

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

**Häufige Aberrationen auf Chromosom 18  
bei gastralen MALT-Lymphomen.**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Alexander Kraus  
aus Regensburg

Würzburg, Februar 2008

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

Korreferent: Priv.- Doz. Dr. med. A. Zettl

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2008

Der Promovend ist Arzt.

## **Inhalt**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Tumorgenese.....	1
1.2	Onkogene und Tumorsuppressorgene .....	1
1.3	Non-Hodgkin-Lymphome: Klassifikation und Eigenschaften .....	3
1.3.1	Extranodale Marginal-Zonen-B-Zell-Lymphome (MZBZL) .....	5
1.3.2	Extranodale, gastrale, diffus-großzellige-B-Zell-Lymphome (DLBCL).....	7
1.4	Problemstellung und verwendete Testsysteme .....	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1	Untersuchungsmaterial .....	10
2.1.1	Gewebegewinnung .....	13
2.1.2	DNA-Extraktion .....	13
2.1.3	Messung der DNA-Menge.....	15
2.1.4	Kontrolle von Tumor- und Normalgewebe-DNA .....	16
2.2	Mikrosatellitenanalyse .....	16
2.2.1	Marker der Satellitenanalyse .....	17
2.2.2	Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion .....	19
2.2.3	Durchführung der Polymerasekettenreaktion .....	20
2.3	Semiquantitative PCR für MALT1- und Bcl-2-Lokus .....	21
2.3.1	Marker der semiquantitativen PCR .....	21
2.3.2	PCR-Ansatz .....	22
2.3.3	Durchführung der semiquantitativen PCR.....	23
2.4	Gelelektrophorese .....	23
2.4.1	Gelherstellung.....	23
2.4.2	Probenvorbereitung.....	25
2.4.3	Gelelektrophorese mittels 377A-DNA-Sequenzier .....	26
2.4.4	Auswertung der Gelelektrophorese .....	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1	Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse .....	33
3.1.1	Mikrosatellitenanalyse der DLBCL.....	33
3.1.2	Mikrosatellitenanalyse der MZBZL .....	36
3.1.3	Ergebnisse der semiquantitativen PCR für MALT1 und Bcl-2.....	38
3.1.4	Ergebnisse der semiquantitativen PCR bei den DLBCL.....	38
3.1.5	Ergebnisse der der semiquantitativen PCR bei den MZBZL .....	39

3.2	Vergleich der Aberrationen zwischen DLBCL und MZBZL.....	43
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Literaturnachweis.....</b>	<b>57</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Tumorgenese**

1914 vermutete der an der Universität Würzburg tätige Professor Theodor Boveri in seinem Werk „Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“, dass Veränderungen der Erbsubstanz eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Krebserkrankungen spielen. Er äußerte bereits 1902, in Anlehnung an eigene Versuche über die Entwicklung doppeltbefruchteter Seeigelleier die Vermutung, „dass maligne Tumoren die Folge eines gewissen abnormen Chromosomenbestandes sein könnten“. Das für ihn Naheliegendste war, „bestimmte teilungshemmende Chromosomen“ anzunehmen. Würde deren hemmende Wirkung durch äußere Reize vorübergehend überwunden, so würde Zellteilung erfolgen. Die Zelle des unbegrenzt wachsenden Tumors aber würde dann entstehen, wenn jene „Hemmungschromosomen“ beseitigt wären. Gleichzeitig vermutete er, dass die Existenz teilungsfördernder Chromosomen seinem Postulat Genüge leisten könnte. „Bei dieser Annahme würde Zellteilung dann erfolgen, wenn die für gewöhnlich zu schwache Wirkung dieser Chromatinteile durch einen Reiz gesteigert wäre. Und die unbegrenzte Wucherungstendenz maligner Tumorzellen wäre aus einem permanenten Übergewicht dieser teilungsfördernden Chromosomen abzuleiten“ (Boveri 1914). Wenn auch zur damaligen Zeit nur geringe Kenntnisse über Bau und Funktionsweisen unseres Genoms existierten und molekulargenetische Analyseverfahren in sehr weiter Zukunft lagen, so erkannte Theodor Boveri vor über 90 Jahren schon zwei grundlegende Wege der Entstehung maligner Tumore. Im Prinzip gaben seine Vermutungen die Wirkungsweise von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen wieder.

## **1.2 Onkogene und Tumorsuppressorgene**

Onkogene sind zelluläre Gene, deren Expressionsprodukte vor allem Proliferation, Mobilität und Differenzierung von Zellen regulieren. In mutierter oder aktivierter Form werden diese Gene zu dominanten, wachstumsstimulierenden Onkogenen, die durch Fehlregulation oder strukturelle Veränderungen ihres Genproduktes unkontrollierte Wachstums- oder Differenzierungsprozesse auslösen (Böcker 2001). Der Begriff

Onkogen impliziert eine dominante Wirkung auf die maligne Transformation, was bedeutet, dass jeweils nur ein Allel des entsprechenden Onkogens aktiviert werden muss, um zur malignen Transformation führen zu können (Wagener 1999). Die Aktivierung von Onkogenen erfolgt über verschiedene Mechanismen. Zum einen durch Amplifikation, das heißt die Vermehrung des normalerweise in zweifacher Kopie vorhandenen Gens. Amplifikationen können ohne Veränderungen der Sequenz oder mit Mutationen auftreten. Zum anderen können chromosomale Translokationen zur Onkogenaktivierung führen. Bei solchen Translokationen kann es zur Überexpression von strukturell nicht veränderten Onkogenprodukten kommen. Dies ist beispielsweise bei der Translokation t(14;18) folliculärer Lymphome der Fall. Hier kommt es zu einer Überexpression des Bcl-2-Onkogens. Eine dritte Möglichkeit ist, die Entstehung von Fusionsgenen durch eine direkte Veränderung der Chromosomenstruktur. Fusionsgene bilden sich beispielsweise bei chronisch-myeloischen Leukämien in ca. 90 Prozent der Fälle, indem es zu einer mit dem Philadelphia-Chromosom einhergehenden Translokation t(9;22)(q34;q11) kommt. Das ABL-Protonkogen (entspricht dem murinen Onkogen des Abelson-Maus-Leukämie-Virus) wird von Chromosom 9 auf Chromosom 22 übertragen und in den als „Breakpoint Cluster Region“ (BCR) bezeichneten Ort integriert. Dabei entsteht das BCR-ABL-Fusionsgen, dessen gebildeten Transfusionsproteine eine Blockierung der Tyrosinaktivität aufheben (Wagener 1999).

Eine andere wichtige Gruppe der an der Tumorentstehung beteiligten Gene sind Tumorsuppressorgene. Sie sind zelluläre Gene, deren Genprodukte Wachstum kontrollieren. Der Verlust dieser Funktion durch fehlende Bildung oder Bildung eines mutierten Proteins führt zu einem deregulierten Wachstum von Tumorzellen (Böcker 2001). Erstmals wurden solche Gene nach der Auswertung von Retinoblastomfällen von Knudson angenommen (Knudson 1971). Er ging davon aus, dass Veränderungen der Allele rezessiv sind. Das bedeutet dass maligne Tumoren nur dann entstehen können, wenn beide normalen Allele der Tumorsuppressorgene mutiert sind oder verloren gehen. Somit sind also zur malignen Progression über den Weg der Tumorsuppressorgene zwei, beide Allele betreffende Ereignisse nötig, was Knudson in seiner „two hit“-Hypothese postulierte (Knudson 1971, Knudson 1985). Als klassisches Beispiel dient die Entstehung des Retinoblastoms.

Es gibt aber auch weitere Beispiele der Tumorsuppressorgeninaktivierung. Zum Beispiel durch Methylierung der DNA. Unter anderem konnte bei Prostatakarzinomen eine Methylierung des 14-3-3 sigma-Gens gezeigt werden. Nach DNA-Schädigung kommt es physiologisch zu einer p53-Aktivierung, welche das 14-3-3 sigma-Gen induziert. Dieses kodiert Proteine welche die Zellteilung hemmen. Aufgrund einer Methylierung des 14-3-3 sigma-Gens kann diese DNA nicht transkribiert werden und verliert somit die Funktion (Lodygin, *et al* 2004).

Welche Rolle diese Tumorsuppressorgene in der Onkogenese spielen können, zeigt sich beispielsweise an dem p53-Gen, dessen Produkt, ein Transkriptionsfaktor, als Zellzykluskontrollpunktprotein agiert und somit zu einem Zellzyklusstop in der späten G1-Phase oder zur Apoptose nach DNA-Schädigung führt (Kastan, *et al* 1991, Kuerbitz, *et al* 1992, Lane 1992). Mutationen des p53-Genes finden sich in 40-45 Prozent aller Tumoren (Soussi, *et al* 1994).

Darüber hinaus spielen, wie in der Übersicht von Hanahan *et al.* geschildert, bei der Tumorentwicklung eine Reihe weiterer Gensysteme, wie Apoptose-, Telomerase- und DNA-Reperaturgene eine Rolle (Hanahan and Weinberg 2000).

### **1.3 Non-Hodgkin-Lymphome: Klassifikation und Eigenschaften**

Maligne Tumoren der B- oder T-Zellreihe mit autonomer Proliferation werden als Lymphome bezeichnet. Man unterscheidet grundsätzlich Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome. Da sich diese Doktorarbeit ausschließlich mit der Analyse von Genveränderungen bei Non-Hodgkin-Lymphomen beschäftigt, begrenzen sich die folgenden Erläuterungen ausschließlich auf die Klasse der Non-Hodgkin-Lymphome.

Maligne Lymphome treten in Europa in fünf bis sieben Fällen pro 100 000 Einwohner mit steigender Tendenz auf. In 60 Prozent der Fälle handelt es sich um Non-Hodgkin-Lymphome. 80 bis 85 Prozent sind B-Zell-Lymphome und nur 15 bis 20 Prozent sind T-zellulären Ursprungs (Böcker 2001).

Die Lymphom-Klassifizierung erlebt einen stetigen Wandel. 1974 verfassten Lennert *et al* die Kiel-Klassifikation (Lennert, *et al* 1975), welche auf der genauen zytologischen Beschreibung basiert. Daneben bestand die vorwiegend in den USA verwendete

„Working Formulation“. Dieses unbefriedigende Nebeneinander konnte überwunden werden, indem Pathologen beider Kontinente in den 90-er Jahren die REAL-Klassifikation (Revised-European-American-Lymphomklassifikation) erarbeiteten. Im Mittelpunkt stand die Definition distinkter Lymphomkrankheiten, die sich mit hoher Reproduzierbarkeit diagnostizieren ließen. Hierzu wurden nicht nur morphologische und klinische, sondern auch neuere Kenntnisse über immunphänotypische und molekulargenetische Merkmale herangezogen (<http://www.lymphome.de>) (Harris, *et al* 1994). Aktuell gilt die neue WHO-Klassifikation der Lymphome, in der nach der Linienzugehörigkeit zur B- oder T-Zellreihe und nach dem Differenzierungsbeziehungswise Reifegrad der Lymphomzellen, mit Unterscheidung in Vorläuferzell-Lymphome und „periphere“ Lymphome unterschieden wird. Dabei werden manche Lymphomtypen, wie das Mantelzelllymphom (membranständige Expression von IgM) oder das folliculäre Lymphom (in 90 Prozent der Fälle t(14;18)) molekular definiert. Die Unterscheidung zwischen niedrigmalignen und blastischen hochmalignen Lymphomen, wie aus der Kiel-Klassifikation bekannt, wird nicht mehr verwendet (<http://www.lymphome.de>) (Jaffe 2001).

Non-Hodgkin-Lymphome werden von neoplastischen, lymphatischen Zellen verschiedenster Morphologie bestimmt. Aufgrund morphologisch-zytologischer Unterschiede lassen sich die Lymphome in ehemals niedrigmaligne, Lymphozyten- oder Zentrozyten-dominierte und ehemals hochmaligne, Blasten-dominierte, differenzieren. Während niedrigmaligne Lymphome geringe Proliferationsraten und damit einen relativ langsamen Verlauf aufweisen, zeigen die hochmalignen eine rasche Proliferation und die Tendenz zur schnellen Generalisierung. Übergänge von niedrig- in sekundär hochmaligne Formen sind möglich und mit einer schlechteren Prognose als bei primär hochmalignen verbunden.

Des Weiteren unterscheidet man nach dem Ort der Entstehung: primär nodale Lymphome, welche primär in Lymphknoten entstehen und sekundär vor allem Milz, Leber, Knochenmark und Gastrointestinaltrakt besiedeln können. Primär extranodale Lymphome befallen primär Organe wie Milz, Leber oder Organe des Gastrointestinaltraktes. Der Anteil primär extranodaler Lymphome an der Gesamtheit der Non-Hodgkin-Malignome liegt bei etwa einem Drittel (Böcker 1997).



Zu den primär gastrointestinalen B-Zell-Lymphome gehören unter anderen extranodale Marginalzonen-B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ (MZBZL; nach WHO: Gruppe I; low risk; ehemals niedrigmaligne MALT-Lymphome) und diffus-großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL; nach WHO: Gruppe II; intermediate risk). Die Gruppe der Marginalzonen-Lymphome besteht neben denen des MALT aus splenischen und nodalen Formen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um verschiedene Lymphomenitäten mit ähnlichem Wachstumsmuster in der Marginalzone der B-Follikel (<http://www.lymphome.de>) (Jaffe E 2001).

### **1.3.1 Extranodale Marginal-Zonen-B-Zell-Lymphome (MZBZL)**

Lymphome vom MALT-Typ, die sieben bis acht Prozent aller Non-Hodgkin-Lymphome ausmachen, sind häufig mit chronischen Entzündungen assoziiert (1997). Anhand der 1991 von Wotherspoon et al. untersuchten 110 MALT-Lymphome des Magens, von denen 102 der Patienten eine *Helicobacter pylori*-Infektion aufwiesen und der Forschungsarbeit von Hyjek et al. über den Zusammenhang myoepithelialer Sialadenitiden mit primären B-Zell-Lymphomen von Speicheldrüsen, nimmt man an, dass eine langanhaltende Antigenstimulation nicht nur zur Ausbildung eines erworbenen MALT sondern auch zu primären MZBZL autoimmuner Genese führen kann (Genta, *et al* 1993, Greiner, *et al* 1994, Hyjek, *et al* 1988, Wotherspoon, *et al* 1991). 1994 wurde diese Hypothese durch die Assoziation von 66 Prozent der untersuchten Magenlymphome zu *Helicobacter pylori*- Infektionen bestätigt (Parsonnet, *et al* 1994). Einige durch *Helicobacter pylori*-assoziierte und damit verbundener Antigenstimulation verursachter, gastrischer MALT-Lymphome zeigten im Frühstadium durch antibiotische Eradikation eine Regression (Wotherspoon, *et al* 1993). Dies konnte auch bei einigen ehemals als hochmaligne bezeichneten Fällen nachgewiesen werden (Morgner, *et al* 2001). Insgesamt haben MALT-Lymphome im Gegensatz zu nodulären Lymphomen eine günstigere Prognose, da sie oft jahrelang auf ein Organ beschränkt bleiben und nur eine geringe Neigung zum Befall entfernter Lymphknoten zeigen (Böcker 2001).

Charakteristisch für ehemals niedrigmaligne B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ (nach WHO: Gruppe I: indolente Lymphome; low risk) sind herdförmige Besiedelung und

Infiltration des Drüsenepithels durch neoplastische Zellen, was als Epitheliotropismus bezeichnet wird und zu sogenannten lymphoepithelialen Läsionen führt. In der Frühphase wird dies von einer ausgeprägten folliculären Hyperplasie begleitet (Böcker 1997, Isaacson 1999). Forschungsarbeiten von Isaacson et al. zeigen, dass normalerweise reaktive, von neoplastischen Zellen durchsetzte Follikel vorhanden sind. Der Tumor besteht aus Marginalzonenzellen, Zellen kleiner bis mittlerer Größe, mit leicht irregulären Kernen, welche mäßig verstreutes Chromatin, einen unauffälligen Nukleolus und relativ blasses Zytoplasma aufweisen. Bei Ansammlung von mehr blassgeflecktem Zytoplasma ähneln sie monozytoiden Zellen, aber auch Ähnlichkeiten zu kleinen Lymphozyten sind vorhanden. Große Zellen, wie Immunoblasten sind vorhanden, aber zahlenmäßig unterlegen (Isaacson and Spencer 1987, Isaacson, *et al* 1991, Jaffe 2001).

Übergänge in ehemals als hochmaligne bezeichnete Lymphome in Form von großzellig-diffusen B-Zell-Lymphomen (DLBCL= diffus large B-cell-lymphoma), mit zum Teil parallel auftretenden Komponenten werden in ungefähr 20 bis 30 Prozent der Fälle beobachtet (Chan, *et al* 1990, Fearon, *et al* 1990, Hyjek and Isaacson 1988).

Drei Tranlokationen scheinen bei der Entstehung der MZBZ-Lymphome eine entscheidende Rolle zu spielen.

Bei der Translokation t(11;18)(q21;q21), die in 27-48 Prozent der MZBZL des MALT nachgewiesen wurde, werden unterschiedlich lange Teile des MALT1-Gens in BIRC3 (ehemals: Apoptose-Inhibitor-Gen API2) auf 11q21 integriert (Baens, *et al* 2000, Dierlamm, *et al* 1999, Motegi, *et al* 2000, Ott, *et al* 1997, Roy, *et al* 1997). Es wird angenommen, dass bei MZBZL, die eine t(11;18)-Translokation aufweisen, Übergänge in DLBCL nicht vorkommen (Starostik, *et al* 2002). Dazu zeigt sich in diesen Fällen eine signifikant niedrige Anzahl anderer genetischer Aberrationen. Bei Translokation t(11;18)-negativer Lymphome, welche häufiger genetische Aberrationen zeigen, werden Übergänge in DLBCL angenommen (Starostik, *et al* 2002).

Eine weitere Translokation stellt t(14;18)(q32;q21) dar. Dabei sind der IGH-Lokus (immunoglobulin heavy-chain locus) auf 14q32 und das MALT1-Gen auf 18q21 betroffen. Die Überexpression von MALT1 ist dabei durch Rearrangement mit dem IGH

bedingt. Im Gegensatz zu t(11;18)(q21;q21) scheint diese Translokation häufig in MZBZL vom MALT-Typ der Leber, des Auges, der Haut oder Speicheldrüse vorzukommen. Kein Vorkommen zeigt sich jedoch in MZBZL des Gastrointestinaltrakt oder der Lunge (Streubel, *et al* 2003).

Die seltene, dritte Translokation, die nur bei B-Zell-Lymphomen vom MALT-Typ nachgewiesen werden kann ist t(1;14)(p22;q32), welche zu einer Überexpression von Bcl-10 führt (Streubel, *et al* 2006, Willis, *et al* 1999, Wotherspoon, *et al* 1992, Zhang, *et al* 1999).

### **1.3.2 Extranodale, gastrale, diffus-großzellige-B-Zell-Lymphome (DLBCL)**

Die diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome (nach WHO: Gruppe II: aggressive Lymphome; intermediate risk) sind diffuse Proliferationen großer neoplastischer B-Lymphozyten, welche 30 bis 40 Prozent der Non-Hodgkin-Lymphome bei Erwachsenen ausmachen. In bis zu 40 Prozent beschränken sie sich wenigstens zunächst auf extranodale Bereiche, wie das MALT, wobei sich der Tumor schnell vergrößert (Jaffe 2001). Morphologisch zeigen sich verschiedene Varianten. Die häufigste stellt die zentroblastische Variante mit mittelgroßen bis großen lymphatischen Zellen, ovalen bis runden blasigen Zellkernen und zwei bis vier membranbegrenzten Nukleoli dar. Die immunoblastische Form besteht zu über 90 Prozent aus Immunoblasten mit einem einzigen zentralen Zellkern und einer beträchtlichen Menge an basophilem Zytoplasma (Jaffe 2001). Die infiltrierenden Tumorzellen sind bei den DLBCL destruktiver als bei MZBZL (Chan, *et al* 1990). Reaktive Follikel sind nicht vorhanden, es werden aber auch lymphoepitheliale Läsionen gesehen (Isaacson 1999).

Im Rahmen der Typisierung konnten drei Genexpressions-Subtypen mit unterschiedlichen Prognosen für das Überleben des Patienten ermittelt werden. DLBCL mit einem keimzentrumzellähnlichen Genexpressionsmuster (DLBCL vom sogenannten Germinal-Center-B-Cell-Typ; kurz GCB-like-Typ) zeigten die höchste 5-Jahres-Überlebensrate mit 60 Prozent. Nur in diesem Subtyp konnten eine Bcl-2-Translokationen t(14;18)(q32;q21) und c-rel Amplifikationen nachgewiesen werden (Rosenwald, *et al* 2002). Ein Genexpressionsmuster, welches normalerweise in vitro bei der Aktivierung von peripheren B-Zellen des Blutes induziert wird, weisen die DLBCL

vom ABC-like-Typ (Activated-B-Cell) auf (Alizadeh, *et al* 2000). Dieser Subtyp weist eine 5-Jahres-Überlebensrate von 35 Prozent auf (Rosenwald, *et al* 2002). Eine weitere Gruppe stellen die Typ-3-DLBCL dar, welche keine auffällig hohen Genexpressionen und eine 5-Jahres-Überlebensrate von 39 Prozent zeigten (Rosenwald, *et al* 2002).

In 20 bis 30 Prozent der DLBCL ist die Translokation t(14;18)(q32;q21), bei der das antiapoptotisch wirkende Bcl-2-Gen in die Immunglobulin-Enhancer-Region transloziert wird, nachzuweisen (Bakhshi, *et al* 1985, Lipford, *et al* 1987, Weiss, *et al* 1987, Yunis, *et al* 1982).

Beschrieben wird die seltene Translokation t(11;18)(q21;q21), bei der Teile des MALT1-Genes in BIRC3 auf 11q21 integriert werden (Huang, *et al* 2003).

Die Translokation t(14;18)(q32;q21), bei der MALT1 in den IGH-Lokus transloziert wird, konnte bisher nur in einem DLBCL-Fall der Haut nachgewiesen werden (Cook, *et al* 2003).

#### **1.4 Problemstellung und verwendete Testsysteme**

In Bande q21 auf Chromosom 18 befinden sich Onkogene wie MALT1 und Bcl-2, sowie die Tumorsuppressorgene Dpc4 und DCC (Akagi, *et al* 1999, Fearon, *et al* 1990, Hahn, *et al* 1996, Tsujimoto, *et al* 1984). Bei Marginalzonen-B-Zell-Lymphomen vom MALT-Typ, diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen, follikulären Lymphomen oder bei Mantelzell-Lymphomen sind Bcl-2- oder MALT1-Gen-Translokationen als Ursache für die Entstehung ermittelt worden (Baens, *et al* 2000, Hockenbery, *et al* 1991, Lipford, *et al* 1987, Ott, *et al* 1997, Streubel, *et al* 2003, Tsujimoto, *et al* 1985, Weiss, *et al* 1987, Yunis, *et al* 1987). Das MALT1-Gen scheint zumindest bei MZBZL vom MALT-Typ und selten bei DLBCL im Rahmen der Translokation t(11;18)(q21;q21), sowie bei der Translokation t(14;18)(q32;q21) bei DLBCL der Haut eine wichtige Rolle zu spielen (Baens, *et al* 2000, Cook, *et al* 2003, Huang, *et al* 2003, Lucas, *et al* 2001, Ott, *et al* 1998, Ott, *et al* 1997).

In 20-30 Prozent der DLBCL konnte eine Translokation des Bcl-2-Gens (t(14;18)(q32;q21)) gezeigt werden (Bakhshi, *et al* 1985, Lipford, *et al* 1987, Weiss, *et al* 1987, Yunis, *et al* 1982). Eine Translokation des Bcl-2-Gens konnte bei MZBZL

vom MALT-Typ bisher noch nicht nachgewiesen werden (Clark, *et al* 1992, Pan, *et al* 1989).

Ziel dieser Doktorarbeit war es festzustellen, ob bei MZBZL und DLBCL neben den bekannten Translokationen selektive MALT1- oder Bcl-2-Genveränderungen, wie Amplifikationen nachweisbar sind. Zudem sollte überprüft werden, ob Bcl-2 auch bei MZBZL eine Rolle spielen könnte. Dies konnte bisher bei MZBZL noch nicht nachgewiesen werden.

Hierfür wurden zunächst Bereiche der 18q21-Region mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse auf genetische Veränderungen untersucht. Dadurch sollten Veränderungen im Bereich der Gene Bcl-2 und MALT1 detektiert werden. Daraufhin sollte überprüft werden, ob die festgestellten Amplifikationen im Bereich der Mikrosatelliten auch die Gene Bcl-2 und MALT1 selbst betreffen. Hierfür wurden DNA-Abschnitte von MALT1 und Bcl-2 der Lymphome mittels semiquantitativer PCR amplifiziert.

## **2 Material und Methoden**

Die folgenden Schritte wurden mittels gängiger Verfahren von der Materialgewinnung über die Amplifikation mittels PCR bis hin zur Gel-Elektrophorese durchgeführt (Sambrook 1989).

### **2.1 Untersuchungsmaterial**

Die Diagnosen der zu untersuchenden Lymphome wurden am Institut für Pathologie der Universität Würzburg nach WHO- und REAL-Klassifikation gestellt (Harris, *et al* 1999, Harris, *et al* 1994, Jaffe E 2001). Zusätzlich wurden die Lymphome in klinische Stadien nach Musshoff (Tabelle 1) eingeteilt (Musshoff 1977).

Nach der WHO-Klassifikation handelte es sich bei allen, ehemals hochmalignen Fällen um primär gastrale DLBCL (Diffuse Large B-Cell Lymphoma) und bei allen ehemals niedrigmalignen um reine gastrale MZBZL (Marginal Zonen B-Zell Lymphome) vom MALT-Typ (Jaffe E 2001). Als Untersuchungsmaterial standen Gewebeproben von 30 DLBCL und 24 MZBZL vom MALT-Typ zur Verfügung. Bei den untersuchten DLBCL waren 22 Patienten männlich und acht weiblich. Die Altersspanne erstreckte sich von 31 bis 79 Jahre und betrug durchschnittlich 58 Jahre. Patienten mit MZBZL waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 32 und 75 (Durchschnitt: 54 Jahre) alt. Davon waren 16 männlich und acht weiblich. Bei allen DLBCL- und 16 MZBZL-Proben konnte jeweils Tumor- und tumorfreie DNA aus tiefgefrorenem Frischmaterial gewonnen werden. Für die restlichen acht MZBZL Fälle stand nur formalinfixiertes Paraffinmaterial zur Verfügung.

**Tabelle 1:** Stadieneinteilung der malignen Lymphome des Gastrointestinaltraktes (Ann-Arbor-Modifikation nach Musshoff)(Classen 1994)

Stadium IE1	uni- oder multilokulärer Magenbefall ohne Lymphknotenbeteiligung und ohne Organinfiltration per continuitatem; Lymphom beschränkt auf die Mukosa und Submukosa
Stadium IE2	uni- oder multilokulärer Magenbefall ohne Lymphknotenbeteiligung und ohne Organinfiltration per continuitatem; Lymphom überschreitet die Submukosa
Stadium IIE1	uni- oder multilokulärer Magenbefall einschließlich der regionalen Lymphknoten (1.-2. Kompartiment) oder Organinfiltration per continuitatem
Stadium IIE2	uni- oder multilokulärer Magenbefall über den regionalen Lymphknotenbefall hinausgehend und Organinfiltration per continuitatem oder lokalisierter Organbefall unterhalb des Zwerchfells
Stadium IIIE	uni- oder multilokulärer Magenbefall und Lymphknotenbefall ober- und unterhalb des Zwerchfells einschließlich eines lokalisierten Organbefalls unter- oder oberhalb des Zwerchfells
Stadium IVE	uni- oder multilokulärer Magenbefall mit oder ohne Befall benachbarter Lymphknoten sowie diffuser oder disseminierter Befall eines oder mehrerer extraintestinaler Organe

**Tabelle 2:** Daten zu beiden Patientengruppen (DLBCL: D1-30; MZBZL M1-24), Tumorstadium nach Musshoff (Classen 1994)

<b>DLBCL</b>				<b>MZBZL</b>			
<b>Fallnummer</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Tumorstadium</b>	<b>Fallnummern</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Tumorstadium</b>
D1	75	m	EII1	M1	56	m	EI2
D2	63	m	EII1	M2	57	m	EII1
D3	35	m	EI2	M3	59	m	EI2
D4	77	m	EII1	M4	36	m	EIII
D5	67	m	EII1	M5	38	m	EII2
D6	62	m	EII1	M6	32	w	EI1
D7	59	w	EI2	M7	43	m	EI2
D8	74	m	EI2	M8	unbek.	w	EI1
D9	64	m	EI2	M9	60	m	EI2
D10	65	m	EII1	M10	74	m	EI1
D11	77	w	EII1	M11	48	m	EI1
D12	31	m	EI2	M12	52	m	EI1
D13	62	m	EI1	M13	46	w	EII1
D14	67	w	EIII	M14	50	m	EII2
D15	65	m	EI2	M15	75	m	EII1
D16	71	w	EI1	M16	41	m	EII1
D17	70	w	EII1	M17	65	w	unbek.
D18	34	m	EI2	M18	53	w	unbek.
D19	42	m	EII1	M19	49	m	EII1
D20	70	w	EI1	M20	unbek.	m	EI2
D21	65	w	EI1	M21	54	w	EII1
D22	34	m	EI2	M22	57	m	unbek.
D23	68	m	EI2	M23	69	w	EII1
D24	38	m	EI2	M24	67	w	EII1
D25	41	m	EI2				
D26	36	m	EI2				
D27	79	m	EII2				
D28	69	m	unbek.				
D29	49	w	EI2				
D30	34	m	EII2				



### **2.1.1 Gewebegewinnung**

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden von jedem Fall aus Tumor- und tumorfreiem Gewebe, beziehungsweise bei gefrorenem Frischmaterial, mittels Kryostat 10 bis 20 ungefähr 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Der erste und letzte Schnitt eines Gewebes wurde mit H&E (Hämatoxilin-Eosin) gefärbt, um die benötigten tumorhaltigen und -freien Gewebeabschnitte ausfindig machen zu können. Unter dem Mikroskop war es bei Frischmaterial möglich die benötigten Gewebestücke, durch Vergleich der zwei gefärbten Schnitte mit den nicht gefärbten Schnitten zu erkennen und anschließend mit Hilfe einer Rasierklinge vom Objektträger zu entfernen. Die Paraffinschnitte wurden mit Nuclear Fast Red gefärbt und daraufhin gleichfalls unter dem Mikroskop untersucht, um auch hier die jeweils nötigen Gewebeteile abzutragen (Burton, *et al* 1998). Das gewonnene Material wurde in ein 1,5 ml Reaktionsbehältnisse (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) gefüllt.

Ziel war es, von jedem Patienten Gewebe und später DNA mit möglichst hohem Tumoranteil und tumorfreies Gewebe, dessen DNA bei der späteren Analyse als Vergleich diente, zu gewinnen.

### **2.1.2 DNA-Extraktion**

#### **2.1.2.1 Extraktion aus Frischgewebe**

Zunächst wurde das mit Gewebe gefüllte 1,5 ml Reaktionsbehältnis zentrifugiert, wodurch sich die Gewebestücke auf dem Grund absetzten. Dazu gibt man 300 µl Verdaupuffer (pH 8,0).

Verdaupuffer:           100mM NaCl  
                              25mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat), pH 8,0  
                              10mM Tris-Cl, pH 8,0  
                              0,5% SDS (Sodiumdodecylsulfat)

Um die Zellkerne aufzubrechen und die genomische DNA freizusetzen, wurden 20 µl Proteinase K (entspricht 0,45 mg) zugesetzt und mindestens einen Tag bei 50°C und

300 Rüttlern pro Minute in einem Thermomixer belassen. Sobald keine Gewebestücke mehr zu erkennen waren, konnte mit der Extraktion fortgefahren werden.

Zur Trennung der DNA von anderen Zellbestandteilen wurden 600 µl Phenolchloroform, gemischt aus Phenol, Chloroform und Isoamyl- Alkohol in einem Verhältnis von 25:24:1, zugesetzt, für 45 Sekunden geschüttelt und anschließend für 5 Minuten bei 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Vorsichtig wurde die wässrige, obere Phase (möglichst ohne feste Bestandteile) abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß gefüllt. Diese Schritte (beginnend mit der Zugabe von Phenolchloroform) mussten dreimal durchgeführt werden, bevor man 500 µl Chloroform zugab, ebenfalls 45 Sekunden geschüttelt, 5 Minuten bei 14000 Umdrehungen pro Minute zentrifugierte, anschließend die obere wässrige Phase, welche die DNA enthielt abnahm und in ein neues 1,5 ml Gefäß gab.

Um die gelöste DNA auszufällen, musste man dreimolares-Natriumacetat in einem Volumen von ungefähr einem Zehntel, des im Gefäß befindlichen Volumens und 1ml 100%iges kaltes Ethanol (minus 20°C) zugeben. Um möglichst viel DNA auszufällen, wurde das Gemisch für mindestens zwei Stunden bei minus 70°C oder über Nacht bei minus 20°C in den Gefrierschrank gestellt. Nach dieser Wartezeit zentrifugierte man bei 4°C für fünf Minuten mit maximaler Drehzahl. Auf dem Boden des Reaktionsgefäßes hatte sich nun ein DNA- Pellet gebildet. Der flüssige Überstand wurde mit einer Pipette entfernt und verworfen. Nochmals wurde 1 ml kaltes 70%iges Ethanol (-20°C) zugegeben, bei 4°C zentrifugiert und der flüssige Überstand abpipettiert. Zum Verdampfen des restlichen Ethanols stellte man das offene Reaktionsgefäß bei 37°C für mindestens 30 Minuten in einen Heizblock. Durch Zugabe von 200 µl sterilem Wasser wurde die DNA abschließend gelöst und bei minus 70°C aufbewahrt.

#### **2.1.2.2 Extraktion aus Paraffinmaterial**

Zur Extraktion der DNA aus Paraffinmaterial mussten dem Verdau noch einige Schritte vorangehen, um das Gewebe zu entparaffinieren. Dafür gab man 800 µl Xylol in das Reaktionsgefäß, schüttelte und zentrifugierte bei maximaler Drehzahl für ungefähr fünf Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Dieser erste Arbeitsschritt wurde wiederholt. Anschließend gab man dem zurückbleibenden Gewebe

800 µl 96%iges Ethanol zu. Das Gemisch wurde abermals geschüttelt und zentrifugiert. Nach vollständigem Abpipettieren des Überstandes und Trocknen des Gewebes im Heizblock bei 50°C erfolgte die weitere DNA-Extraktion wie zuvor bei paraffinfreiem Gewebe beschrieben.

### **2.1.2.3 Verdau nach Higuchi**

Musste davon ausgegangen werden, dass mittels der zuvor genannten Verdaumethoden nur wenig DNA extrahiert werden konnte, fand der Verdaupuffer nach Higuchi Verwendung (Lagerung bei -20°C).

Verdaupuffer nach Higuchi:

- 50mM KCl
- 10mM Tris-HCl, pH 8,3
- 2,5mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,1mg/ml Gelatine
- 0,45% Nonidet P40 (Boehringer, Mannheim)
- 0,45% Tween 20 (Boehringer, Mannheim)

Für die jeweilige Extraktion wurden 300 µl Higuchi-Digestionspuffer und 10 µl Proteinase K (entspricht 0,225 mg) zugesetzt und mindestens über Nacht bei 50°C und 300 Rüttlern pro Minute inkubiert. Danach wurde die Proteinase K 7 Minuten bei 95°C inaktiviert. Die weiteren Extraktionsvorgänge, beginnend mit der Zugabe von 600 µl Phenolchloroform, entsprechen den im Abschnitt DNA-Extraktion beschriebenen Schritten.

Alle diese Tätigkeiten erfolgten stets mit chemikalien-undurchlässigen Handschuhen und unter einem Abzug.

### **2.1.3 Messung der DNA-Menge**

Zur Bestimmung der aus einer Gewebeprobe extrahierten DNA-Menge wurde eine 1:100-Verdünnung (2 µl DNA auf 198 µl Wasser) der zuvor erhaltenen DNA-Lösung angelegt. Mittels photometrischer Messung bei 260 nm (Beckmann Instruments, Inc., Fullerton, California, USA) und unter Berücksichtigung der Verdünnung konnte die

DNA-Konzentration errechnet und daraufhin DNA-Lösungen von jeweils 10 ng/μl für die späteren Analysen angelegt werden.

#### **2.1.4 Kontrolle von Tumor- und Normalgewebe-DNA**

Im Rahmen einer vorangegangenen Forschungsarbeit erfolgte mittels Analyse der CD3-Region des IGH-Chain-Gens die Kontrolle der gewonnenen DNA auf Monoklonalität bei Tumoren und Polyklonalität bei Normalgewebe (Starostik, *et al* 2002). Dadurch konnte die Tumorfreiheit der DNA des Normalgewebes überprüft und der Tumoranteil der gewonnenen Tumor-DNA, welcher möglichst hoch sein sollte, ermittelt werden.

## **2.2 Mikrosatellitenanalyse**

Die Mikrosatellitenanalyse als Testsystem ermöglicht eine genaue Aussage über DNA-Veränderungen beim Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe. Mikrosatelliten sind tandemartige, repetitive Sequenzen. Sie bestehen meist aus  $(CA)_N$ - $(GT)_N$ - oder  $(AT)_N$ -Wiederholungen, seltener aus drei oder vier Nukleotid-Wiederholungen, welche über das gesamte Genom verstreut, meist in Introns zu finden sind über 1 Prozent der DNA ausmachen. Die Gesamtlänge der polymorphen Mikrosatelliten beträgt wenige 100 Basenpaare. Die Vererbung erfolgt stabil. Über die exakte Funktion von Mikrosatelliten ist bisher nicht viel bekannt. Veränderungen von Mikrosatelliten scheinen während der Zellteilung in einer einzigen transformierten Zelle erworben zu sein und breiten sich durch klonale Expansion aus. Durch die Mikrosatellitenanalyse entdeckte man mögliche neue Marker zum Malignomscreening, weil einfach und schnell Änderungen der Mikrosatelliten zwischen DNA des Normalgewebes und DNA des Tumorgewebes nachgewiesen werden können (Mao, *et al* 1994). Zudem lassen Veränderungen im Bereich dieser Mikrosatelliten auf Veränderungen in nahegelegenen Genen (möglichen Protoonko- oder Tumorsuppressorgenen) schließen. Mikrosatelliteninstabilitäten können beispielsweise in erblichen, nicht-polypösen, kolorektalen Karzinomen (HNPCC) nachgewiesen werden und sind auf Defekte in den DNA-Reparaturmechanismen der Zelle während der DNA-Replikation zurückzuführen (Kinzler and Vogelstein 1996).

Ein großer Vorteil von Mikrosatelliten besteht darin, dass sie sich mittels

Polymerasekettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction) amplifizieren lassen (Santos, *et al* 1999, Wagener 1999). Somit sind sie ein guter Marker um DNA-Defekte zu detektieren. Darüber hinaus kann man mit dieser Methode Vermutungen zur Defektbeteiligung nahegelegene Gene treffen.

### **2.2.1 Marker der Satellitenanalyse**

Die Sequenzen der Mikrosatellitenmarker und deren Lokalisation, welche für die Amplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) benötigt wurden, konnten unter <http://www.ensembl.org> und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview> ermittelt werden. Von zentro- nach telomerisch ergaben sich folgende Mikrosatelliten: D18S467, D18S474, D18S1099, D18S484, D18S1156, D18S35, D18S1127, D18S1144, D18S1129, D18S1103, D18S1147, D18S497, D18S462. Die Synthese der Primer und die Markierung eines der beiden Primer eines jeden Paares am 5`-Ende mit fluoreszierenden Phosphoramiden wurde von der Firma MWG-Biotech (München, Deutschland) durchgeführt. Als Markierungsfarbstoffe, die später im Sequenzer von einem Laser angeregt wurden und deren Emission eine CCD-Kamera erfasste, wurden HEX (grün), FAM (blau), NED oder TAMRA (gelb) und ROX (rot) verwendet.

Die gelieferten Marker wurden zunächst mit destilliertem Wasser auf jeweils 100pmol/μl verdünnt und bei -20°C aufbewahrt. Davon wurden 50 pmol/μl-Verdünnungen mit Glycerol (zum Herabsetzen des Gefrierpunktes) angelegt.

**Tabelle 3:** Eigenschaften der von zentro- nach telomerisch geordneten Marker der Mikrosatellitenanalyse

Marker	Markierung	Produkt (Größe in Basenpaaren)	Annealing- Temperatur	Primermenge pro Reaktion
D18S467	HEX	165-175	60°C	20 pmol
D18S474	FAM	119-139	60°C	2,5 pmol
D18S1099	FAM	195-210	62°C	12,5 pmol
D18S484	HEX	255-270	58°C	12.5 pmol
D18S1156	FAM	260-270	58°C	12,5 pmol
D18S35	HEX	104-124	60°C	25 pmol
D18S1127	FAM	170-205	56°C	25 pmol
D18S1144	HEX	155-180	56°C	25 pmol
D18S1129	NED/FAM	235-260	56°C	25 pmol
D18S1103	HEX	230-250	60°C	25 pmol
D18S1147	FAM	200-230	60°C	20 pmol
D18S462	FAM	175-195	62°C	15 pmol
D18S497	HEX	120-140	62°C	10 pmol

**Tabelle 4:** Eigenschaften der verwendeten Vergleichsmarker.

Marker	Markierung	Produkt (Größe in Basenpaaren)	Annealing- Temperatur	Primermenge pro Reaktion
D1S199	FAM	100-125	60°C	25 pmol
D1S206	NED	210-225	60°C	35 pmol
D1S207	FAM	150-180	58°C	50 pmol
D1S2868	FAM	210-225	60°C	50 pmol
D1S2890	HEX	215-240	56°C	30 pmol
D13S153	TAMRA	210-235	60°C	25 pmol
D13S319	TAMRA	170-185	58°C	20 pmol
D15S114	ROX	170-190	60°C	25 pmol
FGA	ROX	255-285	60°C	25 pmol

### 2.2.2 Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Bereiche. Das zugrundeliegende Prinzip ist die enzymatische Duplikation einer DNA-Sequenz. Hierfür werden zwei Oligonukleotide (so genannte Primer), die jeweils komplementär homolog zu den Enden der jeweiligen DNA-Stränge der zu amplifizierenden DNA-Region sind, benötigt. Nach Hitzedenaturierung können sich die Primer bei der Abkühlung an die DNA anlagern. Mittels einer Polymerase wird in der 5`-3`-Richtung eine Kopie der DNA-Vorlage erstellt. Durch Wiederholungen dieses Zyklus (30 Mal im Rahmen dieser Doktorarbeit) konnten millionenfache Kopien der gewünschten DNA-Abschnitte erstellt werden.

Die durch PCR durchgeführte Amplifikation, der durch die Primerpaare festgelegten Abschnitte erfolgte je Fall mit DNA aus Normalgewebe und Tumor-DNA in getrennten PCR-Gefäßen.

Der Reaktionsansatz jeder Probe bestand aus:

- 3,6 µl MgCl<sub>2</sub>, 25 mM (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- 2,5 µl dNTP (Desoxyribonukleinsäure) 10 mM  
gemischt und verdünnt mit Wasser aus jeweils  
100 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP (Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe,  
Deutschland)
- 2,0 µl Gene Amp® 10x PCR-Buffer II (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- 0,12 µl Ampli Taq Gold™, entspricht 0,6 units, bei 5 U/µl  
(Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Primer (jeweils 3`und 5`Primer); bei Multiplexreaktionen Zugabe mehrerer  
Primer (Menge siehe Tab. 3 bzw. 4, S.9)
- Auffüllen des Reaktionsansatzes mit destilliertem Wasser auf ein  
Gesamtvolumen von 15 µl.

Durch Zugabe von 50 ng DNA (5 µl der 10 ng/µl Verdünnung) wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µl erreicht.

### 2.2.3 Durchführung der Polymerasekettenreaktion

Zunächst wurden die zuvor autoklavierten Reaktionsgefäße, Pipetten, Pipettenspitzen, das Wasser und der Arbeitsplatz für ungefähr 10 Minuten mit ultraviolettem Licht zur Zerstörung eventuell vorhandener, kontaminierender DNA bestrahlt. Der in Abschnitt 2.2.2 genannte Reaktionsansatz wurde in 200µl PCR-Gefäße (BIOzym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) pipetiert.

Die Durchführung der PCR erfolgte mit einem „GeneAmp PCR System 2400“ (Applied Biosystems, Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA) oder „Primus 96 plus“ (MWG-Biotech, München) über die folgenden Schritte:

- |               |  |
|---------------|--|
| Hotstart:     | · 13 Minuten bei 95°C zur Denaturierung und Enzymaktivierung   |
| 10 Zyklen:    | · 30 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung<br>· 59 oder 60 Sekunden bei primerabhängiger Annealing-Temperatur<br>· 60 Sekunden bei 72°C zur Elongation des Produktes |
| 20 Zyklen:    | · 30 Sekunden bei 91°C zur Denaturierung<br>· 59 oder 60 Sekunden bei primerabhängiger Annealing-Temperatur<br>· 60 Sekunden bei 72°C zur Elongation               |
| abschließend: | · 30 Minuten bei 72°C<br>· Abkühlen auf 4°C und halten der Temperatur bis die Proben aus der Maschine genommen wurden.   |

Die Produkte lagerten bis zur Auswertung mittels Gelelektrophorese im Gefrierschrank bei minus 20°C.

Bei einigen niedrigmalignen Fällen, bei denen DNA aus Paraffinmaterial gewonnen wurde, musste wegen schlechter DNA-Qualität die doppelte Primermenge verwendet und die Anzahl der Gesamtzyklen auf 35 erhöht werden.



## 2.3 Semiquantitative PCR für MALT1- und Bcl-2-Lokus

Um nähere Aufschlüsse über Veränderungen in den MALT1- und Bcl-2-Loki der zuvor mittels Mikrosatellitenanalyse eingengten chromosomalen Region zu erhalten, wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt.

### 2.3.1 Marker der semiquantitativen PCR

Mittels der jeweiligen Gensequenzen, die sich über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas> oder wie bei MALT1 durch einen Artikel von Judith Dierlamm et al ermitteln ließen, und dem „Gene Tool Version 1“ Softwareprogramm (Bio Tool Inc., Edmonton, Alberta, Canada) konnten die benötigten Primerpaare MALT1/10, MALT1/18, Bcl-2/1 und Bcl-2/2 mittels dem „Gene Tool Version 1“ Softwareprogramm (Bio Tool Inc., Edmonton, Alberta, Canada) konstruiert werden (Dierlamm, *et al* 1999). Als relative Standards dienten zwei Amplifikate aus dem Aktin-Gen (ACTA 2/2 und ACTA 2/6), bei denen keine Veränderungen angenommen wurden und die somit bei Normal- als auch bei Tumorgewebe im Verhältnis zueinander gleich oft amplifiziert werden sollten.

**Tabelle 5:** Verwendete Marker mit Sequenzen

Marker	Richtung	Sequenz	Lokus
ACTA 2/2	up	GGA CAG CAC TGC CTT GGT GTG T	Exon 2
	down	ATA ATT TTC CTC ACC TGA TGT CTGGG	Intron 2-3
ACTA 2/6	up	TTG TCC AGC AAG TAA CCA CAT GCC	Intron 5-6
	down	GAT GGC ATG GGG CAA GGC ATA	Exon 6
MALT1/10	up	ATT ACC GGG AGC ACC CCA AGC T	Exon 9
	down	CTC ATC CAC AGC ATT ACG CAT CTC A	Exon 9
MALT1/18	up	CAT GCA TCG AGG TTT GGG AAG G	Exon 16
	down	ATG GAA TGG GTC TTG CAA TGA GTG A	Exon 16
Bcl-2/1	up	CGT TGG CCC CCG TTG CTT TT	Exon 1
	down	ACA TCT CCC GCA TCC CAC TCG T	Exon 1
Bcl-2/2	up	ATG CCT CTT TCT CTG TGG GGT GG	Intron 2-3
	down	GAA ATC AAA CAG AGG CCG CAT GC	Exon 3

Die Synthese und Markierung mit fluoreszierenden Phosphoramiden wurde von MWG-Biotech (München, Deutschland) durchgeführt. Von diesen Markern wurden ebenfalls mit Glycerol 50pmol/µl-Lösungen hergestellt. Zur Festlegung der Primermengen wurden zunächst Versuchsläufe in unten beschriebener Technik durchgeführt, um die optimale Primerzusammensetzung zu erreichen.

**Tabelle 6:** Markereigenschaften der semiquantitativen PCR.

Marker	Markierung	PCR Produkt (Größe in Basenpaaren)	Annealing-Temperatur	Primermenge pro Reaktion
ACTA 2/2	HEX	129	60°C	7 pmol
ACTA 2/6	HEX	146	60°C	10 pmol
MALT1/10	HEX	141	60°C	5 pmol
MALT1/18	HEX	126	60°C	4 pmol
Bcl-2/1	FAM	136	60°C	4 pmol
Bcl-2/2	FAM	135	60°C	3,5 pmol

### 2.3.2 PCR-Ansatz

Die semiquantitative PCR wurde als Multiplexreaktion durchgeführt. Dies bedeutet, dass alle oben angegebenen Primer gleichzeitig jedem Reaktionsansatz zugesetzt wurden. Dadurch ergab sich für jede Probe folgende Mischung:

3,2 µl MgCl<sub>2</sub>, 25 mM (Applied Biosystems, Foster City, USA)

2,5 µl dNTP, 10 mM gemischt und verdünnt mit Wasser aus jeweils 100 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP (Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)

2,39 µl Gene Amp®, 10x PCR-Buffer II (Applied Biosystems, Foster City, USA)

0,12 µl Ampli Taq Gold, entspricht 0,6 units, bei 5 U/µl (Applied Biosystems, Foster City, USA)

jeweilige, in vorangehender Tabelle 4 angegebene Primermenge

Zuletzt wurde zum Reaktionsansatz 150 ng (15 µl der 10 ng/µl-Verdünnung) der jeweiligen DNA gegeben.

### 2.3.3 Durchführung der semiquantitativen PCR

Der Arbeitsablauf gleicht dem der Mikrosatellitenanalyse, lediglich die PCR im „Primus 96 plus“ (MWG-Biotech, München) wurde modifiziert:

Hotstart:	· 13 Minuten bei 95°C zur Denaturierung und Enzymaktivierung
10 Zyklen:	· 30 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung · 90 Sekunden bei 60°C-Annealing-Temperatur · 90 Sekunden bei 72°C zur Elongation
17 Zyklen:	· 30 Sekunden bei 91°C zur Denaturierung · 90 Sekunden bei 60°C-Annealing-Temperatur · 90 Sekunden bei 72°C zur Elongation
abschließend:	· 20 Minuten bei 72°C · Abkühlen auf 4°C und Halten der Temperatur

Die Zykluszahl wurde niedrig gehalten, um den Vergleich noch in der exponentiellen Phase der PCR durchzuführen.

## 2.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, durch welches geladene Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld voneinander getrennt werden können. Die Fortbewegungsgeschwindigkeit durch das Gel ist abhängig von Molekülform, -größe und -ladung, der Stärke des angelegten elektrischen Feldes und dem Gel. Da DNA aufgrund von Phosphat negativ geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Das Gel behindert diesen Durchgang, wobei kleinere Fragmente leichter hindurch kommen und somit schneller die Anode erreichen, beziehungsweise in gleicher Zeit eine weitere Strecke auf dem Gel zurücklegen.

### 2.4.1 Gelherstellung

Zur Analyse der PCR-Produkte der Mikrosatellitenuntersuchung wurden diese auf formamidhaltige (32%), 5%ige Polyacrylamidgelen aufgetragen. Der Formamidgehalt

erzielte gegenüber formamidfreien Gelen eine bessere Denaturierung der PCR-Produkte und damit eine bessere Auftrennung auf den Gelen. Zur Herstellung eines Gels benötigte man folgende Bestandteile (Litt, *et al* 1993):

1 g Mischbettionenaustauscher Amberlite®	(Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)
13,44 g Harnstoff,	Rotipuran® (Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)
5 ml Acrylamidlösung,	Rotiphorese® NF-Autoseq 1:29 (40%) (Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)
12.8 ml Formamid	(Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)
8 ml 5x TBE-Laufpuffer	
Auffüllen mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 40ml	

Nach Auflösen mit einem Magnetrührgerät und Filtrieren wurden dem Gemisch

450 µl APS (10%)  
30 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin) (Appli Chem, Darmstadt)  
zur Polymerisation zugegeben.

Zusammensetzung des 5x TBE-Laufpuffers:

432 mg Tris, Pufferan® (Karl Roth GmbH&Co.KG; Karlsruhe)  
220 mg Borsäure, Pufferan® (Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)  
33,2 mg EDTA (Appli Chem, Darmstadt)  
aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 8ml.

Zusammensetzung des APS (10%):

45 mg Ammoniumpersulfat (Kodak, New Haven, USA)  
aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 450 µl

Bei der Auswertung semiquantitativer PCRs konnten mit 6%igen Acrylamidgelen genauere Ergebnisse erzielt werden. Für die Herstellung eines Gels benötigte man als Reagenzien:

18 g Harnstoff, Rotipuran®  
(Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)  
5,625 ml Acrylamidlösung, Rotiphorese® NF-Autoseq 29:1 (40%)  
(Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)  
10 ml 5x TBE Laufpuffer  
20 ml destilliertes Wasser

Nachdem sich die Reagenzien aufgelöst hatten und die Flüssigkeit filtriert wurde, erfolgte zur Gelierung der Zusatz von:

250 µl APS (10%)  
30 µl TEMED (Appli Chem, Darmstadt)

Die Gele wurden zwischen zwei sorgfältig gereinigte Glasplatten gegossen. Auf Luftblasenfreiheit musste geachtet werden. Nach mindestens 45-minütiger Aushärtung des Gels wurden die Außenseiten der Glasplatten gereinigt, die Platten senkrecht in den 377A-DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA) gespannt, die obere und untere Laufpufferkammer angebracht und mit 1%iger TBE-Pufferlösung (300 ml 5x TBE-Laufpuffer auf 1200 ml destilliertes Wasser) gefüllt, die Heizplatte angebracht und ein 5-minütiger Probelauf gestartet. Hierdurch konnte die Qualität des Gels beurteilt und Verunreinigungen der Glasplatten entdeckt werden.

#### **2.4.2 Probenvorbereitung**

Vor dem Auftragen auf das Gel wurde 1 µl des jeweiligen PCR-Produktes der Mikrosatellitenanalyse gemischt mit

1,3 µl Formamid (Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)  
0,5 µl Blue Dextran Ladepuffer (Applied Biosystems, Warrington, UK)  
0,15 µl Gene Scan™-350, Rox™ Size Standard, ABI-PRISM®  
(Applied Biosystems, Warrington, UK)

Wegen hoher PCR-Produktkonzentrationen der semiquantitativen PCR musste ein anderes Mischungsverhältnis zur Verdünnung gewählt werden.

Zu 1 µl PCR-Produkt wurden gegeben:

- 8,14 µl Formamid (Karl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)
- 1,56 µl Blue Dextran Ladepuffer (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- 0,3 µl Gene Scan™-350, Rox™ Size Standard, ABI-PRISM® (Applied Biosystems, Warrington, UK)

Der Mix denaturierte 7 Minuten bei 95°C auf dem Heizblock und kühlte danach auf Eis ab. Mit einer 8-fach-Pipette (PrismStrip™, Sorenson Bioscience Inc., Salt Lake City, USA) wurde 1 µl abgekühlter Mix einer jeden Probe, in die, durch einen oben in das Gel gesteckten Kamm gebildeten Kammern, gefüllt. Pro Lauf konnten maximal 64 Proben aufgetragen werden. Am angeschlossenen Computer („Power Macintosh G3“, Apple Computer GmbH, Ismaning) wurden durch Eingabe eines „Sample sheets“ die aufgetragenen Proben den später detektierten Daten zugeordnet und über einen „Run folder“ die Elektrophoreseparameter eingestellt. Nach Verschluss der Gerätetür wurde die Elektrophorese mit 3000 Volt, 60 mA, 200 Watt und 51°C gestartet. Die zuvor im „Run folder“ angegebene Dauer des Laufs richtete sich nach der Länge (Basenpaare) der zu erwartenden PCR-Produkte und dauerte ungefähr 2 bis 3,5 Stunden.

### **2.4.3 Gelelektrophorese mittels 377A-DNA-Sequenzer**

An der oben angebrachten Pufferkammer wurde während des Laufs eine negative, in der unteren Pufferkammer eine positive Spannung angelegt. Somit wanderten die negativ geladenen Amplifikationsprodukte von der oberen Kathode zur unteren Anode. Die Geschwindigkeit, ist dabei abhängig von der Spannung und der Produktgröße. Da die angelegte Spannung während einer Gelelektrophorese konstant bleibt, werden die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Kleine Produkte durchwandern folglich das Gel schneller. Am unteren Gelrand, nahe der Anode, nach einer Laufstrecke von ungefähr 35cm, befand sich eine 2cm hohe Leseregion. Sie reichte über die gesamte Gelbreite und verlief senkrecht zur Laufrichtung der aufgetrennten Fragmente. Während der gesamten Elektrophorese leuchtete ein beweglicher Argon-Laser (Wellenlängen: 488 bis 514,5nm) diese Region ab. Daraufhin emittierten die mit fluoreszierenden Primern markierten PCR-Produkte beim Durchlaufen Licht, welches mit einer CCD-

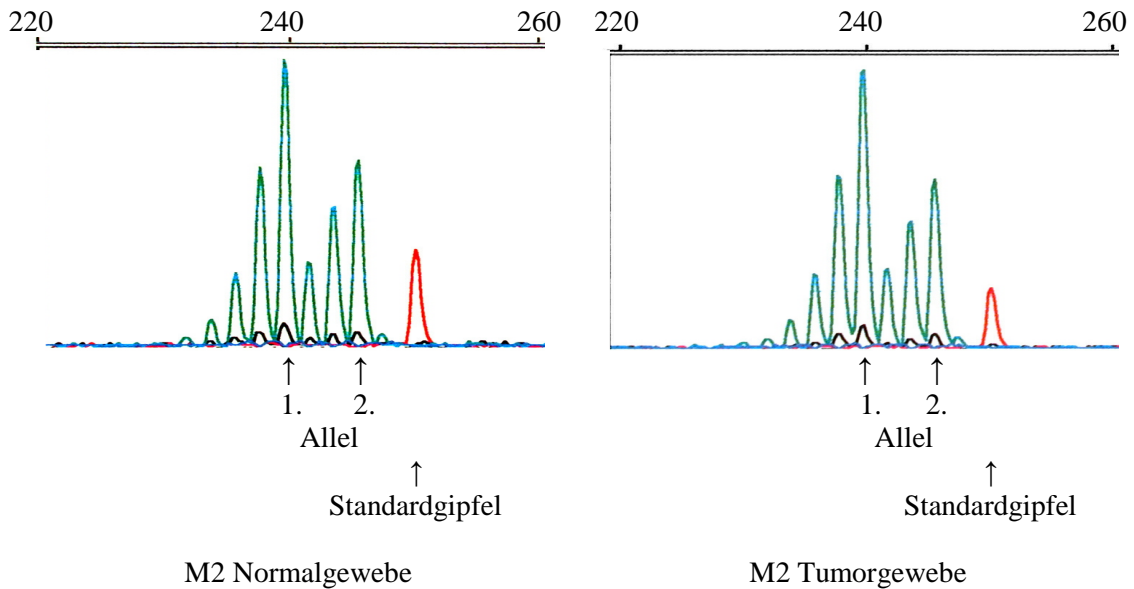
Kamera erfasst wurde. Die Daten konnten mit dem angeschlossenen Computer ausgewertet werden.

#### **2.4.4 Auswertung der Gelelektrophorese**

Nach Beendigung des Laufs konnte das aus den registrierten Daten errechnete Gelbild aufgerufen werden. Den von unten nach oben laufenden Spuren, die jeweils einer aufgetragenen Probe entsprachen, wurden über das „Sample sheet“ die jeweiligen Proben zugeordnet. Der Computer konnte somit zu jedem Elektropherogramm die jeweilige Probe und deren Bezeichnung angeben. Mittels ABI GeneScan®- und Genotyper®-Programm (Applied Biosystems, Foster City, USA) wurden die Spuren analysiert und die entsprechenden Elektropherogramme erstellt. Durch den roten, mitaufgetragenen „Gene Scan™-350, Rox™ Size Standard, ABI-PRISM<sup>R</sup>“ (Applied Biosystems, Warrington, UK), welcher Fragmenten von 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340 und 350 Basenpaaren entsprach, konnte das Elektropherogramm, auf der x-Achse nach Basenpaare normiert werden. Auf der y-Achse wurde die Intensität der fluoreszierenden Signale, was der Menge an Produkten entsprach, aufgetragen. Die Farbe des Diagramms entsprach bei FAM (blau), ROX (rot) und HEX (grün), bei den Produkten. NED und TAMRA (gelb) wegen des besseren Kontrastes schwarz.

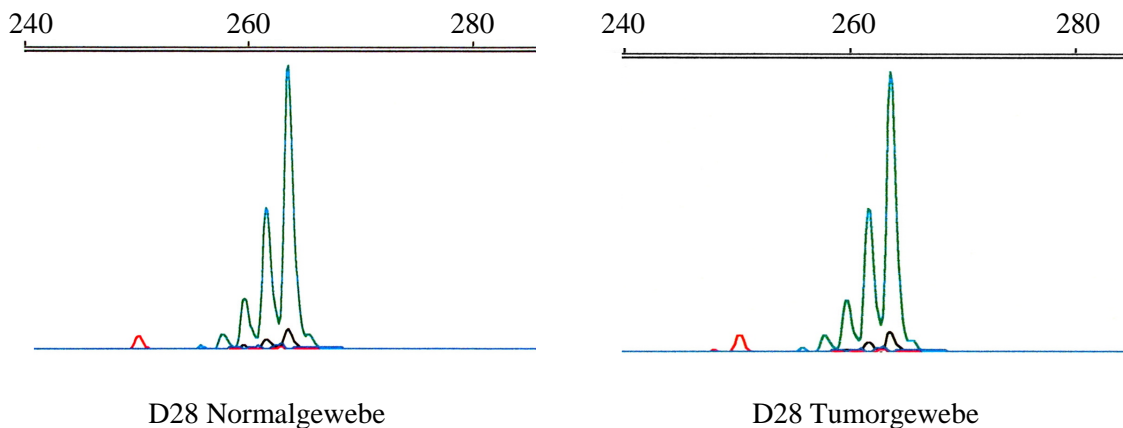
### 2.4.4.1 Interpretation der Gelelektrophorese der Mikrosatelliten-PCR-Produkte

Der höchste Gipfel einer ansteigenden Gipfelfolge im Elektropherogramm entspricht einem amplifizierten Allel. Die vorangehenden Gipfel werden als sog. „Stotterbanden“ bezeichnet. Liegen im Normalgewebe 2 ansteigende Gipfelfolgen vor, ist der untersuchte Bereich heterozygot (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Beispiel für Heterozygotität im Fall M2 bezüglich des Markers D18S1103 (grün); Standard (rot); blau und schwarz: Verunreinigungen; x-Achse: Produktlänge in Basenpaaren; y-Achse: Signalintensität

Ist im Gewebe nur eine ansteigende Gipfelfolge vorhanden, so ist die DNA, bezüglich der untersuchten Mikrosatellitenregion, homozygot (Abbildung 2).

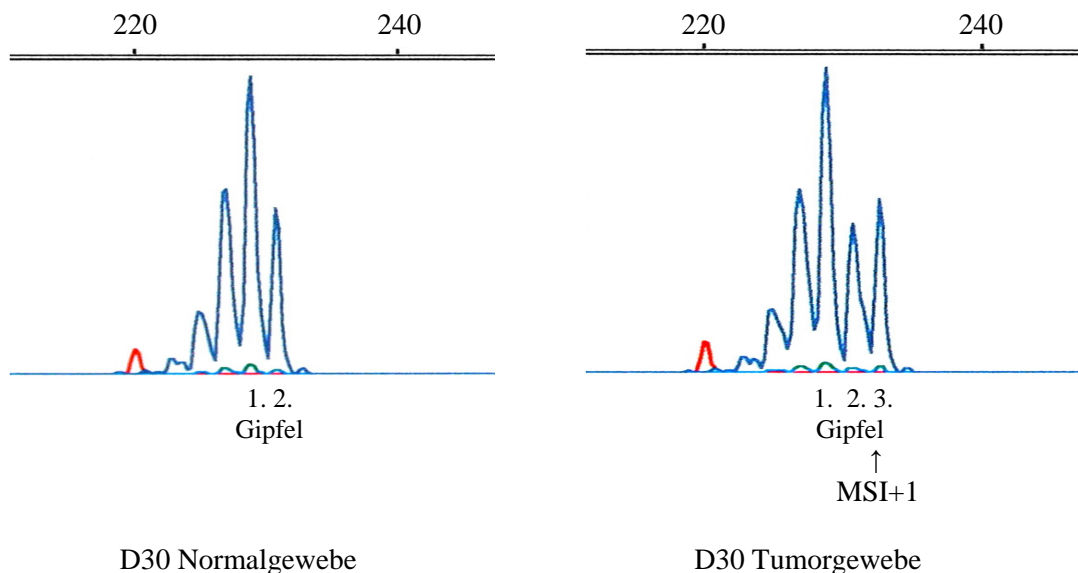


**Abbildung 2:** Beispiel für Homozygotität im Fall D28 bezüglich des Markers D18S484 (grün); Standard (rot); blau und schwarz: Verunreinigungen; x-Achse: Produktlänge in Basenpaaren; y-Achse: Signalintensität



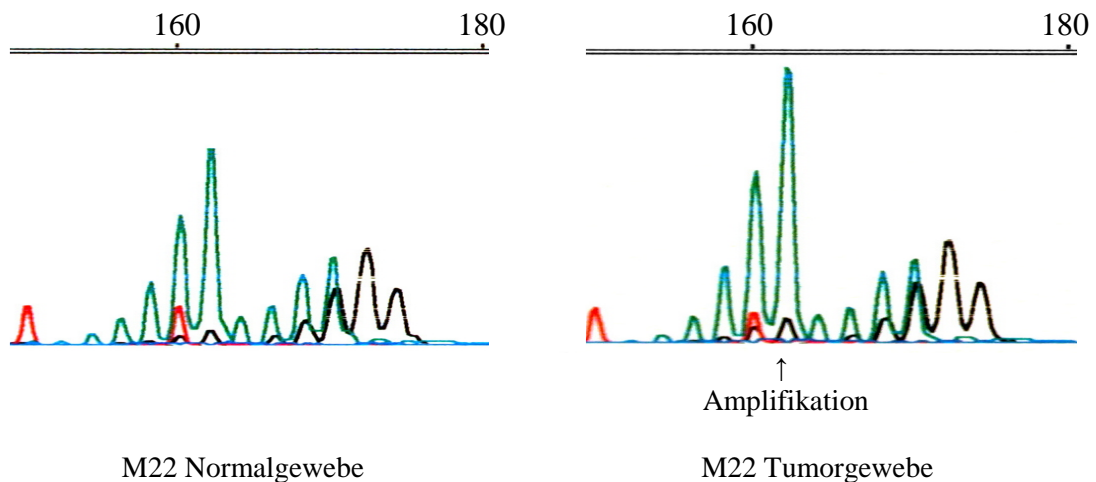
Durch den Vergleich von Normalgewebe- und Tumorgewebe-DNA können Unterschiede festgestellt werden. Das Elektropherogramm der Normalgewebe-DNA definiert den Zustand ohne genetische Veränderungen. Ein davon abweichendes Bild der Tumor-DNA ergibt eine Aussage ob eine MSI (Mikrosatelliteninstabilität), eine LOH (loss of heterozygosity) oder eine Amplifikation vorliegen.

Bei homozygoten Fällen treten durch Verkürzung oder Verlängerung eines Allels um ein oder mehrerer Basenpaare im Tumorgewebe 2 Gipfelfolgen auf. Bei MSI bei heterozygoter Fälle verschieben sich die Gipfelfolgen gegeneinander und es entstehen 3 Gipfelfolgen



**Abbildung 3:** Beispiel für eine MSI+1 im Fall D30 bezüglich des Markers D18S1147 (blau); Standard (rot); grün: Verunreinigungen; x-Achse: Produktlänge in Basenpaaren; y-Achse: Signalintensität

Neben MSI kann die Tumor-DNA auch einen Verlust der Heterozygosität (LOH für Loss of Heterozygosity) oder eine Amplifikation eines Allels (Abbildung 4) aufweisen. Dies sind Fälle deren Quotient aus ermittelter Höhe oder Fläche des ersten Allels und entsprechender Höhe oder Fläche des zweiten Allels, der Tumor-DNA (jeweils nur des höchsten, allel-spezifischen Gipfels) vom entsprechenden Quotienten der Normalgewebe-DNA um mindestens 40 Prozent abweicht ( $LOH \leq 60\%$ ; Amplifikation  $\geq 140\%$ ). Fälle deren Quotient um mehr als 20 Prozent abwichen wurden wiederholt.



**Abbildung 4:** Beispiel für eine Amplifikation im Fall M22 bezüglich des Markers D18S1144 (grün); Vergleichsmarker D13S319 (schwarz); Standard (rot); blau: Verunreinigung; x-Achse: Produktlänge in Basenpaaren; y-Achse: Signalintensität

Zum Beweis, ob es sich um eine LOH oder eine Amplifikation handelte, musste eine weitere PCR durchgeführt werden. Hierfür wurde eine Multiplexreaktion mit einem Vergleichsmarker (Tabelle 4) bei ungefähr gleicher Produktgröße, unterschiedlicher Farbe und bereits bewiesener Heterozygotie (ohne Abweichung der Quotienten) angesetzt. Die Division der Fläche oder Höhe des ersten Allels des Vergleichsmarkers der Normal-DNA zu derjenigen der Tumor-DNA, ergibt einen Wert, der dem auf gleiche Weise gebildeten Quotienten des zweiten Allels des Vergleichsmarkers und dem Quotienten eines Allels des zu untersuchenden Markers, in etwa gleichen sollte. Das Allel, dessen Quotient aus Normal- zu Tumor-DNA von den anderen abweicht, ist somit verändert.

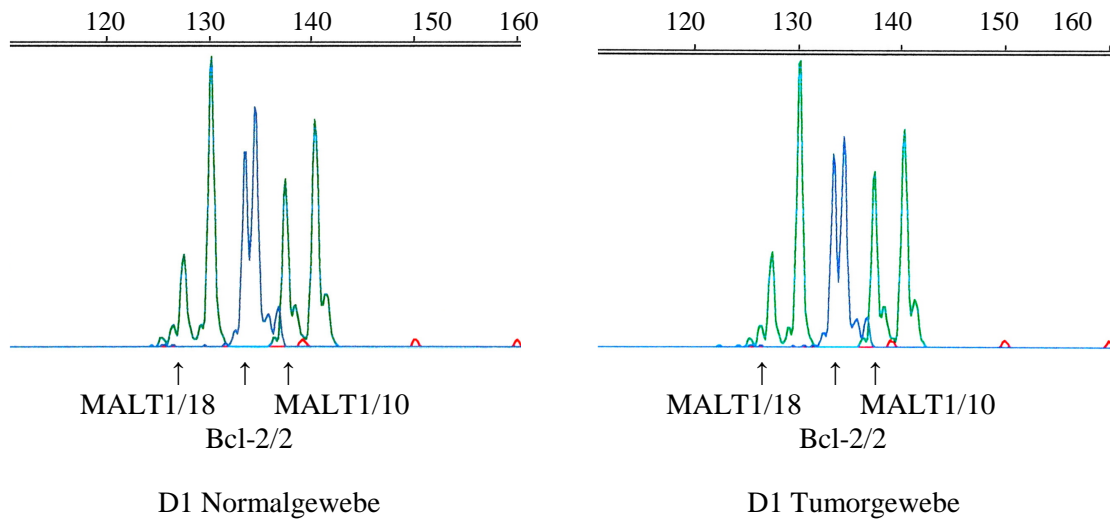
Durch Vergleich mit dem unveränderten Marker lässt sich erkennen, ob der Gipfel im Elektropherogramm des Tumors größer (entspricht einer Amplifikation) oder kleiner (entspricht einer LOH) als im Normalgewebe ist. Von einer LOH wird nicht nur bei einem völligen Fehlen des Allels im Elektropherogramm, sondern schon ab einer Minderung des Gipfels um festgelegte 40 Prozent ausgegangen. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass im Tumorgewebe enthaltene DNA von Normalzellen mitamplifiziert wird, diese aber keine LOH aufweisen.

Gleiches gilt für Amplifikationen, wobei hier die Normalzellen-DNA die Vergrößerung des Gipfels mindert. Auf Grund dessen sollte das Tumorgewebe einen möglichst hohen

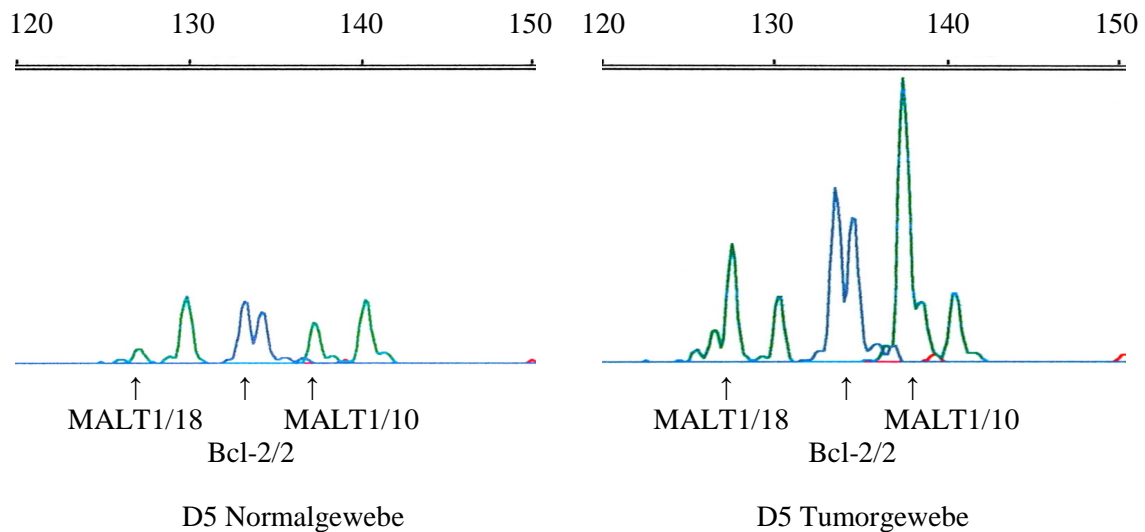
Anteil an Tumorzellen enthalten.

#### **2.4.4.2 Interpretation der Gelelektrophorese der semiquantitativen PCR-Produkte**

Das Elektropherogramm der semiquantitativen PCR zeigte für jeden DNA-Abschnitt, der in der PCR amplifiziert wurde, zwei im Abstand eines Basenpaares liegende Gipfel. Der erste Gipfel entspricht dem reinen Produkt, dem sich ein Adenosin-Rest anlagern kann und damit das Produkt um eine Base verlängert und den zweiten Gipfel verursacht. Für die Ermittlung der PCR-Produktmenge eines jeden Primerpaares mussten daher die Flächen beider Gipfel addiert werden. Da die Werte der Flächen von Probe zu Probe wegen unterschiedlicher PCR-Effizienz stark schwankten, errechnete man jeweils das Flächenverhältnis jedes Primerpaarproduktes von Normal- zu Tumorgewebe. Die beiden Primerpaare, die Bereiche im Aktin-Gen kodierten zeigten im Verhältnis der Flächen der analysierten Normalgewebe-DNA zu den Flächen der Tumor-DNA ungefähr gleiche Werte, da in diesem DNA-Abschnitt keine Veränderungen zu erwarten waren. Die ACTA 2/2- und ACTA 2/6-Primer dienten somit als Standards, anhand derer ersichtlich wurde, ob es im Bereich der anderen analysierten DNA-Abschnitte zu einer DNA-Vermehrung (entspricht einer Amplifikation) (Abbildung 6), oder zu einer DNA-Verminderung (entspricht einer LOH) kam. Die Elektropherogramme der Normalgewebe-DNA waren auch bei diesem Analyseverfahren der definierte Ausgangsbefund, von dem abweichend Veränderungen in der Tumor-DNA unterschieden werden konnten. Als Grenze zwischen Normalbefund und Aberration diente der Mittelwert der Werte aller 54 Normal-Gewebe-Fälle des jeweiligen Primers plus beziehungsweise minus die doppelte Standardabweichung der Normalwerte. Verhältnisse der Flächen der jeweiligen Primer zu den Flächenmittelwert der Standardprimer, die über dem Wert (Mittelwert plus zweifache Standardabweichung) lagen, wurden als Amplifikation bezeichnet; Quotienten, welche kleinere Werte als Mittelwert minus doppelte Standardabweichung ergaben, wurden als LOH interpretiert (Abbildung 7-12).



**Abbildung 5:** Beispiel für unauffälliges Ergebnis der semiquantitativen PCR im Fall D1. Von links nach rechts: MALT1/18 (grün); ACTA 2/2 (grün); Bcl-2/2 (blau); Bcl-2/1 (blau, klein); MALT1/10 (grün); ACTA 2/6 (grün); Standard (rot); x-Achse: Produktlänge in Basenpaaren; y-Achse: Signalintensität



**Abbildung 6:** Beispiel für Amplifikationen der semiquantitativen PCR im Fall D5. Von links nach rechts: MALT1/18 (grün); ACTA 2/2 (grün); Bcl-2/2 (blau); Bcl-2/1 (blau, klein); MALT1/10 (grün); ACTA 2/6 (grün); Standard (rot); x-Achse: Produktlänge in Basenpaaren; y-Achse: Signalintensität

### **3 Ergebnisse**

Um mögliche Unterschiede in Ausmaß, Art und Zahl der DNA-Veränderungen zwischen Normalgewebe-DNA und Tumorzell-DNA festzustellen, wurden zunächst 30 DLBCL- und 24 MZBZL-Fälle mittels Mikrosatellitenanalyse untersucht. Nach Eingrenzung der Aberrationen im Bereich des MALT1- und Bcl-2-Genes erfolgte eine semiquantitative PCR, bei der die 30 DLBCL- und 14 MZBZL-Fälle (bei denen Frischmaterial vorhanden war) auf Veränderungen im Bereich der beiden Gene untersucht wurden.

#### **3.1 Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse**

##### **3.1.1 Mikrosatellitenanalyse der DLBCL**

Insgesamt wurden im Bereich 18q21 der 30 DLBCL-Fälle 390 Untersuchungen durchgeführt. Es konnten 59 Alternationen (15,1 Prozent) ermittelt werden. Diese setzten sich aus 39 Amplifikationen (10,0 Prozent), 11 LOHs (2,8 Prozent) und 9 MSI (2,3 Prozent) zusammen.

17 (56,7 Prozent) der 30 untersuchten DLBCL-Patienten wiesen im gesamten Untersuchungsbereich keine Aberrationen auf.

In sieben Fällen (23,3 Prozent) konnten Amplifikationen nachgewiesen werden. Zwei (6,7 Prozent) davon erstreckten sich über die gesamte untersuchte Region (Fälle D7, D27), im Fall D8 (3,3 Prozent) zeigte erst am Primer D18S462 (Primer welcher am weitesten telomerisch lag) keine Amplifikation. Im Fall D24 reichte die Amplifikation von zentromerisch bis an den Dpc4-Genlocus heran; bei D5 (High-Level-Amplifikation) umschloss sie die MALT1-Genregion beginnend bei D18S35 und grenzte bis einschließlich D18S1147 von zentromerisch an den Bcl-2-Lokus. In diesem Fall fand sich zudem eine Amplifikation bei D18S462. Eine nur den Bcl-2-Lokus umfassende, von D18S1147 bis D18S462 reichende Amplifikation zeigte sich bei DNA-Materialnummer D16. Zu nennen ist darüber hinaus eine einzelne, bei D18S484 im Fall D6 im DCC-Gen-Bereich nachgewiesene Amplifikation. Die kleinste amplifizierte Region fand sich im Fall D16 im Bereich von D18S1147 bis D18S462.

Diese umschließt das Bcl-2-Gen. Der kleinste den MALT1-Lokus umfassende Amplifikationsbereich wurde im Fall D5 entdeckt und reichte von D18S35 bis D18S1147 bis telomerisch an das Bcl-2-Gen heran. Amplifikationen, welchen den MALT1- oder den Bcl-2-Genlokus umschlossen, zeigten sich in fünf Fällen.

Im Fall D17 (3,3 Prozent) zeigte sich eine LOH, welche die gesamte untersuchte Region betraf. Dies deutet auf eine Deletion eines Großteils des langen Arms des Chromosoms 18 oder einen Allelverlust hin.

MSI konnte in neun Fällen (30 Prozent der untersuchten Fälle) nachgewiesen werden, wobei sich nur bei einem Fall das betroffene Allel verkleinerte. In den restlichen Fällen kam es zu einer Vergrößerung. Der Primer D18S1144 zeigte MSI in drei Fällen (D16, D19, D25; entspricht zehn Prozent der mit D18S1144 untersuchten DLBCL-Fälle). Dieser Marker liegt in direkter Nachbarschaft zum MALT1-Gen. Bei D18S474 trat eine Mikrosatelliteninstabilität zweimal auf (D8, D16; entspricht 6,7 Prozent der mit D18S474 untersuchten DLBCL-Fälle). In 16,7 Prozent der untersuchten Fälle ergaben die Analysen MSI als alleinige Veränderung (D2, D19, D23, D25, D30).

Zusammenfassend ließen sich mittels Mikrosatellitenanalyse bei den DLBCL-Fällen LOH oder Amplifikation in acht von 30 Fällen (26,7 Prozent) und MSI in acht von 30 Fällen (26,7 Prozent) nachweisen.

**Tabelle 7:** Die Primer sind von zentro- nach telomerisch mit Angabe der Megabasenpaare (Mbp) angeordnet. Dazwischen befinden sich, der jeweiligen Lokalisation im Genom entsprechend angeordnet die Gene (<http://www.ensembl.org>, <http://ncbi.nlm.nih.gov/mapview>). Die Angaben bezüglich der exakten Lokalisation von D18S467 variieren. Die semiquantitativen PCR-Ergebnisse der Primer MALT1/10 und Bcl-2/2 wurden in der Spalte dem jeweiligen Gen zugeordnet. Graue Felder stehen für Homozygotie, schwarze für Heterozygotie, LOH sind mit L, Amplifikationen mit A und Mikrosatelliteninstabilitäten mit MSI (mit der jeweiligen Angabe um wie viele Repeats (CA)m sich das Allel verändert hat) angegeben. Das Gen DCC umschließt die Marker D18S484 und D18S1156.

	Mbp		
	<46.00	D18S467	
	46.95	D18S474	
	46.81- 46.86	Dpc4	
	47.89	D18S1099	
	48.12	DCC	
	48.38	D18S484	
	49.02	D18S1156	
	49.31	DCC	
	51.31	D18S35	
	51.52	D18S1127	
	53.72	D18S1144	
	54.49- 54.55	MALT1 SQ-PCR	
	54.74	D18S1129	
	55.08	D18S1103	
	57.56	D18S1147	
	58.94- 59.14	Bcl-2 SQ-PCR	
	73.26	D18S462	
	75.96	D18S497	
D1			
D2			
D3			
D4			
D5			
D6			
D7	A	A	
D8	A	MSI+1	
D9			
D10			
D11			
D12			
D13			
D14			
D15			
D16		MSI-1	
D17	L	L	
D18			
D19			
D20			
D21			
D22			
D23			
D24	A	A	
D25			
D26			
D27	A	A	
D28			
D29			
D30			
D18S467			
D18S474			
Dpc4			
D18S1099			
DCC			
D18S484			
D18S1156			
DCC			
D18S35			
D18S1127			
D18S1144			
MALT1 SQ-PCR			
D18S1129			
D18S1103			
D18S1147			
Bcl-2 SQ-PCR			
D18S462			
D18S497			

### **3.1.2 Mikrosatellitenanalyse der MZBZL**

Insgesamt wurden im Bereich 18q21 der 24 MZBZL-Fälle 230 auswertbare Untersuchungen durchgeführt. Es konnten elf Aberrationen (4,8 Prozent) ermittelt werden. Es wurden sieben Amplifikationen (3,0 Prozent), eine LOH (0,4 Prozent) und drei MSI (1,2 Prozent) nachgewiesen. In 19 (79,2 Prozent) der 24 analysierten MZBZ-Lymphome konnten keine Aberrationen festgestellt werden.

In der DNA von drei Patienten (M11, M21, M22, entspricht 12,5 Prozent) zeigten sich Amplifikationen. Alle betrafen den zentromerisch von MALT1 lokalisierten Primer D18S1144. Im Fall M21 war als kleinste Region nur dieser Locus betroffen, bei M22 zusätzlich der telomerisch des Dpc4-Gens gelegene Marker D18S1099 und bei M11 der gesamte Bereich von D18S474 bis einschließlich D18S35, welcher das Dpc4-Gen enthält und zentromerisch des MALT1-Genes endet.

Es konnte eine LOH (4,2 Prozent) ermittelt werden. Diese befand sich in Fall M9, telomerisch des DCC-Gens und zentromerisch des MALT1-Gens bei D18S35.

MSI zeigten sich im Fall M16 (4,2 Prozent), hier dreimal, in Form von zweimal MSI+1 und einmal MSI-3.

Zusammenfassend zeigten sich bei den MZBZL Amplifikationen oder LOH in vier von 24 Fällen (16,7 Prozent) und MSI in einem Fall (4,2 Prozent).





### **3.1.3 Ergebnisse der semiquantitativen PCR für MALT1 und Bcl-2**

In der Mikrosatellitenanalyse konnte ermittelt werden, dass in sieben (M11; M21; M22; D5; D7; D8; D27) von zehn (M11; M21; M22; D5; D7; D8; D27; D16; D6; D24) Fällen, welche eine Amplifikation in dem untersuchten Bereich aufwiesen, die Region um das MALT1-Gen betroffen war. Gleiches konnte in fünf (D5; D7; D8; D16; D27) von sieben (D5; D7; D8; D27; D16; D6; D24) Fällen der DLBCL bezüglich des Bcl-2-Lokus gezeigt werden. Mit Hilfe der semiquantitativen PCR sollte daraufhin untersucht werden, ob in diesen beiden Genen selbst eine Amplifikation oder LOH vorliegt.

Wie unter 2.3.1 erwähnt (S.23), wurden zunächst Versuchsreihen zur Ermittlung der idealen Primermenge im Reaktionsansatz durchgeführt. Bei der Versuchsdurchführung zeigte sich jedoch, daß die Zusammensetzung, welche in den Tests gleichmäßige Gipfel in der Graphik (entspricht der Signalintensität und somit der Amplifikatmenge) erbrachte, nicht optimal war. Die Signale für die MALT1/1- und Bcl-2/1-Loki waren in den untersuchten Proben deutlich geringer als in den Test-PCRs. Die Gipfel in der Graphik waren dadurch sehr flach. Dadurch lag die Standardabweichung bei MALT1/18 bei 16,9, bei Bcl-2/1 bei 30,7 Prozent, verglichen mit 7,4 bei MALT1/10 und 11,1 bei Bcl-2/2. Auf Grund dieser großen Ungenauigkeit wurde beschlossen, Bcl-2/1 nicht in die Auswertung eingehen zu lassen.

### **3.1.4 Ergebnisse der semiquantitativen PCR bei den DLBCL**

Bei den DLBCL konnten in MALT1/10 vier Amplifikationen nachgewiesen werden (13,3 Prozent). In den Fällen D5, D8 und D27 bestätigten sich die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse, wobei in Probe D5 ebenfalls eine High-Level-Amplifikation (500%) vorlag. Zusätzlich zeigte sich bei D14 eine Amplifikation, welche durch die Mikrosatellitenanalyse, in den angrenzenden Regionen nicht nachgewiesen werden konnte. In diesem Fall waren die angrenzenden Mikrosatellitengenotypen homozygot und somit nicht aussagekräftig. Eine in der Mikrosatellitenanalyse gezeigte Amplifikation von Fall D7 bestätigte sich in der semiquantitativen PCR nicht. Bei Fall D17 wurde die LOH der Mikrosatellitenanalyse durch die semiquantitative PCR bestätigt (3,3 Prozent der untersuchten DLBCL).

Der MALT1/18-Lokus zeigte lediglich eine Amplifikation in D5 (3,3 Prozent) und eine

LOH in D17 (3,3 Prozent). Alle weiteren Fälle, bei denen in MALT1/10 Aberrationen nachgewiesen werden konnten, waren unauffällig. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Standardabweichung mit 16,9 Prozent sehr hoch war.

Der Bcl-2/2-Marker bestätigte die aberranten Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse in den Fällen D5, D16, D27 und D8 (13,3 Prozent der untersuchten DLBCL), wobei bei letzterem zuvor in der Mikrosatellitenanalyse eine Amplifikation nur in dem zentromerisch von Bcl-2 gelegenen Markern nachgewiesen werden konnte. D7 zeigte analog zu MALT1/10 keine Amplifikation. Ebenso bestätigte sich die LOH der Mikrosatellitenanalyse im Fall D17 in der semiquantitativen PCR nicht. Zwar ergab sich hier der niedrigste Prozentsatz für Bcl-2/2, dieser lag aber nicht unter der festgesetzten Grenze von Mittelwert minus zweifacher Standardabweichung und wurde deshalb nicht als LOH angesehen. Diese Ergebnisse könnten auf eine niedrigere Sensitivität der semiquantitativen PCR für Aberrationen, aufgrund einer höheren Detektionsschwelle für Veränderungen zurückzuführen sein.

### **3.1.5 Ergebnisse der der semiquantitativen PCR bei den MZBZL**

Der Primer MALT1/10 bestätigte die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse der MZBZL, bezüglich M11. Dort zeigte sich eine Amplifikation.

Dies lies sich in MALT1/18 nicht nachweisen. Alle untersuchten Proben ergaben Normalbefunde, wobei auch hier wieder auf die hohe Standardabweichung hingewiesen werden muss.

Die Fälle M21 und M22, welche in der Mikrosatellitenanalyse eine Amplifikation in D18S1144 aufwiesen, konnten mangels Frischmaterial nicht untersucht werden.

Der Bcl-2/2-Marker zeigte Amplifikationen in den Fällen M7 und M11 (entspricht 14,3 Prozent, der 14 MZBZL, welche mittels semiquantitativer PCR untersucht wurden), welche nicht durch die Mikrosatellitenanalyse vermutet wurden, wobei zu bedenken bleibt, dass diese zuvor nur mit einem, zentromerisch des Bcl-2-Genes lokalisiertem Primer untersucht wurden.

Anzumerken ist, dass die semiquantitative PCR bei MALT1/10 und Bcl-2/2, den

Primern mit den niedrigsten Standardabweichungen, die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse zu 93 Prozent bestätigten. Es zeigte sich bei den Fällen, bei denen die Mikrosatellitenuntersuchung Aberrationen (Amplifikationen und LOH) aufwies, dass diese in 60 Prozent der Fälle (wie durch die semiquantitative PCR gezeigt) auch auf das angrenzende Gen zutrafen.

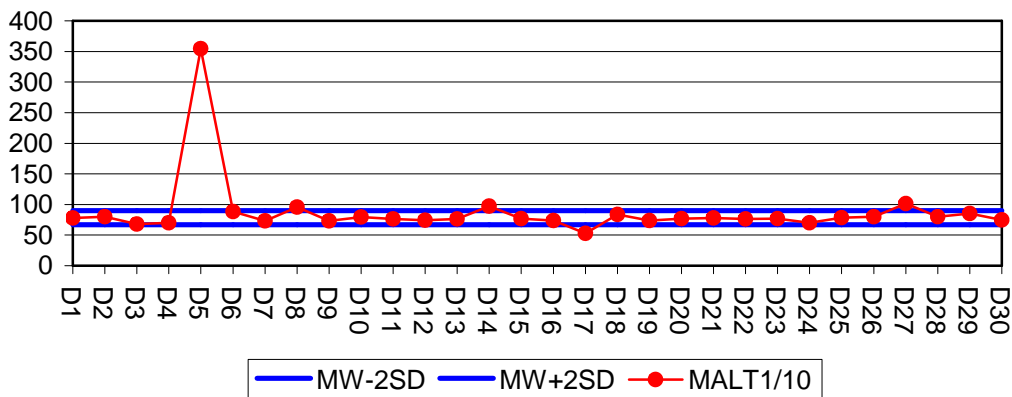


Abbildung 7: MALT1/10 (MW=78,4; SD=5,8)

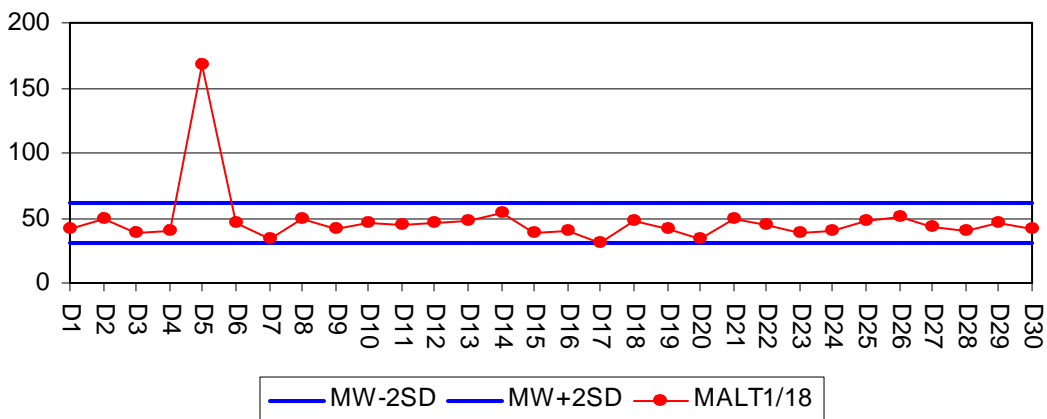


Abbildung 8: MALT1/18 (MW=46,1; SD=7,8)

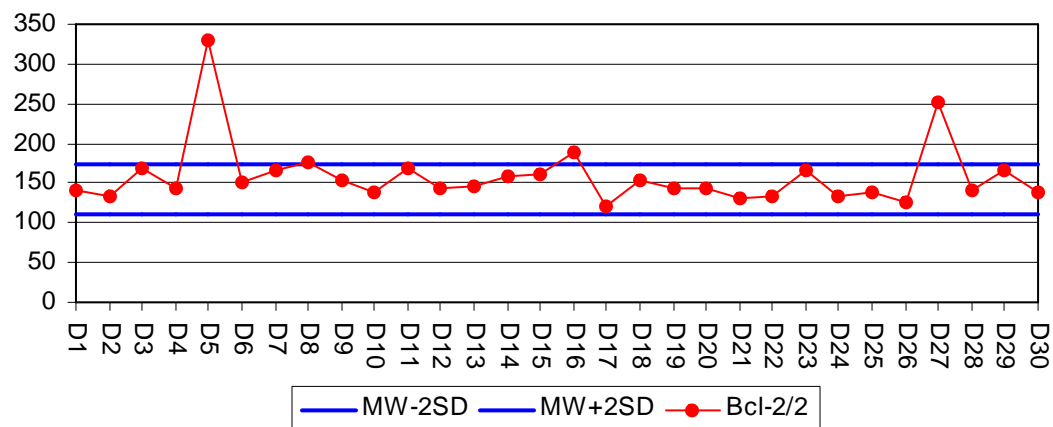


Abbildung 9: Bcl-2/2 (MW=141,9; SD=15,8)

Abb. 7-9: Ergebnisse der semiquantitativen PCR der DLBCL- Fälle. x-Achse: Fallnummern, y-Achse: Prozentzahl des Quotienten aus jeweiliger Primergipffläche des Tumorgewebes zum entsprechenden Flächenmittelwert der Standardprimer, blaue Linien: Mittelwert (MW) +/- 2x Standardabweichung (2SD).

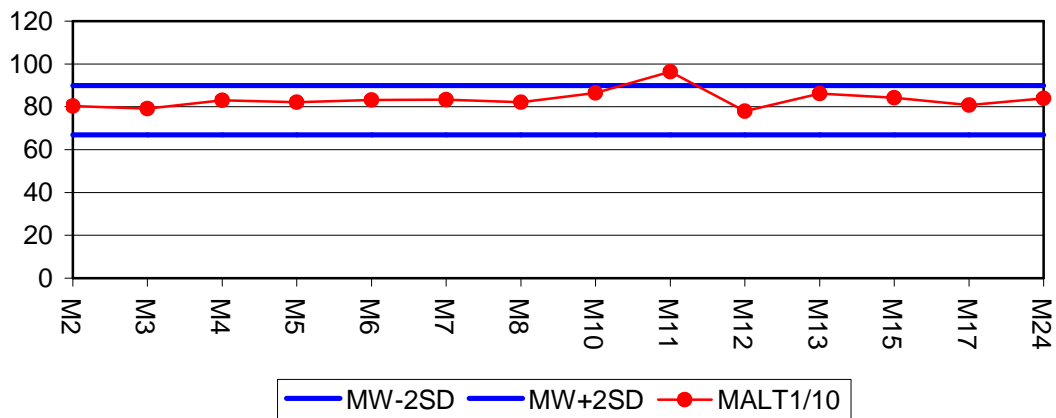


Abbildung 10: MALT1/10 (MW=78,4; SD=5,8)

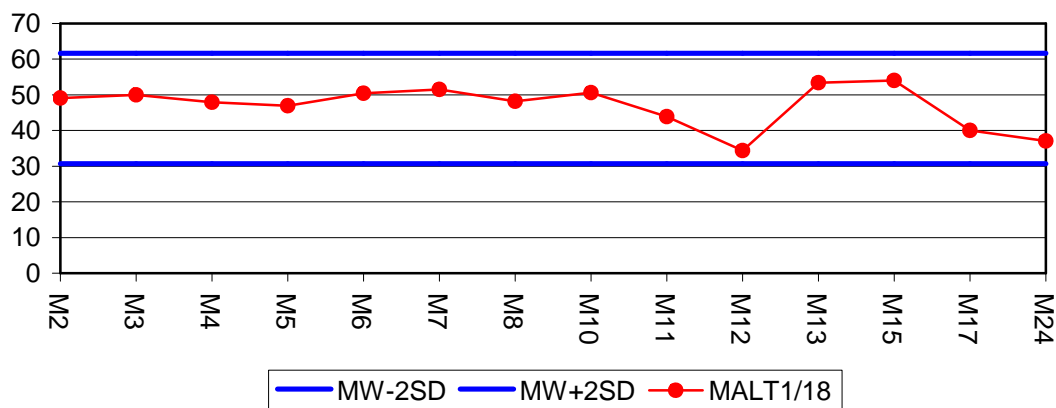


Abbildung 11: MALT1/18 (MW=46,1; SD=7,8)

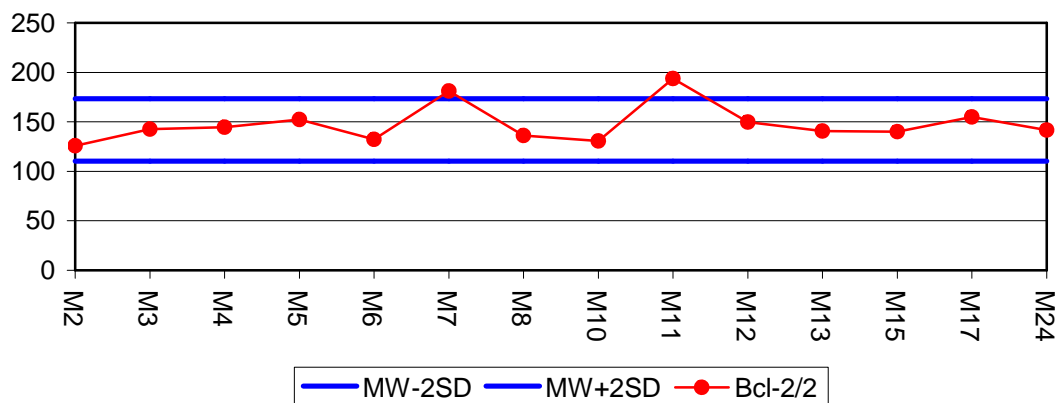


Abbildung 12: Bcl-2/2 (MW=141,9; SD=15,8)

Abb. 10-12: Ergebnisse der semiquantitativen PCR der MZBZL-Fälle. x-Achse: Fallnummern, y-Achse: Prozentzahl des Quotienten aus jeweiliger Primergipffläche des Tumorgewebes zum entsprechenden Flächenmittelwert der Standardprimer, blaue Linien: Mittelwert (MW)  $\pm$  2 x Standardabweichung (2SD).

### **3.2 Vergleich der Aberrationen zwischen DLBCL und MZBZL**

Zwischen MZBZL und DLBCL zeigten sich Unterschiede in der Häufigkeit der Abberationen.

Mikrosatelliteninstabilität konnte bei MZBZL nur in einem Fall (4,2 Prozent; Fall M16; hier doch mehrfach) nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigten acht DLBCL-Fälle (26,7 Prozent; Fälle D2; D6; D8; D16; D19; D23; D25; D30) diese Veränderung.

Amplifikationen in der MALT1-Region konnten in der Mikrosatellitenanalyse in beiden Gruppen gleich oft nachgewiesen werden. Bei den MZBZL wiesen 12,5 Prozent (drei Fälle: M11; M21; M22), bei DLBCL 13,3 Prozent (vier Fälle: D5; D7; D8; D27) diese Veränderung auf. Amplifikationen bezüglich der Bcl-2-Region ließen sich bei MZBZL jedoch nicht zeigen. Hier lag die Anzahl bei den DLBCL mit 13,3 Prozent (4 Fälle: D5; D7; D16; D27) folglich deutlich höher.

LOH war insgesamt weniger vertreten. MZBZL zeigte keinen einzigen Fall; bei den DLBCL konnte nur ein Fall (3,3 Prozent; Fall D17) nachgewiesen werden. Hier erstreckte sich die LOH über den gesamten untersuchten Bereich und schloss somit sowohl die MALT1-, wie auch die Bcl-2-Region ein.

Die semiquantitative PCR zur genaueren Bestimmung der Aberrationen im Bereich der Gene brachte teils unterschiedliche Ergebnisse.

Hier bestätigten sich Amplifikationen bei MALT1 nur in einem untersuchten Fall (7,1 Prozent; Fall M11). Die beiden Fälle (M21 und M22), deren MALT1-Region in der Mikrosatellitenanalyse eine Amplifikation aufwies konnten jedoch aufgrund nicht vorhandenem Frischgewebes nicht mittels semiquantitativer PCR untersucht werden. Bezüglich des MALT1-Gens lagen die Amplifikation bei DLBCL mit 13,3 Prozent fast doppelt so hoch (Fälle: D5; D8; D14; D27). Amplifikationen im Bcl-2-Gen wurden bei MZBZL mit 14,3 Prozent (zwei Fälle: M11; M7) deutlich häufiger gezeigt. Bei DLBCL lag die Rate bei 13,3 Prozent (vier Fälle: D5; D8; D16; D27).

MZBZL wiesen keine LOH auf. Bei den DLBCL bestätigte sich die LOH des Falles D17 (3,3 Prozent ) nur für MALT1. Für Bcl-2 war auch in diesem Fall keine LOH erkennbar.

Mittels Mikrosatellitenanalyse konnten Amplifikationen in der MALT1-Region in 13 Prozent (sieben Fälle: M11; M21; M22; D5; D7; D8; D27); der Bcl-2-Region in 7,4 Prozent (vier Fälle; nur DLBCL: D5; D7; D16; D27) aufgezeigt werden. LOH der MALT1- und Bcl-2-Region jeweils nur in 1,9 Prozent (ein Fall; DLBCL: D17).

MALT1 wies im Rahmen der semiquantitativen PCR in 11,4 Prozent (M11; D5; D8; D14; D27); Bcl-2 in 13,6 Prozent (M11; M7; D5; D8; D16; D27) der untersuchten 44 Fälle eine Amplifikation auf. Eine LOH war in 2,3 Prozent (Fall D17) nachweisbar.



## 4 Diskussion

Bei der Lymphomentstehung spielen Gene auf Chromosom 18q21 eine entscheidende Rolle (Akagi, *et al* 1999, Dierlamm, *et al* 1999, Levine, *et al* 1989, Tsujimoto, *et al* 1984, Yunis, *et al* 1982). Ziel dieser Doktorarbeit war es zunächst mittels Mikrosatellitenanalyse nach Veränderungen der MALT1- und Bcl-2-Genregionen auf 18q21 zu fahnden, um diese Veränderungen dann mittels semiquantitativer PCR genauer zu erfassen. Somit sollte gezeigt werden, dass neben der bereits bekannten Translokationen  $t(14;18)(q32;q21)$  und  $t(11;18)(q21;q21)$  mit Beteiligung des Bcl-2-, beziehungsweise des MALT1-Gens, auch Genamplifikationen, eine Rolle bei der Lymphomentstehung der gastrointestinalen DLBCL und MZBZL spielen könnten (Baens, *et al* 2000, Bakhshi, *et al* 1985, Dierlamm, *et al* 1999, Lipford, *et al* 1987, Motegi, *et al* 2000, Roy, *et al* 1997, Weiss, *et al* 1987, Yunis, *et al* 1982).

In der Region q21 auf Chromosom 18 welche im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurde, sind bereits wichtige Translokationen bei DLBCL und MZBZL bekannt.

Bei DLBCL sind bisher drei Translokationen beschrieben worden. In 20 bis 30 Prozent der DLBCL ist die Translokation  $t(14;18)(q32;q21)$ , bei der das antiapoptotisch wirkende Bcl-2-Gen in die Immunglobulin-Enhancer-Region transloziert wird, nachzuweisen (Bakhshi, *et al* 1985, Lipford, *et al* 1987, Weiss, *et al* 1987, Yunis, *et al* 1982). Selten hingegen (zwei Prozent) wird die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ , bei der Teile des MALT1-Gens in das Apoptose-Inhibitor-Gen BIRC3 (BIR= baculovirus IAP repeat; früher API2: für apoptosis inhibitor gene) auf 11q21 integriert werden beschrieben (Huang, *et al* 2003). Fälle bei denen MALT1 in den IGH-Lokus im Rahmen der Translokation  $t(14;18)(q32;q21)$  transloziert wird, konnten bisher nur bei einem DLBC-Lymphom der Haut, nicht jedoch bei denen des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen werden (Cook, *et al* 2003).

Bei MZBZL vom MALT-Typ wurden folgende Translokationen entdeckt. In 27-48 Prozent der MZBZL des MALT kann die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$ , die mit einer Integration unterschiedlich langer Teile des MALT1-Genes in BIRC3 (früher API2) auf 11q21 einhergeht, nachgewiesen werden (Baens, *et al* 2000, Dierlamm, *et al* 1999,

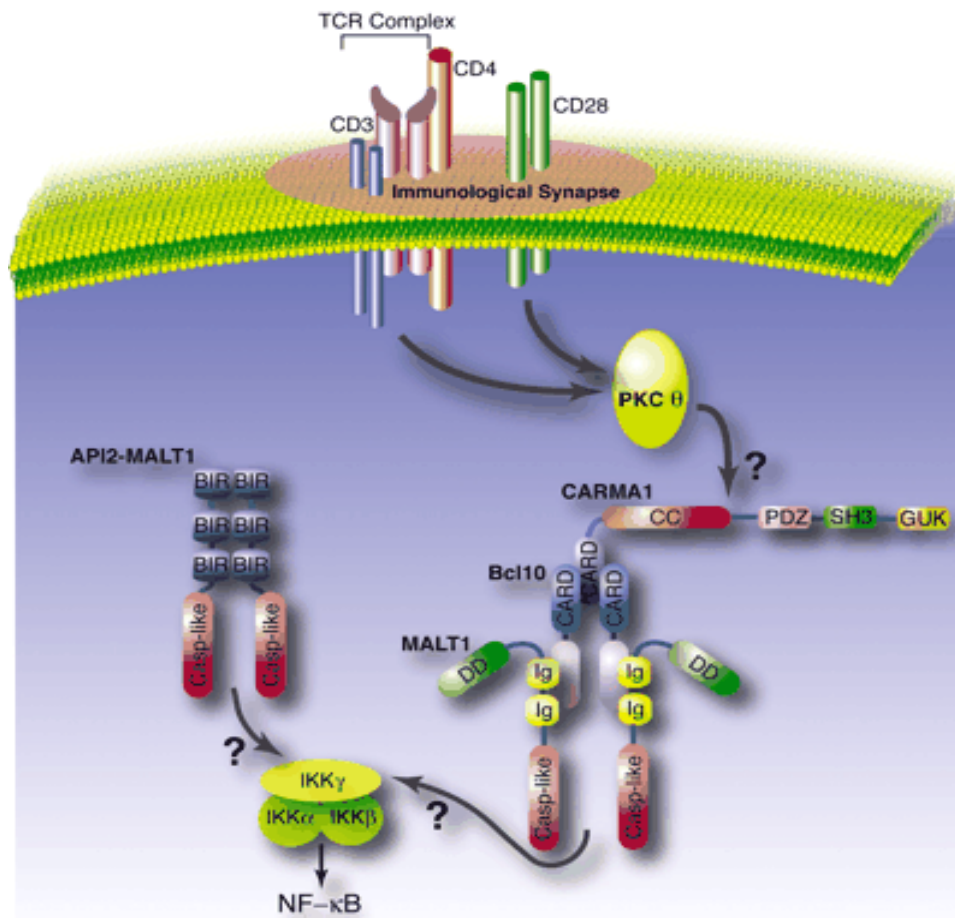
Motegi, *et al* 2000, Ott, *et al* 1997, Roy, *et al* 1997). Diese Translokation scheint einen Übergang von extranodalen MZBZL zu DLBCL zu verhindern (Starostik, *et al* 2002). In nodalen oder splenischen Marginalzonen-Lymphomen konnte sie nicht gefunden werden (Baens, *et al* 2000, Murga Penas, *et al* 2003, Ott, *et al* 1997, Remstein, *et al* 2000, Rosenwald, *et al* 1999). Auffällig ist, dass in der Mehrzahl der Fälle mit *Helicobacter pylori*-assoziierten gastralen MALT-Lymphomen, welche nicht auf eine Eradikationstherapie reagierten, ein BIRC3-MALT1-Fusionstranskript nachgewiesen werden konnte. Dagegen wurde in Fällen, die auf eine Antibiotikatherapie reagieren, keine Translokation t(11;18)(q21;q21) vorgefunden (Inagaki, *et al* 2004, Liu, *et al* 2001).

Die Translokation t(14;18)(q32;q21) bei der MALT1 als Folge eines Rearangements mit IGH überexprimiert wird, wurde bisher nur in MZBZL vom MALT- Typ der Leber, des Auges, der Haut oder Speicheldrüse, nicht jedoch in MZBZL des Gastrointestinaltrakt entdeckt (Streubel, *et al* 2003). Ebenso ist eine Translokation t(14;18)(q32;q21) mit Beteiligung des Bcl-2-Gens bei MZBZL bisher nicht beschrieben (Clark, *et al* 1992, Pan, *et al* 1989).

Das MALT1-Gen (ehemals MLT für MALT-Lymphoma associated Translocation) wurde erstmals durch die Translokation t(11;18)(q21;q21) bei MZBZL vom MALT-Typ entdeckt (Akagi, *et al* 1999, Dierlamm, *et al* 1999, Levine, *et al* 1989, Morgan, *et al* 1999). MALT1 mRNA kann in vielen menschlichen Geweben, darunter in großen Mengen beispielsweise in Nieren, Magen, Pankreas, Milz oder Blut nachgewiesen werden (Remstein, *et al* 2000, Sato, *et al* 2001, Stoffel and Le Beau 2001).

Bei der Translokation t(11;18)(q21;q21) werden unterschiedlich lange Teile des MALT1-Genes in BIRC3 (ehemals Apoptose-Inhibitor-Gen API2) auf 11q21 integriert, wobei ein funktionierendes BIRC3-MALT1-Fusionsprodukt entsteht (Baens, *et al* 2000, Dierlamm, *et al* 1999, Motegi, *et al* 2000, Roy, *et al* 1997). Das BIRC3-MALT1-Fusionsprodukt entzieht sich, im Gegensatz zu unfusioniertem BIRC3 oder MALT1, dem Abbau durch Ubiquitin-Proteasen (Hosokawa 2005).

Der Wirkmechanismus von MALT1 wurde 2004 als Model veröffentlicht (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Signalkaskaden-Model der TCR-CD28 induzierten NFκB-Regulation (nuclear factor κB). Über den TCR-Komplex (T cell receptor) und CD28 wird PKC (Protein Kinase C) aktiviert. Diese aktiviert CARMA1 (Caspase recruitment domain-containing MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) protein-1), welche zusammen mit Bcl-10 und MALT1 einen Komplex bildet und den IKK-Komplex (Inhibitor of NF-kappaB Kinase), bestehend aus IKKα, IKKβ und IKKγ, phosphoryliert und degeneriert. Dadurch mindert sich die Wirkung des IKK-Komplexes, wodurch funktionelles NFκB vermehrt in den Zellkern wandert und dort als Transkriptionsfaktor für mehrere Moleküle, welche das Überleben der Zelle fördern, agiert. Das API-MALT1-Fusionsprodukt (jetzt: BIRC3-MALT1) kann direkt den IKK-Komplex aktivieren (Arendt, *et al* 2002, Baier, *et al* 1993, Bi, *et al* 2001, Caamano and Hunter 2002, Costanzo, *et al* 1999, Gaide, *et al* 2002, Herndon, *et al* 2001, Ho, *et al* 2005, Khoshnan, *et al* 2000, Koseki, *et al* 1999, Li and Verma 2002, Lucas, *et al* 2004, Lucas, *et al* 2001, May and Ghosh 1998, Mayo, *et al* 1997, Monks, *et al* 1997, Ruefli-Brasse, *et al* 2003, Sanchez-Izquierdo, *et al* 2003, Srinivasula, *et al* 1999, Uren, *et al* 2000, Yan, *et al* 1999).

Es wurde gezeigt, dass das BIRC3-MALT1-Fusionsprotein bei der Translokation t(11;18)(q21;q21), nicht jedoch komplettes MALT1 oder BIRC3 alleine, ebenfalls die Aktivierung von NFκB (nuclear factor κB) auf direktem oder indirektem Weg ohne Bcl-10-Beteiligung induziert und somit antiapoptotisch wirkt (Lucas, *et al* 2004, May and Ghosh 1998, Mayo, *et al* 1997, Uren, *et al* 2000). Es stehen jedoch auch direkte Interaktion von BIRC3-MALT1 mit Apoptose-Regulatoren wie Smac und die Hemmung des p53-induzierten Zelltodes zur Diskussion (Hosokawa 2005, Stoffel and Levine 2004). Physiologisches MALT1 bedarf aber wahrscheinlich des Bcl-10s (Lucas, *et al* 2001).

Ein weiterer Pathomechanismus, welcher mit einer erhöhten MALT1-Produktion einhergeht ist die Translokation t(14;18)(q32;q21), bei der das MALT1-Gen in den IGH-Lokus (immunoglobulin heavy-chain locus) auf 14q32 integriert wird. Folglich kommt es zu einer Überexpression von MALT1 und einem Anstieg von Bcl-10 (Sanchez-Izquierdo, *et al* 2003, Ye, *et al* 2005). MALT1 führt zumindest in vitro zu einem gesteigerten Export von Bcl-10 aus dem Zellkern (Nakagawa, *et al* 2005). Diese Translokation ist aber bisher nicht bei MZBZL des MALT des Gastrointestinaltraktes und nur einem DLBCL der Haut nachgewiesen (Cook, *et al* 2003, Sanchez-Izquierdo, *et al* 2003, Streubel, *et al* 2003).

Zu erwähnen ist eine weitere Beteiligung des MALT1-Gens. In einem fortgeschrittenen DLBCL- Fall konnte eine Fusion des Exon 9 von MALT1 mit dem Exon 9 von MAP4 (microtubule-associated protein 4 gene) nachgewiesen werden. Das Fusionstranskript führte aber nicht wie bei t(14;18)(q32;q21) oder t(11;18)(q21;q21) zu einem Anstieg von Bcl-10 oder einer gesteigerten NFκB- Aktivität. Der genaue Mechanismus mit der möglichen Folge einer Hemmung der Apoptose ist bisher noch unklar (Murga Penas, *et al* 2006).

Kürzlich konnten auch alleinige Amplifikationen des MALT1-Gens, welche zu einer Mehrproduktion des Genproduktes führten, bei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomzelllinien nachgewiesen werden. Somit scheint die Dysregulation von MALT1 auch eine Folge von Amplifikationen zu sein. MALT1 würde somit als dominantes Onkogen agieren und womöglich zu einem gesteigerten Export von Bcl-10 aus dem

Zellkern ins Zytoplasma führen (Nakagawa, *et al* 2005, Sanchez-Izquierdo, *et al* 2003).

Bei gastrointestinalen MZBZL vom MALT-Typ und gastrointestinalen DLBZL scheint durch die Translokationen t(11;18)(q21;q21) ein Pathomechanismus entdeckt zu sein (Baens, *et al* 2000, Dierlamm, *et al* 1999, Motegi, *et al* 2000, Roy, *et al* 1997). Zudem besteht der Verdacht, dass MALT1- Amplifikationen zumindest in Abhängigkeit von Bcl-10 eine Rolle bei der Lymphomentstehung haben könnten (Lucas, *et al* 2001, Sanchez-Izquierdo, *et al* 2003).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde versucht, Amplifikationen von MALT1 in den untersuchten Fällen nachzuweisen. In sieben Fällen (13 Prozent der untersuchten Lymphome) konnten Amplifikationen um den MALT1-Lokus ausgemacht werden. Davon betrafen vier die DLBCL (23,3 Prozent der DLBCL) und drei die MZBZL (12,5 Prozent der MZBZL), wobei sich bei Letzteren die Amplifikationen jeweils nur im telomerisch des MALT1-Gen gelegenen Marker D18S1144 nachweisen ließen und dadurch am spezifischsten für das MALT1-Gen waren. Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse geben nicht unbedingt die Beteiligung des angrenzenden Gens wieder, da in den untersuchten Mikrosatelliten keine Intron- beziehungsweise Exonanteile enthalten sind. Deswegen wurde zur Präzisierung eine semiquantitative PCR der Exone 9 und 16 des MALT1-Gens durchgeführt, um festzustellen ob die sieben Fälle, welche bei der Mikrosatellitenanalyse Amplifikationen aufwiesen, diese auch im Gen selbst zeigten. Die Ergebnisse des MALT1/10-Markers, welcher die niedrigste Standardabweichung zeigte und somit am aussagekräftigsten war, bestätigten die Amplifikationen im Bereich des MALT1-Gens in vier von fünf Fällen. Lediglich die Amplifikation in der Mikrosatellitenanalyse in Fall D7 betraf wohl nicht das MALT1-Gen. Statt dessen konnte eine weitere Amplifikation durch die semiquantitative PCR in Probe D14 ermittelt werden. In insgesamt 11,4 Prozent (fünf von insgesamt 44 DLBCL- und MZBZL-Fällen) der mittels semiquantitativer PCR untersuchten Fälle konnte somit eine Amplifikation im MALT1-Gen nachgewiesen werden (vier Fälle: D5, D8, D14, D27 entspricht 13,3 Prozent der untersuchten DLBCL; ein Fall: M11 entspricht 7,1 Prozent der untersuchten MZBZL). Zwei Fälle der MZBZL, welche bei der Mikrosatellitenanalyse eine Amplifikation um den MALT1-Lokus aufwiesen, konnten mangels Frischmaterials nicht mittels semiquantitativer PCR untersucht werden. Der

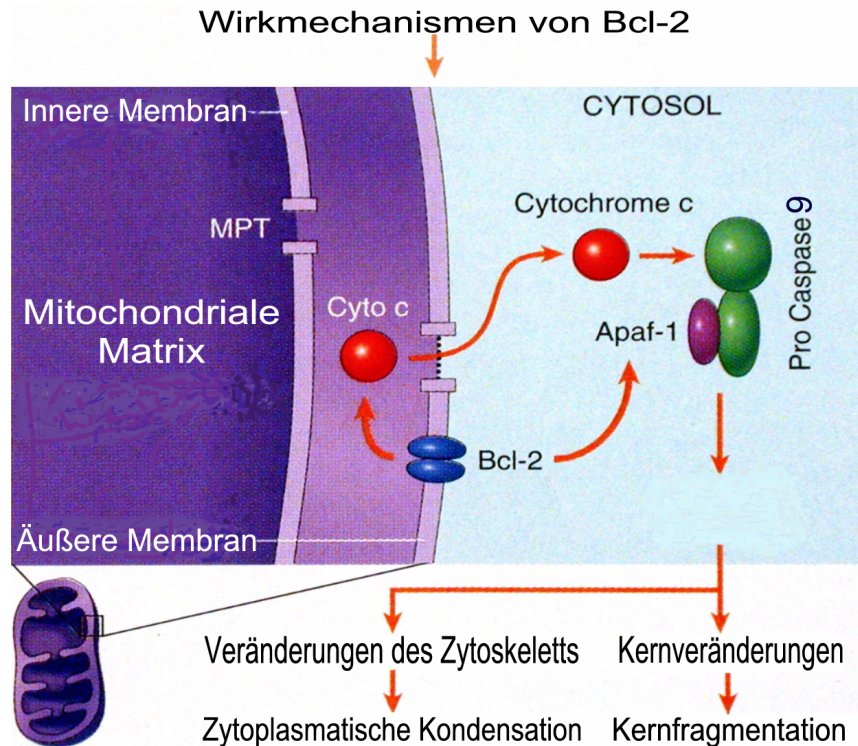
MZBZL-Fall M11 mit Amplifikation im MALT1-Gen wies keine mittels FISH untersuchte Translokation t(11;18)(q21;q21) auf.

MALT1-Amplifikationen könnten in den untersuchten Fällen zu einer vermehrten MALT1-Genprodukt-Synthese führen. Dies konnte bei einigen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen bereits gezeigt werden (Sanchez-Izquierdo, *et al* 2003). Die Vermutung bestärken Forschungsergebnisse über anderer Gene. So konnten Fälle nachgewiesen werden, in den Bcl-2-Amplifikationen ohne Translokation t(14;18)(q32;q21) oder Onkogene wie MYC und BCL11A, welche durch Translokationen mit Immunglobulingenen fusioniert und aktiviert werden, in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zu einer gesteigerten Genaktivierung oder -veränderung führen können (Amakawa, *et al* 1990, Monni, *et al* 1997, Monni, *et al* 1996, Rao, *et al* 1998, Satterwhite, *et al* 2001).

Wie bereits von Sanchez- Izquierdo et al. berichtet und im Rahmen dieser Doktorarbeit bestätigt, könnte MALT1 zumindest in Abhängigkeit von Bcl-10 als dominantes Onkogen auch ohne Translokation agieren (Sanchez-Izquierdo, *et al* 2003).

Das zweite im Rahmen dieser Doktorarbeit näher untersuchte Gen war Bcl-2. Tsujimoto und seine Mitarbeiter klonierten 1984 erstmals das Protoonkogen Bcl-2-Gen (B-cell lymphoma/leukemia 2) im Bereich 18q21.3 (Tsujimoto, *et al* 1984). Physiologische Bcl-2-Expression wurde in langlebenden oder proliferativen Zellzonen, wie beispielsweise in kleinen Lymphozyten der Follikelmantelzone oder in Epithelzellen der Krypten in Dünn- und Dickdarm nachgewiesen (Hockenbery, *et al* 1991). Dort ist das Bcl-2-Protein in der äußeren Mitochondrienmembran, der Kernhülle und dem Endoplasmatischem Retikulum lokalisiert (Hockenbery, *et al* 1990, Krajewski, *et al* 1993).

Der Wirkmechanismus von Bcl-2 wird in Abbildung 14 wiedergegeben.



**Abbildung 14:** Wirkmechanismen von Bcl-2: Zelltodsignale führen zu Veränderungen der inneren Mitochondrienmembran, woraufhin es zu einer Änderung der Mitochondrienpermeabilität (MPT: mitochondrial permeability transition) und zur Ausschüttung von Cytochrom C kommt. Cytochrom C bindet an Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor) und wandelt dadurch dessen Konformation, was über Aktivierung der Pro Caspase 9 über mehrere Schritte zur Apoptose führt. Bcl-2 verhindert Cytochrom C-Ausschüttung und bindet Apaf-1, was dieses inaktiviert. Nach: (Cotran 1999, Kluck, *et al* 1997, Yang, *et al* 1997).

Es werden zudem Bcl-2-Einflüsse auf das Mitochondrienmembranpotential durch Erhöhung des  $H^+$  Effluxes und Wirkungen von Bcl-2 auf das Zellwachstum sowie bei Überexpression eine komplette Hemmung der während der Apoptose stattfindenden Lipidperoxidation vermutet (Chou, *et al* 2000, Hockenbery, *et al* 1993, Shimizu, *et al* 1998).

Die Bcl-2-Expression gibt bei manchen Karzinomen wie Blasenkarzinomen Aufschlüsse über die Prognose (Hussain, *et al* 2003). Gleiches wird für Tumoren des zentralen Nervensystems diskutiert (Tyagi, *et al* 2002).

Bei Translokation t(14;18)(q32;q21), welche zwischen 20 und 30 Prozent der DLBCL nachweisbar ist, wird das antiapoptotisch wirkende Bcl-2-Gen während des VDJ-Joinings in der prä-B-Zell Phase in das oder in die Nähe des J (joining) Segmentes und

die Immunglobulin-Enhancer-Region transloziert (Bakhshi, *et al* 1985, Cleary and Sklar 1985, Lipford, *et al* 1987, Tsujimoto, *et al* 1985, Weiss, *et al* 1987, Yunis, *et al* 1982). Dies führt zu einer Überexpression des Bcl-2-Proteins und damit, wie zuvor erörtert, zur gesteigerten Apoptosehemmung (Ngan, *et al* 1988). In MZBZL vom MALT-Typ konnte dies nicht nachgewiesen werden (Clark, *et al* 1992, Pan, *et al* 1989).

Bei manchen t(14;18)(q32;q21)-negativen DLBCL und follikulären Lymphomen konnten außerdem Amplifikationen des Bcl-2-Gens entdeckt werden. Dies scheint neben t(14;18)(q32;q21) ein weiterer wichtiger Mechanismus für die Überexpression von Bcl-2 zu sein und könnte eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen (Amakawa, *et al* 1990, Monni, *et al* 1997, Monni, *et al* 1996).

Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse dieser Arbeit zeigten in fünf DLBCL-Fällen Amplifikationen im Bereich des Bcl-2-Gens, wobei diese bei Probe D16 nur die Region um den Bcl-2-Genlokus betraf, in D5 und D8 zusätzlich den MALT1-Lokus und in D7 und D27 die gesamte untersuchte Region. MZBZL wurden bezüglich der Beteiligung des Bcl-2-Gens durch die Mikrosatellitenanalyse nur von centromerisch untersucht und zeigten in dieser Region keine Auffälligkeiten. Die semiquantitative PCR mittels Bcl-2/2-Marker bestätigte die Amplifikationen, die in der Mikrosatellitenanalyse aufgezeigt wurden, bis auf eine Ausnahme. Wie schon durch den MALT1/10-Marker ließ sich auch mit Bcl-2/2 in Fall D7 keine Genbeteiligung nachweisen. Dafür wiesen zwei MZBZL-Fälle eine Amplifikation in Bcl-2/2 auf (M7; M11). Somit zeigte sich in insgesamt 13,6 Prozent (sechs von 44 Fällen) der mittels semiquantitativer PCR untersuchten Fällen eine Amplifikation (DLBCL: vier Fälle: D5, D8, D16 und D27 entspricht 13,3 Prozent der untersuchten DLBCL; MZBZL: zwei Fälle: M7, M11 entspricht 14,3 Prozent der untersuchten MZBZL).

Wie zuvor erwähnt, könnten auch Bcl-2-Amplifikationen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese von Lymphomen spielen. Es besteht die Möglichkeit, dass es in den hier nachgewiesenen Fällen mit Bcl-2-Amplifikationen zu einer vermehrten Bcl-2-Expression kommt, falls die Amplifikate intakte Bcl-2-Gene darstellen oder die Translationsprodukte zumindest ihrer Funktion als Hemmer der Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrieninneren behalten und dem gesteigertem Angebot an Bcl-2-Genen nicht eine gesenkte Translationsrate oder andere Regulationsmechanismen



entgegenwirken. Somit wäre eine Hemmung der durch Cytochrom C vermittelten Apoptose denkbar, bedarf aber genaueren Wissens über die biochemischen und zytologischen Folgen von Amplifikationen des Bcl-2-Gens. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit lassen vermuten, dass auch MZBZL (14,3 Prozent) durch Amplifikation von Bcl-2 entstehen oder im Verlauf Bcl-2-Amplifikationen auftreten könnten.

Ein weiteres Resultat ergibt sich aus der Wertung der Ergebnisse mittels des, in einer von Starostik et al veröffentlichten Studie, als Maß für die genomische Instabilität eingeführten MGII (microsatellite genomic instability index) (Starostik, *et al* 2002). Dieser Index errechnet sich als Prozentsatz, aus allen Ergebnissen, welche eine klonale Aberration egal ob allelische Imbalance (LOH oder Amplifikation) oder MSI aufweisen, zur Gesamtheit der untersuchten Mikrosatelliten. Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI), wie beispielsweise in hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinomen (HNPCC), sind auf die gestörten Korrekturmöglichkeiten von während der DNA-Replikation entstandenen, nicht zusammenpassenden Nukleotiden, bedingt durch Mutationen der Mismatch-Reparaturgene zurückzuführen (Kinzler and Vogelstein 1996). In den, im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten MZBZL zeigten sich in allen nach FISH-Analyse für t(11;18)(q21;q21) (Starostik, *et al* 2002) positiven Fällen, sowohl durch die Mikrosatelliten- als auch durch die semiquantitative PCR, keine genomischen Veränderungen, wohingegen zwei der sieben untersuchten t(11;18)(q21;q21) negativen Fälle in der Mikrosatellitenanalyse eine LOH (Fall M9) oder Amplifikationen (Fall M11) zeigten. Die beiden einzigen MZBZL, die in der semiquantitativen PCR Amplifikationen zeigten, waren ebenfalls t(11;18)(q21;q21) negativ. Der MGII in 18q21 liegt somit bei den mittels FISH analysierten t(11;18)(q21;q21) positiven MZBZL-Fällen bei 0, den t(11;18)(q21;q21) negativen MZBZL bei 7,1 und den DLBCL bei 15,1 Prozent.

Diese Ergebnisse bestätigen die von Starostik et al getroffene Annahme, wonach Fälle mit nachgewiesener Translokation t(11;18)(q21;q21) womöglich nicht genügend sekundäre genetische Aberrationen anhäufen können, um zu DLBCL zu transformieren. Dagegen zeigen t(11;18)(q21;q21) negative MZBZL gehäufte und ähnliche Veränderungen, wie DLBCL. Somit könnten diese zumindest teilweise Vorstufen der DLBCL sein (Starostik, *et al* 2002). Diese Vermutung bestärkt das Ergebnis, dass

Aberrationen- vor allem Mikrosatelliteninstabilitäten (MZBZL: 4,2 Prozent; DLBCL 26,7 Prozent)- vermehrt in DLBCL nachweisbar sind. Dabei könnte es sich um sekundäre, aufgrund einer Ansammlung an genetischen Aberrationen zu DLBCL transformierte Fälle handeln. Es sollte allerdings darauf hingewiesen werden, dass der untersuchte Abschnitt nur die Bande q21 auf Chromosom 18 betraf und dadurch nicht für das gesamte Genom repräsentativ sein kann, die Ergebnisse aber die bisherigen Kenntnisse stützen.

## 5 Zusammenfassung

Die primären genetischen Veränderungen gastraler MALT-Lymphome zeigen verschiedene Pathogenesen auf. In 20 bis 30 Prozent der DLBCL kann eine Translokation  $t(14;18)(q32;q21)$  nachgewiesen werden, bei der das antiapoptotisch wirkende Bcl-2-Gen transloziert wird. Dies führt zu einer Überexpression von Bcl-2.

Die Translokation  $t(11;18)(q21;q21)$  wurde in bis zu 50 Prozent der MZBZL vom MALT-Typ und wenigen DLBZL nachgewiesen. Dabei werden unterschiedlich lange Teile des MALT1-Gens in BIRC3 (ehemals: Apoptose- Inhibitor- Gen API2) auf 11q21 integriert. Mit den Translokationen scheint man bei einem Teil der gastrointestinalen Lymphome die primäre genetische Veränderung entdeckt zu haben.

Bei Lymphomen, bei denen die Pathogenese nicht durch Translokationen vorangetrieben wird, könnten die gleichen, von Translokationen betroffenen Gene durch Amplifikationen/ Mutationen überexprimiert/ aktiviert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Gene MALT1 und Bcl-2 hinsichtlich Amplifikationen der genomischen DNA untersucht.

Amplifikationen des Bcl-2-Gens konnten kürzlich bei einigen  $t(14;18)(q32;q21)$ -negativen DLBCL und follikulären Lymphomen nachgewiesen und auch im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden. Mittels semiquantitativer PCR konnte in vier von 30 untersuchten DLBCL-Fällen (13,3 Prozent) eine Amplifikation des Bcl-2-Gens nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass Bcl-2-Amplifikation mit folgender Überexpression des Bcl-2-Proteins (neben Bcl-2-Translokation) eine wichtige Rolle in der Pathogenese bei DLBCL spielt, wird mit diesen Ergebnissen gestützt.

Zudem zeigten zwei von 14 MZBZL-Fällen (14,3 Prozent) eine Bcl-2-Amplifikation. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass Bcl-2 auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung der MZBZL vom MALT-Typ spielen könnte. Bisher konnten Bcl-2-Gen-Beteiligungen (zum Beispiel  $t(14;18)(q32;q21)$ ) nicht nachgewiesen werden.

Amplifikationen des MALT1-Gens wurden kürzlich als mögliche primäre Ursache für die Entstehung von Lymphomen beschrieben. In vier der 30 untersuchten DLBCL-

Fällen (13,3 Prozent) und einem t(11;18)(q21;q21)-negativem MZBZL-Fall konnten mittels semiquantitativer PCR Amplifikationen von MALT1 detektiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass MALT1 als dominantes Onkogen in der Pathogenese von gastralen MZBZL vom MALT-Typ und primär gastralen DLBCL zu agieren scheint. Es kann sowohl durch Translokationen, wie auch durch genomische Amplifikationen dysreguliert werden.

## 6 Literaturnachweis

- (1997) A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*, **89**, 3909-3918.
- Akagi, T., Motegi, M., Tamura, A., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Suzuki, H., Ota, H., Nakamura, S., Morishima, Y., Taniwaki, M. & Seto, M. (1999) A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18) (q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene*, **18**, 5785-5794.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein, D., Brown, P.O. & Staudt, L.M. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, **403**, 503-511.
- Amakawa, R., Fukuhara, S., Ohno, H., Tanabe, S., Horii, M., Matsuyama, F., Kato, I., Kakita, T. & Nagauchi, O. (1990) Amplified and rearranged bcl-2 gene in two lymphoma cell lines, FL-218 and FL-318, carrying a 14;18 translocation. *Cancer Res*, **50**, 2423-2428.
- Arendt, C.W., Albrecht, B., Soos, T.J. & Littman, D.R. (2002) Protein kinase C-theta:: signaling from the center of the T-cell synapse. *Curr Opin Immunol*, **14**, 323-330.
- Baens, M., Maes, B., Steyls, A., Geboes, K., Marynen, P. & De Wolf-Peeters, C. (2000) The product of the t(11;18), an API2-MLT fusion, marks nearly half of gastric MALT type lymphomas without large cell proliferation. *Am J Pathol*, **156**, 1433-1439.
- Baier, G., Telford, D., Giampa, L., Coggeshall, K.M., Baier-Bitterlich, G., Isakov, N. & Altman, A. (1993) Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J Biol Chem*, **268**, 4997-5004.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. & Korsmeyer, S.J. (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*, **41**, 899-906.
- Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van Stipdonk, M.J. & Altman, A. (2001) Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat Immunol*, **2**, 556-563.

- Böcker, D., Heitz (1997) *Pathologie*. Urban und Schwarzenberg, München.
- Böcker, D., Heitz (2001) *Pathologie*. Urban und Fischer, München.
- Boveri, T. (1914) *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- Burton, M.P., Schneider, B.G., Brown, R., Escamilla-Ponce, N. & Gulley, M.L. (1998) Comparison of histologic stains for use in PCR analysis of microdissected, paraffin-embedded tissues. *Biotechniques*, **24**, 86-92.
- Caamano, J. & Hunter, C.A. (2002) NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev*, **15**, 414-429.
- Chan, J.K., Ng, C.S. & Isaacson, P.G. (1990) Relationship between high-grade lymphoma and low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) of the stomach. *Am J Pathol*, **136**, 1153-1164.
- Chou, H.K., Chen, S.L., Hsu, C.T., Chao, Y.C. & Tsao, Y.P. (2000) Bcl-2 accelerates retinoic acid-induced growth arrest and recovery in human gastric cancer cells. *Biochem J*, **348 Pt 2**, 473-479.
- Clark, H.M., Jones, D.B. & Wright, D.H. (1992) Cytogenetic and molecular studies of t(14;18) and t(14;19) in nodal and extranodal B-cell lymphoma. *J Pathol*, **166**, 129-137.
- Classen, D., Kochsiek (1994) *Innere Medizin*. Urban & Schwarzenberg, München.
- Cleary, M.L. & Sklar, J. (1985) Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 7439-7443.
- Cook, J.R., Sherer, M., Craig, F.E., Shekhter-Levin, S. & Swerdlow, S.H. (2003) T(14;18)(q32;q21) involving MALT1 and IGH genes in an extranodal diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol*, **34**, 1212-1215.
- Costanzo, A., Guiet, C. & Vito, P. (1999) c-E10 is a caspase-recruiting domain-containing protein that interacts with components of death receptors signaling pathway and activates nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*, **274**, 20127-20132.
- Cotran, K., Collins (1999) *Robbins: Pathologic Basics of Disease*. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J.M., Hossfeld, D.K., De Wolf-Peeters, C., Hagemeijer, A., Van den Berghe, H. & Marynen, P. (1999) The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21)p6 associated with

- mucosa- associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood*, **93**, 3601-3609.
- Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., Kinzler, K.W. & et al. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, **247**, 49-56.
- Gaide, O., Favier, B., Legler, D.F., Bonnet, D., Brissoni, B., Valitutti, S., Bron, C., Tschopp, J. & Thome, M. (2002) CARMA1 is a critical lipid raft-associated regulator of TCR-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*, **3**, 836-843.
- Genta, R.M., Hamner, H.W. & Graham, D.Y. (1993) Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum Pathol*, **24**, 577-583.
- Greiner, A., Marx, A., Heesemann, J., Leebmann, J., Schmausser, B. & Muller-Hermelink, H.K. (1994) Idiotypic identity in a MALT-type lymphoma and B cells in *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis. *Lab Invest*, **70**, 572-578.
- Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H. & Kern, S.E. (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, **271**, 350-353.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A. & Bloomfield, C.D. (1999) World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*, **17**, 3835-3849.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B. & Gatter, K.C. (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, **84**, 1361-1392.
- Herndon, T.M., Shan, X.C., Tsokos, G.C. & Wange, R.L. (2001) ZAP-70 and SLP-76 regulate protein kinase C-theta and NF-kappa B activation in response to engagement of CD3 and CD28. *J Immunol*, **166**, 5654-5664.
- Ho, L., Davis, R.E., Conne, B., Chappuis, R., Berczy, M., Mhawech, P., Staudt, L.M. & Schwaller, J. (2005) MALT1 and the API2-MALT1 fusion act between CD40 and IKK and confer NF-kappa B-dependent proliferative advantage and resistance against FAS-induced cell death in B cells. *Blood*, **105**, 2891-2899.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. & Korsmeyer, S.J. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell

- death. *Nature*, **348**, 334-336.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, **75**, 241-251.
- Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. & Korsmeyer, S.J. (1991) BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6961-6965.
- Hosokawa, Y. (2005) Anti-apoptotic action of API2-MALT1 fusion protein involved in t(11;18)(q21;q21) MALT lymphoma. *Apoptosis*, **10**, 25-34.
- Huang, X., Zhang, Z., Liu, H., Ye, H., Chuang, S.S., Wang, J., Lin, S., Gao, Z. & Du, M.Q. (2003) T(11;18)(q21;q21) in gastric MALT lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma of Chinese patients. *Hematol J*, **4**, 342-345.
- Hussain, S.A., Ganesan, R., Hiller, L., Cooke, P.W., Murray, P., Young, L.S. & James, N.D. (2003) BCL2 expression predicts survival in patients receiving synchronous chemoradiotherapy in advanced transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep*, **10**, 571-576.
- Hyjek, E. & Isaacson, P.G. (1988) Primary B cell lymphoma of the thyroid and its relationship to Hashimoto's thyroiditis. *Hum Pathol*, **19**, 1315-1326.
- Hyjek, E., Smith, W.J. & Isaacson, P.G. (1988) Primary B-cell lymphoma of salivary glands and its relationship to myoepithelial sialadenitis. *Hum Pathol*, **19**, 766-776.
- Inagaki, H., Nakamura, T., Li, C., Sugiyama, T., Asaka, M., Kodaira, J., Iwano, M., Chiba, T., Okazaki, K., Kato, A., Ueda, R., Eimoto, T., Okamoto, S., Sasaki, N., Uemura, N., Akamatsu, T., Miyabayashi, H., Kawamura, Y., Goto, H., Niwa, Y., Yokoi, T., Seto, M. & Nakamura, S. (2004) Gastric MALT lymphomas are divided into three groups based on responsiveness to Helicobacter Pylori eradication and detection of API2-MALT1 fusion. *Am J Surg Pathol*, **28**, 1560-1567.
- Isaacson, P.G. (1999) Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Semin Hematol*, **36**, 139-147.
- Isaacson, P.G. & Spencer, J. (1987) Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Histopathology*, **11**, 445-462.
- Isaacson, P.G., Wotherspoon, A.C., Diss, T. & Pan, L.X. (1991) Follicular colonization in B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Surg Pathol*, **15**, 819-828.
- Jaffe E, H.N., Stein H, Vardiman J (2001) *Pathology and Genetics of Tumors of*



*Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon.

Jaffe, H., Stein, Vardiman (2001) *Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, **51**, 6304-6311.

Khoshnan, A., Bae, D., Tindell, C.A. & Nel, A.E. (2000) The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J Immunol*, **165**, 6933-6940.

Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-170.

Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, **275**, 1132-1136.

Knudson, A.G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-823.

Knudson, A.G., Jr. (1985) Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res*, **45**, 1437-1443.

Koseki, T., Inohara, N., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Hottiger, M.O., Nabel, G.J. & Nunez, G. (1999) CIPER, a novel NF kappaB-activating protein containing a caspase recruitment domain with homology to Herpesvirus-2 protein E10. *J Biol Chem*, **274**, 9955-9961.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W. & Reed, J.C. (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*, **53**, 4701-4714.

Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V. & Kastan, M.B. (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7491-7495.

Lane, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16.

Lennert, K., Stein, H. & Kaiserling, E. (1975) Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer*, **31 SUPPL 2**, 29-43.

Levine, E.G., Arthur, D.C., Machnicki, J., Frizzera, G., Hurd, D., Peterson, B., Gajl-Peczalska, K.J. & Bloomfield, C.D. (1989) Four new recurring translocations in

- non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, **74**, 1796-1800.
- Li, Q. & Verma, I.M. (2002) NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **2**, 725-734.
- Lipford, E., Wright, J.J., Urba, W., Whang-Peng, J., Kirsch, I.R., Raffeld, M., Cossman, J., Longo, D.L., Bakhshi, A. & Korsmeyer, S.J. (1987) Refinement of lymphoma cytogenetics by the chromosome 18q21 major breakpoint region. *Blood*, **70**, 1816-1823.
- Litt, M., Hauge, X. & Sharma, V. (1993) Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. *Biotechniques*, **15**, 280-284.
- Liu, H., Ruskon-Fourmestiaux, A., Lavergne-Slove, A., Ye, H., Molina, T., Bouhnik, Y., Hamoudi, R.A., Diss, T.C., Dogan, A., Megraud, F., Rambaud, J.C., Du, M.Q. & Isaacson, P.G. (2001) Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Lancet*, **357**, 39-40.
- Lodygin, D., Diebold, J. & Hermeking, H. (2004) Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression. *Oncogene*, **23**, 9034-9041.
- Lucas, P.C., McAllister-Lucas, L.M. & Nunez, G. (2004) NF-kappaB signaling in lymphocytes: a new cast of characters. *J Cell Sci*, **117**, 31-39.
- Lucas, P.C., Yonezumi, M., Inohara, N., McAllister-Lucas, L.M., Abazeed, M.E., Chen, F.F., Yamaoka, S., Seto, M. & Nunez, G. (2001) Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem*, **276**, 19012-19019.
- Mao, L., Lee, D.J., Tockman, M.S., Erozan, Y.S., Askin, F. & Sidransky, D. (1994) Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9871-9875.
- May, M.J. & Ghosh, S. (1998) Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today*, **19**, 80-88.
- Mayo, M.W., Wang, C.Y., Cogswell, P.C., Rogers-Graham, K.S., Lowe, S.W., Der, C.J. & Baldwin, A.S., Jr. (1997) Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science*, **278**, 1812-1815.
- Monks, C.R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A. & Kupfer, A. (1997) Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature*, **385**, 83-86.
- Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K., Klefstrom, J., Alitalo, K. & Knuutila, S. (1997) BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **90**, 1168-1174.

- Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K. & Knuutila, S. (1996) DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma--comparative genomic hybridization study. *Blood*, **87**, 5269-5278.
- Morgan, J.A., Yin, Y., Borowsky, A.D., Kuo, F., Nourmand, N., Koontz, J.I., Reynolds, C., Soreng, L., Griffin, C.A., Graeme-Cook, F., Harris, N.L., Weisenburger, D., Pinkus, G.S., Fletcher, J.A. & Sklar, J. (1999) Breakpoints of the t(11;18)(q21;q21) in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma lie within or near the previously undescribed gene MALT1 in chromosome 18. *Cancer Res*, **59**, 6205-6213.
- Morgner, A., Miehke, S., Fischbach, W., Schmitt, W., Muller-Hermelink, H., Greiner, A., Thiede, C., Schetelig, J., Neubauer, A., Stolte, M., Ehninger, G. & Bayerdorffer, E. (2001) Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of Helicobacter pylori infection. *J Clin Oncol*, **19**, 2041-2048.
- Motegi, M., Yonezumi, M., Suzuki, H., Suzuki, R., Hosokawa, Y., Hosaka, S., Kodera, Y., Morishima, Y., Nakamura, S. & Seto, M. (2000) API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogeneous products. *Am J Pathol*, **156**, 807-812.
- Murga Penas, E.M., Hinz, K., Roser, K., Copie-Bergman, C., Wlodarska, I., Marynen, P., Hagemeyer, A., Gaulard, P., Loning, T., Hossfeld, D.K. & Dierlamm, J. (2003) Translocations t(11;18)(q21;q21) and t(14;18)(q32;q21) are the main chromosomal abnormalities involving MLT/MALT1 in MALT lymphomas. *Leukemia*, **17**, 2225-2229.
- Murga Penas, E.M., Kawadler, H., Siebert, R., Frank, M., Ye, H., Hinz, K., Becher, C., Hummel, M., Barth, T.F., Bokemeyer, C., Stein, H., Trumper, L., Moller, P., Marynen, P., Du, M.Q., Yang, X., Hansmann, M.L. & Dierlamm, J. (2006) A novel fusion of the MALT1 gene and the microtubule-associated protein 4 (MAP4) gene occurs in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 863-873.
- Musshoff, K. (1977) [Clinical staging classification of non-Hodgkin's lymphomas (author's transl)]. *Strahlentherapie*, **153**, 218-221.
- Nakagawa, M., Hosokawa, Y., Yonezumi, M., Izumiyama, K., Suzuki, R., Tsuzuki, S., Asaka, M. & Seto, M. (2005) MALT1 contains nuclear export signals and regulates cytoplasmic localization of BCL10. *Blood*, **106**, 4210-4216.
- Ngan, B.Y., Chen-Levy, Z., Weiss, L.M., Warnke, R.A. & Cleary, M.L. (1988) Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *N Engl J Med*, **318**, 1638-1644.
- Ott, G., Kalla, J., Steinhoff, A., Rosenwald, A., Katzenberger, T., Roblick, U., Ott,

- M.M. & Muller-Hermelink, H.K. (1998) Trisomy 3 is not a common feature in malignant lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Pathol*, **153**, 689-694.
- Ott, G., Katzenberger, T., Greiner, A., Kalla, J., Rosenwald, A., Heinrich, U., Ott, M.M. & Muller-Hermelink, H.K. (1997) 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*, **57**, 3944-3948.
- Pan, L., Diss, T.C., Cunningham, D. & Isaacson, P.G. (1989) The bcl-2 gene in primary B cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). *Am J Pathol*, **135**, 7-11.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J.H. & Friedman, G.D. (1994) Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med*, **330**, 1267-1271.
- Rao, P.H., Houldsworth, J., Dyomina, K., Parsa, N.Z., Cigudosa, J.C., Louie, D.C., Popplewell, L., Offit, K., Jhanwar, S.C. & Chaganti, R.S. (1998) Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **92**, 234-240.
- Remstein, E.D., James, C.D. & Kurtin, P.J. (2000) Incidence and subtype specificity of API2-MALT1 fusion translocations in extranodal, nodal, and splenic marginal zone lymphomas. *Am J Pathol*, **156**, 1183-1188.
- Rosenwald, A., Ott, G., Stilgenbauer, S., Kalla, J., Brecht, M., Katzenberger, T., Greiner, A., Ott, M.M., Gawin, B., Dohner, H. & Muller-Hermelink, H.K. (1999) Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas. *Am J Pathol*, **155**, 1817-1821.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., Gascoyne, R.D., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Giltnane, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Powell, J., Duffey, P.L., Longo, D.L., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Grogan, T.M., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T. & Staudt, L.M. (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, **346**, 1937-1947.
- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J*, **16**, 6914-6925.
- Ruefli-Brasse, A.A., French, D.M. & Dixit, V.M. (2003) Regulation of NF-kappaB-

- dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science*, **302**, 1581-1584.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Ney York.
- Sanchez-Izquierdo, D., Buchonnet, G., Siebert, R., Gascoyne, R.D., Climent, J., Karran, L., Marin, M., Blesa, D., Horsman, D., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Albertson, D.G., Du, M.Q., Ye, H., Marynen, P., Garcia-Conde, J., Pinkel, D., Dyer, M.J. & Martinez-Climent, J.A. (2003) MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, **101**, 4539-4546.
- Santos, A.C., Yamaoka, Y., Graham, D.Y. & Sepulveda, A.R. (1999) Variability in the interpretation of microsatellite patterns with different electrophoretic conditions. *Mol Pathol*, **52**, 302-304.
- Sato, Y., Akiyama, Y., Tanizawa, T., Shibata, T., Saito, K., Mori, S., Kamiyama, R. & Yuasa, Y. (2001) Molecular characterization of the genomic breakpoint junction in the t(11;18) (q21;q21) translocation of a gastric MALT lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 301-306.
- Satterwhite, E., Sonoki, T., Willis, T.G., Harder, L., Nowak, R., Arriola, E.L., Liu, H., Price, H.P., Gesk, S., Steinemann, D., Schlegelberger, B., Oscier, D.G., Siebert, R., Tucker, P.W. & Dyer, M.J. (2001) The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood*, **98**, 3413-3420.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y. (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1455-1459.
- Soussi, T., Legros, Y., Lubin, R., Ory, K. & Schlichtholz, B. (1994) Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer*, **57**, 1-9.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Lin, J.H., Poyet, J.L., Fernandes-Alnemri, T., Tschlis, P.N. & Alnemri, E.S. (1999) CLAP, a novel caspase recruitment domain-containing protein in the tumor necrosis factor receptor pathway, regulates NF-kappaB activation and apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 17946-17954.
- Starostik, P., Patzner, J., Greiner, A., Schwarz, S., Kalla, J., Ott, G. & Muller-Hermelink, H.K. (2002) Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. *Blood*, **99**, 3-9.
- Stoffel, A. & Le Beau, M.M. (2001) The API2/MALT1 fusion product may lead to germinal center B cell lymphomas by suppression of apoptosis. *Hum Hered*, **51**, 1-7.
- Stoffel, A. & Levine, A.J. (2004) Actvation of NF-kappaB by the API2/MALT1 fusions

- inhibits p53 dependant but not FAS induced apoptosis: a directional link between NF-kappaB and p53. *Cell Cycle*, **3**, 1017-1020.
- Streubel, B., Lamprecht, A., Dierlamm, J., Cerroni, L., Stolte, M., Ott, G., Raderer, M. & Chott, A. (2003) T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood*, **101**, 2335-2339.
- Streubel, B., Seitz, G., Stolte, M., Birner, P., Chott, A. & Raderer, M. (2006) MALT lymphoma-associated genetic aberrations occur at different frequencies in primary and secondary intestinal MALT lymphomas. *Gut*.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. & Croce, C.M. (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, **226**, 1097-1099.
- Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C.M. (1985) The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*, **229**, 1390-1393.
- Tyagi, D., Sharma, B.S., Gupta, S.K., Kaul, D., Vasishta, R.K. & Khosla, V.K. (2002) Expression of Bcl2 proto-oncogene in primary tumors of the central nervous system. *Neurol India*, **50**, 290-294.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V. & Dixit, V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell*, **6**, 961-967.
- Wagener, C. (1999) *Molekulare Onkologie- Entstehung und Progression maligner Tumoren*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Weiss, L.M., Warnke, R.A., Sklar, J. & Cleary, M.L. (1987) Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med*, **317**, 1185-1189.
- Willis, T.G., Jadayel, D.M., Du, M.Q., Peng, H., Perry, A.R., Abdul-Rauf, M., Price, H., Karran, L., Majekodunmi, O., Wlodarska, I., Pan, L., Crook, T., Hamoudi, R., Isaacson, P.G. & Dyer, M.J. (1999) Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell*, **96**, 35-45.
- Wotherspoon, A.C., Doglioni, C., Diss, T.C., Pan, L., Moschini, A., de Boni, M. & Isaacson, P.G. (1993) Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*, **342**, 575-577.
- Wotherspoon, A.C., Ortiz-Hidalgo, C., Falzon, M.R. & Isaacson, P.G. (1991) *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet*, **338**, 1175-1176.

- Wotherspoon, A.C., Pan, L.X., Diss, T.C. & Isaacson, P.G. (1992) Cytogenetic study of B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer Genet Cytogenet*, **58**, 35-38.
- Yan, M., Lee, J., Schilbach, S., Goddard, A. & Dixit, V. (1999) mE10, a novel caspase recruitment domain-containing proapoptotic molecule. *J Biol Chem*, **274**, 10287-10292.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. & Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.
- Ye, H., Gong, L., Liu, H., Hamoudi, R.A., Shirali, S., Ho, L., Chott, A., Streubel, B., Siebert, R., Gesk, S., Martin-Subero, J.I., Radford, J.A., Banerjee, S., Nicholson, A.G., Ranaldi, R., Remstein, E.D., Gao, Z., Zheng, J., Isaacson, P.G., Dogan, A. & Du, M.Q. (2005) MALT lymphoma with t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1 is characterized by strong cytoplasmic MALT1 and BCL10 expression. *J Pathol*, **205**, 293-301.
- Yunis, J.J., Frizzera, G., Oken, M.M., McKenna, J., Theologides, A. & Arnesen, M. (1987) Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med*, **316**, 79-84.
- Yunis, J.J., Oken, M.M., Kaplan, M.E., Ensrud, K.M., Howe, R.R. & Theologides, A. (1982) Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, **307**, 1231-1236.
- Zhang, Q., Siebert, R., Yan, M., Hinzmann, B., Cui, X., Xue, L., Rakestraw, K.M., Naeve, C.W., Beckmann, G., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Nowotny, H., Vesely, M., Callet-Bauchu, E., Salles, G., Dixit, V.M., Rosenthal, A., Schlegelberger, B. & Morris, S.W. (1999) Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet*, **22**, 63-68.

## **Danksagung**

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde am Institut für Pathologie der Universität Würzburg (Vorstand: Professor Dr. H.K. Müller-Hermelink) unter der Leitung von Herrn Starostik durchgeführt.

Mein größter Dank gilt ihm, für seine guten Ideen, die geduldige Betreuung und die Fortführung der Betreuung auch nach Beendigung seines Arbeitsverhältnisses am Pathologischen Institut der Universität Würzburg. Seinem Engagement ist es zu verdanken, dass die Promotionsarbeit durch Korrekturen und Verbesserungsvorschläge nun nach langer Zeit beendet wurde.

Des weiteren möchte ich mich bei dem Laborteam um Frau Bonengel, Edda, Claudia und Herrn Schmidt bedanken, welche mir durch ihre freundliche und unkomplizierte Art die Versuchsarbeiten und die Ergebnisauswertung erleichtert haben und bei Problemen jederzeit tatkräftig zur Seite standen.

Ganz besonders möchte ich meiner Frau Caroline für ihre langjährige liebevolle Unterstützung, ihre Motivationspritzen und der Hilfe bei der Formatierung der Arbeit danken. Großer Dank gilt zuletzt auch meinen Eltern, welche mir das Medizinstudium ermöglicht und mich hierbei viele Jahre nicht nur finanziell unterstützt haben.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Alexander Karl-Heinz Kraus  
Geburtsdatum: 30.11.1975  
Geburtsort: Weiden in der Oberpfalz  
Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Caroline Kraus, geb. Gregor;  
Sohn Lukas Sebastian  
Wohnort: Bruderwöhrdstr. 10, D-93055 Regensburg  
Eltern: Wilhelm Kraus; keramischer Diplom-Ingenieur  
Christa Kraus; Erzieherin

## Schulische Ausbildung

09/ 1982-07/ 1986 Pestalozzi-Grundschule, Weiden  
09/ 1986-06/ 1995 Kepler-Gymnasium Weiden mit Abschluss Abitur

## Wehrdienst

07/ 1995-04/ 1996 Sanitätssoldat in Feldkirchen bei Straubing

## Berufliche Ausbildung

05/ 1996-11/ 2002 Studium der Humanmedizin an der Julius- Maximilians-  
Universität Würzburg  
03/ 1998 Ärztliche Vorprüfung  
03/ 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
09/ 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/ 2001-09/ 2002 Praktisches Jahr in Würzburg; Brixen, Bruneck (Südtirol)  
und Aarau (Schweiz)  
11/ 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
01/ 2003-07/ 2004 Arzt im Praktikum im Caritas-Krankenhaus St. Josef in  
Regensburg; Klinik für Chirurgie (Prof. Dr. R. P.  
Wirsching)  
10/ 2004-09/ 2006 Assistenzarzt im Kreiskrankenhaus Kelheim; Abteilung  
für Allgemein- und Unfallchirurgie (Dr. B. Obermeier)  
seit 10/ 2006 Assistenzarzt Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in  
Regensburg; Klinik für Allgemein-, Viszeral- und  
Thoraxchirurgie (Prof. Dr. J. Dobroschke/ PD Dr. B. Sido,  
Prof. Dr. H. S. Hofmann)