

**Untersuchung der chromosomalen Instabilität  
hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren mittels  
spektraler Karyotypisierung (SKY)**

Der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Cornelia Rudolph  
geboren am 14.07.1970 in Zerbst

2006

Referent: Herr Prof. Dr. W. Müller

Korreferent: Frau Prof. Dr. B. Schlegelberger

Tag der Promotion: 27.09.2005

Nichts wahrhaft Wertvolles erwächst  
aus Ehrgeiz oder bloßem Pflichtgefühl,  
sondern vielmehr aus Liebe und Treue  
zu Menschen und Dingen.

**Albert Einstein (1879-1955)**

**Meinen Eltern in Liebe gewidmet**

## Zusammenfassung

Genetische und/oder epigenetische Mutationen können ursächlich an der Tumorgenese beteiligt sein. Eine einzelne Mutation ist dabei oft nicht ausreichend und erfordert, entsprechend der Theorie des Mehrschrittprozesses der Tumorentstehung und -progression, sekundäre Veränderungen.

Die primäre Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  stellt das auf dem Chromosom 11q13 lokalisierte Gen *CCND1/PRAD1/BCL1* unter die transkriptionale Kontrolle des starken *IgH*-Enhancers, der in der chromosomalen Region 14q32 lokalisiert ist. Die molekularbiologische Konsequenz dieses Rearrangements ist die Überexpression des Zellzyklusregulators *Cyclin D1* und führt zu einer forcierten Zellproliferation. Diese Translokation ist in nahezu allen Mantelzell-Lymphomen (MCL) und in etwa 15-20% der Multiplen Myelome (MM) detektierbar. Mausmodelle zeigten, dass sekundäre genetische Veränderungen für die maligne Zelltransformation des MCL erforderlich sind, doch sind die darin involvierten Gene und dysregulierten Signalkaskaden bisher wenig verstanden. In dieser Arbeit wurde die chromosomale Instabilität  $t(11;14)(q13;q32)$ -positiver *in vitro*-Modelle der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)-Entitäten MCL und MM mittels spektraler Karyotypisierung (SKY) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Chromosom 1 in beiden Entitäten gehäuft in strukturelle chromosomale Veränderungen involviert ist und damit eine wichtige Funktion in der Tumorphathogenese auszuüben scheint. Darüber hinaus konnten in den MCL-Zelllinien die chromosomalen Regionen 1p21 und 1p31 als oft in Deletionen involvierte Bruchpunkte detektiert werden, in MM-Zelllinien zeigten dagegen die heterochromatischen Regionen 1p11-12, 1q12 und die Region 1q21 Bruchereignisse, die in Translokationen involviert waren. Diese Ergebnisse könnten für die Lokalisation eines Tumorsuppressorgens (TSG) in 1p und eines Onkogens in 1q sprechen und unterschiedliche Mechanismen in der Tumorgenese und -progression beider NHL-Entitäten bedeuten. Unter Verwendung supportiver molekularzytogenetischer Techniken, wie der Fluoreszenz- *in situ*-Hybridisierung (FISH),

konnten zudem beispielsweise erhöhte Kopienzahlen des Onkogens *BCL2* und/oder Deletionen des TSG *P53* detektiert werden, die die Theorie der multifaktoriellen Tumorgenese unterstützen.

Die zytogenetische Charakterisierung muriner *in vitro*- und *in vivo*-Modelle humaner hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren mittels spektraler Karyotypisierung stellte einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar. In verschiedenen Modellen konnte gezeigt werden, dass das Chromosom 15 wiederkehrend sowohl in numerische als auch strukturelle Veränderungen involviert ist und dass Bruchereignisse meist in der chromosomalen Regionen 15D2–D3, in der das Onkogen *c-myc* lokalisiert ist, stattfinden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass trotz einer starken Onkogenwirkung, z.B. des Transgens *N-RAS*, die Aktivierung des *c-myc* über eine chromosomale Aberration einen wichtigen Einfluss auf die Tumorgenese hat.

In einem weiteren *in vivo*-Modell konnte gezeigt werden, dass die Resistenzentwicklung eines malignen Tumors gegen eine Suizidtherapie durch Verlust des Transgen-tragenden Markerchromosoms erfolgen kann.

In dieser Arbeit wurden auch erstmals experimentell abgesicherte Ergebnisse über die Kooperation zwischen Insertionsmutagenese mit Entwicklung leukämischer Phänotypen und chromosomaler Instabilität in einem murinen *in vivo*-Modell gewonnen.

Schlagnworte: chromosomale Instabilität, spektrale Karyotypisierung, *in vitro*- und *in vivo*-Modelle

## Summary

Genetic and/or epigenetic mutations can be involved causally in tumorigenesis. One single mutation is, however, often not enough and requires secondary alterations, in accordance with the theory of the multistep process of tumor formation and progression. The primary translocation t(11;14)(q13;q32) places the gene *CCND1/PRAD1/BCL1* localized on chromosome 11q13 under the transcriptional control of the strong *IgH* enhancer that is present in the chromosomal region 14q32. The molecular biological consequence of this rearrangement is the overexpression of the cell cycle regulator *cyclin D1* and leads to forced cell proliferation. This translocation can be detected in almost all mantle cell lymphomas (MCL) and in about 15-20% of the multiple myelomas (MM). Mouse models showed that secondary genetic alterations are required for malignant cell transformation of the MCL, yet so far little is understood about the genes involved and dysregulated signal cascades.

In this work, the chromosomal instability of t(11;14)(q13;q32)-positive *in vitro* models of the B-cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL) entities MCL and MM was investigated using spectral karyotyping (SKY). It was shown that chromosome 1 in both entities is often involved in structural chromosomal alterations and thus seems to carry out an important function in tumor pathogenesis. In addition, in the MCL cell lines, the chromosomal regions 1p21 and 1p31 could often be detected as breakpoints involved in deletions. In the MM cell lines, on the other hand, the heterochromatic regions 1p11-12, 1q12 and the region 1q21 showed break events involved in translocations. These results may indicate the localization of a tumor suppressor gene (TSG) in 1p and an oncogene in 1q and mean that different mechanisms are involved in the tumorigenesis and tumor progression of the two NHL entities. Using supportive molecular cytogenetic techniques like fluorescence *in situ* hybridization (FISH), for example, increased copy numbers of the oncogene *BCL2*, and/or deletions of the TSG *P53* could be detected, thus supporting the theory of multifactorial tumorigenesis.

The cytogenetic characterization of mouse *in vitro* and *in vivo* models of human hematological neoplasias and solid tumors using spectral karyotyping was a further main part of this work. It could be shown in various models that chromosome 15 is repeatedly involved in numerical and structural changes and that break events mostly occur in the chromosomal regions 15D2-D3 in which the oncogene *c-myc* is localized. These results indicate that, despite a strong oncogenic effect, e.g. from the transgene *N-RAS*, the activation of *c-myc* via a chromosomal aberration has an important influence on tumorigenesis.

In a further *in vivo* model, it could be shown that the development of resistance of a malignant tumor to suicide gene therapy can occur due to loss of the transgene-carrying marker chromosome.

In this work, experimentally proven results on the cooperation between insertional mutagenesis with the development of leukemic phenotypes and chromosomal instability could be achieved for the first time in a mouse *in vivo* model.

Key words: chromosomal instability, spectral karyotyping, *in vitro* and *in vivo* models

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Krebsentstehung als multifaktorieller Mehrschrittprozess .....</b>	<b>17</b>
1.1.1	Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen .....	20
1.1.2	Mikrosatelliteninstabilität und chromosomale Instabilität .....	20
1.1.2.1	Ursachen chromosomaler Instabilität .....	20
1.1.2.1.1	Defekte der Chromosomensegregation.....	20
1.1.2.1.2	Telomerdysfunktionen.....	21
1.1.2.1.3	Defekte in der Antwort auf DNA-Reparaturschäden – Zellzyklus-Dysregulation.....	22
<b>1.2</b>	<b>Hämatologische Neoplasien als Folge genetischer Instabilität.....</b>	<b>22</b>
1.2.1	Non-Hodgkin-Lymphome .....	22
1.2.1.1	Mantelzell-Lymphome.....	24
1.2.1.1.1	Genetische Marker des MCL.....	26
1.2.1.1.2	Therapeutische Optionen und Prognose .....	31
1.2.1.2	Multiple Myelome .....	32
1.2.1.2.1	Genetische Marker des MM .....	32
1.2.1.2.2	Therapeutische Optionen und Prognose .....	35
<b>1.3</b>	<b>Murine Gentransfermodelle.....</b>	<b>36</b>
1.3.1	Die transgene Maus .....	36
1.3.2	<i>Knock-in</i> und <i>knock-out</i> – konditionale und induzierbare Systeme .....	36
1.3.3	Retroviraler Gentransfer und Insertionsmutagenese .....	37
1.3.4	Nicht-viraler Gentransfer .....	41
1.3.5	Mausmodelle hämatologischer Neoplasien .....	41
1.3.5.1	Leukämischer Phänotyp durch Markergeninsertion.....	41

1.3.5.2	Mausmodelle zur Theorie der multifaktoriellen Tumorgenese .....	42
1.3.5.2.1	Plasmazelltumoren nach Koexpression von <i>C-MYC</i> und <i>BCL-X<sub>L</sub></i> .....	42
1.3.5.2.2	Forcierte Leukämieentwicklung nach Koexpression von <i>PML-RARA</i> und <i>BCL2</i> .....	42
1.3.5.2.3	Forcierte Lymphombildung nach Koexpression von <i>CCND1</i> und <i>N-MYC</i> oder <i>L-MYC</i> .....	43
<b>1.4</b>	<b>Theoretische Grundlagen der in dieser Arbeit untersuchten murinen <i>in vitro</i>- und <i>in vivo</i>-Modelle hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren.....</b>	<b>43</b>
1.4.1	Leukämische Varianten nach retroviralem Gentransfer und Expression des <i>MDR1</i> -Gens im <i>in vivo</i> -Stammzellmodell .....	43
1.4.2	Tumorzellen entgehen suizidaler Strategie im Rahmen der Gentherapie .....	44
1.4.3	<i>BCR-ABL</i> - transduzierte hämatologische Zellen als <i>in vitro</i> -Modelle der humanen Ph-ALL .....	45
1.4.4	<i>In vitro</i> -Modell des humanen anaplastischen großzelligen Lymphoms ...	46
1.4.5	T-Zell-Entartung in <i>N-RAS</i> -transgenen Modellen mit <i>Suv39h1</i> - oder <i>p53</i> -Defizienz.....	46
1.4.6	<i>p18</i> -Defizienz in Onkogen-stressinduzierten ( <i>H-RAS</i> oder <i>C-MYC</i> ) MEF .....	47
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>49</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>52</b>
<b>2.1</b>	<b>Modelle hämatologischer Neoplasien .....</b>	<b>52</b>
2.1.1	<i>In vitro</i> -Modelle humaner Neoplasien.....	52
2.1.2	Murine <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Modelle.....	52
2.1.2.1	Leukämische Klone nach retroviralem Gentransfer und Expression des <i>MDR1</i> -Gens im <i>in vivo</i> -Stammzellmodell .....	52

2.1.2.2	Lymphomzelllinie EL-4wt und retroviral transduzierte Klone mit Expression der HSV-TK, Primärtumoren und Rezidive .....	54
2.1.2.3	<i>BCR-ABL</i> - transduzierte hämatopoetische Zellen als <i>in vitro</i> -Modell der humanen Ph-ALL .....	55
2.1.2.4	TS1G6 als <i>in vitro</i> -Modell des humanen ALCL.....	56
2.1.2.5	<i>N-RAS</i> -transgene Modelle mit <i>Suv39h1</i> - oder <i>p53</i> -Defizienz.....	56
2.1.2.6	Zelllinien <i>p18+/- (C-MYC)</i> und <i>p18+/- (H-RAS)</i> .....	57
<b>2.2</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>57</b>
2.2.1	Kulturbedingungen humaner neoplastischer Zellen.....	57
2.2.2	Kulturbedingungen muriner Zellen .....	58
2.2.2.1	EL-4wt-Zellen und transduzierte Subklone.....	58
2.2.2.2	<i>BCR-ABL</i> -transduzierte hämatopoetische Zellen .....	58
2.2.2.3	Zelllinie TS1G6 .....	58
2.2.2.4	Zelllinien <i>p18+/- (C-MYC)</i> und <i>p18+/- (H-RAS)</i> .....	58
<b>2.3</b>	<b>Zytopenetische und molekulargenetische Analysemethoden.....</b>	<b>59</b>
2.3.1	Chromosomenpräparation .....	59
2.3.1.1	Präparation humaner Chromosomen neoplastischer Zellen.....	59
2.3.1.2	Präparation muriner Chromosomen .....	59
2.3.1.3	Beurteilung der Präparate .....	59
2.3.1.4	Langzeitlagerung der Präparate.....	60
2.3.2	Beschreibung chromosomaler Veränderungen .....	60
2.3.2.1	Beschreibung chromosomaler Veränderungen des humanen Genoms..	60
2.3.2.2	Berechnungen zur strukturellen chromosomalen Instabilität.....	61
2.3.2.3	Beschreibung chromosomaler Veränderungen des murinen Genoms und Bestimmung syntener humaner Loci .....	61
2.3.3	Fluoreszenzbasierende Chromosomen- und Gen-analytische Methoden.....	63
2.3.3.1	Fluoreszenz-R-Bandendarstellung humaner Chromosomen.....	63
2.3.3.1.1	Giemsafärbung .....	63
2.3.3.1.2	Fluoreszenzfärbung .....	64

2.3.3.1.3	Bildaufnahme und Karyotypisierung.....	64
2.3.3.2	<i>In situ</i> -Hybridisierungen .....	64
2.3.3.2.1	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	65
2.3.3.2.1.1	Gen- und lokusspezifische Analysen von <i>in vitro</i> -Modellen humaner hämatologischer Neoplasien .....	65
2.3.3.2.1.1.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung und Signaldetektion .....	66
2.3.3.2.1.1.2	Fluoreszenzmikroskopie, Bildaufnahme und Bearbeitung .....	67
2.3.3.2.1.2	Generierung von DNA-Sonden für FISH an murinen Chromosomen und Interphasekernen .....	67
2.3.3.2.1.2.1	Anzucht von Kolonien .....	68
2.3.3.2.1.2.2	DNA-Isolierung und Aufreinigung .....	68
2.3.3.2.1.2.3	Oligomarkierung ( <i>random primed labelling</i> ).....	68
2.3.3.2.1.2.4	Aufarbeitung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden.....	69
2.3.3.2.1.2.5	Hybridisierung.....	69
2.3.3.2.1.2.6	Posthybridisierung und Fluoreszenzmikroskopie.....	69
2.3.3.2.1.3	WCP ( <i>Whole Chromosome Painting</i> )-FISH an murinen Chromosomen .	70
2.3.3.2.1.3.1	Hybridisierung.....	71
2.3.3.2.1.3.2	Posthybridisierung und Fluoreszenzmikroskopie.....	71
2.3.3.2.2	Spektrale Karyotypisierung (SKY).....	71
2.3.3.2.2.1	Apparative Ausstattung .....	72
2.3.3.2.2.1.1	Hardwarekomponenten.....	72
2.3.3.2.2.1.2	Softwarekomponenten für die Bildaufnahme und Karyotypisierung.....	74
2.3.3.2.2.2	Methodische Durchführung .....	75
2.3.3.2.2.2.1	Vorbehandlung der Präparate .....	76
2.3.3.2.2.2.2	DNA-Denaturierung und Hybridisierung .....	76
2.3.3.2.2.2.3	Detektion der Fluoreszenzsignale .....	77
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>79</b>
<b>3.1</b>	<b>Chromosomale Instabilität in <i>in vitro</i>-Modellen humaner hämatologischer Neoplasien .....</b>	<b>79</b>

3.1.1	Nachweis des <i>CCND1/IgH</i> -Rearrangements als primäres chromosomales Ereignis.....	79
3.1.2	Sekundäre chromosomale Veränderungen.....	81
3.1.2.1	Der Ploidiegrad und Vergleich der strukturellen Instabilität der <i>in vitro</i> -Modelle .....	85
3.1.2.2	Bruchregionen in MCL und MM <i>in vitro</i> -Modellen	87
3.1.2.3	Zytogenetischer Vergleich der verwandten Zelllinien SP-50B und SP-53 sowie KMS-12 PE und KMS-12 BM .....	91
3.1.2.4	Polyklonalität der untersuchten Zelllinien .....	96
3.1.2.5	Untersuchung bekannter Tumor-assoziiertes Gene.....	101
<b>3.2</b>	<b>Chromosomale Aberrationen in murinen <i>in vitro</i>- und <i>in vivo</i>- Modellen .....</b>	<b>109</b>
3.2.1	Chromosomale Defekte in leukämischen Varianten nach retroviralem Gentransfer und Expression des <i>MDR1</i> -Gens im <i>in vivo</i> - Stammzellmodell.....	109
3.2.1.1	Erythroid leukämischer Phänotyp mit strukturellen Aberrationen.....	109
3.2.1.2	Balancierte Translokation in MPD-ähnlicher Leukämie .....	110
3.2.1.3	Vergleich der zytogenetischen Daten nach SKY mit den nachgewiesenen Insertionsloci retroviraler Sequenzen.....	110
3.2.1.4	Bestimmung der syntenen humanen Regionen.....	111
3.2.2	Chromosomaler Verlust führt zur Resistenzentwicklung gegen suizidale Genterapie .....	113
3.2.2.1	Komplexe chromosomale Aberrationen in der Zelllinie EL-4wt.....	115
3.2.2.2	Keine Hinweise auf Veränderungen der chromosomalen Instabilität nach retroviralem Gentransfer.....	115
3.2.2.3	Chromosomaler Verlust in GCV-resistenten Subklonen des Klons I.....	117
3.2.2.4	Vergleich der zytogenetischen Daten mit den Daten des retroviralen Insertionsnachweises.....	117
3.2.2.5	Zytogenetische Charakterisierung der Klone II und III.....	117
3.2.2.6	WCP-FISH zur Bestätigung diskreter chromosomaler Aberrationen.....	118
3.2.3	Chromosomale Instabilität im murinen <i>in vitro</i> -Modell der humanen Ph-ALL.....	118

3.2.3.1	Expression des p185/p190 <i>BCR-ABL</i> -Fusionstranskriptes induziert sekundäre CIN mit Trisomien als klonale Aberration.....	120
3.2.3.1.1	Spektrale Karyotypisierung der Zelllinie BM185wt.....	120
3.2.3.1.2	Spektrale Karyotypisierung der Zelllinie BM185-gfp.....	120
3.2.3.1.3	Spektrale Karyotypisierung der Zelllinie BM185-ova-gfp.....	120
3.2.3.1.4	FISH zur Quantifizierung der Der(12)T(XE?;12D)-positiven Zellen.....	120
3.2.3.1.5	Kein Hinweis auf die Beteiligung der murinen Gene <i>bcr</i> und <i>abl</i> an einem chromosomalen Rearrangement.....	122
3.2.4	Chromosomale Instabilität in einem murinen <i>in vitro</i> -Modell des humanen ALCL.....	123
3.2.4.1	Aneuploidie und Rearrangements des Chromosoms 14 bei Diversität der Translokationspartner.....	123
3.2.4.2	FISH zur Charakterisierung der strukturellen Veränderungen des X-Chromosoms.....	123
3.2.4.3	Intrachromosomales Rearrangement des Chromosoms 15.....	125
3.2.5	Translokationen unter Beteiligung des Chromosoms 15 in <i>N-RAS</i> -transgenen T-Zell-Lymphomen mit <i>Suv39h1</i> - oder <i>p53</i> -Defizienz.....	125
3.2.5.1	Chromosomale Aberrationen in Neoplasien der <i>N-RAS</i> -Kontrollen.....	126
3.2.5.2	<i>N-RAS/Suv39h</i> -null-Mäuse mit ähnlichen chromosomalen Veränderungen zur Kontrollgruppe.....	126
3.2.5.3	<i>N-RAS/p53</i> -null.....	129
3.2.5.4	Chromosomale Aberrationen mit Verdacht auf <i>c-myc</i> -Onkogenaktivierung.....	129
3.2.6	Tetraploidie und strukturelle chromosomale Aberrationen in <i>H-RAS</i> - oder <i>C-MYC</i> -transgenen <i>p18</i> -defizienten MEF.....	130
3.2.6.1	Klonale Aberrationen in <i>H-RAS</i> -transfizierten <i>p18</i> -defizienten MEF.....	130
3.2.6.2	Klonale Aberrationen in <i>C-MYC</i> -transfizierten <i>p18</i> -defizienten MEF....	132
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>135</b>
<b>4.1</b>	<b>Die SKY zur Charakterisierung chromosomaler Instabilitäten und die Limitierung der molekularzytogenetischen Technik.....</b>	<b>136</b>

4.2	Potentielle Onkogene und Tumorsuppressorgene humaner hämatologischer Neoplasien .....	139
4.3	Das Zusammenwirken genetischer und epigenetischer Mutationen.....	141
4.4	Funktionelle Konsequenzen der strukturellen chromosomalen Aberrationen in <i>in vitro</i> -Modellen humaner hämatologischer Neoplasien.....	143
4.5	Forschung an etablierten Zelllinien – eine kritische Betrachtung..	145
4.6	Die Bedeutung chromosomaler Aberrationen in Mausmodellen....	147
4.7	Beurteilung etablierter muriner Modelle hämatologischer Neoplasien aus zytogenetischer Sicht .....	151
4.7.1	Vergleich der chromosomalen Aberrationen der Zelllinie TS1G6 mit dem humanen ALCL .....	151
4.7.2	Vergleich der sekundären CIN des murinen <i>in vitro</i> -Modells BM185wt zur sekundären CIN der humanen Ph-ALL.....	152
4.8	Ausblick.....	155
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	157
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	181
7	ANHANG .....	184
8	CURRICULUM VITAE.....	194
9	PUBLIKATIONEN.....	196
10	DANKSAGUNG.....	200
11	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	201



# **1 Einleitung**

## **1.1 Die Krebsentstehung als multifaktorieller Mehrschrittprozess**

Krebs ist eine Erkrankung der Gene, die durch Veränderung der genetischen Information der Keimzellen oder somatischer Zellen induziert werden kann. Erbliche Krebserkrankungen, wie der erbliche Brust- oder Eierstockkrebs, beruhen auf Keimbahnmutationen. Dem gegenüber stehen nicht-erbliche Erkrankungen mit somatischen Veränderungen. Den erblichen und nichterblichen Erkrankungen sind genetische Defekte gemeinsam, die einzelne Gene betreffen und als Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen einer Base in Erscheinung treten, aber auch größere Gen- oder genomische Bereiche umfassen können. Zudem sind Störungen epigenetischer Modifikationen, wie Defekte des Methylierungsstatus genomischer Sequenzen oder Störungen der Methylierung, Phosphorylierung oder Acetylierung von Histonen als tumorigene Veränderungen bekannt. Genetische Defekte, die auf chromosomaler Ebene detektierbar sind, werden als chromosomale Instabilität (CIN) bezeichnet und zusammen mit der Mikrosatelliteninstabilität (MIN) unter dem Begriff der genomischen Instabilität vereint. Die Charakteristika von Krebszellen sind somit deren genetische und/oder epigenetische Instabilität. Diese Eigenschaften können zu einer forcierten Zellproliferation mit Störung der Zellzykluskontrolle, einer fehlregulierten Apoptose, Störungen der DNA-Reparatursysteme und der Signaltransduktion führen. Häufig tritt ein einzelner genetischer oder epigenetischer Defekt als primäres und initiierendes Ereignis auf, der jedoch für die maligne Zelltransformation und die Tumorprogression sekundäre genetische und/oder epigenetische Veränderungen erfordert. Die Tumorgenese wird somit als ein multifaktorieller Mehrschrittprozess postuliert, in dem synergistische Prozesse das Ziel der ungehinderten und beschleunigten klonalen Zellexpansion verfolgen. Diese Theorie betrifft Keimbahnmutationen und genetische Veränderungen somatischer Zellen gleichermaßen.

### 1.1.1 Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen

Ein Merkmal von Tumorzellen ist die Instabilität ihrer Gene. Diese „Tumorgene“ werden nach dem Zugewinn oder Verlust ihrer Funktion unterschieden und als Onkogene und Tumorsuppressorgene (TSG) bezeichnet. Sowohl Onkogene als auch TSG können positive oder negative Regulatoren zellulärer Prozesse kodieren, die essentielle Faktoren der Zellproliferation, der Apoptose und Gewebedifferenzierung darstellen und Vermittler komplexer intra- und interzellulärer Netzwerke bilden. Somit können auch Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Signalmediatoren und Transkriptionsfaktoren durch „Tumorgene“ kodiert sein.

Die Aktivierung der Onkogene kann durch qualitative (strukturelle) oder durch quantitative Veränderungen erfolgen. Als qualitative Veränderung sind z.B. Punktmutationen der Gene der *RAS*-Familie (*K-RAS*, *H-RAS* und *N-RAS*) bekannt, die sowohl in soliden Tumoren aber auch in hämatologischen Neoplasien auftreten können. So können *K-RAS*-Mutationen bei 75-100% der Patienten mit Pankreaskarzinom (Mu et al., 2004) und *H-RAS*- oder *N-RAS*-Mutation bei 30-40% der Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) nachgewiesen werden (Beaupre & Kurzrock, 1999; Reuter et al., 2000). Strukturelle Defekte werden auch als Genrekombination im Rahmen chromosomaler Translokationen beobachtet. Ein klassisches Beispiel ist die *BCR-ABL*-Rekombination, die, unter Bildung des bekannten Philadelphia-Chromosoms, aus der Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$  resultiert. Die Bildung dieses Fusionsgens ist die charakteristische chromosomale Veränderung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) (Rowley, 1973; Ren, 2005), kann aber auch in 15-30% der Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) im Erwachsenenalter und in 5% der kindlichen ALL beobachtet werden (Clark et al., 1989; Lestingi & Hooberman, 1993). Die Expression des Fusionsgens induziert Störungen der zellulären Signaltransduktion.

Als quantitative Onkogen-aktivierende Veränderungen sind Genamplifikationen von funktioneller Bedeutung. Das *BCL2*-Gen ist auf dem Chromosom 18q21 lokalisiert und kodiert ein anti-apoptotisches Protein. Eine Amplifikation mit Überexpression des Gens führt zur Apoptoseinhibierung, einem wichtigen Pathomechanismus in Tumorzellen. Veränderungen des Gens können in hämatologischen Neoplasien, z.B. in Mantelzell-Lymphomen (MCL) beobachtet werden (De Leeuw et al., 2004). Die Aktivierung des

*BCL2* kann alternativ auch über Translokationsereignisse erfolgen. Beispielsweise wird bei einer Translokation t(14;18)(q32;q21) das *BCL2*-Gen durch den *IgH*-Enhancer dysreguliert. Dieser Austausch von regulatorischen Sequenzen wird bei 80-90% der Patienten mit follikulärem Lymphom und bei etwa 20% der Patienten mit diffusem B-Zell-Lymphom (*diffuse large B-cell lymphoma*, DLCL) beobachtet (Iqbal et al., 2004; Jacobson et al., 1993). Das Ergebnis ist auch hier die Verzögerung der Apoptose der malignen Lymphozyten.

TSG sind rezessive Tumorgene, bei denen sich erst Defekte beider Allele phänotypisch manifestieren. Dieser Funktionsverlust kann auf der Deletion einer chromosomalen Region oder des gesamten Chromosoms beruhen (*loss of heterozygosity*, LOH), auf Mutationen des Gens oder vorgeschalteter Regulatorsequenzen oder auch durch epigenetische Modifikationen (z.B. Histon-Deacetylierung oder Methylierung von Promotorsequenzen) bedingt sein. Ähnlich wie Onkogene sind TSG in komplexe Signalkaskaden involviert. Das bekannteste TSG *P53* ist in der chromosomalen Region 17p13 lokalisiert und kodiert einen Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselfunktion im G1/S Kontrollpunkt des Zellzyklus ausübt. Darüber hinaus ist *P53* an der Regulation der Apoptose nach DNA-Schäden beteiligt (Bode & Dong, 2004). Die größte onkologische Bedeutung besitzen Punktmutationen in der DNA-Bindungsdomäne des Gens, die, meist als *missense*-Mutation, in etwa 50% aller Tumoren zu finden sind (Nigro et al., 1989; Hollstein et al., 1996). Das zweite Allel wird häufig durch eine Deletion inaktiviert und führt letztlich zum Funktionsverlust. Die Zellzyklusinhibitor *P16* und das Retinoblastomgen *RB* sind weitere Beispiele für TSG, auf ihre Funktion wird in Pkt. 1.2.1.2.1 näher eingegangen.

Epigenetische Modifikationen zeigen, dass die Transkriptionsaktivität eines Gens nicht nur durch die primäre DNA-Sequenz bestimmt ist. Methylierte „CpG-Inseln“ in den Promotorregionen vieler Gene unterbinden die Interaktion von Transkriptionsfaktoren und damit die Genexpression. Die Inaktivierung durch DNA-(Hyper)Methylierung ist in verschiedenen Tumorentitäten z.B für die TSG *P16*, *RB* und *MLH1* nachgewiesen (Feinberg & Tycko, 2004). Liegt für das zweite Allel bereits ein genetischer Defekt vor, kann dies zur malignen Zelltransformation führen. Epigenetische Modifikationen können aber auch über Proteine erfolgen. Die Deacetylierung von Histonen führt reversibel zur Kondensation des Chromatins. Auf diese Weise wird Transkriptionsfaktoren der DNA-Zugang und damit die Transkription von Genen unterbunden.

## 1.1.2 Mikrosatelliteninstabilität und chromosomale Instabilität

Mikrosatelliten sind phylogenetisch konservierte, repetitive DNA-Sequenzen, die über das gesamte humane Genom verteilt vorliegen. Die Längen der Mikrosatelliten-DNA-Wiederholungen sind individuell und in den unterschiedlichen Geweben eines Individuums fixiert. Schätzungsweise liegen 50.000-100.000 Mikrosatelliten im humanen Genom vor. Die Wiederholung  $(CA)_n$  ist die am häufigsten vorkommende Sequenz (Hussein & Wood, 2002). Die Variation des Mikrosatelliten-Längenmusters zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe wird als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet. Die bei der Replikation der Mikrosatelliten-DNA auftretenden Fehler, wie fehlgepaarte Nukleotide, kleine Deletionen oder Insertionen, werden normalerweise durch das *mismatch*-Reparatursystem erkannt und korrigiert. MIN ist ein Indiz für defekte DNA-Reparaturmechanismen. Beispielsweise zeigen Patienten mit hereditärem nichtpolypösem kolorektalem Karzinom (HNPCC) eine erhöhte Instabilität der *mismatch*-Reparaturgene *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* und *hMSH6*. Tumorzellen mit einem MIN-Phänotyp zeigen gewöhnlich keine chromosomale Instabilität (Lengauer et al., 1998).

Chromosomale Instabilität ist durch strukturelle und/oder numerische Abweichungen vom regulär diploiden ( $2n$ ) Chromosomensatz charakterisiert. Aneuploidien sind numerische Abweichungen und bedeuten Zugewinne und Verluste ganzer Chromosomen oder chromosomaler Segmente. Als chromosomale Strukturveränderungen werden häufig reziproke (balancierte) und nicht-reziproke (unbalancierte) Translokationen, Deletionen, Insertionen, Inversionen und Amplifikationen beobachtet. Durch CIN kann eine Zelle tumorigene Eigenschaften erhalten.

### 1.1.2.1. Ursachen chromosomaler Instabilität

#### 1.1.2.1.1 Defekte der Chromosomensegregation

Ein fundamentaler Prozess zur Erhaltung der genomischen Stabilität ist die korrekte Segregation der Chromosomen sowohl in der Meiose als auch in der Mitose. Segregationsdefekte können durch abnorme Interaktionen zwischen Spindelapparat und Kinetochor, durch vorzeitige Chromatid-Segregation, multipolare Spindeln oder abnorme

Zytokinese auftreten (Gollin, 2004). Musio et al. (2004) zeigten in einem etablierten *knock-out* Modell, dass die spezifische Inhibierung funktioneller Gene der Chromosomensegregation, wie z.B. *INCENP*, *ZWINT-1* und *ZW10*, zur Zentromer-separation, Aneuploidie und zur Mikronukleiformation führt, die Ausdruck chromosomaler Instabilität sind.

### 1.1.2.1.2 Telomerdysfunktionen

Telomeren sind die physiologischen Chromosomenenden, die die DNA vor Degradierung schützen und chromosomale Fusionen sowie Rekombinationen verhindern. Die Telomeren sind hoch konserviert und zeigen Wiederholungen des Sequenzmotivs  $(T_2AG_3)_n$  (Moyzis et al., 1988). In humanen Chromosomen umfassen die Telomeren ca. 5-15kb (Artandi, 2002; Harley et al., 1990). Die *de novo* Synthese der Telomeren erfolgt enzymatisch durch die Telomerase, einem Ribonukleoprotein mit DNA-Polymeraseaktivität. Nach erfolgter DNA-Replikation können die DNA-Enden nie vollständig synthetisiert werden, so dass jeder Zellteilungsprozess mit einer Telomerverkürzung einhergeht. Nach einer definierten Zahl von Zellteilungen wird mit der Telomerdysfunktion ein finales Stadium erreicht. In den meisten somatischen Zellen ist keine Telomeraseaktivität nachweisbar, wodurch sich die Telomeren kontinuierlich bis zum sog. Hayflick-Limit verkürzen, was die Seneszenz proliferierender Zellen induziert (Chiu & Harley, 1997; Campisi, 1997).

Barbara McClintock beschrieb bereits vor mehr als 60 Jahren (McClintock, 1941), dass Chromosomen mit fehlenden Telomeren eine Fusionstendenz zeigen. Die Telomerase ist in ca. 90% aller Tumoren aktiv und trägt damit zum immortalisierten Wachstum der Zellen bei (Kim et al., 1994; Shay & Bacchetti, 1997). Artandi et al. (2000) zeigten, dass murine *in vivo*-Modelle mit Telomerasedysfunktion epitheliale Tumoren entwickeln, wohingegen Telomerase-Defizienz in Kombination mit Mutationen des TSG *P53* die Entwicklung von Sarkomen und Lymphomen fördert.

Während die genomische Instabilität mit der Entwicklung chromosomal aberranter Klone, z.B. aufgrund verkürzter Telomeren, ein initiierendes Ereignis in der Tumorgenese darstellt, wird die Telomeraseaktivierung als spätes Ereignis diskutiert.

### 1.1.2.1.3 Defekte in der Antwort auf DNA-Reparaturschäden – Zellzyklus-Dysregulation

Während der DNA-Replikation sind Fehler unvermeidlich, weshalb dieser Prozess einer permanenten und intensiven Kontrolle unterliegt. Insgesamt sechs DNA-Reparatursysteme sind in Säugerzellen bekannt. In Abhängigkeit von der DNA-Schädigung werden die Mechanismen *nucleotide-excision repair* (NER), *base-excision repair* (BER), *double-strand-break repair* (*homologous recombination repair* und *non-homologous end joining*), *mismatch-repair* (MMR) und *single-strand-annealing* (SSA) aktiviert (Skorski, 2002).

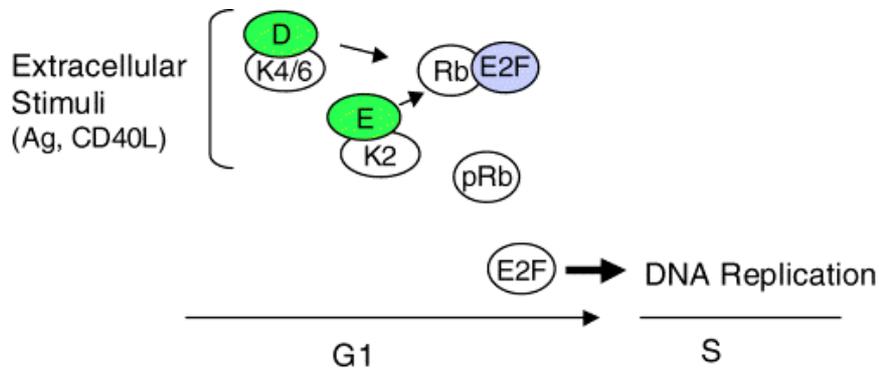
Die DNA-Reparatur wird durch Regulatoren kontrolliert, die die Zellzyklusphasen G1, S und G2 überwachen, DNA-Schäden erkennen und den Zellzyklus transient arretieren, bis der Defekt durch die DNA-Reparatursysteme repariert ist. Die Zellzyklusprogression und damit die Kontrolle der DNA-Reparatursysteme erfolgt über die Aktivierung von Proteinkinase-Komplexen, die sich aus einem spezifischen Cyclin und einer Cyclin-abhängigen Kinase (*cyclin-dependent kinase*, CDK) zusammensetzen (**Abb.1**). CDKs werden innerhalb des Zellzyklus konstitutiv exprimiert, wohingegen die Expression der Cyclin-kodierenden Gene Zellzyklus-abhängig transkriptional kontrolliert wird. CDKs werden nur durch die Bindung an das Cyclin aktiviert und durch CDK-Inhibitoren (CKI) negativ reguliert. Eine gestörte Zellzykluskontrolle kann zur ungehinderten Replikation genetischer Defekte führen.

## 1.2 Hämatologische Neoplasien als Folge genetischer Instabilität

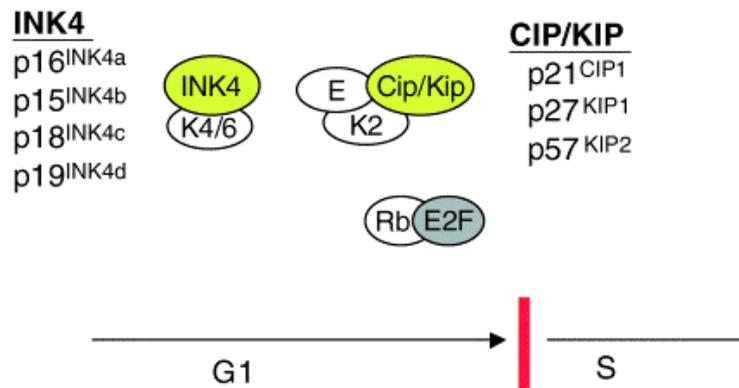
### 1.2.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sind maligne Neoplasien, die sich klonal aus B- oder T-Lymphozyten des lymphatischen Systems entwickeln. Etwa 95% aller Lymphome zeigen einen B-Zell-Ursprung (B-NHL), die verbleibenden 5% sind T-Zell-Neoplasien (T-NHL) (Kuppers, 2005). Circa 30% der NHL zeigen eine leukämische Manifestation. Eine Ausnahme bildet das Multiple Myelom (MM, Synonyme: Plasmozytom, Morbus Kahler) mit primärer Manifestation im Knochenmark (Herold, 1999).

**A**



**B**



**Abb.1 Darstellung der aktivierenden und inhibierenden Faktoren des Zellzyklus während der Transition von der G1- in die S-Phase (aus Chen-Kiang, Immunol Rev. 2003)**

Die Komplexe Cyclin D/CDK4 (D und K4/6) sowie Cyclin E/CDK2 (E und K2) sind während der Progression der G1-Phase aktiv. Die Cyclin-abhängige Kinase (*cyclin-dependent kinase*, CDK)-Untereinheit der Komplexe phosphoryliert sequentiell das Retinoblastom-Protein (RB), das hyperphosphoryliert den Transkriptionsfaktor E2F freisetzt und zur Transkription von Genen führt, in der S-Phase aktiv sind (A). Die Inhibition der Cyclin/CDK-Komplexe erfolgt durch Mitglieder der INK4-Familie und CIP/KIP Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (*cyclin-dependent kinase inhibitor*, CDKI) (B). Diese arretieren nach DNA-Schäden den Zellzyklus transient und ermöglichen die DNA-Reparatur.

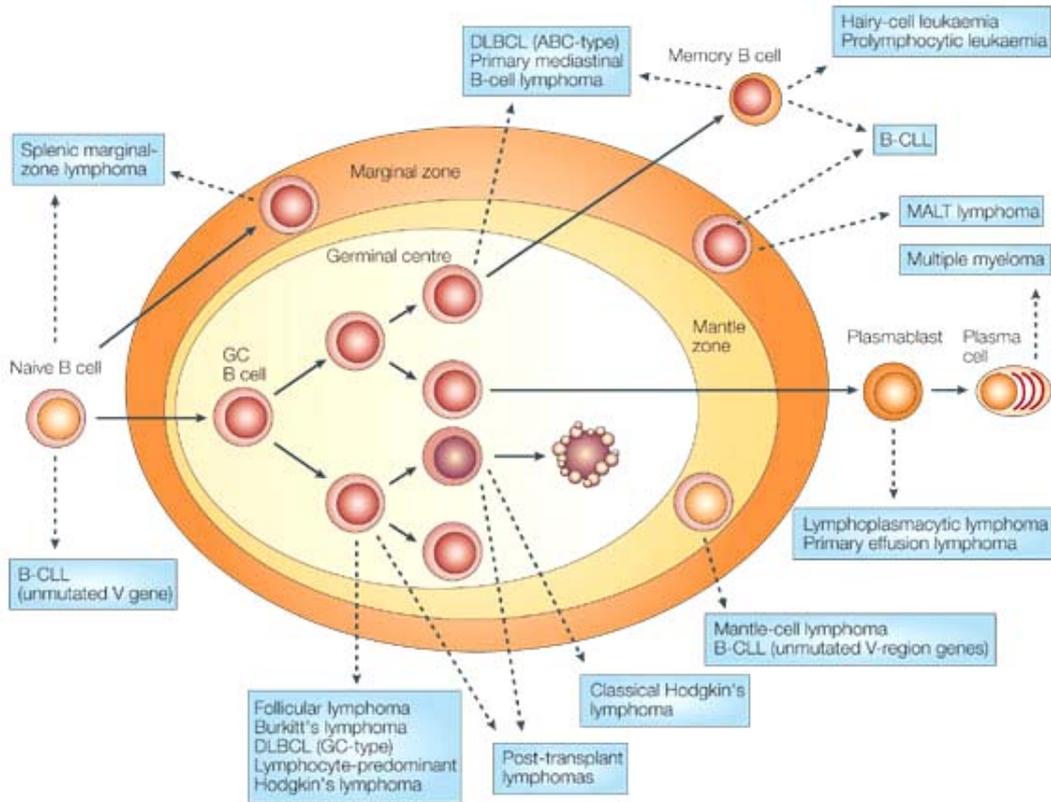
NHL treten mit einer jährlichen Inzidenz von 3-5/100.000 Einwohner auf, wobei das männliche Geschlecht bei einer Verteilung von 1,5:1 häufiger als das weibliche Geschlecht betroffen ist (Herold, 1999). Ein vermehrtes Auftreten wird bei AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*)-Patienten beobachtet (Carli et al., 1994).

Nach morphologischen und immunhistochemischen Charakteristika werden die NHL sowohl der B- als auch der T-Zellreihe klinisch in unterschiedliche Stadien der Aggressivität gruppiert. Weitere Klassifikationen sind die Kiel-Klassifikation, bei der, abhängig vom Entwicklungsstadium der Lymphozyten, zwischen „zytischen“ (niedrig-malignen) und „blastischen“ (hoch-malignen) NHL unterschieden wird und die R.E.A.L. (*Revised European American Lymphoma*)-Klassifikation der ILSG (*International Lymphoma Study Group*), die zwischen Vorläufer- oder peripheren B- oder T-Zell-Neoplasien unterscheidet.

#### 1.2.1.1 Mantelzell-Lymphome

Etwa 6% aller B-NHL werden als Mantelzell-Lymphome (MCL) diagnostiziert (*A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma*, 1997; Anderson et al., 1998). MCL sind aggressive lymphoproliferative Erkrankungen der Zellen der Mantelzone (**Abb.2**) und gehen mit einer sehr schlechten Prognose für den Patienten einher. Die mediane Überlebenszeit beträgt 3 Jahre, Langzeitüberlebende werden kaum beobachtet (Lenz et al., 2004). Die Erkrankung tritt vorrangig in der 6.-7. Lebensdekade mit einer Geschlechterverteilung männlich:weiblich von 3:1 auf (Herold, 1999).

Nach der WHO (*World Health Organization*)-Klassifikation (Swerdlow et al., 2001) werden beim MCL morphologisch zwei Varianten unterschieden, die klassische und die blastoide, wobei die blastoide Variante mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von <2 Jahren die aggressivere Form darstellt. Die blastoide Variante wird auch als transformierte klassische Form betrachtet. Für die Diagnosestellung sind die immunhistochemischen und histopathologischen Untersuchungen sowie der Nachweis der typischen Translokation t(11;14)(q13;q32) mittels Chromosomenanalyse oder FISH entscheidend. Die zytogenetische Diagnostik wird jedoch durch den niedrigen Proliferationsindex der malignen Zellen und der oft unzureichenden Morphologie der Chromosomen erschwert.



**Abb.2 Zellulärer Ursprung des B-Zell-Lymphoms (aus Kuppers, *Nat Rev Cancer* 2005)**

Die Mehrzahl der B-Zell-Lymphome entsteht innerhalb des Keimzentrums (*germinal centre, GC*), was die Bedeutung dieser Region in der Lymphompathogenese verdeutlicht. Das GC ist von einer Mantelzone umgeben, deren naive B-Zellen durch die Expression des Oberflächenmarkers CD5 charakterisiert sind. Veränderungen dieser Zellen können zur Entstehung eines Mantelzell-Lymphomes führen.

( —> B-Zell-Differenzierungsschritte; ----> die aus den Zellen entwickelten Lymphome).

Klassische MCL-Zellen sind klein bis mittelgroß mit irregulären Nuklei, kondensiertem Chromatin, unauffälligen Nukleoli, geringem und hellem Zytoplasma (Harris et al., 1994; Campo et al., 1999; Lai & Medeiros, 2000). Die blastoide Variante ist durch mittelgroße Lymphozyten gekennzeichnet, den Lymphoblasten ähnlich mit geringem Zytoplasma, rundem Zellkern mit fein verteiltem Chromatin und unauffälligen Nukleoli. Der Proliferationsindex der klassischen Form ist im Vergleich zur blastoiden Variante niedrig. Die Lymphomzellen des MCL zeigen immunphänotypisch die Charakteristika einer reifen B-Zelle. Sie exprimieren CD5, CD19, CD20, CD22 und CD79A und die Oberflächen-Immunglobuline IgM und/oder IgD (Campo et al., 1999; Lai & Medeiros, 2000; Pileri et al., 2000; Swerdlow et al., 2001).

#### 1.2.1.1.1 Genetische Marker des MCL

Das zytogenetische Charakteristikum des MCL ist die balancierte Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$ , die fast immer nachweisbar ist (Katz et al., 2000; Welzel et al., 2001; Belaud-Rotureau et al., 2002). Hierdurch wird das auf dem Chromosom 11q13 kartierte Onkogen *CCND1/PRAD1/BCL1*, das das Cyclin D1 kodiert, in die Region 14q32 transloziert und steht hier unter transkriptionaler Kontrolle des *IgH*-Enhancers (**Abb.3**). Die molekularbiologische Konsequenz dieses Rearrangements ist die Überexpression des Zellzyklusregulators Cyclin D1. Die Progression der Zellzyklusphase G1 wird durch die aktivierten Komplexe Cyclin D/CDK4 und Cyclin E/CDK2 vermittelt, die sequentiell das als Tumorsuppressor fungierende Retinoblastom (RB)-Protein phosphorylieren (Sherr, 2000; Blagosklonny & Pardee, 2002). Die Mehrfachphosphorylierung setzt den Transkriptionsfaktor E2F frei und führt zur Expression von Genen, die in der S-Phase aktiv sind (**Abb.1**). Die Passage der Zelle aus der G1 in die S-Phase ist irreversibel und treibt die Zelle bis zur Vollendung des Zellzyklus. Das Ergebnis ist eine unkontrollierte klonale Zellexpansion.

In normalen B-Zellen wird *CCND1/PRAD1/BCL1* nicht exprimiert. Die Dysregulation der Transition von der G1- in die S-Phase spielt in der Tumorgenese des MCL eine bedeutende Rolle und wird als frühes Ereignis angesehen.

Mausmodelle zeigten, dass die Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  allein nicht für eine maligne Zelltransformation ausreichend ist (Bodrug et al., 1994; Lovec et al., 1994). In

transgenen Tieren, die *CCND1/PRAD1/BCL1* unter Kontrolle des *IgH*-(E $\mu$ )-Enhancers exprimieren, entwickeln sich benigne Lymphoproliferationen, die erst nach langer Zeit, z.B durch die gleichzeitige Überexpression von *C-MYC*, in maligne Lymphome übergehen. Damit entspricht die Entwicklung eines MCL dem postulierten Mehrschrittprozess.

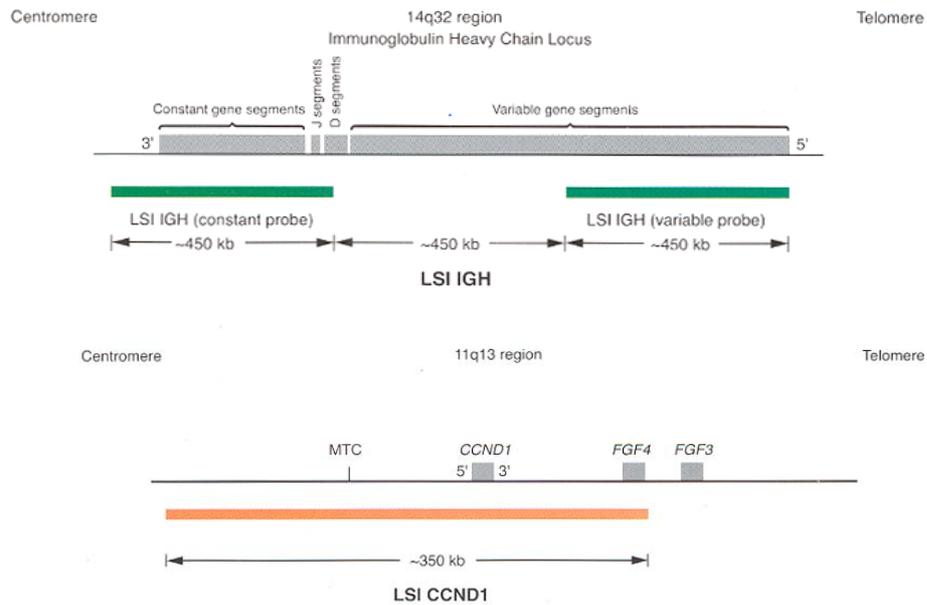
Als sekundäre genetische Veränderungen werden in 20-60% der MCL Punktmutationen und/oder Deletionen in 11q beobachtet, die das Gen *ATM* (Ataxia telangiectasia) involvieren (Stilgenbauer et al., 1999; Schaffner et al., 2000). Desweiteren können Veränderungen in 13q14 (*RB*), Verluste in 9p21 (*P16*), 17p13 (*P53*) und 1p22, sowie Zugewinne in 3q26-29 (*BCL6*), 8q24 (*C-MYC*), 12q13 (*CDK4/MDM2*), und 18q21 (*BCL2*) beobachtet werden. Eine Übersicht über diese Veränderungen mit den entsprechenden Referenzen ist in **Tab.1** gezeigt.

Array/Matrix-CGH (*comparative genomic hybridization*)-Daten von Schraders et al. (2005) zeigten zudem Zugewinne in 4p12-13 (57%), 3q26, 11p12-q11 (29%), 12q21.3 (93%), sowie Deletionen in 10q26.13-26.2 (36%), 13q34 (75%), 20p12.1-12-3 (43%) und 22q12.3 (62%). Die involvierten Gene sind weitestgehend unbekannt und die Pathomechanismen nicht verstanden. Deletionen in 1p22 treten in 40% der MCL vom blastoiden Typ auf (Bea et al., 1999) und lassen ein TSG in dieser Region vermuten.

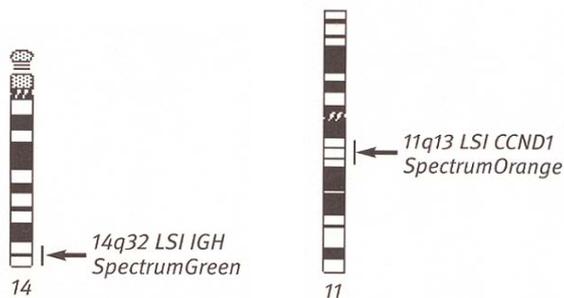
Obwohl MCL im Vergleich zur chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) komplexere chromosomale Aberrationen zeigen, können doch Ähnlichkeiten beobachtet werden. So geht die CLL häufig mit Deletionen in 11q (20-30%) und 13q (>50%) einher (Bentz et al., 2000).

Eine prognostische Relevanz konnte für Veränderungen des TSG *P53* gezeigt werden. Inaktivierende Mutationen des Gens sind mit der aggressiven Variante und einer schlechten Prognose assoziiert (Greiner et al., 1996; Hernandez et al., 1996; Louie et al., 1995). Auch Deletionen in *P16* sind mit der aggressiven Variante assoziiert und damit prognostisch bedeutend (Pinyol et al., 1997). Zudem gehen komplexe Karyotypen oder Tetraploidie mit der blastoiden MCL-Form einher (Ott et al., 1997; Daniel et al., 1995).

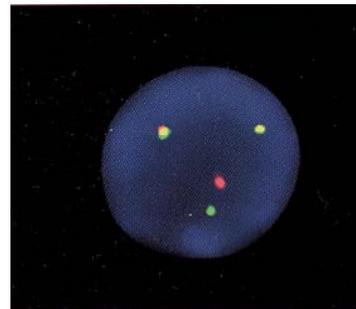
**A**



**B**



**C**



**Abb.3** Markierungsschema der Gene *CCND1/PRAD1/BCL1* (11q13) und *IgH* (14q32), Ideogramme der Chromosomen 11 und 14 und Signalkonstellation in einem *t(11;14)(q13;q32)*-positiven Interphasekern nach Fluoreszenz- *in situ*-Hybridisierung (Vysis Product Catalog 2002-2003, Vysis, Downers Grove, Illinois, USA)

**A** zeigt die Fluoreszenzmarkierung der Gene *IgH* (grün) und *CCND1* (rot) und **B** die Lokalisation der Gene auf den Chromosomen 11 und 14, entsprechend der von der Firma Vysis kommerziell erhältlichen DNA-Sondenkombination. Eine *t(11;14)(q13;q32)*-negative Zelle zeigt zwei rote und zwei grüne Einzelsignale. Bei einer balancierten Translokation führt der chromosomale Austausch zur Verlagerung des Gens *CCND1/PRAD1/BCL1* auf 11q13 in die chromosomale Region des Gens *IgH* auf 14q32. Fluoreszenzmikroskopisch resultiert aus dieser Veränderung die Überlagerung der Rot- und Grünfluoreszenz zum Gelbsignal (**C**).

**Tab.1 Genetische Veränderungen in MCL und MM**

**Mantelzell-Lymphom**

	Lokus	Kandidaten-Gen	(putative) Funktion/ Bedeutung	Veränderung (prozentualer Anteil)	Referenz	Detektionsmethode
primär	11q13	<i>CCND1/BCL1/ PRAD1</i>	Zellzyklusregulator	t(11;14)(q13;q32) (nahezu alle)	Belaud-Rotureau et al., 2002 Welzel et al., 2001 Katz et al., 2000	FISH PCR FISH
sekundär	1p22	—	—	Deletion (24%)	Bea et al., 1999 Jarosova et al., 2004	CGH CGH
	3q26-29	<i>BCL6</i>	Transkriptionsrepressor	variable Rearrangements (5%)	Camacho et al., 2004 Ohshima et al., 1997	Chr.analyse Chr.analyse
	8q22-24	<i>C-MYC</i>	Signaltransduktor	Zugewinn (22%) Amplifikation (15-40%)	Bea et al., 1999 Bentz et al., 2000	CGH CGH/FISH
	9p21	<i>P16</i>	CDKI	Deletion (15-30%)	De Leeuw et al., 2004 Bentz et al., 2000	Array/Matrix-CGH CGH/FISH
	11q22-23	<i>ATM</i>	Apoptosesignalprotein	Deletion (20-60%) Punktmutation	Bentz et al., 2000 Schaffner et al., 2000	CGH/FISH Sequenzierung
	12q13	<i>CDK4/MDM2</i>	Zellzyklusregulator	Amplifikation (5-60%)	Bea et al., 1999	CGH
	13q14	<i>RB</i>	Zellzyklusregulator	Deletion (40-60%)	Kohlhammer et al., 2004 Bentz et al., 2000	Array/Matrix-CGH CGH/FISH
	17p13	<i>P53</i>	Apoptoseregulator	Deletion (15-55%)	Bea et al., 1999 Hernandez et al., 1996	CGH Sequenzierung
	18q21	<i>BCL2</i>	anti-apoptotisches Protein	Amplifikation	De Leeuw et al., 2004 Rudolph et al., 2004 Bentz et al., 2000	Array/Matrix-CGH FISH CGH/FISH

## Multiples Myelom

	Lokus	Kandidaten-Gen	(putative) Funktion/ Bedeutung	Veränderung (prozentualer Anteil)	Referenz	Detektionsmethode
primär/sekundär	1q12-q22	<i>IRTA1/IRTA2</i>	<i>immunoglobulin superfamily receptors</i>	variable Rearrangements	Hatzivassiliou et al., 2001	Bruchpunktklonierung
	4p16	<i>FGFR3/MMSET</i>	Fibroblastenwachstumsfaktor/Transkriptionsregulator	t(4;14)(p16;q32) (15-20%)	Malgeri et al., 2000 Avet-Loiseau et al., 1998	FISH FISH
	6p21	<i>Cyclin D3</i>	Zellzyklusregulator	t(6;14)(p21;q32) (4%)	Shaughnessy et al., 2001	Chr.analyse/FISH
	6p25	<i>MUM1/IRF4</i>	<i>multiple myeloma oncogene 1/ member of the interferon regulatory factor family</i>	t(6;14)(p25;q32)	lida et al., 1997 Yoshida et al., 1999	Bruchpunktklonierung FISH
	8q24	<i>C-MYC</i>	Signaltransduktor	Rearrangement (15%)	Avet-Loiseau et al., 2001 Shou et al., 2000	FISH FISH
	11q13	<i>CCND1/BCL1/PRAD1/MYEOV</i>	Zellzyklusregulator	t(11;14)(q13;q32) (15-20%)	Avet-Loiseau et al., 1998 Fonseca et al., 1998 Janssen et al., 2000	FISH Chr.analyse FISH
	13q14	<i>RB</i>	Zellzyklusregulator	Deletion (50%) Monosomie/Deletion	Dao et al., 1994 Avet-Loiseau et al., 1999	FISH FISH
	16q23	<i>C-MAF</i>	Transkriptionsfaktor	t(14;16)(q32;q23) (5-12%)	Sawyer et al., 1998 Avet-Loiseau et al., 1998	Chr.analyse FISH
	17p13	<i>P53</i>	Apoptoseregulator	Deletion (33-55%)	Drach et al., 1998	Chr.analyse/FISH
	20q12	<i>MAFB</i>	Transkriptionsfaktor	t(14;20)(q32;q12) (2%)	Hanamura et al., 2001	FISH

### 1.2.1.1.2 Therapeutische Optionen und Prognose

Das MCL ist aufgrund der Aggressivität der Erkrankung und den unzureichenden therapeutischen Möglichkeiten nur selten heilbar.

Im frühen Stadium des MCL kann eine sequentielle Radiochemotherapie durchgeführt werden (Leitch et al., 2003). Verschiedene konventionelle chemotherapeutische Regime erreichen ein 70%iges Ansprechen mit totalen Remissionsraten von 20-40% (Meusers et al., 1997; Vandenberghe et al., 1997; Zucca et al., 1995). Darunter stellt die CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) und CHOP-ähnliche Therapie mit einer Gesamtansprechrates von 84-89% die derzeitige Standardtherapie dar. Andere chemotherapeutische Regime wie Gemcitabine, Dexamethason und/oder Cisplatin, Fludarabin und Cytarabin erreichen zwar Ansprechraten bis 88%, die Ansprechzeit ist jedoch kurz (Morschhauser et al., 2002; Seymour et al., 2002).

Ein verlängertes progressionsfreies Intervall wurde in verschiedenen Studien nach Therapie mit Interferon- $\alpha$  beschrieben (Hiddemann et al., 1998; Teodorovic et al., 1995). Eine weitere Möglichkeit stellt die Monotherapie mit monoklonalen Antikörpern dar. Die Behandlung mit dem anti-CD20 Antikörper Rituximab zeigte moderate Aktivitäten mit Responsraten von 20-40% (Foran et al., 2000; Ghielmini et al., 2000; Tobinai, 2003). Im Unterschied dazu erreicht eine kombinierte Immuntherapie mit Rituximab und CHOP ein bemerkenswert hohes Gesamtansprechen (96%) und ein komplettes Ansprechen von 48% (Howard et al., 2002). Inwieweit durch diese Therapie ein Langzeitüberleben erreicht werden kann, bleibt abzuwarten.

Eine autologe Stammzelltransplantation nach myeloablativer Therapie beeinflusst signifikant das progressionsfreie Intervall. Die einzige kurative Therapie des MCL stellt die allogene Stammzelltransplantation dar, die mit einem Gesamtüberleben und rezidivfreien Intervall von 55% für 3 Jahre einhergeht.

Eine der neueren therapeutischen Optionen stellt die Behandlung mit Flavopiridol, einem spezifischen Inhibitor des CDK4/Cyclin D1-Komplexes, dar. Jedoch konnten Kouroukis et al. (2003) keine signifikante Effizienz dieser Therapie erkennen. Dagegen zeigt sich der Einsatz des Proteasominhibitors Bortezomib vielversprechend und kam bereits in Zelllinien und Mausmodellen erfolgreich zum Einsatz (Pham et al., 2003).

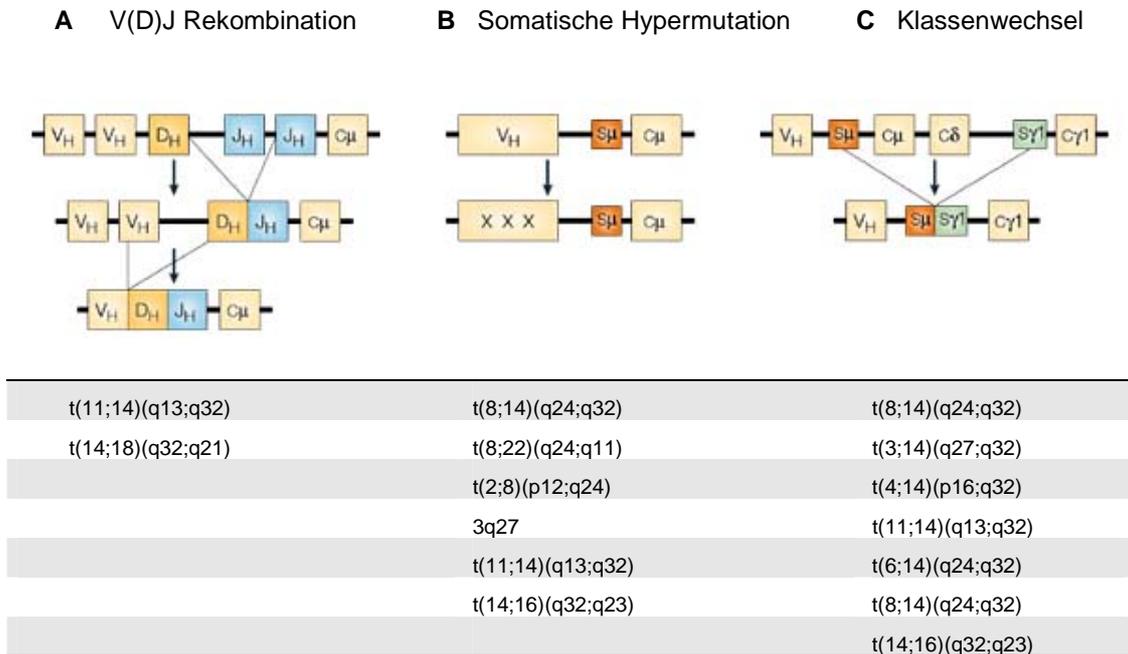
### 1.2.1.2 Multiple Myelome

Das Multiple Myelom (MM, Synonyme: Morbus Kahler, Plasmozytom) ist eine Entität der B-NHL, die durch eine klonale Expansion terminal differenzierter B-Lymphozyten (Plasmazellen) charakterisiert ist. Die jährliche Inzidenz liegt bei 3-5/100.000 Einwohner mit einem medianen Erkrankungsalter von 60-70 Jahren und einem Geschlechterverhältnis Männer:Frauen von 3:2. Die Ätiologie ist unbekannt, genetische Faktoren und ionisierende Strahlen werden diskutiert. Das MM ist der häufigste Knochen- und Knochenmark-Tumor. Eine vom MM abzugrenzende Erkrankung ist die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), die mit einer Knochenmark-Infiltration >10% einhergeht, keine Osteolysen zeigt und klinisch asymptomatisch verläuft (Herold, 1999; Berger et al., 2002).

Die Reifung der B-Zell-Vorläufer in reife Plasmazellen beinhaltet ein Immunglobulin (Ig)-Rearrangement (Kuppers, 2005). Die malignen Zellen bilden Immunglobuline eines einzigen Idiotyps und können entsprechend in IgG-Plasmozytom (54%), IgA-Plasmozytom (25%), IgD-Plasmozytom (1%) oder Leichtketten ( $\kappa$  oder  $\lambda$ )-Plasmozytom (Bence-Jones Typ) (20%) unterschieden werden (Herold, 1999).

#### 1.2.1.2.1 Genetische Marker des MM

Multiple Myelome zeigen, im Unterschied zu den MCL, eine Variabilität bezüglich der zytogenetischen Ereignisse. Die Dysregulation eines von insgesamt 6 bekannten Onkogenen, die durch Translokation unter dem Einfluß des *IgH*-Enhancers (14q32) stehen oder seltener durch *IgL $\kappa$*  (2p11) oder *IgL $\lambda$*  (22q11) kontrolliert werden, gelten als frühe Veränderungen in der Entstehung eines MM. Diese Translokationen können durch drei B-Zell-spezifische DNA-Modifikationen vermittelt werden: die V(D)J Rekombination, die während der frühen B-Zell-Entwicklung auftritt, die *IgH switch* Rekombination (Klassenwechsel) oder die somatische Hypermutation (**Abb.4**). Beim Plasmozytom wird vermutet, dass die für die MCL charakteristische chromosomale Region 11q13 nur in ca. 15-20% der MM den Translokationspartner darstellt (Avet-Loiseau et al., 1998; Fonseca et al., 1998). Erste Studien ließen vermuten, dass diese Translokation mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Tricot et al., 1995; Fonseca et al., 1998). Dies konnte jedoch in nachfolgenden Untersuchungen nicht bestätigt werden (Avet-Loiseau et al., 1998).



**Abb.4 Molekulare Prozesse des Immunglobulin-Gen (Ig)-Rearrangements (modifiziert aus Kuppers, *Nat Rev Cancer* 2005) und daraus resultierende chromosomale Veränderungen, die zur Entwicklung hämatologischer Neoplasien führen können**

Immunglobuline (Ig) werden von B-Zellen exprimiert und bestehen aus einer variablen (V) Region, die mit dem Antigen interagiert und einer konstanten Region (C), die die Effektorfunktionen vermittelt. Ein funktionelles Ig erfordert ein DNA-Rearrangement der schweren (H) und der leichten (L) Kette der variablen Region. Hierbei werden in einem ersten Schritt **(A)** die Gensegmente  $V_H$ ,  $D_H$  und  $J_H$  rekombiniert (V(D)J Rekombination) und kodieren die variable Region des IgH. Die V-Region der  $\kappa$ - und  $\lambda$ -L-Kette werden jeweils von zwei Segmenten kodiert ( $V_L$ - und  $J_L$ -Gene, nicht gezeigt). In B-Zell-Vorstufen kommt es zum  $D_H$ - $J_H$  Rearrangement der H-Ketten, gefolgt von einem  $V_H$ - $D_H$ - $J_H$ -Rearrangement, das zur Expression des B-Zell-Rezeptors führt. Die etwa 50 verschiedenen  $V_H$ - Gensegmente, 27  $D_H$ -Segmente und 6  $J_H$ -Segmente erlauben die Zusammenstellung eines vielfältigen Repertoires an  $V_H$ -Rearrangements. **(B)** Der Vorgang der somatischen Hypermutation ist aktiviert, wenn B-Zellen das Keimzentrum erreichen. Dies kann zu Punktmutationen, Deletionen oder Duplikationen in der rearrangierten V-Region der Ig Gene (bezeichnet mit x- $\mu$ ) führen. **(C)** Klassenwechsel resultiert aus der Replatzierung des C-Region H-Kettengens mit dem eines anderen Igs. Die C-Region des IgM ( $C_\mu$ ) und des IgD ( $C_\delta$ ) werden durch Rekombination der *switch* Region  $S_\mu$  und  $S_{\gamma 1}$  zugunsten der C-Region des IgG ( $C_{\gamma 1}$ ) verändert.

Weitere Onkogene, die als Translokationspartner bekannt sind, sind das auf 6p21 kartierte *Cyclin D3*, der auf 4p16 lokalisierte Rezeptor des Fibroblasten-Wachstumsfaktors (*FGFR3*) oder *MMSET*, *C-MAF* auf 16q23, *MAFB* auf 20q12 und *MUM1/IRF4* auf 6p25. *Cyclin D3*, *C-MAF* und *MAFB* werden auch in *Igλ*-Translokationen involviert beobachtet (Bergsagel & Kuehl, 2001). Ein weiteres Kandidatengen mit onkogenem Potential ist das 360kb zentromerwärts vom *CCND1* lokalisierte *MYEOV*. Janssen et al. (2000) beschrieben die Überexpression des Gens in t(11;14)(q13;q32)-positiven MM-Zelllinien. Die häufigen genetischen Veränderungen, die in MM beobachtet werden können, sind, mit den entsprechenden Referenzen, in **Tab.1** zusammenfassend dargestellt.

Als rekurrente chromosomale Veränderung ist die Monosomie 13 beschrieben, die, insbesondere in Kombination mit  $\beta_2$ -Mikroglobulin, als Prognoseindikator gewertet wird (Konigsberg et al., 2000; Facon et al., 2001). Zytogenetische Studien zeigten, dass die Monosomie 13 oft in Kombination mit weiteren Veränderungen auftritt, insbesondere mit der Translokation t(4;14)(p16;q32) oder t(14;16)(q32;q23). Während die t(4;14)- oder t(14;16)-positiven MM in der Mehrzahl auch eine Monosomie 13 aufweisen, aber eine Monosomie 13 nicht zwangsläufig mit weiteren chromosomalen Defekten assoziiert ist (Sawyer et al., 1998; Fonseca et al., 2001), wird vermutet, dass die Monosomie 13 eine sehr frühe onkogene Veränderung ist, die noch vor den *IgH*-Translokationen auftritt. Etwa 92% der Veränderungen des Chromosoms 13 sind Monosomien, aber auch partielle Deletionen werden beobachtet (Avet-Loiseau et al., 2000). Die deletierte Region ist auf die Region 13q14-21 kartiert, die die minimal deletierte Region in der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) überlappt (Cigudosa et al., 1998; Avet-Loiseau et al., 2000). Das Retinoblastomgen (*RB*) ist in 13q14 lokalisiert und trotz der oft beobachteten monoallelischen Deletion dieser Region (50%) werden Veränderungen im Expressionsmuster des Gens kaum beobachtet. Das weist darauf hin, dass in dieser Region weitere Tumor-assoziierte Gene lokalisiert sein könnten. Als weitere genetische Veränderungen werden variable Rearrangements der Region 1q21-24 (18-31%), 8q24 (25%), sowie Deletionen und 17p13 (33-55%) beobachtet. Numerische Aberrationen werden in etwa 80–90% der MM beobachtet (Drach et al., 1995; Cigudosa et al., 1998) und Hyperdiploidien in 30-45% der aberranten MM (Lai et al., 1995; Calasanz et al., 1997). Neben der Monosomie 13 treten in 21-56% der MM Zugewinne der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11 und 19 auf (Perez-Simon et al., 1998). Dort lokalisierte

Myelom-assoziierte Gene sind nicht bekannt. Neben diesen Veränderungen werden bei ca. 40% der MM-Patienten auch aktivierende Mutationen der Onkogene *N-RAS* und *K-RAS* berichtet (Neri et al., 1989; Billadeau et al., 1995).

#### 1.2.1.2.2 Therapeutische Optionen und Prognose

Das multiple Myelom ist mit den derzeit zur Verfügung stehenden konventionellen Therapieverfahren nicht heilbar. Die Wahl der therapeutischen Strategie orientiert sich am Erkrankungsstadium und am Alter des Patienten. Als wirksamste Primärtherapie werden die Alkylantien Melphalan und Cyclophosphamid, jeweils in Kombination mit Prednison eingesetzt und erreichen eine Responstrate von ca. 40%. Alternativ stehen das VAD-Protokoll (Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason) mit einer Responstrate von 50% zur Verfügung (Ross et al., 2004). Zudem reduziert eine palliative Bestrahlung als supportive Therapie Schmerzen, rekalkifiziert frakturierte oder frakturgefährdete Skeletteile und beseitigt paraossäre Weichteiltumoren. Eine Strahlentherapie wird vorrangig als Rezidiv-Zusatztherapie durchgeführt. Patienten <60 Jahre erhalten eine hochdosierte Chemotherapie mit autologer oder allogener Stammzelltransplantation, die das progressionsfreie Intervall und die Gesamtüberlebenszeit verlängern.

Die Sensitivität der Plasmazellen gegenüber der konventionellen Therapie wird durch die rapide Entwicklung von Resistenzen durch die Induktion des Multidrug-Resistenzgens und Expression des P-Glycoproteins stark reduziert und erfordert neue therapeutische Optionen. Diese orientieren sich nicht nur an den malignen Plasmazellen, sondern setzen auch die Interaktion zwischen Plasmazelle und KM-Milieu in den Vordergrund. Aber auch das KM-Milieu kann zur Entwicklung von Chemoresistenzen durch zwei Mechanismen beitragen. Die Bindung der MM-Zellen an Fibronectin kann zur Zelladhäsions-vermittelten Chemoresistenz führen, die mit der Induktion von KIP1 und einem G1-Arrest assoziiert ist (Damiano et al., 1999; Hazlehurst et al., 2000). Desweiteren können Cytokine innerhalb des KM-Milieus JAK/STAT-(Janus-Kinase/ *signal transducer and activator of transcription*) und PI3K/AKT (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Signalkaskaden aktivieren, die Resistenzen sowohl gegen konventionelle als auch neue therapeutische Optionen vermitteln.

Apoptose-induzierende Therapien basieren auf Caspase 8 und/oder Caspase 9-Aktivierung. Resistenz gegenüber Dexamethason, einem Caspase 9-Aktivator, wird

durch IL-6 vermittelt, über die Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade und Hochregulierung des anti-apoptotischen Proteins BCL-X<sub>L</sub> und MCL1 (*myeloid cell leukemia sequence-1*) (Catlett-Falcone et al., 1999; Dalton & Jove, 1999; Puthier et al., 1999; Wei et al., 2001; Epling-Burnette et al., 2001).

### 1.3 Murine Gentransfermodelle

Mausmodelle stellen seit Jahrzehnten die am besten geeigneten *in vivo*-Systeme humaner Erkrankungen dar. Murine Modelle ermöglichen eine gute Annäherung an pathologische, genetische, ätiologische und therapeutische Merkmale humaner maligner Erkrankungen, die u.a. dadurch zu erklären sind, dass zelluläre Signalkaskaden beider Spezies hoch konserviert sind. Zudem gewährt das murine Modell eine Messbarkeit des Tumorwachstums in einem begrenzten Zeitrahmen. Die Verfügbarkeit von Homologiekartierungen human-murin und murin-human ist zudem aus genetischer Sicht ein vorteilhafter Aspekt.

#### 1.3.1 Die transgene Maus

Als transgen wird ein Organismus bezeichnet, der Fremd-DNA, auch die einer anderen Spezies, in seinem eigenen Genom trägt. Das Transgen wird nach dem Zufallsprinzip in das Genom integriert und seine Expression erfolgt promotorabhängig. Man unterscheidet zwischen konstitutiv aktiven Promotoren, Promotoren, die gewebespezifisch aktiv sind sowie induzierbaren Promotoren (Bernardi et al., 2002). Die als Transgen eingebrachte Fremd-DNA wird in einen der beiden Pronuklei einer fertilisierten Eizelle injiziert, wonach die Integration des Transgens in das Genom erfolgt. Im Zweizellstadium wird der Embryo in den Uterus eines pseudoträchtigen Muttertieres implantiert. Transgene Mäuse, die als Fremd-DNA z.B. ein Onkogen tragen, sind attraktive Tiermodelle und viele dieser Modelle, z.B. Mäuse, die das Fusionsgen *BCR-ABL* exprimieren, stehen kommerziell zur Verfügung.

#### 1.3.2 *Knock-in* und *knock-out* – konditionale und induzierbare Systeme

Die als *knock-in* bezeichneten Modelle stellen Weiterentwicklungen der transgenen Modelle dar. Hierbei wird z.B. ein endogenes Protoonkogen durch das Onkogen ersetzt,

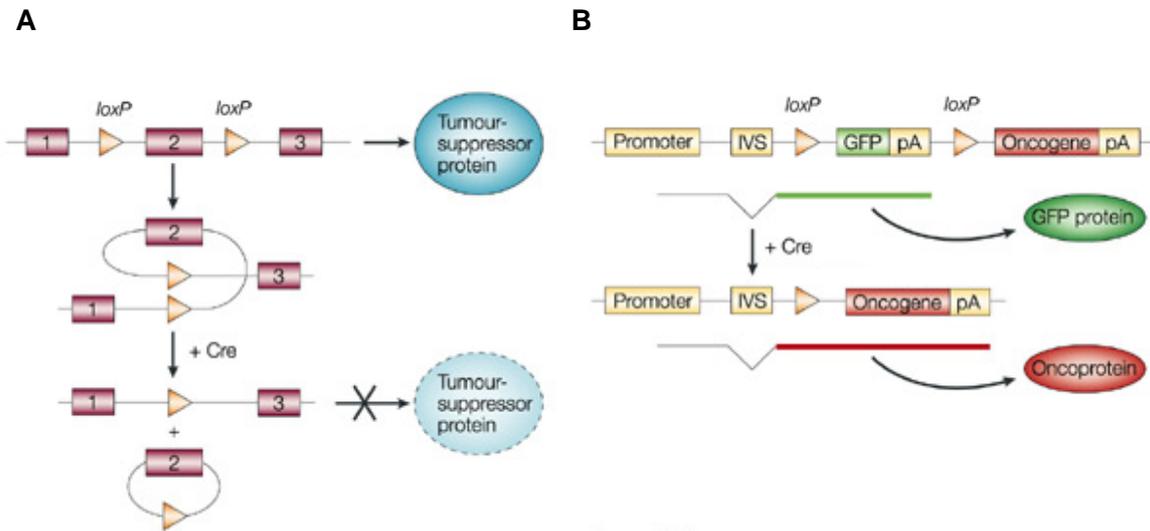
das somit die Position des physiologischen Genlokus einnimmt. Diese Strategie nutzt die Vorteile der homologen Rekombination (Bernardi et al., 2002). Im verwendeten Vektor flankieren die zur Insertionsregion homologen Sequenzen das zu integrierende Gen und die kodierende Sequenz eines Selektionsmarkers. Nach Transfektion des Vektors in die Zielzelle erfolgt die homologe Rekombination und damit der Gen-Austausch (Jonkers & Bern, 2002).

Die Integration der Fremd-DNA erfolgt in der Keimzelle, wohingegen beispielsweise humane Leukämien durch chromosomale Veränderungen somatischer Zellen charakterisiert sind. Das Fehlen einer Gewebe- oder Organspezifität kann eine embryonale Letalität zur Folge haben und damit eine fundamentale Limitierung der *knock-in*, aber auch der *knock-out*-Technik, bei der z.B. ein gesamtes Gen eliminiert werden kann, darstellen. Diese Spezifität konnte durch die Entwicklung konditionaler Systeme verbessert werden. Desweiteren ermöglichen induzierbare Systeme eine zeitliche Spezifität. Bekannte Methoden sind das Cre/*loxP*-System (**Abb.5**) und das tet-System (**Abb.6**). Beide Strategien können für die gezielte *in vivo*-Untersuchung sowohl von Onkogenen (Genaktivierung) als auch von TSG (Geninaktivierung) eingesetzt werden.

### 1.3.3 Retroviraler Gentransfer und Insertionsmutagenese

Retroviren sind die derzeit meistverwendeten Mediatoren gentherapeutischer Strategien. Bevorzugt werden hierbei replikationsdefekte Retroviren, die eine Neusynthese retroviraler Sequenzen unterbinden und nur das in das Wirtsgenom integrierte Transgen exprimieren (**Abb.7**). Die in eine Wirtszelle eingeschleuste retrovirale RNA wird nach dem Umschreiben in DNA in das Wirtsgenom integriert.

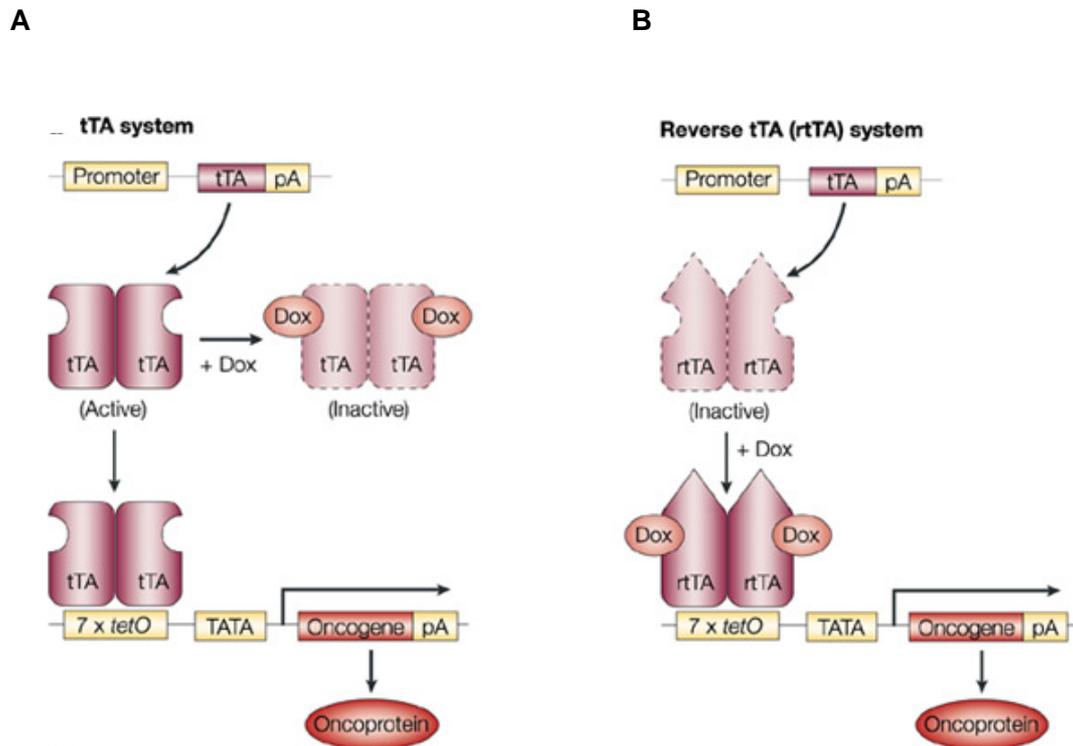
Die retrovirale Insertion erfolgt theoretisch nach dem Zufallsprinzip. Aufgrund des geringen Anteils an kodierenden Sequenzen innerhalb des eukaryontischen Genoms, ist das Risiko einer Mutagenese als sehr gering zu bewerten. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sowohl das MLV (*murine leukemia virus*) als auch Lentiviren bevorzugt in transkriptionsaktive genomische Regionen integrieren (Schroder et al., 2002; Woods et al., 2003; Wu et al., 2003). Das MLV integriert innerhalb oder in die Nähe von Promotorregionen (Wu et al., 2003), während Lentiviren in „Transkriptionseinheiten“ wie TSG integrieren (Schroder et al., 2002; Woods et al., 2003).



**Abb.5 Induktion konditionaler Mutationen im Mausmodell unter Verwendung des Cre/loxP-Systems (modifiziert aus Jonkers & Berns, *Nat Rev Cancer* 2002)**

Die Cre/loxP-vermittelte TSG-Inaktivierung erfordert die Insertion zweier 34bp-loxP Rekombinase-Erkennungssequenzen in Intronsequenzen und direkter Orientierung zum TSG. Die Expression des Enzyms Cre-Rekombinase führt zur Rekombination der loxP-Elemente unter Ausschneidung der intervenierenden Sequenzen, einschließlich der dazwischenliegenden Exonbereiche. Ist dieser Exonbereich für die Genfunktion essentiell, resultiert eine Geninaktivierung („knock-out“) (A). Bei der Cre/loxP-vermittelten Onkogen-Aktivierung wird ein „gefloxter“ Transkriptionsterminator, z.B. ein GFP (*green fluorescent protein*)-Reporter gen zur Isolierung des Gens vom Promotor verwendet („knock-in“). In Abwesenheit der Cre-Rekombinase wird das GFP exprimiert und das Onkogen ist transkriptional inaktiv. Der Rekombinase-vermittelte Ausschneidung der loxP-Elemente unter Verlust von GFP stellt das Onkogen unter die direkte Kontrolle des Promotors (B) und gewährt die Transkription des Gens.

IVS, intervenierende Sequenz; pA, Polyadenylierungssignal

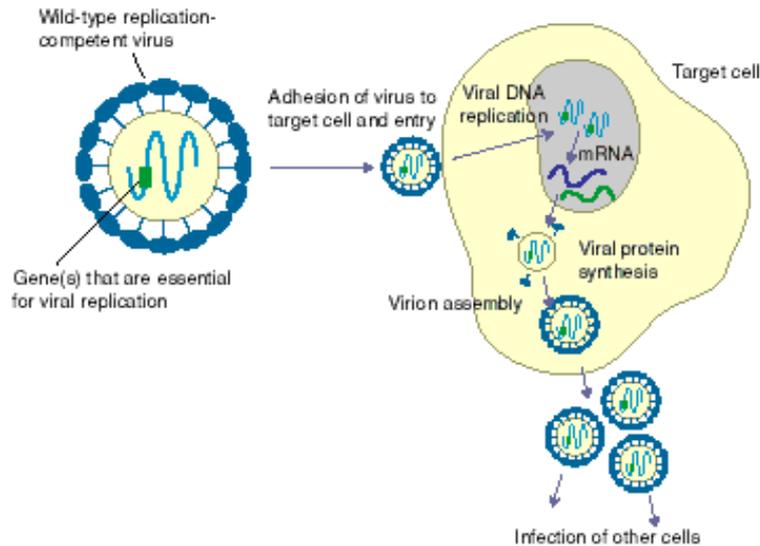


**Abb.6 Kontrollierte Mutationsinduktion im Mausmodell unter Verwendung des tet-Systems (aus Jonkers & Berns, *Nat Rev Cancer* 2002)**

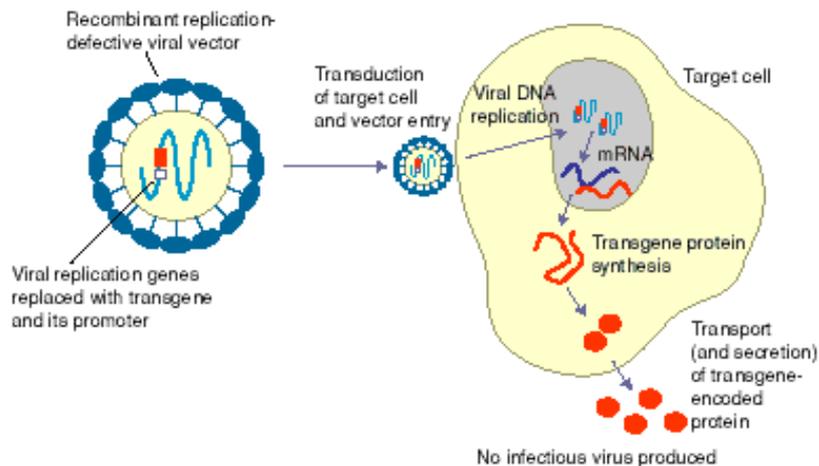
Tetracyclin-regulierte Genexpression verwendet einen Tetracyclin (tet)-unterdrückbaren Transkriptions-Transaktivator (tTA) oder einen tet-induzierbaren Transaktivator (rtTA). In Abwesenheit von Doxycyclin (Dox) (A) binden tTA-Dimere spezifisch an ein Concatamer von tetO-Sequenzen (7xtetO) und aktivieren die Transkription des Onkogens. Die Bindung von Dox führt zur Konformationsänderung der tTA-Dimere und zum Verlust der sequenzspezifischen DNA-Bindung. In einem tet-induzierten System (B) binden die rtTA-Dimere nur in der Anwesenheit von Dox an tetO-Sequenzen und aktivieren die Transkription.

pA, Polyadenylierungssignal

**A**



**B**



**Abb.7 Replikationsaktive und replikationsdefekte Retroviren (aus Fry & Wood, *Exp Rev Mol Med* 1999)**

Die Nukleinsäure des wt-Virus initiiert die Transkription und die Translation viraler Genprodukte, was zur Bildung und Freisetzung neuer Viruspartikel (Virionen) führt, die neue Zellen infizieren können (A). Replikationsdefekte Viren infizieren die Zielzelle, jedoch können sie aufgrund des Fehlens replikationsessentieller genetischer Informationen keine neuen Viruspartikel produzieren (B).

Diese Bevorzugung von Promotor- oder Exonregionen führt dazu, dass das Risiko der Mutagenese, das mit der Entwicklung eines malignen Phänotyps einhergehen kann, auf  $10^{-7}$  pro Insertion eingeschätzt wird (Stocking et al., 1993). Insertionsmutagenese bezeichnet damit die ektopische chromosomale Integration viraler DNA, die zur Aktivierung eines Onkogens führt (Schroder et al., 2002; Woods et al., 2003). Die Insertion retroviraler Sequenzen in das Genom eukaryontischer Zellen kann folglich zur malignen Zelltransformation und zur Entwicklung von Tumoren führen (Li et al., 2002).

#### **1.3.4 Nicht-viraler Gentransfer**

Aus Gründen der Vollständigkeit soll hier auf die Möglichkeit des nicht-viralen Gentransfers hingewiesen werden. Diese Strategien nutzen Liposomen oder Virosomen als Transgen-Träger, aber auch die Injektion nackter DNA oder auch Ligandenkonjugierter DNA-Transfer finden begrenzte Anwendung. Die Expression des Transgens erfolgt, im Unterschied zu den vektoriellen Methoden, oft nur transient. Dennoch sind diese Methoden aufgrund ihrer methodischen Einfachheit sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* genutzte Gentransfer-Strategien (Fry & Wood, 1999).

#### **1.3.5 Mausmodelle hämatologischer Neoplasien**

##### **1.3.5.1 Leukämischer Phänotyp durch Markergeninsertion**

Li et al. (2002) zeigten, dass der Transfer des dLNGFR-Markergens in KM-Zellen des Mausstammes C57BL/6J und die nachfolgende Transplantation in letal bestrahlte Mäuse zur Entwicklung leukämischer Phänotypen führen kann. Nachgewiesen wurde eine Einzelkopie-Insertion der retroviralen Sequenz in das murine *EVI-1* (*ecotropic viral integration site-1*) Gen. Dieser Transkriptionsfaktor ist im humanen Genom auf Chromosom 3q26 lokalisiert und kann in hämatopoetischen Zellen durch eine Translokation t(3;3)(q21;q26) oder durch eine Inversion inv(3)(q21;q26) aktiviert werden (Lahortiga et al., 2004; Testoni et al., 1999). In beiden Rearrangements wird der Verstärker des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens *Ribophorin 1* auf 3q21 in die kodierende Region des *EVI-1* Gens transloziert, was zur Überexpression des *EVI-1* führt. Diese Veränderungen können bei akuter myeloischer Leukämie (AML), die sich als sekundäre AML aus dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) entwickelt, beim MDS

und bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) beobachtet werden. Aktivierungen von *EVI-1* durch Translokation oder Inversion sind mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert (Wieser, 2002; Wieser et al., 2003).

### **1.3.5.2 Mausmodelle zur Theorie der multifaktoriellen Tumorgenese**

Wie es bereits für die Entwicklung des MCL von Lovec et al. (1994) und Bodrug et al. (1994) im Tiermodell gezeigt werden konnte, bestehen wissenschaftliche Hinweise darauf, dass die Tumorgenese einen multifaktoriellen Mehrschrittprozess darstellt. Im Folgenden sollen weitere experimentelle Daten diese Theorie unterstützen.

#### **1.3.5.2.1 Plasmazelltumoren nach Koexpression von *C-MYC* und *BCL-X<sub>L</sub>***

Die dysregulierte Expression von *C-MYC* und *BCL-X<sub>L</sub>* führte in einem doppel-transgenen Mausmodell von Cheung et al. (2004) innerhalb von durchschnittlich 135 Tagen zur Entwicklung von Plasmazelltumoren mit 100%iger Penetranz und Merkmalen des humanen MM. Die Genexpression wurde durch die Insertion des onkogenen Transgens *C-MYC* in den murinen *IgH C $\alpha$* -Locus forciert und simuliert damit eine Translokation t(8;14) im humanen und eine Translokation T(12;15) im murinen Genom. Einzeltransgene *C-MYC*-Mäuse entwickelten dagegen nur zu 9,3% B-Zell-Tumoren. Die fehlregulierte Expression von Genen der *BCL2*-Familie, die zur Apoptose-Suppression führen, sind Merkmale sowohl des humanen als auch des murinen Plasmazytoms. Die Entwicklung der Plasmazellerkrankungen in diesem Modell durch kooperierende Überexpression zweier Tumor-assoziiertes Gene bestätigt die Theorie der multifaktoriellen Tumorgenese.

#### **1.3.5.2.2 Forcierte Leukämieentwicklung nach Koexpression von *PML-RARA* und *BCL2***

Le Beau et al. (2002) stellten die Situation einer human akuten promyelozytären Leukämie (APL) in einem transgenen Mausmodell dar. Die humane Leukämieform ist durch die Translokation t(15;17)(q22;q11.2) charakterisiert, woraus ein *PML-RARA* Fusionstranskript resultiert. Le Beau et al. zeigten, dass die Expression des humanen *PML-RARA*-Fusionsgens in murinen Granulozyten-Vorstufen zur Leukämieentwicklung der transgenen Mäuse führte. Jedoch waren kooperierende Veränderungen notwendig,

um eine Leukämogenese zu induzieren. Doppel-transgene Mäuse, die neben *PML-RARA* auch das anti-apoptotische *BCL2* überexprimierten, entwickelten die Leukämien im Vergleich zu Kontrolltieren auffallend schneller. Mittels spektraler Karyotypisierung konnten in 95% dieser Leukämien klonale chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden, wobei die Trisomie 15 in 79% der Leukämien detektiert wurde und damit die häufigste numerische Aberration darstellte. In der humanen APL wird als häufigste sekundäre Veränderung eine Trisomie 8 beobachtet, wobei die Region 8q24 als die kritische Region betrachtet wird, in der das Onkogen *C-MYC* lokalisiert ist. Diese Region ist synten zum Chromosom 15 der Maus.

#### **1.3.5.2.3 Forcierte Lymphombildung nach Koexpression von *CCND1* und *N-MYC* oder *L-MYC***

Lovec et al. (1994) publizierten ein transgenes Mausmodell, in dem das Cyclin D1 kodierende Gen unter transkriptionaler Kontrolle des E $\mu$ -Elementes des *IgH*-Gens zwar nicht zur Entwicklung lymphoider Tumoren führte, aber die Koexpression von *Cyclin D1* und *N-MYC* oder *L-MYC* in doppel-transgenen Mäusen eine rapide Lymphombildung klonalen prä-B oder B-Zell-Ursprungs zeigte. Auch dieses Beispiel verdeutlicht, dass die MCL-Entwicklung ein synergistischer Prozess ist, der die Einbeziehung mehrerer Gene erfordert.

### **1.4 Theoretische Grundlagen der in dieser Arbeit untersuchten murinen *in vitro*- und *in vivo*-Modelle hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren**

#### **1.4.1 Leukämische Varianten nach retroviralem Gentransfer und Expression des *MDR1*-Gens im *in vivo*-Stammzellmodell**

Die Transduktion hämatopoetischer Stammzellen (HSZ) unter Verwendung eines replikationsdefekten retroviralen Vektors zur Expression des humanen Multidrug-Resistenz (*MDR1*)-Gens und nachfolgende Transplantation der Zellen in letal bestrahlte Rezipienten führte innerhalb eines Zeitraums von 6 Monaten nach Stammzelltransplantation (SZT) zur Entwicklung phänotypisch verschiedener Leukämien. 38% der Tiere erkrankten an hämatologischen Neoplasien myeloischen,

erythroiden oder T-lymphoblastischen Phänotyps. Leukämische Infiltrate wurden in Milz, Niere, Blut und Leber histologisch nachgewiesen. Mithilfe der *Ligation-mediated* Polymerasekettenreaktion (LM-PCR) konnte gezeigt werden, dass die Insertion der retroviralen Sequenzen bei den erkrankten Tieren bevorzugt in die Nähe von Genen erfolgte, die in Signalkaskaden involviert sind, die bei der Leukämieentstehung dysreguliert sein können, oder auch Transkriptionsfaktoren, die regulatorische Funktionen bei der Genexpression ausüben. Die Leukämieentstehung konnte somit auf eine Insertionsmutagenese zurückgeführt werden (Modlich et al., 2005).

#### **1.4.2 Tumorzellen entgehen suizidaler Strategie im Rahmen der Gentherapie**

Die suizidale Gentherapie unter Verwendung retroviraler Vektoren ist eine der neuen und vielversprechenden Ansätze zur Behandlung sowohl solider Tumoren als auch hämatologischer Neoplasien. Die Grundidee basiert auf der durch ein Transgen induzierten Aktivierung einer Substanz (Prodrug), die nachfolgend therapeutisch wirksam wird. Den Prototyp dieser Methode stellt die Aktivierung von Ganciclovir (GCV) durch Phosphorylierung durch die Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus (HSV-TK) dar, die nach retroviraler Transduktion exprimiert wird. Zum Nukleosidanalogon (GCV-Monophosphat) metabolisiert und in die DNA integriert, kann GCV die DNA-Synthese unterbinden und die Proliferation von Tumorzellen hemmen. Zelluläre Kinasen phosphorylieren das GCV-Monophosphat dagegen weiter zum GCV-Triphosphat. Die Transduktion unter Verwendung retroviraler Vektoren kann nur in mitotisch aktiven Zellen erfolgen, wodurch vorrangig die stark proliferierenden Tumorzellen angegriffen werden und Zellen des normalen Gewebes weitestgehend verschont bleiben.

Frank et al. (2004) nutzten die murine Zelllinie EL-4wt, die aus einem chemisch induzierten T-Zell-Lymphom etabliert wurde (Mann et al., 1986), als Modell für retrovirale Transduktionen im Rahmen der Suizid-Gentherapie. Die in diese Zellen retroviral eingeschleuste HSV-TK (Einzelgeninsertion) und die Transplantation der Tumorzellen in immunkompetente Mäuse führte zur Entwicklung von Lymphomen, die sich durch Behandlung mit GCV zurückbildeten. Dennoch entwickelten einige Mäuse Rezidive mit GCV-Resistenz unklarer Genese.

### 1.4.3 ***BCR-ABL*-transduzierte hämatologische Zellen als *in vitro*-Modelle der humanen Ph-positiven ALL**

Die humane reziproke Translokation t(9;22)(q34;q11) führt zur Bildung des *BCR-ABL*-Fusionsgens. Molekulargenetisch entspricht die Translokation einer Rekombination des *ABL*-Gens auf Chromosom 9q34 mit dem *BCR*-Gen auf 22q11, das mit der Expression des *BCR-ABL*-Fusionstranskriptes und gesteigerter Tyrosinkinase-Aktivität einhergeht. Dies führt zur dysregulierten Kontrolle von Zellproliferation und Apoptose der veränderten Zellen. Das reziproke *ABL-BCR*-Rearrangement ist dagegen funktionell bedeutungslos (Salesse & Verfaillie, 2002; Diamond et al., 1995; Melo et al., 1993). Die nach ihrem Entdeckungsort benannte Philadelphia (Ph)-Translokation ist das zytogenetische Charakteristikum der CML und tritt vorrangig als Einzelaberration auf. Die Ph-Translokation wird auch bei der ALL beobachtet. In Abhängigkeit von der Bruchpunktlage werden verschieden große *BCR-ABL*-Fusionsprodukte unterschieden, wodurch CML und ALL differenzierbar sind. Die Ph-positive ALL tritt in ca. 5% der kindlichen und in 15-30% der ALL im Erwachsenenalter auf und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Clark et al., 1989; Lestingi & Hooberman, 1993). Sekundäre genetische Veränderungen werden in mehr als 70% der Patienten beobachtet (Rieder et al., 1996) und beeinflussen sowohl die Progression der Erkrankung als auch das therapeutische Ansprechen.

Die Klonierung der humanen p185/p190 *BCR-ABL* wt-cDNA in einen retroviralen Vektor, *ex vivo* Gentransfer in murine HSZ und nachfolgende Transplantation mit der Entwicklung eines prä-B-Phänotyps führte zur Etablierung der Zelllinie BM185wt, die als *in vitro*-Modell für eine Philadelphia-positive ALL (Ph-ALL) betrachtet werden kann (Goga et al., 1995; Pendergast et al., 1993; Stripecke et al., 1998). Eine zytogenetische Charakterisierung erfolgte jedoch nicht.

In einer Studie zur Untersuchung der *in vivo* T-Zellantwort gegen Antigene in BM185wt-Zellen wurden durch sekundäre retrovirale Transduktion die derivativen Zelllinien BM185-gfp und BM185-ova-gfp etabliert. Diese sind durch die zusätzliche Expression des *green fluorescent protein* (GFP) bzw. die Expression des *Ovalbumin-GFP* Fusionstranskriptes gekennzeichnet.

#### 1.4.4 ***In vitro*-Modell des humanen anaplastischen großzelligen Lymphoms**

Das humane anaplastische großzellige Lymphom (ALCL) ist eine aggressive Erkrankung, die etwa 5% aller NHL im Erwachsenenalter und 15% der kindlichen NHL ausmacht. Das ALCL wird entsprechend des Vorkommens oder Nicht-Vorkommens eines ALK-Fusionsproteins kategorisiert, wobei verschiedene Fusionspartner für das *ALK*-Gen auf 2p23 bekannt sind. Die Translokation t(2;5)(p23;q35) mit Fusion der Gene *ALK* und *NPM1* (*nucleophosmin 1*) wird in ca. 50% der ALCL-Patienten bestimmt. Der Ursprung des ALCL sind meistens T-Zellen, nur selten tritt es als 0-Typ auf, mit vermutlichem Ursprung in einer Vorstufe der T- oder B-Zellen.

Uyttenhove et al. (1991) beschrieben die Zelllinie TS1G6, die aus einem T-Helferzellklon des Mausstammes C57BL/6 nach Interleukin (IL)-9-Transfektion etabliert wurde und bei Transplantation in Rezipienten zur Entwicklung progressiver Tumoren führt. Bittner et al. (2000) beschrieben diese Zelllinie histologisch und immunhistochemisch und zeigten die Ähnlichkeiten zum humanen ALCL. Eine ALK-Überexpression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, womit dieses Modell einen ALCL-Subtyp darstellen könnte. Zytogenetische Daten zur weiteren Charakterisierung dieser Zelllinie lagen bisher nicht vor.

#### 1.4.5 **T-Zell-Entartung in *N-RAS*-transgenen Modellen mit *Suv39h1*- oder *p53*-Defizienz**

Die Histon-Methyltransferasen (HMTasen) *Suv39h* wurden als spezifische Enzyme zur Methylierung des Histons 3 an Lysin 9 (H3-K9) des perizentrischen Heterochromatins identifiziert. Dieses Methylierungsmuster unterscheidet sich von dem anderer chromosomaler Regionen. Die Histon H3-Phosphorylierung wird als essentielles Ereignis für eine fehlerfreie Chromosomensegregation betrachtet, wahrscheinlich durch Schutz der sehr kompakten Chromatinstruktur des perizentrischen Heterochromatins (Rea et al., 2000, Peters et al., 2001).

Die Gene der murinen *Suv39h* HMTasen (*Suv39h1* und *Suv39h2*) sind auf den Chromosomen X und 2 lokalisiert (O'Carroll et al., 2000). *Suv39h1*- und *Suv39h2*-homozygot deletierte Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar, wohingegen gekreuzte doppel-null Mutanten (*Suv39h* null) eine erhöhte Abortrate und pränatale Letalität zeigen

(Peters et al., 2001). Die zytogenetische Untersuchung primärer muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) zeigte Aneuploidien und die Bildung sog. „Butterfly-Chromosomen“ als Zeichen ihrer chromosomalen Segregationsstörung. Zudem konnte gezeigt werden, dass *Suv39h*-Defizienz mit einer erhöhten Tumorinzidenz einhergeht und zur Bildung von B-Zell-Lymphomen führt (Peters et al., 2001).

Zur Untersuchung der Funktion von *Suv39h1*-Defekten in *N-RAS* (Onkogen)-getriebenen Tumoren etablierten Braig et al. (2005) ein murines transgenes E $\mu$  (human)-*N-RAS*-Modell mit *Suv39h1*-Defizienz oder *p53*-Defizienz. *p53*-Defizienz beschleunigt die *RAS*-vermittelte Tumorprogression *in vivo* (Lin et al., 1998). Im Unterschied zu den *Suv39h*-Defizienz-Modellen von Peters et al. (2001) zeigten die *N-RAS*-induzierten *Suv39h1*-defizienten Mäuse invasive T-Zell-Lymphome, während *N-RAS*-„Kontrolltiere“ erst signifikant später an nicht-lymphoiden Neoplasien erkrankten.

#### **1.4.6 p18-Defizienz in Onkogen-stressinduzierten (H-RAS oder C-MYC) MEF**

Der nicht-enzymatische Faktor p18 wurde zunächst innerhalb eines makromolekularen Komplexes aus Aminoacyl-tRNA Synthetasen und Kofaktoren identifiziert, die funktionell in der Proteinbiosynthese von Bedeutung sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass Komponenten dieses multifaktoriellen Komplexes weitere Funktionen innerhalb biologischer Prozesse wahrnehmen, beispielsweise bei der transkriptionalen und translationalen Regulation und bei der Apoptose (Ko et al., 2002).

Park et al. (2005) zeigten, dass *p18*-heterozygote Mäuse in einem Alter von 15-27 Monaten spontan Adenokarzinome, Sarkome und Lymphome entwickeln, die in der *p18wt*-Kontrollgruppe mit dieser Signifikanz nicht zu beobachten waren. Dagegen zeigten homozygot deletierte *p18*-Mäuse eine frühe embryonale Letalität.

Park et al. (2005) konnten ferner zeigen, dass p18 nach DNA-Schäden über Bindung und Aktivierung von ATM/ATR das TSG *p53* aktiviert. Die chromosomale Region 6p24-25, in der auch das *p18*-kodierende Gen lokalisiert ist, ist als LOH-Region humaner Lymphome bekannt (Baumgartner et al., 2003; Wang et al., 2001).

Die Transfektion der Onkogene *H-RAS* oder *C-MYC* führte zur Immortalisierung *p18*-heterozygoter Zellen und darüber hinaus zu schweren Zellteilungsstörungen und Veränderungen der Chromosomensegregation, die in *p18wt* (*H-RAS*) und *p18wt* (*C-MYC*) nicht beobachtet wurden (B.-J. Park, nicht publizierte Daten). Dies unterstreicht

die Rolle von p18 bei der onkogenen stressabhängigen Aktivierung von *p53* und damit die Funktion von p18 zum Erhalt der genomischen Stabilität.

Die Zelllinien *p18*<sup>+/-</sup> (*H-RAS*) und *p18*<sup>+/-</sup> (*C-MYC*) wurden aus MEF *p18*-heterozygoter Mäuse des Stammes C57BL/6 etabliert und zur Expression der Onkogene *H-RAS* und *C-MYC* *in vitro*-transfiziert (B.-J. Park, unveröffentlichte Daten).

## 1.5 Zielsetzung

Das Verständnis der Entstehung chromosomaler Instabilität, den hieraus resultierenden zellulären Konsequenzen und die Nutzung des Erkenntnisgewinns zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze erfordert neben molekularbiologischen, histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen eine detaillierte zytogenetische Analyse. Die teilweise schon seit vielen Jahren in der zytogenetischen Diagnostik genutzten Analysemethoden, wie beispielsweise die konventionellen Bänderungstechniken, sind hierfür oft nicht ausreichend und erfordern weitere Techniken, die eine hochauflösende Charakterisierung der chromosomalen Bruchereignisse ermöglichen. Eine dieser neuen molekulargenetischen Techniken ist die spektrale Karyotypisierung (SKY).

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung der primären und/oder sekundären chromosomalen Instabilität humaner und muriner *in vitro*- oder *in vivo*-Modelle mittels spektraler Karyotypisierung zur Beantwortung folgender Fragestellungen:

### 1) ***In vitro*-Modelle humaner hämatologischer Neoplasien: Untersuchung von 11 t(11;14)(q13;q32)-positiven Zelllinien**

- Zeigen die MCL- bzw. MM-Zelllinien wiederkehrende sekundäre chromosomale Veränderungen?
- Unterscheidet sich die klonale Evolution t(11;14)(q13;q32)-positiver MCL von der t(11;14)(q13;q32)-positiver MM?
- Können die bereits publizierten zytogenetischen Daten der Zelllinien validiert werden und welche Informationen lassen sich zusätzlich durch die SKY gewinnen?
- Welche Regionen zeigen die höchste chromosomale Instabilität? Korrelieren die zytogenetischen Daten der Zelllinien mit publizierten Daten aus Chromosomenanalysen primärer Neoplasien?
- Können den Regionen mit hoher Instabilität Kandidatengene mit tumorprogressiver Funktion zugeordnet werden?

## 2) Murines *in vivo*-Modell mit Entwicklung leukämischer Phänotypen nach Insertionsmutagenese

- Kann in den leukämischen Klonen eine chromosomale Instabilität nachgewiesen werden? Werden klonale chromosomale Aberrationen beobachtet?
- Zeigen sich wiederkehrende chromosomale Aberrationen? Welche, in den veränderten chromosomalen Regionen lokalisierten und bekanntermaßen Leukämie-assoziierten Gene, könnten ggf. involviert sein?
- Führt die Integration der Retroviren in das murine Genom zu chromosomalen, zytogenetisch detektierbaren Bruchereignissen an den Insertionsorten?

## 3) Murines *in vivo*-Lymphom-Modell mit Entzug suizidaler Strategie im Rahmen der Gentherapie

- Zeigt die Lymphom-Zelllinie EL-4wt chromosomale Aberrationen? Treten nach retroviralem Gentransfer und Klonisolierung neue chromosomale Veränderungen auf?
- Können chromosomale Unterschiede zwischen GCV-sensitiven und GCV-resistenten Tumorzellen detektiert werden, die mit dem Ansprechen auf GCV in Zusammenhang stehen könnten?

## 4) Murine *in vitro*-Modelle hämatologischer Neoplasien

- a) Modell der humanen Philadelphia-positiven ALL
  - b) Modell des humanen ALCL
- Zeigen die etablierten Zelllinien chromosomale Veränderungen, die denen der primären hämatologischen Neoplasien vergleichbar sind?
  - Welche Rückschlüsse auf die klonale Evolution lassen sich ziehen?
  - Welche Gene könnten durch die chromosomalen Aberrationen dysreguliert sein?

**5) Transgenes Maus-Modell mit *N-RAS*-Onkogenaktivierung und *Suv39h1*- oder *p53*-Defizienz**

- Zeigen die unter dem Onkogen *N-RAS* induzierten nicht-lymphoiden Neoplasien klonale chromosomale Veränderungen?
- Unterscheiden sich die *N-RAS*-aktivierten *Suv39h1*- oder *p53*-defizienten T-Zell-Lymphomzellen aus zytogenetischer Sicht von den *N-RAS*-induzierten nicht-lymphoiden neoplastischen Zellen?

**6) Murines *in vitro*-Modell zur Charakterisierung des *p18* im Rahmen der Entstehung solider Tumoren**

- Welche Chromosomenaberrationen zeigen die murinen embryonalen Fibroblasten *p18*<sup>+/-</sup> (*C-MYC*) und *p18*<sup>+/-</sup> (*H-RAS*)? Lassen sich zytogenetische Unterschiede feststellen?
- Kooperiert die Expressionsrepression des *p18* mit der Überexpression der Onkogene *C-MYC* oder *H-RAS* bei der Auslösung der chromosomalen Instabilität?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Modelle hämatologischer Neoplasien**

#### **2.1.1 *In vitro*-Modelle humaner Neoplasien**

Als *in vitro*-Modelle humaner hämatologischer Neoplasien standen etablierte MCL- und MM-Zelllinien zur Verfügung (**Tab.2**).

Die Zelllinien SP-53 und SP-50B stellte Dr. Masanori Daibata (Department of Medicine, Kochi Medical School, Kochi, Japan) zur Verfügung, die Zelllinien KMS-12 PE, KMS-12 BM und Molp-5 einschließlich *feeder*-Zellen Dr. Yoshinobu Matsuo (Fujisaki Cell Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan), NOP-2 Dr. Hidehiko Saito (First Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan), die Zelllinie HBL-2 Dr. Masafumi Abe (Department of Pathology, Fukushima Medical College, Japan) und die Zelllinien Granta-519 und JeKo-1 PD Dr. Hans G. Drexler (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig).

#### **2.1.2 Murine *in vitro*- und *in vivo*-Modelle**

##### **2.1.2.1 Leukämische Klone nach retroviralem Gentransfer und Expression des *MDR1*-Gens im *in vivo*-Stammzellmodell**

Modlich et al. (2005) etablierten ein *in vivo*-Modell, in dem die humane *MDR1* cDNA in den retroviralen HaMDR1-Vektor (*Harvey murine sarcoma retrovirus*-Hintergrund) kloniert, in hämatopoetische Zellen (Donor-Mausstamm C57BL/6J-CD45.2) transduziert und in Mäuse des Stammes C57BL/6J-CD45.1 transplantiert wurde.

**Tab.2 B-NHL *in vitro*-Modelle**

Zelllinie	Alter	Geschlecht	Material	EBV	Erkrankung	Referenz
<b>Granta-519</b>	58	m	PB	n.d.	MCL	Jadayel et al., 1997
<b>NCEB-1</b>	57	m	PB	pos.	MCL	Saltman et al., 1988
<b>Rec-1</b>	61	f	PB	n.d.	MCL, transformiertes DLCL	Prod'homme et al., 2004
<b>JeKo-1</b>	87	f	PB	neg.	MCL, leukämische Infiltration	Jeon et al., 1998
<b>SP-50B</b>	58	f	PB	pos.	MCL, leukämische Infiltration	Daibata et al., 1989
<b>SP-53</b>	58	f	PB	neg.	MCL, leukämische Infiltration	Daibata et al., 1989
<b>HBL-2</b>	84	m	LN	neg.	MCL, transformiertes DLCL	Abe et al., 1988
<b>Molp-5</b>	71	m	PB	neg.	MM, Bence-Jones Typ	Matsuo et al., 2000
<b>NOP-2</b>	47	m	OF	neg.	MM, Bence-Jones Typ	Nagai et al., 1991
<b>KMS-12 PE</b>	64	f	PE	n.d.	MM	Namba et al., 1989
<b>KMS-12 BM</b>	64	f	KM	n.d.	MM	Namba et al., 1989

PB, peripheres Blut; LN, Lymphknoten; PE, Pleuraerguss; KM, Knochenmark; MCL, Mantelzell-Lymphom; MM, Multiples Myelom; DLCL, *diffuse large B-cell lymphoma* ; OF, osteolytischer Fokus; m, männlich; f, weiblich ; n.d., nicht definiert

Folgende KM-Reisolate leukämischer Klone (**Tab.3**) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Baum (Abteilung Hämatologie, Hämostaseologie und Onkologie, MHH) kultiviert und für die zytogenetische Analyse zur Verfügung gestellt:

**Tab.3 Charakteristika leukämischer Klone**

Klon	Geschlecht	Phänotyp	untersuchtes Material
# 5	w	MPD-ähnliche myeloische Leukämie	KM
# 5.1	w	myeloische Leukämie mit Reifung	KM
# 31.2	w	erythroide Leukämie	KM
# 40	m	myeloische Leukämie mit Reifung	KM
# 43	m	myeloische Leukämie mit Reifung	Milz
# 46	m	MPD-ähnliche myeloische Leukämie	KM

Die Klone 5.1 und 31.2 stellten Reisolate aus Zweitrezipienten dar, die mit reisolierten leukämischen Zellen aus dem Erstrezipienten transplantiert wurden.

### 2.1.2.2 Lymphomzelllinie EL-4wt und retroviral transduzierte Klone mit Expression der HSV-TK, Primärtumoren und Rezidive

Frank et al. (2004) etablierten ein murines *in vivo*-Modell, in dem die cDNA der Herpes simplex Virus-Thymidinkinase (HSV-TK) in den pMO3N Vektor kloniert und in die murine T-Zell-Lymphomzelllinie EL-4wt (Mann et al., 1986) transduziert wurde. Die Transplantation (subkutane Injektion) erfolgte in Mäuse des Stammes C57BL/6J-Ly5.1. Dieses *in vivo*-Modell wurde von Prof. W. Ostertag (Abteilung Zell- und Virusgenetik des Heinrich-Pette-Institutes, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Nach retroviralem Gentransfer der Ausgangszelllinie EL-4wt wurden Einzelklone isoliert, aus denen die (Sub)Klone I, II, und III entstanden (**Tab.4**). Für die nachfolgenden Experimente von Frank et al. (2004) wurden Klone ausgewählt, bei denen eine Einzelgeninsertion des Retrovirus nachgewiesen werden konnte (Frank et al. 2004). Folgende Zelllinien und Klone wurden, unmittelbar nach Gentransfer, nach Auswachsen von Tumoren in den transplantierten Mäusen bzw. nach Auftreten von Rezidiven nach GCV-Therapie zytogenetisch untersucht:

**Tab.4 Lymphomzellen und Derivate nach Gentransfer**

Nr.	Klon	GCV-Therapie	GCV-Antwort
# 1	EL-4wt (T-Zell-Lymphomzelllinie)	—	—
# 2	EL-4wt nach Gentransfer	+	Sensitivität
<b>Klonisolierung</b>			
<b>Klon I</b>			
# 3	<i>in vitro</i> -Kultur nach Gentransfer	+	Resistenz
# 4	Primär-Tumor	—	—
# 5	Primär-Tumor	—	—
# 6	Rezidiv	+	Resistenz
<b>Klon II</b>			
# 7	<i>in vitro</i> -Kultur nach Gentransfer	—	—
# 8	Primär-Tumor	—	—
# 9	Rezidiv	+	Resistenz
<b>Klon III</b>			
# 10	<i>in vitro</i> -Kultur nach Gentransfer	—	—
# 11	Primär-Tumor	—	—
# 12	Rezidiv	+	Resistenz

### 2.1.2.3 ***BCR-ABL*- transduzierte hämatopoetische Zellen als *in vitro*-Modell der humanen Ph-ALL**

Die murine Zelllinie BM185wt ist eine prä-B-Zelllinie. Die Zelllinie wurde von Pendergast et al. (1993) und Goga et al. (1995) etabliert und beschrieben. Die Zelllinie ist dadurch charakterisiert, dass die humane p185/p190 *BCR-ABL* wt-cDNA in den retroviralen pSR $\alpha$ MSTtkneo-Vektor kloniert und in KM-Zellen des Mausstammes BALB/c transduziert wurde. Eine zweite retrovirale Transduktion der Zelllinie BM185wt führte zur Etablierung der Zelllinien BM185-ova-gfp und BM185-gfp. In **Tab.5** sind die Zelllinien, die Prof. C. Klein (Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, MHH) zur Verfügung stellte, aufgeführt.

**Tab.5 Zelllinie BM185wt und Derivate**

Zelllinie	Expression
BM185wt	<i>BCR-ABL</i>
BM185-gfp	<i>BCR-ABL + GFP</i>
BM185-ova-gfp	<i>BCR-ABL + Ovalbumin-GFP</i>

#### 2.1.2.4 TS1G6 als *in vitro*-Modell des humanen ALCL

Die Zelllinie TS1G6 wurde aus einem CD3+ und CD4+ T-Helferzellklon des Mausstammes C57BL/6 durch Interleukin (IL)-9-Transfektion etabliert (Uyttenhove et al., 1991). Bittner et al. (2000) charakterisierten die tumorigene Zelllinie TS1G6, die als *in vitro*-Modell des humanen ALK-negativen ALCL betrachtet werden kann, morphologisch und immunhistochemisch. Die Zelllinie wurde von Prof. H. Merz (Institut für Pathologie, Universität zu Lübeck) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2.5 *N-RAS*-transgene Modelle mit *Suv39h1*- oder *p53*-Defizienz

Braig et al. (2005) etablierten ein transgenes Modell, in dem E $\mu$ -*N-RAS*-transgene Mäuse mit *Suv39h1*- oder *p53*-deletierten Mäusen gekreuzt wurden. Die Rückkreuzung erfolgte in den Mausstamm C57BL/6.

Die in **Tab.6** aufgeführten Chromosomen-präparierten T-Zellen erkrankter Tiere wurden von Prof. C. Schmitt (Abteilung Hämatologie/Onkologie der Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt.

**Tab.6 Transgene Modelle**

Maus	Geschlecht	Lymphom-Genotyp	untersuchtes Material
# 1	m	<i>N-RAS</i> -Kontrolle	T-Zellen (Thymus)
# 2	m	<i>N-RAS</i> -Kontrolle	T-Zellen (Thymus)
# 3	w	<i>N-RAS/Suv39h1</i> -null	T-Zellen (Thymus)
# 4	w	<i>N-RAS/Suv39h1</i> -null	T-Zellen (Thymus)
# 5	w	<i>N-RAS/Suv39h1</i> -null	T-Zellen (Thymus)

# 6	m	<i>N-RAS/Suv39h1</i> -null	T-Zellen (Thymus)
# 7	w	<i>N-RAS/p53</i> -null	T-Zellen (Thymus)
# 8	m	<i>N-RAS/p53</i> -null	T-Zellen (Thymus)
# 9	m	<i>N-RAS/p53</i> -null	T-Zellen (Thymus)

### 2.1.2.6 Zelllinien *p18+/- (C-MYC)* und *p18+/- (H-Ras)*

Die Zelllinien *p18+/- (C-MYC)* und *p18+/- (H-RAS)* wurden aus MEF *p18*-heterozygoter Mäuse des Stammes C57BL/6 etabliert und zur Expression der Onkogene *H-RAS* und *C-MYC* *in vitro* transfiziert. Das Modell wurde von Prof. S. Kim (*National Creative Research Initiatives Center for ARS network*, Seoul, Korea) zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Zellkultur

Zur Inaktivierung der vorhandenen Faktoren des Komplementsystems wurde das fötale Kälberserum (FCS, Biochrom AG) 30min bei 56°C erhitzt.

Die Zellkultur erfolgte in Ø 10cm-Zellkulturschalen (Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden), die Zelllinie Molp-5 wurde auf *feeder*-Zellen in T25-Flaschen (Sarstedt, Nümbrecht) kultiviert. Die Bearbeitung der Zellkultur erfolgte an einer Sterilwerkbank (SterilGard Hood; The Baker Co., Inc., Sanford, USA) und die Kultivierung bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> (Brutschrank Cytoperm, Heraeus, Hanau).

Zur Vermeidung potentiell möglicher Langzeitkultur-bedingter chromosomaler Veränderungen wurden die Zelllinien maximal 4 Wochen kultiviert und in dieser Zeit die Chromosomenpräparation durchgeführt.

### 2.2.1 Kulturbedingungen humaner neoplastischer Zellen

Die Zelllinien Granta-519, NCEB-1 und JeKo-1 wurden in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Biochrom AG, Berlin) mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin (Biochrom AG) und 100U/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG) in Suspension kultiviert. Rec-1, KMS-12 PE, KMS-12 BM, SP-53 und SP-50B wurden in RPMI 1640 mit 20% FCS, 2mM L-Glutamin und 100U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zellen der Zelllinie NOP-2 wurden ebenfalls in RPMI 1640 mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml

Penicillin/Streptomycin und zusätzlich mit 2.4% HEPES (Biochrom AG) kultiviert. Dieses Medium wurde auch für die Zelllinie Molp-5 verwendet, die auf adhären wachsenden *feeder*-Zellen kultiviert wurde. Zum Passagieren wurden die *feeder*-Zellen mit PBS gewaschen, für 3-4min mit Trypsin/EDTA (Biochrom) bei 37°C bis zum Abrunden und Ablösen inkubiert, in Medium resuspendiert und verdünnt in ein neues Kulturgefäß überführt.

## **2.2.2 Kulturbedingungen muriner Zellen**

### **2.2.2.1 EL-4wt-Zellen und transduzierte Subklone**

Die neoplastischen EL-4wt-Zellen, die transduzierten Zellen und die reisolierten Zellen wurden in RPMI 1640, supplementiert mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat (Biochrom) und 100U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

### **2.2.2.2 BCR-ABL-transduzierte hämatopoetische Zellen**

Die retroviral transduzierte *BCR-ABL*-positive Zelllinie BM185wt und die derivativen Zelllinien BM185-gfp und BM185-ov-gfp wurden in DMEM (Biochrom) mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und 100U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

### **2.2.2.3 Zelllinie TS1G6**

Die Zelllinie TS1G6 wurde in RPMI 1640 mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und 100U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

### **2.2.2.4 Zelllinien *p18+/- (C-MYC)* und *p18+/- (H-RAS)***

Die Zelllinien wurden in RPMI 1640, supplementiert mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, und 100U/ml Penicillin/Streptomycin in T75-Kultuflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 4-5min mit Trypsin/EDTA bei 37°C bis zum Abrunden und Ablösen inkubiert, in 10ml Medium resuspendiert und verdünnt in ein neues Kulturgefäß überführt.

## **2.3 Zytogenetische und molekulargenetische Analysemethoden**

### **2.3.1 Chromosomenpräparation**

#### **2.3.1.1 Präparation humaner Chromosomen neoplastischer Zellen**

Für die Präparation der Chromosomen wurden die Zellen durch Zugabe von Colcemid (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einer Konzentration von 0.035µg/ml im Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Hierdurch werden proliferierende Zellen in der Metaphase arretiert. Die Colcemid-Inkubationszeit variierte, abhängig vom Proliferationsverhalten der Zellen, zwischen 1 und 24 Stunden. Die Inkubation in 0.075M KCl (Merck KgaA, Darmstadt) für 20min bei 37°C weitete die Zellen und erleichterte die Spreitung der Chromosomen. Es folgten 4-6 Waschschrirte mit Methanol:Essigsäure (Carnoy's Fixativ, 3:1) (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) und Zentrifugationsschritte für 10min bei 1.200rpm (Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau) bei RT. Die Zellsuspension wurde im Klimatron (Polymer, Kassel) bei einer konstanten Temperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 48% auf SuperFrost® Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgetropft. Die Objektträger wurden kurz zuvor mit Carnoy's Fixativ gereinigt. Die getropften Präparate wurden in einer Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) jeweils 3min dehydriert und vor der Hybridisierung mindestens 1d bei 37°C getrocknet.

#### **2.3.1.2 Präparation muriner Chromosomen**

Die Präparation muriner Metaphase-Chromosomen erfolgte in Analogie zur Präparation humaner Chromosomen (Pkt. 2.3.1.1). Bei Primärmaterial wurde die FCS-Konzentration im Zellkulturmedium als Proliferationsstimulus bei Zugabe des Colcemid auf 20% erhöht.

#### **2.3.1.3 Beurteilung der Präparate**

Die zytogenetische Untersuchung, insbesondere die Analyse komplex aberranter Karyotypen mittels spektraler Karyotypisierung erfordert qualitativ und quantitativ hochwertige Präparate. Die Bewertung der Metaphasen erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskop Axiostar plus mit 20er und 40er Objektiv (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena). Als qualitativ ausreichend wurde ein Präparat bewertet, wenn die

Chromosomen innerhalb einer Metaphase gut gespreitet und damit kaum überlagerten und zudem nicht zu stark kondensiert waren. An Metaphasen quantitativ ausreichend wurde ein Präparat bewertet, bei dem innerhalb des zu hybridisierenden Bereiches von  $\varnothing$  12mm mindestens 30 als auswertbar eingestufte Metaphasen lagen. Bei unzureichender Qualität und/oder Quantität der Metaphasen wurde die Chromosomenpräparation, meist unter verlängerter Colcemid- oder KCl-Inkubationszeit, wiederholt.

#### **2.3.1.4 Langzeitlagerung der Präparate**

Die Präparate wurden in Präparatekästen (Merck) unter Zugabe von Silica Gel Blau Trockenperlen (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe) in Folie eingeschweißt. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Unter diesen Bedingungen können die Präparate mehrere Jahre lagern. Zur Verwendung der Präparate wurden die Kästen vor dem Öffnen 30min bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut.

### **2.3.2 Beschreibung chromosomaler Veränderungen**

#### **2.3.2.1 Beschreibung chromosomaler Veränderungen des humanen Genoms**

Chromosomale Veränderungen wurden nach der ISCN Nomenklatur (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, 1995) beschrieben. Als klonal wurde eine Aberration bezeichnet, wenn diese in mindestens 3 Metaphasen detektiert werden konnte. Einzelaberrationen können spontan auftreten und werden als funktionell bedeutungslos angesehen. Sie blieben daher unberücksichtigt.

Zum Verständnis der zytogenetischen Terminologie sollen die im Anhang befindlichen **Tab.21** und **Tab.22** behilflich sein. Zudem sind in **Tab.20** ausgewählte Tumor-assoziierte Gene mit ihrer Funktion/Bedeutung, ihrer Lokalisation und den syntenen murinen Loci zusammengestellt. Informationen zu Tumor-assoziierten Genen und den damit verbundenden Erkrankungen wurden aus den Datenbanken [www.infobiogen.fr/services/chromcancer](http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer) und [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) erhalten. Diese Referenzen sind innerhalb der Arbeit nicht einzeln aufgeführt.

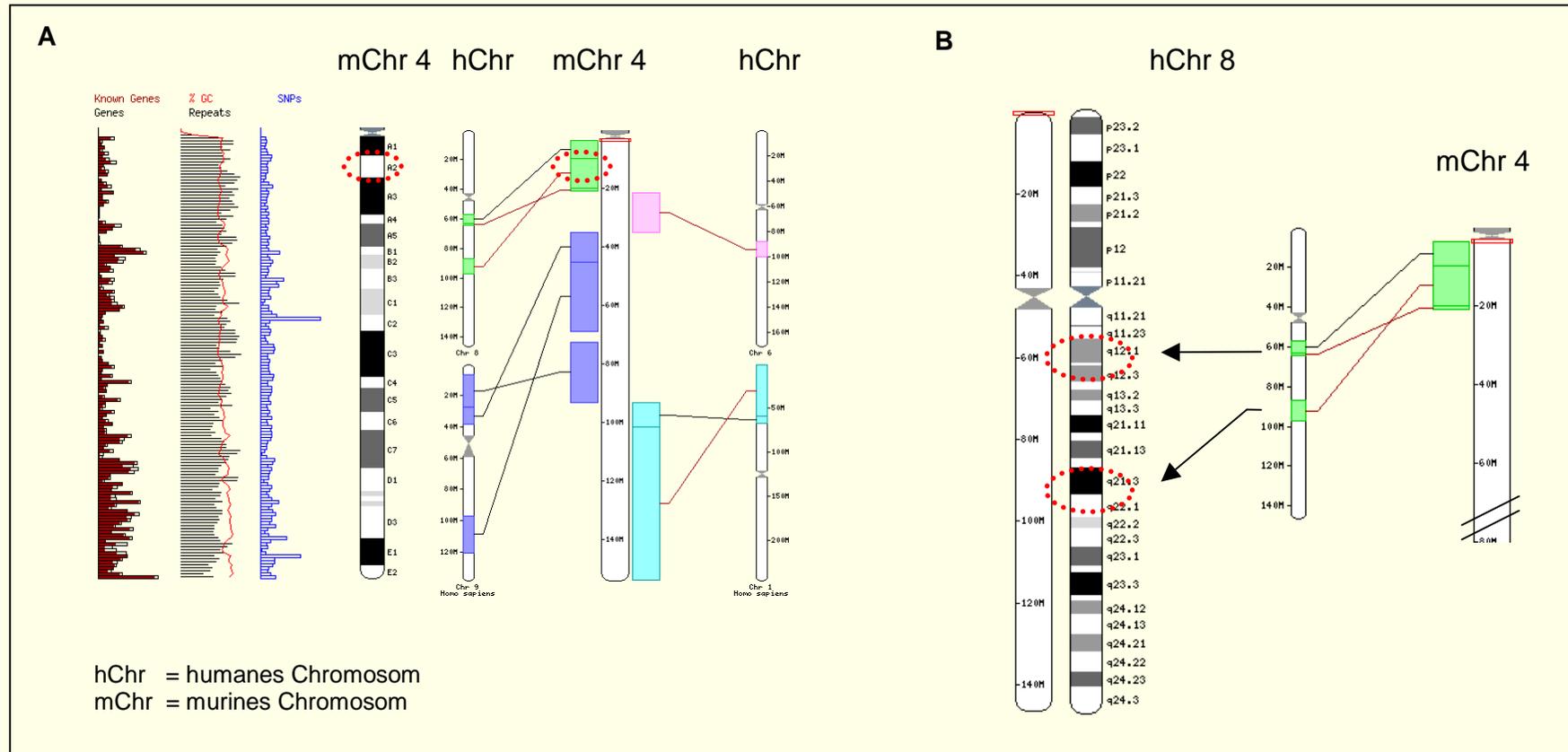
### 2.3.2.2 Berechnungen zur strukturellen chromosomalen Instabilität

Für die Betrachtung der strukturellen Instabilität der *in vitro*-Modelle der hämatologischen Neoplasien wurde die Anzahl der Bruchereignisse pro Metaphase in Relation zur Anzahl der in dieser Metaphase enthaltenen Chromosomen bestimmt. Damit war ein direkter Vergleich der Zelllinien, unabhängig vom Grad der Ploidie, möglich. Pro Zelllinie wurden 10 Metaphasen (Ausnahme: Rec-1 mit 9 Metaphasen) ausgewertet und hieraus der Mittelwert bestimmt.

Die hsr(18)(q?) in Granta-519, das trp(5)(q35) in Rec-1 sowie Markerchromosomen und Ergebnisse aus FISH-Untersuchungen blieben dabei unberücksichtigt. In den Zelllinien Molp-5 und Rec-1 wurden die Hauptklone und bei JeKo-1 der Primärklon betrachtet.

### 2.3.2.3 Beschreibung chromosomaler Veränderungen des murinen Genoms und Bestimmung syntener humaner Loci

Die Bruchpunkte der strukturellen chromosomalen Veränderungen des murinen Genoms wurden anhand der DAPI-„Bandendarstellung“ nach spektraler Karyotypisierung unter Verwendung des Bänderungsmodells des *Wellcome Trust Sanger Institute* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) bestimmt. Die Beschreibung chromosomaler Veränderungen des murinen Genoms erfolgte auf der Grundlage der *Rules for Nomenclature of Chromosome Aberrations* ([www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)). Die Datenbank des *Wellcome Trust Sanger Institute* wurde zudem zur Bestimmung der syntenen humanen Regionen verwendet (**Abb.8**).



**Abb.8** Exemplarische Darstellung für die Bestimmung syntener Regionen: Suche der syntenen humanen Regionen für den Lokus 4A2 des murinen Genoms unter Verwendung der Datenbank des *Wellcome Trust Sanger Institute* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org))

Die genomische DNA des Chromosoms 4 der Maus verteilt sich auf die Chromosomen 9, 1 (zusammen ca. 75%), 8 und 6 (zusammen ca. 25%) des humanen Genoms (**A**). Die Region A2 des murinen Chromosoms 4 teilt sich auf die humanen Regionen 8q12 und 8q21.3-8q22.1(**B**) auf.

### 2.3.3 Fluoreszenzbasierende Chromosomen- und Gen-analytische Methoden

#### 2.3.3.1 Fluoreszenz-R-Bandendarstellung humaner Chromosomen

Die Fluoreszenz-R-Bandendarstellung ist eine Technik, die regelmäßig in der Diagnostik angewendet wird. Die R-Bandendarstellung der Chromosomen erfolgte nach einem Standardprotokoll (Schlegelberger et al., 1999).

*Giemsalösung* 5ml Giemsa, 40ml 0,07M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck), 40ml 0,07M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck)

*Chromomycin* 10mg Chromomycin A3 (Sigma) in 30ml Gebrauchslösung (0,07M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,07M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5mM  $\text{MgCl}_2$  (Merck); pH 6,8)

*Methylgrün*

- *Stammlösung:* 1,75g Methylgrün (Sigma) in 100ml Mc Ilvaine's Puffer pH4,0 (0,1M Zitronensäure (Merck), 0,2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- *Gebrauchslösung:* 1ml Methylgrün in 19ml 0,1M Zitronensäure und 30ml 0,2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

##### 2.3.3.1.1 Giemsafärbung

Die Präparate wurden vor der Fluoreszenzfärbung der Chromosomen 10min in Giemsa gefärbt, kurz in Wasser gespült, luftgetrocknet und auf einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 Imaging; Zeiss)-assoziierten Scanner-Tisch im Durchlicht unter Verwendung der Software Metafer4 (Metasystems, Altlußheim) automatisiert nach Metaphasen abgesucht und die Aufnahmen gespeichert. Die Präparate wurden in einer absteigenden Ethanolreihe (99%, 95%, 70% und 50%) bei RT entfärbt und 15min in Fixativ gewaschen.

### 2.3.3.1.2 Fluoreszenzfärbung

Die Präparate wurden 30min in Chromomycin A3 gefärbt. Das überschüssige Chromomycin wurde unter fließendem Wasser abgespült und die Präparate 5min mit Methylgrün gegengefärbt. Überschüssiges Methylgrün wurde mit Glycerin (Merck) abgespült und die Präparate in Glycerin eingebettet.

### 2.3.3.1.3 Bildaufnahme und Karyotypisierung

Die Bildaufnahme erfolgte mit einem Axioskop 2 Imaging-Fluoreszenzmikroskop und die Karyotypisierung unter Verwendung der Ikaros-Software (Metasystems). Mit der beschriebenen Methode der R-Bänderung wird ein 400 Banden-Niveau als Auflösung erreicht. Je nach Komplexität der Aberrationen wurden zwischen 10 und 25 Metaphasen ausgewertet.

### 2.3.3.2 *In situ*-Hybridisierungen

DNA-Fragmente, bei denen die Nukleotide mit fluoreszierenden Reportermolekülen modifiziert werden (DNA-Sonde), steigern das Auflösungsvermögen und damit die Sensitivität Chromosomen-analytischer Methoden enorm. Die zu untersuchende genomische DNA wird hierbei chemisch oder physikalisch denaturiert und hybridisiert nach Zugabe einer ebenfalls denaturierten DNA-Sonde im komplementären Bereich.

Verschiedene Hybridisierungstechniken basieren auf diesem Prinzip und ermöglichen die Detektion von Gen-Einzelkopien, repetitiven Sequenzen oder ganzer Chromosomen. Im Folgenden wird auf die in dieser Arbeit verwendeten molekulargenetischen Techniken der klassischen Fluoreszenz- *in situ*-Hybridisierung (FISH) und der spektralen Karyotypisierung (SKY) eingegangen. Die **Tab.7** zeigt eine Aufstellung über die eingesetzten Fluoreszenz-basierenden Techniken und deren Auflösungsgrenzen.

**Tab.7 Molekularzytogenetische Analysemethoden**

Methoden	Detektion	Auflösung
<b>R-Banden-darstellung</b>	numerische und strukturelle Aberrationen	5-10Mb
<b>FISH</b>	numerische Aberrationen (Monosomien, Trisomien), Deletionen und Amplifikationen einzelner Gene, spezifischer Translokationsnachweis	100kb
<b>SKY</b>	numerische Aberrationen, strukturelle Aberrationen (balancierte und unbalancierte Translokationen, komplexe Rearrangements), Markerchromosomen, kryptische Veränderungen	1,5Mb

### 2.3.3.2.1 Fluoreszenz- *in situ*-Hybridisierung (FISH)

Bei der klassischen Fluoreszenz- *in situ*-Hybridisierung werden Interphasekerne und Metaphase-Chromosomen mit fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden hybridisiert, die den gezielten Nachweis von Translokationen, Veränderungen in der Kopienzahl einzelner Gene (Deletionen, Amplifikationen) oder ganzer Chromosomen sowie die Untersuchung nicht-kodierender Bereiche wie Telomerregionen ermöglichen. Für diese Untersuchungen werden genspezifische Sonden, Zentromer- und Telomersonden eingesetzt. Zudem gibt es WCP (*whole chromosome painting*)-Sonden, die ein gesamtes Chromosomenpaar markieren und mit Metaphase-Chromosomen hybridisiert werden.

Eine Vielzahl von DNA-Sonden zur Charakterisierung Tumor-assoziiertes Gene des humanen Genoms sind kommerziell erhältlich. Dies sind Sonden, die eine spezifische Untersuchung, vor allem von Onkogenen und TSG ermöglichen.

#### 2.3.3.2.1.1 Gen- und lokusspezifische Analysen von *in vitro*-Modellen humaner hämatologischer Neoplasien

Für die Untersuchung Tumor-assoziiertes Gene in den MCL- und MM-Zelllinien wurden die in der **Tab.8** gezeigten kommerziellen fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) verwendet.

**Tab.8 DNA-Sonden für FISH an humanen Chromosomen**

Sonde	Lokus	Sondentyp	Involvierte(s) Gen(e)	Fluoreszenz- markierung	Größe
LSI 13 (RB1)	13q14	SC	<i>RB</i>	SO	~220kb
LSI p16/CEP 9	9p21	DC	<i>P16</i>	SO	~190kb
	Cep9		—	SG	k.A.
LSI p53	17p13.1	SC	<i>P53</i>	SO	~145kb
LSI IGH/BCL2	14q32	DC, DF, Trans	<i>IgH</i>	SG	~1.5Mb
	18q21		<i>BCL2</i>	SO	~750kb
LSI BCL6	3q27	DC, BAR	flankiert <i>BCL6</i>	SG	~600kb
				SO	~300kb
LSI D20S108	20q12	SC	—	SO	~170kb
LSI Myc	8q24	DC, BAR	<i>C-MYC</i>	SO	~260kb Cen
				SG	~400kb Tel

SC= *single color probe*; DC= *dual color probe*; DF= *dual fusion probe*; Trans= *translocation probe*; BAR= *break apart rearrangement probe*; SO= *SpectrumOrange*; SG= *SpectrumGreen*; k.A. = keine Angabe des Herstellers, Tel= *Telomer*; Cen= *Zentromer*

### 2.3.3.2.1.1.1 *In situ*-Hybridisierung und Signaldetektion

*Hybridisierungsansatz:* 0,5µl DNA-Sonde (Vysis), 0,5µl Wasser, 3µl Hybridisierungspuffer (Vysis)

*4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)* (Sigma, Steinheim):

- Stocklösung: 1mg DAPI in 5ml Wasser lösen und aliquotiert (a 10µl) bei -20°C einfrieren
- Gebrauchslösung: 10µl Stocklösung in 50ml 2xSSC (Vysis); pH7,0 (lichtgeschützt 2 Wochen bei 4°C gelagert verwendbar)

Der Hybridisierungsansatz von 4µl wurde auf den zu hybridisierenden Bereich des Präparates appliziert und mit einem Deckglas Ø 12mm (Marienfeld GmbH & Co. KG,

Lauda-Königshofen) bedeckt. Der Deckglasrand wurde mit Fixogum (Marabuwerke GmbH & Co. KG, Tamm) abgedichtet. Die Chromosomen- und Sondendenaturierung erfolgte auf einem Heizblock (cyclone 96, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 80°C für 10min und die Hybridisierung über Nacht bei 37°C (Brutschrank Heraeus Function Line B6; Heraeus, Hanau) in einer Feuchtkammer unter Lichtschutz. Nach dem Waschen in 0.4% SSC für 2x2min wurden die Chromosomen 10min bei RT mit DAPI gegengefärbt, die Präparate 5min in Wasser gewaschen und in Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) mit einem 24x26mm Deckglas (Menzel-Gläser) eingebettet.

#### 2.3.3.2.1.1.2 Fluoreszenzmikroskopie, Bildaufnahme und Bearbeitung

Die Präparate wurden am Epifluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus (Zeiss) unter Verwendung der Filtersets FITC (SG markierte DNA-Sonde), SO (SO markierte DNA-Sonde) und DAPI (AHF Analysentechnik, Tübingen) ausgewertet.

Die Bildaufnahmen erfolgten mit einem Mikroskop-assoziierten DELL Optiplex GX260 Intel(R) Pentium(R) 4 CPU, 2.00GHz mit 512MD RAM-Speicher und der FISHView EXPO 2.0-Software nach Angaben des Herstellers (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha`Emek, Israel).

#### 2.3.3.2.1.2 Generierung von DNA-Sonden für FISH an murinen Chromosomen und Interphasekernen

DNA-Sonden für FISH am murinen Genom wurden aus kommerziellen BACs (*bacterial artificial chromosomes*) (Children´s Hospital Oakland Research Institute, USA) generiert. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Sonden zeigt **Tab.9**.

**Tab.9 Generierte DNA-Sonden für FISH am murinen Genom**

BAC-Klon	Lokus	DNA-Markierung	Antikörper	Größe
RP23-382J5	XF2-F3	SpectrumGreen-dUTP	—	~200kb
RP24-488H15	15D3 ( <i>c-myc</i> )	Biotin-16-dUTP	Streptavidin-Cy5	~200kb

### 2.3.3.2.1.2.1 Anzucht von Kolonien

Die BACs wurden auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C kultiviert. Von den erhaltenen Kolonien wurden je 2 Klone gepickt, in 3ml LB-Medium vorkultiviert und in einem 200ml-Ansatz über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, USA) inkubiert.

*Agarplatten:* 16g Bacto-Agar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) in  
1l LB-Medium + 20µg/ml Chloramphenicol (Calbiochem, USA)

*LB-Medium:* 10g Bacto-Trypton (Becton Dickinson), 5g Bacto-Hefeextrakt  
(Becton Dickinson), 7g NaCl (Merck), ad 1l Wasser, 20µg/ml  
Chloramphenicol

### 2.3.3.2.1.2.2 DNA-Isolierung und Aufreinigung

Für die DNA-Isolierung im präparativen Maßstab wurde eine 200ml über Nacht-Kultur bei 37°C angesetzt und die DNA nach dem Perfectprep Plasmid Maxi-Protokoll (Eppendorf, Hamburg) isoliert und aufgereinigt. Die DNA-Reinheits- und Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Photometer DU<sup>®</sup> 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld).

### 2.3.3.2.1.2.3 Oligomarkierung (*random primed labelling*)

Das als *random-primed labelling* bezeichnete Verfahren dient der direkten oder indirekten DNA-Markierung der DNA-Sonden, die in Fluoreszenz- *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt werden. Als Primer wird eine aus vorrangig Hexameren bestehende Oligonukleotidmischung mit sämtlich denkbaren Sequenzkombinationen eingesetzt, so dass etwa alle 80 bis 100 Basen ein Primer an die Matrize bindet. Das Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase mit seiner 5´->3´-Polymeraseaktivität katalysiert dann den Einbau der markierten Nukleotide.

Für das *random priming* wurden 200ng BAC-DNA auf 24µl mit Wasser verdünnt und zusammen mit 20µl (3µg/µl) *Random primers* (Invitrogen, Karlsruhe) 5min bei 96°C denaturiert. Nach sofortigem Abkühlen auf Eis wurden dem Ansatz je 0,5µl 10mM dATP, dCTP, dGTP, 0,25µl 10mM dTTP (Invitrogen), 2,5µl 1mM X-dUTP mit X=

SpectrumOrange™ oder SpectrumGreen™ (Vysis) oder Biotin-16-dUTP (Roche) sowie 0,75µl Wasser zugegeben. Nach Zusatz von 1µl (40U/µl) Klenow-Fragment (Invitrogen) wurde der Ansatz 3h bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Markierungsreaktion mit 5µl Stop Buffer (Invitrogen) gestoppt.

#### **2.3.3.2.1.2.4 Aufarbeitung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden**

Die DNA-Sonden wurden über eine Microcon Säule YM 30 (Millipore GmbH, Schwalbach) aufgereinigt. Dazu wurde das Gesamtvolumen aus der Oligomarkierung mit 380µl TE-Puffer auf die Säule pipettiert, 12min bei 10.000rpm zentrifugiert, mit weiteren 380µl TE-Puffer und Zentrifugation für 8min bei 13.000rpm gewaschen. Die DNA-Sonden wurden durch Zentrifugation bei 10.000rpm für 2min eluiert und auf 50µl mit Wasser verdünnt. Hieraus wurde der Hybridisierungsmix angesetzt.

<i>TE-Puffer:</i>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer (10mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanacetat, Merck; 1mM EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat, Merck); pH 8,0
<i>Hybridisierungspuffer:</i>	50% Formamid, 2xSSC, 10% Dextransulfat (Sigma)
<i>Hybridisierungsansatz:</i>	5µl DNA-Sonde, 17µl Hybridisierungspuffer, 1µl Heringssperma (Invitrogen), 2µl murine Cot-1-DNA (Invitrogen)

#### **2.3.3.2.1.2.5 Hybridisierung**

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden 5µl des Hybridisierungsansatzes verwendet. Die Denaturierung und Hybridisierung wurde wie in Pkt. 2.3.3.2.1.1.1 beschrieben durchgeführt.

#### **2.3.3.2.1.2.6 Posthybridisierung und Fluoreszenzmikroskopie**

Die hybridisierten Präparate wurden 2x2min in 0,4xSSC bei 75°C gewaschen, 10min in DAPI bei RT inkubiert, 5min in Wasser gewaschen und in 2 Tropfen Vectashield und einem 24x60mm Deckglas eingebettet. Die mikroskopische Auswertung erfolgte wie in Pkt. 2.3.3.2.1.1.2 beschrieben. Bei Verwendung von Sonden mit Fluoreszemission im

IR-Bereich wurden die Präparate wie in Pkt.2.3.3.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet und analysiert.

### 2.3.3.2.1.3 WCP (*Whole Chromosome Painting*)-FISH an murinen Chromosomen

Die WCP (*Whole Chromosome Painting*)-FISH ermöglicht, einzelne Chromosomenpaare fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. Wie auch bei der SKY sind für die WCP-FISH Metaphase-Chromosomen erforderlich. Die DNA wird jedoch oft mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Die verwendeten *painting*-Sonden wurden freundlicherweise von Frau Prof. Evelin Schröck (Institut für Medizinische Genetik, Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten DNA-Sonden und die für die Detektion verwendeten Antikörper sind in **Tab.10** aufgeführt. Die für die WCP-FISH verwendeten Präparate wurden wie in Pkt. 2.3.1.2 beschrieben angefertigt.

**Tab.10 WCP-Sonden für FISH an murinen Chromosomen**

WCP-Sonde	DNA-Markierung	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Emissionspeak [nm]
Chr.1	Rhodamin	—	—	570
Chr.2	Biotin-16-dUTP	Streptavidin-Cy5	—	670
Chr.3	Digoxigenin-dUTP	Maus $\alpha$ Digoxin	Cy5.5 $\alpha$ Maus	694
Chr.6	Digoxigenin-dUTP	Maus $\alpha$ Digoxin	Cy5.5 $\alpha$ Maus	694
Chr.7	SpectrumOrange-dUTP	—	—	588
Chr.8	TexasRed	TexasRed $\alpha$ Maus	—	620
Chr.11	Biotin-16-dUTP	Avidin -FITC	—	525
Chr.14	Biotin-16-dUTP	Avidin -FITC	—	525

### **2.3.3.2.1.3.1 Hybridisierung**

Zur DNA-Fällung wurde der Hybridisierungsmix 1h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt, 30min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13.000rpm zentrifugiert, mit 70%igem eiskalten Ethanol 5min gewaschen, bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13.000rpm zentrifugiert und das DNA-Pellet bei RT getrocknet. Die DNA wurde in 6 $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter leichtem Schütteln 1h resuspendiert, 6min bei  $87^{\circ}\text{C}$  denaturiert und 30min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Metaphase-Chromosomen wurden 1,5min bei  $72^{\circ}\text{C}$  in 70%igem Formamid/1,5xSSC denaturiert, in einer aufsteigenden eiskalten Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3min inkubiert und bei RT getrocknet. In einer Hybridisierung wurden 2 bis maximal 3 Sonden zusammen verwendet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer Feuchtkammer bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

*Hybridisierungsmix für 2 DNA-Sonden:* je 2 $\mu\text{l}$  DNA-Sonde, 10 $\mu\text{l}$  murine Cot-1- DNA  
1 $\mu\text{l}$  Heringssperma, 0,5 $\mu\text{l}$  NaAc (Natriumacetat, Merck), 52 $\mu\text{l}$  Ethanol

*Hybridisierungsmix für 3 DNA-Sonden:* je 3 $\mu\text{l}$  DNA-Sonde, 10 $\mu\text{l}$  murine Cot-1-DNA,  
1 $\mu\text{l}$  Heringssperma, 0,5 $\mu\text{l}$  NaAc, 60 $\mu\text{l}$  Ethanol

### **2.3.3.2.1.3.2 Posthybridisierung und Fluoreszenzmikroskopie**

Bei der Verwendung einer indirekten Fluoreszenzmarkierung (Cy5- und Cy5.5-Detektion) wurde die Posthybridisierung wie in Pkt.2.3.3.2.2.3 beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenzmikroskopie, die Bildaufnahme und die Bearbeitung erfolgte unter Verwendung der Filtersets Cy5 und Cy 5.5 (AHF) wie in Pkt. 2.3.3.2.1.1.2 erläutert.

### **2.3.3.2.2 Spektrale Karyotypisierung (SKY)**

Die spektrale Karyotypisierung (SKY) ist eine molekulargenetische Technik, die es ermöglicht, die Chromosomen eines Chromosomensatzes farblich differenziert und simultan darzustellen. Die Methode wurde erstmalig 1996 von Schröck et al. für humane Chromosomen und wenige Monate später von Liyanage et al. (1996) für murine Chromosomen publiziert, die damit einen weiteren Meilenstein in der zytogenetischen

Analyse legen. Insgesamt 5 Fluoreszenzfarbstoffe können in ihrer Kombination 31 ( $2^n-1$  mit  $n=5$ ) Farbvarianten bilden die ausreichen, um 22 Autosomen und 2 Gonosomen des humanen Chromosomensatzes als auch einen murinen Chromosomensatz mit 19 Autosomen und 2 Gonosomen darzustellen.

Physikalisch beruht die SKY darauf, dass die Gesamtfluoreszenz eines Objektes mittels Sagnag-Interferometer und CCD-Kamera aufgenommen wird. Eine Fourier-Transformation ordnet jedem Datenpunkt (Pixel) des erhaltenen Interferogramms ein Spektrum zu. Die Gesamtheit der Datenspektren ergibt ein Falschfarbenbild. Jeder Punkt des Falschfarbenspektrums wird durch ein algorithmisches Verfahren in ein klassifiziertes Farbbild verrechnet. Das klassifizierte Bild kann dann softwareunterstützt karyotypisiert werden (**Abb.9**).

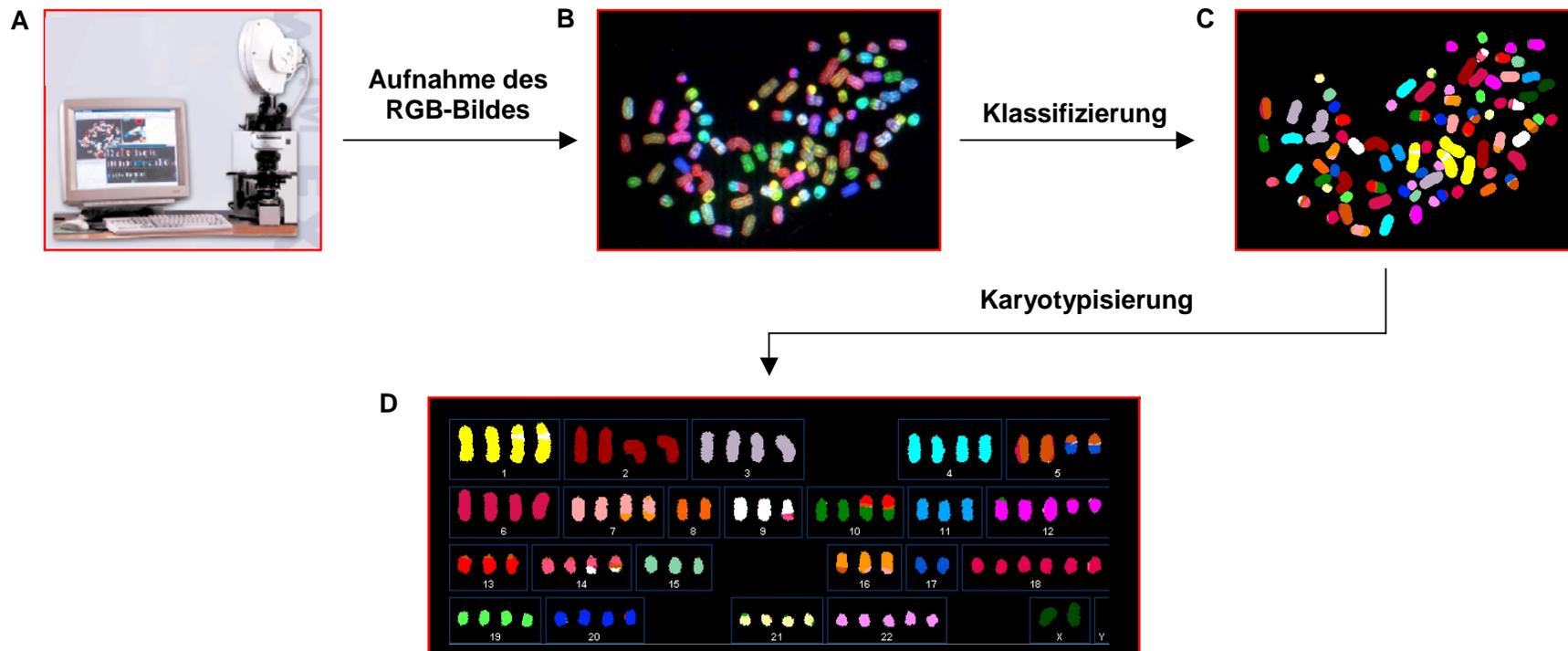
#### **2.3.3.2.2.1 Apparative Ausstattung**

Die für die fluoreszenzmikroskopischen Bildaufnahmen und –bearbeitungen erforderlichen Hardware- und Softwarekomponenten wurden von der Firma ASI (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha`Emek, Israel) aufgebaut und installiert.

##### **2.3.3.2.2.1.1 Hardwarekomponenten**

Die Analysen erfolgten an einem Epifluoreszenz-Mikroskop Axioskop 2 plus (Zeiss), ausgerüstet mit einem SpectraCube® SD-200-Interferometer (ASI) und einer hochauflösenden CCD (*charge coupled device*)-1300D-Kamera, die mit einer Auflösung von 1280 (horizontal) x 1024 (vertikal) effektiver Pixel und einer Kapazität von bis zu 12.5 Bilder/sec hochauflösende Bilder generiert. Der verwendete Fluoreszenzfilter wurde speziell für die spektrale Karyotypisierung entwickelt und erlaubt die zeitgleiche Extinktion als auch die zeitgleiche Emission verschiedener Fluoreszenzfarben.

Das System ist zudem mit zwei Mikroskopleuchten ausgerüstet. Eine Mikroskopleuchte umfasst die Komponenten Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100 W/2 (Osram GmbH, München) Kollektor und ein elektronisches Vorschaltgerät ebq 100 isolated (Zeiss) und wurde für die Fluoreszenzanregung von FISH-Präparaten und zur Aufnahme der DAPI-Bilder bei der SKY verwendet, bei denen Fluorochrome mit Extinktionswerten von ca. 450nm bis 650nm verwendet wurden.



**Abb.9 Spektrale Karyotypisierung: Von der Aufnahme eines Spektralbildes bis zum Karyogramm**

Die Einheit aus Epifluoreszenzmikroskop, SKY-Filterset, CCD-Kamera und SpectraCube (Sagnag-Interferometer) und den Softwareprogrammen zur spektralen Karyotypisierung (A) ermöglichen die Aufnahme der Gesamtfluoreszenz eines Objektes (Metaphase-Chromosomen) in RGB (Rot-Grün-Blau)-Farben (B). Das so entstandene Falschfarbenbild wird durch ein algorithmisches Verfahren in ein klassifiziertes Farbbild verrechnet (C). Dieses klassifizierte Bild kann in einem weiteren Schritt karyotypisiert werden. Auf diese Weise können numerische als auch strukturelle chromosomale Veränderungen detektiert werden (D).

Eine zweite Mikroskopleuchte, bestehend aus einer Xenon-Kurzbogenlampe XBO 75 W/2 (Osram), Kollektor und Vorschaltgerät ebx 75 *isolated* für N XBO 75 (Zeiss) wurde bei SKY-Präparaten verwendet. Die Intensität der Lampen verringert sich mit zunehmender Betriebsdauer, weshalb die Quecksilberlampe nach 300h Brenndauer und die Xenon-Lampe nach 400h Brenndauer gewechselt werden.

Die Xenonlampe erreicht, im Unterschied zur Quecksilberdampf Lampe, eine fast gleichmäßige Fluoreszenzanregung der Fluorochrome über einen Wellenlängenbereich von 500nm bis 800nm. Damit kann eine optimale Detektion der IR (Infrarot)-Signale gewährleistet werden.

Für die computergestützte Bildaufnahme und -bearbeitung wurde ein DELL Optiplex GX260 Intel(R) Pentium(R) 4 CPU, 2.00GHz Prozessor mit 512MD RAM-Speicher und 21" Monitor verwendet.

#### **2.3.3.2.2.1.2 Softwarekomponenten für die Bildaufnahme und Karyotypisierung**

##### ***Case Data Manager (CDM)***

Als Datenbank für die Bildaufnahmen, -analysen und Datenspeicherung wurde der CDM (*Case Data Manager*) EXPO 2.0 (ASI) verwendet. Hierin wurde für jedes Präparat ein Ordner generiert und die entsprechenden Programme zur Bildaufnahme, -bearbeitung und -analyse für SKY und FISH geöffnet.

##### **SkyView 2.0**

Der Prozess der spektralen Karyotypisierung erfordert die SkyView 2.0 Software (ASI). Hierüber erfolgt die Bearbeitung der Bilder, die Karyotypisierung und damit die Auswertung der Daten. Zu beachten ist die Wahl des *ctb.file* für humane (human.ctb) oder murine Chromosomen (mouse.ctb). Dieser beinhaltet die Informationen für die Klassifizierung der Chromosomen in Abhängigkeit von der Spezies.

Unterschiede in der Klassifizierungsfarbe können sich in einer softwareinternen Umstellung begründen und bedeuten keine Falschklassifizierung (Beispiel: Chromosom X klassifiziert in **Abb.22** blau und in **Abb.26** grün).

### 2.3.3.2.2 Methodische Durchführung

Es wurden Kits für humane (SkyPaint™ Kit DNA H-10) und murine Chromosomen (SkyPaint™ Kit DNA M-10) der Firma ASI verwendet. Die Präparate wurden wie in Pkt. 2.3.1 beschrieben angefertigt. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und das Markierungsschema für humane und murine Chromosomen sind in **Tab.11** gezeigt.

**Tab.11 Markierungsschema der DNA-Sonden für die spektrale Karyotypisierung humaner und muriner Chromosomen (A) und Absorptions- und Emissionswerte der verwendeten Fluorochrome (B).**

**A**

		Chromosom																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
human	A			+		+				+		+		+		+			+	+	+		+	+	
	B	+				+	+	+					+		+	+	+		+				+		
	C	+		+	+		+	+			+	+				+		+		+			+		+
	D	+		+	+	+	+		+	+		+		+			+		+				+		+
	E		+			+	+			+	+		+										+	+	+
murin	A	+		+	+	+		+						+	+	+					+	+			
	B				+		+	+			+							+	+		+				
	C	+	+			+					+	+	+		+			+			+				
	D	+			+			+					+	+		+		+		+		+		+	
	E		+	+			+		+				+		+					+		+		+	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y	-	-	-
		Chromosom																							

**B**

	Fluorochrom	Absorption [nm]	Emission [nm]
<b>A</b>	Rhodamin	550	570
<b>B</b>	Texas Red	596	620
<b>C</b>	Cy5	650	670 (IR)
<b>D</b>	FITC	495	525
<b>E</b>	Cy5.5	675	694 (IR)

### 2.3.3.2.2.1 Vorbehandlung der Präparate

In Abhängigkeit von der Zytoplasmamenge wurden die Präparate vorbehandelt. Hierzu erfolgte die Äquibrierung des Präparates in 2xSSC (pH 7,0) bei RT, Inkubation mit 120µl RNase A (Quiagen, Hilden) in einer Konzentration von 0,1mg/ml in 2xSSC unter einem 24x60mm Deckglas für 45min bei 37°C und Waschen für 3x5min in 2xSSC. Das Präparat wurde 2-5min bei 37°C in Pepsin/HCl inkubiert und in 1xPBS gewaschen. Je nach Bewertung des Präparates am Phasenkontrastmikroskop wurde die Inkubation in Pepsin/HCl wiederholt oder das Präparat weiter aufgearbeitet. Dazu wurde 2x5min in 1xPBS, 1x5min in PBS/MgCl<sub>2</sub>, 10min in Formaldehyd und 1x5min in 1xPBS bei RT gewaschen. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe für je 3min bei RT wurde das Präparat bei RT getrocknet.

*Pepsin/HCl:* 5µl Pepsin (Sigma) (c= 100mg/ml) in 100ml 0,01M HCl (Merck)

*PBS/MgCl<sub>2</sub>:* 5ml 1M MgCl<sub>2</sub> (Merck), 95ml 1xPBS (Biochrom)

*Formaldehyd:* 1,35ml 37%iges Formaldehyd (Merck), 48,65ml PBS/MgCl<sub>2</sub>

Bei geringen Zytoplasmamengen wurden die Präparate nicht vorbehandelt. Hier konnte die Hybridisierung direkt erfolgen.

### 2.3.3.2.2.2 DNA-Denaturierung und Hybridisierung

In Abhängigkeit von der Anzahl der Metaphasen wurde mit 5µl SKY-Kit (Ø 12mm Deckglas) oder 10µl SKY-Kit (18x18mm Deckglas) hybridisiert.

Die SKY-Kit-DNA wurde bei 80°C für 7min denaturiert und 1h bei 37°C vorinkubiert. Die zu hybridisierende DNA wurde bei 72°C für 1,5min denaturiert und durch eine eiskalte Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) für je 3min fixiert. Nach Trocknung des Präparates wurde die denaturierte SKY-Kit-DNA mit den denaturierten Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte für 48-72h in einer Feuchtkammer bei 37°C unter Lichtschutz.

Alternativ erfolgte die Denaturierung der SKY-Kit-DNA zusammen mit den Metaphase-Chromosomen. Dazu wurde die SKY-Kit-DNA direkt auf den zu hybridisierenden Bereich des Präparates pipettiert, mit einem Deckglas versehen und nach Versiegelung mit

Fixogum 10min bei 80°C auf einem Heizblock (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) danaturiert und wie beschrieben 48-72h in einer Feuchtkammer bei 37°C unter Lichtschutz hybridisiert.

### 2.3.3.2.2.3 Detektion der Fluoreszenzsignale

Die Fluorochrome Rhodamin, Texas Red und FITC sind nach Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge direkt fluoreszenzaktiv. Dagegen wurden die biotinylierten Nukleotide über die fluoreszierenden Sekundäntikörper Streptavidin-Cy5 (Amersham Bioscience, Freiburg) und die Digoxigenin-markierten Nukleotide über einen monoklonalen Antikörper Maus anti Digoxin (Sigma) und nachfolgend einem Cy5.5-konjugierten Ziege anti Maus IgG-Antikörper (Sigma) detektiert. Cy5 und Cy5.5 emittieren Licht im IR-Bereich.

*Blockingreagenz:* 3% (w/v) BSA (Sigma) in 4xSSC/Tween 20

*4xSSC/Tween 20:* 100ml 20xSSC, 400ml Wasser; pH 7,0;  
0,5ml Tween 20 (Merck)

*Antifade (1,4-phenylenediamine):* 50mg Antifade (Sigma) in 2ml 1xPBS lösen, pH-Wert mit Carbonat-Bicarbonat-Puffer auf pH 8,0 einstellen, auf 5ml mit 1xPBS auffüllen, mit 45ml 6%igem Glycerin (Merck) mischen (lichtgeschützt) und aliquotiert bei -20°C einfrieren (3 Monate verwendbar)

*Carbonat-Bicarbonat-Puffer:* 10ml 0,5M Natriumbicarbonat (Sigma), pH 8,13 und 40ml 0,5M Natriumcarbonat (Sigma), pH 11,32; sterilfiltriert

Die Signaldetektion wurde, soweit möglich, unter Lichtschutz der Präparate durchgeführt. Nach Entfernung des Fixogums und des Deckglases wurde das Präparat 3x5min bei 45°C in 50% Formamid/2xSSC, 3x5min bei 45°C in 1xSSC, kurz bei 45°C in

4xSSC/Tween 20 gewaschen und 30min mit Blockingreagenz in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert. Nach kurzem Waschen in 4xSSC/Tween 20 wurde das Präparat mit 120µl Antikörperlösung (Maus anti Digoxin + Streptavidin-Cy5; vor Gebrauch 3min bei 13.000rpm zentrifugiert, Überstand 1:200 in 4xSSC/Tween 20 verdünnt) 45min in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert, 3x5min in 4xSSC/Tween 20 und mit dem Zweitantikörper (Cy5.5-konjugierter Ziege anti Maus IgG-Antikörper; vor Gebrauch 3min bei 13.000rpm zentrifugiert, Überstand 1:200 in 4xSSC/Tween 20 verdünnt) 45min in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert. Das Präparat wurde dann 3x5min in 4xSSC/Tween 20 unter Schütteln gewaschen, 10min bei RT in DAPI inkubiert, 5min in Wasser gewaschen, in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) je 3min dehydriert, getrocknet und mit 35µl Antifade unter einem 24x60mm Deckglas eingebettet. Alternativ wurden die Präparate nach dem Waschen mit 2 Tropfen Vectashield eingebettet.

Das Präparat wurde dann fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Bildaufnahmen erfolgten innerhalb von 2 Tagen. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Chromosomale Instabilität in *in vitro*-Modellen humaner hämatologischer Neoplasien

Die Translokation t(11;14)(q13;q32) wird als primäres Ereignis in der Pathogenese der MCL betrachtet, wird aber auch in 15-20% der MM beobachtet. Für die maligne Zelltransformation sind sekundäre chromosomale Veränderungen erforderlich. Für die Untersuchung der sekundären chromosomalen Instabilität dieser B-NHL-Entitäten wurden etablierte *in vitro*-Modelle gewählt, die durch die primäre Translokation t(11;14)(q13;q32) und sekundäre chromosomale Defekte charakterisiert sind. Insgesamt wurden 7 MCL- und 4 MM-Zelllinien untersucht.

##### 3.1.1 Nachweis des *CCND1/IgH*-Rearrangements als primäres chromosomales Ereignis

Die Erstbeschreibungen der Zelllinien (**Tab.2**) beinhalten die Karyotypen, die durch die zytogenetische Untersuchung nach G-Bandendarstellung erstellt wurden. Alle hier ausgewählten *in vitro*-Modelle wurden als *CCND1/IgH*-Rearrangement-positiv beschrieben. Dies wurde zunächst überprüft.

In den MCL-Zelllinien Granta-519, SP-50B, SP-53, NCEB-1, Rec-1 und HBL-2 wurde die klassische Form, die balancierte Translokation t(11;14)(q13;q32), mit der Fluoreszenz R-Bandendarstellung detektiert und damit zytogenetisch bestätigt.

In der MCL-Zelllinie JeKo-1 konnten Jeon et al. (1998) die Translokation t(11;14)(q13;q32) in der G-Bandendarstellung nicht nachweisen. Dagegen gelang ihnen der Nachweis des *CCND1/IgH*-Fusionstranskriptes molekularbiologisch mittels PCR. Die hier durchgeführte R-Bandendarstellung und die SKY-Analyse (**Abb.10A**) zeigten auch keine typische Translokation t(11;14)(q13;q32).

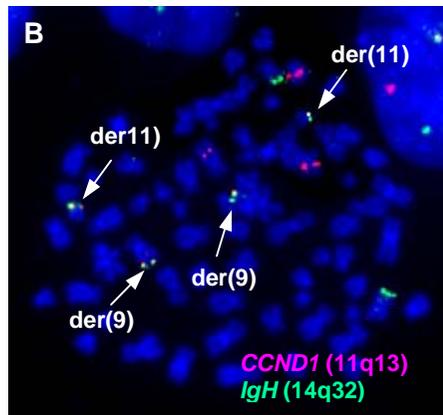
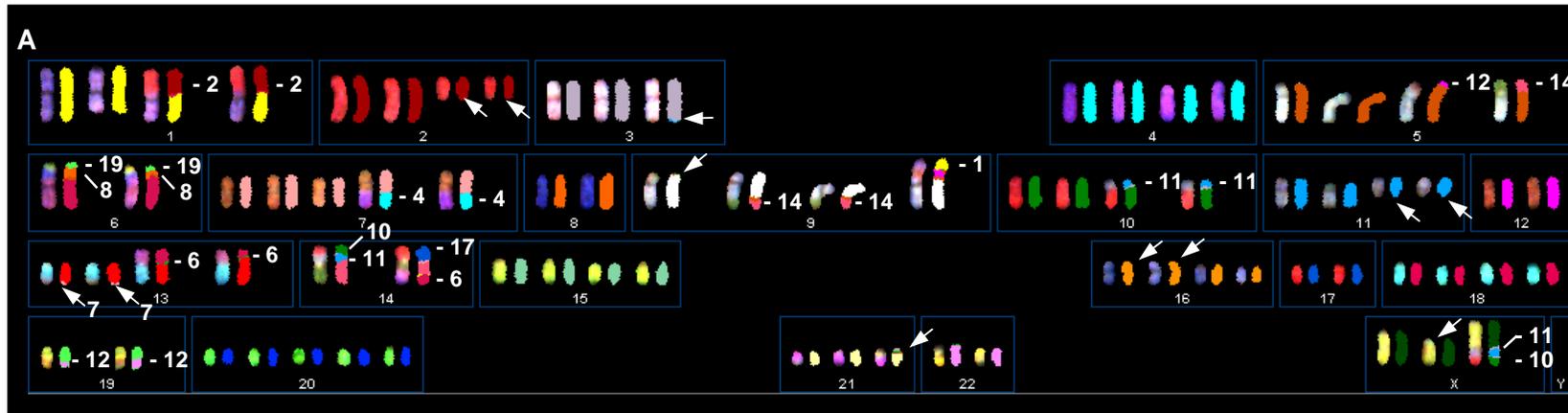


Abb.10 SKY und FISH der MCL-Zelllinie JeKo-1 zum Nachweis eines *CCND1/IgH*-Rearrangements

Die SKY-Analyse (A) zeigte komplexe strukturelle Veränderungen eines hypertriploiden Chromosomensatzes, jedoch keine typische balancierte Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$ . Eine FISH an Metaphase-Chromosomen und der Vergleich mit den SKY-Daten identifizierte zwei derivative Chromosomen 9 mit einem *CCND1/IgH*-Rearrangement (B).

Mit einer durchgeführten FISH konnten jedoch 4 deutliche Fusionssignale zur Bestätigung von insgesamt 2 *CCND1/IgH*-Rearrangements dargestellt werden (**Abb.10B**). Verglichen mit dem Ergebnis der SKY wurden zwei aberrante Chromosomen 9 mit Material der Chromosomen 11 und 14 identifiziert, die als  $der(9)t(9;14)(q34;q22)t(11;14)(q13;q32)del(11)(q13)$  beschrieben werden konnten.

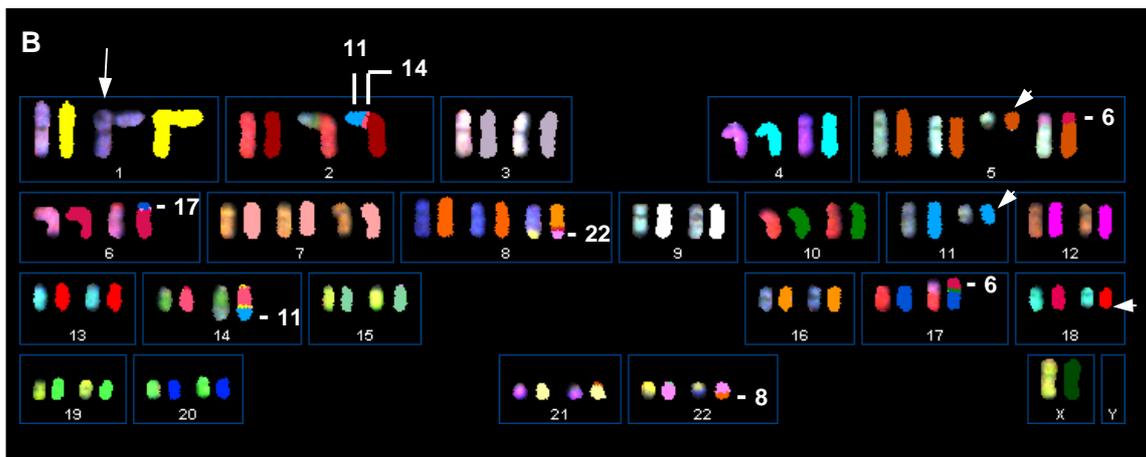
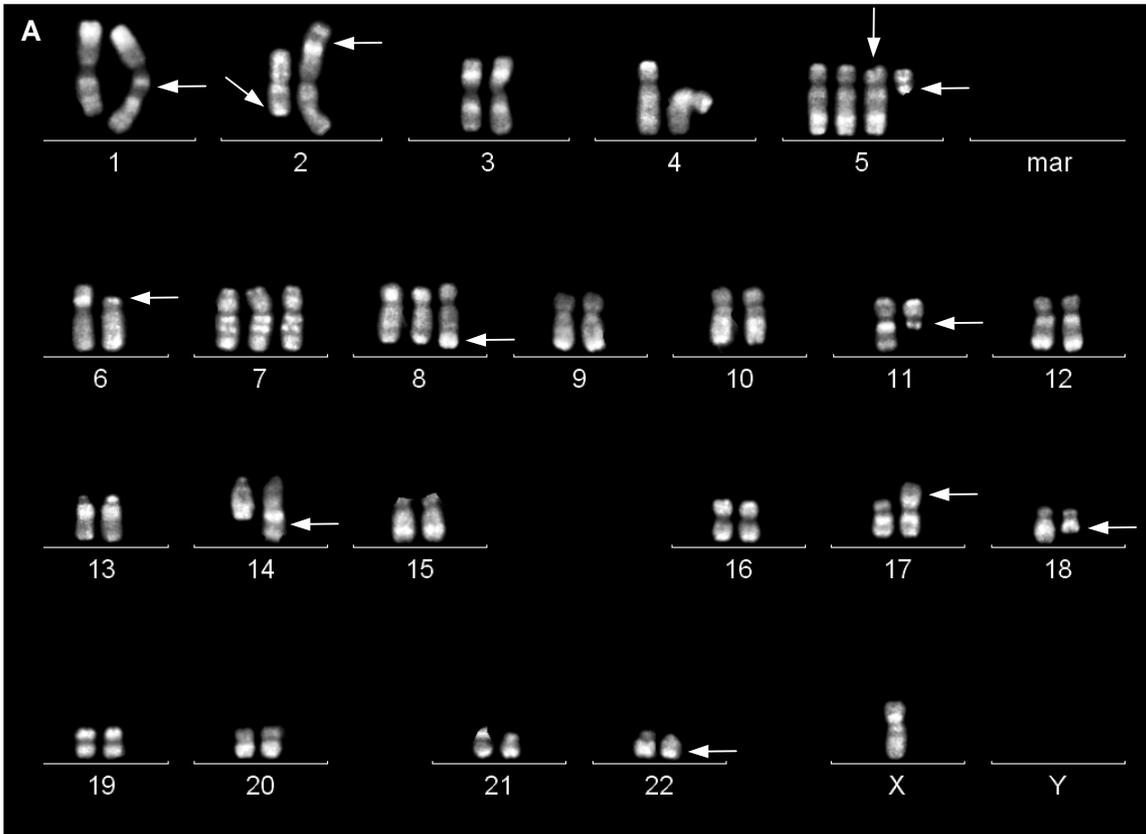
In der diploiden MM-Zelllinie NOP-2 zeigte die R-Bandendarstellung (**Abb.11A**) neben der balancierten Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  ein derivatives Chromosom 2, das die Bruchpunkte der  $t(11;14)$  enthielt und zusammen mit dem Ergebnis der SKY-Analyse (**Abb.11B**) als  $der(2)t(2;14)(p22;q31)t(11;14)(q13;q32)$  beschrieben werden konnte. Die FISH zum Nachweis eines *CCND1/IgH*-Rearrangements zeigte deutliche Fusionssignale für die derivativen Chromosomen 2 und 14 (**Abb.11C**).

In der MM-Zelllinie KMS-12 PE wurde ein derivatives Chromosom  $der(11)t(11;14)(q13;q32)$  identifiziert, das *Cyclin D1*-aktivierende Rearrangement dagegen nicht. Die SKY-Analyse zeigte zwei derivative Chromosomen 1 als Rearrangements der Chromosomen 1, 11 und 14, was den Verdacht auf eine  $t(11;14)(q13;q32)$  nahe legte (**Abb.12A**). Die Signalfusion in der FISH bestätigte diese Vermutung (**Abb.12B**). Ebenfalls zwei Signale für ein *CCND1/IgH*-Rearrangement wurden in der verwandten Zelllinie KMS-12 BM detektiert, resultierend aus zwei balancierten Translokationen  $t(11;14)(q13;q32)$ .

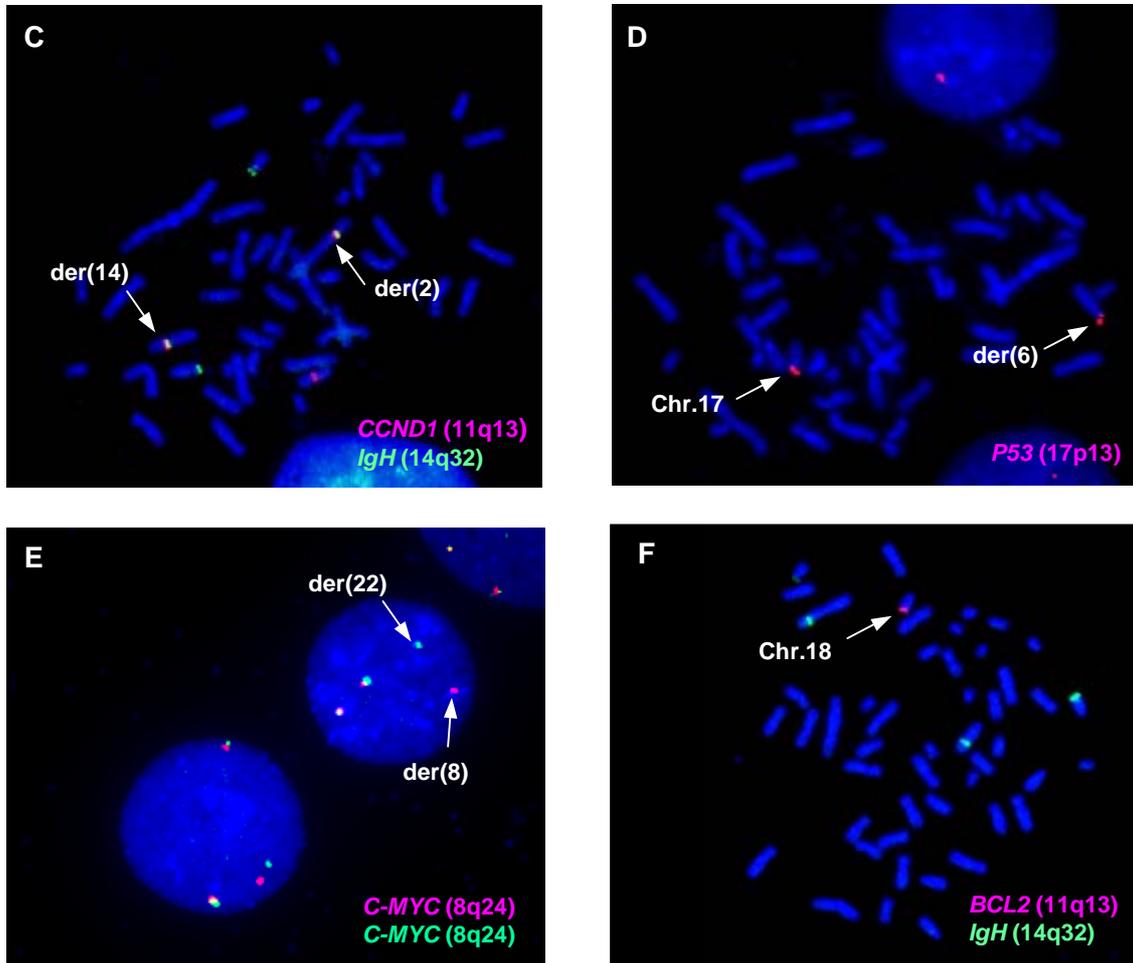
### 3.1.2 Sekundäre chromosomale Veränderungen

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur sekundären chromosomalen Instabilität in den *in vitro*-Modellen basierten auf Veränderungen, die mittels R-Bandendarstellung und SKY-Analyse und z.T. mittels FISH detektiert werden konnten. Die zytogenetischen Ergebnisse sind in **Tab.23** den zytogenetischen Daten der Erstbeschreibungen gegenübergestellt. Die Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchung der Zelllinie Granta-519 sind in Rudolph et al. (2004) publiziert.

NOP-2

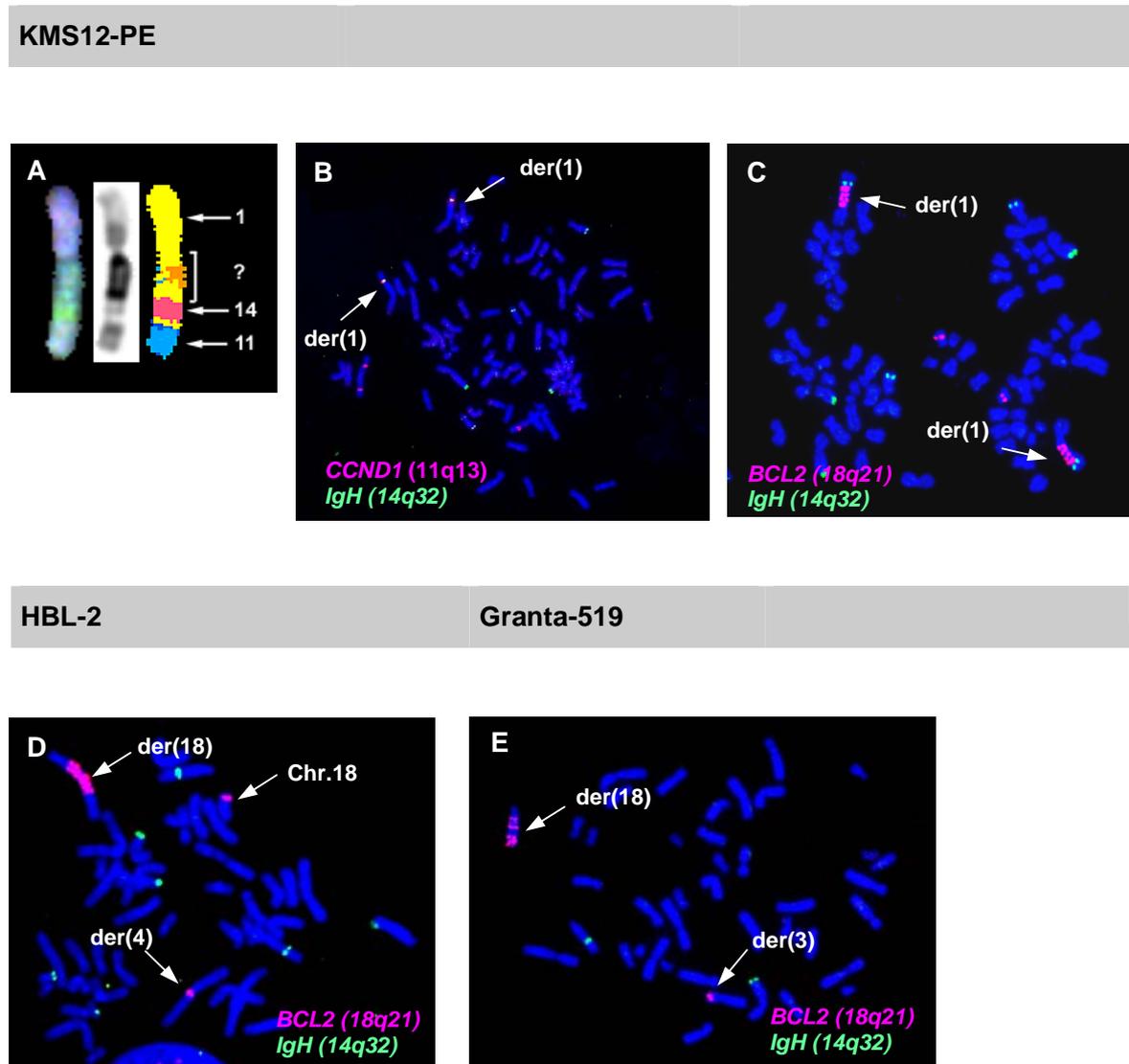


## NOP-2



**Abb.11** Zytogenetische Charakterisierung der MM-Zelllinie NOP-2

Die R-Bandendarstellung (A) der Zelllinie NOP-2 zeigte eine balancierte Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$ . In Kombination mit der SKY-Analyse (B) konnten zudem die balancierten Translokationen  $t(6;17)(p21.1;p12-13)$  und  $t(8;22)(q24;q11)$  identifiziert werden. Ein derivatives Chr.2 wurde in der FISH ebenfalls als  $t(11;14)(q13;q32)$ -positiv detektiert (C). Eine FISH zum Nachweis des TSG *P53* zeigte zwei Signale, jeweils ein Signal für das Chr.17 und das derivative Chr.6 (D). Zum Nachweis eines aus der balancierten Translokation  $t(8;22)(q24;q11)$  resultierenden *C-MYC/IgL*-Rearrangements wurde eine FISH mit einer *C-MYC break apart*-Sonde eingesetzt, die ein Signalsplit für die Translokation und zwei Fusions-signale für die Chromosomen 8 zeigte (E). Weiterhin wurde in der R-Bandendarstellung eine Deletion in 18q12.3 mit Hinweis auf eine monoallelische Deletion des Gens *BCL2* detektiert. Dies konnte in einer FISH bestätigt werden, die nur ein Signal für das unauffällige Chr.18 zeigte (F).



**Abb.12 Nachweis des *CCND1/IgH*-Rearrangements und erhöhte *BCL2*-Kopienzahl in MCL und MM *in vitro*-Modellen**

Die SKY-Analyse der MM-Zelllinie KMS-12 PE zeigte zwei derivative Chr.1 mit erweiterter Zentromerregion und Material unbekannter Herkunft sowie Rearrangements der Chr.14 und 11. In (A) ist ein der(1) als SKY-Ausschnitt dargestellt. Eine FISH zum Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32) zeigte deutliche Fusionssignale auf beiden derivativen Chr.1 (B). Zudem konnten 4-6 Kopien des Gens *BCL2* innerhalb der Zentromerregion der derivativen Chr.1 und zwei Einzelsignale für zwei Chr.18 detektiert werden (C). In der MCL-Zelllinie HBL-2 wurden 7 Kopien des Gens *BCL2* nachgewiesen. Darüber hinaus zeigte sich ein Signal für das zytogenetisch unauffällige Chr.18 sowie ein Signal für das derivative Chr.4 (D). In der MCL-Zelllinie Granta-519 ließen sich 4-6 Kopien des Gens *BCL2* nachweisen und eine weitere Kopie auf dem derivativen Chr.3 (E).

### 3.1.2.1 Der Ploidiegrad und Vergleich der strukturellen Instabilität der *in vitro*-Modelle

Die Anzahl der Chromosomen innerhalb einer Metaphase kann in Form der Ploidie ausgedrückt werden. Abweichungen vom normalen diploiden  $<2n>$  Chromosomensatz (vgl. **Tab.21**) können ein Zeichen chromosomaler Instabilität sein.

Die untersuchten MCL-Zelllinien zeigten diploide oder nahe diploide Chromosomensätze, Ausnahmen bildeten die hypotetraploide Zelllinie NCEB-1 und die hypertriploide Zelllinie JeKo-1. Die MM-Zelllinien zeigten vorwiegend Chromosomenzahlen im nahen diploiden oder triploiden Bereich (**Tab.11**).

	Zelllinie	Ploidie
MCL	Granta-519	hypodiploid
	NCEB-1	hypotetraploid
	Rec-1	diploid
	JeKo-1	hypertriploid
	SP-50B	diploid
	SP-53	diploid
	HBL-2	hyperdiploid
	Molp-5	hypodiploid
MM	NOP-2	hyperdiploid/ hypertetraploid*
	KMS-12 PE	hypertriploid
	KMS-12 BM	hypertriploid

**Tab.11 Übersicht über die Ploidie der t(11;14)(q13;q32)-positiven *in vitro*-Modelle**

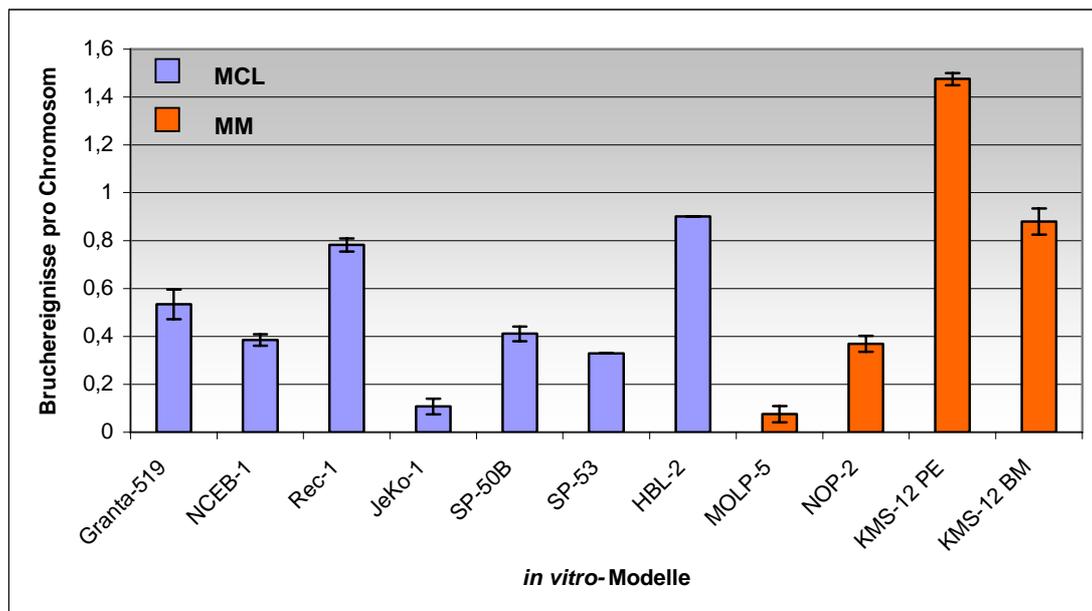
Für die Untersuchung der strukturellen Instabilität wurden die detektierten Bruchereignisse pro Chromosom bestimmt (**Abb.13**). Diese Berechnung wurde unter Berücksichtigung der Ploidie durchgeführt und ließ somit einen Vergleich der Zelllinien zu. Die hypodiploide Zelllinie Molp-5 zeigte die wenigsten Bruchereignisse pro Chromosom, die MM-Zelllinie KMS-12 PE dagegen mehr als das Zehnfache an Bruchereignissen pro Chromosom.

\*40% der in der SKY ausgewerteten Metaphasen zeigten hypertetraploide Chromosomensätze mit identischen strukturellen Aberrationen.

Die graphische Darstellung zeigte keine Unterschiede im Grad der strukturellen Instabilität zwischen den NHL-Entitäten. In beiden Gruppen konnten Zelllinien mit wenigen und Zelllinien mit vielen strukturellen Veränderungen beobachtet werden.

Verglichen zum Ploidiegrad konnten in der hypertriploiden MCL-Zelllinie JeKo-1 weniger strukturelle Veränderungen pro Chromosom detektiert werden als beispielsweise in den diploiden oder nahe diploiden MCL-Zelllinien.

Im Unterschied dazu zeigten in der Gruppe der MM-Entität die Zelllinien KMS-12 PE und KMS-12 BM mit hypertriploiden Chromosomensätzen sehr viele strukturelle Veränderungen, die nahe diploiden Zelllinien Molp-5 und NOP-2 dagegen eine geringere strukturelle Instabilität.



**Abb.13 Vergleich der strukturellen chromosomalen Instabilität in t(11;14)(q13;q32)-positiven *in vitro*-Modellen**

### 3.1.2.2 Bruchregionen in MCL und MM *in vitro*-Modellen

Eine Auflistung aller (in strukturelle Veränderungen involvierte) Bruchpunkte nach Chromosom und chromosomaler Bande und eine Zuordnung der Zelllinien, die diese Veränderungen zeigten (Tabelle nicht gezeigt), gab einen Überblick über die Regionen, die vermehrt (mindestens in 3 Zelllinien) oder weniger oft in strukturelle Veränderungen involviert waren.

Die eingehende Betrachtung aller Bruchereignisse zeigte, dass die Chromosomen 1 und 14 sowohl in den MCL- als auch in den MM-Zelllinien am häufigsten in strukturelle Veränderungen involviert waren. Ausgehend von der Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  als primäre zytogenetische Veränderung, betrafen dementsprechend die meisten sekundären Aberrationen in beiden NHL-Entitäten das Chromosom 1.

In den MCL-Zelllinien konnten zudem die Regionen 2q11~q12, 6p22, 7q21~q31, 8q21~q24, 12p11~p12 und 15q13~q15 als häufig instabil detektiert werden. Diese Veränderungen resultierten vorrangig aus Translokationsereignissen und Deletionen, wobei wiederkehrende Translokationspartner nur in den Zelllinien SP-50B und SP-53 aufgrund ihrer Verwandtschaft nachgewiesen werden konnten.

Dagegen zeigten die MM-Zelllinien vermehrt strukturelle Veränderungen der Regionen 5p10~p11, 17p11~p13 und 22q11~q13. In beiden NHL-Entitäten konnte zudem die Region 17q21~q24 als oft instabil beobachtet werden. Auch diese Bruchpunkte waren in verschiedene Translokationsereignisse involviert.

Aufgrund der Häufung struktureller Veränderungen des Chromosoms 1 wurden zur Bestätigung oder Korrektur der mittels R-Bandendarstellung und SKY-Analyse detektierten Bruchpunkte bei allen MCL- und MM-Zelllinien eine MCB1-Analyse durchgeführt. Diese diente zudem zur Detektion möglicher diskreter intrachromosomaler Rearrangements. Die MCB1-Analysen an den bereits angefertigten Metaphase-Präparaten wurde von PD Dr. T. Liehr (Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena) nach Chudoba et al. (1999) und Liehr et al. (2002) durchgeführt.

Die aus den R-Bandendarstellungen, den SKY- und den MCB1-Analysen erhaltenen Daten für das Chromosom 1 wurden in **Tab.12** zusammengefasst.

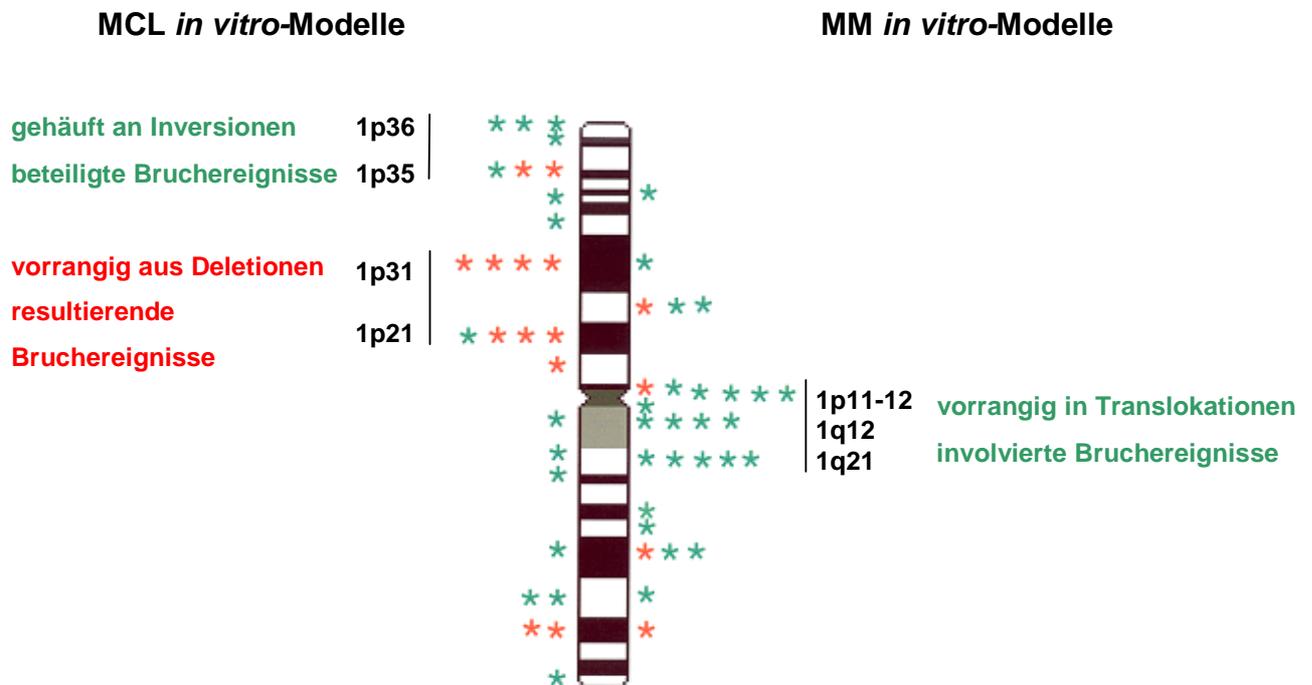
**Tab.12 Klonale Veränderungen des Chromosoms 1 in t(11;14)(q13;q32)-positiven B-NHL-Zelllinien (detektiert mittels R-Bandendarstellung, SKY und MCB1-Analyse)**

NHL-Subtyp	Zelllinie	Veränderungen des Chromosoms 1
<b>MCL</b>	Granta-519	inv(1)(p32p36.3) der(1)t(1;14)(p36.3;q11)del(1)(p31p13)t(1;12)(q21.2-22;q24.1) der(13)t(1;13)(q21.2;p13)add(1)(q44)
	JeKo-1	der(1)t(1;2)(p21;q12) der(9)t(9;12)(p21;q21)t(1;12)(p34;q24)t(9;9)(q34;?p21)
	Rec-1	del(1)(p21p31)
	NCEB-1	inv(1)(p36.2p35)
	SP-50B	der(1)del(1)(p35)del(1)(p21p31) del(1)(q41)
	SP-53	der(1)del(1)(p35)del(1)(p21p31) der(1)t(1;7)(q32;p14)
	HBL-2	der(1)ins(1;6)(p36;?p22?p24)t(1;3)(q31;q13) der(4)t(1;4)(q12;p13)ish der(4)t(1;4)(q12;p13)(wcp1+,bcl2+,wcp4+) der(3)t(1;3)(q32;p14)del(1)(q42)t(3;15)(q13;q12~14)
<b>MM</b>	Molp-5	der(1)t(1;?)(p11;?)
	KMS-12 PE	der(1)t(1;14)(q21;q22)t(11;14)(q13;q32)ish der(1)(BCL2 x 7) der(1)del(1)(p12p22)t(1;19)(q23;p13) der(5)t(1;5)(p12;q12) der(6)t(1;6)(p22;q31) dic(1;9)(p11;q34)del(1)(q41) der(17)(11pter->11p12::17p12->17q21::1q21.1->1q21.3::1q31->1q21.1::1q32->1qter) der(19)t(1;19)(q24;p13)del(1)(q?31)
	KMS-12 BM	der(1;4)(p10;p10) der(1)(1pter->1p34::1q11->1p22::1q12->qter) der(1)(?::1p11->1q31::?) der(8)t(1;8)(q12;p21) der(8)t(1;8)(q12;p21)del(8)(q12) der(13)t(1;13)(p31;q22) der(?)t(1;?)(?;p11)
	NOP-2	ish trp(1)(q12q21)(pcp1p12x1)(pcp1q21.1x5)(pcp1px4)

Eine graphische Darstellung der Bruchpunkte des Chromosoms 1 (**Abb.14**) zeigte deutliche Unterschiede zwischen den MCL- und den MM-Zelllinien. Während in den MCL-Zelllinien häufig die Regionen 1p21 und 1p31 in chromosomale Veränderungen involviert waren, zeigten die MM-Zelllinien in den heterochromatischen Regionen 1p11-12, 1q12 und in der Region 1q21 die meisten Bruchereignisse. Eine genauere Betrachtung zeigte zudem, dass die Bruchereignisse in den MCL-Zelllinien vorrangig aus Deletionen, in den MM-Zelllinien dagegen vorwiegend aus Translokationsereignissen resultierten. Die involvierten Translokationspartner waren dabei unterschiedlicher Herkunft. Als Translokationspartner konnten die Regionen 4p10, 5q12, 6q31, 8p21, 9q34, 13q22, 14q22, 17q21 und 19p13 identifiziert werden.

Die Detektion intrachromosomaler Veränderungen der Region 1p ist mittels R-Bandendarstellung aufgrund der sehr homogen fluoreszierenden Banden oft sehr schwierig, z.T. bleiben diese Veränderungen auch unerkannt. Auch mit der SKY-Analyse, die vorrangig interchromosomale Rearrangements aufzeigt, können diese Veränderungen nicht detektiert werden. So zeigte erst die MCB1-Analyse in der MCL-Zelllinie Granta-519 eine  $inv(1)(p32p36.3)$ , in der Zelllinie NCEB-1 eine  $inv(1)(p36.2p35)$ , in den Zelllinien SP-50B und SP-53 ein  $der(1)del(1)(p35)del(1)(p21p31)$  und in der Zelllinie HBL-2 ein  $der(1)ins(1;6)(p36;p22?p24)t(1;3)(q31;q13)$ . Damit konnten auch in den Regionen 1p35-1p36 der MCL-Zelllinien wiederkehrende Bruchereignisse beobachtet werden (**Abb.14**).

In der MM-Zelllinie NOP-2 fiel ein Chromosom 1 durch eine erweiterte Zentromerregion auf (**Abb.11A**). Die SKY-Analyse (**Abb.11B**) konnte jedoch kein zusätzliches Material identifizieren, das auf ein interchromosomales Rearrangement hingewiesen hätte. Mithilfe der MCB1-Analyse und nachfolgenden FISH-Analysen unter Verwendung der Sonden pcp1p12, pcp21.1 und pcp1p konnte gezeigt werden, dass hier ein Triplikon der Region 1q12q21 vorlag. Diese FISH-Analysen wurden von PD Dr. T. Liehr (Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena) durchgeführt. Das derivative Chromosom 1 konnte als  $ish\ trp(1)(q12q21)(pcp1p12x1)(pcp1q21.1x5)(pcp1px4)$  angegeben werden.



**Abb.14 Darstellung der Bruchpunkte des Chromosoms 1 in MCL- und MM-Zelllinien**

Die dargestellten Bruchpunkte resultierten aus den Ergebnissen der R-Bandendarstellung, der SKY- und der MCB1-Analyse. Jeder Bruchpunkt wurde im Ideogramm mit einem Stern gekennzeichnet. In grün wurden die Bruchereignisse dargestellt, die aus Translokationen oder Inversionen und in rot diejenigen, die aus Deletionen resultierten. Die häufigsten Bruchereignisse in den MCL-Zelllinien wurden in den Regionen 1p31 und 1p21 detektiert, die damit die chromosomal instabilsten Regionen darstellten (links). In den MM-Zelllinien wurden vorrangig Bruchereignisse in den zentromernahen Regionen 1p11-12, 1q12 und 1q21 detektiert (rechts), die im Unterschied zu den Bruchereignissen der MCL-Zelllinien vorrangig aus Translokationsereignissen resultierten. Zudem zeigten die Regionen 1p35 und 1p36 in den MCL-Zelllinien gehäuft Bruchereignisse, die in Inversionen involviert waren.

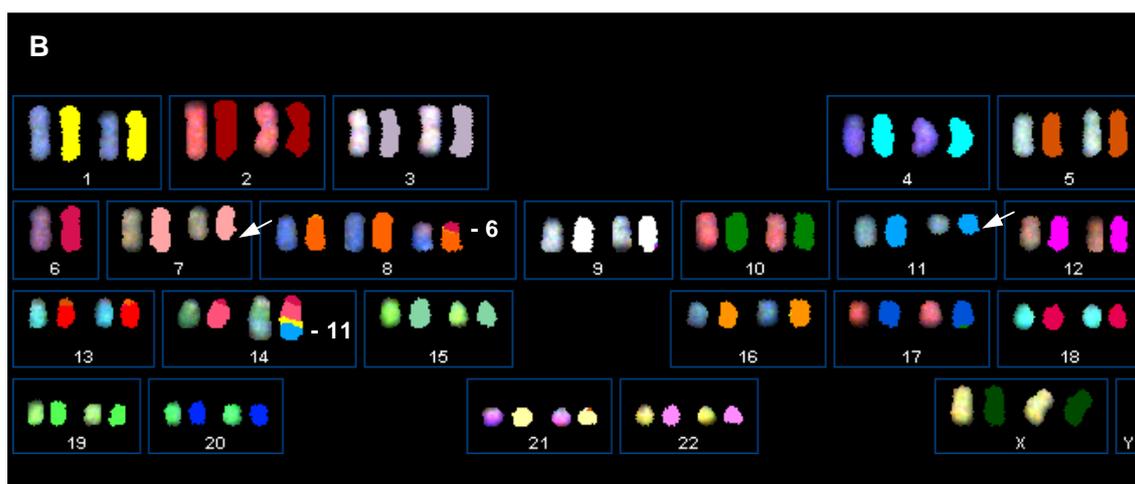
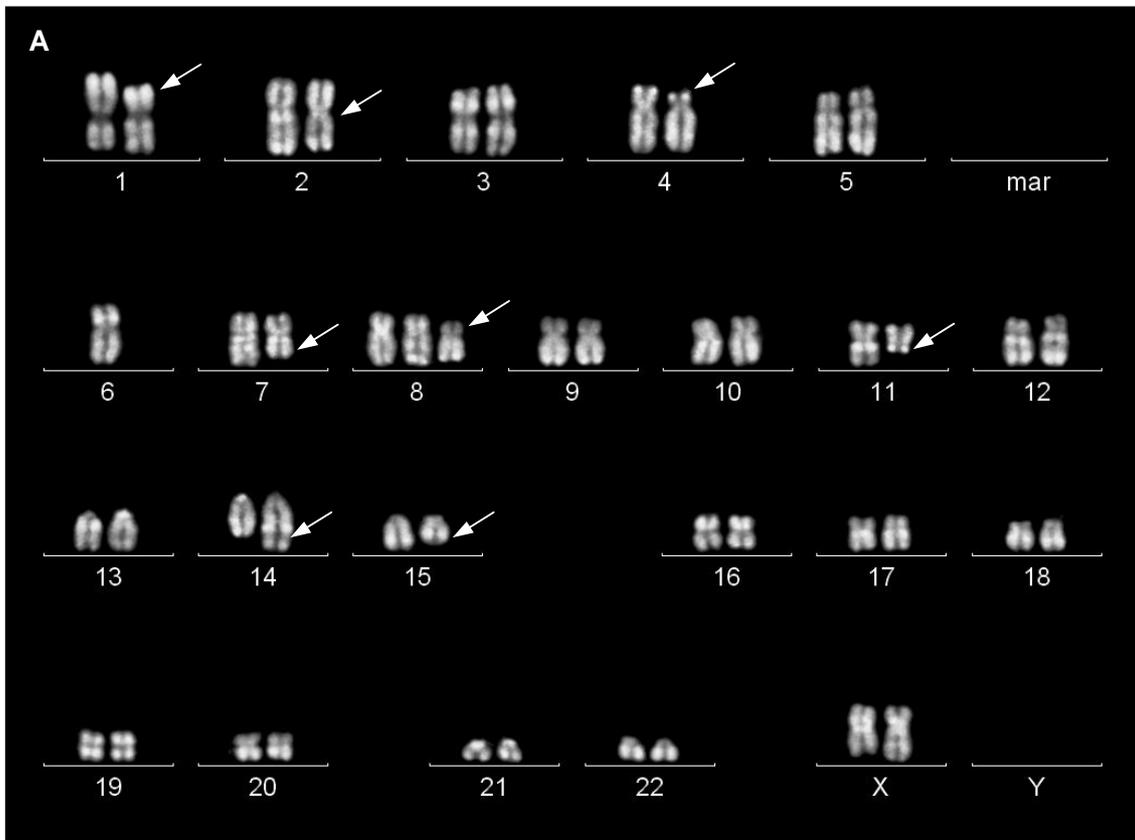
Auch die hypertriploide MM-Zelllinie KMS-12 PE zeigte eine erweiterte Zentromerregion zweier Chromosomen 1, die bereits als  $t(11;14)(q13;q32)$ -positiv identifiziert wurden (vgl. Pkt.3.1.1 und **Abb.12**). Mithilfe der SKY-Analyse konnte zwar innerhalb dieser Region zusätzliches chromosomales Material detektiert, jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Eine FISH zur Untersuchung des *BCL2* zeigte für diese Region eine Amplifikation des Onkogens. Hierauf wird in Pkt.3.1.2.5 detaillierter eingegangen.

### 3.1.2.3 Zygotenetischer Vergleich der verwandten Zelllinien SP-50B und SP-53 sowie KMS-12 PE und KMS-12 BM

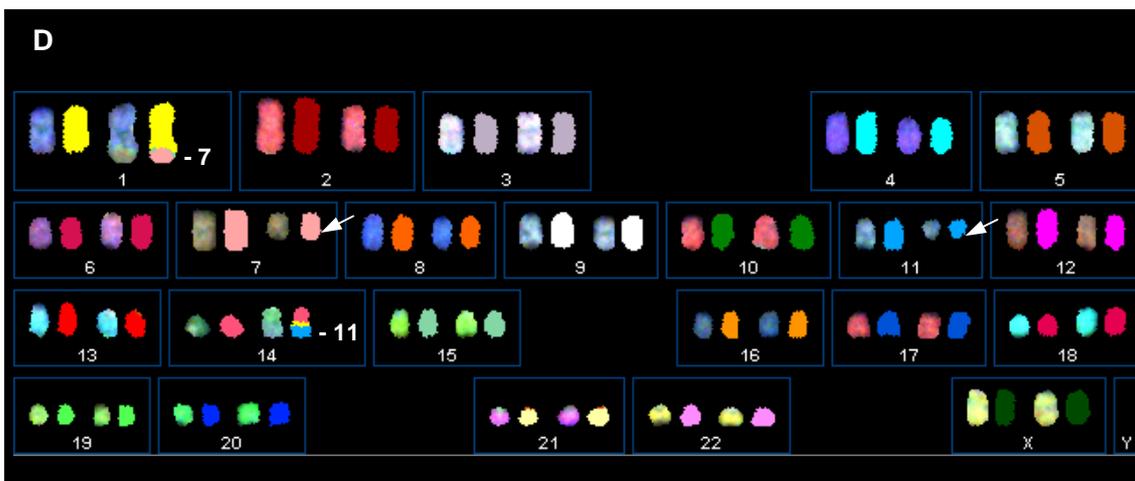
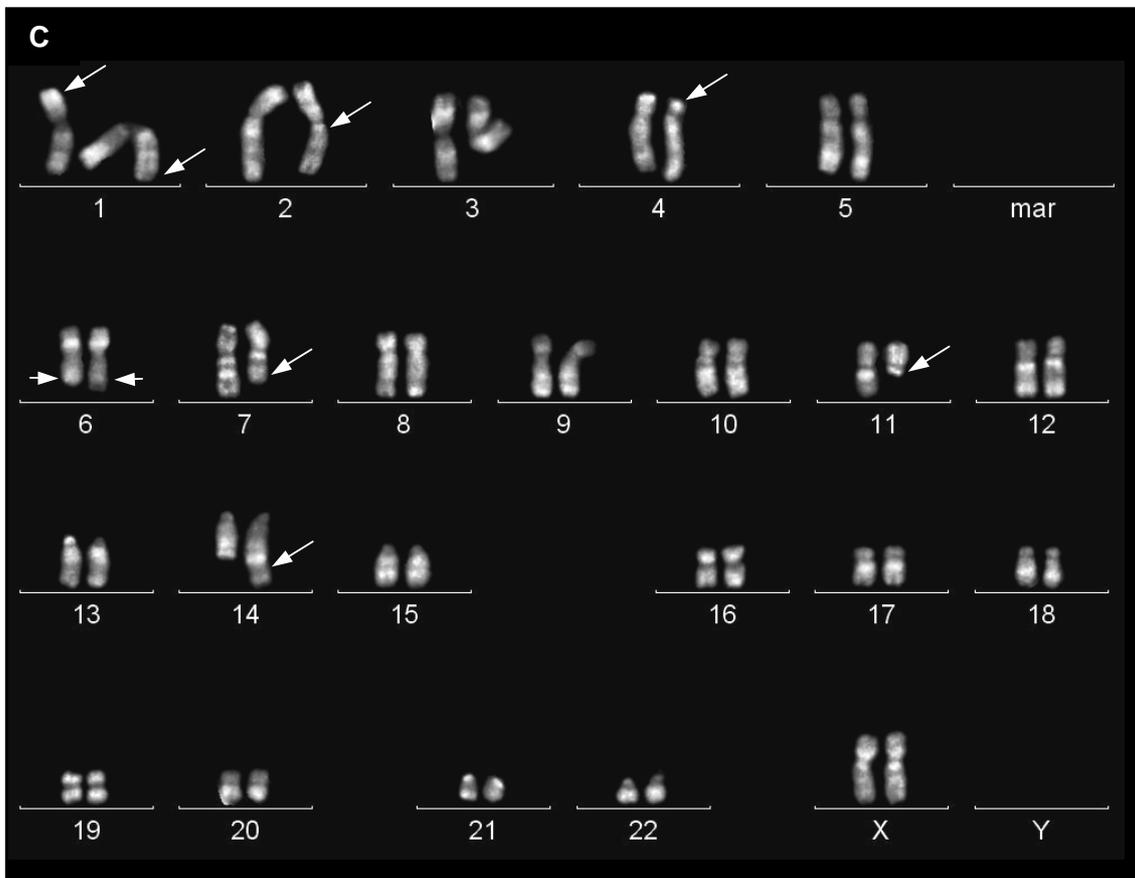
Die Zelllinien SP-50B und SP-53 wurden aus dem peripheren Blut eines Patienten mit MCL etabliert und sind damit gleichen Ursprungs. SP-50B ist als EBV-positiv, SP-53 als EBV-negativ beschrieben (Daibata et al., 1989). In beiden Zelllinien konnten neben dem *CCND1/IgH*-Rearrangement interstitielle Deletionen detektiert und als  $der(1)del(1)(p35)del(1)(p21p31)$ ,  $del(2)(q11q21)$ ,  $del(4)(p12p15)$  und  $del(7)(q21q31)$  beschrieben werden. Ausschließlich in der Zelllinie SP-53 konnte zudem ein derivatives Chromosom 1, involviert in eine unbalancierte Translokation  $t(1;7)(q32;p14)$  und zwei Chromosomen 6 mit terminaler Deletion mit Bruchpunkt in  $6q?22$  identifiziert werden. Im Unterschied dazu zeigte die Zelllinie SP-50B eine terminale Deletion des homologen Chromosoms 1 mit Bruchpunkt in  $1q41$ , ein derivatives Chromosom 8, involviert in eine Translokation  $t(6;8)(p22;p11)$  mit interstitieller Deletion in  $8q$  und ein Chromosom 15 mit interstitieller Deletion der Banden  $q13q21$ . Die zytogenetischen Daten sind in **Abb.15** dargestellt und vergleichend in **Tab.13** zusammengefasst.

Diese Daten zeigen, dass sich beide Zelllinien, ausgehend von einem Ursprungsklon mit  $t(11;14)(q13;q32)$  und interstitiellen Deletionen der Regionen 1p, 2q, 4p und 7q, separat entwickelten. Die zusätzlichen strukturellen Veränderungen scheinen zur weiteren Stabilisierung der Klone beigetragen zu haben.

SP-50B



SP-53



**Abb.15 Zytogenetische Charakterisierung der MCL-Zelllinien SP-50B und SP-53**

Die Zelllinien SP-50B und SP-53 sind gemeinsamen Ursprungs. Die R-Bandendarstellungen (**A**) und (**C**) zeigen diploide Chromosomensätze mit wenigen strukturellen Veränderungen. Zusammen mit der SKY-Analyse konnten in beiden Zelllinien eine balancierte Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  und interstitielle Deletionen in 1p, 2q, 4p und 7q detektiert werden. Die Zelllinien unterschieden sich durch eine terminale Deletion in 1q und ein derivatives Chromosom 8 (involviert in eine Translokation  $t(6;8)$  mit interstitieller Deletion in 8q) sowie einer interstitiellen Deletion in 15q der Zelllinie SP-50B (**B**), einer unbalancierten Translokation  $der(1)t(1;7)(q32;p14)$  sowie terminaler Deletionen der homologen Chromosomen 6 in SP-53 (**D**).

**Tab.13 Vergleich der strukturellen Veränderungen der *in vitro*-Modelle SP-50B und SP-53**

SP-50B	SP-53
der(1)del(1)(p35)del(1)(p21p31)	der(1)del(1)(p35)del(1)(p21p31)
del(1)(q41)	—
—	der(1)t(1;7)(q32;p14)
del(2)(q11q21)	del(2)(q11q21)
del(4)(p12p15)	del(4)(p12p15)
—	del(6)(q?22)x2
del(7)(q21q31)	del(7)(q21q31)
der(8)t(6;8)(p22;p11)del(8)(q12q21)	—
t(11;14)(q13;q32)	t(11;14)(q13;q32)
del(15)(q13q21)	—

Die Zelllinien KMS-12 PE und KMS-12 BM wurden aus dem Pleuraerguss und dem KM eines Patienten mit MM etabliert. Namba et al. (1989) beschrieben die Zelllinien als hypodiploid und detektierten die Translokationen t(11;14)(q13;q32) und t(9;11)(q34;q13), letztere als *ABL/IgH*-Rearrangement, als gemeinsame zytogenetische Veränderungen. Die hier durchgeführten zytogenetischen Untersuchungen zeigten bei beiden Zelllinien komplexe chromosomale Veränderungen (**Tab.23**). Sowohl die *CCND1/IgH*-Rearrangements als auch die t(9;11)(q34;q11) konnten, unter Korrektur des Bruchpunktes in 9q11, bestätigt werden. Zudem zeigten beide Zelllinien zwei derivative Chromosomen 5, die als der(5)t(5;17)(p10;q10) identifiziert werden konnten. Weitere Gemeinsamkeiten konnten trotz der Komplexität der Veränderungen, die fast jedes Chromosom involvierten, nicht festgestellt werden. Beide Zelllinien zeigten, im Unterschied zur Beschreibung von Namba et al. (1989), hypertriploide Chromosomensätze.

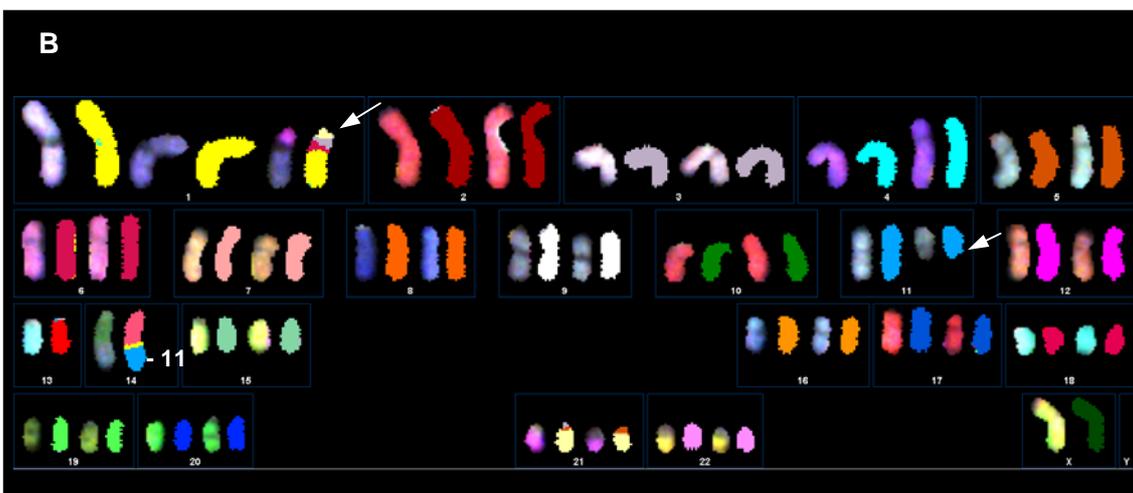
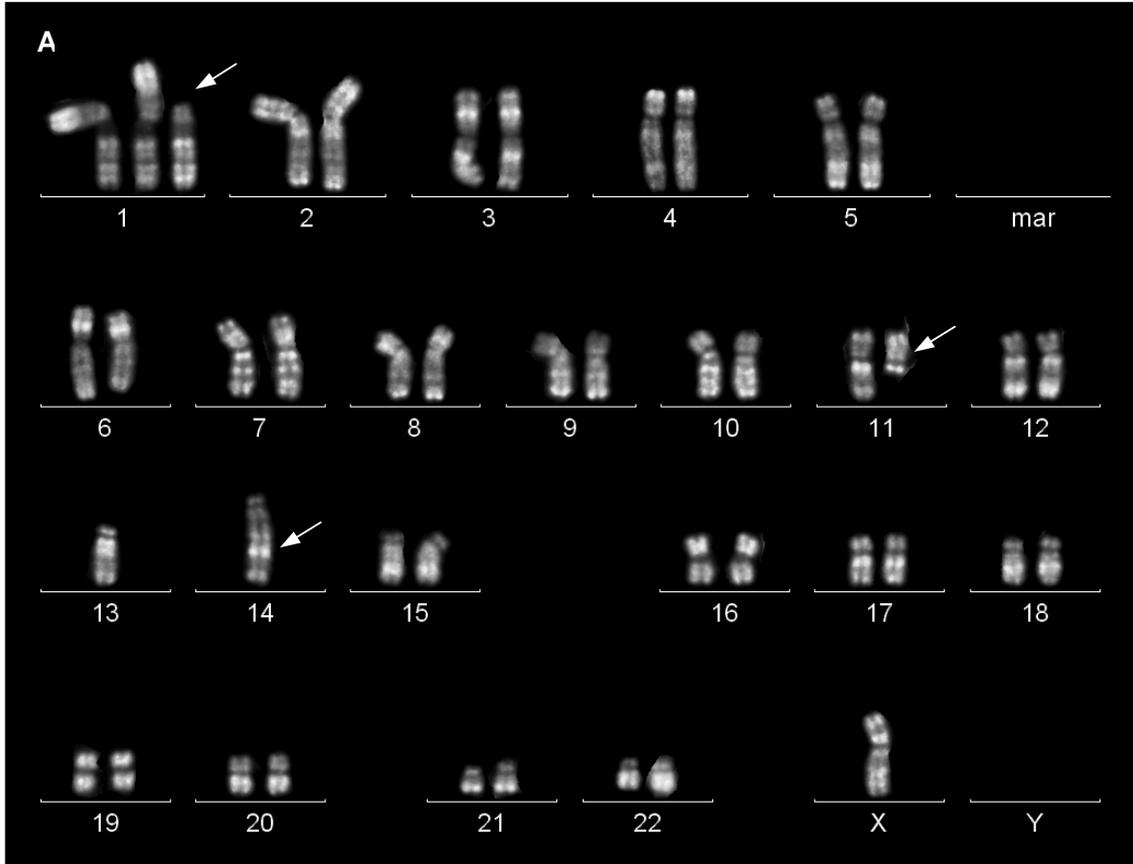
### 3.1.2.4 Polyklonalität der untersuchten Zelllinien

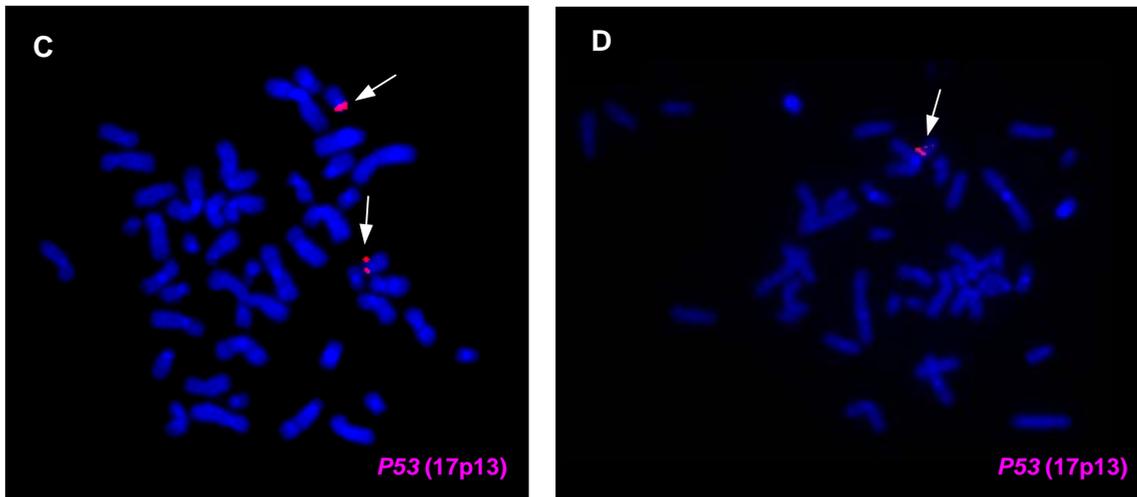
Mithilfe der R-Bandendarstellung und der SKY-Analyse konnten in der Zelllinie Molp-5 drei Klone nachgewiesen werden. Der als Klon A bezeichnete Hauptklon machte 73% der mittels SKY analysierten Metaphasen aus, die Klone B und C waren zu etwa gleichen Anteilen vertreten, stellten jedoch keine Subklone des Klons A dar.

Der Klon A zeichnete sich, neben der  $t(11;14)(q13;q32)$ , durch den Verlust des Y-Chromosoms, eine Monosomie 13 und ein strukturell aberrantes Chromosom 1 mit Material unbekannter Herkunft in 1p aus. Mithilfe der SKY-Analyse konnte die Herkunft des Materials nicht eindeutig identifiziert werden, in Frage kam Material der Chromosomen 3, 6 oder 21. Auch der Vergleich mit der R-Bandendarstellung gab kein eindeutiges Ergebnis (**Abb.16**). Die daraufhin von Frau Dr. B. Pabst (Institut für Humangenetik, MHH) durchgeführten FISH-Untersuchungen mit einer WCP-Sonde für das Chromosom 6 (WCP6; Angewandte Gentechnologie Systeme, Heidelberg), einer in der Subtelomerregion 21q22.13-q22.2 hybridisierenden Sonde (LSI 21, D21S259/D21S341/D21S342; Vysis) und einer zentromerspezifischen Sonde für die Chromosomen 13 und 21 (D/13Z1/D21Z1; Oncor) brachte kein Ergebnis, das die Herkunft des Materials klärte. Jedoch konnte die Vermutung von Matsuo et al. (2000) widerlegt werden, dass Material des Chromosoms 13 transloziert sein könnte. Eine DNA-Sonde für das Chromosom 3 stand nicht zur Verfügung, der Ausschluss eines translozierten Fragmentes dieses Chromosoms erfolgte durch die R-Bandendarstellung. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse musste das Chromosom als  $der(1)t(1;?)(p11;?)$  beschrieben werden.

Die Klone B und C zeigten im Vergleich zu Klon A kein derivatives Chromosom 1. Dagegen konnte in beiden Klonen das Y-Chromosom und eine Deletion  $del(17)(p12)$  nachgewiesen werden. Ausschließlich in Klon B wurde zudem eine Deletion  $del(7)(q22)$  und ein zweites derivatives Chromosom 14, involviert in eine Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$ , beobachtet. In Klon C konnten dagegen der Verlust eines Chromosoms 14 und ein dizentrisches Chromosom  $dic(1;12)(1qter \rightarrow 1p11.1::1q43 \rightarrow 1q31::12p12 \rightarrow 12qter)$  verzeichnet werden.

Molp-5 Klon A



**Molp-5 Klon A und B**

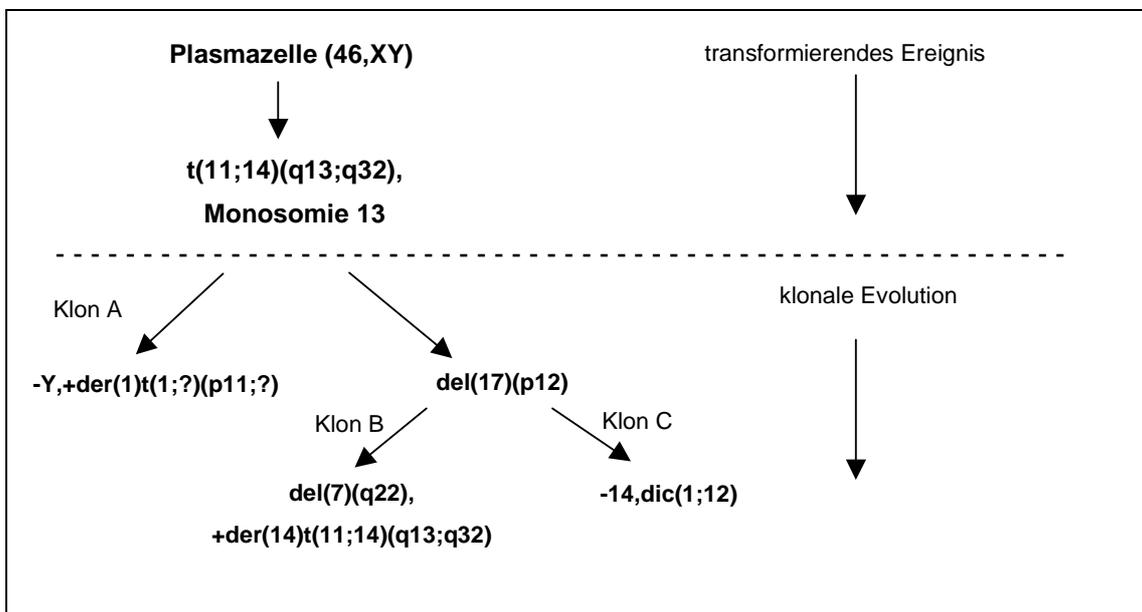
**Abb.16 Zytogenetische Charakterisierung der MM-Zelllinie Molp-5**

In der Zelllinie Molp-5 konnten 3 Klone identifiziert werden. Der hier in der R-Bandendarstellung (A) und in der SKY-Analyse (B) gezeigte Hauptklon A machte 73% der ausgewerteten Metaphasen aus. Die Herkunft des additiven Materials am derivativen Chromosom 1 konnte nicht eindeutig bestimmt werden, der Verdacht auf Material der Chromosomen 3, 6 oder 21 konnte nicht bestätigt werden. Die Klone B und C traten zu etwa gleichen Anteilen auf und zeigten im Unterschied zu Klon A u.a. beide eine Deletion in 17p12. Die FISH zum Nachweis des TSG *P53* auf 17p13 bestätigte in Klon A zwei Signale (C), wohingegen in den Klonen B und C nur ein Signal detektierbar war, was in (D) für Klon B dargestellt ist.

Die **Abb.17** stellt die klonale Evolution der Zelllinie Molp-5 dar und zeigt, dass neben der Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  die Monosomie 13 in allen drei Klonen als sehr frühes Ereignis gewertet werden kann. Daraus isolierte sich der Klon A durch Verlust des Y-Chromosoms und Entwicklung eines derivativen Chromosoms 1 und ein weiterer Klon mit einer Deletion  $del(17)(p12)$ , aus dem sich die Klone B und C entwickelten. Die Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchung der Zelllinie Molp-5 sind in **Tab.14** zusammengefasst.

**Tab.14 Karyotypen der detektierten Klone der Zelllinie Molp-5**

Klon	Karyotyp
<b>A</b>	40~45,X,-Y,+der(1)t(1;?)(p11;?),t(11;14)(q13;q32),-13
<b>B</b>	46,XY,t(11;14)(q13;q32),del(7)(q22),-13,+der(14)t(11;14)(q13;q32),del(17)(p12)
<b>C</b>	44,XY,dic(1;12)(1qter->1p11.1::1q43->1q31::12p12->12qter),t(11;14)(q13;q32),-13,-14,del(17)(p12)



**Abb.17 Klonale Evolution der MM-Zelllinie Molp-5**

Interessanterweise konnten weder der Klon mit dem *CCND1/IgH*-Rearrangement und der Monosomie 13 als primäre chromosomale Veränderungen, noch der Klon, der zusätzlich eine Deletion in 17p aufwies, detektiert werden. Dies könnte dafür sprechen, dass diese Veränderungen – als Einzelveränderungen oder synergistisch, eine weitere zytogenetische Evolution forcierten.

Die zytogenetische Untersuchung der MCL-Zelllinie Rec-1 wurde aufgrund des Vorliegens mehrerer Klone und einer Vielzahl zusätzlicher Einzelaberrationen erschwert. Alle Klone zeigten diploide Chromosomensätze mit zahlreichen strukturellen Veränderungen. Der Hauptklon, der 9 der insgesamt 19 (47%) mittels SKY ausgewerteten Metaphasen ausmachte, zeigte folgende, und nur in diesem Klon detektierten sekundären strukturellen Veränderungen:

ein der(3)t(3;14)(p14;q21), ein trp(5)(q35), ein der(9)tas(9;9)(q34;q34)del(9)(p11) und ein del(17)(q22). Als zusätzliche Veränderungen, die auch in weiteren Klonen detektiert werden konnten, wurden ein der(Y)t(Y;8)(q12;q24), ein del(1)(p21p31), ein der(2)t(2?6)(q12;p22), ein del(4)(q13;q22), eine inv(7)(p12q21.3), ein der(8;11)(p11;q13), ein del(9)(p12), ein der(10)t(2;10)(p15;q26), eine t(12;17)(p12;q22), ein der(12)t(8;12)(q11;p12), ein der(13)(12pter->12p12::13q13->13cen::12cen->12p12::12q11->12q13::13q21->13qter), ein der15(t(15;19)(q15;q13), ein dic(16;22)(16pter->16cen::22q12 - >22 pter) und ein der(19)t(15;19)(q?25;q13) beobachtet.

In weiteren Klonen konnten ein der(20)t(2;20)(p10;p10), ein der(5)t(5;?6)(p14;p22), ein der(7)t(7;17)(q35;q24), ein der(8)(q10;q10), eine t(9;17)(q32;q12~q21), eine t(9;17)(p21;q24), eine del(10)(p11), ein der(11)t(11;?16)(p11;?), ein der(16)t(2;16)(q33;q12), ein der(17;20)(p10;q10) und ein der(18)t(12;18)(?;?) als strukturelle Veränderungen detektiert werden.

In **Tab.23** sind nur die strukturellen Veränderungen des Hauptklons aufgeführt.

In der MCL-Zelllinie JeKo-1 konnte ein zweiter Klon detektiert werden, der 48% der mittels SKY analysierten Metaphasen ausmachte und im Vergleich zum Hauptklon den Verlust des der(5)t(5;14)(p13;q?21) zeigte, aber dafür ein der(2)t(2;8)(q35;p22), ein der(14)t(14;17)(p11;q21) sowie ein der(13)t(6;13)(p11;p13)t(6;13)(p22;q12). Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass sich dieser Klon aus dem primären Klon entwickelte und damit einen Subklon darstellt (nicht gezeigt).

Für die Zelllinie Granta-519 beschrieben Jadayel et al. (1997) drei Klone, wobei ein kleinerer Klon Ähnlichkeiten zum Hauptklon zeigte und ein zweiter kleiner Klon die hypotetraploide Version des Hauptklons darstellte. Dieser Befund konnte nicht bestätigt werden. Die hier detektierten chromosomalen Veränderungen resultierten aus einer Einzelklonpopulation und ähnelten dem von Jadayel et al. (1997) beschriebenen kleinen Klon. Dies weist auf einen, im Laufe der Zellkultur entstandenen, Proliferationsvorteil des Klons hin.

### 3.1.2.5 Untersuchung bekannter Tumor-assoziiertes Gene

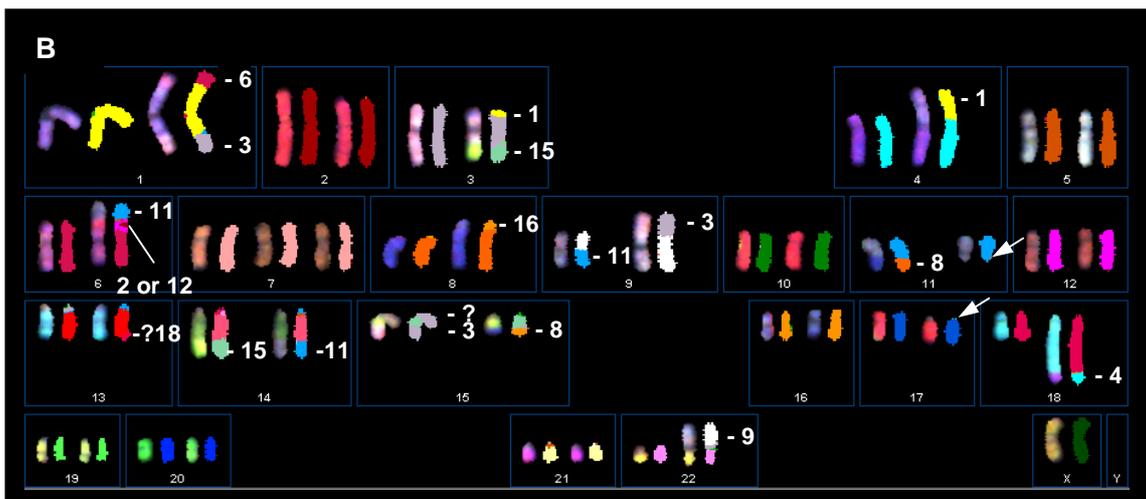
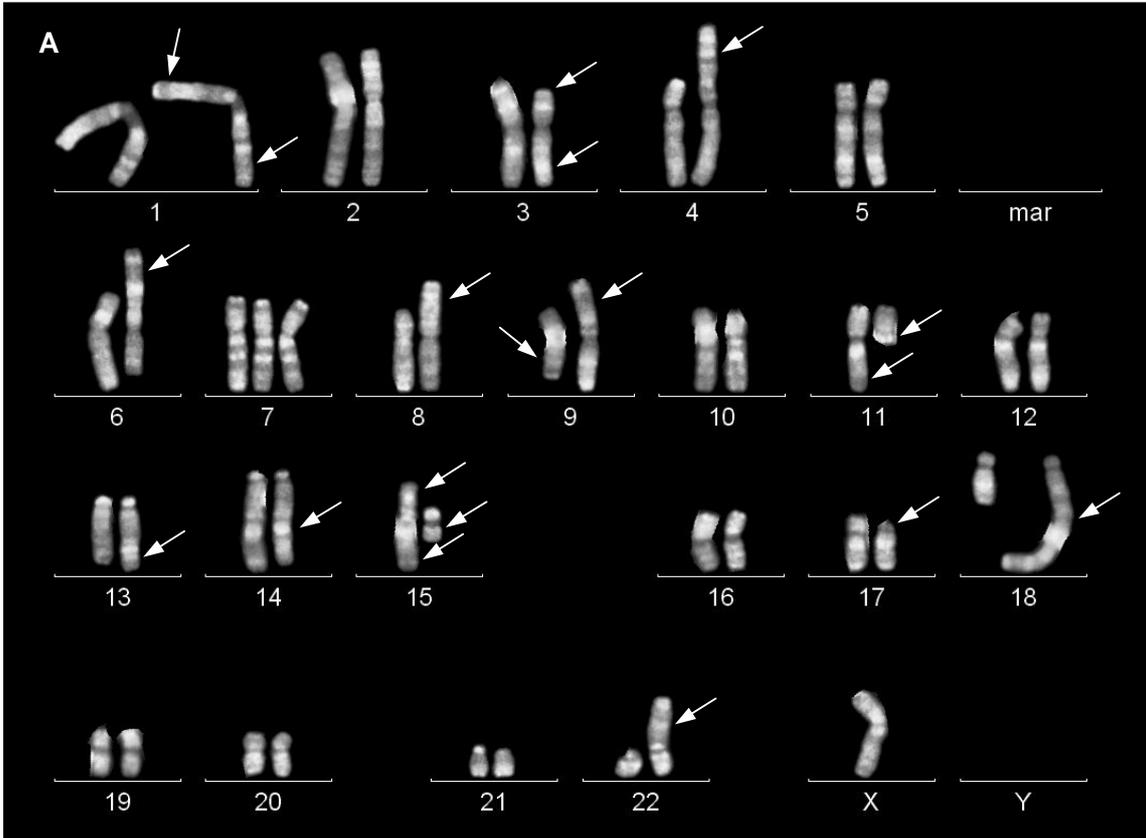
Die Gene *BCL2*, *BCL6*, *P53*, *RB*, *C-MYC* und *P16*, deren genetische Veränderungen bekanntermaßen funktionelle Bedeutung in der Tumorphathogenese besitzen können, wurden bei einem Hinweis auf eine Veränderung mittels Fluoreszenz- *in situ*-Hybridisierung untersucht.

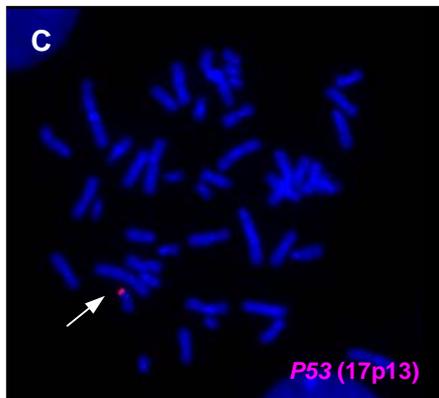
In der Zelllinie Granta-519 zeigte die R-Bandendarstellung ein strukturell auffälliges und in der SKY homogen gefärbtes Chromosom 18, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass sich Material eines anderen Chromosoms an das aberrante Chromosom angelagert hatte. Das Chromosom wurde als *hsr(18)(q?)* beschrieben. Die FISH zur Untersuchung des Gens *BCL2* auf 18q21 detektierte mit 4-6 Signalen eine erhöhte Kopienzahl des Gens. Ein weiteres Signal konnte für das Chromosom *der(3;18)(q10;q10)* nachgewiesen werden (**Abb.12E**).

Die SKY-Analyse der MM-Zelllinie KMS-12 PE zeigte zwei derivative Chromosomen 1 mit erweiterter Zentromerregion und zusätzlichem chromosomalen Material, dessen Herkunft mithilfe der SKY-Analyse nicht eindeutig zugeordnet werden konnte (vgl. Pkt.3.1.1. und **Abb.12A**). Eine FISH zur Untersuchung des *BCL2*-Gens detektierte in der Zentromerregion dieser beiden Chromosomen 4-6 Kopien des Onkogens. Zwei weitere Signale konnten für die strukturell unauffälligen Chromosomen 18 detektiert werden (**Abb.12C**).

Taniwaki et al. (1995) beschrieben für die Zelllinie HBL-2 eine Amplifikation des *BCL2*-Gens mit 7 bis 10 Kopien auf einem als *add(18)(q23)* angegebenen Chromosom. Eine hier durchgeführte FISH konnte 7 Kopien des *BCL2*-Gens bestätigen (**Abb.12D**).

HBL-2



**HBL-2**

**Abb.18 Zytogenetische Charakterisierung der MCL-Zelllinie HBL-2**

Sowohl die R-Bandendarstellung (**A**) als auch die SKY-Analyse (**B**) verdeutlichen die Komplexität der strukturellen Veränderungen dieser MCL-Zelllinie. Die in dieser Metaphase nicht zu erkennende Insertion von Material des Chromosoms 6 in das derivative Chromosom 1 konnte mit Unterstützung der MCB1-Analyse gezeigt werden. Die Herkunft des an das derivative Chromosom 15 angelagerte Material ist unbekannt und klassifizierte nur vereinzelt als Material des Chromosoms 3 wie in dieser Metaphase. Die Vermutung einer monoallelischen Deletion des TSG *P53* konnte mittels FISH bestätigt werden (**C**). Auffallend war in der SKY eine *hsr(18)(q?)* mit Translokation *t(4;18)*. In einer FISH konnten 7 Kopien des Gens *BCL2* nachgewiesen werden (**Abb.14D**).

Das von Taniwaki et al. (1995) detektierte additive Material wurde mithilfe der SKY-Analyse als Material des Chromosoms 4 identifiziert (**Abb.18B**), so dass das Chromosom als  $der(18)amp(q?)t(4;18)(p13;q23)$ . ish  $amp(BCL2x7)$  beschrieben werden konnte. Ein weiteres *BCL2*-Signal zeigte das derivative Chromosom 4, das als  $der(4)t(1;4)(q12;p13)$ . ish  $der(4)t(1;4)(q12;p13)(wcp1+,bcl2+,wcp4+)$  beschrieben wurde (**Abb.12D**). In der MM-Zelllinie NOP-2 konnte dagegen eine monoallelische Deletion des *BCL2*-Gens nachgewiesen werden (**Abb.11F**).

Monoallelische Deletionen des TSG *P53* wurden in den Klonen B und C der MM-Zelllinie Molp-5 detektiert. Beide Klone zeigten ein  $del(17)(p12)$ , wohingegen diese Veränderung im Hauptklon nicht detektiert werden konnte (**Abb.16C** und **16D**). Über eine genetische Veränderung des zweiten Allels, die mit dem Funktionsverlust des *P53* einhergehen könnte, ist nichts bekannt.

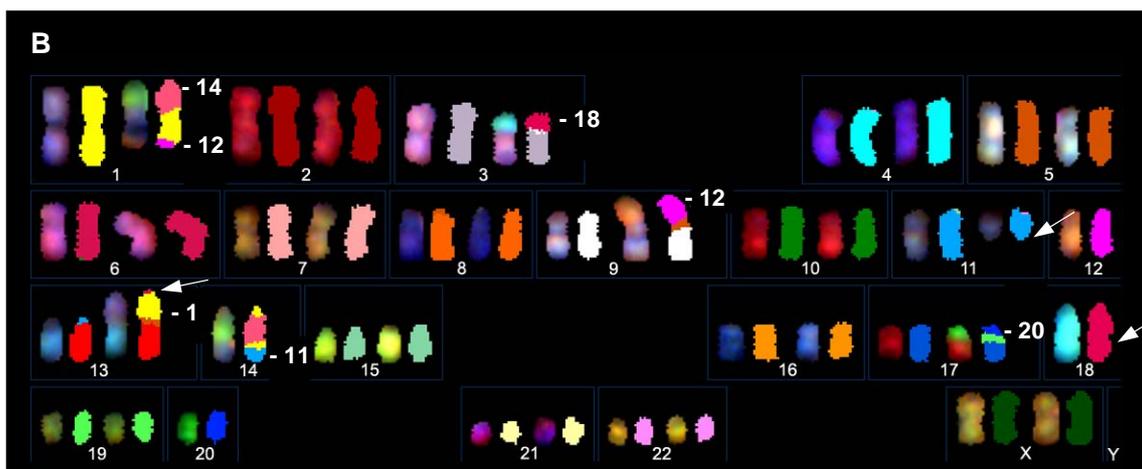
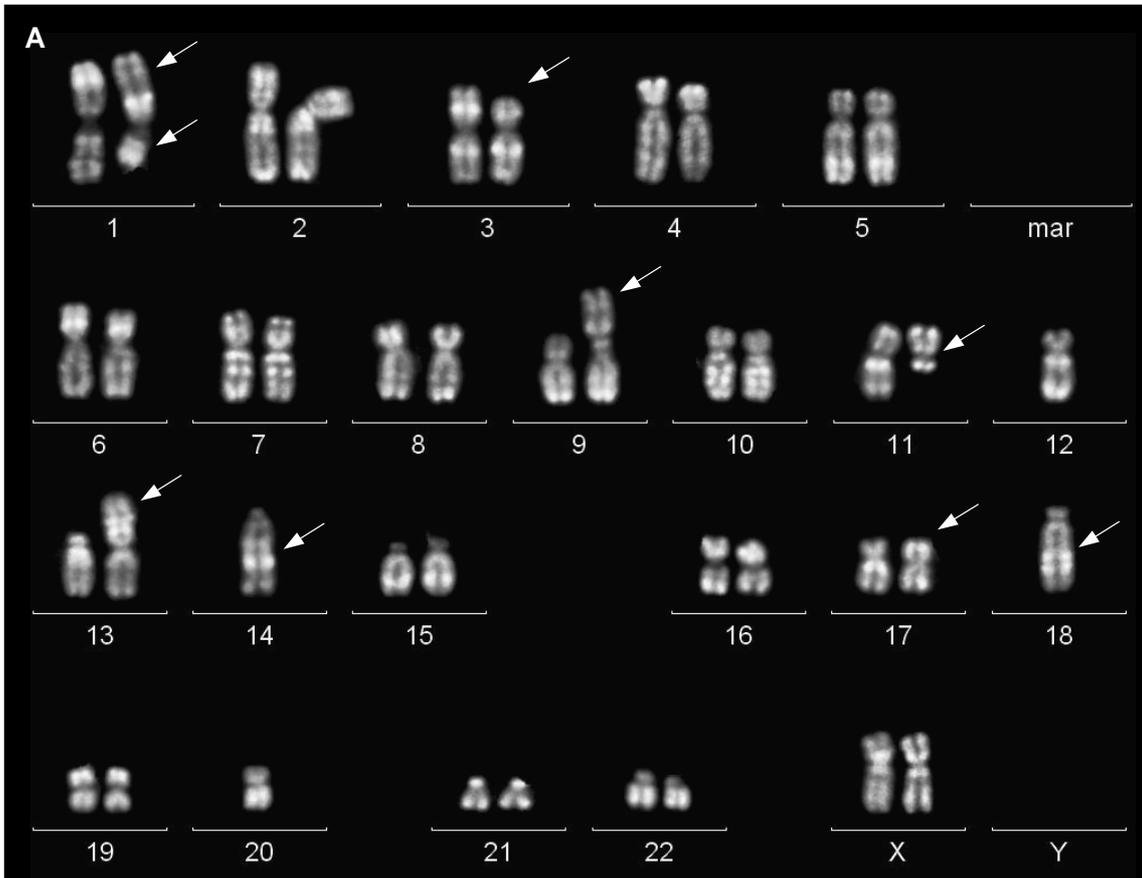
Auch in der Zelllinie Granta-519 konnte eine aus einer unbalancierten Translokation  $t(17;20)$  resultierende monoallelische Deletion des TSG *P53* mittels FISH nachgewiesen werden (**Abb.19C**). Jadayel et al. (1997) zeigten zwar eine fehlende Expression des *P53* in der Zelllinie Granta-519, Mutationen in den Exons 5-9 des zweiten Allels konnten sie jedoch nicht nachweisen.

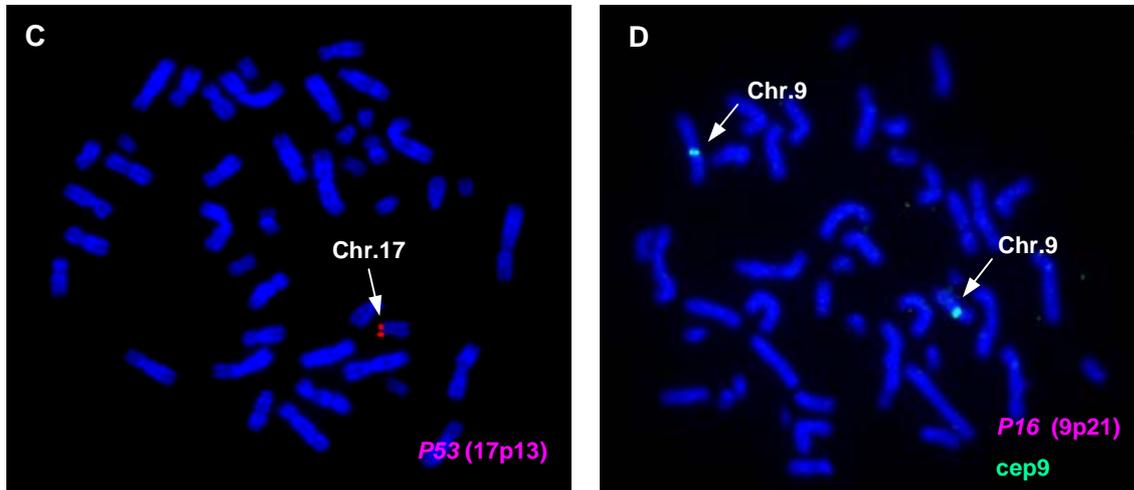
In der Zelllinie Granta-519 konnte durch spektrale Karyotypisierung (**Abb.19B**) ein  $dic(9;12)(p13;p11)del(12)(q24.1)$  detektiert werden. Jadayel et al. (1997) beschrieben für diese Zelllinie eine bialellische Deletion von *P16*. Diese konnte in einer FISH bestätigt werden (**Abb.19D**).

Nagai et al. (1991) detektierten in der MM-Zelllinie NOP-2 eine balancierte Translokation  $t(8;22)(q24;q11)$  und beschrieben ein daraus resultierendes *C-MYC* aktivierendes *IgLλ/C-MYC*-Rearrangement. Die hier durchgeführte FISH konnte dieses Rearrangement bestätigen und zeigte unter Verwendung einer DNA-Sonde für das Onkogen *C-MYC* ein Signalsplit für die derivativen Chromosomen 8 und 22 (**Abb.11E**).

Die FISH zur Untersuchung des Gens *BCL6* zeigte in der MM-Zelllinie KMS-12 PE zwei Signale, ein Signal für das Chromosom 3 und ein Signal für das p-terminal deletierte Chromosom 3, sowie jeweils Doppelsignale für die derivativen Chromosomen  $der(15)t(15;3;21)(q22;?28?q13;q11)$  und  $der(11)t(3;11)(q13;q13)der(3)t(3;3)(q28?p24)$  (**Abb.20A**).

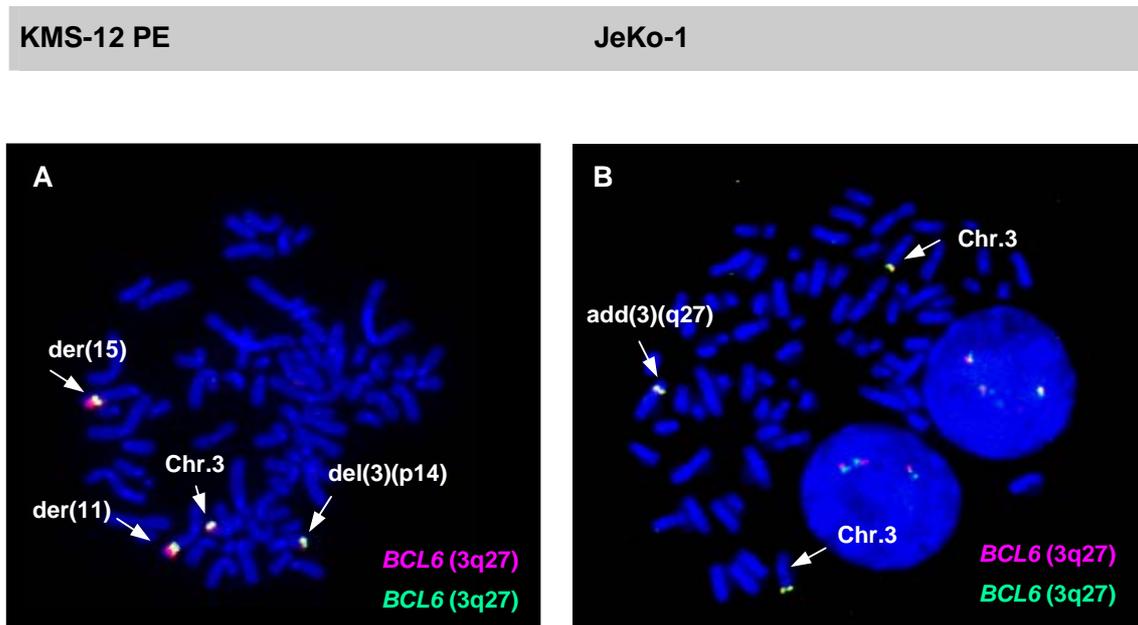
Granta-519



**Granta-519**

**Abb.19 Zytogenetische Analyse der MCL-Zelllinie Granta-519**

Der Karyotyp einer Metaphase nach R-Bandendarstellung (A) und die SKY-Analyse (B) zeigen die verschiedenen strukturellen Veränderungen der Zelllinie. Die detektierte unbalancierte Translokation  $t(17;20)(p11;q11)del(17)(q21q24)$  wies auf eine monoallelische Deletion des TSG *P53* hin, die in einer FISH bestätigt werden konnte (C). Zudem konnte in einer weiteren FISH zur Untersuchung der TSG *P15/P16* auf 9p21 eine homozygote Deletion nachgewiesen werden (D) und den Befund von Jadayel et al. (1997) bestätigen.



**Abb.20** Untersuchung des Gens *BCL6* in der MM-Zelllinie KMS-12 PE und in der MM-Zelllinie JeKo-1

In der Zelllinie KMS-12 PE konnten zwei Signale des Gens *BCL6* für die Chromosomen 3 und  $\text{del}(3)(\text{p}14)$  detektiert werden. Doppelsignale wurden in einem  $\text{der}(15)\text{t}(15;3;21)(\text{q}22;? \text{q}28; \text{q}13; \text{q}11)$  und in einem  $\text{der}(11)\text{t}(3;11)(\text{q}13; \text{q}13)\text{der}(3)\text{t}(3;3)(\text{q}28; ? \text{p}24)$  detektiert (**A**). In der hypotriploiden MCL-Zelllinie JeKo-1 zeigte die FISH insgesamt drei Signale für das Gen *BCL6* und bestätigte damit ein  $\text{add}(3)(\text{q}27)$  terminal zum *BCL6*-Lokus (**B**).

In MCL erfolgt die Aktivierung des *BCL6*-Gens gewöhnlich über verschiedene Rearrangements. Strukturelle Veränderungen der Region 3q27, in der das Gen *BCL6* lokalisiert ist, konnten nicht detektiert werden. In der MCL-Zelllinie JeKo-1 zeigte die FISH zur Untersuchung des Gens *BCL6* drei regelrecht lokalisierte Signale, von denen ein Signal das in der SKY detektierte add(3)(q27) bestätigte (**Abb.20B**).

In der MM-Zelllinie Molp-5 konnte in allen Klonen eine Monosomie 13 detektiert werden, die damit eine monoallelische Deletion des TSG *RB* anzeigte. Zudem zeigte die MM-Zelllinie KMS-12 PE zwei Chromosomen 13 mit einer interstitiellen Deletion del(13)(q12q14) und zwei dizentrische Chromosomen, die als dic(13;16)(p11;q11) del(13)(q?12 or q12q33) beschrieben werden konnten. Eine FISH zur Untersuchung des TSG *RB* war hier nicht möglich. Eine homozygote Deletion des Gens konnte damit nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann formuliert werden, dass die mittels R-Bandendarstellung, SKY und MCB1-Analyse gewonnenen Ergebnisse der untersuchten MCL und MM *in vitro*-Modelle verglichen mit den bereits publizierten Daten einen deutlichen Informationszugewinn brachten. Einerseits konnten bekannte chromosomale Veränderungen dieser Zelllinien bestätigt oder präzisiert werden, zudem konnte eine Vielzahl weiterer struktureller Veränderungen detektiert und identifiziert werden.

Es konnten Chromosomenregionen definiert werden, in denen gehäuft strukturelle Veränderungen auftraten. Es ist zu vermuten, dass in diesen Regionen Gene lokalisiert sind, die in der Tumorentstehung und –progression eine wichtige Rolle spielen und darüber hinaus die Theorie des Mehrschrittprozesses der Krebsentstehung unterstreichen.

### 3.2 Chromosomale Aberrationen in murinen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen

#### 3.2.1 Chromosomale Defekte in leukämischen Varianten nach retroviralem Gentransfer und Expression des *MDR1*-Gens im *in vivo*-Stammzellmodell

Modlich et al. (2005) zeigten, dass der retrovirale Gentransfer zur Expression des *MDR1* in murinen HSZ und die nachfolgende Transplantation dieser Zellen in letal bestrahlte Mäuse zur Entwicklung leukämischer Phänotypen führen kann.

Die SKY-Analyse wurde an reisolierten und kurzzeitkultivierten hämatopoetischen Zellen von insgesamt 6 Mäusen mit leukämischem Phänotyp durchgeführt. 5 der zytogenetisch untersuchten Tiere zeigten phänotypisch eine myeloische Leukämie und ein Tier eine erythroide Leukämie. Von den 5 Mäusen mit myeloischer Leukämie zeigten die untersuchten leukämischen Zellen in 4 Mäusen unauffällige Karyotypen mit einem Chromosomensatz von 40,XX oder 40,XY. In der weiteren Maus mit myeloischer Leukämie und in der Maus mit erythroider Leukämie konnten in den neoplastischen Zellen klonale chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden (**Tab.15**). Die Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchung sind in Modlich et al. (2005) publiziert.

##### 3.2.1.1 Erythroid leukämischer Phänotyp mit strukturellen Aberrationen

Die SKY-Analyse des erythroid leukämischen Klons (# 31.2) zeigte als klonale strukturelle Veränderungen ein aberrantes Chromosom 11, involviert in eine komplexe Translokation T(4;11), bei der die Region 4A2-A3->4D3 in die Region 11B3-?4 inserierte und das Fragment 4A2-A3->4A1 zur terminalen Region 11D translozierte. Daraus resultierte ein partieller Zugewinn der Region 4A2-3->4A1 und ein partieller Verlust der Region 4D3->4ter. Desweiteren wurde ein zusätzliches derivatives Chromosom 9, involviert in eine unbalancierte Translokation T(9;18), nachgewiesen. Aus diesem Translokationsereignis resultierte als genomische Imbalance eine partielle Trisomie 9 (Region 9cen->9B) und eine partielle Monosomie 18 (18cen->18A2). Die beschriebenen chromosomalen Veränderungen konnten in 13 (87%) der analysierten Metaphasen detektiert werden, zwei weitere Metaphasen zeigten unauffällige Karyotypen. Die SKY-Analyse einer Metaphase des erythroiden Leukämieklons ist in **Abb.21B** dargestellt.

### 3.2.1.2 Balancierte Translokation in MPD-ähnlicher Leukämie

Die zytogenetische Untersuchung des leukämischen Klons einer Maus mit histologisch nachgewiesener MPD-ähnlicher Leukämie (# 46) zeigte in 12 der 15 analysierten Metaphasen (79%) als klonale strukturelle Veränderung eine balancierte Translokation T(1E3-F;9C-D) (**Abb. 21A**). Klonale numerische Veränderungen wurden nicht detektiert. Drei der ausgewerteten Metaphasen (21%) zeigten keine detektierbaren chromosomalen Veränderungen.

**Tab.15 Karyotypen leukämischer Klone**

Maus	Leukämie-Phänotyp	Karyotyp
# 5	MPD-ähnliche myeloische Leukämie	40,XX [13]
# 5.1	myeloische Leukämie mit Reifung	40,XX [12]
# 31.2	erythroide Leukämie	38~40,XX,Der(4)T(4A2;11D), +Der(9)T(9B;18A2), Der(11)T(11pter-> 11B3-?4::4A2~A3->4D3::11B3~?4->11D:: 4A2~A3->4A1),-18 [13]/ 40,XX [2]
# 40	myeloische Leukämie mit Reifung	40,XY [15]
# 43	myeloische Leukämie mit Reifung	40,XY [10]
# 46	MPD-ähnliche Leukämie	37~40,XY,T(1E3-F;9C-D) [11]

### 3.2.1.3 Vergleich der zytogenetischen Daten nach SKY mit den nachgewiesenen Insertionsloci retroviraler Sequenzen

Der Vergleich der zytogenetisch ermittelten Bruchpunkte (# 31.2 und # 46) mit den Insertionsloci der retroviralen Sequenzen, die mittels LM-(*ligation-mediated*)-PCR oder LAM-(*linear amplification-mediated*)-PCR ermittelt wurden (Modlich et al., 2005), zeigte deutliche Unterschiede. Dies führte zu dem Ergebnis, dass:

1. die Insertion der retroviralen Sequenzen in das murine Genom als primäres Ereignis zu bewerten ist und eine hierdurch erfolgte (Onko)Gen-Aktivierung den initialen Schritt in der Leukämogenese darstellte und nachfolgend chromosomale Veränderungen induzierte.

2. die Insertionsmutagenese zur sekundären chromosomalen Instabilität mit detektierbaren klonalen Aberrationen führen kann, aber nicht muss. (Eine Insertionsmutagenese konnte auch in Klonen nachgewiesen werden, die keine chromosomalen Aberrationen in der SKY-Analyse zeigten.)

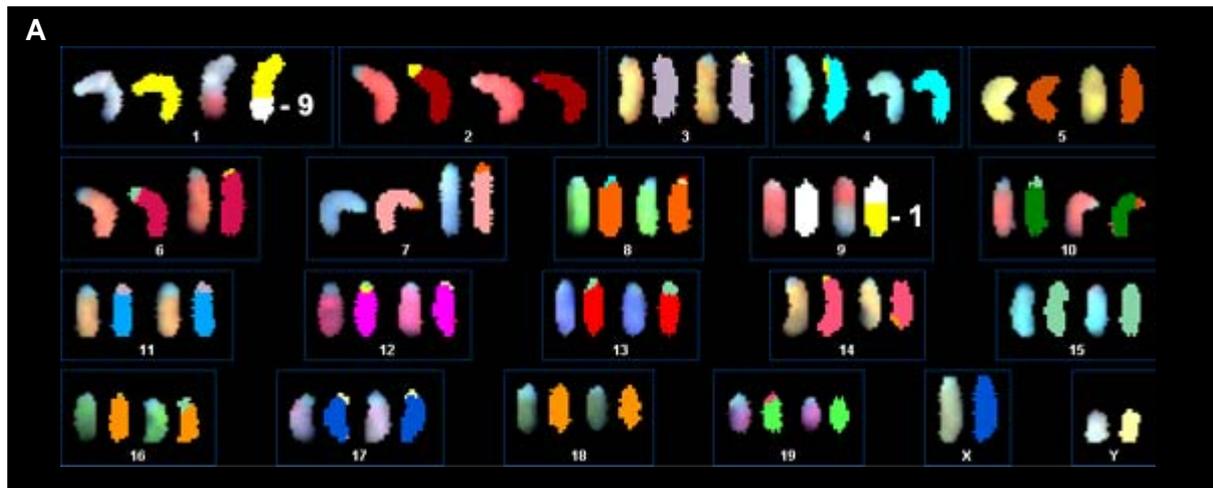
#### **3.2.1.4 Bestimmung der syntenen humanen Regionen**

Zu den murinen Bruchpunkten beider Klone wurden die syntenen humanen Regionen bestimmt (**Tab.16**). Den in der erythroiden Leukämie detektierten Veränderungen konnten 3 syntene humane Loci mit bekannten Leukämie-assoziierten Genen zugeordnet werden. Zur Region 4A2 des murinen Genoms ist die humane Region 8q21.3~8q22.1 synten, in der beispielsweise das Gen *ETO* lokalisiert ist. Dieses Gen ist in 40% der AML M2 in eine t(8;21)(q22;q22) involviert (Löwenberg et al., 1999). Die murine Region 9B ist zur humanen Region 11q22.3-qter synten. Das Gen *ATM* ist in der Region 11q22.3 lokalisiert. In verschiedenen Tumoren können Deletionen des Gens detektiert werden, typische inaktivierende Translokationen sind nicht bekannt. Zudem ist in dieser Region das *MLL*-Gen lokalisiert (11q23.3), das in verschiedene Translokationen involviert sein kann (Löwenberg et al., 1999). Die murine Region 11B3-?4 entspricht der Region 17pter-p11.2 im humanen Genom, in der auch das TSG *P53* lokalisiert ist. Jedoch sind funktionell bedeutende inaktivierende oder aktivierende Rearrangements unbekannt.

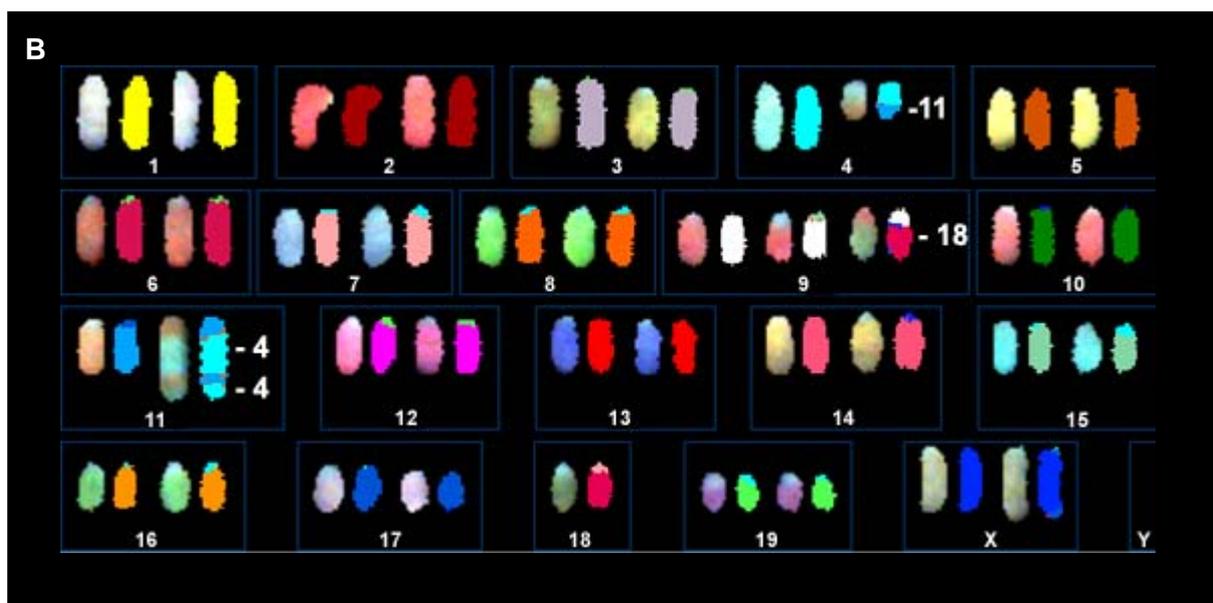
Der in der MPD-ähnlichen Leukämie detektierte Bruchpunkt 9C-D ist zur humanen Region 15q21.2-q24.3 synten. In dieser Region ist das Gen *PML* lokalisiert, das bei fast allen Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie (APL) in eine Translokation t(15;17)(q22;q21) involviert ist (Löwenberg et al., 1999).

Es bleibt fraglich, ob diese Gene in die hier beschriebene chromosomale Instabilität involviert sind. Die Bedeutung der chromosomalen Veränderungen hinsichtlich einer möglichen klonalen Evolution mit weiteren genomischen und/oder genetischen Veränderungen ist somit unklar.

## MPD-ähnliche Leukämie



## erythroide Leukämie



**Abb.21 Nachweis chromosomaler Aberrationen in einem murinen *in vivo*-Modell nach Insertionsmutagenese**

In 2 von insgesamt 6 untersuchten leukämischen Klonen konnte eine nach Insertionsmutagenese induzierte sekundäre chromosomale Instabilität zytogenetisch nachgewiesen werden. In **A** ist das Karyogramm eines Tieres mit MPD-ähnlicher Leukämie gezeigt, in **B** das einer Maus mit erythroider Leukämie. In beiden Fällen konnten klonale chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden. Das Tier mit MPD-ähnlicher Leukämie zeigte eine reziproke Translokation T(1E3-F;9C-D), wohingegen die Maus mit erythroider Leukämie ein komplexes Rearrangement unter Einbeziehung der Chromosomen 4 und 11, sowie ein zusätzliches derivatives Chromosom 9, involviert in einer unbalancierten Translokation T(9B;18A2), aufwies.

**Tab.16 Detektierte chromosomale Bruchpunkte und Imbalancen in leukämischen Klonen, Bestimmung der syntenen humanen Regionen mit Zuordnung bekannter Leukämie-assoziiierter Genen**

	Bruchpunkt	syntene humane Region	bekannte Leukämie-assoziierte Gene	
<b>erythroide Leukämie</b>	4A2	8q21.3-8q22.1	<i>ETO</i>	
	4D3	1pter-p32.3	—	
	9B	11q22.3-qter	<i>ATM, MLL</i>	
	11B3-?4	17pter-p11.2	<i>P53</i>	
	11D	17q12-q21.3	—	
	18A2	18cen-q12.3	—	
	18cen bis 18A2 (Verlust)	10p12.1-p11.21 18cen-q12.3	—	
	9cen bis 9B (Zugewinn)	11q14.3-qter 7p14.3-p14.2	<i>ATM, MLL</i>	
	<b>MPD-ähnliche Leukämie</b>	1E3-F	2q13-q14.2 1q23.2-q32.1	—
		9C-D	15q21.2-q24.3	<i>PML</i>

### 3.2.2 Chromosomaler Verlust führt zur Resistenzentwicklung gegen suizidale Gentherapie

Die Lymphom-Zelllinie EL-4wt wurde von Frank et al. (2004) als Ausgangszelllinie für retroviralen Gentransfer im Rahmen der suizidalen Gentherapie verwendet. Die Zellen wurden zur Expression der HSV-TK retroviral transduziert und in immunkompetente Mäuse transplantiert, die progressive Tumoren entwickelten. Unter GCV-Therapie bildeten sich diese Tumoren zurück, teilweise traten jedoch innerhalb kurzer Zeit Rezidive auf. Mit der Frage nach chromosomalen Veränderungen wurden sowohl die Lymphom-Zelllinie EL-4wt vor und nach Gentransfer als auch entwickelte Primärtumor-Zellen und Zellen der Rezidive zytogenetisch untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tab.17** zusammengefasst.

Tab.17 Zytogenetische Analyse der Lymphom-Zelllinie EL-4wt und retroviral transduzierter Derivate

Aberration	EL-4 wt	EL-4 nach GT	Klon I				Klon II			Klon III		
	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	# 11	# 12
Chr.zahl	72-76	75-77	73-77	75-78	74-77	68-75	74-78	71-78	72-82	75-77	71-78	72-77
Dup(XF4-5D)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Del(1F)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Der(2)T(1F;2H)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T(2E;13A)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Del(3F)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Del(4D)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T(5D;12C)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
+Der(5)T(5D;12C)	—	—	—	—	—	—	+	—	+	++	++	++
Der(6)T(6D;11B2) T(11D;7F)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Del(7E)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Der(7)T(7F;11D)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Der(9)T(1F;9E)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
?T(10D;10B)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Der(10)T(10D;1D)T(1F;9D) T(9F;7F)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Der(11)T(6D;11B2) Der(11)T(11;15)Del(15)	++	++	++	++[10] +[3]	++	++	++	++	++	++	++	++
Del(13A2A5)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
RT(13;13)Del(13)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+[10]	+[9]	+[11]
Del(14B)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Der(14)T(8E;14E)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+Del(15B)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Der(15)T(14B;15E)	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++
RT(16;17)T(16C1;7F?2) T(7F?2;9F)	+	+	+	+	+	+	+[7]	+	+	+	+[7]	+
Dic(7;16)(7B;16cen) T(16C1;7F?2)T(7F?4;9F)	—	+	+	+	+	+	+[7]	+	+	+	+	+
Dic(7B;18cen)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Der(19)T(6B;19D)	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+
numerische Veränderungen	-6,+10, -14	-6,+10, 14	-6,+10, -14	-6,+10, -14, +11[3]	-6,+10, -14	-6,+10, -14	-6,-14, +10, +1~3 mar	-6,+10, -14,+mar	-6,+10, -14, +1~3mar	-1,-6, +10,-14 +mar [5]	-1,-6, +10,-14, +mar[4]	-1,-6, +10,-14, +mar[3]
ausgewertete Metaphasen	10	10	10	10	10	10	10	10	11	12	11	12

+ / ++ Anzahl der detektierten Chromosomen mit dieser Aberration; [ ] Anzahl der Metaphasen, in der die Aberration detektiert werden konnte; GT, Gentransfer

Zunächst sollten folgende Fragen beantwortet werden:

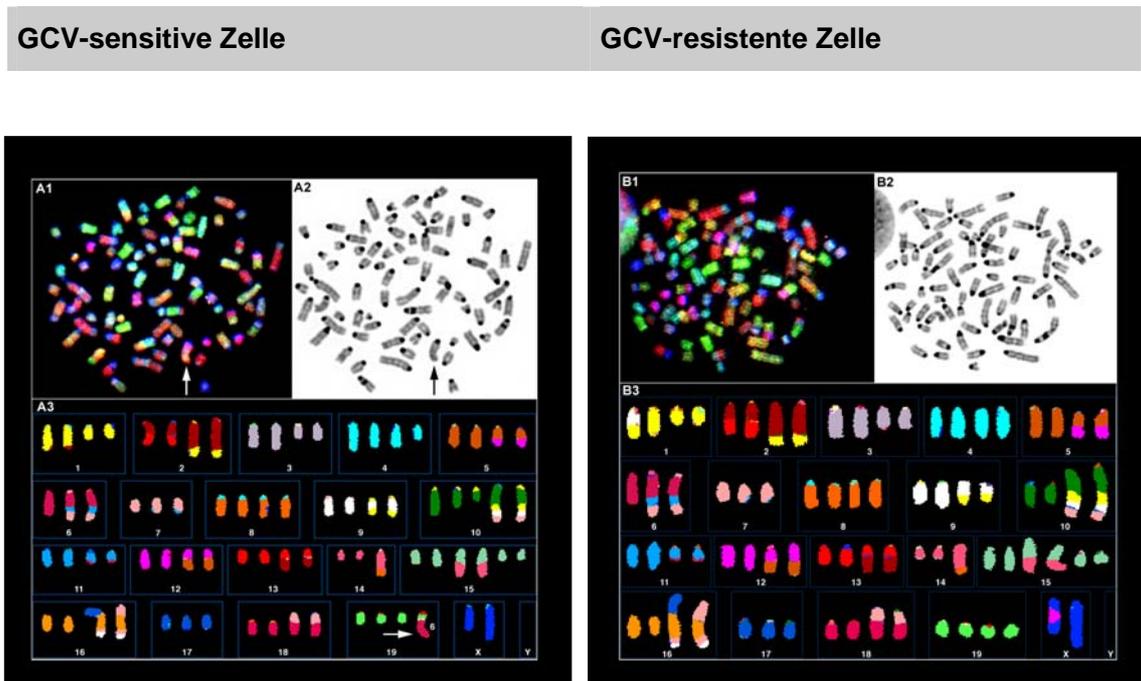
- Welche klonalen chromosomalen Veränderungen zeigt die Ausgangs-Lymphom-Zelllinie EL-4wt?
- Resultiert aus dem retroviralen Gentransfer zur Expression der HSV-TK eine, durch potentielle Insertionsmutagenese induzierte, (sekundäre) chromosomale Instabilität?

### **3.2.2.1 Komplexe chromosomale Aberrationen in der Zelllinie EL-4wt**

Die zytogenetische Untersuchung der Zelllinie EL-4wt (# 1) zeigte einen tetraploiden Chromosomensatz mit klonalen strukturellen Aberrationen, in die alle Chromosomen involviert waren. Detektiert wurden balancierte und unbalancierte Translokationen, vereinzelt mit komplexen Rearrangements, dizentrischen Chromosomen und einer Robertson-Translokation, sowie zahlreiche Deletionen. Als balancierte Veränderungen konnten die Translokationen T(2E;13A) und T(5D;12C) detektiert werden, als fragliche Veränderung wurde eine Translokation T(10D;10B) beschrieben. Als unbalancierte Veränderungen wurden zwei Der(2)T(1F;2H), zwei Der(9)T(1F;9E), zwei Der(10)T(10D;1D)T(1F;9D)T(9F;7F), ein Der(14)T(8E;14E), zwei Der(15)T(14B;15E), ein Der(19)T(6B;19D), ein Dic(7;16)(7B;16cen)T(16C1;7F?2)T(7F?4;9F), zwei Dic(7B;18cen) und eine RT(16;17)T(16C1;7F?2)T(7F?4;9F) detektiert. Zudem wurde eine komplexe Translokation unter Involvierung der Chromosomen 6, 7 und 11 vermutet. Deletionen betrafen die Chromosomen 1, 3, 4, 7 und 14 und eine interstitielle Deletion das Chromosom 13. In einem der X-Chromosomen konnte zudem eine Dup(XF4-5D) detektiert werden, numerische Veränderungen betrafen die Chromosomen 1, 6, 10, 11 und 14.

### **3.2.2.2 Keine Hinweise auf Veränderungen der chromosomalen Instabilität nach retroviralem Gentransfer**

Die SKY-Analyse der Zelllinie EL-4wt nach retroviralem Gentransfer (# 2) zeigte einen identischen Karyotyp zur Ausgangszelllinie EL-4wt. Damit konnte gezeigt werden, dass der retrovirale Gentransfer *per se* keine sekundäre chromosomale Instabilität induzierte. Aus dem polyklonalen Kulturansatz nach Gentransfer wurden durch Klonisolierung die Klone II und III etabliert.



**Abb.22 SKY-Analyse GCV-sensitiver und GCV-resistenter Klone**

Die SKY-Analyse GCV-resistenter und GCV-sensitiver Klone zeigte komplex aberrante Karyotypen mit sowohl numerischen als auch strukturellen Aberrationen. Das Karyogramm einer GCV-sensitive Zelle (**A**) zeigt 3 normale Chromosomen 19 und ein derivatives Chromosom  $\text{Der}(19)\text{T}(6\text{B};19\text{D})$ , während die GCV-resistente Zelle (**B**) 4 normale Chromosomen 19 aufwies. Alle weiteren chromosomalen Veränderungen wurden in beiden Zellen detektiert. Der Verlust des  $\text{Del}(4\text{D})$  und eines Chromosoms 10 im resistenten Klon in dieser Metaphase ist präparationsbedingt, konnte jedoch in allen anderen Zellen nachgewiesen werden.

### 3.2.2.3 Chromosomaler Verlust in GCV-resistenten Subklonen des Klons I

Die zytogenetische Untersuchung der Proben # 4 und # 5, deren Zellen aus primärem Tumormaterial isoliert wurden, zeigten die gleichen chromosomalen Veränderungen wie die Ausgangszelllinie EL-4wt (# 1). Dagegen konnte in den Proben # 3 und # 6, die beide eine GCV-Resistenz zeigten, das derivative Chromosom Der(19)T(6B;19D) nicht nachgewiesen werden (**Abb.22**).

### 3.2.2.4 Vergleich der zytogenetischen Daten mit den Daten des retroviralen Insertionsnachweises

Frank et al. (2004) wählten für die Experimente Klone aus, bei denen eine retrovirale Einzelgeninsertion nachweisbar war. Sie zeigten zudem für den Klon I die Insertion des Transgens in die Region 6B3. Im Vergleich dazu zeigten die GCV-resistenten Proben # 3 und # 6 in der zytogenetischen Analyse den Verlust des Der(19)T(6B;19D). Die GCV-Resistenzentwicklung in den Proben # 3 und # 6 konnte somit auf den Verlust des Transgens durch eine sekundäre chromosomale Instabilität zurückgeführt werden.

### 3.2.2.5 Zytogenetische Charakterisierung der Klone II und III

Die Klone II und III zeigten, im Vergleich zur Ausgangszelllinie EL-4wt, ähnliche chromosomale Veränderungen. Als Unterschied konnten in beiden Klonen ein (Klon II) bis zwei (Klon III) zusätzliche derivative Chromosomen 5, resultierend aus einer Translokation T(5D;12C), nachgewiesen werden. Zudem wurden in beiden Klonen 1~3 Markerchromosomen detektiert. In Klon III waren zudem eine Robertson-Translokation der Chromosomen 13 und der Verlust eines Chromosoms 1 als klonale Veränderung nachweisbar (**Tab.17**).

Der retrovirale Insertionsnachweis zeigte für den Klon II eine Insertion in das Chromosom 3 und für den Klon III eine Insertion in das Chromosom 11 (O.Frank, Dissertation). Diese Chromosomen zeigten, im Vergleich zum Ausgangsklon EL-4wt, keine sekundären chromosomalen Veränderungen. Die Entwicklung der Rezidive (# 9 und # 12) konnte damit nicht auf eine sekundäre chromosomale Instabilität unter Verlust des Transgens zurückgeführt werden.

### 3.2.2.6 WCP-FISH zur Bestätigung diskreter chromosomaler Aberrationen

Die Bestätigung von Translokationen, die nur diskrete chromosomale Fragmente betrafen oder der Ausschluss fraglicher Translokationen wurde mittels WCP-FISH durchgeführt.

Unter Verwendung der WCP-Sonden für die Chromosomen 6, 7 und 11 konnte eine komplexe Translokation dieser Chromosomen nachgewiesen werden (**Abb.23**). Die Veränderungen wurden als Der(6)T(6D;11B2)T(11D;7F), Der(7)T(7F;11D) und Der(11)T(6D,11B2) beschrieben.

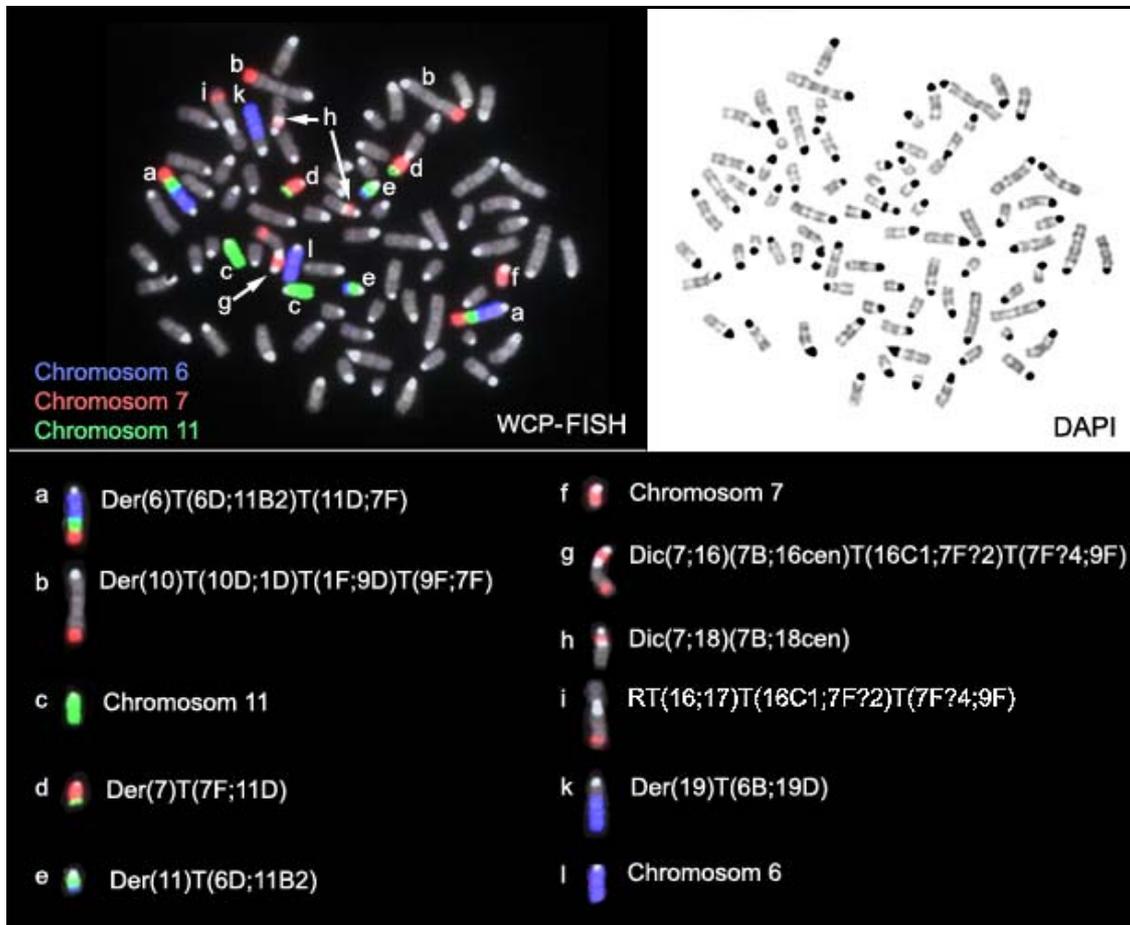
In weiteren WCP-FISH konnte, unter Verwendung der entsprechenden WCP-Sonden, ein Der(14)T(8E;14E) bestätigt werden. Dagegen ergab sich kein Hinweis auf eine balancierte Translokation der Chromosomen 1 und 2, womit ein Der(2)(1F;2H) beschrieben werden konnte. Ausgeschlossen werden konnten außerdem eine balancierte Translokation T(1;9), ein derivatives Chromosom Der(3)T(3;8) und ein derivatives Chromosom Der(3)T(3;14).

Die zytogenetischen Daten der EL-4wt Zelllinie (# 1), der retroviral transduzierten Zellen (# 2) und des Klons I sind in Frank et al. (2004) publiziert.

### 3.2.3 Chromosomale Instabilität im murinen *in vitro*-Modell der humanen Ph-ALL

Die Expression des humanen *BCR-ABL*-Fusionstranskriptes führte zur Etablierung der Zelllinie BM185wt als *in vitro*-Modell für die humane Ph-ALL. Mit der Frage, ob die retroviral induzierte Expression des Onkogens *BCR-ABL* in dem etablierten Modell zur chromosomalen Instabilität oder sogar zur Entwicklung klonaler chromosomaler Aberrationen führt, wurde die Zelllinie zytogenetisch untersucht. Zwei weitere derivative Zelllinien, BM185-gfp und BM185-ova-gfp, entstanden nach zweitem Gentransfer zur Expression des *GFP* und *Ovalbumin-GFP* und wurden im Vergleich zum wt-Klon zytogenetisch analysiert. Leervektor-Kontrollen, zum Ausschluss einer retroviral induzierten Insertionsmutagenese, standen nicht zur Verfügung. Die zytogenetische Charakterisierung der *in vitro*-Modelle ist in Rudolph et al. (2005) beschrieben.

## Primärtumor-Metaphase



**Abb.23 WCP-FISH zum Nachweis einer komplexen Translokation unter Beteiligung der Chromosomen 6, 7 und 11**

Die SKY-Analyse ließ eine komplexe Translokation unter Beteiligung der Chromosomen 6, 7 und 11 vermuten. Aufgrund der z.T. nur diskreten Veränderungen wurde eine WCP-FISH mit den entsprechenden WCP-Sonden durchgeführt. Die FISH zeigte, dass auf eine balancierte Translokation der Chromosomen 6 und 11 eine balancierte Translokation der Chromosomen 7 und der bereits derivativen Chromosomen 6 folgte (vgl. **Abb.22**).

### **3.2.3.1 Expression des p185/p190 *BCR-ABL*-Fusionstranskriptes induziert sekundäre CIN mit Trisomien als klonale Aberration**

#### **3.2.3.1.1 Spektrale Karyotypisierung der Zelllinie BM185wt**

Die zytogenetische Untersuchung der Zelllinie BM185wt zeigte einen hyperdiploiden Chromosomensatz. In 13 der ausgewerteten Metaphasen (87%) konnte eine Trisomie 5 und in 4 weiteren Metaphasen (27%) zusätzlich eine Trisomie 18 nachgewiesen werden. In zwei Metaphasen mit Trisomie 18 wurde zudem ein derivatives Chromosom 12, involviert in eine unbalancierte Translokation T(XE?;12D), detektiert (**Abb.24A, Tab.18**).

#### **3.2.3.1.2 Spektrale Karyotypisierung der Zelllinie BM185-gfp**

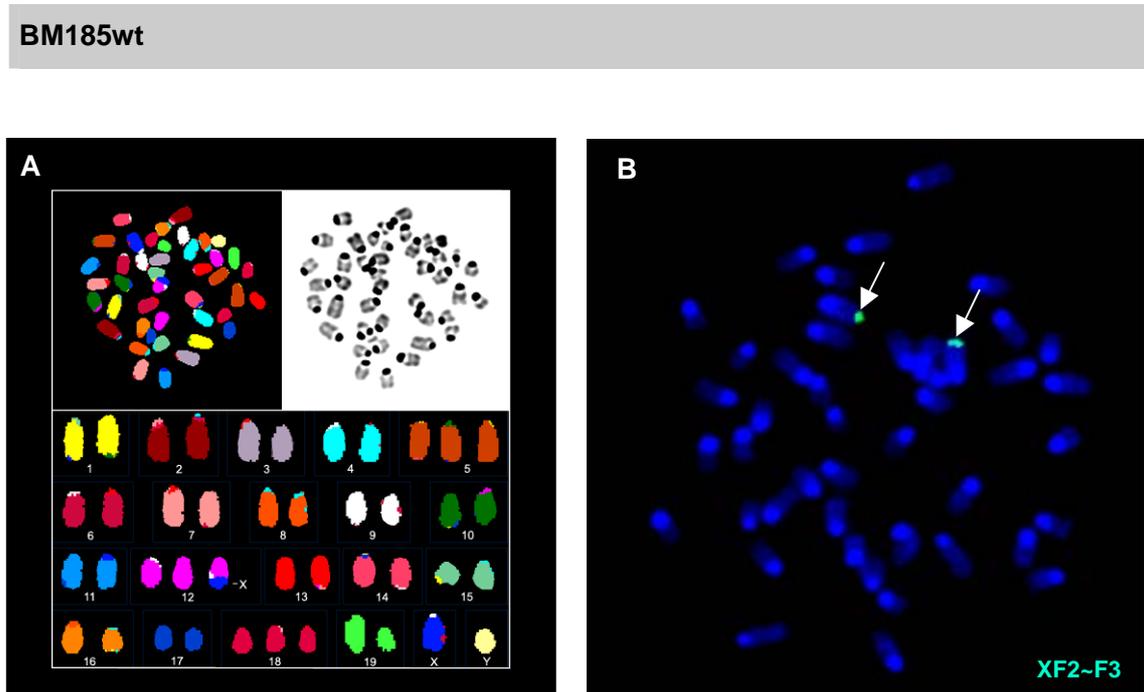
Von den *GFP*-exprimierenden Zellen konnten 15 Metaphasen mit vorrangig hyperdiploidem Chromosomensatz ausgewertet werden. In 13 Metaphasen (87%) wurde eine Trisomie 5 detektiert. In 5 weiteren Metaphasen lag neben der Trisomie 5 eine Trisomie 18 vor. In 4 dieser 5 Metaphasen konnte zudem eine Trisomie 12 nachgewiesen werden und in weiteren 2 Metaphasen der Verlust des Y-Chromosoms (**Tab.18**).

#### **3.2.3.1.3 Spektrale Karyotypisierung der Zelllinie BM185-ova-gfp**

Die 15 ausgewerteten Metaphasen der *Ovalbumin-GFP*-exprimierenden Zellen zeigten alle eine Trisomie 5. Im Unterschied zu den Zelllinien BM185wt und BM185-gfp konnte in keiner Metaphase eine Trisomie 18 nachgewiesen werden. Dagegen zeigten insgesamt 8 Metaphasen den Verlust des Y-Chromosoms. Im Vergleich zum Wildtyp konnte in einer Metaphase die Translokation T(XE?;12D) und zusätzlich eine Translokation T(X?;18) detektiert werden (**Tab.18**).

#### **3.2.3.1.4 FISH zur Quantifizierung der Der(12)T(XE?;12D)-positiven Zellen**

Die genaue Quantifizierung der Der(12)T(XE?;12D)-positiven Zellen innerhalb eines jeden Klons wurde in einer FISH unter Verwendung einer DNA-Sonde durchgeführt, die in der Region XF2-F3 des murinen Genoms hybridisiert.



**Abb.24 Spektrale Karyotypisierung und Fluoreszenz- *in situ*-Hybridisierung eines murinen *in vitro*-Modells der humanen Ph-ALL**

Die Zelllinie BM185wt zeigte als klonale numerische Aberrationen eine Trisomie 5, eine Trisomie 18 und ein zusätzliches derivatives Chr.12, hervorgegangen aus einem unbalancierten Rearrangement der Chromosomen X und 12 (**A**). Dargestellt sind in **A** die Metaphasechromosomen nach Klassifizierung (links oben) und daneben die DAPI-Aufnahme derselben Metaphase. Der untere Bildteil zeigt das Karyogramm mit dem Karyotyp 43,XY,+5,+18,+Der(12)T(XE?;12D). Die aus dem BAC-Klon RP23-382J5 generierte DNA-Sonde ist zur Region F2-F3 des X-Chromosoms komplementär und die FISH (**B**) detektierte sowohl das X-Chromosom als auch das derivative Chr.12 mit Anteilen des X-Chromosoms und ermöglichte die Quantifizierung der Der(12)T(XE?;12D)-positiven Zellen.

Eine männliche Zelle, die Der(12)T(XE?;12D)-negativ ist, sollte ein Einzelsignal für die chromosomale Region XF2~F3 zeigen. **Abb.24B** zeigt Metaphase-Chromosomen einer männlichen BM185wt-Zelle mit zwei Signalen und bestätigte damit die strukturelle Aberration. Insgesamt konnte das derivative Chromosom 12 in 15% der BM185wt-Zellen und in 12% der BM185-ova-gfp-Zellen nachgewiesen werden. In der Zelllinie BM185-gfp war das derivative Chromosom 12 in keiner Zelle nachweisbar.

**Tab.18 Karyotypen der *in vitro*-Modelle der humanen Ph-ALL und derivativer Zelllinien**

Zelllinie	Karyotyp	Der(12)T(XE?;12D)-positive Zellen
BM185wt	41,XY,+5 [8],40-44*,idem,+18,+Der(12)T(XE?;12D),+mar [cp7]	15%
BM185-gfp	41,XY,+5 [8],37-43*,X,-Y,+5,+12,+18 [cp7]	—
BM185-ova-gfp	41,XY,+5 [6],39-40,X,-Y,+5 [8], 36*,XY,+5,+Der(12)T(XE?;12D),+18 [1]	12%

\*Einige Metaphasen zeigten, bedingt durch technische Artefakte, Verluste einzelner Chromosomen.

### 3.2.3.1.5 Kein Hinweis auf die Beteiligung der murinen Gene *bcr* und *abl* an einem chromosomalen Rearrangement

Das *bcr*-Gen ist im murinen Genom in der Region 10B5.3 lokalisiert, das *abl*-Gen in der Region 2B. Weder das Chromosom 10 noch das Chromosom 2 zeigte in den untersuchten Metaphasen numerische oder strukturelle Aberrationen. Damit ist anzunehmen, dass die detektierten chromosomalen Veränderungen auf die Expression des transduzierten *BCR-ABL*-Fusionsgens zurückzuführen sind und nicht auf ein chromosomales Rearrangement der murinen Gene *bcr* und *abl*.

### **3.2.4 Chromosomale Instabilität in einem murinen *in vitro*-Modell des humanen ALCL**

Bittner et al. (2000) charakterisierten die Zelllinie TS1G6, die ein Modell des humanen ALCL darstellt, morphologisch und immunhistochemisch. Zur weiteren Charakterisierung wurde in dieser Arbeit eine zytogenetische Analyse mittels spektraler Karyotypisierung durchgeführt.

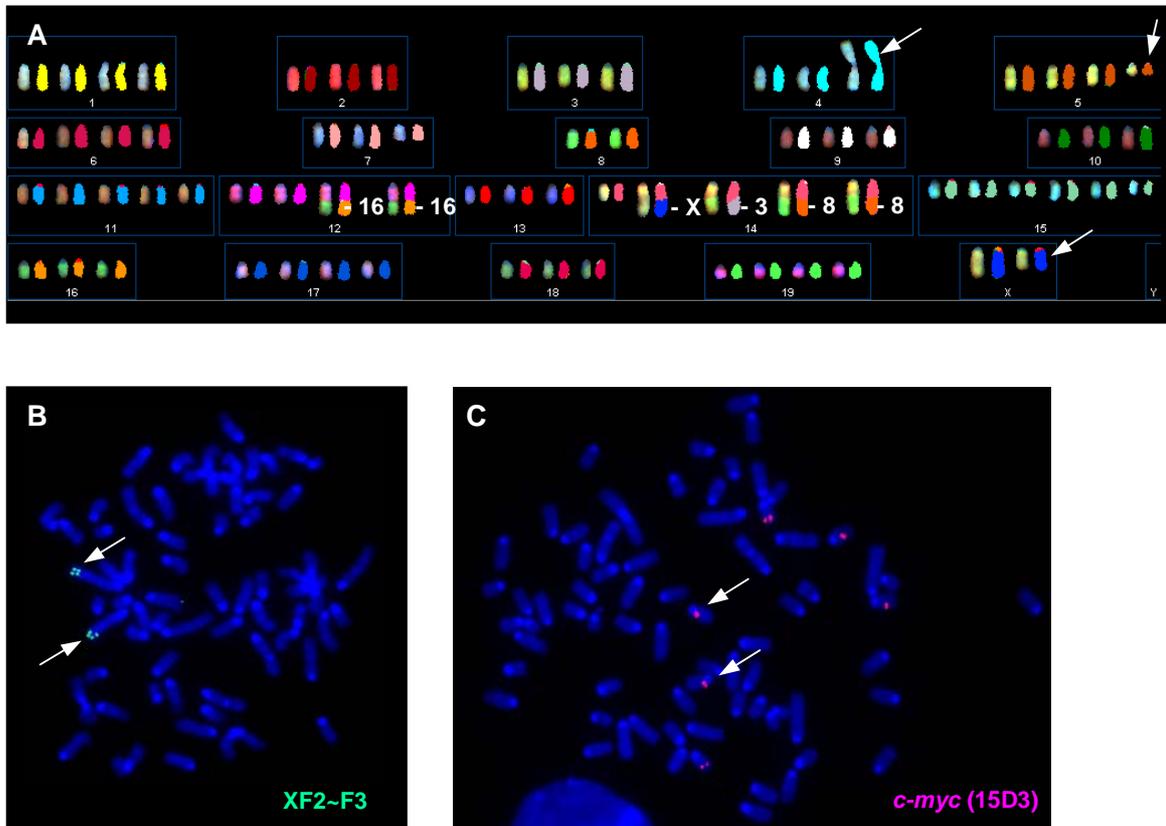
#### **3.2.4.1 Aneuploidie und Rearrangements des Chromosoms 14 bei Diversität der Translokationspartner**

Die zytogenetische Analyse der Zelllinie TS1G6 mittels SKY zeigte sowohl numerische als auch strukturelle Aberrationen. Es fanden sich Zugewinne, d.h. mehr als 4 Kopien der Chromosomen 11, 14 und 15, sowie Verluste der Chromosomen X, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 13, 16 und 18. Als strukturelle Veränderungen wurden verschiedene unbalancierte Translokationen unter Involvierung des Chromosoms 14 detektiert. Die Bruchpunktregion für das Chromosom 14 konnte bei allen Translokationsereignissen auf die Region 14E5 festgelegt werden, als Translokationspartner wurden die Chromosomen X, 3 und 8 identifiziert. Diese Veränderungen wurden als Der(14)T(X?A6;14E5), Der(14)T(3A3;14E5) und Der(14)T(8A1;14E5) beschrieben. Zudem konnten ein dizentrisches Chromosom Dic(12F;16cen) und ein isodizentrisches Chromosom iDic(4cen), sowie Deletionen der Chromosomen X und 5 nachgewiesen werden (**Abb.25A**).

#### **3.2.4.2 FISH zur Charakterisierung der strukturellen Veränderungen des X-Chromosoms**

Zur weiteren Charakterisierung der strukturellen Veränderungen des X-Chromosoms wurde eine FISH unter Verwendung der in der Region XF2-F3 hybridisierenden DNA-Sonde durchgeführt. Sowohl das in der SKY unauffällige X-Chromosom als auch das derivative Chromosom 14 zeigte zwei Fluoreszenzsignale, die auf Duplikationen der Region hinwiesen (**Abb.25B**).

## TS1G6



**Abb.25 Zytogenetische Analyse der Zelllinie TS1G6**

Die SKY-Analyse (**A**) zeigte einen hypertriploiden Chromosomensatz mit strukturellen Aberrationen. Deletionen wurden für die Chromosomen 5 und X nachgewiesen. Unbalancierte Translokationen betrafen das Chromosom 14 mit den Chromosomen X, 3 und 8 als Translokationspartner. Zudem konnten ein isodizentrisches Chromosom 4 und zwei dizentrische Chromosomen Dic(12F;16cen) nachgewiesen werden. Die Bruchpunkte der derivativen Chromosomen 14 wurden auf die Region 14E5 festgelegt. Die in dieser Metaphase detektierte Del(7) zeigte keine Klonalität. Die FISH unter Verwendung der in der Region XF2~F3 hybridisierenden Sonde zeigte zwei Doppelsignale, eins für das in der SKY unauffällige Chr. X und eins für ein Der(14) (**B**). Die Verwendung der *c-myc*-Sonde zeigte 6 Signale für das Onkogen. Vier dieser Signale konnten in der Region 15D3, in der das *c-myc*-Gen lokalisiert ist, detektiert werden, zwei weitere Signale (Pfeil) konnten zentromernah detektiert werden und wiesen auf ein intrachromosomales Rearrangement hin (**C**).

### 3.2.4.3 Intrachromosomales Rearrangement des Chromosoms 15

Zur Ermittlung der Kopienzahl des Gens *c-myc* in der Region 15D3 wurde in einer FISH eine lokusspezifische DNA-Sonde eingesetzt. Es konnten sechs Kopien des Gens *c-myc*, entsprechend den 6 Kopien des Chromosoms 15 detektiert werden. Jeweils vier Signale entsprachen der Region 15D3, zwei Signale dagegen wurden weiter zentromerwärts gelegen detektiert und wiesen auf ein intrachromosomales Rearrangement, z.B. eine Inversion, hin (**Abb.25C**). Die sechs Kopien des Chromosoms 15 des hypertriploiden Chromosomensatzes sind mit einer Trisomie 15 in einem diploiden Chromosomensatz äquivalent. Die Trisomie 15 stellt eine charakteristische T-Zell-Lymphomaberration der Maus dar. In der Region 15D3 des murinen Genoms ist das Onkogen *c-myc* lokalisiert. Eine von Prof. H. Merz (Institut für Pathologie, Universität zu Lübeck) durchgeführte Westernblot-Analyse zeigte jedoch keine *c-myc*-Überexpression.

Der Karyotyp der Zelllinie TS1G6 konnte angegeben werden mit:

68-70<4n>,-X,-X,X. ish XF2 (BAC RP23-382J5x2),Del(XD),iDic(4cen),Del(5D),-2,-3,-7, -8,-8,-9,-10,+11,Dic(12F;16cen)x2,-13,Der(14)T(8A1;14E5)x2,Der(14)T(3A3;14E5),+Der(14)T(X?A6;14E5). ish XF2 (BAC RP23-382J5x2), +15,+15,-16,-16,-18 [20]

### 3.2.5 Translokationen unter Beteiligung des Chromosoms 15 in *N-RAS*-transgenen T-Zell-Lymphomen mit *Suv39h1*- oder *p53*-Defizienz

In einem von Braig et al. (2005) etablierten E $\mu$ -*N-RAS*-transgenen Modell entwickelten die Mäuse nicht-lymphoide Neoplasien. Diese Mäuse stellten die Kontrollen zu E $\mu$ -*N-RAS*-transgenen Mäusen mit zusätzlicher *Suv39h1*- oder *p53*-Defizienz (*N-RAS/Suv39h1*-null und *N-RAS/p53*-null) dar, die invasive T-Zell-Lymphome entwickelten. Die Ergebnisse der hier durchgeführten zytogenetischen Untersuchung sind ebenfalls in Braig et al. (2005) publiziert.

Eine Zusammenfassung der zytogenetischen Ergebnisse der drei untersuchten Gruppen zeigt **Tab.19** und in **Abb.26** sind Beispiele nach SKY-Analyse gezeigt.

### 3.2.5.1 Chromosomale Aberrationen in Neoplasien der *N-RAS*-Kontrollen

Aus der Kontrollgruppe konnten zwei Mäuse zytogenetisch untersucht werden.

In Maus # 1 wurde in 12 der insgesamt 14 ausgewerteten Metaphasen (86%) eine balancierte Translokation der Chromosomen 6 und 15 detektiert. Die Bruchpunkte wurden auf die Regionen 6A3~B1 und 15D2~D3 eingegrenzt. Zwei weitere Metaphasen zeigten einen normalen männlichen Chromosomensatz.

Die Maus # 2 zeigte in 12 der insgesamt 15 ausgewerteten Metaphasen (80%) ebenfalls eine balancierte Translokation T(6A3~B1;15D2~D3) und zusätzlich als numerische Aberration eine Trisomie 10. In drei weiteren Metaphasen konnte, entsprechend einer klonalen Evolution, als sekundäre Veränderung eine Trisomie 17 detektiert werden.

### 3.2.5.2 *N-RAS/Suv39h1*-null-Mäuse mit ähnlichen chromosomalen Veränderungen zur Kontrollgruppe

In der Gruppe der *N-RAS/Suv39h1*-null-Mäuse konnten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, auch Trisomien 10 und 17 sowie Translokationen unter Beteiligung des Chromosoms 15 mit Bruchpunkt in der Region 15D2~D3 als die häufigsten klonalen Veränderungen detektiert werden. Insgesamt wurden aus dieser Gruppe 4 Mäuse untersucht.

In den insgesamt 11 analysierten Metaphasen der Maus # 3 konnten keine klonalen numerischen oder strukturellen Veränderungen festgestellt werden.

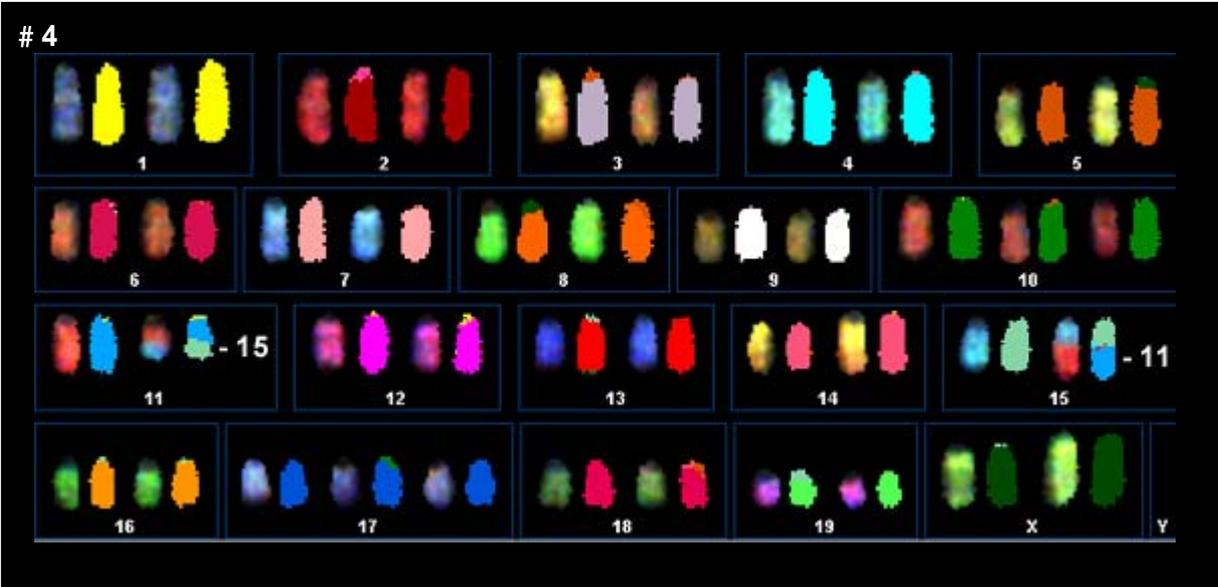
Die Lymphomzellen der Maus # 4 wiesen neben den Trisomien 10 und 17 in 10 der 15 untersuchten Metaphasen (67%) eine balancierte Translokation T(11B1;15D2~D3) auf, in vier weiteren als sekundäre klonale Veränderung auch eine Trisomie 12. Eine Metaphase war zytogenetisch unauffällig.

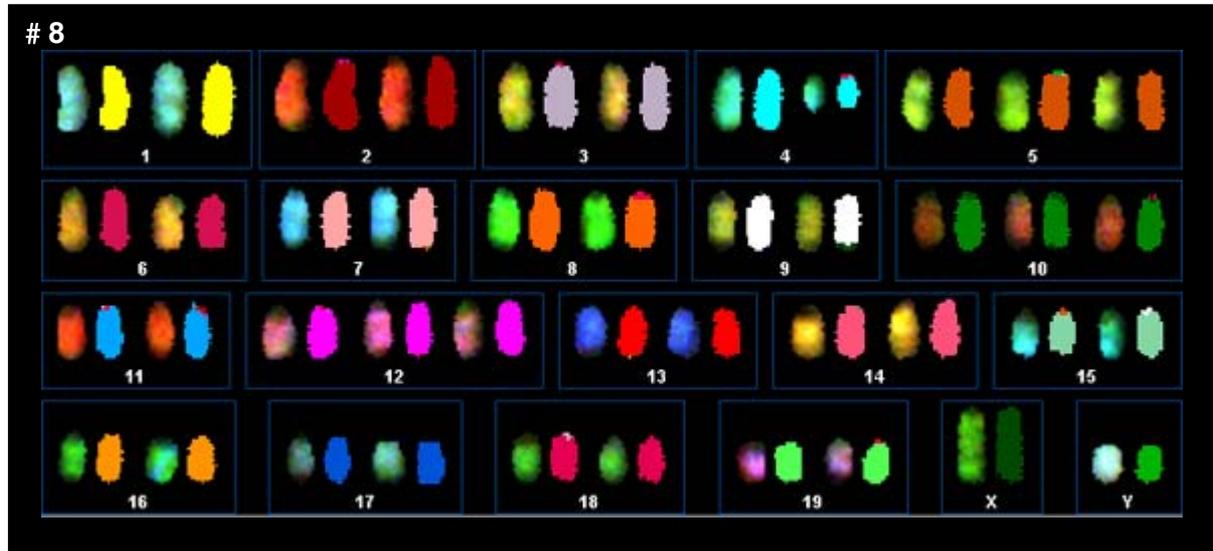
In der Maus # 5 wurde in 7 Metaphasen (47%) eine Translokation T(6A3~B1;15D2~D3) detektiert, in einer weiteren zusätzlich eine Trisomie 10 und in noch einer Metaphase zusätzlich eine Trisomie 17. Der Verlust eines X-Chromosoms konnte zudem als klonale Veränderung detektiert werden. Drei Metaphasen zeigten keine chromosomalen Aberrationen.

**N-RAS Kontrolle**



**N-RAS/Suv39h1-null**



***N-RAS/p53*-null**

**Abb.26 Zytogenetische Charakterisierung *N-RAS*-transgener Mäuse (Kontrollen) und *N-RAS*-transgener Mäuse mit *Suv39h1*- oder *p53*-Defizienz**

Aus den drei Gruppen der *N-RAS*-transgenen Mäuse ist je ein Beispiel gezeigt. Auffallend häufig zeigten die Mäuse strukturelle Veränderungen des Chromosoms 15, wie hier für die Kontrolle (# 2) und die *N-RAS/Suv39h1*-Maus (# 4) gezeigt ist. Die Bruchpunkte des Chromosoms 15 konnten in der Region 15D2~D3 bestimmt werden und lassen eine *c-myc*-Onkogenaktivierung vermuten. Als Translokationspartner wurden verschiedene Chromosomen beobachtet. Neben diesen strukturellen Veränderungen des Chromosoms 15 konnten auch gehäuft Trisomien der Chromosomen 5, 10, 12 und 17 als klonale Veränderungen detektiert werden.

In der Maus # 6 konnte in allen 15 ausgewerteten Metaphasen (100%) eine balancierte Translokation T(14C2~C3;15D2~D3) und zusätzlich ein derivatives Chromosom 15 mit T(14C2~C3;15D2~D3) nachgewiesen werden.

### **3.2.5.3 N-RAS/p53-null**

Die zytogenetischen Veränderungen der drei untersuchten Mäuse aus dieser Gruppe zeigten deutliche Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen.

In Maus # 9 konnte in allen 15 analysierten Metaphasen eine Trisomie 5, eine Trisomie 10, eine Trisomie 12 und ein Chromosom 4 mit interstitieller Deletion der Regionen 4A4-4D1 detektiert werden. Die Lymphomzellen der Maus # 8 zeigten ebenfalls Trisomien der Chromosomen 5, 10 und 12 und eine Del(4A4~4D1) in 13 von 15 Metaphasen (87%). Daneben zeigten 2 weitere Metaphasen keine chromosomalen Veränderungen. Die Maus # 7 zeigte vorrangig numerische klonale Veränderungen. Hierbei traten Zugewinne der Chromosomen 1, 4, 5, 7, 9, 10, 15, 17 und 18 und der Verlust eines X- Chromosoms auf. Als strukturelle Veränderung wurden ein +Del(1E?) und ein Markerchromosom detektiert. Translokationen unter Involvement des Chromosoms 15 konnten in dieser Gruppe nicht nachgewiesen werden.

### **3.2.5.4 Chromosomale Aberrationen mit Verdacht auf *c-myc*-Onkogenaktivierung**

Die Häufung von Translokationsereignissen in der Kontrollgruppe und in den *N-RAS*-aktivierten und zugleich *Suv39h1*-defizienten Zellen unter Beteiligung des Chromosoms 15 lässt eine *c-myc*-Onkogenaktivierung vermuten und würde damit eine typische Veränderung eines murinen T-Zell-Lymphoms darstellen. Die Translokationspartner waren, auch innerhalb einer Gruppe, verschieden. Hier konnten die Regionen 6A3~B1, 11B1 und 14C2~C3 identifiziert werden, die zu den humanen Regionen 7q31.1~q36.1 (murin 6A3~B1), 5q33.1~qter (murin 11B1) und 13q12.11~q12.13, 13q14.2~q14.3 sowie 8p23.1 (murin 14C2~C3) synten sind. Möglicherweise involvierte Gene, die für eine Aktivierung des Onkogens *c-myc* verantwortlich sein könnten, sind nicht bekannt. Die Bedeutung der gehäuft detektierten Trisomien 10, 12 und 17 in diesem *in vivo*-Modell ist ebenso unklar.

Tab.19 Karyotypen *N-RAS*-transgener Mäuse und Derivate

Lymphom-Genotyp	Maus	Karyotyp
<b><i>N-RAS</i>-Kontrolle</b>	# 1	40,XY [2]/ 40,XY,T(6A3~B1;15D2~D3) [12]
	# 2	41,XY,+10,T(6A3~B1;15D2~D3) [12]/ 42,idem,+17 [3]
<b><i>N-RAS/Suv39h1</i>-null</b>	# 3	40,XX [11]
	# 4	40,XX [1]/42,XX,+10,+17,T(11B1;15D2~D3) [10]/ 43,idem,+12 [4]
	# 5	40,XX [3]/40,XX,T(6A3~B1;15D2~D3) [7]/ 41,idem,+10 [1]/ 42,idem,+10,+17[1]/ 41,idem,-X,+10,+17 [cp3]
	# 6	41,XY,T(14C2~C3;15D2~D3),+Der(15)T(14C2~C3;15D2~ D3) [15]
<b><i>N-RAS/p53</i>-null</b>	# 7	48-54,X,-X,+1,+4,+4,+5,+5,+7,+9,+10,+14,+15,+15,+17, +18,+Del(1E?2),+mar [cp15]
	# 8	40,XY [2]/ 43,XY,+5,+10,+12,Del(4A4-4D1) [13]
	# 9	43,XY,+5,+10,+12,Del(4A4-4D1) [15]

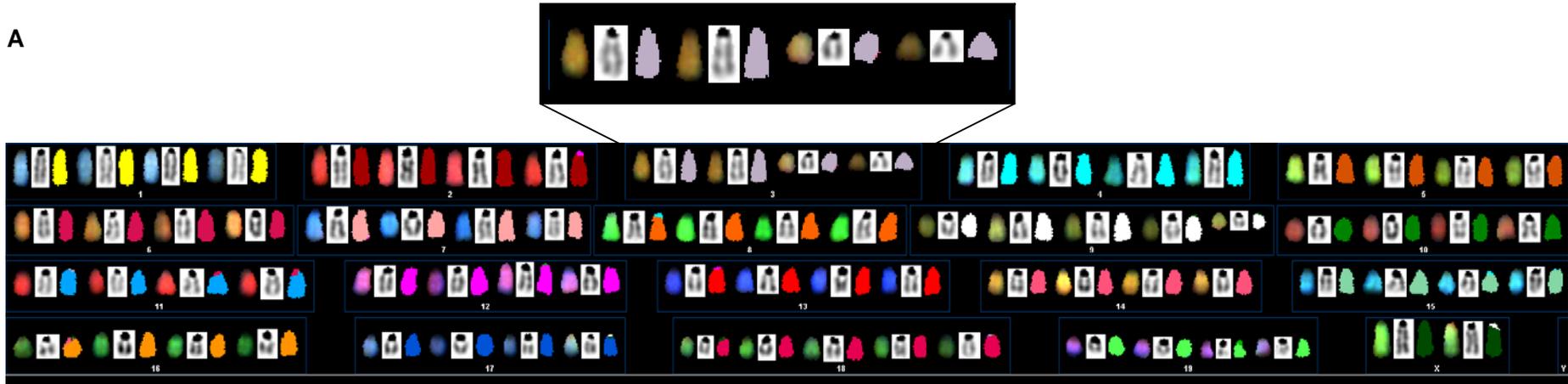
### 3.2.6 Tetraploidie und strukturelle chromosomale Aberrationen in *H-RAS*- oder *C-MYC*-transgenen *p18*-defizienten MEF

#### 3.2.6.1 Klonale Aberrationen in *H-RAS*-transfizierten *p18*-defizienten MEF

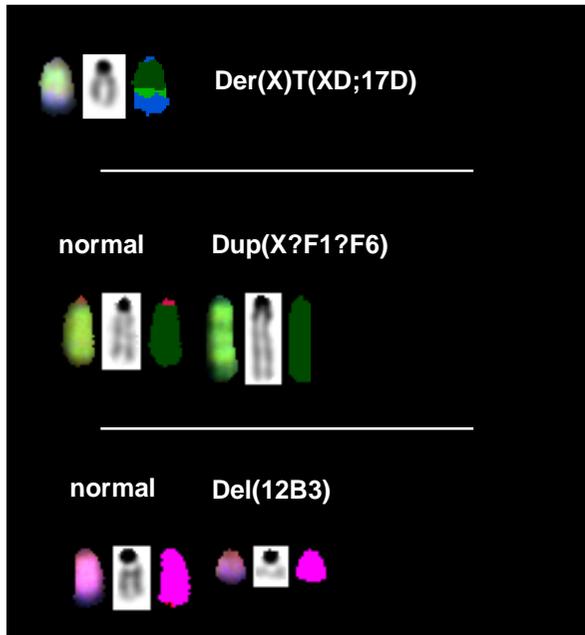
Die zytogenetische Analyse der Zelllinie *p18*<sup>+/-</sup> (*H-RAS*) mittels SKY zeigte einen tetraploiden Chromosomensatz mit klonalen numerischen und strukturellen chromosomalen Veränderungen. Der Verlust von zwei Chromosomen X, der Zugewinn eines Chromosoms 18 und 1-2 deletierte Chromosomen 3 konnten in 3 der insgesamt 15 ausgewerteten Metaphasen detektiert werden. Als sekundäre klonale Veränderungen wurden eine Duplikation des Chromosoms X, eine unbalancierte Translokation T(XD;17D), die Deletion eines Chromosoms 12, der Verlust eines Chromosoms 4 und ein Markerchromosom detektiert (**Abb.27**).

*p18+/- (H-RAS)*

A



B



**Abb.27 SKY-Analyse der Zelllinie *p18+/- (H-RAS)***

Das Karyogramm der MEF zeigt einen tetraploiden Chromosomensatz mit Deletionen des Chromosoms 3 (Chr.3 vergrößert dargestellt), den Zugewinn eines Chromosoms 18 und den Verlust von zwei Chromosomen X. Die in dieser Metaphase detektierte Del(9) zeigte keine Klonalität (A). Einige Metaphasen zeigten zudem eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen X und 17, eine Deletion 12 und ein intrachromosomales Rearrangement des Chromosoms X (B).

### 3.2.6.2 Klonale Aberrationen in *C-MYC*-transfizierten *p18*-defizienten MEF

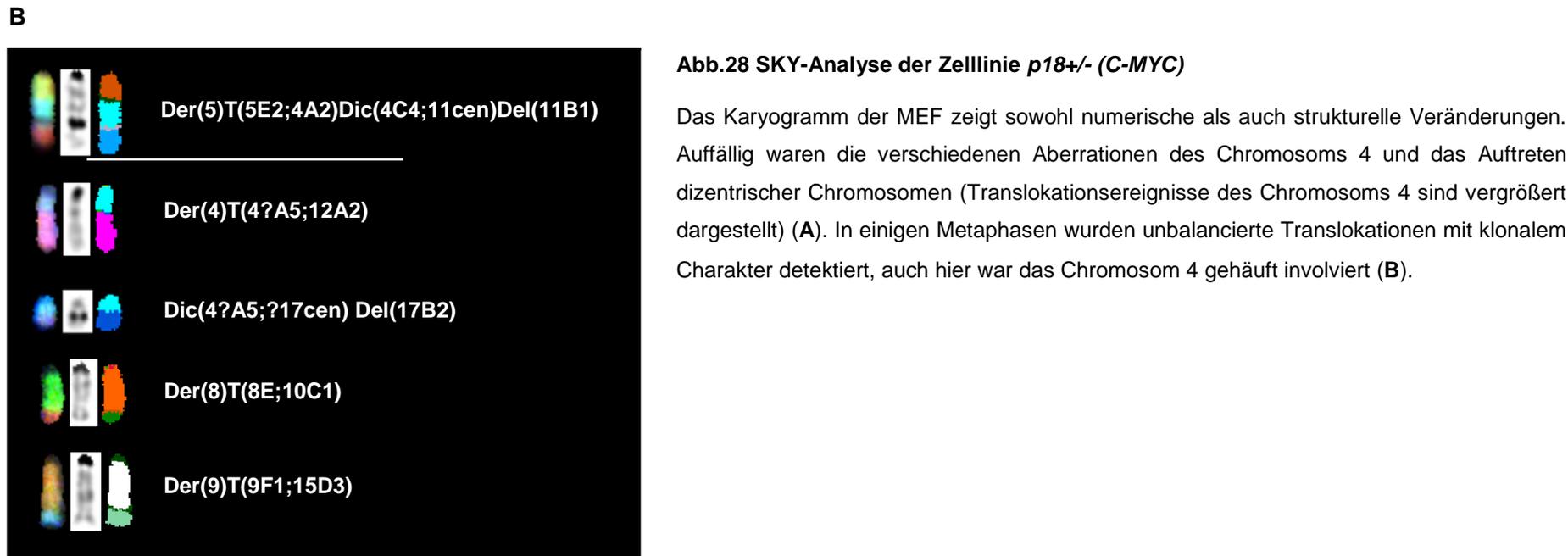
Die Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchung der Zelllinie *p18*<sup>+/-</sup> (*C-MYC*) zeigten im Unterschied zu den *H-RAS*-transfizierten *p18*-defizienten MEF einen hypotetraploiden Chromosomensatz mit bis zu vier deletierten Chromosomen 4 mit möglichem Bruchpunkt in der Region 4A5. Alternativ könnte die Veränderung eine interstitielle Deletion mit Bruchpunkt in A2D3 darstellen. Verschiedene dizentrische Chromosomen, die aus Veränderungen des Chromosoms 4 mit Bruchpunkten in 4A5 entstanden sind, zeigten als Translokationspartner die Chromosomen 10, 15 und 17. Weiterhin konnte eine unbalancierte Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 12, ebenfalls mit dem Bruchpunkt in der Region 4A5 detektiert werden. Ein dizentrisches Chromosom, das aus den Chromosomen 4 und 11 entstand, zeigte einen Bruchpunkt in 4C4 und ging eine weitere Translokation mit dem Chromosom 5 ein. Zudem konnten unbalancierte Translokationen zwischen den Chromosomen 8 und 10 sowie 9 und 15 identifiziert werden, ferner bis zu 4 Markerchromosomen. Als numerische klonale Veränderungen wurden Verluste der Chromosomen 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 17 und 19, sowie der Zugewinn eines Chromosoms 12 verzeichnet (**Abb.28**). Verglichen mit der Zelllinie *p18*<sup>+/-</sup> (*H-RAS*) zeigte die Zelllinie *p18*<sup>+/-</sup> (*C-MYC*) damit eine erhöhte chromosomale Instabilität.

Die Bedeutung der einzelnen chromosomalen Veränderungen, insbesondere die Häufung der Bruchereignisse in 4A5 in der Zelllinie *p18*<sup>+/-</sup> (*C-MYC*), ist unklar. Die zur murinen Region 4A5 syntenen humanen Regionen sind 6q15-q16.2 und 9p21.2-9cen. Die möglicherweise involvierten Gene sind jedoch nicht bekannt.

**Tab.22 Karyotypen der murinen *in vitro*-Modelle *p18*<sup>+/-</sup> (*C-MYC*) und *p18*<sup>+/-</sup> (*H-RAS*)**

Zelllinie	Karyotyp
<i>p18</i> <sup>+/-</sup> ( <i>C-MYC</i> )	77-84<4n>,-1,-2,-3,-3,-5,-6,-8,-9,+12,-13,-14,-15,-16,-16,-17,-19,+Del(4A5 or A2D3)x3-4,Dic(4?A5;15cen),Dic(4?A5;?17cen)Del(17B2),Dic(4C4;11cen)Del(11B1), Dic(4?A5;10A4),Der(4)T(4?A5;12A2),Der(5)T(5E2;4A2)Dic(4C4;11cen)Del(11B1), Der(8)T(8E;10C1),Der(9)T(9F1;15D3),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4 [cp14]
<i>p18</i> <sup>+/-</sup> ( <i>H-RAS</i> )	80<4n>,XX,-X,-X,+18,Del(3F1)x1-2 [3]/ 75-82,idem,+Dup(X?F1?A6),+Der(X) T(XD;17D),-4,+18,Del(12B3),+mar [cp12]

*p18+/- (C-MYC)*



**Abb.28 SKY-Analyse der Zelllinie *p18+/- (C-MYC)***

Das Karyogramm der MEF zeigt sowohl numerische als auch strukturelle Veränderungen. Auffällig waren die verschiedenen Aberrationen des Chromosoms 4 und das Auftreten dizentrischer Chromosomen (Translokationsereignisse des Chromosoms 4 sind vergrößert dargestellt) (A). In einigen Metaphasen wurden unbalancierte Translokationen mit klonalem Charakter detektiert, auch hier war das Chromosom 4 gehäuft involviert (B).

Eine nicht-transfizierte p18-defiziente MEF-Zelllinie und p18+/- (*H-Ras* und *C-MYC*) co-transfizierte MEF-Zelllinien werden derzeit von Prof. S. Kim (National Creative Research Initiatives Center for ARS network, Seoul, Korea) etabliert und standen deshalb für eine vergleichende zytogenetische Betrachtung nicht zur Verfügung.

## 4 Diskussion

Dass Krebs mit genetischen Veränderungen einhergeht, ist seit vielen Jahrzehnten evident und inspiriert die Forscher seither zur akribischen Suche nach verantwortlichen Genen und epigenetischen Veränderungen. Bisher sind Ursachen, Mechanismen und Konsequenzen der genetischen und epigenetischen Veränderungen von Krebszellen keineswegs vollständig verstanden. Krebszellen können sich morphologisch, immunologisch, molekularbiologisch und zytogenetisch von nicht-Krebszellen unterscheiden und verdeutlichen hiermit die Komplexität ihrer Veränderungen. Entsprechend ist die Krebsforschung auf eine interdisziplinäre Zusammenarbeit angewiesen. Die Tumorzytogenetik als ein Teilaspekt gewährt Einblicke in die chromosomalen Veränderungen von Krebszellen. Einen enormen Fortschritt stellte in diesem Zusammenhang die Entschlüsselung des humanen Genoms im Jahre 2000 durch das Humangenomprojekt (HUGO) dar, wodurch mit der Kenntnis der genomischen Sequenz auch die Gene präzise lokalisierbar wurden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der chromosomalen Instabilität humaner und muriner *in vitro*- und *in vivo*-Modelle hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren zum Verständnis dieser genetischen Veränderungen im Rahmen der Tumorgenese und -progression. Für die Untersuchungen stand die spektrale Karyotypisierung als molekularzytogenetische Analysemethode im Vordergrund, die dafür im Institut für Zell- und Molekularpathologie der MHH für humane und murine Chromosomen etabliert wurde.

#### 4.1 Die SKY zur Charakterisierung chromosomaler Instabilitäten und die Limitierung der molekularzytogenetischen Technik

Die spektrale Karyotypisierung ermöglicht durch Verwendung einer kombinatorischen Fluoreszenzmarkierung die simultane Darstellung aller Chromosomen eines Chromosomensatzes (Schröck et al., 1996). Verglichen zu den konventionellen Bänderungstechniken, die Auflösungen von ca. 10Mb erreichen, schätzten Schröck et al. (1996) die Auflösung der SKY zwischen 500bp und 1,5Mb ein. In einer zytogenetischen Analyse von 16 Proben (Lymphozytenpräparate von Personen nach multiplen Fehlgeburten und Individuen mit klinisch syndromalem Geschehen) zeigten Schröck et al. (1997) das Potential der Kombination aus konventioneller Bänderungstechnik und spektraler Karyotypisierung für humane Chromosomen. Ermöglicht die SKY die Detektion diskreter interchromosomaler Veränderungen, die Identifizierung komplexer Rearrangements und Markerchromosomen, erfordert die Bestimmung der Bruchpunktregion struktureller Aberrationen eine Chromosomen-Bänderungstechnik. Auch die in dieser Arbeit durch die Kombination von SKY und R-Bandendarstellung erhaltenen Ergebnisse zeigten im Vergleich zu den bereits publizierten zytogenetischen Daten der *in vitro*-Modelle humaner hämatologischer Neoplasien nach G-Bandendarstellung einen deutlichen Informationszugewinn (vgl. Tab.23). Beispielsweise konnte bei einem von Jadayel et al. (1997) in der Zelllinie Granta-519 beschriebenen add(18)(q21) in der SKY ein homogen gefärbtes Chromosom 18 identifiziert werden, das keinen Hinweis auf additives chromosomales Material gab. Dieses Chromosom zeigte in der R-Bandendarstellung eine hsr, in der mittels FISH eine erhöhte Kopienzahl des *BCL2*-Gens detektiert und durch eine Westernblotanalyse (Daten nicht gezeigt) die Überexpression des Gens bestätigt werden konnte. Diese Veränderung ist wahrscheinlich für die Tumorprogression mitverantwortlich (Rudolph et al., 2004).

Die SKY zeigte aber auch Limitierungen ihrer Anwendung. Die Methode erfordert qualitativ hochwertige Metaphase-Chromosomen in ausreichender Quantität. Die Sensitivität der Methode wird daher nicht durch die spektrale Bildgebung limitiert, sondern eher durch die Probe selbst (Schröck et al., 1997). Die Chromosomenpräparation stellt hierbei oft ein nicht unerhebliches Problem dar.

Tumorzellen zeigen zwar im Vergleich zu den normalen Zellen *in vivo* ein gesteigertes Proliferationsverhalten, dennoch ist die Anzahl der präparierten Metaphasen aus *in vitro*-Kulturen oft nicht ausreichend für eine SKY-Analyse.

Die Detektion intrachromosomaler Rearrangements wie Deletionen, Duplikationen oder Inversionen erfordert zusätzlich die Bandendarstellung der Chromosomen (Schröck et al., 1997) oder auch DNA-Sonden, mit denen die Identifizierung intrachromosomaler oder telomernaher Deletionen mikroskopisch nachweisbar wird (Ning et al., 1996).

Lee et al. (2001) zeigten, dass die fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden in telomernahen Regionen schwächer hybridisieren, so dass hier auftretende minimale chromosomale Veränderungen nur sehr schwer detektierbar sind. Zudem können bei interchromosomalen Translokationen Fluoreszenzüberlagerungen entstehen, die zur Fehlklassifizierung und damit leicht zur Fehlinterpretation der translozierten Fragmente führen können. Damit kann sowohl die Detektion von Translokationen, in die nur sehr kleine DNA-Fragmente involviert sind, als auch die Identifizierung der Translokationspartner auch in der SKY-Analyse erschwert oder auch unmöglich sein. Beispielsweise zeigte die hier analysierte MCL-Zelllinie Granta-519 ein derivatives Chromosom 13, das als der(13)t(1;13)(q21.2;p13)add(1)(q44) beschrieben wurde und darauf hinweist, dass das in die Region 1q44 translozierte Material auch mit der Kombination aus SKY und R-Bandendarstellung nicht identifiziert werden konnte (vgl. Abb.19).

Die Limitierung der Detektion intrachromosomaler Aberrationen konnte auch für die hier durchgeführten Untersuchungen der *in vitro*-Modelle der humanen hämatologischen Neoplasien bestätigt werden. Beispielsweise zeigte die SKY-Analyse der MCL-Zelllinien SP-50B und SP-53 nur wenige interchromosomale Rearrangements, die mittels SKY detektiert werden konnten, der Nachweis der interstitiellen Deletionen del(2)(q11q21), del(4)(p12p15), del(6)(q?22), del(7)(q21q31) und del(15)(q13;q21) erforderte dagegen die R-Bandendarstellung. Aber auch diese Methode zeigte ihre Limitierung darin, dass die intrachromosomalen Rearrangements des Chromosoms 1 nur mittels MCB1 Analyse detektierbar waren (vgl.Pkt.3.1.2.2). Desweiteren wurden in den Zelllinien NCEB-1, KMS-12 PE und KMS-12 BM Markerchromosomen detektiert, deren Herkunft auch mittels spektraler Karyotypisierung nicht identifizierbar war.

Imbalancen lassen sich, insbesondere bei der Charakterisierung komplex aberranter Karyotypen, mittels SKY kaum bestimmen. Die ebenfalls fluoreszenzbasierte Array/Matrix-CGH dagegen erreicht eine Auflösung von 50-100kb, wodurch Veränderungen auf Einzelgenebene sehr präzise detektierbar werden. Mit der Kenntnis der Veränderung einer Gendosis kann es gelingen, beteiligte Tumor-assoziierte Signalkaskaden zu identifizieren (De Vos et al., 2001; Zamurovic et al., 2004; Chen et al., 2003).

Zusammenfassend kann/muß die SKY somit als ergänzende Methode bewertet werden, die, insbesondere zur Identifizierung komplex aberranter Veränderungen, wertvolle Beiträge liefern kann. Sie kann jedoch die klassischen Bänderungstechniken nicht ersetzen (Schröck et al., 1997). Deshalb sind die hier erhaltenen Daten aus der Untersuchung der strukturellen chromosomalen Instabilität mittels R-Bandendarstellung, SKY und auch FISH als Primärdaten zu verstehen, die supportive molekularbiologische Methoden erfordern, um die chromosomalen (numerischen und strukturellen) Veränderungen genauer zu erfassen.

Im Unterschied zur zytogenetischen Untersuchung humaner Chromosomen war die zytogenetische Analyse muriner Chromosomen zusätzlich dadurch erschwert, dass die konventionelle G- oder R-Bandendarstellung als supportive Methode zur SKY nicht zur Verfügung stand. Murine Chromosomen sind alle acrozentrisch und in ihrer Größe relativ ähnlich (Liyanage et al. 1996). Die Karyotypisierung auf der Grundlage einer Bänderungstechnik ist daher extrem schwierig und die Bestimmung der Bruchpunkte der strukturellen Aberrationen in den hier untersuchten *in vitro*- und *in vivo*-Modellen erfolgte durch die weniger auflösende DAPI-„Bänderung“, die in das Protokoll der SKY eingebunden ist.

#### 4.2 Potentielle Onkogene und Tumorsuppressorgene humaner hämatologischer Neoplasien

Die in dieser Arbeit untersuchten t(11;14)(q13;q32)-positiven *in vitro*-Modelle zeigten eine Vielzahl sekundärer chromosomaler Aberrationen (vgl.Tab.23). Besonders häufig war das Chromosom 1 betroffen. Die detektierten Aberrationen könnten damit funktionell bedeutende Veränderungen der malignen Zelltransformation und/oder der Tumorprogression sowohl t(11;14)(q13;q32)-positiver MCL als auch t(11;14)(q13;q32)-positiver MM darstellen. Die Unterschiede der strukturellen Veränderungen scheinen aber auch auf mechanistische Unterschiede in der Tumorphogenese hinzuweisen. Während bei den MCL-Zelllinien die instabilsten Regionen 1p21 und 1p31 vorrangig aus Deletionen resultierten, konnten in den MM-Zelllinien vermehrt die heterochromatischen Regionen 1p11-12 und 1q12 sowie die Region 1q21 als chromosomal instabil und zudem vorrangig in Translokationsereignisse involviert beobachtet werden (vgl.Pkt.3.1.2.2).

Die zytogenetische Untersuchung von Au et al. (2002), bei der insgesamt 78 primäre MCL mittels Array/Matrix-CGH analysiert wurden, zeigte Bruchpunktcluster in den Regionen 1p21-22, 1p31-32 sowie 1q21 und Array/Matrix-CGH-basierende Daten von Schraders et al. (2005) zeigten in 71% der analysierten Proben Verluste in 1p22.1-31.1 als wiederkehrende Veränderungen primärer MCL. In den letzten Jahren wurden verschiedene Gene als potentielle TSG in 1p diskutiert. Ein Kandidatengen, das *BCL10*, ist in 1p22 lokalisiert und kodiert ein Protein mit CARD (*caspase recruitment domain*)-Motiv. Dieses Motiv wurde von Hofmann et al. (1997) als neues Apoptosesignalmotiv beschrieben. Zhang et al. (1999) berichteten die Überexpression des Proteins in t(1;14)(p22;q32)-positiven MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*)-Lymphomen, die einen NHL-Subtyp repräsentieren. Untersuchungen der cDNA dieser Lymphomzellen zeigten verschiedene Mutationen des Gens, woraus Zhang et al. (1999) interpretierten, dass hieraus ein Proliferationsvorteil der Lymphomzellen resultiert und zudem eine konstitutive NF- $\kappa$ B Aktivierung einen antiapoptotischen und proliferationssteigernden Effekt vermittelt. Steinemann et al. (2001) zeigten LOH für das *BCL10* in primären MCL und zusätzlich in der Zelllinie Granta-519. Diese Ergebnisse favorisierten das *BCL10* als TSG. Durchgeführte Mutations- (DNA-Sequenzierungen) und Methylierungsanalysen (Bullinger et al., 2000; Steinemann et al., 2001) an primären MCL zeigten jedoch keine

inaktivierenden Mutationen und keine Methylierungsdefekte innerhalb der kodierenden Sequenz. Damit scheint das *BCL10* kein TSG zu sein, das durch biallelische Mutationen zur Tumorprogression in MCL beiträgt.

Die Aminosäuresequenz des P53 zeigt eine auffällige Homologie zum P73. Das P73 kodierende Gen ist in der Region 1p36 lokalisiert. Die Homologie zum P53 zeigt sich in der DNA-Bindungs-, der Transaktivierungs- und in der homo-Oligomerisierungsdomäne (Chen, 1999; Yang & McKeon, 2000). Jost et al. (1997) konnten in *P53*-defizienten Zellen eine Apoptoseinduktion nach *P73* Überexpression nachweisen. Im Unterschied zu *P53* sind Mutationen des *P73* jedoch nur vereinzelt in humanen Krebserkrankungen zu beobachten (Han et al., 1999; Stirewalt et al., 1999). Transkriptionales *Silencing* des *P73* durch epigenetische Mutationen konnte für einige Leukämien und Lymphome demonstriert werden. So zeigten Martinez-Delgado et al. (2002) eine gehäufte Inaktivierung des Gens durch Hypermethylierung oder LOH in NHL und Kawano et al. (1999) konnten den aus einer Hypermethylierung resultierenden Expressionsverlust des *P73* in myeloischen und lymphoblastischen Leukämien und in B-NHL nachweisen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Inaktivierung des *P73* durch Hypermethylierung an der Tumorgenese hämatologischer Neoplasien beteiligt sein kann und eine Tumorsuppressive Funktion des *P53*-Homologs bedeuten könnte.

Ein weiteres interessantes Gen der chromosomalen Region 1p36 ist das als TSG vermutete 14-3-3- $\sigma$  (Stratifin) (Bhatia et al., 2003; Hermeking, 2003). Das kodierende Gen ist in der chromosomalen Bande 1p36.11 lokalisiert und kodiert einen *p53*-regulierten Inhibitor der G2/M Progression (Hermeking et al., 1997; Laronga et al., 2000). Neben dieser Zellzyklus-regulierenden Funktion ist es an der Apoptoseregulation beteiligt (Fu et al., 2000; van Hemert et al., 2001). Eine zum Funktionsverlust führende aberrante CpG-Methylierung (Hypermethylierung) des Gens konnte in 94% der von Ferguson et al. (2000) untersuchten Brustkrebsgewebe nachgewiesen werden. Bhatia et al. (2003) zeigten jedoch in einer Untersuchung von 23 primären ALL sowie 3 ALL- und 15 Burkitt-Lymphom (BL)-Zelllinien, dass eine Methylierung des Gens in normalen und malignen Lymphozyten nicht mit einer vollständigen Expressionsinhibierung einherging. In diesem Zusammenhang scheint es interessant, dass die hier untersuchten MCL-Zelllinien Granta-519 und NCEB-1 Inversionen mit Bruchpunkten in 1p36.2-3 und die

MCL-Zelllinie HBL-2 eine Insertion mit Bruchpunkt in 1p36.2 zeigten (vgl.Pkt.3.1.2.2). Es ist nicht geklärt, ob durch die Inversion oder Insertion Sequenzen verloren gegangen sind oder eine Genstruktur zerstört oder verändert wurde.

Die häufig detektierten strukturellen Veränderungen des Chromosoms 1 in den MM-Zelllinien könnten ein Hinweis auf die Lokalisation eines Onkogens in 1q sein, das durch chromosomale Rearrangements eine Aktivierung erfährt. Desweiteren wäre aber auch denkbar, dass eine Inaktivierung der heterochromatischen Regionen auf benachbarte chromosomale Regionen übergreift und auf diese Weise eine Geninaktivierung induziert. In Übereinstimmung zu den hier detektierten Veränderungen konnten Nilsson et al. (2003) durch zytogenetische Analysen von insgesamt 783 abnormen primären MM zeigen, dass das Chromosom 1 zu den instabilsten Chromosomen zählte und ferner die häufigsten Bruchereignisse in den heterochromatischen Regionen 1p11, 1q10, 1q11 sowie in den Regionen 1p13, 1p22, and 1q21 auftraten. Zudem wurden von Inoue et al. (2004) in 11 von 37 MM-Zelllinien ein Amplikon der chromosomalen Bande 1q12-q22 detektiert und Nietzel et al. (2001) zeigten eine 6-fache Amplifikation der Zentromerregion des Chromosoms 1 in einem NHL. Ein Triplikon und damit eine abnorme Kopienzahl der chromosomalen Bande 1q21 konnte in der vorliegenden Arbeit für die MM-Zelllinie NOP-2 gezeigt werden (vgl.Pkt.3.1.2.2). Inoue et al. (2004) berichteten über eine, aus der Amplifikation der Region 1q12-q22 resultierende Überexpression des Gens *PDZK1*. Proteine mit PDZ-Domäne sind in Prozesse der Proteinfaltung, der Organisation von Ionenkanälen, aber auch in die Signaltransduktion involviert (Kocher et al., 2003). Die funktionelle Relevanz des PDZK1 in MM bleibt jedoch zu prüfen.

### **4.3 Das Zusammenwirken genetischer und epigenetischer Mutationen**

Die Signifikanz epigenetischer Mutationen wurde von Gaudet et al. (2003) eindrucksvoll gezeigt. In einem murinen *in vivo*-Modell, in dem die Expression der DNA-Methyltransferase 1 (*Dnmt1*) verglichen zum Wildtyp genomweit auf 10% reduziert war, entwickelten die Mäuse in einem Zeitraum von 4-8 Monaten aggressive T-Zell-Lymphome mit Trisomien 15 als chromosomale Veränderung. Auf dem murinen Chromosom 15 ist das Onkogen *c-myc* lokalisiert und es ist anzunehmen, dass die veränderte Genexpression zur Überexpression des Gens führte.

In Analogie zu diesem Beispiel konnten in der hier durchgeführten zytogenetischen Untersuchung *N-RAS*-transgener Mäuse, die zusätzlich durch eine *Suv39h1*-Defizienz charakterisiert waren, ebenfalls Veränderungen des Chromosoms 15 als klonale Aberrationen detektiert werden (vgl. Pkt. 3.2.5). Im Unterschied zu dem *in vivo*-Modell von Gaudet et al. (2003) war durch die Defizienz des spezifischen Enzyms *Suv39h1* der Methylierungsdefekt auf das pericentrische Heterochromatin begrenzt und ist damit von einer genomweiten Hypomethylierung abzugrenzen. Desweiteren wurden im Gegensatz zu dem Modell von Gaudet et al. (2003) strukturelle Veränderungen des Chromosoms 15 mit Bruchpunkt in 15D2~D3 bestimmt, in der *c-myc* lokalisiert ist. Als Translokationspartner waren verschiedene Chromosomen beteiligt. Es ist zu vermuten, dass diese unterschiedlichen chromosomalen Rearrangements zu einer Onkogenaktivierung führten. Weitere zytogenetische Veränderungen, die in diesem transgenen Modell detektiert werden konnten, sprechen möglicherweise für eine Onkogen-induzierte sekundäre chromosomale Instabilität. Die dysregulierte Expression des Onkogens *c-myc* ist für eine gesteigerte chromosomale Instabilität ausreichend (Mai et al., 1999; Mai & Mushinski, 2003; Fest et al., 2002).

Dodge et al. (2005) zeigten die Bildung von Aneuploidien und Polyploidien, die Entstehung von Chromosomenbrüchen und Fusionen von Chromosomen als Zeichen chromosomaler (genetischer) Instabilität, die nach partiellem Verlust der DNA-Methylierung in *Dnmt3b*-defizienten MEF beobachtet werden konnten. Diese Zellen zeigten zudem eine vorzeitige Seneszenz oder eine spontane Immortalisierung. Die genannten Beispiele deuten darauf hin, dass genetische und epigenetische Defekte kooperierend bei der Entstehung von Tumoren wirken können. Entsprechend kann es möglich sein, dass auch die detektierten strukturellen Aberrationen der hier untersuchten *in vitro*-Modelle hämatologischer Neoplasien die Folge epigenetischer Mutationen sind und in der Änderung einer Genaktivität Tumor-progressive Bedeutung finden.

Hypomethylierungen können vermehrt in Satellitensequenzen pericentrischer Regionen beobachtet werden (Dunn, 2003). In Krebserkrankungen wie Wilmstumor, Brust- oder Eierstockkrebs zeigen gerade diese chromosomalen Regionen auch eine gesteigerte strukturelle Instabilität (Feinberg & Tycko, 2004). Diese äußert sich beispielsweise beim

Wilmstumor in unbalancierten Translokationen mit Bruchereignissen der pericentrischen Regionen der Chromosomen 1 und 16 (Qu et al., 1999). Die häufigen Bruchereignisse der heterochromatischen Region des Chromosoms 1 der hier untersuchten MM-Zelllinien könnten damit auch aus einer Hypomethylierung dieser Regionen resultieren.

#### **4.4 Funktionelle Konsequenzen der strukturellen chromosomalen Aberrationen in *in vitro*-Modellen humaner hämatologischer Neoplasien**

Zusätzlich zu den Veränderungen des Chromosoms 1 konnten in den MCL-Zelllinien Regionen mit gehäuften strukturellen Veränderungen in 2q, 6p, 7q, 8q, 12p und 15q detektiert werden. Amplifikationen unter Aktivierung des Onkogens *C-MYC* auf 8q24 werden oft in MCL beobachtet (Bea et al., 1999; Bentz et al., 2000), alle weiteren strukturellen Veränderungen sind bisher nicht als wiederkehrende Aberrationen in MCL beschrieben und könnten damit einen Anhaltspunkt für die Suche nach bisher unbekanntem Tumor-assoziierten Genen geben. In den MM-Zelllinien konnten zusätzlich zu den Veränderungen des Chromosoms 1 vermehrt strukturelle Veränderungen in 5p, 17p und 22q sowie in beiden NHL-Entitäten in 17q definiert werden (vgl. Pkt. 3.1.2.2). Die zytogenetische Untersuchung von Nilsson et al. (2003) an 783 abnormen MM zeigte, in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Bruchpunkten, u.a. häufige Bruchereignisse in 17p11 und 22q11. Ähnlich wie bei den MCL-Zelllinien könnten die weiteren, bisher nicht beschriebenen strukturellen Veränderungen Hinweise auf mögliche Tumor-assoziierte Gene sein. Es muss dennoch darauf hingewiesen werden, dass in dieser Arbeit nur wenige Zelllinien untersucht wurden (7 MCL- und 4 MM-Zelllinien) und damit keine allgemeingültige Aussage zu rekurrenten strukturellen Veränderungen in den NHL-Entitäten möglich ist. Dennoch zeigen die Übereinstimmungen zu zytogenetischen Daten aus Primärmaterial, dass die Zelllinien durchaus geeignete *in vitro*-Modelle der hämatologischen Neoplasien repräsentieren.

Die Ergebnisse der Untersuchung der strukturellen chromosomalen Aberrationen lassen vermuten, dass auch chromosomale (genetische) Veränderungen kooperierend in der Tumorgenese wirken können. So konnte die aus der  $t(11;14)(q13;q32)$  resultierende Dysregulation der Zellzykluskontrolle zusammen mit einer erhöhten Kopienzahl des *BCL2*-Gens detektiert werden, die nachgewiesen (MCL-Zelllinie Granta-519) oder

wahrscheinlich mit einer Überexpression (MCL-Zelllinie HBL-2 und MM-Zelllinie KMS12-PE) einhergeht (vgl.Pkt.3.1.2.5). *BCL2* kodiert ein Protein, dass die Apoptose-Induktion über den mitochondrialen Signalweg unterbindet (Cory & Adams, 2002). Die Dysregulation des Gens durch aktivierende *IgH*-Rearrangements ist eine typische chromosomale Veränderung Follikulärer Lymphome (Winter et al., 2004). Dagegen werden in MCL vorrangig Veränderungen der Kopienzahl des Gens beobachtet (De Leeuw et al., 2004; Bentz et al., 2000). In MM sind Veränderungen des Gens dagegen selten.

Dysregulationen des Onkogens *BCL6* sind typische chromosomale Veränderungen der B-NHL Entitäten DLCL und FL (Pasqualucci et al., 2003; Lossos & Levy, 2000). Aber auch in MCL sind strukturelle chromosomale Aberrationen der Region 3q27, in der das Gen *BCL6* lokalisiert ist, bekannt (Camacho et al., 2004; Ohshima et al., 1997) und können in etwa 5% der primären MCL beobachtet werden. Auch Amplifikationen des Gens wurden beispielsweise von Schraders et al. (2005) beschrieben. Albagli-Curiel (2003) berichtete über die ambivalente Rolle des *BCL6* in Proliferation und Apoptose. Wenngleich dem *BCL6* verschiedene zelluläre Funktionen zugeordnet werden konnten, ist noch immer unklar, wie es zur Tumorgenese oder –progression beiträgt (Albagli-Curiel, 2003). Eine abnorme Gendosis des Onkogens *BCL6* wurden in der MM-Zelllinie KMS-12 PE mittels FISH beobachtet (vgl.Abb.20). Inwiefern diese mit einer Überexpression des Transkriptionsfaktors einhergeht und damit zur Malignität der Zellen beitragen könnte, ist nicht geklärt. In Multiplen Myelomen sind Veränderungen des *BCL6* sehr selten.

Mutationen, insbesondere monoallelische Deletionen des TSG *P53* werden in etwa 50% aller humanen Tumoren beobachtet (Nigro et al., 1989; Hollstein et al., 1996). Die Aktivierung des Tumorsuppressors erfolgt durch Phosphorylierung, wodurch die Interaktion mit *mdm2* unterbunden wird. Genmutationen beider *P53*-Allele können zum Funktionsverlust und damit zum Verlust der Zellzykluskontrolle führen. FISH Analysen zeigten monoallelische Deletionen des *P53* in der MCL-Zelllinie Granta-519 und in der MM-Zelllinie Molp-5 (vgl.Pkt.3.1.2.5). Molekularbiologische Untersuchungen von Amin et al. (2003) an insgesamt vier MCL-Zelllinien zeigten den *P53*-Expressionsverlust in der Zelllinie JeKo-1. In einer hier durchgeführten FISH konnten jedoch Signale des Gens

detektiert werden (Daten nicht gezeigt), was für mögliche inaktivierende genetische oder epigenetische Mutationen sprechen könnte.

Weniger häufig als Mutationen des TSG *P53* sind Deletionen des TSG *P16* in Tumorzellen zu beobachten. Die Genprodukte sind CDK-Inhibitoren (CDKI). Inaktivierungen durch Hypermethylierung sind für MM bekannt (Galm et al., 2004; Chim et al., 2004). Die biallelische Deletion des TSG *P16* konnte in der MCL-Zelllinie Granta-519, in Übereinstimmung zu dem Ergebnis von Jadayel et al. (1997), gezeigt werden (vgl. Pkt.3.1.2.5). Array/Matrix-CGH-Daten von De Leeuw et al. (2004) zeigten in verschiedenen MCL-Zelllinien Verluste der chromosomalen Regionen 9p21.2-pter, u.a. für die MCL-Zelllinie HBL-2. Die hier durchgeführte zytogenetische Untersuchung zeigte, dass der Verlust aus einer unbalancierten Translokation der(9)t(3;9)(q21;p21) resultierte. Dreyling et al. (1997) zeigten mittels Interphase-FISH in 15 MCL (41%) Deletionen des TSG *P16*, darunter 6 homozygote Verluste. Diese CDKI sind, wie auch das Cyclin D1, in der Transition der Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus aktiv (Chen-Kiang, 2003). Inaktivierende Mutationen führen zu einer gesteigerten Zellproliferation.

In den hier untersuchten Zelllinien konnten somit, neben der dysregulierten Zellzykluskontrolle durch die Translokation t(11;14)(q13;q32) und der daraus resultierenden *Cyclin D1* Überexpression auch chromosomale Veränderungen detektiert werden, die möglicherweise mit einer Störung der Apoptoseregulation (Mutationen des Onkogens *BCL2* und des TSG *P53* - hier auch die Störung der DNA-Reparatur) einhergehen. Zudem konnten Mutationen von Genen detektiert werden, die, wie auch das *CCND1*, an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (*P16*), oder in die Transkriptionregulation von Genen involviert sind (*BCL6*).

#### **4.5                    Forschung an etablierten Zelllinien – eine kritische Betrachtung**

Die Immortalisierung von Zellen aus Primärmaterial zur Etablierung von Zelllinien ist eine Möglichkeit, uneingeschränkt zur Verfügung stehendes Zellmaterial für funktionelle Untersuchungen zu erhalten. Die Immortalisierung von Zellen durch Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) ist hierfür eine gebräuchliche Methode. Von den hier untersuchten Zelllinien ist eine EBV-Infektion für NCEB-1 und SP-50B bekannt (Saltman

et al., 1988; Daibata et al., 1989). Das Virus ist jedoch auch ursächlich an der Entstehung verschiedener Lymphomentitäten beteiligt, die mit chromosomalen Veränderungen einhergehen können. Etwa 95% der endemisch auftretenden BL, 90% aller post-Transplantations-Lymphome und etwa 40% der klassischen Hodgkin-Lymphome sind EBV infiziert (Rickinson & Kieff, 2001). Sowohl sporadische BL, als auch die endemische Subform, zeigen als typische chromosomale Veränderung eine  $t(8;14)(q24;q32)$ , die mit einer Dysregulation des Onkogens *C-MYC* einhergeht. Als zusätzliche rekurrente chromosomale Veränderungen sind Duplikationen in 1q21-25, Deletionen in 6q11-14 und Trisomien 7, 8, 12 und 18 bekannt. Wenngleich in den hier untersuchten EBV-positiven Zelllinien keine bekannten EBV-assoziierten strukturellen chromosomalen Veränderungen detektiert wurden, kann ein Einfluss des Virus auf die genetische Instabilität nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Die Zelllinien SP-50B und SP-53, die gemeinsamen Ursprungs sind, zeigten verschiedene chromosomale Veränderungen, die auf eine klonale Evolution hinweisen. Ob diese klonale Evolution der Zelllinie SP-50B auch viral beeinflusst sein könnte, ist nicht zu beantworten.

Zudem ist zu erwähnen, dass Zelllinien aus terminal transformierten Krebszellen gewonnen werden, die oft keine EBV-Infektion zur Immortalisierung erfordern. Durch die forcierte Proliferation *in vitro* werden besonders aggressiv wachsende Klone herausselektiert, die sich mitunter durch weitere oder auch andere strukturelle chromosomale Veränderungen von der Primärkultur unterscheiden können. Dies könnte ein Grund für die Unterschiede zwischen den bereits publizierten und den hier gezeigten strukturellen Veränderungen der Zelllinien sein. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine chromosomal instabile Tumorzelle *in vitro* durch zusätzliche spontan entstandene Aberrationen weitere Proliferationsvorteile erhält, aus denen sich ein neuer Klon entwickelt. Andererseits zeigen EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinien in der Regel einen normalen Karyotyp, was beweist, dass eine EBV-Infektion allein nicht für die Entwicklung einer chromosomalen Instabilität ausreicht.

#### 4.6 Die Bedeutung chromosomaler Aberrationen in Mausmodellen

Die genetisch veränderte Maus als *in vitro*- oder *in vivo*-Modell humaner hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren gewinnt zunehmend an wissenschaftlicher Bedeutung, insbesondere aufgrund der Möglichkeit der zytogenetischen Charakterisierung mittels spektraler Karyotypisierung.

In dieser Arbeit wurden murine *in vitro*- und *in vivo*-Modelle zytogenetisch untersucht, die vorwiegend durch Gentransfer unter Verwendung replikationsdefekter retroviraler Vektoren generiert wurden. Die Gentherapie mit retroviralen Vektoren zeigt, wie auch andere Therapieformen, Nebenwirkungen, insbesondere das Risiko der Krebsentstehung. Dies wurde vor kurzem deutlich, als innerhalb einer klinischen Gentherapiestudie zur Behandlung von Patienten mit SCID-X1 (*X-linked severe combined immunodeficiency*) (Hacein-Bey-Abina et al., 2002) zwei der insgesamt elf behandelten Patienten eine T-Zell-Leukämie entwickelten (Hacein-Bey-Abina et al., 2003a; Hacein-Bey-Abina et al., 2003b). Bei beiden erkrankten Patienten konnte die Integration des MLV-Vektors in das *LMO2* (*growth-promoting LIM domain only 2*)-Gen nachgewiesen werden (Hacein-Bey-Abina et al., 2003b). Das als Onkogen bekannte *LMO2* kann über chromosomale Translokation aktiviert werden und darüber zur kindlichen T-Zell-Leukämie führen (McCormack et al., 2003). Li et al. (2002) zeigten kurz zuvor, dass auch in murinen *in vivo*-Modellen nach Transduktion mit replikationsdefekten retroviralen Vektoren Insertionsmutagenese zur Entwicklung von Leukämien führen kann. Der retrovirale Transfer des dLNGFR-Markergens führte in 10 von 10 Tieren zu hämatologischen Erkrankungen und 6 der 10 Tiere entwickelten eine AML. Nachweisbar war hier ein Einzelkopieintegration des Transgens in das Gen *EVI1* (*ecotropic virus integration 1*) des murinen Genoms. *EVI1* ist ein Transkriptionsfaktor, der, u.a. durch eine Inversion *inv(3)(q21q26)*, z.B. bei Patienten mit AML aktiviert sein kann (Lahortiga et al., 2004; Testoni et al., 1999).

In einer aktuellen Publikation von Kustikova et al. (2005) konnte die Insertion retroviraler Sequenzen nach Transduktion hämatopoetischer Stammzellen (HSZ) in Gene gezeigt werden, welche eine nachgewiesene oder potentielle Funktion bei der Selbsterneuerung und Proliferation hämatopoetischer Zellen ausüben. Ausgehend von der Tatsache, dass retroviraler Gentransfer zur Krebsentstehung führen oder beitragen kann, stellt das

„*Retroviral Gene Marking*“ somit auch eine Möglichkeit dar, neue Gene zu identifizieren, die in die Tumorgenese involviert sein könnten.

*In vivo*-Experimente zeigten, dass die multiple retrovirale Integration mit Überexpression des humanen *MDR1* zur Leukämieentwicklung führen kann (Bunting et al., 2000; Bunting et al., 1998). Auch Modlich et al. (2005) konnten in einem murinen *in vivo*-Stammzellmodell nachweisen, dass sich nach retroviraler Transduktion HSZ mit hohen Gendosen - zur Expression des Gens *MDR1* - leukämische Klone mit unterschiedlichem Phänotyp entwickeln können. Nachweisbar war auch hier eine multiple Vektorinsertion mit kombinatorischer Onkogenaktivierung. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte zytogenetische Untersuchung dieser leukämischen Klone zeigte in zwei der insgesamt sechs untersuchten Klone eine sekundäre chromosomale Instabilität (vgl. Pkt.3.2.1). Die Bruchpunkte der chromosomalen Instabilität waren jedoch nicht mit den retroviralen Insertionsstellen identisch (Modlich et al., 2005). Damit konnte gezeigt werden, dass der initiale Schritt zur Entstehung der hämatologischen Neoplasien die durch Insertion des Retrovirus induzierte Onkogenaktivierung war und die chromosomalen Aberrationen als sekundäres genetisches Ereignis zu bewerten sind. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen erstmals das Zusammenwirken von Insertionsmutagenese und chromosomaler Instabilität in einem murinen *in vivo*-Experiment unter Verwendung hämatopoetischer Stammzellen.

An dieser Stelle soll kurz auf die Rolle HSZ im Rahmen der Tumorgenese eingegangen werden, die bereits seit vielen Jahren kontrovers diskutiert wird. Die Tatsache, dass nachgewiesenen Tumor-assoziierte Signalkaskaden auch die normale Entwicklung von Stammzellen regulieren, legt den Rückschluss nahe, dass unter den Zellen eines Tumors einige wenige „Tumor-Stammzellen“ existieren, von denen sich alle Tumorzellen ableiten (Reya et al., 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass die Prävention der Apoptose durch gesteigerte *BCL2* Expression zu einer HSZ-Proliferation *in vivo* führt (Domen et al., 1998; Domen & Weissman, 2000). Die funktionelle Bedeutung der Dysregulation des Onkogens *BCL2* im Rahmen der Tumorgenese und -progression konnte bereits für die *in vitro*-Modelle der humanen hämatologischen Neoplasien gezeigt werden. Zudem zeigten Le Beau et al. (2002) die Bedeutung des *BCL2* im Rahmen einer kombinatorischen

Onkogenaktivierung in einem murinen *in vivo*-Modell, worauf nachfolgend noch eingegangen wird.

Weitere, in der Tumorgenese dysregulierte Signalwege, sind die *Notch*- und die *Wnt*-Signalkaskaden. Auch ihre Funktion wird im Rahmen der Selbsterneuerung von Stammzellen diskutiert. Berechtigterweise stellt sich damit die Frage, ob Stammzellen, deren Signalkaskaden bei physiologischer Funktion zur Selbsterneuerung beitragen und bei Dysregulation zur Tumorentstehung führen, nicht genau die Zellen darstellen, die zum Target der Transformation werden (Reya et al., 2001). Bei einer Vielzahl von Tumoren ist die Zielzelle transformierender Mutationen unbekannt und die Vermutung liegt nahe, dass verschiedene Leukämietypen aus Mutationen entstehen, die in HSZ akkumulieren. Die Translokation t(8;21)(q22;q22), die mit der Bildung des *AML1-ETO*-Transkriptes einhergeht, kann bei Patienten mit AML beobachtet werden. Miyamoto et al. (2000) konnten dieses *AML1-ETO*-Transkript bei Patienten in Vollremission in einer nicht-leukämischen HSZ-Fraktion des KM nachweisen.

Das Potential einer kombinatorischen Onkogenaktivierung konnte auch in einem doppeltransgenen *in vivo*-Mausmodell der humanen akuten promyelozytären Leukämie (APL) von Le Beau et al. (2002) gezeigt werden. Die gleichzeitige Expression des Fusions(Onko)gens *PML-RARA* und des Onkogens *BCL2* führte zu einer rapiden Leukämieentwicklung, die zytogenetisch durch numerische Aberrationen charakterisiert war (vgl.Pkt.1.3.5.2.2).

Sekundäre chromosomale Veränderungen sind in 38% der humanen APL beschrieben, wobei vorrangig Trisomien des Chromosoms 8 oder partielle Trisomien der Region 8q auftreten (Le Beau et al., 2002). Als kritisch wird dabei die Region 8q24 betrachtet, in der das Onkogen *C-MYC* lokalisiert ist. In dem Mausmodell von Le Beau et al. (2002) traten als die häufigsten Veränderungen Trisomien des Chromosoms 15 auf. Die Region 15D2~D3 ist zur humanen Region 8q24 synten.

Veränderungen des Chromosoms 15 konnten auch in den hier untersuchten murinen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen als häufige chromosomale Veränderung detektiert werden. Beispielsweise konnten neben Trisomien 15 in einem murinen *in vitro*-Modell des humanen ALCL (vgl.Pkt.3.2.4) auch Translokationen mit Bruchpunkten in der Region 15D2~D3 bei verschiedenen Translokationspartnern in den bereits diskutierten *N-RAS* transgenen Modellen beobachtet werden (vgl.Pkt. 3.2.5). Möglicherweise gehen diese

Veränderungen mit einer Aktivierung des Gens *c-myc* einher. Beiden Modellen ist ein T-Zellursprung gemeinsam. Trisomien 15 werden in 40-90% der spontanen oder induzierten murinen T- und B-Zell-Lymphome beobachtet (Wiener et al., 1978; Wiener et al., 1981; Vasmel et al., 1989; Silva et al., 1988), zudem in B-Zell- und myeloiden Leukämien transgener und bestrahlter E $\mu$ -*BCL2* Mäuse (Gibbons et al., 1999). Das Onkogen *c-myc* scheint damit eine bedeutende Funktion bei der Entwicklung muriner Tumoren auszuüben und zeigt hiermit eine Analogie zu humanen Krebserkrankungen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte zytogenetische Analyse der stressinduzierten *p18*-defizienten MEF könnte ein weiteres Beispiel für die Theorie der multifaktoriellen Tumorgenese darstellen. Die Transfektion der Onkogene *H-Ras* oder *C-Myc* in *p18*-defiziente MEF immortalisierte die Zellen und induzierte zudem schwere Defekte der Zellteilung und der Chromosomensegregation (B-J. Park, nicht publizierte Daten). *p18*-Defizienz führte in diesen *in vitro*-Modellen zur Tetraploidisierung und strukturellen chromosomalen Aberrationen (vgl. Pkt. 3.2.6). Die Ergebnisse verdeutlichen eine mögliche Signifikanz des *p18* bei der Aktivierung von p53 nach induziertem onkogenen Stress und geben Hinweise darauf, dass *p18* zum Erhalt der genomischen Stabilität beitragen könnte. In Analogie dazu zeigten Woo & Poon (2004), dass *p53* homozygot deletierte SFMEF (serumfrei-Medium MEF) in Anwesenheit von h-RasV12 zu Aneuploidien neigen. Etwa 35% der Zellen zeigten Chromosomensätze mit mehr als 45 Chromosomen. Somit könnten die hier detektierten chromosomalen Veränderungen ein Hinweis auf eine Tumor-suppressive Funktion des *p18* sein.

In den hier untersuchten transgenen oder Gen-defizienten *in vitro*- und *in vivo*-Modellen konnten neben einer Vielzahl struktureller auch numerische Veränderungen detektiert werden, insbesondere gehäuft numerische Veränderungen der Chromosomen 5, 10, 12, 17 und 18. Aufgrund der Homologiekartierung konnten zwar die syntenen humanen Regionen bestimmt werden, dennoch bleibt eine mögliche funktionelle Bedeutung dieser Veränderungen unklar.

Neben dem Auftreten von Trisomien 15 können auch chromosomale Verluste eine Rolle in der Tumorgenese – oder, wie in dieser Arbeit in einem murinen Modell der suizidalen Gentherapie gezeigt – zur Therapieresistenz führen.

Frank et al. (2004) beobachteten in einem murinen Modell der suizidalen Gentherapie Revertanten einiger retroviral transduzierten Klone. Die zytogenetischen Daten der therapieresistenten Klone zeigten in einem dieser Klone den Verlust des derivativen Chromosoms Der(19)T(6B;19D) (vgl.Tab.17). Für diesen Klon konnte die Integration des suizidalen Transgens in die Region 6B3 nachgewiesen werden (Frank et al., 2004). Für weitere therapieresistente Klone konnte gezeigt werden (O.Frank, Dissertation), dass auch die Excision des proviralen Vektors durch LTR-Rekombination oder die Löschung der Suizidgenexpression - und damit epigenetische Veränderungen - ursächlich zur Inaktivierung der retroviralen Sequenzen beitragen. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass retroviraler Gentransfer nicht nur zur Insertionsmutagenese führen kann, wie es anhand des Beispiels von Modlich et al. (2005) gezeigt werden konnte, sondern auch der Verlust retroviraler Sequenzen durch chromosomale Instabilität oder epigenetische Veränderungen limitierende Faktoren der Methode bedeuten können.

Aneuploidien sind Ausdruck chromosomaler Instabilität als Folge einer gestörten Missegregation der Chromosomen im Zellteilungsprozess. Bekannte Ursachen chromosomaler Segregationsdefekte wurden in Pkt.1.1.2.1.1 beschrieben. Es ist zu erwarten, dass sie darüber hinaus durch eine gestörte Genfunktion oder -regulation induziert werden können.

#### **4.7 Beurteilung etablierter muriner Modelle hämatologischer Neoplasien aus zytogenetischer Sicht**

##### **4.7.1 Vergleich der chromosomalen Aberrationen der Zelllinie TS1G6 mit dem humanen ALCL**

Das ALCL wird entsprechend der Repräsentanz (ALK-positive ALCL; 50-60% der ALCL) oder Nicht-Repräsentanz (ALK-negative ALCL) eines ALK-Fusionsproteins kategorisiert. ALK-positive ALCL weisen meist Translokationen unter Einbeziehung des *ALK*-Gens auf, das in der chromosomalen Region 2p23 lokalisiert ist. Als häufige Translokationspartner sind insgesamt 8 Gene beschrieben, wobei das in der Region 5q35 lokalisierte *NPM1*-Gen in mehr als der Hälfte der ALK-positiven ALCL involviert ist (Bai et al., 2000). Sekundäre chromosomale Veränderungen werden selten beobachtet.

Die von Bittner et al. (2000) morphologisch und immunhistochemisch analysierte Zelllinie TS1G6 repräsentiert als murines *in vitro*-Modell einen T-Zell-ALK-negativen ALCL-Subtyp. Das *ALK*-Gen ist im murinen Genom auf Chromosom 17E2 lokalisiert. Strukturelle chromosomale Veränderungen konnten, wie erwartet, in dieser Region nicht nachgewiesen werden. Die zytogenetische Untersuchung der Zelllinie zeigte einen hypertriploiden Chromosomensatz u.a. mit einer Trisomie 15 (vgl.Pkt.3.2.4) als charakteristische Aberration von T-Zell-Lymphomen der Maus. Eine FISH unter Verwendung einer lokusspezifischen *c-myc*-Sonde zeigte vier reguläre und zwei abnorme Signale, die auf ein intrachromosomales Rearrangement hinwiesen. Bittner et al. (2000) konnten jedoch keine Überexpression des Gens *c-myc* im Westernblot nachweisen (mündliche Mitteilung). Diese chromosomale Veränderung könnte damit ein geninaktivierendes Rearrangement bedeuten. Dagegen konnten Inghirami et al. (1994) in 33% der untersuchten primären humanen ALCL Veränderungen des *C-MYC*-Gens detektieren. Hierunter waren Punktmutationen, chromosomale Rearrangements und eine Genamplifikation, die auf eine funktionelle Bedeutung der Onkogens im ALCL hinweisen könnten.

Neben numerischen Veränderungen wurden in der Zelllinie auch Fusionen in telomer- oder zentromernahen Regionen als Zeichen chromosomaler Instabilität nachgewiesen. In strukturelle Veränderungen war hauptsächlich, und unter Beteiligung verschiedener Translokationspartner, die Region 14E5 involviert. Die Bedeutung der strukturellen Veränderungen in diesem murinen *in vitro*-Modell bleibt offen.

Das kodierende Gen für den T-Zellrezeptor alpha (*TCR $\alpha$* ) ist in der chromosomalen Region 14C1 lokalisiert. Wenngleich klonale strukturelle Veränderungen des Chromosoms 14 detektierbar waren, zeigten diese jedoch Bruchereignisse in der Region 14E5, die eine Beteiligung des Gens *TCR $\alpha$*  unwahrscheinlich machen.

#### **4.7.2 Vergleich der sekundären CIN des murinen *in vitro*-Modells BM185wt zur sekundären CIN der humanen Ph-ALL**

Die *BCR-ABL*-Überexpression in der Zelllinie BM185wt als primäres Ereignis betrachtend, werden die hier detektierten chromosomalen Aberrationen als sekundäre chromosomale Instabilität angesehen und mit den sekundären chromosomalen Veränderungen der humanen Ph-ALL verglichen.

Die detektierten chromosomalen Veränderungen der drei murinen *in vitro*-Modelle, die aus der gleichen *BCR-ABL*-positiven Zelllinie generiert wurden, waren, wie zu erwarten, sehr ähnlich (vgl.Pkt.3.2.3). Als häufige sekundäre Veränderung wurden Trisomien der Chromosomen 5, 12 und 18, der Verlust des Y-Chromosoms und eine strukturelle Veränderung des Chromosoms 12 nachgewiesen.

Sekundäre chromosomale Veränderungen werden bei 50-80% der Patienten mit Ph-ALL beobachtet. Als häufigste sekundäre Aberration wird ein zusätzliches Ph-Chromosom (+der(22)) beschrieben. Weiterhin treten Monosomien 7, del(7q), Trisomien 8 und Strukturveränderungen in 9p als Sekundäraberrationen in Erscheinung. Zudem treten oft komplexe Karyotypen und Hyperploidie auf. Während ein zusätzliches Ph-Chromosom wahrscheinlich mit einer Überexpression des *BCR-ABL* einhergeht, sind die Gene, die durch die anderen sekundären chromosomalen Instabilitäten dysreguliert sind, unbekannt.

Die syntenen Regionen der murinen Chromosomen 5, 18, 12, X und Y sind auf eine Vielzahl humaner Chromosomen verteilt, so dass die relevanten chromosomalen Regionen unklar bleiben. Die Ursache des Y-Chromosom-Verlustes in 53% der analysierten Metaphasen der Ovalbumin-GFP-exprimierenden Zellen in diesem Mausmodell bleibt ebenso unverstanden. Ein Verlust des humanen Y-Chromosoms wird gelegentlich in myeloproliferativen Erkrankungen (MPD), myelodysplastischen Syndromen (MDS), in akuten nicht-lymphozytären Leukämien (ANLL) und ohne klinische Bedeutung bei älteren Männern beobachtet. Die Funktion des Verlustes als auch involvierte Gene sind unbekannt. Die Einschätzung, ob die etablierte Zelllinie BM185wt ein geeignetes murines Modell der Ph-ALL darstellt, ist damit aus Sicht der sekundären chromosomalen Veränderungen nicht klar zu beantworten.

**Zusammenfassend und abschließend** kann formuliert werden, dass durch die Untersuchung der chromosomalen Instabilität der humanen als auch der murinen *in vitro*- und *in vivo*-Modelle die Bedeutung chromosomaler Aberrationen im Kontext der Tumorgenese und -progression gezeigt und verdeutlicht werden konnte und die spektrale Karyotypisierung hierfür eine geeignete molekulargenetische Technik darstellt. Das Postulat, dass Krebs ein Zusammenspiel sowohl genetischer als auch epigenetischer Mutationen ist und damit einen multifaktoriellen und letztendlich mehrere

kooperierende Schritte umfassenden Prozess darstellt, konnte durch verschiedene Beispiele bekräftigt werden. Die Ergebnisse bilden zugleich auch die Basis für weiterführende Untersuchungen unter Einbeziehung supportiver molekularbiologischer und molekulargenetischer Techniken.

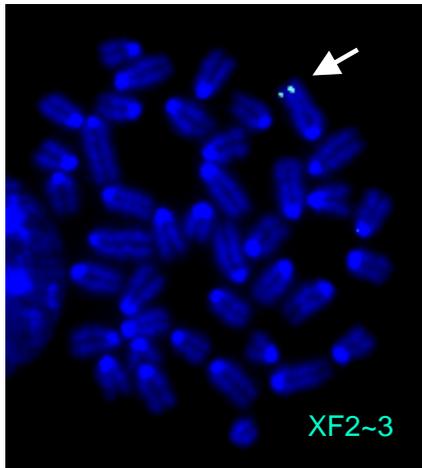
#### 4.8           **Ausblick**

In Anlehnung an die bereits in der Diskussion angedeuteten supportiven Methoden zur Untersuchung chromosomaler Instabilitäten ist im Besonderen die Array/Matrix-CGH eine Technologie, die zur Aufklärung genomischer Imbalancen der humanen *in vitro*-Modelle weitere Informationszugewinne liefern kann. Mit einem Auflösungsvermögen von 50-100kb werden damit Veränderungen auf Einzelgenebene detektierbar, die möglicherweise Hinweise auf funktionell bedeutende dysregulierte Signalkaskaden und Störungen molekularer Netzwerke in der Tumorpathologie geben. Zusammen mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit gezeigten strukturellen chromosomalen Veränderungen könnte eine detaillierte und präzise Aussage zur chromosomalen Instabilität der *in vitro*-Modelle der humanen hämatologischen Neoplasien möglich sein. Die Methode der Array/Matrix-CGH ist am Institut für Zell- und Molekularpathologie der MHH etabliert.

Im Hinblick auf weiterführende Möglichkeiten zur Untersuchung chromosomaler Veränderungen des murinen Genoms ist die Etablierung der SKY nach Fluoreszenz-R-Bänderung muriner Chromosomen denkbar. Damit könnten die Bruchregionen struktureller Veränderungen präziser bestimmbar und damit die Suche nach Tumor-assoziierten Genen erleichtert werden.

Zudem stellt die Generierung fluoreszenzmarkierter muriner DNA-Sonden zur Detektion bekannter TSG und Onkogene sowie zum Nachweis retroviraler Sequenzen einen Ausblick dar. Eine attraktive und möglicherweise vielversprechende Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung von DNA-Sonden ist die Verwendung von QuantumDots (Qdots). Qdots sind auf Cadmiumselenid [(CdSe)ZnS]-basierende Nanokristalle mit Halbleitereigenschaften, die im Vergleich zu konventionellen organischen Fluorophoren ein enges, symmetrisches Emissionsspektrum mit intensiverer Signalgebung und photochemischer Stabilität zeigen.

Der Einsatz der Qdots in der FISH humaner Chromosomen konnte bereits von Xiao und Barker (2004) zur Detektion des *ERBB2/Her2neu* Gens mit Streptavidin-konjugierten Qdot605 demonstriert werden und zeigte damit deren mögliche Anwendung in der klinischen Zytogenetik.



**Abb.29 FISH mit Qdot-detektierter DNA-Sonde**

Murine Metaphase-Chromosomen des Mausstammes C57BL/6, die mit einer, in der Region XF2~3 bindenden Biotin-16-dUTP-markierten, DNA-Sonde (~200kb) hybridisiert und mit Streptavidin-konjugierten-Qdot565 detektiert wurde. Das Grünsignal zeigt das X-Chromosom des männlichen Chromosomensatzes.

Auch die ersten murinen DNA-Sonden, die unter Verwendung von Qdots fluoreszenzmikroskopisch detektierbar sind, wurden bereits im Institut für Zell- und Molekularpathologie der MHH generiert. **Abb.29** zeigt die Anwendung einer mit Qdots detektierten DNA-Sonde in einer FISH an murinen Metaphase-Chromosomen.

Diese neuen technischen Möglichkeiten können in der Zukunft dazu beitragen, die Bedeutung der chromosomalen Instabilität in der Tumorentwicklung und –progression besser zu verstehen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abe M, Nozawa Y, Wakasa R, Ohno H, Fukuhara S: Characterization and comparison of two newly established Epstein-Barr virus-negative lymphoma B-cell lines. *Cancer* 1988;61:483-490.
- Albagli-Curiel O. Ambivalent role of BCL6 in cell survival and transformation. *Oncogene* 2003;22:507-16.
- Amin HM, McDonnell TJ, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, Leventaki V, O'Connor SL, Keating MJ, Lai R. Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127(4):424-431.
- Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* 1998;9:717-20.
- Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000;406:641-5.
- Artandi SE. Telomere shortening and cell fates in mouse models of neoplasia. *Trends Mol Med* 2002;8:44-7.
- 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;43:783-91.
- Avet-Loiseau H, Daviet A, Sauner S, Bataille R, Intergroupe Francophone du Myelome. Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol* 2000;111:1116-1117.
- Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, Godon C, Rapp MJ, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Cancer Res* 1999;59:4546-50.
- Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Minvielle S, Harousseau JL, Bataille R; Intergroupe Francophone du Myelome. Rearrangements of the c-myc oncogene are

- present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 2001;98:3082-3086.
- Avet-Loiseau H, Li J, Facon T, Brigaudeau C, Morineau N, Maloisel F, Rapp MJ, Talmant P, Trimoreau F, Jaccard A, Harousseau JL, Bataille R. High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res* 1998, 58:5640-5645.
- Bai RY, Ouyang T, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* 2000;96:4319-27.
- Baumgartner AK, Zettl A, Chott A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Starostik P. High frequency of genetic aberrations in enteropathy-type T-cell lymphoma. *Lab Invest* 2003;83:1509-16.
- Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, Garcia JL, Flores T, Gonzalez M, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Cardesa A, Montserrat E, Miro R, Campo E. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999;93:4365-4374.
- Beaupre DM, Kurzrock R. RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. *J Clin Oncol* 1999;17:1071-9.
- Belaud-Rotureau MA, Parrens M, Dubus P, Garroste JC, de Mascarel A, Merlio JP. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. *Mod Pathol* 2002;15:517-525.
- Bentz M, Plesch A, Bullinger L, Stilgenbauer S, Ott G, Muller-Hermelink HK, Baudis M, Barth TF, Moller P, Lichter P, Dohner H. t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:285-294.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20:5611-5622.
- Bernardi R, Grisendi S, Pandolfi PP. Modelling haematopoietic malignancies in the mouse and therapeutical implications. *Oncogene* 2002;21:3445-3458.

- Bhatia K, Siraj AK, Hussain A, Bu R, Gutierrez MI. The tumor suppressor gene 14-3-3 sigma is commonly methylated in normal and malignant lymphoid cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:165-9.
- Billadeau D, Jelinek DF, Shah N, LeBien TW, Van Ness B. Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6. *Cancer Res* 1995;55:3640-6.
- Bittner C, Feller AC, Renaud JC, Lange K, Pietrzik R, Jenetzky C, Briese J, Gaiser T, Muller A, Wiedemann GJ, Van Snick J, Merz H. An animal model for anaplastic large cell lymphoma in the immunocompetent syngeneic C57BL/6 mouse. *Lab Invest* 2000;80:1523-31.
- Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* 2002;1:103-10.
- Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2004;4:793-805.
- 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;13:2124-2130.
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AHFM, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA. The Suv39h1 histone methyltransferase cancels Ras-initiated lymphomagenesis by mediating cellular senescence. *Nature* 2005;436:660-665.
- Bullinger L, Leupolt E, Schaffner C, Mertens D, Bentz M, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S. BCL10 is not the gene inactivated by mutation in the 1p22 deletion region in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2000;14:1490-2.
- Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP. Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood* 1998;92:2269-79.
- Bunting KD, Zhou S, Lu T, Sorrentino BP. Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo. *Blood* 2000;96:902-9.
- Calasanz MJ, Cigudosa JC, Odero MD, Ferreira C, Ardanaz MT, Fraile A, Carrasco JL, Sole F, Cuesta B, Gullon A. Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple

- myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;18:84-93.
- Camacho FI, Garcia JF, Cigudosa JC, Mollejo M, Algara P, Ruiz-Ballesteros E, Gonzalvo P, Martin P, Perez-Seoane C, Sanchez-Garcia J, Piris MA. Aberrant Bcl6 protein expression in mantle cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1051-6.
- Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 1997;33:703-9.
- Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol* 1999; 36:115-127.
- Carli PM, Boutron MC, Maynadie M, Bailly F, Caillot D, Petrella T. Increase in the incidence of non-Hodgkin's lymphomas: evidence for a recent sharp increase in France independent of AIDS. *Br J Cancer* 1994;70:713-5.
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;1:105-115.
- Chen X. The p53 family: same response, different signals? *Mol Med Today* 1999;5:387-92.
- Chen Z, Lund R, Aittokallio T, Kosonen M, Nevalainen O, Lahesmaa R. Identification of novel IL-4/Stat6-regulated genes in T lymphocytes. *J Immunol* 2003;171:3627-35.
- Chen-Kiang S. Cell-cycle control of plasma cell differentiation and tumorigenesis. *Immunol Rev* 2003;194:39-47.
- Cheung WC, Kim JS, Linden M, Peng L, Van Ness B, Polakiewicz RD, Janz S. Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. *J Clin Invest* 2004;113:1763-73.
- Chim CS, Kwong YL, Fung TK, Liang R. Methylation profiling in multiple myeloma. *Leuk Res* 2004;28:379-85.
- Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:99-106.
- Chudoba I, Plesch A, Lorch T, Lemke J, Claussen U, Senger G. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1999;84:156-60.

- Cigudosa JC, Rao PH, Calasanz MJ, Odero MD, Michaeli J, Jhanwar SC, Chaganti RS. Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood* 1998;91:3007-3010.
- Clark SS, Crist WM, Witte ON. Molecular pathogenesis of Ph-positive leukemias. *Annu Rev Med* 1989;40:113-22.
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647-56.
- Daibata M, Kubonishi I, Eguchi T, Yano S, Ohtsuki Y, Miyoshi I. The establishment of Epstein-Barr virus nuclear antigen-positive (SP-50B) and Epstein-Barr virus nuclear antigen-negative (SP-53) cell lines with t(11;14)(q13;q32) chromosome abnormality from an intermediate lymphocytic lymphoma. *Cancer* 1989;64:1248-53.
- Dalton WS, Jove R. Drug resistance in multiple myeloma: approaches to circumvention. *Semin Oncol* 1999;26:23-27.
- Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 1999;93:1658-67.
- Daniel MT, Tigaud I, Flexor MA, Nogueira ME, Berger R, Jonveaux P. Leukaemic non-Hodgkin's lymphomas with hyperdiploid cells and t(11;14)(q13;q32): a subtype of mantle cell lymphoma?. *Br J Haematol* 1995;90:77-84.
- Dao DD, Sawyer JR, Epstein J, Hoover RG, Barlogie B, Tricot G. Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia* 1994;8:1280-4.
- De Leeuw RJ, Davies JJ, Rosenwald A, Bebb G, Gascoyne RD, Dyer MJ, Staudt LM, Martinez-Climent JA, Lam WL. Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Hum Mol Genet* 2004;13:1827-1837.
- De Vos J, Couderc G, Tarte K, Jourdan M, Requirand G, Delteil MC, Rossi JF, Mechti N, Klein B. Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays. *Blood* 2001;98:771-780.
- Diamond J, Goldman JM and Melo JV. BCR-ABL, ABL-BCR, BCR, and ABL genes are all expressed in individual granulocyte-macrophage colony-forming unit colonies derived from blood of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995;85:2171-2175.
- Dodge JE, Okano M, Dick F, Tsujimoto N, Chen T, Wang S, Ueda Y, Dyson N, Li E. Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA

- hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J Biol Chem* 2005;280:17986-91.
- Domen J, Gandy KL, Weissman IL. Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood* 1998;91:2272-82.
- Domen J, Weissman IL. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kit/c-Kit signaling the other. *J Exp Med* 2000;192:1707-18.
- Drach J, Ackermann J, Fritz E, Kromer E, Schuster R, Gisslinger H, DeSantis M, Zojer N, Fiegl M, Roka S, Schuster J, Heinz R, Ludwig H, Huber H. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998 ;92:802-9.
- Drach J, Angerler J, Schuster J, Rothermundt C, Thalhammer R, Haas OA, Jager U, Fiegl M, Geissler K, Ludwig H, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 1995; 86:3915-3921.
- Dreyling MH, Bullinger L, Ott G, Stilgenbauer S, Muller-Hermelink HK, Bentz M, Hiddemann W, Dohner H. Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 1997;57:4608-4614.
- Dunn BK. Hypomethylation: one side of a larger picture. *Ann N Y Acad Sci* 2003;983:28-42.
- Epling-Burnette PK, Zhong B, Bai F, Jiang K, Bailey RD, Garcia R, Jove R, Djeu JY, Loughran TP Jr, Wei S. Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J Immunol* 2001;166:7486-7495.
- Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Genevieve F, Zandecki M, Lai JL, Leleu X, Jouet JP, Bauters F, Harousseau JL, Bataille R, Mary JY, Intergroupe Francophone du Myelome. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 2001, 97:1566-1571.
- Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004;4:143-53.

- Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, Pandita TK, Chan TA, Hermeking H, Marks JR, Lambers AR, Futreal PA, Stampfer MR, Sukumar S. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6049-54.
- Fest T, Mougey V, Dalstein V, Hagerty M, Milette D, Silva S, Mai S. c-MYC overexpression in Ba/F3 cells simultaneously elicits genomic instability and apoptosis. *Oncogene* 2002;21:2981-90.
- Fonseca R, Oken MM, Greipp PR, Eastern Cooperative Oncology Group Myeloma Group. The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2001;98:1271-1272.
- Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, Kyle RA, Hoyer JD, Jalal SM, Greipp PR. Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): a report on 13 cases. *Br J Haematol* 1998;101:296-301.
- Foran JM, Rohatiner AZ, Cunningham D, Popescu RA, Solal-Celigny P, Ghilmini M, Coiffier B, Johnson PW, Gisselbrecht C, Reyes F, Radford JA, Bessell EM, Souleau B, Benzohra A, Lister TA. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol* 2000;18:317-324.
- Frank O, Rudolph C, Heberlein C, von Neuhoff N, Schrock E, Schambach A, Schlegelberger B, Fehse B, Ostertag W, Stocking C, Baum C. Tumor cells escape suicide gene therapy by genetic and epigenetic instability. *Blood* 2004;104:3543-9.
- Fry JW and Wood KJ. Gene therapy: potential applications in clinical transplantation. *Exp Rev Mol Med* 1999; 8 June
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:617-47.
- Galm O, Wilop S, Reichelt J, Jost E, Gehbauer G, Herman JG, Osieka R. DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* 2004;18:1687-92.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003;300:489-92.

- Ghielmini M, Schmitz SF, Burki K, Pichert G, Betticher DC, Stupp R, Wernli M, Lohri A, Schmitter D, Bertoni F, Cerny T. The effect of Rituximab on patients with follicular and mantle-cell lymphoma. Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Ann Oncol* 2000;11 Suppl 1:123-126.
- Gibbons DL, MacDonald D, McCarthy KP, Cleary HJ, Plumb M, Wright EG, Greaves MF. An E mu-BCL-2 transgene facilitates leukaemogenesis by ionizing radiation. *Oncogene* 1999;18:3870-3877.
- Goga A, McLaughlin J, Afar DE, Saffran DC, Witte ON. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the *BCR-ABL* oncogene. *Cell* 1995;82:981-988
- Gollin SM. Chromosomal instability. *Curr Opin Oncol* 2004;16:25-31.
- Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, Weisenburger DD. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 1996;87:4302-10.
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulfraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 2002;346:1185-1193.
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulfraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003a;348:255-256.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulfraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003b;302:415-419.
- Han S, Semba S, Abe T, Makino N, Furukawa T, Fukushige S, Takahashi H, Sakurada A, Sato M, Shiiba K, Matsuno S, Nimura Y, Nakagawara A, Horii A. Infrequent somatic mutations of the p73 gene in various human cancers. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:194-8.

- Hanamura I, Iida S, Akano Y, Hayami Y, Kato M, Miura K, Harada S, Banno S, Wakita A, Kiyoi H, Naoe T, Shimizu S, Sonta SI, Nitta M, Taniwaki M, Ueda R. Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:638-44.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;345:458-60.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
- Hatzivassiliou G, Miller I, Takizawa J, Palanisamy N, Rao PH, Iida S, Tagawa S, Taniwaki M, Russo J, Neri A, Cattoretti G, Clynes R, Mendelsohn C, Chaganti RS, Dalla-Favera R. IRTA1 and IRTA2, novel immunoglobulin superfamily receptors expressed in B cells and involved in chromosome 1q21 abnormalities in B cell malignancy. *Immunity* 2001;14:277-89.
- Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, Pledger WJ, Dalton WS. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene* 2000;19:4319-27.
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997;1:3-11.
- Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* 2003;3:931-43.
- Hernandez L, Fest T, Cazorla M, Teruya-Feldstein J, Bosch F, Peinado MA, Piris MA, Montserrat E, Cardesa A, Jaffe ES, Campo E, Raffold M. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1996;87:3351-3359.
- Hiddemann W, Unterhalt M, Herrmann R, Woltjen HH, Kreuser ED, Trumper L, Reuss-Borst M, Terhardt-Kasten E, Busch M, Neubauer A, Kaiser U, Hanrath RD, Middeke H, Helm G, Freund M, Stein H, Tiemann M, Parwaresch R. Mantle-cell lymphomas have more widespread disease and a slower response to chemotherapy compared with follicle-center lymphomas: results of a prospective comparative analysis of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 1998;16:1922-1930.

- Hofmann K, Bucher P, Tschopp J. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 1997;22:155-6.
- Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res* 1996;24:141-6.
- Howard OM, Gribben JG, Neuberg DS, Grossbard M, Poor C, Janicek MJ, Shipp MA. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol* 2002;20:1288-1294.
- Hussein MR, Wood GS. Building bridges in cancer: mismatch repair and microsatellite instability. *Am J Dermatopathol* 2002;24:76-81.
- Iida S, Rao PH, Butler M, Corradini P, Boccadoro M, Klein B, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet* 1997;17:226-30.
- Inghirami G, Macri L, Cesarman E, Chadburn A, Zhong J, Knowles DM. Molecular characterization of CD30+ anaplastic large-cell lymphoma: high frequency of c-myc proto-oncogene activation. *Blood* 1994;83:3581-90.
- Inoue J, Otsuki T, Hirasawa A, Imoto I, Matsuo Y, Shimizu S, Taniwaki M, Inazawa J. Overexpression of PDZK1 within the 1q12-q22 amplicon is likely to be associated with drug-resistance phenotype in multiple myeloma. *Am J Pathol* 2004;165:71-81.
- Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, Rosenwald A, Pickering DL, Dave B, Dave S, Xiao L, Cao K, Zhu Q, Sherman S, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Ott G, Muller-Hermelink HK, Delabie J, Braziel RM, Jaffe ES, Campo E, Lynch JC, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Grogan TM, Staudt LM, Chan WC. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2004;165:159-66.
- Jacobson JO, Wilkes BM, Kwaiatkowski DJ, Medeiros LJ, Aisenberg AC, Harris NL. bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer* 1993;72:231-6.
- Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E, Bartkova J, Stranks G, De Schouwer PJ, Lens D, Bartek J, Dyer MJ, Kruger AR, Catovsky D. 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;11:64-72.
- Janssen JW, Vaandrager JW, Heuser T, Jauch A, Kluin PM, Geelen E, Bergsagel PL, Kuehl WM, Drexler HG, Otsuki T, Bartram CR, Schuurin E. Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 2000;95:2691-2698.
- Jarosova M, Papajik T, Holzerova M, Dusek L, Pikalova Z, Lakoma I, Raida L, Faber E, Divoka M, Vlachova S, Prekopova I, Novosadova A, Pospisilova H, Indrak K. High incidence of unbalanced chromosomal changes in mantle cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:1835-46.
- Jeon HJ, Kim CW, Yoshino T, Akagi T: Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *Br J Haematol* 1998;102:1323-1326.
- Jonkers J and Berns A. Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:251-265.
- Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr.. p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997;389:191-4.
- Katz RL, Caraway NP, Gu J, Jiang F, Pasco-Miller LA, Glassman AB, Luthra R, Hayes KJ, Romaguera JE, Cabanillas FF, Medeiros LJ. Detection of chromosome 11q13 breakpoints by interphase fluorescence in situ hybridization. A useful ancillary method for the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2000;114:248-57.
- Kawano S, Miller CW, Gombart AF, Bartram CR, Matsuo Y, Asou H, Sakashita A, Said J, Tatsumi E, Koeffler HP. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 1999;94:1113-20.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-2015.
- Ko YG, Park H, Kim S. Novel regulatory interactions and activities of mammalian tRNA synthetases. *Proteomics* 2002;2:1304-1310.
- Kocher O, Pal R, Roberts M, Cirovic C, Gilchrist A. Targeted disruption of the PDZK1 gene by homologous recombination. *Mol Cell Biol* 2003;23:1175-80.
- Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Holzmann K, Kestler HA, Kienle D, Barth TF, Moller P, Ott G, Kalla J, Radlwimmer B, Pscherer A, Stilgenbauer S, Dohner H,

- Lichter P, Bentz M. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 2004;104:795-801.
- Konigsberg R, Zojer N, Ackermann J, Kromer E, Kittler H, Fritz E, Kaufmann H, Nosslinger T, Riedl L, Gisslinger H, Jager U, Simonitsch I, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2000;18:804-812.
- Kouroukis CT, Belch A, Crump M, Eisenhauer E, Gascoyne RD, Meyer R, Lohmann R, Lopez P, Powers J, Turner R, Connors JM; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Flavopiridol in untreated or relapsed mantle-cell lymphoma: results of a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2003;21:1740-1745.
- Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005;5:251-262.
- Kustikova O, Fehse B, Modlich U, Yang M, Dullmann J, Kamino K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Li Z, Baum C. Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science* 2005;308:1171-4.
- Lahortiga I, Vazquez I, Agirre X, Larrayoz MJ, Vizmanos JL, Gozzetti A, Calasanz MJ, Odero MD. Molecular heterogeneity in AML/MDS patients with 3q21q26 rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:179-89.
- Lai JL, Zandecki M, Mary JY, Bernardi F, Izydorczyk V, Flactif M, Morel P, Jouet JP, Bauters F, Facon T. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 1995;85:2490-2497.
- Lai R, Medeiros LJ. Pathologic diagnosis of mantle cell lymphoma. *Clin Lymphoma* 2000;1:197-206.
- Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *Biol Chem* 2000;275:23106-12.
- Le Beau MM, Bitts S, Davis EM, Kogan SC. Recurring chromosomal abnormalities in leukemia in *PML-RARA* transgenic mice parallel human acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2002;99:2985-2991.

- Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E, Fletcher JA, Morton CC. Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am J Hum Genet* 2001;68:1043-1047.
- Leitch HA, Gascoyne RD, Chhanabhai M, Voss NJ, Klasa R, Connors JM. Limited-stage mantle-cell lymphoma. *Ann Oncol* 2003;14:1555-61.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643-9.
- Lenz G, Dreyling M, Hiddemann W. Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions. *Ann Hematol* 2004;83:71-7.
- Lestingi TM, Hooberman AL. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993;7:161-75.
- Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kuhlcke K, Eckert HG, Fehse B, Baum C. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002;296:497.
- Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U. Microdissection based high resolution multicolor banding (MCB) for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 2002;9:335-339.
- Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998;12:3008-19.
- Liyanage M, Coleman A, du Manoir S, Veldman T, McCormack S, Dickson RB, Barlow C, Wynshaw-Boris A, Janz S, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Schrock E, Ried T. Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat Genet* 1996;14:312-5.
- Lossos IS, Levy R. Higher-grade transformation of follicle center lymphoma is associated with somatic mutation of the 5' noncoding regulatory region of the BCL-6 gene. *Blood* 2000;96:635-9.
- Louie DC, Offit K, Jaslow R, Parsa NZ, Murty VV, Schluger A, Chaganti RS. p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 1995;86:2892-9.
- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341:1051-62.

- 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;13:3487-3495.
- Mai S, Hanley-Hyde J, Rainey GJ, Kuschak TI, Paul JT, Littlewood TD, Mischak H, Stevens LM, Henderson DW, Mushinski JF. Chromosomal and extrachromosomal instability of the cyclin D2 gene is induced by Myc overexpression. *Neoplasia* 1999;1:241-52.
- Mai S, Mushinski JF. c-Myc-induced genomic instability. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2003;22:179-99.
- Malgeri U, Baldini L, Perfetti V, Fabris S, Vignarelli MC, Colombo G, Lotti V, Compasso S, Bogni S, Lombardi L, Maiolo AT, Neri A. Detection of t(4;14)(p16.3;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of IGH-MMSET fusion transcripts. *Cancer Res* 2000;60(15):4058-61.
- Mann V, Szyf M, Razin A, Chriqui-Zeira E, Kedar E. Characterization of a tumorigenic murine T-lymphoid-cell line spontaneously derived from an IL-2-dependent T-cell line. *Int J Cancer* 1986;37:781-6.
- Martinez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M, Jose Garcia M, Nomdedeu J, Rivas C, Fernandez-Piqueras J, Benitez J. Frequent inactivation of the p73 gene by abnormal methylation or LOH in non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer* 2002;102:15-19.
- Matsuo Y, Drexler HG, Nishizaki C, Harashima A, Fukuda S, Kozuka T, Sezaki T, Orita K: Human bone marrow stroma-dependent cell line MOLP-5 derived from a patient in leucaenic phase of multiple myeloma. *Br J Haematol* 2000;109:54-63.
- McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 1941;26:234-282.
- McCormack MP, Forster A, Drynan L, Pannell R, Rabbitts TH. The LMO2 T-cell oncogene is activated via chromosomal translocations or retroviral insertion during gene therapy but has no mandatory role in normal T-cell development. *Mol Cell Biol* 2003;23:9003-9013.
- Melo JV, Gordon DE, Cross NC, Goldman JM. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1993;81:158-65.
- Meusers P, Hense J, Brittinger G. Mantle cell lymphoma: diagnostic criteria, clinical aspects and therapeutic problems. *Leukemia* 1997;11 Suppl 2:S60-S64.

- Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:7521-6.
- Modlich U, Kustikova OS, Schmidt M, Rudolph C, Meyer J, Li Z, Kamino K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Kuehlcke K, Bunting KD, Schmidt S, Deichmann A, von Kalle C, Fehse B, Baum C. Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood* 2005;105:4235-46.
- Monni O, Oinonen R, Elonen E, Franssila K, Teerenhovi L, Joensuu H, Knuutila S. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21:298-307.
- Morschhauser F, Marit G, Jourdan E, Solal-Celigny P, Fitoussi O, Wetterwald M, Rose C, Sebban C, Bouabdallah R, Kayitalire L, Dumontet C. Gemcitabine with dexamethasone+/-cisplatin in patients with relapsing/refractory mantle cell lymphoma. *Blood* 2002 Suppl, abstract 4707.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Daeven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6622-6626.
- Mu DQ, Peng YS, Xu QJ. Values of mutations of K-ras oncogene at codon 12 in detection of pancreatic cancer: 15-year experience. *World J Gastroenterol* 2004;10:471-5.
- Musio A, Mariani T, Montagna C, Zambroni D, Ascoli C, Ried T, Vezzone P. Recapitulation of the Roberts syndrome cellular phenotype by inhibition of INCENP, ZWINT-1 and ZW10 genes. *Gene* 2004;331:33-40.
- Nagai T, Ogura M, Morishita Y, Okumura M, Kato Y, Morishima Y, Hirabayashi N, Ohno R, Saito H: Establishment and characterization of a new human Bence Jones-type myeloma cell line. *Int J Hematol* 1991;54:141-149.
- Namba M, Ohtsuki T, Mori M, Togawa A, Wada H, Sugihara T, Yawata Y, Kimoto T: Establishment of five human myeloma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989;25:723-729.
- Neri A, Murphy JP, Cro L, Ferrero D, Tarella C, Baldini L, Dalla-Favera R. Ras oncogene mutation in multiple myeloma. *J Exp Med* 1989;170:1715-25.

- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T. A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet* 2001;108:199-204.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989;342:705-8.
- Nilsson T, Hoglund M, Lenhoff S, Rylander L, Turesson I, Westin J, Mitelman F, Johansson B. A pooled analysis of karyotypic patterns, breakpoints and imbalances in 783 cytogenetically abnormal multiple myelomas reveals frequently involved chromosome segments as well as significant age- and sex-related differences. *Br J Haematol* 2003;120:960-969.
- Ning Y, Roschke A, Christian SL, Lesser J, Sutcliffe JS, Ledbetter DH. Identification of a novel paternally expressed transcript adjacent to snRPN in the Prader-Willi syndrome critical region. *Genome Res* 1996;6:742-6.
- O'Carroll D, Scherthan H, Peters AH, Opravil S, Haynes AR, Laible G, Rea S, Schmid M, Lebersorger A, Jerratsch M, Sattler L, Mattei MG, Denny P, Brown SD, Schweizer D, Jenuwein T. Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* 2000;20:9423-33.
- Ohshima A, Miura I, Hashimoto K, Takahashi N, Utsumi S, Nimura T, Saito M, Miki T, Hirosawa S, Miura AB. Rearrangements of the BCL6 gene and chromosome aberrations affecting 3q27 in 54 patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1997;27:329-34.
- Ott G, Kalla J, Ott MM, Schryen B, Katzenberger T, Muller JG, Muller-Hermelink HK. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood* 1997;89:1421-1429.
- Park BJ, Kang JW, Lee SW, Choi SJ, Shin YK, Ahn YH, Choi YH, Choi D, Lee KS, Kim S. The haploinsufficient tumor suppressor p18 upregulates p53 via interactions with ATM/ATR. *Cell* 2005;120:209-21.

- Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K, Houldsworth J, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003 Apr;101:2914-23.
- Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, Schlessinger J, Gishizky L. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 1993;75:175-185.
- Perez-Simon JA, Garcia-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, Gonzalez M, Fernandez-Calvo J, Moro MJ, Hernandez JM, San Miguel JF, Orfao A. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 1998;91:3366-71.
- Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 2001;107:323-37.
- Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ. Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol* 2003;171:88-95.
- Pileri SA, Ascani S, Sabattini E, Fraternali-Orcioni G, Poggi S, Piccioli M, Piccaluga PP, Gamberi B, Zinzani PL, Leoncini L, Falini B. The pathologist's view point. Part II – aggressive lymphomas. *Haematologica* 2000;85:1308-1321.
- Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, Balbin M, Jares P, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Lopez-Otin C, Campo E. Deletions and loss of expression of p16INK4a and P21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1997;89:272-280.
- Prod'homme T, Drénou B, De Ruyffelaere C, Barbieri G, Wiszniewski W, Bastard C, Charron D, Alcaide-Loridan C. Defective class II transactivator expression in a B lymphoma cell line. *Leukemia* 2004;18:832-840.
- Puthier D, Bataille R, Amiot M. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK/STAT rather than ras/MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* 1999;29:3945-3950.
- Qu GZ, Grundy PE, Narayan A, Ehrlich M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;109:34-9.

- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 2000;406:593-9.
- Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005;5:172-83.
- Reuter CW, Morgan MA, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 2000;96:1655-69.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-11.
- Rieder H, Ludwig WD, Gassmann W, Maurer J, Janssen JW, Gokbuget N, Schwartz S, Thiel E, Loffler H, Bartram CR, Hoelzer D, Fonatsch C. Prognostic significance of additional chromosome abnormalities in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1996;95:678-91.
- Ross DM, To LB, Horvath N. Assessment of early paraprotein response to vincristine-doxorubicin-dexamethasone chemotherapy may help guide therapy in multiple myeloma. *Intern Med J* 2004;34:576-8.
- Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-3.
- Rudolph C, Hegazy AN, von Neuhoff N, Steinemann D, Schrock E, Stripecke R, Klein C, Schlegelberger B. Karyotypic evolution in a *BCR-ABL* transduced mouse cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;161:51-56.
- Rudolph C, Steinemann D, von Neuhoff N, Gadzicki D, Ripperger T, Drexler HG, Mrasek K, Liehr T, Claussen U, Emura M, Schrock E, Schlegelberger B. Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;153:144-150.
- Salesse S, Verfaillie CM. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 2002;21:8547-59.
- Saltman DL, Cachia PG, Dewar AE, Ross FM, Krajewski AS, Ludlam C, Steel CM. Characterization of a new non-Hodgkin's lymphoma cell line (NCEB-1) with a chromosomal (11:14) translocation [t(11:14)(q13;q32)]. *Blood* 1988;72:2026-30.

- Sawyer JR, Lukacs JL, Munshi N, Desikan KR, Singhal S, Metha J, Siegel D, Shaughnessy J, Barlogie B. Identification of new nonrandom translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping. *Blood* 1998; 92:4269-4278.
- Sawyer JR, Lukacs JL, Thomas EL, Swanson CM, Goosen LS, Sammartino G, Gilliland JC, Munshi NC, Tricot G, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B. Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2001;112:167-174.
- Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2773-2778.
- Schraders M, Pfundt R, Straatman HM, Janssen IM, van Kessel AG, Schoenmakers EF, van Krieken JH, Groenen PJ. Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* 2005;105:1686-93.
- Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494-497.
- Schrock E, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Spurbeck J, Jalal S, Shaffer LG, Papenhausen P, Kozma C, Phelan MC, Kjeldsen E, Schonberg SA, O'Brien P, Biesecker L, du Manoir S, Ried T. Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum Genet* 1997;101:255-62.
- Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 2002;110:521-529.
- Seymour JF, Grigg AP, Szer J, Fox RM. Cisplatin, fludarabine, and cytarabine: a novel, pharmacologically designed salvage therapy for patients with refractory, histologically aggressive or mantle cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 2002; 94:585-93.
- Shaughnessy J Jr, Gabrea A, Qi Y, Brents L, Zhan F, Tian E, Sawyer J, Barlogie B, Bergsagel PL, Kuehl M. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* 2001;98:217-23.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-791.

- Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000;60:3689-3695.
- Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA, Roschke A, Dewald G, Kirsch IR, Bergsagel PL, Kuehl WM. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:228-33.
- Silva S, Babonits M, Wiener F, Klein G. Further studies on chromosome 15 trisomy in murine T-cell lymphomas: mapping of the relevant chromosome segment. *Int J Cancer* 1988;41:738-743.
- Skorski T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene* 2002;21:8591-604.
- Steinemann D, Siebert R, Harder S, Martin-Subero I, Kettwig G, Hinzmann B, Gesk S, Tiemann M, Merz H, Rosenthal A, Grote W, Morris SW, Schlegelberger B. Frequent allelic loss of the BCL10 gene in lymphomas with the t(11;14)(q13;q32). *Leukemia* 2001;15:474-475.
- Stilgenbauer S, Winkler D, Ott G, Schaffner C, Leupolt E, Bentz M, Moller P, Muller-Hermelink HK, James MR, Lichter P, Dohner H. Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood* 1999;94:3262-3264.
- Stirewalt DL, Clurman B, Appelbaum FR, Willman CL, Radich JP. p73 mutations and expression in adult de novo acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 1999;13:985-90.
- Stocking C, Bergholz U, Friel J, Klingler K, Wagener T, Starke C, Kitamura T, Miyajima A, Ostertag W. Distinct classes of factor-independent mutants can be isolated after retroviral mutagenesis of a human myeloid stem cell line. *Growth Factors* 1993;8:197-209.
- Stripecke R, Skelton DC, Gruber T, Afar D, Pattengale PK, Witte ON, Kohn DB. Immune response to Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia induced by expression of CD80, interleukin 2, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Hum Gene Ther* 1998;9:2049-2062.
- Taniwaki M, Sliverman GA, Nishida K, Horiike S, Misawa S, Shimazaki C, Miura I, Nagai M, Abe M, Fukuhara S, Kashima K. Translocations and amplification of the BCL2

- gene are detected in interphase nuclei of non-Hodgkin's lymphoma by in situ hybridization with yeast artificial chromosome clones. *Blood* 1995;86:1481-6.
- Teodorovic I, Pittaluga S, Kluin-Nelemans JC, Meerwaldt JH, Hagenbeek A, van Glabbeke M, Somers R, Bijmens L, Noordijk EM, Peeters CD. Efficacy of four different regimens in 64 mantle-cell lymphoma cases: clinicopathologic comparison with 498 other non-Hodgkin's lymphoma subtypes. European Organization for the Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1995;13:2819-2826.
- Testoni N, Borsaru G, Martinelli G, Carboni C, Ruggeri D, Ottaviani E, Pelliconi S, Ricci P, Pastano R, Visani G, Zaccaria A, Tura S. 3q21 and 3q26 cytogenetic abnormalities in acute myeloblastic leukemia: biological and clinical features. *Haematologica* 1999;84:690-4.
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;89:3909-3918.
- Tobinai K. Monoclonal antibodies for the treatment of hematologic malignancies: clinical trials in Japan. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;52 Suppl 1:S90-S96.
- Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer JR. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood* 1995;86:4250-4256.
- Uyttenhove C, Druetz C, Renaud JC, Herin M, Noel H, Van Snick J. Autonomous growth and tumorigenicity induced by P40/interleukin 9 cDNA transfection of a mouse P40-dependent T cell line. *J Exp Med* 1991;173:519-22.
- van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 2001;23:936-46.
- Vandenberghe E, De Wolf-Peeters C, Vaughan Hudson G, Vaughan Hudson B, Pittaluga S, Anderson L, Linch DC. The clinical outcome of 65 cases of mantle cell lymphoma initially treated with non-intensive therapy by the British National Lymphoma Investigation Group. *Br J Haematol* 1997;99:842-847.
- Vasmel WL, Matthews EA, Gillis CP, Nieland J, Borst EA, Leupers CJ, Melief CJ, Slater RM. Distinct chromosomal abnormalities in murine leukemia virus-induced T- and B-cell lymphomas. *Int J Cancer* 1989;43:1112-1119.

- Wang VW, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC. Whole genome amplification and high-throughput allelotyping identified five distinct deletion regions on chromosomes 5 and 6 in microdissected early-stage ovarian tumors. *Cancer Res* 2001;61:4169-74.
- Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Cheng WF, Chang MC, Su JL, Hsieh CY. The anti-apoptotic role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by up-regulation of Mcl-1 through a PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 2001;20:5799-5809.
- Welzel N, Le T, Marculescu R, Mitterbauer G, Chott A, Pott C, Kneba M, Du MQ, Kusec R, Drach J, Raderer M, Mannhalter C, Lechner K, Nadel B, Jaeger U. Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2001;61:1629-1636.
- Wiener F, Babonits M, Spira J, Bregula U, Klein G, Merwin RM, Asofsky R, Lynes M, Haughton G. Chromosome 15 trisomy in spontaneous and carcinogen-induced murine lymphomas of B-cell origin. *Int J Cancer* 1981;27:51-58.
- Wiener F, Spira J, Ohno S, Haran-Ghera N, Klein G. Chromosome changes (trisomy 15) in murine T-cell leukemia induced by 1,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). *Int J Cancer* 1978;22:447-453.
- Wieser R, Schreiner U, Rieder H, Pirc-Danoewinata H, Gruner H, Loncarevic IF, Fonatsch C. Interphase fluorescence in situ hybridization assay for the detection of rearrangements of the EVI-1 locus in chromosome band 3q26 in myeloid malignancies. *Haematologica* 2003;88:25-30.
- Wieser R. Rearrangements of chromosome band 3q21 in myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2002;43:59-65.
- Winter JN, Gascoyne RD, Van Besien K. Low-grade lymphoma. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004;203-20.
- Woo RA, Poon RY. Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev* 2004;18:1317-30.
- Woods NB, Muessig A, Schmidt M, Flygare J, Olsson K, Salmon P, Trono D, von Kalle C, Karlsson S. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood* 2003;101:1284-1289.
- Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003;300:1749-1751.

- Xiao Y, Barker PE. Semiconductor nanocrystal probes for human metaphase chromosomes. *Nucleic Acids Res* 2004;32:28.
- Yang A, McKeon F. P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:199-207.
- Yoshida S, Nakazawa N, Iida S, Hayami Y, Sato S, Wakita A, Shimizu S, Taniwaki M, Ueda R. Detection of MUM1/IRF4-IgH fusion in multiple myeloma. *Leukemia* 1999;13:1812-6.
- Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D, Susa M. Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenetic protein-2 induced osteogenesis. Notch target gene Hey1 inhibits mineralization and Runx2 transcriptional activity. *J Biol Chem* 2004;279:37704-37715.
- Zhang Q, Siebert R, Yan M, Hinzmann B, Cui X, Xue L, Rakestraw KM, Naeve CW, Beckmann G, Weisenburger DD, Sanger WG, Nowotny H, Vesely M, Callet-Bauchu E, Salles G, Dixit VM, Rosenthal A, Schlegelberger B, Morris SW. Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet* 1999;22:63-68.
- Zucca E, Roggero E, Pinotti G, Pedrinis E, Cappella C, Venco A, Cavalli F. Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 1995;6:257-262.

### **Buchartikel**

- Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R. Das Rote Buch. Hämatologie und Internistische Onkologie. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage, Ecomed, 2002
- Frank O. Abschaltungsmechanismen retroviraler Gensequenzen: Konstruktion verbesserter Vektoren für die somatische Gentherapie beim Menschen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg. 2002.
- Herold G. Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. 1999.
- ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995). (ed. Mitelman F), Karger Basel, 1995.
- Rickinson A, Kieff B. Epstein-Barr virus. In: Fields Virology (eds. Knipe DM and Howley PM) pp. 2575-2627. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001.

- Schlegelberger B, Metzke S, Harder S, Zuhlke-Jenisch R, Zhang Y, Siebert R. Classical and molecular cytogenetics of tumor cells. In: Diagnostic Cytogenetics (ed. Wegner R-D) pp.151-185. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1999.
- Swerdlow SH, Berger F, Isaacson PI, Muller-Hermelink, HK, Nathwani BN, Piris MA, Harris NL. Mantle cell lymphoma. In: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (eds. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW) pp. 168-170. IARC Press, Lyon, 2001.

**Datenbanken**

[www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

[www.infomatics.jax.org](http://www.infomatics.jax.org)

[www.infobiogen.fr/services/chromcancer](http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer)

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABL	Abelson
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrom</i>
ALCL	anaplastisches großzelliges Lymphom
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute promyelozytäre Leukämie
ASI	<i>Applied Spectral Imaging</i>
ATM	Ataxia telangiectasia
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BAR	<i>break apart rearrangement probe</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BER	<i>base-excision repair</i>
B-NHL	B-Zell- Non-Hodgkin-Lymphom
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	<i>charge coupled device</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i>
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
Chr.	Chromosom
CIN	chromosomale Instabilität
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML	chronisch myeloische Leukämie
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DC	<i>dual color</i>
DF	<i>dual fusion</i>
DLCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dup	Duplikation

---

EBV	Epstein-Barr Virus
FCS	fötale Kälberserum
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FL	follikuläres Lymphom
GCV	Ganciclovir
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
HNPPC	hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
HUGO	Humangenomprojekt
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
HSV-TK	Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus
IL	Interleukin
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995)</i>
LMO2	<i>growth-promoting LIM domain only 2</i>
LM-PCR	<i>ligation-mediated</i> -Polymerasekettenreaktion
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
m	männlich
MCB	<i>multicolor banding</i>
MCL	Mantelzell-Lymphom
MCL1	<i>myeloid cell leukemia sequence-1</i>
MDR1	Multidrug-Resistenzgen 1
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MEF	murine embryonale Fibroblasten
M-FISH	<i>multiplex</i> - Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
min	Minute
MLV	<i>murine leukemia virus</i>
MM	Multiples Myelom
MMR	<i>mismatch repair</i>
MPD	myeloproliferative Erkrankung
NER	<i>nucleotide-excision repair</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PCR	Polymerasekettenreaktion

---

Ph	Philadelphiachromosom
Pkt.	Punkt
Qdot	QuantumDot
Rb	Retinoblastom
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SC	<i>single color probe</i>
sec	Sekunde
SG	SpectrumGreen™
SKY	Spektrale Karyotypisierung
SO	SpectrumOrange™
sog.	sogenannt
SSA	<i>single-strand annealing</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
SZT	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
TSG	Tumorsuppressorgen
T-NHL	T-Zell- Non-Hodgkin-Lymphom
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
w	weiblich
WHO	World Health Organization
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 7 Anhang

**Tab.20 Lokalisation ausgewählter Tumor-assoziiierter Gene im humanen und murinen Genom (www.ensembl.org)**

Gen	Beschreibung, (bedeutende Funktion)	Lokus	
		human	murin
<i>ABL</i>	Tyrosinkinase	9q34.13	2B
<i>ALK</i>	<i>anaplastic lymphoma kinase</i> , Membran-assoziiierter Tyrosinkinase-Rezeptor	2p23	17E2
<i>ATM</i>	Apoptosesignalprotein	11q22.3	9C
<i>C-MYC</i>	Transkriptionsfaktor	8q24.21	15D3
<i>BCL2</i>	Apoptoserespressor	18q21.33	1D
<i>BCL6</i>	Transkriptionsrepressor	3q27.3	16B1
<i>BCR</i>	<i>breakpoint cluster region</i>	22q11.21	10B5.3
<i>CCDND/PRAD1/BCL1</i> ( <i>Cyclin D1</i> )	Zellzyklusregulator	11q13.3	7F5
<i>Cyclin D3</i>	Zellzyklusregulator	6p21.1	17C
<i>EVI-1</i>	Transkriptionsfaktor	3q26.2	3A3
<i>IgH</i>	Immunglobulin schwere Kette	14q32.33	12F2
<i>IgLκ</i>	Immunglobulin leichte Kette kappa	2p11.2	6C2
<i>IgLλ</i>	Immunglobulin leichte Kette lambda	22q11.22	16B1
<i>MLL</i>	Transkriptionsfaktor	11q23.3	9B
<i>NPM1</i>	Nucleophosmin	5q35.1	11A5
<i>N-RAS</i>	Signaltransduktor	1p13.1	3F3
<i>P16</i>	CDKI	9p21.3	4C4
<i>P18</i>	<i>Multisynthetase complex auxiliary component p18</i>	6p24.3	13A5
<i>P53</i>	Zellzyklus- und Apoptoseregulator	17p13.1	11B4
<i>RB</i>	Zellzyklusregulator	13q14.2	14D2
<i>TCL-1</i>	T-Zell-Leukämie/Lymphom-Protein	14q32.13	12F1
<i>TCR α</i>	T-Zellrezeptor alpha	14q11.2	14C1
<i>TCR β</i>	T-Zellrezeptor beta	7q34	6B2
<i>TCR γ</i>	T-Zellrezeptor gamma	7p14.1	13A3.1
<i>TCR δ</i>	T-Zellrezeptor delta	14q11.2	14C1

**Tab.21 Bestimmung der Ploidie nach Anzahl der Chromosomen im humanen und murinen Genom**

Ploidie		Anzahl der Chromosomen	
		human	murin
hypodiploid		35-45	31-39
diploid	<2n>	46	40
hyperdiploid		47-57	41-50
hypotriploid		58-68	51-59
triploid	<3n>	69	60
hypertriploid		70-80	61-70
hypotetraploid		81-91	71-79
tetraploid	<4n>	92	80
hypertetraploid		93-103	81-89

**Tab.22 Bedeutung und Abkürzungen der in dieser Arbeit verwendeten zytogenetischen Fachbegriffe**

<b>Begriff</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Abkürzung human/murin</b>
<b>Aberration</b>	strukturelle oder numerische Veränderung eines Chromosoms	—
<b>Addition</b>	angelagertes chromosomales Material unbekannter Herkunft	<b>add/Add</b>
<b>Aneuploidie</b>	Abweichung der Chromosomenzahl vom diploiden Chromosomensatz	—
<b>Amplifikation</b>	vervielfältigte (mehr als 4 Kopien bei $<2n>$ ) chromosomale Region, die meist als Cluster innerhalb eines Chromosoms auftritt; bei FISH erhöhte Kopienzahl eines Gens	<b>amp/Amp</b>
—	Karyotyp, der auf der Auswertung mehrerer nicht komplett analysierbarer Metaphasen beruht und/oder einige Metaphasen klonale Veränderungen zeigen, die nicht in allen Metaphasen detektiert werden können	<b>cp</b>
<b>Deletion</b>	strukturelle Chromosomenaberration: Verlust eines Chromosomenteils	<b>del/Del</b>
<b>Dizentrisches Chromosom</b>	abnormes Chromosom mit zwei Zentromeren unterschiedlicher Herkunft	<b>dic/Dic</b>
<b>Duplikation</b>	strukturelle Chromosomenaberration: Verdopplung chromosomalen Materials innerhalb eines Chromosoms	<b>dup/Dup</b>
<b>Fluoreszenz- <i>in situ</i>-Hybridisierung</b>	Verwendung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden an Interphasekernen (oder Metaphasechromosomen) zum spezifischen Nachweis genomischer Veränderungen	<b>FISH</b>
—	homogen anfärbbare Region, meist zytogenetisches Korrelat einer Genamplifikation	<b>hsr</b>
—	= der Gleiche; Bezeichnung für den erstbeschriebenen Klon, der zusätzliche Veränderungen im Subklon zeigt	<b>idem</b>
<b>Insertion</b>	Einfügung eines chromosomalen Fragmentes in ein nichthomologes Chromosom	<b>ins/Ins</b>
<b>Inversion</b>	invertierte Region innerhalb eines Chromosoms	<b>inv/Inv</b>
<b>Isodizentrisches Chromosom</b>	aus homologen Chromosomen gebildetes dizentrisches Chromosom	<b>idic/iDic</b>
<b><i>in situ</i>-Hybridisierung</b>	Einsatz von DNA-Sonden an Metaphasechromosomen zum spezifischen Nachweis genomischer Veränderungen	<b>ish</b>

Begriff	Bedeutung	Abkürzung human/murin
<b>Karyotyp</b>	Anordnung der Chromosomen einer Zelle nach ihrer Größe und der Lage des Zentromers	—
<b>Klon/Konalität</b>	Auftreten einer strukturellen oder numerischen Veränderung, die in mindestens 3 Metaphasen detektiert werden kann	—
<b>Markerchromosom</b>	strukturell abnormes Chromosom, dessen chromosomales Material nicht zuzuordnen ist	<b>mar/mar</b>
<b>Monosomie</b>	Verlust eines ganzen Chromosoms bei <2>	<b>- (minus)</b>
—	alternative Interpretation	<b>or</b>
—	kurzer Chromosomenarm	<b>p (human)</b>
<b><i>partial chromosome painting</i></b>	Fluoreszenzdarstellung einer chromosomalen Region/ eines Chromosomenarms	<b>pcp</b>
—	langer Chromosomenarm	<b>q (human)</b>
<b>Ringchromosom</b>	Ringbildung eines Chromosoms oder chromosomaler Fragmente	<b>r/R</b>
<b>Robertson-Translokation</b>	zentrische Fusion akrozentrischer Chromosomen unter Verlust beider p-Arme	<b>rob/RT</b>
<b>Translokation</b>	Strukturelle Chromosomenaberration: Austausch chromosomalen Materials zweier Chromosomen <ul style="list-style-type: none"> <li>Balancierte Translokation: <b>ohne</b> chromosomalen Verlust/Zugewinn einhergehender Austausch</li> <li>Unbalancierte Translokation: <b>mit</b> chromosomalem Verlust/Zugewinn einhergehender Austausch</li> </ul>	<b>t/T</b>
<b>Telomer</b>	Chromosomenende	<b>tel/Tel</b>
<b>Telomerassoziati</b>	Verbindung zweier Chromosomen in der Telomerregion	<b>tas/Tas</b>
<b>Triplikon</b>	Verdreifachung einer chromosomalen Region	<b>trp</b>
<b>Trisomie</b>	Zugewinn eines ganzen Chromosoms bei <2n>	<b>+ (plus)</b>
<b><i>whole chromosome painting</i></b>	Fluoreszenzdarstellung eines Chromosomenpaares	<b>wcp</b>
<b>Zentromer</b>	Ansatzstelle des Spindelapparates in der Zellteilung, unterteilt das Chromosom in p- und q-Arm	<b>cen/Cen</b>

**Tab.23 Strukturelle Veränderungen in t(11;14)(q13;q32)-positiven Zelllinien und Vergleich der Ergebnisse nach R-Bandendarstellung, FISH, SKY und MCB1-Analyse mit bereits publizierten Daten**  
Die Referenzen sind in Tab.2 angegeben. Numerische Veränderungen sind unberücksichtigt.

Zelllinie	Publizierte chromosomale Veränderungen	Chromosomale Veränderungen, detektiert mit R-Bandendarstellung, SKY, FISH und MCB1-Analyse
<b>Granta-519</b>	—	inv(1)(p32p36.3)
	add(1)(p22)	der(1)t(1;14)(p36.3;q11)del(1)(p31p13)t(1;12)(q21.2~q22;q24.1)
	—	der(3;18)(q10;q10)
	add(9)(p22)	dic(9;12)(p13;p11)del(12)(q24.1)
	t(11;14)(q13;q32)	t(11;14)(q13;q32)
	add(13)(p12)	der(13)t(1;13)(q21.2;p13)add(1)(q44)
	add(17)(p11)	der(17)t(17;20)(p11;q11)del(17)(q21q24)
	add(18)(q21)	hsr(18)(q?)
mar	—	
<b>NCEB-1</b>	—	inv(1)(p36.2p35)
	der(5)t(5;12)(p14;q12)	t(5;12)(p14;q12)x2
	—	der(7)t(6;7)(p22;p12)
	add(8)(p11.2)	der(8)t(8;17)(p11;q11)del(17)(q22q24)
	t(9;?;13)(q32;?;q14)	t(9;12;13)(q33;p12;q14)x2
	—	der(9)t(9;13)(q33;q14)
	der(10)t(10;15)(q24;q15)	der(10)t(10;15)(q24;q15)x2
	t(11;14)(q13;q32)	t(11;14)(q13;q32)x2
	—	der(11)t(X;11)(q21;q21)
	—	del(14)(q11q31)
	—	del(X)(q21)
mar	mar1, mar2, mar3	
<b>Rec-1</b>	—	der(Y)t(Y;8)(q12;q24)
	del(1)(p21p31)	del(1)(p21p31)
	t(2;16)(q24;q24)	der(2)t(2;?6)(q12;p22)
	—	der(3)t(3;14)(p14;q21)
	—	del(4)(q13q22)
	—	trp(5)(q35)
	—	inv(7)(p12q21.3)
	der(8)t(8;11)(p11;q13)	der(8)T(8;11)(p11;q13)
	add(9)(p21)	del(9)(p12)
	add(9)(q32)	der(9)tas(9;9)(q34;q34)del(9)(p11)
—	der(10)t(2;10)(p15;q26)	

Fortsetzung 1

Zelllinie	Publizierte chromosomale Veränderungen	Chromosomale Veränderungen, detektiert mit R-Bandendarstellung, SKY, FISH und MCB1-Analyse
	der(14)t(11;14)(q13;q32)	t(11;14)(q13;q32)
	—	t(12;17)(p12;q22)
	der(12)t(8;12)(q11;p12)	der(12)t(8;12)(q11;p12)
	del(13)(q32)	der(13)(12pter->12p12::13q13->13cen::12cen->12p12::12q11->12q13::13q21->13qter)
	—	der(15)t(15;19)(q15;q13)
	—	dic(16;22)(16pter->16cen::22q12->22pter)
	del(17)(q22)	del(17)(q22)
	i(18q)	—
	del(18)(q21)	—
	—	der(19)t(15;19)(q?25;q13)
<b>JeKo-1</b>	add(1)(p13)	der(1)t(1;2)(p21.??;q12)x2
	add(1)(q12)	—
	—	del(2)(q12)x2
	add(3)(q27)	add(3)(q27)
	add(5)(p13)	add(5)t(5;14)(p13;q?21)
	—	add(5)t(5;12)(p15;p?12)
	add(6)(q12)	der(6)t(6;8)(p21;q21)t(8;19)(q24;q13)x2
	add(7)(q22)	der(7)t(4;7)(q25;q31)x2
	—	i(7q10)
	—	der(9)t(9;12)(p21;q21)t(1;12)(p34;q24)inv(9)(q22.3;q34.1)
	add(9)(q34)	der(9)t(9;14)(q34;q22)t(11;14)(q13;q32)del(11)(q13)x2
	—	add(9)(p21)
	add(10)(p15)	der(10)t(10;11)(p11;p13)del(11)(p15)x2
	add(11)(p11)	—
	—	der(11)t(11;14)(q13;q32)x2
	—	der(13)t(7;13)(p21;q32)x2
	—	der(13)t(6;13)(p11;p13)x2
	—	der(14)t(11;14)(q11;p11)t(10;11)(p13;q23)
	—	der(14)t(6;14)(p11;q21)t(14;17)(p11;q11)?dup(17)(q21q22)
	—	inv(16)(p13;q12)x2
	—	ins(19;12)(q13.3;q14q21)x2
	add(21)(p13)	add(21)(p13)
	—	der(X)t(X;11)(q22;q11)t(10;11)(p13;q23)
	—	del(X)(p11)
	mar1, mar2, mar3, mar4, mar5, mar6	—

Fortsetzung 2

Zelllinie	Publizierte chromosomale Veränderungen	Chromosomale Veränderungen, detektiert mit R-Bandendarstellung, SKY, FISH und MCB1-Analyse
<b>SP-50B</b>	del(1)(p?)	der(1)del(1)(p35)del(1)(p21p31)
	—	del(1)(q41)
	del(2)(p?)	del(2)(q11q21)
	del(4)(p14)	del(4)(p12p15)
	del(6)(q21)	—
	del(7)(q32)	del(7)(q21q31)
	—	der(8)t(6;8)(p22;p11)del(8)(q12q21)
	t(11;14)(q13;q32)	t(11;14)(q13;q32)
—	del(15)(q13;q21)	
<b>SP-53</b>	del(1)(p?)	der(1)del(1)(p35)del(1)(p21p31)
	—	der(1)t(1;7)(q32;p14)
	del(2)(p?)	del(2)(q11q21)
	del(4)(p14)	del(4)(p12p15)
	del(6)(q21)	del(6)(q?22)x2
	del(7)(q32)	del(7)(q21q31)
	t(11;14)(q13;q32)	t(11;14)(q13;q32)
<b>HBL-2</b>	der(1)t(1;6)(?::1p36->1q32::6q21->6qter)	der(1)ins(1;6)(p36.2;?p22?p24)t(1;3)(q31;q13)
	—	der(3)t(1;3)(q32;p14)del(1)(q42)t(3;15)(q13;q12~14)
	der(4)t(1;4)(1qter->1q21::4p15.2->4qter)	der(4)t(1;4)(q12;p13). ish der(4)t(1;4)(q12;p13) (wcp1+, bcl2+, wcp4+)
	der(6)t(6;9;11)(11qter->11q11::6p23->6q21::9p22->9pter)	der(6)ins(6;2 or 12)(p22;q24q32 or p11p12)t(2 or 12;11) (q32 or p12;q12)del(6)(q22)
	add(8)(p23)	der(8)t(8;16)(p23;q11)del(8)(q24). ish der(8)t(8;16)(p23;q11)del(8)(q24) (wcp16+, wcp8+, IgH+)
	der(9)t(3;9)(3qter->3q21::9p22->9qter)	der(9)t(3;9)(q21;p21)
	del(9)(pter->q32)	der(9)t(9;11)(p10;p10)der(11)(?)
	t(11;14)(q13;q32)	t(11;14)(q13;q32)
	der(11)t(11;?)(11pter->11q23::?)	der(11)t(8;11)(q13;q14)del(8)(q24)(wcp11+, wcp8+, IgH+)
	—	der(13)t(13;?18)(q31;q21)
	der(14)t(14;15)(14pter->14q32::15q15->15qter)	der(14)t(14;15)(q32;q11)
	—	der(15)add(15)(p11)t(3;15)(p21;q15)
	—	der(15)t(15;16)(q?15;q?22)
	del(17)(qter->?)	del(17)(p11)

Fortsetzung 3

Zelllinie	Publizierte chromosomale Veränderungen	Chromosomale Veränderungen, detektiert mit R-Bandendarstellung, SKY, FISH und MCB1-Analyse
	der(18)t(18;?;9)(18pter->18q23 ::-> :: 9q13 ->9qter)	der(18)amp(q?)t(4;18)(p13;q23). ish amp(BCL2x7)
	der(22)t(9;22)(9qter->9q11::22p12->22qter)	dic(9;22)(p11;p13)
	mar1, mar2, mar3, mar4	—
<b>MOLP-5</b>	dic(1;?13)(p?22;q?14)	der(1)t(1;?)(p11;?)
	add(3)(p11)	—
	add(5)(q?11.2)	—
	t(11;14)(q13;q32)	t(11;14)(q13;q32)
	del(17)(p11.2)	—
	?add(18)(q21)	—
	mar	—
<b>NOP-2</b>	inv dup del(1)(p13-q21q21)	ish trp(1)(q12q21)(pcp1p12x1)(pcp1q21.1x5)(pcp1px4)
	—	del(2)(q21q32)
	—	der(2)t(2;14)(p22;q31)t(11;14)(q13;q32)
	—	del(5)(q12)
	—	der(5)t(5;6)(p11;p21.2)
	—	t(6;17)(p21.1;p12-13)
	t(8;22)(q24;q11)	t(8;22)(q24;q11)
	t(11;14)(q13;q32)	t(11;14)(q13;q32)
	der(15)t(1;15)(p22;p11)	—
	—	del(18)(q21)
<b>KMS-12 PE</b>	—	der(1)t(1;14)(q21;q22)t(11;14)(q13;q32). ish der(1)(BCL2x4-6)x2
	—	der(1)del(1)(p12p22)t(1;19)(q23;p13)
	—	dic(1;9)(p11;q34)del(1)(q41)
	—	der(2;14)(q24;q24)
	—	der(2;14)(q32;q32)
	—	der(2)t(2;14)(?;?)
	—	der(3)t(3;11)(p24;q23)t(3;21)(q27;q11)
	—	del(3)(p14)
	—	der(4)t(4;4)(q26;p15)
	—	inv(4)(p15q11)t(4;7)(q13;p21)
	—	der(5)t(1;5)(p12;q12)
	—	der(5)t(5;11)(q32;q13)
	—	der(5;17)(p10;q10)x2
	—	der(6)t(1;6)(q31;p22)

## Fortsetzung 4

Zelllinie	Publizierte chromosomale Veränderungen	Chromosomale Veränderungen, detektiert mit R-Bandendarstellung, SKY, FISH und MCB1-Analyse
KMS-12 PE	—	der(7)t(7;10)(p21;p13)
	—	del(8)(q21)
	t(9;11)(q34;q13)	der(9)t(9;11)(q34;q11)
	—	ider(9)(q10)t(9;11)(q13;q34)t(5;11)(?;q14)t(3;11)(p24;q14)
	—	der(10)t(5;10)(q32;p13)
	t(11;14)(q13;q32)	der(11)t(11;14)(q13;q32)
	—	der(11)t(3;11)(q13;q13)der(3)t(3;3)(q28;p24) ish der(11)(BCL6x2)
	—	der(11)t(10;11)(?;?)
	—	der(12)t(7;12)(p21;q21)
	—	del(12)(p12)
	—	del(13)(q12q14)x2
	—	dic(13;16)(p11;q11)del(13)(q?12 or q12q33)x2
	—	der(14)t(2;14)(q36;q21)
	—	der(15)t(15;3;21)(q22;q28;q13;q11) ish der(15)(BCL6x2)
	—	der(16)t(10;16)(p11;p11)x2
	—	der(16)t(5;16)(?q34;q11)
	—	der(17)(?::17q24->17q22::17p12->17q24::?)
	—	der(17)(11pter->11p12::17p12->17q21::1q21.1->1q21.3::1q31-> 1q21.1::1q32->1qter)
	—	del(18)(q11q21) or del(18)(q22)x3
	—	der(19)t(1;19)(q24;p13)del(1)(q?31)
	—	del(19)(p13)
—	der(22)t(15;22)(q?25;q13)	
—	mar	
KMS-12 BM	—	der(1)(1pter->1p34::1q11->1p22::1q12->qter)
	—	der(1;4)(p10;p10)
	—	der(1)(?::1p11->1q31::?)
	—	del(2)(p14)
	—	der(5)t(5;17)(p10;q10)x2
	—	dic(6;22)(q13;q12)
	—	der(6)t(6;13)(p11;q32)
	—	idic(7)(p12)t(X;7)(q25;q31)t(7;9)(q31;q12)
	—	der(8)t(1;8)(q12;p21)
	—	der(8)t(1;8)(q12;p21)del(8)(q12)
	t(9;11)(q34;q13)	der(9)t(9;11)(q34;q11)
	—	der(10)t(10;14)(p14;q22)t(14;18)(q32;q?21)

Fortsetzung 5

Zelllinie	Publizierte chromosomale Veränderungen	Chromosomale Veränderungen, detektiert mit R-Bandendarstellung, SKY, FISH und MCB1-Analyse
—		der(10)t(10;14)(p14;q22)add(14)(q?)
	t(11;14)(q13;q32)	t(11;14)(q13;q32)x2
—		der(11)dup(q13q14)del(11)(q14)x2
—		der(12)t(11;12)(q23;q14)
—		der(13)t(1;13)(p31;q22)
—		ins(13;?3)(?;?)
—		der(13)t(13;21)(q13;q11)
—		der(13)t(3;13)(?;?)t(3;18)(?;?)
—		del(17)(p11)
—		der(17)t(7;17)(q34;q22)
—		der(22)t(6;22)(?q25;?q12)
—		der(X)del(X)(p22)t(X;16)(q23;q21)
—		der(?)t(?;1)(?;p11)
—		del(X)(p21)
—		mar1, mar2, mar3

---

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

<b>Name</b>	Rudolph
<b>Vorname</b>	Cornelia
<b>Anschrift</b>	Ferdinand-Wallbrecht-Straße 52 30163 Hannover
<b>Geburtsdatum/-ort</b>	14.07.1970 in Zerbst/ Anhalt
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Nationalität</b>	deutsch

### Schulbildung

<b>1977-1987</b>	Polytechnische Oberschule, Lübs erweiterter Sek. I-Abschluss
<b>1992-1995</b>	Abendgymnasium Kleine Burg, Braunschweig Allgemeine Hochschulreife

### Berufsausbildung

<b>1987-1990</b>	Medizinische Fachschule Magdeburg Fachschulabschluss: Kinderkrankenschwester
------------------	---

### Berufstätigkeit

<b>1990-1991</b>	Kreiskrankenhaus Zerbst, Säuglingsstation
<b>1991-1995</b>	Städtisches Krankenhaus Salzgitter-Lebenstedt, Frühgeburtenstation

## Hochschulausbildung

**1995-2001** Studium der Biochemie an der Universität Hannover

**2000-2001** **Diplomarbeit**  
Abteilung für Zell- und Immunbiologie, Gesellschaft für  
Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Braunschweig  
Betreuung: Prof. Dr. Jürgen Wehland  
Thema: ***Untersuchungen zur Funktion der ERM-  
Proteinfamilie in der Phagozytose***

**2001-2005** **Promotion**  
Institut für Zell- und Molekularpathologie,  
Medizinische Hochschule Hannover  
Betreuung: Prof. Dr. Brigitte Schlegelberger  
Thema: ***Untersuchung der chromosomalen Instabilität  
hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren mittels  
spektraler Karyotypisierung (SKY)***

## Mitgliedschaft

Deutsche Gesellschaft für Humangenetik

## Publikationen

### Vorträge

#### **Zytogenetische Charakterisierung der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie GRANTA-519 mittels Spektraler Karyotypisierung (SKY)**

Rudolph C, Steinemann D, von Neuhoff N, Wilkens L, Emura M, Drexler HG, Schröck E, Schlegelberger B

*87. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie/ 23. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Zytologie*, 12.-14. Juni 2003, Bamberg

Auszeichnung mit Reisestipendium

### Poster

#### **Genetic instability in a transgenic mouse model for Philadelphia chromosome-positive ALL**

Rudolph C, Steinemann D, Hegazy AN, Schrock E, Klein C, Schlegelberger B

*17. International Mouse Genome Conference*, 09.-12. November 2003, Braunschweig

#### **Chromosomal instability following retroviral gene transfer in mice**

Rudolph C, Modlich U, Meyer J, Li Z, Kamino K, Baum C, Schlegelberger B

*European Human Genetics Conference*, 12.-15. Juni 2004, München

#### **Molecular cytogenetic investigation of t(11;14)(q13;q32)-positive B-cell NHL cell lines increases the suspicion of tumor-associated genes on chromosome 1**

Rudolph C, Wingen LU, Emura M, Schlegelberger B, Daibata M, Matsuo Y, Emi N, Abe M, Lai R, Mrasek K, Claussen U, Liehr T

*16. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik*, 9.-12. März 2005, Halle/Saale

## **Originalarbeiten**

### **Cytogenetic characterization of a BCR-ABL transduced mouse cell line**

Rudolph C, Hegazy AN, von Neuhoff N, Steinemann D, Schrock E, Stripecke R, Klein C, Schlegelberger B

*Cancer Genet Cytogenet* 2005;161:51-6

### **Different breakage-prone regions on chromosome 1 detected in t(11;14)-positive mantle cell lymphoma cell lines and multiple myeloma cell lines are associated with different tumor progression-related mechanisms**

Rudolph C, Liehr T, Steinemann D, Emura M, Daibata M, Matsuo Y, Emi N, Abe M, Lai R, Mrasek K, Claussen U, Schlegelberger B

*Cytogenet Genome Res* 2005, in Druck

### **Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development**

Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AHFM, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA

*Nature* 2005;436:660-5

### **Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis**

Modlich U, Kustikova OS, Schmidt M, Rudolph C, Meyer J, Li Z, Kamino K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Kuehlcke K, Bunting KD, Schmidt S, Deichmann A, von Kalle C, Fehse B, Baum C

*Blood* 2005;105:4235-46.

### **The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis *in vivo***

Lechel A, Satyanarayana A, Ju Z, Plentz RR, Schaetzlein S, Rudolph C, Wilkens L, Wiemann SU, Saretzki G, Malek NP, Manns MP, Buer J, Rudolph KL

*EMBO Rep* 2005;6:275-81

**The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses *PCM1* to *JAK2***

Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, Schlegelberger B, Berger U, Telford N, Aruliah S, Yin JA, Vanstraelen D, Barker HF, Taylor PC, O'Driscoll A, Benedetti F, Rudolph C, Kolb HJ, Hochhaus A, Hehlmann R, Chase A, Cross NC  
*Cancer Res* 2005;65:2662-2667

**Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma (MCL) cell line GRANTA-519**

Rudolph C, Steinemann D, von Neuhoff N, Gadzicki D, Ripperger T, Drexler HG, Mrasek K, Liehr T, Claussen U, Emura M, Schrock E, Schlegelberger B  
*Cancer Genet Cytogenet* 2004;153:144-150

**Tumor cells escape suicide gene therapy by genetic and epigenetic instability**

Frank O, Rudolph C, Heberlein C, von Neuhoff N, Schrock E, Schambach A, Schlegelberger B, Fehse B, Ostertag W, Stocking C, Baum C  
*Blood* 2004;12:3543-3549

**Abstrakts**

**More than one mutation is required for leukemia development following retroviral vector-mediated gene transfer**

Kustikova O, Schmidt M, Modlich U, Li Z, Schmidt S, Deichmann A, Rudolph C, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Fehse B, Kalle C, Baum C  
*Blood* 2004;104 (Suppl.). abstract 294

**Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using a subtelomeric 11q probe as a new diagnostic tool for congenital thrombocytopenia caused by deletions in 11q**

Gadzicki D, Michaelsen G, Rudolph C, Steinemann D, Happel C M, Welte K, Klein C, Toennies H, Lichter P, Kontny U, Niemeyer CM, Schlegelberger B  
*Blood* 2004;104 (Suppl.).abstract 3035

---

**Characterization of secondary alterations in mantle cell lymphomas using matrix-/array CGH**

Steinemann D, Tauscher M, Rudolph C, Emura M, Abe M, Daibata M, Matsuo Y, Drexler HG, Radlwimmer B, Kestler HA, Lichter P, Schlegelberger B  
*Blood* 2004;104 (Suppl.).abstract 4349

**Charakterisierung von Mantelzell-Lymphomen mittels Matrix-CGH**

Steinemann D, Tauscher M, Rudolph C, Emura M, Radlwimmer B, Kestler H, Lichter P, Schlegelberger B  
*Medgen* 2004;16:140

**Reproducible insertional leukemogenesis with evidence for chromosomal instability following dose-escalated retroviral vector transfer into murine hematopoietic cells**

Modlich U, Meyer J, Rudolph C, Knoess S, Kuehlcke K, Li Z, Bunting KD, von Neuhoff N, Schlegelberger B, von Kalle C, Baum C  
*Blood* 2003;102(Suppl.).abstract 699

**Generation and characterization of a novel multipotential murine hematopoietic progenitor cell line with DC-differentiation potential using *Notch-1* gene transfer**

Rathinam C, Rudolph C, Schlegelberger B, Klein C  
*Blood* 2003;102 (Suppl.).abstract 3064

## Danksagung

Ein großer Dank gilt meiner Chefin, Frau Prof. Brigitte Schlegelberger, für die Möglichkeit, die Arbeit in ihrem Institut durchführen zu können, ihre Vorbildwirkung und die Begeisterungsfähigkeit für die wissenschaftliche Arbeit und nicht zuletzt für ihre Unterstützung bei der Verfassung der Publikationen als auch dieser Zusammenschrift.

Ich bedanke mich weiterhin ganz, ganz herzlich bei allen Kollegen des Institutes für Zell- und Molekularpathologie der MHH, die, in welcher Art und Weise auch immer, zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Zudem möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern bedanken, insbesondere bei Frau Prof. Evelin Schröck und ihren Mitarbeitern für ihre Hilfeleistung bei der Etablierung der SKY.

Ich bedanke mich bei meiner Freundin Cathleen Filor, die mir sehr viel Kraft gibt und deren Freundschaft mir sehr am Herzen liegt.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Lehrern und Dozenten bedanken, die die Grundsteine meiner jetzigen Arbeit legten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir immer das Gefühl gegeben haben, etwas Wertvolles zu sein, die mir stets uneingeschränkt vertrauten und zu dem von mir gewählten Lebensweg ihren Zuspruch gaben. Ich danke ihnen für diese Liebe.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen der chromosomalen Instabilität hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren mittels spektraler Karyotypisierung (SKY)“ eigenständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere an Eides Statt, dass diese Dissertation nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Zell- und Molekularpathologie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit von Oktober 2001 bis Juni 2005 durchgeführt.

Hannover, im Juni 2005

Cornelia Rudolph