Aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

Molekulargenetische Charakterisierung tumorigener Chromosomenaberrationen in extranodalen Marginalzonenlymphomen vom MALT-Typ der Lunge

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Alexandra Metzger
aus Würzburg

Würzburg, April 2008

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

Korreferent: Prof. Dr. med. German Ott

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2008

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Großeltern.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1. Maligne Lymphome 1
1.2. Das MALT-System und die extranodalen Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ 1
1.2.1. Pathogenese 1
1.2.2. Morphologie 3
1.2.3. Genetik 8
1.3. Fragestellung der Arbeit 9
2. Material und Methoden 10
2.1. Tumorgewebe 10
2.2. Tissue microarray (TMA) 10
2.3. Immunhistochemische Färbungen 12
2.3.1. Allgemeines 12
2.3.2. Angewandte Methode und durchgeführte Färbungen 14
2.4. PCR-basierter Nachweis der Translokation t(11;18)(q21;q21) 15
2.4.1. RNA-Extraktion aus Paraffinmaterial 15
2.4.2. DNase I-Digestion 16
2.4.3. Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) 17
2.4.3.1. 1. Zyklus (Multiplex One-Tube RT-PCR) 18
2.4.3.2. 2. Zyklus (Multiplex Nested PCR) 19
2.4.4. Gelelektrophorese mit GeneScan® 3.1 21
2.4.4.1. Durchführung 22
2.4.4.2. Auswertung 23
2.5. Untersuchung anderer mit eMZBCL assoziierter chromosomaler Aberrationen 25
2.5.1. FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) 26
2.5.1.1. Methodik 26
2.5.1.2. FISH-basierter Nachweis von chromosomalen Translokationen und Trisomien 27
2.5.1.3. Auswertung 28

3. Ergebnisse 29
3.1. Detektion der Translokation t(11;18) 29
3.1.1. Multiplex-RT-PCR-basierter Nachweis 29
3.1.2. FISH-basierte Analyse von Bruchereignissen im *MALT1*-Genlokus 29
3.1.3. Korrelation von Molekularbiologie und FISH bezüglich der t(11;18) 30
3.2. FISH-basierte Analyse sowie immunhistochemische Analyse von *FOXP1* 31
3.3. FISH-Analyse von Bruchereignissen im Immunglobulinschwerkettenlokus (*IgH*) 33
3.4. FISH-basierte Analyse numerischer Aberrationen von Chromosom 3 33
3.5. Immunhistochemische Darstellung des BCL10-Protein 34
3.6. Immunhistochemische Analyse einer sekretorischen Differenzierung 36
3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse und Korrelationen 37
3.7.1. Zusammenfassung 37
3.7.2. Korrelationen 38
4. Diskussion 39
4.1. Genese der MALT-Lymphome 39
4.2. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur 43
4.2.1. Chromosomale Translokation t(11;18) 43
4.2.2. FISH-basierte Analyse chromosomaler Translokationen 44
4.3. Hypothese über alternative Aktivierung des Zellzyklus 45
4.4. Vergleich der genetischen und immunhistochemischen Ergebnisse bezüglich FOXP1- und BCL10-Expression 46
4.5. Sekretorische Differenzierung 48
5. Zusammenfassung 49
6. Literaturverzeichnis 50
7. Anhang 53
7.1. Studienfälle eMZBCL vom MALT-Typ der Lunge (MALT) 53
7.2. TMA-Datenblatt 54
7.3. Arbeitsprotokolle 55
7.3.1. RNA-Extraktion und DNase I-Digestion 55
7.3.2. Multiplex-PCR 56

7.3.3. FISH-Protokoll 57
7.4. Fusionsprodukte 58
7.5. Ergebnistabellen 58
7.5.1. Positive Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung von t(11;18) 58
7.5.2. *MALT1*-BAP 59
7.5.3. *FOXP1*-BAP 59
7.5.4. Numerische Aberration von *FOXP1* 60
7.5.5. Immunhistochemie FOXP1 61
7.5.6. *IgH*-BAP 62
7.5.7. Numerische Aberration von Chromosom 3 63
7.5.8. Immunhistochemie BCL10 64
7.5.9. Immunhistochemie sekretorische Differenzierung 65
7.6. Zusammenfassung TMA 66
Abkürzungsverzeichnis 68
Danksagung

1. Einleitung

1.1. Maligne Lymphome

Mit dem Begriff "Lymphosarkom" beschrieb im Jahre 1893 der Pathologe Kundrath erstmals einen malignen Tumor aus Lymphozyten [1].
Als "malignes Lymphom" wird heute eine primäre Neoplasie der lymphatischen Zellen (in Lymphknoten, Milz, Tonsillen etc.) bezeichnet, welche sowohl leukämisch (hämatogene Streuung) als auch aleukämisch sein kann [2]. Es wurden im Laufe der Zeit verschiedene Klassifikationen erarbeitet, die Lymphome nach bestimmten Merkmalen einteilen [Kiel-Klassifikation, 1974: Einteilung nach korrespondierendem Zelltyp (Morphologie); International Working Formulation, 1980: Einteilung nach Korrelation des Wachstumsmusters und der Zytologie mit der Prognose; R.E.A.L. (Revised European-American Lymphoma)-Klassifikation, 1994: Einteilung nach korrespondierendem Zelltyp (Immunphänotyp und Genotyp), inklusive extranodaler Lymphome und Hodgkin-Lymphome; WHO-Klassifikation, 2001: Einteilung nach korrespondierendem Zelltyp unter Mitberücksichtigung klinischer Daten]. Die WHO-Klassifikation gewährleistet weltweite Kongruenz und Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Studien der hämatologischen Erkrankungen.
Es werden Hodgkin- (30-50 % aller Lymphome) von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL; 50-70 % aller Lymphome) abgegrenzt, wobei die NHL ein Sammelbegriff verschiedener Lymphomerkrankungen sind, die sich auf Lymphome der T-Zell-Reihe und Lymphome der B-Zell-Reihe verteilen [s. Anhang 7.1.].

1.2. Das MALT-System und die extranodalen Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ

1.2.1. Pathogenese

Mucosa associated lymphatic tissue (MALT) bezeichnet das primär vorhandene lymphatische Gewebe der Schleimhäute und ist in Organen zu finden, deren

Schleimhautoberfläche Kontakt zur Außenwelt aufweisen [3]. Das klassische MALT findet sich im Intestinaltrakt (GALT = gut associated lymphoid tissue), genauer gesagt im terminalen Ileum. Diese sog. Peyer`schen Plaques weisen große Sekundärfollikel mit breiter Marginalzone auf [vgl. Abb.1]. Zwischen der Marginalzone und dem die Peyer-Plaques bedeckendem Epithel [sog. M-Zone] sind IgA-positive Plasmazellen nachweisbar. Spezialisierte sogenannte M-Zellen in der M-Zone haben die Aufgabe des Transports luminaler Antigene in das immunkompetente Gewebe [3].

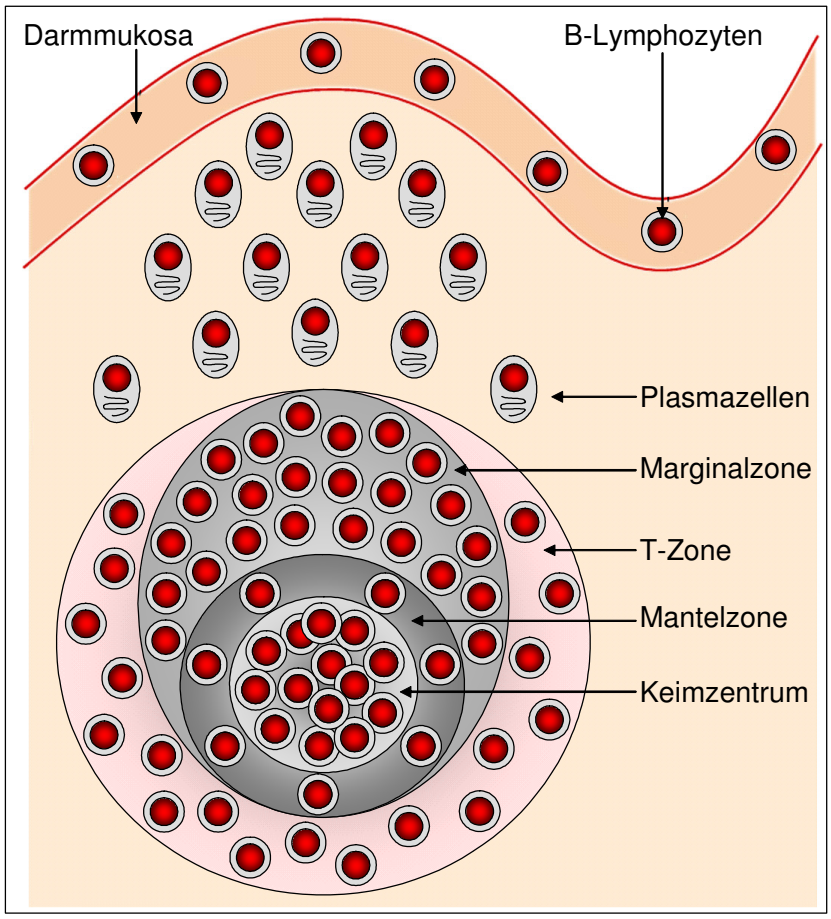


Abb.1: Schema des lymphatischen Gewebes im Intestinaltrakt (GALT= gut associated lymphoid tissue) [3]

Das extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphom vom MALT-Typ (eMZBCL) wurde erstmals 1983 von Isaacson und Wright als Mukosa-assoziiertes B-Zell-Lymphom des Gastrointestinaltrakts beschrieben [4].

Später wurden ihre Beobachtungen um gleichartige Lymphome in verschiedenen weiteren anatomischen Lokalisationen (z.B. Lunge, Speicheldrüsen, Auge, Schilddrüse)

erweitert. Zwischenzeitlich wurden eMZBCL in nahezu jedem Organ zumindest in Einzelfallberichten beschrieben [5].

Im Gegensatz zu den nodalen Lymphomen bleiben eMZBCL vom MALT-Typ typischerweise lange auf ihren Entstehungsort beschränkt, befallen selten das Knochenmark und sind oft durch lokale Maßnahmen (z.B. chirurgische Exzision) kurabel. Bemerkenswerterweise entstehen eMZBCL vom MALT-Typ nur selten in Lokalisationen, die über ein ausgeprägtes physiologisches MALT-System verfügen (terminales Ileum), sondern vielmehr in Organen, die erst im Laufe einer chronischen Entzündung ein lymphoides Gewebe erwerben.

So wird in Speicheldrüsen und in der Schilddrüse im Verlauf einer chronischen (autoimmunen) Entzündung (z. B. Sjögren-Syndrom bzw. Hashimoto-Thyreoiditis) lymphoides Gewebe um geweitete Drüsengänge angelegt [4].

Im Magen, der häufigsten Lokalisation der eMZBCL vom MALT-Typ (etwa 40 % der Fälle) [6], ist die Assoziation der Erkrankung mit einer chronischen Helicobacter pylori (H. p.) - Infektion in über 90 % der Fälle pathogenetisch bedeutsam. Eine solche Infektion induziert offenbar die Entstehung klonaler B-Zell-Populationen, begünstigt durch die Ausbildung eines besonderen Mikromilieus. Erhärtet wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass eine antibiotische Eradikationstherapie von H. p. bei ca. 75 % primär gastraler MALT-Lymphome zur Tumorremission führt [7].

Ein gleichartiges „erworbenes MALT-System“, das unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar ist, wurde auch in fetalen und neonatalen Lungen von Kindern mit pulmonalen Infektionen unklarer Genese gefunden und als „follikuläre Bronchiolitis“ bezeichnet (Bronchus-assoziiertes lymphoides Gewebe; BALT). Auch hier besteht zumindest in einem Teil der Fälle eine Assoziation mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen [4].

1.2.2. Morphologie

Morphologisch bestehen die eMZBCL vom MALT-Typ aus kleinen bis mittelgroßen Zellen mit einem etwas unregelmäßig geformten Kern und weisen manchmal ein klares Zytoplasma auf [vgl. Abb. 2]. Aufgrund dieser Ähnlichkeit mit Zentrozyten werden sie als Zentrozyten-ähnliche (CCL) Zellen bezeichnet. Daneben finden sich kleine

Lymphozyten sowie in wechselnder Zahl untermischt blastäre Zellen nach Art von Zentroblasten und Immunoblasten [**4**, **6**].

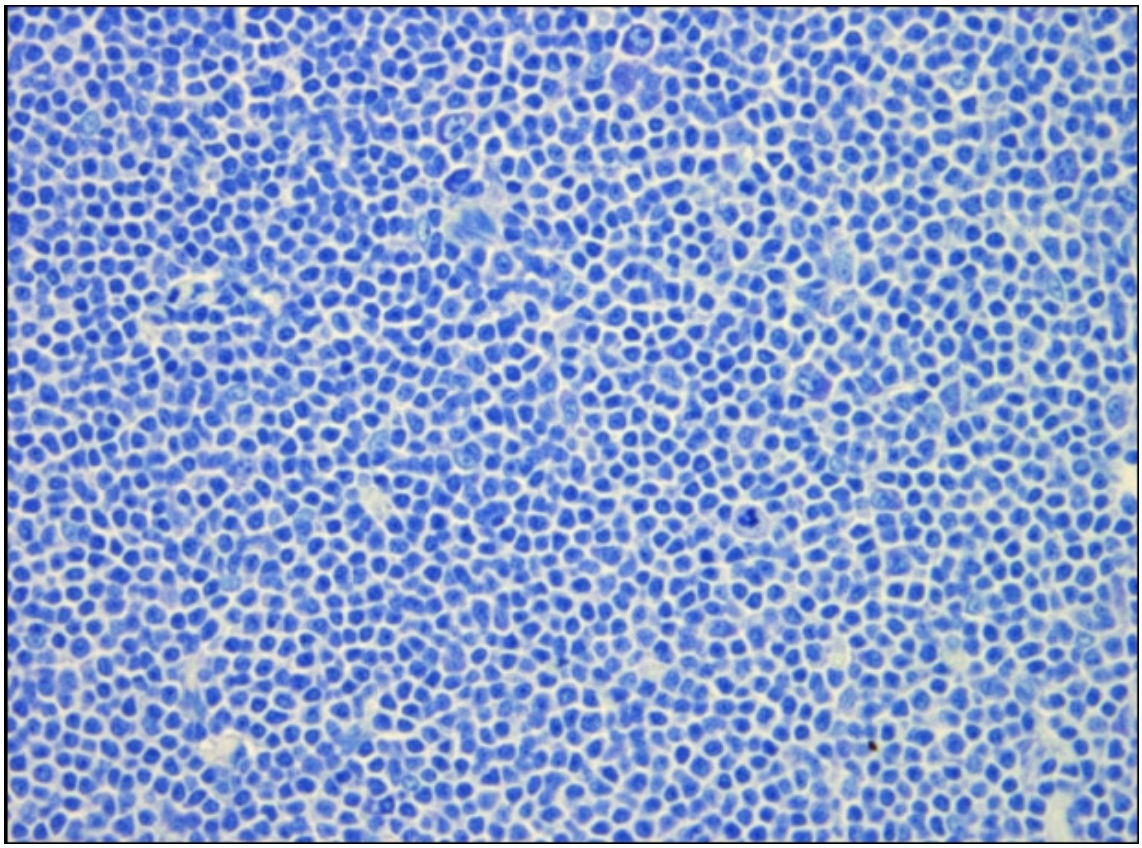


Abb. 2: Morphologie der extranodalen Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ (Giemsa, 400x)

Häufig umwächst das Tumorinfiltrat erhaltene (reaktive) Keimzentren, so dass ein charakteristisches, auf die Marginalzone akzentuiertes Wachstumsmuster erkennbar ist [vgl. Abb. 3]. Erst bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung bricht der Tumor auch in die Follikelstrukturen ein („follikuläre Kolonisierung“) und destruiert sie. Es resultiert ein diffuses Infiltrat in fortgeschrittenen Tumorstadien [**6**].

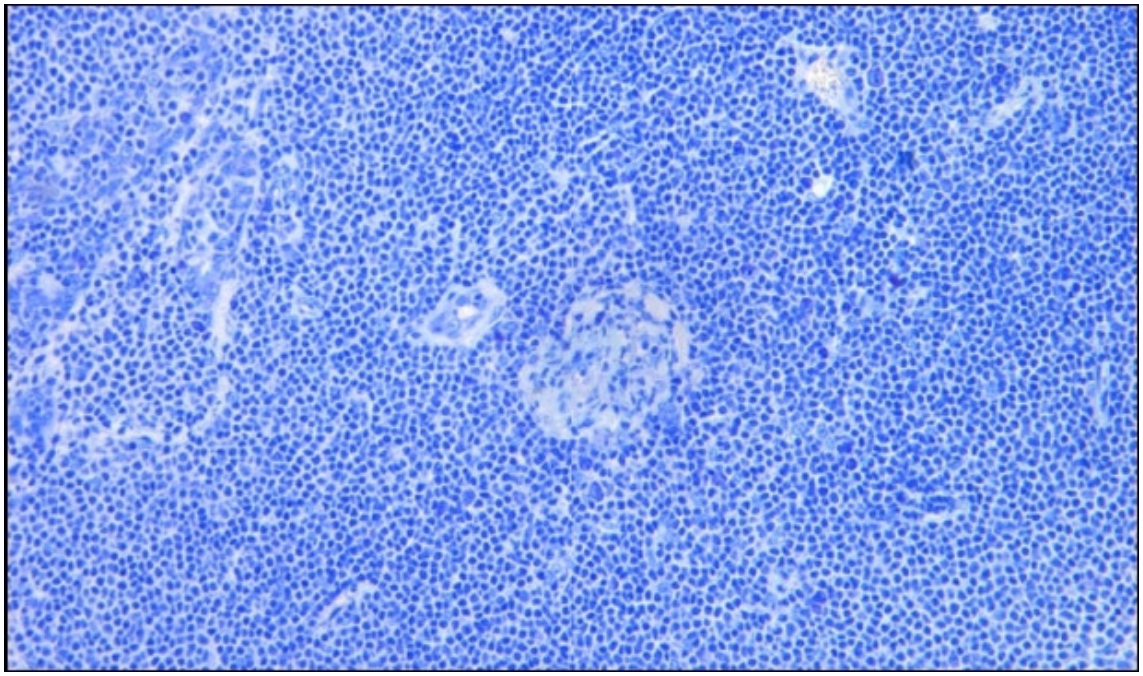


Abb. 3: In der Marginalzone reaktiver Keimzentren akzentuiertes Wachstum der eMZBCL vom MALT-Typ (Giemsa, 200x)

Ein wichtiges Charakteristikum und im Falle der gastralen eMZBCL auch ein diagnostisches Kriterium ist die Ausbildung „lymphoepithelialer Läsionen“ (LEL). Man versteht darunter eine Infiltration und Destruktion von Epithelien durch Gruppen von Tumorzellen [vgl. Abb. 4 und 5]. Das Vorliegen solcher LEL spiegelt das destruktive Tumorwachstum des Lymphoms wieder [**6**].

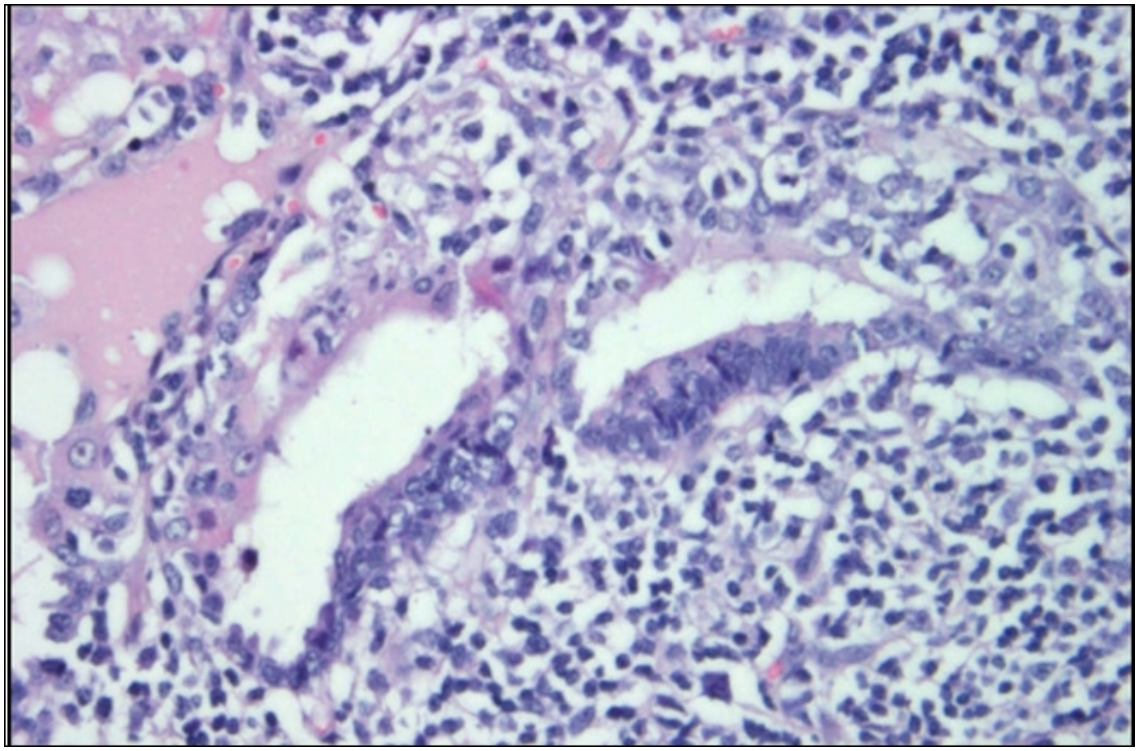


Abb. 4: Lymphoepitheliale Läsionen (LEL) im eMZBCL vom MALT-Typ mit Infiltration und Destruktion von Deckepithelien durch Gruppen von Tumorzellen (HE, 400x)

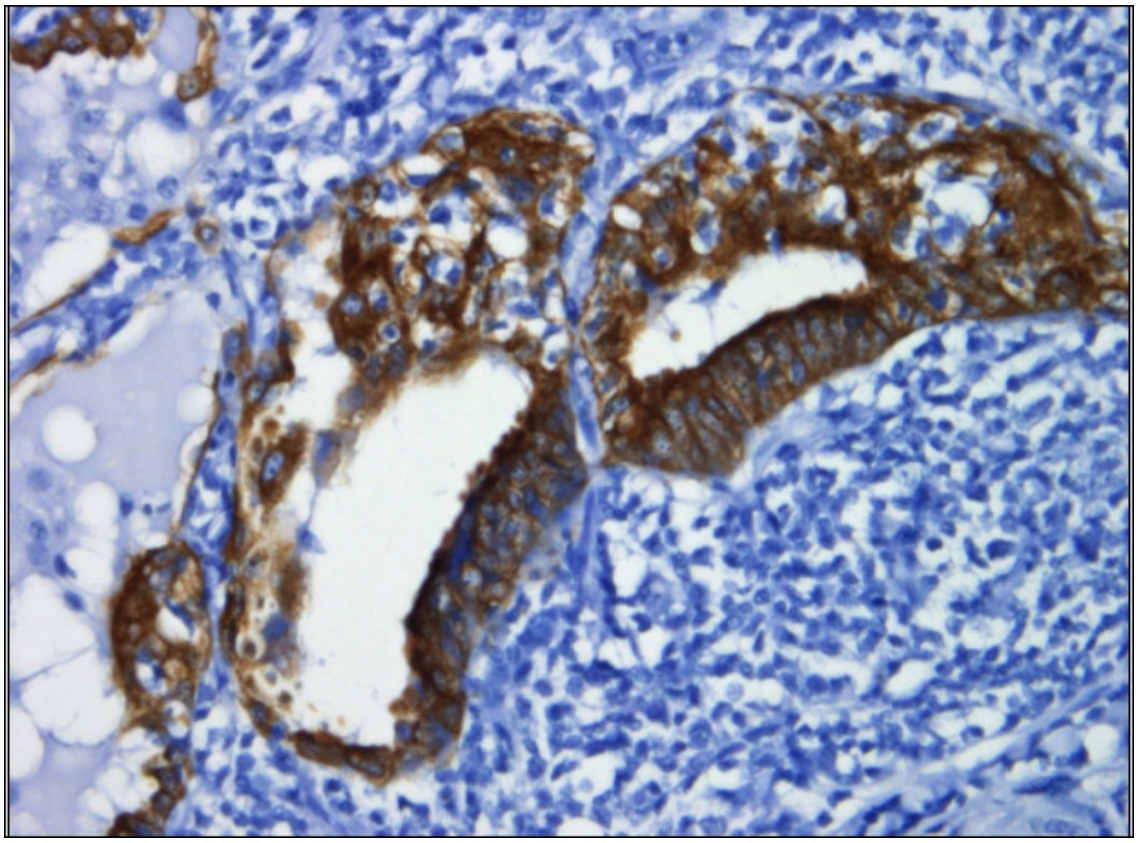


Abb. 5: Lymphoepitheliale Läsionen (LEL) im eMZBCL vom MALT-Typ (immunhistochemische Färbung mit dem panepithelialen Marker AE1-3, 400x)

Gelegentlich ist in den eMZBCL vom MALT-Typ eine Ausreifung der Tumorzellen zu Plasmazellen zu beobachten (sog. „sekretorische Differenzierung“, vgl. Abb. 6 und 7).

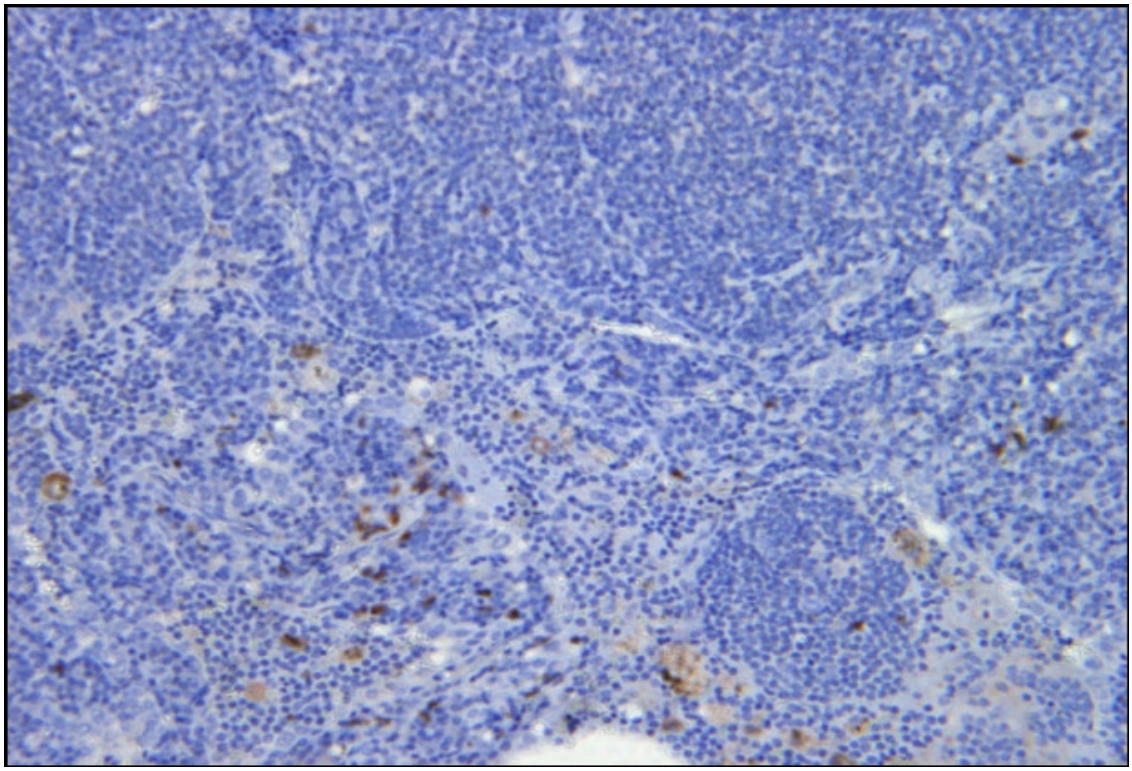


Abb. 6: Sekretorische Differenzierung und Leichtketten-Restriktion (Kappa, H/01/1668, 200x)

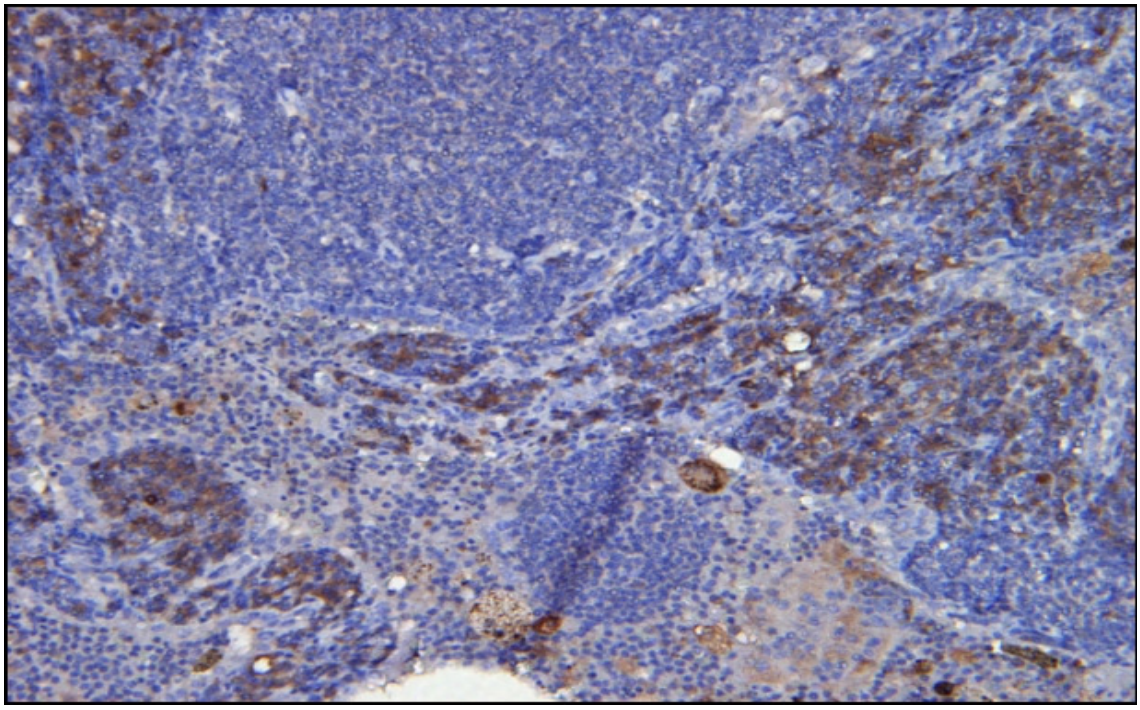


Abb. 7: Sekretorische Differenzierung und Leichtketten-Restriktion (Lambda, H/01/1668, 200x)

Eine solche Ausdifferenzierung hat für den Verlauf der Erkrankung offenbar keine Konsequenz, kann aber – wenn sie sehr ausgeprägt ist – Schwierigkeiten in der diagnostischen Abgrenzung zu anderen plasmazellulär differenzierten Tumoren bereiten [6].

Ungeklärt ist bislang die Frage, ob in eMZBCL vom MALT-Typ das Vorliegen genetischer Aberrationen, die zu einer Daueraktivierung des Zellzyklus und damit anhaltender Zellproliferation führen, eine solche plasmazelluläre Ausreifung verhindert. Von Untersuchungen an Follikulären Lymphomen ist bekannt, dass die dort häufig vorliegende Translokation t(14;18), die zu einer BCL2-Überexpression führt, eine Differenzierung zu Plasmazellen verhindert [8].

1.2.3. Genetik

In den eMZBCL vom MALT-Typ ist eine Reihe von rekurrenten genetischen Aberrationen bekannt [9], die offenbar aufgrund unterschiedlicher Mechanismen direkt in die Tumorgenese involviert sind. Interessanterweise sind insbesondere die bislang bekannten Translokationen t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21), t(1;14)(p22;q32) und t(3;14) (p14.1;q32) in den verschiedenen anatomischen Lokalisationen in sehr variabler, aber organspezifischer Frequenz nachweisbar.

In den eMZBCL vom MALT-Typ wird die Translokation t(11;18)(q21;q21) mit der höchsten Frequenz unter allen anatomischen Lokalisationen gefunden. Die Bruchpunkte liegen bei dieser Translokation sowohl auf Chromosom 11 als auch auf Chromosom 18 im Bereich der ersten Unterbande („1“) der 2.Hauptbande („2“) des langen Arms des Chromosoms („q“).

Von Chromosom 11 wird durch dieses chromosomale Bruchereignis das *API2*-Gen transloziert, welches eine Rolle bei der Signaltransduktion der antiapoptotischen Kaskade spielt, die vom Tumornekrosefaktor-Rezeptor II vermittelt wird. Auf Chromosom 18 ist das *MALT1*-Gen von der Translokation betroffen. Zusammen mit weiteren Molekülen (BCL10, CARMA1) ist das MALT1-Protein an der rezeptormediierten Aktivierung von NFκB in B- und T-Zellen beteiligt, die für die Proliferation, das Überleben und die Effektorfunktionen der Lymphozyten eine zentrale Rolle spielt.

Das durch die Translokation t(11;18)(q21;q21) entstehende chimäre Protein API2-MALT1 kann durch Auto-Oligomerisierung den physiologischen NFκB-Signalpfad kurzschließen und führt zu einer konstitutionellen NFκB-Aktivierung. Die Translokationen t(14;18)(q32;q21) und t(1;14)(p22;q32), die zu einer Fusion des *MALT1*- bzw. des *BCL10*-Gens mit dem Immunglobulinschwerkettenlokus führen, resultieren ebenfalls in einer anhaltenden Aktivierung dieses Signalpfades.
Die jüngste beschriebene Translokation t(3;14)(p14.1;q32) bringt das *FOXP1*-Gen unter die Regulation des Immunglobulinschwerketten-Promotors und bewirkt auf bislang nicht bekanntem Weg die Zellzyklusaktivierung.
Neben den Translokationen sind weitere strukturelle (1q21, 1p34) und numerische Chromosomenaberrationen (Trisomien 3, 7, 12 und 18) bekannt, die rekurrent in unterschiedlicher Häufigkeit in eMZBCL vom MALT-Typ vorkommen.

1.3. Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Serie von 60 primären eMZBCL des Bronchialsystems mit molekulargenetischen (Multiplex-RT-PCR, FISH) und immunhistochemischen Methoden bezüglich der bekannten rekurrenten chromosomalen Translokationen t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21), t(1;14)(p22;q32) und t(3;14)(p14.1;q32) analysiert.
Zusätzlich wurde durch immunhistochemische Färbungen die Expression des BCL10-Proteins, dessen Gen in die Translokation t(1;14)(p22;q32) involviert ist, bestimmt. Hintergrund war die Frage der Nutzbarkeit dieser immunhistochemischen Färbung als Surrogatmarker für das Vorliegen einer Translokation t(1;14)(p22;q32).
Schließlich wurden die Fälle der Serie bezüglich einer sekretorischen Differenzierung untersucht, und diese mit dem Vorliegen chromosomaler Aberration korreliert mit der Frage, ob eine translokationsbedingte konstitutionelle Zellproliferation eine sekretorische Ausdifferenzierung der Tumorzellen bei eMZBCL verhindert.

2. Material und Methoden

2.1. Tumorgewebe

60 konsekutive Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben von eMZBCL vom MALT-Typ aus den Jahren 1992 bis 2004 wurden im Register des Referenzzentrums für Lymphknotenerkrankungen der Universität Würzburg identifiziert und entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation von Tumoren der hämatopoetischen und lymphoiden Gewebe anhand von konventionellen (HE, Giemsa) und ergänzenden immunhistochemischen Färbungen (CD20, CD5, CD23, Ki67, Leichtketten, AE1/3) re-evaluiert.

2.2. Tissue microarray (TMA)

Ein TMA ist ein Paraffinblock, in dem zahlreiche schematisch geordnete Stanzzylinder aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben zusammengefasst sind. Ein TMA ermöglicht beispielsweise den Vergleich von Gen- und Proteinexpression in größeren Zahlen von Gewebeproben gleichzeitig, ohne dass die Fälle einzeln gefärbt werden müssen. Anwendung finden TMAs bei einer ganzen Reihe routinemäßiger Gewebeuntersuchungen, z.B. Immunhistochemie, mRNA-in-situ-Hybridisierung (ISH) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) [**10**, **11**, **12**, **13**].

Vor der Stanzung der Fälle dieser Studie wurde der Tumorzellgehalt anhand einer immunhistochemischen Färbung von CD20 erfasst, und die am besten geeigneten Tumorareale auf den korrespondierenden Paraffinblöcken markiert. Dann wurden jeweils 5 Gewebestanzen mit einem Durchmesser von 0,6 mm und einem Abstand von 1mm voneinander aus den 60 Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten eMZBCL vom MALT-Typ in den TMA überführt.
Um den jeweiligen Stanzzylinder seinem Ausgangsgewebe zuordnen zu können, wurde ein sog. „Spreadsheet“ erstellt, aus dem sowohl die Fallnummer der jeweiligen Probe als auch die Anordnung der Fälle im TMA entnommen werden können.

Die Stanzung selbst wurde mit einer manuellen Gewebestanze (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) durchgeführt, die eine mikrometergenaue Positionierung des Empfängerblocks erlaubte.

Voraussetzung für den Einschluss der verwendeten Gewebeblöcke in die Studie war eine Dicke des Gewebes von mindestens 2-3 mm; idealerweise sollten alle 300 Stanzzylinder des TMA gleich lang sein, um sicherzustellen, dass alle Schnitte Gewebe von allen Blöcken enthalten.

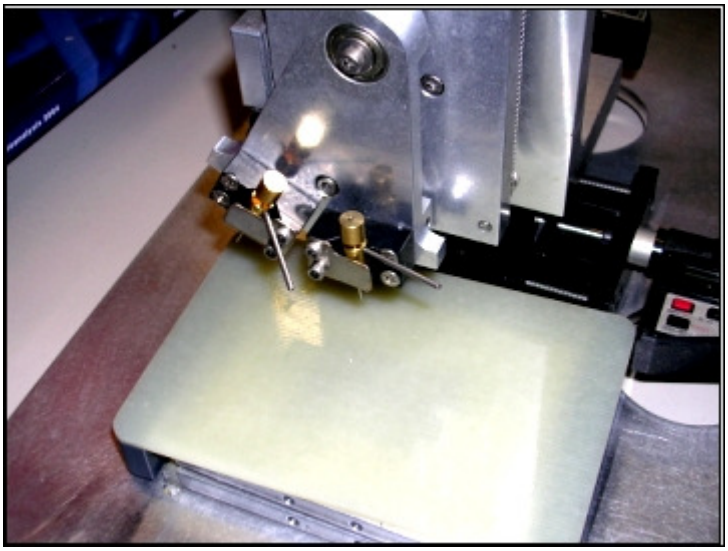


Abb. 8: Manuelle Gewebestanze zur Erstellung eines TMA

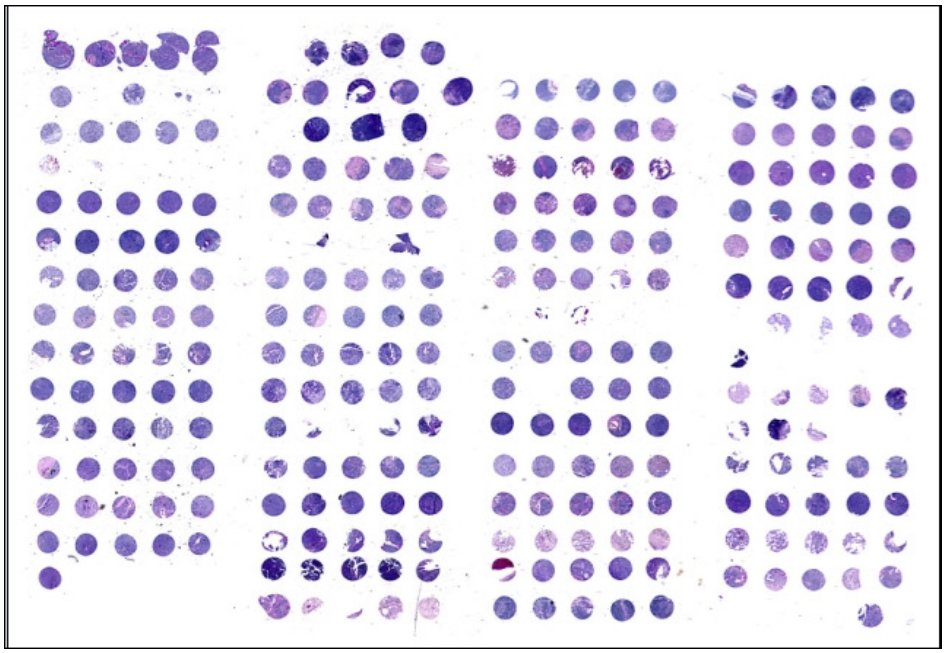


Abb. 9: Schnitt des TMA, HE, Übersichtsaufnahme

2.3. Immunhistochemische Färbungen

2.3.1. Allgemeines

Immunhistochemie (auch: Immunhistologie, Immunzytologie) ist die Darstellung antigener Strukturen (z.B. Tumorantigene) auf oder in Formaldehyd-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe oder fixierten Zellen. Das Prinzip dieser Methode ist die spezifische Bindung zwischen Antigen und Antikörper. In der praktischen Anwendung wird das zu untersuchende Präparat mit einer Lösung überschichtet, die entsprechende Antikörper gegen das im Präparat nachzuweisende Antigen enthält.

Verwendet werden entweder polyklonale Antiseren, die durch die Immunisierung von Tieren (Kaninchen, Ziege, Schaf, Schwein) mit gereinigten Antigenen (periodische Gewinnung des Serums; Nachteil: Kreuzreaktionen mit Epitopen anderer Antigene, welche zu unerwünschten Hintergrundreaktionen führt) hergestellt werden, oder monoklonale Antikörper, die durch die Fusion von in Kultur gezüchteten Tumorzellen (Myelomzellen; hohe Teilungsrate) mit Immunglobulin-produzierenden Milzzellen immunisierter Tiere erzeugt werden (als Zellkultur; kontinuierliche Produktion des selektionierten Antikörpers; Vorteil: ausschließlich gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet, folglich hohe Spezifität).

Komplizierend für die Anwendung antikörperbasierter Färbungen kann sein, dass die Gewebefixation zur Maskierung antigener Strukturen (Denaturierung oder Ausfällung von Proteinen) führt, weshalb eine Vorbehandlung der Schnittpräparate mit proteolytischen Enzymen (z.B. Trypsin, Pronase) oder mit Mikrowellen zur Demaskierung notwendig ist. Antikörper, die nur nicht-denaturierte Strukturen erkennen (z.B. verschiedene Lymphozytenmarker), können nur an Gefrierschnitten oder speziell präpariertem Gewebe (z.B. Periodat-Lysin-Paraformaldehyd-Fixation, Gefriertrocknung) angewendet werden.

Um im histologischen Schnittpräparat zu einer Färbereaktion zu führen, müssen die Antikörper markiert werden. Die Markierung kann auf verschiedene Weise erfolgen:

a) mit einem fluoreszierenden Farbstoff:

gibt nach Anregung durch Ultrablau- oder Ultraviolettstrahlung sichtbares Licht definierter Wellenlänge ab: der Antikörper wird nach der Antigenbindung unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen;

b) mit einem Enzym (z.B. Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase):

nach der Antigenbindung wird ein entsprechendes farbloses Substrat enzymatisch in einen unlöslichen (präzipitierenden) Farbstoff umgewandelt, der am Ort der Antikörperbindung lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann;

c) mit einer elektronendichten Verbindung:

dieses Verfahren dient der elektronenmikroskopischen Erfassung des Antigen-Antikörper-Komplexes; dazu wird der Antikörper entweder mit Ferritin, einem eisenreichen Protein, oder mit kolloidalem Gold versehenem Protein A (ein Membranprotein von Staphylococcus aureus) markiert.

Zum Nachweis der gebundenen Antikörper werden direkte und indirekte Nachweismethoden verwendet:

a) <u>direkte Methode</u>:

nach der Überschichtung der Gewebeschnitte mit einem in Lösung befindlichen, markierten Antikörper (der nicht gebundene Antikörperüberschuss wird nach kurzer Einwirkzeit ausgewaschen) wird das Gewebe mit der für die Markierungssubstanz geeigneten Methode untersucht (Licht-, Fluoreszenz- oder Elektronenmikroskopie);

b) <u>indirekte Methode</u>:

dabei wird der Antigen-Antikörper-Komplex im Gewebe indirekt, d.h. durch zusätzliche immunologische oder chemische Reaktionen, sichtbar gemacht. Hierzu werden meist Antikörper verwendet, die gegen den primären Antikörper gerichtet sind (sog. Sekundäre Antikörper; diese dürfen im Falle einer Gewinnung aus tierischem Serum nicht vom gleichen Tier stammen wie der primäre

Antikörper); diese sind entweder selbst markiert oder binden einen mit Markermolekülen versehenen Komplex als dritte Stufe der Reaktion.

Eine Sonderform ist die indirekte Methode mit Signalverstärkung; dabei kommt es durch den sequenziellen Ablauf mehrerer Reaktionen zu einer kaskadenartigen Verstärkung des Nachweissignals (Amplifikation; z.B. Verwendung eines biotinylierten sekundären Antikörpers, der von einem Komplex von Avidin und einem biotinylierten Enzymmarker erkannt wird).

2.3.2. Angewandte Methode und durchgeführte Färbungen

Nach Herstellung der Schnitte aus dem TMA wurden diese auf mit (3-Aminopropyl-) Triethoxysilan (mind. 98 %) beschichtete Objektträger aufgezogen, um dann über Nacht bei Raumtemperatur (RT) zu trocknen. Daraufhin wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Das anschließende Kochen im Dampfdrucktopf erfolgte mit Zitronensäure (10 mM, pH 5,5) für 5 Minuten bei 125°C.

Im Anschluss daran wurden die Schnitte in Phosphatpuffer (PBS) überführt. Die eigentliche Färbung erfolgte mit dem Histostain®- PLUS Bulk Kit (Broad Spectrum)[1] (Zymed Laboratories, Inc., S. San Francisco, California, USA). Dazu wurden die Schnitte zunächst 15 Minuten mit Blockerlösung behandelt, um dann für eine Stunde mit dem primären Antikörper (AK) überschichtet zu werden, bevor die überschüssigen, nicht gebundenen AK mit PBS (pH 7,4) abgespült wurden. Anschließend erfolgte die Überschichtung mit dem biotinylierten sekundären AK für 20 Minuten, woraufhin ebenfalls mit PBS (pH 7,4) gespült wurde, um die überschüssigen AK abzuwaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für 20 Minuten mit Streptavidin-POX (an Streptavidin[2] konjugierte Peroxidase) behandelt und anschließend ein weiteres Mal mit PBS (pH 7,4)

[1] Enthält: Reagenz A: 110 ml gebrauchsfertige Serumblockerlösung; davon sind 10 % nicht immunisiertes Ziegenserum
Reagenz B: 110 ml gebrauchsfertiger biotinylierter sekundärer Antikörper
Reagenz C: 110 ml gebrauchsfertige, an Streptavidin konjugierte Meerrettichperoxidase

[2] Tetramerisches Protein, das sehr gut an Biotin, ein kleines Molekül, bindet

gespült. Der Färbung mit 3,3`-Diaminobenzidin DAB für 10 Minuten folgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun[3].

Im histologischen Schnittpräparat erschien die durch den Antikörper erkannte Zielstrukur dunkelbraun, bei Negativität blau durch die Gegenfärbung.

Die nach dieser Methode im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Färbungen waren:

- CD 20 (B-Zell-Marker; Dako Cytomation GmbH, Hamburg, Germany);
- CD 5 (T-Zell-Marker; Novocastra Laboratories Ltd, Dossenheim, Germany);
- CD 79a (B-Zell-Marker; Dako Cytomation GmbH, Hamburg, Germany);
- kappa, lambda (Ig-Leichtketten; Dako Cytomation GmbH, Hamburg, Germany);
- BCL10 (Zytomed GmbH, Berlin, Germany);
- FOXP1 (von A. Banham, Oxford, Großbritannien zur Verfügung gestellt)
- IgD (Dako Cytomation, Hamburg, Germany).

Die immunhistochemischen Färbungen wurden lichtmikroskopisch ausgewertet, weshalb die Ergebnisse in semiquantitativer Form erfasst wurden.

2.4. PCR-basierter Nachweis der Translokation t(11;18)(q21;q21)

Der Nachweis der Translokation t(11;18)(q21;q21) lässt sich in folgende Schritte gliedern:

1. RNA-Extraktion aus Paraffinmaterial
2. DNase I-Digestion
3. Polymerasekettenreaktion PCR
4. GeneScan®-Elektrophorese

2.4.1. RNA-Extraktion aus Paraffinmaterial

Für die RNA-Extraktion wurden von jedem Block 1-2 10-20 µm dicke Schnitte – abhängig von der Materialgröße – geschnitten und in autoklavierte 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben [s. Anhang 7.3.1.].

[3] Mischung aus Hämatoxylin und Alaun im Verhältnis 1:50; Blaufärbung von Zellkernen

Zur Entparaffinierung wurde 1 ml Xylol in jedes Röhrchen pipettiert und bei RT 20 Minuten unter Bewegung inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen 5 Minuten bei RT mit maximaler Rotationsgeschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert und das Xylol entfernt. Anschließend wurden die Sedimente dreimal je 3 Minuten mit jeweils 1 ml 100%igem Alkohol bei RT unter Bewegung gewaschen. Nach einer fünfminütigen Lufttrocknung bei RT wurde ein Proteinase K-Verdau vorbereitet.

Dazu wurden in jedes Zentrifugenröhrchen je 100 µl Proteinase K-Digestionspuffer (PKDB) und 5 µl Proteinase K pipettiert. Anschließend wurde bei 45°C mindestens 10 Minuten, maximal 2 Stunden inkubiert.

Im Anschluss daran wurden in jedes Zentrifugenröhrchen je 600 µl RNA-Extraktionspuffer gegeben (ohne die bereits enthaltene Lösung zu entfernen), die Röhrchen wurden gevortext und dann 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 700 µl Phenolchloroform aus der Phenolphase wurden die Zentrifugenröhrchen erneut gevortext, 5 Minuten bei RT inkubiert und 5 Minuten bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase jedes Röhrchens in ein frisches 1,5 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Um auch geringe Mengen RNA zu extrahieren, wurde je 1 µl lineares Acrylamid hinzugefügt.

Nach Zugabe eines zu der überführten wässrigen Phase gleichen Volumens Isopropanol wurde mindestens 30 Minuten oder über Nacht bei -20°C inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Röhrchen bei 4°C für 15 Minuten bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert. Anschließend wurden je 500 µl 75%iger Alkohol zugegeben, gevortext und erneut 5 Minuten bei 4°C und maximaler Rotationsgeschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert. Nach Entfernung des Alkohols wurden die erhaltenen Pellets 5 Minuten luftgetrocknet. Schließlich wurde die extrahierte RNA entweder in 10 µl RNA Storage Solution™ resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt, oder gleich die DNase I-Digestion angeschlossen [s. Anhang 7.4.1.].

2.4.2. DNase I-Digestion

Auf Eis wurde in jedes Zentrifugenröhrchen

- 10 µl RNA Storage Solution™ (falls noch nicht wie oben beschrieben hinzugefügt)

- 7 µl Nuclease-freies Wasser
- 2 µl 10x DNase I- Reaktionspuffer
- 1 µl DNase I (2 U/µl)

pipettiert und bei 37°C 15 Minuten inkubiert.
Nachdem die Röhrchen kurz zentrifugiert worden sind, damit sich die festen Bestandteile am Boden sedimentieren, wurden je 80 µl Nuclease-freies Wasser und 100 µl der Phenolphase von Phenolchloroform hinzugegeben, gevortext und anschließend bei RT 5 Minuten bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde jeweils die wässrige Phase in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt, jeweils 1 µl lineares Acrylamid und 10 µl 3M Sodiumacetat pH4,5 hinzupipettiert und gevortext. Nach Zugabe von Isopropanol in einem Volumen, das dem der wässrigen Phase entsprach, wurde 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Darauf folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 4°C und maximaler Rotationsgeschwindigkeit (14.000 rpm). Nach Abpipettieren der Flüssigkeit wurden die Pellets mit je 500 µl 75%igem Alkohol gewaschen, kurz gevortext und 5 Minuten bei 4°C und maximaler Rotationsgeschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert. Die Pellets wurden schließlich nach Entfernen des Alkohols 1 Minute bei RT luftgetrocknet, mit je 10 µl RNA Storage Solution™ resuspendiert und bei -20°C bis zum nächsten Schritt gelagert [s. Anhang 7.3.1.].

2.4.3. Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Das Prinzip der RT-PCR beruht auf der Herstellung von cDNA aus mRNA bestimmter Gensequenzen, welche durch „sense“ (hier: PA1-6, AC1, AC3) und „antisense“ (hier: PM1-6, AC2, AC4) Primer detektiert und anschließend amplifiziert werden [[9]].
Verwendet wurde ein Primus 96 (Authorized Thermal Cycler For PCR), MWG-BIOTECH AG.

2.4.3.1. 1.Zyklus (Multiplex One-Tube RT[4]-PCR)

Zur Vorbereitung wurden sowohl die extrahierte RNA als auch die Positivkontrolle (ein t(11;18)(q21;q21) positiver Fall) 5 Minuten bei 70°C zur Denaturierung erhitzt und dann auf Eis gestellt.

Für die RT-PCR wurden 2 Master-Mixes (MM) pipettiert – einer, der die Primer zum Nachweis von β-Aktin enthält (MM AC1/2), um Qualität und Integrität der extrahierten RNA beurteilen zu können, und ein zweiter mit den Primern zum Nachweis der Translokation (MM I).

Nachdem Pipetten, passende Einwegspitzen, 2 autoklavierte 1,5 ml-Eppendorf-Zentrifugenröhrchen (für die MM), eine ausreichende Menge Aqua bidestillata (Aqua bidest.) und eine entsprechende Anzahl PCR-Röhrchen ca. 7-10 Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden sind, wurden zunächst die Master-Mixes vorbereitet. Für den MM I wurden entsprechend der Anzahl der Proben inklusive Positiv-, Negativkontrolle und 2 Reserven je

- 2,5 µl AmpliTaq Buffer II (enthält kein $MgCl_2$)
- 3,6 µl $MgCl_2$
- 2,5 µl dNTP (aus je 12,5 µl ATP, CTP, GTP und TTP + 950 µl Aqua bidest.)
- 0,2 µl RNasin (RNase-Inhibitor; 40 U/µl)
- 0,25 µl Reverse Transkriptase (RT; 200 U/µl)
- 0,2 µl AmpliTaq Gold® (thermostabile DNA-Polymerase; 5 U/µl)
- 0,2 µl PA1[5]
- 0,2 µl PA3[5]
- 0,2 µl PA5[5]
- 0,2 µl PM2[6]
- 0,2 µl PM4[6]
- 0,2 µl PM6[6]
- 5,55 µl Aqua bidest.

zusammen pipettiert.

[4] Reverse Transkriptase
[5] 20 pmol/µl; verdünnt mit Glycerin
[6] 50 pmol/µl; verdünnt mit Glycerin

Für den MM AC1/2 wurden entsprechend der Anzahl der Proben inklusive Positiv-, Negativkontrolle und 2 Reserven je

- 2,5 µl AmpliTaq Buffer II
- 3,6 µl $MgCl_2$
- 2,5 µl dNTP
- 0,2 µl RNasin
- 0,25 µl RT
- 0,2 µl AmpliTaq Gold®
- 0,2 µl AC1[5]
- 0,2 µl AC2[5]
- 6,35 µl Aqua bidest.

zusammen pipettiert.

Anschießend wurden die MM auf die PCR-Röhrchen verteilt - je 16 µl – und je 4 µl der extrahierten RNA bzw. 2 µl Aqua bidest. bzw. 0,8 µl der Positivkontrolle (H/99/9207) hinzupipettiert.

Das Programm des 1.Zyklus der RT-PCR bestand aus:

- 45minütiger Inkubation bei 37ºC initial
- 13minütiger Inkubation bei 95ºC zur Inaktivierung der RT genauso wie zur Aktivierung der DNA-Polymerase
- anschließend 35 Zyklen:

  30 Sekunden bei 95ºC,

  30 Sekunden bei 50ºC,

  45 Sekunden bei 72ºC.

Nach dem Durchlaufen des 1.Zyklus konnten die Proben entweder bei -20ºC gelagert, oder es konnte gleich mit dem 2.Zyklus fortgefahren werden [s. Anhang 7.3.2.].

2.4.3.2. 2.Zyklus (Multiplex Nested PCR)

Zuerst wurden sämtliche Proben des 1. Zyklus 1:500 verdünnt. Dazu wurden 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen zunächst mit UV-Licht bestrahlt, dann wurden je 998 µl Aqua bidest. (ebenfalls bestrahlt) mit 2 µl der jeweiligen Probe pipettiert.

Für den 2. Zyklus wurden wiederum Pipetten, passende Einwegspitzen, 4 autoklavierte 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen (für die MM), eine ausreichende Menge Aqua bidest. und eine entsprechende Anzahl PCR-Röhrchen ca. 7-10 Minuten mit UV-Licht bestrahlt, bevor die 4 Master-Mixes (MM AC3/4, I, II, III) pipettiert werden konnten.

Der MM AC3/4 setzte sich wie folgt zusammen (Mengenangabe je Probe inklusive Positiv-, Negativkontrolle und 2 Reserve):

- 2 µl AmpliTaq Buffer II
- 3,6 µl $MgCl_2$
- 2,5 µl dNTP
- 0,15 µl AmpliTaq Gold®
- 0,2 µl AC3[6]
- 0,2 µl AC4[6]
- 9,35 µl Aqua bidest.

Die MM I, II und III hatten die gleiche Basiszusammensetzung, nämlich je Probe inklusive Positiv-, Negativkontrolle und 2 Reserve:

- 2 µl AmpliTaq Buffer II
- 1,2 µl $MgCl_2$
- 2,5 µl dNTP
- 0,15 µl AmpliTaq Gold®
- 0,2 µl PM1[6]
- 0,2 µl PM3[6]
- 0,2 µl PM5[6]
- 11,35 µl Aqua bidest.

Zusätzlich wurden zum MM I 0,2 µl PA2 (50 pmol/µl; verdünnt mit Glycerin), zum MM II 0,2 µl PA4 (50 pmol/µl; verdünnt mit Glycerin) und zum MM III 0,2 µl PA6 (50 pmol/ µl; verdünnt mit Glycerin) pipettiert.

Für die RT-PCR wurden nun je 16 µl MM und 2 µl cDNA (1:500) in PCR-Röhrchen pipettiert.

Die Amplifikation im 2. Zyklus bestand aus:

- 13minütiger Inkubation bei 95ºC,
- anschließend 35 Zyklen:

30 Sekunden bei 95ºC,

59 Sekunden bei 55ºC,

59 Sekunden bei 72ºC.

Nach Beendigung des 2. Zyklus konnten die PCR-Produkte entweder zunächst bei -20ºC gelagert oder gleich zur Ergebniskontrolle via Gelelektrophorese im GeneScan® aufgetragen werden

[s. Anhang 7.3.2.].

Abb. 10: PCR-Maschine, beschriftete Caps

2.4.4. Gelelektrophorese mit GeneScan® 3.1

Das Prinzip ist die direkte Sequenzierung der amplifizierten PCR-Produkte durch Elektrophorese (Auftrennung der geladenen Moleküle nach Molekulargewicht mittels Gleichstrom).

Sequenziert werden die Produkte des 2. Zyklus, 3 Primer-Reaktionen und 1 Aktin-Reaktion.

Verwendet wurde der ABI Prism 377XL collection, ABI 377 DNA Sequenzer, Applied Biosystems, Foster City, USA.

2.4.4.1. Durchführung

Für die Gelelektrophorese mit dem GeneScan® wurde eine Gellösung zwischen 2 Glasplatten gegossen, die nach einiger Zeit polymerisierte. Nach Polymerisation des Gels wurden die Platten in die Maschine eingehängt. Eine Puffermischung aus 300 ml 5xTBE[7] und 1200 ml entionisiertem Wasser wurde auf die Pufferkammern verteilt, bevor die obere an den positiven und die untere an den negativen Pol des Gleichstroms angeschlossen wurden.

Das 4,5%ige Polyacrylamid-Gel bestand aus:

- 18 g Urea (Harnstoff)
- 20 ml Aqua bidest.
- 10 ml 5xTBE
- 5,625 ml Acrylamid
- 250 µl APS[8]
- 30 µl TEMED[9].

Bevor die Proben aufgetragen werden konnten, wurden je 1,9 µl der Probe mit 2 µl GeneScan®-Mischung (hergestellt aus: 110 µl Formamid, 30 µl Blaupuffer und 10 µl Größenstandard)[10] auf einer Mikrotiterplatte zusammen pipettiert. Bei 98ºC wurden die Proben auf dem Heizblock 7 Minuten lang denaturiert und anschließend bis zum Auftragen auf Eis gestellt.

Zur Auftragung der Proben wurde zunächst ein Auftragungskamm mit den Zacken in das Gel im Bereich der vorgeformten „Tasche“ eingesteckt, so dass die Zacken minimal ins Gel reichten. Nun wurden 1,2 µl der denaturierten, mit der GeneScan®-Mischung versetzten Probe mit einer PrismPette™ (Sorenson, BioScience, Inc.) mit den entsprechenden Spitzen in die Lücken zwischen 2 Zacken pipettiert – zunächst die ungeraden (Reaktion 1-3), nach 2 Minuten Laufzeit die geraden Spuren (Aktin).

Um bei der Auswertung die jeweilige Spur der darauf aufgetragenen Probe zuordnen zu können, wurde ein Sample Sheet geschrieben.

---

[7] Für 5 l: 270 g Tris ($C_4H_{11}NO_3$), 137,5 g Borsäure, 20,75 g EDTA (=Ethylendiamintetraessigsäure); aufgefüllt mit Aqua bidest. auf 5 l

[8] Ammoniumpersulfat ($H_8N_2O_8S_2$) 10% (M=228,2 g/mol)

[9] N,N,N`,N`-Tetramethylethylenediamine

[10] GeneScan™-350 ROX™ Size Standard, Applied Biosystems, Warrington, UK

2.4.4.2. Auswertung

Die Bruchpunkte bei der Translokation t(11;18)(q21;q21) liegen sowohl auf Chromosom 11 als auch auf Chromosom 18 im Bereich der ersten Unterbande („1“) der 2. Hauptbande („2“) des langen Arms des Chromosoms („q“).

Von Chromosom 11 wird durch dieses chromosomale Bruchereignis das *API2*-Gen transloziert, welches eine Rolle bei der Signaltransduktion der antiapoptotischen Kaskade spielt, die vom Tumornekrosefaktor-Rezeptor II vermittelt wird.

Innerhalb dieses Gens sind vier Bruchpunkte beschrieben: bei 1203 Basenpaaren (bp; A1203, detektiert durch die Primer PA1 und PA2), bei 1446 bp (A1446, detektiert durch PA3 und PA4) und bei 1701 bzw. 1743 bp (A1701 bzw. A1743, detektiert durch PA5 und PA6) [**14**; bzw. s. Anhang 7.4.].

Auf Chromosom 18 ist das *MALT1*-Gen bei dieser Translokation betroffen, das eine wesentliche Rolle in der NFkB-Signalkaskade spielt. Es weist Homologien mit dem Immunglobulin-ähnlichen Bereich von CD22β, der Laminin-α3b-Untereinheit und des F22D3.6 von Caenorhabditis elegans auf. Auch für *MALT1* sind vier mögliche Bruchpunkte beschrieben: bei 541 bp (M541, detektiert durch PM1 und PM2), bei 814 bp (M814, detektiert durch PM3 und PM4) und bei 1123 bzw. 1150 bp (M1123 bzw. M1150, detektiert durch PM5 und PM6) [**14**].

Auf dem Gelbild waren die API2-MALT1-Fusionsprodukte in Form blauer Banden der jeweiligen Größe (bp) nachweisbar [s. Anhang 7.5.].

Die Bestimmung von β-Aktin dient dem Nachweis ausreichender Quantität und Integrität der extrahierten RNA (interne Positivkontrolle). Auf dem Gelbild wurde das Aktin in Form grüner Banden bei ca. 189 bp sichtbar (alle angegebenen Größen $\pm$ 2 bp).

Der in jeder Spur mitlaufende Größenstandard (mit Produkten von 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340 und 350 bp) wurde als rote Banden an definierten Stellen erkennbar, anhand derer die Größe der blauen und grünen Produkte bestimmt werden konnten.

Für die Auswertung der auf dem Sequencer (ABI Prism 377XL collection, ABI 377 DNA Sequenzer, Applied Biosystems, Foster City, USA) erzeugten Elektropherogramme wurde das Computerprogramm GeneScan Analysis Software 3.1 verwendet.

Abb. 11: Vorbereitung des GeneScan®

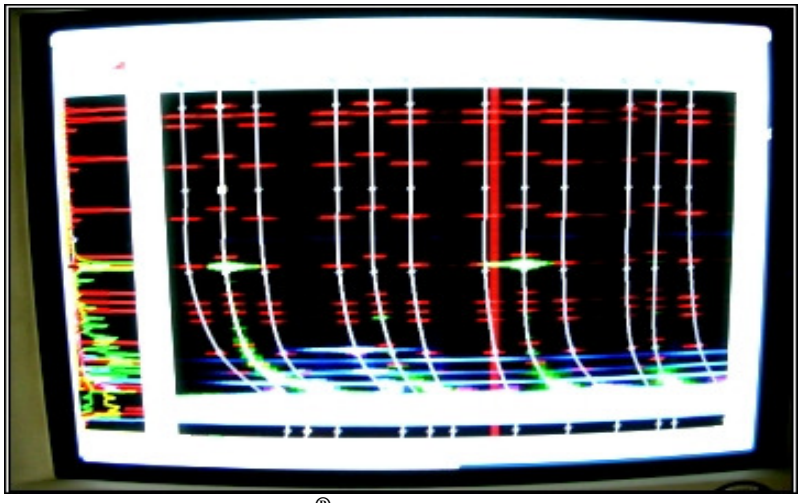


Abb. 12: Auswertung des GeneScan®

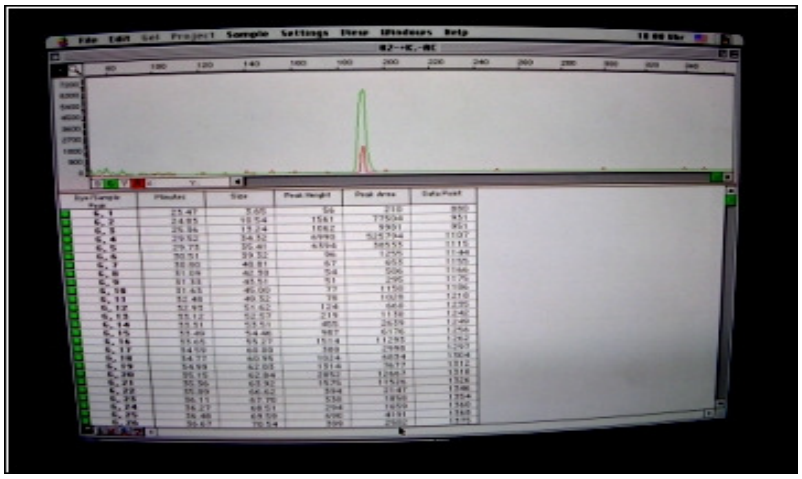


Abb. 13: Auswertung des GeneScan®

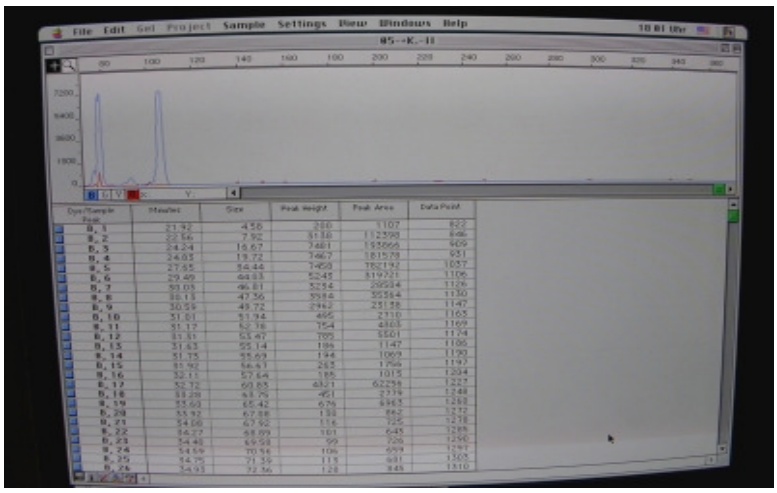


Abb. 14: Auswertung des GeneScan®

2.5. Untersuchung anderer mit eMZBCL assoziierter chromosomaler Aberrationen

Neben der Translokation t(11;18)(q21;q21) sind weitere Chromosomenaberrationen - sowohl strukturelle als auch numerische - beschrieben, die rekurrent in unterschiedlicher Häufigkeit in eMZBCL gefunden werden [**9,15**]:

Die Translokation t(14;18)(q32;q21) führt zu einer Fusion von *MALT1* mit dem Immunglobulinschwerkettenlokus. In eMZBCL der Lunge ist sie in den bislang beschriebenen kleinen Serien untersuchter Fälle mit einer Häufigkeit von 6,7 % nachweisbar. Am häufigsten wurde sie in eMZBCL des Auges (24,3 %) gefunden.

Die Translokation t(1;14)(p22;q32), die in einer Fusion des *BCL10*-Gens mit dem Ig-Schwerketten-Gen resultiert, fand sich in eMZBCL der Lunge mit einer Häufigkeit von 6,7 %; am häufigsten war sie in eMZBCL des Intestinaltraktes mit 12,5 % nachweisbar.

Die Translokation t(3;14) (p14.1;q32), die das *FOXP1*-Gen unter den Einfluss von IgH bringt, war in eMZBCL der Lunge nicht nachweisbar, die größte Häufigkeit wiesen eMZBCL der Schilddrüse mit 50 % auf.

Trisomie 3 konnte in eMZBCL der Lunge in 20 % nachgewiesen werden, während sie am häufigsten in eMZBCL der Speicheldrüse mit 54,8 % zu finden war.

2.5.1. FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung)

2.5.1.1. Methodik

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist eine molekulargenetische Methode, um strukturelle bzw. numerische Chromosomenaberrationen mittels fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden nachzuweisen, wobei der Vorteil gegenüber der klassischen Zytogenetik in der Verwendbarkeit von Zellen in der Interphase liegt, also keine Tumormetaphasen benötigt werden.

Die Ziel-DNA muss für die Hybridisierung der Sonden als Einzelstrang vorliegen, weshalb der erste Schritt die Hitzedenaturierung ist. Die Renaturierung erfolgt dann mit markierten DNA-Sonden, die homolog zu dem zu markierenden DNA-Abschnitt sind; als Marker kann z.B. Biotin verwendet werden, das als Biotin-16-dUTP in den Doppelstrang eingebaut wird.

Als dritter Schritt folgt die Detektion der eingebauten markierten Nukleotide; dies erfolgt mit Antikörpern, die spezifisch das verwendete Markermolekül erkennen (im Fall von Biotin wird Avidin verwendet, welches eine hohe Bindungsspezifität zu Biotin besitzt, die vergleichbar ist mit einer Antigen-Antikörper-Bindung). Diese Antikörper sind an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt (z.B. FITC-Avidin = Avidin mit Fluoresceinisothiocyanat), um so die Lokalisation der gebundenen Markermoleküle unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen zu können.

Zur Signalverstärkung kann auch ein zweistufiges Nachweisverfahren eingesetzt werden, bei dem mehrere Sekundärantikörper an jeden einzelnen primären Antikörper binden:

1. Stufe: Überschichtung mit biotinyliertem Anti-Avidin-AK (Antikörper gegen Avidin, der mit Biotin gekoppelt ist);
2. Stufe: nochmalige Überschichtung mit signalgebenden Avidinkonjugaten.

Der Vorteil dieses zweistufigen Verfahrens gegenüber dem einstufigen ist die erheblich gesteigerte Sensitivität.

Die Auswertung erfolgt dann an einem Fluoreszenzmikroskop, das mit einem der Emissionswellenlänge des verwendeten Fluorochroms entsprechenden Anregungsfilter ausgestattet ist.

Auf diese Weise ist es möglich, sowohl einzelne ganze Chromosomen (durch sog. Painting-Sonden) als auch nur spezielle Teile der Chromosomen (Zentromer-, Telomer- oder Gen-Sonden) im Interphasekern zu lokalisieren und somit gezielt nach bekannten Translokationen zu suchen [[16]].

2.5.1.2. FISH-basierter Nachweis von chromosomalen Translokationen und Trisomien

Zum Nachweis von genetischen Bruchereignissen – in der vorliegenden Arbeit im *MALT1*-, *FOXP1*- und *IgH*-Genlokus - wurden flankierende Sondensets verwendet. Diese Gensonden sind homolog zu dem gesuchten Gen benachbarten Regionen.
Für den *FOXP1*-Genlokus (3p13) wurden fluorochrommarkierte flankierende Sonden der BAC-Klone RP11-118011, RP11-1031N18 und RP11-430J3 als Telomersonden sowie RP11-154H23, RP11-321A23 und RP11-266022 als Zentromersonden verwendet.
Die Analyse chromosomaler Bruchereignisse im *MALT1*- sowie im Immunglobulin-schwerkettenlokus und numerischer Aberrationen von Chromosom 3 wurde mit kommerziell erhältlichen Sonden der Firma VYSIS durchgeführt (LSI® MALT 1 (18q21) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe; 32-190055 bzw. LSI® IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe; 32-191019, bzw. CEP 3 Spectrum Orange Probe 32-130003).

Die TMA-Schnitte wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in Xylol entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 % und 70 % EtOH) bei RT rehydriert. Anschließend erfolgte das Dampfkochen in Tris/EDTA-Puffer (pH 9,0) bei 100 °C für 5 Minuten.
Zur Entfernung der enthaltenen RNA wurde dann ein RNase-Verdau (100 µg/ml in 2 x SSC) bei 37 °C für 1 Stunde durchgeführt. Danach wurden die Schnitte mit 2 x SSC (pH 7,0) bei RT für 10 Minuten gewaschen.
Anschließend wurden die Strukturproteine mit Pepsin (50 µg/ml in 0,01 M HCl) bei 37 °C für 10 Minuten verdaut. Um den Pepsin-Verdau zu stoppen, wurden die Schnitte für 10 Minuten in 1xPBS gegeben und anschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 % und 100 % EtOH) je 5 Minuten bei RT entwässert.

Nach dem Trocknen der Schnitte für 20 Minuten bei RT erfolgte in Dunkelheit die Hybridisierung. Dazu wurde pro Schnitt 7 µl LSI® Hybridisierungspuffer, 2 µl Aqua destillata (Aqua dest.) sowie 1 µl Sondenlösung in ein 1,5 ml Röhrchen pipettiert, abzentrifugiert und gevortext, auf den Schnitt pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die TMA-Schnitte mit der aufgebrachten Sonde wurden auf einem Heizblock bei 80 °C für 10 Minuten denaturiert und anschließend bei 37 °C für 12-16 Stunden (über Nacht) in einer feuchten Kammer hybridisiert.
Am nächsten Tag wurden die Schnitte - ebenfalls im Dunkeln - nach Entfernung des Fixogums und des Deckglases in einer Waschlösung (95 ml Aqua dest., 2 ml 2 x SCC und 300 µl NP-40 (pH 7,0-7,3)) bei 70-73 °C für 3 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe von 70 %, 90 % und 100 % je 4 Minuten bei RT entwässert, getrocknet (15 Minuten bei RT) und anschließend mit 1 Tropfen Vectashield® Eindeckmittel (etwa 1-1,5 ml Vectashield® Mounting Medium und 0,75 µl DAPI-Stammlösung) eingedeckt.

2.5.1.3. Auswertung

Mit der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden die 60 in einem TMA zusammengefassten eMZBCL-Fälle, die auch bezüglich des Vorliegens der Translokation t(11;18)(q21;q21) mittels Multiplex-PCR analysiert worden sind, auf das Vorliegen eines genetischen Bruchereignisses im *MALT1*- und *FOXP1*-Genlokus untersucht. Die Auswertung erfolgte mit einem „Cut off“ von 10 %, d.h. das Vorliegen des betreffenden Bruchereignisses wurde angenommen, wenn mindestens 10 % der Zellen ein Auseinanderweichen der kolokalisierten Signale aufwiesen. Die Definition des „Cut off“ erfolgte anhand der Untersuchung von 5 reaktiven Lymphknoten und wurde festgelegt als Mittelwert der Anzahl von Zellen mit Auseinanderweichen der Sondensignale in den untersuchten Fällen plus drei Standardabweichungen.

3. Ergebnisse

3.1. Detektion der Translokation t(11;18)

3.1.1. Multiplex-RT-PCR-basierter Nachweis

Insgesamt sollten 60 Fälle von eMZBCL vom MALT-Typ aus dem Zeitraum von 1992 bis 2004 auf das Vorliegen der t(11;18) mittels RT-PCR untersucht werden. Abzüglich der 7 Fälle, die entweder nicht mehr genug Material für die Untersuchung aufwiesen bzw. von denen nicht ausreichend RNA zur Untersuchung extrahiert werden konnte, blieben 53 Fälle zur Auswertung [s. Anhang 7.4.].
Von diesen waren in 11 Fällen (21 %) spezifische Amplifikate in der RT-PCR nachweisbar, die das Vorhandensein einer t(11;18) belegten [s. Anhang 7.5.1.].

3.1.2. FISH-basierte Analyse von Bruchereignissen im *MALT1*-Genlokus

Ergänzend zur PCR-basierten Detektion des *API2-MALT1*-Fusionsgens wurde eine FISH-Analyse der in eMZBCL vom MALT-Typ am häufigsten beschriebenen genetischen Translokation durchgeführt. Von 60 Fällen waren 42 auswertbar (70 %). 17 Fälle von diesen (40,5 %) waren positiv für ein Bruchereignis im *MALT1*-Genlokus [vgl. Abb. 15] und 17 negativ (40,5 %). 8 Fälle (19 %) waren negativ, wiesen aber eine Amplifikation des Genlokus auf [s. Anhang 7.5.2.3.].

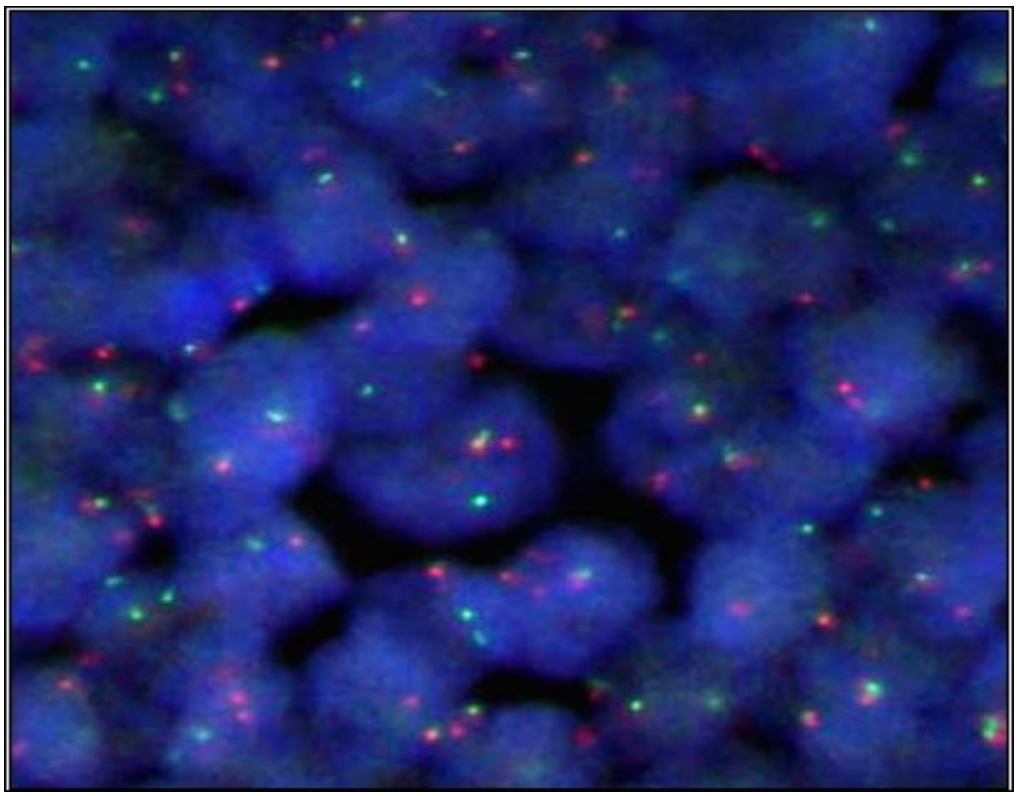


Abb. 15: FISH-Analyse der *MALT1*- Break Apart Sonde in einem Fall mit Bruchereignis im *MALT1*- Genlokus: in zahlreichen Zellen ist ein Auseinanderweichen der beiden den Genlokus flankierenden Gensonden zu erkennen.

3.1.3. Korrelation von Molekularbiologie und FISH bezüglich der t(11;18)

Der direkte Vergleich der in der Multiplex-RT-PCR bezüglich der t(11;18) positiven Fälle mit dem durch FISH nachgewiesenen Bruchereignis im *MALT1*-Lokus im Sinne einer internen Kontrolle ergab folgende Ergebnisse:

Zwei der 11 Fälle, die positiv für die t(11;18) in der RT-PCR waren, wiesen in der FISH-Analyse keinen Bruch im *MALT1*-Genlokus auf, weshalb hier von einem falsch positiven Ergebnis in der PCR bzw. einem falsch negativen Ergebnis in der FISH ausgegangen werden muss.

Von den 17 Fällen, bei denen ein Bruchereignis im *MALT1*-Lokus detektiert werden konnte, wurden alle mittels der Multiplex-RT-PCR untersucht. Dabei wiesen 6 eine t(11;18) auf (35 %).

3.2. FISH-basierte Analyse sowie immunhistochemische Analyse von *FOXP1*

In der FISH-Analyse von Bruchereignissen im *FOXP1*-Genlokus konnten 43 Fälle ausgewertet werden (72 %), die sämtlich kolokalisierte Signale der den Genlokus flankierenden Sonden zeigten [vgl. Abb. 17]. Für eine *FOXP1*-involvierende genetische Translokation t(3;14) fand sich somit in keinem der Fälle ein Hinweis [s. Anhang 7.5.2.1.].

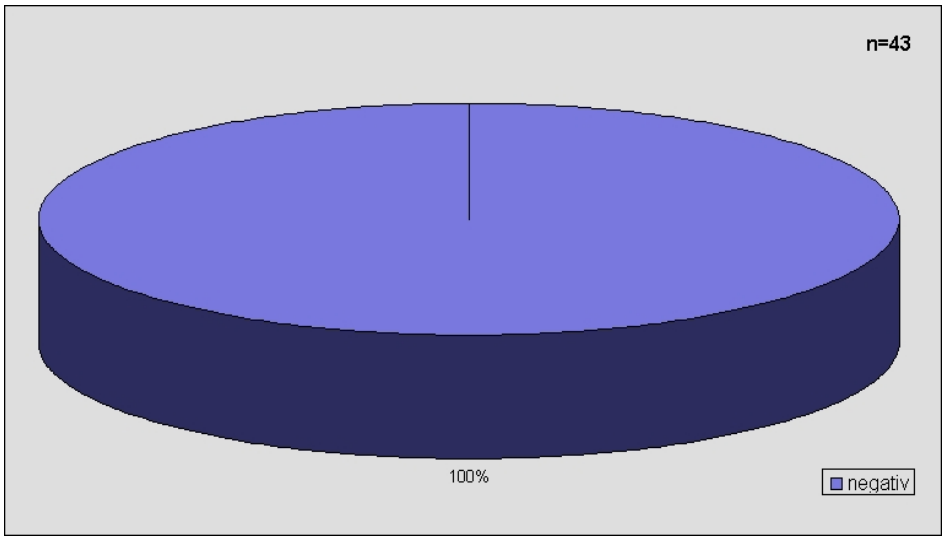


Abb. 16: Ergebnisse für FOXP1-BAP

Die numerische Untersuchung des *FOXP1*-Genlokus ergab in 28 der 43 auswertbaren Fälle (65 %) 2 Signale pro Zellkern, in 10 Fällen (23 %) 3 Signale und in 5 Fällen (12 %) teils 3, teils 4 Signale, als Hinweis auf eine Trisomie/Tetrasomie 3 [s. Anhang 7.5.2.2.].

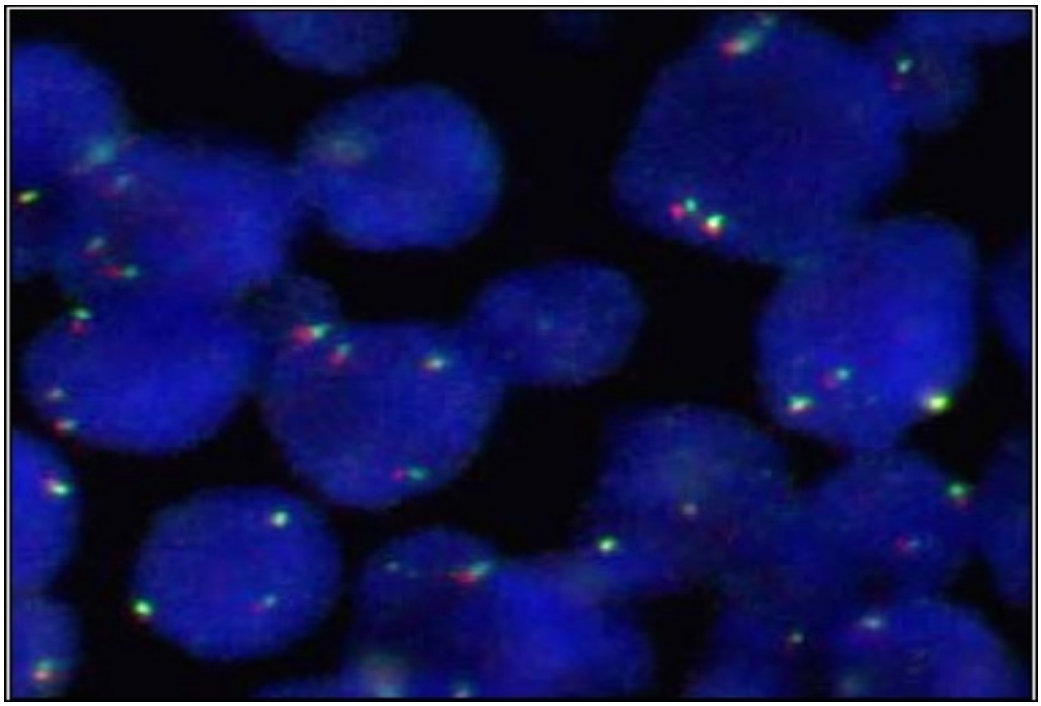


Abb. 17: FISH der numerischen Untersuchung des *FOXP1*- Genes. Es konnten nur kolokalisierte Sonden beobachtet werden. In 5 Fällen wurden Zellen mit teils 3, teils 4 Signalen pro Zellkern detektiert.

Die immunhistochemische Färbung von FOXP1 war in 49 von 60 Fällen (82 %) auswertbar und fiel in 18 Fällen davon positiv (37 %), in 31 Fällen (63 %) dagegen negativ aus [s. Anhang 7.5.3.1.].

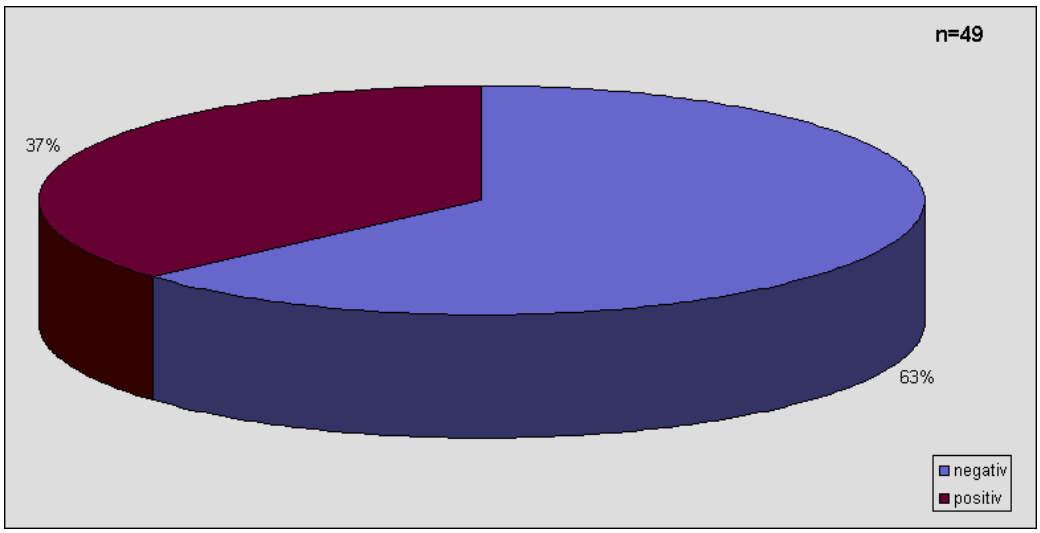


Abb. 18: Ergebnisse der FOXP1- Färbung

3.3. FISH-Analyse von Bruchereignissen im Immunglobulinschwerkettenlokus (*IgH*)

In der FISH-basierten Analyse des Immunglobulinschwerkettenlokus, der auf Chromosom 14 (14q32) liegt und im Fall einer t(14;18) ein Bruchereignis aufweist, waren 47 der 60 Fälle auf dem TMA auswertbar (78 %). In 6 von diesen Fällen war ein chromosomales *IgH*-Bruchereignis nachweisbar (13 %). 40 Fälle (85 %) zeigten kolokalisierte Signale, so dass sich in diesen Fällen kein Hinweis auf eine *IgH*-involvierende Translokation ergab. In einem dieser Fälle waren drei Kopien des Immunglobulinschwerkettenlokus detektierbar (2 %) [s. Anhang 7.5.2.4.].

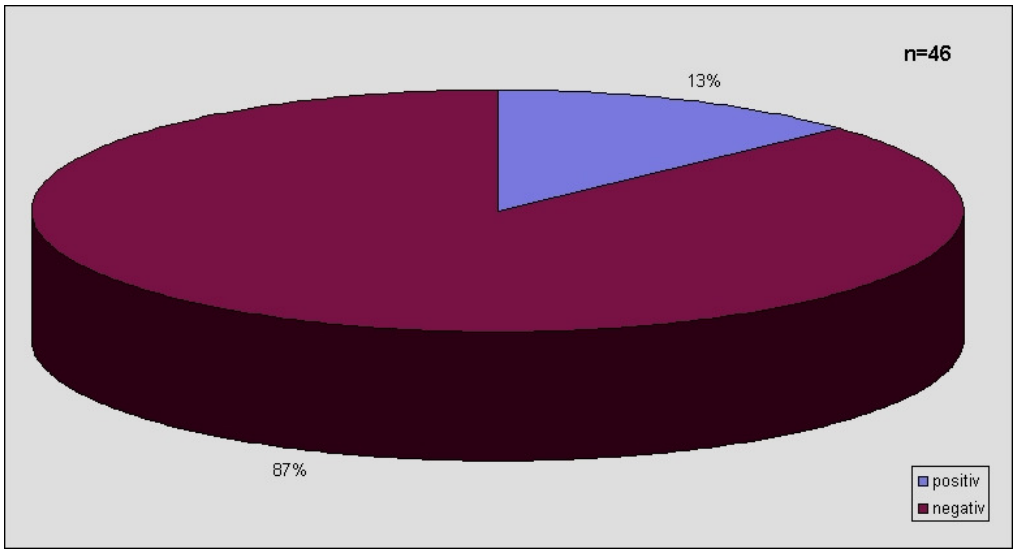


Abb. 19: Ergebnisse für *IgH*

3.4. FISH-basierte Analyse numerischer Aberrationen von Chromosom 3

Für die Analyse der Kopienzahlen der Zentromersequenz des Chromosoms 3 konnten insgesamt 47 der 60 Fälle ausgewertet werden (78 %). In 33 Fällen davon (70 %) lag eine regelhafte Signalverteilung mit je zwei Signalen pro Zellkern vor. 14 Tumoren (30 %) zeigten drei Signale in jeweils mehr als 10 % der Tumorzellen, entsprechend einer Trisomie 3 [vgl. Abb. 20 und s. Anhang 7.5.2.5.]

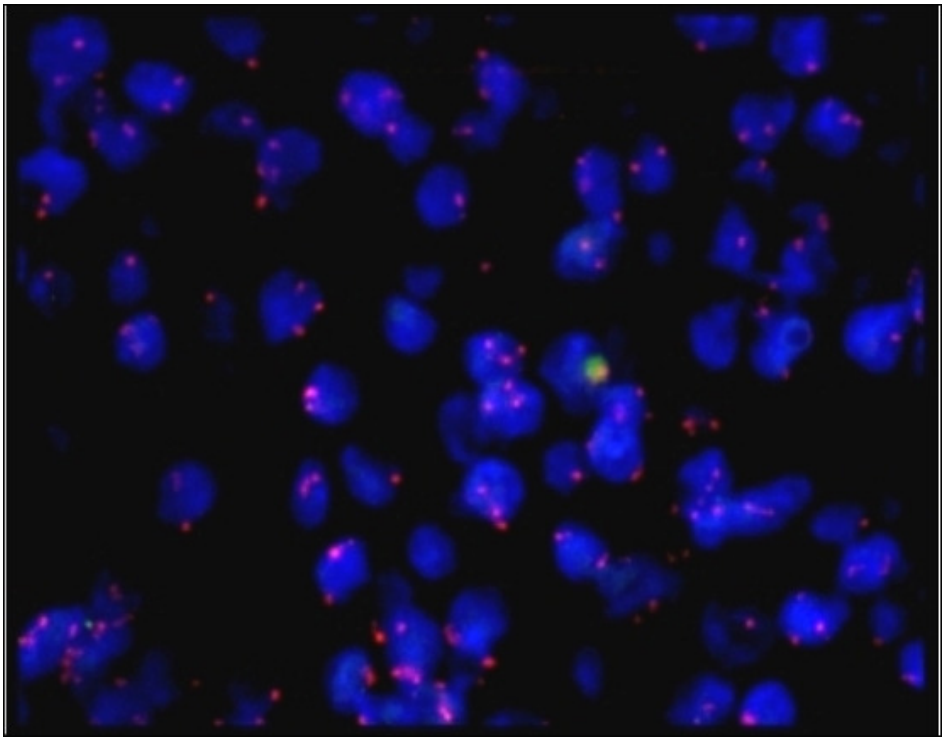


Abb. 20: FISH-Analyse der Kopienzahl der Zentromersequenz von Chromosom 3: in diesem Fall finden sich drei Sondensignale in mehr als 10 % der Tumorzellen, entsprechend einer Trisomie 3.

3.5. Immunhistochemische Darstellung des BCL10-Proteins

Die in eMZBCL bekannten rekurrenten Translokationen und insbesondere die t(1;14)(p22;q32), die das *BCL10*-Gen involviert, können zu einer konstitutionellen Überexpression des BCL10-Proteins führen. Zur Untersuchung einer Korrelation der BCL10-Expression mit dem Translokationsstatus der Fälle dieser Studie wurde eine immunhistochemische Darstellung des BCL10-Proteins durchgeführt.

In der Färbung für BCL10 waren alle 60 Fälle auswertbar. 3 Fälle (5 %) zeigten eine starke [vgl. Abb. 21] und 34 Fälle (57 %) eine mäßig starke [vgl. Abb. 22] nukleäre Expression des Proteins. 23 Fälle (38 %) waren in der Färbung negativ [vgl. Abb. 23] [s. Anhang 7.5.3.2.].

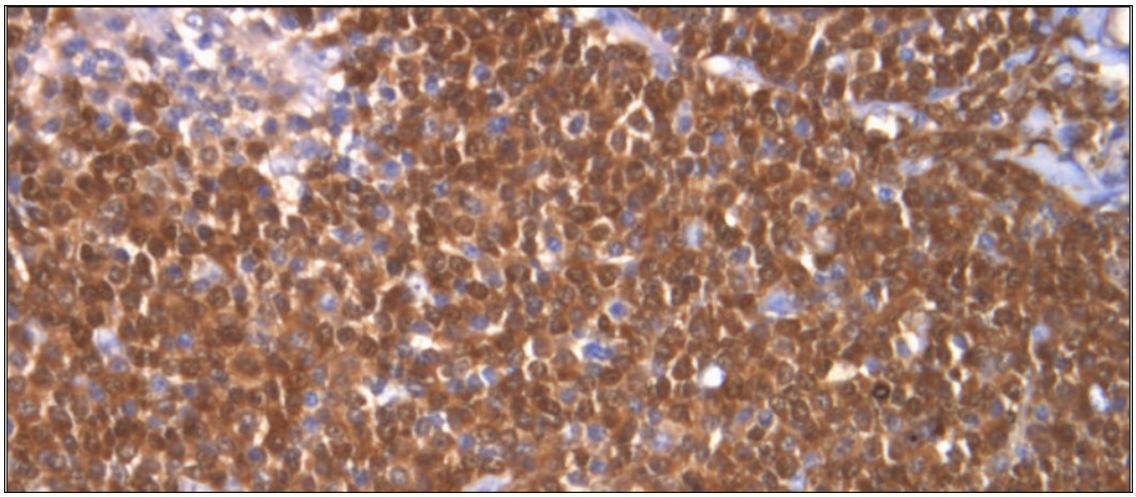


Abb. 21: Immunhistochemische Darstellung des BCL10-Proteins: starke nukleäre Expression (H/01/1668; 400x)

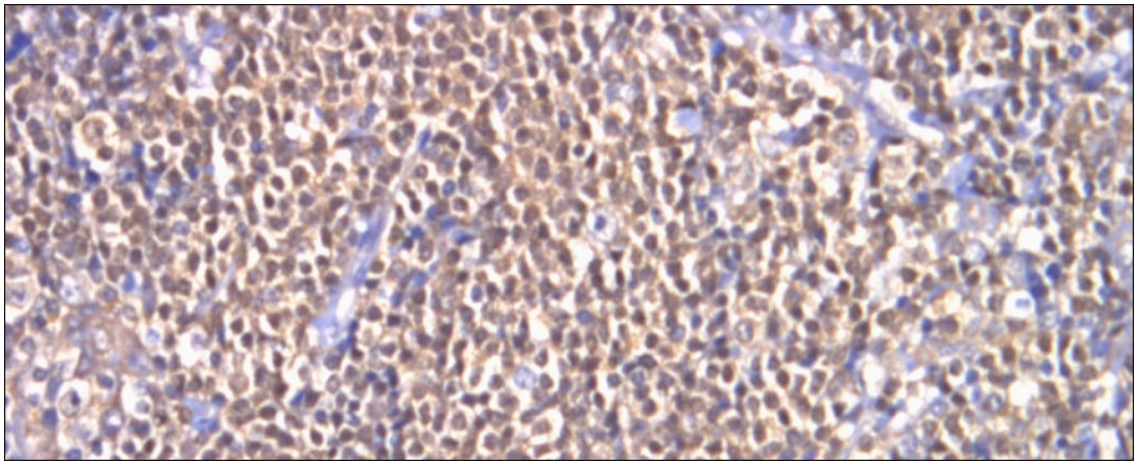


Abb. 22: Immunhistochemische Darstellung des BCL10-Proteins: mäßig starke nukleäre Expression (H/00/1134; 400x)

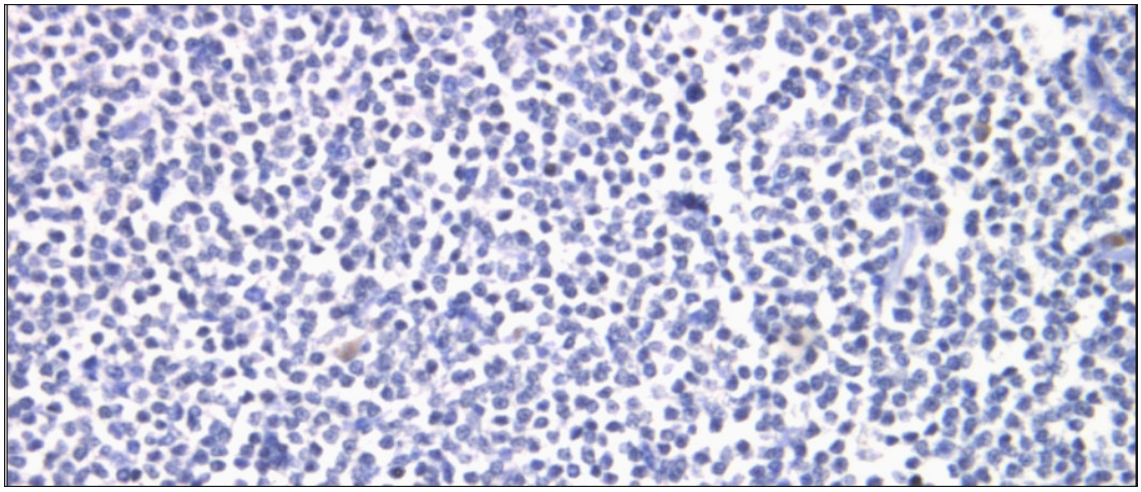


Abb. 23: Immunhistochemische Darstellung des BCL-10 Proteins: keine nukleäre Expression (H/99/9207; 400x)

3.6. Immunhistochemische Analyse einer sekretorischen Differenzierung

In 53 Fällen aus dem TMA wurde durch eine immunhistochemische Analyse an Ganzflächenschnitten der Paraffinblöcke untersucht, ob eine sekretorische Differenzierung der Tumoren vorliegt. Die übrigen sieben Blöcke der insgesamt 60 TMA-Fälle wiesen nicht mehr genügend Gewebe für die benötigten Färbungen auf.
Zunächst wurde in der CD138-Färbung der Gehalt an Plasmazellen bestimmt. Anschließend, ob in der Leichtkettendarstellung (κ/λ) eine Restriktion vorliegt.
In 28 Fällen (53 %) war eine sekretorische Differenzierung erkennbar (davon je 14 Fälle mit κ- und λ- Restriktion), während 25 Fälle (47 %) keine sekretorische Differenzierung der Tumorzellen aufwiesen [s. Anhang 7.5.3.3.].

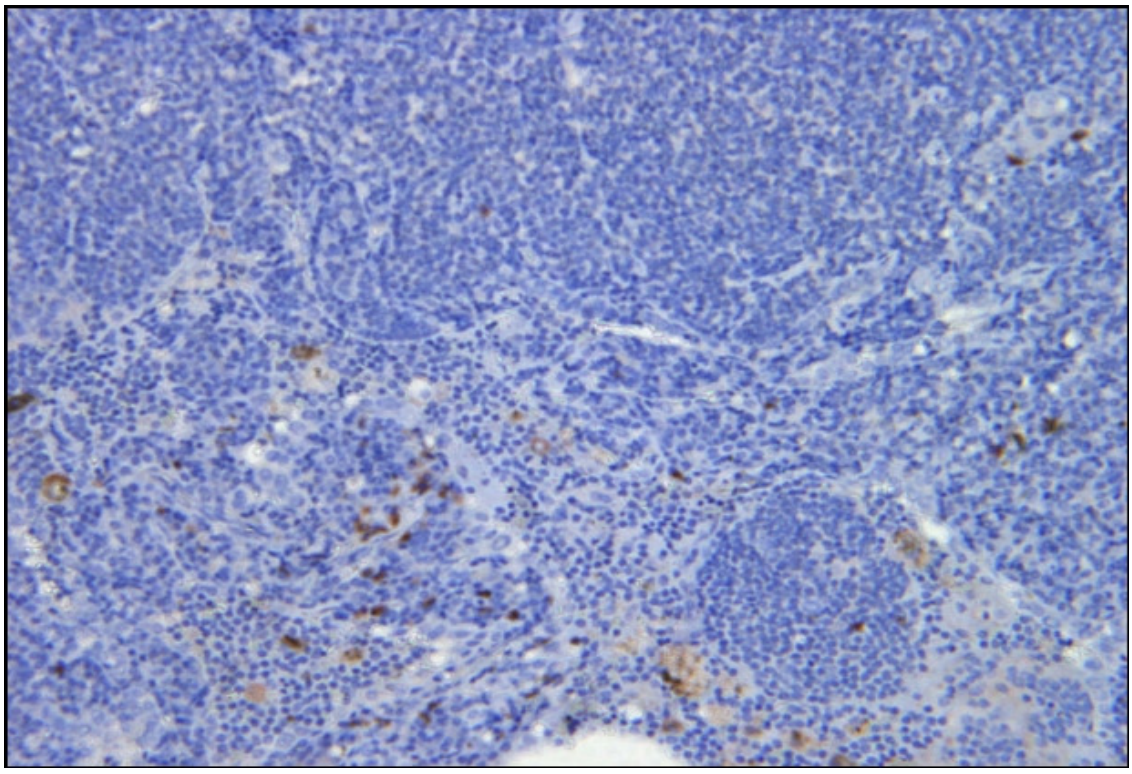


Abb. 24: Sekretorische Differenzierung und Leichtketten-Restriktion (Kappa, H/01/1668, 200x)

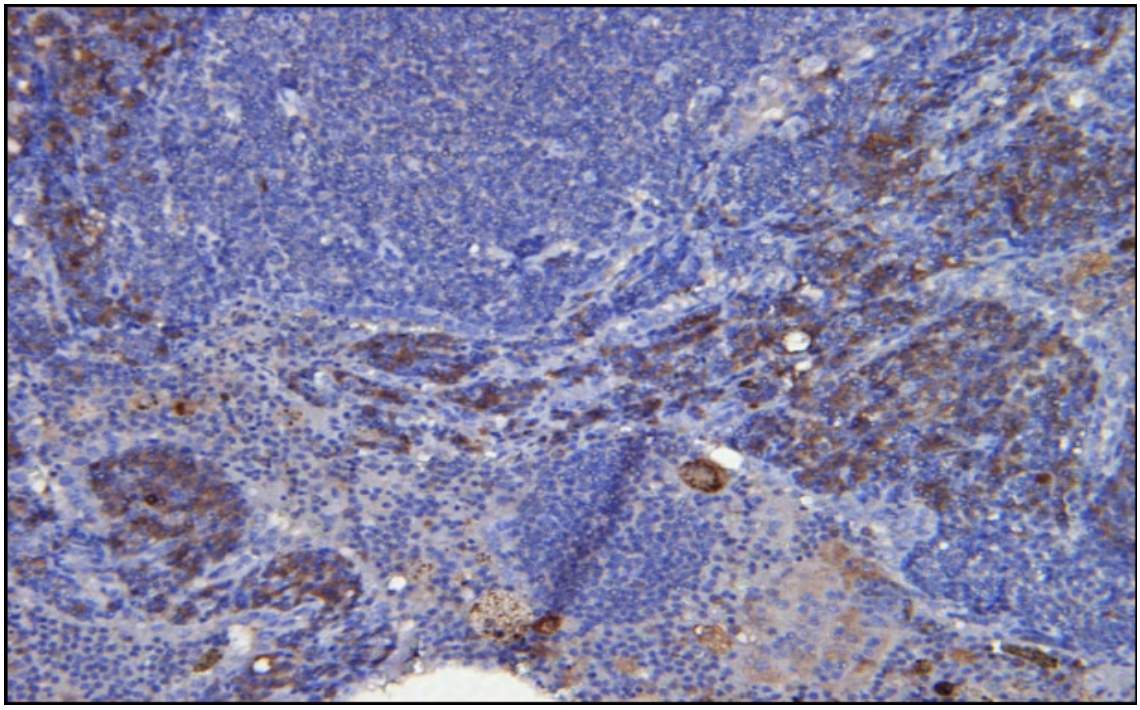


Abb. 25: Sekretorische Differenzierung und Leichtketten-Restriktion (Lambda, H/01/1668, 200x)

3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse und Korrelationen

3.7.1. Zusammenfassung

Multiplex-RT-PCR: - t(11;18) in 21 % positiv;

FISH: - MALT1-BAP in 40,5 % positiv, 40,5 % negativ, 19 % negativ mit Amplifikation;

- FOXP1-BAP in 100 % negativ;
- FOXP1 numerisch in 65 % 2 Signale, in 23 % 3 Signale, in 12 % $\geq$ 3 Signale;
- IgH in 13 % positiv, in 85 % negativ, in 2 % 3 Kopien des Immunglobulinschwerkettenlokus;
- Chromosom 3 numerisch in 70 % regelhafte Signalverteilung (2 Signale), in 30 % mehr als 2 Signale;

Immunhistochemie: - FOXP1 in 37 % positiv und in 63 % negativ;

- BCL10 in 5 % starke, in 57 % mäßige und in 38 % keine nukleäre Expression;
- sekretorische Differenzierung in 53 % (davon je 26,5 % κ u. λ).

3.7.2. Korrelationen

Trisomie 3 +	FOX P1-BAP +	kein Fall	
Trisomie 3 +	FOX P1 immun +	11 Fälle	37 %
FOX P1-Überexpression (FISH)	Trisomie 3 +	9 Fälle	60 %
	FOX P1 immun +	13 Fälle	86 %
	Trisomie 3 **und** FOX P1 immuno +	9 Fälle	60 %
BCL10 +	t(11;18) +	9 Fälle	24 %
	MALT 1-BAP +	11 Fälle	30 %
MALT 1-BAP +	IgH-BAP +	2 Fälle	12 %
MALT 1-BAP +	t(11;18) +	6 Fälle	35 %
MALT 1-BAP + **und** t(11;18) -	IgH-BAP +	2 Fälle	18 %

Tab. 1: Korrelationen

4. Diskussion

4.1. Genese der MALT-Lymphome

Extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ (eMZBCL) sind ein besonders eindrückliches Beispiel für eine direkte Beziehung zwischen einer Infektion und der Genese eines malignen Tumors:

Wie nur bei wenigen anderen Tumorerkrankungen wird bei dieser Tumorentität deutlich, dass eine chronische Entzündung das „Mikromilieu" für die Expansion eines autonomen Tumorklons bieten kann. Am bekanntesten ist dabei die Entstehung eines eMZBCL im Magen vor dem Hintergrund einer chronisch aktiven Gastritis, wobei auch der Erreger dieser Gastritisform, *Helicobacter pylori*, eine große Bekanntheit erlangt hat [**5**].

Auch für eMZBCL in verschiedenen anderen Lokalisationen wurde eine Assoziation mit bestimmten Erregern beschrieben, z.B. *Campylobacter jejuni* im Dünndarm, *Chlamydia psittaci* in der Orbitalregion, *Borrelia burgdorferi* in der Haut und das Hepatitis-C-Virus in der Leber [**17**, **18**, **19**, **20**]. Typischerweise handelt es sich dabei um nicht sehr virulente Erreger, die aber durch das Immunsystem nicht effektiv eliminiert werden können.

Ein alternativer Mechanismus, der aber einen vergleichbaren inflammatorischen Hintergrund hervorruft, liegt der Entstehung von eMZBCL in Speicheldrüsen und der Schilddrüse zugrunde: hier rufen organspezifische Autoimmunerkrankungen, wie das Sjögren-Syndrom oder die Hashimoto-Thyreoiditis, eine chronische Entzündung hervor [**21**, **22**].

Auch molekulargenetische Untersuchungen ergaben Hinweise auf einen wesentlichen Einfluss eines chronischen Entzündungsgeschehens auf die Entstehung maligner Lymphome vom MALT-Typ: so sind die Gene für die Immunglobulinschwerketten in eMZBCL in vielen Fällen mutiert und zeigen anhaltende intraklonale Hypermutationen [**23**]**.** Diese Mechanismen dienen unter physiologischen Umständen der Affinitätssteigerung des an der Zelloberfläche von B-Lymphozyten lokalisierten Antigenrezeptors. Im Tumor stellen sie eine Reaktion des malignen Klons auf einen

evolutiven Druck dar und weisen daher auf die spezifische Erkennung eines Antigens hin.

Im Gegensatz zu diesen molekularen Hintergründen ist die Bedeutung der individuellen Immunsituation für die Tumorgenese noch weitgehend ungeklärt: so entwickelt nur eine sehr kleine Zahl der mit *Helicobacter pylori* infizierten Personen im Lauf ihres Lebens ein gastrales Lymphom.

In zytogenetischer Hinsicht weisen eMZBCL vom MALT-Typ eine erstaunliche Heterogenität auf: als rekurrente Aberrationen sind zum einen die charakteristischen reziproken Translokationen t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21), t(1;14)(p22;q32) [**9**] und t(3;14)(p13;q32) beschrieben [**15**]. Zum anderen finden sich Trisomien der Chromosomen 3, 7, 12 und 18 sowie strukturelle Aberrationen auf 1q21 und 1p34 [**24**]**.**

Verschiedene Studien haben gezeigt [**14**, **15**, **9**]**,** dass o. g. genetische Aberrationen in unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen unterschiedlich häufig vorkommen.

So wurden bei 71 untersuchten MALT-Lymphomen des Magens 17 Fälle mit t(11;18), ein Fall mit t(14;18), 8 Fälle mit Trisomie 3 und 4 Fälle mit Trisomie 18 gefunden. 28 Fälle zeigten mehr als eine Chromosomenaberration, wobei die charakteristischen Translokationen wechselseitig ausschließlich gefunden wurden [**9**].

Im Gegensatz dazu zeigten 42 Fälle von Speicheldrüsen-MALT-Lymphomen nur einen Fall mit t(11;18), 5 Fälle mit t(14;18), einen Fall mit t(1;14), 23 Fälle mit Trisomie 3 und 8 Fälle mit Trisomie 18; insgesamt 31 Fälle wiesen mehr als eine genetische Veränderung auf.

In der gleichen Studie stammten 15 von insgesamt 252 MALT-Lymphomen aus der Lunge; von diesen waren 8 Fälle positiv für die t(11;18), ein Fall für die t(14;18), ein Fall für die t(1;14), 3 Fälle für die Trisomie 3 und ein Fall für die Trisomie 18; 12 Fälle zeigten mehr als eine Chromosomenaberration [**9**].

	MAGEN	SPEICHELDRÜSEN	LUNGE
t(11;18)	23,9 %	2,4 %	53,3 %
t(14;18)	1,4 %	11,9 %	6,7 %
t(1;14)	0 %	2,4 %	6,7 %
Trisomie 3	11,3 %	54,8 %	20 %
Trisomie 18	5,6 %	19 %	6,7 %
>1 chromosomale Aberration	39,4 %	73,8 %	80 %

Tab. 2: Verteilung der Chromosomenaberrationen bei MALT-Lymphomen in unterschiedlicher anatomischer Lokalisation [9].

Eine Studie, die 91 MALT-Lymphome hinsichtlich der t(3;14) untersucht hat [15], zeigte eine solche Translokation in 4 von 20 Lymphomen der Orbitalregion des Auges, in 2 von 20 Hautlymphomen und in 3 von 6 Tumoren der Schilddrüse. Keiner der 20 Fälle aus Speicheldrüsen, der 20 MALT-Lymphome des Magens oder der 5 pulmonalen Tumore zeigte diese Translokation.

	t(3;14)
AUGE	20 %
HAUT	10 %
SCHILDDRÜSE	50 %
SPEICHELDRÜSEN	0 %
MAGEN	0 %
LUNGE	0 %

Tab. 3: Häufigkeit der t(3;14) bei MALT-Lymphomen in unterschiedlicher anatomischer Lokalisation [15]

Unter den genannten genetischen Aberrationen sind die Translokationen t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21) und t(1;14)(p22;q32) von besonderem Interesse, weil sie offenbar zur Deregulation desselben onkogenen Signalweges führen, nämlich des „Nuclear factor kB (NFκB)"-Signalpfades. Für die Aktivierung von NFκB ist unter anderem die Rekrutierung und Aktivierung eines trimolekularen Komplexes aus den drei Proteinen MALT1 (18q21), BCL10 (1p22) und CARMA1 (7p22) notwendig [24], von denen die beiden ersteren in den beschriebenen rekurrenten Translokationen vorkommen. Interessanterweise scheint CARMA1 dagegen nicht von vergleichbaren genetischen Imbalancen betroffen zu sein [25].

Die Translokation t(11;18)(q21;q21), die in einem chimären Fusionsgen aus *API2* und *MALT1* resultiert, ist erstaunlicherweise in so spezifischer Weise mit den MALT-Lymphomen assoziiert [26], dass sie bislang noch in keiner anderen Lymphomentität beschrieben wurde. Da eMZBCL mit dieser genetischen Aberration oft nicht auf eine *H. p.*-Eradikationstherapie ansprechen [27] und nur selten eine hochmaligne Transformation erfahren [28], scheint der Nachweis dieser Translokation eine distinkte Untergruppe der gastralen eMZBCL vom MALT-Typ zu definieren. Typischerweise ist in diesen Fällen die t(11;18) fast immer die einzige chromosomale Aberration [26] ohne weitere Karyotypumbauten.

Im Gegensatz dazu zeigen die t(11;18)-negativen Tumoren oft weitere Imbalancen wie Trisomien 3, 12 und 18 und allelische Imbalancen [9].

Die Translokationen t(1;14)(p22;q32) und t(14;18)(q32;q21) resultieren in einer deregulierten Expression von *BCL10* bzw. *MALT1*, indem diese Gene mit den regulatorischen Sequenzen des Immunglobulinschwerketten-Genclusters (*IgH*) fusioniert werden [9]. Die Translokation t(1;14)(p22;q32) wurde ebenfalls bislang ausschließlich in MALT-Lymphomen nachgewiesen, wenngleich auch nur mit einer Häufigkeit von unter 4 % der Fälle [9]. Das Wildtyp-BCL10-Protein wird im Zytoplasma normaler Keimzentrums- und Marginalzonen-B-Zellen exprimiert. MALT-Lymphome mit der Translokation t(1;14)(p22;q32) zeigen dagegen eine starke nukleäre Expression [29]. Interessanterweise exprimieren MALT-Lymphome, die die t(11;18) aufweisen, ebenfalls nukleär BCL10 [30], woraus sich ein Hinweis auf eine mögliche onkogene Aktivität einer nukleären BCL10-Expression ergibt.

Der Transkriptionsfaktor NFκB ist ein Protein, das in den meisten Zelltypen vorkommt und an eine spezifische, aus 10 Basen bestehende DNA-Sequenz innerhalb des Transkriptionsenhancers des Introns der Immunglobulinleichtkette in reifen B- und Plasmazellen, nicht aber in prä-B-Zellen bindet [31]. Seine Bindungsaktivität wird von verschiedenen exogenen Stimuli beeinflusst, wobei diese Aktivierung unabhängig von der De-novo-Proteinsynthese ist. Gebildet wird der Transkriptionsfaktor von Homo- oder Heterodimeren verschiedener Untereinheiten, die alle zu einer Familie strukturell verwandter Proteine (Rel/NFκB-Proteine) gehören; jedes dieser Rel-Proteine hat eine N-terminale Region, die als „Rel Homology Domain“ (RHD) bezeichnet wird und die DNA-Bindungsdomäne enthält. NFκB greift regulierend in viele Bereiche der zellulären

Aktivität ein, besonders im Bereich der Immunantwort [31]. Induziert wird der Transkriptionsfaktor z. B. von proinflammatorischen Zytokinen und Bakterientoxinen (z. B. Lipopolysaccharide, Exotoxin B), einer Reihe von Viren und viraler Produkte (z. B. HIV-1, HTLV-1, EBV, Herpes simplex) und proapoptotischen und nekrotischen Stimuli (freie Sauerstoffradikale, UV-Licht, Gammastrahlung) [31]. Im Zytosol unstimulierter Zellen sind die NFκB-Dimere mit Hilfe von nicht-kovalenten Bindungen einer Klasse von Inhibitorproteinen getrennt, die als IκBs bezeichnet werden. Alle IκBs enthalten multiple Kopien einer 30-33 aa-Sequenz, Ankyrin-Repeats genannt, welche die Bindung zwischen IκB und den NFκB-Dimeren vermitteln [31].

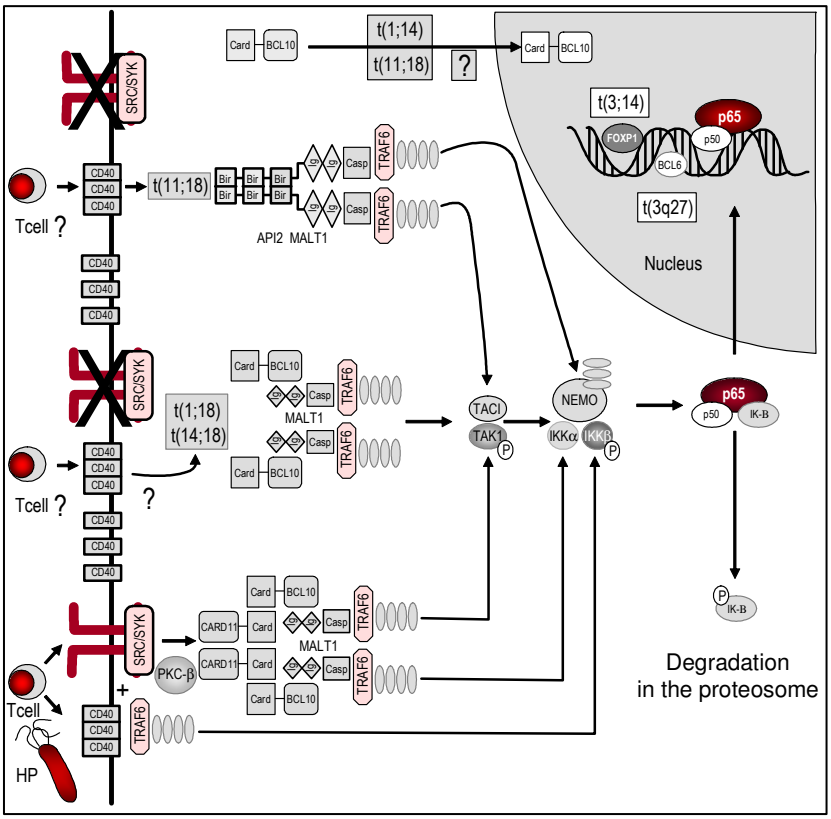


Abb. 26: Häufigste chromosomale Translokationen in Mucosa-assoziiertem lymphoiden Gewebe (MALT) [24]

4.2. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur

4.2.1. Chromosomale Translokation t(11;18)

Die Translokation t(11;18) wurde in der vorliegenden Arbeit deutlich seltener gefunden als in der Literatur beschrieben:

Während in der vorliegenden Studie in der Multiplex-RT-PCR-Analyse von 53 auswertbaren Fällen 11 positiv (entspricht 21 %) für die t(11;18) waren, fanden Streubel et al. in insgesamt 15 mit der gleichen Methode untersuchten MALT-Lymphomen der Lunge 8 positiven Fälle, entsprechend 53,3 % [**9**].

Okabe et al. wiesen bei 41 % von 51 untersuchten Patienten mit pulmonalen MALT-Lymphomen ein *API2-MALT1*-Fusionsprodukt in der Multiplex-RT-PCR nach [**32**].

In einer Gruppe von insgesamt 35 MALT-Lymphomen unterschiedlicher Lokalisation, von denen 4 pulmonalen Ursprungs waren, detektierten Inagaki et al. mittels Multiplex-RT-PCR in 5 Fällen eine t(11;18); 3 dieser 5 positiven Fälle (entspricht 75 %) waren MALT-Lymphome der Lunge [**14**]. Die größere Häufigkeit dieser Translokation in diesen Studien könnte v.a. durch die geringe Anzahl an primär pulmonalen MALT-Lymphomen bedingt sein.

Auf diese Ursache deuten auch die Ergebnisse von Remstein et al. hin. Sie konnten in 28 primär pulmonalen MALT-Typ-Lymphomen eine t(11;18) in 7 Fällen nachweisen (entspricht 25 %) [**33**].

Die Häufigkeit der hier mit Multiplex-RT-PCR nachgewiesenen t(11;18) korreliert nicht mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen der gleichen Methode, sondern eher mit den Ergebnissen der FISH für t(11;18) von Remstein et al.

4.2.2. FISH-basierte Analyse chromosomaler Translokationen

Eine *MALT1-IgH*-Fusion, welche aus einer Translokation t(14;18) resultiert, wurde in 2 von 42 auswertbaren Fällen gefunden, entsprechend 5 %. Dieses Resultat steht in guter Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur: Streubel et al. fanden nur in einem Fall von 15 ebenfalls mit FISH untersuchten pulmonalen MALT-Lymphomen eine t(14;18) (entspricht 6,7 %) [**9**].

In einer Studie von Remstein und Kollegen war in 3 der 28 mit der gleichen Methode untersuchten Fälle von MALT-Lymphomen der Lunge eine t(14;18) nachweisbar (entspricht 11 %) [**33**].

Die t(14;18) ist also in eMZBCL vom MALT-Typ der Lunge ein seltenes Ereignis, verglichen mit den Fällen in anderer Lokalisation, z.B. der Orbitalregion (24 %) oder den Speicheldrüsen (12 %) [**9**].

Die t(1;14), die *BCL10* mit dem Immunglobulinschwerkettenpromotor fusioniert, fand sich in der hier vorliegenden Studie in 4 von 46 auswertbaren Fällen (entspricht 9 %), was gut mit den Ergebnissen von Streubel et al. übereinstimmt (ein positiver von 15 Fällen, entspricht 6,7 %) [**9**].
Da in keinem von 41 auswertbaren Fällen ein Bruchereignis im *FOXP1*-Genlokus nachgewiesen werden konnte, sind alle Fälle bezüglich der t(3;14) (*FOXP1-IgH*) negativ. Auch hier deckt sich das Ergebnis der vorliegenden Studie mit dem von Streubel et al., in deren Serie sich bei keinem der 5 auf diese Translokation hin untersuchten eMZBCL vom MALT-Typ der Lunge eine entsprechende Signalkonstellation ergab [**15**].

In 11 von 47 auswertbaren Lymphomen der vorliegenden Serie, die alle negativ waren für sämtliche o. g. Translokationen, fand sich eine Trisomie 3 (entspricht 23 %), was auch ungefähr mit den Ergebnissen von Streubel et al. übereinstimmt; dort wurde eine Trisomie 3 in 3 von 15 Fällen (entspricht 20 %) beschrieben, wobei aus den publizierten Daten nicht hervorgeht, ob eine isolierte Trisomie 3 vorlag [**9**].

8 von 42 analysierbaren MALT-Lymphomen in der vorliegenden Studie zeigten eine Amplifikation des *MALT1*-Lokus (19 %). Von diesen 8 wies kein Fall eine chromosomale Translokation t(11;18) auf. Das Vorhandensein mehrerer Genkopien von *MALT1* ohne nachweisbares chromosomales Translokationsereignis wurde also in 8 Fällen detektiert (entspricht 100 %). Diese Beobachtung deutet auf einen alternativen Zellzyklus-Aktivierungsweg, außerhalb der bekannten chromosomalen Translokationen, hin: so könnte nicht nur eine konstitutionelle Überexpression von *MALT1* durch die translokationsbedingte Dauertranskription des *MALT1*-Gens zu einer Daueraktivierung des Signalpfades führen, sondern auch das Vorliegen mehrerer Genkopien.

4.3. Hypothese über alternative Aktivierung des Zellzyklus

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass neben den bekannten (und hier untersuchten) genetischen Translokationen offenbar auch andere genomische Imbalancen (z.B. Amplifikationen des *MALT1*-Genlokus) zu einer Expansion eines malignen Klons führen können.

In diesem Zusammenhang fanden sich 11 von 47 Fällen (entspricht 23 %), die keine Translokation, aber eine Trisomie 3 aufweisen. Diese 3 Kopien des Chromosoms 3 und damit auch des hier lokalisierten *FOXP1*-Genlokus können auch zu einer Aktivierung des Zellzyklus führen.

FOXP1 spielt eine wichtige Rolle in der normalen Zellentwicklung, inklusive der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung, Signaltransduktion und Zelltransformation [**34**].

Auch in der Studie von Streubel et al. fand sich eine hohe *FOXP1*-Expression in Fällen, die außer einer Trisomie 3 entweder t(3;14)(p14.1;q32) oder t(14;18)(q32;q21) aufwiesen. Unter den Translokation-negativen MALT-Lymphomen zeigte der Fall, bei dem „nur" eine Trisomie 3 zu finden war, die höchste Genexpression von *FOXP1* [**15**], so dass offenbar auch hier eine erhöhte Kopienzahl des *FOXP1*-Gens in einer Protein-Überexpression und Deregulation des betreffenden Signalweges resultiert.

4.4. Vergleich der genetischen und immunhistochemischen Ergebnisse bezüglich FOXP1- und BCL10-Expression

18 von 49 auswertbaren Fällen (37 %) waren positiv in der immunhistochemischen Färbung für FOXP1. Davon zeigten 8 in der FISH 3 Signale (entspricht 44 %), 5 Fälle 4 Signale für den *FOXP1*-Genlokus (entspricht 28 %) und 3 Fälle zeigten 2 Signale (entspricht 17 %). Ein Fall (entspricht 6 %) konnte nicht ausgewertet werden.

Von den 31 in der immunhistochemischen Analyse negativen Fällen für FOXP1 wiesen 21 Fälle in der FISH-Analyse 2 Signale für den *FOXP1*-Genlokus auf (entspricht 68 %) und ein Fall 3 Signale (entspricht 3 %). 9 Fälle waren nicht auswertbar (entspricht 29 %).

Im χ^2-Signifikanztest ergab sich eine hohe Signifikanz (p-Wert = 0,001) für die Korrelation der immunhistochemisch detektierbaren FOXP1-Proteinexpression mit der Amplifikation des *FOXP1*-Genlokus.

BCL10 ist ein Apoptose-regulierendes Molekül, welches essentiell für die NFκB-Aktivierung durch T- und B-Zell-Rezeptoren ist [**35**]. In der Literatur wurde eine mäßige nukleäre Expression von BCL10 in 17 von 21 MALT-Lymphomen der Lunge

beschrieben, die positiv für eine t(11,18) waren, während nur 7 von 30 t(11;18)-negativen Fällen diese aufwiesen (Sensitivität[11] 81 %, Spezifität[12] 77 %) [**32**], bzw. eine starke nukleäre Expression im Zusammenhang einer t(1;14) gesehen wurde [**36**].

Unter den 3 Fällen mit starker nukleärer Expression von BCL10 fand sich je ein positiver Fall für t(1;14) und t(14;18) (entspricht je 33 %).

Von den 34 Lymphomen, die BCL10 mäßig exprimierten, waren 17 positiv für die t(11;18) (entspricht 50 %) und 3 positiv für die t(1;14) (entspricht 9 %).

Bei 4 von 23 Fällen, welche keine BCL10-Expression zeigten, fand sich ein *API2-MALT1*-Fusionsprodukt (entspricht 17 %); bei einem dieser 23 Lymphome konnte eine *IgH-MALT1*- Fusion nachgewiesen werden (entspricht 4 %).

BCL10	negativ	mäßig	stark
t(11;18) positiv	5,5%	94,4%	0%
negativ	45,8%	35,4%	16,7%
t(1;14) positiv	0%	75%	25%
negativ	41,1%	55,4%	3,6%
t(14;18) positiv	50%	0%	50%
negativ	37,9%	58,6%	3,4%

Tab. 4: Immunhistochemische BCL10-Positivität und Häufigkeit chromosomaler Translokationen

Demnach wäre die mäßige Expression von BCL10 zu 81 % sensitiv und zu 56 % spezifisch bezüglich der t(11;18); im Fall einer starken nukleären Expression von BCL10 und einer t(1;14) besteht eine Sensitivität von 25 % und eine Spezifität von 96%.

Es ergibt sich daher für die Verwendung der immunhistochemischen Färbung für BCL10 als Surrogatmarker für das Vorliegen einer genetischen Translokation in dem betreffenden Fall, dass eine immunhistologische Überexpression allenfalls einen

[11] **Sensitivität:** P (positiv erkannt/tatsächlich positiv) =

$$\frac{\text{Anzahl d richtig positiven}}{\text{Anzahl d richtig positiven + Anzahl d falsch negativen}}$$

[12] **Spezifität:** P (negativ erkannt/tatsächlich negativ) =

$$\frac{\text{Anzahl d richtig negativen}}{\text{Anzahl d richtig negativen + Anzahl d falsch positiven}}$$

diesbezüglichen Hinweis gibt, sich aber nicht als Ersatz für entsprechende genetische Untersuchungen eignet.

4.5. Sekretorische Differenzierung

In der immunhistochemischen Untersuchung bezüglich einer sekretorischen Differenzierung der Tumorzellen an 53 Fällen des TMA zeigte sich, dass in der Mehrzahl der Fälle (47 %) keine sekretorische Differenzierung nachweisbar war. In den 28 Lymphomen, die sekretorisch differenziert sind, findet sich eine κ- und eine λ-Leichtkettenrestriktion in jeweils 14 Fällen.
Bei dem Vergleich der sekretorischen Differenzierung mit den untersuchten Chromosomenaberrationen zeigte sich keine Korrelation, was den Schluss zulässt, dass weder – wie angenommen – ein Bruch im *MALT1*-Genlokus noch das Vorhandensein einer anderen Aberration die sekretorische Ausreifung der Tumorzellen verhindert.

5. Zusammenfassung

MALT-Lymphome der Lunge gehören als extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen zu den malignen Non-Hodgkin-Lymphomen. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass rekurrenten genetischen Translokationen eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese zukommt.

Eine zentrale Rolle nimmt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB ein, die Folge solcher rekurrenter Translokationen (z.B. t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21), t(1;14)(p22;q32)) und numerischer Chromosomenaberrationen (Trisomie 3, Trisomie 18) ist.

In der vorliegenden Arbeit haben wir 60 Fälle extranodaler Marginalzonen-B-Zell-Lymphome der Lunge bezüglich der genannten genetischen Translokationen untersucht. Es ist dies die größte bisher in der Literatur beschriebene Serie von MALT-Lymphomen in dieser Lokalisation.

Die Untersuchung der t(11;18) ergab in der vorliegenden Arbeit eine geringere Häufigkeit als in der Literatur beschrieben, wobei zu berücksichtigen ist, dass die bisher vorgestellten Studien deutlich geringere Fallzahlen aufwiesen.

Bezüglich der Translokationen t(14;18), t(1;14), t(3;14) und der Trisomie 3 waren in der vorliegenden Studie ähnliche Häufigkeiten zu finden, wie sie in der Literatur beschrieben sind.

Als möglichen alternativen Aktivierungsweg des Zellzyklus zeigte sich in dieser Studie neben den genannten Translokationen sowohl eine Trisomie 3 als auch eine Amplifikation der Genkopienzahl von *MALT1*.

Im Vergleich der genetischen und immunhistochemischen Ergebnisse bezüglich der FOXP1- und der BCL10-Expression zeigte sich für FOXP1 eine hohe Korrelation zwischen immunhistologischer Expression und genetischem Nachweis einer Genaktivierung, während für BCL10 eine starke Diskrepanz bezüglich Sensitivität und Spezifität gefunden wurde, so dass die immunhistologische Analyse nur einen Hinweis auf das Vorliegen einer genetischen Translokation zu geben vermag, aber nicht als Surrogatmarker zu verwenden ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Gesundheitsportal. www.medicine-worldwide.de.
2. *Roche-Lexikon Medizin* (4. Auflage): Urban & Schwarzenberg; 1998.
3. Böcker, Denk, Heitz. Pathologie (ed 3.Auflage): Urban & Fischer; 2004.
4. Isaacson Peter G., Norton Andrew J. *Extranodal Lymphomas*: Churchill Livingstone-Verlag; 1994.
5. Adam P, Haralambieva E, Ott G. Extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ. *Der Pathologe*. 2007;28:6-14.
6. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. P*athology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyons, France: IARC Press; 2001.
7. Zucca E, Bertoni F, Roggero E, Bosshard G, Cazzaniga G, Pedrinis E, Biondi A, Cavalli F. Molecular analysis of the progression from Helicobacter pylori-associated chronic gastritis to mucosa-associated lymphoid-tissue of the stomach. *N Engl J Med*. 1998 Mar 19.
8. Rowley J. Chromosome studies in the non-Hodgkin`s lymphomas: the role of the 14;18 translocation. *J Clin Oncol*. 1988;6(5):919-925.
9. Streubel B, Simonitsch-Klupp I, Mullauer L, et al. Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. *Leukemia*. 2004;18:1722-1726.
10. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4:844-847.
11. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Suater G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*. 2001;195:72-79.
12. Richter J, Wagner U, Kononen J et al. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. *Am J Pathol*. 2000;157:787-794.
13. Mucci NR, Akdas G, Manely S, Rubin MA. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol*. 2000;31:406-415.

14. Inagaki H, Okabe M, Seto M, Nakamura S, Ueda R, Eimoto T. API2-MALT1 fusion transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: multiplex RT-PCR detection using formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Am J Pathol*. 2001;158:699-706.
15. Streubel B, Vinatzer U, Lamprecht A, Raderer M, Chott A. T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia*. 2005;19:652-658.
16. Kaiserslautern TU. www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/FISH.htm.
17. Parsonnet J, Isaacson PG. Bacterial infection and MALT lymphoma. *N Engl J Med*. 2004;350:213-215.
18. Ferreri AJ, Guidoboni M, Ponzoni M, et al. Evidence for an association between Chlamydia psittaci and ocular adnexal lymphomas. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:586-594.
19. Cerroni L, Zochling N, Putz B, et al. Infection by Borrelia burgdorferi and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol*. 1997;24:457-461.
20. Ascoli V, Lo Coco F, Artini M, Levrero M, Negro F. Extranodal lymphomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Clin Pathol*. 1998;109 (5):508-510.
21. Streubel B, Huber D, Wohrer S, et al. Frequency of chromosomal aberrations involving MALT1 in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in patients with Sjogren`s syndrome. *Clin Cancer Res*. 2004;10:476-480.
22. Thieblemont C, Mayer A, Dumontet C, et al. Primary thyroid lymphoma is a heterogeneous disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:105-111.
23. Wotherspoon AC, Soosay G, Diss TC, et al. Low-grade primary B-cell lymphoma of the lung. An immunhistochemical, molecular, and cytogenetic study of a single case. *Am J Clin Pathol*. 1990;94:655-660.
24. Farinha P, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:6370-6378.
25. Adam P, Haralambieva E, Greiner A. et al. CARMA1 and chromosomal translocations in extranodal marginal zone B-cell lymphomas of MALT type or diffuse large B-cell lymphomas. *Haematologica*. 2006;91:1575-1576.

26. Ott G, Katzenberger T, Greiner A et al. 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.

27. Ye H, Liu H, Attygalle A et al. Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of H pylori in gastric MALT lymphoma. *Blood*. 2003;102:1012-1018.

28. Starostik P, Patzner J, Greiner A et al. Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. *Blood*. 2002;99:3-9.

29. Ye H, Dogan A, Karran L et al. BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma. *Am J Pathol*. 2000;157:1147-1154.

30. Liu H, Ye H, Dogan A et al. T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that express nuclear BCL10. *Blood*. 2001;98:1182-1187.

31. Klinikum rechts der Isar MD, Institute for Hematology and Oncology, 81675 Munich, Germany. www.celldeath.de/encyclo/misc/nfkb.htm.

32. Okabe M, Inagaki H, Ohshima K, et al. API2-MALT1 fusion defines a distinctive clinicopathologic subtype in pulmonary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol*. 2003;162:1113-1122.

33. Remstein ED, Kurtin PJ, Einerson RR, Paternoster SF, Dewald GW. Primary pulmonary MALT lymphomas show frequent and heterogeneous cytogenetic abnormalities, including aneuploidy and translocations involving API2 and MALT1 and IGH and MALT1. *Leukemia*. 2004;18:156-160.

34. Isis-Innovation-Ltd. www.isis-innovation.com/licensing/634.htm.

35. Zhou H, Wertz I et al. Bcl10 activates the NF-kB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature*. 2004.

36. Department of Histopathology RFaUCMS, London, United Kingdom. BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT-lymphoma. *PubMed*. 2000.

7. Anhang

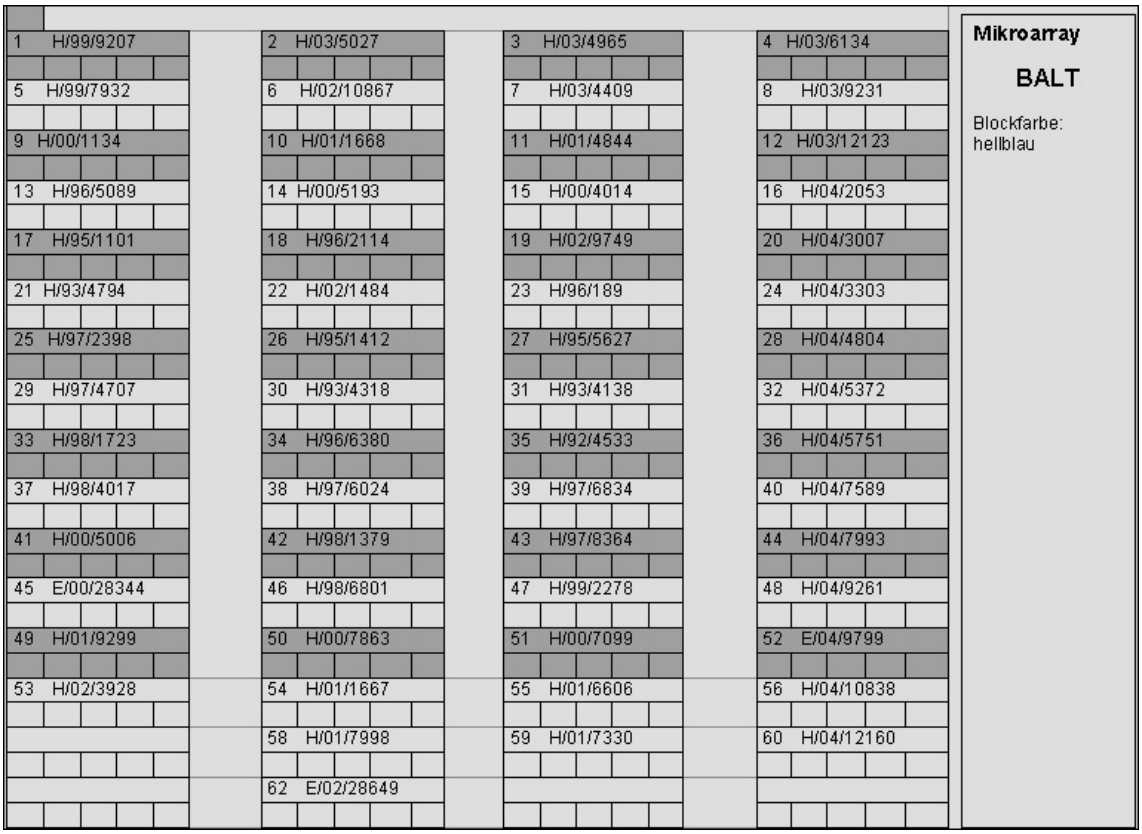
7.1. Studienfälle eMZBCL vom MALT-Typ der Lunge (MALT)

M A L T t(11 ;18) [13]

H/92/4533	H/99/2278	E/02/28649
H/93/4138	H/99/7932	H/02/10867
H/93/4318	H/99/9207	H/03/4409
H/93/4794	H/00/1134	H/03/4965
H/95/1101	H/00/4014	H/03/5027
H/95/1412	H/00/5193	H/03/6134
H/95/5627	H/00/7099	H/03/9231
H/96/189	H/00/7863	H/03/12123
H/96/2114	H/00/9006	H/04/2053
H/96/5089	E/00/28344	H/04/3007
H/96/6380	H/01/1667	H/04/3303
H/97/2398	H/01/1668	H/04/4804
H/97/4707	H/01/4844	H/04/5372
H/97/6024	H/01/6606	H/04/5751
H/97/6834	H/01/7330	H/04/7589
H/97/8364	H/01/7998	H/04/7993
H/98/1379	H/01/9299	H/04/9261
H/98/1723	H/02/1484	H/04/10838
H/98/4017	H/02/3928	H/04/12160
H/98/6801	H/02/9749	E/04/9799

[13] **Schwarz**: ohne Ergebnis bearbeitet
Rot: negativ für t(11;18)
Grün: positiv für t(11;18)

7.2. TMA-Datenblatt



1 H/99/9207	2 H/03/5027	3 H/03/4965	4 H/03/6134
5 H/99/7932	6 H/02/10867	7 H/03/4409	8 H/03/9231
9 H/00/1134	10 H/01/1668	11 H/01/4844	12 H/03/12123
13 H/96/5089	14 H/00/5193	15 H/00/4014	16 H/04/2053
17 H/95/1101	18 H/96/2114	19 H/02/9749	20 H/04/3007
21 H/93/4794	22 H/02/1484	23 H/96/189	24 H/04/3303
25 H/97/2398	26 H/95/1412	27 H/95/5627	28 H/04/4804
29 H/97/4707	30 H/93/4318	31 H/93/4138	32 H/04/5372
33 H/98/1723	34 H/96/6380	35 H/92/4533	36 H/04/5751
37 H/98/4017	38 H/97/6024	39 H/97/6834	40 H/04/7589
41 H/00/5006	42 H/98/1379	43 H/97/8364	44 H/04/7993
45 E/00/28344	46 H/98/6801	47 H/99/2278	48 H/04/9261
49 H/01/9299	50 H/00/7863	51 H/00/7099	52 E/04/9799
53 H/02/3928	54 H/01/1667	55 H/01/6606	56 H/04/10838
	58 H/01/7998	59 H/01/7330	60 H/04/12160
	62 E/02/28649		

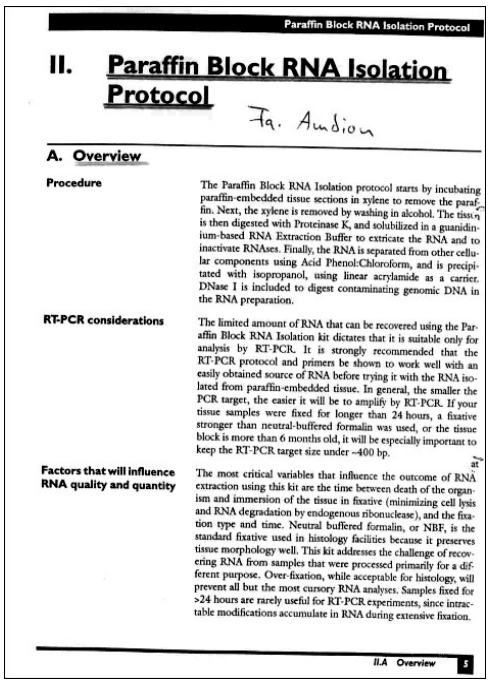
Mikroarray

BALT

Blockfarbe:
hellblau

7.3. Arbeitsprotokolle

7.3.1. RNA-Extraktion und DNase I-Digestion



Paraffin Block RNA Isolation Protocol

II. Paraffin Block RNA Isolation Protocol Fa. Ambion

A. Overview

Procedure

The Paraffin Block RNA Isolation protocol starts by incubating paraffin-embedded tissue sections in xylene to remove the paraffin. Next, the xylene is removed by washing in alcohol. The tissue is then digested with Proteinase K, and solubilized in a guanidinium-based RNA Extraction Buffer to extricate the RNA and to inactivate RNAses. Finally, the RNA is separated from other cellular components using Acid Phenol:Chloroform, and is precipitated with isopropanol, using linear acrylamide as a carrier. DNase I is included to digest contaminating genomic DNA in the RNA preparation.

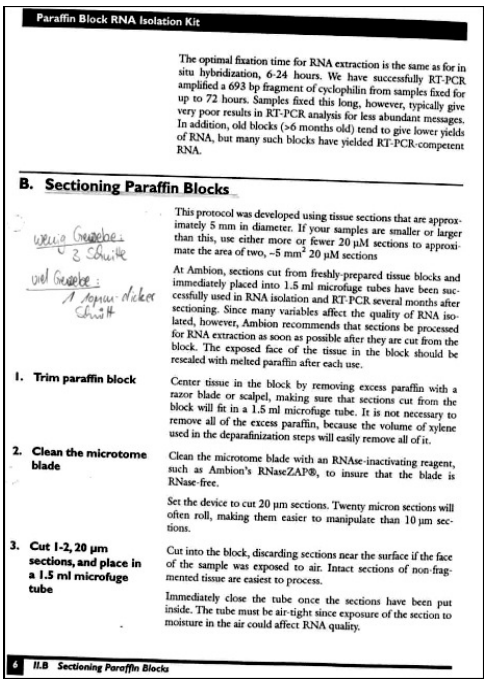
RT-PCR considerations

The limited amount of RNA that can be recovered using the Paraffin Block RNA Isolation kit dictates that it is suitable only for analysis by RT-PCR. It is strongly recommended that the RT-PCR protocol and primers be shown to work well with an easily obtained source of RNA before trying it with the RNA isolated from paraffin-embedded tissue. In general, the smaller the PCR target, the easier it will be to amplify by RT-PCR. If your tissue samples were fixed for longer than 24 hours, a fixative stronger than neutral-buffered formalin was used, or the tissue block is more than 6 months old, it will be especially important to keep the RT-PCR target size under ~400 bp.

Factors that will influence RNA quality and quantity

The most critical variables that influence the outcome of RNA extraction using this kit are the time between death of the organism and immersion of the tissue in fixative (minimizing cell lysis and RNA degradation by endogenous ribonuclease), and the fixation type and time. Neutral buffered formalin, or NBF, is the standard fixative used in histology facilities because it preserves tissue morphology well. This kit addresses the challenge of recovering RNA from samples that were processed primarily for a different purpose. Over-fixation, while acceptable for histology, will prevent all but the most cursory RNA analyses. Samples fixed for >24 hours are rarely useful for RT-PCR experiments, since intractable modifications accumulate in RNA during extensive fixation.

II.A Overview 5



Paraffin Block RNA Isolation Kit

The optimal fixation time for RNA extraction is the same as for in situ hybridization, 6-24 hours. We have successfully RT-PCR amplified a 693 bp fragment of cyclophilin from samples fixed for up to 72 hours. Samples fixed this long, however, typically give very poor results in RT-PCR analysis for less abundant messages. In addition, old blocks (>6 months old) tend to give lower yields of RNA, but many such blocks have yielded RT-PCR-competent RNA.

B. Sectioning Paraffin Blocks

This protocol was developed using tissue sections that are approximately 5 mm in diameter. If your samples are smaller or larger than this, use either more or fewer 20 µM sections to approximate the area of two, ~5 mm^2 20 µM sections

At Ambion, sections cut from freshly-prepared tissue blocks and immediately placed into 1.5 ml microfuge tubes have been successfully used in RNA isolation and RT-PCR several months after sectioning. Since many variables affect the quality of RNA isolated, however, Ambion recommends that sections be processed for RNA extraction as soon as possible after they are cut from the block. The exposed face of the tissue in the block should be resealed with melted paraffin after each use.

1. Trim paraffin block

Center tissue in the block by removing excess paraffin with a razor blade or scalpel, making sure that sections cut from the block will fit in a 1.5 ml microfuge tube. It is not necessary to remove all of the excess paraffin, because the volume of xylene used in the deparafinization steps will easily remove all of it.

2. Clean the microtome blade

Clean the microtome blade with an RNAse-inactivating reagent, such as Ambion's RNaseZAP®, to insure that the blade is RNase-free.

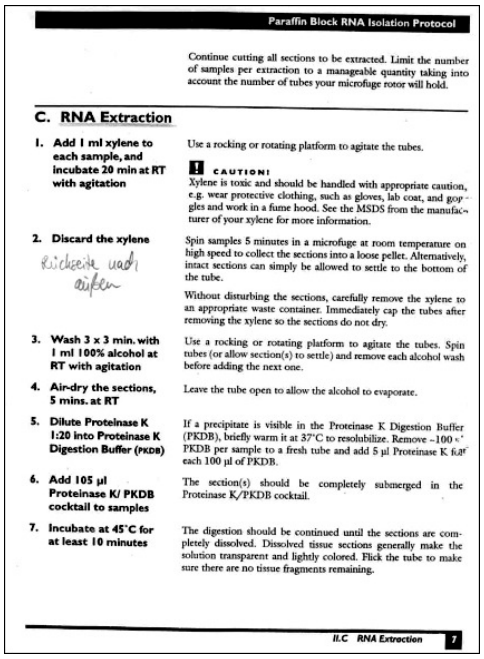
Set the device to cut 20 µm sections. Twenty micron sections will often roll, making them easier to manipulate than 10 µm sections.

3. Cut 1-2, 20 µm sections, and place in a 1.5 ml microfuge tube

Cut into the block, discarding sections near the surface if the face of the sample was exposed to air. Intact sections of non-fragmented tissue are easiest to process.

Immediately close the tube once the sections have been put inside. The tube must be air-tight since exposure of the section to moisture in the air could affect RNA quality.

6 II.B Sectioning Paraffin Blocks



Paraffin Block RNA Isolation Protocol

Continue cutting all sections to be extracted. Limit the number of samples per extraction to a manageable quantity taking into account the number of tubes your microfuge rotor will hold.

C. RNA Extraction

1. Add 1 ml xylene to each sample, and incubate 20 min at RT with agitation

Use a rocking or rotating platform to agitate the tubes.

CAUTION!
Xylene is toxic and should be handled with appropriate caution, e.g. wear protective clothing, such as gloves, lab coat, and goggles and work in a fume hood. See the MSDS from the manufacturer of your xylene for more information.

2. Discard the xylene

Spin samples 5 minutes in a microfuge at room temperature on high speed to collect the sections into a loose pellet. Alternatively, intact sections can simply be allowed to settle to the bottom of the tube.

Without disturbing the sections, carefully remove the xylene to an appropriate waste container. Immediately cap the tubes after removing the xylene so the sections do not dry.

3. Wash 3 x 3 min. with 1 ml 100% alcohol at RT with agitation

Use a rocking or rotating platform to agitate the tubes. Spin tubes (or allow section(s) to settle) and remove each alcohol wash before adding the next one.

4. Air-dry the sections, 5 mins. at RT

Leave the tube open to allow the alcohol to evaporate.

5. Dilute Proteinase K 1:20 into Proteinase K Digestion Buffer (PKDB)

If a precipitate is visible in the Proteinase K Digestion Buffer (PKDB), briefly warm it at 37°C to resolubilize. Remove ~100 µl PKDB per sample to a fresh tube and add 5 µl Proteinase K for each 100 µl of PKDB.

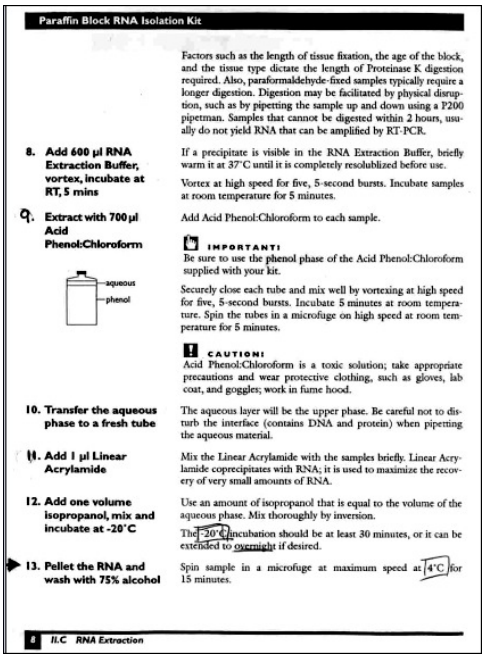
6. Add 105 µl Proteinase K/ PKDB cocktail to samples

The section(s) should be completely submerged in the Proteinase K/PKDB cocktail.

7. Incubate at 45°C for at least 10 minutes

The digestion should be continued until the sections are completely dissolved. Dissolved tissue sections generally make the solution transparent and lightly colored. Flick the tube to make sure there are no tissue fragments remaining.

II.C RNA Extraction 7



Paraffin Block RNA Isolation Kit

Factors such as the length of tissue fixation, the age of the block, and the tissue type dictate the length of Proteinase K digestion required. Also, paraformaldehyde-fixed samples typically require a longer digestion. Digestion may be facilitated by physical disruption, such as by pipetting the sample up and down using a P200 pipetman. Samples that cannot be digested within 2 hours, usually do not yield RNA that can be amplified by RT-PCR.

8. Add 600 µl RNA Extraction Buffer, vortex, incubate at RT, 5 mins

If a precipitate is visible in the RNA Extraction Buffer, briefly warm it at 37°C until it is completely resolubilized before use.

Vortex at high speed for five, 5-second bursts. Incubate samples at room temperature for 5 minutes.

9. Extract with 700 µl Acid Phenol:Chloroform

Add Acid Phenol:Chloroform to each sample.

IMPORTANT!
Be sure to use the phenol phase of the Acid Phenol:Chloroform supplied with your kit.

Securely close each tube and mix well by vortexing at high speed for five, 5-second bursts. Incubate 5 minutes at room temperature. Spin the tubes in a microfuge on high speed at room temperature for 5 minutes.

CAUTION!
Acid Phenol:Chloroform is a toxic solution; take appropriate precautions and wear protective clothing, such as gloves, lab coat, and goggles; work in fume hood.

10. Transfer the aqueous phase to a fresh tube

The aqueous layer will be the upper phase. Be careful not to disturb the interface (contains DNA and protein) when pipetting the aqueous material.

11. Add 1 µl Linear Acrylamide

Mix the Linear Acrylamide with the samples briefly. Linear Acrylamide coprecipitates with RNA; it is used to maximize the recovery of very small amounts of RNA.

12. Add one volume isopropanol, mix and incubate at -20°C

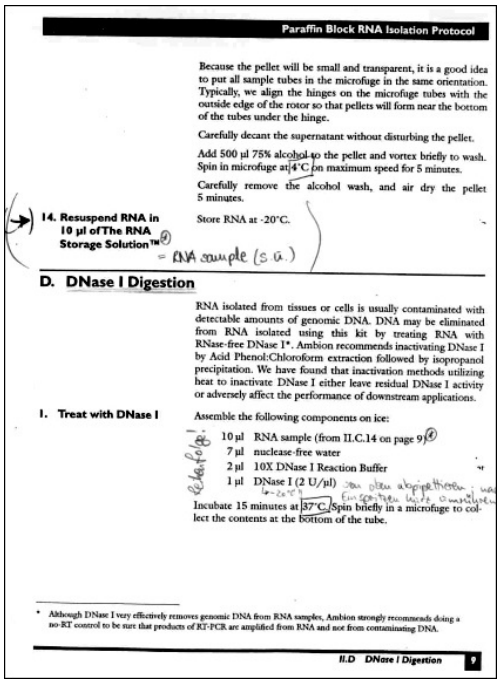
Use an amount of isopropanol that is equal to the volume of the aqueous phase. Mix thoroughly by inversion.

The -20°C incubation should be at least 30 minutes, or it can be extended to overnight if desired.

13. Pellet the RNA and wash with 75% alcohol

Spin sample in a microfuge at maximum speed at 4°C for 15 minutes.

8 II.C RNA Extraction



Paraffin Block RNA Isolation Protocol

Because the pellet will be small and transparent, it is a good idea to put all sample tubes in the microfuge in the same orientation. Typically, we align the hinges on the microfuge tubes with the outside edge of the rotor so that pellets will form near the bottom of the tubes under the hinge.

Carefully decant the supernatant without disturbing the pellet.

Add 500 µl 75% alcohol to the pellet and vortex briefly to wash. Spin in microfuge at 4°C on maximum speed for 5 minutes.

Carefully remove the alcohol wash, and air dry the pellet 5 minutes.

14. Resuspend RNA in 10 µl of The RNA Storage Solution™*

Store RNA at -20°C.

= RNA sample (s.o.)

D. DNase I Digestion

RNA isolated from tissues or cells is usually contaminated with detectable amounts of genomic DNA. DNA may be eliminated from RNA isolated using this kit by treating RNA with RNase-free DNase I*. Ambion recommends inactivating DNase I by Acid Phenol:Chloroform extraction followed by isopropanol precipitation. We have found that inactivation methods utilizing heat to inactivate DNase I either leave residual DNase I activity or adversely affect the performance of downstream applications.

1. Treat with DNase I

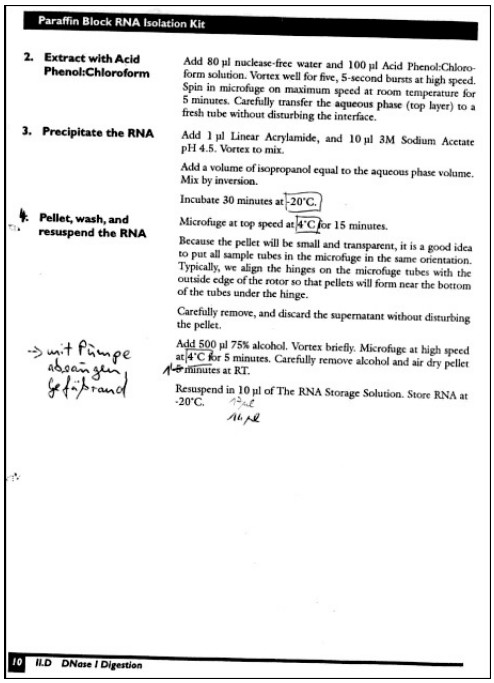
Assemble the following components on ice:

10 µl RNA sample (from II.C.14 on page 9)
7 µl nuclease-free water
2 µl 10X DNase I Reaction Buffer
1 µl DNase I (2 U/µl)

Incubate 15 minutes at 37°C. Spin briefly in a microfuge to collect the contents at the bottom of the tube.

* Although DNase I very effectively removes genomic DNA from RNA samples, Ambion strongly recommends doing a no-RT control to be sure that products of RT-PCR are amplified from RNA and not from contaminating DNA.

II.D DNase I Digestion 9



Paraffin Block RNA Isolation Kit

2. Extract with Acid Phenol:Chloroform

Add 80 µl nuclease-free water and 100 µl Acid Phenol:Chloroform solution. Vortex well for five, 5-second bursts at high speed. Spin in microfuge on maximum speed at room temperature for 5 minutes. Carefully transfer the aqueous phase (top layer) to a fresh tube without disturbing the interface.

3. Precipitate the RNA

Add 1 µl Linear Acrylamide, and 10 µl 3M Sodium Acetate pH 4.5. Vortex to mix.

Add a volume of isopropanol equal to the aqueous phase volume. Mix by inversion.

Incubate 30 minutes at -20°C.

4. Pellet, wash, and resuspend the RNA

Microfuge at top speed at 4°C for 15 minutes.

Because the pellet will be small and transparent, it is a good idea to put all sample tubes in the microfuge in the same orientation. Typically, we align the hinges on the microfuge tubes with the outside edge of the rotor so that pellets will form near the bottom of the tubes under the hinge.

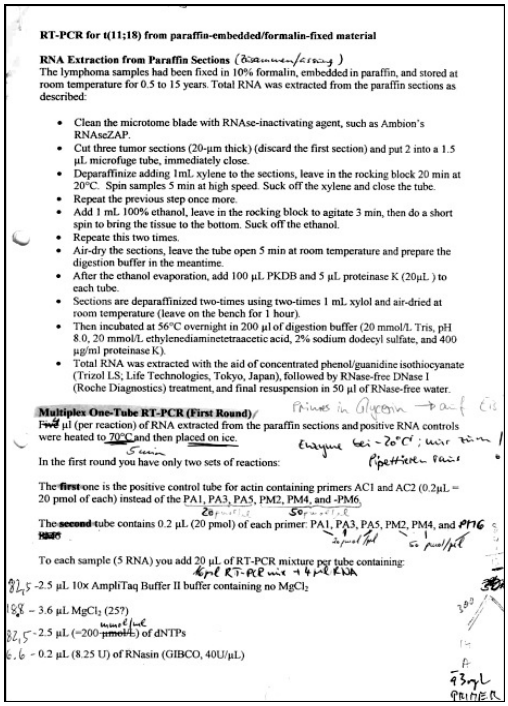
Carefully remove, and discard the supernatant without disturbing the pellet.

Add 500 µl 75% alcohol. Vortex briefly. Microfuge at high speed at 4°C for 5 minutes. Carefully remove alcohol and air dry pellet 1-5 minutes at RT.

Resuspend in 10 µl of The RNA Storage Solution. Store RNA at -20°C.

10 II.D DNase I Digestion

7.3.2. Multiplex-PCR



RT-PCR for t(11;18) from paraffin-embedded/formalin-fixed material

RNA Extraction from Paraffin Sections (Zusammenfassung)

The lymphoma samples had been fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and stored at room temperature for 0.5 to 15 years. Total RNA was extracted from the paraffin sections as described:

- Clean the microtome blade with RNAse-inactivating agent, such as Ambion's RNAseZAP.
- Cut three tumor sections (20-µm thick) (discard the first section) and put 2 into a 1.5 µL microfuge tube, immediately close.
- Deparaffinize adding 1mL xylene to the sections, leave in the rocking block 20 min at 20°C. Spin samples 5 min at high speed. Suck off the xylene and close the tube.
- Repeat the previous step once more.
- Add 1 mL 100% ethanol, leave in the rocking block to agitate 3 min, then do a short spin to bring the tissue to the bottom. Suck off the ethanol.
- Repeate this two times.
- Air-dry the sections, leave the tube open 5 min at room temperature and prepare the digestion buffer in the meantime.
- After the ethanol evaporation, add 100 µL PKDB and 5 µL proteinase K (20µL) to each tube.
- Sections are deparaffinized two-times using two-times 1 mL xylol and air-dried at room temperature (leave on the bench for 1 hour).
- Then incubated at 56°C overnight in 200 µl of digestion buffer (20 mmol/L Tris, pH 8.0, 20 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid, 2% sodium dodecyl sulfate, and 400 µg/ml proteinase K).
- Total RNA was extracted with the aid of concentrated phenol/guanidine isothiocyanate (Trizol LS; Life Technologies, Tokyo, Japan), followed by RNase-free DNase I (Roche Diagnostics) treatment, and final resuspension in 50 µl of RNase-free water.

Multiplex One-Tube RT-PCR (First Round)

Five µl (per reaction) of RNA extracted from the paraffin sections and positive RNA controls were heated to 70°C and then placed on ice.

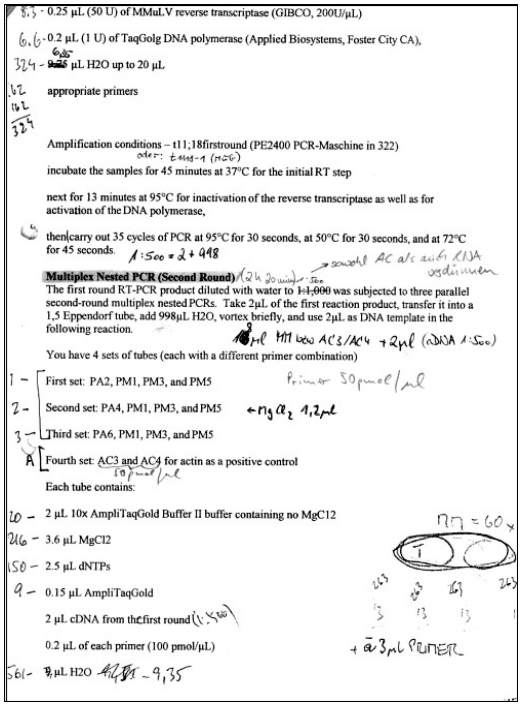
In the first round you have only two sets of reactions:

The first one is the positive control tube for actin containing primers AC1 and AC2 (0.2µL = 20 pmol of each) instead of the PA1, PA3, PA5, PM2, PM4, and -PM6.

The second tube contains 0.2 µL (20 pmol) of each primer: PA1, PA3, PA5, PM2, PM4, and PM6

To each sample (5 RNA) you add 20 µL of RT-PCR mixture per tube containing:

2.5 µL 10x AmpliTaq Buffer II buffer containing no $MgCl_2$
3.6 µL $MgCl_2$ (25?)
2.5 µL (=200 pmol/L) of dNTPs
0.2 µL (8.25 U) of RNasin (GIBCO, 40U/µL)



0.25 µL (50 U) of MMuLV reverse transcriptase (GIBCO, 200U/µL)

0.2 µL (1 U) of TaqGolg DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City CA),

µL H2O up to 20 µL

appropriate primers

Amplification conditions – t11;18firstround (PE2400 PCR-Maschine in 322)

incubate the samples for 45 minutes at 37°C for the initial RT step

next for 13 minutes at 95°C for inactivation of the reverse transcriptase as well as for activation of the DNA polymerase,

then carry out 35 cycles of PCR at 95°C for 30 seconds, at 50°C for 30 seconds, and at 72°C for 45 seconds.

Multiplex Nested PCR (Second Round)

The first round RT-PCR product diluted with water to 1:1,000 was subjected to three parallel second-round multiplex nested PCRs. Take 2µL of the first reaction product, transfer it into a 1,5 Eppendorf tube, add 998µL H2O, vortex briefly, and use 2µL as DNA template in the following reaction.

You have 4 sets of tubes (each with a different primer combination)

First set: PA2, PM1, PM3, and PM5

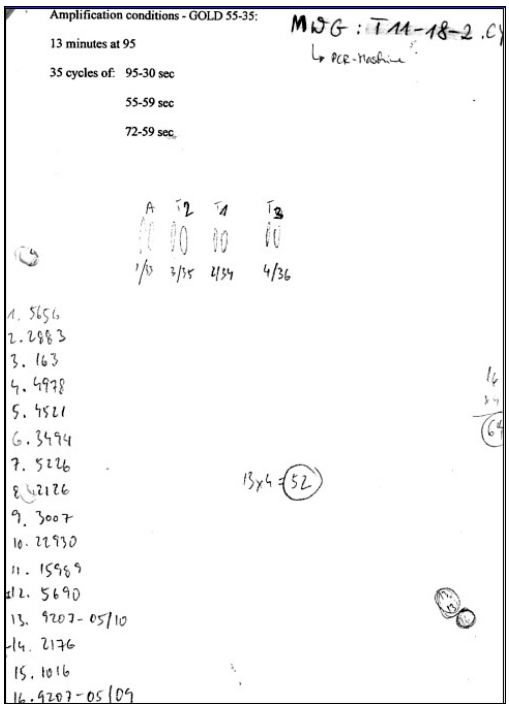
Second set: PA4, PM1, PM3, and PM5

Third set: PA6, PM1, PM3, and PM5

Fourth set: AC3 and AC4 for actin as a positive control

Each tube contains:

2 µL 10x AmpliTaqGold Buffer II buffer containing no MgC12
3.6 µL MgCl2
2.5 µL dNTPs
0.15 µL AmpliTaqGold
2 µL cDNA from the first round
0.2 µL of each primer (100 pmol/µL)
µL H2O



7.3.3. FISH-Protokoll

Paraffin-FISH für Vysis-Sonden

Fallnummer	Slide	Sonde

	Temperatur	Zeit
Xylol	RT	20min
absteigende Alkoholreihe 100%,90%,70% (Abfallbehälter) bis a.d.	RT	je 5min
Dampfkochen mit TRIS/EDTA-Puffer pH 9,0 **Alternativ:**10min im 100°C Wasserbad, danach 10min bei RT und offenem Deckel abkühlen lassen	100°C	5min

2xSSC oder a.dest pH 7,0	RT	Transport
RNAse-Verdau 100µg/ml 2xSSC **=>10mg auf 100ml**	37°C	1h
2xSSC pH 7,0	RT	10min
Pepsin-Verdau 50µg/ml 0,01M HCL **=>5mg auf 100ml**	37°C	10min
1xPBS (stoppt den Verdau)	RT	5-10min
aufsteigende Alkoholreihe 70%,90%,100% (Abfallbehälter)	RT	je 5min
trocknen	RT	15-20min
Ab jetzt im Dunklen arbeiten !!!		
Hybridisierungslsg. (-25°C) (für einen Schnitt ungefähr 10µl Sonde einplanen)**=>das ist jetzt die Menge pro Schnitt!!** 7µL LSI Hybr. Buffer 4926 2µL Aqua. dest. ***1,5µL*** 1µL Probe ***0,5µL 17C*** zentrifugieren, vortexen,	RT	
~10ul Sonde auf Schnitt pipettieren	RT	
mit Deckglas+Fixogum versiegeln	RT	
Schnitt(Gewebe)+Sonde auf Heizblock denaturieren	80°C	10min
Über Nacht in feuchter Kammer hybridisieren	37°C	12-16h
2 Tag auch im Dunkeln arbeiten		
Fixo-Gum ablösen, Deckglas entfernen. Küvette in Alufolie einpacken, mit 95mL Aqua. dest. 2mL 20xSSC je höher die Temp. Und je niedriger der 300µL NP-40 Salzgehalt, desto besser der Wash pH 7,0-7,3	70-73°C **=>72°C**	3min.
aufsteigende Alkoholreihe 70%,90%,100%	RT	je 4min
Trocknen(entweder 15min RT od. ~10min im Trockenschrank)		
Eindecken in Vectashield(~1-1,5ml Vectashield+0,75µl DAPI-Stammlsg.) =>ungefähr 1Tropfen pro Fall		

7.4. Fusionsprodukte

Table 2. Size (bp) of the Second-Round Multiplex PCR Products

Second round multiplex PCR	Primers for second round PCR	API2 breakpoint	MALT1 breakpoint M541	M814	M1123	M1150
Second PCR-A	PA2, PM1, PM3, PM5	A1203	122 bp	147 bp*	135 bp	108 bp
Second PCR-B	PA4, PM1, PM3, PM5	A1446	94 bp*	119 bp*	107 bp*	80 bp*
Second PCR-C	PA6, PM1, PM3, PM5	A1701 or A1743	112 bp or 154 bp	137 bp† or 179 bp*	125 bp* or 167 bp*	98 bp or 140 bp‡

Most of the fusion types could be easily distinguished on an 8% polyacrylamide gels by the size of the second round PCR products because the primers were designed to generate more than 12-bp difference in size between the PCR products.
*Previously reported fusion variants are all included in our study as positive controls.
†The size of fusion A1701-M814† is close to that of A1743-M1150‡ although the two can be distinguished by digestion with restriction enzymes: the former possesses restriction sites for *Bbl*I and *Hin*fI, and the latter for *Mbo*II. bp, base pair.

7.5. Ergebnistabellen

7.5.1. Positive Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung von t(11;18)

H/96/5089	II. Reaktion bei 117 bp (A 1446 – M 814)
H/98/1723	II. Reaktion bei 106 bp (A 1446 – M 1123)
H/99/7932	II. Reaktion bei 105 bp (A 1446 – M 1123)
H/99/9207	II. Reaktion bei 105 bp (A 1446 – M 1123)
H/00/4014	II. Reaktion bei 118 bp (A 1446 – M 814)
H/00/9006	I. Reaktion bei 106 bp (A 1203 – M1150)

H/01/6606	II. Reaktion bei 77 bp (A 1446 – M 1150)
H/02/3928	II. Reaktion bei 78 bp (A 1446 – M 1150) und
	III. Reaktion bei 97 bp (A 1701 – M 150)
H/04/2053	II. Reaktion bei 105 bp (A 1446 – M1123)
H/04/3303	II. Reaktion bei 118 bp (A 1446 – M 814)
H/04/5372	II. Reaktion bei 116 bp (A 1446 – M 814)

7.5.2. *MALT1*-BAP

positiv:	negativ:	Amplifikation:
H/93/4794	H/95/5627	H/93/4318
H/95/1101	H/97/4707	H/95/1412
H/96/189	H/97/8364	H/97/6024
H/96/5089	H/98/4017	H/02/9749
H/96/6380	H/99/7932	E/02/28649
H/97/2398	H/00/5193	H/03/4965
H/98/1723	H/00/7863	H/03/5027
H/99/9207	H/01/4844	H/04/10838
H/00/1134	H/01/7998	
H/00/4014	H/03/4409	
E/00/28344	H/03/12123	
H/01/1668	H/04/3007	
H/01/6606	H/04/3303	
H/02/1484	H/04/5751	
H/02/3928	H/04/7589	
H/04/2053	H/04/7993	
H/04/9261	E/04/9799	

7.5.3. *FOXP1*-BAP

negativ:
H/93/4318
H/93/4794
H/95/1101
H/95/1412
H/95/5627
H/96/189
H/96/5089
H/96/6380
H/97/4707
H/97/6024
H/97/6834
H/97/8364

H/98/1723
H/98/4017
H/99/7932
H/99/9207
H/00/1134
H/00/4014
H/00/5193
H/00/7863
E/00/28344
H/01/1667
H/01/1668
H/01/4844
H/01/6606
H/01/7998
H/02/1484
H/02/3928
H/02/9749
E/02/28649
H/03/4409
H/03/4965
H/03/5027
H/03/12123
H/04/2053
H/04/3007
H/04/7589
H/04/3303
H/04/4804
H/04/7993
H/04/9261
H/04/10838
E/04/9799

7.5.4. Numerische Aberration von *FOXP1*

2 Signale:	**3 Signale:**	**teils 3, teils 4 Signale:**
H/93/4318	H/95/1101	H/98/4017
H/93/4794	H/97/6834	H/99/7932
H/95/1412	H/97/8364	H/00/7863
H/95/5627	H/00/1134	E/00/28344
H/96/189	H/00/5193	H/01/7998
H/96/5089	H/01/1667	
H/96/6380	H/01/1668	
H/97/4707	H/03/4965	
H/97/6024	H/04/3007	
H/98/1723	H/04/7589	
H/99/9207		
H/00/4014		
H/01/4844		

H/01/6606		
H/02/1484		
H/02/3928		
H/02/9749		
H/03/4409		
H/03/5027		
H/03/12123		
H/04/2053		
H/04/5751		
H/04/7993		
H/04/9261		
H/04/10838		
E/04/9799		
E/02/28649		
H/04/3303		

7.5.5. Immunhistochemie FOXP1

positiv:
H/95/1412
H/95/5627
H/97/6834
H/97/8364
H/98/4017
H/98/6801
H/99/7932
H/00/1134
H/00/5193
H/00/7863
E/00/28344
H/01/1667
H/01/1668
H/01/7998
E/02/28649
H/03/4965
H/04/3007
H/04/7589
H/93/4138
H/93/4318
H/93/4794
H/95/1101
H/96/189
H/96/6380
H/97/2398
H/97/4707
H/97/6024
H/98/1723

H/99/2278
H/99/9207
H/00/4014
H/00/7099
H/01/4844
H/01/6606
H/01/7330
H/01/9299
H/02/1484
H/02/3928
H/02/9749
H/02/10867
H/03/4409
H/03/5027
H/03/9231
H/03/12123
H/04/2053
H/04/7993
H/04/9261
H/04/10838
E/04/9799

7.5.6. *IgH*-BAP

positiv:	negativ:	negativ mit trisomen Zellen:
H/95/5627	H/93/4138	H/04/9261
H/96/6380	H/93/4318	
H/97/6834	H/93/4794	
H/98/4017	H/95/1101	
H/99/7932	H/95/1412	
H/01/1668	H/96/189	
	H/96/2114	
	H/96/5089	
	H/97/2398	
	H/97/4707	
	H/97/8364	
	H/98/1723	
	H/98/6801	
	H/99/2278	
	H/99/9207	
	H/00/4014	
	H/00/5193	
	H/00/7099	
	H/00/7863	
	H/01/1667	
	H/01/4844	
	H/01/6606	

	H/01/7330	
	H/01/7998	
	H/01/9299	
	H/02/1484	
	H/02/3928	
	H/02/9749	
	E/02/28649	
	H/03/4409	
	H/03/4965	
	H/03/5027	
	H/03/6134	
	H/03/9231	
	H/03/12123	
	H/04/5372	
	H/04/5751	
	H/04/7589	
	H/04/7993	
	E/04/9799	

7.5.7. Numerische Aberration von Chromosom 3

2 Signale:	**3 Signale (trisom):**
H/92/4533	H/95/1412
H/93/4138	H/97/8364
H/93/4318	H/98/4017
H/93/4794	H/98/6801
H/95/1101	H/00/5193
H/95/5627	H/00/7863
H/96/189	E/00/28344
H/96/6380	H/01/1667
H/97/2398	H/01/1668
H/97/4707	H/01/7998
H/97/6024	E/02/28649
H/98/1723	H/03/4409
H/99/7932	H/03/4965
H/99/9207	H/04/7589
H/00/4014	
H/00/7099	
H/01/4844	
H/01/6606	
H/01/7330	
H/01/9299	
H/02/1484	
H/02/3928	
H/02/9749	
H/02/10867	
H/03/5027	
H/03/9231	

H/03/12123	
H/04/2053	
H/04/5751	
H/04/7993	
H/04/9261	
H/04/12160	
E/04/9799	

7.5.8. Immunhistochemie BCL10

keine Expression:	mäßige Expression:	starke Expression:
H/92/4533	H/93/4138	H/00/5006
H/95/1101	H/93/4318	H/01/1668
H/95/1412	H/93/4794	E/02/28649
H/95/5627	H/96/189	
H/96/6380	H/96/2114	
H/97/2398	H/96/5089	
H/97/4707	H/97/6024	
H/97/8364	H/97/6834	
H/98/1723	H/98/1379	
H/99/9207	H/98/4017	
H/00/7863	H/98/6801	
E/00/28344	H/99/2278	
H/01/4844	H/99/7932	
H/01/9299	H/00/1134	
H/02/9749	H/00/4014	
H/03/5027	H/00/5193	
H/03/12123	H/00/7099	
H/04/3007	H/01/1667	
H/04/4804	H/01/6606	
H/04/5751	H/01/7330	
H/04/7993	H/01/7998	
H/04/10838	H/02/1484	
H/04/12160	H/02/3928	
	H/02/10867	
	H/03/4409	
	H/03/4965	
	H/03/6134	
	H/03/9231	
	H/04/2053	
	H/04/3303	
	H/04/5372	
	H/04/7589	
	H/04/9261	
	E/04/9799	

7.5.9. Immunhistochemie sekretorische Differenzierung

keine sekretorische Differenzierung:	κ-Leichtkettenrestriktion:	λ-Leichtkettenrestriktion:
H/93/4318	H/96/189	H/93/4138
H/96/2114	H/96/6380	H/93/4794
H/96/5089	H/98/1379	H/95/1101
H/97/6024	H/99/2278	H/95/5627
H/97/6834	H/00/4014	H/97/2398
H/97/8364	H/01/7330	H/97/4707
H/98/1723	H/01/9299	H/98/4017
H/98/6801	H/02/1484	H/99/7932
H/99/9207	H/02/3928	H/01/1668
H/00/1134	H/03/4409	H/01/6606
H/00/5193	H/03/9231	E/02/28649
H/00/7099	H/04/2053	H/03/5027
E/00/28344	H/04/10838	H/04/5372
H/01/4844	H/04/12160	E/04/9799
H/02/9749		
H/02/10867		
H/03/6134		
H/03/12123		
H/04/3007		
H/04/3303		
H/04/4804		
H/04/5751		
H/04/7589		
H/04/7993		
H/04/9261		

7.6. Zusammenfassung TMA

	t(11;18) PCR	FOXP1-BAP	FOXP1 num (Signale)	MALT1-BAP	IgH	x3 (Sig.)	FOXP1 immun	BCL10	Sekretor. Diff.
H/99/9207	pos	neg	2	pos	neg	2	neg	keine	keine
H/99/7932	pos	neg	3 bzw. 4	neg	pos	2	pos	mäßig	λ
H/00/1134	neg	neg	3	pos	NA	NA	pos	mäßig	keine
H/96/5089	pos	neg	2	pos	neg	NA	NA	mäßig	keine
H/95/1101	neg	neg	3	pos	neg	2	neg	keine	λ
H/93/4794	neg	neg	2	pos	neg	2	neg	mäßig	λ
H/97/2398	neg	NA	NA	pos	neg	2	neg	keine	λ
H/97/4707	neg	neg	2	neg	neg	2	neg	keine	λ
H/98/1723	pos	neg	2	pos	neg	2	neg	keine	keine
H/98/4017	neg	neg	3 bzw. 4	neg	pos	3	pos	mäßig	λ
H/00/5006	pos	NA	NA	NA	NA	NA	NA	stark	NA
E/00/28344	neg	neg	3 bzw. 4	pos	NA	3	pos	keine	keine
H/01/9299	neg	NA	NA	NA	neg	2	neg	keine	κ
H/02/3928	pos	neg	2	pos	neg	2	neg	mäßig	κ
H/03/5027	neg	neg	2	mehrere Signale	neg	2	neg	keine	λ
H/02/10867	neg	NA	NA	NA	NA	NA	neg	mäßig	keine
H/01/1668	neg	neg	3	pos	pos	3	pos	stark	λ
H/00/5193	neg	neg	3	neg	neg	3	pos	mäßig	keine
H/02/1484	neg	neg	2	pos	neg	2	neg	mäßig	κ
H/96/2114	neg	NA	NA	NA	neg	NA	NA	mäßig	keine
H/95/1412	neg	neg	2	mehrere Signale	NA	2	pos	keine	NA
H/93/4318	neg	NA	NA	mehrere Signale	NA	NA	NA	NA	keine
H/96/6380	neg	neg	2	pos	pos	2	neg	keine	κ
H/97/6024	neg	neg	2	mehrere Signale	NA	2	neg	mäßig	keine
H/98/1379	neg	NA	NA	NA	NA	NA	NA	mäßig	κ
H/98/6801	neg	NA	NA	NA	neg	3	pos	mäßig	keine
H/00/7863	NA	neg	3 bzw. 4	neg	neg	3	pos	keine	NA
H/01/1667	neg	neg	3	NA	neg	3	pos	mäßig	NA
H/01/7998	neg	neg	3 bzw. 4	neg	neg	3	pos	mäßig	NA
E/02/28649	neg	neg	2	mehrere Signale	neg	3	pos	stark	λ
H/03/4965	neg	neg	3	mehrere Signale	neg	3	pos	mäßig	NA
H/03/4409	neg	neg	2	neg	neg	3	neg	mäßig	κ
H/01/4844	neg	neg	2	neg	neg	2	neg	keine	keine
H/00/4014	pos	neg	2	pos	neg	2	neg	mäßig	κ
H/02/9749	neg	neg	2	mehrere Signale	neg	2	neg	keine	keine
H/96/189	neg	neg	2	pos	neg	2	neg	mäßig	κ
H/95/5627	neg	neg	2	neg	pos	2	pos	keine	λ
H/93/4138	neg	NA	NA	NA	neg	2	neg	mäßig	λ
H/92/4533	neg	NA	NA	NA	NA	2	NA	Keine	NA
H/02/10867	neg	NA	NA	NA	NA	NA	neg	mäßig	keine
H/97/6834	neg	neg	3	NA	pos	NA	pos	mäßig	keine
H/99/2278	neg	NA	NA	NA	neg	NA	neg	mäßig	κ

H/00/7099	neg	NA	NA	NA	neg	2	neg	mäßig	keine
H/01/6606	pos	neg	2	pos	neg	2	neg	mäßig	λ
H/01/7330	neg	NA	NA	NA	neg	2	neg	mäßig	κ
H/03/6134	neg	NA	NA	NA	neg	NA	NA	mäßig	keine
H/03/9231	neg	NA	NA	NA	neg	2	neg	mäßig	κ
H/03/12123	neg	neg	2	NA	neg	2	neg	keine	keine
H/04/2053	pos	neg	2	pos	NA	2	neg	mäßig	κ
H/04/3007	neg	neg	3	neg	NA	NA	pos	keine	keine
H/04/3303	pos	neg	2	neg	NA	NA	NA	mäßig	keine
H/04/4804	neg	neg	NA	NA	NA	NA	NA	keine	keine
H/04/5372	pos	NA	NA	NA	neg	NA	NA	mäßig	λ
H/04/5751	neg	NA	2	neg	neg	2	NA	keine	keine
H/04/7589	neg	neg	3	neg	neg	3	pos	mäßig	keine
H/04/7993	neg	neg	2	neg	neg	2	neg	keine	keine
H/04/9261	neg	neg	2	pos	neg mit triploiden Zellen	2	neg	mäßig	keine
E/04/9799	neg	neg	2	neg	neg	2	neg	mäßig	λ
H/04/10838	neg	neg	2	mehrere Signale	NA	2	neg	keine	κ
H/04/12160	neg	NA	NA	NA	NA	2	NA	keine	κ

Abkürzungsverzeichnis

AC 1-4	Primer 1-4 für Aktin
AG	Antigen
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat $H_8N_2O_8S_2$
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	break apart point
bp	base pair
CARD 1	caspase recruitment domain 1
CARMA 1	caspase recruitment domain membrane-associated Guanylate kinase 1
CD	Cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
CTP	Cytosintriphosphat
DAB	3,3`-Diaminobenzidin
DAPI	4`-6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	diverse Nukleintriphosphate (je 12,5 µl ATP, CTP, GTP und TTP + 950 µl Aqua bidest.)
E	Eingangsfall
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eMZBCL	extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOXP1	forkhead box protein 1
GTP	Guanosintriphosphat
H	Referenzfall
HCl	Salzsäure
IgH	Immunglobulinschwerketten

IκB	kappaB-Inhibitor
ISH	In-situ-Hybridisierung
κ	kappa-Leichtkette
λ	lambda-Leichtkette
LSI	lokusspezifisch
M.	Morbus
MALT	mucosa associated lymphatic tissue
MM	Master-Mix
MZBCL	Marginalzonen-B-Zell-Lymphome
NFκB	nuclear factor kappaB
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NP-40	Nonidet-P40 (nonethylen glycol octylphenyl ether)
PA 1-6	Primer 1-6 für API2
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKDB	Proteinase K Digestion Buffer
PM 1-6	Primer 1-6 für MALT1
R.E.A.L.	Revised European-American Lymphoma
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RNA	Ribonucleinacid
RNasin	RNase-Inhibitor
RT	Raumtemperatur (20-21°C)
RT	Reverse Transkriptase
TBE	Puffer aus **T**ris ($C_4H_{11}NO_3$), **B**orsäure und **E**DTA
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylenediamine
TMA	Tissue micro array
TTP	Thymidintriphosphat
SSC	Sodium Chloride Sodium Citrate
WHO	World Health Organisation

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. German Ott für die Überlassung des Themas, die Betreuung sowie für die Übernahme des Korreferates danken.
Mein Dank gebührt ebenso Herrn Dr. med. Patrick Adam, der mit sehr viel Geduld und ständiger Motivation die Erstellung dieser Arbeit intensiv betreute bzw. in dieser Form erst ermöglichte.
Des Weiteren möchte ich mich bei Edda Eckenreiter, die mir bei der Einarbeitung in die notwendige Methodik zur Seite stand, und Dr. med. Eugenia Haralambieva, die mir die Ergebnisse der FISH für diese Arbeit zur Verfügung stellte, bedanken.
Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. med. Martina Hartmann, die „unter Aufbietung ihrer letzten Ressourcen“ den TMA erstellte.
Mein Dank gilt ferner Prof. Dr. med. Hans Konrad Müller-Hermelink für die Übernahme des Referates und .Prof. Dr. med. Ralph C. Bargou, der das Amt des Zweitprüfers übernahm.
Und natürlich nicht zu vergessen die übrigen Mitarbeiter der Labors des Pathologischen Institutes, besonders auch der Immunhistochemie, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ihnen bzw. Euch vielen herzlichen Dank!