

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

**„Genetische Aberrationen auf Chromosom 1
in gastralen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen“**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kerstin Göbel

aus Neuburg

Würzburg, November 2005

Referent: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

Korreferent: Professor Dr. med. W. Scheppach

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2007

Die Promovendin ist Ärztin

1. EINLEITUNG	1
1.1 Epidemiologie gastrointestinaler Non-Hodgkin-Lymphome.....	1
1.2 Klassifikation und Charakterisierung der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL) des Magens	1
1.3 Ätiologie diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome des Magens.....	3
1.4 Zytogenetik/Molekulargenetik bei DLBCL.....	5
1.5 Mikrosatellitenanalyse	8
1.6 Ziel dieser Arbeit	9
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Untersuchungsgut	10
2.2 Untersuchung genetischer Aberrationen anhand fluoreszenzmarkierter Mikrosatellitenmarker	12
2.2.1 Mikrodissektion	12
2.2.2 DNA-Extraktion.....	12
2.2.3 Kontrolle der Klonalität	13
2.2.4 Mikrosatelliten-PCR	14
2.2.4.1 Auswahl der Mikrosatellitenmarker	14
2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion	16
2.2.5 Vorbereitung der Gelelektrophorese	17
2.2.6 Elektrophorese und anschließende Auswertung	19
3. ERGEBNISSE	21
3.1 Chromosom 1 weist bei gastralen DLBCL multiple genetische Aberrationen auf.....	23
3.2 Fälle mit größeren Abschnitten an Deletionen	26
3.3 Amplifikationen treten nur selten auf	27
3.4 Auf 1q21-23 können nur wenig Aberrationen festgestellt werden	29
3.5 Die Chromosomenbande 1p22, Locus für BCL10, ist kaum verändert	29
3.6 Mikrosatelliteninstabilität	30
3.6.1 Die Inzidenz der MSI steigt mit dem Alter	32
3.6.2 Die Inzidenz der MSI steigt nicht stadienabhängig.....	33
4. DISKUSSION	34
4.1 Die Chromosomenbande 1p36.32 als Locus des Gens TP73 ist am stärksten von LOH betroffen .	34
4.2 Auf 1q32.3-41 steht LOH im Vordergrund	36
4.3 Die Chromosomenbande 1q21-23 zeigt wenig Aberrationen	37
4.4 In der Chromosomenbande 1p22 gibt es wenig Veränderungen	38
4.5 Mikrosatelliteninstabilität kommt bei gastralen DLBCL selten vor	40
5. ZUSAMMENFASSUNG	43
6. ABKÜRZUNGEN	44
7. LITERATURVERZEICHNIS	46

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie gastrointestinaler Non-Hodgkin-Lymphome

In der Gruppe der Lymphome unterscheidet man generell die Hodgkin-Lymphome von den Non-Hodgkin-Lymphomen. Der Hauptteil der Non-Hodgkin-Lymphome wächst primär in den Lymphknoten. Etwa 25-40% aller Non-Hodgkin-Lymphome sind primär extranodale Lymphome. Diese entstehen in Organen, die normalerweise frei von spezifischem lymphatischem Gewebe sind. Das von den extranodalen Non-Hodgkin-Lymphomen am häufigsten befallene Organsystem ist der Gastrointestinaltrakt, insbesondere der Magen. Die NHL machen ca. 5% aller gastralen Malignome aus [1]. Die malignen Lymphome des Magens wachsen bevorzugt im präpylorischen Antrum und im Korpus.

1.2 Klassifikation und Charakterisierung der diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL) des Magens

Die Einteilung der Lymphome erfolgt nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des hämatopoietischen und lymphatischen Gewebes, die im Jahre 2001 veröffentlicht wurde und seither als Standard-Klassifikation der hämatologischen malignen Erkrankungen gilt [2]. Danach machen die diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (nodal und extranodal) circa 30-40% der adulten Non-Hodgkin-Lymphome in den westlichen Ländern aus. In den Entwicklungsländern nehmen sie einen noch größeren Anteil ein. Die Inzidenz der DLBCL ist in den letzten Jahrzehnten gestiegen, unabhängig von HIV als Risikofaktor.

Die diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome werden definiert als diffuse Proliferation großer neoplastischer B-Lymphozyten mit Zellkernen, die weit größer als die normaler Lymphozyten sind, deren Größe eher mit der der Makrophagen verglichen werden kann. Zytologisch kann man die DLBCL in mehrere Gruppen einteilen. Den Hauptteil machen die zentroblastischen DLBCL aus. Weiterhin findet man immunoblastische, anaplastische, T-Zell- oder histiozytenreiche und plasmablastische DLBCL.

Von den DLBCL des Magens, um die es sich in dieser Arbeit handelt, müssen die Marginalzonen B-Zell-Lymphome (MZBCL) vom MALT-Typ abgegrenzt werden. Nach der REAL-Klassifikation (Revised European American Lymphoma Classification) von 1994 wurden diese auch „niedrigmaligne B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ“ genannt. Diese Lymphome kommen bei einem Teil der DLBCL als mögliche Vorläufer in Frage. Findet man Anteile von DLBCL und MZBCL in einem Gewebe, wird nach der WHO-Klassifikation der Begriff „Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom mit Anteilen eines Marginalzonen B-Zell-Lymphoms vom MALT-Typ“ verwendet [3,4].

Prognostisch gesehen ist das Grading und die Klassifikation der gastralen MALT-Lymphome in MZBCL vom MALT-Typ und DLBCL, mit oder ohne Zeichen der jeweils anderen Komponente, von größter Bedeutung. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt für Patienten mit MZBCL vom MALT-Typ ungefähr 80%. Bei den primär hochmalignen DLBCL des Magens liegt diese Rate bei 40-50% [2,5]. Die Gruppe um de Jong untersuchte Biopsate von 106 Patienten mit MALT-NHL des Magens. Dabei zeigte sich, dass die 5- bzw. 10-Jahresüberlebensraten um so schlechter waren, je höher der Anteil an großzelligen Komponenten in einem Lymphom war. So betrug die 5-Jahresüberlebensrate von Patienten mit einem reinen MZBCL vom MALT-Typ 95%, von Patienten mit MZBCL mit einem Anteil hochmaligner Komponenten bis maximal 5% des Gesamtmaterials 64% und von Patienten mit einem DLBCL ohne niedrigmaligne Komponenten nur noch 35% [3].

Makroskopisch imponiert das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom meist als knotige Formation mit oder ohne zentrale Ulzeration. Lymphoepitheliale Läsionen, die typisch für die MZBCL sind, fehlen meist. Oft infiltriert das DLBCL tief in die Magenwand und hebt dort die normale Architektur auf [6].

DLBCL exprimieren häufig verschiedene pan-B-Marker wie CD19, CD20, CD22 und CD79a; einer oder mehrere dieser Marker können aber auch fehlen. Bei der großen Mehrzahl der anaplastischen DLBCL findet man CD30 auf der Oberfläche, bei den nicht-anaplastischen DLBCL wird dieser Oberflächenmarker nur gelegentlich exprimiert. CD5-positive DLBCL entstehen eher de novo als durch eine Progression aus niedrigmalignen Vorstufen [2].

DLBCL treten gehäuft bei älteren Patienten mit einem Altersgipfel im 7. Lebensjahrzehnt auf. Man findet sie jedoch in jedem Alter, auch bei Kindern kommen sie vor. In der Geschlechterverteilung überwiegen die männlichen Patienten leicht.

Das Staging der gastralen DLBCL wird nach der modifizierten Ann-Arbor-Klassifikation von Musshoff durchgeführt [7].

Stadieneinteilung gastrointestinaler Lymphome nach Musshoff	
<i>Stadium</i>	<i>Ausdehnung</i>
EI1	Uni- oder multilokuläres Magenlymphom, beschränkt auf Mukosa und Submukosa, ohne Lymphknotenbeteiligung
EI2	EI1 + Infiltration der Muskularis propria, Subserosa oder Infiltration per continuitatem in ein benachbartes Organ, ohne Lymphknotenbefall
EII1	EI2 + Befall regionaler Lymphknoten
EII2	EII1 + Befall regionaler Lymphknoten + lokalisierter Organbefall unterhalb des Zwerchfells
EIII	EII2 + Lymphknotenbefall ober- oder unterhalb des Zwerchfells einschließlich eines weiteren lokalisierten Befalls eines Organs, ober- oder unterhalb des Zwerchfells
EIV	Uni- oder multilokuläres Magenlymphom mit oder ohne Lymphknotenbefall sowie diffuser oder disseminierter Organbefall

1.3 Ätiologie diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome des Magens

Zwei Arten der Genese diffuser großzelliger B-Zell-Lymphome sind bekannt. Eine Form ist die der Transformation aus kleinzelligen Lymphomen, weshalb man diese Lymphome dann als sekundäre DLBCL bezeichnet. Verschiedene Gruppen haben Untersuchungen durchgeführt, um die Beziehung zwischen den MZBCL vom MALT-Typ und den DLBCL des Magens aufzudecken. Boot et al. zeigten anhand einiger Patientenbeispiele, dass sich hinter den im Vordergrund stehenden diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen jeweils niedrigmaligne Komponenten verbargen. Durch

therapeutische Maßnahmen kamen diese zum Vorschein. Dieses gleichzeitige Vorhandensein beider Komponenten weist auf eine direkte Entwicklung zumindest einiger hochmaligner Lymphome aus der niedrigmalignen Vorstufe hin [8]. Immunhistochemische Untersuchungen von Chan et al. zeigten, dass die neoplastischen Zellen – sowohl der hochmalignen als auch der niedrigmalignen Komponenten – dieselbe Klasse an Leichtketten der Immunglobuline exprimieren. Auch andere Studien geben Hinweise darauf, dass die DLBCL durch Blastentransformation aus niedrigmalignen Vorstufen entstehen können [9,10,11,12].

Im Widerspruch dazu stehen verschiedene Arbeiten, die belegen, dass niedrig- und hochmaligne Lymphome des Magens nicht aus demselben Klon hervorgehen [13,14]. Bei diesen Lymphomen geht man davon aus, dass sie de novo entstehen, also als primär großzellige Lymphome in der Magenschleimhaut in Erscheinung treten. Nach Yoshino et al. erkranken zumindest Patienten mit einem Alter unter 50 Jahren eher an den de-novo-Lymphomen, weil die „high-grade“-Transformation mindestens 10 Jahre zu benötigen scheint [15].

Als Ursache extranodaler Lymphome kommen chronische Entzündungen in Frage. So weiß man, dass beispielsweise Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis oder Sjögren-Syndrom der Speicheldrüsen ein vielfach erhöhtes Risiko haben, an einem Lymphom zu erkranken [1,16]. Als gastrales Pathogen wurde das gramnegative Bakterium *Helicobacter pylori* im Jahr 1983 von Warren und Marshall identifiziert. Man erkannte, dass eine Infektion des Magens mit *H. pylori* mit gewissen Erkrankungen wie der chronischen Gastritis und Duodenalulzera assoziiert ist [17]. Erst 1991 wurde von Wotherspoon et al. die Beziehung zwischen einer Infektion mit *Helicobacter pylori* und der Entstehung eines B-Zell-Lymphoms des Magens erkannt [18]. Verschiedene seither durchgeführte Studien belegen, dass gastrale Non-Hodgkin-Lymphome mit einer H.P.-Infektion des Magens in Zusammenhang stehen. Das Bakterium greift dabei in die normalen physiologischen und immunologischen Vorgänge innerhalb des Magens ein. Es wird ein Milieu errichtet, in dem Zellproliferation und DNA-Schäden sowohl in Epithel- als auch in hämatopoietischen Zellen auftreten können [19]. Lange Zeit wurde jedoch nur das MZBCL vom MALT-Typ mit einer H.P.-Infektion in Verbindung gebracht. Man ging davon aus, dass eine Eradikation nicht zu einer Remission der DLBCL führt, sondern nur zur Beeinflussung möglicher niedrigmaligner Komponenten

des Tumors und zur Vorbeugung späterer MZBCL-Rezidive durchgeführt werden soll. Die Ergebnisse einer retrospektiven Studie von Morgner et al. widersprechen dieser Behauptung jedoch. Man untersuchte den Effekt einer Eradikationstherapie bei acht Patienten mit primärem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom des Magens und H. pylori-Infektion. In sechs von acht Fällen wurde komplette Remission allein durch die Eradikation von H. pylori beobachtet [20]. Offensichtlich besteht Bedarf an prospektiven Studien, die die Beziehung zwischen H. pylori und den DLBCL näher untersuchen. Bis dahin ist die Therapie der Wahl die Chemotherapie (nach dem CHOP-Schema) und/oder Radiatio, evtl. begleitet von einer H.P.-Eradikationstherapie [8,16,20].

Neben chronischer Entzündung scheint ein abnormer Immunstatus zu den Risikofaktoren des DLBCL zu zählen. So beobachtet man diese Lymphome vermehrt bei Patienten mit AIDS oder Epstein-Barr-Virus-Infektion und bei Patienten, die unter Immunsuppression stehen (Organtransplantation, Chemotherapie) [2,21].

1.4 Zytogenetik/Molekulargenetik bei DLBCL

Die bei extranodalen DLBCL am häufigsten veränderte chromosomale Region ist der lange Arm des Chromosoms 6. In einer Studie von Starostik et al. wurden bei 42% der Patienten in diesem Bereich Deletionen gefunden [22].

Während die Translokation $t(11;18)(q21;q21)$ bei den extranodalen MZBCL als häufigste Aberration gilt, scheint diese bei den DLBCL keine Rolle zu spielen. Ein Vorhandensein dieser strukturellen Aberration bei niedrigmalignen Lymphomen wird vielmehr mit einem Stopp in der Tumorprogression assoziiert. Es zeigte sich, dass zusätzliche genomische Veränderungen, die auch bei den DLBCL gefunden werden, fast nur bei $t(11;18)$ -negativen MZBCL vom MALT-Typ auftreten. Die Translokation $t(11;18)$ ist mit dem API2-MLT-Fusionstranskript assoziiert [23,24,25].

Das Gen MALT1 ist auch in die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ involviert, durch die es mit dem IGH-Lokus kombiniert wird. Diese Translokation, die bisher nur bei den MZBCL beschrieben worden war, wurde in jüngerer Zeit auch bei einem DLBCL der Haut nachgewiesen [26,27].

Daneben ist noch die Translokation t(1;14)(p22;q32) zu nennen. Eine stark erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens BCL10 in der Chromosomenregion 1p22 ist mit dieser Translokation assoziiert, wurde aber auch als von ihr unabhängig beschrieben [28,29]. Das Wildtypgen BCL10 hat eine proapoptotische Funktion, die durch Mutation verloren geht. Die BCL10-Mutation wurde mit einer Progression der MZBCL zu den DLBCL in Verbindung gebracht und scheint auch in die Pathogenese anderer Malignome, z.B. in die der folliculären Lymphome, verwickelt zu sein [30]. Es gibt andererseits Studien, die dafür sprechen, dass die Mutation des BCL10-Gens nur eine begrenzte Rolle in der Pathogenese der extranodalen DLBCL spielt [31,32,33].

Die bei MALT-Lymphomen am häufigsten gefundene numerische Aberration ist die Trisomie 3. Bei den DLBCL fand man diese Trisomie in 8 bis 36% der Fälle [34,35,36], bei den MZBCL vom MALT-Typ wurde sie in 10 bis 85% der Fälle beschrieben [36,37,38,39]. Nach Ansicht einiger Autoren spielt die Trisomie des Chromosoms 3 bei der Transformation von niedrig- in hochmaligne MALT-Lymphome jedoch keine bedeutende Rolle [34,35]. Weitere numerische Aberrationen, die bei der Pathogenese der DLBCL von Bedeutung sein könnten, sind die Trisomien 12 und 18 [36].

Des Weiteren müssen Veränderungen von Genen beachtet werden, die in der Pathogenese der DLBCL eine Rolle einnehmen könnten. Hierzu zählt die bei DLBCL häufig vorkommende Translokation des in der Chromosomenregion 3q27 liegenden BCL6-Gens. Lo Coco et al. fanden diese Aberration bei 35,5% der untersuchten diffusen großzelligen Lymphome, im Vergleich dazu jedoch nur bei 6,4% der untersuchten folliculären Lymphome [40]. Andere Arbeitsgruppen stießen nur bei den DLBCL auf Rearrangement des BCL6, nicht aber bei den MZBCL vom MALT-Typ. Sie vermuten, dass die Transformation der kleinzelligen Lymphome in die DLBCL mit einer Überexpression des BCL6 assoziiert ist [41,42].

Außerdem tritt BCL2-Rearrangement bei den DLBCL auf. Diese Veränderung konnte bei 17 bis 40% der nodalen, jedoch nur bei rund 4% der extranodalen DLBCL nachgewiesen werden. BCL2 blockiert den programmierten Zelltod und spielt damit eine Rolle in der Lymphomagenese. Das Gen ist in die Translokation t(14;18)(q21;q34) involviert und gilt als primäre Aberration für die folliculären Lymphome [43,44].

Daneben wird der c-myc-Mutation eine Rolle in der Lymphomagenese bzw. der Transformation der kleinzelligen Formen in die DLBCL zugeschrieben. Der Stellenwert

dieser Veränderung wird jedoch von verschiedenen Untersuchern unterschiedlich dargestellt [45,46]. Die c-myc-Mutation wird bei den extranodalen DLBCL, insbesondere bei denen des Gastrointestinaltrakts, viel häufiger gefunden als bei den nodalen DLBCL. Insgesamt zeigen 15,5 bis 35% der extranodalen und 2,2 bis 5% der nodalen DLBCL diese Mutation [43,44].

In einer neueren Studie von Wohlfart et al. konnten FAS-(CD95-)Mutationen bei 14,3% der untersuchten gastralen DLBCL nachgewiesen werden, damit häufiger als bei den MZBCL des Magens (5,6%) [47]. FAS gehört zu den Tumornekrosefaktor-Rezeptoren und vermittelt mit seinem Liganden ein Apoptose-Signal. Durch FAS-Mutation kommt es zu einem Verlust dieser Apoptose-Funktion und Entstehung der Lymphome [48].

Das Tumorsuppressorgen p53, das bei menschlichen Malignomen die am häufigsten gefundene Veränderung darstellt, wird auch mit der Entstehung der MZBCL und der Transformation in die großzellige Form in Verbindung gebracht. In einer Studie von Du et al. fand man p53-Veränderungen sowohl bei den MZBCL als auch bei den DLBCL. Es zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tumorformen. Teilweise Inaktivierung des Tumorsuppressorgens, die sich bei den MZBCL zeigte, wurde mit der Entstehung dieser Lymphome assoziiert. Dem kompletten Ausfall der p53-Funktion, den man bei den DLBCL fand, wurde eine Rolle bei der Transformation in die hochmalignen Lymphome zugeschrieben [49].

Ebenso soll die Deletion des Gens p16, u.a. auch als INK4A bekannt, bei der Transformation in die DLBCL von Bedeutung sein. Dieses Gen ist auf dem Chromosom 9p21 lokalisiert und übt normalerweise als Tumorsuppressorgen eine Funktion in der Kontrolle des Zellwachstums aus [50].

Veränderungen auf beiden Armen des Chromosoms 1 sind geläufige zytogenetische Ereignisse. Zu den häufigsten chromosomalen Veränderungen bei DLBCL gehören Aberrationen der Chromosomenbande 1p36. Dieser Bereich enthält viele Kandidatengene, deren Funktion durch Deletionen verloren gehen kann. Auf 1p36 wurden u.a. die Gene PITSLRE, PAX7, AML2 und TP73 lokalisiert [51,52,53,54].

Das 1997 von Kaghad et al. identifizierte Gen TP73, auch p73 genannt, wird aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten der Genfamilie um p53 zugeordnet. p73 ist in der distal gelegenen Chromosomenbande 1p36.3 lokalisiert, in der man beim

Neuroblastom und anderen Tumoren häufig Deletionen findet [55]. Es wird deshalb vermutet, dass es sich bei TP73 um ein Tumorsuppressorgen handelt. Welche exakte Rolle TP73 in der Tumorigenese einnimmt und ob einige Isoformen nicht sogar onkogene Funktion haben, muss noch geklärt werden [56].

Le Baccon et al. beschreiben auch die Chromosomenbande 1q12 als eine für die Pathogenese von B-Zell-Lymphomen und Plasmozytomen wichtige Region [57]. In ihr liegen u.a. die Loci der Gene SLAM und D1Z1.

Des Weiteren findet man bei den meisten Lymphomen mit struktureller Aberration des langen Arms des Chromosoms 1 eine Amplifikation der Region 1q21-23. Vor allem bei den DLBCL ist eine Veränderung dieser Bande mit einer signifikant verkürzten Überlebenszeit assoziiert [58]. Bisher wurden in diesem Chromosomenbereich z.B. die Gene IRTA1/2, BCL9, MUC1 und FCGR2B identifiziert [59,60,61,62].

1.5 Mikrosatellitenanalyse

Bei Mikrosatelliten handelt es sich um repetitive Sequenzen der DNA, die aus ein bis vier Nukleotiden bestehen können, meist kommen jedoch Dinukleotide vor. Die Länge der Mikrosatelliten unterscheidet sich von Individuum zu Individuum und wird stabil vererbt. Mikrosatelliten sind über das gesamte eukaryote Genom unregelmäßig verteilt. Die Tatsache, dass sie auch in bestimmten Genloci vorkommen, macht sie für die Analyse dieser Abschnitte so interessant.

Mit Verwendung der Mikrosatellitenanalyse lassen sich relativ einfach Bereiche genomischer Instabilität finden. Diese treten entweder als allelische Imbalancen, wobei Amplifikationen bzw. „loss of heterozygosity“ bekannt sind, oder als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) in Erscheinung. Letztere äußert sich in einer Veränderung der Anzahl der Nukleotidrepeats der Mikrosatelliten im Tumorgewebe gegenüber dem normalen Gewebe. Die früher auch „replication error phenotype“ oder „RER+“ genannte MSI wurde 1993 zuerst bei den hereditären kolorektalen Karzinomen (Lynch-Syndrom) beschrieben und mit einem Defekt von DNA-Mismatch-Repair-Genen assoziiert [63].

1.6 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels einer verhältnismäßig großen Anzahl an Patienten und Mikrosatellitenmarkern Bereiche genomischer Instabilität bei gastralen DLBCL auf Chromosom 1 zu charakterisieren. Damit soll ein Beitrag geleistet werden, in Zukunft nähere Aussagen bezüglich Tumorentstehung, Progression, klinischem Verlauf und Prognose machen zu können.

Eine für DLBCL charakteristische primäre Aberration, wie z.B. die Translokation t(11;18) bei den MZBCL, wurde bisher nicht gefunden. Dennoch sind bei DLBCL viele sekundäre Aberrationen bekannt, wobei das Chromosom 1 eine große Rolle spielt. Die in der vorliegenden Untersuchung angewandte Mikrosatellitenanalyse ermöglicht es, diese genomischen Aberrationen aufzudecken.

Weil Mikrosatelliten u.a. an wichtigen Genorten lokalisiert sind, kann man mit Hilfe von Markern Informationen bezüglich des Genstatus erhalten. Besonders bei der Analyse von Tumorerkrankungen bedeutet diese Methode einen großen Fortschritt.

In unserer Arbeit wurde ausschließlich das Chromosom 1 auf mögliche Veränderungen bei DLBCL untersucht. Bei der Auswahl der Mikrosatellitenmarker beachteten wir einerseits, dass sie die gesamte Länge des Chromosoms 1 grob abdeckten. Andererseits war es an bestimmten Stellen wichtig, eng benachbarte Mikrosatellitenmarker zu verwenden, um mögliche oder bereits identifizierte Genorte von Onko- bzw. Tumorsuppressorgenen einer genaueren Analyse zuzuführen.

Die beim Neuroblastom und vielen anderen Tumoren durch Deletionen veränderte Chromosomenbande 1p36.3 enthält das Gen TP73. In der vorliegenden Untersuchung wurde ein Schwerpunkt auf diesen Bereich gelegt, um eine mögliche Rolle der TP73-Mutation bei der Lymphomagenese bzw. Progression der DLBCL des Magens zu beleuchten. Des Weiteren wurde v.a. den Bereichen 1q21-23, 1q32.3-41 und 1p22 Beachtung geschenkt. In den genannten chromosomalen Regionen interessierten uns die als Deletionen bzw. Amplifikationen in Erscheinung tretenden allelischen Imbalancen.

Eine weitere durch die Mikrosatellitenanalyse zugängliche Veränderung der genomischen DNA ist die Mikrosatelliteninstabilität. Durch unsere Ergebnisse konnten Aussagen bezüglich des Stellenwerts dieser Aberration bei DLBCL des Magens gemacht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

Die Untersuchung wurde an Schnittpräparaten von 30 Patienten mit diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) des Magens durchgeführt. Das Material entstammte dem Zentrum für Lymphknotenpathologie des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg. Als Referenzgewebe stand hauptsächlich tumorfreies Material aus Lymphknoten, aber z.B. auch aus Leber- und Darmgewebe zur Verfügung.

Zur Durchführung der Versuche dienten ausschließlich Frischmaterial-Präparate. Die Tumoren wurden gemäß den Kriterien der WHO-Klassifikation definiert. Entsprechend der Klassifikation nach Musshoff wurde die Stadieneinteilung vorgenommen.

Über zwei Patienten liegen keine Angaben zu Alter, Geschlecht und Tumorstadium vor. Bei den übrigen 28 Patienten handelte es sich um 20 Männer und 8 Frauen. Damit waren 71,4% der Patienten männlich. Der Altersmedian betrug 64,5 Jahre mit einem 68%-Konfidenzintervall von 36,6 bis 73,1 Jahren. Von diesen 28 Patienten befanden sich vier Patienten im Stadium EI1, 13 im Stadium EI2, neun im Stadium EII1 und jeweils ein Patient in Stadium EII2 und EIII.

Die verfügbaren Patientendaten können in Tabelle 1 eingesehen werden.

TABELLE 1: PATIENTENDATEN (GASTRALE DLBCL)

Patientennummer	Geschlecht	Alter (in Jahren)	Tumorstadium nach Ann-Arbor, mod. nach Musshoff
1	M	75	EII1
2	M	63	EII1
3	M	35	EI2
4	M	77	EII1
5	M	67	EII1
6	M	62	EII1
7	F	59	EI2
8	M	74	EI2
9	M	64	EI2
10	M	65	EII1
11	F	77	EII1
12	M	31	EI2
13	M	62	EI1
14	F	67	EIII
15	M	65	EI2
16	F	71	EI1
17	F	70	EII1
18	M	34	EI2
19	M	42	EII1
20	F	70	EI1
21	F	65	EI1
22	M	34	EI2
23	M	68	EI2
24	M	38	EI2
25	M	41	EI2
26	M	36	EI2
27	M	79	EII2
28	unbek.	unbek.	unbek.
29	F	49	EI2
30	unbek.	unbek.	unbek.

2.2 Untersuchung genetischer Aberrationen anhand fluoreszenzmarkierter Mikrosatellitenmarker

2.2.1 Mikrodissektion

Sowohl für Tumor- als auch für Kontrollgewebe wurden in jedem Fall je nach Größe des jeweiligen Gewebestückes Serien von zehn bis 20 ca. zehn µm dicken Schnitten hergestellt. Jeweils der erste und letzte dieser Schnitte wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, um das zu gewinnende Gewebe erkennen zu können. Die dazwischenliegenden Schnitte wurden nicht gefärbt. Mit Hilfe eines Mikroskops wurde aus den Schnitten, die nicht mit HE gefärbt worden waren, mit einer Rasierklinge ein Gewebeausschnitt mit hohem Tumoranteil bzw. mit dem tumorfreien Kontrollgewebe abgekratzt und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen [64].

2.2.2 DNA-Extraktion

Daraufhin wurden die Zellen zwölf Stunden bei 50°C mit 300 µl Digestionspuffer inkubiert:

- 100 mM NaCl
- 10 mM TrisCl (pH 8)
- 25 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (pH 8)
- 0,5% Sodiumdodecylsulfat (SDS)
- 0,45 mg Proteinase K (20 µl von 20 mg/ml-Verdünnung).

Nach erfolgter Inkubation wurde der Ansatz mit 600 µl Phenolchloroform (Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol – 25:24:1, TrisCl äquilibriert) versetzt, eine Minute vortexiert und fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde nur die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß übertragen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Dem jetzt vorliegenden Überstand wurden 500 µl Chloroform zugegeben, wieder eine Minute vortexiert und fünf Minuten zentrifugiert. Diese Prozedur wiederholte man noch

einmal. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 10% des erhaltenen Volumens von 3M Natriumazetat, anschließend kurzes Vortexieren und dann die Zugabe von 1 ml 100%igem Ethanol (-20°C-kalt). Nach wiederholtem Vortexieren wurden die Proben bei -20°C bis -70°C für mindestens zwei Stunden, besser über Nacht inkubiert. Diesem Arbeitsschritt folgte fünfminütiges Zentrifugieren und Entfernung des entstandenen Überstands. Dann gab man 1 ml -20°C-kalten, 70%igen Ethanol dazu, schwenkte das Gefäß einige Male, zentrifugierte wiederum fünf Minuten und verwarf den Überstand. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Jetzt folgten 30 Minuten Inkubation bei 37°C mit offenem Gefäß, um noch vorhandene Ethanol-Reste entweichen zu lassen. Die gefällte DNA wurde mit 200 µl sterilem Wasser versetzt, kurz vortexiert und ihre Konzentration anschließend spektrometrisch bei 260 nm bestimmt (Beckmann Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA). Bei einer beispielsweise ermittelten Konzentration von 0,75 µg/µl wurde nun eine Stammlösung von 400 µl aus ca. 5 µl DNA und 395 µl sterilem Wasser hergestellt.

2.2.3 Kontrolle der Klonalität

Mittels PCR nach den Protokollen von Trainor et al. wurde die gewonnene DNA einer Analyse der CDR-3-Region des Immunglobulins für schwere Ketten unterzogen, um jeweils den Tumoranteil in der extrahierten DNA des Tumors und die Tumorfreiheit im Kontrollgewebe festzustellen [65]. Monoklonalität wurde bei Vorhandensein einer singulären, dominanten Bande registriert. Zeigte das Elektropherogramm mehrere kleine Banden entsprechend der Gauß'schen Normalverteilung, ging man von Polyklonalität der Probe aus. So wurde jeweils die Monoklonalität der Tumor-DNA und die Polyklonalität und damit das Nichtvorhandensein von Tumorzellen im Kontrollgewebe bestätigt [64].

2.2.4 Mikrosatelliten-PCR

2.2.4.1 Auswahl der Mikrosatellitenmarker

Zuerst erfolgte ein Screening mit Markern der Firma Applied Biosystems ABI (Weiterstadt, Deutschland), dann wurden einige Regionen mit Primern der Firma MWG-Biotech (München, Deutschland) näher bestimmt. Die Primersequenzen für die Amplifikation entnahm man der „Genome Database“ (GDB, <http://gdbwww.gdb.org>). Von den Primerpaaren war jeweils einer am 5'-Ende mit einem der fluoreszierenden Phosphoramide FAM (blau), NED (gelb) oder HEX (grün) markiert.

In Tabelle 2 wird eine Übersicht über die Mikrosatellitenmarker einschließlich jeweils verwendeter Menge und Annealing-Temperatur gegeben. Die letzten drei Marker wurden als „Standardmarker“ eingesetzt, um in bestimmten Fällen zwischen Amplifikation und LOH unterscheiden zu können. Locus und chromosomale Position der Marker wurden der Datenbank www.ensembl.org entnommen. Wenn der jeweilige Marker dort nicht vermerkt war, wurde die Datenbank www.genome.ucsc.edu (fett gedruckt) zu Rate gezogen.

TABELLE 2: 42 MIKROSATELLITENMARKER AUF CHROMOSOM 1

MARKER	Locus	Chromosomale Position (in Mbp)	Markierung	Produktgröße (in bp)	Menge (in pmol)	Annealing-Temperatur (in °C)
D1S468	1p36.32	3,2	Hex	193-213	30	55
D1S450	1p36.22	9,2	Fam	316-340	30	55
D1S2667	1p36.22	11,1	Hex	128-156	30	55
D1S2826	1p36.13	17,5	Fam	123-?	30	58
D1S2644	1p36.13	18,1	Fam	227-?	30	58
D1S2647	1p36.13	19,0	Hex	187-?	50	58
D1S199	1p36.13	19,1	Fam	99-125	15	61
D1S234	1p36.11	24,1	Fam	268-288	9	61
D1S255	1p34.3	37,1	Hex	91-111	7,5	55
D1S2797	1p33	46,3	Fam	102-138	30	55
D1S2890	1p32.2	57,2	Hex	214-238	30	55
D1S230	1p31.3	62,0	Hex	154-166	30	55
D1S2841	1p31.1	78,9	Hex	234-254	30	55
D1S207	1p31.1	81,8	Fam	149-179	30	55
D1S2766	1p22.3	85,4	Hex	183-195	50	62
D1S2865	1p22.3	87,7	Hex	221-233	50	56
D1S2868	1p22.1	92,7	Fam	210-224	30	55
D1S206	1p21.2	101,0	Ned	208-226	21	55
D1S2726	1p13.3	110,3	Ned	284-296	24	55
D1S252	1p13.1	116,7	Hex	95-115	24	55
D1S498	1q21.3	148,1	Ned	190-212	16,5	55
D1S2343	1q21.3	148,3	Ned	242-268	40	58
D1S484	1q23.3	157,6	Hex	276-290	30	55
D1S2878	1q23.3	162,1	Ned	152-178	30	55
D1S196	1q24.2	164,3	Hex	322-338	30	55
D1S218	1q25.1	171,1	Ned	271-295	36	55
D1S2883	1q25.2	176,6	Ned	179-199	40	58
D1S238	1q31.1	184,7	Fam	296-330	15	55
D1S413	1q31.3	195,1	Fam	254-270	15	55
D1S2668	1q32.1	200,4	Ned	233-247	50	58
D1S249	1q32.1	202,1	Fam	163-193	30	55
D1S245	1q32.2	206,3	Ned	235-253	50	56
D1S425	1q32.3	208,7	Ned	336-360	30	55
D1S237	1q41	211,4	Fam	172-192	15	60
D1S2827	1q41	212,8	Hex	142-152	50	60
D1S399	1q41	214,1	Ned	179-?	15	62
D1S2894	1q41	218,9	Hex	157-173	50	56
D1S213	keine Angabe	keine Angabe	Ned	107-133	5,4	55
D1S2800	1q42.2	230,8	Fam	210-224	30	55
D1S2785	1q43	237,2	Hex	173-187	30	55
D1S2842	1q43	239,1	Ned	338-358	30	55
D1S2836	1q44	243,0	Ned	246-260	18	55
Standardmarker						
D1S114	15q24.3	74,4	Rox	177-187	30	55-62
CHLC	3p22	63,8	Rox	102-114	10	55-62
FGA	4q31.3	156,1	Rox	256-284	50	55-62

2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifizierung der Mikrosatelliten bediente man sich der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der angegebenen Primer. Vor Durchführung der PCR mit Patienten-DNA wurden zuerst mittels der Zelllinien Raji und Jurkat die jeweils optimale Primermenge, Annealing-Temperatur und für die Multiplex-PCR Primerkombinationen bestimmt. Die überwiegend angewandte Multiplex-PCR, bei der zwei oder mehr Primerpaare in einem PCR-Gefäß genutzt wurden, erlaubte eine Co-Amplifikation mehrerer Produkte. Diese hatte gegenüber der Uniplex-PCR den Vorteil, dass die einen Mikrosatelliten flankierenden Produkte als Standardmarker genutzt werden konnten. Die Ansätze wurden jeweils für Tumor- und Kontrollgewebe getrennt pipettiert.

Der Mastermix für jeweils eine Reaktion setzte sich (bei einer Primermenge von z.B. 1,0 µl) zusammen aus:

- 2,0 µl 10x PCR-buffer II (100mM Tris HCL ph 8.3, 500 mM KCL)
- 2,5 µl dNTP (10mM)
- 3,6 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,12 µl AmpliTaqGold™ Polymerase (5 U/µl)
- 1,0 µl Primer (3` und 5`-Primer)
- 5,78 µl H₂O
- 5,0 µl DNA.

Die Menge des autoklavierten, destillierten Wassers wurde dabei nach individueller Primermenge (siehe Tabelle 2) auf eine Mastermix-Gesamtmenge von 20 µl angepasst.

Die Amplifizierung der PCR-Proben wurde im „PE 2400 Thermozykler“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

Die Polymerasekettenreaktion lief bei der für das Primerpaar jeweils idealen Annealing-Temperatur nach folgendem Schema ab:

Hotstart	13 min. bei 95°C
10 Zyklen	30 sec. bei 95°C (Denaturierung)
	30-59 sec. bei jeweiliger Annealing-Temperatur
	59 sec. bei 72°C (Extension)
20 Zyklen	30 sec. bei 91°C (Denaturierung)
	30-59 sec. bei jeweiliger Annealing-Temperatur
	59 sec. bei 72°C (Extension)
Elongation	30 min. bei 72°C, dann Abkühlen auf 4°C

2.2.5 Vorbereitung der Gelelektrophorese

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden daraufhin durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese im 377A-DNA-Sequenzier (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) aufgetrennt.

Für die Herstellung eines 6%igen Polyacrylamid-Gels wurden folgende Substanzen verwendet:

-5,625 ml Acrylamidlösung (40% - 1:29)

-18 g Harnstoff

-20 ml Aqua dest.

-10 ml Laufpuffer 5xTBE (540 mg Tris, 275 mg Borat, 41,4 mg EDTA und zu
10 ml autoklaviertes, destilliertes Wasser)

Der Ansatz wurde mit dem Magnetrührer gemischt, bis sich der Harnstoff aufgelöst hatte. Anschließend filtrierte man die Lösung mit der Vakuumpumpe.

Direkt vor dem Gießen des Gels wurden zugesetzt:

- 30 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- 250 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS).

Zur noch besseren Auftrennung der Produkte bediente man sich eines formamidhaltigen 5%igen Polyacrylamidgels:

- 5 ml Acrylamidlösung (40% - 1:29)
- 13,4 g Harnstoff
- 4,5 ml Aqua dest.
- 8 ml Laufpuffer 5xTBE
- 12,8 ml Formamid
- 1 g Amberlite.

Nach Durchmischung und Filtration gab man

- 30 µl TEMED
 - 250 µl APS
- dazu.

Für einen Gellauf mit 64 Bahnen wurden angesetzt:

- 115 µl Formamid
- 10 µl Standard „ROX 350“
- 20 µl Blue Dextran Puffer.

Von dieser Mischung wurden nun jeweils 2 µl auf die Wells einer Mikrotiterplatte verteilt und dann jeweils 1 µl des zu untersuchenden Amplifikats dazu gegeben.

Vor der Beladung des Gels mussten die Proben noch fünf Minuten im Heizblock bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eiswasser abgekühlt werden.

Nun konnten jeweils 1,1 µl des Proben-Formamid-Gemisches in die Taschen des mittlerweile fertiggestellten Gels gegeben werden.

2.2.6 Elektrophorese und anschließende Auswertung

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode, DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Das Migrationsverhalten durch das Gel ist rein von der Nukleotidzahl abhängig.

Die Gelelektrophorese im ABI PRISM 377A-DNA-Sequenzer und anschließende Sammlung und Auswertung der Daten wurde folgendermaßen durchgeführt:

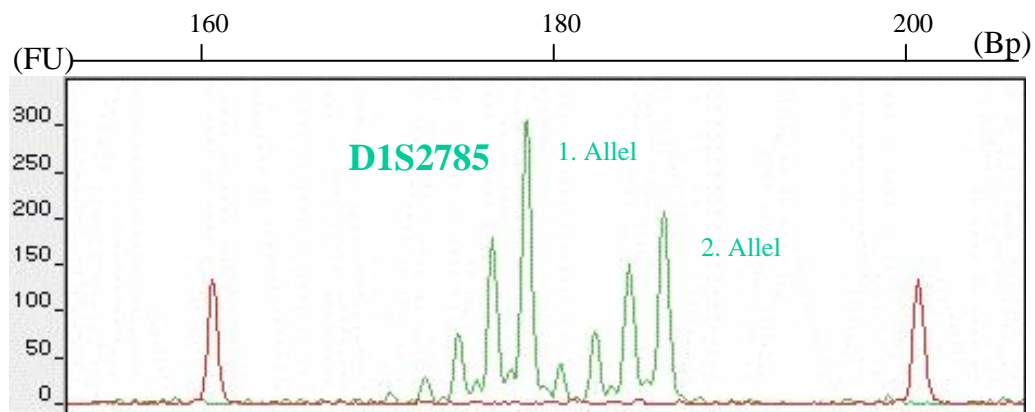
Die geladenen Proben wanderten bei 51°C, 3000 Volt, 60 mA und 200 Watt durch das Gel. Im unteren Teil passierten die Fragmente einen Bereich, in dem ein Laserstrahl kontinuierlich das Gel absannte. Durch den Laser wurden die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte dazu angeregt, Licht zu emittieren. Dieses wurde entsprechend der farbenspezifischen Wellenlänge detektiert. Die gewonnenen Rohdaten wurden mittels einer speziellen Software gesammelt und gespeichert. Ein Gellauf dauerte ungefähr 2,5 Stunden.

Zur weiteren Analyse wurden die Programme ABI GeneScan® und ABI Genotyper® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet. Die ermittelten Elektropherogramme und die durch die Software errechneten Quotienten aus Kontroll- und Tumorallel dienten nun zur Auswertung.

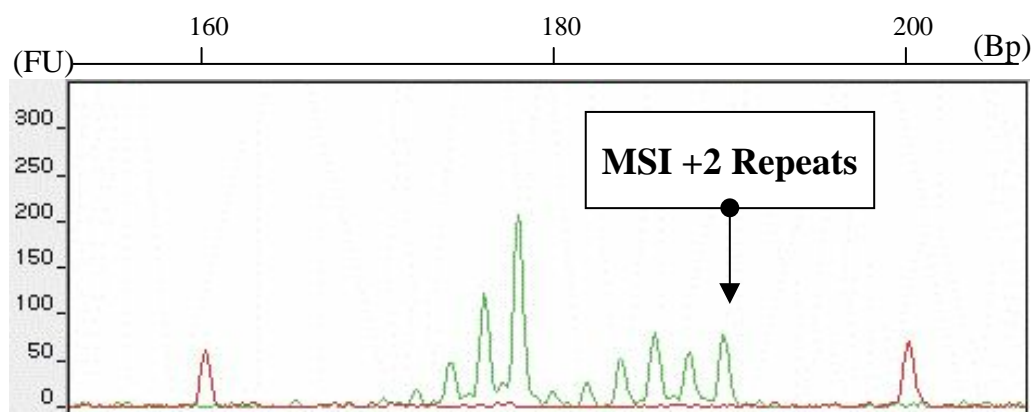
Für die Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität wurden alle ermittelten Genotypen, also Heterozygote und Homozygote, als informativ betrachtet. Man markierte die Anzahl der fehlenden bzw. hinzugewonnenen Repeats mit einem „Minus“ bzw. mit einem „Plus“.

Entsprechend einer Arbeit von Boland et al. über MSI bei kolorektalen Karzinomen teilt man die Mikrosatelliteninstabilität in MSI-H, MSI-L und MSS ein. Dabei spricht man von MSI-H (high frequency MSI) bei einem Gewebe, das bei mindestens 40% der Marker mikrosatelliteninstabil ist. Wenn keiner der Marker Mikrosatelliteninstabilität aufweist, bezeichnet man diesen Zustand als MSS (Mikrosatellitenstabilität). Alle Fälle, die dazwischen liegen, werden als MSI-L (low frequency MSI) bezeichnet [66].

In die Berechnung der Deletionen und Amplifikationen konnten die homozygoten und MSI-positiven Fälle nicht einfließen. Man verglich bei allen Heterozygoten beide Allele jeweils des Normal- und des Tumorgewebes miteinander. Bei Abweichungen ihres Quotienten von mindestens 40% wurde von einer allelischen Imbalance ausgegangen. Dabei diente die Multiplex-PCR bzw. der Einsatz von Kontrollmarkern dazu, eine Amplifikation von einer Deletion unterscheiden zu können. Ein Quotient unter 60% signalisierte eine Deletion, bei einem Quotienten über 140% wurde eine Amplifikation registriert.



Kontrollgewebe Patient Nr.1



Tumorgewebe Patient Nr.1

ABB. 1: MIKROSATELLITENINSTABILITÄT (MSI) MIT 2 ZUSÄTZLICHEN REPEATS BEI PATIENT NR. 1 IM BEREICH DES MARKERS D1S2785

3. Ergebnisse

Aus den bearbeiteten Proben mit 42 Mikrosatellitenmarkern und 30 Patientenproben von gastralen DLBCL erhielt man 1251 Genotypen. Neun Genotypen ließen sich trotz mehrfacher Wiederholung nicht amplifizieren.

Bei den vorliegenden 1251 Genotypen ergaben sich 148 (11,83%) genomische Aberrationen. Zur Analyse der Deletionen (LOH) und Amplifikationen zog man nur 928 Genotypen heran, weil hierzu die Homozygoten und Mikrosatelliteninstabilitäten herausfielen. Von den 928 Genotypen zeigten insgesamt 130 (14,0%) LOH oder eine Amplifikation. Die große Mehrheit der allelischen Imbalancen waren Deletionen im Vergleich zu Amplifikationen, die nur vereinzelt gefunden wurden (93% v. 7%). Für die Analyse auf Mikrosatelliteninstabilität wurden alle 1251 Genotypen betrachtet. Davon zeigten nur 18 (1,44%) MSI. In Abb. 2 wird ein Überblick über alle Genotypen gegeben.

Patienten-Nummer	Marker		Locus
	Mbp		
8	D1S468	3,2	1p36.32
	D1S450	9,2	1p36.22
	D1S2667	11,1	1p36.22
	D1S2826	17,5	1p36.13
	D1S2644	18,1	1p36.13
	D1S2647	19,0	1p36.13
	D1S199	19,1	1p36.13
	D1S234	24,1	1p36.11
	D1S255	37,1	1p34.3
	D1S2797	46,3	1p33
	D1S2890	57,2	1p32.2
	D1S230	62,0	1p31.3
	D1S2841	78,9	1p31.1
	D1S207	81,8	1p31.1
	D1S2766	85,4	1p22.3
	D1S2865	87,7	1p22.3
	D1S2868	92,7	1p22.1
	D1S206	101,0	1p21.2
	D1S2726	110,3	1p13.3
	D1S252	116,7	1p13.1
Zentromer			
	D1S498	148,1	1q21.3
	D1S2343	148,3	1q21.3
	D1S484	157,6	1q23.3
	D1S2878	162,1	1q23.3
	D1S196	164,3	1q24.2
	D1S218	171,1	1q25.1
	D1S2883	176,6	1q25.2
	D1S238	184,7	1q31.1
	D1S413	195,1	1q31.3
	D1S2668	200,4	1q32.1
	D1S249	202,1	1q32.1
	D1S245	206,3	1q32.2
	D1S425	208,7	1q32.3
	D1S237	211,4	1q41
	D1S2827	212,8	1q41
	D1S399	214,1	1q41
	D1S2894	218,9	1q41
	D1S213	?	?
	D1S2800	230,8	1q42.2
	D1S2785	237,2	1q43
	D1S2842	239,1	1q43
	D1S2836	243,0	1q44

ABB. 2: ÜBERSICHT ÜBER ALLE GENOTYPEN

Legende der Mastertabelle:

Schwarze Balken: heterozygot

Graue Balken: homozygot

Rote Balken: LOH

Grüne Balken: Amplifikation

Gelbe Balken: Mikrosatelliteninstabilität (einschl. verlorene oder gewonnene Repeats)

Weißer Balken: kein Amplifikat erhalten

3.1 Chromosom 1 weist bei gastralen DLBCL multiple genetische Aberrationen auf

Die gefundenen genetischen Aberrationen erstreckten sich gleichmäßig über beide Chromosomenarme. Im Folgenden werden besonders interessante Bereiche näher beschrieben.

Die mit Abstand häufigste Veränderung konnte im Bereich des Markers D1S468 festgestellt werden. Hier fand man ausschließlich Deletionen bei 8 (34,8%) der hierzu informativen Fälle. Der Mikrosatellitenmarker D1S468 ist im Chromosomenbereich 1p36.32 bei 3,2 Mbp angesiedelt, wo sich auch der Locus für das Gen TP73 befindet [54].

Ein weiterer stark veränderter Bereich ist die Chromosomenregion zwischen 1q32.3 und 1q41, die mittels der Marker D1S425, D1S237, D1S2827, D1S399 und D1S2894 analysiert wurde und ungefähr 10 Mbp groß ist. In dieser Chromosomenbande wird u.a. der Locus für ein Tumorsuppressorgen vermutet, das möglicherweise an der Pathogenese der Medulloblastome beteiligt ist [67]. Der Abschnitt zeigt alle verschiedenen Aberrationen, die in dieser Arbeit untersucht wurden; am häufigsten konnten Deletionen nachgewiesen werden. Bei sechs (20%) Patienten fand sich LOH, ein (3,3%) Patient wies eine Amplifikation auf und fünf (16,7%) Patienten zeigten eine Mikrosatelliteninstabilität. Die MSI in diesem Bereich trat dabei bei vier der fünf Mikrosatellitenmarker auf. D1S2827, D1S399 und D1S2894 waren in jeweils einem Fall instabil, D1S237 wies bei zwei Patienten MSI auf.

Neben dem als Hotspot bezeichneten Chromosomenabschnitt bei D1S468 gab es weitere Veränderungen auf 1p36. Es handelt sich hierbei um das zu D1S468 proximal

gelegene Stück des kurzen Arms des Chromosoms 1, das durch die Mikrosatellitenmarker D1S450 und D1S234 eingegrenzt wird und ca. 15 Mbp groß ist. Was allelische Imbalancen betrifft, konnten in diesem Bereich bei sieben (23,3%) Patienten Veränderungen gefunden werden. Dabei zeigten sechs Patienten LOH und zwei Patienten Amplifikation. Bei zwei Patienten konnte außerdem eine Mikrosatelliteninstabilität festgestellt werden. Patient Nr.21 wies Amplifikationen in den Markern D1S2826 und D1S2647 im Bereich des Locus 1p36.13 auf. Patient Nr.14 zeigte dagegen nur bei Marker D1S2647 eine Amplifikation. Die Deletionen erstreckten sich teilweise über die gesamte Bande, bei manchen Patienten jedoch nur über Teile. So fand man eine Deletion bei Marker D1S450 bei drei (10%) Patienten und bei Marker D1S2667 bei fünf (16,7%) Patienten. Beide Mikrosatellitenmarker liegen im Locus 1p36.22. Auf Chromosom 1p36.13 zeigte sich LOH im Bereich des Markers D1S2826 bei drei (10%) Patienten, bei Marker D1S2644 bei zwei (6,7%) Patienten, bei Marker D1S2647 bei zwei (6,7%) Patienten und bei Marker D1S199 bei vier (13,3%) Patienten. Der Marker D1S234 auf 1p36.11 erbrachte eine Deletion bei fünf (20%) der informativen Patienten. Bei Patient Nr.21 fand man in diesem Bereich vier Deletionen und zwei Amplifikationen.

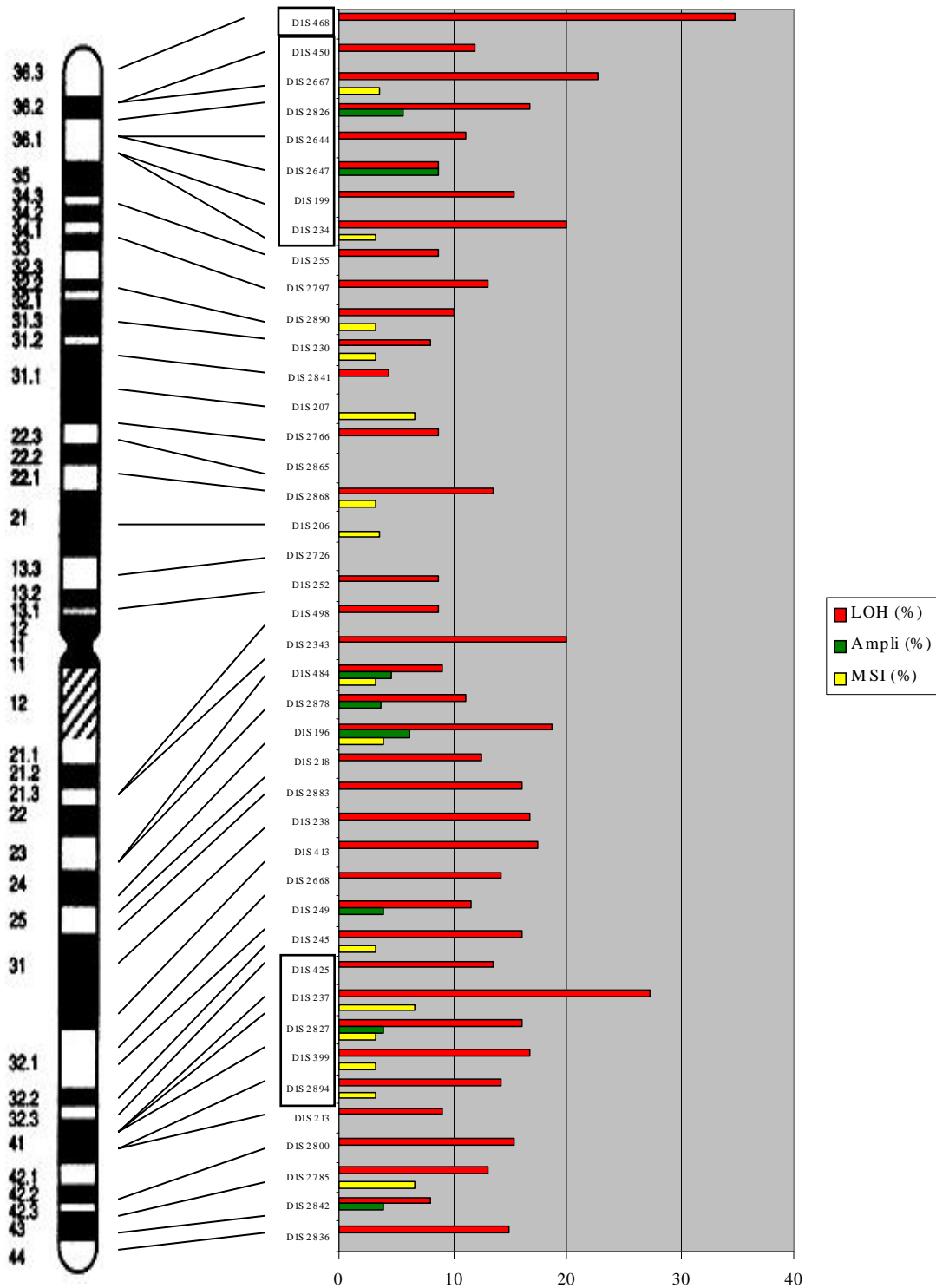
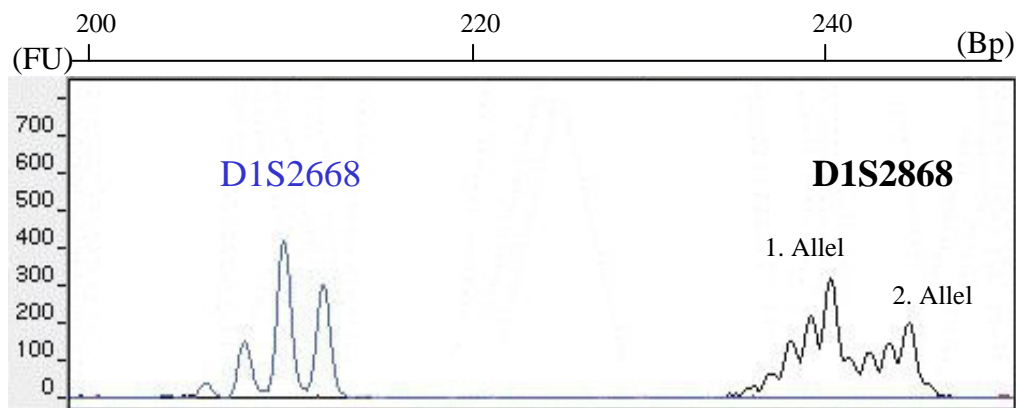


ABB. 3: GENOMISCHE ABERRATIONEN AUF CHROMOSOM 1 MIT ANGABEN DER PROZENTSÄTZE DER BETROFFENEN PATIENTEN BEI ALLEN MARKERN (HERVORGEHOBEN WURDEN DIE BEREICHE 1P36.32, 1P36.22-11 UND 1Q32.3-41)

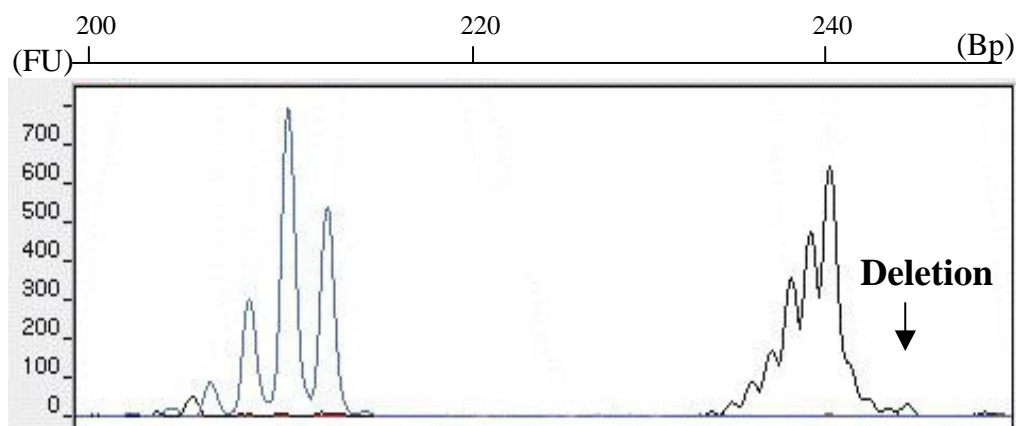
3.2 Fälle mit größeren Abschnitten an Deletionen

Patient Nr.8 zeigte eine Deletion nicht nur in der gesamten Chromosomenbande 1p36, sondern eine Monosomie, die sich über beide Arme des Chromosoms 1 erstreckte. Es ist hier also zu einem vollständigen Verlust eines Homologen gekommen.

Bei Patient Nr.27 trat loss of heterozygosity über die gesamte Länge des langen Arms von Chromosom 1 auf, während sich auf dem kurzen Arm keinerlei Veränderung zeigte. Der Bereich des langen Arms, der die Deletionen aufwies, erstreckte sich von Marker D1S498 bis Marker D1S2836 über eine Länge von ungefähr 95 Mbp. Ebenso fand sich eine, wenn auch teilweise, Monosomie des langen Arms von Chromosom 1 bei Patient Nr.30. Bei diesem Patienten wurden Deletionen im Chromosomenbereich zwischen 1q23.3 und 1q44 ermittelt, der von den Markern D1S484 und D1S2836 flankiert wird. Der in dieser Region liegende Mikrosatellitenmarker D1S2878 auf 1q23.3 war jedoch heterozygot. Zum teilweisen Verlust eines Allels des Chromosoms 1p ist es bei Patient Nr.29 gekommen. Hier fand man LOH im Bereich zwischen 1p36.32 und 1p22.3. Diese Chromosomenregion wird von den Markern D1S468 und D1S2766 begrenzt und ist ca. 82 Mbp groß.



Kontrollgewebe Patient Nr.30



Tumorgewebe Patient Nr.30

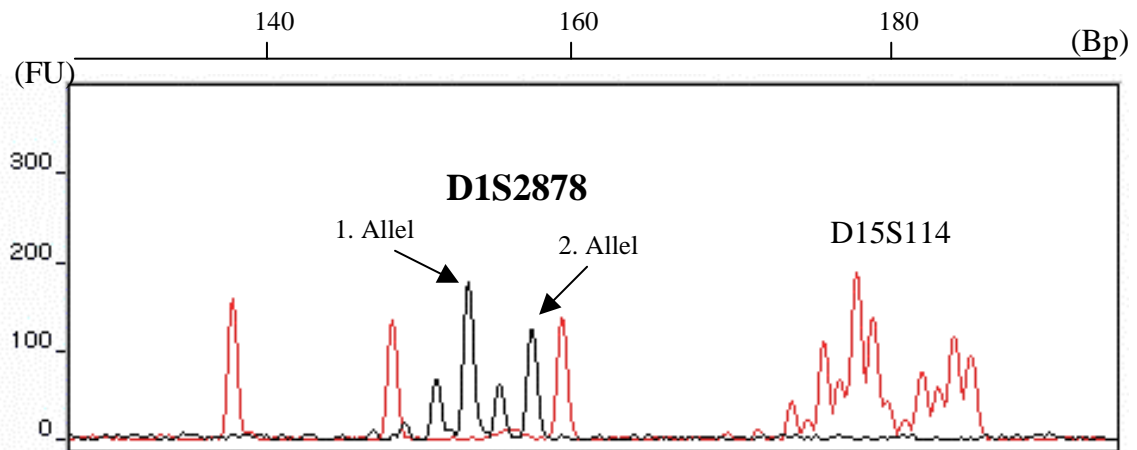
ABB. 4: DELETION (LOH) BEI PATIENT NR. 30 IM BEREICH DES MARKERS D1S2868, DANEBEN VERGLEICHSMARKER D1S2668

3.3 Amplifikationen treten nur selten auf

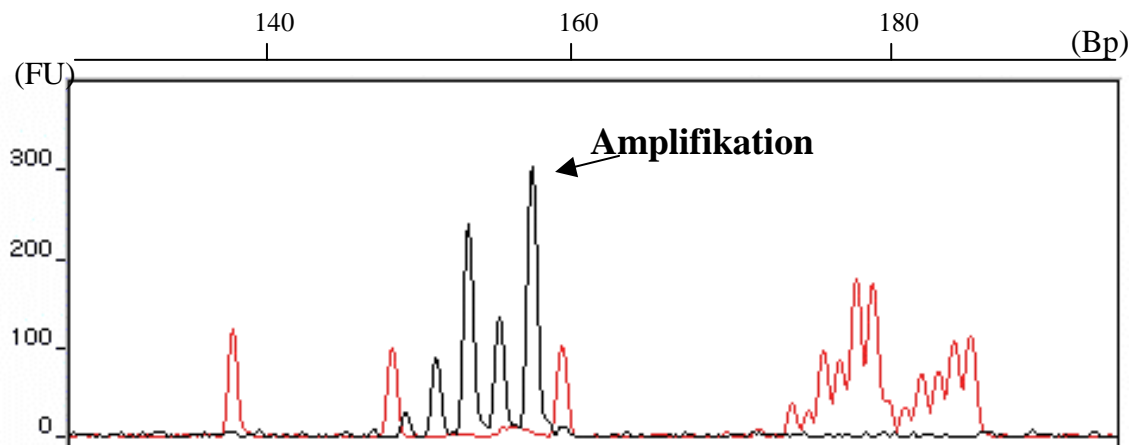
Bei Patient Nr.25 fand sich ein ca. 6,5 Mbp großer Bereich, der eine kontinuierliche Amplifikation aufwies. Diese Veränderung wurde durch die Marker D1S484, D1S2878 und D1S196 im Bereich der Bande 1q23.3 bis 1q24.2 ermittelt.

Weitere vereinzelte Amplifikationen wurden bei Patient Nr.2 im Marker D1S249, bei Patient Nr.9 im Marker D1S2842, bei Patient Nr.13 im Marker D1S2827 und bei Patient Nr.14 im Marker D1S2647 gefunden. Amplifikationen in benachbarten

Mikrosatellitenmarkern zeigte Patient Nr.21 in den Markern D1S2826 und D1S2647. Eine sogenannte high-level-Amplifikation konnte nicht nachgewiesen werden.



Kontrollgewebe Patient Nr.25



Tumorgewebe Patient Nr.25

ABB. 5: AMPLIFIKATION IM BEREICH DES MARKERS D1S2878 BEI PATIENT NR. 25, DANEBEN STANDARDMARKER D15S114

3.4 Auf 1q21-23 können nur wenig Aberrationen festgestellt werden

Die Chromosomenbande 1q21-23, die in einer zytogenetischen Studie von Offit et al. als der bei DLBCL am häufigsten aberrierte Bereich auf Chromosom 1 beschrieben wurde [58], war bei den von uns untersuchten gastralen DLBCL nicht stark aberriert. Die Analyse dieser ca. 14 Mbp großen chromosomalen Region wurde mit den Mikrosatellitenmarkern D1S498, D1S2343, D1S484 und D1S2878 durchgeführt. Deletionen konnten bei insgesamt fünf (16,7%) Patienten nachgewiesen werden, wobei Patient Nr.27 LOH in allen Markern aufwies. Bei Patient Nr.8 fand sich ebenfalls in allen Markern LOH, nur im Marker D1S484 war dieser Patient homozygot und daher nicht informativ. Die Patienten Nr.2, Nr.22 und Nr.30 zeigten in jeweils einem Marker Deletionen. Amplifikationen konnten lediglich bei Patient Nr.25 im Marker D1S484 und D1S2878 festgestellt werden. Patient Nr.2 war im Marker D1S484 mikrosatelliteninstabil.

3.5 Die Chromosomenbande 1p22, Locus für BCL10, ist kaum verändert

In der Chromosomenbande 1p22, die den Locus für das Tumorsuppressorgen BCL10 beherbergt und in die Translokation $t(1;14)(p22;q32)$ involviert ist, war kein erhöhtes Auftreten von Veränderungen zu beobachten. Dieser Abschnitt, der ca. 7 Mbp umfasst, wurde anhand der Mikrosatellitenmarker D1S2766, D1S2865 und D1S2868 untersucht. Es konnte lediglich bei vier (13,3%) Patienten LOH und bei einem (3,3%) Patienten Mikrosatelliteninstabilität festgestellt werden. Die Patienten Nr.15, Nr.17 und Nr.29 zeigten dabei jeweils nur in einem Marker eine Deletion, bei Patient Nr.8 fand man LOH in zwei Mikrosatellitenmarkern. Der Mikrosatellitenmarker D1S2865 wies bei keinem der 30 Patienten eine Aberration auf. 25 (83,3%) Patienten zeigten keinerlei Veränderungen in diesem Bereich des kurzen Arms von Chromosom 1.

3.6 Mikrosatelliteninstabilität

In der vorliegenden Untersuchung trat Mikrosatelliteninstabilität in 18 Fällen auf, das sind 1,44% aller Genotypen. Bei sieben Patienten zeigte sich MSI jeweils in einem Marker. Patient Nr.4 war in Marker D1S2667, D1S207 und D1S245 mikrosatelliteninstabil. Bei den Patienten Nr.11, Nr.14, Nr.15 und Nr.16 wurde MSI jeweils zweimal gefunden. Somit handelt es sich bei allen MSI-Fällen um MSI-L, denn keine der Proben kann in mindestens 40% der Marker MSI aufweisen.

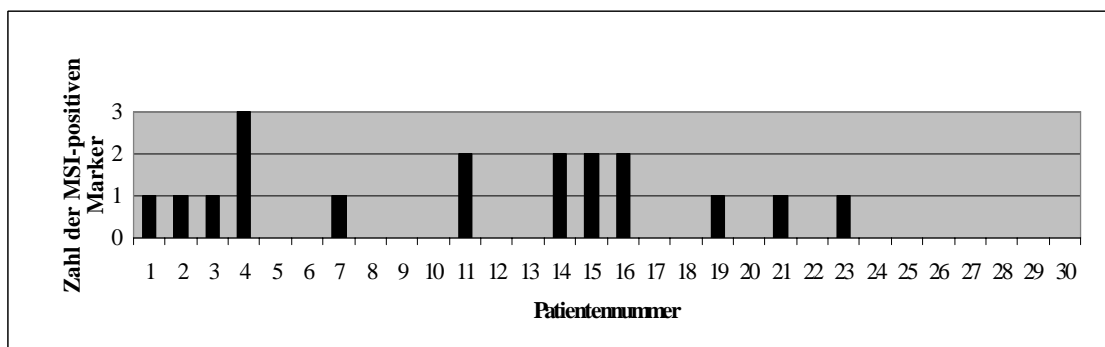


ABB. 6: ZAHL DER MSI-POSITIVEN MARKER PRO PATIENT

Insgesamt zeigten also 12 (40%) Patienten MSI. Als mikrosatellitenstabil wurden die übrigen 18 (60%) Patienten bezeichnet, bei denen man in keinem Marker MSI finden konnte.

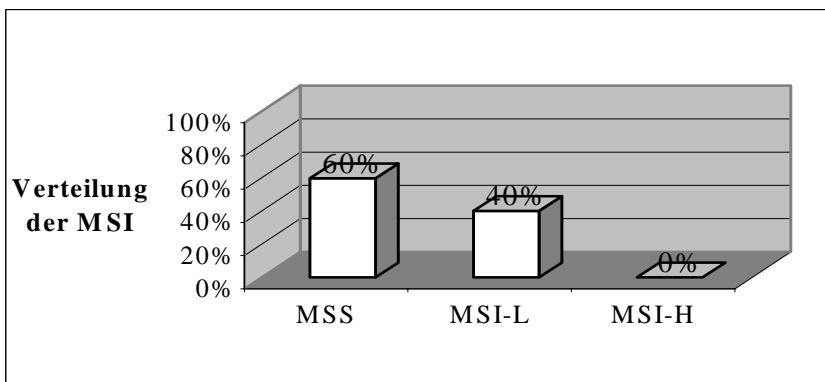


ABB. 7: VERTEILUNG DER MSI (IN MSS, MSI-L UND MSI-H)

In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle (83,3%) wurde eine nur in einem Repeat veränderte Allellänge, eine sogenannte Typ II-Mutation, festgestellt. Darunter fand man 20% verkürzte und 80% verlängerte Allele. 16,7% der MSI-Fälle waren mit zwei hinzugewonnenen Allelen Typ I-Mutationen.

Bei Betrachtung der Mikrosatellitenmarker ergaben sich für Marker D1S207, D1S237 und D1S2785 bei jeweils zwei Patienten Instabilitäten. Die übrigen MSI-positiven Marker zeigten nur bei jeweils einem Patienten Mikrosatelliteninstabilität.

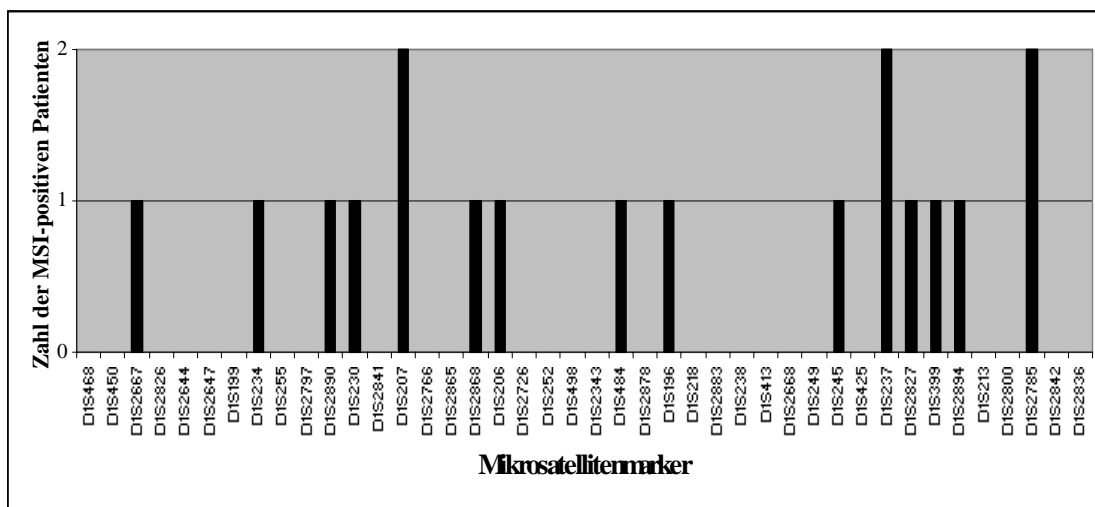


ABB. 8: ZAHL DER MSI-POSITIVEN PATIENTEN PRO MIKROSATELLITENMARKER

3.6.1 Die Inzidenz der MSI steigt mit dem Alter

Wenn man jeweils das Alter der Patienten berücksichtigt, fällt auf, dass die zwölf Patienten, deren Tumorgewebe MSI aufwies, einen mit 63,7 Jahren höheren Altersdurchschnitt als die übrigen Patienten hatten (54,75 Jahre). In die Berechnung der mikrosatellitenstabilen Patientengruppe konnten nur 16 Patienten einbezogen werden, weil von zwei Patienten keine Angaben über das Alter vorlagen.

Außerdem fanden sich desto mehr Mikrosatelliteninstabilitäten, je älter die Patienten waren. Diese Abhängigkeit war signifikant ($\tau = 0,3147$, $p = 0,019$ aus der Kendall'schen Korrelation).

Interessant ist, dass die Patienten dem Alter nach in zwei Gruppen zerfallen. Eine Gruppe mit jüngerem Patientengut, das keine Mikrosatelliteninstabilität oder MSI in nur einem Marker zeigte, und eine ältere Gruppe, die auch Mikrosatelliteninstabilität in zwei oder drei Markern aufwies.

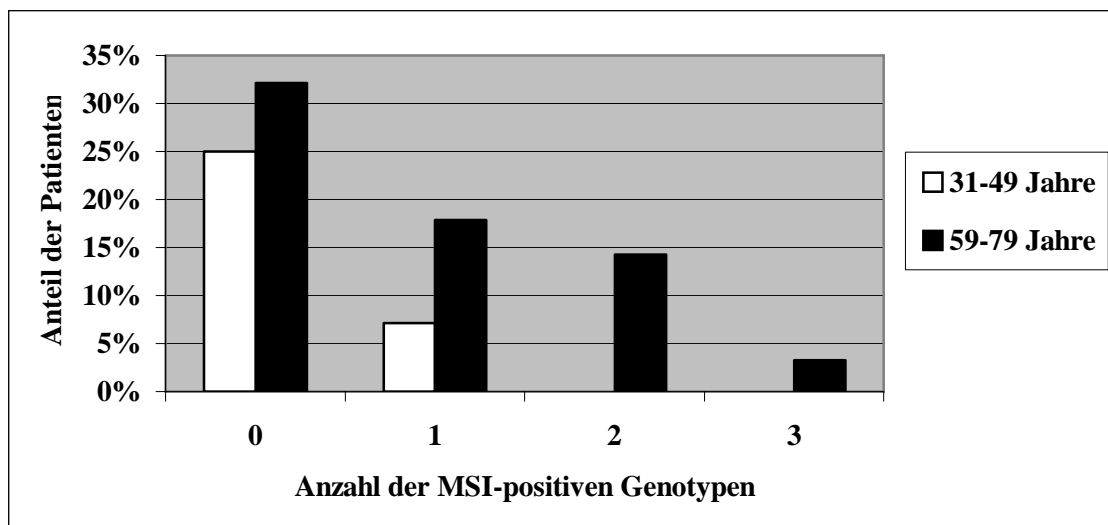


ABB. 9: ALTERSVERTEILUNG DER PATIENTEN (AUFGETEILT NACH ANZAHL DER MSI-POSITIVEN GENOTYPEN)

3.6.2 Die Inzidenz der MSI steigt nicht stadienabhängig

Nach Berechnung der steigenden MSI-Inzidenz mit dem Alter könnte man auch einen Zusammenhang zwischen Stadium und Zahl der Mikrosatelliteninstabilitäten vermuten. Betrachtet man zuerst den Zusammenhang zwischen Alter und Tumorstadium, so lassen sich zwar bei älteren Patienten höhere Stadien finden, jedoch ohne Signifikanz ($\tau = 0,2589$, $p = 0,053$ aus der Kendall'schen Korrelation). Außerdem ist dieser Zusammenhang von Alter und Tumorstadium nicht linear. Wenn man die Patienten wieder in Altersgruppen zwischen 31–49 Jahre und 59–79 Jahre einteilt, fällt auf, dass 87,5% der jüngeren Patienten das Tumorstadium EI2 zeigen. Nur ein Patient mit dem Stadium EIII gehört ebenfalls dieser Gruppe an. Alle anderen Patienten lassen sich der Gruppe von 59–79 Jahren zuordnen.

Fokussiert man nun die Korrelation zwischen Tumorstadium und Anzahl der Mikrosatelliteninstabilitäten, findet man wiederum keinen signifikanten Zusammenhang ($\tau = 0,1393$, $p = 0,30$ aus der Kendall'schen Korrelation).

4. Diskussion

Das Chromosom 1, welches mit einer Länge von über 246 Mbp [68] das größte menschliche Chromosom darstellt, ist bei einer Vielzahl von Erkrankungen auf verschiedenen Chromosomenabschnitten verändert. In dieser Studie wurde das Chromosom 1 bei gastralen DLBCL mittels der Mikrosatellitenanalyse auf allelische Imbalancen und Mikrosatelliteninstabilität untersucht. Dabei konnten in einigen Chromosomenbereichen beachtliche Veränderungen festgestellt werden.

4.1 Die Chromosomenbande 1p36.32 als Locus des Gens TP73 ist am stärksten von LOH betroffen

Von besonderer Bedeutung für diese Studie ist der Bereich 1p36.32, in dem sich der Locus für TP73 befindet [54]. Wir fanden bei mehr als einem Drittel (34,8%) der hierzu informativen Fälle Deletionen, die kleinste Deletion war 9,2 Mbp groß, im Bereich des Markers D1S468, der im Locus für TP73 bei 3,2 Mbp angesiedelt ist. Damit handelt es sich um die mit Abstand häufigste Aberration dieser Untersuchung.

Bei TP73, das eine große Homologie zu p53, dem Prototyp eines Tumorsuppressorgens, aufweist und der gleichen Genfamilie zugeordnet wird, soll es sich ebenfalls um ein Tumorsuppressorgen handeln. Es gibt hierzu jedoch noch keine abschließende Meinung, denn von TP73 existieren im Gegensatz zu p53, das ausschließlich apoptotische Funktion ausübt, durch alternatives Splicing neben verschiedenen pro- auch antiapoptotische Isoformen [56,69]. Während außerdem bei p53-Knock-out-Mäusen spontane Tumoren entstehen, neigen Mäuse mit mangelndem TP73 nicht zu Tumoren. Sie zeigen vielmehr gehäuft Defekte auf neurologischer Ebene, chronische Infekte und sensorische Störungen [70].

Deletionen in dem chromosomalen Bereich, wo sich der Locus für TP73 befindet, wurden in der Literatur bei einer Vielzahl von Tumoren, darunter z.B. beim Neuroblastom, beschrieben [55]. Es gibt allerdings eine Reihe von Untersuchern, die zwar bei einem hohen Prozentsatz der Patienten Deletionen in dieser Region fanden, TP73-Dysfunktion als Zielgen des Allelverlustes auf 1p36.32 jedoch als eher unwahrscheinlich erachteten [71,72]. Andere Studien können Aussagen zu Mutationen

des Gens bei bestimmten Erkrankungen machen. Bei Non-Hodgkin-Lymphomen wurde beschrieben, dass es durch LOH oder abnorme Methylierung zu einer Deaktivierung von TP73 gekommen ist. LOH im Bereich des TP73 wurde bei den in der genannten Studie untersuchten nodalen DLBCL zwar in keinem der Fälle gefunden, abnorme Methylierung trat aber bei 4/17 (24%) der DLBCL auf [73]. In einer anderen Studie fand man bei 33% der untersuchten ALL bzw. B-NHL eine nur sehr geringe Expression des TP73-Genes. Auch hier wurde Hypermethylierung als Ursache für den Verlust oder Deaktivierung des Genes angesehen [74]. Ob Beeinträchtigung des TP73 bei der Lymphomagenese der von uns untersuchten gastralen DLBCL tatsächlich eine Rolle spielt, kann nur durch weiterführende Analysen des Genes selbst abschließend geklärt werden.

Vorstellbar ist auch, dass andere in diesem Bereich lokalisierte Tumorsuppressorgene für die Entwicklung bzw. Progression der gastralen DLBCL von Bedeutung sind. Zu nennen ist hier das Tumor-Suppressor-Gen CDC2L1, auch bekannt als TP58 oder PITSLRE, das auf 1p36.3 sehr distal liegt. Es handelt sich um eine Proteinkinase, die bei der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. CDC2L1, zuerst bei den Neuroblastomen identifiziert, liegt in einem Bereich, der auch bei den NHL häufig in Translokationen involviert ist [51,75].

Die Chromosomenbande 1p36 wies außerhalb des Hotspots weitere Deletionen auf, die Hinweis auf vorhandene, in ihrer Funktion beeinträchtigte Tumorsuppressorgene geben könnten. Wir konnten in dem ca. 15 Mbp großen Bereich, der von den Markern D1S450 und D1S234 begrenzt wird, bei sechs (20,0%) Patienten LOH nachweisen. In dieser Region liegt der Locus für das Gen PAX7 (Hup1), das normalerweise in Nerven- und Skelettmuskelgewebe exprimiert wird. Bei Neuroblastomen wurde dieses Gen als in Translokationen involviert beschrieben [52]. Zentromerisch von PAX7 liegt das AML2-Gen, das ebenso von den Deletionen betroffen sein könnte. Eine verminderte Expression dieses Tumorsuppressorgens, das u.a. auch RUNX3 genannt wird, wurde mit Entstehung und Progression des Magen-Karzinoms assoziiert [53,76].

4.2 Auf 1q32.3-41 steht LOH im Vordergrund

Ein anderer Bereich, der häufig von Aberrationen betroffen war, ist die Bande 1q32.3-41, die eine Länge von ca. 10 Mbp umfasst. Dieser Bereich wurde mit den Markern D1S425 für 1q32.3 und D1S237, D1S2827, D1S399 und D1S2894 für 1q41 analysiert. In unserer Arbeit konnte bei insgesamt sechs (20%) Patienten mit gastralem DLBCL LOH nachgewiesen werden, davon in drei Fällen über die gesamte Bande. In früheren Studien wurde bei anderen Tumoren ebenfalls ein erhöhtes Auftreten von loss of heterozygosity in diesem Bereich gefunden, was zu der Vermutung veranlasst, dass hier Tumorsuppressorgene lokalisiert sein könnten. Kraus et al. fanden bei 36% der untersuchten Medulloblastome LOH auf Chromosom 1q, die kleinste gemeinsame Region war dabei der Bereich um den Mikrosatellitenmarker D1S237. Zentromerisch zu D1S237 liegt der Locus F13B, der wahrscheinlich ein Tumorsuppressorgen beinhaltet [67]. In der genannten Studie wurde D1S237 allerdings auf 1q31-q32.1 lokalisiert, während sich der Marker laut der von uns verwendeten ensembl-Datenbank auf Chromosom 1q41 befindet. In unserer Studie konnte in 27,3% der informativen Fälle LOH im Bereich des Markers D1S237 bei 211,4 Mbp nachgewiesen werden, womit es sich neben dem Hotspot um die am zweithäufigsten von Deletionen betroffene Region auf Chromosom 1 handelt. Ebenso konnte bei Urotheliomen im Bereich des Mikrosatellitenmarkers D1S237 ein gehäuftes Auftreten von LOH (46,2%) beobachtet werden. In einer Studie von Steiner et al. wurde der Marker allerdings auf 1q32.1 lokalisiert [77].

Die Bande 1q32.3-41 beherbergt eine Vielzahl von Genen. Hier sollen Kandidatengene diskutiert werden, die bereits bekannt sind. Im Bereich 1q41 wurde das Gen TGFB2 lokalisiert, welches einen hemmenden Effekt auf die Interleukin-2-abhängige T-Zell-Reifung haben soll. Beim Menschen wurde es auch Glioblastom-abhängiger T-Zell-Suppressor-Faktor genannt, da dieses Protein von Glioblastom-Zellen exprimiert wird. TGFB2 soll eine Rolle in der Beschleunigung des Tumorwachstums bzw. in der Hemmung der Immunkontrolle bei der Tumorentstehung spielen [78]. Es ist somit vorstellbar, dass dieses Gen in der Pathogenese der extranodalen DLBCL eine Rolle spielt.

Die Chromosomenbande 1q32.3, die mit dem Marker D1S425 nur bei drei (10%) Patienten LOH zeigte, enthält u.a. den Locus für das Gen ATF3, das Mitglied der Familie der Transkriptionsfaktoren ist. ATF3 wird bei Stress induziert und wurde selbst als Zielgen, reguliert durch das Tumorsuppressorgen p53, beschrieben [79]. Ein anderes in diesem Bereich lokalisiertes Gen ist TFDP1P, das als Genkomplex regulierenden Einfluss auf Gene haben soll, die eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen [80]. Ebenso könnte RBQ-3 von den Deletionen betroffen sein, ein Tumorsuppressorgen, das bei Inaktivierung u.a. beim Retinoblastom beobachtet wird [81].

4.3 Die Chromosomenbande 1q21-23 zeigt wenig Aberrationen

Die Chromosomenbande 1q21-23, die in einer zytogenetischen Untersuchung von Offit et al. als der bei DLBCL am häufigsten aberrierte Bereich auf Chromosom 1 beschrieben wurde [58], ist in unserer Studie nicht stark verändert. In der chromosomalen Region 1q21-23, die durch die Marker D1S498, D1S2343, D1S484 und D1S2878 repräsentiert wird, findet man lediglich bei fünf (16,7%) Patienten Deletionen. Eventuell von Bedeutung könnten die Gene IRTA1 und IRTA2 sein. Diese Gene sind Mitglieder der Immunglobulin-Rezeptor-Familie und sollen für die normale Lymphozytenfunktion wichtig sein. Bei abnormer Expression scheinen sie eine Rolle bei der B-Zell-Lymphomagenese zu spielen [59]. Des Weiteren findet sich in diesem Bereich das Gen BCL9, das bei Überexpression bei einem Teil der B-Zell-Lymphome pathogenetische Bedeutung haben soll, dessen exakte Funktion aber noch unklar ist [60]. Außerdem wurde MUC1 auf 1q21 identifiziert. Hierbei handelt es sich um ein Gen, dessen Expression bei B-Zell-Lymphomen durch die Translokation $t(1;14)(q21;q32)$ häufig fehlreguliert wird, und das damit zur Lymphomagenese beizutragen scheint [61]. Zudem könnte mit FCGR2B ein Gen von den Deletionen betroffen sein, das durch die Translokation $t(1;22)(q22;q11)$ fehlreguliert wird und in der Lymphomagenese des folliculären Lymphoms eine Rolle zu spielen scheint [62]. Bei einem (3,3%) Patienten wurden Amplifikationen in den Mikrosatellitenmarkern D1S484 und D1S2878 gefunden, die in der Chromosomenbande 1q23.3 lokalisiert sind. In unserer Untersuchung konnten in der Chromosomenbande 1q21-23 wenig allelische

Imbalancen nachgewiesen werden. Wir vermuten deshalb, dass Veränderung von Genen in diesem Bereich eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese der extranodalen DLBCL spielt.

4.4 In der Chromosomenbande 1p22 gibt es wenig Veränderungen

Die Chromosomenregion 1p22 ist in die Translokation $t(1;14)(p22;q32)$ involviert, wobei 1p22.3 als Locus für das Gen BCL10 gilt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bande 1p22.3, die ca. 2 Mbp umfasst, anhand der Mikrosatellitenmarker D1S2766 und D1S2865 analysiert. Wir fanden lediglich bei zwei (6,7%) Patienten eine Deletion im Bereich des Markers D1S2766. Bei D1S2865 zeigten sich keinerlei Auffälligkeiten. Nimmt man den angrenzenden chromosomalen Bereich 1p22.1 mit D1S2868 hinzu, findet man bei insgesamt vier (13,3%) Patienten LOH und bei einem (3,3%) Patienten Mikrosatelliteninstabilität.

Das Wildtyp-Gen BCL10 soll apoptotische Funktion haben und als Tumorsuppressorgen wirken. Durch Mutation kann es zu einem Verlust dieser Funktion und damit zu onkogener Aktivität kommen. Zwei Gruppen um Willis und Zhang fanden unabhängig voneinander beim Klonen der Translokation $t(1;14)(p22;q32)$ bei MALT-Lymphomen das Gen BCL10. Die BCL10-Mutation wurde als häufig in die Pathogenese verschiedener Tumoren involvierte Veränderung gesehen [29,82]. In früheren Arbeiten fand sich dagegen bei 0 bis 11,1% der untersuchten extranodalen DLBCL, darunter auch solche mit gastraler Lokalisation, eine BCL10-Mutation. [30,31,32,33]. Wir fanden ebenfalls auf der DNA-Ebene keinen Hinweis darauf, dass die BCL10-Funktion bei extranodalen DLBCL verändert ist.

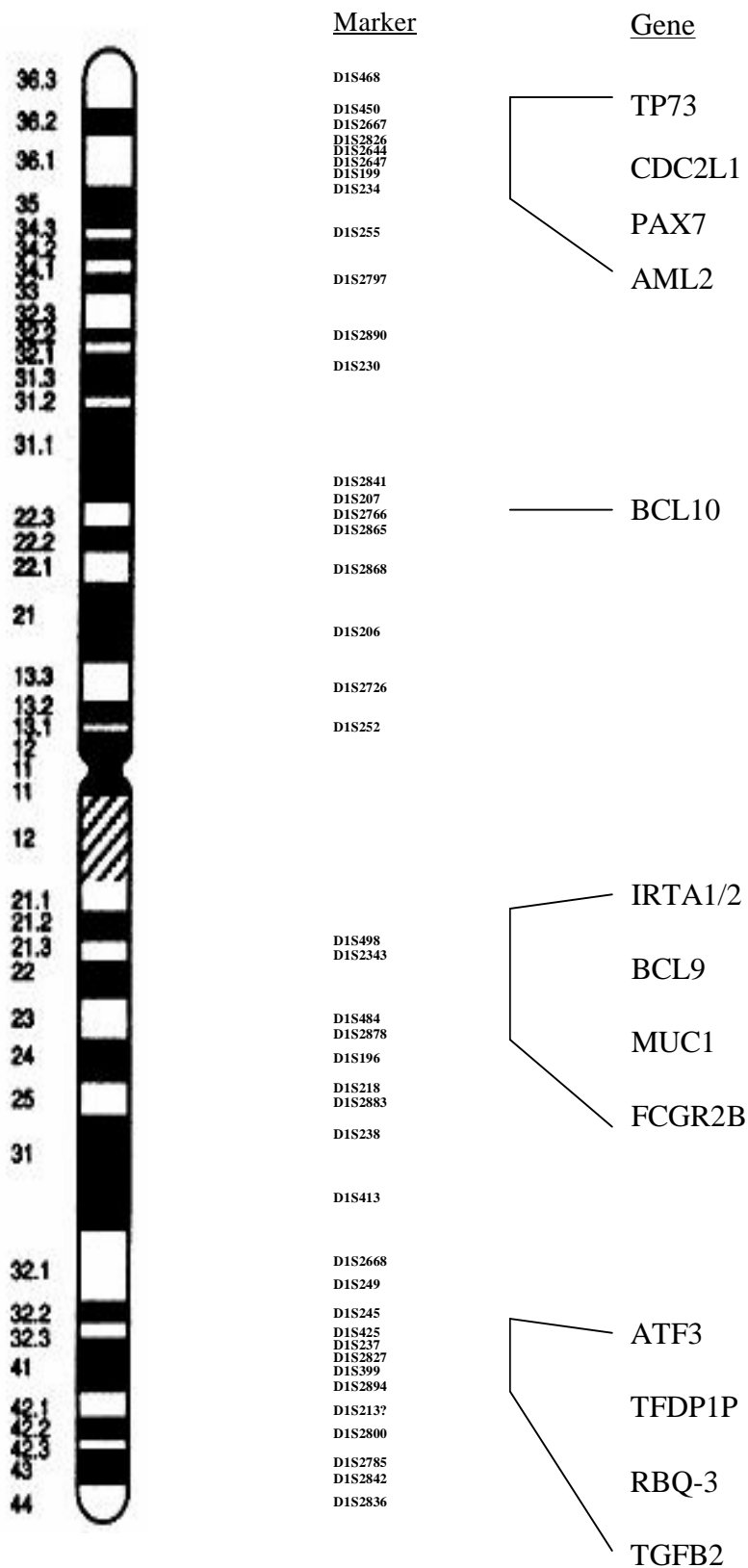


ABB. 10: DARSTELLUNG DES CHROMOSOMS 1, DANEBEN DIE MARKERVERTEILUNG UND DISKUTIERT E GENE

4.5 Mikrosatelliteninstabilität kommt bei gastralen DLBCL selten vor

Mikrosatelliteninstabilität liegt vor, wenn Mikrosatelliten eine veränderte Allellänge aufgrund verlorener oder hinzugewonnener Repeats vorweisen. Es wird vermutet, dass Dysfunktion bestimmter DNA-Reparaturgene, also fehlende oder nicht korrekte Kontrolle der Replikation, zu Mutation anderer Gene und Mikrosatelliteninstabilität führt. Dieser sogenannte Mutator Pathway ist neben dem Tumorsuppressor Pathway als Weg der Tumorigenese anerkannt [83]. MSI wurde zuerst beim hereditären non-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) beschrieben und spielt in der Karzinogenese einiger anderer Tumoren eine Rolle [63]. Anhand der Mikrosatellitenanalyse wollten wir nun herausfinden, ob diese Art genomischer Instabilität auch für die Lymphomagenese der gastralen DLBCL von Bedeutung ist. Für die Einteilung der MSI wandten wir die Kriterien nach Boland an. Danach handelt es sich um MSI-H, wenn zwei oder mehr von fünf Markern, d.h. mindestens 40% der Mikrosatellitenmarker, eine Instabilität zeigen. Findet man bei keinem der Mikrosatellitenmarker eine Instabilität, spricht man von MSS (Mikrosatellitenstabilität). Alle Fälle, die dazwischen liegen, nennt man MSI-L [66].

Mikrosatelliteninstabilität wurde in unserer Arbeit nur bei 1,44% aller Genotypen gefunden. Dabei zeigten 40% (12 von 30) der untersuchten gastralen DLBCL MSI-L. Die übrigen 60% wurden der Gruppe der MSS zugeordnet. MSI-H trat in keinem der Fälle auf. Im Unterschied zu den meisten vorausgehenden Studien über MSI bei gastralen DLBCL können wir eine vergleichsweise große Anzahl an Patientenproben und Mikrosatellitenmarkern vorweisen. Die in früheren Studien nach den Kriterien des RER+-Phänotyp eingeteilten Tumoren bewerteten wir, um sie vergleichbar zu machen, anhand der Boland-Kriterien.

Xu et al. untersuchten mittels neun Mikrosatellitenmarkern 33 gastrale Lymphome, darunter 26 DLBCL. Bei sechs der 26 (23,1%) analysierten DLBCL konnte MSI-L nachgewiesen werden. MSI-H zeigte sich in keinem der Fälle [84]. Starostik et al. nahmen 118 Mikrosatellitenmarker heran, um 31 DLBCL des Magens zu analysieren. Dabei fanden sich bei 28 der untersuchten 31 Proben (90,3%) MSI-L. Keiner der Tumoren zeigte MSI-H [85]. Des Weiteren unternahm Furlan et al. eine Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität u.a. bei einem gastralen high-grade

MALT-Lymphom. Dieses zeigte nur in einem (10%) der 10 Marker MSI-L. MSI-H wurde nicht gefunden [86]. In einer Untersuchung von Hoeve et al. mit 17 Mikrosatellitenmarkern konnte bei zwei von 13 (15,4%) high-grade-Lymphomen des Magens, jedoch bei keinem der drei gastralen DLBCL, somit bei zwei von 16 (12,5%) der mit unseren Proben vergleichbaren Lymphomen, jeweils MSI-L nachgewiesen werden. MSI-H zeigte sich nicht [87]. Zusammenfassend lässt sich MSI-L in den verschiedenen Studien in 10 bis 90,3% der gastralen DLBCL finden, wobei das Ergebnis von Starostik et al. mit 90,3% eher aus der Reihe fällt, was man u.a. mit der hohen Anzahl an untersuchten Mikrosatellitenmarkern erklären könnte. Der durch uns erbrachte Nachweis von MSI-L bei 40% der untersuchten DLBCL des Magens liegt somit im Durchschnitt. Ein absolutes Fehlen von MSI-H konnte bei unserer sowie den früheren Studien festgestellt werden. Im Vergleich unserer mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen wird also deutlich, dass MSI kein entscheidender Faktor in der Pathogenese der gastralen DLBCL zu sein scheint. Abweichend von dieser These erscheinen die Ergebnisse einer Studie von Peng et al. In dieser Untersuchung wurde MSI-H bei neun von 16 (56,3%) analysierten DLBCL gefunden [88]. Genaue Angaben über MSI-L wurden nicht gemacht. Auch die Lokalisation der Lymphome wurde nicht angegeben. Ob diese Studie aufgrund der evtl. unterschiedlichen Lymphom-Lokalisation nicht mit unserer und den anderen Arbeiten verglichen werden kann, bleibt offen.

In unserer Studie ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und einer steigenden MSI-Inzidenz nachweisen. Dabei fand sich eine jüngere Patientengruppe von 31 bis 49 Jahren, die keine Mikrosatelliteninstabilität bzw. MSI in nur einem Marker, und eine ältere Gruppe von 59 bis 79 Jahren, die MSI zusätzlich in zwei und drei Mikrosatellitenmarkern zeigte. In einer Arbeit von Starostik et al. wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied der MSI-Inzidenz bei den Patienten, aufgeteilt in drei Altersgruppen, gesehen. Mit steigendem Alter zeigte sich auch in dieser Untersuchung eine erhöhte MSI-Inzidenz [22]. Die anderen genannten Studien machten keine Aussagen über das Alter der Patienten.

Insgesamt kommen wir zu dem Schluss, dass MSI bei den untersuchten DLBCL des Magens nur eine untergeordnete Bedeutung zu haben scheint. Die Inzidenz der Mikrosatelliteninstabilität scheint aber mit zunehmendem Alter zu steigen.

Die bei lediglich 1,44% aller Genotypen auftretende Mikrosatelliteninstabilität steht den allelischen Imbalancen mit 14% der informativen Fälle gegenüber. Für die Genese der extranodalen DLBCL scheint der Tumorsuppressor Pathway eine wesentlich wichtigere Rolle zu spielen als der für die Mikrosatelliteninstabilität stehende Mutator Pathway.

5. Zusammenfassung

Eine primäre Aberration wurde bei den extranodalen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen bisher nicht definiert. Das in dieser Arbeit untersuchte Chromosom 1 birgt dennoch eine Vielzahl an genomischen Veränderungen, die möglicherweise als sekundäre Aberrationen an der Pathogenese der extranodalen DLBCL beteiligt sein könnten.

Als Hotspot unserer Untersuchung gilt die Chromosomenbande 1p36.32, die den Locus für das Gen TP73 enthält. Loss of heterozygosity in diesem Bereich wurde von uns in 34,8% der informativen Fälle nachgewiesen. Wie bei einer Reihe weiterer Erkrankungen könnte TP73 also bei den extranodalen DLBCL als Kandidatengen betroffen sein. Ein Aufschluss darüber wäre durch zukünftige Untersuchungen möglich. Außerdem ist noch zu klären, an welcher Stelle eine Veränderung des TP73 ihren Beitrag zur Pathogenese der DLBCL leisten könnte. Dies ließe sich durch Studien herausfinden, die auch die MZBCL vom MALT-Typ miteinbezögen. Die am zweithäufigsten von Deletionen betroffene Region (20% der Patienten) war 1q32.3-41. Es handelte sich v.a. um große Deletionen, so dass weitere Untersuchungen nötig sind, um Kandidatengene benennen zu können. Die Bereiche 1p22 und 1q21-23 waren nicht auffällig verändert. Wir vermuten, dass Aberrationen dieser Bereiche in der Pathogenese der gastralen DLBCL von untergeordneter Bedeutung sind.

Wir kommen zu dem Schluss, dass Mikrosatelliteninstabilität keine ausschlaggebende Rolle auf dem Weg zum DLBCL einnimmt. Lediglich 1,44% aller Genotypen zeigten MSI, high frequency MSI konnte dabei in keinem der Fälle nachgewiesen werden. Bei Betrachtung des Alters der Patienten, die MSI aufwiesen, fällt ein signifikanter Zusammenhang zwischen höherem Alter und steigender MSI-Inzidenz auf. Eine Korrelation zwischen Tumorstadium und MSI-Inzidenz konnte nicht festgestellt werden.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung veranlassen uns dazu, dem Tumorsuppressor Pathway eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der extranodalen DLBCL zuzuschreiben.

6. Abkürzungen

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	base pairs
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementary Determining Region
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	weiblich
FU	Fluorescence units
GDB	Genome Database
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
H.P.	Helicobacter pylori
IGH	Schwere Kette der Immunglobuline
LOH	Loss of heterozygosity
M	männlich
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
Mbp	Mega base pairs
min.	Minute(n)
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	high frequency MSI
MSI-L	low frequency MSI
MSS	Mikrosatellitenstabilität
MZBCL	Marginalzonen B-Zell-Lymphom
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PCR	Polymerase chain reaction

REAL classification	Revised European American Lymphoma Classification
RER+	Replication error-positiv
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec.	Sekunde(n)
TBE	Tris, Borat, EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
unbek.	unbekannt
WHO	World Health Organization

7. Literaturverzeichnis

1. Isaacson PG: Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, *Semin Hematol* 1999; 36: 139-147
2. Harris NL, Jaffe ES, Vardiman JW, Stein H, Diebold J, Müller-Hermelink HK, Flandrin G: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, Lyon: IARC Press 2001
3. De Jong D, Boot H, van Heerde P, Hart GAM, Taal BG: Histological grading in gastric lymphoma: pretreatment criteria and clinical relevance, *Gastroenterology* 1997; 112: 1466-1474
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD: The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997, *Histopathology* 2000; 36: 69-87
5. Cogliatti SB, Schmid U, Schumacher U, Eckert F, Hansmann ML, Hedderich J, Takahashi H, Lennert K: Primary B-cell gastric lymphoma: a clinicopathological study of 145 patients, *Gastroenterology* 1991; 101: 1159-1170
6. Chan JK: Gastrointestinal lymphomas: an overview with emphasis on new findings and diagnostic problems, *Semin Diagn Pathol* 1996; 13: 260-296
7. Musshoff K: Clinical staging classification of non-Hodgkin`s lymphomas (author`s translation), *Strahlentherapie* 1977; 153: 218-221
8. Boot H, de Jong D, van Heerde P, Taal B: Role of Helicobacter pylori eradication in high-grade MALT lymphoma [letter], *Lancet* 1995; 346: 448-449
9. Chan JK, Ng CS, Isaacson PG: Relationship between high-grade lymphoma and low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) of the stomach, *Am J Pathol* 1990; 136: 1153-1164
10. Peng H, Du M, Diss TC, Isaacson PG, Pan L: Genetic evidence for a clonal link between low and high-grade components in gastric MALT B-cell lymphomas, *Histopathology* 1997; 30: 425-429

11. Hallas C, Greiner A, Peters K, Müller-Hermelink HK: Immunoglobulin VH genes of high-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas show a high load of somatic mutations and evidence of antigen-dependent affinity maturation, *Lab Invest* 1998; 78: 277-287
12. Montalban C, Manzanal A, Castrillo JM, Escribano L, Bellas C: Low grade gastric B-cell MALT lymphoma progressing into high grade lymphoma. Clonal identity of the two stages of the tumour, unusual bone involvement and leukaemic dissemination, *Histopathology* 1995; 27: 89-91
13. Matolcsy A, Nagy M, Kisfaludy N, Kelényi G: Distinct clonal origin of low-grade MALT-type and high-grade lesions of a multifocal gastric lymphoma, *Histopathology* 1999; 34: 6-8
14. Cabras AD, Candidus S, Fend F, Kremer M, Schulz S, Bordi C, Weirich G, Höfler H, Werner M: Biclinality of gastric lymphomas, *Lab Invest* 2001; 81: 961-967
15. Yoshino T, Omonishi K, Kobayashi K, Mannami T, Okada H, Mizuno M, Yamadori I, Kondo E, Akagi T: Clinicopathological features of gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas: high grade transformation and comparison with diffuse large B cell lymphomas without MALT lymphoma features, *J Clin Pathol* 2000; 53: 187-190
16. Raderer M, Chott A, Drach J, Montalban C, Dragosics B, Jäger U, Püspök A, Österreicher C, Zielinski CC: Chemotherapy for management of localised high-grade gastric B-cell lymphoma: how much is necessary?, *Ann Oncol* 2002; 13: 1094-1098
17. Warren JR, Marshall BJ: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *Lancet* 1983; 330: 1273-1275
18. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG: Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma, *Lancet* 1991; 338: 1175-1176
19. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelman JH, Friedman GD: Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma, *N Engl J Med* 1994; 330: 1267-1271

20. Morgner A, Miehle S, Fischbach W, Schmitt W, Müller-Hermelink HK, Greiner A, Thiede C, Schetelig J, Neubauer A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdörffer E: Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection, *J Clin Oncol* 2001; 19: 2041-2048
21. Burke JS: Extranodal hematopoietic/lymphoid disorders, *Am J Clin Pathol* 1999; 111 (Suppl. 1): S40-S45
22. Starostik P, Greiner A, Schultz A, Zettl A, Peters K, Rosenwald A, Kolve M, Müller-Hermelink HK: Genetic aberrations common in gastric high-grade large B-cell lymphoma, *Blood* 2000; 95: 1180-1187
23. Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, Ott MM, Müller-Hermelink HK: The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type, *Cancer Res* 1997; 57: 3944-3948
24. Starostik P, Patzner J, Greiner A, Schwarz S, Kalla J, Ott G, Müller-Hermelink HK: Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways, *Blood* 2002; 99: 3-9
25. Baens M, Maes B, Steyls A, Geboes K, Marynen P, de Wolf-Peeters C: The product of the t(11;18), an API2-MLT fusion, marks nearly half of gastric MALT type lymphomas without large cell proliferation, *Am J Pathol* 2000; 156: 1433-1439
26. Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, Cerroni L, Stolte M, Ott G, Raderer M, Chott A: T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma, *Blood* 2003; 101: 2335-2339
27. Cook JR, Sherer M, Craig FE, Shekhter-Levin S, Swerdlow SH: T(14;18)(q32;q21) involving MALT1 and IGH genes in an extranodal diffuse large B-cell lymphoma, *Hum Pathol* 2003; 34: 1212-1215
28. Wotherspoon AC, Pan L, Diss TC, Isaacson PG: Cytogenetic study of B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 58: 35-38

29. Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer MJS: Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types, *Cell* 1999; 96: 35-45
30. Du MQ, Peng H, Liu H, Hamoudi RA, Diss TC, Willis TG, Ye H, Dogan A, Wotherspoon AC, Dyer MJS, Isaacson PG: BCL10 gene mutation in lymphoma, *Blood* 2000; 95: 3885-3890
31. Chen YW, Wong KY, Au WY, Liang RHS, Srivastava G: BCL10 somatic mutations rarely occur in gastric lymphoma: detection of high frequency of polymorphisms in BCL10 coding region, *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 127: 184-187
32. Maes B, Demunter A, Peeters B, de Wolf-Peeters C: BCL10 mutation does not represent an important pathogenic mechanism in gastric MALT-type lymphoma, and the presence of the API2-MLT fusion is associated with aberrant nuclear BCL10 expression, *Blood* 2002; 99: 1398-1404
33. Luminari S, Intini D, Baldini L, Berti E, Bertoni F, Zucca E, Cro L, Maiolo AT, Cavalli F, Neri A: BCL10 gene mutations rarely occur in lymphoid malignancies, *Leukemia* 2000; 14: 905-908
34. Barth TFE, Döhner H, Werner CA, Stilgenbauer S, Schlotter M, Pawlita M, Lichter P, Möller P, Bentz M: Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract, *Blood* 1998; 91: 4321-4330
35. Ott G, Kalla J, Steinhoff A, Rosenwald A, Katzenberger T, Roblick U, Ott MM, Müller-Hermelink HK: Trisomy 3 is not a common feature in malignant lymphomas of Mucosa-associated lymphoid tissue type, *Am J Pathol* 1998; 153: 689-694
36. Hoeve MA, Gisbertz IAM, Schouten HC, Schuurin E, Bot FJ, Hermans J, Hopman A, Kluin PM, Arends JW, van Krieken JHJM: Gastric low-grade MALT lymphoma, high-grade MALT lymphoma and diffuse large B cell lymphoma show different frequencies of trisomy, *Leukemia* 1999; 13: 799-807
37. Wotherspoon AC, Finn TM, Isaacson PG: Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue, *Blood* 1995; 85: 2000-2004

38. Brynes RK, Almaguer PD, Leathery KE, McCourty A, Arber DA, Medeiros LJ, Nathwani BN: Numerical cytogenetic abnormalities of chromosomes 3, 7 and 12 in marginal zone B-cell lymphomas, *Mod Pathol* 1996; 9: 995-1000
39. Wotherspoon AC, Finn T, Isaacson PG: Numerical abnormalities of chromosome 3 and 7 in lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue and the spleen marginal zone, *Lab Invest* 1994; 70: 124A-?
40. Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, Chaganti RSK, Dalla-Favera R: Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin`s lymphoma, *Blood* 1994; 83: 1757-1759
41. Omonishi K, Yoshino T, Sakuma I, Kobayashi K, Moriyama M, Akagi T: bcl-6 protein is identified in high-grade but not low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas of the stomach, *Mod Pathol* 1998; 11: 181-185
42. Gaidano G, Volpe G, Pastore C, Chiarle R, Capello D, Glohini A, Perissinotto E, Savinelli F, Bosco M, Mazza U, Pileri S, Palestro G, Carbone A, Saglio G: Detection of BCL-6 rearrangements and p53 mutations in Malt-lymphomas, *Am J Hematol* 1997; 56: 206-213
43. Kramer MHH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JHJM, de Jong D, Maartense E, Schuurin E, Kluin PM: Clinical relevance of BCL2, BCL6 and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma, *Blood* 1998; 92: 3152-3162
44. Raghoebier S, Kramer MHH, van Krieken JHJM, de Jong D, Limpens J, Kluin-Nelemans JC, van Ommen GJB, Kluin PM: Essential differences in oncogene involvement between primary nodal and extranodal large cell lymphoma, *Blood* 1991; 78: 2680-2685
45. Van Krieken JHJM, Raffeld M, Raghoebier S, Jaffe ES, van Ommen GJB, Kluin PM: Molecular genetics of gastrointestinal non-Hodgkin`s lymphomas: unusual prevalence and pattern of c-myc rearrangements in aggressive lymphomas, *Blood* 1990; 76: 797-800
46. Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Masuda H, Miyamoto M, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K: c-myc gene mutation in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma, *Oncol Rep* 2001; 8: 289-292

47. Wohlfart S, Sebinger D, Gruber P, Buch J, Polgar D, Krupitza G, Rosner M, Hengstschläger M, Raderer M, Chott A, Müllauer L: FAS (CD95) mutations are rare in gastric MALT lymphoma but occur more frequently in primary gastric diffuse large B-cell lymphoma, *Am J Pathol* 2004; 164: 1081-1089
48. Seeberger H, Starostik P, Schwarz S, Knörr C, Kalla J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Greiner A: Loss of Fas (CD95/APO-1) regulatory function is an important step in early MALT-type lymphoma development, *Lab Invest* 2001; 81: 977-986
49. Du M, Peng H, Singh N, Isaacson PG, Pan L: The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, *Blood* 1995; 86: 4587-4593
50. Neumeister P, Hoefler G, Beham-Schmid C, Schmidt H, Apfelbeck U, Schaidler H, Linkesch W, Sill H: Deletion analysis of the p16 tumor suppressor gene in gastrointestinal mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas, *Gastroenterology* 1997; 112: 1871-1875
51. Lahti JM, Valentine M, Xiang J, Jones B, Amann J, Grenet J, Richmond G, Look AT, Kidd VJ: Alterations in the PITSLRE protein kinase gene complex on chromosome 1p36 in childhood neuroblastoma, *Nat Genet* 1994; 7: 370-375
52. Schäfer BW, Mattei MG: The human paired domain gene PAX7 (Hup1) maps to chromosome 1p35-1p36.2, *Genomics* 1993; 17: 249-251
53. Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y: AML1, AML2 and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression and chromosomal localization, *Genomics* 1994; 23: 425-432
54. Perri P, Praml C, Savelyeva L, Pillmann A, Schwab M: Fine mapping of distal 1p loci reveals TP73 at D1S468, *Cytogenet Cell Genet* 1999; 84: 111-114
55. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D: Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers, *Cell* 1997; 90: 809-819
56. Stiewe T, Pützer BM: Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene?, *Cell Death Differ* 2002; 9: 237-245

57. Le Baccon P, Leroux D, Dascalescu C, Duley S, Marais D, Esmenjaud E, Sotto JJ, Callanan M: Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and Multiple myeloma, *Genes Chrom Canc* 2001; 32: 250-264
58. Offit K, Wong G, Filippa DA, Tao Y, Chaganti RSK: Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations, *Blood* 1991; 77: 1508-1515
59. 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 RSK, 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: 277-289
60. Willis TG, Zalcborg IR, Coignet LJA, Wlodarska I, Stul M, Jadayel DM, Bastard C, Treleaven JG, Catovsky D, Silva MLM, Dyer MJS: Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21, *Blood* 1998; 91: 1873-1881
61. Dyomin VG, Palanisamy N, Lloyd KO, Dyomina K, Jhanwar SC, Houldsworth J, Chaganti RSK: MUC1 is activated in a B-cell lymphoma by the t(1;14)(q21;q32) translocation and is rearranged and amplified in B-cell lymphoma subsets, *Blood* 2000; 95: 2666-2671
62. Callanan MB, Le Baccon P, Mossuz P, Duley S, Bastard C, Hamoudi R, Dyer MJ, Klobeck G, Rimokh R, Sotto JJ, Leroux D: The IgG Fc receptor, FcγRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma, *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 309-314
63. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer, *Science* 1993; 260: 812-816
64. Patzner J: Analyse genomischer Aberrationen gastraler Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ, Würzburg 2002

65. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA: Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction, *Blood* 1991; 78: 192-196
66. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer, *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257
67. Kraus JA, Koch A, Albrecht S, von Deimling A, Wiestler OD, Pietsch T: Loss of heterozygosity at locus F13B on chromosome 1q in human medulloblastoma, *Int J Cancer* 1996; 67: 11-15
68. www.sanger.ac.uk/HGP/Chr 1/
69. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr: p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis, *Nature* 1997; 389: 191-194
70. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D: p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours, *Nature* 2000; 404: 99-103
71. Nomoto S, Haruki N, Kondo M, Konishi H, Takahashi T, Takahashi T, Takahashi T: Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers, *Cancer Res* 1998; 58: 1380-1383
72. Shan L, Yang Q, Nakamura Y, Nakamura M, Miyauchi A, Tsujimoto M, Nakatani Y, Wakasa K, Mori I, Kakudo K: Frequent loss of heterozygosity at 1p36.3 and p73 abnormality in parathyroid adenomas, *Mod Pathol* 2001; 14: 273-278
73. 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
74. 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: 1113-1120

75. Dave BJ, Pickering DL, Hess MM, Weisenburger DD, Armitage JO, Sanger WG: Deletion of Cell Division Cycle 2-Like 1 gene locus on 1p36 in non-Hodgkin lymphoma, *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 108: 120-126
76. Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y: Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer, *Cell* 2002; 109: 113-124
77. Steiner G, Cairns P, Polascik TJ, Marshall FF, Epstein JI, Sidransky D, Schoenberg M: High-density mapping of chromosomal arm 1q in renal collecting duct carcinoma: region of minimal deletion at 1q32.1-32.2, *Cancer Res* 1996; 56: 5044-5046
78. De Martin R, Haendler B, Hofer-Warbinek R, Gaugitsch H, Wrann M, Schlusener H, Seifert JM, Bodmer S, Fontana A, Hofer E: Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family, *EMBO J* 1987; 6: 3673-3677
79. Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Kela K, Kaminski N, Getz G, Domany E, Givol D: DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53, *Oncogene* 2001; 20: 2225-2234
80. Zhang Y, Venkatraj VS, Fischer SG, Warburton D, Chellappan SP: Genomic cloning and chromosomal assignment of the E2F dimerization partner TFDP gene family, *Genomics* 1997; 39: 95-98
81. Saijo M, Sakai Y, Kishino T, Niikawa N, Matsuura Y, Morino K, Tamai K, Taya Y: Molecular cloning of a human protein that binds to the retinoblastoma protein and chromosomal mapping, *Genomics* 1995; 27: 511-519
82. 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

83. Perucho M: Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator, *Nat Med* 1996; 2: 630-631
84. Xu WS, Chan ACL, Liang R, Srivastava G: No evidence of replication error phenotype in primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, *Int J Cancer* 1998; 76: 635-638
85. Starostik P, Greiner A, Schwarz S, Patzner J, Schultz A, Müller-Hermelink HK: The role of microsatellite instability in gastric low- and high-grade lymphoma development, *Am J Pathol* 2000; 157: 1129-1136
86. Furlan D, Bertoni F, Cerutti R, Taborelli M, Pinotti G, Roggero E, Cavalli F, Bonato M, Zucca E, Capella C: Microsatellite instability in gastric MALT lymphomas and other associated neoplasms, *Ann Oncol* 1999; 10: 783-788
87. Hoeve MA, Ferreira Mota SC, Schuurin E, de Leeuw WJF, Chott A, Meijerink JPP, Kluin PM, van Krieken JHJM: Frequent allelic imbalance but infrequent microsatellite instability in gastric lymphoma, *Leukemia* 1999; 13: 1804-1811
88. Peng H, Chen G, Du M, Singh N, Isaacson PG, Pan L: Replication error phenotype and p53 gene mutation in lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue, *Am J Pathol* 1996; 148: 643-648

Danksagung

Mein Dank geht besonders an Herrn Prof. Dr. H. K. Müller-Hermelink, der mir den Arbeitsplatz in seinem Labor zur Verfügung stellte und die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte. Danken möchte ich auch meinem Betreuer Dr. P. Starostik, der sich immer Zeit für meine Fragen nahm und auch nach seinem Wechsel an das Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, USA, für mich da war. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. S. Schwarz, Frau S. Müller und vielen weiteren Mitarbeitern des Pathologischen Instituts für die Unterstützung während der experimentellen Phase meiner Arbeit bedanken. Dank gilt auch Frau Dr. I. Haubitz für die Hilfe bei der Erstellung der Statistik. Ganz besonders möchte ich meiner lieben Familie für die Unterstützung danken.

Lebenslauf Kerstin Göbel

Persönliche Daten

Adresse Leopoldineninsel C34, 86633 Neuburg/Donau
Geburtsdatum 8. September 1975
Geburtsort Schweinfurt
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1982-1986 Grundschule Waigolshausen
1986-1995 Celtis-Gymnasium und Abitur in Schweinfurt

Studienvorbereitende Tätigkeit

1995-1996 Freiwilliges Soziales Jahr bei Internationalem Bund Nürnberg
und Arbeit als Pflegehilfe im Juliusspital Würzburg

Hochschulausbildung

1996-2003 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
04/2002-08/2002 1. PJ-Tertial Innere Medizin Missionsärztliche Klinik Würzburg
08/2002-10/2002 2. PJ-Tertial Chirurgie Missionsärztliche Klinik Würzburg
10/2002-11/2002 Chirurgie CHU Pointe à Pitre, Guadeloupe (F)
12/2002-03/2003 3. PJ-Tertial Kinderklinik Wildermeth Biel, Schweiz

Berufserfahrung

10/2003-9/2004 Ärztin im Praktikum und
seit 10/2004 Assistenzärztin in der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin
Kliniken St. Elisabeth Neuburg/Donau
bei CA Dr. med. Ivo A. Henrichs

Neuburg, den 12.11.2005

Kerstin Göbel