

Claudius Alexander Werner
Dr. med.

Nachweis chromosomaler Aberrationen bei centroblastisch-centrocytischen Non-Hodgkin-Lymphomen mittels vergleichender genomischer Hybridisierung

Geboren am 07.12.1970 in Freiburg
Reifeprüfung am 08.05.1990 in Karlsbad
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/1992 bis SS 1998
Physikum am 25.08.1993 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 29.10.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. M. Bentz

Centroblastisch-centrocytische Non-Hodgkin-Lymphome entstehen als Folge genetischer Veränderungen in B-Zellen. In über 80% der Fälle weisen diese Lymphome eine charakteristische genetische Veränderung auf. Hierbei handelt es sich um die chromosomale Translokation $t(14;18)(q21;q32)$, bei der es zu einer Zusammenlagerung des Protoonkogens *BCL2*, das auf der chromosomalen Bande 18q21 lokalisiert ist, und regulatorischen Elementen des Immunglobulin-Schwerkettengens (*IgH*) auf der chromosomalen Bande 14q32 kommt. Die hieraus resultierende Überexpression des *BCL2*-Proteins inhibiert die Apoptose und führt so zu einem Selektionsvorteil der $t(14;18)$ -positiven Zellen. Dies allein führt jedoch noch nicht zur malignen Transformation der B-Zellen, wie der Nachweis $t(14;18)$ -positiver Zellen in nicht-neoplastischen Lymphknotenvergrößerungen mit folliculärer Hyperplasie und sogar im peripheren Blut gesunder Kontrollpersonen sowie tierexperimentelle Modelle zeigen. Dies legt nahe, daß zusätzliche genetische Veränderungen für die Entwicklung centroblastisch-centrocytischer Non-Hodgkin-Lymphome verantwortlich sind. Bei den meisten dieser sekundären Veränderungen handelt es sich um chromosomale Imbalancen, d. h. um Gewinne und Verluste von chromosomalem Material, die mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) nachgewiesen werden können. Diese Methode erlaubt eine genomweite Analyse chromosomaler Imbalancen, ist jedoch nicht wie die konventionelle Bänderungsanalyse auf die Präparation von Metaphasezellen angewiesen. Dies ermöglicht die Analyse von archiviertem Material und somit von Tumorentitäten, bei denen es problematisch ist, frische, teilungsfähige Zellen zu erhalten. Darüber hinaus spiegeln die mittels CGH erfaßten Befunde die klonale Zusammensetzung der untersuchten Tumoren in vivo wider, während es bei der Bänderungsanalyse durch die Kultivierung der Tumorzellen zur Selektion von Subpopulationen mit höherer Proliferationsrate kommen kann.

In der hier vorliegende Arbeit wurden 28 Patienten mit centroblastisch-centrocytischem Non-Hodgkin-Lymphom molekularzytogenetisch untersucht. Ein *BCL2/IgH*-Rearrangement lag bei 25 der 28 Patienten vor (89%). Dies wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion sowie der Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden nachgewiesen. Die häufigsten mittels CGH identifizierten chromosomalen Imbalancen waren Zugewinne von genetischem Material auf den Chromosomen X, 7, 8, 12 und 18 sowie Verluste auf dem langen Arm von Chromosom 6. Auf der Basis der CGH-Befunde konnten für diese Chromosomen Subregionen identifiziert werden, die in jedem dieser Fälle überbeziehungsweise unterrepräsentiert waren (sog. Konsensus-Regionen).

Im Gegensatz zu den bislang publizierten zytogenetischen Studien wurde mittels CGH eine hohe Inzidenz an DNA-Amplifikationen nachgewiesen (fünf Amplifikationen bei vier der 28 Patienten). Diese waren auf den chromosomalen Banden 1p36, 6p21, 8q24 (zwei Fälle) sowie 12q13-14 lokalisiert. DNA-Amplifikationen führen über die Erhöhung der Kopienzahl von Genen, die im amplifizierten DNA-Abschnitt lokalisiert sind, zu einer gesteigerten Expression der entsprechenden Gen-Produkte. Solche DNA-Amplifikationen können bei der Entwicklung von Tumoren eine wichtige Rolle spielen, insbesondere wenn Protoonkogene Teil der Amplikons sind. Bei einigen soliden Tumoren sind eine Reihe spezifischer Gen-Amplifikationen identifiziert worden, die mit einem aggressiveren Tumorphänotyp sowie einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Bei Lymphomen hingegen sind mit Hilfe der chromosomalen Bänderungsanalyse lediglich in 19 von mehr als 3000 Non-Hodgkin-Lymphomen Hinweise auf das Vorhandensein amplifizierter DNA-Sequenzen identifiziert worden.

Bei beiden Fällen, bei denen amplifizierte Sequenzen der Bande 8q24 identifiziert wurden, konnte mittels Southern Blot Analyse eine Amplifikation des *C-MYC*-Protoonkogens nachgewiesen werden. Ebenso konnte mit Hilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierung das Protoonkogen *GLI* bei dem Fall mit einer Amplifikation der Banden 12q13-14 als Teil der Amplifikationseinheit identifiziert werden. Um eine größere Zahl an Genen zu identifizieren, die in B-Zell-Neoplasien amplifiziert sind, wurden zusätzlich noch weitere Patienten untersucht, bei denen mittels CGH DNA-Amplifikationen nachgewiesen wurden. So wurden Amplifikation des Protoonkogens *BCL2* in zwei Fällen mit Mantelzell-Lymphom sowie eine Amplifikation des Protoonkogens *N-MYC* in je einem Fall mit Burkitt-Lymphom und einem Fall mit Mantelzell-Lymphom demonstriert. Amplifikationen der Protoonkogene *GLI* und *N-MYC* waren bislang bei Non-Hodgkin-Lymphomen nicht beschrieben worden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnten mittels CGH Regionen eingegrenzt werden, in denen möglicherweise Gene lokalisiert sind, die eine wichtige Rolle in der Tumorprogression spielen. In einigen Fällen konnten bereits Amplifikationen spezifischer Gene identifiziert werden. Die klinische und biologische Bedeutung dieser Genamplifikationen kann nun durch Untersuchung einer großen Patientenzahl sowie durch genetisch-klinische Korrelationen bestimmt werden.