

**Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg**

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

Genetische Aberrationen von Enteropathie-Typ T-Zell-Lymphomen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Anne Katrin Baumgärtner

aus Glattbach

Würzburg, Mai 2004

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

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. G. Ott

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 21.7.2004

Die Promovendin ist Ärztin.

1	Einleitung	1
1.1	Einordnung und Charakteristika von ETL	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit	3
2	Material und Methoden	5
2.1	Untersuchungsmaterial	5
2.2	Untersuchungsmethoden	7
2.2.1	Mikrodissektion	7
2.2.2	Extraktion genomischer DNA	7
2.2.3	Kontrolle der Klonalität von Tumor- und Kontrollgewebe	8
2.2.4	Mikrosatellitenanalyse	11
2.2.4.1	Auswahl der Mikrosatellitenmarker	11
2.2.4.2	Polymerasekettenreaktion	13
2.2.4.3	Polyacrylamidgelelektrophorese	14
2.2.4.4	Analyse der Elektrophorese	15
3	Ergebnisse	17
3.1	Häufiges Vorkommen genomischer Aberrationen bei ETL	17
3.2	Amplifikation von 9q34 und Deletion von 17q23-25 als die häufigsten allelischen Imbalancen	21
3.3	Zwei Gruppen von ETL mit charakteristischen Aberrationen	23
3.4	Spezifische und häufigere allelische Imbalancen bei ETL mit monoallelischer Umlagerung für das T-Zell-Rezeptor- γ -Gen	24

3.5	Selteneres Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität bei ETL	26
3.6	Unterschiede im Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität in Abhängigkeit	28
	Abhängigkeit von der Expression des Markers CD56	
4	Diskussion	31
4.1	Allelische Imbalancen in der Region 9q34	31
4.2	Allelische Imbalancen in der Region 17q23-25	33
4.3	LOH im p53-Locus	34
4.4	Weitere häufige allelische Imbalancen	35
4.5	Zwei unterschiedliche Wege in der ETL-Pathogenese	36
4.6	Zusammenhang zwischen der Umlagerung des T-Zell-Rezeptor- γ -Gens	37
	und den allelischen Imbalancen	
4.7	Untergeordnete Bedeutung von MSI für die Pathogenese der ETL	38
4.8	Erste Hinweise auf Unterschiede zwischen CD56+ und CD56-ETL auf	40
	molekularer Ebene	
5	Zusammenfassung	42
6	Abkürzungen	44
7	Literaturverzeichnis	46

1 Einleitung

1.1 Einordnung und Charakteristika von ETL

Im Jahr 1937 berichteten Fairley und Mackie erstmals über einen Zusammenhang von Malabsorption und intestinalen Lymphomen. [1] Es stellte sich in der Folgezeit heraus, dass diese Lymphome nicht wie zunächst angenommen die Ursache für die Malabsorption waren, sondern im Gegenteil als Komplikation einer Malabsorption vom Typ der Zöliakie/Sprue auftraten [2] und eine eigene Entität darstellten, welche Isaacson und Wright 1978 als „maligne Histiocytose des Darmes“ beschrieben. [3, 4] In späteren Studien konnte die Herkunft der Tumoren von T-Lymphozyten nachgewiesen werden, was zur Bezeichnung „Enteropathieassoziierte T-Zell-Lymphome“ führte. [5, 6] Die REAL Klassifikation (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms) [7] ordnet diese Tumoren in die Gruppe der T-Zell- und NK-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) als „intestinale T-Zell-Lymphome mit/ohne Enteropathie“ ein. In der WHO-Klassifikation [8] werden sie als „Enteropathie-Typ T-Zell-Lymphome“ (ETL) aufgeführt.

Insgesamt sind ETL sehr seltene Lymphome und kommen lediglich in Gebieten mit hoher Prävalenz an Sprue häufiger vor. [8] In einer Untersuchung von 1378 NHL der International Lymphoma Study Group betrug ihre Häufigkeit weniger als 1%. [9] ETL treten zumeist in Jejunum oder Ileum auf, können aber auch sehr selten an anderen Stellen des Verdauungstraktes oder extraintestinal gefunden werden. [8, 10]

Klinisch imponieren ETL in Form von abdominellen Schmerzen, Gewichtsverlust, Diarrhoe und Erbrechen oder rufen mit Ileus, gastrointestinalen Blutungen oder Darmperforation akute Notfallsituationen hervor. [11, 12] Nur in wenigen Fällen weisen die Patienten die Anamnese einer klassischen Zöliakie seit dem Kindesalter auf, was wohl auf die lymphompräventive Wirkung der glutenfreien Diät zurückzuführen ist. [13] Meist besteht erst seit kurzer Zeit eine Sprue oder wird diese zeitgleich mit dem Lymphom diagnostiziert. [8]

ETL werden nach der modifizierten Ann-Arbor-Klassifikation nach Musshoff in die Stadien EI bis EIV eingeteilt. [14] Ihre Ausbreitung erfolgt zu den mesenterialen Lymphknoten, zu Leber, Milz, Knochenmark, Lunge und Haut. [10] Meistens treten ETL zwischen der 5. und 7. Lebensdekade auf, etwas häufiger bei Männern. [12] Die Prognose der Erkrankung ist ausgesprochen ungünstig, was wohl zum Teil durch die oft

späte Diagnosestellung und den lymphombedingten schlechten Allgemein- und Ernährungszustand der Patienten verursacht wird. In einer Untersuchung über 31 Patienten mit ETL fanden sich 1- und 5-Jahresüberlebensraten von 38.7% bzw. 19.7% mit rezidivfreiem 1-/5-Jahresüberleben von 19.4% und 3.2%. 84% der Patienten starben, und zwar alle infolge von Tumorprogression oder aufgrund von Krankheits- oder Therapiekomplicationen.[11]

Makroskopisch wachsen die Tumoren in der Wand von multiplen, meist multifokalen, z.T. perforierenden Ulcera; seltener kommen exophytische Wachstumsformen vor.

Die Darmschleimhaut zeigt enteropathietypische Veränderungen unterschiedlichen Ausprägungsgrades mit Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie und Vermehrung von Lymphozyten und Plasmazellen in der lamina propria sowie intraepithelialer Lymphozytose. Das histologische und zytologische Erscheinungsbild der Lymphome variiert stark: Bei einer Gruppe von Tumoren kommen monomorphe mittelgroße bis große Tumorzellen mit vesikulären Kernen, prominenten Nukleolen und schwach anfärbbarem Zytoplasma vor. Andere Tumoren weisen pleomorphe vielkernige Tumorzellen auf und erinnern an das Erscheinungsbild anaplastisch großzelliger Lymphome. Eine weitere Gruppe von ETL zeigt kleine monomorphe Tumorzellen mit dunkel anfärbbaren Kernen und schmalem Zytoplasma. [8, 10, 12, 13]

Immunophänotypisch finden sich bei den Tumorzellen unterschiedliche Muster: Meist sind die Tumorzellen CD3+, CD5-, CD7+, CD8-/+, CD4-, CD103+ und variabel CD30+. [8, 12, 15-17] Außerdem werden zytotoxische-Granula-assoziierte Proteine exprimiert. [18] Die Tumorzellen der monomorphen kleinzelligen Untergruppe sind zumeist CD8+ und CD56+. [19]

Untersucht man die Umlagerung der Gene für den T-Zell-Rezeptor β und γ bei den Tumoren, so zeigen ETL wie andere T-Zell-Lymphome ein klonales Rearrangement. [5, 17, 20, 21]

Die Mehrzahl von ETL-Patienten weist den für Sprue charakteristischen Genotyp HLA DQA1*0501, DQB1*0201 auf, was zeigt, dass beide Erkrankungen vor dem gleichen genetischen Hintergrund entstehen. [22] Als Vorläuferläsionen von ETL sind refraktäre Sprue, dh. das primäre oder sekundäre Nichtansprechen der klinischen Symptome und pathologisch-anatomischen Befunde eines Patienten auf eine glutenfreie Diät [23], und ulcerative Jejunitis, welche durch chronische benigne erscheinende Dünndarmulcera charakterisiert ist [10, 12, 24], anzusehen. Verschiedene Studien konnten in der

Darmschleimhaut von Patienten dieser Erkrankungen und in der angrenzenden Mucosa von ETL intraepitheliale T-Lymphozyten mit abnormem Immunphänotyp und monoklonaler Umlagerung der T-Zell-Rezeptorgene β und γ nachweisen. [17, 20, 21, 25] Diese Befunde entsprechen denen, die sich bei den neoplastischen Zellen der ETL ergeben. Wie Sequenzanalysen zeigen konnten, setzen sich ETL, die sich auf dem Boden der Vorläuferläsionen entwickeln, aus immunphänotypisch aberranten klonalen intraepithelialen T-Zellen zusammen, welche identisch mit denen der Vorläuferläsionen sind. [21, 26] Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die refraktäre Sprue mit Nachweis von immunphänotypisch aberranten klonalen T-Zellen als Übergangsform im Sinne eines kryptischen low grade Lymphoms zwischen unkomplizierter Sprue und hochaggressivem ETL anzusehen ist. [26-28]

Es ist also vorstellbar, wie sich unter lang bestehendem und wiederholtem Antigenstimulus durch Gluten aus dem reaktiven T-Zellinfiltrat ein neoplastischer T-Zellklon herausbildet und schließlich ein hochmalignes ETL entwickelt. Angesichts der Tatsache, dass jedoch bei manchen Patienten, die abnorme intraepitheliale T-Zellen aufweisen, nie oder erst spät ein ETL auftritt, sind für diesen Übergang weitere sekundäre genetische Aberrationen anzunehmen. [12, 28-30]

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Man nimmt an, dass genomische Instabilität eine wichtige Eigenschaft maligner Tumoren darstellt, welche ihnen ermöglicht, sich durch Selektion der Kontrolle ihres Wachstums und ihrer Ausbreitung zu entziehen. Spezifische Amplifikationen, Deletionen, Translokationen oder numerische Aberrationen, die sich bei malignen Zellen und Geweben nachweisen lassen, werden als Anzeichen solcher genomischer Instabilität betrachtet.

Nach Kinzler und Vogelstein unterscheidet man zwei klassische Tumorprogressionswege: „mutator“ und „suppressor pathway“. Im ersten Fall bewirkt der Ausfall sogenannter caretaker Gene, welche im gesunden Gewebe als DNA-mismatch-repair-Gene für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich sind, zahlreiche weitere Mutationen. Dieser Weg wird z.B. bei der Entstehung von Kolonkarzinomen beim hereditären, nichtpolypösen Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) beschritten. Beim Tumorsuppressorweg hingegen kommt es infolge der

Inaktivierung von gatekeeper Genen (z.B. Rb oder p53), welche für Proliferationsstillstand und Apoptose von Zellen mit irreparablen DNA-Schäden sorgen, zu unkontrollierter Zellproliferation. Fällt die Kontrolle durch solche Reparatur- und Tumorsuppressorgene weg, so kann die mutierte Zelle den Zellzyklus ungehindert fortsetzen und dabei weitere genomische Aberrationen anhäufen, die ihr Überlebensvorteile gegenüber normalen Zellen, deren Proliferation streng reguliert wird, sichert. [31, 32]

Über die Charakteristika von ETL auf genomischer Ebene besteht noch keine ausreichende Erkenntnis, da diese Lymphome bislang kaum zytogenetisch oder molekulargenetisch untersucht wurden. Es existieren lediglich Einzelfallbeschreibungen [33-35] und eine systematische CGH-Übersichtsarbeit von Zettl et al. mit 44 Fällen, welche 12 der in der vorliegenden Arbeit analysierten Fälle einschloss. [36] Hier stellte sich die Amplifikation der Region 9q33-34, welche bei 58% der Lymphome gefunden wurde, als für die ETL charakteristische chromosomale Aberration heraus. Weitere häufige Zugewinne zeigten sich auf 7q (24%), 5q (18%) und 1q (16%). Den höchsten Anteil von Verlusten wies die Region 8p und 13q mit Deletionen in je 24% der Fälle auf. Interessanterweise ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Aberrationen und der Überlebensdauer der Patienten nachweisen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, anhand der molekulargenetischen Methode der Mikrosatellitenanalyse erste Einsichten in genetische Veränderungen direkt auf DNA-Ebene zu gewinnen, mögliche typische Aberrationen zu finden und über den Vergleich mit klinischen und immunhistochemischen Daten den Wert dieser Aberrationen als prognostische Marker für den Krankheitsverlauf zu beurteilen und Hinweise auf potentielle Entstehungswege von ETL zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Es wurde Tumor-DNA von 26 ETL aus Material des Zentrums für Lymphknotenpathologie des Pathologischen Institutes der Universität Würzburg und des Klinischen Institutes für Pathologie am Allgemeinen Krankenhaus der Universität Wien untersucht. Beim Fall 18 wurde zusätzlich DNA eines Tumorzidives (18R) analysiert. In allen 26 Fällen wurde DNA aus formalinfixiertem Paraffinmaterial gewonnen. Als Referenzmaterial diente tumorfreie Darmschleimhaut oder Muskulatur bzw. tumorfreies Lymphknotengewebe der Patienten. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten betrug 1,4 (15 männliche und 11 weibliche Patienten). Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag zwischen 29 und 82 Jahren mit einem Durchschnittsalter von circa 60 Jahren. Bei der Untersuchung der Umlagerung der VJ-Verbindung des T-Zell-Rezeptor- γ -Gens resultierte bei 16 Tumoren ein monoallelisches Ergebnis, zehn Tumoren zeigten biallelische Umlagerung. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verfügbaren klinischen, immunhistochemischen und molekulargenetischen Daten der untersuchten Patienten.

Tabelle 1: Patientendaten

Patient	Alter	Geschlecht	Überleben	Tumorstadium	Morphologie	CD56	BF1	CD3	CD4	CD8	CD2	CD5	CD7	CD30	TIA1	TCR γ
1	64	w	KV1	NS	mono ml	+	-	+	-	+	-	-	0	0	+	BA
2	53	w	KV19	E I	pleo ml	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	MA
3	64	w	KV12	EII	pleo ml	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	MA
4	60	w	KD	KD	pleo ml	-	+	+	-	+	+	-	0	0	+	MA
5	29	m	LK72+	NS	pleo ml	-	-	+	-	-	+	-	0	0	+	MA
6	59	m	KV2	EIII	ALCL	-	-	+	-	-	-	-	0	0	+	BA
7	51	m	KV45	NS	IB	-	-	+/-	-	+	-	-	0	0	+	MA
8	53	w	NK80+	NS	pleo ml	-	-	+	-	-	0	-	0	0	+	MA
9	63	m	KV16	EIIB	mono sm	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	BA
10	66	w	NK29+	EI2	IB	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	MA
11	82	m	KV1	EIV	mono m	+	-	+	-	-	-	-	0	0	+	BA
12	63	m	KV4T	EIII	mono m	-	+	+	0	-	+	+	0	0	+	BA
13	65	w	KV15	NS	ALCL	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	MA
14	77	m	KV1	NS	IB	-	-	+	-	-	+	-	0	+	+	MA
15	51	m	KV1	EII2	pleo ml	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	MA
16	64	m	LK6	EI	mono sm	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	MA
17	61	m	KD	KD	mono sm	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	MA
18	70	m	LK87+	EI	IB	+	-	+	-	+	-	-	0	0	+	BA
18R	70	m	NK87+	EI	mono sm	+	-	+	-	+	-	-	0	-	+	BA
19	44	w	KD	KD	mono sm	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	BA
20	39	w	KV6	EIVB	unklass.	-	-	+	-	-	-	-	0	0	+	MA
21	67	m	KV2	KD	mono sm	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	BA
22	68	w	KD	NS	unklass.	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	MA
23	61	m	KV5	EIV	mono sm	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	MA
24	68	m	KV2	EIII	pleo ml	-	-	+	-	-	-	-	0	0	+	MA
25	61	m	NK27+	EIIB	mono sm	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	BA
26	50	w	NK48+	NS	pleo ml	-	+	+	-	-	-	-	0	-	-	BA

Legende: ALCL anaplastisch großzelliges Lymphom; BA biallelisches TZR-Rearrangement; IB immunoblastisch; KD keine Daten vorhanden; KV an der Krankheit verstorben in Monat x; LK lebt mit Erkrankung seit x Monaten; m männlich, MA monoallelisches TZR-Rearrangement; mono m monomorph mittelzellig; mono ml monomorph mittel-großzellig; mono sm monomorph klein-mittelzellig; NK keine Krankheitsanzeichen seit x Monaten; NS kein Staging durchgeführt; pleo ml pleomorph mittel-großzellig; T Tage; unklass. unklassifiziert; w weiblich; 0 nicht untersucht; - negativ ; + positiv.

2.2 Untersuchungsmethoden

Wie folgt beschrieben wurde aus formalinfixiertem in Paraffin eingebettetem Material genomische DNA extrahiert, die Mikrosatelliten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und die Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend analysiert.[37]

2.2.1 Mikrodissektion

In allen Fällen wurden von Tumor- und Kontrollgeweben Serien von circa fünfzehn 10 µm dicken Schnitten angefertigt. Als Orientierungshilfe für die nachfolgende Dissektion wurden der erste und letzte Schnitt einer Serie mit Hämatoxylin & Eosin (H&E) angefärbt. Die dazwischenliegenden Schnitte blieben ungefärbt. Unter dem Mikroskop wurden dann aus den ungefärbten Schnitten Areale mit hohem Tumoranteil bzw. tumorfreies Kontrollgewebe abgekratzt und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2 Extraktion genomischer DNA

Zur Entparaffinierung des gewonnenen Materials wurde in jedes Reaktionsgefäß 800 µl Xylol zugegeben, 1 min vortexiert, 5 min bei 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Darauf folgte die Zugabe von 800 µl 96% Ethanol mit anschließend 1 min Vortexieren, 5 min Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes. Das Gewebe wurde dann bei 50°C in offenen Reaktionsgefäßen im Heizblock vollständig getrocknet.

Nun folgte die DNA-Extraktion: Unter Zugabe von 300 µl Verdaupuffer wurden die Gewebeproben bei 50°C im Wasserbad mindestens 12 Stunden inkubiert.

Zusammensetzung des Verdaupuffers:

100 mM NaCl

10 mM TrisCl (pH 8)

25 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (pH 8)

0.5% Natriumdodecylsulfat (SDS)

Proteinase K (Menge je nach Bedarf)

Danach wurde 600 µl Phenolchloroform hinzugegeben, 45 sec vortexiert und 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues steriles Reaktionsgefäß übertragen und dem gleichen Vorgang noch zweimal unterzogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl Chloroform, 45 sec Vortexieren und 5 min Zentrifugieren sowie die Übertragung der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. Dazu gab man zur Fällung der DNA entsprechend 10% des Gesamtvolumens 3M NaAcetat, vortexierte und inkubierte die Proben mit 1 ml kaltem 100%igem Ethanol über 48 Stunden bei -20°C. Danach wurden die Proben 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurde nun 1 ml -20°C kalter 70%iger Ethanol hinzugefügt, welcher nach vorsichtigem Schwenken des Gefäßes und 5 min Zentrifugieren wieder entfernt wurde. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Danach ließ man die Proben zur vollständigen Entfernung des Ethanols circa 30 min bei 37°C im Heizblock bei offenem Reaktionsgefäß trocknen. Abschließend wurde die DNA in 100 µl sterilem H₂O aufgelöst.

2.2.3 Kontrolle der Klonalität von Tumor- und Kontrollgewebe

Zur Beurteilung des Tumoranteils in der extrahierten DNA des Tumors sowie der Tumorfreiheit der DNA des Kontrollgewebes wurde jede extrahierte DNA-Probe der Untersuchung auf Klonalität der Umlagerung der VJ-Verbindung des T-Zell-Rezeptor- γ -Gens mittels PCR unterzogen und das Produkt anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. [38]

Für die PCR wurden acht Primer mit folgenden Sequenzen verwendet:

V2: 5'CTT CCT GCA GAT GAC TCC TAC AAC TCC AAG GTT G 3'

V3: 5'CTT CCT GCA GAT GAC GTC TCC ACC GCA AGG GAT G 3'

V4: 5' CTT CCT GCA GAT GAC TCC TAC ACC TCC AGC GTT G 3'

V8: 5' CTT CCT GCA GAT GAC TCC TAC AAC TCC AGG GTT G 3'

V9: 5' GG (A/G/C/T) ACT GCA GGA AAG GAA TCT GGC ATT CCG 3'

JGT3- FAM-markiert: 5' AGT TAC TAT GAG C(T/C)T AGT CCC 3'

JGT4- FAM-markiert: 5' TGT AAT GAT AAG CTT TGT TCC 3'

JGT12- FAM-markiert: 5' AAG TGT TGT TCC ACT GCC AAA 3'

Nach 20-minütiger Bestrahlung der PCR-Utensilien mit UV-Licht wurde die PCR folgendermaßen durchgeführt: In ein PCR-Reaktionsgefäß wurden 20 µl dieses Ansatzes gegeben:

18 µl Mastermix, bestehend aus:
 2 µl 10x PCR-Puffer II (100mM Tris-Hcl, pH 8.3, 500mM KCl)
 3,6 µl MgCl₂ (25mM)
 2,5 µl dNTPs (1,25 mM)
 0,12 µl AmpliTaqGold Polymerase (5U/µl)
 1,6 µl des Primergemisches aus allen acht Primern (6,25 pmol/µl)
 bis 18 µl Gesamtvolumen autoklaviertes destilliertes Wasser
 plus
 2 µl DNA (pro Gewebe in drei Verdünnungen 1/3, 1/6, 1/12)

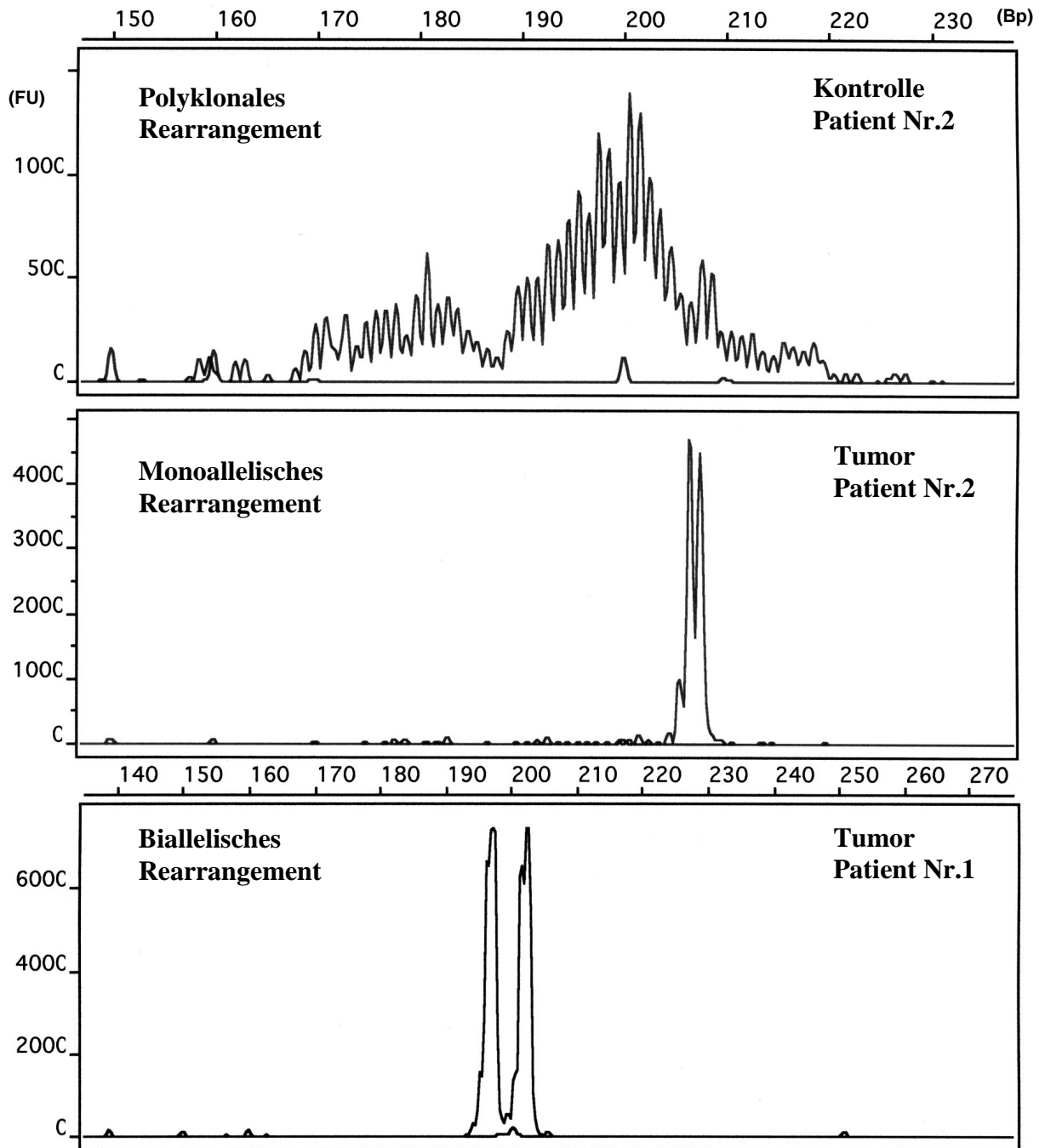
Zur Ermittlung der Verdünnungen der DNA-Gebrauchslösungen für die PCR-Reaktionen mit den Mikrosatellitenmarkern wurde vom Tumor- und Referenzgewebe jedes Patienten DNA in jeweils drei Verdünnungen mit Wasser eingesetzt: 1/3, 1/6, und 1/12 verdünnt. Als monoklonale Kontrolle diente DNA der Jurkatzelllinie (150 ng pro Ansatz), als Negativkontrolle wurde autoklaviertes destilliertes Wasser eingesetzt. Die PCR-Proben wurden daraufhin in einem „Primus 96^{plus}“ Thermocycler (MWG Biotech, München) nach folgendem Schema amplifiziert:

Hotstart	13 min bei 95°C
10 Zyklen	30 sec bei 95°C (Denaturierung) 1 min bei 56°C (Annealing) 1 min bei 72°C (Extension)
20 Zyklen	30 sec bei 91°C (Denaturierung) 1 min bei 56°C (Annealing) 1 min bei 72°C (Extension)
Ende	10 min bei 72°C, dann Herunterkühlen auf 4°C

Alle PCR-Produkte wurden auf einem formamidhaltigen (28,8%) 4,5%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des Programmes ABI GeneScanTM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert. Beim Auftreten einer einzelnen dominanten Bande wurde die Probe als monoallelisch bewertet, bei zwei dominanten Banden als biallelisch und bei drei bis acht isolierten Banden als oligoklonal; hierbei galten Banden als dominant, wenn sie mindestens dreimal so groß waren wie die größte Bande des polyklonalen Hintergrundes. Traten mehr als acht Banden im Sinne einer Gaußschen Normalverteilung auf, so wertete man die Probe als

polyklonal. Auf diese Weise wurden Klonalität von Tumor-DNA bzw. Polyklonalität der Kontroll-DNA bestätigt. Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für die Untersuchung der Umlagerung des T-Zell-Rezeptor- γ -Gens bei zwei Patienten.

Abbildung 1: Beispiele für die Analyse der Umlagerung des T-Zell-Rezeptor- γ -Gens mittels PCR



2.2.4 Mikrosatellitenanalyse

Mikrosatelliten sind kurze, repetitive DNA-Abschnitte, welche sich über das gesamte menschliche Genom verteilt finden. Polymorph bezüglich ihrer Länge werden sie stabil an die Nachkommen weitervererbt. [39, 40] Da die Anzahl der repetitiven Einheiten eines bestimmten Mikrosatelliten in allen Körperzellen eines Individuums identisch ist, können Mikrosatelliten zur Erforschung genomischer Aberrationen in Tumorzellen herangezogen werden. Mutationen in Folge von DNA-Reparaturdefekten, wie sie für den mutator pathway typisch sind, führen zum Phänomen der Mikrosatelliteninstabilität (MSI), dh. dem Auftreten zusätzlicher Allele in einem Locus. Außerdem lassen sich Amplifikationen und Deletionen an einem gegebenen Genort mit Hilfe dieser Methode entdecken. Da nämlich die Deletion eines Genortes auch zu Verlust der benachbarten Mikrosatelliten führt, lässt sich über das Auftreten von LOH (loss of heterozygosity, Verlust der Heterozygotie) in Mikrosatelliten einer Region auf die Deletion eines dort lokalisierten Tumorsuppressorgens rückschließen.

2.2.4.1 Auswahl der Mikrosatellitenmarker

In dieser Arbeit wurde DNA von 26 ETL mit 47 Mikrosatellitenmarkern aus Regionen bekannter oder vermuteter Tumorsuppressor- und Protoonkogene auf das Vorhandensein von Amplifikationen, LOH oder Mikrosatelliteninstabilität (MSI) untersucht. Die Auswahl der Marker richtete sich dabei auch nach der CGH-Studie von Zettl et al. [36]

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Mikrosatellitenmarker mit Bezeichnung, Lokalisation, Produktgröße, Fluoreszenzmarkierung, Menge für die PCR und Annealing-Temperatur. Dabei beruhen die Angaben zur Lokalisation der Mikrosatelliten auf den Daten des Sanger Institutes (<http://www.sanger.ac.uk>). Die letzten drei aufgeführten Marker dienten auch als Standardmarker zur Unterscheidung zwischen LOH und Amplifikation. Je einer der Primer eines Paares war mit einem der fluoreszierenden Phosphoramide FAM (blau), HEX (grün), NED/TAMRA (beide gelb) oder ROX (rot) am 5'-Ende markiert. Die Primersequenzen für die Mikrosatellitenanalyse wurden der Genome Database (GDB, <http://gdbwww.gdb.org>, Stand: Januar 2002) entnommen. Die Synthese der FAM-, HEX-, TAMRA- und ROX-markierten Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech (München) und die der NED-markierten durch Applied Biosystems (Weiterstadt).

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Mikrosatellitenmarker

Marker	Locus	Produktgröße (in Bp)	Fluoreszenzmarkierung	Primermenge pro Reaktion (in pmol)	Annealing-Temperatur (in °C)
D1 S468	1p36	193-213	HEX	25	59
D1 S214	1p36	120	FAM	25	62
D1 S237	1q41	172-192	FAM	7,5	60
D1 S2827	1q41	142	HEX	12,5	60
D3 S4103	3p14.2	115-185	NED	20	60
D3 S1300	3p14.2	217-241	FAM	7,5	60
D3 S1261	3p14.1	185	FAM	15	60
D3 S1530	3q27.2	250	FAM	3	62
D3 S1262	3q27.2	90-120	HEX	25	58
D5 S82	5q21.1	138-180	FAM	15	58
D5 S346	5q21.1	96-122	HEX	6	56
D5 S422	5q33.3-34	114	FAM	10	62
D5 S498	5q33.3-34	188	FAM	10	62
D6 S470	6p24	135	NED	25	58
D6 S1721	6p24	253-267	FAM	10	60
D6 S447	6q21	201-211	FAM	3	58
D6 S310	6q24.1	159-183	FAM	4	62
D6 S441	6q25.2	162-186	HEX	12,5	60
D7 S507	7p21	148-168	FAM	25	58
D7 S493	7p21	194-239	HEX	25	59
D7 S501	7q31	163-197	HEX	25	56-62
D7 S486	7q31	114-146	HEX	5	60
D8 S1820	8p21	103	HEX	10,5	58
D8 S1734	8p21	114	FAM	6	58
D8 S1712	8q24	211	HEX	10	59
D8 S1836	8q24	137	HEX	25	62
D9 S2136	9p21	130-150	FAM	10	60
D9 S1748	9p21	130-150	HEX	15	58
D9 S290	9q34	156	HEX	10	59
D9 S1847	9q34	193	HEX	15	59
D11 S1356	11q23	193-213	FAM	5	60
D11 S925	11q23	173	FAM	25	62
D13 S153	13q14.2	212-236	NED	11	60
D13 S319	13q14.2	168-182	TAMRA	15	60
D16 S3070	16p13	161	FAM	15	62
D16 S3114	16p13	164	FAM	25	62
p53p	17p13.1	130	HEX	25	60
TP53CA	17p13.1	103-135	FAM	4	62
D17 S939	17q23-25	213	FAM	15	55-59
D17 S784	17q23-25	226	FAM	15	59
D17 S785	17q23-25	181-207	HEX	25	61
D18 S474	18q21-23	119-139	FAM	2,5	60
D18 S497	18q21-23	120-150	HEX	10	62
D18 S462	18q21-23	170-200	FAM	15	62
D15 S114	15q24.3	177-187	ROX	25	56-62
D15 S231	15q13.3	102-114	ROX	4	56-62
FGA	4q28	256-284	ROX	25	56-62

2.2.4.2 Polymerasekettenreaktion

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die Mikrosatelliten unter Verwendung der angeführten Primer aus der extrahierten DNA amplifiziert: Nach Bestrahlung der notwendigen Utensilien mit UV-Licht für 20 min wurde die PCR wie folgt durchgeführt: In ein Reaktionsgefäß wurden 20µl diesen Ansatzes gegeben:

1 µl Patienten-DNA (Konzentration der Gebrauchslösung durch die TCRγ-Reaktionen ermittelt)

plus

19 µl Mastermix, bestehend aus:

2 µl 10x PCR-Puffer II (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl)

3,6 µl MgCl₂ (25mM)

2,5 µl dNTPs (1,25mM)

0,12 µl AmpliTaq Gold PolymeraseTM (5U/µl)

je x µl Primer (3´ und 5´ Primer, individuelle Menge siehe Tabelle)

zu 19 µl Gesamtvolumen autoklaviertes destilliertes Wasser

Die PCR-Proben wurden dann einzeln oder als Multiplex-Reaktionen, worunter man den Einsatz von mehr als einem Primerpaar im selben Reaktionsgefäß versteht, in einem „Primus 96^{plus}“ Thermocycler (MWG Biotech, München) nach folgendem Schema amplifiziert:

Hotstart	13 min bei 95°C
10 Zyklen	30 sec bei 95°C (Denaturierung) 1 min bei spezifischer Annealingtemperatur 1 min bei 72°C (Extension)
20 Zyklen	30 sec bei 91°C (Denaturierung) 1 min bei spezifischer Annealingtemperatur 1 min bei 72°C (Extension)
Ende	10 min bei 72°C, dann Herunterkühlen auf 4°C

Bei Proben, die sich unter diesen Bedingungen nicht oder nur schlecht amplifizieren ließen, wurde nachfolgendes Programm verwendet:

Hotstart	13 min bei 95°C
15 Zyklen	30 sec bei 95°C (Denaturierung) 2 min bei spezifischer Annealingtemperatur 2 min bei 72°C (Extension)
20 Zyklen	30 sec bei 91°C (Denaturierung) 2 min bei spezifischer Annealingtemperatur 2 min bei 72°C (Extension)
Ende	30 min bei 72°C, dann Herunterkühlen auf 4°C

2.2.4.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 4.5%igen Polyacrylamidgel im ABI-Prism-DNA-Sequencer.

Ein solches Gel setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen: [41]

18 g Harnstoff

20 ml Aqua dest.

10 ml 5xTBE (540 mg Tris, 265 mg Borat, 41,5 EDTA plus zu 10 ml autoklaviertes Aqua dest.)

5,625 ml Acrylamidlösung 40% (29:1)

Dazu wurden unmittelbar vor dem Gießen des Gels

250 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat)

plus

30 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

hinzugegeben.

Zur besseren Auftrennung bei Produkten, die größer als 100 Basenpaare waren, wurde ein formamidhaltiges (28,8%) 4,5%iges Polyacrylamidgel folgender Zusammensetzung verwendet: [41]

13,4 g Harnstoff

4,5 ml Aqua dest.

8 ml 5xTBE

12,8 ml Formamid

1 g Amberlite Ionenaustauscher

5 ml Acrylamidlösung 40% (29:1)

Unmittelbar vor dem Gelgießen wurden

300 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat)

plus

30 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

hinzugefügt.

Zur Vorbereitung auf den Gellauf wurden die Probenmixe 7 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eiswasser abgekühlt. Aufgetragen wurden 1,3 µl des Probenmixes, bestehend aus:

2 µl PCRprodukt

plus

3 µl Laufpufferlösung:

2,1 µl Formamid

0,2 µl Größenstandard "ROX 350"

0,7 µl Blue Dextran Puffer

Ein Gellauf dauerte circa 3,5 Stunden bei 51°C, 3000 V, 60mA und 200 W.

2.2.4.4 Analyse der Elektrophorese

Zunächst wurden die Elektrophorese-Rohdaten vollautomatisch gesammelt. Die Analyse der PCR-Produkt-Auftrennung erfolgte dann mit Hilfe des Programms ABI GeneScan™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) entsprechend der Herstellerangaben.

Die denaturierten PCR-Produkte sind negativ geladen und wandern im elektrischen Feld von Kathode zu Anode. Dabei werden sie ihrer Größe nach aufgetrennt. Während des Laufes scannt ein Laser auf einer konstanten Linie vor der Anode kontinuierlich das Gel senkrecht zur Laufrichtung. Kleine Produkte wandern schneller und passieren so die Scanlinie früher als große. Sobald der Laser auf ein fluoreszierendes PCR-Produkt trifft, emittiert dieses Licht entsprechender Wellenlänge, welches wiederum über ein Spiegelsystem weitergeleitet wird und mit dem angeschlossenen Computer registriert werden kann. [42]

Daraufhin wurden die Rohdaten manuell mit Hilfe des Programmes ABI GeneScan™ bearbeitet und man erhielt auswertbare Elektropherogramme. Auf der x-Achse lässt sich die Produktgröße in Basenpaaren (Bp) ablesen, definiert über den mitlaufenden

Größenstandard ROX 350. Die y-Achse gibt die Fluoreszenz-Einheiten (FU) an, dh. die Signalintensität, welche sich zur Menge des amplifizierten Produktes proportional verhält. Zum semiquantitativen Vergleich von Tumor- und Kontrollgewebe wurden die Peak-Höhen der jeweiligen Allele ausgemessen.

Bei der Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI) waren alle amplifizierten Marker informativ, unabhängig davon, ob das jeweilige Produkt homozygot oder heterozygot war. Unter MSI versteht man die Längenveränderung in einem Mikrosatelliten im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe aufgrund von Insertion oder Deletion repetitiver Einheiten. [43] Dabei treten zusätzliche Allele auf, die größer oder kleiner als das ursprüngliche Allel sein können.

Bei der Untersuchung auf Amplifikation und LOH galten nur die Marker als informativ, die heterozygot waren und bei denen sich keine MSI fand. Man berechnete hier die Höhenverhältnisse von beiden Kontroll- und Tumorallelen. Ergab sich eine Differenz von mehr als 20% zwischen den zwei Verhältnissen, wurde eine genetische Aberration an diesem Locus angenommen.

Um weiter zwischen LOH und Amplifikation unterscheiden zu können, wurden Multiplex-PCR-Reaktionen mit einem Standardmarker bzw. einem Marker, der bei diesem Patienten keine Veränderungen aufwies, durchgeführt. Man berechnete hiervon die Verhältnisse der Kontrollallele zu jeweils entsprechenden Tumorallelen. Aus dem Vergleich der erhaltenen Werte ließ sich das amplifizierte oder deletierte Allel herausfinden, da dessen Quotient von Kontrollallele zu Tumorallelen deutlich von den anderen drei Quotienten abwich. Als Amplifikation wurde die Vergrößerung des Tumorallels im Vergleich zum Kontrollallelen um mindestens 40%, als LOH die Verkleinerung um mindestens 40% bezeichnet. Veränderungen im Sinne von MSI, Amplifikation oder LOH bei einem Patienten an einem Marker wurden einmal bestätigt, bevor sie als genetische Aberrationen gewertet wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Häufiges Vorkommen genomischer Aberrationen bei ETL

Bei der Untersuchung von 26 ETL Tumoren mit 47 Mikrosatellitenmarkern ergaben sich 1214 Genotypen. Fall 18 und die zugehörige Tumorrezidiv-DNA (18R) wurden zu einem Fall zusammengefasst, da kein Unterschied hinsichtlich der Genotypen bestand. Bei acht Analysen erhielt man auch nach wiederholten Versuchen kein PCR-Amplifikat.

Für die Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse waren alle 1214 Genotypen informativ. 38 von ihnen zeigten MSI, entsprechend einem Anteil von 3,13%. Bei der Untersuchung auf Amplifikationen und LOH waren 907 Genotypen informativ, da homozygote Genotypen und solche, die MSI zeigten, hier auszuschließen waren. Unter diesen fanden sich insgesamt 185 Genotypen mit allelischen Imbalancen (20,4%), davon 70 Amplifikationen (7,7%), 105 LOH-Analysen (11,6%) und 10 Genotypen mit allelischen Imbalancen, bei denen sich nicht endgültig entscheiden ließ, ob es sich um Amplifikation oder LOH handelte (1,1%).

Die Mikrosatellitenmarker wurden hinsichtlich ihrer chromosomalen Lokalisation in 26 Gruppen eingeteilt und die Ergebnisse zu jeweils einem Genotyp pro Locus zusammengefasst. Daraus resultierten 675 Genotypen. 593 davon waren informativ für die Untersuchung auf Amplifikationen und LOH. Von den 593 informativen Genotypen wiesen 133 (22,4%) Amplifikationen oder LOH auf.

Die Abbildungen 2 bis 4 zeigen Beispiele für Deletion, Amplifikation und Mikrosatelliteninstabilität bei drei Patienten.

Abbildung 2: Deletion in 17q23-25 im Marker D17S784 bei Pat Nr. 17 im Vergleich mit dem Standardmarker D13S153

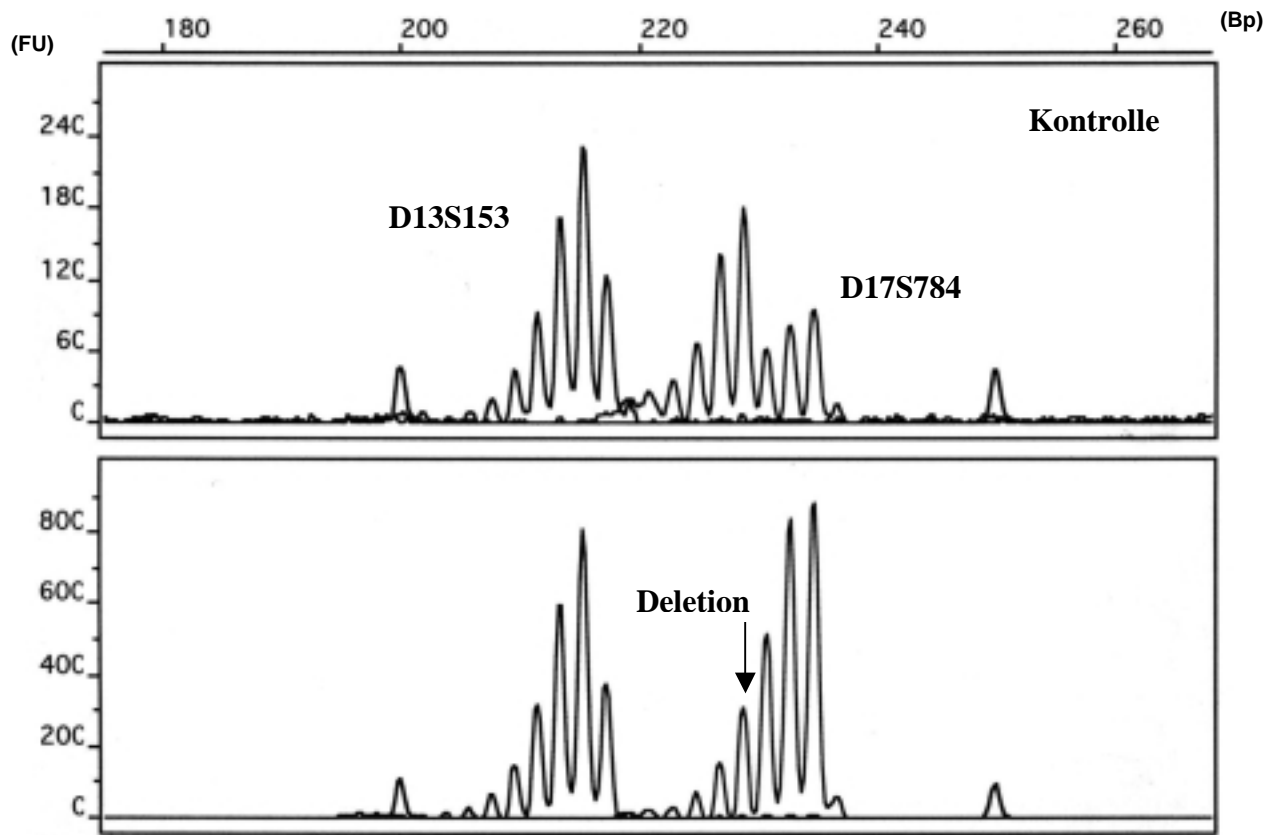


Abbildung 3: Amplifikation in 9q34 im Marker D9S290 bei Patient Nr. 2 im Vergleich mit dem Standardmarker D6S470

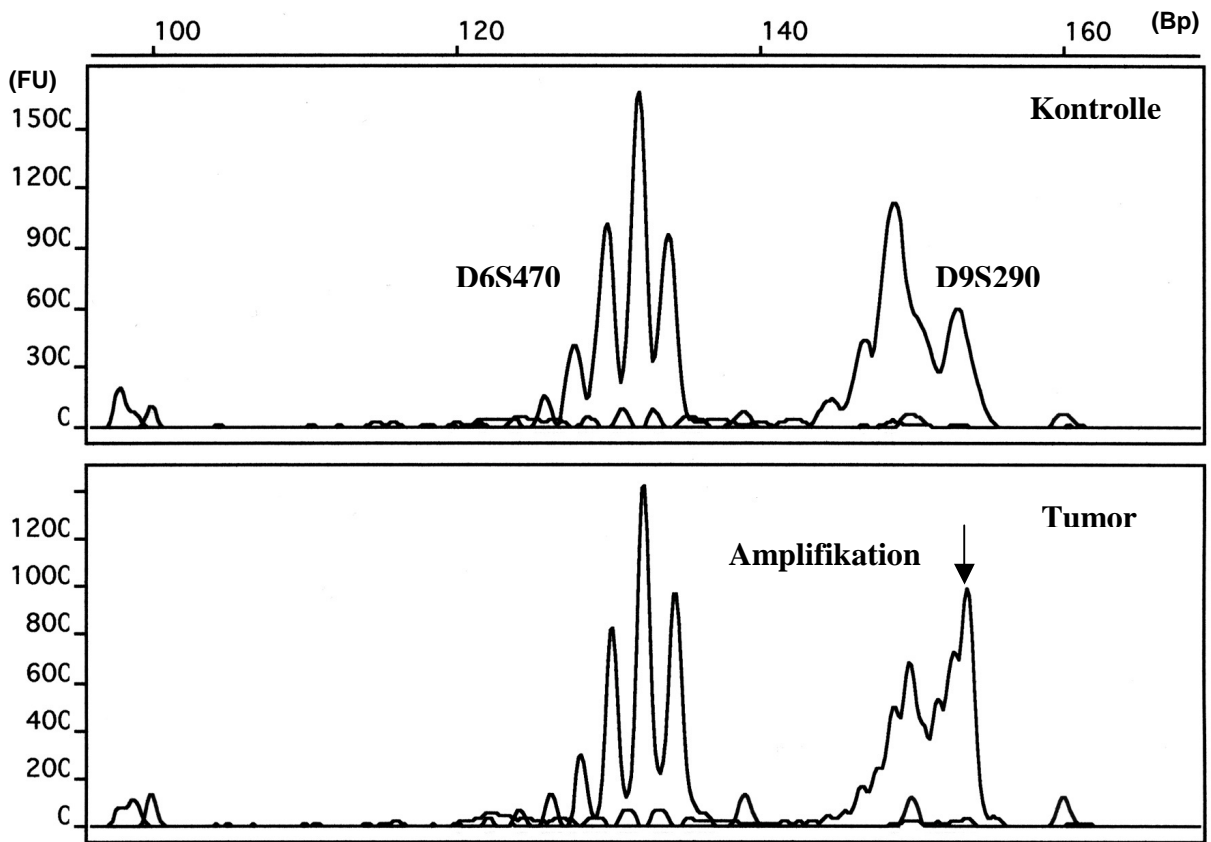
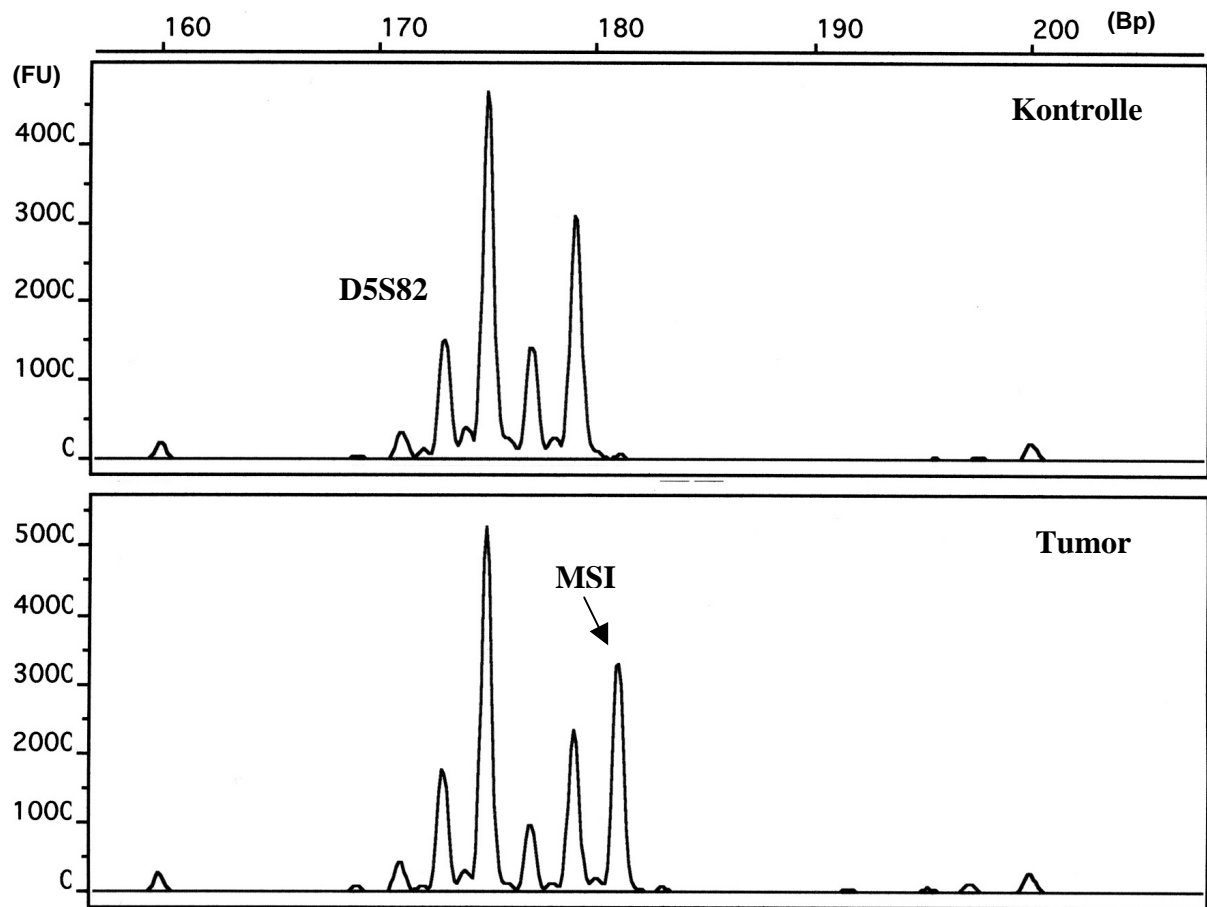


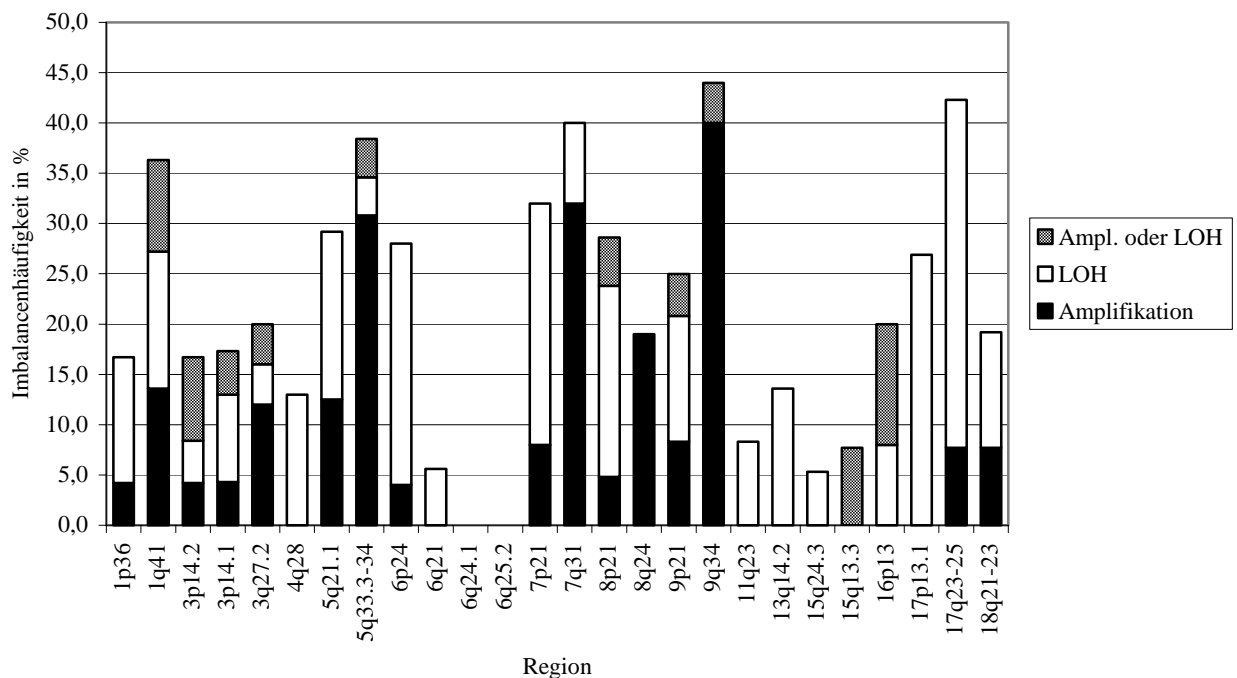
Abbildung 4: Beispiel einer Mikrosatelliteninstabilität bei Patient Nr. 14 im Marker D5S82



3.2 Amplifikation von 9q34 und Deletion von 17q23-25 als die häufigsten allelischen Imbalancen

Bei der Untersuchung auf allelische Imbalancen der ETL fand sich eine Vielzahl von Veränderungen an unterschiedlichen chromosomalen Lokalisationen. Die Regionen mit dem höchsten Anteil an Deletionen und Amplifikationen waren hierbei 9q34, 17q23-25, 7q31, 5q33.3-34, 1q41 und 7p21. Abbildung 5 gibt eine Übersicht über die Imbalanzenhäufigkeit der einzelnen Regionen:

Abbildung 5: Häufigkeit allelischer Imbalancen in den verschiedenen Regionen



Die häufigsten allelischen Imbalancen zeigten sich in der Region 9q34. Sie wurde mit Hilfe der beiden 3,88 MBp voneinander entfernten Mikrosatellitenmarker D9S290 und D9S1847 analysiert. Hier befinden sich unter anderem auch die Genloci der Protoonkogene Notch 1 und c-abl. Bei 44% der informativen Genotypen der Region fanden sich Veränderungen: Zehn Tumoren (40%) wiesen eine Amplifikation an einem oder beiden betroffenen Markern auf, ein Tumor (4%) zeigte LOH an D9S1847 und gleichzeitig eine Amplifikation in D9S290.

Die Region 17q23-25 auf dem langen Arm von Chromosom 17, welche den Genlocus für TIMP 2 enthält, wurde mit den Markern D17S939, D17S784 und D17S785

untersucht. Dort zeigten ebenfalls elf Lymphome (42,3%) allelische Imbalancen. Bei neun Lymphomen (34,6%) fanden sich Deletionen in allen drei Markern, zwei (7,7%) wiesen Amplifikationen der Marker D17S784 und D17S939 auf.

Veränderungen der Region 7q31 konnten bei zehn Tumoren (40%) nachgewiesen werden: In acht Fällen (32%) waren dies Amplifikationen, bei zwei Tumoren (8%) handelte es sich um Deletionen.

Zehn Lymphome (38,5%) wiesen Veränderungen in 5q33.3-34 auf; in acht Fällen (30,8%) waren es Amplifikationen, ein Fall (3,8%) zeigte ein LOH, in einem weiteren Fall traten gleichzeitig LOH und Amplifikation auf.

Die Untersuchung der Region 1q41 ergab einen Anteil von 36,4% allelischen Imbalancen. Mit gleicher Häufigkeit, nämlich bei jeweils drei Tumoren (13,8%) fanden sich Deletionen und Amplifikationen. Bei zwei Tumoren (9,1%) traten Amplifikation und Deletion gemeinsam an den beiden hier untersuchten Markern D1S237 und D1S2827 auf, wobei an jedem Marker beide Veränderungen vorkamen.

Auch im Bereich 7p21 zeigten acht Lymphome (32%) Veränderungen, bei sechs Lymphomen (24%) in Form von LOH und bei zwei Lymphomen (8%) als Amplifikationen.

Die Region 5q21 mit dem APC-Genlocus war bei sieben Tumoren (29,2%) verändert. Vier der informativen Genotypen (16,7%) zeigten eine Deletion, Amplifikationen traten in drei Fällen (12,5%) auf.

Bei sechs Lymphomen (28,6%) zeigten sich Veränderungen in 8p21. Vier Mal (19%) war diese Region deletiert, einmal (4,8%) fand sich eine Amplifikation und in einem Fall (4,8%) traten gemeinsam eine Amplifikation und eine Deletion auf.

In der Region 6p24 traten bei 28% der Genotypen allelische Imbalancen auf. Bei sechs Tumoren (24%) als LOH, bei einem (4%) als Amplifikation.

In sieben der untersuchten Fälle (26,9%) ließ sich eine Deletion der Region 17p13.1, welche den p53-Genlocus enthält, feststellen; Amplifikationen traten hier nicht auf.

In allen übrigen untersuchten Regionen lag der Anteil allelischer Imbalancen unter 25%. Die jeweiligen Ergebnisse lassen sich der Abbildung 5 entnehmen.

3.3 Zwei Gruppen von ETL mit charakteristischen Aberrationen

Zusätzlich zur Gesamthäufigkeit der Amplifikationen und Deletionen der einzelnen Regionen wurde untersucht, wie sich die allelischen Imbalancen zueinander verhalten und ob sich charakteristische Muster von Aberrationen ergeben. Eine Übersicht über die Genotypen der Patienten in den einzelnen Regionen gibt Tabelle 3:

Tabelle 3: Unterschiedliche Allelotypen bei ETL

Patient	1p36	1q41	3p14.2	3p14.1	3q27.2	4q 28	5q21.1	5q33.3-34	6p24	6q21	6q24.1	6q25.2	7p21	7q31	8p21	8q24	9p21	9q34	11q23	13q14.2	15q24.3	15q13.3	16p13	17p13.1	17q23-25	18q21-23
13																										
5																										
15																										
7																										
8																										
10																										
22																										
12																										
16																										
19																										
24																										
21																										
26																										
6																										
23																										
4																										
9																										
14																										
17																										
20																										
25																										
1																										
2																										
3																										
11																										
18																										

Legende:

	heterozygot
	nicht informativ
	nicht amplifizierbar
	Amplifikation
	LOH
	unklassifizierbare Imbalance

Wie aus dieser Allelotypenübersicht deutlich wird, ließen sich zwei Gruppen mit charakteristischen Genotypkonstellationen unterscheiden: Die unteren elf Tumoren in der Tabelle (44%) wiesen allelische Imbalancen in der Region 9q34 auf und zeigten keine Veränderungen der Region 3q27.2. Die zweite Gruppe umfasst die in der Tabelle ganz oben angeführten fünf Lymphome (20%), bei denen sich allelische Imbalancen in der Region 3q27.2 und gleichzeitig keine Veränderungen in 9q34 fanden. Es gab keine

Überschneidungen zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der zwei Regionen. Aberrationen in 9q34 und 3q27.2 schlossen sich also gegenseitig aus.

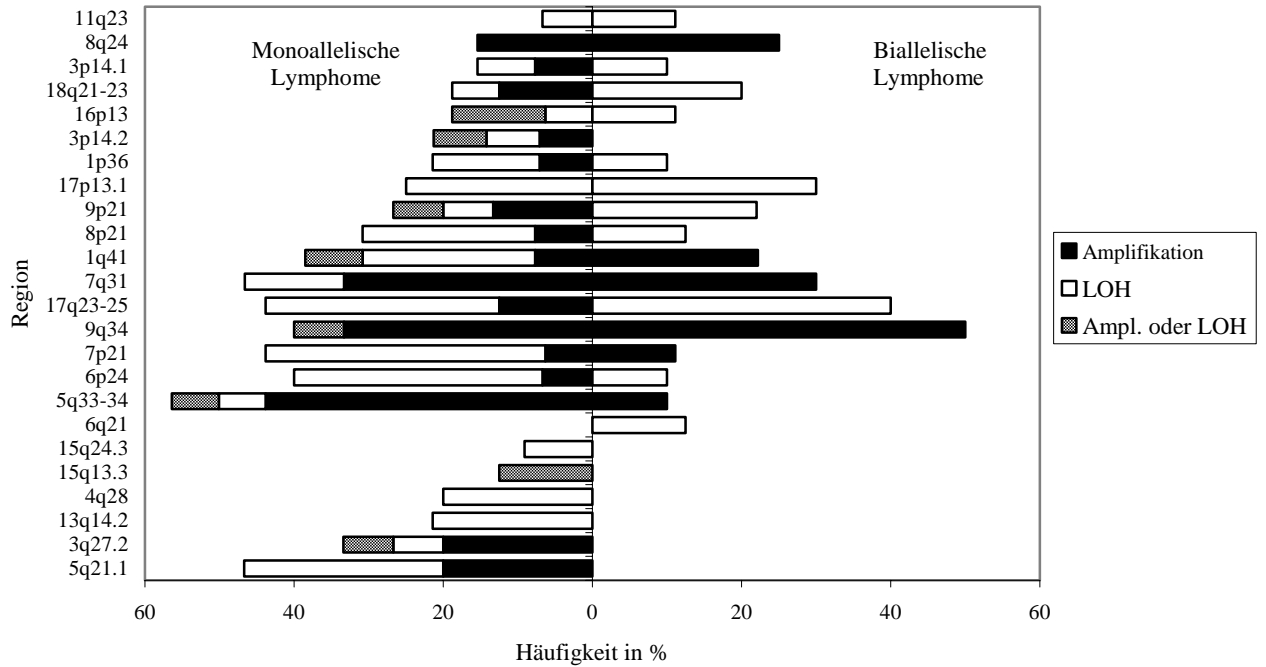
Innerhalb der Gruppe mit Imbalancen in der Region 9q34 konnten noch zwei Subgruppen differenziert werden, nämlich fünf Tumoren (45,5%) mit und sechs Tumoren (54,5%) ohne Amplifikation in der Region 5q33.3-34. Bei drei Tumoren (60%) war die Amplifikation in der Region 5q33.3-34 assoziiert mit LOH in der Region 17p13.1, welche den Locus für das p53-Gen enthält, und in 17q23-25, der Lokalisation des TIMP-2-Gens.

3.4 Spezifische und häufigere allelische Imbalancen bei ETL mit monoallelischer Umlagerung für das T-Zell-Rezeptor- γ -Gen

Bei der Analyse der allelischen Imbalancen im Zusammenhang mit den Ergebnissen der T-Zell-Rezeptor- γ -Gen-Umlagerung bei den einzelnen Tumoren fielen deutliche Unterschiede bezüglich Häufigkeit und Vorkommen der Aberrationen auf. Imbalancen der Region 5q21.1 kamen ebenso wie Veränderungen in den Regionen 3q27, 4q28 und 13q14.2 ausschließlich bei Lymphomen mit monoallelischer Umlagerung vor (siehe Abbildung 6).

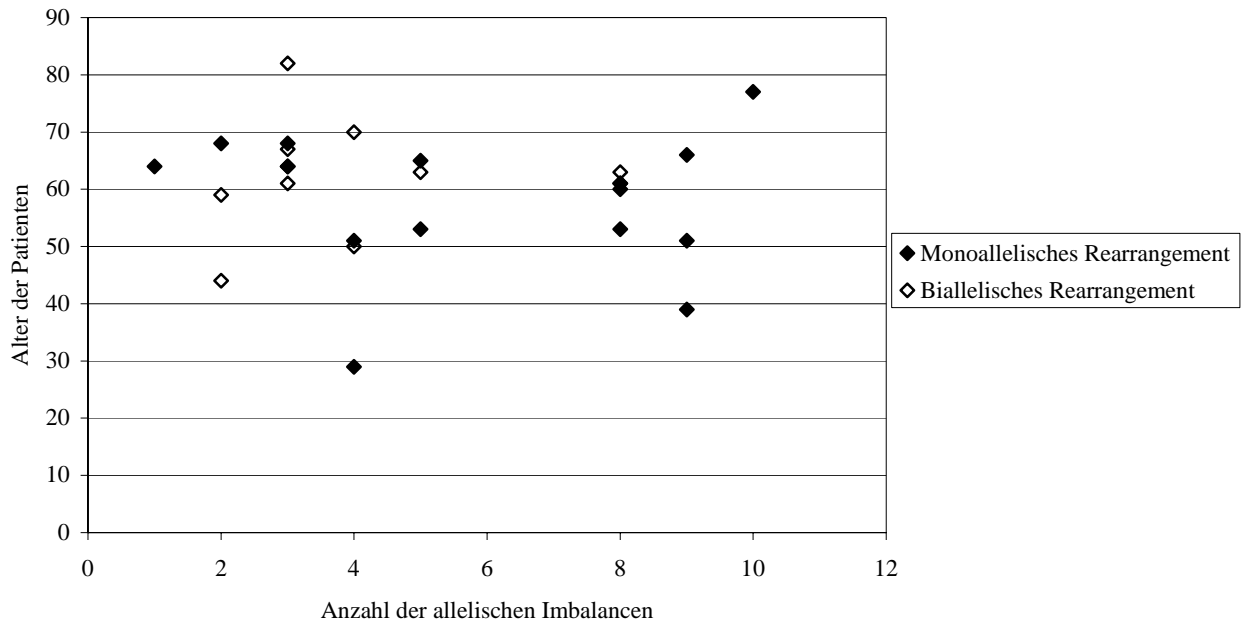
Abbildung 6: Häufigkeit allelischer Imbalancen abhängig vom Ergebnis der TCR γ

Analyse



Wie aus Abbildung 7 ersichtlich wird, ließen sich die untersuchten Tumoren anhand der Gesamtzahl der allelischen Imbalancen in den verschiedenen Regionen in zwei Gruppen aufteilen: Eine Gruppe von Tumoren, die insgesamt weniger als sechs Deletionen und Amplifikationen zeigten und eine zweite Gruppe mit je mehr als sechs Imbalancen. In der zweiten Gruppe kam monoallelische Genumlagerung signifikant häufiger vor ($p=0,045$ im einseitigen exakten Fisher-Test). Gleichzeitig macht die Abbildung deutlich, dass kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und der Häufigkeit allelischer Imbalancen besteht.

Abbildung 7: Ergebnis der TCR γ -Analyse und Anzahl der allelischen Imbalancen

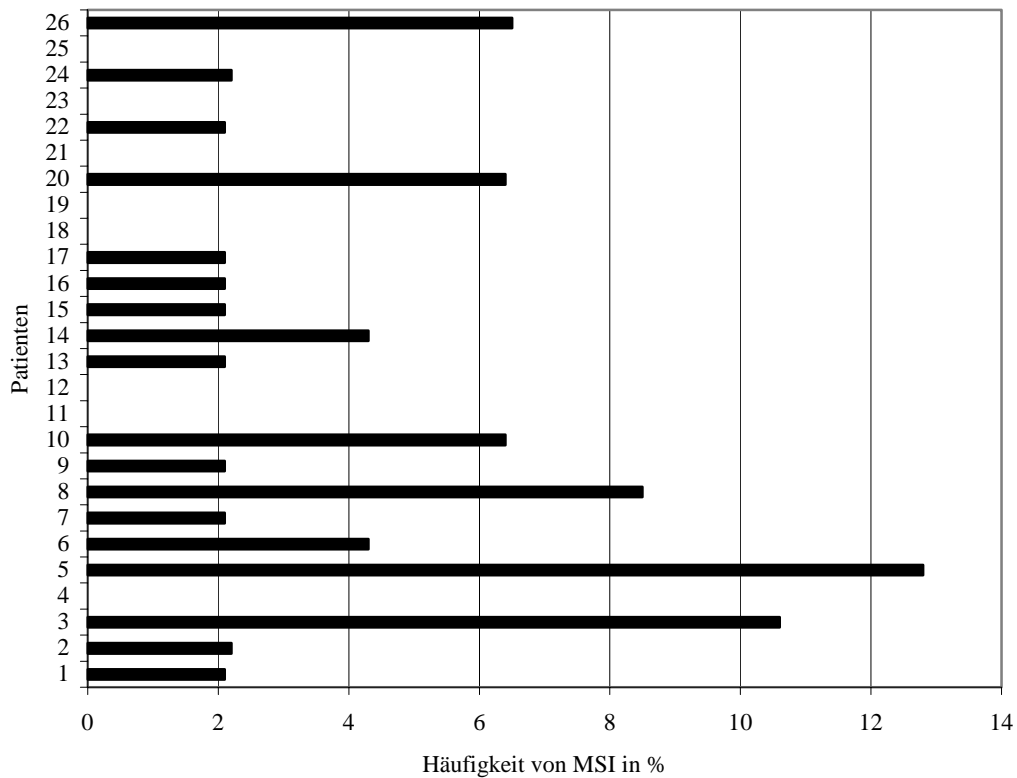


3.5 Selteneres Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität bei ETL

Als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet man das Vorkommen zusätzlicher Allele in einem Mikrosatellitenmarker im Tumorgewebe verglichen mit dem zugehörigen Normalgewebe eines Patienten. Sie entsteht aufgrund von Fehlern im DNA-mismatch-repair-System und ist gekennzeichnet durch Längenveränderungen mit Vermehrung oder Verminderung der repetitiven Einheiten in den Mikrosatellitensequenzen.

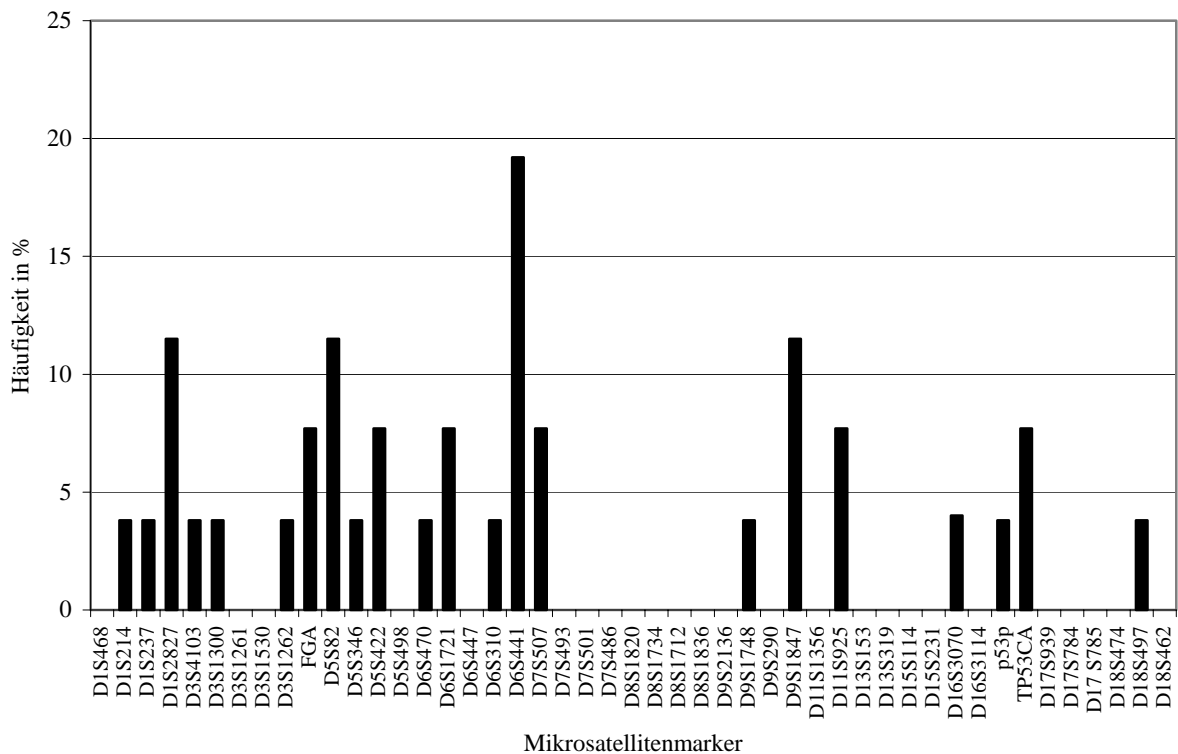
In der vorliegenden Untersuchung kam MSI viel seltener vor als allelische Imbalancen. Bei den 1214 Genotypen trat insgesamt 38-mal (3,13%) MSI auf, verteilt auf 18 Patienten (69,2%). Bei diesen 18 Patienten lag die MSI-Häufigkeit in jedem Fall unter 15%, sodass alle in die Kategorie MSI-L einzuordnen waren. Acht Patienten wiesen in keinem Marker MSI auf (MSS); die Kategorie MSI-H kam nicht vor. Aus Abbildung 8 wird die Verteilung der MSI auf die einzelnen Patienten ersichtlich:

Abbildung 8: Häufigkeit von MSI bei den einzelnen Patienten



Betrachtet man die Mikrosatellitenmarker im einzelnen, so war D6S441 am häufigsten betroffen: Fünf Patienten wiesen hier MSI auf, entsprechend einem Anteil von 19,2% an den informativen Genotypen. Je drei Fälle von MSI (11,5%) traten bei D1S2827, D5S82 und D9S1847 auf. Bei weiteren 18 Fällen lag der Anteil von MSI an den Genotypen bei unter 10%. In den Bereichen von 25 Markern kam kein Fall von MSI vor. Eine Übersicht über die MSI-Verteilung auf die einzelnen Marker zeigt Abbildung 9:

Abbildung 9: Häufigkeit von MSI bezüglich der verschiedenen Marker

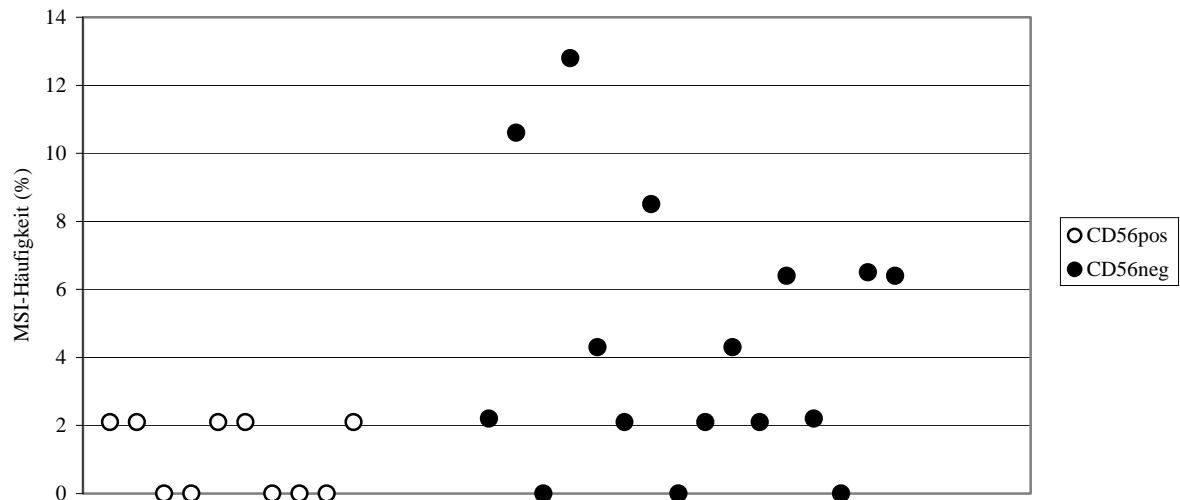


3.6 Unterschiede im Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität in Abhängigkeit von der Expression des Markers CD56

Bei der Analyse der Mikrosatelliteninstabilität der ETL im Zusammenhang mit der Expression des Markers CD56 wurde deutlich, dass Unterschiede bezüglich Gesamthäufigkeit und Vorkommen an bestimmten Mikrosatellitenmarkern zwischen den CD56+ und CD56- Lymphomen bestehen. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der MSI-Analyse getrennt für die CD56+ und CD56- Lymphome: Während die CD56+ Lymphome entweder der Kategorie MSS angehörten oder in nur einem einzigen von 47 analysierten Marker MSI zeigten (MSI-Häufigkeit <2,2%), trat bei der Hälfte der CD56- ETL MSI in mehr als 2,2% der Marker auf.

Dieser Unterschied war signifikant ($p=0,0082$ im einseitigen exakten Fisher-Test).

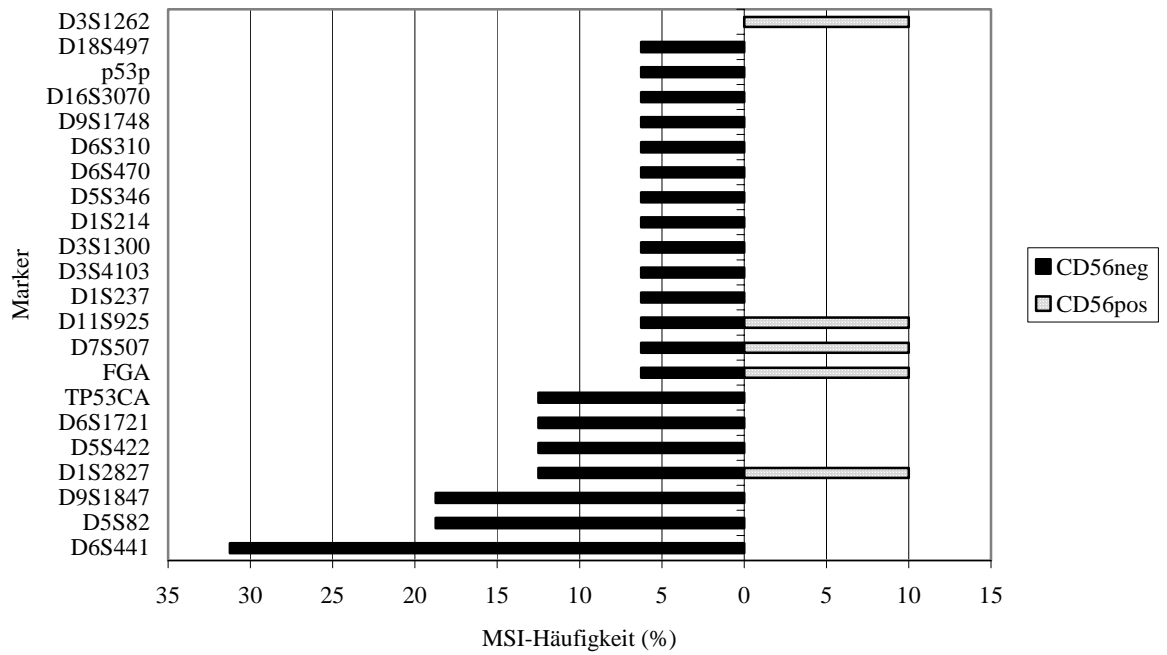
Abbildung 10: MSI-Häufigkeit bei den CD56+ und CD56- ETL



Aus Abbildung 11 lässt sich die Häufigkeit von MSI in den einzelnen Markern bezogen auf die CD56+ und CD56- Gruppe ablesen: Der insgesamt am häufigsten von MSI betroffene Marker D6S441 zeigte nur bei den CD56- MSI, und zwar in 31,25% der CD56- Lymphome. Ebenso kam MSI in D5S82 und D9S1847 mit einer Häufigkeit von 18,75% ausschließlich bei den CD56- ETL vor.

Bezüglich des Auftretens allelischer Imbalancen bei CD56+ und CD56- ETL ließ sich allerdings kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen.

Abbildung 11: MSI-Häufigkeit an ausgewählten Markern bezogen auf die Gruppen der CD56- und CD56+ ETL



4 Diskussion

ETL sind hochmaligne aggressive T-Zell-Neoplasien des Gastrointestinaltraktes, die auf dem Boden einer Sprueerkrankung entstehen. T-Zell-Lymphome wurden bislang im Gegensatz zu B-Zell-Lymphomen hinsichtlich ihrer genetischen Aberrationen wenig untersucht. Insbesondere über die chromosomalen und molekularen Eigenschaften der ETL besteht noch zu wenig Erkenntnis. Die vorliegende Arbeit analysierte 26 Fälle von ETL in 47 Mikrosatellitenmarkern in der Nachbarschaft von bekannten und vermuteten Tumorsuppressorgenen und Onkogenen. Abhängig vom Genotypmuster fanden sich verschiedene Gruppen von Lymphomen mit jeweils charakteristischen Aberrationen, welche möglicherweise auf unterschiedliche Wege in der Pathogenese dieser Tumoren hinweisen.

4.1 Allelische Imbalancen in der Region 9q34

Die chromosomale Region, welche bei der Analyse der ETL den größten Anteil an Aberrationen aufwies, war 9q34. Sie wurde mit den Mikrosatellitenmarkern D9S290 und D9S1847 untersucht. 40% der informativen Genotypen zeigten hier Amplifikationen und in einem Fall (4%) traten gleichzeitig LOH und Amplifikation an den beiden Markern auf. In der CGH-Studie über eine heterogene Gruppe von T-Zell NHL von Renedo et al wurden Amplifikationen dieser Region in 10% der Fälle festgestellt [44] und Zettl et al. fanden 9q34-Amplifikationen als häufigsten Zugewinn in 58% der untersuchten ETL. [36] Die analysierte Region beherbergt eine große Anzahl von Genen, welche eine Rolle bei der Entstehung der ETL spielen könnten:

Als möglicherweise betroffenes und für die Tumorgenese wichtiges Gen liegt in 9q34 Notch 1. Notch 1 ist wesentlich an der Hämatopoese beteiligt. Bei Stammzellen verstärkt es die Selbsterneuerung von Vorläuferzellen und bereitet den Weg in Richtung zur lymphatischen Entwicklungsreihe. [45-48] Wie verschiedene Experimente zeigten, bewirkt Notch 1, dass aus der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle vornehmlich T-Lymphozyten entstehen und die Entwicklung von B-Zellen gehemmt wird. Hierbei scheinen bevorzugt CD8⁺ statt CD4⁺ und TCR $\alpha\beta$ statt TCR $\gamma\delta$ T-Zellen zu entstehen. [48-50]

Das Gen kodiert für einen Transmembranrezeptor, über den Differenzierungs-, Proliferations- und Apoptosevorgänge von Zellen reguliert werden. Binden Liganden der Delta- und Jagged-Familien an den Notch 1-Rezeptor, so wird die intrazelluläre Rezeptordomäne abgespalten und in den Kern transloziert, wo sie über verschiedene noch nicht endgültig verstandene Signalwege die Expression unterschiedlicher Zielgene (z.B. der Gene für hairy enhancer of split (Hes)-1, Hes-5, HRT und HERP) aktiviert. [48, 51-53]

Die Beteiligung von Notch 1 an hämatopoetischen Neoplasien wurde erstmals bei der T-ALL beschrieben. [54] Die hierbei auftretende Translokation t(7;9)(q34;q34.3) führt zur Fusion des Genabschnittes von Notch 1, welcher für die intrazelluläre Domäne kodiert, mit enhancer- und promoter-Abschnitten des Gens für die T-Zellrezeptor β -Untereinheit. [55] Die direkte Induktion von T-Zell-Leukämien durch Notch 1-Aktivierung konnte in den Studien von Pear et al und Aster et al anhand von Knochenmarkstransplantationen bei Mäusen nachgewiesen werden. [55, 56] Eine Arbeit von Jundt et al berichtet über verstärkte Expression von Notch 1 und seinem Liganden Jagged1 in Sternberg-Reed-Zellen in Hodgkin-Lymphomen und in T-Zellen bei Fällen von ALCL. Gleichzeitig gibt es Hinweise auf die Proliferationsverstärkung durch Notch 1-Jagged 1-Interaktion sowie Apoptoseverhinderung durch Notch 1-Aktivität. [57, 58] Notch 1-Expression findet sich auch bei epithelialen Tumoren wie Zervixkarzinomen, Kolonkarzinomen und Pattenepithelkarzinomen der Lunge. [59, 60]

Die bei den ETL gefundenen Amplifikationen in 9q34 könnten ein Hinweis darauf sein, dass verstärkte Expression von Notch 1 mit daraus resultierender gesteigerter Zellproliferation und Hemmung des programmierten Zelltodes charakteristisch und wegbereitend für die Progression dieser Lymphome ist.

Ein weiteres Gen, das von den Amplifikationen betroffen sein könnte, ist das c-abl Protoonkogen, welches innerhalb des von den Markern D9S290 und D9S1847 begrenzten Bereiches liegt. Es kodiert für eine in Zytoplasma und Kern lokalisierte Tyrosinkinase, die über verschiedene Signalwege bei der Regulation des Zellzyklus, der Antwort der Zelle auf DNA-Schädigung, der Zelldifferenzierung und der Induktion von Apoptose beteiligt ist. Alterationen dieses Gens führen über einen bislang ungeklärten Mechanismus zur malignen Transformation der Zellen. [61-65]

Bei 95% der Fälle von CML findet man das sogenannte Philadelphia-Chromosom, ein deletiertes Chromosom 22, das aufgrund der reziproken Translokation t(9;22)(q34;q11)

entsteht. Es findet sich auch in 15-30% der Fälle von ALL und in 2% der Fälle von AML. [66] Bei dieser Translokation entsteht ein Fusiongen aus c-abl und dem Gen für bcr (breakpoint cluster region). Im Gegensatz zur streng regulierten c-abl Tyrosinkinase ist das bcr-abl Genprodukt konstitutiv aktiv und fördert damit das Zellwachstum, verbessert das Überleben von Zellen, verhindert Apoptose und führt zu Defekten bei DNA-Reparaturmechanismen. [66-70]

Den amplifizierten Mikrosatelliten in 9q34 benachbart liegt das LIM homeo box 2-Gen (LHX2), welches für einen vermutlichen Transkriptionsfaktor kodiert. Wu et al fanden bei allen von ihnen untersuchten Fällen von CML sowie bei verschiedenen Lymphomen verstärkte Expression dieses Gens. [71]

Ebenfalls in 9q34 lokalisiert und möglicherweise von der Amplifikation betroffen ist das Gen für die cyclinabhängige Kinase 9 (CDK 9). Cyclinabhängige Kinasen aktivieren über Phosphorylierung spezifische Signalproteine, die den Übergang von einer Phase des Zellzyklus in die nächste bedingen. Damit spielen diese Enzyme eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus. CDK 9 phosphoryliert möglicherweise das Rb-Protein und ist außerdem Teil des Proteinkomplexes TAK/P-TEFb, der als Elongationsfaktor der Transkription wirkt. [72, 73]

Auch das VAV 2-Onkogen könnte von der Amplifikation in 9q34 betroffen sein. Das von ihm kodierte Protein gehört zu den Guanosinnucleotid Austauschfaktoren (GEF), die die Aktivität von G-Proteinen der Rho/Rac-Familie im Signaltransduktionsweg der Zelle regulieren. [74]

4.2 Allelische Imbalancen in der Region 17q23-25

Die Region 17q23-25, welche mit den Markern D17S939, D17S784 und D17S785 analysiert wurde, wies den zweithöchsten Anteil an Aberrationen auf, nämlich bei 34,6% der Genotypen Deletionen und in 7,7% der Fälle Amplifikationen. Es handelt sich um eine sehr genreiche Region, die unter anderem den Genlocus für tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) enthält. [75-77]

Matrixmetalloproteinasen (MMP) bilden eine Familie verschiedener Enzyme, die extrazelluläre Matrix abbauen und bei Vorgängen wie Trophoblastimplantation, Embryonalentwicklung, Angiogenese und Tumorausbreitung eine wichtige Rolle

spielen. Die vier bisher bekannten TIMP regulieren deren Aktivität, indem sie Komplexe mit den Proteasen bilden und sie dadurch hemmen. [77-79]

Es wäre also anzunehmen, dass eine verminderte Expression von TIMP-2 nachhaltigen Einfluss auf Tumorinvasion und Metastasierung haben müsste, da der Abbau extrazellulärer Matrix ungehindert ablaufen könnte und damit die Ausbreitung von Tumoren erleichtert wäre. So zeigt sich auch ein deutlicher Zusammenhang zwischen der vermehrten Expression von MMP und schlechterer Prognose bei verschiedenen Karzinomen. [78, 80, 81] Umgekehrt führt die verstärkte Expression von TIMP bei Zelllinien von Magen- [82], Pankreas- [83, 84], Bronchial- [81] und Mammakarzinomen [85] zu einer Abnahme des Wachstums, der Invasion und der Metastasierung der Tumoren.

Jedoch ist die ursprüngliche Vorstellung, dass die einzige Funktion von TIMP in der Hemmung von MMP bestehe, nicht mehr haltbar. Nemeth et al wiesen die wachstumsfördernde Wirkung von TIMP-2 nach [86] und bei Studien an verschiedenen menschlichen Karzinomen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen erhöhter TIMP Expression und schlechterer Prognose. [78, 87-89] Die tumorfördernde Wirkung von TIMP-2 könnte auf seine Interaktion mit MMP2 zurückzuführen sein: TIMP-2 bildet einen Komplex mit MT1-MMP (Membrantyp 1-MMP) und bewirkt darüber die Aktivierung von pro-MMP2 und den Abbau von Extrazellulärschubstanz und verhindert gleichzeitig die Inaktivierung von MT1-MMP. [78] [90]

TIMP üben also sowohl hemmende als auch fördernde Wirkung auf das Wachstumsverhalten von Zellen aus und ihre komplexe Rolle im Rahmen der Tumorprogression ist noch nicht ausreichend verstanden. Wie die Deletionen in 17q23-25 somit auf die Entstehung der ETL Einfluss nehmen, kann daher nicht eindeutig entschieden werden. Es ist jedoch denkbar, wie aufgrund des Ausfalls von TIMP 2 in den Tumorzellen deren Ausbreitung ins umliegende Gewebe weniger behindert würde und damit das Wachstum der Lymphome wesentlich erleichtert wäre.

4.3 LOH im p53-Locus

Bei 26,9% der informativen Genotypen fand sich LOH in der Region 17p13.1, welche den Locus für das p53-Gen enthält. Alterationen dieses sehr gut erforschten Tumorsuppressorgens finden sich bei etwa 50% aller bösartigen Tumoren beim

Menschen. In normalen Zellen führen DNA-Schäden und Hypoxie zur Aktivierung von p53, woraufhin die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert werden. Ebenso ist p53 an der Induktion des programmierten Zelltodes beteiligt. [91-94] Funktionsverlust von p53 tritt erst spät in der Tumorprogression auf und ist kennzeichnend für den Übergang von niedrigmalignen zu hochmalignen Tumoren. Die Deletionen des p53-Locus bei mehr als einem Viertel der analysierten ETL-Fälle zeigt, dass es sich um hochmaligne Lymphome handelt, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits eine Vielzahl von genetischen Aberrationen aufweisen.

4.4 Weitere häufige allelische Imbalancen

Häufige Imbalancen zeigte die Region 7q31, welche bei 32% der Lymphome amplifiziert war und bei 8% eine Deletion aufwies. Von den Genen, die sich in dieser Region befinden, könnte das MET-Onkogen, welches für eine Tyrosinkinase kodiert, überexprimiert sein. [95, 96]

In 5q33.3-34 kamen Amplifikationen mit 30,8% Häufigkeit vor. Deletionen und nicht zu klassifizierende Imbalancen zeigten jeweils 3,8% der Genotypen. Ein hier in Frage kommendes Onkogen wurde bislang noch nicht charakterisiert.

Unklar bleibt die Bedeutung der Imbalancen in 1q41, da Amplifikationen und Deletionen in dieser Region zu gleichen Anteilen auftraten. Die Imbalancen könnten das TGFβ2-Gen betreffen, dessen Genprodukt das Wachstum von Tumoren begünstigen und die Immunantwort auf den wachsenden Tumor beeinträchtigen soll. [97]

Bei 24% der Lymphome war 7p21 deletiert und 8% der Genotypen zeigten hier Amplifikationen. Den untersuchten Markern benachbart liegt das HDAC9-Gen. Die von ihm kodierte Histondeacetylase 9 wirkt an der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse wie zum Beispiel der Gentranskription und DNA-Replikation mit. [98, 99]

In 8p21 fanden sich zu 19% LOH und in jeweils 4,8% Amplifikationen bzw. uncharakterisierbare Imbalancen. Zwischen den hier analysierten Mikrosatellitenmarker und ihnen benachbart liegen eine Reihe interessanter Gene, deren Produkte für die Tumorphathogenese und -progression bedeutsam sein könnten: Zwei Gene kodieren für die TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 (death receptor 4 und 5), welche am Signalweg der Apoptoseinduktion beteiligt sind. [100] Ebenso kommen das häufig bei Leberzellkarzinomen deletierte DLC1-Gen [101], sowie das PDGFRL-Gen [102],

welches bei Leberzellkarzinomen, kolorektalen Karzinomen sowie nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen Deletionen zeigt, als involvierte Gene in Frage.

Imbalancen in 5q21.1 traten bei 29,9% der Lymphome auf. Sie könnten das hier lokalisierte Tumorsuppressorgen APC betreffen, dessen Mutation die Tumorentstehung bei der familiären adenomatösen Polyposis bewirkt. [103] Deletionen und Amplifikationen kamen jedoch in etwa gleich häufig vor, sodass eine eindeutige Interpretation dieser Ergebnisse nicht möglich ist.

In 6p24 wurden in 24% der Fälle LOH gefunden neben einem Fall von Amplifikation (4%). Ein Tumorsuppressorgen ist in dieser Region bislang noch nicht bekannt.

Interessanterweise trat bei allen drei analysierten Mikrosatelliten auf dem langen Arm von Chromosom 6 nur in einem einzigen Fall LOH auf. Deletionen dieser Region kommen in einem hohen Prozentsatz von gastralen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) vor und scheinen charakteristisch für den Übergang von niedrigmalignen in hochmaligne Magenlymphome zu sein. [104, 105] Das Fehlen von Deletionen auf 6q bei den hochmalignen ETL könnte also ein Hinweis sein, dass diese Tumoren einen Pathogeneseweg einschlagen, der sich von dem der B-Zell Lymphome deutlich unterscheidet.

4.5 Zwei unterschiedliche Wege in der ETL-Pathogenese

Neben der Häufigkeit der Aberrationen in den einzelnen Regionen wurde das Verhältnis der Imbalancen zueinander analysiert. Darauf aufbauend ließen sich die Tumoren in zwei Gruppen mit charakteristischen Genotypkonstellationen einteilen. Fünf Tumoren (20%) zeigten Imbalancen in 3q27.2 und waren bezüglich der Region 9q34 in allen Fällen unauffällig, während bei den elf Lymphomen (20%) der zweiten Gruppe in 9q34 Imbalancen gefunden wurden und gleichzeitig keinerlei Veränderungen in 3q27.2 auftraten. Weiter ließen sich die Tumoren der zweiten Gruppe unterteilen in fünf Tumoren (45,5%) mit und sechs Tumoren (54,5%) ohne Amplifikationen in 5q33.3-34. Diese Amplifikation war bei drei Lymphomen (60%) assoziiert mit LOH in 17p13.1 und 17q23-25.

Chromosomale Aberrationen, welche die Region 3q27 betreffen, finden sich bei B-Zell NHL mit großer Häufigkeit. In zwei Mikrosatelliten-Studien über gastrale MZBCL vom

MALT-Typ sowie DLBCL des Magens zeigten sich Amplifikationen dieser Region in 21% bzw. 16% der Fälle als sehr häufige Veränderung, welche für die Lymphompathogenese und -progression eine kritische Rolle spielen. [104, 105] Den hier untersuchten Markern D3S1530 und D3S1262 benachbart liegt das Bcl-6-Gen, ein Onkogen, welches als Transkriptionsfaktor bei der Keimzentriumbildung beteiligt ist. [106, 107] Ebenso könnte das Gen für die p110- α -katalytische Untereinheit der Phosphatidylinositolkinase (PIK3CA), welches als Onkogen bei Ovarial- [108] und Zervixkarzinomen [109] eine Rolle spielen soll, von den Imbalancen in 3q27.2 betroffen sein. Welche Bedeutung die Imbalancen in 3q27.2 für die ETL haben, ist ungewiss, insbesondere da in der vorliegenden Studie in dieser Region gleichzeitig Amplifikationen und LOH auftraten.

Tumoren mit allelischen Imbalancen in 9q34 zeigten nie Veränderungen in 3q27.2. Die Lymphome dieser Gruppe schlagen also möglicherweise einen völlig anderen Pathogeneseweg ein: Die vermehrte Expression eines Onkogens in dieser Region, wobei am ehesten Notch 1 oder c-abl in Frage kämen, bewirkt über Proliferationsverstärkung und Apoptoseinhibition das Tumorwachstum. Die Lymphome, bei denen sich auch Amplifikationen in 5q33.3-34 fanden, müssen als weitere Gruppe abgegrenzt werden: Noch ist kein Onkogen in dieser Region bekannt, und somit bleibt unklar, was eine Amplifikation hier bewirkt. Unter Berücksichtigung der Assoziationen von LOH in 17p13.1 und 17q23-25 bei drei Lymphomen könnte man annehmen, dass diese Tumoren unter Umständen eine besonders aggressive Subgruppe darstellen, die sich zum Teil durch assoziierte späte Deletionen in Genen wie TIMP 2 und p53 auszeichnet.

4.6 Zusammenhang zwischen der Umlagerung des T-Zell-Rezeptor- γ -Gens und den allelischen Imbalancen

Um die Klonalität von Tumor- und Normalgewebeproben zu bestimmen, wurden zu Beginn der Studie bei allen DNA-Proben die Umlagerung der VJ-Verbindung des T-Zell-Rezeptor- γ -Gens untersucht. Bei der Analyse der allelischen Imbalancen im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser TCR γ -Untersuchung traten deutliche Unterschiede bezüglich des Vorkommens und der Häufigkeit der Aberrationen zutage. Ausschließlich bei Lymphomen mit monoallelischer TCR-Genumlagerung kamen

allelische Imbalancen der Regionen 5q21.1 und 3q27.2, sowie LOH in 4q28 und 13q14.2 vor. Als möglicherweise betroffene Gene, welche bei der Tumorentstehung und -progression eine Rolle spielen könnten, liegen in 5q21.1 das APC-Gen und in 3q27.2 die Gene für Bcl-6 und PIK3CA. Die Deletionen der Region 4q28 betreffen wohl ein noch unbekanntes Tumorsuppressorgen. In der Region 13q14.2 kommt das Retinoblastomgen (Rb), welches in der Kontrolle des normalen Zellzyklus eine Rolle spielt, als involviertes Gen in Betracht. [110, 111]

Die monoallelischen ETL zeigten nicht nur diese spezifischen allelischen Imbalancen, sondern sie wiesen insgesamt signifikant häufiger Aberrationen auf als die biallelischen Lymphome ($p=0,045$ im einseitigen exakten Fisher-Test). Bezüglich der Prognose der Patienten bestand jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so könnten sie ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei den ETL um eine heterogene Gruppe von Lymphomen handelt, von denen die monoallelischen Vertreter früher und schneller Aberrationen entwickeln. Die allelischen Imbalancen an vier Orten bekannter Onkogene und Tumorsuppressorgene, welche sich ausschließlich bei den monoallelischen Lymphomen finden, ermöglichen diesen Tumoren unter Umständen, weitere Aberrationen anzusammeln und damit der Regulation und Kontrolle des Zellzyklus zu entgehen.

4.7 Untergeordnete Bedeutung von MSI für die Pathogenese der ETL

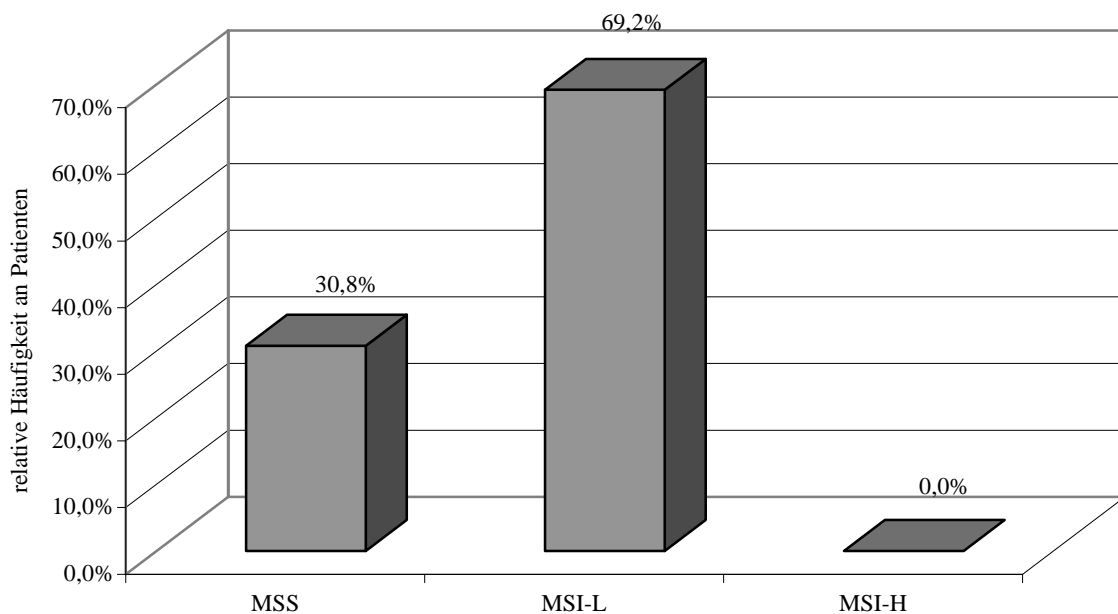
Es werden als klassische Tumorprogressionswege „suppressor“ und „mutator pathway“ unterschieden. [31, 32] Bei letzterem fallen sogenannte caretaker Gene, also DNA-mismatch repair Gene aus, was vermehrte Mutationen und schließlich auch den Verlust von Tumorsuppressorgen nach sich zieht. Kennzeichnend für die genomische Instabilität ist das Vorkommen von MSI. Einige Tumoren, deren typischer Vertreter das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPCC) ist, schlagen in ihrer Pathogenese genau diesen Weg ein. MSI wurde aber auch bei sporadischen Tumoren beschrieben.[112]

Den Kriterien von Boland et al. [43] zur Bestimmung der Mikrosatelliteninstabilität bei kolorektalen Karzinomen folgend lassen sich drei Kategorien von MSI-Häufigkeit unterscheiden: MSI-H (große Häufigkeit an MSI), MSI-L (geringe Häufigkeit an MSI) und MSS (Mikrosatellitenstabilität). Um einen Patienten in die Gruppe MSI-H

einordnen zu können, muss er an mindestens zwei von fünf untersuchten Markern MSI zeigen. MSI-L ist definiert als MSI an einem von fünf Markern. Tritt an keinem Marker MSI auf, so bezeichnet man dies als MSS. Bei einer Untersuchung mit mehr als fünf Markern, wie in dieser Arbeit mit 47 Markern, werden für die Kategorie MSI-H mehr als 30-40% MSI-aufweisende Marker gefordert. MSI-L ist dann definiert als MSI bei weniger als 30-40% der Marker.

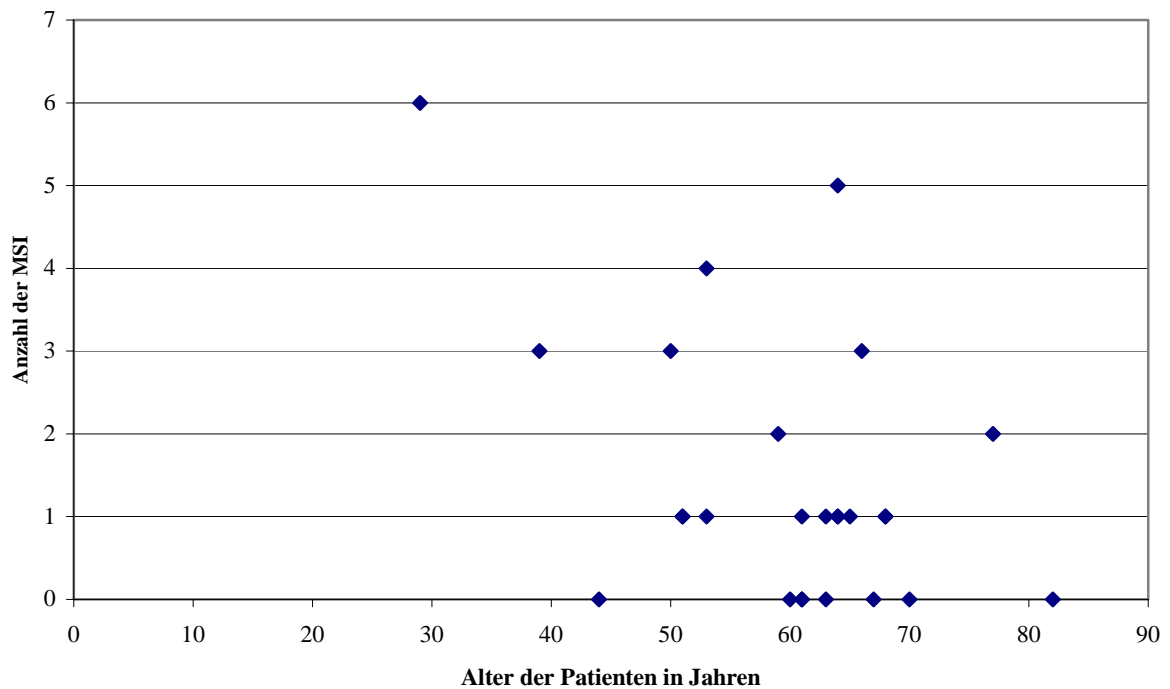
Bei den 18 Patienten, die in der vorliegenden Untersuchung MSI zeigten, lag die MSI-Häufigkeit in jedem Fall unter 15%, sodass alle in die Kategorie MSI-L einzuordnen waren. Acht Patienten wiesen an keinem Marker MSI auf (MSS); die Kategorie MSI-H kam nicht vor. Eine Übersicht über die Verteilung der Patienten auf die einzelnen MSI-Häufigkeits-Kategorien zeigt Abbildung 12:

Abbildung 12: Verteilung der Patienten auf die einzelnen MSI-Häufigkeitskategorien



Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei gastralen diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL), bei denen die Häufigkeit der MSI mit dem Alter der Patienten deutlich zunimmt, [104, 113] konnte für die ETL keinerlei Zusammenhang zwischen Patientenalter und MSI-Häufigkeit festgestellt werden (siehe Abbildung 13).

Abbildung 13: Alter der Patienten und MSI-Häufigkeit



Angesichts ihrer geringen Häufigkeit bei ETL im Vergleich zu solchen Tumoren, die dem „mutator pathway“ folgen, scheint MSI für die Pathogenese dieser Lymphome lediglich eine untergeordnete Bedeutung zu haben und ist im Rahmen der Tumorprogression wohl nur als ein Begleitphänomen zu interpretieren.

4.8 Erste Hinweise auf Unterschiede zwischen CD56+ und CD56- ETL auf molekularer Ebene

Charakteristische Unterschiede in Vorkommen und Häufigkeit von MSI bestand zwischen den CD56+ und CD56- ETL: MSI trat nämlich bei den CD56+ signifikant seltener auf als bei den CD56- ($p=0,0082$ im einseitigen exakten Fisher-Test). Die am häufigsten im Sinne von MSI veränderten Marker D6S441, D5S82 und D9S1847 waren ausschließlich bei CD56- Lymphomen betroffen.

Beim Glykoprotein CD56 handelt es sich um eine 140 kd schwere Isoform des Nervenzellenadhäsionsmoleküls (N-CAM), das in verschiedenen Geweben gefunden wird. CD56 ist ein typischer Marker Natürlicher Killerzellen (NK), wird aber auch von Nervengewebe, neuroendokrinen und endokrinen Organen sowie einer kleinen Gruppe von T-Lymphozyten exprimiert. [114-116] Innerhalb der hämatologischen Tumoren

kommt CD56 bei NK-Zell-Lymphomen/Leukämien und bei einigen peripheren T-Zell-Lymphomen vor. [8]

Wie Chott et al in ihrer Studie über 70 ETL zeigen konnten, lässt sich die Gruppe der CD56+ Lymphome innerhalb der ETL aufgrund charakteristischer Befunde abgrenzen: Die untersuchten CD56+ ETL waren signifikant häufiger CD8+, gehörten dem monomorph klein- bis mittelzelligen Subtyp an, wiesen seltener enteropathietytische Veränderungen auf und waren häufiger auf das Ileum beschränkt. Bei keinem der Patienten mit CD56+ ETL war vorher eine Sprue bekannt und die Lymphome innerhalb dieser Gruppe manifestierten sich häufiger mit intestinaler Perforation als Erstsymptom. Bezüglich des Tumorstadiums und der Überlebenszeit fand sich jedoch kein Unterschied zwischen den zwei Gruppen, was wohl mit der hohen Aggressivität der Tumoren und dem weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung bei Diagnosestellung zu erklären ist. [19]

Das in der hier vorliegenden Arbeit gefundene Ergebnis von signifikant weniger MSI bei den CD56+ Tumoren und häufigem Vorkommen von MSI in spezifischen Markern ausschließlich bei CD56- ETL ist ein erster Hinweis darauf, dass neben den bereits bekannten morphologischen Befunden auch auf molekularer Ebene charakteristische Unterschiede zwischen den beiden Gruppen von ETL existieren. Möglicherweise deuten sich hier getrennte Pathogenesewege an, denen die CD56+ und CD56- Lymphome folgen.

5 Zusammenfassung

Bislang bestand noch zu wenig Erkenntnis über die molekulargenetischen Veränderungen, die der Entstehung und Progression von ETL zugrunde liegen. Um erste Einsichten in die Art und Häufigkeit der genetischen Aberrationen dieser Lymphome zu erlangen und über charakteristische Veränderungsmuster Hinweise auf mögliche Pathogenesemechanismen zu gewinnen, wurden 26 ETL Fälle mit 47 Mikrosatellitenmarkern untersucht.

Es stellte sich in dieser Untersuchung heraus, dass Amplifikationen und LOH wegbereitend für die Entstehung und Ausbreitung dieser Lymphome sind, wohingegen der „mutator pathway“ in der ETL Pathogenese von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint und das Auftreten von MSI wohl nur als ein Begleitphänomen zu werten ist. Unterschiede im Vorkommen von MSI zeigten sich jedoch in Abhängigkeit von der Expression des Oberflächenmarkers CD56: CD56+ ETL zeigten signifikant seltener MSI als die CD56- Lymphome ($p=0,0082$ im einseitigen exakten Fisher-Test). Häufige MSI in D6S441, D5S82 und D9S1847 kamen ausschließlich bei CD56- ETL vor. Somit ließen sich erstmals auch auf molekularer Ebene Charakteristika finden, welche die Abgrenzung der CD56+ Lymphome innerhalb der ETL ermöglichen.

Die ETL zeigten sehr häufig Aberrationen. Dabei wies die Region 9q34 mit 44% allelischen Imbalancen den höchsten Anteil an Veränderungen auf. Hier befinden sich unter anderem die Genloci von Notch 1, welches eine entscheidende Rolle in der T-Zell-Entwicklung spielt, und c-abl, das bei Regulationsvorgängen im Zellzyklus mitwirkt. Außerdem zeigten sich Imbalancen im TIMP 2 Locus in 17q23-25 bei 40% der Tumoren, sowie LOH im p53 Locus in 17p13.1 (26,9%) und in 5q21.1, der Lokalisation des APC Gens (29,2%). Weitere häufige allelische Imbalancen wurden in 7q31 (40%), 5q33-34 (38,5%), 1q41 (36,4%), 7p21 (32%) und 6p24 (28%) gefunden.

Interessanterweise zeigten ETL Fälle mit monoallelischer Umlagerung des Gens der T-Zell- Rezeptor- γ -Untereinheit signifikant häufiger Aberrationen als biallelische Lymphome ($p=0,045$ im einseitigen exakten Fisher-Test). Allelische Imbalancen der Regionen 5q21.1, 3q27.2, 13q14.2 und 4q28 traten ausschließlich bei den monoallelischen Tumoren auf.

Auf der Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung ließen sich ETL in zwei Gruppen von Tumoren einteilen, welche möglicherweise verschiedene Pathogenesewege einschlagen. Eine erste Gruppe mit allelischen Imbalancen in 3q27.2

und eine zweite Gruppe mit Aberrationen in 9q34. Bei den Lymphomen der zweiten Gruppe konnte eine Subgruppe mit zusätzlichen Amplifikationen in 5q33.3-34 abgegrenzt werden, welche wiederum bei einem Teil der Tumoren assoziierte LOH der Regionen 17q23-25 und 17p13.1 aufwiesen.

6 Abkürzungen

abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
ALCL	Anaplastisch großzelliges Lymphom
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Einfach destilliertes Wasser
BC	biklonal
bcl	B-cell lymphoma
bcr	breakpoint cluster region
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CA	Kalifornien
CD	cluster of differentiation
CDK	Cyclinabhängige Kinase
CGH	comparative genomic hybridization
CML	Chronische myeloische Leukämie
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DLC	deleted in liver cancer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DR	death receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETL	Enteropathie-Typ T-Zell-Lymphom
FU	Fluoreszenz-Einheiten
g	Gramm
GEF	Guanosinnukleotid Austauschfaktor
H ₂ O	Wasser
HDAC	Histondeacetylase
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HERP	HES-related repressor protein
HES	hairy enhancer of split
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HNPCC	Hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom
HRT	hairy-related transcription factor
KCl	Kaliumchlorid
kd	Kilodalton
LHX	LIM homeo box
LOH	Verlust der Heterozygotie
M	Mol
mA	Milliampere

MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
Mbp	Megabasenpaare
MC	monoklonal
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	Millimol
ml	Milliliter
ml	Mikroliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	große Häufigkeit an MSI
MSI-L	geringe Häufigkeit an MSI
MSS	Mikrosatellitenstabilität
MT-MMP	Membrantyp-Matrixmetalloproteinase
MZBCL	Marginalzonen B-Zell Lymphom
NaCl	Natriumchlorid
N-CAM	Nervenzellenadhäsionsmolekül
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK	Natürliche Killerzellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFRL	platelet derived growth factor receptor-like
PIK	Phosphatidylinositolkinase
pmol	Pikomol
P-TEF	positive transcription elongation factor
Rb	Retinoblastom
REAL Klassifikation	Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TrisCl	Trischlorid
TrisHCl	Trishydrochlorid
V	Volt
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
+	positiv
-	negativ

7 Literaturverzeichnis

1. Fairley, N.H. and F.P. Mackie, The clinical and biochemical syndrome in lymphadenoma and allied diseases involving the mesenteric lymph glands. *British Medical Journal*, 1937. 1: p. 3972-3980.
2. Gough, K.R., A.E. Read, and J.M. Naish, Intestinal reticulosis as a complication of idiopathic steatorrhoea. *Gut*, 1962. 3: p. 232-239.
3. Isaacson, P. and D.H. Wright, Intestinal lymphoma associated with malabsorption. *Lancet*, 1978. 1(8055): p. 67-70.
4. Isaacson, P. and D.H. Wright, Malignant Histiocytosis of the Intestine; its Relationship to Malabsorption and Ulcerative Jejunitis. *Human Pathology*, 1978. 9(6): p. 661-677.
5. Isaacson, P.G., et al., Malignant histiocytosis of the intestine: a T-cell lymphoma. *Lancet*, 1985. 2(8457): p. 688-91.
6. O'Farrelly, C., et al., Humoral response to wheat protein in patients with coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1986. 293(6552): p. 908-10.
7. Harris, N.L., et al., A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 1994. 84(5): p. 1361-92.
8. Jaffe, E.S., et al., eds. *Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. World Health Organization Classification of Tumours, ed. S.L.H. Kleihues P. 2001, IARC Press: Lyon.
9. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*, 1997. 89(11): p. 3909-18.
10. Isaacson, P.G. and A.J. Norton, Enteropathy-associated t-cell lymphoma (EATL), in *Extranodal Lymphomas*, N. Isaacson, Editor. 1994, Churchill Livingstone. p. 55-65.
11. Gale, J., et al., Enteropathy-type intestinal T-cell lymphoma: clinical features and treatment of 31 patients in a single center. *J Clin Oncol*, 2000. 18(4): p. 795-803.
12. Wright, D.H., Enteropathy associated T cell lymphoma. *Cancer Surv*, 1997. 30: p. 249-61.

13. Isaacson, P.G., Intestinal (enteropathy-associated) T cell lymphoma, in *Human Lymphoma: Clinical Implications of the REAL Classification*, H.N.L. Mason D.Y., Editor. 1999, Springer-Verlag: London. p. 36.1-36.4.
14. Musshoff, K., [Clinical staging classification of non-Hodgkin's lymphomas (author's transl)]. *Strahlentherapie*, 1977. 153(4): p. 218-21.
15. Spencer, J., et al., Enteropathy-associated T cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine) is recognized by a monoclonal antibody (HML-1) that defines a membrane molecule on human mucosal lymphocytes. *Am J Pathol*, 1988. 132(1): p. 1-5.
16. Chott, A., B. Dragosics, and T. Radaszkiewicz, Peripheral T-cell lymphomas of the intestine. *Am J Pathol*, 1992. 141(6): p. 1361-71.
17. Bagdi, E., et al., Mucosal intra-epithelial lymphocytes in enteropathy-associated T-cell lymphoma, ulcerative jejunitis, and refractory celiac disease constitute a neoplastic population. *Blood*, 1999. 94(1): p. 260-4.
18. de Bruin, P.C., et al., Enteropathy-associated T-cell lymphomas have a cytotoxic T-cell phenotype. *Histopathology*, 1997. 31(4): p. 313-7.
19. Chott, A., et al., Most CD56+ intestinal lymphomas are CD8+CD5-T-cell lymphomas of monomorphic small to medium size histology. *Am J Pathol*, 1998. 153(5): p. 1483-90.
20. Murray, A., et al., Study of the immunohistochemistry and T cell clonality of enteropathy-associated T cell lymphoma. *Am J Pathol*, 1995. 146(2): p. 509-19.
21. Ashton-Key, M., et al., Molecular analysis of T-cell clonality in ulcerative jejunitis and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Am J Pathol*, 1997. 151(2): p. 493-8.
22. Howell, W.M., et al., HLA-DRB, -DQA, and -DQB polymorphism in celiac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma. Common features and additional risk factors for malignancy. *Hum Immunol*, 1995. 43(1): p. 29-37.
23. Ryan, B.M. and D. Kelleher, Refractory celiac disease. *Gastroenterology*, 2000. 119(1): p. 243-51.
24. Biagi, F., P. Lorenzini, and G.R. Corazza, Literature review on the clinical relationship between ulcerative jejunoileitis, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell. *Scand J Gastroenterol*, 2000. 35(8): p. 785-90.
25. Cellier, C., et al., Abnormal intestinal intraepithelial lymphocytes in refractory sprue. *Gastroenterology*, 1998. 114(3): p. 471-81.

26. Cellier, C., et al., Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. *Lancet*, 2000. 356(9225): p. 203-8.
27. Carbonnel, F., et al., Are complicated forms of celiac disease cryptic T-cell lymphomas? *Blood*, 1998. 92(10): p. 3879-86.
28. Daum, S., et al., Refractory sprue syndrome with clonal intraepithelial lymphocytes evolving into overt enteropathy-type intestinal T-cell lymphoma. *Digestion*, 2000. 62(1): p. 60-5.
29. Ruskone-Fourmestreaux, A. and J.C. Rambaud, Gastrointestinal lymphoma: prevention and treatment of early lesions. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2001. 15(2): p. 337-54.
30. Isaacson, P.G., Relation between cryptic intestinal lymphoma and refractory sprue. *Lancet*, 2000. 356(9225): p. 178-9.
31. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 1997. 386(6627): p. 761, 763.
32. Perucho, M., Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med*, 1996. 2(6): p. 630-1.
33. Wright, D.H., et al., Is adult-onset coeliac disease due to a low-grade lymphoma of intraepithelial T lymphocytes? *Lancet*, 1991. 337(8754): p. 1373-4.
34. Carbonnel, F., et al., Extensive small intestinal T-cell lymphoma of low-grade malignancy associated with a new chromosomal translocation. *Cancer*, 1994. 73(4): p. 1286-91.
35. Ott, G., et al., Chromosomal abnormalities in nodal and extranodal CD30+ anaplastic large cell lymphomas: infrequent detection of the t(2;5) in extranodal lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998. 22(2): p. 114-21.
36. Zettl, Chromosomal Gains at 9q Characterize Enteropathy-Type T-Cell Lymphoma. *American Journal of Pathology*, 2002. 161(5): p. 1635-1645.
37. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press.
38. Trainor, K.J., et al., Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood*, 1991. 78(1): p. 192-6.
39. Naidoo, R. and R. Chetty, The application of microsatellites in molecular pathology. *Pathol Oncol Res*, 1998. 4(4): p. 310-5.

40. Pharoah, P.D.P. and C. C., Molecular genetics and the assessment of human cancers. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 1999. 11 March 1999: p. 1-19.
41. GeneScan Reference Guide. Chemistry Reference for the ABI Prism 377 and ABI TM 373 DNA Sequencers. 1997.
42. ABI PRISM 377 DNA Sequencer. For Sequencing and GeneScan Analysis Software Applications User's Manual. 1998.
43. Boland, C.R., et al., A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, 1998. 58(22): p. 5248-57.
44. Renedo, M., et al., Chromosomal changes pattern and gene amplification in T cell non- Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*, 2001. 15(10): p. 1627-32.
45. Stier, S., et al., Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*, 2002. 99(7): p. 2369-78.
46. Varnum-Finney, B., et al., Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*, 2000. 6(11): p. 1278-81.
47. Karanu, F.N., et al., The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 2000. 192(9): p. 1365-72.
48. Izon, D.J., J.A. Punt, and W.S. Pear, Deciphering the role of Notch signaling in lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol*, 2002. 14(2): p. 192-9.
49. Anderson, A.C., E.A. Robey, and Y.H. Huang, Notch signaling in lymphocyte development. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. 11(5): p. 554-60.
50. Robey, E., Regulation of T cell fate by Notch. *Annu Rev Immunol*, 1999. 17: p. 283-95.
51. Koch, U., et al., Subversion of the T/B lineage decision in the thymus by lunatic fringe- mediated inhibition of Notch-1. *Immunity*, 2001. 15(2): p. 225-36.
52. Milner, L.A. and A. Bigas, Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*, 1999. 93(8): p. 2431-48.
53. Artavanis-Tsakonas, S., M.D. Rand, and R.J. Lake, Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 1999. 284(5415): p. 770-6.

54. Ellisen, L.W., et al., TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, 1991. 66(4): p. 649-61.
55. Aster, J.C., et al., Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(20): p. 7505-15.
56. Pear, W.S., et al., Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med*, 1996. 183(5): p. 2283-91.
57. Jundt, F., et al., Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 2002. 99(9): p. 3398-3403.
58. Jehn, B.M., et al., Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J Immunol*, 1999. 162(2): p. 635-8.
59. Zagouras, P., et al., Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(14): p. 6414-8.
60. Liu, Y., et al., Epithelial expression and chromosomal location of human TLE genes: implications for notch signaling and neoplasia. *Genomics*, 1996. 31(1): p. 58-64.
61. Sawyers, C.L., Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 1999. 340(17): p. 1330-40.
62. Van Etten, R.A., Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol*, 1999. 9(5): p. 179-86.
63. Shaul, Y., c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ*, 2000. 7(1): p. 10-6.
64. Wang, J.Y., Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene*, 2000. 19(49): p. 5643-50.
65. Kharbanda, S., et al., Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene*, 1998. 17(25): p. 3309-18.
66. Kalidas, M., H. Kantarjian, and M. Talpaz, Chronic myelogenous leukemia. *Jama*, 2001. 286(8): p. 895-8.
67. Sattler, M. and J.D. Griffin, Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene. *Int J Hematol*, 2001. 73(3): p. 278-91.

68. Maru, Y., Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*, 2001. 73(3): p. 308-22.
69. Mauro, M.J. and B.J. Druker, STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. *Oncologist*, 2001. 6(3): p. 233-8.
70. Sattler, M. and R. Salgia, Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1997. 8(1): p. 63-79.
71. Wu, H.K., et al., Identification of a human LIM-Hox gene, hLH-2, aberrantly expressed in chronic myelogenous leukaemia and located on 9q33-34.1. *Oncogene*, 1996. 12(6): p. 1205-12.
72. Grana, X., et al., PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(9): p. 3834-8.
73. Garriga, J., X. Mayol, and X. Grana, The CDC2-related kinase PITALRE is the catalytic subunit of active multimeric protein complexes. *Biochem J*, 1996. 319(Pt 1): p. 293-8.
74. Bustelo, X.R., Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(5): p. 1461-77.
75. Stetler-Stevenson, W.G., H.C. Krutzsch, and L.A. Liotta, Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem*, 1989. 264(29): p. 17374-8.
76. De Clerck, Y., et al., The gene for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is localized on human chromosome arm 17q25. *Genomics*, 1992. 14(3): p. 782-4.
77. Hammani, K., et al., Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene. *J Biol Chem*, 1996. 271(41): p. 25498-505.
78. Kallakury, B.V., et al., Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(10): p. 3113-9.
79. Gomez, D.E., et al., Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 1997. 74(2): p. 111-22.
80. Bramhall, S.R., et al., Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol*, 1997. 182(3): p. 347-55.

81. Kawano, N., et al., Expression of gelatinase A, tissue inhibitor of metalloproteinases-2, matrilysin, and trypsin(ogen) in lung neoplasms: an immunohistochemical study. *Hum Pathol*, 1997. 28(5): p. 613-22.
82. Watanabe, M., et al., Inhibition of metastasis in human gastric cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene in nude mice. *Cancer*, 1996. 77(8 Suppl): p. 1676-80.
83. Bramhall, S.R., et al., Expression of collagenase (MMP2), stromelysin (MMP3) and tissue inhibitor of the metalloproteinases (TIMP1) in pancreatic and ampullary disease. *Br J Cancer*, 1996. 73(8): p. 972-8.
84. Rigg, A.S. and N.R. Lemoine, Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect in vivo. *Cancer Gene Ther*, 2001. 8(11): p. 869-78.
85. Alonso, D.F., et al., Histopathological findings in a highly invasive mouse mammary carcinoma transfected with human tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Oncol Rep*, 1998. 5(5): p. 1083-7.
86. Nemeth, J.A., et al., TIMP-2 growth-stimulatory activity: a concentration- and cell type- specific response in the presence of insulin. *Exp Cell Res*, 1996. 224(1): p. 110-5.
87. Murashige, M., et al., Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. *Jpn J Clin Oncol*, 1996. 26(5): p. 303-9.
88. Ree, A.H., et al., High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin Cancer Res*, 1997. 3(9): p. 1623-8.
89. Grignon, D.J., et al., High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res*, 1996. 56(7): p. 1654-9.
90. Toth, M., et al., Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro- MMP-2. *J Biol Chem*, 2000. 275(52): p. 41415-23.
91. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, p53 function and dysfunction. *Cell*, 1992. 70(4): p. 523-6.

92. Harris, C.C. and M. Hollstein, Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*, 1993. 329(18): p. 1318-27.
93. Levine, A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997. 88(3): p. 323-31.
94. el-Deiry, W.S., et al., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993. 75(4): p. 817-25.
95. Dean, M., et al., The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. *Nature*, 1985. 318(6044): p. 385-8.
96. Park, M., et al., Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(18): p. 6379-83.
97. de Martin, R., et al., Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. *Embo J*, 1987. 6(12): p. 3673-7.
98. Zhou, X., et al., Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(19): p. 10572-7.
99. Bertos, N.R., A.H. Wang, and X.J. Yang, Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol*, 2001. 79(3): p. 243-52.
100. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. 11(2): p. 255-60.
101. Yuan, B.Z., et al., Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer Res*, 1998. 58(10): p. 2196-9.
102. Fujiwara, Y., et al., Isolation of a candidate tumor suppressor gene on chromosome 8p21.3-p22 that is homologous to an extracellular domain of the PDGF receptor beta gene. *Oncogene*, 1995. 10(5): p. 891-5.
103. Fearnhead, N.S., M.P. Britton, and W.F. Bodmer, The ABC of APC. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(7): p. 721-33.
104. Starostik, P., et al., Genetic aberrations common in gastric high-grade large B-cell lymphoma. *Blood*, 2000. 95(4): p. 1180-7.
105. Starostik, P., et al., Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. *Blood*, 2002. 99(1): p. 3-9.
106. Cattoretti, G., et al., BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*, 1995. 86(1): p. 45-53.

107. Ye, B.H., et al., The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2- type inflammation. *Nat Genet*, 1997. 16(2): p. 161-70.
108. Shayesteh, L., et al., PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*, 1999. 21(1): p. 99-102.
109. Ma, Y.Y., et al., PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene*, 2000. 19(23): p. 2739-44.
110. Weinberg, R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995. 81(3): p. 323-30.
111. Nevins, J.R., The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet*, 2001. 10(7): p. 699-703.
112. Wooster, R., et al., Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet*, 1994. 6(2): p. 152-6.
113. Starostik, P., et al., The role of microsatellite instability in gastric low- and high-grade lymphoma development. *Am J Pathol*, 2000. 157(4): p. 1129-36.
114. Schubert, J., L.L. Lanier, and R.E. Schmidt, Cluster Report: CD56, in *Leucocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens*, W. Knapp, Editor. 1992, Oxford University Press. p. 699-702.
115. Wong, K.F., et al., CD56 (NKH1)-positive hematolymphoid malignancies: an aggressive neoplasm featuring frequent cutaneous/mucosal involvement, cytoplasmic azurophilic granules, and angiocentricity. *Hum Pathol*, 1992. 23(7): p. 798-804.
116. Zeromski, J., E. Nyczak, and W. Dyszkiewicz, Significance of cell adhesion molecules, CD56/NCAM in particular, in human tumor growth and spreading. *Folia Histochem Cytobiol*, 2001. 39(Suppl 2): p. 36-7.

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Pathologischen Institut der Universität Würzburg, Vorstand: Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink, in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. med. P. Starostik. Ihm möchte ich danken für seine Ideen, die Begleitung bei meiner ersten Begegnung mit der Molekulargenetik und die gute Betreuung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. A. Zetl für seine Anregung und Hilfe und für Erklärungen bei meinen Fragen zur Pathologie der malignen Lymphome.

Danken möchte ich Frau E. Eckenreiter, die mir mit ihrer langjährigen Erfahrung immer bereitwillig in praktisch-technischen Fragen zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink danke ich für die Möglichkeit, im Pathologischen Institut zu promovieren.

Mein Dank gilt darüber hinaus all denen, die mich in der langen Zeit meiner Doktorarbeit begleitet haben und mir ermöglichten, Hoffnung und Humor zu behalten.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für die Unterstützung meines beruflichen Weges, für ihren Rat und ihr Vertrauen und für die Liebe, die ich in meinem Zuhause erfahren durfte.

Lebenslauf Anne Katrin Baumgärtner

A.-B.-Franken-Str.21

63864 Glattbach

Telefon: 06021/46839

annebaumgaertner@web.de

Persönliche Angaben:

Geburtsdatum: 1. Februar 1978
Geburtsort: Aschaffenburg
Familienstand: ledig
Vater: Dr. med. Wilfried Baumgärtner, Frauenarzt
Mutter: Dr. med. Margot Baumgärtner, Kinderärztin

Schulbildung:

1984-1988 Verbandsschule Glattbach
1988-1997 Karl-Theodor-von Dalberg-Gymnasium, Aschaffenburg
1997 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1997-2004 Studium der Humanmedizin, Bayer. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
09/1999 Ärztliche Vorprüfung
08/2000 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
03/2003 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
05/2004 Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

Praktika:

06-08/1997 Krankenpflegepraktikum Medizinische Klinik II, Klinikum Aschaffenburg
03/1998 Praktikum, Gynäkologische Abteilung, Kreiskrankenhaus Alzenau-Wasserlos
03/1999 Praktikum, Chirurgische Abteilung, Kreiskrankenhaus Alzenau-Wasserlos

Famulaturen:

03/2000 Innere Medizin (Kardiologie und Intensivmedizin), Medizinische Klinik I, Klinikum Aschaffenburg
09/2000 Gynäkologie und Geburtshilfe, Stepping Hill Hospital, Stockport, England
08/2001 Allgemeinmedizin, Fairmont Clinic, Mayo Health System, Fairmont, MN, USA

07/2002 Gynäkologie und Geburtshilfe, Praxis Dres. med. Baumgärtner/Lang,
Aschaffenburg
08/2002 Kinder- und Jugendpsychiatrie, Universitätsklinik, Lübeck

Praktisches Jahr:

Innere Medizin 04-06/2003 Medical College of Virginia at Virginia Commonwealth
University, Richmond, VA, USA:
Allgemeine Innere Medizin, Nephrologie
08-10/2003 Wellington School of Medicine, Wellington, Neuseeland:
Kardiologie, Endokrinologie

Chirurgie 06-08/2003 Memorial University of Newfoundland, St. John's,
Kanada:
Allgemeine Chirurgie, Notaufnahme
11-12/2003 Chirurgische Universitätsklinik, Würzburg:
Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

Kinderheilkunde 12/2003-03/2004 Universitätskinderklinik, Würzburg:
Neuropädiatrie, Neonatologie, Perinatalzentrum, pädiatrische
Urologie/Nephrologie

Dissertation:

Analyse genetischer Aberrationen von Enteropathie-Typ T-Zell-
Lymphomen
Doktorvater: Prof. Dr. med. H.K. Müller-Hermelink, Institut für
Pathologie, Universität Würzburg

Kongressbeitrag und Publikation:

Petr Starostik, Anne K. Baumgärtner, Andreas Zettl, Andreas Chott,
German Ott, Hans Konrad Müller-Hermelink: 9q34 Amplifications
Define the Pathogenesis of Enteropathy-Associated T-Cell Lymphoma,
Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH),
Dezember 2002, Philadelphia, USA

Anne K. Baumgärtner, Andreas Zettl, Andreas Chott, German Ott,
Hans Konrad Müller-Hermelink, Petr Starostik: High Frequency of
Genetic Aberrations in Enteropathy-Type T-Cell Lymphoma,
Laboratory Investigation, Vol.83, No.10, 2003

Stipendien:

1997-2003 Stipendiatin der Bayerischen Begabtenförderung
2000-2004 Stipendiatin des Cusanuswerks, Bischöfliche Studienförderung

Sprachkenntnisse:

Englisch, Latein, Französisch, Spanisch
1995 Cambridge Certificate in Advanced English
1997 Cambridge Certificate of Proficiency in English

Besondere Interessen/ Engagement:

1997-2003 Mitarbeit im Studentenverband Ethik in der Medizin, Würzburg
1997-2001 Mitwirkung im Akademischen Orchester der Universität Würzburg
(Violine)
seit 1995 Mitglied der Aschaffener Bachsolisten

Würzburg, 17.5.2004