert werden konnten, ließ sich nur ein kleiner Teil im Rahmen dieser Arbeit weiterführend untersuchen. Ähnlich wie es für ausgesuchte Gene bereits geschehen ist, könnten Mutationsanalysen, epigenetische Untersuchungen, Expressionstudien und FISH-Analysen klären, wie häufig die bislang nicht weiter untersuchten Genloci in Mantelzell-Lymphomen von Aberrationen betroffen sind. Des Weiteren ließe sich durch funktionelle Analysen der Kandidatengene zeigen, inwieweit diese als Tumorsuppressor- bzw. Onkogene in die Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms involviert sind. Eine Möglichkeit, die Auswirkung potentieller Onkogene auf die Zellproliferation und Apoptose in Zelllinien genauer untersuchen zu können, ist das gezielte Einbringen von kleinen siRNAs (short interfering RNAs), die durch einen zelleigenen Mechanismus namens RNA-Interferenz (RNAi) zum sequenzspezifischen Abbau endogener mRNAs führen (219). Die Kombination dieses Verfahrens mit der Microarray-Technologie ermöglicht eine umfassende Suche nach Genen, die für die gesteigerte Zellproliferation und Apoptosehemmung der Tumorzellen verantwortlich sind (220). Für die Untersuchung

potentieller Tumorsuppressorgene können die entsprechenden Genkonstrukte in Zelllinien eingebracht werden, um dort das defekte Gen zu ersetzen. Im Jahre 2006 stellten Pscherer et al. (221) ein bidirektionales transgenes System vor, welches sowohl den Knockdown aktivierter Onkogene über RNAi als auch die Komplementierung inaktivierter Tumorsuppressorgene durch das Einbringen genomischer DNA erlaubt. Da dieses Konstrukt an der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 etabliert wurde, erscheint es für die Untersuchungen am Mantelzell-Lymphom sehr geeignet.

Durch den Einsatz von immer hochauflösenderen Microarrays, wie beispielweise Tiling-Arrays, welche das gesamte Genom lückenlos abdecken, könnte die Detektion von chromosomalen Imbalancen und die Kartierung minimal aberranter Regionen noch verbessert und so die Auswahl potentieller Zielgene erleichtert werden. Durch den Anteil repetitiver Sequenzen, die mit einem Tiling-Array abgedeckt werden, ist die Streuung allerdings auch hier ein auflösungslimitierender Faktor. Entsprechende Tiling-Arrays können auch zur Erstellung von Genexpressionsprofilen genutzt werden. Des Weiteren wurden erst kürzlich neuartige High-Throughput-Sequenzierungsverfahren vorgestellt, mit denen eine vollständige Genomsequenzierung ermöglicht wird (222, 223). Damit kann in einem Experiment die Gesamtheit aller Mutationen einer untersuchten Probe erfasst werden. Durch die zunehmende Kommerzialisierung dieser Technologien werden auch umfangreiche Studien in absehbarer Zeit finanzierbar sein und zeitaufwendige oder auf bestimmte Mutationen beschränkte Verfahren, wie beispielweise die GINI-Analyse, überflüssig machen. Für ein besseres Verständnis der zellbiologischen Prozesse, die zur malignen Transformation des Mantelzell-Lymphoms beitragen, gewinnt die Analyse epigenetischer Veränderungen immer mehr an Bedeutung. Jüngste Studien belegen, dass sich unterschiedliche Tumorentitäten und -subtypen deutlich in ihrem DNA-Methylierungsmuster unterscheiden (224). Aber auch aberrante Histonmodifikationen können bei der Tumorgenese eine Rolle spielen (225). Zur Epigenetik des Mantelzell-Lymphoms ist bislang nur wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte aber bereits differentielle Methylierung des *MAP2*-Gens nachgewiesen werden. Neueste Mikroarray-Technologien ermöglichen neben der Untersuchung des Genoms oder Transkriptoms auch eine High-Throughput-Analyse des Epigenoms, bei der hauptsächlich Promotorregionen und CpG-Islands der Gene analysiert werden. Dabei können durch verschiedene Verfahren sowohl die DNA-Methylierung als auch das Modifikationsmuster der Histone im großen Umfang untersucht werden (225). Durch die genomweite Detektion hyper- bzw. hypomethylierter Gene in Mantelzell-Lymphomen ließen sich möglicherweise weitere Tumorsuppressor- oder Onkogene

identifizieren, die bei der Entstehung und Progression des Mantelzell-Lymphoms von Bedeutung sein könnten.

Zusammengefasst ist der Einsatz neu entwickelter Mikroarray-Technologien in der Mantelzell-Lymphom-Forschung eine vielversprechende Strategie, um die Genetik bzw. Epigenetik dieses komplex aberranten Lymphoms besser verstehen zu können. Darüberhinaus könnte die Kombination verschiedener Mikroarray-Technologien zur Untersuchung des Genoms, des Epigenoms sowie des Transkriptoms bei der Suche nach tumorassoziierten genetischen Aberrationen sehr hilfreich sein. So kann beispielsweise anhand Microarray-basierter Genexpressionsprofile überprüft werden, ob sich bestimmte genetische oder epigenetische Veränderungen tatsächlich auf die Genexpression auswirken. Auf diese Weise wird die Identifikation unbekannter Tumorsuppressor- und Onkogene erleichtert. Anschließende Studien können dann die Bedeutung dieser Gene für die prädiktive Diagnostik sowie Risikostratifizierung untersuchen und neue biologisch begründete Therapieansätze entwickeln.

5. Zusammenfassung

Das Mantelzell-Lymphom ist eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems und gehört zu den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen. Als primäre genetische Veränderung tragen fast alle Mantelzell-Lymphome die charakteristische Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, infolgedessen Cyclin D1 in den Tumorzellen überexprimiert wird. Anhand von transgenen Mausmodellen konnte allerdings gezeigt werden, dass diese strukturelle Aberration für eine maligne Transformation nicht ausreichend ist. Vielmehr spielen zusätzliche sekundäre genetische Veränderungen bei der Entstehung und Progression des Mantelzell-Lymphoms eine entscheidende Rolle. Diese tragen möglicherweise über gonosomale Effekte auch zu der bislang noch ungeklärten Prädominanz des männlichen Geschlechts bei.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Microarray-Technologien zur genomweiten Identifizierung und Charakterisierung sekundärer Aberrationen bei Mantelzell-Lymphomen eingesetzt. Mit der Gene Identification by Nonsense-mediated mRNA Decay Inhibition (GINI)-Technologie sollten in zwei Mantelzell-Lymphom-Zelllinien potentielle Tumorsuppressorgene identifiziert werden, die durch Nonsense-Mutationen inaktiviert werden. Insgesamt wurden 26 solcher Gene mittels GINI detektiert. In den zwei bislang untersuchten Kandidatengenomen konnten allerdings keine Nonsense-Mutationen sondern lediglich Spleißvarianten identifiziert werden. Die Ergebnisse der GINI-Analysen führten zu einer kritischen Einschätzung der Methode, die sehr anfällig für falsch-positive Ergebnisse scheint.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die BAC/PAC-basierten ArrayCGH-Daten von 68 primären Mantelzell-Lymphomen und neun Mantelzell-Lymphom-Zelllinien bezüglich X-chromosomaler Imbalancen ausgewertet. Es konnten eine homozygote Deletion in Xp22.3 und rekurrente Zugewinne in der Chromosomenregion Xq27.3-Xq28 identifiziert werden. Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden diese Aberrationen bezüglich ihrer Bruchpunkte genauer charakterisiert und die minimal betroffenen Regionen bestimmt.

Als dritte Microarray-Technologie wurde das 100K GeneChip® Mapping eingesetzt, mit dem 26 primäre Mantelzell-Lymphome und sechs Mantelzell-Lymphom-Zelllinien analysiert wurden. Mit dieser Technologie konnte die Auflösung gegenüber der BAC/PAC-basierten ArrayCGH deutlich verbessert werden. Genomweit ließen sich mit Hilfe der 100K GeneChip®-Arrays neben bereits bekannten Imbalancen 12 neue Regionen mit rekurrenten Zugewinnen oder Verlusten identifizieren. In die Aberrationen waren Gene mit typischen Tumorsuppressor- und Onkogeneigenschaften involviert, wie beispielweise

FOXP1, MYCBP2, CDKN2AIP, ING/P33, und CDKN1B/P27. Des Weiteren ließ sich mit dieser zur Genotypisierung geeigneten Technologie erstmals zeigen, dass partielle uniparentale Disomien (pUPD) bei Mantelzell-Lymphomen rekurrent auftreten und hier einen alternativen Mechanismus der Tumorsuppressorgen-Inaktivierung darstellen. Vor allem durch die Detektion von 21 kleinen High-Level-Amplifikationen und 21 mittels PCR oder FISH bestätigten homozygoten Deletionen konnten eine Reihe neuer potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene identifiziert werden, wie z.B. das amplifizierte *MAP6*-Gen oder die deletierten Gene *MAP2, MOBKL2B, IFNK, GRIN2B und FGF14*. Anschließende zytogenetische, molekulargenetische und epigenetische Untersuchungen ausgesuchter Aberrationen und Kandidatengene lieferten Hinweise, dass rekurrente Veränderungen von Genen, die für Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie *MAP2, MAP6* und *TP53* kodieren, in die Pathogenese des Mantelzell-Lymphoms involviert sind. Neunzehn primäre Mantelzell-Lymphome und fünf Mantelzell-Lymphom-Zelllinien zeigten Veränderungen in einem dieser drei Gene. Mit der Detektion rekurrenter X-chromosomaler Deletionen der pseudoautosomalen Region 1 in Verbindung mit häufigen Verlusten des Y-Chromosoms konnte außerdem eine geschlechtschromosomale Aberration identifiziert werden, die mit der charakteristischen Prädominanz des männlichen Geschlechts bei Mantelzell-Lymphomen assoziiert sein könnte.

Somit konnten in dieser Arbeit

1. verschiedene neue Tumorsuppressor- und Onkogenkandidaten identifiziert und initial charakterisiert werden,
2. pUPD als neuer molekularer Mechanismus der Mantelzell-Lymphom-Genese nachgewiesen werden,
3. Veränderungen Mikrotubuli-assoziiierter Gene als neuer Pathomechanismus bei Mantelzell-Lymphomen beschrieben werden sowie
4. ein pseudoautosomaler Genort identifiziert und eingegrenzt werden, der möglicherweise mit der männlichen Prädominanz bei Mantelzell-Lymphomen assoziiert ist.

Diese Erkenntnisse und darauf aufbauende weiterführende Studien könnten zu einem besseren Verständnis der genetischen Ursachen sowie zu einer verbesserten Prognoseabschätzung und Therapie bei Mantelzell-Lymphomen beitragen.

6. Summary

Mantle cell lymphoma is a lymphoproliferative disorder and belongs to the group of B-cell derived Non-Hodgkin lymphoma. The hallmark of mantle cell lymphoma is the translocation t(11;14)(q13;q32) that leads to overexpression of cyclin D1. Based on studies with transgenic mice, it is well established that this chromosomal event alone is not sufficient to drive in lymphomagenesis but secondary genomic alterations are required for malignant transformation. Hypothetically, such secondary alterations affecting the X or Y chromosome might also contribute to the male predominance in mantle cell lymphoma for which the causes are still unknown.

In the present study, three different microarray-based technologies were applied for the genome-wide identification and characterization of secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma. A recently introduced technology, called gene identification by nonsense-mediated mRNA decay inhibition (GINI), was applied in two MCL cell lines to identify candidate tumor suppressor genes silenced by nonsense-mutations. Although 26 candidate genes were suggested by GINI, sequencing of two candidate genes failed to identify nonsense-mutation but revealed plenty of splice variants. These findings show that the power of GINI to identify tumor suppressor genes is limited by its high rate of false positive results.

In a second approach, BAC/PAC-based arrayCGH data of 68 primary mantle cell lymphomas and nine mantle cell lymphoma cell lines was evaluated with regard to genomic imbalances of the chromosome X. Two aberrant regions were identified including a hemizygous deletion in Xp22.3 and recurrent chromosomal gain in Xq27.3-Xq28. Fluoreszenz *in situ* hybridization (FISH) was performed to delineate the minimally aberrant regions.

In a third approach, 26 primary mantle cell lymphomas and six mantle cell lymphoma cell lines were analysed by an innovative microarray technology, the so-called 100K GeneChip® mapping. By using this platform spatial resolution was considerably increased compared to the BAC/PAC-array. In addition to previously described genomic imbalances in mantle cell lymphoma 12 novel gains and losses were identified by 100K GeneChip® analyses. The minimally aberrant regions involved candidate genes showing typical tumor suppressor or oncogene properties, e.g. *FOXP1*, *MYCBP2*, *CDKN2AIP*, *ING/P33*, and *CDKN1B/P27*. Moreover, this platform allowed simultaneous genotyping, so that loss of heterozygosity without changes in DNA copy number was also detectable. Here, it was demonstrated for the first time, that partial uniparental disomy (pUPD) is a recurrent

genetic mechanism of tumor suppressor gene inactivation alternative to chromosomal deletion in mantle cell lymphoma.

Taking advantage of the high resolution of 100K GeneChip® mapping 21 high level amplifications and 21 short regions of homozygous loss verified by extensive PCR or FISH analyses were detected and novel putative oncogenes and tumor suppressor genes were identified, e.g. amplified *MAP6* or deleted *MAP2*, *MOBK2B*, *IFNK*, *GRIN2B*, and *FGF14*. Genetic and epigenetic studies of several candidate genes provide evidence that recurrent aberrations of genes encoding microtubule-associated proteins, such as *MAP2*, *MAP6* and *p53*, might be involved in mantle cell lymphoma pathogenesis, as changes of this pathway were shown in 19 primary MCL and five MCL cell lines. Finally, detection of both recurrent deletions in Xp22.33 as well as frequent loss of the Y chromosome suggest that a candidate tumor suppressor gene located in the pseudoautosomal region in combination with chromosome Y loss might be associated with male predominance in mantle cell lymphoma through an age-related effect in elderly cells.

In summary, the present study could

1. identify and initially characterize a series of novel candidate tumor suppressor and oncogenes in mantle cell lymphoma,
2. demonstrate that pUPD is an alternative mechanism to chromosomal deletion leading to tumor suppressor gene inactivation in mantle cell lymphoma,
3. describe recurrent aberration of genes encoding microtubule-associated proteins as novel pathomechanism in mantle cell lymphoma, and
4. characterize a gonosomal gene locus which might be associated with male predominance in mantle cell lymphoma.

These findings and ongoing studies might contribute to a better understanding of genetic events causing mantle cell lymphoma development in order to improve prognostic parameters and therapeutic options.

7. Referenzen

1. Stein H, Hummel M, Johrens K, Anagnostopoulos I. Classification and pathogenesis of malignant lymphomas. *Internist (Berl)*. 2007 Apr;48(4):351-61.
2. Coupland SE, Hummel M, Stein H. Lymphatisches System und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten. Aus: *Der Pathologe*. Springer-Verlag, Hamburg. 2000;21:106-12.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The adaptive immune system. Aus: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York. 2002:1364-409.
4. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005 Apr;5(4):251-62.
5. Harris NL. Mature B cell neoplasm. Aus: *World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press. 2001:121-30.
6. Kuppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 2001 Sep 10;20(40):5580-94.
7. Drouet M, Lees O. Clinical applications of flow cytometry in hematology and immunology. *Biol Cell*. 1993;78(1-2):73-8.
8. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 1997 Oct 15;90(8):2863-92.
9. Knapp W, Rieber P, Dorken B, Schmidt RE, Stein H, vd Borne AE. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol Today*. 1989 Aug;10(8):253-8.
10. Szczepanski T, van der Velden VH, van Dongen JJ. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(7):775-96.
11. Non-Hodgkin-Lymphome. Buchreihe des Tumorzentrums (TUZ) Rhein-Main eV, AALEX Druck GmbH. 2001.
12. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994 Sep 1;84(5):1361-92.
13. Siebert R, Rosenwald A, Staudt LM, Morris SW. Molecular features of B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2001 Sep;13(5):316-24.
14. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene*. 2007 May 28;26(25):3603-13.
15. Harris NL, Jaffe ES, Vardiman JW, Stein H, Diebold J, Müller-Hermelink HK, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Aus: *World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues* Lyon: IARC Press 2001:12-3.
16. Foss HD, Coupland SE, Stein H. Klinisch-pathologische Formen peripherer T- und NK-Zell-Lymphome. Aus: *Der Pathologe*. Springer-Verlag, Hamburg. 2000;21:137-46.
17. Willis TG, Dyer MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):808-22.
18. Gladden AB, Woolery R, Aggarwal P, Wasik MA, Diehl JA. Expression of constitutively nuclear cyclin D1 in murine lymphocytes induces B-cell lymphoma. *Oncogene*. 2006 Feb 16;25(7):998-1007.
19. Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, Moroy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J*. 1994 Aug 1;13(15):3487-95.
20. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*. 1991 Jan 17;349(6306):254-6.
21. Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct;7(10):750-62.
22. Hiddemann W. Hämatologie Onkologie: Niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymphome. Verlag Urban und Schwarzenberg, München. 1997.
23. Decaudin D, Salanoubat C, Carde P. Is mantle cell lymphoma a sex-related disease? *Leuk Lymphoma*. 2000 Mar;37(1-2):181-4.

24. Au WY, Gascoyne RD, Viswanatha DS, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE. Cytogenetic analysis in mantle cell lymphoma: a review of 214 cases. *Leuk Lymphoma*. 2002 Apr;43(4):783-91.
25. Espinet B, Sole F, Woessner S, Bosch F, Florensa L, Campo E, et al. Translocation (11;14)(q13;q32) and preferential involvement of chromosomes 1, 2, 9, 13, and 17 in mantle cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999 May;111(1):92-8.
26. Bigoni R, Cuneo A, Milani R, Roberti MG, Bardi A, Rigolin GM, et al. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma: cytogenetic and fluorescence in situ hybridization studies. *Leuk Lymphoma*. 2001 Feb;40(5-6):581-90.
27. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol*. 1999 Apr;36(2):115-27.
28. Swerdlow SH, Berger F, Isaacson PI, Müller-Hermelink HK, Nathwani BN, Piris MA, et al. Mantle cell lymphoma. *Aus: World Health Organization Classification of Tumors, Pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues*. . IARC Press, Lyon. 2001:168-70.
29. Lenz G, Dreyling M, Hiddemann W. Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions. *Ann Hematol*. 2004 Feb;83(2):71-7.
30. Lenz G, Dreyling M, Hoster E, Wormann B, Duhrsen U, Metzner B, et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol*. 2005 Mar 20;23(9):1984-92.
31. Brody J, Advani R. Treatment of mantle cell lymphoma: current approach and future directions. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006 Jun;58(3):257-65.
32. Ratech H. Molecular pathology of low grade malignant lymphomas. *Med Oncol*. 1995 Sep;12(3):167-76.
33. Callanan M, Leroux D, Magaud JP, Rimokh R. Implication of cyclin D1 in malignant lymphoma. *Crit Rev Oncog*. 1996;7(3-4):191-203.
34. Barista I, Romaguera JE, Cabanillas F. Mantle-cell lymphoma. *Lancet Oncol*. 2001 Mar;2(3):141-8.
35. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*. 1993 May 7;73(3):487-97.
36. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May 5;81(3):323-30.
37. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun 15;13(12):1501-12.
38. Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, Lindeman GJ, Harris AW, Adams JM. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J*. 1994 May 1;13(9):2124-30.
39. Monni O, Oinonen R, Elonen E, Franssila K, Teerenhovi L, Joensuu H, et al. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998 Apr;21(4):298-307.
40. Bentz M, Plesch A, Bullinger L, Stilgenbauer S, Ott G, Muller-Hermelink HK, et al. t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000 Mar;27(3):285-94.
41. Stilgenbauer S, Winkler D, Ott G, Schaffner C, Leupolt E, Bentz M, et al. Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood*. 1999 Nov 1;94(9):3262-4.
42. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Dohner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Jul 15;94(2):748-53.
43. Koduru PR, Zariwala M, Soni M, Gong JZ, Xiong Y, Broome JD. Deletion of cyclin-dependent kinase 4 inhibitor genes P15 and P16 in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1995 Oct 15;86(8):2900-5.
44. Dreyling MH, Bullinger L, Ott G, Stilgenbauer S, Muller-Hermelink HK, Bentz M, et al. Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. 1997 Oct 15;57(20):4608-14.

45. Pinyol M, Bea S, Pla L, Ribrag V, Bosq J, Rosenwald A, et al. Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5422-9.
46. Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, et al. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4302-10.
47. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3.
48. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001 Nov;1(2):157-62.
49. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.
50. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 13;103(24):9136-41.
51. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 1994 Apr 15;264(5157):436-40.
52. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.
53. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 1986 Oct 16-22;323(6089):643-6.
54. Bignell GR, Huang J, Greshock J, Watt S, Butler A, West S, et al. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Res*. 2004 Feb;14(2):287-95.
55. Bruce S, Leinonen R, Lindgren CM, Kivinen K, Dahlman-Wright K, Lipsanen-Nyman M, et al. Global analysis of uniparental disomy using high density genotyping arrays. *J Med Genet*. 2005 Nov;42(11):847-51.
56. Adams J, Williams SV, Aveyard JS, Knowles MA. Loss of heterozygosity analysis and DNA copy number measurement on 8p in bladder cancer reveals two mechanisms of allelic loss. *Cancer Res*. 2005 Jan 1;65(1):66-75.
57. Fitzgibbon J, Smith LL, Raghavan M, Smith ML, Debernardi S, Skoulakis S, et al. Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res*. 2005 Oct 15;65(20):9152-4.
58. Gorletta TA, Gasparini P, D'Elios MM, Trubia M, Pelicci PG, Di Fiore PP. Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 Nov;44(3):334-7.
59. Lu YJ, Yang J, Noel E, Skoulakis S, Chaplin T, Raghavan M, et al. Association between large-scale genomic homozygosity without chromosomal loss and nonseminomatous germ cell tumor development. *Cancer Res*. 2005 Oct 15;65(20):9137-41.
60. Raghavan M, Lillington DM, Skoulakis S, Debernardi S, Chaplin T, Foot NJ, et al. Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res*. 2005 Jan 15;65(2):375-8.
61. Teh MT, Blaydon D, Chaplin T, Foot NJ, Skoulakis S, Raghavan M, et al. Genomewide single nucleotide polymorphism microarray mapping in basal cell carcinomas unveils uniparental disomy as a key somatic event. *Cancer Res*. 2005 Oct 1;65(19):8597-603.
62. Murthy SK, DiFrancesco LM, Ogilvie RT, Demetrick DJ. Loss of heterozygosity associated with uniparental disomy in breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2002 Dec;15(12):1241-50.
63. Henry I, Bonaiti-Pellie C, Chehensse V, Beldjord C, Schwartz C, Utermann G, et al. Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature*. 1991 Jun 20;351(6328):665-7.

64. Strachan T, Read AP. Struktur und Funktion der Chromosomen. Aus: Molekulare Humangenetik, 3 Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH. 2005:207-34.
65. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.
66. Kiechle M, Jacobsen A, Schwarz-Boeger U, Hedderich J, Pfisterer J, Arnold N. Comparative genomic hybridization detects genetic imbalances in primary ovarian carcinomas as correlated with grade of differentiation. *Cancer*. 2001 Feb 1;91(3):534-40.
67. Stokke T, DeAngelis P, Smedshammer L, Galteland E, Steen HB, Smeland EB, et al. Loss of chromosome 11q21-23.1 and 17p and gain of chromosome 6p are independent prognostic indicators in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*. 2001 Dec 14;85(12):1900-13.
68. Allen JE, Hough RE, Goepel JR, Bottomley S, Wilson GA, Alcock HE, et al. Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol*. 2002 Feb;116(2):291-8.
69. Flordal E, Berglund M, Rosenquist R, Erlanson M, Enblad G, Roos G, et al. Clonal development of a blastoid mantle cell lymphoma studied with comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002 Nov;139(1):38-43.
70. Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Marugan I, Benet I, et al. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3479-82.
71. Trevino V, Falciani F, Barrera-Saldana HA. DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Mol Med*. 2007 Sep-Oct;13(9-10):527-41.
72. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997 Dec;20(4):399-407.
73. Snijders AM, Nowak N, Segreaves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet*. 2001 Nov;29(3):263-4.
74. Pinkel D, Segreaves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998 Oct;20(2):207-11.
75. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999 Sep;23(1):41-6.
76. Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, et al. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Apr;36(4):361-74.
77. Greshock J, Naylor TL, Margolin A, Diskin S, Cleaver SH, Futreal PA, et al. 1-Mb resolution array-based comparative genomic hybridization using a BAC clone set optimized for cancer gene analysis. *Genome Res*. 2004 Jan;14(1):179-87.
78. Cowell JK, Wang YD, Head K, Conroy J, McQuaid D, Nowak NJ. Identification and characterisation of constitutional chromosome abnormalities using arrays of bacterial artificial chromosomes. *Br J Cancer*. 2004 Feb 23;90(4):860-5.
79. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet*. 2004 Mar;36(3):299-303.
80. Krzywinski M, Bosdet I, Smailus D, Chiu R, Mathewson C, Wye N, et al. A set of BAC clones spanning the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(12):3651-60.
81. Slater HR, Bailey DK, Ren H, Cao M, Bell K, Nasioulas S, et al. High-resolution identification of chromosomal abnormalities using oligonucleotide arrays containing 116,204 SNPs. *Am J Hum Genet*. 2005 Nov;77(5):709-26.
82. Nicolae DL, Wen X, Voight BF, Cox NJ. Coverage and characteristics of the Affymetrix GeneChip Human Mapping 100K SNP set. *PLoS Genet*. 2006 May;2(5):e67.

83. Noensie EN, Dietz HC. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat Biotechnol.* 2001 May;19(5):434-9.
84. Mercola D, Welsh J. From mRNA to tumor suppressor. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):937-8.
85. Huusko P, Ponciano-Jackson D, Wolf M, Kiefer JA, Azorsa DO, Tuzmen S, et al. Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):979-83.
86. Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet.* 1999;8(10):1893-900.
87. Lewis BP, Green RE, Brenner SE. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):189-92.
88. Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Holzmann K, Kestler HA, Kienle D, et al. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood.* 2004 Aug 1;104(3):795-801.
89. Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A, et al. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene.* 2005 Feb 17;24(8):1348-58.
90. de Leeuw RJ, Davies JJ, Rosenwald A, Bebb G, Gascoyne RD, Dyer MJ, et al. Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Hum Mol Genet.* 2004 Sep 1;13(17):1827-37.
91. Abe M, Nozawa Y, Wakasa H, Ohno H, Fukuhara S. Characterization and comparison of two newly established Epstein-Barr virus-negative lymphoma B-cell lines. Surface markers, growth characteristics, cytogenetics, and transplantability. *Cancer.* 1988 Feb 1;61(3):483-90.
92. Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E, Bartkova J, Stranks G, De Schouwer PJ, et al. Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519). *Leukemia.* 1997 Jan;11(1):64-72.
93. Rudolph C, Steinemann D, Von Neuhoff N, Gadzicki D, Ripperger T, Drexler HG, et al. Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004 Sep;153(2):144-50.
94. Drexler HG. The leukemia-lymphoma cell line facts book. Academic Press, London. 2001.
95. Drexler HG, MacLeod RA. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of mantle cell lymphoma. *Leuk Res.* 2002 Sep;26(9):781-7.
96. Amin HM, McDonnell TJ, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, Leventaki V, O'Connor SL, et al. Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines. *Arch Pathol Lab Med.* 2003 Apr;127(4):424-31.
97. M'Kacher R, Bennaceur A, Farace F, Lauge A, Plassa LF, Wittmer E, et al. Multiple molecular mechanisms contribute to radiation sensitivity in mantle cell lymphoma. *Oncogene.* 2003 Sep 11;22(39):7905-12.
98. M'Kacher R, Farace F, Bennaceur-Griscelli A, Violot D, Clause B, Dossou J, 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 May;143(1):32-8.
99. Zamo A, Ott G, Katzenberger T, Adam P, Parolini C, Scarpa A, et al. Establishment of the MAVER-1 cell line, a model for leukemic and aggressive mantle cell lymphoma. *Haematologica.* 2006 Jan;91(1):40-7.
100. Jeon HJ, Kim CW, Yoshino T, Akagi T. Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *Br J Haematol.* 1998 Sep;102(5):1323-6.
101. Saltman DL, Cachia PG, Dewar AE, Ross FM, Krajewski AS, Ludlam C, 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 Dec;72(6):2026-30.
102. Camps J, Salaverria I, Garcia MJ, Prat E, Bea S, Pole JC, et al. Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines. *Leuk Res.* 2006 Aug;30(8):923-34.

103. Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martin-Subero JI, Nielander I, et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4445-54.
104. Nannya Y, Sanada M, Nakazaki K, Hosoya N, Wang L, Hangaishi A, et al. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6071-9.
105. Lin M, Wei LJ, Sellers WR, Lieberfarb M, Wong WH, Li C. dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics*. 2004 May 22;20(8):1233-40.
106. Oefner PJ, Underhill, P.A. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet*. 1995;57(Suppl):266.
107. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat*. 2001 Jun;17(6):439-74.
108. Schwarzer S. DHPLC spürt Mutationen auf. *Labor Praxis*. 2000;Okt.
109. Schmitt TJ, Robinson ML, Doyle J. Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Insertion & Deletion on the WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System. *Transgenomic Inc Application Note 112*. 2000.
110. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
111. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*. 2004;1:92-5.
112. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 2002 Aug 12;21(35):5427-40.
113. Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*. 1988 Sep;2(9):1136-43.
114. Esteller M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J Pathol*. 2005 Jan;205(2):172-80.
115. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415-28.
116. Carew JA, Feldberg RS. Recognition of a cytosine base lesion by a human damage-specific DNA binding protein. *Nucleic Acids Res*. 1985 Jan 11;13(1):303-15.
117. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9821-6.
118. Liu ZJ, Maekawa M. Polymerase chain reaction-based methods of DNA methylation analysis. *Anal Biochem*. 2003 Jun 15;317(2):259-65.
119. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1827-31.
120. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*. 1994 Aug 11;22(15):2990-7.
121. Linke R. *Funktionsanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin. 1998.
122. Strachan T, Read, A.P. *Analyse von DNA und Genstruktur, Variation und Expression*. In *Molekulare Humangenetik*, 3 Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH. 2005:207-34.
123. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003 Jan 22;19(2):185-93.
124. Benjamini YaH, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B*. 1995;57:289-300.
125. Affymetrix. BRLMM: an improved genotype calling method for the genechip human mapping 500k array set. *Techrep, Affymetrix, Inc White Paper*. 2006.

126. Beroukhim R, Lin M, Park Y, Hao K, Zhao X, Garraway LA, et al. Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Comput Biol*. 2006 May;2(5):e41.
127. Zhao X, Li C, Paez JG, Chin K, Janne PA, Chen TH, et al. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res*. 2004 May 1;64(9):3060-71.
128. Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, Campo E. Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica*. 2006 Jan;91(1):11-6.
129. Bentz M, Cabot G, Moos M, Speicher MR, Ganser A, Lichter P, et al. Detection of chimeric BCR-ABL genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia by in situ hybridization. *Blood*. 1994 Apr 1;83(7):1922-8.
130. Bea S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernandez L, Hernandez S, et al. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res*. 2001 Mar 15;61(6):2409-12.
131. Mestre-Escorihuela C, Rubio-Moscardo F, Richter JA, Siebert R, Climent J, Fresquet V, et al. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):271-80.
132. Bichsel SJ, Tamaskovic R, Stegert MR, Hemmings BA. Mechanism of activation of NDR (nuclear Dbp2-related) protein kinase by the hMOB1 protein. *J Biol Chem*. 2004 Aug 20;279(34):35228-35.
133. Bosc C, Andrieux A, Job D. STOP proteins. *Biochemistry*. 2003 Oct 28;42(42):12125-32.
134. Giannakakou P, Sackett DL, Ward Y, Webster KR, Blagosklonny MV, Fojo T. p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat Cell Biol*. 2000 Oct;2(10):709-17.
135. Schmitz R, Hartmann S, Giefing M, Mechttersheimer G, Zühlke-Jenisch R, Martin-Subero JI, et al. Inactivating mutations of TNFAIP3 (A20) indicate a tumor suppressor role for A20 in Hodgkin's lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *Haematologica*. 2007;92(Supplement 5):41.
136. Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT. Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene*. 1999 May 20;18(20):3063-70.
137. Drexler HG, Matsuo AY, MacLeod RA. Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research. *Leuk Res*. 2000 Nov;24(11):881-911.
138. Ionov Y, Nowak N, Perucho M, Markowitz S, Cowell JK. Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer Cells with microsatellite instability. *Oncogene*. 2004 Jan 22;23(3):639-45.
139. Rossi MR, Hawthorn L, Platt J, Burkhardt T, Cowell JK, Ionov Y. Identification of inactivating mutations in the JAK1, SYNJ2, and CLPTM1 genes in prostate cancer cells using inhibition of nonsense-mediated decay and microarray analysis. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005 Sep;161(2):97-103.
140. Schmechel SC, LeVasseur RJ, Yang KH, Koehler KM, Kussick SJ, Sabath DE. Identification of genes whose expression patterns differ in benign lymphoid tissue and follicular, mantle cell, and small lymphocytic lymphoma. *Leukemia*. 2004 Apr;18(4):841-55.
141. Zhu Y, Hollmen J, Raty R, Aalto Y, Nagy B, Elonen E, et al. Investigatory and analytical approaches to differential gene expression profiling in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2002 Dec;119(4):905-15.
142. Islam TC, Asplund AC, Lindvall JM, Nygren L, Liden J, Kimby E, et al. High level of cannabinoid receptor 1, absence of regulator of G protein signalling 13 and differential expression of Cyclin D1 in mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2003 Sep;17(9):1880-90.
143. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2003 Feb;3(2):185-97.
144. Affymetrix. GeneChip Mapping 500K Assay Manual. www.affymetrix.com. 2006.
145. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007 Apr 12;446(7137):758-64.

146. Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, Rawluk J, Kreutz C, Martens UM, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):1202-10.
147. Rinaldi A, Kwee I, Poretti G, Mensah A, Pruneri G, Capello D, et al. Comparative genome-wide profiling of post-transplant lymphoproliferative disorders and diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2006 Jul;134(1):27-36.
148. Ross CW, Ouillette PD, Saddler CM, Shedden KA, Malek SN. Comprehensive analysis of copy number and allele status identifies multiple chromosome defects underlying follicular lymphoma pathogenesis. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 15;13(16):4777-85.
149. Fitzgibbon J, Iqbal S, Davies A, O'Shea D, Carlotti E, Chaplin T, et al. Genome-wide detection of recurring sites of uniparental disomy in follicular and transformed follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1514-20.
150. Flotho C, Steinemann D, Mullighan CG, Neale G, Mayer K, Kratz CP, et al. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis in juvenile myelomonocytic leukemia identifies uniparental disomy surrounding the NF1 locus in cases associated with neurofibromatosis but not in cases with mutant RAS or PTPN11. *Oncogene*. 2007 Aug 23;26(39):5816-21.
151. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000 Dec 28;343(26):1910-6.
152. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Dohner H. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*. 2002 Jun;16(6):993-1007.
153. Banham AH, Beasley N, Campo E, Fernandez PL, Fidler C, Gatter K, et al. The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. *Cancer Res*. 2001 Dec 15;61(24):8820-9.
154. Hu H, Wang B, Borde M, Nardone J, Maika S, Allred L, et al. Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nat Immunol*. 2006 Aug;7(8):819-26.
155. Fuxa M, Skok JA. Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr Opin Immunol*. 2007 Apr;19(2):129-36.
156. Barrans SL, Fenton JA, Banham A, Owen RG, Jack AS. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2933-5.
157. Brown P, Marafioti T, Kusec R, Banham AH. The FOXP1 transcription factor is expressed in the majority of follicular lymphomas but is rarely expressed in classical and lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma. *J Mol Histol*. 2005 May;36(4):249-56.
158. Banham AH, Connors JM, Brown PJ, Cordell JL, Ott G, Sreenivasan G, et al. Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 1;11(3):1065-72.
159. Koon HB, Ippolito GC, Banham AH, Tucker PW. FOXP1: a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Jul;11(7):955-65.
160. Sakamuro D, Prendergast GC. New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene*. 1999 May 13;18(19):2942-54.
161. Pierre SC, Hausler J, Birod K, Geisslinger G, Scholich K. PAM mediates sustained inhibition of cAMP signaling by sphingosine-1-phosphate. *EMBO J*. 2004 Aug 4;23(15):3031-40.
162. Gao X, Patel TB. Histidine residues 912 and 913 in protein associated with Myc are necessary for the inhibition of adenyl cyclase activity. *Mol Pharmacol*. 2005 Jan;67(1):42-9.
163. Hasan MK, Yaguchi T, Sugihara T, Kumar PK, Taira K, Reddel RR, et al. CARF is a novel protein that cooperates with mouse p19ARF (human p14ARF) in activating p53. *J Biol Chem*. 2002 Oct 4;277(40):37765-70.
164. Hasan MK, Yaguchi T, Minoda Y, Hirano T, Taira K, Wadhwa R, et al. Alternative reading frame protein (ARF)-independent function of CARF (collaborator of ARF) involves its interactions with p53: evidence

- for a novel p53-activation pathway and its negative feedback control. *Biochem J.* 2004 Jun 15;380(Pt 3):605-10.
165. Kamrul HM, Wadhwa R, Kaul SC. CARF binds to three members (ARF, p53, and HDM2) of the p53 tumor-suppressor pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Apr;1100:312-5.
 166. Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedoux R, et al. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 14;98(17):9671-6.
 167. Wang J, Chin MY, Li G. The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):1906-11.
 168. Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li G. Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Oct;61(19-20):2597-613.
 169. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell.* 1996 May 31;85(5):733-44.
 170. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med.* 2002 Oct;8(10):1136-44.
 171. Hershko DD, Shapira M. Prognostic role of p27Kip1 deregulation in colorectal cancer. *Cancer.* 2006 Aug 15;107(4):668-75.
 172. Wu FY, Wang SE, Sanders ME, Shin I, Rojo F, Baselga J, et al. Reduction of cytosolic p27(Kip1) inhibits cancer cell motility, survival, and tumorigenicity. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):2162-72.
 173. Kossatz U, Malek NP. p27: tumor suppressor and oncogene ...? *Cell Res.* 2007 Oct;17(10):832-3.
 174. Sherr CJ. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect.* 2000;96:73-92.
 175. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Mar 14;1602(1):73-87.
 176. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002 Dec;2(12):910-7.
 177. Fernandez V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 10;23(26):6364-9.
 178. Denarier E, Fourest-Lieuvin A, Bosc C, Pirollet F, Chapel A, Margolis RL, et al. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26;95(11):6055-60.
 179. Bosc C, Cronk JD, Pirollet F, Watterson DM, Haiech J, Job D, et al. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 5;93(5):2125-30.
 180. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2006 Oct 13;314(5797):268-74.
 181. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007 Nov 16;318(5853):1108-13.
 182. Beerwinkel N, Antal T, Dingli D, Traulsen A, Kinzler KW, Velculescu VE, et al. Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Comput Biol.* 2007 Nov;3(11):e225.
 183. Hayden JH, Bowser SS, Rieder CL. Kinetochore capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *J Cell Biol.* 1990 Sep;111(3):1039-45.
 184. Zhai Y, Kronebusch PJ, Simon PM, Borisy GG. Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J Cell Biol.* 1996 Oct;135(1):201-14.
 185. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2004 Apr;4(4):253-65.

186. Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis*. 2003 Oct;8(5):413-50.
187. Bhat KM, Setaluri V. Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007 May 15;13(10):2849-54.
188. Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol*. 2000 Jun;61(2):133-68.
189. Vallee RB, DiBartolomeis MJ, Theurkauf WE. A protein kinase bound to the projection portion of MAP 2 (microtubule-associated protein 2). *J Cell Biol*. 1981 Sep;90(3):568-76.
190. Theurkauf WE, Vallee RB. Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. *J Biol Chem*. 1982 Mar 25;257(6):3284-90.
191. Serrano L, Avila J, Maccioni RB. Controlled proteolysis of tubulin by subtilisin: localization of the site for MAP2 interaction. *Biochemistry*. 1984 Sep 25;23(20):4675-81.
192. Hirokawa N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1994 Feb;6(1):74-81.
193. Janssens V, Goris J, Van Hoof C. PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev*. 2005 Feb;15(1):34-41.
194. Soltani MH, Pichardo R, Song Z, Sangha N, Camacho F, Satyamoorthy K, et al. Microtubule-associated protein 2, a marker of neuronal differentiation, induces mitotic defects, inhibits growth of melanoma cells, and predicts metastatic potential of cutaneous melanoma. *Am J Pathol*. 2005 Jun;166(6):1841-50.
195. Fang D, Hallman J, Sangha N, Kute TE, Hammarback JA, White WL, et al. Expression of microtubule-associated protein 2 in benign and malignant melanocytes: implications for differentiation and progression of cutaneous melanoma. *Am J Pathol*. 2001 Jun;158(6):2107-15.
196. Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, et al. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev*. 1999 Oct 1;13(19):2490-501.
197. Johnsen JI, Aurelio ON, Kwaja Z, Jorgensen GE, Pellegata NS, Plattner R, et al. p53-mediated negative regulation of stathmin/Op18 expression is associated with G(2)/M cell-cycle arrest. *Int J Cancer*. 2000 Dec 1;88(5):685-91.
198. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*. 2002 Apr 18;21(17):2613-22.
199. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.
200. Galmarini CM, Kamath K, Vanier-Viorner A, Hervieu V, Peiller E, Falette N, et al. Drug resistance associated with loss of p53 involves extensive alterations in microtubule composition and dynamics. *Br J Cancer*. 2003 Jun 2;88(11):1793-9.
201. Murga Penas EM, Kawadler H, Siebert R, Frank M, Ye H, Hinz K, et al. A novel fusion of the MALT1 gene and the microtubule-associated protein 4 (MAP4) gene occurs in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Sep;45(9):863-73.
202. Alberts B, Johnsen A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *The Cytoskeleton. Aus: Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York. 2002:907-82.
203. Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*. 2005;6(1):204.
204. Nunez J, Fischer I. Microtubule-associated proteins (MAPs) in the peripheral nervous system during development and regeneration. *J Mol Neurosci*. 1997 Jun;8(3):207-22.
205. Neben K, Ott G, Schweizer S, Kalla J, Tews B, Katzenberger T, et al. Expression of centrosome-associated gene products is linked to tetraploidization in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2007 Apr 15;120(8):1669-77.
206. Loss of the Y chromosome from normal and neoplastic bone marrows. United Kingdom Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Genes Chromosomes Cancer*. 1992 Jul;5(1):83-8.

207. Vijayakumar S, Garcia D, Hensel CH, Banerjee M, Bracht T, Xiang R, et al. The human Y chromosome suppresses the tumorigenicity of PC-3, a human prostate cancer cell line, in athymic nude mice. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 Dec;44(4):365-72.
208. Vijayakumar S, Hall DC, Reveles XT, Troyer DA, Thompson IM, Garcia D, et al. Detection of recurrent copy number loss at Yp11.2 involving TSPY gene cluster in prostate cancer using array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):4055-64.
209. Pyakurel P, Montag U, Castanos-Velez E, Kaaya E, Christensson B, Tonnie H, et al. CGH of microdissected Kaposi's sarcoma lesions reveals recurrent loss of chromosome Y in early and additional chromosomal changes in late tumour stages. *AIDS*. 2006 Sep 11;20(14):1805-12.
210. Blaschke RJ, Rappold G. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Jun;16(3):233-9.
211. Horwitz M, Wiernik PH. Pseudoautosomal linkage of Hodgkin disease. *Am J Hum Genet*. 1999 Nov;65(5):1413-22.
212. Horwitz MS, Mealiffe ME. Further evidence for a pseudoautosomal gene for Hodgkin's lymphoma: Reply to 'The familial risk of Hodgkin's lymphoma ranks among the highest in the Swedish Family-Cancer Database' by Altieri A and Hemminki K. *Leukemia*. 2007 Feb;21(2):351.
213. Weltfriend S, Friedman-Birnbaum R, Pollack S. Decreased natural killer cell function in patients with classical Kaposi's sarcoma. *Dermatologica*. 1990;181(3):207-10.
214. Iscovich J, Boffetta P, Brennan P. Classic Kaposi's sarcoma in Arabs living in Israel, 1970-1993: a population-based incidence study. *Int J Cancer*. 1998 Jul 29;77(3):319-21.
215. Tessari G, Naldi L, Boschiero L, Cordiano C, Piaserico S, Fortina AB, et al. Incidence and clinical predictors of Kaposi's sarcoma among 1721 Italian solid organ transplant recipients: a multicenter study. *Eur J Dermatol*. 2006 Sep-Oct;16(5):553-7.
216. Kremer E, Baker E, D'Andrea RJ, Slim R, Phillips H, Moretti PA, et al. A cytokine receptor gene cluster in the X-Y pseudoautosomal region? *Blood*. 1993 Jul 1;82(1):22-8.
217. Durig J, Schmucker U, Duhrsen U. Differential expression of chemokine receptors in B cell malignancies. *Leukemia*. 2001 May;15(5):752-6.
218. Trentin L, Cabrelle A, Facco M, Carollo D, Miorin M, Tosoni A, et al. Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2004 Jul 15;104(2):502-8.
219. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
220. Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G, et al. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*. 2006 May 4;441(7089):106-10.
221. Pscherer A, Schliwka J, Wildenberger K, Mincheva A, Schwaenen C, Dohner H, et al. Antagonizing inactivated tumor suppressor genes and activated oncogenes by a versatile transgenesis system: application in mantle cell lymphoma. *FASEB J*. 2006 Jun;20(8):1188-90.
222. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):376-80.
223. Rogers YH, Venter JC. Genomics: massively parallel sequencing. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):326-7.
224. Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, et al. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2003 Mar 1;63(5):1114-21.
225. Nielander I, Bug S, Richter J, Giefing M, Martin-Subero JI, Siebert R. Combining array-based approaches for the identification of candidate tumor suppressor loci in mature lymphoid neoplasms. *APMIS*. 2007 Oct;115(10):1107-34.

8. Anhang

Anhang 1: Affymetrix Referenzen

Als Referenzen für die 100K GeneChip[®]-Analyse wurden 90 Hapmap-Proben (30 CEPH Trios) von der Firma Affymetrix zur Verfügung gestellt.

(http://www.affymetrix.com/support/technical/sample_data/hapmap_trio_data.affx)

Files:

100K_trios.hind.1.zip, 100K_trios.hind.2.zip, 100K_trios.hind.3.zip, 100K_trios.hind.4.zip, 100K_trios.hind.5.zip
100K_trios.xba.1.zip, 100K_trios.xba.2.zip, 100K_trios.xba.3.zip, 100K_trios.xba.4.zip, 100K_trios.xba.5.zip

Liste der Affymetrix Referenzen:

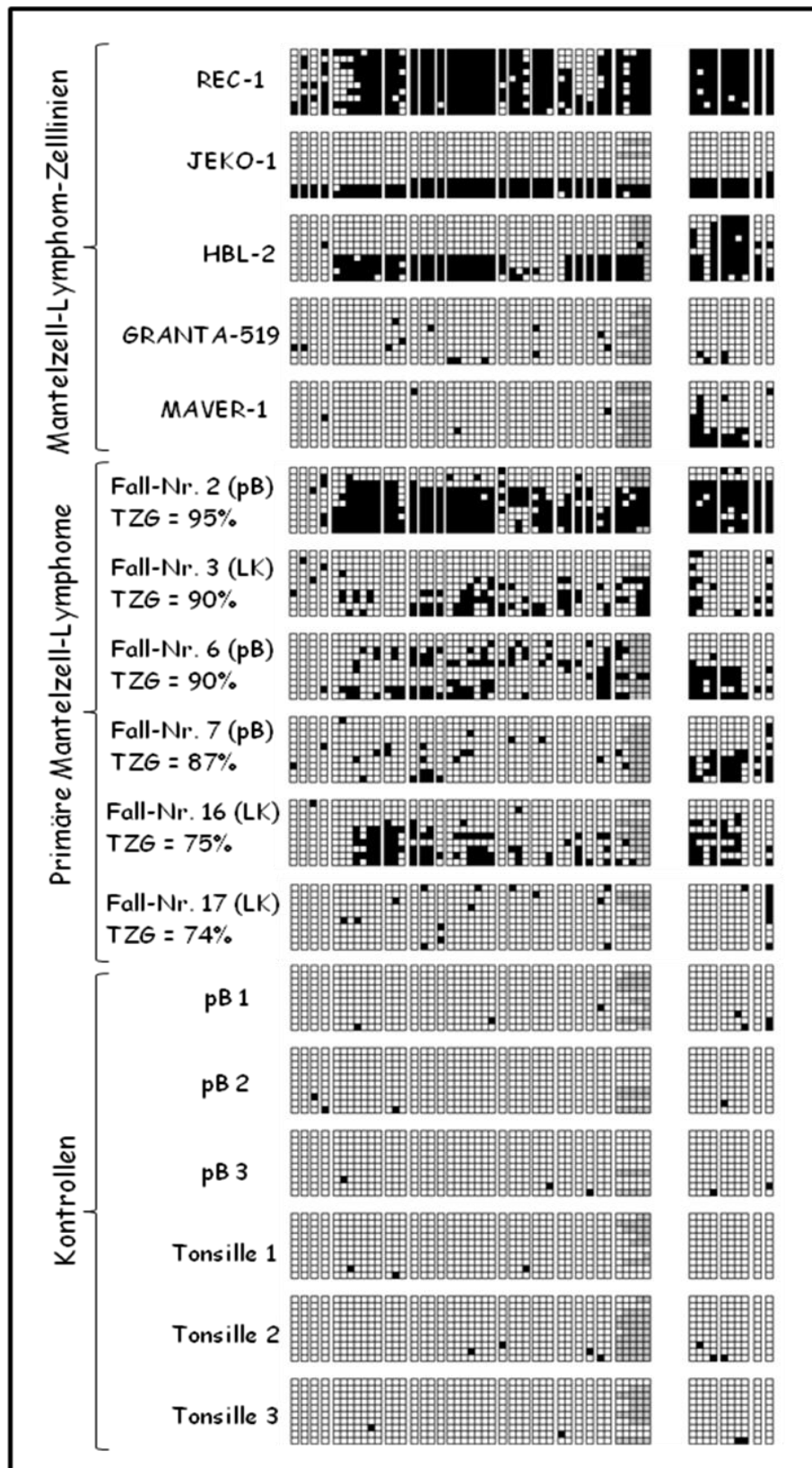
NA06985, NA06991, NA06993, NA06994, NA07000, NA07019, NA07022, NA07029, NA07034, NA07048, NA07055, NA07056, NA07345, NA07348, NA07357, NA10830, NA10831, NA10835, NA10838, NA10839, NA10846, NA10847, NA10851, NA10854, NA10855, NA10856, NA10857, NA10859, NA10860, NA10861, NA10863, NA11829, NA11830, NA11831, NA11832, NA11839, NA11840, NA11881, NA11882, NA11992, NA11993, NA11994, NA11995, NA12003, NA12004, NA12005, NA12006, NA12043, NA12044, NA12056, NA12057, NA12144, NA12145, NA12146, NA12239, NA12716, NA12717, NA12707, NA12264, NA12234, NA12154, NA12236, NA12155, NA12156, NA12248, NA12249, NA12750, NA12751, NA12740, NA12760, NA12761, NA12752, NA12762, NA12763, NA12753, NA12812, NA12813, NA12801, NA12814, NA12815, NA12802, NA12872, NA12873, NA12864, NA12874, NA12875, NA12865, NA12891, NA12892, NA12878

Anhang 2: Identifizierte Transkripte, Spleißvarianten und SNPs der Gene *PIM2* und *OAS1* in der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 nach Emetin-Behandlung.

Fragment ¹	<i>PIM2</i>		<i>OAS1</i>			
	Primerpaar 1	Primerpaar 2	Primerpaar 1 ²	Primerpaar 2 ²	Primerpaar 3 ³	Primerpaar 4 ⁴
1	Transkript NM_00687	Transkript NM_00687	Transkripte NM_016816, NM_001032409 oder NM_002534, enthält 3 SNPs (rs1050994, rs1050995, rs3741981)	Spleißvariante von NM_016816 mit zusätzlicher Intronsequenz ausgelöst durch einen SNP an der Spleißstelle (rs10774671), führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon	Spleißvariante von NM_016816 mit zusätzlicher Intronsequenz ausgelöst durch einen SNP an der Spleißstelle (rs10774671), führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon	Transkript NM_002534
2	kürzere Spleißvariante, ohne Exon 2, führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon	-	Sequenzüberlagerung von Fragment 1 und 3	Sequenzüberlagerung von Fragment 1 und 3	Sequenzüberlagerung von Fragment 1 und 4	-
3	-	-	kürzere Spleißvariante, ohne Exon 2, führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon, enthält 2 SNPs (rs1050994, rs3741981)	Transkripte NM_016816, NM_001032409 oder NM_002534	Sequenzüberlagerung von Fragment 1 und 4	-
4	-	-	-	-	Transkript NM_001032409	-

¹die Fragmente wurden ihrer Größe nach durchnummeriert, ²Primerpaar amplifiziert alle drei bekannten *OAS1*-Transkripte, ³Primerpaar amplifiziert nur die *OAS1*-Transkripte NM_016816 und NM_001032409, ⁴Primerpaar amplifiziert nur das kurze *OAS1*-Transkript NM_002534

Einige der Banden aus dem Agarosegel lieferten keine lesbaren Sequenzen, vielmehr handelte es sich hierbei um Überlagerung der Sequenzen eines längeren und eines kürzeren Transkripts.



Anhang 3: Bisulfitsequenzierung des MAP2-CpG-Islands. Jede Spalte entspricht einem CpG-Dinukleotid, jede Zeile entspricht einem von zehn sequenzierten Klonen. Methylierte CpGs sind schwarz, unmethylierte CpGs weiß dargestellt. Die CpG-Dinukleotide, die nicht ausgewertet werden konnten, sind grau markiert (TZG: Tumorzellgehalt, pB: peripheres Blut, LK: Lymphknoten).

9. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Arnold für die Übernahme des Hauptreferats, seine hervorragende Betreuung während der gesamten Promotionsarbeit sowie seine hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch für sein Interesse am Thema und die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Reiner Siebert für die überaus interessante Themenauswahl sowie die hervorragende Betreuung und weitreichende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine konstruktive Kritik haben im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. rer. nat. Florian Wagner und Herrn Prof. Dr. med. Martin-Leo Hansmann für die Möglichkeit eines Gastaufenthalts in ihren Laboren und ihre unentbehrliche fachliche Unterstützung bei den Microarray-Analysen bedanken. Gleichmaßen danke ich Herrn Prof. José Angel Martinez-Climent für die zur Verfügung gestellten ArrayCGH-Daten.

Aufrichtig bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Dipl. Inf. Markus Kreuz, Herrn Dr. rer. nat. Dirk Hasenclever und Herrn Hilmar Berger, die durch ihre bioinformatische Unterstützung maßgeblich zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Frau Dr. med. Christiane Pott bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Zusammenstellung des Untersuchungsmaterials.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. med. Svetlana Harder für die Bereitstellung und Revision der für die Arbeit erforderlichen zytogenetischen Daten.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. med. Wolfram Klapper bedanken, in dessen Labor freundlicherweise die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt wurden.

Ich danke Frau Claudia Becher, Frau Dorit Schuster, Frau Gabi Riesen, Frau Magret Ratjen, Frau Reina Zühlke-Jenisch, Frau Simone Hartmann, Frau Susanne Kuklinski,

Danksagung

Frau Astrid Schneider, Frau Christine Radbruch, Frau Annekatrin Borowski und Frau Lamia Grimm für ihre technische Assistenz und ihre große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Herrn Claus Peter Blohm möchte ich für seine Unterstützung bei der Dokumentation der Ergebnisse und seine Hilfe in allen IT-Fragen danken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. José Ignacio Martín-Subero, Frau Dipl. Biochem. Inga Nagel und Herrn Dr. med. Stefan Gesk für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit sowie für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und fruchtbare Zusammenarbeit.

Darüberhinaus möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern für die ständige Ermutigung, ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft und zeitweise notwendige Geduld während der gesamten Promotionsarbeit bedanken.

Und nicht zuletzt gilt mein tiefempfundener Dank Dir, Hinrich, für Deine uneingeschränkte Unterstützung und die Kraft, die Du mir jeden Tag gibst, meine Ziele zu verfolgen.

10. Lebenslauf

	<h3>Persönliche Daten</h3>
Name	Inga Nieländer
Akademischer Grad	Diplom-Biochemikerin
Anschrift	Unterstkoppel 111 24222 Schwentinental Tel.: 0170/7346271
Geburtsdatum und –ort	04.12.1979 in Düsseldorf
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
	<h3>Schulbildung und beruflicher Werdegang</h3>
seit 06/2004	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
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 mit dem Titel „Molekulare Untersuchungen des Methyltransferase <i>SUV39H1</i> -Gens bei Mantelzell-Lymphomen“
1990-1999	Gymnasium Elmschenhagen in Kiel Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1986-1990	Theodor-Möller-Grundschule in Kiel
Kiel, den	

11. Publikationen

Originalarbeiten

Nieländer I, Wagner F, Kreuz M, Berger H, Martín-Subero JI, Pott C, Martinez-Climent JA, Klapper W, Krause K, Dyer MJS, Gesk S, Harder L, Zamo A, Dreyling M, Hasenclever D, Arnold N, Siebert R: GeneChip analyses identify genes encoding microtubule-associated proteins as recurrent targets of chromosomal aberrations in mantle cell lymphoma. *Cancer Research* (submitted, CAN-08-0913).

Nieländer I, Martín-Subero JI, Wagner F, Baudis M, Gesk S, Harder L, Hasenclever D, Klapper W, Kreuz M, Pott C, Martinez-Climent JA, Dreyling M, Arnold N, Siebert R: Recurrent loss of the Y chromosome and homozygous deletions within the pseudoautosomal region 1: Association with male predominance in mantle cell lymphoma? *Haematologica* (in press, manuscript 12656, June 2008).

Giefing M, Arnemann J, Martin-Subero JI, **Nieländer I**, Bug S, Hartmann S, Arnold N, Tiacci E, Frank M, Hansmann ML, Küppers R and Siebert R: Identification of candidate tumour suppressor gene loci for Hodgkin and Reed-Sternberg cells by characterisation of homozygous deletions in classical Hodgkin lymphoma cell lines. *British Journal of Haematology* (in press, BJH-2008-00038.R1)

Nieländer I, Martin-Subero JI, Wagner F, Martinez-Climent JA, Siebert R: Partial uniparental disomy: a recurrent genetic mechanism alternative to chromosomal deletion in malignant lymphoma. *Leukemia* 20:904-905 (2006).

Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martin-Subero JI, **Nieländer I**, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Terol MJ, Pinkel D, Martinez-Climent JA: Mantle cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 105:4445-4454 (2005).

Übersichtsartikel

Nieländer I, Bug S, Richter J, Giefing M, Martin-Subero JI, Siebert R: Combining array-based approaches for the identification of candidate tumor suppressor loci in mature lymphoid neoplasms. *APMIS* 115:1107-1134 (2007).

Veröffentlichte Tagungsbeiträge

Nieländer I, Martin-Subero JI, Wagner F, Pott C, Martinez-Climent JA, Siebert R (2007) Microarray-based genome-wide analyses of single nucleotide polymorphisms (SNPs) revealed regions of partial uniparental disomy (pUPD) and small homozygous deletions in mantle cell lymphoma (MCL). Medgen 19: W1 05.

Nieländer I, Martin-Subero JI, Wagner F, Martinez-Climent JA, Siebert R (2006) Partial uniparental disomy is recurrent in mantle cell lymphoma and affects chromosomal regions supposed to harbor tumor suppressor genes. Medgen 18: P016.

Giefing M, Martin-Subero JI, **Nieländer I**, Arnemann J, Hansmann ML, Küppers R, Siebert R (2006) Identification of 40 homozygous deletions in Hodgkin lymphoma cell lines using six different array-CGH platforms. Medgen 18: P002.

Nieländer I, Martin-Subero J, Gascoyne R, Pott C, Grote W, Siebert R (2005) The Codon 242 G/A polymorphism in the CCND1 gene is not associated with age of disease onset in mantle cell lymphoma with IGH/CCND1 fusion. Medgen 17: P090.

Nieländer I, Gesk S, Arnold N, Martin-Subero JI, Grote W, Siebert R (2004) Molecular analyses of the gene encoding the methyltransferase SUV39H1 in mantle cell lymphomas. Eur J Hum Genet 12 Suppl 1: P0463.

Weitere Vorträge

Nieländer I, Martin-Subero JI, Wagner F, Pott C, Martinez-Climent JA, Siebert R (2007) Microarray-based genome wide analyses of single nucleotide polymorphisms (SNPs) revealed regions of partial uniparental disomy (pUPD) and small homozygous deletions in mantle cell lymphoma (MCL). 20. Tumorzytogenetische Arbeitstagung, Grünberg/Oberhessen.

Nieländer I, Martin-Subero JI, Wagner F, Martinez-Climent JA, Siebert R (2006) Partielle Uniparentale Disomien (pUPD) bei Mantelzell-Lymphomen. Treffen Norddeutscher Humangenetiker, Bremen

Nagel I, **Nieländer I**, Martin-Subero JI, Dyer MJ, Gesk S, Harder L, Siebert R (2006) Charakterisierung der Deletion del(14)(q24q32) bei B-Zell-Neoplasien. 19. Tumorzytogenetische Arbeitstagung, Wernigerode.

12. Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit - abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegt. Teilergebnisse der Arbeit wurden bereits publiziert (siehe Abschnitt 11).

Kiel, den.....

.....

Inga Nieländer