

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

**Genetische Aberrationen in sekundären gastralen diffusen
großzelligen B-Zell Lymphome**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von:
Camelia Maria Monoranu
aus Targu-Mures (Rumänien)

Würzburg, Juni 2006

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

Koreferent: Prof. Dr. W. Roggendorf

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2006

Die Promovendin ist Ärztin:

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Einordnung und Charakteristika der gastralen Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ	1
1.2	Zielsetzung dieser Arbeit	5
2.	Material und Methoden	6
2.1	Untersuchungsmaterial	6
2.2	Untersuchungsmethoden	6
2.2.1	Mikrodissektion	6
2.2.2	Gewinnung genomischer DNA	7
2.2.3	Kontrolle der Klonalität von Tumor- und Kontrollgewebe	8
2.2.4	DNA-Sequenzierung	9
2.2.5	Mikrosatellitenanalyse	14
2.2.5.1	Auswahl der Mikrosatellitenmarker	14
2.2.5.2	Polymerasekettenreaktion für Mikrosatellitenanalyse	16
2.2.5.3	Polyacrylamidgelelektrophorese	16
2.2.5.4	Analyse der Elektrophorese	16
3.	Ergebnisse	18
3.1	Patientendaten	18
3.2	Ergebnisse der Klonalitätsanalyse	18
3.3	Ergebnisse der Sequenzanalyse	21
3.4	Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse	26
3.4.1	Amplifikationen auf 3q und Deletionen auf 6q sind die häufigsten detektierten Veränderungen in sekundären gastralen DLBCL	26

3.4.2	Gastrale Lymphome vom MALT-Typ zeigen weniger genomische Aberrationen als die sekundären DLBCL	27
3.4.3	Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) spielt in der Pathogenese gastraler DLBCL vom MALT-Typ keine bedeutende Rolle	31
4.	Diskussion	31
5.	Zusammenfassung	38
6.	Anhang	40
6.1	Verwendete Abkürzungen	40
6.2	PCR-Ansätze und PCR-Programme	41
6.2.1	PCR-Ansatz (pro Reaktion) und Programm für Klonalitätsanalyse	41
6.2.2	PCR-Ansatz (pro Reaktion) und Programme für Mikrosatellitenanalyse	42
6.3	Zusammensetzung verwendeter Lösungen	42
7.	Literaturverzeichnis	44

1. Einleitung

1.1 Einordnung und Charakteristika der gastralen Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ

Seit der Einführung der WHO-Klassifikation im Jahr 2001¹ unterscheidet man innerhalb der Non-Hodgkin Lymphome (NHL) drei Gruppen von Marginalzonen B-Zell-Lymphome (MZBCL): das nodale MZBCL, das splenische MZBCL und das extranodale MZBCL vom MALT-Typ (Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe). Bei der WHO-Klassifikation werden die malignen Lymphome anhand ihrer biologischen Eigenschaften im Vergleich zu dem putativen normalen Gegenstück eingeteilt, so dass es sich bei den MZBCL um entartete B-Zellen handelt, die von ihrer Differenzierungsstufe phänotypisch, immunologisch und molekular den Marginalzonen-B-Zellen entsprechen.

Die häufigste Form ist das extranodale MZBCL vom MALT-Typ (MALT-Typ Lymphom). Diese Tumoren treten bevorzugt im Magen auf, seltener auch in anderen Organen (wie z. B. Speicheldrüsen, Schilddrüse, Lunge)^{2,3}

Das klinische Verhalten ist oft indolent³ und die Tumoren treten vornehmlich im höheren Lebensalter mit einer Häufung in der 7. Lebensdekade auf.

Die Stadieneinteilung der gastralen MALT-Typ Lymphome erfolgt nach der modifizierten Ann-Arbor Klassifikation nach Musshoff⁴ in vier Stadien (EI-EIV).

Makroskopisch findet man meistens multifokale flache infiltrative und zum Teil ulzerierende, seltener exophytische Läsionen.^{3,5}

1983 wurde von Isaacson et al das Konzept des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes (MALT) eingeführt⁶. In der nachfolgenden Zeit wurde dabei das Paradoxon beobachtet, dass der Magen, der unter normalen Zuständen kein eigenes lymphatisches Gewebe aufweist, ein sogenanntes sekundäres MALT in Folge einer chronischen Entzündung speziell durch eine Besiedlung mit *Helicobacter pylori* (H.p.) und einer damit verbundenen lymphfollikulären Gastritis ausbildet³.

Dass der Prozess der MALT-Lymphomentwicklung, offenbar noch lange Zeit nach der Tumorexpansion von lokaler Antigenstimulation abhängig ist wird durch die Tatsache

hervorgehoben, dass in vielen Fällen die gastralen MZBCL vom MALT-Typ durch Antibiotikatherapie gegen *Helicobacter pylori* eradiziert werden können^{3,7,8}.

Während die meisten gastralen MALT-Typ Lymphome im weiteren Verlauf stabil bleiben, entwickelt sich nach mehreren Jahren in ungefähr einem Drittel der Fälle eine Progression in aggressive Tumoren, die nach der neuen WHO-Klassifikation¹ als diffuses großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL) bezeichnet werden. Werden in einem Tumor MALT-Typ Anteile und DLBCL simultan nachgewiesen spricht man von einem sekundären gastralen DLBCL. Das Verhältnis der MALT-Typ Zellkomponente zu der blastären DLBCL-Zellkomponente kann gradet werden.⁹ Die Frage, ob und in welchem Ausmaß die DLBCL als blastäre Transformation gastraler MALT-Typ Lymphome zu verstehen sind, ist aber immer noch offen.

B-Zell Lymphome zeichnen sich gewöhnlich durch ein monoklonales Rearrangement der Schwerketten des Immunglobulins das sich auf dem Chromosom 14q23 befindet³. Die Analyse der CDR-3 Region des Immunglobulins für schwere Ketten mittels PCR zur Darstellung des Rearrangements dieser Region kann lediglich als indirekter Beweis der klonalen Identität der beiden Tumoranteile angenommen werden, wenn die Größe der klonalen Bande übereinstimmt¹⁰. Deshalb ist eine DNA-Sequenzierung der CDR-3-Region erforderlich um tatsächlich eine klonale Identität nachweisen zu können. Manche der bisherigen Studien die solche Sequenz-Analysen durchgeführt haben unterstützen die Theorie der direkten Tumorprogression eines MALT-Typ Lymphoms in ein DLBCL¹¹⁻¹³, andere hingegen deuten auf eine simultane Entwicklung des DLBCL hin^{14,15}.

Die gastralen MALT-Typ Lymphome charakterisieren sich wie auch andere hämathopathologische Entitäten durch verschiedene Chromosomalen Aberrationen.

Bisher wurden vereinzelt bestimmte genomische Aberrationen in gastralen Lymphome beschrieben, wie zum Beispiel die vermehrte Translokation t(11; 18)(q21; q21) die in mehr als 50% der extranodalen gastralen MZBCL vom MALT-Typ als spezifische chromosomale Aberration nachgewiesen werden kann.¹⁶⁻²²

Weitere Translokationen, wie zum Beispiel t(3; 14)(q27; q32), t(14; 18)(q32; q21) oder t(1; 14)(p22; q32) wurden ebenfalls beschrieben, treten allerdings nur relativ selten oder in gastralen Lymphome vom MALT-Typ nie auf.^{2,23-25}

Die Untersuchungen der letzten Jahre konzentrierten sich auf die karyotypische Instabilität als Ursache für Inaktivierung einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorsuppressorgene (TSG). Diese ist typisch für den sogenannten „tumor suppressor pathway“ der Onkogenese²⁶.

Die andere Form, die Mikrosatelliteninstabilität, ist Ergebnis der Malfunktion der Mismatch-Repair-Gene und führt zu sogenanntem Replikationserrorphänotyp, der charakteristisch für den „mutator pathway“ der Onkogenese ist. Dieses Phänomen wurde in keinem²⁷ bis die Hälfte²⁸ der untersuchten gastralen MALT-Typ Lymphome und in 3% der untersuchten gastralen DLBCL²⁹ nachgewiesen.

Analysen von polymorphen Mikrosatellitenloci, die mittels PCR-Technik durchgeführt wurden, konnten Allelverluste auf mehreren unterschiedlichen Chromosomregionen nachweisen und den Ausmaß an Aberrationen im Detail definieren. So zeigten z. B. 7% der gastralen MALT-Typ Lymphome³⁰ und 29% der gastralen DLBCL einen Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens p53³¹. Es konnte auch gezeigt werden, dass manche der gastralen DLBCL das BCL6-Protein überexprimieren oder Rearrangements in dem BCL6-Locus auf Chromosom 3q27 aufweisen^{32,33}. Zytogenetische Studien mittels CGH haben bei primären gastralen DLBCL Verluste im Bereich 6q sowie Gewinn von genomischem Material im Bereich 3q gezeigt.³⁴

Während der letzten Jahre wurde am Pathologischen Institut der Universität Würzburg ein umfangreiches Untersuchungsgut an extranodalen gastralen Lymphomen vom MALT-Typ sowie von gastralen DLBCL aufgebaut und untersucht. So wurden bisher 31 gastrale DLBCL und 24 gastrale MALT-Typ Lymphome einer detaillierten Mikrosatellitenanalyse unterzogen, mit dem Ziel, die Regionen zu charakterisieren, die Verluste der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) oder Amplifikationen (A) aufweisen um sicher zu stellen welche bekannte oder putative TSG oder Onkogene eine Rolle in der Lymphomgenese spielen^{34,35}.

Einschränkend bestand jedoch das Problem in der Studie von Starostik et al, dass die untersuchte Serie nicht homogen war da in der Gruppe der gastralen DLBCL mindestens 6 sekundäre DLBCL aufgenommen wurden. In der Gruppe der gastralen DLBCL wurde in der erwähnten Studie als häufigste Aberration (42% der Fälle) der Verlust (LOH) von genomischem Material auf dem langen Arm des Chromosoms 6 gefunden. Es konnten zwei LOH Hotspots identifiziert werden, einen in der Bande

6q21-22.1, begrenzt von den Markern D6S246-D6S261 und einen in der Bande 6q23.3-25, flankiert von D6S310 und D6S441, die putative TSG beinhalten.³⁴

Ein weiterer wichtiger Befund waren häufig auftretende Amplifikationen von genomischem Material auf dem langen Arm des Chromosom 3, in der Bande 3q27, wo sich das BCL6-Gen und das PIK3CA-Gen befindet³⁴.

Diesem ermittelten Profil konnte man später den der gastralen MALT-Typ Lymphome gegenüberstellen.³⁵

Die bisherigen genetischen Untersuchungen konnten zeigen, dass die gastralen MALT-Typ Lymphome hinsichtlich der genetischen Instabilität in zwei Gruppen eingeteilt werden können: die erste Gruppe ist durch die Translokation t(11; 18) charakterisiert, die zweite Gruppe besitzt diese Translokation nicht. Die Tumoren mit Translokation wiesen in dieser Studie keine zusätzlichen chromosomalen Aberrationen auf. Die gastralen MZBCL vom MALT-Typ ohne die Translokation t(11; 18) zeigten dagegen erhöhte genomische Instabilität mit Deletionen im Bereich 5q21, 9p21, 13q14, 17p13 und häufige 3q27 Amplifikation. Die Ähnlichkeit der genetischen Aberrationen zwischen t(11; 18)-negativen MALT-Typ Lymphome und den DLBCL lässt den Schluss zu, dass möglicherweise die t(11; 18)-negativen MALT-Typ Lymphome ein höheres Risiko tragen in ein sekundäres DLBCL zu transformieren.^{3,35}

Diese Ergebnisse von Starostik et al führten zur Erstellung eines Tumorprogressionsmodells:

Möglicherweise lassen sich zwei verschiedene Gruppen von gastralen DLBCL abgrenzen: die eine Gruppe die über eine 3q27-Amplifikationen (und zusätzlichen Aberrationen wie Deletionen im Bereich 5q21, 13q14, 17p13) aus MALT-Typ Lymphomen entsteht und die zweite Gruppe die überwiegend 6q Deletionen aufweist (sowie zusätzliche Deletionen im Bereich 5q21, 9p21, 13q14, 17p13) und „de novo“ aus normalen Zellen (NC) entsteht (siehe Abbildung 1).

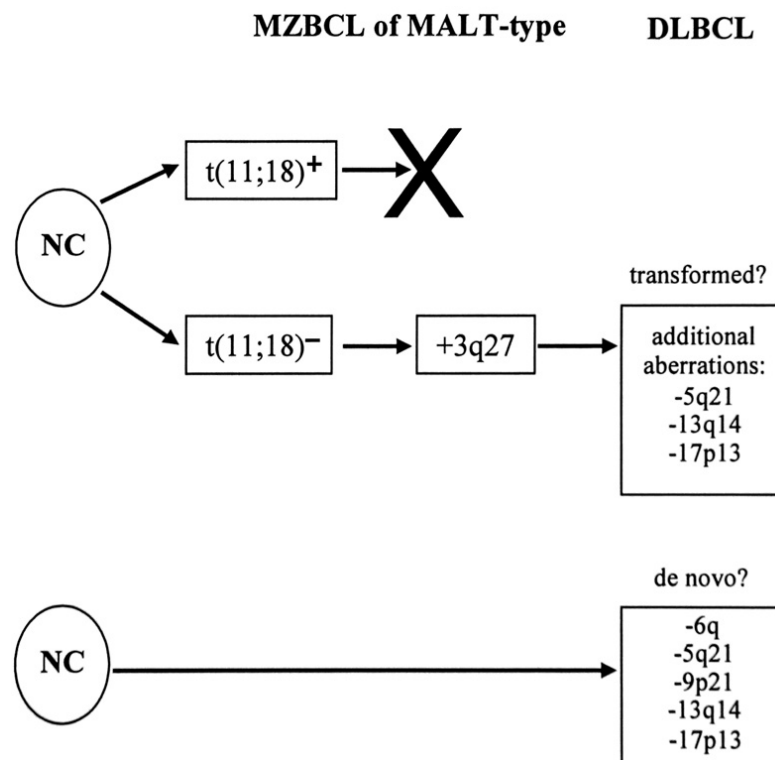


Abbildung 1: Vorgeschlagene Hypothese für die Entstehung von gastralen DLBCL vom MALT-Typ (nach Starostik et al)³⁵

1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher die Tumorprogression der gastralen MALT-Typ Lymphome zu DLBCL näher zu untersuchen. Dafür wurden gezielt lediglich solche Fälle ausgewählt bei denen die beiden Tumorkomponenten im Magen simultan vorhanden waren.

Eine Analyse der Klonalität sollte die Verwandtschaft der jeweiligen Tumoranteile untersuchen.

Bei diesen Patienten sollte dann eine Mikrosatellitenanalyse mit den in den vorangegangenen Studien eingesetzten Markern in den chromosomalen Lokalisationen 3q21.3-25, 3q26.2-27, 6q21-22.1, 6q22.3-23, 6q23.3-25 und 6q25.2 durchgeführt werden um einen Vergleich zu den Voruntersuchungen zu ermöglichen^{34,35}.

Darüber hinaus sollte näher die umstrittene Rolle der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) als Zeichen des „mutator-pathway“ in der Lymphomentstehung untersucht werden.

Letztendlich sollte eine Korrelation der genetischen Aberrationen mit den Ergebnissen der Klonalitätsanalyse dargestellt werden zur Frage des Einflusses der Aberrationen auf eine direkte Tumorprogression.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Untersucht wurde genomische DNA von 19 Magenresektaten mit sekundären DLBCL wobei in allen Fällen eine simultane MALT-Typ Komponente abgegrenzt werden konnte. Das Material wurde vom Lymphomregister des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. In allen 19 Fällen wurde genomische DNA ausschließlich aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Material gewonnen.

Als Referenzmaterial diente tumorfreie Magenschleimhaut oder tumorfreies Lebergewebe desselben Patienten. In allen Fällen wurde die Diagnose von zwei Pathologen am konventionell gefärbten Paraffinmaterial entsprechend der WHO-Klassifikation gestellt. Die Stadieneinteilung wurde mittels der modifizierten Musshoff Klassifikation festgelegt. Der Helicobacter-pylori-Status wurde in jedem Fall histologisch bestimmt.

2.2 Untersuchungsmethoden

2.2.1 Mikrodissektion

In allen Fällen wurden von den jeweiligen Tumoranteilen und dem Kontrollgewebe Serien von circa zwanzig 10 µm dicken Schnitten angefertigt. Als Orientierungshilfe für die nachfolgende Mikrodissektion wurden der erste und der letzte Schnitt einer Serie mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) angefärbt. Die dazwischenliegenden Schnitte wurden mit dem Nuclear Fast Red-Farbstoff behandelt, um die Mikrodissektion zu erleichtern.

Unter Lichtmikroskopkontrolle wurden aus diesen Schnitten Areale mit hohem Tumoranteil, bzw. tumorfreies Kontrollgewebe mit einer scharfen Klinge, durch Abkratzen gewonnen und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2 Gewinnung genomischer DNA

Zur Entparaffinierung des gewonnenen Materials wurde in jedes Reaktionsgefäß 800 µl Xylol zugegeben, 1 min vortexiert, 5 min bei 1400 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 Vortexen, 5 min Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes. Das Gewebe wurde danach bei 50°C in offenen Reaktionsgefäßen im Heizblock vollständig getrocknet. Anschließend erfolgte die DNA-Extraktion:

Unter Zugabe von 300 µl Verdaupuffer wurden die Gewebeproben bei 50°C im Wasserbad (in einem Schüttler) mindestens 12 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Extraktion mit 600 µl Phenolchloroform (Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol – 25:24:1).

Die obere wässrige Phase wurde in ein neues steriles Reaktionsgefäß übertragen und der Vorgang zweimal wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl Chloroform, 45 sec Vortexen 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 und inkubierte die Proben mit 1 ml kaltem 100%igem Ethanol über 12 Stunden bei -20°C.

Danach wurden die Proben erneut 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Es wurde nun 1 ml von dem bei -20°C gekühltem 70%-igem Ethanol hinzugefügt, welcher nach fünf min Zentrifugieren wieder entfernt wurde. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Die Proben wurden zur vollständigen Entfernung des Ethanols circa 30 min bei 37°C im Heizblock bei offenem Reaktionsgefäß getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 100 µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgelöst und eine Nacht bei Raumtemperatur gelagert.

Die auf dieser Weise gewonnene genomische DNA wurde für die Untersuchungen mittels PCR verwendet.

2.2.3 Kontrolle der Klonalität von Tumor- und Kontrollgewebe

Zur Beurteilung des Tumoranteils in der extrahierten genomischen DNA des Tumors, sowie der Tumorfreiheit der DNA des Kontrollgewebes wurde jede DNA-Probe der Untersuchung auf Klonalität mittels PCR unterzogen und das Produkt anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurde eine Analyse der variablen Region CDR-3 (complementary determining region 3) des Immunglobulins für schwere Ketten das sich auf dem Chromosom 14 befindet, über eine PCR nach den entsprechenden Protokollen zur Darstellung des Rearrangements dieser Region durchgeführt.

Für diese PCR wurden zwei Primer mit folgenden Sequenzen, verwendet (synthetisiert bei MWG-Biotech, München, Germany):

FR3A: 5' ACA CGG CYS TGT ATT ACT GTT GTG CCC GYS ACA TAA TGA CA 3'

LJH : 5' TGA GGA GAC GGT GAC CAC TCC TCT GCC ACT GG 3'

Der Marker FR3A wurde am 5'-Ende mit grünem fluoreszierendem Farbstoff markiert (HEX).

Als monoklonale Kontrolle diente DNA der Raji-B-Zelllinie, als Negativkontrolle wurde autoklaviertes bidestilliertes Wasser eingesetzt. Die PCR-Proben wurden daraufhin in einem „Primus 96 plus“ Thermocycler (MWG Biotech, München, Germany) amplifiziert.

Alle PCR-Produkte wurden auf ein Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des Software- Programmes ABI GeneScan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert.

Ein Gellauf dauerte circa 2,5 Stunden bei 51°C, 3000V, 60 mA und 200 W.

Die Größe der Produkte betrug zwischen 90 und 129 Basenpaare.

Eine Untersuchung der Fälle bezüglich der Translokation t(11; 18) blieb erfolglos, weil technisch keine RNA-Isolierung aus dem formalinfixierten Material möglich war.

Die Ergebnisse dieser Analyse wurden wie folgt bewertet:

Beim Auftreten einer einzelnen dominanten Bande wurde die Probe als monoklonal bewertet, bei zwei dominanten Banden als biklonal 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 (siehe Abbildung 2). Auf diese Weise wurden Klonalität von Tumor-DNA bzw. Polyklonalität der Kontroll-DNA bestätigt.

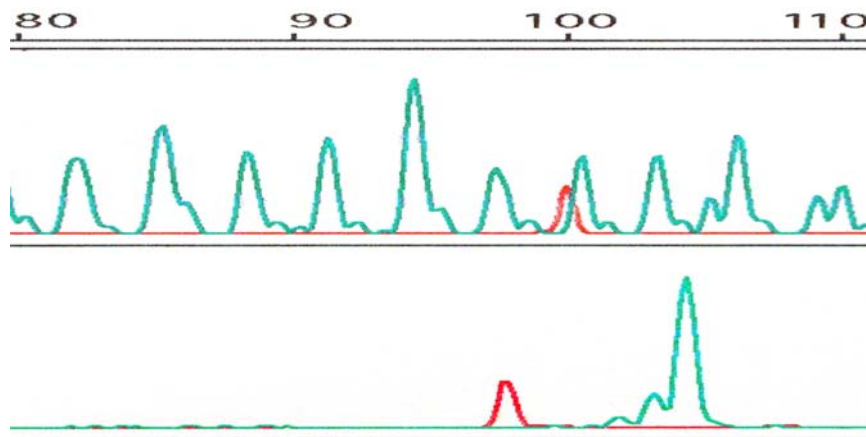


Abbildung 2: Elektropherogramm einer Klonalitätsanalyse: oben Polyklonalität des tumorfreien Kontrollgewebes, unten monoklonale Bande im Tumorgewebe

2.2.4 DNA-Sequenzierung

Der zweite Teil der Arbeit umfasst die DNA-Sequenzanalyse der variablen CDR3-Region des Immunglobulin-Gens für schwere Ketten, die sowohl im niedrigmalignen, als auch im hochmalignen Tumoranteil durchgeführt wurde. Dadurch sollte die Klonalitätsverwandschaft der beiden Tumoren untersucht werden. Die variable CDR3-Region (complementary determining region) befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 14, im Bereich 14q23 und stellt den sogenannten „Fingerabdruck“ einer jeden B-Zelle dar. Nur B-Zellen, die sich aus dieser einen Zelle entwickeln werden (klonale Expansion), tragen dieselbe CDR3 Sequenz. Deshalb wird dieser kurze Bereich in der Regel herangezogen, um Klonalitätsanalysen von B-Zellen durchzuführen.

Für die Sequenzanalyse der CDR3-Region wurde eine Klonalitäts-PCR angesetzt die in zwei Schritten durchgeführt wurde (seminested hot-start PCR).³⁶

Die erste Amplifizierung (sogenannte external PCR) wurde mit dem Primer FR3A, spezifisch für die entsprechende Region der variablen Region des IgH (VH) framework III, in Kombination mit dem reversen Primer LJH durchgeführt.

Für die zweite Amplifizierung (sogenannte internal PCR) wurde der LJH Primer mit dem nested consensus Primer VLJH ersetzt.

Primersequenzen (synthetisiert bei MWG-Biotech, München, Germany):

FR3A: 5' ACA CGG CYS TGT ATT ACT GTT GTG CCC GYS ACA TAA TGA CA 3'

LJH : 5' TGA GGA GAC GGT GAC CAC TCC TCT GCC ACT GG 3'

VLJH : 5' GTGACCAGGGTNCCTTGCCCCAG 3'

Diese PCR wurde für jeden Patienten sowohl von der genomischen DNA des Lymphoms vom MALT-Typ, als auch von der DNA des hochmalignen DLBCL Tumoranteil durchgeführt.

Die PCR-Proben wurden daraufhin in einem „Primus 96“ Thermocycler (MWG Biotech, München, Germany) amplifiziert.

Die zweite Runde der Amplifizierung bestand aus einer ähnlich angesetzten PCR, unter Anwendung eines unterschiedlichen Reverse-Primer, nämlich den VLJH-Primer. Statt der DNA-Stocklösung wurden 2 µl von den 1:1000 verdünnten PCR-Produkten der ersten PCR genommen. Die PCR-Produkte der zweiten Runde wurden dann für die nächsten Schritte der Sequenzierung verwendet.

Als Qualitätskontrolle wurden 5 µl von den PCR-Produkten mit 1µ blauem (1000 Bp) Ladebuffer gemischt und auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und nach einem 20-minütigem Lauf unter 130V Stromspannung, unter UV-Licht, abgebildet. Es sollten die entsprechenden monoklonalen Banden mit einer Größe zwischen 90 und 129 Basenpaare auftreten. Die übriggebliebene Menge von jedem PCR-Produkt wurde erneut auf ein Agarosegel aufgetragen. Jede gut definierte monoklonale Bande wurde unter UV-Licht unverzüglich ausgeschnitten um eine Schädigung der DNA durch UV-Bestrahlung zu verhindern.

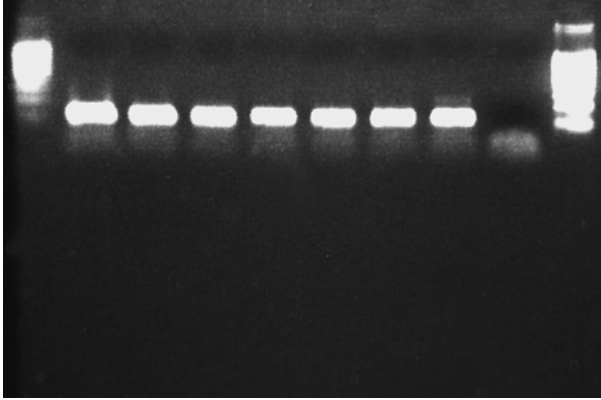


Abbildung 3: Darstellung monoklonaler Banden auf dem Agarosegel.

Daraufhin folgte die Extraktion der PCR-Produkten vom Agarosegel mit Hilfe eines „Gel Extraction Kit“ (JETSORB- Genomed, Germany). Am Ende der Extraktion erhielt man das aufgereinigte PCR-Produkt das für eine Sequenzanalyse geeignet war.

Um das DNA-Fragment zu amplifizieren, führte man ein DNA-Klonierungsexperiment durch. In diesem Fall bedeutet „Klonieren“ der Einbau eines fremden DNA-Fragments in einem Vektor (Transportmolekül, Vehikel) und dessen anschließende Vermehrung in geeignete Wirtszellen (z.B. Bakterienzellen). In derartige Vektoren werden die zu sequenzierenden DNA-Fragmente eingebaut und anschließend gemeinsam in die Wirtszellen eingeschleust.

Der nächste Schritt der Sequenzierung bestand aus einer Ligation (Bindung) der zu sequenzierenden DNA mit einem Vektor (in der vorliegenden Arbeit- pGEM-T Easy Vector- Promega, Madison, USA).

Die Reaktionen wurden daraufhin bei + 4°C über Nacht inkubiert, um eine höhere Anzahl an Transformanten zu erreichen. Zur Klonierung wurde *Escherichia coli* wegen der bekannten hohen Klonierungseffizienz angewendet.

50µl von den suspendierten Bakterienzellen wurden sorgfältig gemeinsam mit den Ligationsprodukten in auf Eis gestellten 15ml-Tuben pipettiert und nach 20 Minuten, für 47 Sekunden, in ein Wasserbad bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen.

Die Tuben wurden gleich darauf, für 2 Minuten wieder auf Eis gestellt. Danach wurden je 950µl LBB-Medium (Luria Broth Base) mit Ampicillin (40 mg/ml) dazugegeben und 1,5 Stunden bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Inzwischen wurden die Platten vorbereitet, auf denen die transformierten Bakterien in der LBB-Lösung dünn aufgestrichen wurden:

Für 24 Platten wurden folgende Mengen verwendet:

In einer 500 ml Flasche wurden 6 g Agarpulver gegeben. In einer anderen 500 ml Flasche wurden 12,5 g LBB mit 500 ml destilliertem Wasser gut vermischt und den Mix in die erste Flasche eingegeben. Die Lösung wurde noch am selben Tag autoklaviert, um eine Vermehrung von Bakterien und Pilze zu verhindern.

Unmittelbar vor dem Gießen wurden noch 500 µl Ampicillinlösung (40 mg/ml) dazugegeben (als Selektionsverfahren für die Bakterienkolonien mit Insertion).

Nach der Transformation erfolgte die Plattierung mit 150µl Zentrifugat von den Transformationskulturen auf LBB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Platten. Die Inkubation bei 37°C dauerte danach 16-24 Stunden. So vermehren sich die Bakterienzellen und entstehen zahlreiche weiße und blaue Kolonien.

Die weißen Kolonien beinhalten in der Regel die Insertion, doch gelegentlich befindet sich die Insertion auch in den blauen Kolonien. Nun hat man die Bakterienklonen erhalten, die das gewünschte DNA-Fragment beinhalten. Jede Kolonie stellt einen Klon dar, das heißt eine Gruppe von genetisch identischen Zellen, die durch Teilung aus einer einzigen, transformierten Bakterienzelle hervorgegangen sind.

Material aus jeder weißen Kolonie wurde im nächsten Schritt auf ein Nährboden (LBB-Medium-Ampicillin) übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert (sogenannte Minipreps).

Daraufhin folgte die Isolierung der rekombinanten Plasmid-DNA: unser DNA-Fragment sollte aus den Bakterienzellen wieder isoliert werden. Die Isolierung läuft nach einem Protokoll mit Hilfe eines „Plasmid-DNA-Isolation“-Kit nach Angaben des Herstellers (Genomed, Germany). Dafür wurden die Bakterienzellen resuspendiert und lysiert und das gewünschte DNA-Fragment (das PCR-Produkt gemeinsam mit dem Vektor) wurde isoliert.

Die DNA wurde danach mit Hilfe einer 70%-igen Alkohollösung gereinigt und resuspendiert. Am Ende wurde sie in 45 µl bidestilliertem Wasser aufgelöst, bei 60°C inkubiert, daraufhin zentrifugiert und der Überstand wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäßen überführt. Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde anschließend für die Sequenzierungs-PCR verwendet.

Nach der Isolierung der Plasmid-DNA wurde aus 5µl Produkt zuerst eine Kontrolle durch eine Verdauungsreaktion durchgeführt um festzustellen ob unser DNA-Fragment sich auf dem Vektor befindet. Diese Kontrolle wurde wie folgt durchgeführt:

Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Produkte auf einen 1,5%igen Agarosegel aufgetragen. Hierbei sollte man im UV-Licht zwei unterschiedliche Banden erkennen- unser DNA-Fragment (die Insertion) und den Vektor.

Daraufhin wurde die Sequenzierungs-PCR angesetzt:

Mit einem Sequenzierungsmix (BigDye Terminator v3.1 Sequencing Standard, von Applied Biosystems, USA) wurde die PCR in einem 12,5 µl Gesamtvolumen/Reaktion angesetzt.

Primer-Sequenzen (synthetisiert bei MWG Biotech, München):

M13 U: 5' TGTAACGACGGCCAGT 3'- forward

M13 R: 5' GTCATAGCTGTTTCCTG 3' – reverse

Die PCR-Proben wurden nach einem 35-Zyklen-Programm in einem „Primus 96“ Thermocycler (MWG Biotech, München, Germany) amplifiziert.

Der letzte Schritt vor der Sequenzierung ist die Aufreinigung der PCR-Produkte mit Hilfe von Sephadex-Säulen (Sephadex G-50, Amersham, Biosciences, Uppsala, Schweden). Die PCR-Produkten wurden durch Sephadex-Säulen auf 2µl 3M Na Acetat pH 5,2 zentrifugiert und dazu wurden noch 100 µl 95% Ethanol gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis folgte eine 5 minütige Zentrifugierung. Anschließend wurden die Proben bei 60°C 5 bis 10 Minuten getrocknet.

Eine solche Aufreinigung ist in der Regel nötig um freie fluoreszierende Nukleotide zu entfernen, die bei der Auswertung der Sequenzen als störender Hintergrund erscheinen können.

Es folgte danach die Sequenzierung der Proben in einem 337 ABI- Sequencer Applied Biosystems, CA, USA).

Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Sequence Navigator (Applied Biosystems, CA, USA) als Elektropherogramm analysiert (siehe Abbildung 3). Die gewünschten Insertionen wurden zunächst von den Vektor-Sequenzen getrennt, danach erfolgte in jedem Fall eine Alignment-Analyse um den dominanten Klon in jedem Tumoranteil zu definieren.

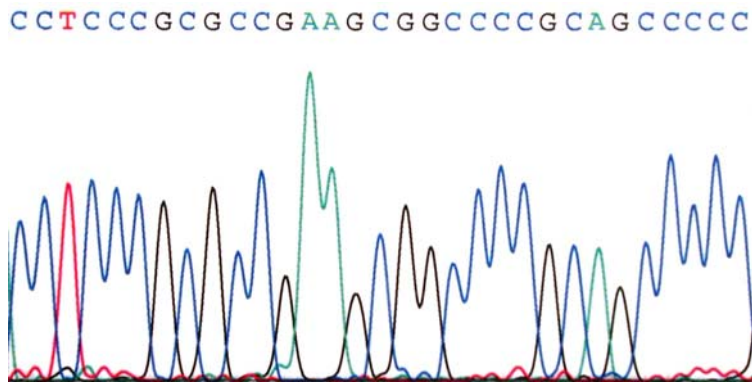


Abbildung 4: Elektropherogramm eines Sequenzabschnitts der CDR3-Region

2.2.5 Mikrosatellitenanalyse

2.2.5.1 Auswahl der Mikrosatellitenmarker

Mikrosatelliten sind DNA-Sequenzwiederholungen von mindestens 2 Basen. Es handelt sich sehr oft dabei um CA-repeats die bis zu 100mal wiederholt werden können. Diese befinden sich auf das ganze menschliche Genom verstreut etwa alle 10 kb und werden nach den Mendelschen Regeln kodominant vererbt. Von großer Bedeutung sind die kurzen Fragmente, sogenannte short tandem repeats (STR). Diese werden heute oft für LOH Analysen herangezogen um Informationen über Verluste oder Gewinne von genomischen Material zu erhalten.

Für die Mikrosatellitenanalyse werden in der Regel solche Primer eingesetzt, die einen hochpolymorphen Mikrosatelliten-Locus flankieren, jedoch selbst in der single-copy Region liegen. Dabei werden Mikrosatellitenmarker mit hohem Heterozygotie-Index (H.I.) bevorzugt um eine möglichst hohe Anzahl an informativen Loci zu erzielen.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht der verwendeten Mikrosatellitenmarkern mit Bezeichnung, Lokalisation, Produktgröße, Fluoreszenzmarkierung, Menge für die PCR und Annealingtemperatur. Dabei beruhen die Angaben zur Lokalisation der Mikrosatelliten auf Daten des Sanger Instituts (<http://www.sanger.ac.uk>) und der Genome Database (<http://gdbwww.gdb.org>).

Die letzten drei aufgeführten Marker die sich auf dem Chromosom 15 (D15S114, D15S231) oder Chromom 4 (FGA) befinden dienten als Standardmarker zur Unterscheidung zwischen LOH und Amplifikation des untersuchten Locus. Dabei wurde berücksichtigt, dass diese Marker keine bisher bekannten allelischen Imbalancen bei Lymphome aufweisen und einen hohen Heterozygotie-Index besitzen (0,71-0,84).

Jeweils einer der beiden Primer eines Primerpaares wurde mit einem der fluoreszierenden Phosphoramide FAM (blau), HEX (grün), NED/TAMRA (beide gelb) oder ROX (rot) am 5'-Ende markiert. Die Primersequenzen wurden der Genome Database (GDB, <http://gdbwww.gdb.org>) entnommen.

Die Synthese der benötigten Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech (München-Germany). Die Primern wurden gemäß Angaben des Herstellers zunächst als Stocklösungen mit einer Konzentration von 100 pmol/µl angesetzt. Davon wurden Aliquots von Gebrauchslösungen mit den gewünschten Konzentrationen für jede PCR angesetzt.

Marker	Lokus	Produkt-Größe	Markierung	Max. H. I.	Annealing-Temperatur
D3S 1206	3q21.3-25	171 bp	HEX	0,58	60°C
D3S 1212	3q26.2-27	193 bp	HEX	0,75	56°C
D3S 1229	3q26.2-27	110-122 bp	HEX	0,843	56°C
D3S 1580	3q27- ter	139-155 bp	FAM	0,84	60°C
D3S 1262	3q27- ter	120 bp	HEX	0,8078	60°C
D6S 447	6q21-22.1	195-212 bp	FAM	0,7717	58-60°C
D6S 1592	6q21-22.1	194-210 bp	HEX	0,83	55-56°C
D6S 1698	6q21-22.1	155-181 bp	HEX	0,8246	60°C
D6S 246	6q21-22.1	220-230 bp	TAMRA	0,68	62°C
D6S 261	6q21-22.1	101-129 bp	FAM	0,8299	60°C
D6S 292	6q22.3-23	141-161 bp	TAMRA	0,8343	62°C
D6S 310	6q23.3-25	159-183 bp	FAM	0,8012	62°C
D6S 441	6q25.2	162-186 bp	HEX	0,8635	60°C
D15S 114	15q24.3	177-187 bp	ROX	0,7157	56-62°C
D15S 231	15q13.3	102-114 bp	ROX	0,735	56-62°C
FGA	4q28	256-284 bp	ROX	0,845	56-62°C

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Mikrosatellitenmarker

2.2.5.2 Polymerasekettenreaktion für Mikrosatellitenanalyse

Mittels PCR wurden die Mikrosatelliten unter Verwendung der angeführten Primer aus der extrahierten genomischen DNA amplifiziert: Die PCR wurde jeweils getrennt für Kontroll- und Tumorgewebe (niedrig-maligner bzw. hochmaligner Anteil) durchgeführt, einzeln oder als Multiplex-Reaktion. Die Proben wurden in einem „Primus 96“ Thermocycler (MWG Biotech, München) amplifiziert.

Bei Proben, die sich unter den angegebenen Bedingungen nicht oder nur schlecht amplifizieren ließen, wurde die Anzahl der Zyklen um 10 bis 15 Zyklen erhöht.

Auch unter diesen Bedingungen ließen sich einige Proben nicht amplifizieren (mit „kein Amplifikat“ KA in der Tabelle 4 bezeichnet).

2.2.5.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkten erfolgte in einem 6%igen Polyacrylamidgel im 377A-DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Zur besseren Auftrennung bei Produkten, die größer als 100 Basenpaare waren, wurde ein formamidhaltiges (28,8%) 4,5%iges Polyacrylamidgel verwendet.

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

2,5 µl PCR-Probe

plus

3 µl Laufpufferlösung:

2,3 µl Formamid plus

0,2 µl Standard „ROX 500“ oder „ROX 350“ plus

0,5 µl Blue Dextran Puffer.

Ein Gellauf dauerte circa 2,5 bis 3 Stunden bei 51°C, 3000 V, 60 mA und 200 W.

2.2.5.4 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 Sammlung und Analyse der Daten funktioniert auf folgende Weise:

Die denaturierten PCR-Produkte sind negativ geladen und bewegen sich im elektrischen Feld von Kathode zu Anode. Dabei werden sie ihrer Größe nach aufgetrennt. Während des Laufes scannt ein Argonlaser 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. Diese Schritte der Analyse erfolgen somit vollautomatisch.

Daraufhin werden die Rohdaten manuell mit Hilfe des Programmes ABI GeneScan bearbeitet und man erhält auswertbare Elektropherogramme. Auf der x-Achse lässt sich die Produktgröße in Basenpaaren (Bp) ablesen, definiert über den mitlaufenden Größenstandard ROX 350. Die y-Achse zeigt die Fluoreszenz-Einheiten in Fluoreszenz-Units (FU), d.h. die Signalintensität, welche sich zur Menge des amplifizierten Produktes direkt proportional verhält. In den darauf folgenden Schritten kann die Fläche oder die Höhe der Peaks des jeweiligen Allels ermittelt werden, über welche nun Tumor- und Kontrollgewebe semiquantitativ verglichen werden können.

Man berechnete hier die Höhenverhältnisse von beiden Kontroll- und Tumorallelen, sowohl im MALT-Typ Tumoranteil als auch im DLBCL. Ergab sich eine Differenz von mehr als 20% zwischen den Verhältnissen, so wurde eine genetische Aberration an diesem Locus angenommen.

Um weiter zwischen LOH und Amplifikation unterscheiden zu können, wurden Multiplex-PCR-Reaktionen mit dem Marker bei dem sich die Aberration gezeigt hat und einem Standardmarker, der bei diesem Patienten keine Veränderungen aufwies, durchgeführt. Man berechnete hiervon die Verhältnisse der Kontrollallele zum jeweils entsprechenden Tumorallel. Als Amplifikation wurde die Vergrößerung des Tumorallels im Vergleich zum Kontrollallel um mindestens 40%, als LOH die Verkleinerung um mindestens 40% bezeichnet. Veränderungen im Sinne von

Amplifikation oder LOH bei einem Patienten an einem Marker wurden einmal bestätigt, bevor sie als genetische Aberrationen gewertet wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Es wurde genomische DNA von 19 Patienten untersucht.

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten betrug 2,1/1 (13 männliche und 6 weibliche Patienten).

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag zwischen 41 und 87 Jahren, mit einem Durchschnittsalter von 64 Jahren (siehe Tabelle 2).

Vier von den 19 Patienten befanden sich im Stadium E I 1, neun befanden sich im Stadium E I 2, 5 im Stadium E II 1 und ein Patient befand sich im Stadium E II 2 mit multilokulärem Magenbefall und Lymphknotenbefall der über die regionalen Lymphknoten hinausging.

Bei vier Patienten konnte histologisch *Helicobacter pylori* in der Magenschleimhaut nachgewiesen werden.

Bei der Extraktion genomischer DNA traten bei einigen Fällen Schwierigkeiten bei der Mikrodissektion der niedrig-malignen Tumoranteile auf, weil diese Tumorareale sehr klein und manchmal nur schlecht abgrenzbar waren. Das führte dazu, dass die daraus gewonnenen DNA-Mengen sehr niedrig waren. Das Material ließ sich mittels PCR nur schlecht oder überhaupt nicht amplifizieren auch nicht wenn die Zyklenanzahl erhöht wurde (insbesondere bei den Fällen 779 und 999).

3.2 Ergebnisse der Klonalitätsanalyse

Bei der Klonalitätsuntersuchung mittels PCR sollte in den jeweiligen Tumoranteilen eine klonale Bande nachgewiesen werden, wohingegen im Kontrollgewebe ein oligo-

oder polyklonales Muster zu erwarten war, als Hinweis auf die Abwesenheit von Tumorzellen.

Bei allen 19 untersuchten Fällen bestätigte sich die Tumorfreiheit des Kontrollgewebes und konnte jeweils im MALT-Typ Tumoranteil und im DLBCL eine dominante klonale Bande nachgewiesen werden. Somit konnten die vom Tumorgewebe gewonnenen DNA-Proben für die weitere Sequenzanalyse genommen werden sowie paarweise (Kontroll- und Tumorgewebe) für die Mikrosatellitenanalyse.

Bei 13 Fällen stimmte die Größe (in Basenpaaren) des Amplifikates überein, was einen indirekten Beweis für eine klonale Identität der beiden Tumoranteile ergibt. Bei den übrigen 6 Fällen bestand zwischen den jeweiligen Tumoranteilen ein Größenunterschied von zwei bis zehn Basenpaaren. Ein Unterschied von mindestens zwei Basenpaaren wurde als indirekter Beweis für einen klonalen Unterschied angenommen und bei der Durchführung der Sequenzanalyse berücksichtigt.

Die Ergebnisse der Klonalitätsanalyse und die Patientendaten (Alter, Geschlecht, Tumorstadium nach Musshoff und histologischer Helicobacter-pylori-Status) sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

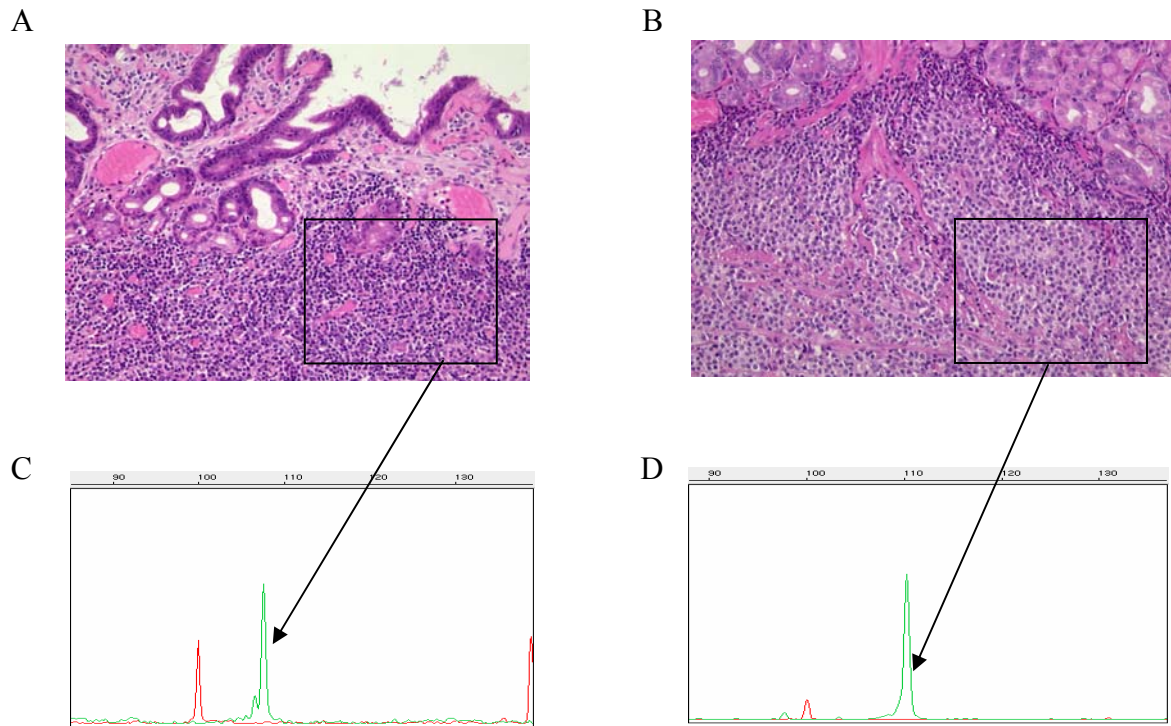


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung des Falls 3457 – Gastrales MZBCL vom MALT-Typ (A; H&E x40) und DLBCL (B; H&E x40):

Tumorareale beider Tumoren wurden unter Lichtmikroskop mikrodissiziert (A, B jeweils markiertes Areal) und anschließend analysiert.

Genescan-Analyse der JH-CDR3: PCR-Analyse zeigt einen monoklonalen Peak (Pfeil) jeweils für das MALT-Typ Lymphom (C) und das DLBCL (D) wobei die Amplifikatgröße sich jeweils um zwei Basenpaare unterscheidet (108 bzw 110 Bp).

Dieser Fall (3547) zeigte keine genetischen Aberrationen in den untersuchten Microsatellitenoci und wurde daher von der Sequenzanalyse ausgeschlossen.

Fall-Nr.	Alter	Geschlecht	Tumorstadium	MALT	DLBCL	Histologischer H.p.-Status
3463	68	m	E I 2	125 Bp	125 Bp	positiv
4391	50	m	E II 1	110 Bp	110 Bp	negativ
5002	87	w	E I 2	97 Bp	95 Bp	negativ
1807	68	w	E I 1	92 Bp	92 Bp	negativ
800	74	m	E II 1	97 Bp	100 Bp	positiv
3005	65	m	E I 2	103 Bp	97 Bp	negativ
5240	59	m	E I 1	90 Bp	92 Bp	negativ
4342	68	m	E I 2	100 Bp	100 Bp	negativ
660	72	w	E I 2	98 Bp	108 Bp	negativ
6184	57	m	E II 1	128 Bp	128 Bp	negativ
3833	69	w	E I 2	108 Bp	108 Bp	negativ
5508	65	m	E I 2	97 Bp	97 Bp	positiv
4424	41	m	E I 1	95 Bp	95 Bp	positiv
4441	44	m	E II 1	90 Bp	90 Bp	negativ
4487	64	m	E I 1	94 Bp	94 Bp	negativ
6917	50	m	E II 2	107 Bp	107 Bp	negativ
3547	71	m	E II 1	108 Bp	110 Bp	negativ
779	70	w	E I 2	129 Bp	129 Bp	negativ
999	78	w	E I 1	107 Bp	107 Bp	negativ

Tabelle 2: Zusammenfassung der Patientendaten mit Klonalitätsanalyse und H.p.-Status

3.3 Ergebnisse der Sequenzanalyse

Für die Sequenzanalyse wurden die Fälle wie folgt ausgewählt: es wurden alle Fälle die bei der Mikrosatellitenanalyse genetische Aberrationen aufgewiesen haben (10 Fälle) sowie zusätzlich ein Fall ohne Aberrationen einer Sequenzanalyse unterzogen.

Von den zehn Fällen mit Aberrationen konnte die Sequenzanalyse lediglich bei 8 Fällen durchgeführt werden, bei den übrigen zwei Fällen (779 und 999) konnte keine ausreichende Anzahl an Transformanten erzielt werden und wurden daher nicht weiter untersucht.

So wurde bei insgesamt acht Fällen mit Aberrationen und einem Fall ohne Aberrationen eine Sequenzanalyse der CDR-3-Region durchgeführt (insgesamt neun Fälle). Davon

hatten vier Fälle in der Klonalitätsuntersuchung übereinstimmende klonale Banden gezeigt, bei den übrigen fünf bestanden Unterschiede von zwei bis zehn Basenpaaren.

Die Sequenzanalyse zeigte eine klonale Identität (85-95%) in den vier Fällen die mittels Klonalitäts-PCR gleich große klonale Banden aufgewiesen hatten. Von den übrigen fünf Fällen zeichnete sich der Fall 660 durch eine Übereinstimmung der Sequenzen von 52% aus, die übrigen vier Fälle zeigten keine klonale Verwandtschaft. Hier handelte es sich um ganz unterschiedliche dominanten Klonen in den beiden Tumoranteilen.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse sind in der Tabelle 3 (siehe Seite 23) zusammengefasst.

4391MALT1	TACACGGCTCTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTTTGTATTATGGTGACTTACTA
4391MALT2	TACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTTTGTATTATGGTGACTTACTA
4391MALT3	TACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTTTGTATTATGGTGATTTACTA
4391MALT4	TACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTTTGTATTATGGTGACTTACTA
4391MALT5	TACACGGCTCTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTCCTTGTATTACGGTGATTTATTA
4391MALT6	TACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTTTGTATTATGGTGATTTATTA
4391MALT7	TACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTCCTTGTATTACGGTGATTTATTA
4391MALT8	TACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTCCTTGTATTACGGTGATTTATTA
4391MALT9	TACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTCCTTGTATTACGGTGATTTATTA
4391MALT10	TACACGGGCGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTCCTTGTATTACGGTGATTTATTA
4391DLBCL1	TACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTTTGTATTATGGTGATTTACTA
4391DLBCL2	TACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTCCTTGTATTATGGTGACTTATTA
4391DLBCL3	TACACGGCTCTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTCCTTGTATTATGGTGACTTATCA
4391DLBCL4	TACACGGCACTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTTTGTATTATGGTGACTTACTA
4391DLBCL5	TACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGCCACAAAATTCCTTGTATTACGGTGATTTATTA
4391MALT1	TCCTCTCATTATTTCATACGCACCTGGACGTCTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACA
4391MALT2	TCCTCTCATTATTTCATACGCACCTGGACGTCTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACA
4391MALT3	TTCTCTCATTATTTCATACGCACCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACA
4391MALT4	TCCTCTCATTATTTCATACGCACCTGGACGTCTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACA
4391MALT5	TCGTCTCATTATTTCATATGCATTGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACA
4391MALT6	TCGTCTCATTATTTCATATGCATTGGACGTCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACA
4391MALT7	TCGTCTCATTATTTCATATGCATTGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACA
4391MALT8	TCGTCTCATTATTTCATATGCATTGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACA
4391MALT9	TCGTCTCATTATTTCATATGCATTGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACA
4391MALT10	TCGTCTCATTATTTCATATGCATTGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACA
4391DLBCL1	TCCTCTCATTATTTCATACGCACCTGGACGTCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACA
4391DLBCL2	TCCTCTCATTATTTCATACGCACCTGGACGTCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACA
4391DLBCL3	TCCTCTCATTATTTCATACGCACCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACA
4391DLBCL4	TCCACTCATTATTTCATACGCACCTGGACGACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACA
4391DLBCL5	ACGTCTCATTATTTCATATGCATTGGACGTCTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACA

Abbildung 6: Beispiel der CDR3-Sequenzen des monoklonalen Falls 4391 bei dem 10 Sequenzen des MALT-Typ Tumoranteils mit 6 Sequenzen des DLBCL übereinstimmen:

```

5240MALT1      ----TACACGGCTCTGTATTACTGTGCGAGAGAG----GGTGGCTACGAATTTGACTACT
5240MALT2      ----TACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGAGAG----GGTGGCTACGAATTTGACTACT
5240MALT3      ----TACACGGCCCTGTATTACTGTGCGTGTGTG----GGTGGCTACGAATTTGCTACT
5240MALT4      ----TACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAG----GGTGGCTACGAATTTGACTACT
5240MALT5      ----TACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGAGAG----GGTGGCTACGAATTTGACTACT
5240MALT6      ----TACACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGAGAG----GGTGGCTACGAATTTGACTACT

5240DLBCL1     TGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCAGTAGTCAAAGCCCCGATAGTACAATATCCTACGTCG
5240DLBCL2     TGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCAGTAGTCAAAGCCCCGATAGTACAATATCCTACGACG
5240DLBCL3     TGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCAGTAGTCAAAGCCCCGATAGTACAATATCCTACGACG
5240DLBCL4     TGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCAGTAGTCAAAGCCCCGATAGTACAATATCCTACGTCG
5240DLBCL5     TGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCAGTAGTCAAAGCCCCGATAGTACAATATCCTACGACG
5240DLBCL6     TGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCAGTAGTCAAAGCCCCGATAGTACAATATCCTACGACG

5240MALT1     GGGGCCAAGGAACCCTGGT-CACA-----
5240MALT2     GGGGCCAAGGTACCCTGGT-CACA-----
5240MALT3     GGGGCCAAGGTACCCTGGT-CACA-----
5240MALT4     GGGGCCAAGGAACCCTGGT-CACA-----
5240MALT5     GGGGCCAAGGAACCCTGGT-CACA-----
5240MALT6     GGGGCCAAGGAACCCTGGT-CACA-----

5240DLBCL1     GGGCCTCTCGCACAGTAATACACAGCCGTG
5240DLBCL2     GGGCCTCTCGCACAGTAATACACGGCCGTG
5240DLBCL3     GGGCACACGCACAGTAATACACAGCCGTG
5240DLBCL4     GGGCCTCTCGCACAGTAATACAGTCCGTG
5240DLBCL5     GGGCCTACCGCACAGTAATACACGGCCGTG
5240DLBCL6     GGGCCTCTCGCACAGTAATACACAGCCGTG

```

Abbildung 7: Beispiel der CDR3-Sequenzen des monoklonalen Falls 5240 bei dem sich die 6 Sequenzen des dominanten Klon des MALT-Typ Tumoranteils von den Sequenzen des DLBCL komplett unterscheiden:

Für das Sequenzen-Alignment wurde das Programm von <http://www.ebi.ac.uk> (ALN/ClustalW format) ausgewählt.

Der Fall 660 ließ sich nur schwierig sequenzieren, wir erhielten eine relativ niedrige Anzahl an Transformanten und implizit an Sequenzen deren Qualität als nicht ganz optimal zu bewerten war. Dieser Fall wies in der Klonalitätsanalyse klonale Banden die sich um 10 Basenpaare unterschieden und wir erhielten im Alignment Window eine Übereinstimmung von 52%.

Fall-Nr.	Klonalitätsanalyse (PCR)		*N/N total sequenziert		Sequenzvergleich
	MALT	DLBCL	MALT	DLBCL	
Nr.					
3463	monoklonal	monoklonal	6/19	4/24	identisch (>90%)
4391	monoklonal	monoklonal	9/18	6/16	identisch (>90%)
5002	monoklonal	monoklonal	3/10	2/6	unterschiedlich
1807	monoklonal	monoklonal	4/13	3/9	identisch (>85%)
800	monoklonal	monoklonal	4/8	3/9	unterschiedlich
3005	monoklonal	monoklonal	8/11	5/10	unterschiedlich
5240	monoklonal	monoklonal	6/17	6/15	unterschiedlich
4342	monoklonal	monoklonal	6/8	6/8	identisch (>95%)
660	monoklonal	monoklonal	4/14	4/7	unterschiedlich (?) (52%)

Tabelle 3: Bestimmung der Klonalität und der tumorspezifischen CDR3-Region

* N entspricht der Anzahl an Klonen mit der gleichen Sequenz

N total ist die Anzahl aller Klone die pro Fall untersucht wurden.

Eine Analyse auf somatische Mutationen bei den sequenzierten CDR3-Regionen wurde nicht durchgeführt, da Schwierigkeiten dabei bestanden das jeweilige sehr kurze D-Segment eindeutig einem Keimbahn-D-Segment zuzuordnen. Das Gleiche galt für die jeweiligen JH-Segmenten (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurden die klonal verwandten Fälle auf intraklonale Variationen untersucht, um eventuelle sogenannte ongoing mutations zu identifizieren.

Hierbei konnten im MALT-Typ Tumoranteil intraklonale Variationen beobachtet werden, die jedoch im DLBCL nur noch im geringen Ausmaß auftraten (siehe Abbildung 8).

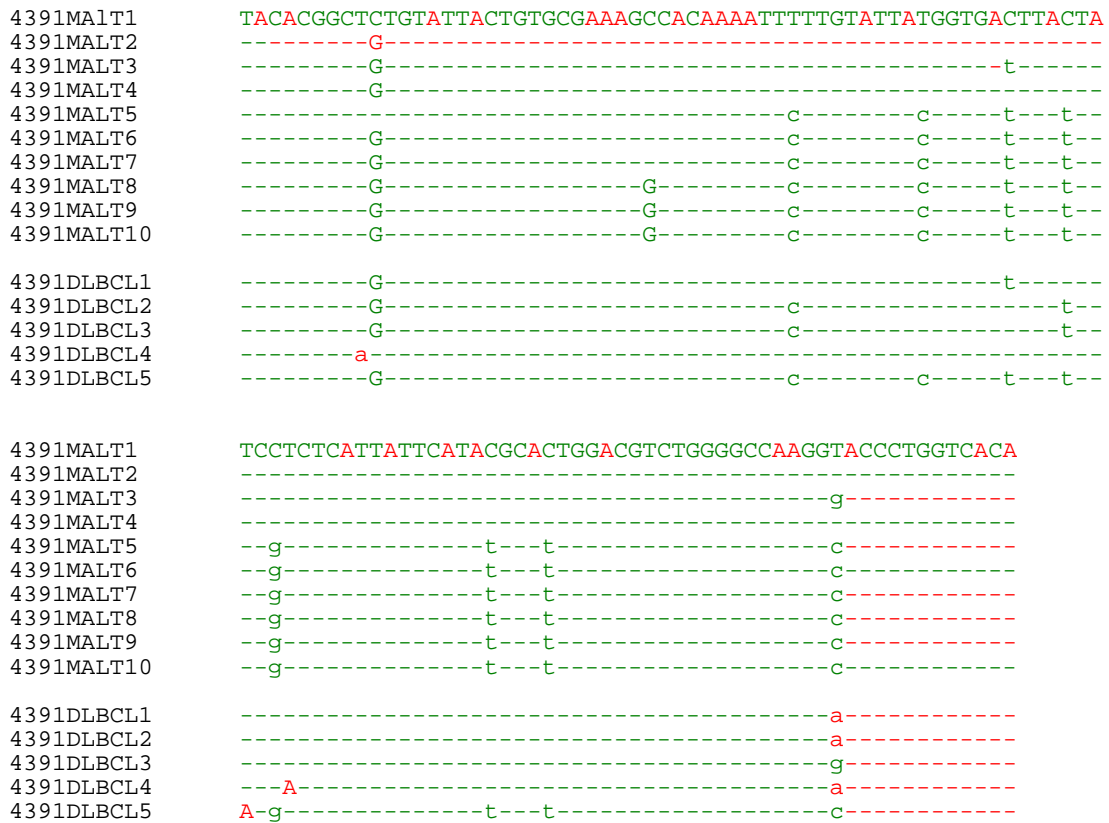


Abbildung 8: Fall 4391 mit intraklonalen Variationen im MALT-Typ Tumorteil. Die Großbuchstaben stehen für Austauschmutationen (replacement mutations), die Kleinbuchstaben stehen für stille Mutationen (silent mutations).

Man erkennt, dass die meisten Mutationen vom stillen Typ sind (silent mutation), dass bedeutet, dass sie keine Auswirkung auf die Sequenz der Aminosäuren haben.

Am Beispiel von Fall 4391 (Abbildung 9) wurde der erste Klon (M1) mit wenig mutierten Grundgerüst als Referenzsequenz ausgewählt und daraufhin wurde schematisch das Verhältnis zu den übrigen Klonen hergestellt. Mit dem Buchstaben „M“ wurden die Sequenzen des MALT-Lymphoms, mit „D“ die Sequenzen des DLBCL-Anteils bezeichnet.

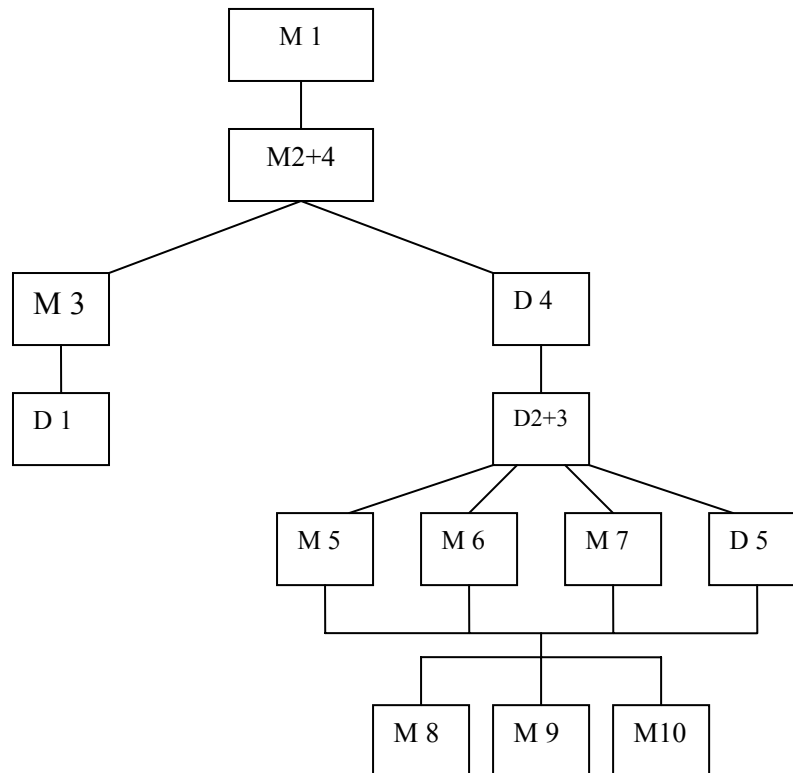


Abbildung 9: Schematische Darstellung als Stammbaum der intraklonalen Variationen im Fall 4391

3.4 Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse

3.4.1 Amplifikationen auf 3q und Deletionen auf 6q sind die häufigsten detektierten Veränderungen in sekundären gastralen DLBCL

Über die durchgeführte Untersuchung von 19 gastralen MALT-Typ Lymphome mit insgesamt 13 Mikrosatellitenmarkern erhielt man 494 Genotypen. In wenigen Fällen, vor allem im MALT-Typ Lymphomanteil, bekam man auch nach wiederholten Versuchen kein Amplifikat. Von den 494 Genotypen zeigten insgesamt 31 (6,27%) genomische Aberrationen.

Für die Untersuchung auf LOH oder Amplifikationen waren nur die heterozygoten Genotypen informativ.

Insgesamt elf von den 19 untersuchten Patienten (57,89%) zeigten genomische Aberrationen. Nur zwei von den 11 Patienten (10,52%) mit Aberrationen waren histologisch Helicobacter-pylori-positiv, somit konnte keine Korrelation zwischen dem

Auftreten von genomischen Aberrationen und dem Helicobacter-pylori-Status festgestellt werden.

Bei dem Vergleich zwischen dem Auftreten von genomischen Aberrationen und dem Tumorstadium zeigte sich, dass von den elf Patienten mit Aberrationen sich 8 im Stadium EI befanden, die übrigen 3 im Stadium EII.

Die häufigsten Aberrationen, die gefunden werden konnten, waren Amplifikationen auf dem Chromosomarm 3q und Deletionen auf dem Chromosomarm 6q (siehe Abbildung 10).

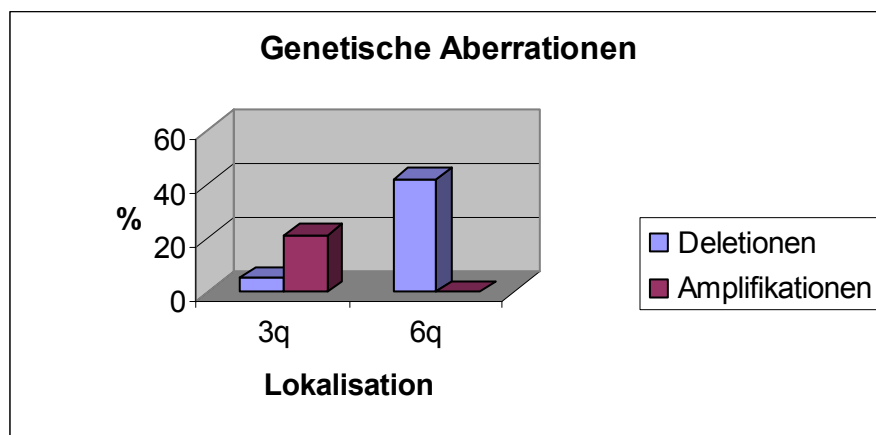


Abbildung 10: Anteil der Patienten mit 3q und 6q Aberrationen

Die 6q Deletionen erstreckten sich bei sieben Fällen (36,84%) vom chromosomalen Bereich 6q21 bis hin zum 6q26, flankiert von den Markern D6S447 und D6S441. Die Verluste von genomischem Material traten als interstitielle Deletionen auf, so dass man nicht von einem Verlust des ganzen Chromosomarms in diesem Bereich reden kann. Bei einem einzigen Fall (5,26%) fanden wir lediglich im Bereich 6q26 eine Deletion.

3.4.2 Gastrale Lymphome vom MALT-Typ zeigen weniger genomische Aberrationen als die sekundären DLBCL

Bei insgesamt vier Patienten (21,05%) konnten im Bereich der Marker D3S1206 und D3S1212 auf dem langen Arm des Chromosoms 3 Amplifikationen nachgewiesen werden, bei drei Patienten (15,78%) sowohl im MALT-Typ Tumoranteil als auch im DLBCL. Bei dem vierten Patient konnten wir lediglich im DLBCL-Anteil eine 3q

Amplifikation sicherstellen, da die DNA des MALT-Typ Anteils sich mittels PCR nicht amplifizieren ließ (siehe Tabelle 4).

Ein einziger Patient (5,26%) zeigte im Bereich des Markers D3S1229 eine Deletion im DLBCL- Tumoranteil, und keine 3q Amplifikation.

Auf dem langen Arm des Chromosoms 6 konnten bei acht Patienten (42,10%) Deletionen nachgewiesen werden und zwar überwiegend im DLBCL Tumoranteil (5 Patienten). Bei zwei Patienten zeigten sich hier Deletionen auch im MALT-Typ Tumoranteil, im Bereich der Marker D6S1592 und D6S447.

Region	3q21.3-25				3q26.2-27				3q27-qter				6q21-6q22						6q22.3-23				6q23.3-25				6q26	
	d3s1203		d3s1213		d3s122		d3s1583		d3s126		d6s447		d6s159		d6s246		d6s169		d6s261		d6s292		d6s310		d6s441			
Marker	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
Fall-Nr.	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
5002	KA																				L	KA	L	KA	L		L	
800	A	A										L	L		L						L							
5240																					L						L	
999	KA	KA	KA	KA									KA	KA			KA	KA	KA	KA						KA	KA	
779	KA	KA	KA	KA	KA	KA							KA	L										KA	KA	KA	KA	
4342												L	L														L	
3463														L	L												L	
6184																											L	
660	A	A	A	A																								
3005	KA	A																										
4391	A	A																										
4487																												
3833																												
1807																												
5508																												
6917																												
3547																												
6904																												
4424																												
4441																												

Übersicht über alle Genotypen

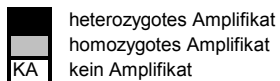




Legende:  heterozygotes Amplifikat  Amplifikation
 homozygotes Amplifikat  LOH
 kein Amplifikat

Tabelle 4- Übersicht über alle analysierten Genotypen

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen, dass die Aberrationen insgesamt deutlich häufiger im DLBCL Tumoranteil vorkommen als im MALT-Typ Tumoranteil, insbesondere die 6q Deletionen, die lediglich bei 3 Patienten auch im MALT-Typ Tumoranteil auftraten. Die häufigsten Aberrationen bei den MALT-Typ Lymphomen waren 3q Amplifikationen.

Eine Gegenüberstellung der Anzahl jeweiliger Aberrationen ergibt keine statistische Signifikanz, eine Tendenz zeigt sich allerdings bei den 6q Verluste (mit einem chi-quadrat score von 0,1286).

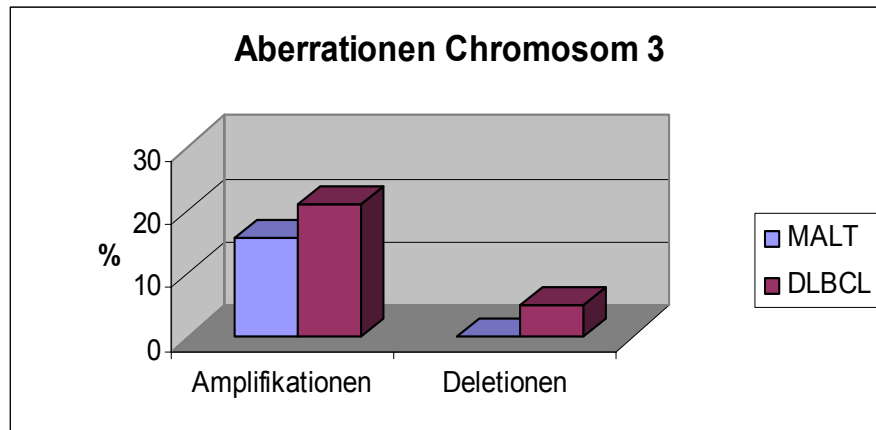


Abbildung 11: Aberrationen Chromosom 3

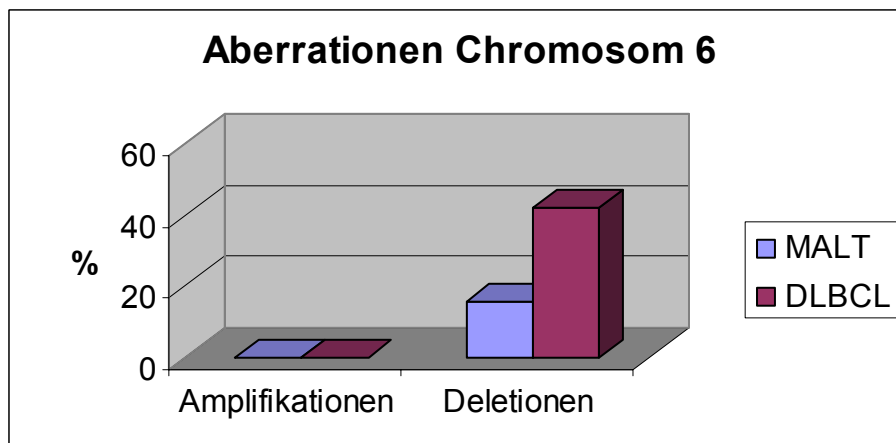


Abbildung 12: Aberrationen Chromosom 6

Die beiden Abbildungen stellen den Anteil der Patienten (%) mit Aberrationen auf Chromosom 3 und 6 dar mit Berücksichtigung der beiden Tumoranteile (MALT und DLBCL)

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen ein Beispiel von Verlust der Heterozygotie (LOH), bzw. von Amplifikation (A).

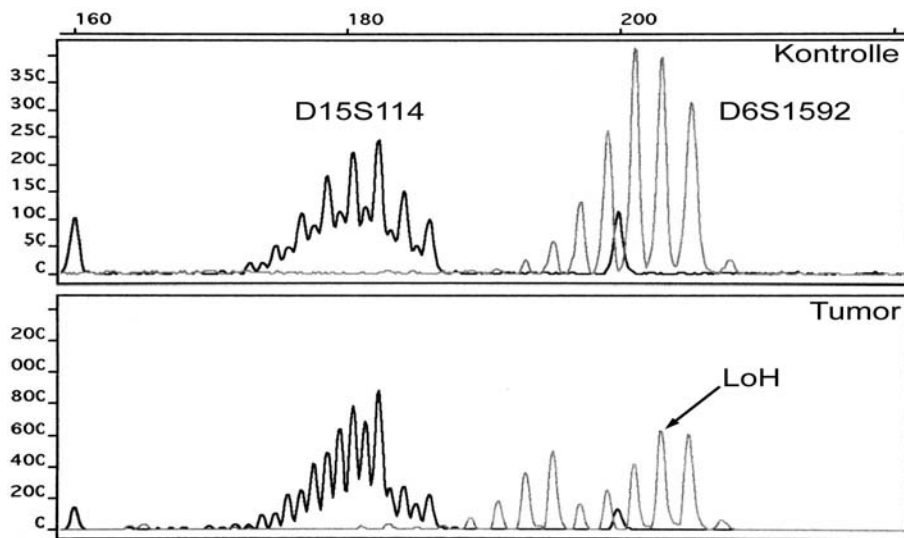


Abbildung 13: Analyse eines Elektropherogramms mit LOH exemplarisch dargestellt für den Marker D6S1592 mit Hilfe des Standardmarkers D15S114:

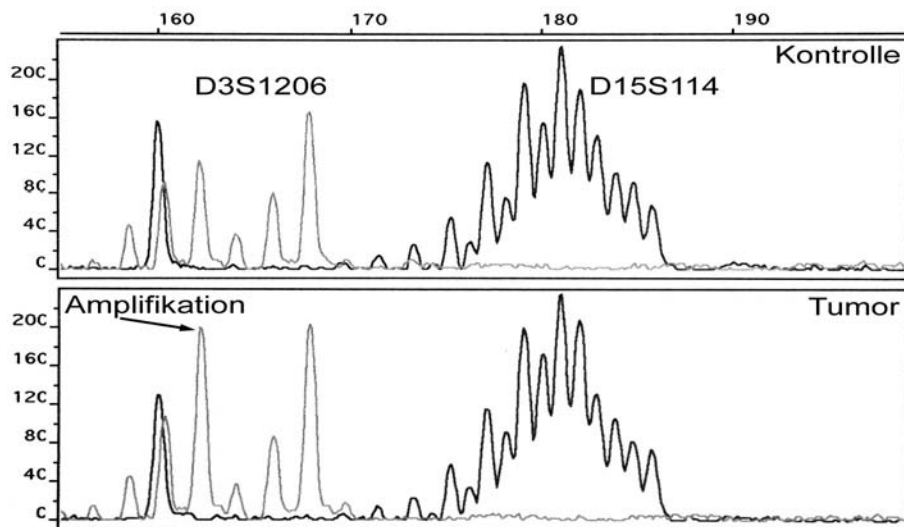


Abbildung 14: Analyse eines Elektropherogramms mit Amplifikation exemplarisch dargestellt für den Marker D3S1206 mit Hilfe des Standardmarkers D15S114:

Die von uns untersuchten Fälle zeigten häufiger Aberrationen im DLBCL-Anteil als im MALT-Typ Lymphom, vor allem in der Gruppe der 6q Deletionen. Was die 3q Amplifikation betrifft, konnten wir sie bei drei Patienten sowohl im niedrig-malignen MALT-Typ als auch im hoch-malignen DLBCL Tumoranteil nachweisen.

Bemerkenswert ist dass mit einer einzigen Ausnahme (Fall 800) die 3q Amplifikationen und die 6q Deletionen sich bei den untersuchten Fällen gegenseitig ausschließen.

3.4.3 Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) spielt in der Pathogenese gastraler DLBCL vom MALT-Typ keine bedeutende Rolle

Für die Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse waren alle Genotypen informativ.

Die MSI ist definiert als das Auftreten zusätzlicher Allele eines Mikrosatellitenmarkers in einem bestimmten Tumorgewebe im Vergleich zum Referenzgewebe, was durch eine Vermehrung oder Verminderung der Anzahl der Mikrosatellitenrepeats zu Stande kommt.

Ein Auftreten solcher Allele konnte in keinem der 19 von uns untersuchten Fälle nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Da in ungefähr einem Drittel der Fälle ein gastrales MALT-Typ Lymphom und ein DLBCL koexistieren stellen die MALT-Typ Lymphome ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Tumorprogression dar. Die Frage ob es zwischen den beiden Tumoranteile ein direkter Bezug existiert, ist immer noch offen.

Ein unentbehrlicher Schritt in der Beantwortung dieser Frage ist die DNA-Sequenzanalyse der variablen CDR3-Region des Immunglobulins für schwere Ketten, das sich im Bereich 14q23 befindet. Diese Regionen entstehen durch ein VDJ-Rearrangement auf genomischer Ebene und stellen den sogenannten „Fingerabdruck“ einer jeden B-Zelle dar. Ergibt sich dabei eine klonale Identität der beiden Tumoranteile, so kann man von einer direkten Progression eines gastralen MALT-Typ Lymphoms in ein DLBCL ausgehen.

Hinsichtlich der Klonalitätsverwandtschaft sind die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen an gastralen MALT-Typ Lymphome uneinheitlich.

So zeigten Matolcsy et al bei einem gastralen MALT-Typ Lymphom mit simultaner DLBCL Komponente unterschiedliche DNA-Sequenzen der CDR3-Region in den jeweiligen Tumoranteile und schlossen einen direkten Bezug zwischen den beiden Tumoren aus¹⁵. Ähnliche Ergebnisse stellten später Cabras et al bei zwei bzw. einem Fall mit Koexistenz beider Tumorkomponenten vor^{14,36} sowie Alpen et al bei einem weiteren Fall.³⁷

Andere Autoren hingegen berichten über klonale Verwandtschaft der beiden simultanen Tumorkomponenten. So zeigten Chan et al bei zehn Fällen eine klonale Verwandtschaft der beiden Tumoren und postulierten, dass sekundäre gastrale DLBCL durch blastäre Transformation gastraler MALT-Typ Lymphome entstehen.¹¹ Allerdings wurde hier lediglich ein indirekter Beweis mittels Konalitäts-PCR gebracht, da eine DNA-Sequenzanalyse bei diesen Fällen nicht durchgeführt wurde. Über eine klonale Identität beider simultaner Tumoren berichten auch Montalban et al bei einem Fall und Peng et al bei 4 Fällen. Deren Ergebnisse gehen auf Sequenzanalysen der CDR3-Region zurück.^{12,13}

Die bisherigen Publikationen hinsichtlich klonaler Verwandtschaft simultaner gastraler MALT-Typ Lymphome und DLBCL lassen den Schluß zu, dass es sowohl eine direkte Progression als auch die Entstehung eines vom MALT-Lymphom unabhängigen DLBCL möglich sind.

Unsere Ergebnisse (vier klonal identische von neun sequenzierten Fällen) sind im Einklang mit den bisher publizierten Daten und stellen im Vergleich zu den bisherigen Studien ein umfangreicheres Untersuchungskollektiv dar.

Um ein Tumorprogressionsmodell zu erstellen ist eine komparative Sequenzanalyse unerlässlich, allerdings ist die Tumorentstehung ein sehr komplexer und multifaktoriell bedingter Prozess.

Die Entstehung maligner Tumoren ist einerseits von genomischer Instabilität begleitet als Ursache für die Inaktivierung unterschiedlicher Tumorsuppressorgene (sogenannter „tumor suppressor pathway“ der Onkogenese), andererseits assoziiert sich die Tumorigenese mit einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Die MSI ist Ergebnis der Malfunktion der DNA-Reparaturgene und führt zu sogenanntem Replikationserrorphenotyp, der charakteristisch für den „mutator pathway“ der Onkogenese²⁶.

Bezüglich der genetischen Aberrationen die in der Tumorentstehung eine Rolle spielen können gibt es eine Reihe von Publikationen. Die vorliegende Arbeit befasst sich lediglich mit Deletionen und Amplifikationen von genomischem Material im Bereich der von Starostik et al beschriebenen Mikrosatellitenloci die als LOH „hot spots“ bezeichnet wurden und zwar 3q27 sowie 6q21-22.1 und 6q23.3-26.^{34,35}

In diesen chromosomalen Regionen wurden auch bei anderen hämatopathologischen Entitäten genetische Aberrationen festgestellt:

So zeigen zum Beispiel Untersuchungen unter Anwendung zytogenetischer Methoden (CGH, FISH) partielle 6q Verluste (insbesondere im Bereich 6q23-q25) und 3q Amplifikationen bei Mantelzell-Lymphome³⁸⁻⁴² oder non-MALT Marginalzonen B-Zell Lymphome⁴³⁻⁴⁶. Andere Entitäten charakterisieren sich überwiegend durch 6q Verluste und zeigen keine 3q Amplifikationen, so zum Beispiel akute und chronische lymphatische Leukämien oder das multiple Myelom⁴⁷⁻⁵⁷. Bei den gastralen MALT-Typ Lymphome und den DLBCL wird sowohl über 3q Amplifikationen als auch über 6q Verluste berichtet. So fanden Barth et al 3q Amplifikationen in 4 von 31 primären gastralen DLBCL und 6q Verluste in 6 Fällen⁵⁸ sowie 3q Amplifikationen bei gastralen MALT-Typ Lymphome und 6q Verluste bei sekundären gastralen DLBCL⁵⁹. Peters et al berichten ebenfalls von 3q Amplifikationen und 6q Verluste bei primären und sekundären gastralen DLBCL⁶⁰. Desweiteren fanden sich 6q Deletionen bei nicht-gastralen DLBCL⁶¹⁻⁶³

Auch der Einsatz von Mikrosatellitenmarkern zur Untersuchung verschiedener chromosomaler Loci auf LOH oder Amplifikationen konnte vermehrt 6q Deletionen feststellen, insbesondere im Bereich 6q21-q23, 6q25-q27 bei Non-Hodgkin-Lymphome, akute lymphoblastische Leukämie, Burkitt-Lymphome, Hodgkin-Lymphome oder bei primären ZNS-Lymphome⁶⁴⁻⁷².

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der von Starostik et al in unserem Institut durchgeführten Mikrosatellitenanalysen an gastralen MALT-Typ Lymphomen und gastralen DLBCL^{34,35} mit unseren Ergebnissen stellt sich eine deutliche Ähnlichkeit bezüglich der Frequenz und Typ der genetischen Aberrationen heraus.

Abbildungen 15 und 16: Vergleich genetischer Aberrationen (in %) der von uns untersuchten MALT-Typ Lymphome (mit 1 bezeichnet) mit denen von Starostik et al^{34,35} (mit 2 bezeichnet).

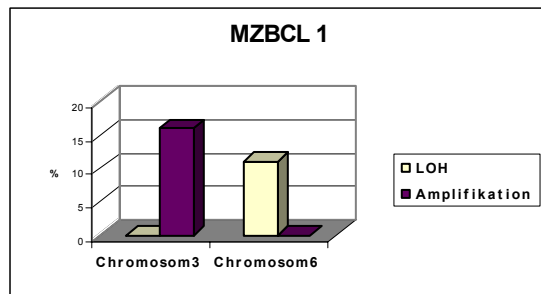


Abbildung 15

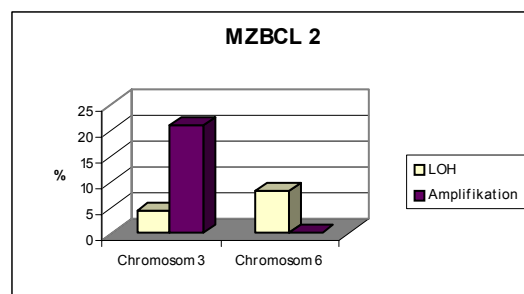


Abbildung 16

Abbildungen 17 und 18: Vergleich genetischer Aberrationen (in %) der von uns untersuchten sekundären DLBCL (mit 1 bezeichnet) mit denen von Starostik et al untersuchten DLBCL (mit 2 bezeichnet)

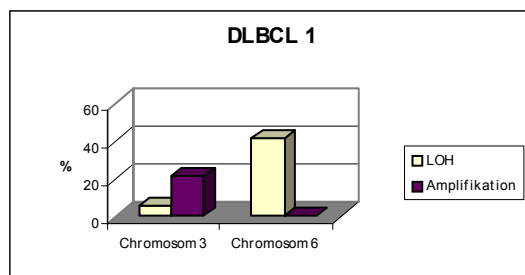


Abbildung 17

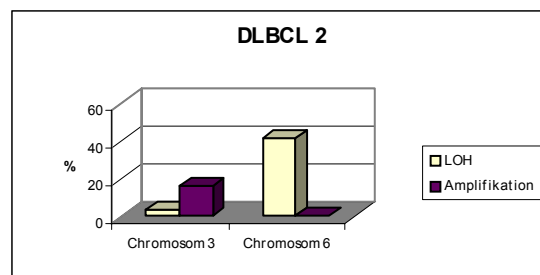


Abbildung 18

Man erkennt eine Korrelation der genetischen Aberrationen in beiden Studien: sowohl in der Studie von Starostik et al als auch bei den von uns untersuchten Fällen überwiegen bei den MALT-Typ Lymphomen die 3q Amplifikationen. Insgesamt weisen die MALT-Typ Lymphome Aberrationen auf als die DLBCL in beiden Studien.

Bei der Gruppe der DLBCL ist die Ähnlichkeit größer: hier sind die Aberrationen auf 3q und 6q in den beiden Studien vergleichbar verteilt (siehe Abbildungen 17 und 18).

Ziel der vorliegenden Arbeit war das von Starostik et al vorgeschlagene Tumorprogressionsmodell an Fällen mit simultanen Tumoren zu überprüfen.

Dieses Modell teilt die gastralen DLBCL in 2 Gruppen: die eine Gruppe die über eine 3q Amplifikation und zusätzlichen Aberrationen aus MALT-Typ Lymphome entsteht und die zweite Gruppe die überwiegend 6q Deletionen aufweist und „de novo“ entsteht. Der gegenseitige Ausschluß der 3q und 6q Aberrationen der von Starostik et al beobachtet wurde, bestätigt sich auch in der von uns untersuchte Gruppe (mit Ausnahme des Falls 800, der zusätzlich eine 6q Deletion im DLBCL Anteil aufweist). Man kann allerdings beobachten, dass die klonal identischen Fälle aus unserer Studie auch identische Aberrationen in den beiden Tumoranteilen aufweisen (siehe Tabelle 5), so dass man den Schluß ziehen kann, dass nicht nur die 3q Amplifikationen sondern auch die 6q Deletionen ebenfalls den Tumorprogressionsprozess begleiten können. Bei dem Fall 660 gab es insgesamt Schwierigkeiten im Prozess der Sequenzierung, es wurde einerseits auch nach Wiederholung der Experimente eine niedrige Anzahl an Transformanten im DLBCL Anteil erreicht und andererseits waren einige sehr unterschiedliche Sequenzen von wohl nichttumoralen B-Zellen beigemischt, die die Auswertung eines dominanten Klons erschwert haben. Hier erhielten wir eine Übereinstimmung der Sequenzen des dominanten Klons in beiden Tumoranteilen von 52% und ein Unterschied von 10 Basenpaaren in der Klonalitätsanalyse mittels PCR. Angenommen der Fall würde als klonal verwandt eingeordnet, würde das mit der Identität der Aberrationen in beiden Tumoranteilen auch hier gut korrelieren.

Fall-Nr.	Genetische Aberrationen 3q		Genetische Aberrationen 6q		Sequenzvergleich MALT/DLBCL
	MALT	DLBCL	MALT	DLBCL	
3463	-	-	LOH	LOH	identisch
4391	A	A	-	-	identisch
4342	-	-	LOH	LOH	identisch
1807	-	-	-	-	identisch
800	A	A	-	LOH	unterschiedlich
3005	KA	A	-	-	unterschiedlich
5240	-	-	-	LOH	unterschiedlich
5002	-	-	-	LOH	unterschiedlich
660	A	A	-	-	unterschiedlich (52%)

Tabelle 5: Gegenüberstellung der genetischen Aberrationen mit Sequenzanalyse

Die Mikrosatelliteninstabilität als zweiter Weg für die Tumorgenese wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht. Die Rolle der MSI in der Lymphomgenese ist umstritten. Die bisherigen Untersuchungen von gastralen MZBCL und DLBCL^{27,28,73-75} haben von unterschiedlichen Levels an MSI berichtet die zwischen 10 und 66% schwankten. Xu et al, Hoeve et al, Furlan et al berichten über eine sehr niedrige Häufigkeit an MSI in gastralen MALT Lymphomen, wohingegen Peng und Chong eine viel wichtigere Rolle der MSI zuschreiben. Manche Autoren berichten über eine „high rate“ von MSI in bestimmten, spezifischen Genloci bei gastralen MALT-Typ Lymphomen und erklären die sehr unterschiedlichen bisher publizierten Ergebnisse als Folge einer willkürlicher Auswahl der untersuchten Loci und der unterschiedlichen Definitionen die dem „RER+“ zugeschrieben wurden⁷⁶.

In den vorangegangenen Studien zeigten Starostik et al eine sehr geringe Häufigkeit an MSI bei gastralen MALT-Typ Lymphome (nur 0,6% aller Genotypen, bei 24 Fällen die mit 39 Mikrosatellitenmarkern untersucht wurden) bzw. DLBCL (3% der 2263 Genotypen) und eine geringe Steigerung mit zunehmendem Alter^{29,34,35}.

Bei den von uns untersuchten Fällen ergab sich kein Nachweis einer MSI in den ausgewählten Loci. Dieser Befund ist im Einklang mit den oben erwähnten Studien die der MSI eine weniger bedeutende Rolle in der Lymphomgenese und Progression zuschreiben.

Vielmehr ist die chromosomale Instabilität diejenige die eine Rolle in der Tumorentstehung und Tumorprogression dieser gastralen Lymphome eine wichtige Rolle spielt und vor allem die häufig auftretenden 3q Amplifikationen und die 6q Deletionen.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten chromosomalen Loci beinhalten manche interessante Gene deren bei anderen hämathopathologischen Tumorentitäten oder bei verschiedenen anderen Tumoren (Karzinome, Hirntumoren) eine Bedeutung als Onkogene oder Tumorsuppressorgene zugeschrieben wurde (siehe Tabelle 6).

Marker	Locus	Gen	Prod.-Größe
D3S 1206	3q21.3-25	unknown	171 bp
D3S 1212	3q26.2-27	BCL6	193 bp
D3S 1229	3q26.2-27	PIK3CA,PHC3,SKIL,PRKCI,TNIK	110-122 bp
D3S 1580	3q27- ter	LPP	139-155 bp

Marker	Locus	Gen	Prod.-Größe
D3S 1262	3q27- ter	CRYGS,DGKG,DNAJB11	120 bp
D6S 447	6q21-22.1	PREP,POPD3	195-212 bp
D6S 1592	6q21-22.1	PRDM1(BLIMP1),APG5L,Q9NRZ3	194-210 bp
D6S 1698	6q21-22.1	C6orf51,BXDC1,SLC16A10,AMD1	155-181 bp
D6S 246	6q21-22.1	NR2E1,OSTM1,SNX3,SEC63,LACE1	220-230 bp
D6S 261	6q21-22.1	MARCKS,HDAC2	101-129 bp
D6S 292	6q22.3-23	BCLAF1	141-161 bp
D6S 310	6q23.3-25	NMBR,Q8N886	159-183 bp
D6S 441	6q25.2	MTRF1L,RGS17	162-186 bp
D15S 114	15q24.3	Standard-Marker	177-187 bp
D15S 231	15q13.3	Standard-Marker	102-114 bp
FGA	4q28	Standard-Marker	256-284 bp

Tabelle 6: Übersicht der untersuchten Genloci

An möglicherweise betroffenen Genen liegt zum einen in dem chromosomalen Bereich 3q27 das BCL-6-Gen. Dieses Onkogen spielt als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der Keimzentribildung und da eine große Anzahl nodaler DLBCL aus B-Zellen des Keimzentrums entsteht, könnte eine gestörte BCL-6-Expression durch eine Verhinderung der weiteren Differenzierung zur Lymphomentstehung beitragen^{77,78}.

Zum anderen liegt in dieser Region das PIK3CA-Gen. Dieses Gen kodiert für die p110-alpha-katalytische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-kinase) und spielt als Onkogen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Entstehung verschiedener Tumoren: So wurde von verschiedenen Autoren z. B. bei ovarialen und zervikalen Neoplasien, sowie bei dem nasopharyngealen und hepatozellulären Karzinom, bei verschiedenen Formen des Mammakarzinoms oder bei Hirntumoren von einer Rolle dieses Onkogens berichtet.⁷⁹⁻⁸³

Im Bereich 6q21-q22.1 flankiert von den Markern D6S447 und D6S261 befinden sich mehrere Gene die eine Rolle als putative TSG spielen können, wie zum Beispiel das Gen BLIMP1, das eine wichtige Rolle im Reifungsprozess der B-Lymphozyten spielt und oft Deletionen in Non-Hodgkin B-Zell Lymphome zeigt^{64,84,85}. Hier fanden wir Deletionen bei insgesamt sieben von den 19 untersuchten Patienten (36,8%).

Ein weiteres Gen das sich in den untersuchten Loci auf 6q befindet ist das APG5L-Gen, dessen Proteinprodukt eine wichtige Rolle im Prozess der Apoptose spielt⁸⁶.

Ebenfalls in diesem Bereich liegt das Gen NR2E1 (alias HTLX), dessen Funktion in der Lymphomgenese noch nicht geklärt ist, allerdings werden Verluste in dieser

chromosomalen Region bei Patienten mit lymphatischer Leukämie beschrieben⁶⁴. Etwas weiter, im Bereich 6q22.3-q23 befindet sich BCLAF1, ein BCL2-assoziiierter Transkriptionsfaktor der ebenfalls im Prozess der Apoptose eine Rolle spielt und bei anderen Tumoren als Tumorsuppressoren beschrieben wurde⁸⁷.

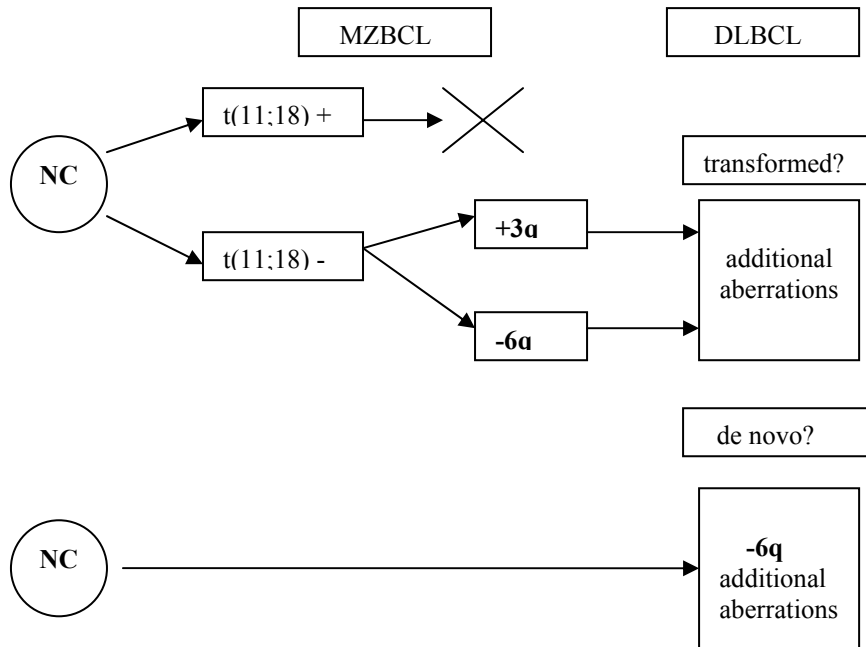
5. Zusammenfassung

Die t(11; 18)-negativen gastralen MZBCL vom MALT-Typ können zu hoch-malignen gastralen DLBCL transformieren. Die noch offene Frage, ob und in welchem Ausmaß die DLBCL als blastäre Transformation gastraler MZBCL vom MALT-Typ zu verstehen sind, haben wir versucht durch diese Arbeit zu beantworten. So konnten wir zeigen, dass eine direkte Progression möglich ist: vier von neun sequenzierten Fälle haben eine klonale Identität der beiden Tumoren aufgewiesen. Wir konnten aber auch feststellen, dass manche von den sekundären gastralen DLBCL keine klonale Verwandtschaft zu dem simultanen MZBCL vom MALT-Typ zeigen und somit als „de novo“ entstandenen Tumoren zu betrachten sind.

Das Ausmaß und die Bedeutung molekulargenetischen Veränderungen in der Pathogenese und Tumorprogression der gastralen MZBCL vom MALT-Typ ist derzeit noch nicht geklärt. Wir konnten zeigen, dass 3q Amplifikationen (21,05% der Fälle) und 6q Deletionen (36,84%) häufig vorkommen und somit eine Rolle in der Tumorprogression spielen können. Diese Aberrationen schließen sich in den von uns untersuchten Fällen gegenseitig aus. Die klonal identischen Tumoren weisen die gleichen Aberrationen auf, im Gegensatz zu den klonal nicht verwandten Tumoren, die unterschiedliche Aberrationen im MZBCL bzw. DLBCL zeigen.

Die am Anfang dieser Arbeit vorgeschlagene Hypothese der Tumorprogression konnte teilweise bestätigt aber auch ergänzt werden. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine direkte Progression nicht nur über 3q Amplifikationen sondern auch über 6q Deletionen entstehen kann und dass klonal unterschiedliche simultane Tumoren sich mit unterschiedlichen genetischen Aberrationen in den beiden Tumoranteilen assoziieren.

Anhand unserer Daten ergibt sich folgende, ergänzende Hypothese der Tumorprogression der gastralen MZBCL vom MALT-Typ:



Der „mutator pathway“ mit dem Kennzeichen der Mikrosatelliteninstabilität spielt nach unseren Erkenntnissen keine bedeutende Rolle in der Entstehung und Progression der gastralen MZBCL vom MALT-Typ, vielmehr ist die chromosomale Instabilität in Form von Amplifikationen und Deletionen von Bedeutung. Die Tumorprogression ist ein komplexer Prozess der auch mit zusätzlichen, hier nicht untersuchten genetischen Aberrationen verbunden ist.

6. Anhang

6.1 Verwendete Abkürzungen

ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata = einfach destilliertes Wasser
Bp	basepairs = Basenpaare
CA	California
CDR3	Complementary Determining Region 3
CGH	Comparative Genomic Hybridisation
DLBCL	Diffuse Large B-Cell Lymphoma = Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	Fluorescence in situ Hybridisation
H&E	Hämatoxylin-Eosin
H.p.	Helicobacter pylori
Ig	Immunglobulin
LOH	Loss of Heterozygosity = Verlust der Heterozygotie
m	männlich
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue = Mukosa-assoziiertes Lymphatisches Gewebe
min	Minute
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MZBCL	Marginalzonen B-Zell Lymphom
NaCl	Natriumchlorid
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion
RER+	Replication-Error positiv
RNA	Ribonukleinsäure

SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBE	Tris, Borat und EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TSG	Tumorsuppressoren
W	weiblich
WHO	World Health Organisation = Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2 PCR-Ansätze und PCR-Programme

6.2.1 PCR-Ansatz (pro Reaktion) und Programm für Klonalitätsanalyse

PCR-Ansatz:

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

3,6 µl MgCl₂ (25mM)

2,5 µl dNTPs (1,25mM)

0,12 µl AmpliTaqGold Polymerase (5U/µl)

0,15 µl FR3A Primer

0,15 µl LJH Primer

bis zu 18 µl Gesamtvolumen autoklaviertes bidestilliertes Wasser

plus

2µl DNA (pro Gewebeanteil in drei Verdünnungen 1/3, 1/6, 1/12)

Gesamtvolumen pro Reaktion 20µl.

PCR-Programm:

Hotstart 13 min bei 95°C

10 Zyklen 30 sec bei 95°C (Denaturierung)

1 min bei 95°C (Annealing)

1 min bei 72°C (Extension)

25 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

6.2.2 PCR-Ansatz (pro Reaktion) und Programme für Mikrosatellitenanalyse

Mastermix, bestehend aus:

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

3,6 µl MgCl₂ (25mM)

2,5 µl dNTPs (1,25mM)

0,12 µl AmpliTaqGold Polymerase (5U/µl)

je x µl Primer (3' und 5' Primer, individuelle Menge)

plus 2µ DNA-Lösung

bis zu 20 µl Gesamtvolumen autoklaviertes bidestilliertes Wasser.

PCR-Programm:

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

6.3 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Verdaupuffer für DNA- Extraktion:

100 mM NaCl
10 mM TrisCl (pH 8)
25 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (pH 8)
0.5% Sodiumdodecylsulfat (SDS)
0,45 mg Proteinase K (20µl von 20 mg/ml-Verdünnung)

Formamidhaltige (28,8%) Gellösung (für Mikrosatellitenanalyse) für einen Gellauf:

13,4 g Harnstoff- Pulver
4,5 ml Aqua destillata
8 ml 5 x TBE
12,8 ml Formamid
1 g Amberlite Ionenaustauscher
5 ml Acrylamidlösung 40%

Gellösung ohne Formamid (für Klonalitätsanalyse) für einen Gellauf:

18g Harnstoff- Pulver
20 ml Aqua destillata
10 ml 5 x TBE (540 mg Tris, 265 mg Borat, 41,4 EDTA plus zu 10 ml autoklaviertes Aqua dest.)
5,625 ml Acrylamidlösung 40%

7. Literaturverzeichnis

1. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology*. 2000;36:69-86
2. Isaacson PG. Update on MALT lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18:57-68
3. Cavalli F, Isaacson PG, Gascoyne RD, Zucca E. MALT Lymphomas. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2001:241-258
4. Musshoff. Klinische Stadieneinteilung der nicht-Hodgkin-Lymphome. *Strahlentherapie*. 1977;153:218-221
5. Ahmad A, Govil Y, Frank BB. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:975-986
6. Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer*. 1983;52:1410-1416
7. Wotherspoon AC, Doglioni C, Isaacson PG. Low-grade gastric B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT): a multifocal disease. *Histopathology*. 1992;20:29-34
8. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 1993;342:575-577
9. de Jong D, Boot H, van Heerde P, Hart GA, Taal BG. Histological grading in gastric lymphoma: pretreatment criteria and clinical relevance. *Gastroenterology*. 1997;112:1466-1474
10. Aiello A, Giardini R, Tondini C, Balzarotti M, Diss T, Peng H, Delia D, Pilotti S. PCR-based clonality analysis: a reliable method for the diagnosis and follow-up monitoring of conservatively treated gastric B-cell MALT lymphomas? *Histopathology*. 1999;34:326-330

11. Chan JK, Ng CS, Isaacson PG. Relationship between high-grade lymphoma and low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) of the stomach. *Am J Pathol.* 1990;136:1153-1164
12. Montalban C, Manzanal A, Castrillo JM, Escribano L, Bellas C. Low grade gastric B-cell MALT lymphoma progressing into high grade lymphoma. Clonal identity of the two stages of the tumour, unusual bone involvement and leukemic dissemination. *Histopathology.* 1995;27:89-91
13. Peng H, Du M, Diss TC, Isaacson PG, Pan L. Genetic evidence for a clonal link between low and high-grade components in gastric MALT B-cell lymphoma. *Histopathology.* 1997;30:425-429
14. Cabras AD, Weirich G, Fend F, Nahrig J, Bordi C, Hofler H, Werner M. Oligoclonality of a "composite" gastric diffuse large B-cell lymphoma with areas of marginal zone B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue type. *Virchows Arch.* 2002;440:209-214
15. Matolesy A, Nagy M, Kisfaludy N, Kelenyi G. Distinct clonal origin of low-grade MALT-type and high-grade lesions of a multifocal gastric lymphoma. *Histopathology.* 1999;34:6-8
16. Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, Cotter FE, Greiner TC, Sanger WG, Horsman DE. t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol.* 1997;8:979-985
17. Baens M, Maes B, Steyls A, Geboes K, Marynen P, De Wolf-Peeters C. The product of the t(11;18), an API2-MLT fusion, marks nearly half of gastric MALT type lymphomas without large cell proliferation. *Am J Pathol.* 2000;156:1433-1439
18. Kalla J, Stilgenbauer S, Schaffner C, Wolf S, Ott G, Greiner A, Rosenwald A, Dohner H, Muller-Hermelink HK, Lichter P. Heterogeneity of the API2-MALT1 gene rearrangement in MALT-type lymphoma. *Leukemia.* 2000;14:1967-1974
19. Liu H, Ruskon-Fourmestiaux A, Lavergne-Slove A, Ye H, Molina T, Bouhnik Y, Hamoudi RA, Diss TC, Dogan A, Megraud F, Rambaud JC, Du MQ, Isaacson PG. Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Lancet.* 2001;357:39-40

20. Maes B, Baens M, Marynen P, De Wolf-Peeters C. The product of the t(11;18), an API2-MLT fusion, is an almost exclusive finding in marginal zone cell lymphoma of extranodal MALT-type. *Ann Oncol.* 2000;11:521-526
21. Ott G, Katzenberger T, Greiner A, Kalla J, Rosenwald A, Heinrich U, Ott MM, Muller-Hermelink HK. The t(11;18)(q21;q21) chromosome translocation is a frequent and specific aberration in low-grade but not high-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-) type. *Cancer Res.* 1997;57:3944-3948
22. Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S, Kalla J, Brecht M, Katzenberger T, Greiner A, Ott MM, Gawin B, Dohner H, Muller-Hermelink HK. Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas. *Am J Pathol.* 1999;155:1817-1821
23. Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M, Pittaluga S, Wlodarska I, Michaux L, Dehaen M, Verhoef G, Thomas J, de Kelder W, Bakker-Schut T, Cassiman JJ, Raap AK, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe H, Hagemeijer A. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia.* 1997;11:747-758
24. Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer MJ. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell.* 1999;96:35-45
25. Wotherspoon AC, Pan LX, Diss TC, Isaacson PG. Cytogenetic study of B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer Genet Cytogenet.* 1992;58:35-38
26. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 1997;386:761, 763
27. Xu WS, Chan AC, Liang R, Srivastava G. No evidence of replication error phenotype in primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Int J Cancer.* 1998;76:635-638

28. Peng H, Chen G, Du M, Singh N, Isaacson PG, Pan L. Replication error phenotype and p53 gene mutation in lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol.* 1996;148:643-648
29. Starostik P, Greiner A, Schwarz S, Patzner J, Schultz A, Muller-Hermelink HK. The role of microsatellite instability in gastric low- and high-grade lymphoma development. *Am J Pathol.* 2000;157:1129-1136
30. Calvert R, Randerson J, Evans P, Cawkwell L, Lewis F, Dixon MF, Jack A, Owen R, Shiach C, Morgan GJ. Genetic abnormalities during transition from *Helicobacter-pylori*-associated gastritis to low-grade MALToma. *Lancet.* 1995;345:26-27
31. Du M, Peng H, Singh N, Isaacson PG, Pan L. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood.* 1995;86:4587-4593
32. Gaidano G, Capello D, Gloghini A, Fassone L, Vivenza D, Ariatti C, Migliazza A, Saglio G, Carbone A. Frequent mutation of bcl-6 proto-oncogene in high grade, but not low grade, MALT lymphomas of the gastrointestinal tract. *Haematologica.* 1999;84:582-588
33. Lossos IS, Akasaka T, Martinez-Climent JA, Siebert R, Levy R. The BCL6 gene in B-cell lymphomas with 3q27 translocations is expressed mainly from the rearranged allele irrespective of the partner gene. *Leukemia.* 2003;17:1390-1397
34. Starostik P, Greiner A, Schultz A, Zettl A, Peters K, Rosenwald A, Kolve M, Muller-Hermelink HK. Genetic aberrations common in gastric high-grade large B-cell lymphoma. *Blood.* 2000;95:1180-1187
35. Starostik P, Patzner J, Greiner A, Schwarz S, Kalla J, Ott G, Muller-Hermelink HK. Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. *Blood.* 2002;99:3-9
36. Cabras AD, Candidus S, Fend F, Kremer M, Schulz S, Bordi C, Weirich G, Hofler H, Werner M. Biclinality of gastric lymphomas. *Lab Invest.* 2001;81:961-967
37. Alpen B, Wundisch T, Dierlamm J, Borsch G, Stolte M, Neubauer A. Clonal relationship in multifocal non-Hodgkin's lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). *Ann Hematol.* 2004;83:124-126

38. Allen JE, Hough RE, Goepel JR, Bottomley S, Wilson GA, Alcock HE, Baird M, Lorigan PC, Vandenberghe EA, Hancock BW, Hammond DW. Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol.* 2002;116:291-298
39. Au WY, Gascoyne RD, Viswanatha DS, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE. Cytogenetic analysis in mantle cell lymphoma: a review of 214 cases. *Leuk Lymphoma.* 2002;43:783-791
40. Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, Garcia JL, Flores T, Gonzalez M, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Cardesa A, Montserrat E, Miro R, Campo E. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood.* 1999;93:4365-4374
41. Flordal E, Berglund M, Rosenquist R, Erlanson M, Enblad G, Roos G, Larsson C, Lagercrantz S. Clonal development of a blastoid mantle cell lymphoma studied with comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;139:38-43
42. Wlodarska I, Pittaluga S, Hagemeijer A, De Wolf-Peeters C, Van Den Berghe H. Secondary chromosome changes in mantle cell lymphoma. *Haematologica.* 1999;84:594-599
43. Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Atkinson S, Matutes E, Catovsky D, Pedersen RK, Pedersen BB, Pulczynski S, Hokland P, Jacobsen E, Koch J. Recurrent genomic imbalances in B-cell splenic marginal-zone lymphoma revealed by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;156:122-128
44. Callet-Bauchu E, Baseggio L, Felman P, Traverse-Glehen A, Berger F, Morel D, Gazzo S, Poncet C, Thieblemont C, Coiffier B, Magaud JP, Salles G. Cytogenetic analysis delineates a spectrum of chromosomal changes that can distinguish non-MALT marginal zone B-cell lymphomas among mature B-cell entities: a description of 103 cases. *Leukemia.* 2005;19:1818-1823
45. Cuneo A, Bigoni R, Roberti MG, Milani R, Agostini P, Cavazzini F, Minotto C, De Angeli C, Bardi A, Tammiso E, Negrini M, Cavazzini P, Castoldi G. Molecular cytogenetic characterization of marginal zone B-cell lymphoma: correlation with clinicopathologic findings in 14 cases. *Haematologica.* 2001;86:64-70

46. Hernandez JM, Garcia JL, Gutierrez NC, Mollejo M, Martinez-Climent JA, Flores T, Gonzalez MB, Piris MA, San Miguel JF. Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol.* 2001;158:1843-1850
47. Amiel A, Mulchanov I, Elis A, Gaber E, Manor Y, Fejgin M, Lishner M. Deletion of 6q27 in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999;112:53-56
48. Andreasson P, Hoglund M, Bekassy AN, Garwicz S, Heldrup J, Mitelman F, Johansson B. Cytogenetic and FISH studies of a single center consecutive series of 152 childhood acute lymphoblastic leukemias. *Eur J Haematol.* 2000;65:40-51
49. Bentz M, Huck K, du Manoir S, Joos S, Werner CA, Fischer K, Dohner H, Lichter P. Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood.* 1995;85:3610-3618
50. Bigoni R, Cuneo A, Roberti MG, Bardi A, Rigolin GM, Piva N, Scapoli G, Spanedda R, Negrini M, Bullrich F, Veronese ML, Croce CM, Castoldi G. Chromosome aberrations in atypical chronic lymphocytic leukemia: a cytogenetic and interphase cytogenetic study. *Leukemia.* 1997;11:1933-1940
51. Cigudosa JC, Rao PH, Calasanz MJ, Otero MD, Michaeli J, Jhanwar SC, Chaganti RS. Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood.* 1998;91:3007-3010
52. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2000;343:1910-1916
53. Liebisch P, Viardot A, Bassermann N, Wendl C, Roth K, Goldschmidt H, Einsele H, Straka C, Stilgenbauer S, Dohner H, Bentz M. Value of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization for molecular diagnostics in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2003;122:193-201
54. Mancini M, Vegna ML, Castoldi GL, Mecucci C, Spirito F, Elia L, Tafuri A, Annino L, Pane F, Rege-Cambrin G, Gottardi M, Leoni P, Gallo E, Camera A, Luciano L, Specchia G, Torelli G, Sborgia M, Gabbas A, Tedeschi A, Della Starza I, Cascavilla N, Di Raimondo F, Mandelli F, Foa R. Partial deletions of long arm of

- chromosome 6: biologic and clinical implications in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2002;16:2055-2061
55. Menasce LP, Orphanos V, Santibanez-Koref M, Boyle JM, Harrison CJ. Deletion of a common region on the long arm of chromosome 6 in acute lymphoblastic leukaemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;10:26-29
 56. Sinclair PB, Sorour A, Martineau M, Harrison CJ, Mitchell WA, O'Neill E, Foroni L. A fluorescence in situ hybridization map of 6q deletions in acute lymphocytic leukemia: identification and analysis of a candidate tumor suppressor gene. *Cancer Res*. 2004;64:4089-4098
 57. Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Dohner K, Ho AD, Lichter P, Dohner H. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 1999;13:1331-1334
 58. Barth TF, Dohner H, Werner CA, Stilgenbauer S, Schlotter M, Pawlita M, Lichter P, Moller P, Bentz M. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. *Blood*. 1998;91:4321-4330
 59. Barth TF, Bentz M, Leithauser F, Stilgenbauer S, Siebert R, Schlotter M, Schlenk RF, Dohner H, Moller P. Molecular-cytogenetic comparison of mucosa-associated marginal zone B-cell lymphoma and large B-cell lymphoma arising in the gastrointestinal tract. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;31:316-325
 60. Peters K, Zettl A, Starostik P, Greiner A, Rosenwald A, Katzenberger T, Ott G, Muller-Hermelink HK. Genetic imbalances in primary gastric diffuse large B-cell lymphomas: comparison of comparative genomic hybridization, microsatellite, and cytogenetic analysis. *Diagn Mol Pathol*. 2000;9:58-65
 61. Vitolo U, Gaidano G, Botto B, Volpe G, Audisio E, Bertini M, Calvi R, Freilone R, Novero D, Orsucci L, Pastore C, Capello D, Parvis G, Sacco C, Zagonel V, Carbone A, Mazza U, Palestro G, Saglio G, Resegotti L. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol*. 1998;9:55-61
 62. Dave BJ, Nelson M, Pickering DL, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Sanger WG. Cytogenetic characterization of diffuse large cell

- lymphoma using multi-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;132:125-132
63. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Puig X, Yang L, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Grogan TM, Braziel R, Fisher RI, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Simon R, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Campo E, Rosenwald A. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood.* 2005;106:3183-3190
 64. Jackson A, Carrara P, Duke V, Sinclair P, Papaioannou M, Harrison CJ, Foroni L. Deletion of 6q16-q21 in human lymphoid malignancies: a mapping and deletion analysis. *Cancer Res.* 2000;60:2775-2779
 65. Merup M, Moreno TC, Heyman M, Ronnberg K, Grandt D, Detlofsson R, Rasool O, Liu Y, Soderhall S, Juliusson G, Gahrton G, Einhorn S. 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood.* 1998;91:3397-3400
 66. Nakamura M, Kishi M, Sakaki T, Hashimoto H, Nakase H, Shimada K, Ishida E, Konishi N. Novel tumor suppressor loci on 6q22-23 in primary central nervous system lymphomas. *Cancer Res.* 2003;63:737-741
 67. Ohshima K, Haraoka S, Ishihara S, Ohgami A, Yoshioka S, Suzumiya J, Kikuchi M. Analysis of chromosome 6q deletion in EBV-associated NK cell leukaemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2002;43:293-300
 68. Parsa NZ, Gaidano G, Mukherjee AB, Hauptschein RS, Lenoir G, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Cytogenetic and molecular analysis of 6q deletions in Burkitt's lymphoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* 1994;9:13-18
 69. Re D, Starostik P, Massoudi N, Staratschek-Jox A, Dries V, Thomas RK, Diehl V, Wolf J. Allelic losses on chromosome 6q25 in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res.* 2003;63:2606-2609
 70. Sherratt T, Morelli C, Boyle JM, Harrison CJ. Analysis of chromosome 6 deletions in lymphoid malignancies provides evidence for a region of minimal deletion within a 2-megabase segment of 6q21. *Chromosome Res.* 1997;5:118-124

71. Takeuchi S, Bartram CR, Wada M, Reiter A, Hatta Y, Seriu T, Lee E, Miller CW, Miyoshi I, Koeffler HP. Allelotype analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 1995;55:5377-5382
72. Takeuchi S, Koike M, Seriu T, Bartram CR, Schrappe M, Reiter A, Park S, Taub HE, Kubonishi I, Miyoshi I, Koeffler HP. Frequent loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6: identification of two distinct regions of deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 1998;58:2618-2623
73. Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Koike M, Matsuya S, Konishi M, Miyaki M. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in gastric lymphoma. *Lab Invest.* 1997;77:639-645
74. Furlan D, Bertoni F, Cerutti R, Taborelli M, Pinotti G, Roggero E, Cavalli F, Bonato M, Zucca E, Capella C. Microsatellite instability in gastric MALT lymphomas and other associated neoplasms. *Ann Oncol.* 1999;10:783-788
75. Hoeve MA, Ferreira Mota SC, Schuurin E, de Leeuw WJ, Chott A, Meijerink JP, Kluin PM, van Krieken JH. Frequent allelic imbalance but infrequent microsatellite instability in gastric lymphoma. *Leukemia.* 1999;13:1804-1811
76. Niv E, Bomstein Y, Bernheim J, Lishner M. Microsatellite instability in gastric MALT lymphoma. *Mod Pathol.* 2004;17:1407-1413
77. Niu H. The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development. *Hematol Oncol.* 2002;20:155-166
78. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science.* 1993;262:747-750
79. Bertelsen BI, Steine SJ, Sandvei R, Molven A, Laerum OD. Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: Frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *Int J Cancer.* 2005
80. Knobbe CB, Trampe-Kieslich A, Reifenberger G. Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005;31:486-490
81. Liang R, Chan WP, Kwong YL, Chan AC, Xu WS, Srivastava G. Mutation of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene in low-grade gastric lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998;102:110-113

82. Or YY, Hui AB, To KF, Lam CN, Lo KW. PIK3CA mutations in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 2005
83. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*. 1999;21:99-102
84. Mock BA, Liu L, LePaslier D, Huang S. The B-lymphocyte maturation promoting transcription factor BLIMP1/PRDI-BF1 maps to D6S447 on human chromosome 6q21-q22.1 and the syntenic region of mouse chromosome 10. *Genomics*. 1996;37:24-28
85. Schebesta M, Heavey B, Busslinger M. Transcriptional control of B-cell development. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:216-223
86. Schmeiser K, Armstrong S, Hammond EM, Grand RJ. Assignment of the yeast APG5 human homologue APG5L to chromosome band 6q21 by fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet*. 1999;87:213-214
87. Kasof GM, Goyal L, White E. Btf, a novel death-promoting transcriptional repressor that interacts with Bcl-2-related proteins. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4390-4404

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, allen, die mir bei der Vollendung dieser Arbeit ihre Unterstützung gaben, Danke zu sagen.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H. K. Müller-Hermelink für die mir gegebene Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen. Dank gilt auch meinen beiden Betreuern Dr. P. Starostik und Prof. Dr. A. Greiner, die mich eingearbeitet haben bzw. mit wertvollen Anregungen mich immer wieder motiviert haben. Auch danken möchte ich Frau Edda Eckenreiter, die mich mit Geduld in die molekularbiologischen Techniken eingeführt hat sowie vielen weiteren Mitarbeitern des Pathologischen Instituts Würzburg für ihre Unterstützung und Motivation während der Zeit im Labor. Dank auch an Herrn E. Schmitt und Herrn B. Puppe für die stetige Hilfe in Sachen Dokumentation, statistische Auswertung und Behebung von Computerproblemen.

Der größte Dank jedoch geht an meinen Ehemann Stefan ohne dessen bedingungslose Unterstützung diese Arbeit wohl nicht entstanden wäre.

Lebenslauf – Camelia Maria Monoranu

Persönliche Angaben

Adresse: Weingartenstr.16, 97072 Würzburg
Geburtsdatum: 9. Juli 1966
Geburtsort: Dumbraveni, Kreis Sibiu, Rumänien
Staatsangehörigkeit: rumänisch

Schulausbildung

09/72- 07/76 Grundschule- Dumbraveni, Kreis Sibiu, Rumänien
09/76- 07/84 Gymnasium und Lyzeum in Tagu-Mures, Rumänien, Abitur 1984
(Leistungskursfächer Mathematik und Physik)

Hochschulausbildung und beruflicher Werdegang

09/84- 07/87 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Targu-Mures (Rumänien)
09/87- 07/91 Klinisches Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität Targu-Mures (Rumänien) mit Abschluss durch Promotionsprüfung
Titel der Doktorarbeit: „Traumatische und nichttraumatische intrazerebrale Blutungen- morphologisch-statistische retrospektive Studie auf 10 Jahre“ am Institut für Rechtsmedizin der Universität Targu-Mures, Rumänien (unter Betreuung von Prof. Dr. L. Hecser)
09/91- 11/92 AiP in den Abteilungen für Gynäkologie und Innere Medizin des Universitätsklinikums Targu-Mures (Rumänien)
12/92-01/96 Assistenzärztin in der Abteilung für Pathologische Anatomie und Anatomische Pathologie des Universitätsklinikums Targu-Mures mit bestandener Facharztprüfung für Pathologie 10/95
02/96- 06/01 Tätigkeit als Facharzt für Pathologie im Städtischen Krankenhaus Tarnaveni (Rumänien) mit inzwischen bestandener Prüfung (06/00) zur Erlangung des Oberarzttitels
07/01-04/03 Doktorandin an der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Von 07/02 bis 04/03 Stipendiatin des Graduiertenkollegs GK 639 mit Immatrikulation als Studentin der Medizinischen Fakultät Würzburg (2 Studiensemester)
seit 04/03 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Pathologie Würzburg